

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACION DE LA VARIACIÓN DE FLAVONOIDES POR CAMBIOS DE
ALTITUD Y ESTACIÓN DE DOS *BACCHARIS* DEL VALLE DE LA PAZ**

TESIS
**PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER SCIENTIARUM, EN
CIENCIAS QUÍMICAS**

TESISTA: Lic. ALBERTO CALLE

TUTORES: GIOVANNA ROCIO ALMANZA VEGA Ph.D.

YONNY RENE FLORES SEGURA Ph.D.

La Paz- Bolivia

2017

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES
CARRERA DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACION DE LA VARIACIÓN DE FLAVONOIDES POR CAMBIOS DE
ALTITUD Y ESTACIÓN DE DOS *BACCHARIS* DEL VALLE DE LA PAZ**

TESIS
PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER SCIENTIARUM, EN
CIENCIAS QUÍMICAS

TESISTA: Lic. ALBERTO CALLE
TUTORES: GIOVANNA ROCIO ALMANZA VEGA Ph.D.
YONNY RENE FLORES SEGURA Ph.D.

TRIBUNALES: M.Sc. LUIS MORALES ESCOBAR
RÓMULO GEMIO Ph.D.

La Paz- Bolivia

2017

“Las ciencias tienen las raíces amargas, pero muy dulces los frutos”

Aristóteles.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas personas que me han acompañado en esta aventura que inicié hace unos años. Gracias a ellas, en parte, soy lo que soy. Ahora ha llegado el momento de cerrar un capítulo más, de pasar página, y no puedo hacerlo sin antes agradecerles todo lo que me han dado...

A mis tutores, Dra. Giovanna Almanza y Dr. Yonny Flores, por haberme permitido incorporarme en su grupo de investigación con total libertad y autonomía y por confiar en mí y apoyarme siempre, sobre todo por su tiempo dedicado en la realización de este trabajo de tesis.

Especial agradecimiento a la Lic. Maribel Lozano y a la Lic. Angela San Martín, compañeras de viaje y laboratorio incondicional, por estar ahí siempre que lo necesité, apoyarme en todo momento y darme ánimos para continuar.

A todos los compañeros del laboratorio de Bio-orgánica Lic. Yaquelin Suño, Univ. María Dina Mamani, Univ. Silvia Ramos, Univ. Gabriela Romero, Univ. Gabriela Rodríguez, Univ. Romel Aruquipa y Univ. Santos Quispe... por prestarse gentilmente a resolver cuantos problemas o dudas me surgieron en este tiempo.

También quiero agradecer a la Lic. Esther Valenzuela y a su grupo de investigación por ayudarme en la identificación de las especies *Baccharis* en cada recolección. También agradecer al Juan C. Peñaranda por disposición en la resolución de mis dudas estadísticas.

Quiero agradecer a la Lic. Amurrio y a su grupo de investigación por ayudarme en el estudio de suelos de las especies *Baccharis* en cada recolección.

A mis tribunales de tesis MSc. Luis Morales y Dr. Rómulo Gemio, por dejarme contar con ellos siempre que lo he necesitado y que me han ayudado a “recargar pilas” para seguir con el trabajo diario.

GRACIAS A TODOS

DEDICATORIAS

Principalmente a **Dios**, quien me ha cuidado y mantenido con vida hasta este día.

Hoy, con el logro de este nuevo paso, quiero dedicar este trabajo, que ha significado un gran esfuerzo y sacrificio no solo de mi parte sino de muchas personas, a todos aquellos que alguna u otra forma con su amor, apoyo y comprensión me alentaron a culminar esta etapa de mi vida, por lo que mantengo la promesa de seguir siempre adelante.

A mi **madre** (†) que en paz descanse, por ser la fuente de mi inspiración y motivación para superarme cada día más.

A mi **padre** por tenerme alta estima, por confiar en mí.

A mis hermanos **Lucio, Luis, Roberto, Rubén, Gonzalo** y a mi hermana **Olga R.**, que han estado siempre a mi lado siendo mi inspiración para superarme.

A mi tutora la **Dra. Giovanna Almanza Vega**, que siempre ha confiado en mis ideas y trabajo. Pero sobre todo, porque ha puesto en mí la mentalidad que se puede ser cada vez mejor.

INDICE

Capítulo 1 (Introducción, antecedentes, justificación)	11
1.1. Introducción	11
1.2. Antecedentes	12
1.2.1. Metabolismo secundario y medio ambiente	13
1.2.2. Antecedentes del género Baccharis	15
1.3. Justificación	26
Capítulo 2 (Objetivos)	28
2.1. Objetivo general.....	28
2.2. Objetivos específicos	28
Capítulo 3 (Parte experimental)	29
3.1. Equipos y reactivos	29
3.2. Material vegetal	31
3.2.1. Colecta de las especies vegetales.....	31
3.2.2. Descripción de la zona de recolección de las especies vegetales de Baccharis	31
3.3. Métodos	33
3.3.1. Obtención de extractos de las especies vegetales.....	33
3.3.2. Métodos de identificación; screening fitoquímico cualitativo de metabolitos secundarios	33
3.3.3. Evaluación de flavonoides totales por espectrofotometría UV- visible .	34
3.3.4. Separación y aislamiento de la luteolina y acetina de la especie Baccharis latifolia	35
3.3.5. Separación y aislamiento de compuestos de la especie Baccharis papillosa.	35
3.3.6. Identificación de compuestos aislados de Baccharis papillosa.	36
3.3.7. Evaluación e identificación de flavonoides y ácidos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	37
3.3.8. Análisis estadístico	38
Capítulo 4 (Resultados y discusiones)	40
4.1. Selección dos especies con potencial fitoterapéutico y/o cosmeceutico	41

4.2. Evaluación del contenido de flavonoides totales en las dos especies seleccionadas recolectadas en diferentes estaciones y alturas.	48
4.2.1. Variación cuantitativa de flavonoides totales en 4 estaciones y en diferentes altitudes en hojas de <i>Baccharis papillosa</i>	49
4.2.2. Variación cuantitativa de flavonoides en las 4 estaciones y en diferentes altitudes de producción en hojas de <i>Baccharis latifolia</i>	51
4.3. Evaluación por cromatografía HPLC de los compuestos seleccionados, de las dos especies recolectadas en diferentes estaciones y alturas.....	71
4.3.1. Evaluación del contenido de Bpap A-1, Bpap A-11 y drupanina por HPLC en especímenes de <i>Baccharis papillosa</i> recolectados en diferentes estaciones y alturas.72	
4.3.2. Identificación de tiempos de retención en cromatogramas HPLC, de los flavonoides luteolina y acetina, en muestra de <i>Baccharis latifolia</i>	77
4.4. Evaluación del contenido de la luteolina y acetina en las muestras de <i>Baccharis latifolia</i> por HPLC, recolectadas en diferentes estaciones y alturas	78
Conclusiones.....	82
Bibliografía	84
Anexos.....	90
Publicaciones y manuscritos	102
8.1. Alberto Calle, Ángela San Martín, Marcela Melgarejo, Yonny Flores and Giovanna R. Almanza (2017). Evaluation of flavonoid contents and antibacterial activity of five Bolivian <i>Baccharis</i> species, manuscrito submitido a la <i>Revista Boliviana de Química</i> . Ojo talvez en el indice solo tenga que ir como Manuscrito I.....	102
8.2. Soledad Enríquez, Angela San Martín, Ruth E. Quispe, Patricia Amurrio, Juan Carlos Peñaranda, Alberto Calle y Giovanna R. Almanza (2017). Cambios por altitud y posición de flavonoides totales en hojas de <i>Baccharis latifolia</i> (chilca) y su correlación con propiedades fisicoquímicas del suelo, manuscrito submitido al Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA). Ojo talvez en el índice solo tenga que ir como Manuscrito II.....	102
8.3. Alberto Calle, Jimena Yupanqui, Yonny Flores y Giovanna R. Almanza (2012). Flavonoides de <i>Baccharis boliviensis</i> , <i>Revista Boliviana de Química</i> , Vol 29, No.2, 55-60. Ojo talvez en el índice solo tenga que ir como Publicación I.....	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Flavanonas del género <i>Baccharis</i>	18
Figura 1-2. Flavonas del género <i>Baccharis</i>	19
Figura 1-3. Especie vegetal <i>Baccharis latifolia</i>	23
Figura 1-4. Especie vegetal <i>Baccharis pentlandii</i>	24
Figura 1-5. Especie vegetal <i>Baccharis tola</i>	25
Figura 1-6. Especie vegetal <i>Baccharis boliviensis</i>	25
Figura 1-7. Especie vegetal <i>Baccharis papillosa</i>	26
Figura 3-1. Las 5 especies vegetales del género <i>Baccharis</i>	31
Figura 3-2. Localización de la zona de estudio de los 5 especies vegetales de <i>Baccharis</i> (<i>B. latifolia</i> , <i>B. papillosa</i> , <i>B. pentlandii</i> , <i>B. boliviensis</i> y <i>B. tola</i>).	32
Figura 3-3. Localización de la zona de trabajo de dos especies a diferentes altitudes y estaciones del año (<i>B. latifolia</i> y <i>B. papillosa</i>).	32
Figura 3-4. Esquema para obtención de los extractos de las especies vegetales.....	33
Figura 3-5. Formación del complejo de coordinación de color amarillo debido a la quelación del aluminio con la flavona luteolina en la presencia o ausencia de ácido.	34
Figura 3-6. Diagrama de cuantificación de flavonoides.....	35
Figura 3-7. Aislamiento de compuestos de la especie vegetal <i>B. papillosa</i>	36
Figura 3-8. Flavonoides y un derivado de ácido cinámico estudiados (1 – 4 flavonoides y 5 derivado de ácido cinámico).....	38
Figura 4-1. Desplazamiento batocrómico de la quercetina por quelación con $AlCl_3$	42
Figura 4-2. Desplazamiento batocrómico de la luteolina por quelación con $AlCl_3$	42
Figura 4-3. Desplazamiento batocrómico de las EFS por quelación con $AlCl_3$	43
Figura 4-4. Flavonoides totales (mg FT/g Ext.) obtenidos en muestras de EE y EFS de las 5 especies <i>Baccharis</i>	44
Figura 4-6. Cromatogramas a 370 nm de las EFS de las 5 <i>Baccharis</i> en estudio	46
Figura 4-7. Cromatogramas a 315 nm de las EFS de las 5 <i>Baccharis</i> en estudio	47
Figura 4-8. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de <i>Baccharis papillosa</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio (n=4x3x3=36). Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	51
Figura 4-9. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de <i>Baccharis latifolia</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	52
Figura 4-10. Espectros UV del compuestos B pap A-1.....	55
Figura 4-11. 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (B pap A-1).....	55
Figura 4-12. Espectros UV del compuesto B pap A-2	57

Figura 4-13. 5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona (B pap A-2).....	57
Figura 4-14. Espectros UV del compuestos B pap A-6.....	58
Figura 4-15. Ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico (Bpap A-6).....	59
Figura 4-16. Espectro de RMN ¹ H de Bpap A-7 en CDCl ₃	60
Figura 4-17. Espectro de correlación homonuclear COSY ¹ H de Bpap A-7	60
Figura 4-18. Espectro de RMN ¹³ C de Bpap A-7.....	61
Figura 4-19. Espectro de correlación HSQC de Bpap A-7	62
Figura 4-20. Espectro de correlación HMBC de Bpap A-7	62
Figura 4-21. Correlaciones HMBC más importantes en Bpap A-7.....	63
Figura 4-22. Espectros UV del compuesto A-7.....	64
Figura 4-23. 5,7- dihidroxi - 4' - metoxiflavonol (Bpap A-7).....	64
Figura 4-24. Espectros UV del compuestos B pap A-9.....	65
Figura 4-25. 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (B pap A-9).....	66
Figura 4-26. Espectro de RMN ¹ H de Bpap A-11 en CDCl ₃	67
Figura 4-27. Espectro de correlación homonuclear COSY ¹ H de Bpap A-11	67
Figura 4-28. Espectro de RMN ¹³ C de Bpap A-11	68
Figura 4-29. Espectro de correlación HSQC de Bpap A-11	68
Figura 4-30. Espectro de correlación HMBC de Bpap A-11	69
Figura 4-31. Correlaciones HMBC más importantes en Bpap A-11.....	70
Figura 4-32. Espectros UV del compuestos Bpap A-11.....	70
Figura 4-33. 5,7,4' - trihidroxi - flavonol (Bpap A-11).....	70
Figura 4-34. Identificación de los flavonoides: 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1) y 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-11) en el Perfil cromatograma de HPLC en extracto etanólico de <i>Baccharis papillosa</i> , a $\lambda = 370$ nm.....	71
Figura 4-35. Identificación de la Drupanina en el perfil cromatogrma de HPLC en extracto etanólico de <i>Baccharis papillosa</i> a $\lambda = 315$ nm.....	72
Figura 4-36. Concentración del compuesto Bpap A-1 (mgFT/100g PS) en hojas de <i>Baccharis papillosa</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	74
Figura 4-37. Concentración del compuesto Bpap A-11 (mg/100g PS) en hojas de <i>Baccharis papillosa</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	75
Figura 4-38. Concentración de la drupanina (mg/g PS) en hojas de <i>Baccharis papillosa</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	77

Figura 4-39. Identificación de los flavonoides: Luteolina y la Acacetina en el Perfil cromatograma de HPLC en extracto etanólico de <i>Baccharis latifolia</i> a $\lambda = 370$ nm.	78
Figura 4-40. Concentración de la luteolina (mg/100g PS) en hojas de <i>Baccharis latifolia</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	79
Figura 4-41. Concentración de la acacetina (mg/g PS) en hojas de <i>Baccharis latifolia</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.	81
Figura 7-1. Desplazamientos espectrales de luteolina, (A) en etanol y (B) adición con 10% de $AlCl_3$	90
Figura 7-2. Recta de calibración del estándar Luteolina a 406 nm	90
Figura 7-3. Recta de calibración de la luteolina (ver datos en la tabla 7-4).	92
Figura 7-4. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto de luteolina a $\lambda = 370$ nm identificado en la muestra de <i>Baccharis latifolia</i>	92
Figura 7-5. Recta de Calibración de la acacetina (ver datos en la Tabla 7-5).	93
Figura 7-6. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto de acacetina a $\lambda = 370$ nm identificado en la muestra de <i>Baccharis latifolia</i>	93
Figura 7-7. Recta de Calibración de la Bpap A-1 (ver datos en la Tabla 7-6)	94
Figura 7-8. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto Bpap A-1 a $\lambda = 370$ nm, identificado en la muestra de <i>Baccharis papillosa</i>	94
Figura 7-9. Recta de calibración de Bpap A-11 (ver datos en la Tabla 7-7)	95
Figura 7-10. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto Bpapa A-11 a $\lambda = 370$ nm, identificado en la muestra de <i>Baccharis papillosa</i>	95
Figura 7-11. Recta de Calibración de la drupanina (ver datos en la Tabla 7-8).	96
Figura 7-12. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto de drupanina a $\lambda = 310$ nm, identificado en la muestra de <i>Baccharis papillosa</i>	96
Figura 7-13. Espectro de RMN 1H del B pap A-1	97
Figura 7-14. Espectro de RMN ^{13}C del Bpap A-1	97
Figura 7-15. Espectro de RMN 1H del B pap A-2	98
Figura 7-16. Espectro de RMN ^{13}C del B pap A-2	98
Figura 7-17. Espectro de RMN 1H del B pap A-6	99
Figura 7-18. Espectro de RMN ^{13}C del Bpap A-6	99
Figura 7-19. Espectro de RMN 1H del B pap A-9	100
Figura 7-20. Espectro de RMN ^{13}C del B pap A-9	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Flavanonas aisladas en el género <i>Baccharis</i> (Almanza <i>et al.</i> , 2011).....	18
Tabla 1-2. Flavonoides aislados en el género <i>Baccharis</i> (Almanza <i>et al.</i> , 2011)	19
Tabla 1-3. Propiedades terapéuticas tradicionales más importantes y modo de uso.....	20
Tabla 3-1. Equipos de uso habitual durante el transcurso del trabajo.	29
Tabla 3-2. Solventes utilizados durante el transcurso del trabajo.	29
Tabla 3-3. Reactivos utilizados habitualmente durante el trabajo realizado.	29
Tabla 3-4. Ensayos para la identificación de metabolitos secundarios	34
Tabla 4-1. Estudio químico preliminar de extractos etanólicos de 5 <i>Baccharis</i>	41
Tabla 4-2. Absorbancia y λ_{\max} de la última banda de las EFS queladas con AlCl_3	43
Tabla 4-3. Flavonoides totales en EE y EFS en hojas de 5 <i>Baccharis</i> de Bolivia.	44
Tabla 4-4. Determinación de la absorbancia en las regiones UVA (320-400 nm) y UVB (280-320 nm).....	48
Tabla 4-5. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de <i>Baccharis papillosa</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio (n=4x3x3=36).	49
Tabla 4-6. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de <i>Baccharis latifolia</i> , para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio.	51
Tabla 4-7. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de B pap A-1 en CDCl_3	54
Tabla 4-8. Características generales de B pap A-1.....	55
Tabla 4-9. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de Bpap A-2 en CDCl_3	56
Tabla 4-10. Características generales de Bpap A-2.....	57
Tabla 4-11. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de B pap A-6 en CDCl_3	58
Tabla 4-12. Características generales de B pap A-6.....	59
Tabla 4-13. $\delta^1\text{H}$ y $\delta^{13}\text{C}$ y correlaciones HMBC de Bpap A-7 en CDCl_3	63
Tabla 4-14. Características generales de Bpap A-7.....	64
Tabla 4-15. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de B pap A-9 en CDCl_3	65
Tabla 4-16. Características generales de Bpap A-9.....	66
Tabla 4-17. $\delta^1\text{H}$ y $\delta^{13}\text{C}$ y correlaciones HMBC de Bpap A-11 en CDCl_3	69
Tabla 4-18. Características generales de Bpap A-11.....	70
Tabla 4-19. Concentración del compuesto Bpap A-1 en <i>Baccharis papillosa</i> , en cuatro estaciones y tres alturas.	73
Tabla 4-20. Concentración del compuesto Bpap A-11 en <i>Baccharis papillosa</i> , en 4 estaciones y 3 alturas.	75
Tabla 4-21. Concentración la drupanina en <i>Baccharis papillosa</i> , en cuatro estaciones y tres alturas	76
Tabla 4-22. Tiempos de retención (min) de los compuestos flavonoides en el extracto etanólico de <i>Baccharis latifolia</i> determinados en HPLC. (Luteolina y Acacetina)	78
Tabla 4-23. Concentración de la luteolina en <i>Baccharis latifolia</i> , en cada estación y altitud..	79

Tabla 4-24. Concentración de la acetina en <i>Baccharis latifolia</i> , en cada estación y altitud.	80
Tabla 7-1. Desplazamiento espectral observado en los máximos de absorción de la solución de la luteolina cuando se trata con cloruro de aluminio y acetato de potasio.....	90
Tabla 7-2. Concentraciones nominales de patrón (luteolina) y valores hallados por un método analítico (con sus desvíos estándar).....	91
Tabla 7-3. Parámetros analíticos del método propuesto.....	91
Tabla 7-4. Datos de las Áreas de las señales HPLC de la luteolina, en función de sus concentraciones	92
Tabla 7-5. Datos de las Áreas de las señales HPLC de acetina, en función de sus Concentraciones.....	93
Tabla 7-6. Datos de las Áreas de las señales HPLC de Bpap A-1, en función de sus Concentraciones.....	94
Tabla 7-7. Datos de las Áreas de las señales HPLC de Bpap A-11, en función de sus concentraciones	95
Tabla 7-8. Datos de las Áreas de las señales HPLC de drupanina, en función de sus concentraciones	96
Tabla 7-9. Tratamiento estadístico de las 5 especies <i>Baccharis</i>	101
Tabla 7-10. Tiempo de retención (min) y longitud de onda máxima a la cual absorben los compuestos estándares.....	101

Capítulo 1 (Introducción, antecedentes, justificación)

1.1. Introducción

Actualmente es de gran interés la utilización de productos naturales, principalmente de plantas medicinales, no solo para tratar enfermedades ya existentes, sino también para prevenir la aparición de otros desórdenes en la salud; esto fundamentalmente respaldado por estudios etnofarmacológicos sobre su actividad terapéutica además porque debido a la concentración de sus principios activos presentan menores efectos secundarios, que los encontrados en los productos de síntesis (Chaves et al., 1993; 1997).

Uno de los principales problemas para la utilización de plantas medicinales y productos derivados de ellas es que la concentración de principios activos (metabolitos secundarios) varía notablemente por diversos factores ambientales, como la época del año, altura, daños por plagas y enfermedades (Chaves & Escudero, 1999; Watterman & Mole, 1989). Entre los principios activos de algunas plantas medicinales se encuentran una clase de metabolitos secundarios denominados flavonoides, que han sido ampliamente estudiados debido a su importancia farmacológica (Laitenen *et al.*, 2000). Trabajos recientes muestran que la mayor producción de flavonoides en la planta es en la época de verano (Chaves *et al.*, 1993; 1997), y se ha evidenciado que la radiación UV influye en la síntesis de flavonoides en la planta (Lancaster *et al.*, 2000; Ray & Lancaster, 2001), por otro lado Keinanen *et al.*, 1999 reportó que la defoliación afecta el contenido de flavonas pero no de flavonoles, mientras Laitenen *et al.*, 2000 encontró variación de tipos y cantidades de flavonoides en diferentes estados fenológicos de la planta.

La ciudad de La Paz (Bolivia) y sus alrededores, muestra unas características ambientales muy particulares (bajas temperaturas, altas fluctuaciones térmicas, baja humedad absoluta y elevada radiación UV solar) que combinados con el comportamiento de las masas de aire locales y latitud, determinan características intrínsecas de la región. En respuesta a este fenómeno, las plantas sintetizan compuestos, entre ellos, los compuestos fenólicos (Alonso & Amelot *et al.*, 2006). Estos compuestos cumplen diferentes roles en la planta, actuando como fitoalexinas, en la atracción de polinizadores, en la pigmentación de la planta o como protectores frente a la radiación ultravioleta. Las referencias sobre variaciones de estos metabolitos secundarios en especies vegetales de montaña son principalmente de regiones templadas (Spitaler *et al.*, 2006). Hasta el momento no se han publicado trabajos sobre la variación altitudinal de estos metabolitos en especies de comunidades de los andes subtropicales.

En este sentido, en el presente estudio se seleccionarán 5 *Baccharis* del valle de La Paz: *B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. boliviensis*, *B. pentlandii* y *B. tola*, entre las cuales las de mayor interés son *B. latifolia* y *B. papillosa*, debido a que ya se realizaron varios estudios que demostraron la importancia de *B. latifolia* como planta medicinal de interés industrial, ya que debido a su contenido de flavonoides con actividad antiinflamatoria y analgésica, se realizaron varios estudios complementarios que dieron las bases para la producción de una crema antiinflamatoria y analgésica “Chillkaflam” en base al extracto de esta planta (Almanza & Salcedo, 2012). Por otro lado, *B. papillosa* tiene derivados de ácido cinámico y flavonoides con actividad fotoprotectora (Curi, 2012). Por lo que, en el presente trabajo se realizará la evaluación del contenido de principios activos de estas especies en diferentes estaciones del año y alturas, considerando este estudio de gran importancia para determinar las mejores condiciones de producción y recolección de la materia vegetal para la elaboración de productos de interés medicinal en base a estas plantas.

1.2. Antecedentes

Desde hace algunos años, tanto países altamente desarrollados como aquellos con escasos recursos, han retomado y desarrollado el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos, ya que disminuyen o eliminan síntomas de manera similar a cuando se utilizan medicamentos alopáticos (García *et al.*, 2002).

En la actualidad, en Bolivia, la medicina tradicional sigue satisfaciendo las necesidades de alivio y curación que la población rural requiere, ya sea debido a la tradición o a la falta de recursos económicos. Adicionalmente, Bolivia presenta una de las mayores biodiversidades vegetales del mundo, atrayendo el interés de diversos grupos no solo por su diversidad sino también por los escasos estudios científicos desarrollados sobre esta biodiversidad, por lo que presenta grandes potenciales para el descubrimiento y desarrollo de productos con potencial económico.

Sin embargo, son escasos los productos desarrollados y comercializados en base a la biodiversidad vegetal boliviana, siendo una de las causas principales la falta de estudios científico-clínicos que respalden su desarrollo y comercialización (García *et al.*, 2002). En particular es importante determinar los marcadores químicos de actividad, que normalmente son metabolitos secundarios producidos de acuerdo a las condiciones medioambientales en los que se desarrollan las plantas.

Entre los metabolitos secundarios de interés están los flavonoides, que se constituyen en una de las subfamilias de polifenoles naturales a las que la comunidad científica ha dedicado más atención en los últimos años. Sus múltiples propiedades biológicas observadas experimentalmente y su abundancia en la dieta, junto con su presencia en numerosos remedios de la medicina tradicional, los convierten en posibles candidatos para explicar la

asociación encontrada entre el consumo de determinados productos de origen vegetal y la disminución del riesgo de presentar determinadas enfermedades crónicas (Álvarez & Orallo, 2003).

1.2.1. *Metabolismo secundario y medio ambiente*

Relación del metabolismo secundario y el entorno ecológico de las plantas

Los metabolismos secundarios no son producidos al azar, ya que han sido modelados y optimizados durante la evolución (Jarvis, 2000). Su estudio ha implicado diversas ramas de la ciencia como la Ecología, Química Orgánica, Bioquímica, Zoología, Botánica, Sistemática, Micología, Fisiología, Biología Evolutiva, Agronomía, Antropología e incluso Arqueología (Seigler, 1998). Estos compuestos intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, y pueden desempeñar una amplia variedad de funciones ecológicas en la planta.

La mayoría de los metabolitos secundarios cumplen funciones de defensa contra depredadores y patógenos, mejorando el crecimiento de la planta. También se incluyen compuestos venenosos, donde la concentración puede reducir la digestibilidad de la planta y la palatabilidad de los herbívoros (Lindroth & Batzli, 1984; Baas, 1989; Sosa & col., 2004).

Los metabolismo secundario es la de actuar como agentes alelopáticos, es decir, intervenir en la defensa química de las plantas. De esta manera, los metabolitos secundarios que son secretados por una planta, pueden interactuar con otra planta y/o con los componentes bióticos y abióticos del sustrato produciendo un efecto negativo o positivo sobre ella. Esta interacción planta-planta, mediada por los compuestos derivados del metabolismo secundario se denomina alelopatía (Rice, 1984).

Las condiciones ambientales influyen en la síntesis de los compuestos con actividad alelopática potencial, pero esta potencialidad vuelve a sufrir las consecuencias de la interacción con el ambiente, pudiendo ser ésta modificada por las distintas condiciones ambientales (Kobayashi, 2004). Todos estos compuestos incrementan su concentración cuando la planta está bajo diferentes condiciones meteorológicas. En general, la síntesis de fenoles varía y está inducida por factores ecológicos como la radiación UV, estrés hídrico (Chaves & Escudero, 1999) u ozono (Sandermann *et al.*, 1998).

Otra función ecológica importante es la atracción de polinizadores (Chou & Kou, 1986; Harborne, 1988; Baas, 1989), o dispersores de las semillas (Swain, 1973; Levin, 1976; Cronquist, 1977). Estos compuestos ayudan a las plantas a vivir en suelos ricos en metales pesados como por ejemplo en aluminio (Barceló & Poschenrieder, 2002) e intervienen en la actividad microbiana del suelo (Vokou & Margaris, 1984).

Principalmente es la de proteger a la planta de las radiaciones UV (Zobel & Lynch, 1997). El efecto de la radiación UV en la planta es importante, elevadas cantidades de radiación UV disminuyen la biomasa de la planta y aumenta la cantidad de flavonoides (Cuadra *et al.*, 1997) pudiendo así incrementar ésta la concentración de metabolitos, tanto en las células como en la superficie de la planta (Zobel *et al.*, 1999).

Variación del metabolismo secundario por acción del medio ambiente

Se llama adaptación a toda característica definitiva de un organismo que le permite persistir en las condiciones de su hábitat (Whittaker *et al.*, 1973), es decir, al ajuste fenotípico de un organismo a su ambiente. Tales rasgos aseguran cierto grado de éxito, ya sea permitiéndole a la planta hacer uso total de las cantidades de nutrientes, agua, o luz disponibles, o bien un alto grado de protección contra factores adversos, como son las temperaturas extremas, la sequía, los parásitos y los herbívoros (Root, 1967).

Si una serie de plantas genéticamente idénticas crecen en regiones diferentes, las características de cada individuo se desarrollan de acuerdo con el hábitat particular en el cual crecen (Falconer & Mackay, 1996). El efecto fenotípico provocado por la interacción con el ambiente se llama plasticidad fenotípica (Falconer, 1989). Teniendo en cuenta que la plasticidad fenotípica es un rango universal y se corresponde con la capacidad de un determinado genotipo de dar lugar a distintos fenotipos en diferentes condiciones ambientales, el grado de plasticidad y, por lo tanto, la variación fenotípica, puede oscilar desde las diferencias más sorprendentes hasta los cambios más ligeros, según la constitución hereditaria de la planta. Además, se pueden distinguir variaciones morfológicas y fisiológicas. Las variaciones de naturaleza morfológica inducidas por el ambiente ocurren únicamente como resultado de una exposición continua durante una gran parte del ciclo vital; pero los ajustes fisiológicos pueden aparecer en pocos días (Valladares, 2006).

Las plantas pueden adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes por la plasticidad o la selección sobre la variabilidad genética existente. Además, puede producirse una selección en la plasticidad fenotípica. Si se produce una selección hacia un fenotipo concreto, se pueden dar variaciones ecológicas como respuestas a la evolución (Schlichting & Pigliucci, 1998). El concepto de plasticidad fenotípica se visualiza a partir de la confección de la norma de reacción. Así, la norma de reacción de un genotipo dado es un rango de respuestas genotípicas a lo largo de un gradiente ambiental (Schlichting & Pigliucci, 1998).

Por ello, el estudio de la variabilidad de los metabolitos secundarios puede ayudar a conocer la capacidad de respuesta que posee una especie en diferentes condiciones ambientales y a su vez su plasticidad fenotípica.

La importancia del estudio de la plasticidad fenotípica de una especie radica en su significado adaptativo y se puede determinar al menos desde tres aproximaciones distintas que además involucran diferentes escalas: 1) a nivel del individuo, 2) a nivel de la población y 3) a nivel de la especie (Gianoli, 2004).

En el primer caso, enmarcado dentro de una perspectiva ecofisiológica, se indaga por el significado funcional de las respuestas plásticas observadas en los fenotipos. En el segundo caso, orientado a la ecología evolutiva, se aborda la relación entre la norma de reacción y la adecuación biológica de genotipos representativos de una población. En el tercer caso, se estudia el papel de la plasticidad fenotípica en los patrones de distribución de una especie.

Por lo tanto, conocer los componentes ambientales de la variación es fundamental para la comprensión de cómo una población se estructura en el tiempo y en el espacio.

En las plantas, la síntesis y la acumulación de los metabolitos secundarios reflejan diferentes etapas evolutivas. Algunos de estos compuestos se producen sólo esporádicamente, mientras que otros se distribuyen ampliamente en todo el reino vegetal (Harborne, 1980; Rhodes, 1994). Un solo metabolito secundario puede ser específico de órdenes, familias, especies, y a veces incluso de taxones intraespecíficos (Harborne, 1980; Wollenweber & Dietz, 1981). Dada la función que desempeñan estos compuestos en las plantas, la existencia de una variación intraespecífica puede tener un papel importante para la especie, ya que cuando el hábitat original sufre cambios, sus procesos fisiológicos deben actuar a un nuevo ritmo dictado por las nuevas intensidades de los factores. Por ejemplo, la competencia, la polinización y el herbivorismo son algunos de los muchos procesos ecológicos que influyen en el estado de la planta, y todos ellos pueden variar con el fenotipo de la planta (Cariveau *et al.*, 2004; Cahill *et al.*, 2005; Moore & Foley, 2005).

En presencia de la presión selectiva que ejercen otros organismos y el medio ambiente en general sobre las plantas, la ausencia de variabilidad en la defensa química implicaría una posible reducción de la población. Si la presión fuera suficiente y se mantuviera en el tiempo, esa población podría desaparecer. La supervivencia depende del grado al cual los caracteres heredados le permiten ajustarse al cambio ambiental (Stebbins, 1950). De esta manera, una elevada adaptabilidad química puede mejorar este proceso (Van der Meijden, 1996).

1.2.2. Antecedentes del género *Baccharis*

Antecedentes botánicos del género *Baccharis*

El género *Baccharis* pertenece a la familia de las Asteraceae. Los miembros de esta familia se caracterizan por ser organismos avanzados en las siguientes características: número de partes definido, ovarios ínferos, pétalos unidos (fusionados), corolas irregulares, en ocasiones cuentan con flores incompletas y a veces flores imperfectas. El rasgo más característico de

este grupo es la disposición de sus flores en cabezuelas, cada una de las cuales está rodeada por brácteas que tienen forma más o menos semejante a la de los sépalos. Para un observador aficionado, o para un insecto, la cabezuela puede parecer una sola flor (Jensen *et al.*, 1988). Con frecuencia las flores son bisexuales, y los estambres o los pistilos pueden estar ausentes o bien en las flores del radio o en las del disco. En contadas ocasiones se encuentran los sexos en cabezuelas distintas o incluso en flores separadas. Algunos miembros de la familia se polinizan por medio del viento. Esta familia es la más grande, o tal vez, la segunda más grande de todo el mundo y se encuentra distribuida en todo el planeta. Casi todos los miembros del grupo son especímenes herbáceos, e incluso unos cuantos son árboles. Los distintos taxónomos dividen a esta familia en 12 o 15 subgrupos llamados tribus. Su clasificación se está revisando en la actualidad mediante trabajos referentes a bioquímica, análisis de polen, microbiología, anatomía y citología de estas plantas (Jensen *et al.*, 1988). Son arbustos, sufrútices o hierbas perennes. Las hojas son alternas raramente opuestas y a veces bracteiformes y reducidas. Los capítulos son homógamos o heterógamos, discoides, disciformes o subradiados. El involucre puede ser hemisférico, acampanado o cilíndrico, pluri o pauciseriado. El receptáculo suele ser plano, convexo o cónico, liso o alveolado, desnudo o provisto de páleas en algunos capítulos pistilados. Las flores del margen son pistiladas con corola generalmente filiforme de ápice dentado, truncado o levemente ligulado, constituyendo capítulos propios en las plantas dioicas y gino-dioicas: estilo con ramas lineares largas (Giuliano, 2000).

Las flores del disco son perfectas, pero en general funcionalmente estaminadas por atrofia del ovario con corola tubulosa de limbo ensanchado y ápice 5-lobado o 5-secto, conformando capítulos propios en las plantas dioicas y antro-dioicas; anteras con tecas obtusas en la base; estilo con ramas desarrolladas y separadas o bien breves y adheridas entre sí. Los aquenios de las flores pistiladas son bien desarrollados, glabros o con algún tipo de pubescencia, mientras que los aquenios de las flores estaminadas son rudimentarios. El papus 1-2 uniseriado formado por pelos escabrosos frecuentemente acrescentes en las flores pistiladas (Giuliano, 2000). Algunas de las características taxonómicas de las hojas y de las inflorescencias son consideradas herramientas útiles para la sistemática. Varios autores las han utilizado con el fin de establecer una clasificación infragenérica para este género. Su distribución geográfica es exclusivamente americana, desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el extremo austral de Argentina y Chile (Giuliano, 2001).

El género *Baccharis* comprende plantas dioicas, excepcionalmente monoicas o polígamo-dioicas. Se caracteriza por ser arbustos, sufrútices o hierbas, a veces provistos de xilopodios o de raíces gemíferas. Las hojas son alternas (pocas veces opuestas o sub opuestas), algunas veces tempranamente caducas o reducidas a brácteas inconspicuas. Los capítulos son solitarios o dispuestos en inflorescencias diversas, discoides (excepcionalmente disciformes) y homógamos (en casos excepcionales heterógamos). Las plantas pistiladas están constituidas

por flores pistiladas (raramente puede haber algunas flores estaminadas centrales) y las plantas estaminadas por flores morfológicamente perfectas. El involucre hemisférico puede ser acampanado o cilíndrico, con filarios dispuestos en varias series, imbricados siendo los exteriores gradualmente menores. El receptáculo plano, convexo o cónico, puede ser liso o alveolado, desnudo o con páleas caducas en algunos capítulos pistilados. Con respecto a las flores pistiladas, su corola es filiforme de ápice dentado, truncado o brevemente ligado; estilo exserto, con ramas lineares. Por el contrario, las flores estaminadas presentan una corola tubulosa de limbo ensanchado y ápice 5-lobado o 5-secto; anteras con tecas obtusas en la base; estilo con ramas largas, oblongas y separadas, o bien cortas y adheridas entre sí. Los aquenios de las flores pistiladas son cilíndricos, elipsoides u ovoides y en ocasiones comprimidos 5- (8) 10-costados; los aquenios de las flores estaminadas son rudimentarios. En lo referente al pappus está formado por pelos delgados escabrosos, dispuestos en 1-2 (a veces más) series; en las flores pistiladas con frecuencia acrescentes, en las estaminadas por lo general crespos, ensanchados o no en el ápice (Giuliano, 2000).

Antecedentes químicos del género Baccharis

Varias especies del género *Baccharis* han sido estudiadas químicamente, principalmente aquellas que presentan actividad biológica. De forma general, entre los metabolitos secundarios que se destacan están los flavonoides, diterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanoides y ácidos cumáricos. Dentro de los estudios terapéuticos realizados se ha demostrado que varias especies del género *Baccharis* poseen efectos aleopáticos, antimicrobianos, citotóxicos y antiinflamatorios (Gonzaga *et al.*, 2005).

Los flavonoides en conjunto con los diterpenos son los compuestos de mayor concurrencia en el género *Baccharis* y son descritos como marcadores químicos dentro de la Familia Asteraceae. Estos flavonoides se pueden encontrar como agliconas libres o unidos a azúcares, se hallan presentes en todas las partes de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo las más comunes las flavonas. En el estudio de actividades biológicas encontradas en los extractos etanólicos de las especies del género *Baccharis* se ha demostrado que la mayoría de estas actividades terapéuticas son producto de los flavonoides o diterpenos (Gonzaga *et al.*, 2005). Los flavonoides están despertando mucho interés por sus diversas aplicaciones para la medicina, entre ellas como antioxidantes y compuestos anti-HIV (Gonzaga *et al.*, 2005). Aunque los flavonoides han sido empleados desde hace mucho tiempo solo como colorantes, en la actualidad se les atribuye diversas propiedades en las plantas, entre ellos podemos citar protección a los vegetales contra la incidencia de rayos ultravioleta y visible, así como protección contra insectos, hongos, virus y bacterias, son atrayentes de insectos con finalidad de polinización, antioxidantes, poseen un control de la acción de las hormonas vegetales, agentes aleopáticos e inhibidores de enzimas. Por otro lado, estos compuestos poseen también importancia farmacológica, resultado de

algunas propiedades importantes como antiinflamatorio, antialérgico, antiulcerogénico, antiviral, anticarcinogénico; y además son utilizados para el tratamiento de la fragilidad capilar, diabetes, y afecciones cardiacas (Lock *et al.*, 2006).

- **Flavonoides del género *Baccharis***

Los flavonoides, junto a los diterpenos, son los tipos de metabolitos secundarios con mayor ocurrencia en el género *Baccharis*, como se puede comprobar en las distintas revisiones de compuestos encontrados en *Baccharis*. Así, Verdi *et al.* (2005) indica que los flavonoides se presentan generalmente como agliconas libres y rara vez se han encontrado glicosilados, lo que corresponde a una característica de la familia Asteraceae (Zdero *et al.*, 1986). En total se han reportado unos 298 flavonoides en el género *Baccharis* de los cuales 24 presentan esqueleto de flavanona y 85 esqueleto de flavona, siendo común la presencia de funciones oxigenadas en C-3 (48%). Adicionalmente es frecuente la presencia de oxígeno en C-5 y C-7 del anillo A y en C-4' del anillo B, el grupo metoxilo aparece con mayor frecuencia en C-7 y C-6 del anillo A y C-4' del anillo B.

Entre las flavanonas, el compuesto sakuranetina 1 fue reportado en 14 especies de *Baccharis*, el compuesto naringenina 2 aparece en ocho especies de *Baccharis*, el compuesto pinocembrina 3 tiene una ocurrencia en seis especies de *Baccharis* y los compuestos eriodictiol 4 y el 5-OH-4',7-OMe flavanona 5 fueron reportados en cinco especies.

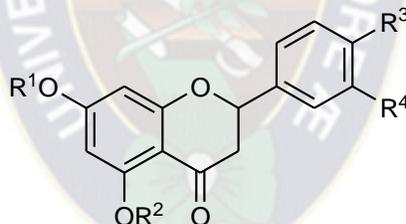


Figura 1-1. Flavanonas del género *Baccharis*

Tabla 1-1. Flavanonas aisladas en el género *Baccharis* (Almanza *et al.*, 2011)

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Nombre
1	Me	H	OH	H	Sakuranetina
2	H	H	OH	H	Naringenina
3	Me	H	OMe	H	Pinocembrina
4	H	H	OH	OH	Eriodictiol
5	H	H	H	H	5-OH-7,4'-OMe flavona

Las flavonas son el tipo de flavonoides más encontrados en el género *Baccharis*, como la genkwanina que fue reportada en 12 especies, algunos flavonoides comunes en este género se muestran en la siguiente tabla 1-2.

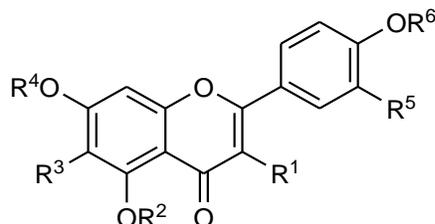


Figura 1-2. Flavonas del género *Baccharis*

Tabla 1-2. Flavonoides aislados en el género *Baccharis* (Almenza *et al.*, 2011)

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	Nombre
6	H	H	H	Me	H	H	Genkwanina
7	H	H	OMe	H	H	H	5,7,4'-OH-6-OMe flavona Hispidulina
8	OH	H	H	H	OH	H	3,5,7,3',4'-OH flavona Quercetina
9	OH	H	H	H	H	H	3,5,7,4'-OH flavona Canferol
10	H	H	H	H	H	H	5,7,4'-OH flavona Apigenina
11	H	H	OMe	Me	H	H	5,4'-OH-6,7-OMe flavona Cirsimaritina
12	H	H	H	Me	H	Me	5-OH-7,4'-Ome flavona

Antecedentes farmacológicos y etnofarmacológicos del género Baccharis

- Propiedades farmacológicas del género Baccharis

La farmacología se orienta al estudio de los extractos de estas plantas del género *Baccharis* medicinales o fitofármacos, para poder descifrar los mecanismos de acción subyacentes a los diversos compuestos contenidos en los extractos en especial de los compuestos bioactivos que pueden interactuar con múltiples sitios en el organismo. (Samniego & Escaleras, 1987)

Entre los productos de origen vegetal, los hay de diverso grado de potencia farmacológica:

Muy potentes, relativamente poco potentes y de potencia intermedia (Cáceres, 1996)(Samniego & Escaleras, 1987)

Los extractos del género *Baccharis* son utilizados como productos de origen vegetal, como la utilización terapéutica de productos con una actividad suave o moderada, con márgenes terapéuticos relativamente amplios y que dan lugar a tratamientos menos agresivos (Samniago & Escaleras, 1987).

Así, la farmacología de estas plantas del género *Baccharis* debe considerarse especialmente útil en el tratamiento de patologías leves o moderadas, así como de enfermedades crónicas (Samniago & Escaleras, 1987).

- **Propiedades etnofarmacológicas del género *Baccharis***

El género *Baccharis* son plantas de uso de mucha fama como plantas medicinales entre los primitivos pueblos de América, considerándose como plantas sagradas por los efectos terapéuticos que se le han atribuido (Gupta, 1995).

Las partes aéreas de estas plantas pueden ser aplicadas directamente sobre las heridas o afecciones de la piel y dan mejores resultados si se las aplican calientes en las áreas reumáticas. (Astudillo, 2003)

Asimismo, las hojas de estas plantas del género *Baccharis* son aplicadas en forma de cataplasma se utilizan para calmar los dolores reumáticos. También son usadas para las afecciones bronquiales y pulmonares. Las hojas y flores frescas en decocción son administradas oralmente para calmar la tos y la bronquitis. La infusión de estas plantas del género *Baccharis* ha sido usada contra el asma, dolores menstruales y afecciones uterinas. (Gupta, 1995)

Las propiedades terapéuticas y modos de aplicaciones más importantes que se le atribuyen a este género están descritas en la tabla 1-3 (Roersch, 1994).

Tabla 1-3. Propiedades terapéuticas tradicionales más importantes y modo de uso.

Enfermedad	Uso tradicional
Tos	Emplasto (hervido en agua), Mate
Reumatismo	Baños de vapor
Golpes interiores	Mate Emplasto
Luxaciones	Emplasto
Heridas	Tomar mate y poner emplasto
Inflamación	Tomar mate y poner emplasto

- **Propiedades Farmacológicas de flavonoides**

Desde su descubrimiento, los flavonoides se han descrito con propiedades farmacológicas, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antiarteroescleróticas, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas, hepatoprotectoras, diuréticas, antihipertensivas, antiespasmódicas y antiulcerosas gástricas, entre otras, ejercidas por diversos mecanismos de acción (Middleton & Kandaswami, 1994). En fitoterapia, los flavonoides se emplean principalmente en los casos de fragilidad capilar como venotónicos, también se utilizan en proctología, metrorragias y retinopatías (Álvarez & Orallo, 2003).

Desde su descubrimiento, los flavonoides se han descrito con propiedades farmacológicas, tales como antioxidantes, antiinflamatorias, antiagregantes, antiarteroescleróticas, antihemorrágicas, vasodilatadoras, antineoplásicas, antivirales, antibacterianas, antialérgicas, hepatoprotectoras, diuréticas, antihipertensivas, antiespasmódicas y antiulcerosas gástricas, entre otras, ejercidas por diversos mecanismos de acción (Middleton & Kandaswami, 1994). En fitoterapia, los flavonoides se emplean principalmente en los casos de fragilidad capilar como venotónicos, también se utilizan en proctología, metrorragias y retinopatías (Álvarez & Orallo, 2003).

Actualmente, los campos en los que más estudios se realizan con los flavonoides son las enfermedades cardiovasculares y el cáncer, dos de los principales problemas sanitarios del mundo occidental. Los mecanismos de acción y las posibles moléculas diana de éstos compuestos continúan siendo objeto de la investigación biomédica (Álvarez & Orallo, 2003; López, 2002).

Cabe destacar que el flavopiridol que inhibe ciclinas dependientes de cinasas, induce apoptosis, suprime la inflamación y modula respuestas inmunológicas, es el primer flavonoide con actividad biológica que ha entrado a la clínica como fármaco anticancerígeno (Rao *et al.*, 2005).

Así, sus efectos en los humanos pueden clasificarse en:

Propiedades anticancerosas: muchos han demostrado ser tremendamente eficaces en el tratamiento del cáncer. Se sabe que muchos inhiben el crecimiento de las células cancerosas (J. Med Food, 2005)

Propiedades cardiotónicas: tienen un efecto tónico sobre el corazón, potenciando el músculo cardíaco y mejorando la circulación. Atribuidas fundamentalmente al flavonoide quercetina aunque aparece en menor intensidad en otros como la genisteina y la luteolina. Se ha estudiado que los flavonoides reducen el riesgo de enfermedades cardíacas (Hertog, *et al.*, 1995; Yochum, *et al.*, 1999).

Fragilidad capilar: mejoran la resistencia de los capilares y favorecen el que éstos no se rompan, por lo que resultan adecuados para prevenir el sangrado. Los flavonoides con mejores resultados en este campo son la hesperidina, la rutina y la quercetina.

Propiedades antitrombóticas: la capacidad de estos componentes para impedir la formación de trombos en los vasos sanguíneos posibilita una mejor circulación y una prevención de muchas enfermedades cardiovasculares.

Disminución del colesterol: poseen la capacidad de disminuir la concentración de colesterol y de triglicéridos.

Protección del hígado: algunos flavonoides han demostrado disminuir la probabilidad de enfermedades en el hígado. Fue probado en laboratorio que la silimarina protege y regenera el hígado durante la hepatitis. Junto con la apigenina y la quercetina, son muy útiles para eliminar ciertas dolencias digestivas relacionadas con el hígado, como la sensación de plenitud o los vómitos.

Protección del estómago: ciertos flavonoides, como la quercetina, la rutina y el kaempferol, tienen propiedades antiulcéricas al proteger la mucosa gástrica.

Antiinflamatorios y analgésicos: la hesperidina por sus propiedades antiinflamatorias y analgésicas, se ha utilizado para el tratamiento de ciertas enfermedades como la artritis. Los taninos tienen propiedades astringentes, vasoconstrictoras y antiinflamatorias, pudiéndose utilizar en el tratamiento de las hemorroides (Palazón, *et al.*, 2001)

Antimicrobianos: isoflavonoides, furanocumarinas y estilbenos han demostrado tener propiedades antibacterianas, antivirales y antifúngicas.

Propiedades antioxidantes: Los flavonoides contienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez S. *et al.*, 2002).

Antecedentes de las 5 especies del género Baccharis del valle de La Paz

En el Valle de La Paz, particularmente en los alrededores de la ciudad de La Paz, se encuentran mayoritariamente cinco especies del género *Baccharis*: *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. boliviensis*, *B. tola* y *B. papillosa*.

Estas especies vegetales están sometidas a una alta radiación UV solar, por las condiciones de latitud y altitud del valle de La Paz, además de suelos secos y grandes fluctuaciones térmicas en corto tiempo, como una de las respuestas a estas condiciones medioambientales estas plantas pueden biosintetizar metabolitos secundarios, entre los cuales están los flavonoides.

Por este motivo se realizó un estudio químico preliminar de los extractos de estas especies para seleccionar dos especies en base a estos estudios y revisiones bibliográficas.

Baccharis latifolia

- Descripción botánico y distribución

Es un arbusto perenne muy ramificado con tallos leñosos de 2 a 3 m de altura. Las hojas son alternas, dentadas, pecioladas, oblongo-lanceoladas, de ápice acuminado, base decidua o atenuada, de 6 a 12 cm de largo y 2 a 3.5 cm de ancho. La inflorescencia es blanquecina paniculada, terminal y ramificada. Los frutos son aquenios de 4 a 5 mm de longitud. Su propagación es por semilla y por esquejes.

La especie se distribuye por toda la zona tropoandina, de Venezuela a Bolivia y norte de la Argentina. Se encuentra entre los 1600 y 3800 m.s.n.m. pero predominantemente entre los 2500 y 3000 m.s.n.m. pudiendo subir hasta los 3400 m.s.n.m. (Hoyos, 2008).



Figura 1-3. Especie vegetal *Baccharis latifolia*.

- Antecedentes químicos

En las hojas de *Baccharis latifolia* se han encontrado galotaninos, rutina, quercitrina, apigenina, dilactonas A, B, C, dipterpenos del tipo eupatorina, germacreno – D hispidulina, luteolina, nepetina, quercetina, saponinas, quinonas, fenoles simples catequina, cumarinas sesquiterpénicos y eudesmano. También contiene aceites esenciales y ácidos grasos, así como una serie de alcoholes lineales saturados, monoterpénos (nopineno, carquejol, acetato de carquejilo), el triterpeno-friedelina y una dimetoxiflavona (Gonzales *et al.*, 1998).

Antecedentes farmacológicos y etnofarmacológicos

Las personas utilizan las hojas de *Baccharis latifolia* en las heridas que se forman en sus labios pues desinflama rápidamente y calma el dolor que sienten. También la utilizan

calentando las hojas para colocarlas sobre las piernas porque calma el dolor que siente por las frías mañanas. (Gonzales *et al.*, 1998).

Además se han reportados propiedades como analgésico, para el adormecimiento de las extremidades, agrietamiento de los pezones, artritis, bronquitis, diarrea, disentería, gripe, helmintiasis, hemorroides, inflamación renal de las extremidades, lumbagos, reumatismo y ulceraciones (Gonzales *et al.*, 1998).

Baccharis pentlandii

- Descripción botánico y distribución

La especie vegetal *Baccharis pentlandii* es un arbusto, raras veces es un árbol, tiene entre 0.5 y 8 m de altitud, brotes verdes, cafés, raramente rojizos. Tiene hojas de 3 a 17 cm de longitud, 0.8 a 5.2 de ancho. Brotes aserrado. Se distinguen de otras especies porque son arbustos altos, con hojas resinosas.

Incluye 2 taxas morfológicas distintas, una distribuida en el trópico (Yungas al sur de Perú) y otro subtropical distribuida desde el centro de Bolivia hasta el centro de Argentina (Müller, 2006).



Figura 1-4. Especie vegetal *Baccharis pentlandii*.

- Antecedentes farmacológicos y etnofarmacológicos

Utilizada por la medicina tradicional de Bolivia y Perú, para tratar diferentes procesos patológicos, como desinfectante, antiséptico, antirreumático, inflamaciones, fracturas y dislocaciones, también para la tos y neumonía (Freyre *et al.*, 2007).

Baccharis tola

- Descripción botánico y distribución

Es un arbusto, o arbusto enano de 0.5 a 1.0 m de alto. Posee brotes verdes, amarillos o rojizos. Tiene hojas alargadas de 0.4 a 2.5 cm de largo y 0.1 a 0.8 cm de ancho y son aserradas. Tiene una distribución a lo largo de las zonas andinas altas, al sur del Perú y al norte de Chile. Por otro lado se la encuentra desde el norte y centro de Argentina hasta el centro occidental de Bolivia (Müller, J. 2006).



Figura 1-5. Especie vegetal *Baccharis tola*.

- **Antecedentes farmacológicos y etnofarmacológicos**

La utilizan para diversas dolencias, dolores musculares (Freyre *et al.*, 2007).

Baccharis boliviensis

Descripción botánico y distribución

Es un arbusto de 0.1 a 1m de altitud, brotes verdes o cafés verdosos, hojas de 0.5 a 4 cm de longitud, 0.3 a 0.2 cm de ancho. Distribución andina, desde el sur del Perú (Arequipa y Cuzco) hasta el norte de Chile y oeste de Argentina. Está ampliamente distribuida en Bolivia en regiones de gran altura exceptuando lugares muy húmedos (2500 a 4200 msnm) (Müller, 2006).



Figura 1-6. Especie vegetal *Baccharis boliviensis*.

- **Antecedentes farmacológicos y etnofarmacológicos**

La utilizan para tratar diferentes problemas infecciosos (Freyre *et al.*, 2007).

Baccharis papillosa

Descripción botánico y distribución

La *Baccharis papillosa* es un arbusto de 0.3 – 2 m de altura; de brotes verdes, grises o gris-oliva, poco resinosos y densos. La forma de las hojas es variada, puede ser obovada, casi circular, raramente oblanceolada o elíptica, generalmente obtusa o truncada en el ápice, entera o con margen de hasta 2 a 4 dientes o lóbulos obtusos. Presenta entre 10 y 60 flores (Escóbar, 2008). Distribución andina, desde el sur del Perú hasta el norte de Chile y oeste de Argentina. Está ampliamente distribuida en Bolivia en regiones de gran altura exceptuando lugares muy húmedos (2500 a 4200 msnm) (Müller, 2006).



Figura 1-7. Especie vegetal *Baccharis papillosa*.

- Antecedentes farmacológicos y etnofarmacológicos

Tradicionalmente la usan en decocción de las partes aéreas para tratar el reumatismo, mareos, resfríos, cólico estomacal, cólico hepático, enfermedades del hígado, heridas, úlceras y problemas nerviosos. También usan las hojas maceradas en alcohol sobre regiones dérmicas inflamadas, cumpliendo una función antiinflamatoria y cicatrizante (Ceccherelli, 2004; Tene *et al.*, 2007).

1.3. Justificación

A nivel mundial las investigaciones acerca del uso de plantas han demostrado que representan cerca del 25% del total de las prescripciones médicas en los países industrializados y cerca del 80% del arsenal terapéutico en los países en vías de desarrollo (WHO/IUCN/WWF 1993). La industria farmacéutica y en general el mercado de productos terapéuticos, no solo han reconocido a las plantas como fuente de compuestos con actividad biológica, sino también como materia prima para la preparación de productos fitoterapéuticos y/o cosmeceúticos, productos que tienen como base un extracto o fitocomplejo de una planta, cuyo uso y comercialización están en franca expansión a nivel mundial (Cañigueral *et al.*, 2003).

En los países desarrollados, se ha evidenciado un crecimiento acelerado del mercado de productos naturales fitoterapéuticos y cosmeceúticos. Desde el año 2001, en siete de los países más industrializados del mundo-Canadá, Francia, Alemania, Italia, Rusia, Reino Unido y Estados Unidos – formulaciones de extractos derivados de 1350 plantas fueron ampliamente comercializadas. De estas, 202 formulaciones fueron elaboradas en base a compuestos puros, mientras que el resto fueron elaboradas a partir de extractos preparados en base a varias farmacopeas (Bombardelli, 2001). Sin embargo, a pesar del gran potencial de la biodiversidad vegetal de Sudamérica pocos productos en base a plantas de la región han alcanzado los mercados de países industrializados (Desmarchelier, 2010), aspecto atribuido principalmente a la falta de estudios científico-clínicos que respalden su uso y eficacia, así como a la escasa planificación apropiada que respalde su desarrollo sostenible.

Los flavonoides y compuestos fenólicos presentes del género *Baccharis* son constituyentes que participan en su actividad biológica, teniendo diversas aplicaciones en la medicina, agricultura e industria. Con respecto a la salud humana, muchas de las propiedades terapéuticas encontradas de la especie *Baccharis*, corresponden a aquellas atribuidas a los flavonoides, lo cual pone a estas plantas y a estos metabolitos secundarios en una posición de interés, ante la posibilidad de la generación de información que pueda conducirnos a entender en mejor forma su aplicabilidad y funcionalidad. Así, se consideró importante, realizar una identificación de compuestos fenólicos específicos, así como una determinación de la variación cuantitativa, de los flavonoides y compuestos fenólicos simples en especies del género *Baccharis*, producida por cambios medio ambientales tales como por cambios de altitud y estación del año, entre otros, lo cual constituirá un aporte importante para el desarrollo de un producto fitoterapéutico a partir de *B. latifolia* y un producto cosmeceútico, fotoprotector a partir de *B. papillosa*, ya que se requiere determinar las mejores condiciones medioambientales para la producción de principios activos en las plantas de potencial interés industrial y medicinal.

Además, esta parte se constituye en parte importante de la contribución del grupo de química bio-orgánica a los proyectos multidisciplinarios: “Desarrollo de productos cosmeceúticos a partir de plantas del departamento de La Paz” y “Desarrollo de Productos Fitoterapéuticos parte IV y parte V”, en los cuales además de ver el estudio cuantitativo de los flavonoides se determinará las variaciones morfológicas anatómicas (Instituto Biología Molecular y Biotecnología), variaciones fisicoquímicas del suelo (Instituto de Ecología Unidad Suelos) y variaciones de radiaciones UV (Instituto de Física), tratando de determinar en todos los casos su influencia en la producción de principios activos en la planta.

2.1. Objetivo general

Evaluar la variación de flavonoides, producida por cambios de altitud y de estación, de dos *Baccharis* con potencial fitoterapéutico y/o cosmeceútico del valle de La Paz.

2.2. Objetivos específicos

1. Seleccionar dos especies con potencial fitoterapéutico y/o cosmeceútico en base a antecedentes científicos, tradicionales y un estudio preliminar de compuestos fenólicos simples y flavonoides de cinco *Baccharis* del Valle de La Paz
2. Evaluar el contenido de flavonoides totales en las dos especies seleccionadas recolectadas en diferentes estaciones y alturas, por el método colorimétrico con $AlCl_3$ por espectroscopia UV-Vis.
3. Seleccionar e identificar compuestos mayoritarios en las dos especies seleccionadas para estudios de influencia de altitud y estación en su producción
4. Evaluar cuantitativamente los compuestos mayoritarios seleccionados, en las especies recolectadas en diferentes estaciones y alturas, por cromatografía HPLC.

3.1. Equipos y reactivos

Equipos

En la Tabla 3-1 se da detalles de los equipos empleados durante el transcurso del trabajo.

Tabla 3-1. Equipos de uso habitual durante el transcurso del trabajo.

Equipo	Características	Ubicación
Rotaevaporador	Heidolph Laborota 4011	IIQ – UMSA
Espectrofotómetro UV	Genesys 10S UV-VIS	IIQ – UMSA
HPLC	Agilent 1100 series	IIQ – UMSA
Lampara UV	254 – 365 nm	IIQ – UMSA
Termoplato con control de temperatura	Heidolph Laborota 4011	IIQ – UMSA
Balanza analítica	Precisa XT 120 ^a	IIQ – UMSA
Resonancia Magnética Nuclear	Bruker 300 MHz	IIQ – UMSA

Solventes y Reactivos

En las Tabla 3-2 y Tabla 3-3 se da un detalle característico de los solventes y reactivos empleados durante el transcurso de todo el trabajo, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio Bioorganica-IIQ, gracias a los proyectos: “Estudio de la Biodiversidad Vegetal”, “Desarrollo de productos cosmeceúticos a partir de plantas del departamento de La Paz” financiado con fondos IDH y “Biomoléculas de Interés Medicinal e Industrial Anticancer” financiado con fondos ASDI.

Tabla 3-2. Solventes utilizados durante el transcurso del trabajo.

Solvente	Pureza	Aplicación
Etanol	Comercial 96° GL	Obtención de extractos
Metanol	Grado HPLC	Preparación de las muestras - HPLC
Acetonitrilo	Grado HPLC	Fase móvil – HPLC
Agua	Ultra purificada	Fase móvil – HPLC

Tabla 3-3. Reactivos utilizados habitualmente durante el trabajo realizado.

Reactivo	Pureza	Aplicación
<u>Reactivo de Dragendorff</u>		
Carbonato de bismuto	pa	Identificación de alcaloides
Yoduro de sodio	pa	
Ácido cético glacial	pa	
Acetato de sodio	pa	
<u>Reactivo de Lierberman Buchard</u>		
Anhídrido acético		Identificación de triterpenos y/o esteroides
Cloroformo	pa	
Ácido sulfúrico	98%	
<u>Reactivo de Borntrager</u>		
Ácido sulfúrico	98%	Identificación de quinonas
Cloruro férrico	96%	
Hidróxido de amonio	pa	
<u>Cloruro férrico</u>		
Cloruro férrico	96%	Identificación de compuestos fenólicos
<u>Reactivo de Fehling</u>		
Sulfato de cobre	98%	Identificación de azúcares reductores
Tartrato de sodio potasio	pa	
Hidróxido de sodio	99%	
<u>Reactivo de Shinoda</u>		
Magnesio	metálico	Identificación de flavonoides
Zinc	metálico	
Ácido clorhídrico	37%	Condiciones de la columna de HPLC
Ácido fórmico	pa 98 – 100%	
<u>Estándares</u>		
Luteolina	Sigma – Aldrich 98 – 100%	Curva de calibración UV y HPLC
Acacetina	Sigma – Aldrich 98 – 100%	Curva de calibración – HPLC
Drupanina	Aislado – purificado	Curva de calibración – HPLC
5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1)	Aislado – purificado	Curva de calibración – HPLC
5,7,4'-trihidroxi-flavonol (Bpap A-11)	Aislado – purificado	Curva de calibración – HPLC

Acetato de potasio	pa	Análisis espectral y cuantificación – UV
Cloruro de aluminio	pa	Análisis espectral y cuantificación – UV

3.2. Material vegetal

3.2.1. Colecta de las especies vegetales

Las cinco especies vegetales del género *Baccharis* se colectaron del Campus universitario de Cota Cota, en otoño (marzo) de 2014 a una altura de 3600 m.s.n.m. (Figura 3-1).



Figura 3-1. Las 5 especies vegetales del género *Baccharis*

Posteriormente las 5 especies colectadas fueron trasladadas al laboratorio de Bioorgánica y secadas a temperatura ambiente luego se emplearon las hojas para su estudio. Por otro lado las dos especies vegetales de *Baccharis papillosa* y *Baccharis latifolia* fueron recolectadas de la ladera de Lluto desde verano del 2013 (diciembre), otoño de 2014 (marzo), invierno del 2014 (junio) hasta primavera del 2014 (septiembre), y en tres alturas diferentes situadas a 4182 (alto), 4000 (intermedio) y 3825 (bajo) m.s.n.m. Cada muestra colectada fue depositada e identificada en el Herbario Nacional de Bolivia por la Lic. Esther Valenzuela.

3.2.2. Descripción de la zona de recolección de las especies vegetales de *Baccharis*

El perfil químico de las especies vegetales varía respecto a las condiciones ambientales como; estaciones del año y alturas (Bohm, 1987; Bryant & Julkunen – Tiitto, 1995). Para el

desarrollo del presente trabajo y con la colaboración del Jardín Botánico del Herbario Nacional de Bolivia se ha escogido dos zonas de trabajo Campus Universitario de Cota Cota (Figura 3-2) debido a que existe una abundancia de las especies de interés, y por otro lado la ladera de la localidad de Lluto en la cual se escogieron tres zonas de estudio a diferentes alturas (Figura 3-3), el lugar está situado al sur de la Ciudad de La Paz y se caracteriza por ser una zona abierta poco intervenida con unas características medioambientales que favorecen la producción de las especies de interés.



Figura 3-2. Localización de la zona de estudio de los 5 especies vegetales de *Baccharis* (*B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. pentlandii*, *B. boliviensis* y *B. tola*).



Figura 3-3. Localización de la zona de trabajo de dos especies a diferentes altitudes y estaciones del año (*B. latifolia* y *B. papillosa*).

3.3. Métodos

3.3.1. Obtención de extractos de las especies vegetales

De acuerdo estudios realizados sobre las especies *Baccharis latifolia* (Almanza. *et al.*, 2012) y *Baccharis papillosa* (Curi, 2012), en el laboratorio de Bioorgánica del Instituto de Investigaciones Químicas, hay presencia de flavonoides y ácidos fenólicos en ambas especies, que son los compuestos de interés en el presente estudio. Además, se determinó que una extracción etanólica por maceración durante 15 minutos extrae la mayor proporción de estos compuestos.

Siguiendo el mismo método se procedió a la extracción mediante una trituración manual de las hojas pesando 1 g de la planta seca (tres réplicas) de las especies, para luego realizar una extracción por maceración durante 15 min con 15 mL de etanol al 96°GL, concentrando el extracto por rotaevaporación hasta eliminación del solvente (Figura 3-4).

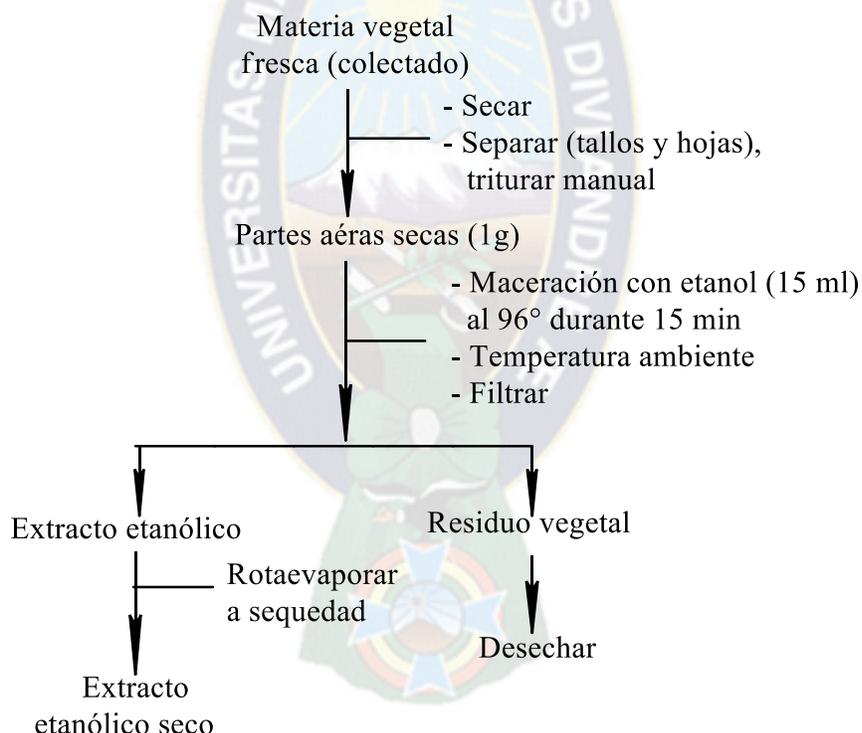


Figura 3-4. Esquema para obtención de los extractos de las especies vegetales

3.3.2. Métodos de identificación; screening fitoquímico cualitativo de metabolitos secundarios

Para la determinación de grupos de metabolitos secundarios y azúcares en los extractos etanólicos de las especies se realizó un screening fitoquímico cualitativo mediante reacciones

colorimétricas y de precipitaciones en tubos de ensayo, buscando principalmente respuestas positivas para flavonoides y compuestos fenólicos mediante la reacción con los reactivos de Shinoda y cloruro férrico (Tabla 3-4), (Brunenton, 1991).

Tabla 3-4. Ensayos para la identificación de metabolitos secundarios

Ensayo	Metabolitos
Dragendorff	Alcaloides
Lieberman Buchard	Triterpenos y/o esteroides
Borntrager	Quinonas
Cloruro férrico	Fenólicos
Fehling	Azúcares reductores
Espuma	Saponinas
Shinoda	Flavonoides

3.3.3. Evaluación de flavonoides totales por espectrofotometría UV- visible

Para la determinación de los flavonoides totales en los extractos por espectroscopia UV se siguió el método descrito por Mamen D. (2012), que consiste en la preparación de 0,5 ml de solución de flavonoide estándar (luteolina), con 1,5 ml de etanol destilado 96°GL. A la solución se adiciona 2.8 ml de agua destilada, 0,1 ml de 10% de solución de $AlCl_3$ (w/v), y 0,1 ml de 1 M de solución de acetato de potasio, causando la formación de un complejo amarillo intenso con quercetina, luteolina, ERF y extractos etanólicos de los 5 especies *Baccharis* (Figura 3-5). La solución se incubó durante 30 – 40 min y después se sometió a análisis espectral en el rango de 200 a 500 nm.

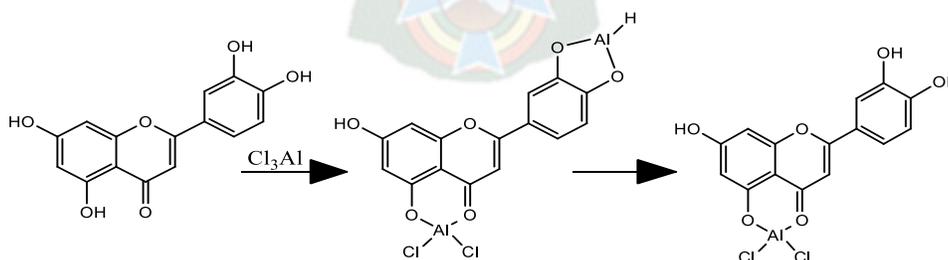


Figura 3-5. Formación del complejo de coordinación de color amarillo debido a la quelación del aluminio con la flavona luteolina en la presencia o ausencia de ácido.

Para la cuantificación de flavonoides en las muestras se tomaron 30 μL del volumen de la muestra (extracto) aforado a 5 mL, se añadió 1700 μL de etanol 96°GL y luego se sigue el procedimiento descrito en párrafo anterior (Figura 3-6).

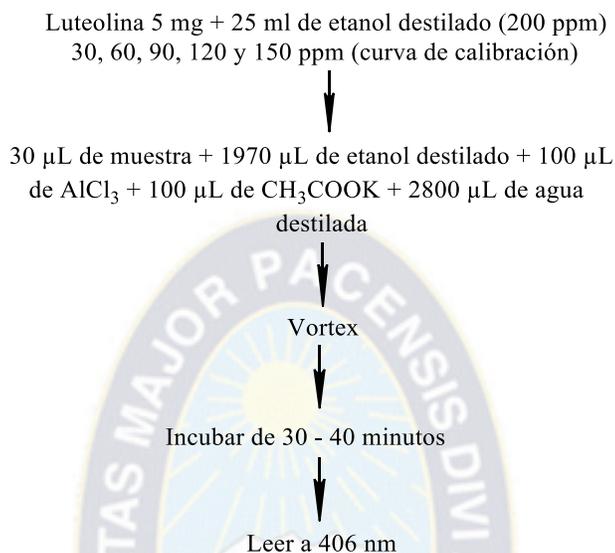


Figura 3-6. Diagrama de cuantificación de flavonoides

3.3.4. Separación y aislamiento de la luteolina y acetina de la especie *Baccharis latifolia*

Para la separación y aislamiento de la luteolina y acetina, compuestos mayoritarios de la especie *Baccharis latifolia*, se utilizó dos técnicas cromatográficas de separación: cromatografía líquida al vacío o Vacuum liquid Chromatography (VLC) y cromatografía de exclusión molecular Sephadex LH-20, las cuales fueron utilizadas repetidas veces para aislar los compuestos, debido a que la especie vegetal *Baccharis latifolia* tiene muchos flavonoides de estructura similar. Una vez aislados fueron comparados, con estándares de acetina y la luteolina comprados de Sigma-Aldrich, mediante cromatografía en capa fina (TLC) y RMN 1D. Los estándares comprados fueron utilizados en las curvas de calibración para los estudios por HPLC.

3.3.5. Separación y aislamiento de compuestos de la especie *Baccharis papillosa*.

Para la separación y aislamiento de compuestos mayoritarios de especie de *Baccharis papillosa*, se utilizó dos técnicas cromatográficas de separación: cromatografía líquida al vacío (VLC) y Sephadex LH-20, lográndose aislar e identificar 6 compuestos: Bpap A-1,

Bpap A-2, Bpap A-6, Bpap A-7, Bpap A-9 y Bpap A-11. En la **Figura 3-7** se da un detalle del proceso del aislamiento empleando ambas cromatografías.

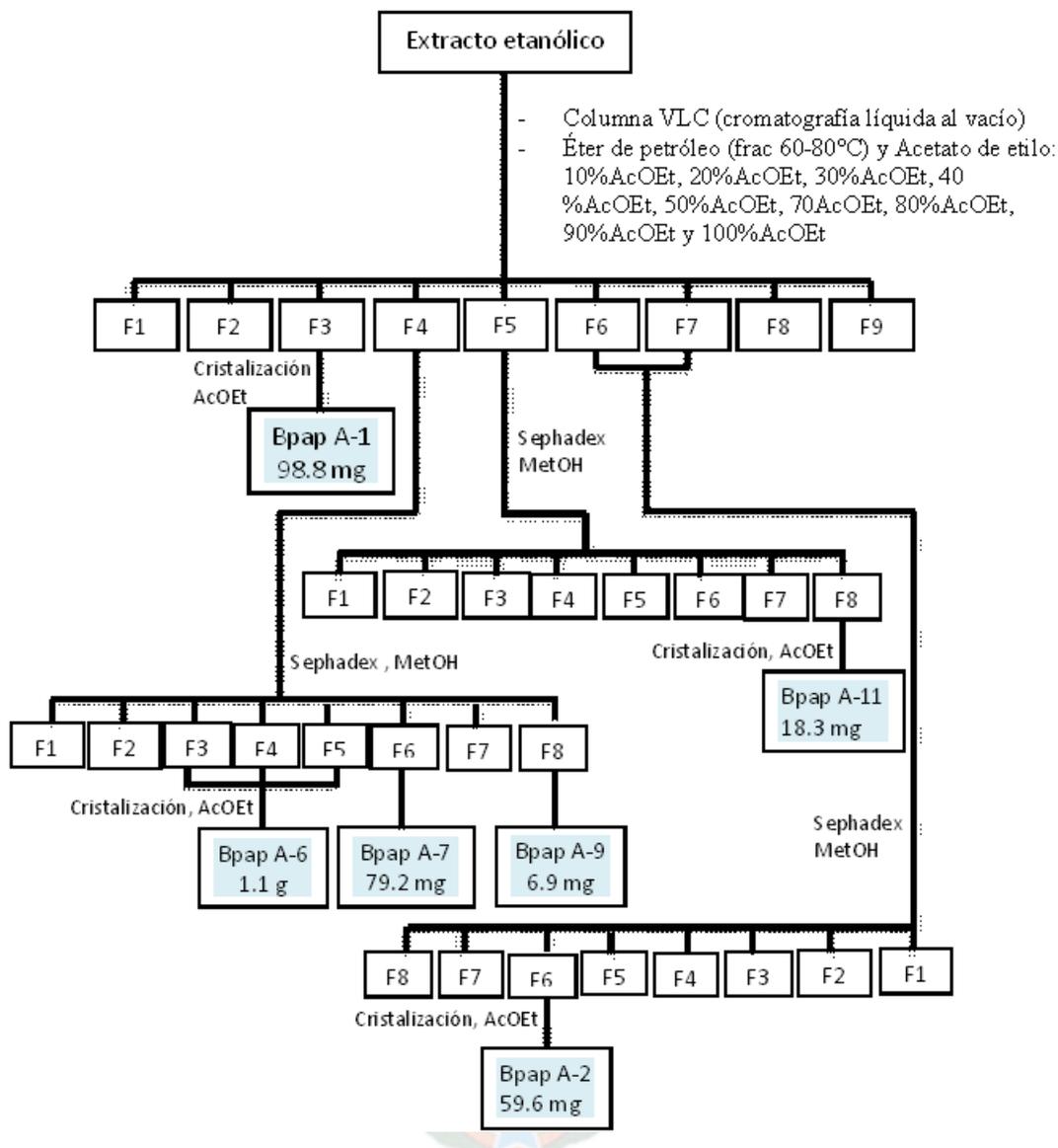


Figura 3-7. Aislamiento de compuestos de la especie vegetal *B. papillosa*

3.3.6. Identificación de compuestos aislados de *Baccharis papillosa*.

Los compuestos aislados fueron identificados principalmente mediante técnicas de RMN 1D y 2D, así como por comparación con patrones de laboratorio.

Los compuestos *5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona* (Bpap A-1), *5,7,5',4-tetrahidroxi-3-metoxiflavona* (Bpap A-2), *ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico* (Bpap A-6) y el compuesto

5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-9), fueron identificados en base a una comparación de datos de RMN 1D con los datos obtenidos de estos compuestos en la misma planta por Escobar Z. (2008) y Curi C. (2012), Los datos de comparación de RMN ^1H y RMN ^{13}C correspondientes se pueden observar en las tablas 4-7, 4-9, 4-11 y 4-15.

Los dos nuevos compuestos aislados en este estudio fueron identificados por las siguientes técnicas espectroscópicas y cromatográficas: RMN, HPLC y UV.

Compuesto 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavonol (Bpap A-7)

Cristales amarillos, $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_6$ (PM 300.3 g/mol); UV (c. 0.04 g/L. en EtOH); λ max 265 (absorbancia 0.75); λ max 365 (absorbancia 0.88), RMN ^1H (300 MHz, en CCl_3D), RMN ^{13}C (300 MHz en CCl_3D), ver Tabla 4-13; HPLC (t_{R} 26.985 min).

Compuesto 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavonol (Bpap A-11)

Cristales amarillos, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_6$ (PM 286.2 g/mol); UV (c. 0.04 g/L. en MeOH); λ max 265 (absorbancia 0.80); λ max 367 (absorbancia 0.98), RMN ^1H (300 MHz, en CCl_3D), RMN ^{13}C (300 MHz en CCl_3D), ver Tabla 4-17; HPLC (t_{R} 18.493 min).

3.3.7. Evaluación e identificación de flavonoides y ácidos fenólicos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

En Ciencias Químicas – UMSA, mención Productos Naturales “Estudio químico, antiinflamatorio y antioxidante de flavonoides mayoritarios de *Baccharis latifolia* (chilca) y *Arachis hypogaea* (maní)” en fase de redacción de tesis de maestría de la Lic. Ángela San Martín. Se evaluó un método de análisis para flavonoides y compuestos fenólicos simples en los extractos etanólicos de las hojas de *Baccharis*, a partir de un método desarrollado por Nassima Talhaoui *et al.*, fue efectuado en un equipo HPLC Agilent 1100 Series, que consta de un desgasificador de vacío, inyector manual, una bomba cuaternaria, un detector conformado por un arreglo de diodos (diode array detector, DAD) y múltiple longitud de onda. Las separaciones se realizó en una columna ZORBAX Eclipse Plus (fase reversa) C_{18} de 4.6 x 250 mm d.i., 5 μm a 25 °C y 370.4, 310.8, 280 nm de longitud de onda, empleando como fase móvil un sistema de gradiente: ácido fosfórico pH = 2 (solvente C) y acetonitrilo (solvente D); 0 min, 25% de D; 5 min, 28% de D; 10 min, 30% de D; 17 min, 32.5% de D; 20 min, 36% de D; 25 min, 42% de D; 33 min, 44.8% de D; 40 min, 53.5% de D; 60 min, 100% de D y un flujo constante de 0,6 ml/min durante todo el gradiente. En la cual se inyectó 25 μL de muestra, las cromatogramas HPLC se muestran en las figuras 4-5 y 4-6. Para la inyección de las muestras, los extractos obtenidos se aforaron a 5 mL con metnol grado HPLC y se filtró con un filtro de membrana PTFE de 0.45 μm .

Con los compuestos aislados se realizó su determinación de t_R utilizando el método descrito y luego se realizó la curva de calibración empleando el compuesto a las concentraciones y considerando la absorbancia en UV.

En base a la curva de calibración de cada compuesto se cuantificó el contenido de la luteolina, acacetina en los extractos de *Baccharis latifolia*, por otro lado drupanina, 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-11) y 5,7-trihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1) en el extracto de *Baccharis papillosa*. Empleando como estándar externo los mismos compuestos en base a curvas de calibración (ANEXO II).

Las estructuras químicas de los estándares empleados se muestran en la Figura 3-8.

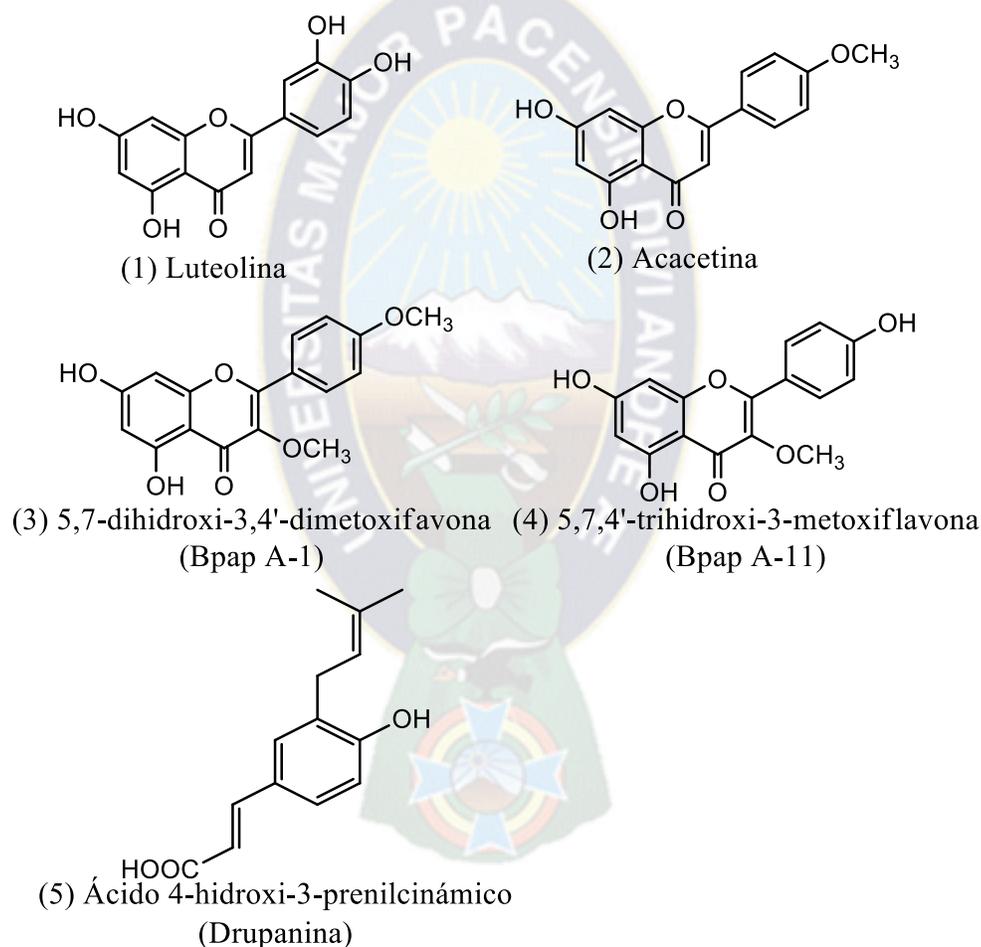


Figura 3-8. Flavonoides y un derivado de ácido cinámico estudiados (1 – 4 flavonoides y 5 derivado de ácido cinámico)

3.3.8. Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos efectuados en este estudio, han sido realizados mediante el programa estadístico SPSS – PASW statistics 18.

En relación al procedimiento para cuantificar la variabilidad del metabolismo secundario (flavonoides), y debido a la no normalidad de los datos, se decidió utilizar test no paramétricos. Los resultados se sometieron al test de Kruskal-Wallis para determinar si existían diferencias significativas entre estaciones y altitudinal para ambos métodos de evaluación UV y HPLC. Para establecer entre qué estación y alturas. Las diferencias se consideraron significativas con un nivel de significancia $p \leq 0,05$.



Capítulo 4 (Resultados y discusiones)

El género *Baccharis* es el género más grande de la familia Compositae, con más de 500 especies distribuidas en el continente americano (Abad & Bermejo, 2007). En Bolivia, varias especies de este género crecen sobre los 3.000 m.s.n.m. y son usadas en la medicina tradicional (Almanza *et al.*, 2012; Salcedo *et al.*, 2014). Estudios fitoquímicos de este género han determinado como principales componentes a los diterpenos, flavonoides y otros compuestos fenólicos simples (Abad & Bermejo, 2007). Los flavonoides y compuestos fenólicos simples presentes en el género *Baccharis* son constituyentes que participan en su actividad biológica (De Oliveira *et al.*, 2014; Rodriguez *et al.*, 2013), teniendo diversas aplicaciones en la medicina, agricultura e industria. Con respecto a la salud humana, muchas de las propiedades terapéuticas encontradas de la especie *Baccharis*, corresponden a aquellas atribuidas a los flavonoides, lo cual pone a estas plantas y a estos metabolitos secundarios en una posición de interés, ante la posibilidad de la generación de información que pueda conducirnos a entender de mejor forma su aplicabilidad y funcionalidad.

Por lo expuesto, se consideró importante, realizar una identificación de compuestos fenólicos específicos, así como una determinación de la variación cuantitativa, de los flavonoides y compuestos fenólicos simples en especies seleccionadas del género *Baccharis*, variación producida por cambios medio ambientales tales como cambios por altitud y estación del año, entre otros, lo cual constituirá un aporte importante para el desarrollo de productos con valor agregado de especies seleccionadas, como *B. latifolia* de la cual se desarrolló industrialmente un producto fitoterapéutico con propiedades antiinflamatorias (Almanza *et al.*, 2012) y que requiere la determinación de las mejores condiciones medioambientales para la producción de principios activos.

En el presente trabajo decidimos empezar el estudio con cinco *Baccharis* de amplia disponibilidad física en el Valle de La Paz (*Baccharis latifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis boliviensis*, *Baccharis tola* y *Baccharis pentlandii*) de las cuales se realizó una evaluación de antecedentes científicos, tradicionales y contenido de flavonoides, lo cual está descrito en el Artículo I de ésta tesis “Evaluación del contenido de flavonoides y de la actividad antibacteriana de cinco especies de *Baccharis* de Bolivia” (ANEXO VII).

A partir de esta evaluación se seleccionó dos especies: *Baccharis papillosa* y *Baccharis latifolia*, de las cuales se evaluó el contenido de flavonoides totales, así como de marcadores químicos seleccionados en diferentes estaciones del año y a diferentes alturas en la Localidad de Lluto, una ladera con una gran pendiente y alta disponibilidad física de las dos especies seleccionadas. Ver artículo II “Cambios por altitud y posición de flavonoides totales en hojas de *Baccharis latifolia* (chilca) y su correlación con propiedades fisicoquímicas del suelo” y

manuscrito III “Cambios por altitud y estación de compuestos fenólicos en hojas de *Baccharis papillosa* subsp. *papillosa*”.

4.1. Selección dos especies con potencial fitoterapéutico y/o cosmeceutico

Estudio fitoquímico preliminar

Cinco especies del género *Baccharis* se recolectaron en el campus universitario de Cota-Cota, en otoño (marzo) de 2014, a una altura de 3600 m.s.n.m. A partir de 1 g de planta seca y utilizando 15 mL de etanol 96° para una extracción por maceración se obtuvo los extractos etanólicos para el análisis fitoquímico preliminar.

Los resultados del estudio fitoquímico preliminar de los metabolitos en los extractos etanólicos de 5 *Baccharis* se muestran en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, donde se puede observar que, en general, estas especies poseen principalmente: triterpenos y/o esteroides, compuestos fenólicos, y flavonoides.

Tabla 4-1. Estudio químico preliminar de extractos etanólicos de 5 *Baccharis*

Ensayo/ Metabolitos	<i>B. latifolia</i>	<i>B. papillosa</i>	<i>B. boliviensis</i>	<i>B. pentlandii</i>	<i>B. tola</i>
Dragendorff/ Alcaloides	(±)	(±)	(±)	(+)	(±)
Lieberman Buchard / Triterpenos y/o esteroides	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+++)
Borotrager/Quinonas	(-)	(-)	(±)	(++)	(+++)
Cloruro férrico / fenólicos	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(+++)
Fehling/azucars reductores	(+)	(±)	(+)	(±)	(++)
Espuma / saponinas	(-)	(±)	(-)	(-)	(±)
Shinoda/ Flavonoides	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)

(±) presencia dudosa, (+) presencia en poca cantidad, (++) presencia clara, (+++) presencia en gran cantidad

Cuantificación de flavonoides totales

Para la cuantificación los flavonoides totales en las muestras de *Baccharis*, se utilizó el método de quelación con AlCl₃, esta cuantificación se realiza normalmente respecto a un estándar, el más utilizado es quercetina, por lo que inicialmente se realizó un barrido del desplazamiento batocrómico de la muestra estándar de quercetina para la determinación de la longitud de onda a la máxima absorbancia, el barrido se realizó del compuesto sin quelar y quelado con AlCl₃ como se muestra a continuación en la figura siguiente:

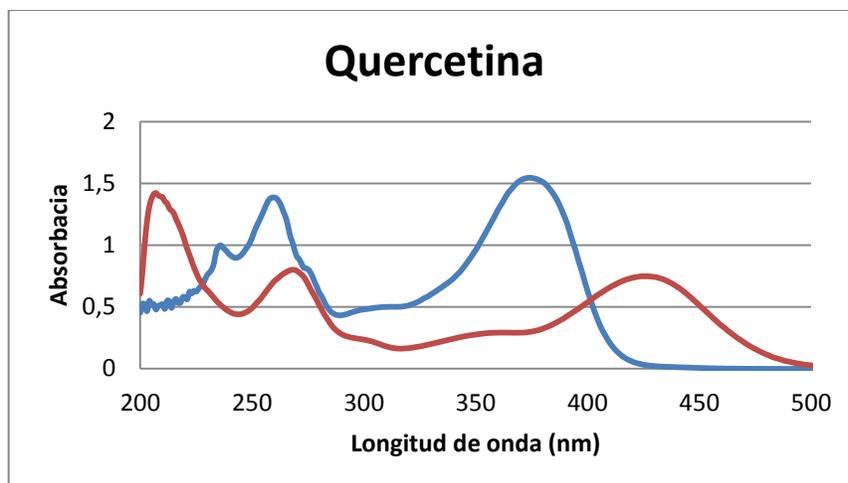


Figura 4-1. Desplazamiento batocrómico de la quercetina por quelación con AlCl₃

En la figura 4-1, se puede observar que en el espectro de absorción del compuesto sin quelar, color azul, tenemos las dos bandas características de un flavonoide, la banda más intensa tiene una longitud de onda máxima a 374 nm, ésta banda sufre un desplazamiento batocrómico, con la formación de un complejo resultante de la quelación con AlCl₃, color rojo, dando una banda con una longitud de onda máxima a 427 nm.

Por otro lado, se realizó el estudio del desplazamiento batocrómico con AlCl₃ de la muestra estándar Luteolina, uno de los compuestos mayoritarios determinados en *Baccharis latifolia* (Almanza *et. al.*, 2012), para lo cual se realizó el barrido sin quelar (azul) y quelado (rojo), como se observa en la Figura 4-2.

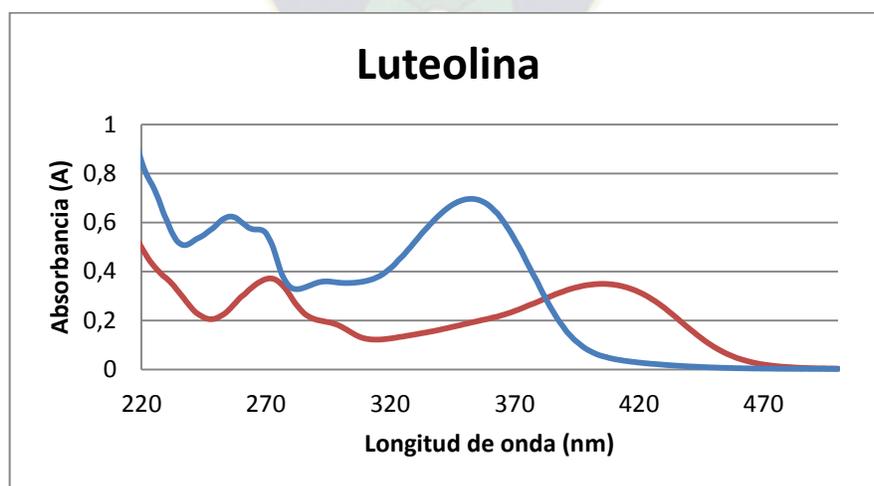


Figura 4-2. Desplazamiento batocrómico de la luteolina por quelación con AlCl₃

En la Figura 4-2 también se puede apreciar las dos bandas características de un flavonoide en el espectro de barrido sin quelar (azul), la banda más intensa tiene una longitud de onda máxima de 352 nm sin la quelación y sufre un desplazamiento batocrómico por quelación con AlCl_3 a una longitud de onda máxima de 406 nm.

Luego se prepararon extractos etanólicos y fracciones enriquecidas en flavonoides y derivados de ácido cinámico por Sephadex (EFS). Las EFS corresponden a la unión de las últimas fracciones de columnas en Sephadex LH-20, considerando que los flavonoides y derivados de ácido cinámico son moléculas pequeñas que se eluiden en las últimas fracciones de una columna de separación por exclusión molecular.

Las EFS fueron luego sometidas a un análisis de su desplazamiento batocrómico por quelación con AlCl_3 dando los espectros de la figura 4-3.

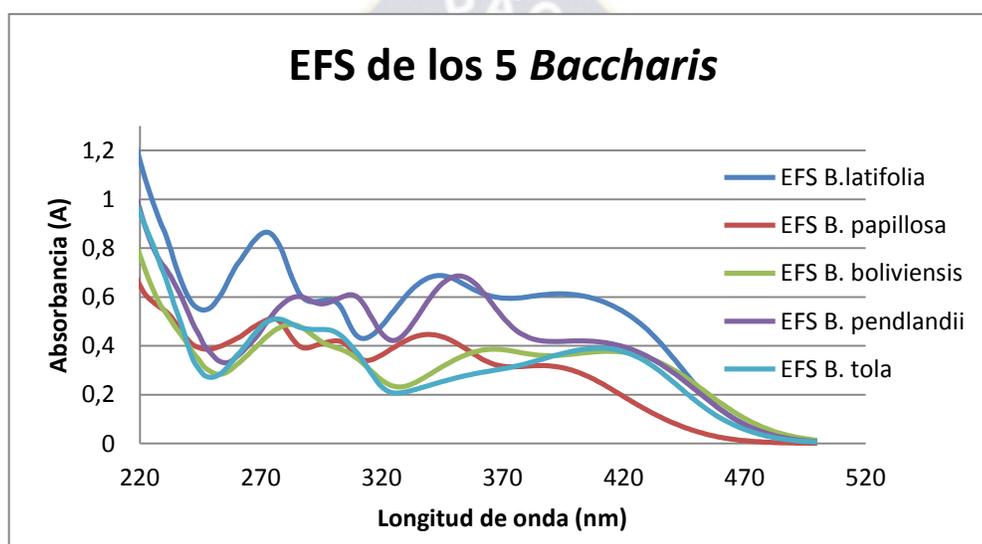


Figura 4-3. Desplazamiento batocrómico de las EFS por quelación con AlCl_3

En la siguiente tabla se puede observar las absorbancias y la longitud de onda de máxima absorción de la última banda de las fracciones enriquecidas por sephadex (EFS) de los cinco *Baccharis* (Tabla 4-2)

Tabla 4-2. Absorbancia y λ_{max} de la última banda de las EFS queladas con AlCl_3

EFS <i>B. lat.</i>		EFS <i>B. pap.</i>		EFS <i>B. bol.</i>		EFS <i>B. pend.</i>		EFS <i>B. thola.</i>	
Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}	Abs	λ_{max}
0,613	395	0,319	388	0,378	413	0,420	400	0,391	410

Por lo tanto, en base a las longitudes de onda (λ_{max}) de los espectros de absorción por quelación con AlCl_3 de las EFS de las 5 *Baccharis* se escogió a la luteolina, porque la λ_{max} de las últimas bandas de las EFS queladas están en un rango de 388 – 413 nm, y el de la

Luteolina quelada está en 406 nm, mientras que el de la quercetina esta 427 nm. Entonces, para la cuantificación de flavonoides totales en las muestras de extractos etanólicos y EFS se utilizará la luteolina como referencia. Así los datos serán dados en mg de Flavonoides Totales equivalente a Luteolina por g de extracto (mg FT eq a Lu/g de Ex), para lo cual se utilizó la curva de calibración del estándar de Luteolina dada en (ANEXO I).

En la Figura 4-4 y Tabla 4-3 se muestra el contenido de flavonoides totales equivalentes a luteolina cuantificados en EE y EFS de las 5 *Baccharis*, que han sido muestreados en otoño (marzo) del 2014. Los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias cuantitativas significativas ($p \leq 0.05$) entre las 5 especies de *Baccharis* elegidas para selección de dos especies en este estudio. La especie *Baccharis latifolia* presenta mayor cantidad de flavonoides en EE y EFS, seguida por *Baccharis tola*, *Baccharis boliviensis*, *Baccharis papillosa* y finalmente la especie *Baccharis pentlandii*.

Tabla 4-3. Flavonoides totales en EE y EFS en hojas de 5 *Baccharis* de Bolivia.

Especies	mg FT eq Lu/g EE	mg FT eq Lu/g EFS
<i>Baccharis latifolia</i>	85,86 ± 3,35 ^a	397,12 ± 8,89 ^a
<i>Baccharis tola</i>	82,83 ± 4,48 ^b	349,33 ± 5,84 ^b
<i>Baccharis boliviensis</i>	78,57 ± 2,45 ^c	338,80 ± 12,98 ^c
<i>Baccharis papillosa</i>	68,45 ± 5,90 ^d	296,68 ± 2,99 ^d
<i>Baccharis pentlandii</i>	53,06 ± 6,32 ^e	260,43 ± 8,20 ^e

Valores expresados como promedio ± la Desviación Estándar (DE)

^{a,b,c,d,e} diferentes letras significan diferencias significativas en hojas de las 5 especies *Baccharis*, $p \leq 0.05$.

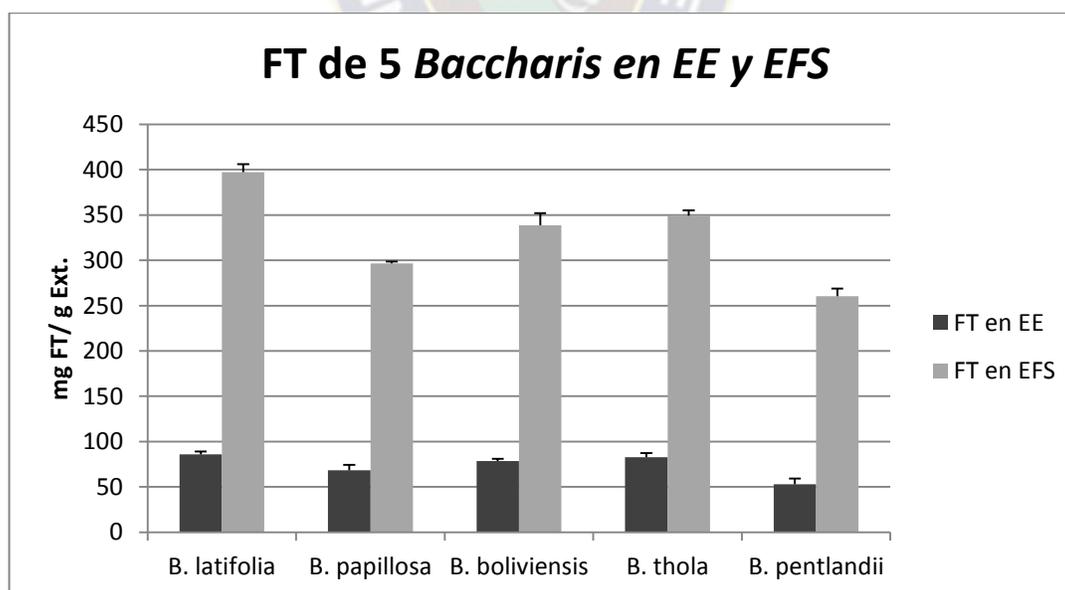


Figura 4-4. Flavonoides totales (mg FT/g Ext.) obtenidos en muestras de EE y EFS de las 5 especies *Baccharis*.

De acuerdo a los antecedentes bibliográficos (Calle *et al.*, 2012; Escobar *et al.*, 2009), las especies del género *Baccharis* producen flavonoides y derivados de ácido cinámico, entre sus metabolitos secundarios mayoritarios. Por esto, se hizo un análisis de los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC de EFS de las 5 *Baccharis*, para hacer una evaluación cualitativa y semi-cuantitativa de estos compuestos en los EFS. Los perfiles fueron analizados a dos longitudes de onda, a $\lambda = 370$ nm, para analizar principalmente el contenido de flavonoides, ya que la segunda banda característica de flavonoides normalmente muestra absorbancia a ésta longitud de onda, y a $\lambda = 315$ nm para analizar principalmente el contenido de derivados de ácido cinámico, porque estos compuestos presentan una banda ancha característica con un λ_{max} alrededor de 315 nm. (Figura 4-5 y Figura 4-6).

En la Figura 4-5 se observan los cromatogramas de los EFS a $\lambda = 370$ nm, donde, de acuerdo a un análisis de los espectros UV de cada pico, se asignaron con números las señales correspondientes a los flavonoides. Así, la figura 4-5 muestra que el extracto con mayor cantidad y variedad de flavonoides es el extracto de *B. latifolia* seguido en orden de complejidad por los EFS de las siguientes especies *Baccharis tola* \geq *Baccharis boliviensis*, $>$ *Bacchari papillosa* $>$ *Baccharis pentlandii*.

En la Figura 4-6 están los cromatogramas de los EFS a $\lambda = 315$ nm, donde, de acuerdo a un análisis de los espectros UV de cada pico, se asignaron con números las señales correspondientes a los derivados de ácido cinámico, los números se pusieron con un 0 previo al número para distinguirlos de los números correspondientes a los flavonoides. El análisis de esta figura nos muestra que el EFS que muestra mayor cantidad y variedad de derivados de ácido cinámico es el de *B. papillosa*.

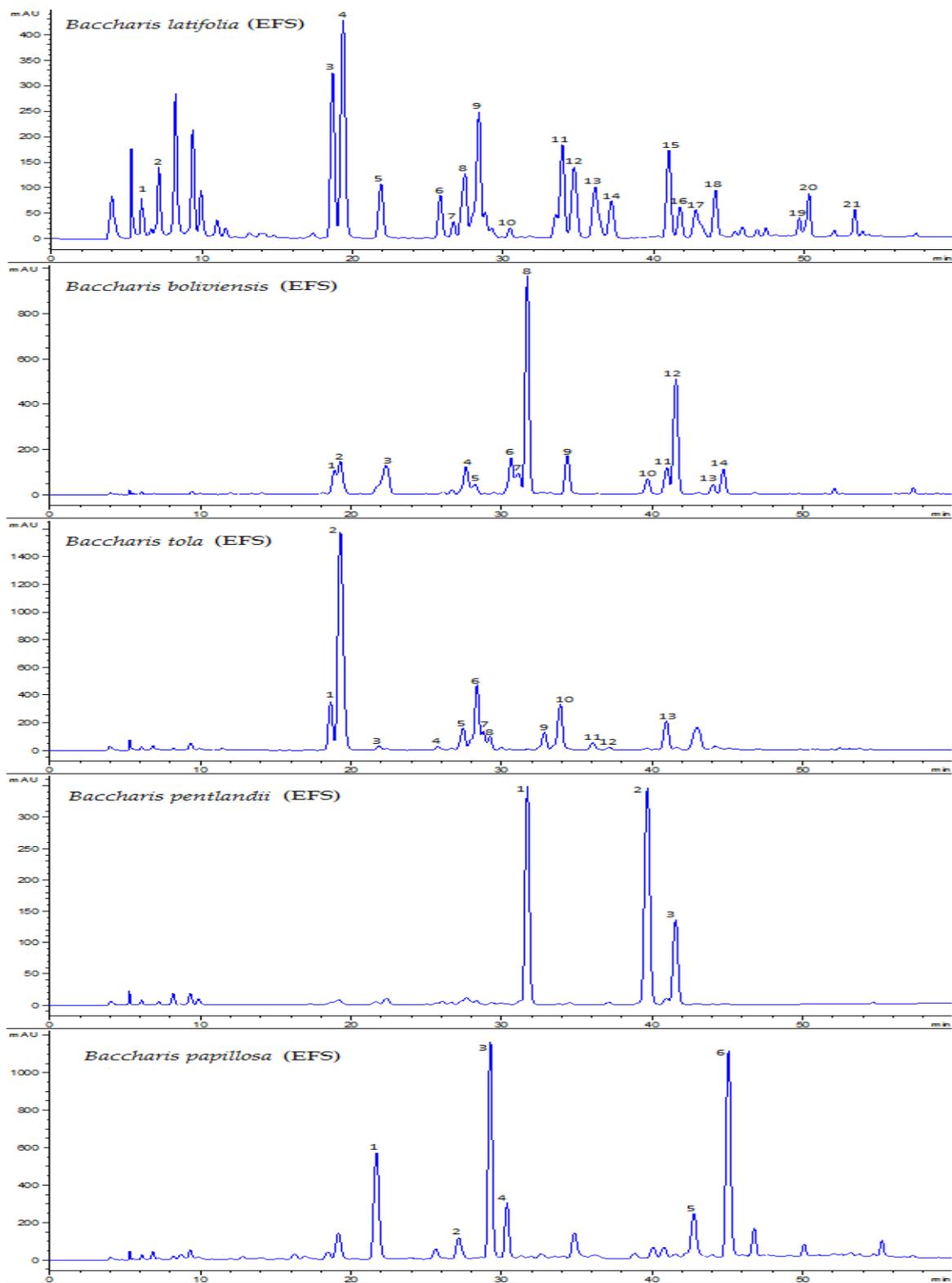


Figura 4-5. Cromatogramas a 370 nm de las EFS de las 5 *Baccharis* en estudio

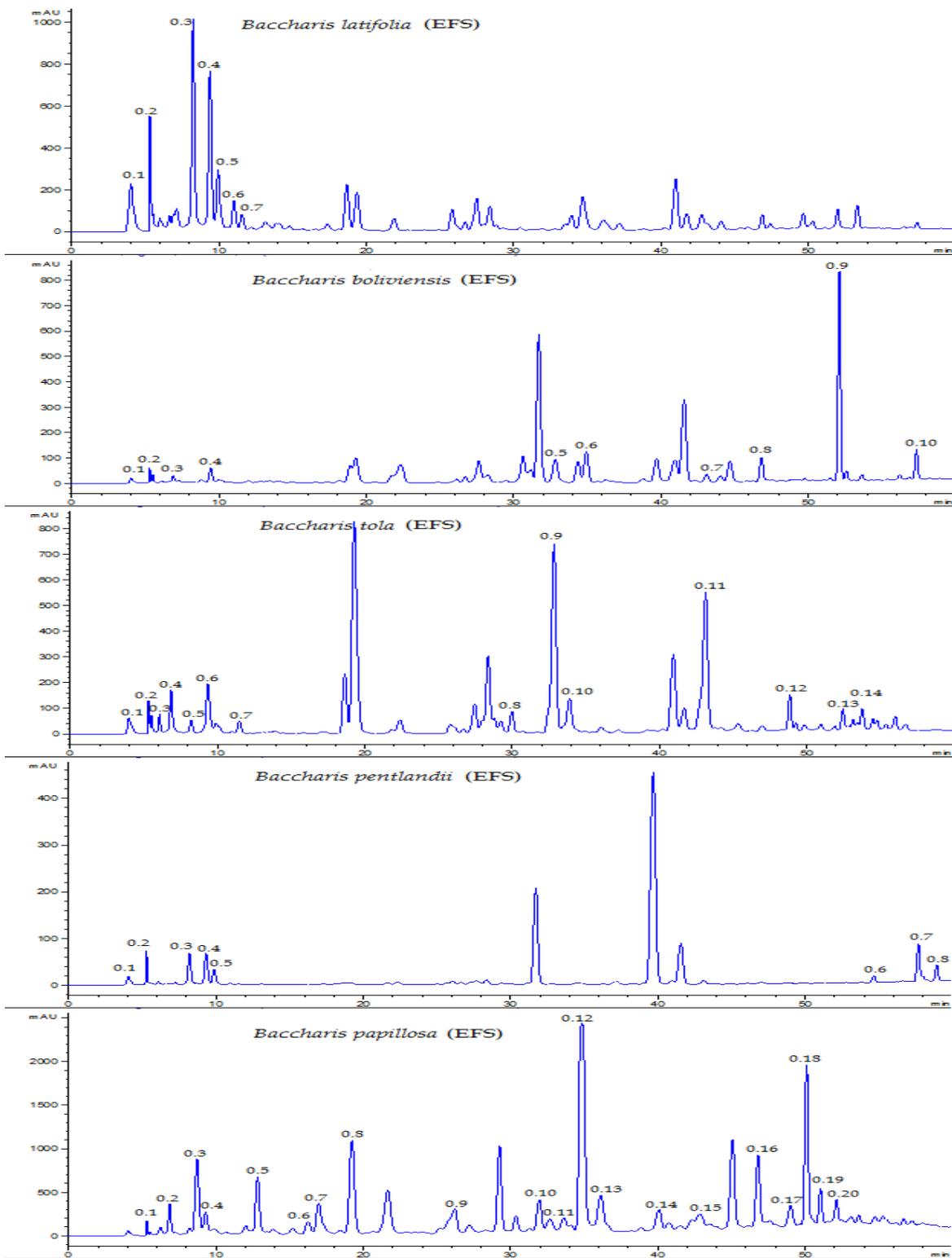


Figura 4-6. Cromatogramas a 315 nm de las EFS de las 5 *Baccharis* en estudio

Finalmente, como parte de la selección de extractos, se realizó un estudio preliminar de su potencial fotoprotector mediante la medición del área bajo la curva de absorción de los espectros UV de los extractos etanólicos (EE) y las fracciones enriquecidas en flavonoides (EFS) en soluciones a 80 ppm, utilizando como disolvente metanol, obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 4-4 (Tesis Cecilia Curi) donde se observa que el extracto con mayor absorbancia en las regiones UVB y UVA, es el extracto de *B. papillosa*, seguido del extracto de *B. latifolia*. La alta absorbancia en la región UVB es atribuible principalmente a la alta concentración de derivados de ácido cinámico observados en la Figura 4-6.

Tabla 4-4. Determinación de la absorbancia en las regiones UVA (320-400 nm) y UVB (280-320 nm).

Áreas debajo de las curvas de absorción a 80 ppm				
Especie	Muestra	Área		
		Total (270--400)	UVB (280--320)	UVA (320--400)
<i>B. papillosa</i>	EE	134,02	70,43	51,75
	EFS	152,10	78,09	59,96
<i>B. latifolia</i>	EE	88,90	36,57	43,82
	EFS	108,77	44,12	53,70
<i>B. boliviensis</i>	EE	42,92	13,72	24,61
	EFS	61,11	25,28	29,13
<i>B. pentlandii</i>	EE	62,04	23,82	30,46
	EFS	72,58	28,30	35,63
<i>B. tola</i>	EE	54,82	23,13	25,89
	EFS	59,99	24,81	28,73

Finalmente, es importante mencionar que *B. latifolia* tiene varios estudios científicos que demuestran su actividad analgésica y antiinflamatoria, en base a los cuales se está realizando la producción industrial del producto “Chillkaflam” (Almanza *et al.*, 2012) y que estudios previos de *B. papillosa* (Tesis Cecilia Curi, 2012) muestran que ésta especie tiene un gran potencial como producto fotoprotector.

Por tanto, en base a todos los estudios arriba mencionados, se seleccionó dos especies para los estudios posteriores más profundos: *Baccharis latifolia* y *Baccharis papillosa*.

4.2. Evaluación del contenido de flavonoides totales en las dos especies seleccionadas recolectadas en diferentes estaciones y alturas.

Las hojas de las especies vegetales, *Baccharis papillosa* y *Baccharis latifolia*, seleccionadas en este estudio, fueron recolectadas durante un año en la ladera de la Localidad de Lluto, concretamente desde el verano del 2013 hasta la primavera del 2014. Para englobar a las estaciones: verano (diciembre) de 2013, otoño (marzo) de 2014, invierno (junio) de 2014 y

primavera (septiembre) de 2014, las áreas de colecta del estudio están situadas a las siguientes alturas: más alto de 4182 m.s.n.m. (S 16°35'23,1''; W 68°00'08,2''), intermedio de 4000 m.s.n.m. (S 16°35'24,0''; W 68°00'42,6'') y más bajo de 3825 m.s.n.m. (S 16° 35'18,1''; W 68°01'10,6''). En cada estación se recogieron muestras aleatorias de hojas de *B. latifolia* y *B. papillosa* de especímenes seleccionados y marcados.

Las muestras colectadas de las especies de *Baccharis* fueron depositadas en el Herbario Nacional de Bolivia, donde fueron identificadas por la Lic. Esther Valenzuela.

La cuantificación de flavonoides totales se realizó mediante la formación de un complejo resultante de la quelación con Cl_3Al (Anexo I), utilizando como estándar de referencia la luteolina, adquirida de Sigma – Aldrich de pureza 98 – 100%, uno de los compuestos mayoritarios de la especie vegetal de *Baccharis latifolia*.

El resultado del tratamiento de la solución de flavonoide (luteolina) con AlCl_3 produce un desplazamiento batocrómico y una intensificación (efecto hipsocrómico) de los picos derivados de la absorción UV del anillo B del núcleo flavonoide (Mabry, Markham & Thomas, 1970). El segundo pico característico de la flavona se desplaza de λ_{max} 351 → 406 nm, por lo que 406 nm, fue la longitud de onda utilizada para las determinaciones cuantitativas de flavonoides en los extractos etanólicos de las dos especies de *Baccharis* seleccionadas (Figuras 4.2 y 4.3). Por lo tanto, los resultados son reportados en mg de Flavonoides Totales equivalentes a Luteolina por 100g de extracto (mg FT eq a Lu/100 g de Ex).

4.2.1. Variación cuantitativa de flavonoides totales en 4 estaciones y en diferentes altitudes en hojas de *Baccharis papillosa*

Las muestras colectadas de *B. papillosa*, en diferentes estaciones y altitudes, fueron evaluadas por el método descrito de determinación de Flavonoides Totales respecto a la Luteolina, dando los resultados expresados, en mg de Flavonoides Totales equivalentes a Luteolina por 100g de Planta Seca, Tabla 4-5.

Los resultados ponen de manifiesto que existe una diferencia cuantitativa significativa entre las diferentes estaciones y diferentes alturas estudiadas en la Localidad de Lluto.

Tabla 4-5. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de *Baccharis papillosa*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio (n=4x3x3=36).

	Altitud (m)	Flavonoides totales (mg/100 g PS) respecto a la luteolina ± SD
Verano 2013	4182	653,027±1,621 ^a
	4000	518,022±0,016 ^e

	3825	473,993±0,358 ⁱ
Otoño 2014	4182	647,921±9,201 ^{b,a}
	4000	516,376±5,734 ^{f,e}
	3825	469,345±4,442 ^{j,i}
Invierno 2014	4182	597,991±7,256 ^c
	4000	595,344±9,771 ^g
	3825	549,570±10,645 ^k
Primavera 2014	4182	794,120±7,484 ^d
	4000	685,623±7,006 ^h
	3825	606,701±8,566 ^l

Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

Si realizamos un análisis de los datos presentados en la Tabla 4-5 y en la Figura 4-7 se puede determinar que en general la especie produce mayor cantidad de flavonoides a mayor altura, esto probablemente se deba a que a mayor altura hay mayor incidencia de radiación UV solar, que puede ser dañina para la planta por lo que biosintetizaría estos compuestos como uno de los mecanismos de fotoprotección (Strack, D. 1997). Sin embargo, se observa menor variación en invierno, esto es concordante con otros resultados encontrados en estudios realizados en invierno de *B. latifolia* en la misma ladera (Manuscrito II), donde se determinó que en invierno pueden existir otros factores determinantes para la generación de estos metabolitos, como el agua. La región más baja es más húmeda, por lo que en invierno la producción de flavonoides en la zona más baja casi se nivela con el de las zonas altas (607 mgFT/100g PS en la zona más alta; 615 mgFT/100g PS en la zona media y 696 mgFT/100g PS en la zona baja) e inclusive puede sobrepasar a la de regiones más elevadas, porque en ésta época del año el agua es un factor determinante.

Por otra parte, considerando la producción en las diferentes estaciones, se puede ver que la mayor producción se da en Primavera, esto probablemente se deba a que, de acuerdo a sus etapas fenológicas, son hojas nuevas que no tienen mucho estrés hídrico y deben protegerse de agentes fitopatógenos, además de la Radiación UV. En cada estación son diferentes los aspectos medioambientales de la planta, pero entre otoño e invierno del año 2014 probablemente no existieron muchos cambios por lo que su contenido de flavonoides no varía de manera significativa.

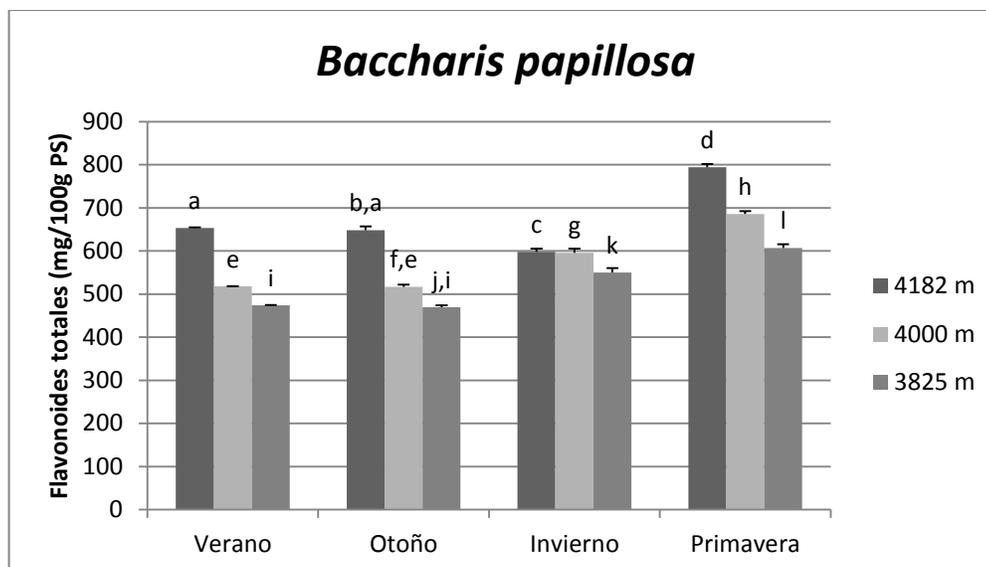


Figura 4-7. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de *Baccharis papillosa*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio (n=4x3x3=36). Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

4.2.2. Variación cuantitativa de flavonoides en las 4 estaciones y en diferentes altitudes de producción en hojas de *Baccharis latifolia*.

En la Tabla 4.6 se muestran los resultados de la producción de Flavonoides Totales a diferentes altitudes y estaciones

En verano 2013 y en otoño 2014, no se pudo muestrear la especie vegetal *Baccharis latifolia* en la altura más alta, a 4182 m.s.n.m. de la localidad de Lluto, debido a que los especímenes fueron afectados por un hongo y las hojas estaban muy dañadas.

Tabla 4-6. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de *Baccharis latifolia*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio.

	Altitud (m)	Flavonoides totales (mg/g PS) respecto a la luteolina \pm SD
Verano 2013	4182	nd
	4000	707,660 \pm 0,050 ^a
	3825	492,801 \pm 2,914 ^e
Otoño 2014	4182	nd
	4000	662,899 \pm 0,093 ^b
	3825	477,738 \pm 8,434 ^f
Invierno 2014	4182	524,168 \pm 6,176 ⁱ
	4000	467,446 \pm 7,584 ^c

	3825	393,452±8,957 ^g
Primavera 2014	4182	783,708±8,400 ^j
	4000	675,883±3,016 ^d
	3825	656,152±9,057 ^h

nd = no determinado. Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

En las Figura 4-8 se muestra la suma total de flavonoides (mg/100g PS) cuantificados en hojas de *B. latifolia*, que han sido muestreados desde el verano del 2013 hasta la primavera del 2014 en la ladera de la Localidad de Lluto. Los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias cuantitativas significativas entre las tres alturas elegidas para realizar este estudio, como se puede observar también en la Tabla 4-6. Las hojas de la *Baccharis latifolia* que presentan mayor cantidad de flavonoides son las de los especímenes colectados en la zona más alta, a 4182 m.s.n.m., a éstos les sigue los colectados a 4000 m.s.n.m. y finalmente los colectados a 3825 m.s.n.m. la que tiene menor cantidad.

Si realizamos el análisis estacional en la Figura 4-8 y la Tabla 4-6, existe una diferencia cuantitativa significativa en la producción de flavonoides entre las 4 estaciones, estando su síntesis potenciada durante el verano y primavera de los años estudiados, cuando se cuantificaron la mayor cantidad de flavonoides. En invierno se observa la menor producción. Esto es concordante con el hecho de que la producción de metabolitos secundarios varía sustancialmente entre genotipos, cambios estacionales, edades, daños de la hoja y sitios de recolección..

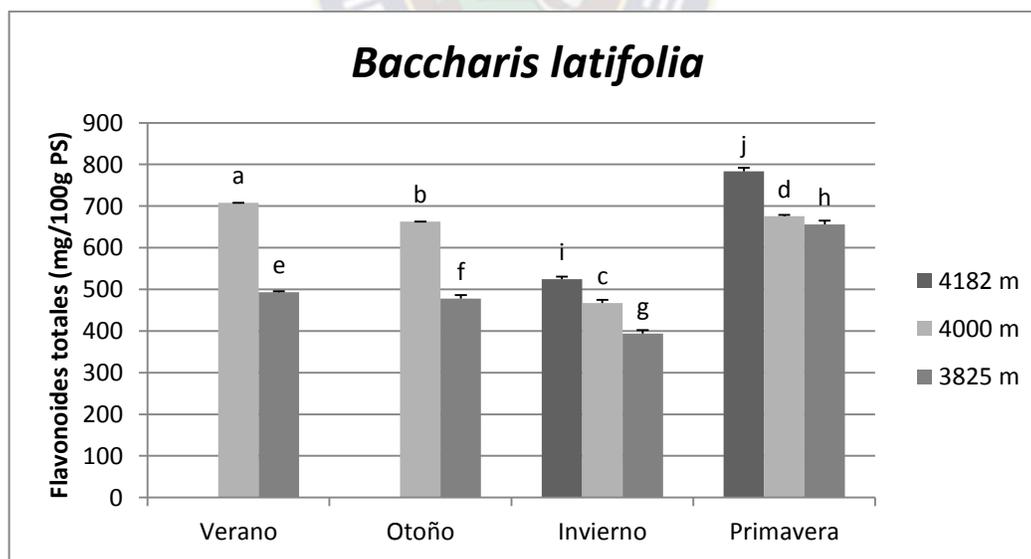


Figura 4-8. Flavonoides totales (mg/100g PS) en hojas de *Baccharis latifolia*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

4.3. Determinación de la influencia de altitud y estación en compuestos mayoritarios seleccionados

En distintas estaciones y de altitudes la síntesis de los flavonoides y otros compuestos fenólicos de las especies vegetales seleccionadas tiene interacción con el ambiente, pudiendo ser ésta modificada por las distintas condiciones ambientales. Todos estos compuestos varían su concentración cuando la planta está bajo diferentes condiciones meteorológicas y ecológicas. En general, la síntesis de fenoles varía y está inducida por factores ecológicos como la radiación UV, estrés hídrico u ozono.

Para seleccionar compuestos mayoritarios de interés para el estudio en las dos especies seleccionadas, inicialmente podemos ver los perfiles cromatográficos HPLC (Figura 4-5 y 4-6) donde se puede observar que el extracto más complejo es el de *Baccharis latifolia*, con un mayor número de flavonoides que el de la especie vegetal *Baccharis papillosa*. Sin embargo, la especie *B. papillosa* tiene un mayor número de derivados de ácido cinámico. Por otra parte, el análisis UV mediante el detector DAD, confirmó que los componentes de todos los extractos EFS evaluados, son derivados de ácido cinámico (una banda de absorción UV ancha alrededor de 315 nm) o flavonoides (dos bandas de absorción UV características una alrededor 280 nm y la otra alrededor de 340 nm).

En el caso de *Baccharis latifolia*, se seleccionaron los flavonoides luteolina y acacetina para los estudios posteriores, porque son compuestos mayoritarios de la especie, con varios antecedentes farmacológicos que justifican el uso tradicional e industrial como antiinflamatorio de la planta (Almanza *et al.*, 2012) y se pudieron adquirir estándares de Sigma-Aldrich. Por otro lado, de la especie *B. papillosa*, se pudo aislar 6 compuestos Bpap A-1, Bpap A-2, Bpap A-6, Bpap A-7, Bpap A-9 y Bpap A-11.

4.3.1. Selección, aislamiento e identificación de compuestos de *B. papillosa*

El extracto etanólico de *B. papillosa* fue sometido a un proceso de fraccionamiento a partir del cual se lograron aislar 6 compuestos. La identificación de los compuestos se realizó principalmente por análisis de sus espectros de RMN 1D y 2D, y por comparación de los datos de RMN obtenidos con los reportados previamente en la bibliografía. Así, se identificó que cuatro corresponden a compuestos previamente aislados de la misma planta en un trabajo previo realizado en nuestro mismo laboratorio por la Escobar Z. (2008) y Curi C. (2012), mientras que los otros dos son nuevos compuestos reportados en la especie.

A continuación se muestra los resultados y se hace una discusión sobre la identificación de cada uno de los 6 compuestos. En el caso de los compuestos ya reportados procedente de la planta *B. papillosa*, solo se muestra la comparación de datos que confirma la identidad de los

mismos, mientras que en el caso de los compuestos no reportados de dicha planta, se hace una discusión más profunda.

Compuesto (B pap A-1): 5,7-dihidroxi- 3,4'-dimetoxiflavona.

El compuesto 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona es un flavonoide de cristales amarillos aislado a partir del extracto etanólico de la especie vegetal *B. papillosa*. Este flavonoide fue anteriormente reportado y aislado como producto de esta planta (Escobar Z., 2008 & Curi C., 2012), por lo que su identificación se basó principalmente en una comparación de datos de RMN ¹³C con los previamente reportados.

La Tabla 4-7 muestra la comparación de desplazamientos químicos de RMN ¹³C de la muestra y del compuesto BP-1 presentado en las tesis de Escobar Z. (2008) y Curi C. (2012). Como se puede observar, los desplazamientos químicos son prácticamente los mismos, por lo que se identificó al B pap A-1 como la 5,7-dihidroxi- 3,4'-dimetoxiflavona.

Tabla 4-7. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ¹³C de B pap A-1 en CDCl₃.

Nº Carbón	δ [ppm] Experimental	δ [ppm] Bibliográfico (Escobar Z. & Curi C.)	Asignación
2	156.11	155.1	C
3	138.53	137.8	C
4	178.68	177.8	C
5	156.98	156.3	C
6	98.87	98.5	CH
7	164.06	164.1	C
8	94.01	93.7	CH
9	161.65	161.0	C
10	105.02	104.2	C
1'	122.63	122.1	C
2'	130.09	129.9	CH
3'	113.99	114.1	CH
4'	161.42	161.2	C
5'	113.99	114.1	CH
6'	130.09	129.9	CH
3-OCH ₃	60.04	59.6	-OCH ₃
4'-OCH ₃	55.31	55.3	-OCH ₃

Los espectros de RMN ^1H y de RMN ^{13}C se presentan en el Anexo III. Las señales de RMN ^1H también confirman que se trata del flavonoide señalado.

Por otro lado, se obtuvo el espectro de absorción del flavonoide mostrado en la Figura 4-9. Este espectro muestra claramente dos bandas de absorción; una de 245 a 279 nm con λ_{max} a 266 nm, y la segunda de 279 a 410 nm con λ_{max} a 347 nm, bandas características de flavonoides.

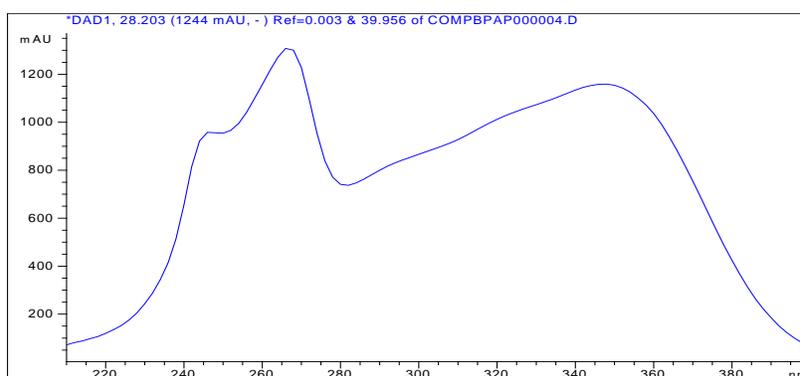


Figura 4-9. Espectros UV del compuestos B pap A-1

Un resumen de algunas características generales y de la estructura del compuesto identificado se presenta en la **Tabla 4-8** y la **Figura 4-10**, respectivamente.

Tabla 4-8. Características generales de B pap A-1

Aspecto	Cristales amarillos
Formula molecular	$\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$
Peso molecular	314.29 g/mol
Nombre Químico	5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona
Nombre comercial	Ermanine

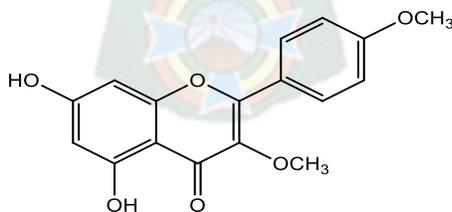


Figura 4-10. 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (B pap A-1)

Compuesto (B pap A-2): 5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona

El compuesto 5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona también fue aislado e identificado anteriormente en la misma planta (Escobar Z., 2008 & Curi C., 2012) por lo que se cuenta con

los datos bibliográficos de los desplazamientos químicos de RMN ^{13}C y de RMN ^1H , con los que se compararon los datos experimentales obtenidos del compuesto aislado (**Tabla 4-9**), determinándose que se trata de la 5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona.

Tabla 4-9. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de Bpap A-2 en CDCl_3

Nº Carbón	δ [ppm] Experimental	δ [ppm] Bibliográfico ^(Escobar z. & Curi C.)	Asignación
2	156.47	155.5	C
3	138.18	137.5	C
4	178.56	177.8	C
5	156.82	156.2	C
6	98.67	98.4	CH
7	163.96	164.0	C
8	93.77	93.5	CH
9	161.24	161.1	C
10	104.76	104.4	C
1'	121.20	120.4	C
2'	121.64	120.7	CH
3'	115.11	115.6	CH
4'	147.99	148.6	C
5'	144.61	145.1	CH
6'	115.07	115.3	CH
3-OCH ₃	59.72	59.6	-OCH ₃

La estructura de este flavonoide cuyos cristales son amarillos, fue corroborada por los datos obtenidos de su espectro de RMN ^1H de RMN ^{13}C mostrado en el Anexo IV.

Finalmente se obtuvo su espectro de absorción ultravioleta mostrado en la Figura 4-11, el cual muestra dos bandas de absorción típicas de flavonoides. La primera banda está entre 237 y 280 nm con un λ_{max} a 255 nm y la segunda entre 280 y 420 nm con un λ_{max} a 356 nm.

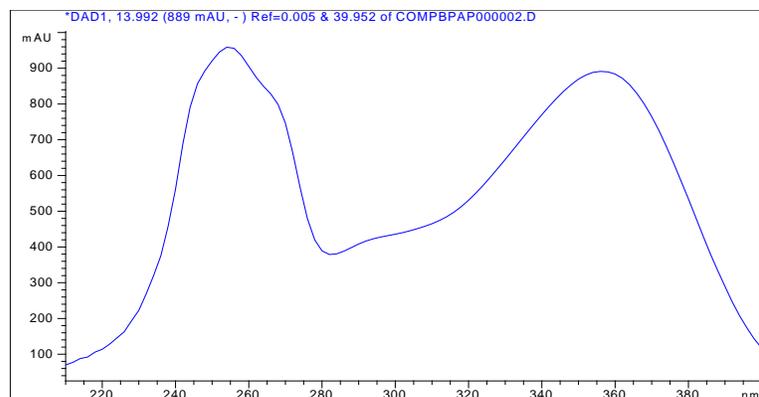


Figura 4-11. Espectros UV del compuesto B pap A-2

Un resumen de algunas características generales y de la estructura química del compuesto identificado se presenta en la Tabla 4-10 y la Figura 4-12, respectivamente.

Tabla 4-10. Características generales de Bpap A-2

Aspecto	Cristales amarillos
Formula molecular	$C_{16}H_{12}O_7$
Peso molecular	316.262 g/mol
Nombre Químico	5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona

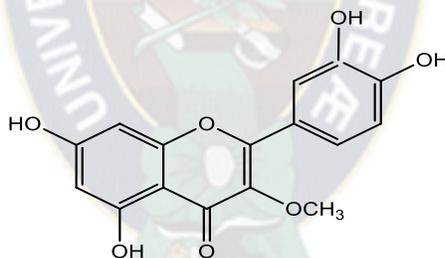


Figura 4-12. 5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona (B pap A-2)

Compuesto (Bpap A-6): Ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico (Drupanina)

El compuesto Bpap A-6 es un derivado prenilado del ácido cinámico, anteriormente aislado en la planta (Escobar Z., 2008 & Curi C., 2012). Se obtuvieron los espectros de 1H y de RMN ^{13}C del compuesto Bpap A-6 (**Anexo V**). Los desplazamientos químicos de ^{13}C del Bpap A-6 son los mismos que los desplazamientos químicos pertenecientes al compuesto fenólico aislado anteriormente (**Tabla 4-11**). Por tal razón y por la demás información espectroscópica obtenida para este compuesto, se determinó que se trata del Ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico.

Tabla 4-11. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de B pap A-6 en CDCl_3

Nº Carbón	δ [ppm] Experimental	δ [ppm] Bibliográfico (Escobar z. & Curi C.)	Asignación
1	125.90	125.2	C
2	129.67	129.6	CH
3	128.55	128.1	C
4	157.17	157.3	C
5	114.17	15.0	CH
6	127.37	127.5	CH
1'	145.97	144.4	CH
2'	115.07	115.2	CH
3'	169.95	167.9	C
1''	28.06	27.9	CH_2
2''	121.66	122.4	CH
3''	133.23	131.5	C
4''	25.60	25.5	CH_3
5''	17.57	17.6	CH_3

El espectro de absorción UV (Figura 4-13) muestra una banda intensa desde 253 a 270 nm con un λ_{max} a 315 nm, característica de compuestos fenólicos.

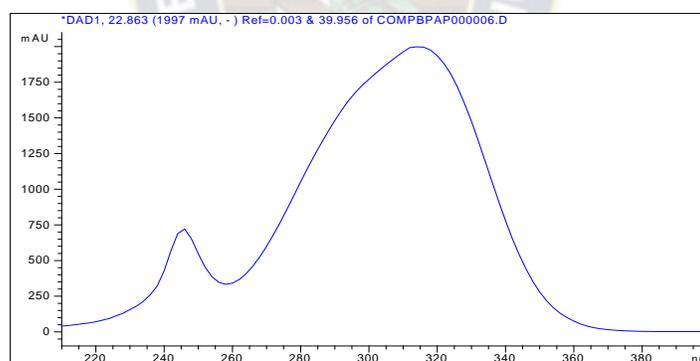


Figura 4-13. Espectros UV del compuestos B pap A-6

En la Tabla 4-12 se presenta un resumen de las características generales del derivado del ácido cinámico y la Figura 4-14 muestra su estructura.

Tabla 4-12. Características generales de B pap A-6

Aspecto	Cristales blancos
Formula molecular	$C_{14}H_{16}O_3$
Peso molecular	232.275 g/mol
Nombre Químico	Ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico
Nombre comercial	Drupanina

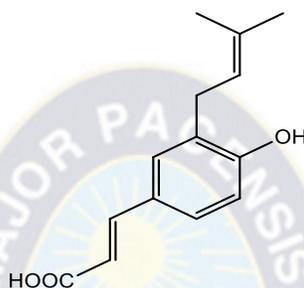


Figura 4-14. Ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico (Bpap A-6)

Compuesto (B pap A-7): 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavinol.

El Bpap A-7 es un flavonoide que no fue aislado previamente de la especie vegetal *B. papillosa*. Este flavonoide se presenta en forma de cristales amarillos. Su estructura química fue elucidada utilizando técnicas espectroscópicas de RMN y UV. En base al análisis de los datos espectroscópicos, se identificó este flavonoide como la 5,7- Dihidroxi-4'-metoxiflavinol.

El espectro de RMN 1H (Figura 4-15) muestra 6 protones aromáticos formando dos sistemas de spin: el primero es un sistema de spin *meta* a δ_H 6.37 *br.s* y δ_H 6.21 *br.s* donde cada señal integra a un protón, que corresponden a los protones H-6 y H-8, respectivamente, acoplados en el anillo A (Figura 4-16).

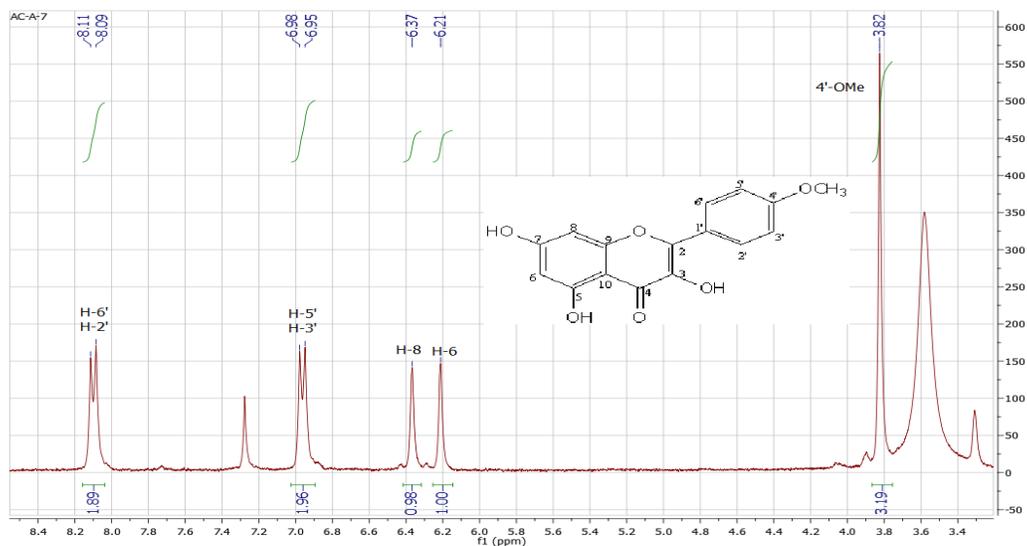


Figura 4-15. Espectro de RMN ^1H de Bpap A-7 en CDCl_3

El anillo B presenta un sistema de spin *orto* a δ_{H} 6.96 *d* ($J = 8.8$ Hz) y a δ_{H} 8.10 *d* ($J = 8.8$ Hz) correspondiente a los protones H-5' y H-3' acoplados a H-6' y H-2', respectivamente. Estos sistemas de spin se corroboraron en el espectro de correlación homonuclear ^1H -COSY (Figura 4-16).

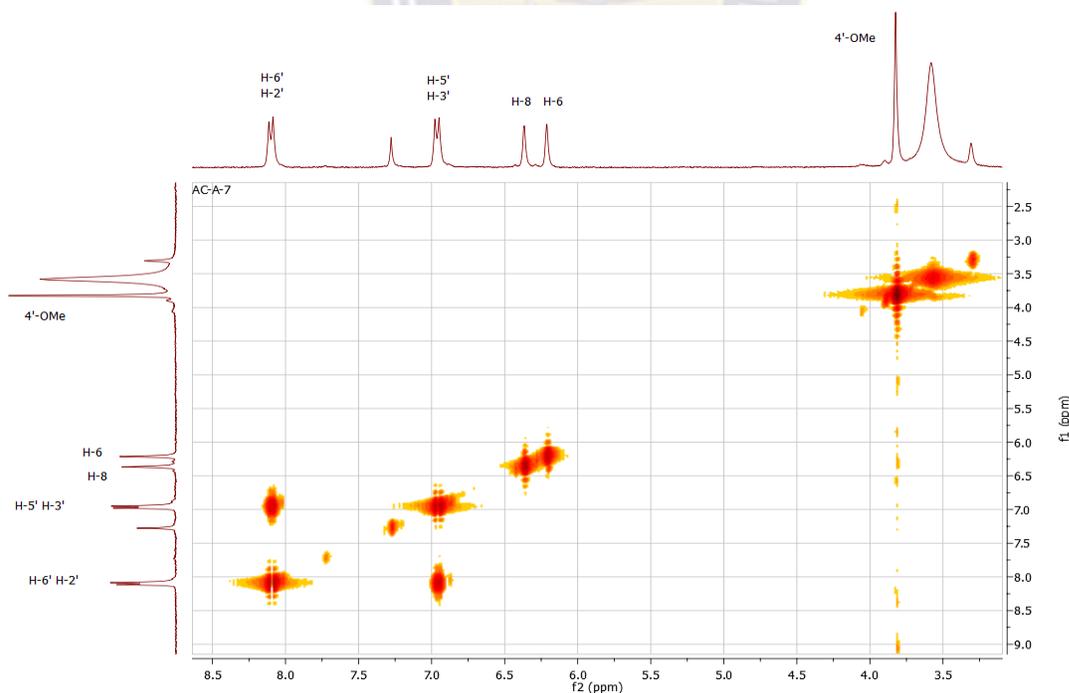


Figura 4-16. Espectro de correlación homonuclear COSY ^1H de Bpap A-7

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 4-17) se distinguen 16 Carbonos: un carbonilo a δ_{C} 175.40 ppm; 14 carbonos aromáticos, desde δ_{C} 93 ppm hasta 165 ppm; y 1 carbono metoxílico a δ_{C} 55.28 ppm. Los tres hidroxilos se encuentran en los carbonos con δ_{C} 135.61, 156.91 y 163.98 ppm.

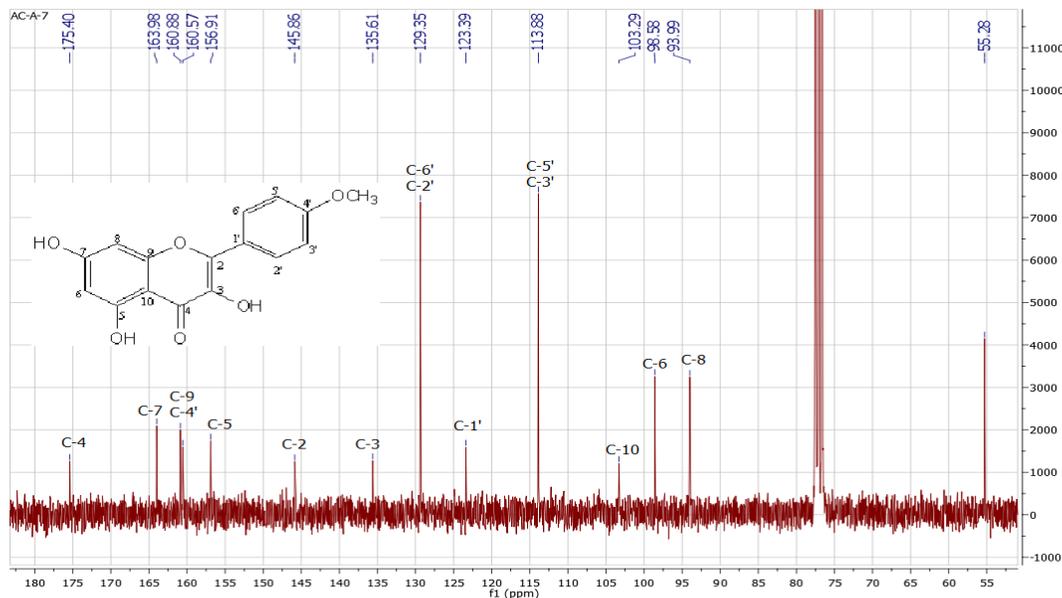


Figura 4-17. Espectro de RMN ^{13}C de Bpap A-7

La asignación de los carbonos enlazados a protones se realizó usando el espectro de correlación HSQC (Figura 4-18), mientras que el resto de los carbonos fueron asignados principalmente en base al espectro HMBC (Figura 4-19). Todas las correlaciones se muestran en la Tabla 4-13. La Figura 4-20 muestra las correlaciones más importantes a larga distancia.

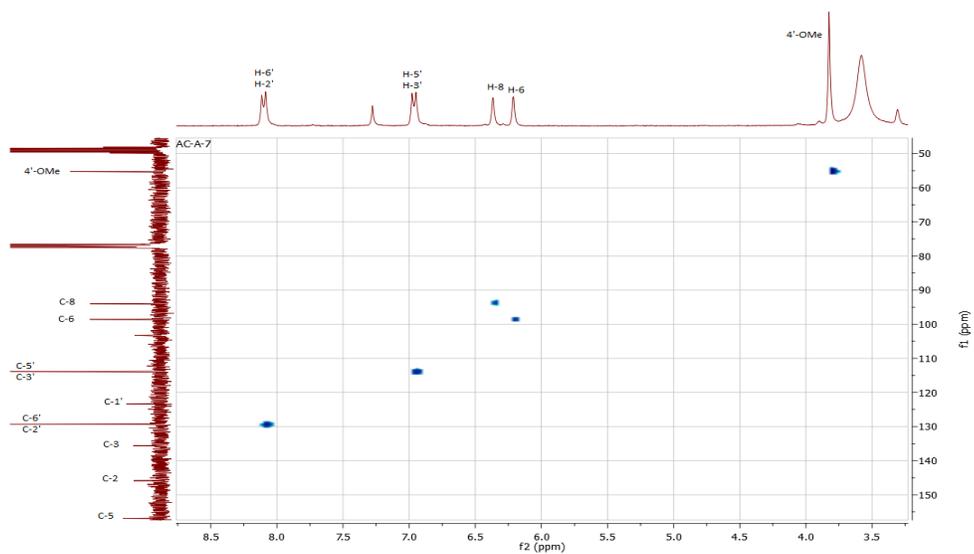


Figura 4-18. Espectro de correlación HSQC de Bpap A-7

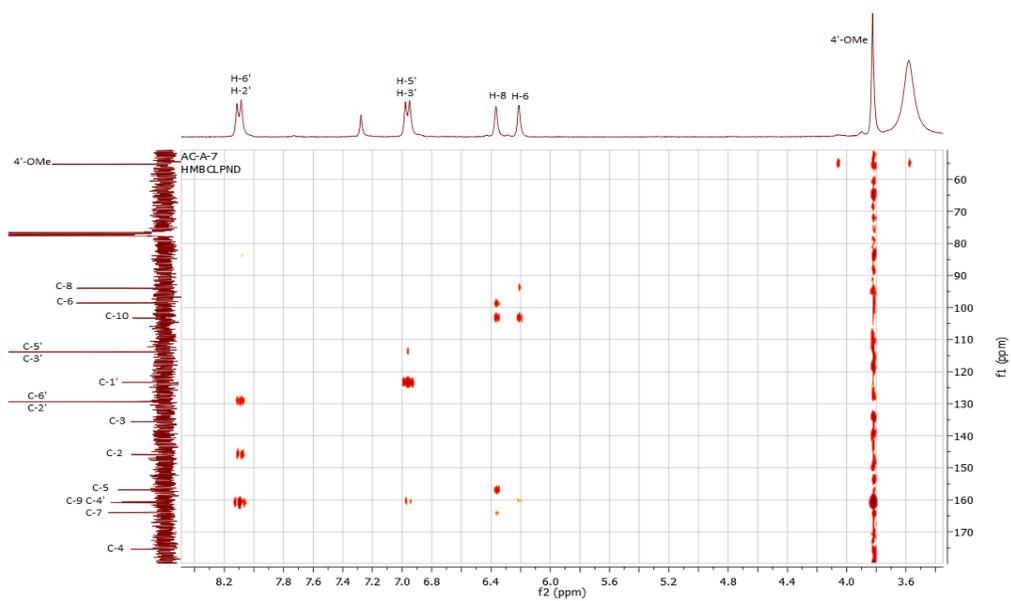


Figura 4-19. Espectro de correlación HMBC de Bpap A-7

Tabla 4-13. $\delta^1\text{H}$ y $\delta^{13}\text{C}$ y correlaciones HMBC de Bpap A-7 en CDCl_3

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)	HMBC
2	145.86		
3	135.61		
4	175.40		
5	156.91		
6	98.58	6.21 s	C-8, C-10
7	163.98		
8	93.99	6.37 s	C-6, C-10
9	160.88		
10	103.29		
1'	123.39		
2'	129.35	8.09 d (8.8)	C-6', C-4', C-2
3'	113.88	6.95 d (8.8)	C-5', C-1'
4'	160.57		
5'	113.88	6.98 d (8.8)	C-3', C-1'
6'	129.35	8.11 d (8.8)	C-2', C-4' C-2
4'-OMe	55.28	3.82 s	C-4'

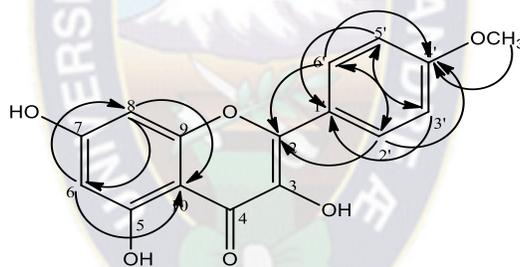


Figura 4-20. Correlaciones HMBC más importantes en Bpap A-7

Por otro lado, se obtuvo el espectro de absorción UV de este flavonoide ver Figura 4-21. Este espectro muestra claramente dos bandas de absorción: una de 237 a 279 nm, con λ_{max} a 265 nm; y la segunda de 279 a 408 nm, con su λ_{max} a 366 nm, bandas que son características de flavonoides.

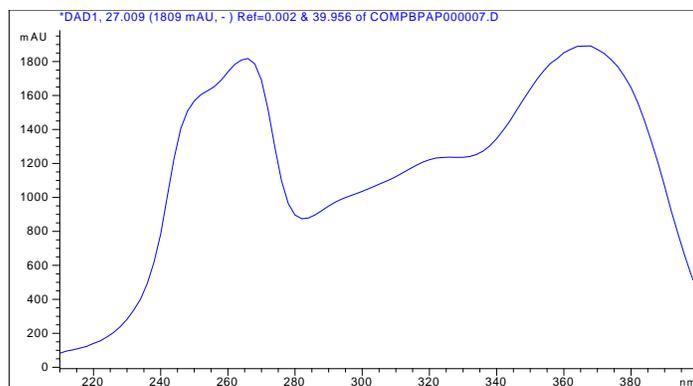


Figura 4-21. Espectros UV del compuesto A-7

Un resumen de algunas características generales y de la estructura química del compuesto identificado se presenta en la Tabla 4-14 y la Figura 4-22, respectivamente.

Tabla 4-14. Características generales de Bpap A-7

Aspecto	Cristales amarillos
Fórmula molecular	$C_{16}H_{12}O_6$
Peso molecular	300.3 g/mol
Nombre químico	5,7- Dihidroxi-4'-metoxiflavonol

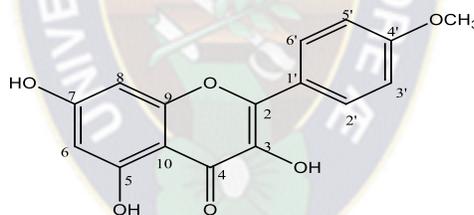


Figura 4-22. 5,7- dihidroxi - 4'- metoxiflavonol (Bpap A-7)

Compuesto (Bpap A-9): 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona.

El compuesto 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona es un flavonoide que ya fue previamente identificado en la especie vegetal *B. papillosa* (Escobar Z., 2008 & Curi C., 2012), por lo que en el presente trabajo se lo identificó por comparación de sus desplazamientos químicos de RMN ^{13}C y de RMN 1H con los del compuesto previamente reportado. La Tabla 4-15 muestra la comparación de desplazamientos químicos de ambos compuestos.

Tabla 4-15. Datos bibliográficos y experimentales de RMN ^{13}C de B pap A-9 en CDCl_3

Nº Carbón	δ [ppm] Experimental	δ [ppm] Bibliográfico (Zilma Escobar)	Asignación
2	156.53	155.5	C
3	138.21	137.5	C
4	178.62	177.8	C
5	156.90	156.3	C
6	98.75	98.5	CH
7	163.90	164.0	C
8	93.91	93.6	CH
9	161.35	161.1	C
10	104.93	104.1	C
1'	121.39	120.5	C
2'	130.18	129.9	CH
3'	115.46	115.5	CH
4'	159.74	160.0	C
5'	115.46	115.5	CH
6'	130.18	129.9	CH
3-OCH ₃	59.89	59.6	-OCH ₃

De acuerdo a los datos de esta tabla, los desplazamientos químicos son prácticamente iguales, por lo que se concluyó que el flavonoide aislado es la 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona. Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C son presentados en el Anexo VI.

También se obtuvo el espectro de absorción UV de este compuesto ver figura 4-23, el cual presenta dos bandas de absorción: una desde 249 a 280 nm, con λ_{max} a 266 nm; y la segunda banda, desde 280 nm a 420 nm, con λ_{max} a 352 nm. Estas bandas de absorción son características de flavonoides.

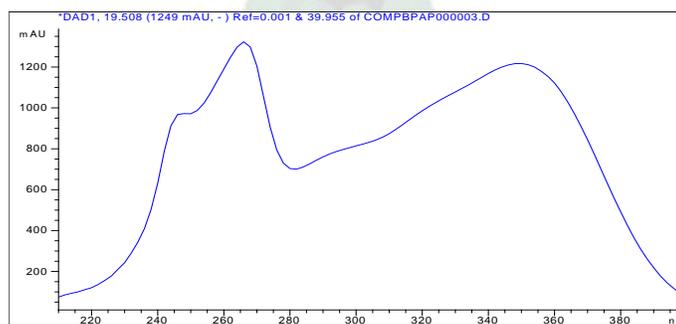


Figura 4-23. Espectros UV del compuestos B pap A-9

Un resumen de algunas características generales y de la estructura química del compuesto identificado se presenta en la tabla 4-16 y la figura 4-24, respectivamente.

Tabla 4-16. Características generales de Bpap A-9

Aspecto	Cristales amarillos
Formula molecular	$C_{16}H_{12}O_6$
Peso molecular	300.263 g/mol
Nombre Químico	5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona
Nombre comercial	Isokamferine

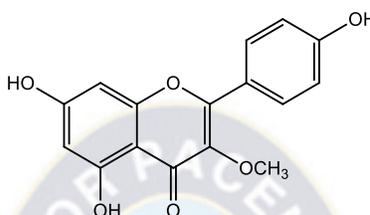


Figura 4-24. 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (B pap A-9)

Compuesto (Bpap A-11): 5,7,4'-trihidroxi-flavonol.

El Bpap A-11 es un flavonoide que no fue aislado de la especie vegetal *B. papillosa*. Este flavonoide se presenta en forma de cristales amarillos. Su estructura química fue elucidada utilizando técnicas espectroscópicas de RMN y UV. En base al análisis de los datos espectroscópicos, se identificó este flavonoide como la 5,7,4'-trihidroxi-flavonol.

El espectro de RMN 1H (Figura 4-25) muestra 6 protones aromáticos formando dos sistemas de spin: el primero es un sistema de spin *meta* a δ_H 6.21 d ($J=2.0$) y δ_H 6.40 d ($J=2.0$) donde cada señal integra a un protón, que corresponden a los protones H-6 y H-8, respectivamente, acoplados en el anillo A.

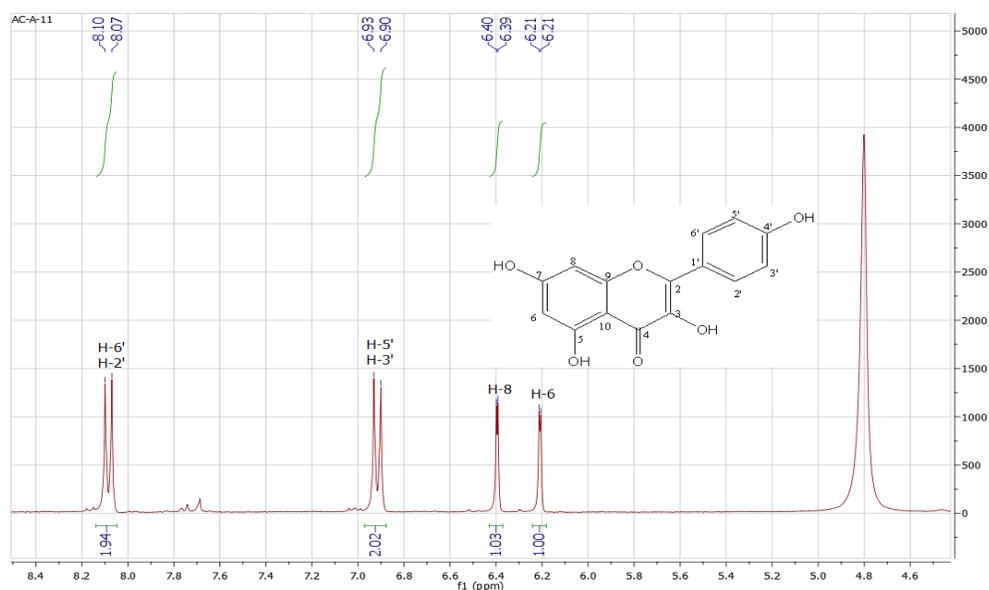


Figura 4-25. Espectro de RMN ^1H de Bpap A-11 en CDCl_3

El anillo B presenta un sistema de spin *orto* a δ_{H} 6.92 *d* ($J = 8.9$ Hz) y a δ_{H} 8.08 *d* ($J = 8.9$ Hz) correspondiente a los protones H-5' y H-3' acoplados a H-6' y H-2', respectivamente. Estos sistemas de spin se corroboraron en el espectro de correlación homonuclear ^1H -COSY (Figura 4-26).

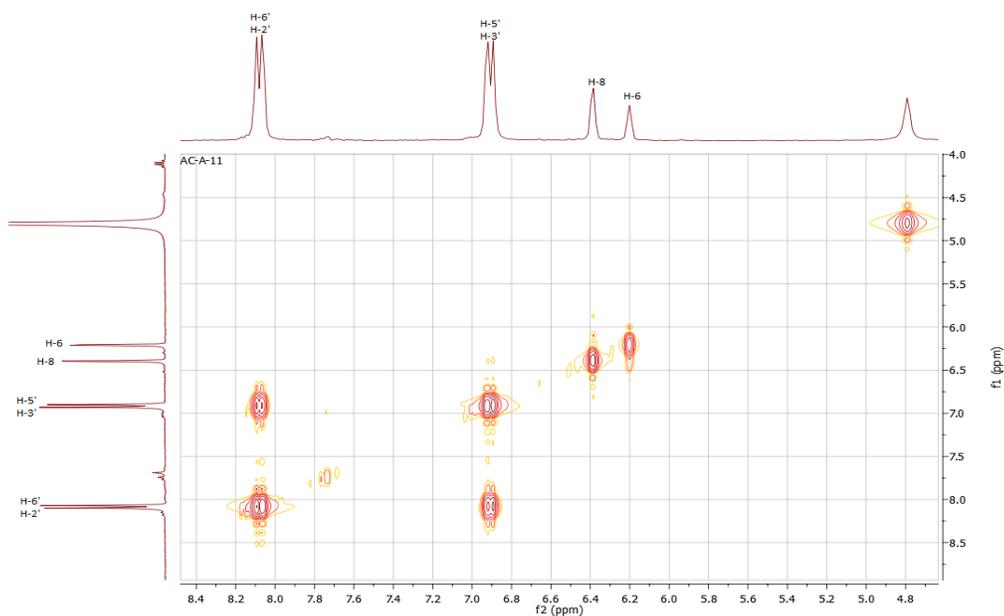


Figura 4-26. Espectro de correlación homonuclear COSY ^1H de Bpap A-11

En el espectro de RMN ^{13}C (Figura 4-27) se distinguen 15 Carbonos: un carbonilo a δ_{C} 175.90 ppm; 14 carbonos aromáticos, desde 93 ppm hasta 165 ppm. Los cuatro hidroxilos se encuentran en los carbonos con δ_{C} 135.69, 156.87, 164.01 y 158.95 ppm.

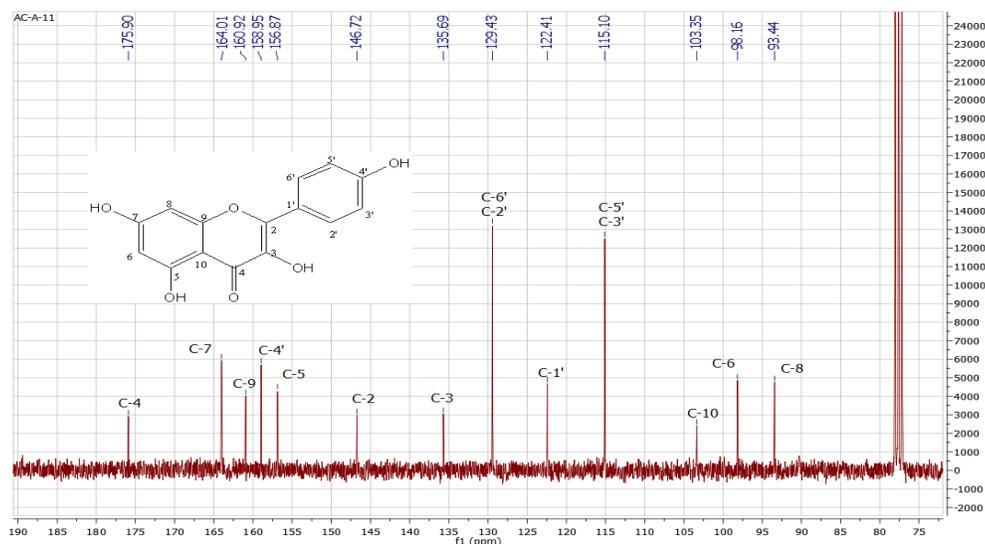


Figura 4-27. Espectro de RMN ^{13}C de BpA-11

La asignación de los carbonos enlazados a protones se realizó usando el espectro de correlación HSQC (Figura 4-28), mientras que el resto de los carbonos fueron asignados principalmente en base al espectro HMBC (Figura 4-29). Todas las correlaciones se muestran en la Tabla 4-17. La Figura 4-30 muestra las correlaciones más importantes a larga distancia.

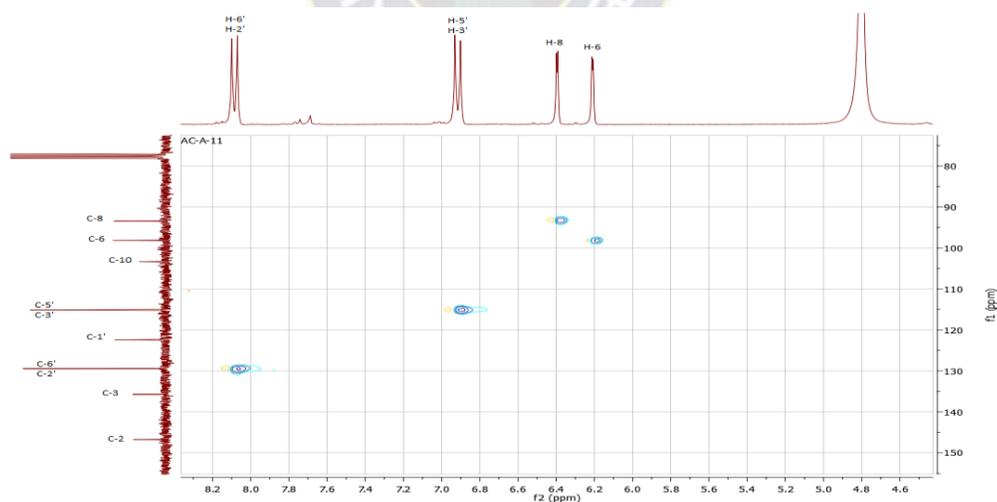


Figura 4-28. Espectro de correlación HSQC de BpA-11

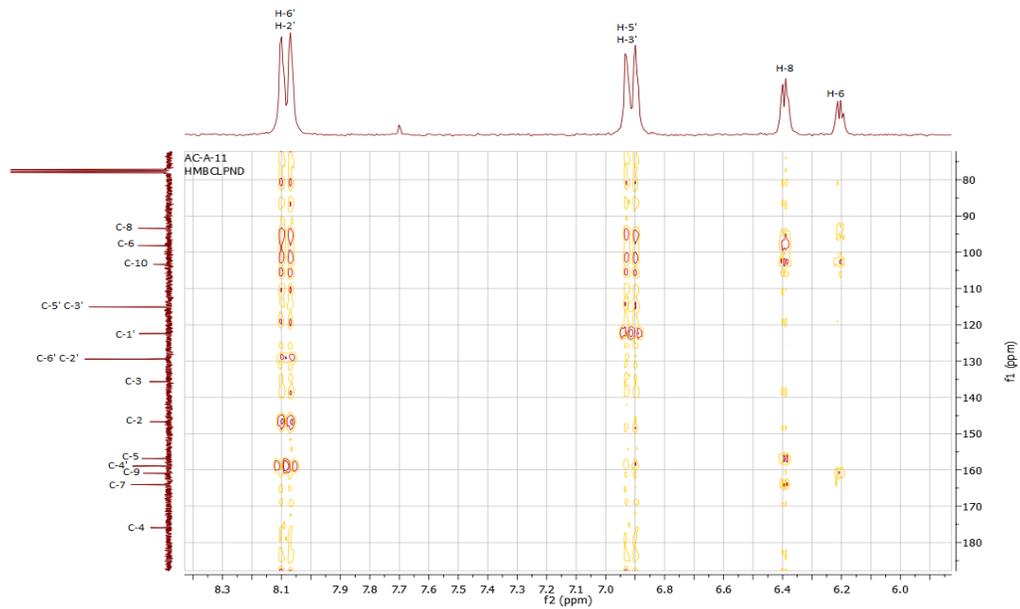


Figura 4-29. Espectro de correlación HMBC de Bpap A-11

Tabla 4-17. $\delta^1\text{H}$ y $\delta^{13}\text{C}$ y correlaciones HMBC de Bpap A-11 en CDCl_3

Posición	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (J)	HMBC
2	146.72		
3	135.69		
4	175.90		
5	156.87		
6	98.16	6.21 d (2.0)	C-8, C-10
7	164.01		
8	93.44	6.40 d (2.0)	C-6, C-10
9	160.92		
10	103.35		
1'	122.41		
2'	129.43	8.07 d (8.9)	C-6', C-4', C-2
3'	115.10	6.93 d (8.9)	C-5', C-1'
4'	158.95		
5'	115.10	6.90 d (8.9)	C-3', C-1'
6'	129.43	8.10 d (8.9)	C-2', C-4' C-2

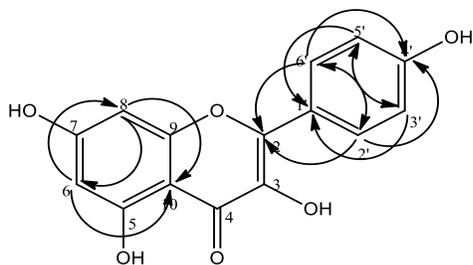


Figura 4-30. Correlaciones HMBC más importantes en Bpap A-11

Por otro lado, se obtuvo el espectro de absorción UV de este flavonoide (ver Figura 4-31). Este espectro muestra claramente dos bandas de absorción: una de 237 a 279 nm, con λ_{max} a 265 nm; y la segunda de 279 a 408 nm, con su λ_{max} a 366 nm, bandas que son características de flavonoides.

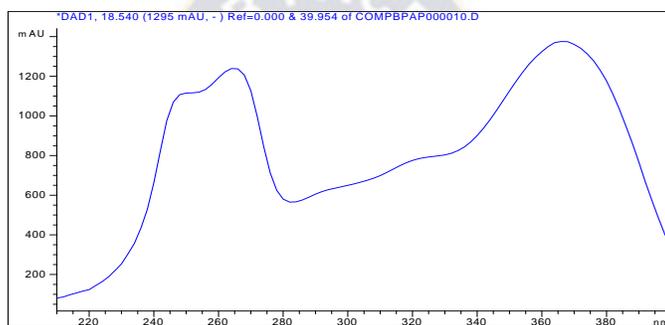


Figura 4-31. Espectros UV del compuestos Bpap A-11

Un resumen de algunas características generales y de la estructura química del compuesto identificado se presenta en la Tabla 4-18 y la Figura 4-32, respectivamente.

Tabla 4-18. Características generales de Bpap A-11

Aspecto	Cristales amarillos
Fórmula molecular	$C_{15}H_{10}O_6$
Peso molecular	286.2 g/mol
Nombre químico	5,7,4'- Trihidroxi-flavonol

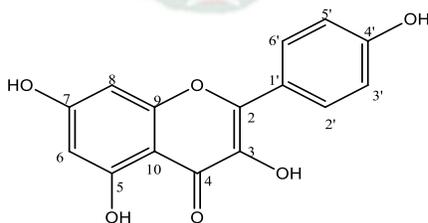


Figura 4-32. 5,7,4'- trihidroxi - flavonol (Bpap A-11)

4.3. Evaluación por cromatografía HPLC de los compuestos seleccionados, de las dos especies recolectadas en diferentes estaciones y alturas

Identificación de los flavonoides y drupanina en la muestra de *Baccharis papillosa* por cromatografía HPLC

La Figura 4-33 muestra el cromatograma HPLC, a $\lambda = 370$ nm, del extracto etanólico de *Baccharis papillosa*, donde se determinaron los t_R flavonoides y derivado de ácido cinámico aislado. Así, se observa la presencia de los flavonoides 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1) a t_R 28.26 min; 5,7,5',4'-tetrahidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-2) a t_R 14.03 min; 5,7- Dihidroxi-4'-metoxiflavonol (Bpap A-7) a t_R 26.98 min; 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-9), a t_R 19.53 min; y 5,7,4'- trihidroxi-flavonol (Bpap A-11), a t_R 18.49 min.

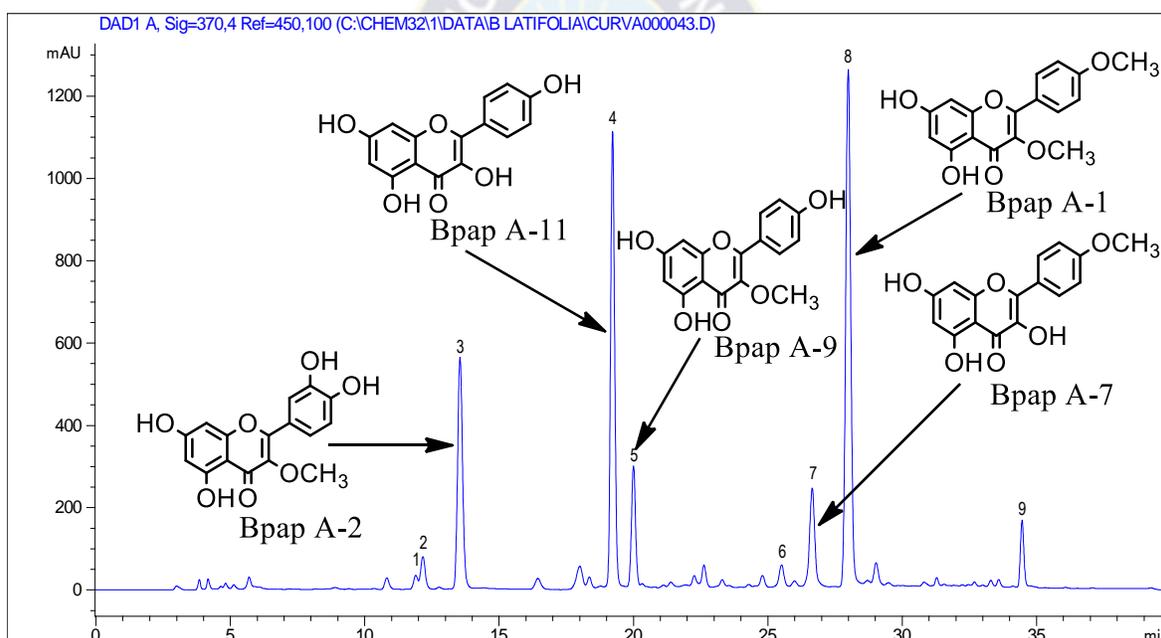


Figura 4-33. Identificación de los flavonoides: 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1) y 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-11) en el Perfil cromatograma de HPLC en extracto etanólico de *Baccharis papillosa*, a $\lambda = 370$ nm.

La Figura 4-34 muestra el cromatograma HPLC a $\lambda = 315$ nm, en la cual se identificó la señal correspondiente a la drupanina a un tiempo de retención de 22.905 min, en extracto etanólico de *Baccharis papillosa*.

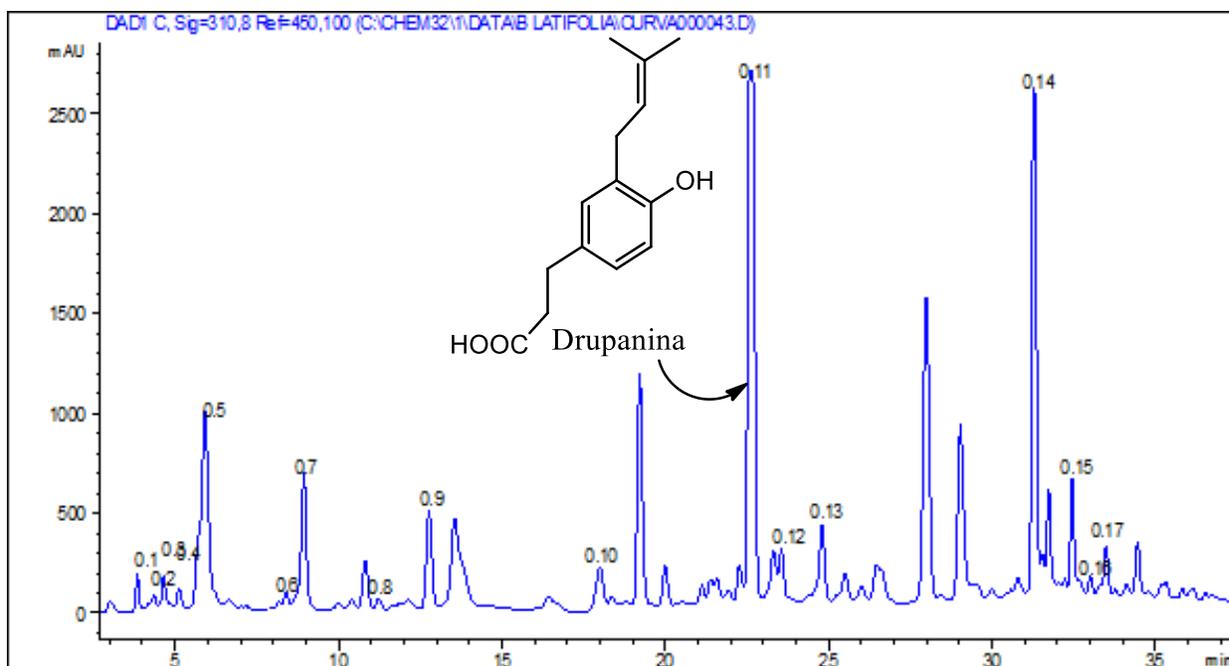


Figura 4-34. Identificación de la Drupanina en el perfil cromatograma de HPLC en extracto etanólico de *Baccharis papillosa* a $\lambda = 315$ nm.

Para la identificación de las señales correspondientes a los compuestos aislados, se hizo correr cada uno de los flavonoides y derivado de ácido cinámico, puros, con el mismo método, determinándose así los tiempos de retención, además se confirmó las asignaciones comparando los espectros de UV (DAD) en las señales correspondientes a los compuestos puros y a los compuestos en el extracto.

4.3.1. Evaluación del contenido de Bpap A-1, Bpap A-11 y drupanina por HPLC en especímenes de *Baccharis papillosa* recolectados en diferentes estaciones y alturas.

En base a los cromatogramas presentados anteriormente se identificó tres compuestos (5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1); 5,7,4'- Trihidroxi-flavonol (Bpap A-11) y drupanina (Bpap A-6) en la muestra de *Baccharis papillosa*. En cada caso se hizo una curva de calibración con diferentes concentraciones de los compuestos aislados y, siguiendo el método descrito en la parte experimental, se evaluó el contenido de estos tres compuestos en las muestras colectadas en diferentes alturas y estaciones, dando los siguientes resultados.

Bpap A-1

Los resultados encontrados de la evaluación del compuesto Bpap A-1 a 4182 m.s.n.m. muestran que se encontró mayor concentración en verano (419,237 mg/100g PS), seguidamente de otoño (385,242 mg/100g PS) y menor en invierno y primavera, además la concentración es muy parecida entre en estas dos últimas estaciones (298,199 y 299,111 mg/100g PS respectivamente).

A 4000 m.s.n.m. el compuesto Bpap A-1 se encontró en mayor concentración en primavera (349,276 mg/100g PS), seguido de invierno (327,470 mg/100g PS), luego verano (310,977 mg/100g PS) y finalmente se encontró menor concentración en otoño (293,697 mg/100g PS).

Finalmente a 3825 m.s.n.m. la mayor concentración se determinó en otoño (354,052 mg/100g PS), seguido en éste es muy parecida entre verano y primavera (308,162 y 314,346 mg/100g PS respectivamente) y la menor concentración en invierno (218,886 mg/100g PS), como se puede apreciar en la Tabla 4-19.

Tabla 4-19. Concentración del compuesto Bpap A-1 en *Baccharis papillosa*, en cuatro estaciones y tres alturas.

	Altitud (m)	Cantidad de Bpap A-1 (mg/100g PS)
Verano 2013	4182	419,237±10,722 ^a
	4000	310,977±9,575 ^e
	3825	308,162±8,367 ⁱ
Otoño 2014	4182	385,242±4,526 ^b
	4000	293,697±12,161 ^f
	3825	354,052±0,324 ^j
Invierno 2014	4182	298,199±5,677 ^c
	4000	327,470±0,068 ^g
	3825	218,886±4,412 ^k
Primavera 2014	4182	299,111±5,760 ^{d,c}
	4000	349,276±11,252 ^h
	3825	314,346±9,385 ^l

Letras diferentes indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

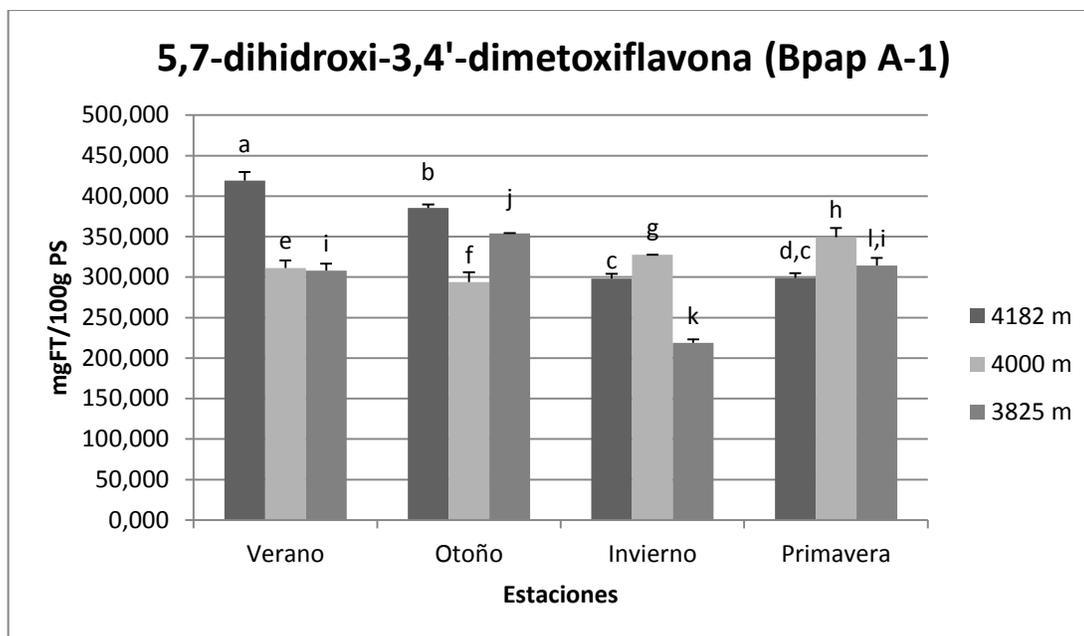


Figura 4-35. Concentración del compuesto Bpap A-1 (mgFT/100g PS) en hojas de *Baccharis papillosa*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

Analizando las diferencias significativas entre las diferentes estaciones y altitudes, se observa que en general presenta diferencias significativas tanto entre estaciones como entre altitudes (Tabla 4-19). Sin embargo, no se observa una correlación directa entre altitud y producción, como en el caso de flavonoides totales, esto probablemente se debe a que todos los flavonoides tienen una función contra la radiación UV, pero además cada uno cumple alguna otra función específica.

Por otra parte, entre las diferentes estaciones, tampoco se pueden llegar a conclusiones generales, por el mismo motivo de funciones específicas de este compuesto en cada zona de estudio y en cada estación.

Bpap A-11

La mayor concentración del compuesto Bpap A-11 a 4182 m.s.n.m. se encontró en verano y primavera (332,580 y 298,990 mg/100g PS respectivamente), seguido de otoño (220,432 mg/100g PS) y la menor concentración se encontró en invierno (191,994 mg/100g PS).

A 4000 m.s.n.m. el compuesto Bpap A-11 se encontró mayor concentración en otoño (288,708 mg/100g PS), seguido de invierno (276,764 mg/100g PS) y la menor concentración en verano y primavera, en estas dos últimas estaciones la concentración es muy parecida (248,002 y 250,249 mg/100g PS respectivamente).

Por último a 3825 m.s.n.m. la mayor concentración de este compuesto, Bpap A-11, se determinó en primavera (535,760 mg/100g PS), seguido de invierno (458,687 mg/100g PS), luego de verano (320,996 mg/100g PS) y finalmente la menor concentración en otoño (204,502 mg/100g PS), Tabla 4-20.

Tabla 4-20. Concentración del compuesto Bpap A-11 en *Baccharis papillosa*, en 4 estaciones y 3 alturas.

	Altitud (m)	Cantidad de Bpap A-11 (mg/g PS)
Verano 2013	4182	332,580±9,266 ^a
	4000	248,002±9,859 ^e
	3825	320,996±12,109 ⁱ
Otoño 2014	4182	220,432±7,623 ^b
	4000	288,708±7,924 ^f
	3825	204,502±0,857 ^j
Invierno 2014	4182	191,994±1,351 ^c
	4000	276,764±2,256 ^g
	3825	458,687±9,488 ^k
Primavera 2014	4182	298,990±0,586 ^d
	4000	250,249±8,232 ^{h,e}
	3825	535,760±9,926 ^l

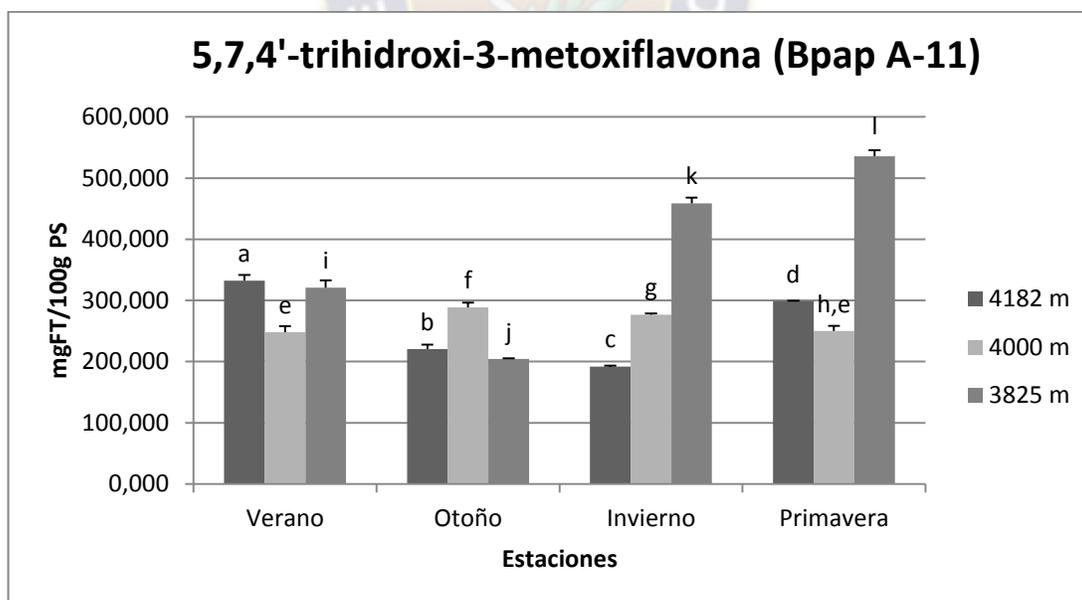


Figura 4-36. Concentración del compuesto Bpap A-11 (mg/100g PS) en hojas de *Baccharis papillosa*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

Haciendo un análisis general de los resultados encontrados, se puede observar claramente que la mayor concentración se determinó entre invierno y primavera a 3825 m.s.n.m., esto probablemente indica que para la producción de este compuesto es importante la humedad del suelo, ya que la zona más baja es la más húmeda y que no cumple una función muy importante como agente fotoprotector contra la RadUV, que es más fuerte en la zona más alta. Además, deben existir otros factores en la zona de estudio, entre los meses de julio y septiembre (como insectos fitopatógenos), que promueven que la planta utilice su energía en la biosíntesis de este compuesto. Finalmente analizando las diferencias significativas entre las estaciones y altitudes se observa que presenta diferencias significativas entre las diferentes altitudes y estaciones, pero no existe una correlación clara, como en el caso de Bpap A-1, probablemente debido a las funciones específicas que cumplen estos flavonoides en la planta, en cada estación y en cada lugar.

Bpap A-6 (Drupanina)

En las alturas de 4182, 4000 y 3825 m.s.n.m. la mayor concentración de la drupanina se encontró en primavera (1.453,576; 1.381,500 y 1.242,312 mg/100g PS respectivamente), seguida de invierno (1.186,367; 1.148,007 y 1.067,302 mg/100g PS respectivamente). Y las menores concentraciones están en otoño (552,009; 584,789 y 578,082 mg/100g PS respectivamente) y verano (501,683; 471,724 y 476,320 mg/100g PS respectivamente), Tabla 4-21 y Figura 4-37.

Tabla 4-21. Concentración la drupanina en *Baccharis papillosa*, en cuatro estaciones y tres alturas

	Altitud (m)	Cantidad de Drupanina (mg/100g PS)
Verano 2013	4182	501,683±6,344 ^a
	4000	471,724±13,147 ^e
	3825	476,320±10,236 ⁱ
Otoño 2014	4182	552,009±3,799 ^b
	4000	584,789±4,538 ^f
	3825	578,082±13,117 ^j
Invierno 2014	4182	1.186,367±11,311 ^c
	4000	1.148,007±12,030 ^g
	3825	1.067,302±14,854 ^k
Primavera 2014	4182	1.453,576±12,777 ^d
	4000	1.381,500±10,354 ^h
	3825	1.242,312±2,061 ^l

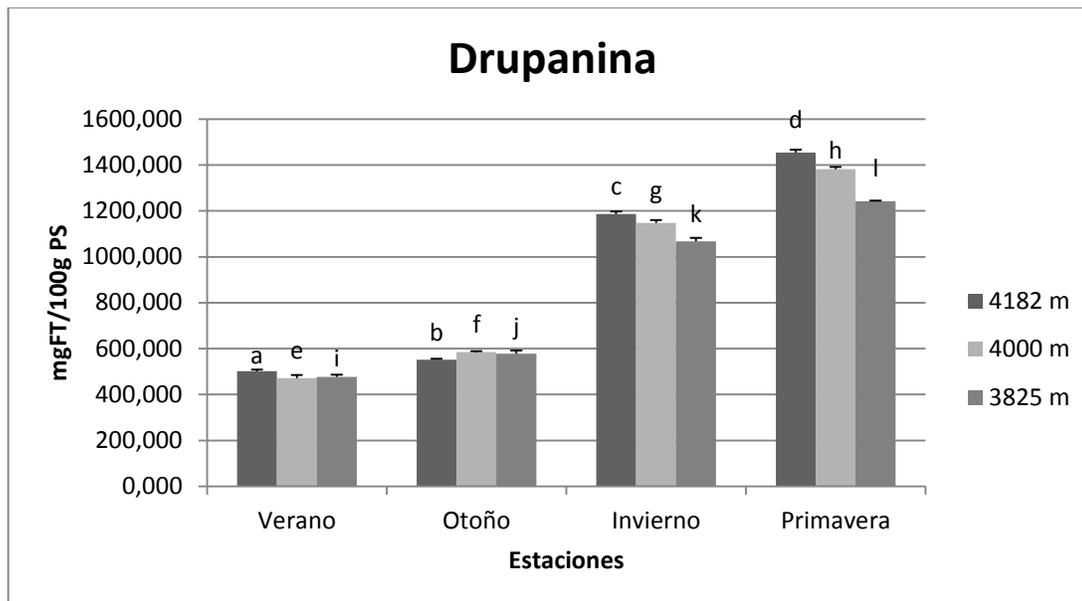


Figura 4-37. Concentración de la drupanina (mg/g PS) en hojas de *Baccharis papillosa*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

Para la Drupanina, si se puede observar una correlación entre su producción y las épocas de estudio y alturas, ya que en invierno y primavera (época seca) hay una mayor producción de este compuesto que en verano y otoño (época húmeda), además en época seca (invierno y primavera), hay una mayor producción a mayor altura, eso implica que este compuesto tiene una función importante como fotoprotector en la planta contra la Rad UVB, ya que es el metabolito secundario mayoritario de la especie y presenta una fuerte absorbancia en la región UVB (290-320 nm), radiación UV solar que se incrementa con la altura y que en ésta época tiene una alta incidencia por los cielos despejados.

4.3.2. Identificación de tiempos de retención en cromatogramas HPLC, de los flavonoides luteolina y acetina, en muestra de *Baccharis latifolia*

La Figura 4-38 muestra el cromatograma de flavonoides en extracto etanólico de *Baccharis latifolia*, resuelto por HPLC (Agilent 1100) mediante el método descrito en la parte experimental, donde el tiempo de retención encontrado para la Luteolina es de 11.93 min y el de la Acetina es de 25.54 min.

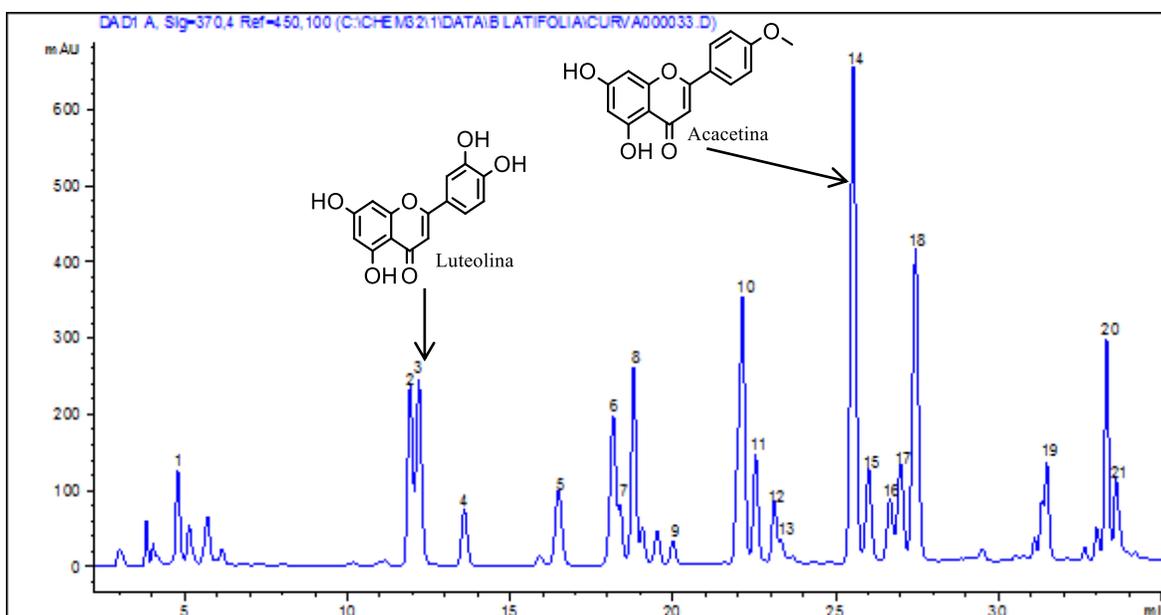


Figura 4-38. Identificación de los flavonoides: Luteolina y la Acacetina en el Perfil cromatograma de HPLC en extracto etanólico de *Baccharis latifolia* a $\lambda = 370$ nm.

Una vez obtenidos los tiempos de retención de los estándares que se observa en la Tabla 4-22, se procedió a la identificación de los flavonoides: Luteolina y Acacetina a 370 nm en la Figura 4-38 presentes en los extractos de *Baccharis latifolia* que a continuación se muestra.

Tabla 4-22. Tiempos de retención (min) de los compuestos flavonoides en el extracto etanólico de *Baccharis latifolia* determinados en HPLC. (Luteolina y Acacetina)

Especie	T_R (min) Flavonoides a 370 nm	
	Luteolina	Acacetina
<i>B. latifolia</i>	11.934	25.542

4.4. Evaluación del contenido de la luteolina y acacetina en las muestras de *Baccharis latifolia* por HPLC, recolectadas en diferentes estaciones y alturas

Luteolina

En base al cromatograma presentado anteriormente se identificó dos compuestos (luteolina y acacetina) en la muestra de *Baccharis latifolia*, y siguiendo el método descrito en la parte

experimental se evaluó el contenido de estos dos compuestos en las muestras colectadas en diferentes alturas y estaciones en la ladera de Lluto como se muestra a continuación los siguientes resultados.

Tabla 4-23. Concentración de la luteolina en *Baccharis latifolia*, en cada estación y altitud.

	Altitud (m)	Cantidad de Luteolina (mg/g PS)
Verano 2013	4182	nd
	4000	17,822±0,640 ^a
	3825	19,960±0640 ^e
Otoño 2014	4182	nd
	4000	25,977±1,645 ^b
	3825	15,486±0,856 ^f
Invierno 2014	4182	16,666±0,303 ⁱ
	4000	14,865±2,154 ^c
	3825	23,868±2,218 ^g
Primavera 2014	4182	16,692±0,690 ^{j,i}
	4000	22,679±0,595 ^d
	3825	24,757±1,182 ^h

nd = no determinado.

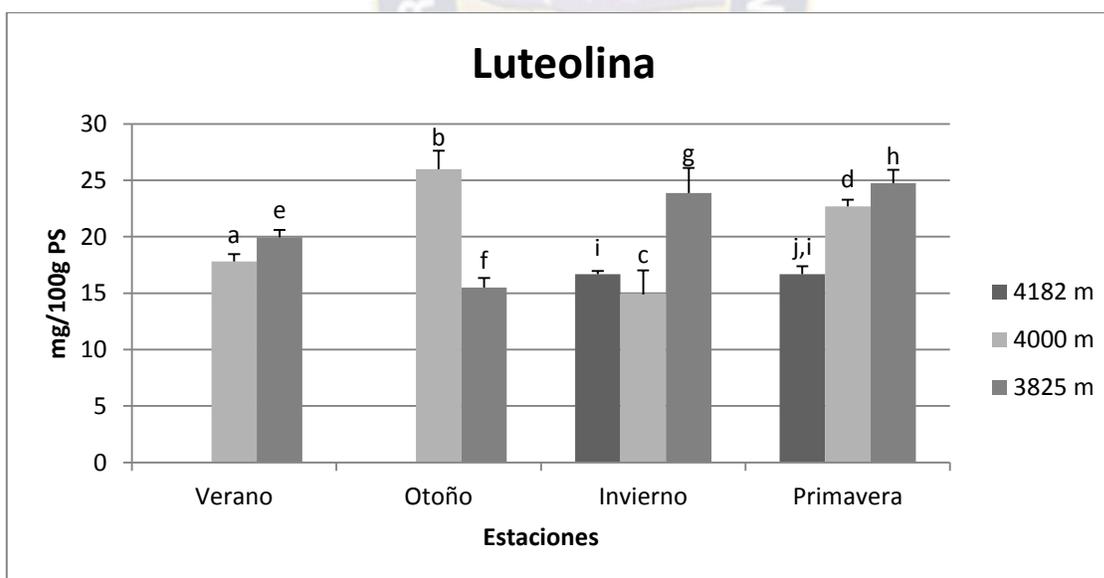


Figura 4-39. Concentración de la luteolina (mg/100g PS) en hojas de *Baccharis latifolia*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

A 4182 m.s.n.m. en verano 2013 y en otoño 2014 la especie vegetal *Baccharis latifolia* en esta altura no se muestrearon debido a que fueron afectados por un hongo y carecían de hojas muy dañadas por tal motivo no se pudo determinar la cantidad de la luteolina, sin embargo se pudo determinar la cantidad de luteolina en invierno y primavera (16,666 y 16,692mg/100g PS respectivamente), además la variabilidad es igual entre en estas estaciones.

En 4000 m.s.n.m. la luteolina se encontró mayor concentración en otoño (25,977 mg/100g PS), seguido en primavera (22,679 mg/100g PS), luego en verano (17,822 mg/g PS) y menor concentración en invierno (14,865 mg/g PS).

Por último a 3825 m.s.n.m. la mayor concentración de la luteolina se determinó en primavera (24,757 mg/100g PS), seguidos en invierno (23,868 mg/100g), verano (19,960 mg/100g PS) y la menor concentración en otoño (15,486 mg/g PS).

La mayor concentración de producción de la luteolina se encontró en otoño a 4000 m.s.n.m. (25,977 mg/100g PS) y la menor concentración se encontró en invierno y a 4000 m.s.n.m. (14,865 mg/100g PS) (Figura 4-39). Si analizamos las diferencias significativas entre las estaciones y altitudes, se observa que presentan diferencias significativas, las cantidades de la luteolina se puede observar en la Tabla 4-23.

Acacetina

Tabla 4-24. Concentración de la acacetina en *Baccharis latifolia*, en cada estación y altitud.

	Altitud (m)	Cantidad de Acacetina (mg/100g PS)
Verano 2013	4182	nd
	4000	158,141±5,124 ^a
	3825	84,415±0,961 ^e
Otoño 2014	4182	nd
	4000	118,255±7,086 ^b
	3825	54,511±2,776 ^f
Invierno 2014	4182	85,526±3,541 ⁱ
	4000	114,315±0,512 ^c
	3825	60,996±3,134 ^g
Primavera 2014	4182	59,272±2,680 ^j
	4000	136,472±3,610 ^d
	3825	77,325±2,133 ^h

nd = no determinado.

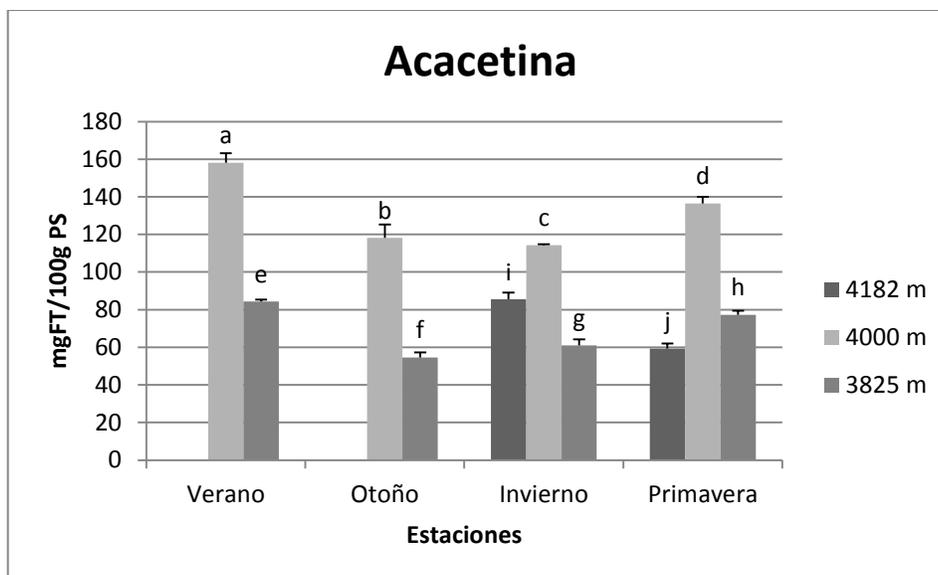


Figura 4-40. Concentración de la acacetina (mg/g PS) en hojas de *Baccharis latifolia*, para cada estación de muestreo y altitud que comprende el estudio. Barras de error representan desviación \pm estándar. Letras diferentes indican diferencias estadísticas, $p \leq 0.05$ (Kruskal Wallis test) entre altitudes dentro de cada estación de muestreo.

En la altura de 4182 m.s.n.m. en verano 2013 y en otoño 2014 la especie vegetal *Baccharis latifolia* no se colectaron debido a que fueron afectados por un hongo y carecían de hojas muy dañadas por tal motivo no se pudo determinar la cantidad de la acacetina, sin embargo se determinó la cantidad de acacetina en invierno (85,526 mg/100g PS) obteniéndose con mayor concentración y en primavera (59,272 mg/g PS).

A 4000 m.s.n.m. en verano la concentración de la acacetina se encontró mayor (158,141 mg/100g PS), seguidos en primavera y otoño (136,472 y 118,255 mg/100g PS respectivamente), y menor concentración de la acacetina en invierno (114,315 mg/100g PS).

Y a 3825 m.s.n.m. la mayor concentración de la acacetina se encontró en verano (84,415 mg/100g PS), seguido en primavera (77,325 mg/100g PS) y la menor concentración en invierno y otoño (60,996 y 54,511 mg/100g PS respectivamente).

La síntesis de mayor producción de la acacetina se encontró en verano a 4000 m.s.n.m. (158,141 mg/100g PS), la menor concentración se determinó en otoño a 3825 m.s.n.m. (54,511 mg/100g PS) (Figura 4-40). Finalmente si analizamos las diferencias significativas entre las estaciones y altitudes, se observa que presentan diferencias significativas, las cantidades de la acacetina se puede observar en la Tabla 4-24.

5. Conclusiones

Las conclusiones obtenidas en este estudio son las siguientes:

1. Se realizó un estudio fitoquímico preliminar y una evaluación de flavonoides totales por espectroscopia UV y cromatografía HPLC de 5 especies de *Baccharis* del valle de La Paz: *B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. pentlandii*, *B. boliviensis* y *B. tola*. En base al cual y considerando su uso medicinal, actividad biológica y disponibilidad física se seleccionaron dos especies para estudios más profundos: *Baccharis latifolia* y *Baccharis papillosa*
2. Los estudios de las dos especies seleccionadas, *B. latifolia* y *B. papillosa*, se realizaron en la ladera de la Localidad de Lluto, donde existe una ladera con una pendiente pronunciada y disponibilidad física de ambas especies.
3. Se cuantificó el contenido de flavonoides totales por un método de espectroscopia UV-Vis, mediante quelación con $AlCl_3$, en hojas de especímenes seleccionados a tres alturas de la ladera de Lluto (4182, 4000 y 3825 msnm) y durante las cuatro estaciones Verano 2013, Otoño 2014, Invierno 2014 y Primavera 2014. Los resultados ponen de manifiesto que existen diferencias significativas en la producción de estos compuestos en las 4 diferentes estaciones y las 3 alturas. Respecto a la variación altitudinal se puede observar una mayor producción de flavonoides en los especímenes desarrollados a mayor altura (4182 msnm), probablemente debido a que estos compuestos pueden actuar como fotoprotectores de Rad UV solar en la planta y a mayor altura hay mayor Rad UV. Sin embargo, es de destacar que las diferencias en las tres alturas de colecta, no son las mismas en todas las estaciones, disminuyendo las diferencias en invierno probablemente porque en ésta época no sólo existe un estrés oxidativo debido a la Rad UV sino también un estrés hídrico, por ser época seca, y la zona más baja es la más húmeda.
4. Se estudió la influencia estacional y altitudinal en dos compuestos de *B. latifolia*, luteolina y acetina, seleccionados por ser mayoritarios en la especie y tener diversos antecedentes farmacológicos directamente relacionados al uso de la planta. La evaluación por cromatografía HPLC de estos compuestos en el extracto EFS de *B. latifolia* mostró una variabilidad de producción de estos flavonoides a diferentes alturas y estaciones. Comparando la variación de la concentración en cada estación de muestreo y altitud para cada compuesto seleccionado se puede ver que existen diferencias significativas entre las estaciones y altitudes, pero éstas no tienen una relación directa con los parámetros en estudio, posiblemente, porque cumplen los compuestos además con otras funciones específicas no relacionadas a estos parámetros

5. Se aisló e identificó los siguientes compuestos mayoritarios de *B. papillosa*: 5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1), 5,7,5',4-tetrahidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-2), ácido 4-hidroxi-3-prenilcinámico (Bpap A-6), 5,7- Dihidroxi-4'-metoxiflavonol (Bpap A-7), 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-9) y el compuesto 5,7,4'- Trihidroxi-flavonol (Bpap A-11), de los cuales se seleccionaron tres de ellos para los estudios de influencia estacional y altitudinal en compuestos de *B. papillosa*: Bpap A-6, Bpap A-7 y Bpap A-9, por ser mayoritarios, tener una estructura relacionadas a las propiedades biológicas y farmacológicas de la especie y tener señales claramente distinguibles en cromatografía HPLC:
6. La evaluación por cromatografía HPLC de los compuestos seleccionados (5,7-dihidroxi-3,4'-dimetoxiflavona (Bpap A-1) y 5,7,4'-trihidroxi-3-metoxiflavona (Bpap A-11) y la Drupanina en el extracto EFS de *Baccharis papillosa*, mostró diferencias significativas en su producción a diferentes alturas y estaciones, que en general no presentan una correlación directa con la altitud o la estación, probablemente debido a que además de cumplir funciones como fotoprotectores cumplen otras funciones específicas en la especie, como la protección contra agentes fitopatógenos, que no tienen que ver directamente con la altitud o estación
7. Finalmente, se determinó que la cuantificación por HPLC es mucho más exacta que la cuantificación por espectroscopía UV/Vis, que solo nos da una idea cuantitativa de las variaciones, pero los datos son solo aproximaciones referidas a algún flavonoide.

6. Bibliografía

- Abad MJ & Bermejo P. 2007. Baccharis (Compositae): a review update, ARKIVOC VII: 76-96
- Almanza GR & Salcedo L. 2012. De la planta al medicamento; Parte I Investigaciones de Baccharis latifolia (Chilca). Editorial Académica Española, Saarbrucken, Germany, pp. 55-75, 271-303.
- Álvarez CE, Orallo CF. 2003a. Actividad biológica de los flavonoides (I). Acción frente al cáncer. *Bioquímica*, 22 (10): 130-140.
- Álvarez CE, Orallo CF. 2003b. Actividad biológica de los flavonoides (II). Acción cardiovascular y sanguínea. *Bioquímica*, 22 (11): 102-110.
- Alonso-Amelot et al., 2006. Phenolics and condensed tannins of high altitude Pteridium arachnoideum in relation to sun light exposure, elevation, and rain regime.
- Astudillo A. Fitoterápicos antibacterianos y antifúngicos. Revista de la Facultad de Ciencias Química/ Facultad de Ciencias Químicas. N° 2. 2003. Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Baas W.J. (1989). Causes and Consequences of variation in growth rate and productivity of higher plants, pp: 313 – 340. En H. Lambers, M.L. Cambridge, H. Konings y T.L. Pons (eds). *SPB Academic Publishing, the Hague*.
- Barceló J. y Poschenrieder C. (2002). Fast root growth responses, root exudates, and internal detoxification as clues to the mechanisms of aluminium toxicity and resistance: a review. *Environmental Experiment Botany*, 48: 75 – 92.
- Bohm B.A. (1987). Intraspecific flavonoid variation. *Botanical Review*, 53: 197 – 279.
- Bornmann, J.F. 1999. Localisation and functional significance of flavonoids and related compounds. Stratospheric ozone depletion: the effects of enhanced UV-B radiation on terrestrial ecosystems. pp. 59-69.
- Bruneton, J. 1991. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España) 560 pp.

- Cahill J.F., Kembel S.W. y Gustafson D.J. (2005). Differential genetic influences on competitive effect and response in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Ecology*, 93: 958 – 967.
- Cariveau D., Irwin R.E., Brody A.K., Garcia – Mayeya L.S. y Von Der Ohe A. (2004). Direct and indirect effects of pollinators and seed predators to selection on plant and floral traits. *Oikos* 104: 15 – 26.
- Cáceres, A. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala: Universitaria 1996. pp. 5, 43,110.
- Ceccherelli, P. 2004. *XIII congreso Italo-Latinoamericano di Etnomedicina*. Instituto Italo – Latino Americano (IILA) Roma Societa – Latinoamericana di Etnomedicina SILAE Universita Degli studi de Salerno – Faculta di farmacia, Roma.
- Curi, C. Evaluación de un extracto de la especie vegetal *Baccharis papilosa* como agente activo de foto-protección UVA/UVB. La Paz: Carrera de Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés, 2008.
- CHAVES 1993; 1997, How Plants Copewith Water Stress in the Field Photosynthesis and Growth, <http://services.oxfordjournals.Pp>. 907-916.
- CHAVES and J. C. ESCUDERO, 1999, Plant Growth Inhibiting Flavonoids in Exudate of *Cistusladanifer* and in Associated Soils, <http://link.springer.com/journal/10886>, Volume 27, Issue 3, pp 623-631.
- Chou C.H. y Kuo Y.L. (1986). Allelopathic research of subtropical vegetation in Taiwan. Allelopathic exclusion of understorey by *Leucaena leucopylla* (Lam) de Wi. *Journal of Chemical Ecology*, 12: 1431 – 1448.
- Cronquist A. (1977). On the taxonomic significance of secondary metabolites in angiosperms. *Plant Systematics and Evoliion*, 1: 179 – 189.
- De Oliveira SQ, Kappel VD, Pires VS, Lencina CL, Sonnet P, Moreira JC, Gosmann G. 2014. Antioxidant properties of phenolic compounds from *Baccharis articulata* and *B. usterii*. *Nat Prod Commun*. 9(7): 941-2.
- Escóbar, Z. Aislamiento de Compuestos Fenólicos de Polaridad Media de *Baccharis Papillosa* Subs. *Papillosa* (*Baccharis obtusifolia*). La Paz: Carrera de Ciencias

Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales, Universidad Mayor de San Andrés, 2008.

- Falconer D. S. (1989). Introducción a la genética cuantitativa. Compañía editorial continental, S.A. Calz. De Tlalpan Núm 4620, México 22, D. F.
- Falconer D. S. y Mackay T.F.C. (1996) Introduction to quantitative genetics. 4th edn. Longman, New York, 464 pp.
- Freire, E. S., Urtube, E. & Giuliano, A. D. 2007. Epidermal caracteres of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*, 29, 23-38.
- García BL, Rojo DDM, García GLV, Hernández AM. 2002. Plantas con propiedades antiinflamatorias. *Revista cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21 (3): 214-216.
- Gianoli E. (2004). Plasticidad fenotípica adaptativa en plantas, pp: 13 – 25, en H. Marino (ed.). *Fisiología Ecológica en plantas. Mecanismos y respuestas a estrés en los ecosistemas*. EUV Valparaíso (Chile).
- Giuliano D. (2000). Sub tribu Baccharinae: *Baccharis*, Editorial Flora Anerogámica Argentina. *Pro Flora CONICET*, 66, 6-67.
- Giuliano D. (2001). Clasificación Infragenérica de las especies de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Editorial Darwiniana*, 39, 137- 138.
- Gonzales, E. 1998. *Especies antiinflamatorias de la flora boliviana*. Tesis Doctoral. Madrid-España.
- Harbone J.B. (1980). Plant phenolics. *Plant Physiology*. pp: 329 – 395.
- Harbone J.B. y Turner B.L. (1984). *Plant Chemosystematics*. London: *Academic Press*.
- Harborne J.B. (1988). *Introduction to Ecological Biochemistry*. *Academic Press*. London.
- Huck, C.W., Buchmeiser, M.R., Bonn, G.K. 2001. Fastanalysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly (carboxylic acid)-coated silica and electrosprayionization tan dem mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 943:33-38.
- Jarvis B. (2000) The role of nature products in evolution. *Recent Avances in Phytochemistry*. Elsevier Science, 1-24.

- Jensen W, Salisbury F. (1988). *Botánica*. Segunda Edición. México. Editorial Mc Graw Hill. Pág. 618-619.
- Kobayashi K. (2004). Factors affecting phytotoxic activity of allelochemicals in soil. *Weed Biol. Management.*, 4: 1 – 7.
- Julkunen – Tiitti R., Rousi M., Bryant J., Sorsa S., Keinänen M. and Sikanen H. (1996). Chemical diversity of Betulaceae species: Comparison of phenolics and terpenoids in northern birch stems. *Trees* 11: 16 – 22.
- Levin D.A. (1976). The chemical defenses of plants to pathogens and herbivores. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7: 121 – 159.
- Lindroth R.L. y Batzli G.O. (1984). Plant phenolics as chemical defenses: effects of natural phenolics on survival and growth of prairie voles (*Microtus ochrogaster*). *Journal of Chemical Ecology*, 10: 229 – 244.
- Lock et. al., 2006. ANÁLISIS DE FLAVONOIDES EN PLANTAS.
- Moore B. D., y Foley W. J. (2005). Tree use by koalas in a chemically complex landscape. *Nature*, 435: 488 – 490.
- Müller, J. Systematics of *Baccharis* (Compositae Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. 2006. Pag. 1-341. Vol 76.
- K. R. MARKHAM and T. J. MABRY. A procedure for the ultraviolet spectral detection of ortho-dihydroxyl groups in flavonoids.
- Markham KR, Mabry TJ. 1975. Ultraviolet-visible and proton magnetic resonance spectroscopy of flavonoids. En: Harbone JB, Mabry TJ, Mabry H (eds.), *The Flavonoids*. Academic Press, New York, pp. 45-77.
- Pigliucci M. y Schlichting C.D. (1996). Reaction norms of *Arabidopsis*. IV. Relationships between plasticity and fitness. *Heredity* 76: 427 – 436.
- Rao, YK, Fang SH, Tzeng YM. 2005. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 249-253.
- Rhodes M.J.C. (1994). Physiological roles for secondary metabolites in plants: Some progress many outstanding problems. *Plant Molecular Biology*, 24: 1 – 20.
- Rice E.L. (1984). *Allelopathy*. Academic Press, Orlando, Florida.

- Root r. b. (1967). The niche exploitation pattern of the blue – grey gnatcatcher. *Ecological. Monographs*, 37: 317 – 350.
- Roersch C. Plantas medicinales en el sur andino del Perú 1994.
- Rodriguez MV, Sortino MA, Ivancovich JJ, Pellegrino JM, Favier LS, Raimondi MP, Gattuso MA, Zacchino SA. 2013. Detection of synergistic combinations of Baccharis extracts with terbinafine against Trichophyton rubrum with high throughput screening synergy assay (HTSS) followed by 3D graphs. Behavior of some of their components. *Phytomed.* 20 (13): 1230-1239.
- Salcedo L, Almanza GR. 2011. Uso de Baccharis latifolia (Chilca) en La Paz, Bolivia, *Biofarbo* 19(1): 59–63.
- Sandermann H. JR., Ernst D., Heller W. y Langebartels C. (1998). Ozone: an abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends in Plants Science*, 3: 47 – 50.
- Samaniego R., Escaleras R. Fundamentos de la farmacología Médica. Quito: Universitaria. 1987. pp 1343-137.
- Schlichting C. D. y Pigliucci M. (1998). Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Seigler SD. 1998. Plant Secondary Metabolism. E.U.A. pp. 151-192.
- Spitaler et al., 2006. INFLUENCE OF ULTRAVIOLET RADIATION ON PLANT SECONDARY METABOLITE PRODUCTION, *Genetics and Plant Physiolo Gy–2012, Volume2(3–4),PP.113–144.*
- Sosa T., Chaves N., Alías J.C., Escudero J.C., Henao F. y Gutiérrez – Merino C. (2004). Inhibition of mouth skeletal muscle relaxation by flavonoids of *Citrus ladanifer* L.: a plant defense mechanism against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 30: 1087 – 1101.
- Stebbins G. L. (1950). Variation and evolution in plants. Pp 659 New York: *Columbia Univ Press.*
- Swain, T. (1973). Chemistry in evolution and systematics. Butterworth, Londres.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (Eds). *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 387–416.

- TTene, V., Malagon, O., Vita, P., Vidari, G., Armijos, C. & Zaragoza, T. 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora – Chinchipe, Ecuador, *J. of Ethnopharmacology*, 111, 62-81.
- Ulla Justesen*, PiaKnuthsen, Torben Leth. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection.
- Van Der Meijden E. (1996). Plant defence, an evolutionary dilemma: Contrasting effects of (specialist and generalist) herbivores and natural enemies. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80: 307 – 310.
- Valladeres F. (2006). ¿Por qué las plantas difieren en su plasticidad fenotípica? Una perspectiva ecofisiológica sobre la canalización. 2º Congreso Ibérico de Ecología. Lisboa, 2006.
- Vokou D. y Margaris N.S. (1984). Effects of volatile oils from aromatic shrubs on soil microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 6: 509 – 513.
- Watterman y Mole, 1989, PHENOLICS CONTENT IN ASTRAGALUS SPECIES.
- Whittaker R. H., Levin S. A. y Root R. B. (1973). Niche, hábitat, and ecotopé. *The American Naturalist*, 107: 321 – 338.
- Wollenweber E. y Diez V.H. (1981). Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20: 869 – 932.
- Zobel A.M. y Lynch J.M. (1997). Extrusion of UV-A absorbing phenolics in *Acer* spp. In response to UV and freezing temperature. *Allelopathy Journal*, 4: 269 – 276.
- Zobel A.M., Clarke P.A. y Lynch J.M. (1999). Production of phenolics in response to UV irradiation and heavy metals in seedling of *Hacer* spp. *Recent Advances in Allelopathy*. Servicio de publicaciones UCA, pp: 231 – 243

7. Anexos

ANEXO I: Desplazamiento espectral y la recta de calibración de estándar luteolina para el método UV

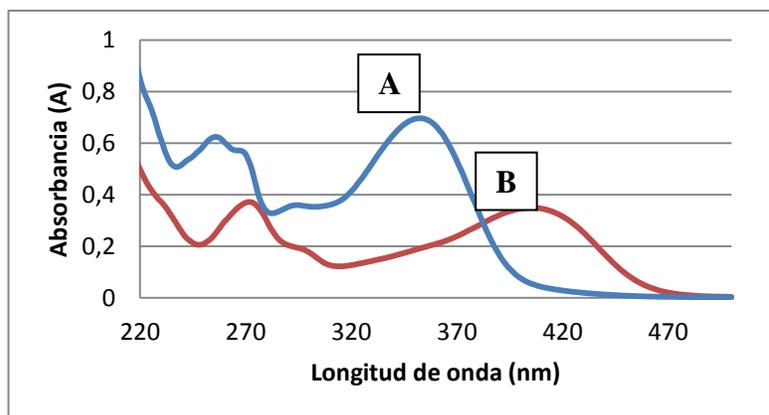


Figura 7-1. Desplazamientos espectrales de luteolina, (A) en etanol y (B) adición con 10% de AlCl₃

Tabla 7-1. Desplazamiento espectral observado en los máximos de absorción de la solución de la luteolina cuando se trata con cloruro de aluminio y acetato de potasio.

Nombre del compuesto	Máximos de absorción en etanol (nm)	Máximo de absorción con adición de AlCl ₃ (nm)
Luteolina	351	406

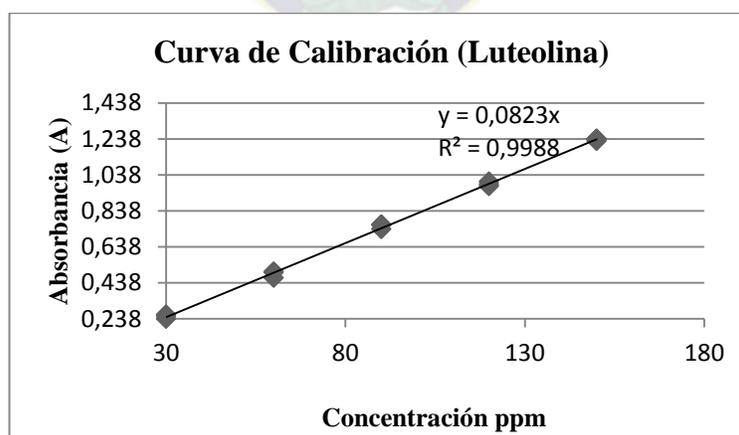


Figura 7-2. Recta de calibración del estándar Luteolina a 406 nm

Tabla 7-2. Concentraciones nominales de patrón (luteolina) y valores hallados por un método analítico (con sus desvíos estándar).

Concentración mg/L	Respuesta 1	Respuesta 2	Respuesta 3	Promedio \pm SD
30	0.238	0.26	0.251	0.249 \pm 0.011
60	0.466	0.499	0.496	0.487 \pm 0.018
90	0.736	0.761	0.759	0.752 \pm 0.014
120	0.975	0.986	1.000	0.987 \pm 0.013
150	1.238	1.225	1.234	1.232 \pm 0.007

Tabla 7-3. Parámetros analíticos del método propuesto

LOD Detección) (Límite de	Analito	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Ecuación de calibración	r^2	(Límite de y LOQ
	Luteolina	4.736	13.374	Y = 0.0082x	0.9988	

Cuantificación)

ANEXO II: Rectas de calibración HPLC y gromatogramas HPLC de los 5 compuestos flavonoides mayoritarios

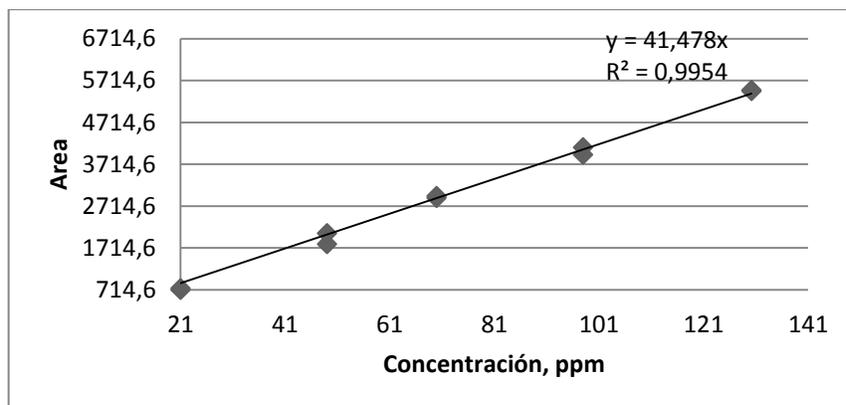


Figura 7-3. Recta de calibración de la luteolina (ver datos en la tabla 7-4).

Tabla 7-4. Datos de las Áreas de las señales HPLC de la luteolina, en función de sus concentraciones

Concentración (mg/L)	Respuesta 1 Área	Respuesta 2 Área	Promedio ± SD
21	714,6	749,6	732,1 ± 24,7
49	1801,6	2065,1	1933,4 ± 186,
70	2908,9	2953,3	2931,1 ± 31,4
98	3939,2	4114,3	4026,8 ± 123,8
130,2	5463	5485,1	5474,1 ± 15,6

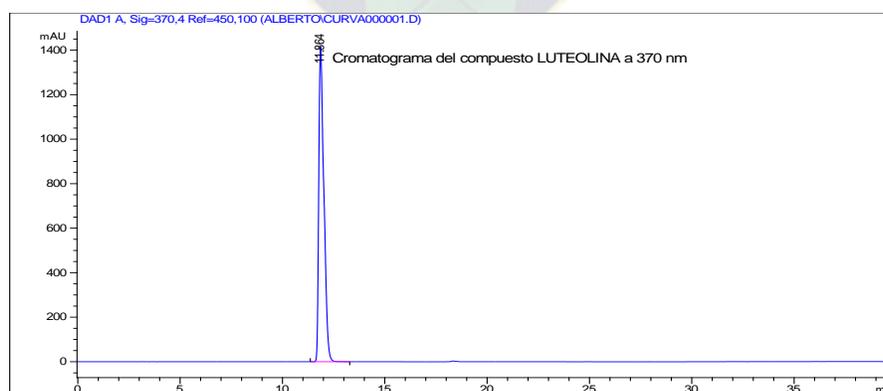


Figura 7-4. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto de luteolina a $\lambda = 370$ nm identificado en la muestra de *Baccharis latifolia*

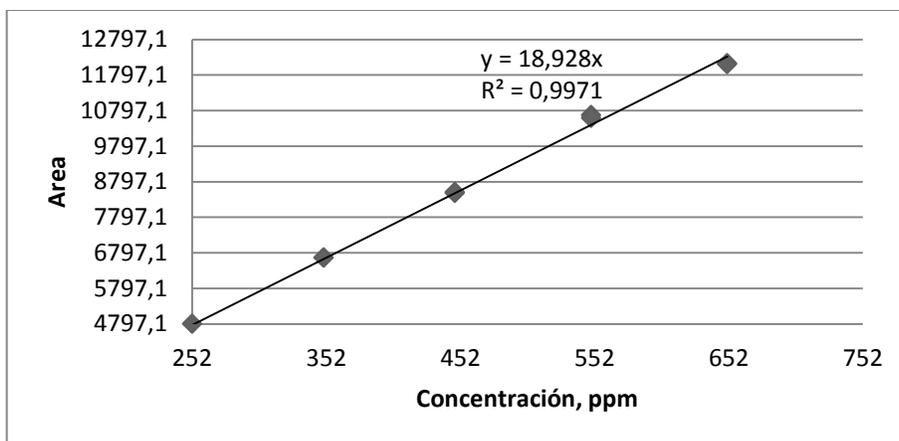


Figura 7-5. Recta de Calibración de la acetina (ver datos en la Tabla 7-5).

Tabla 7-5. Datos de las Áreas de las señales HPLC de acetina, en función de sus Concentraciones

Concentración (mg/L)	Respuesta 1 Área	Respuesta 2 Área	Promedio ± SD
252	4797,1	4714,3	4755,7±58,5
350	6656,4	6655,7	6656,1±0,5
448	8476,2	8504,8	8490,5±20,2
549,5	10670,1	10583,8	10627,0±61,0
651	12128,2	12096,8	12112,5±22,2

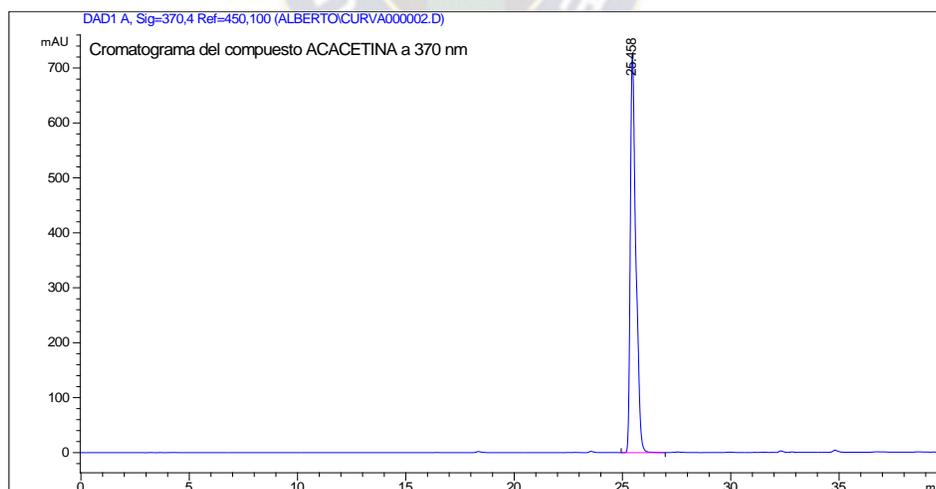


Figura 7-6. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto de acetina a $\lambda = 370$ nm identificado en la muestra de *Baccharis latifolia*.

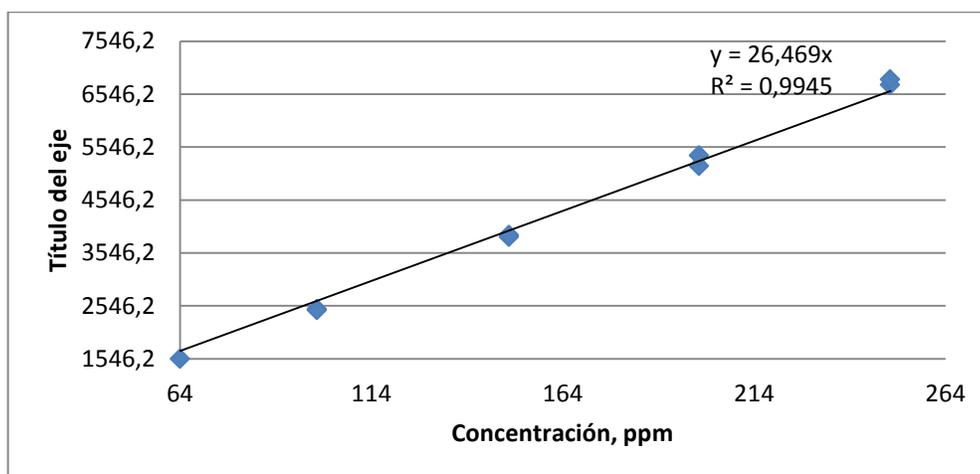


Figura 7-7. Recta de Calibración de la Bpap A-1 (ver datos en la Tabla 7-6)

Tabla 7-6. Datos de las Áreas de las señales HPLC de Bpap A-1, en función de sus Concentraciones

Concentración (mg/L)	Respuesta 1 Área	Respuesta 2 Área	Promedio ± SD
64	1546,2	1508,8	1527,5±26,4
99,8	2484,2	2467,3	2475,8±12,0
150	3852,7	3888,9	3870,8±25,6
199,7	5188,9	5386,3	5287,6±139,6
249,6	6723,8	6824,6	6774,2±71,3

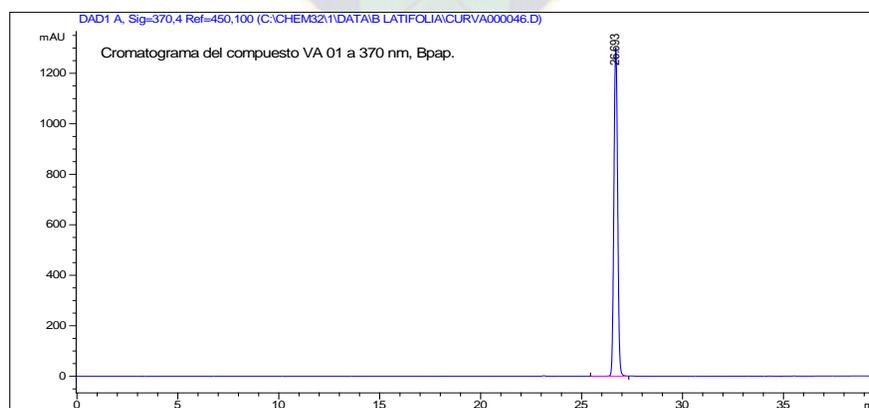


Figura 7-8. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto Bpap A-1 a $\lambda = 370$ nm, identificado en la muestra de *Baccharis papillosa*.

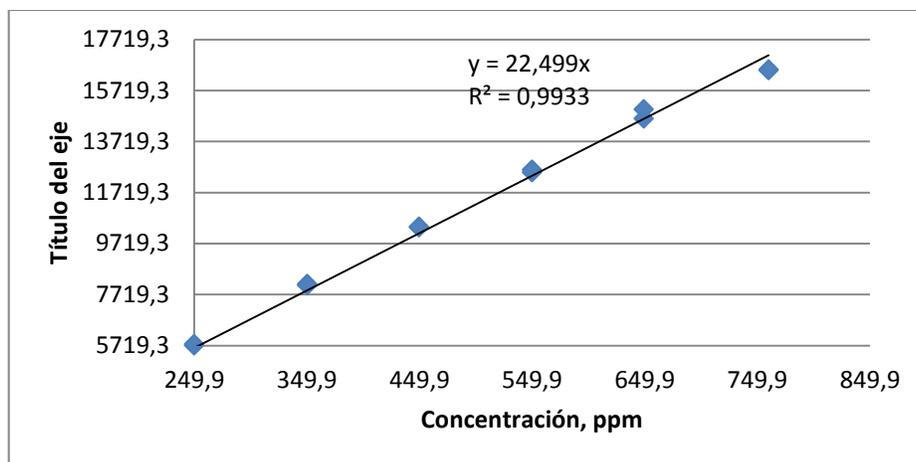


Figura 7-9. Recta de calibración de Bpap A-11 (ver datos en la Tabla 7-7)

Tabla 7-7. Datos de las Áreas de las señales HPLC de Bpap A-11, en función de sus concentraciones

Concentración (mg/L)	Respuesta 1 Área	Respuesta 2 Área	Promedio ± SD
249,9	5719,3	5763,7	5741,5±31,4
350,2	8126,1	8083,4	8104,8±30,2
449,7	10344,3	10367,2	10355,8±16,2
550	12510,6	12611,3	12561,0±71,2
649,4	14618,9	14970,2	14794,6±248,4
760	16532,6	16513,1	16522,9±13,8

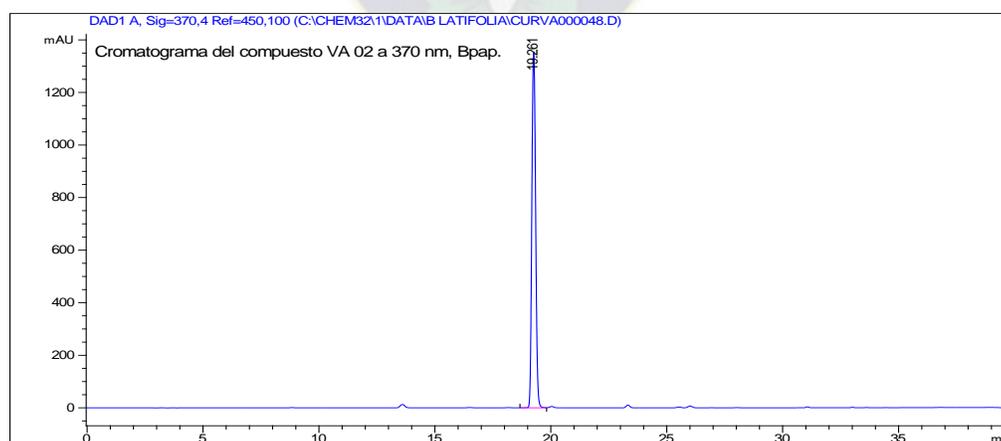


Figura 7-10. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto Bpapa A-11 a $\lambda = 370$ nm, identificado en la muestra de *Baccharis papillosa*.

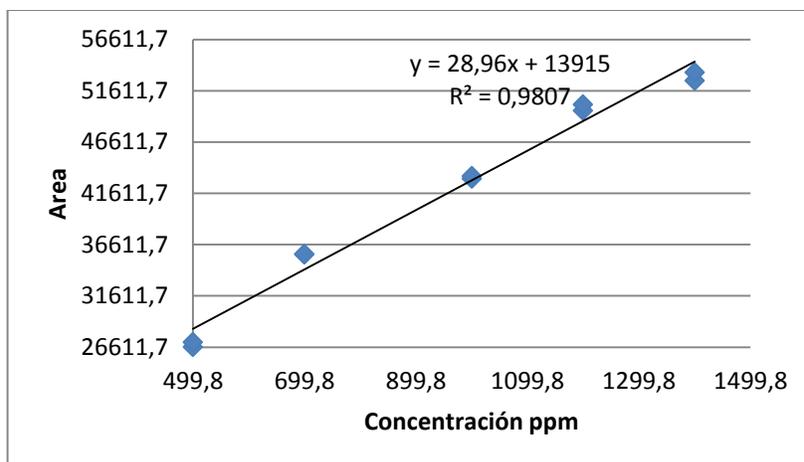


Figura 7-11. Recta de Calibración de la drupanina (ver datos en la Tabla 7-8).

Tabla 7-8. Datos de las Áreas de las señales HPLC de drupanina, en función de sus concentraciones

Concentración (mg/L)	Respuesta 1 Área	Respuesta 2 Área	Promedio ± SD
499,8	26611,7	27066,1	26838,9±321,3
700	35645,6	35659,9	35652,8±10,1
1000	43032,4	43275,4	43153,9±171,8
1199,8	49655,5	50239,7	49947,6±413,2
1400	52569,7	53383,9	52976,8±575,7

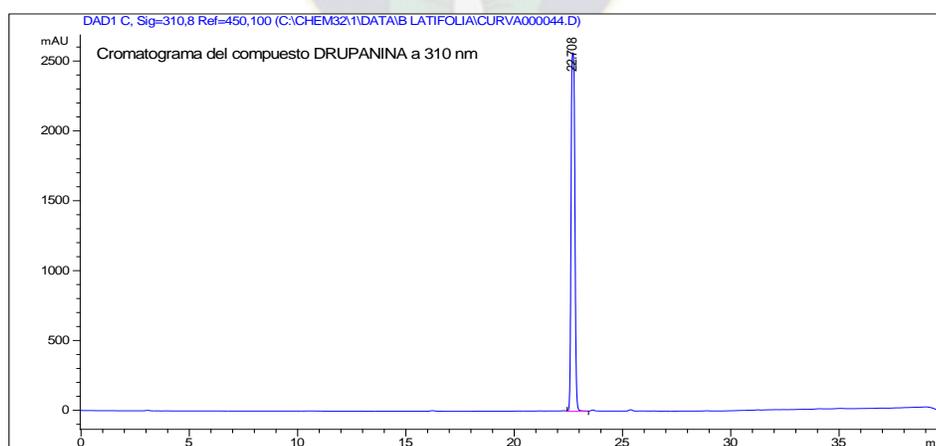


Figura 7-12. Perfil cromatograma de HPLC del compuesto de drupanina a $\lambda = 310$ nm, identificado en la muestra de *Baccharis papillosa*.

ANEXO III: Datos espectroscópicos y espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del Bpap A-1

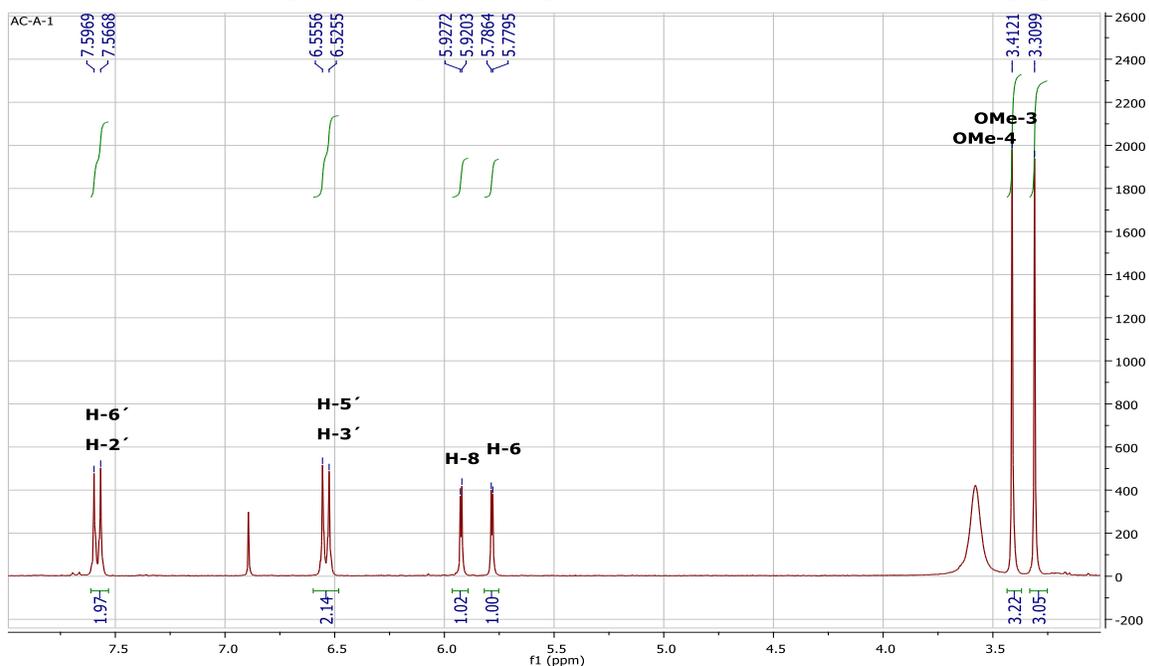


Figura 7-13. Espectro de RMN ^1H del B pap A-1

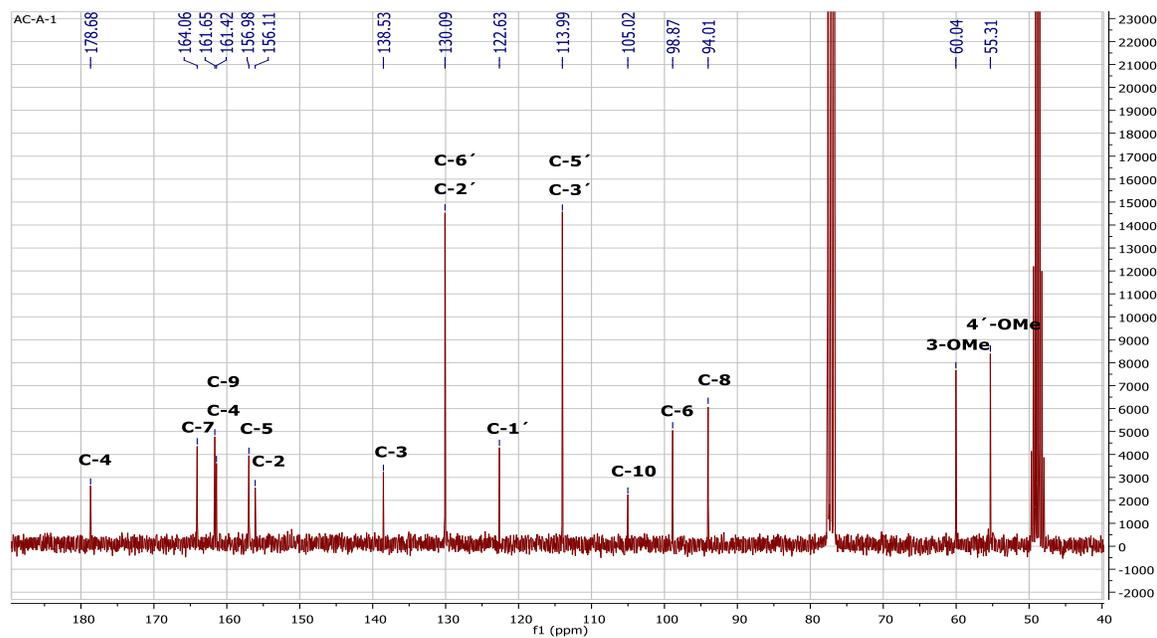


Figura 7-14. Espectro de RMN ^{13}C del Bpap A-1

ANEXO IV: Datos espectroscópicos y espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del Bpap A-2

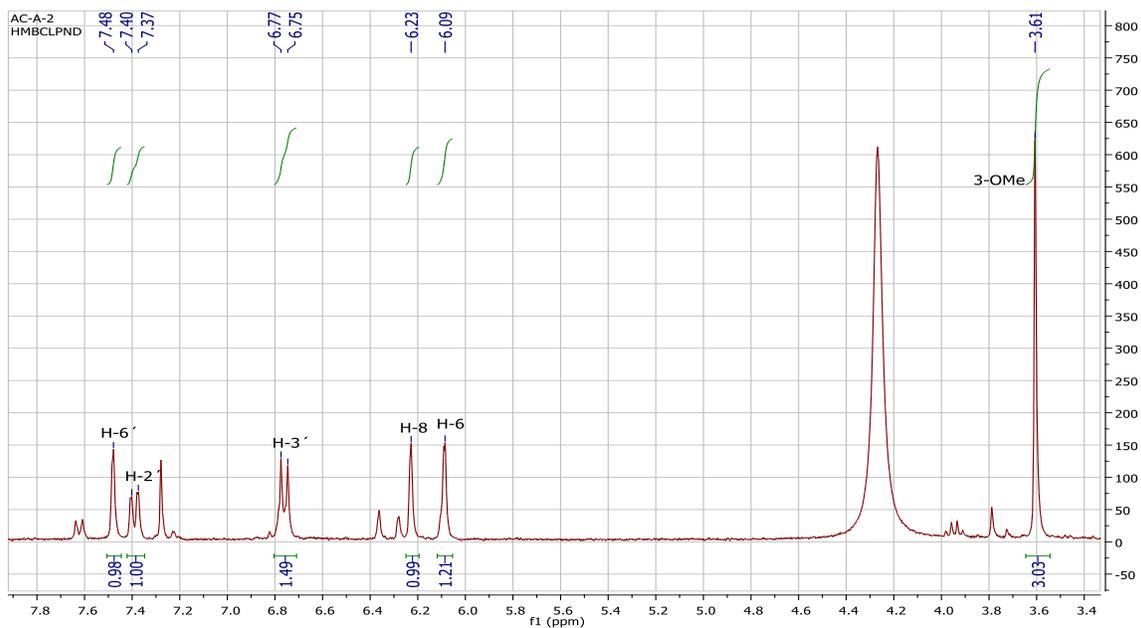


Figura 7-15. Espectro de RMN ^1H del B pap A-2

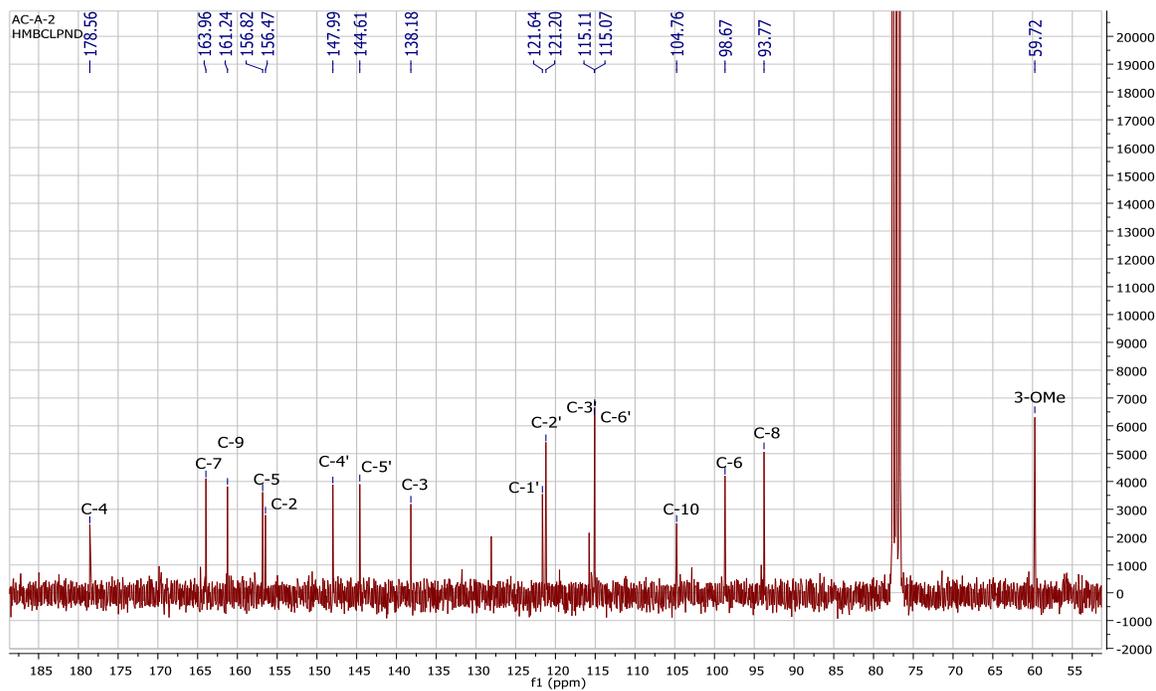


Figura 7-16. Espectro de RMN ^{13}C del B pap A-2

ANEXO V: Datos espectroscópicos y espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del Bpap A-6

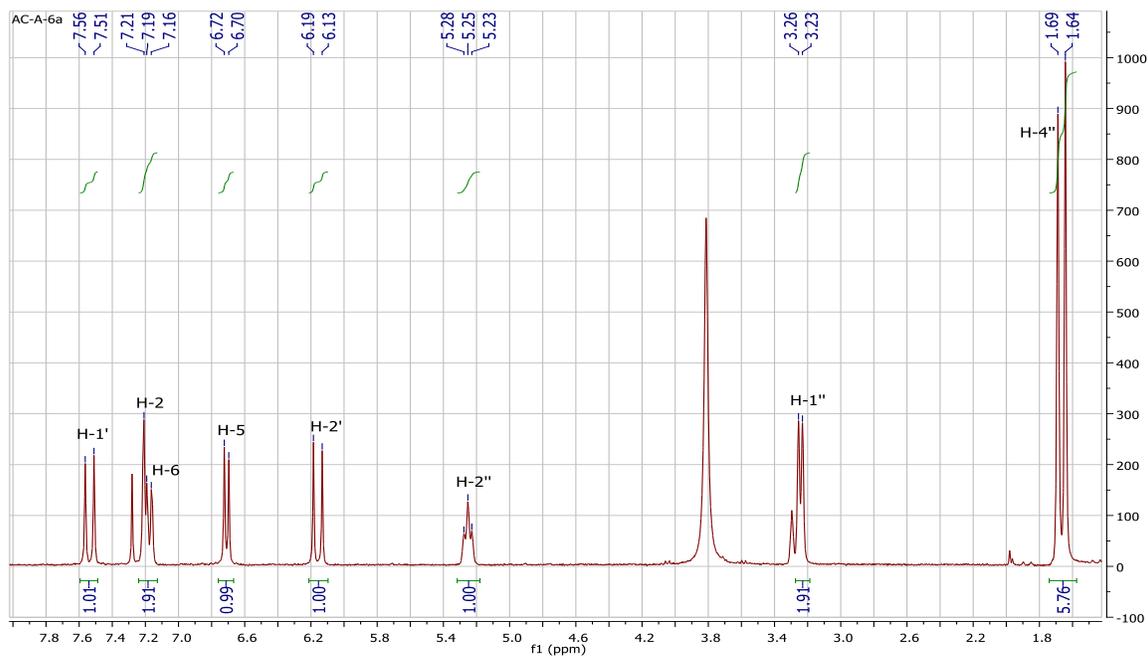


Figura 7-17. Espectro de RMN ^1H del B pap A-6

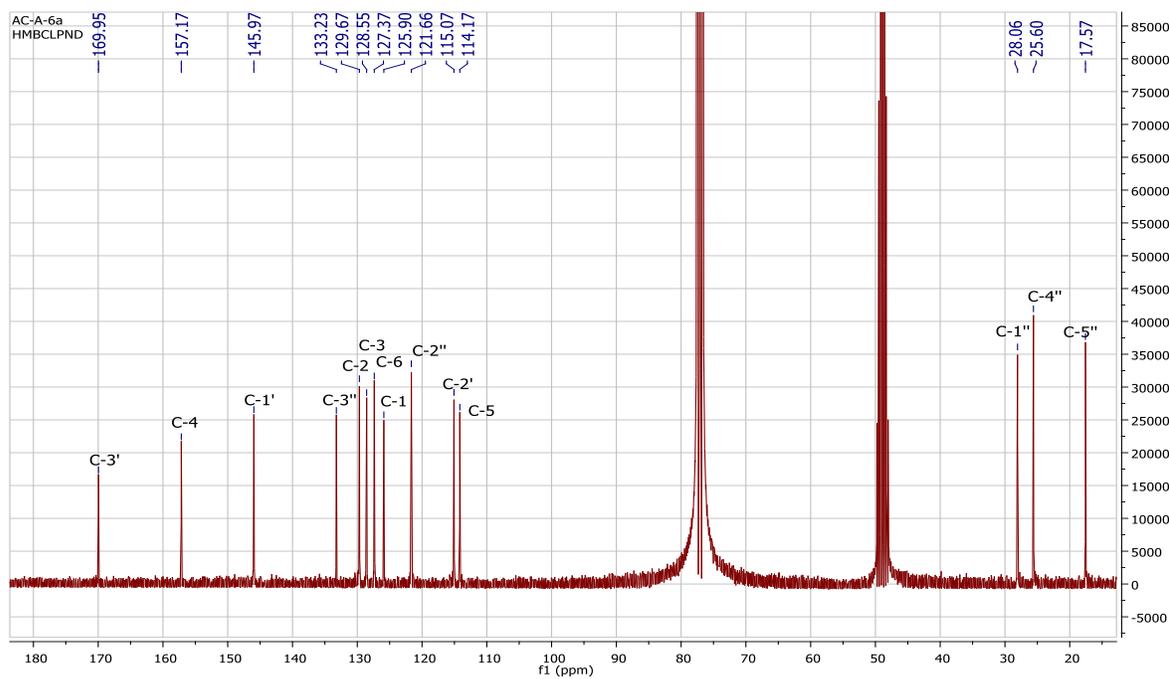


Figura 7-18. Espectro de RMN ^{13}C del Bpap A-6

ANEXO VI: Datos espectroscópicos y espectros de RMN de ^1H y ^{13}C del Bpap A-9

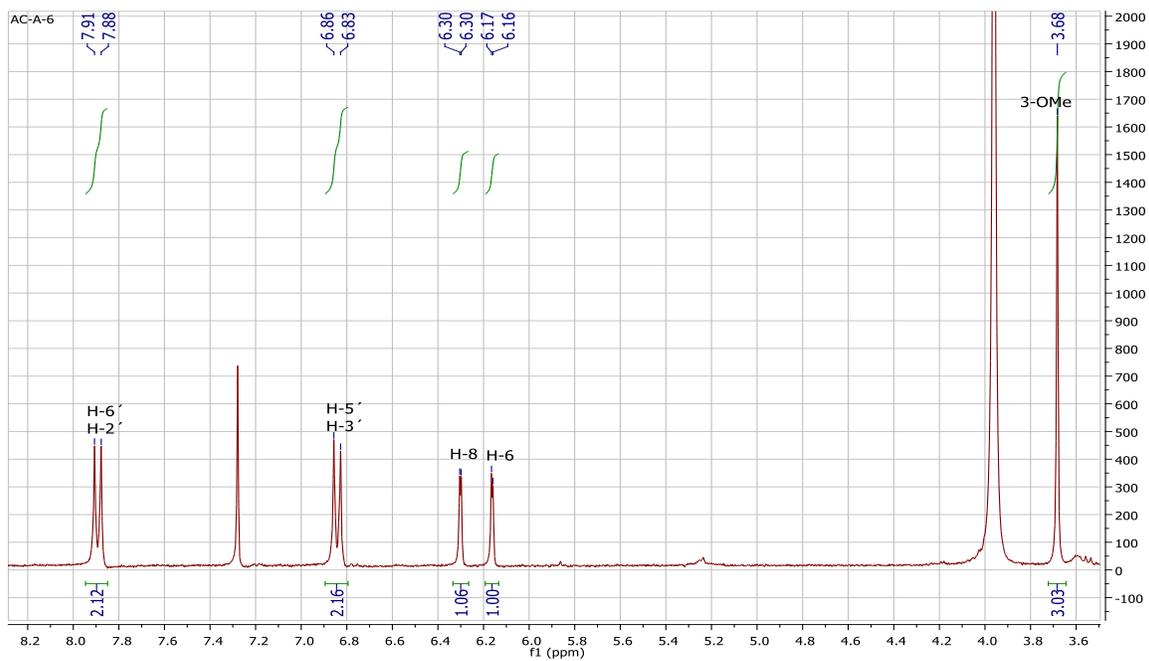


Figura 7-19. Espectro de RMN ^1H del B pap A-9

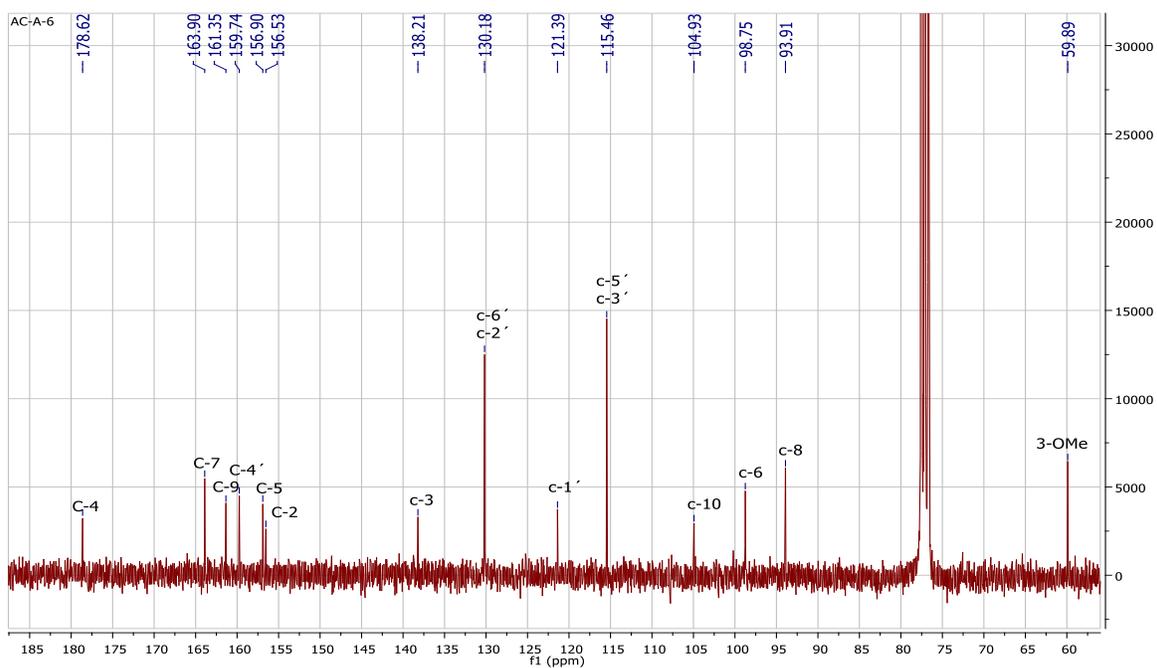


Figura 7-20. Espectro de RMN ^{13}C del B pap A-9

ANEXO VI: TRATAMIENTO ESTADISTICO

Tabla 7-9. Tratamiento estadístico de las 5 especies *Baccharis*.

Tratamiento	H	GL	$p \leq 0.05$
5 especies <i>Baccharis</i>	13.500	4	0.009*

*estadísticamente significativo.

Tabla 7-10. Tiempo de retención (min) y longitud de onda máxima a la cual absorben los compuestos estándares.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	de $\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Flavonoides		
Luteolina	11.864	351
Acacetina	26.458	329
Compuesto Bpap A-9	19.261	348
Compuesto Bpap A-7	26.693	366
Ácido fenólico		
Drupanina	22.708	315

8. Publicaciones y manuscritos

- 8.1. Alberto Calle, Ángela San Martín, Marcela Melgarejo, Yonny Flores and Giovanna R. Almanza (2017). **Evaluation of flavonoid contents and antibacterial activity of five Bolivian *Baccharis* species**, manuscrito submitido a la *Revista Boliviana de Química*. Ojo talvez en el índice solo tenga que ir como **Manuscrito I**
- 8.2. Soledad Enríquez, Angela San Martín, Ruth E. Quispe, Patricia Amurrio, Juan Carlos Peñaranda, Alberto Calle y Giovanna R. Almanza (2017). **Cambios por altitud y posición de flavonoides totales en hojas de *Baccharis latifolia* (chilca) y su correlación con propiedades fisicoquímicas del suelo**, manuscrito submitido al Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas (BLACPMA). Ojo talvez en el índice solo tenga que ir como **Manuscrito II**
- 8.3. Alberto Calle, Jimena Yupanqui, Yonny Flores y Giovanna R. Almanza (2012). **Flavonoides de *Baccharis boliviensis***, *Revista Boliviana de Química*, Vol 29, No.2, 55-60. Ojo talvez en el índice solo tenga que ir como **Publicación I**