

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS  
FACULTAD DE CIENCIAS PURAS Y NATURALES

“MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS”



**Identificación, cuantificación y propiedades farmacológicas de  
flavonoides de *Baccharis latifolia* (chilca) y  
*Arachis hypogaea* (maní)**

**Postulante:** Lic. Ángela Jhamilka San Martín Ortiz

**Tutora:** Giovanna Almanza Vega PhD.

**Co-Tutor:** Yonny René Flores Segura PhD.

**La Paz- Bolivia**

**2017**



### **DEDICATORIA**

*A mis queridos papás Ligia y José,  
a mi hermano José Miguel y  
a mi tía abuela Angélica (†),  
por su amor y apoyo incondicional para  
lograr culminar esta nueva etapa  
académica en mi vida.  
¡Muchas gracias!*

## RESUMEN

Se realizó el estudio químico y farmacológico de las especies vegetales *Baccharis latifolia* (chilca), planta medicinal ampliamente distribuida en valles secos del occidente boliviano y *Arachis hypogaea* (maní), planta alimenticia con alta producción en los valles de Chuquisaca, Tarija y Santa Cruz, específicamente en los municipios del Chaco boliviano.

De la especie vegetal *Baccharis latifolia* (chilca) se logró obtener: el Extracto Etanólico (EEBL); la metodología para el Extracto Rico en Compuestos Fenólicos (ERCF); identificación de 13 flavonoides mediante técnicas de RMN 1D y 2D, de los cuales 6 fueron cuantificados utilizando un método HPLC con Patrón Interno; los dos extractos y 8 flavonoides fueron evaluados en su capacidad antioxidante por las técnicas DPPH, ABTS y Folin Ciocalteu; por último los extractos y 4 flavonoides fueron evaluados en su capacidad antiinflamatoria *in vitro* mediante los mediadores de inflamación PGE<sub>2</sub>, LC<sub>4</sub>, TNF- $\alpha$ , NO e IL-6.

En los ensayos antioxidante, se determinó que los extractos EEBL y ERCF tienen capacidad antioxidante similar y que el flavonoide mayoritario Luteolina tiene la mejor actividad inhibidora de radicales libres, confirmándose resultados previos que demuestran que las principales características estructurales requeridas para que un flavonoide sea eficiente en la eliminación de radicales libres, son un anillo B tipo catecol y grupos OH en C-3 y C-5.

En la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos EEBL, ERCF y 4 flavonoides mayoritarios, se determinó que el extracto etanólico en general presenta una actividad inhibitoria significativa frente a todos los mediadores evaluados, por lo que es un agente antiinflamatorio de amplio espectro; mientras que los flavonoides en algunos casos son efectivos (NO, LC-4 y PG-2) pero en otros casos no (IL-6 y TNF- $\alpha$ ), lo que sugiere que la actividad del extracto no se debe solamente a la presencia de flavonoides.

De la especie vegetal *Arachis hypogaea* (maní) se obtuvo muestras de cáscaras de 41 cultivares de maní proporcionadas por el Banco de Germoplasma de BIORENA de la USFX de Chuquisaca y de colectas realizadas en colaboración del Ing. Eloy Blanco del

Instituto Superior Tecnológico Agroindustrial de Monteagudo (ISTAM), además de 4 muestras obtenidas de los diferentes mercados de Sucre.

Las cáscaras contienen luteolina, un flavonoide de interesantes propiedades farmacológicas, por lo que se cuantificó la cantidad de luteolina mediante un método de cromatografía HPLC con Patrón Interno. Según los resultados obtenidos, la muestra que presentó mayor concentración de luteolina fue la muestra procesada (tostada), obtenida de los mercados de la ciudad de Sucre, del cultivar conocido como Larguillo de Icla; las siguientes en contenido de luteolina fueron las muestras sin procesar “Phiti cintura colorado” y “Pico y Loro”.

Por otra parte, del extracto etanólico de cáscaras de maní del cultivar Larguillo de Icla, se obtuvo un extracto rico en luteolina (ERL) del cual se aisló Luteolina; el compuesto aislado fue comparado con un estándar adquirido de Sigma-Aldrich, confirmándose su identidad. El estándar fue utilizado para la cuantificación por el método de Patrón Interno por HPLC, mientras que el compuesto aislado fue utilizado para los estudios de termoestabilidad.

Los estudios de termoestabilidad fueron realizados tanto de los extractos como del compuesto aislado, mostrando que a los diferentes tiempos y temperaturas evaluados (50, 60 y 80°C), son todos termoestables. Esto corrobora el hecho de que se puede utilizar las cáscaras tostadas para la obtención de Luteolina y extracto rico en Luteolina (ERL), ya que a la temperatura de tostado (80°C) la Luteolina permanece estable.

Las actividades farmacológicas evaluadas nos muestran que tanto los extractos, como el compuesto aislado tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, incrementándose la actividad antioxidante en el extracto desengrasado (ERL) respecto al extracto EtOH y más aún en el compuesto aislado luteolina. En cuanto a la actividad antiinflamatoria la luteolina presenta una actividad inhibitoria significativa tanto frente al agente pro-inflamatorio NO, como frente a los mediadores de procesos inflamatorios LC-4 y PG-2, mientras que para los mediadores IL-6, TNF- no presenta actividad significativa. Por lo tanto, tanto el compuesto puro luteolina, como los ERL, obtenidos de la cascara de maní, pueden ser principios activos para la elaboración de potenciales productos fitoterapéuticos con actividad antioxidante y/o antiinflamatoria.

## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi profundo agradecimiento a los proyectos “Biomoléculas de interés medicinal e industrial – Anticancerígeno” y “Productos fitoterapéuticos y cosmeceúticos a partir de residuos agroindustriales” financiados por fondos ASDI concursables. También al proyecto “Bases científicas para el desarrollo de productos naturales con valor agregado a partir de residuos de café y maní” financiado por recursos IDH-UMSA. Así mismo a los institutos BIORENA de la USFX, ISTAM e IIQ de la UMSA, por el apoyo económico, infraestructura, carga horaria de investigadores y equipos para la realización del presente trabajo

A mis tutores Giovanna Rocío Almanza Vega PhD. D. y Yonny Rene Flores Segura PhD. D. por su apoyo incondicional y la confianza depositada en mí, ya que sin ellos este trabajo no hubiera sido posible a quienes admiro por su gran vocación profesional, les estoy infinitamente agradecida.

Al personal que integra la carrera de Ciencias Químicas, especialmente a los docentes de la maestría quienes nos transmitieron nuevos conocimientos y experiencias.

Al Laboratorio de Bioorgánica del Instituto de Investigaciones Químicas, que me proporciono todos los materiales y equipos necesarios para realizar mi tesis de maestría, además de mis compañeros de laboratorio por todo su apoyo y colaboración, especialmente al Univ. Guilberto Chui Tinco por la obtención de extractos etanólicos de cascara de maní para la posterior cuantificación de luteolina.

A mis amigas y amigos por su apoyo a lo largo de este nuevo proceso académico en mi vida profesional.

## Lista de artículos

**Artículo 1.** Ángela San Martín, Gilberto Chui, Aleida S. Romero, Roberto Acebey, Eloy Blanco, Yonny Flores, Giovanna R. Almanza.

**Contenido de luteolina en cascaras de maní de varios cultivares de Bolivia.**

Manuscrito aceptado en la *Revista Boliviana de Química* en el Vol.34, No 3, 2017 (fecha de aceptación: 29, agosto, 2017).

**Contribución:** Cuantificación de Luteolina por HPLC, estudios de termoestabilidad y escritura del manuscrito.

**Artículo 2.** Soledad Enríquez, Ángela San Martín, Ruth E. Quispe, Patricia Amurrio, Juan Carlos Peñaranda, Alberto Calle y Giovanna R. Almanza.

**Cambios por altitud y posición de flavonoides totales en hojas de *Baccharis latifolia* (chilca) y su correlación con propiedades fisicoquímicas del suelo.**

Manuscrito enviado a *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas medicinales y Aromáticas*, en revisión

**Contribución:** Método de análisis por HPLC de extractos de *B. latifolia* e identificación de flavonoides del extracto.

**Artículo 3.** Alberto Calle, Ángela San Martín, Marcela Melgarejo, Yonny Flores y Giovanna R. Almanza.

**Evaluation of flavonoid contents and antibacterial activity of five bolivian *Baccharis* species.**

Manuscrito aceptado en la *Revista Boliviana de Química* en el Vol.34, No 4, 2017 (fecha de aceptación: 20, Octubre, 2017).

**Contribución:** Método de análisis por HPLC de extractos de *Baccharis*

## ABREVIACIONES

EEBL	Extracto Etanólico de <i>Baccharis latifolia</i>
ERCF	Extracto Rico en Compuestos Fenólicos
ERL	Extracto Rico en Luteolina
ExtEtOH	Extracto Etanólico
ISTAM	Instituto Superior Tecnológico Agroindustrial de Monteagudo
USFX	Universidad San Francisco Xavier
UMSA	Universidad Mayor de San Andrés
OMS	Organización Mundial de la Salud
HPLC	High performance liquid
IIQ	Instituto de Investigaciones Químicas
IIFB	Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas
IBMB	Instituto de Biología Molecular y Biotecnología
RMN	Resonancia magnética nuclear
COSY	Correlation spectroscopy
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
UV	Ultravioleta-visible
TLC	Thin Layer Chromatography
VLC	Vacuum Liquid Chromatography

## INDICE

RESUMEN .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	v
Lista de artículos.....	vi
ABREVIACIONES .....	vii
INDICE.....	viii
INDICE DE FIGURAS PARTE I.....	xi
INDICE DE FIGURAS PARTE II .....	xiii
INDICE DE TABLAS PARTE I.....	xiv
INDICE DE TABLAS PARTE II .....	xv
PROLOGO.....	xvi
PARTE I ( <i>Baccharis latifolia</i> ).....	1
<b>1.1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEORICO</b> .....	<b>1</b>
1.1.1. Plantas Medicinales .....	1
1.1.2. Productos Fitoterapéuticos .....	3
1.1.3. Género <i>Baccharis</i> .....	4
1.1.4. Especie vegetal <i>Baccharis latifolia</i> .....	5
1.1.5. Antecedentes etnobotánicos de <i>B. latifolia</i> .....	7
1.1.6. Antecedentes químicos de <i>B. latifolia</i> .....	8
1.1.7. Antecedentes farmacológicos de <i>B. latifolia</i> .....	12
1.1.8. Efectos farmacológicos de flavonoides .....	12
<b>1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS</b> .....	<b>21</b>
<b>1.3. PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	<b>21</b>
1.3.1. Equipos y reactivos.....	21

1.3.2.	Material vegetal <i>Baccharis latifolia</i> (R y P) Pers.....	22
1.3.3.	Obtención de extractos .....	22
1.3.4.	Cuantificación relativa del contenido de flavonoides totales por quelación con AlCl <sub>3</sub> .....	24
1.3.5.	Aislamiento de Flavonoides .....	25
1.3.6.	Identificación de Flavonoides.....	27
1.3.7.	Análisis de flavonoides aislados por cromatografía de alta eficiencia HPLC	31
1.3.8.	Cuantificación de 6 flavonoides por HPLC (método Patrón Interno) .....	31
1.3.9.	Evaluación de Actividad antioxidante.....	33
1.3.10.	Evaluación de Actividad antiinflamatoria .....	35
<b>1.4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>36</b>
1.4.1.	Material vegetal <i>Baccharis latifolia</i> (R y P) Pers.....	36
1.4.2.	Obtención de extractos .....	37
1.4.3.	Aislamiento e Identificación de Flavonoides .....	41
1.4.4.	Cuantificación de 6 flavonoides por HPLC (método Patrón Interno) .....	50
1.4.5.	Evaluación de la Actividad Antioxidante.....	52
1.4.6.	Evaluación de Actividad Antiinflamatoria.....	55
<b>1.5.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>1.6.</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>62</b>
<b>1.7.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>63</b>
<b>PARTE II</b>	<b>(<i>Arachis hypogaea</i> L.).....</b>	<b>73</b>
<b>2.1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN Y MARCO TEORICO.....</b>	<b>73</b>
2.1.1.	El Maní .....	73
2.1.2.	Genero <i>Arachis</i> .....	74
2.1.3.	<i>Arachis hypogaea</i> L.....	74

2.1.4. Variedades de Maní en Bolivia .....	75
2.1.5. Química de <i>Arachis hypogaea</i> L. ....	77
2.1.6. Luteolina.....	80
<b>2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>82</b>
<b>2.3. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>82</b>
2.3.1. Equipos y reactivos.....	82
2.3.2. Material vegetal .....	83
2.3.3. Obtención de extractos .....	84
2.3.4. Aislamiento e identificación de luteolina .....	85
2.3.5. Cuantificación de luteolina por HPLC (método Patrón Interno).....	86
2.3.6. Termoestabilidad .....	88
2.3.7. Evaluación de Actividad farmacológica de luteolina.....	88
<b>2.4. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>90</b>
2.4.1. Material vegetal .....	90
2.4.2. Obtención de extractos .....	92
2.4.3. Cuantificación de luteolina por HPLC .....	93
2.4.4. Aislamiento e identificación de luteolina .....	98
2.4.5. Termoestabilidad .....	99
2.4.6. Evaluación de Actividad farmacológica de luteolina.....	103
<b>2.5. CONCLUSIONES .....</b>	<b>104</b>
<b>2.6. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>105</b>
<b>2.7. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>106</b>
<b>ANEXOS</b>	
<b>ARTICULOS</b>	

## INDICE DE FIGURAS PARTE I

### *Baccharis latifolia* (chilca)

<b>Figura 1. 1.</b> Plantas medicinales y remedios herbales .....	1
<b>Figura 1. 2.</b> Alcaloides obtenidos a partir de la morfina .....	2
<b>Figura 1. 3.</b> Dioscorides, padre de la Fitoterapia .....	3
<b>Figura 1. 4.</b> <i>Baccharis</i> que se encuentran en los predios del Campus Universitario .....	5
<b>Figura 1. 5.</b> Especie vegetal <i>Baccharis latifolia</i> .....	6
<b>Figura 1. 6.</b> Distribución de <i>B. latifolia</i> en Bolivia.....	7
<b>Figura 1. 7.</b> Primeros compuestos reportados en <i>B. latifolia</i> .....	9
<b>Figura 1. 8.</b> Monoterpenos y sesquiterpenos determinados en el aceite esencial de <i>B. latifolia</i> .....	10
<b>Figura 1. 9.</b> Flavonoides aislados de <i>B. latifolia</i> .....	11
<b>Figura 1. 10.</b> Requerimientos estructurales para A) Inhibición de la xantina oxidasa y B) Inhibición de la lipoxigenasa.....	13
<b>Figura 1. 11.</b> Características estructurales de flavonoides con alta actividad antioxidante .....	14
<b>Figura 1. 12.</b> Mecanismos de actividad antioxidante, inhibidora de Radicales Libres .....	15
<b>Figura 1. 13.</b> Sitios de unión con metales de los flavonoides .....	16
<b>Figura 1. 14.</b> Propuesta de mecanismo de acción antiinflamatoria de flavonoides (F).....	17
<b>Figura 1. 15.</b> Inhibición de citoquinas proinflamatorias e inducción de citoquinas antiinflamatorias de algunos flavonoides .....	18
<b>Figura 1. 16.</b> Aspectos estructurales para actividad antiinflamatoria (inhibición de LTB <sub>4</sub> ) y antioxidante .....	19
<b>Figura 1. 17.</b> Procedimiento para la obtención de los extractos etanólico y Extracto Rico en Compuestos Fenólicos (ERCF) .....	23
<b>Figura 1. 18.</b> Extractos obtenidos del proceso de desengrase para la obtención del ERCF; A: extracto etanólico; B: extractos etéreos y C: extracto etéreo y ERCF .....	24
<b>Figura 1. 19.</b> Curva de calibración del estándar luteolina.....	25
<b>Figura 1. 20.</b> Placas TLC del primer fraccionamiento del ERCF, reveladas con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y FeCl <sub>3</sub> ....	25
<b>Figura 1. 21.</b> Proceso para la separación de flavonoides presentes en <i>B. latifolia</i> .....	27
<b>Figura 1. 22.</b> Curvas de calibración de los compuestos aislados <b>1, 5, 8, 11, 12 y 13</b> .....	32
<b>Figura 1. 23.</b> Posibles mecanismos de acción inhibitoria de radicales DPPH de la quercetina .....	34
<b>Figura 1. 24.</b> Análisis por TLC de las 4 pruebas realizadas para la obtención de ERCF.....	38
<b>Figura 1. 25.</b> Bandas UV características de los flavonoides (Acacetina).....	40

<b>Figura 1. 26.</b> Banda característica de un derivado de ácido cinámico .....	40
<b>Figura 1. 27.</b> Análisis HPLC de los extractos EEBL y ERFC de <i>B. latifolia</i> .....	41
<b>Figura 1. 28.</b> Determinación del tiempo de retención del <b>Compuesto 1</b> en cromatografía HPLC..	49
<b>Figura 1. 29.</b> Cromatograma HPLC-DAD del extracto EtOH de hojas de <i>B. latifolia</i> , obtenido a = 360 nm, donde se muestran las señales correspondientes a los flavonoides identificados .....	50
<b>Figura 1. 30.</b> Cromatograma de los extractos EEBL con y sin el Patrón Interno, para la cuantificación de compuestos.....	51
<b>Figura 1. 31.</b> Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de <i>B. latifolia</i> sobre la producción de Interleuquina 6 (IL-6) a: dexametasona 1 $\mu$ M, b: LPS 0.5 $\mu$ g/ml, c: control negativo.....	57
<b>Figura 1. 32.</b> Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de <i>B. latifolia</i> sobre la producción de Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- ) a: dexametasona 1 $\mu$ M, b: LPS 0.5 $\mu$ g/ml, c: control negativo.....	57
<b>Figura 1. 33.</b> Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de <i>B. latifolia</i> sobre la producción Leucotrieno C4 pg/ml a: dexametasona 1 $\mu$ M, b: LPS 0.5 $\mu$ g/ml, ..... c: control negativo.....	58
<b>Figura 1. 34.</b> Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de <i>B. latifolia</i> sobre la producción Prostaglandina E2 pg/ml a: dexametasona 1 $\mu$ M, b: LPS 0.5 $\mu$ g/ml, c: control negativo.....	59

## INDICE DE FIGURAS PARTE II

### *Arachis hypogaea* (maní)

<b>Figura 2. 2.</b> Estilbenos aislados en <i>Arachis hypogaea</i> .....	79
<b>Figura 2. 3.</b> Flavonoides y derivados de flavonoides aislados en <i>Arachis hypogaea</i> .....	80
<b>Figura 2. 4.</b> Estructura química de la luteolina .....	81
<b>Figura 2. 5.</b> Procedimiento de la obtención de los extractos etanólico y Extracto Rico en Luteolina (ERL).....	85
<b>Figura 2. 6.</b> Cromatograma HPLC-DAD del estándar de luteolina (30 ppm) con el estándar de quercetina (20 ppm) .....	87
<b>Figura 2. 7.</b> Curva de calibración de luteolina usando el Método HPLC de Patrón Interno.....	87
<b>Figura 2. 8.</b> Regiones de mayor producción de maní en Bolivia .....	90
<b>Figura 2. 9.</b> Extracto etanólico de cáscaras de maní .....	92
<b>Figura 2. 10.</b> Cromatogramas de 2 muestras de cáscaras de maní: (a) Tubito Bayo y (b) Chiquitano Coloradito; usando el método desarrollado HPLC-DAD con patrón interno y sin patrón interno. ..	94
<b>Figura 2. 11.</b> Contenido de luteolina en extractos y cáscaras de los diferentes cultivares de maní no procesados .....	96
<b>Figura 2. 12.</b> Luteolina en extractos y cáscaras de cultivares procesados y no procesados del mercado de Sucre .....	97
<b>Figura 2. 13.</b> Placas TLC del proceso de aislamiento de luteolina .....	98

## INDICE DE TABLAS PARTE I

### *Baccharis latifolia* (chilca)

<b>Tabla 1. 1.</b> Acciones de los principales mediadores de inflamación y su función en las diferentes reacciones de inflamación.....	20
<b>Tabla 1. 2.</b> Rendimiento del proceso de extracción con EtOH de hojas de <i>B. latifolia</i> .....	37
<b>Tabla 1. 3.</b> Rendimientos de los ERFC y Extractos etéreos de 4 pruebas de separación de compuestos apolares.....	38
<b>Tabla 1. 4.</b> Flavonoides Totales equivalentes a Luteolina por gramo de hojas secas o gramo de ERFC resultante de las pruebas con éter de petróleo.....	39
<b>Tabla 1. 5.</b> Obtención del ERFC de las muestras colectadas de <i>B. latifolia</i> en Lluto y Apaña.....	41
<b>Tabla 1. 6.</b> Flavonoides identificados en el extracto EtOH de hojas de <i>B. latifolia</i> .....	42
<b>Tabla 1. 7.</b> Datos de RMN 1D y 2D para el <b>Compuesto 2</b> .....	43
<b>Tabla 1. 8.</b> Datos de RMN 1D y 2D para el <b>Compuesto 3</b> .....	44
<b>Tabla 1. 9.</b> Datos de RMN 1D y 2D para el <b>Compuesto 6</b> .....	45
<b>Tabla 1. 10.</b> Datos de RMN 1D y 2D para el <b>Compuesto 7</b> .....	46
<b>Tabla 1. 11.</b> Datos de RMN 1D y 2D para el <b>Compuesto 9</b> .....	47
<b>Tabla 1. 12.</b> Datos de RMN 1D y 2D para el <b>Compuesto 10</b> .....	48
<b>Tabla 1. 13.</b> Cuantificación de 6 compuestos identificados, en los extractos EEBL y ERFC, mediante el método HPLC con Patrón Interno.....	52
<b>Tabla 1. 14.</b> Actividad inhibitoria de radicales libres DPPH, ABTS y determinación de fenólicos totales por Folin-Ciocalteu de extractos y compuestos seleccionados de <i>B. latifolia</i> .....	53
<b>Tabla 1. 15.</b> Flavonoides evaluados en su capacidad antioxidante y determinación de OH fenólicos.....	54
<b>Tabla 1. 16.</b> Producción de óxido nítrico en los sobrenadantes de macrófagos de tratamientos con extractos y compuesto de <i>B. latifolia</i> .....	56

## INDICE DE TABLAS PARTE II

### *Arachis hypogaea* (maní)

<b>Tabla 2. 1.</b> Algunas especies de mayor producción en Bolivia.....	76
<b>Tabla 2. 2.</b> Muestras de diferentes cultivares obtenidas de las regiones de mayor producción de Bolivia.....	91
<b>Tabla 2. 3.</b> Rendimiento del extracto EtOH respecto a la materia seca, de cultivares de maní de Bolivia.....	92
<b>Tabla 2. 4.</b> Contenido de luteolina en cáscaras y extractos de los diferentes cultivares de maní no procesados de Bolivia .....	95
<b>Tabla 2. 5.</b> Contenido de luteolina en cultivares procesados y sin procesar del mercado de Sucre.....	97
<b>Tabla 2. 6.</b> Datos de RMN 1D y 2D de luteolina aislada de la cascara de maní. ....	99
<b>Tabla 2. 7.</b> Gráficas del estudio de termoestabilidad de los extractos etanólicos a 50, 60 y 80 °C. ....	100
<b>Tabla 2. 8.</b> Gráficas del estudio de termoestabilidad de los ERL a 50, 60 y 80 °C.....	101
<b>Tabla 2. 9.</b> Gráficas del estudio de termoestabilidad de la luteolina a 50, 60 y 80 °C.....	102
<b>Tabla 2. 10.</b> Determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos y la luteolina.....	103

## PROLOGO

El hombre a lo largo de la historia ha estado conectado con la naturaleza, acudiendo a ella, por el método de ensayo y error, logrando seleccionar lo que poseía una acción real o imaginaria para sanar o aliviar las sensaciones extrañas que le impedían realizar sus actividades cotidianas.

El avance científico y tecnológico, principalmente de los países occidentales, dio lugar al descubrimiento y desarrollo de complejos procesos de síntesis orgánica, conllevando a una nueva línea de producción de medicamentos que han contribuido a curar enfermedades que antes eran mortales<sup>1</sup>. La inclusión de técnicas modernas en el descubrimiento de nuevas drogas como: Screening de librerías de compuestos, modificación racional de drogas existentes, diseño a partir de un ligando natural o modulador, síntesis combinatoria y diseño asistido por computadoras, entre otros<sup>2</sup> hicieron que las inversiones se redujeran en el campo de los productos naturales y se invirtiera más en síntesis. Sin embargo, esto no produjo los resultados esperados pues no se vio un incremento real de nuevos fármacos, por lo que nuevamente se desvió la atención a los productos naturales cuyas estructuras unidas a los métodos modernos de síntesis, han servido de base para la mayor parte de nuevos fármacos desarrollados en este siglo.<sup>3</sup>

Sin embargo, se ha demostrado que varios compuestos químicos sintéticos utilizados como fármacos han causado efectos colaterales dañinos para la salud. Además, estos avances científicos no han estado al alcance de una gran mayoría de poblaciones que por razones estructurales viven en condiciones de extrema pobreza, principalmente en los países llamados del Tercer Mundo, los cuales siguen recurriendo al uso de la medicina tradicional, basándose en conocimientos que fueron llevados de generación en generación, para cuidar

---

<sup>1</sup>Seminario J. Editor Técnico, Raíces Andinas: Contribuciones al conocimiento y a la capacitación, Sánchez I., 2 Biodiversidad Vegetal en Los Andes, Arnez T. de Icochea Centro Internacional de la Papa Editorial, 2004, Pág. 39 – 40

<sup>2</sup> Patrick, G. L. 2009. An Introduction to medicinal Chemistry, New York, Oxford University Press Inc.

<sup>3</sup> Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Product Reports 17 (3), 215–234.

su salud. Así, la Organización mundial de la Salud estima que un 75% de la población se trata con plantas medicinales y sus extractos.<sup>4</sup>

Considerando la gran importancia que tiene la medicina tradicional y en particular las plantas medicinales, la Industria Farmacéutica y en general el mercado de productos terapéuticos, no solo han reconocido a las plantas como fuente de compuestos bioactivos sino también como materia prima para el desarrollo de productos fitoterapéuticos, que tienen como base un extracto o fitocomplejo, pero que para entrar al mercado farmacéutico requieren varios estudios que verifiquen su calidad, seguridad y eficacia, mediante investigaciones científico-clínicas.

Las investigaciones en plantas han demostrado que varias contienen compuestos activos (metabolitos secundarios) favorables para el ser humano, Entre los principios activos de las plantas medicinales se encuentran los metabolitos secundarios denominados fenólicos, que han sido ampliamente estudiados debido a su importancia biológica<sup>5</sup>. Entre estos compuestos fenólicos destacan, los flavonoides, un grupo de metabolitos ampliamente distribuido en plantas alimenticias y medicinales. Los flavonoides son bien reconocidos por sus actividades farmacológicas, por ejemplo, como agentes antioxidantes, antitumorales, antibacterianos y antiinflamatorios. Demostrándose así que tales actividades dependen de su estructura.<sup>6</sup> También se sabe que los antioxidantes previenen lesiones causadas por los radicales libres en diferentes mecanismos tales como: la inhibición de la formación de radicales, la promoción de la descomposición de radicales libres y la eliminación de radicales libres<sup>7</sup>. Los flavonoides son antioxidantes que pueden recoger directamente superóxido y peroxinitrito. También pueden inhibir la reacción de los radicales libres en la vía de señalización de óxido nítrico en diferentes tipos de células.<sup>8</sup> Se ha demostrado que una alta concentración de ROS desencadena la expresión de NF- $\kappa$ B, un factor de transcripción de los genes pro-inflamatorios como, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , COX-2 e iNOS. El

<sup>4</sup> Gonzáles A. G., Galindo A. y Luis J. G, Síntesis y Transformaciones Biogénicas de Diterpenos de Salvias y Lactonas Sesquiterpénicas Compuestas, Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Garbarino J. A. y Fiedler P. Editores, Impreso Talleres Gráficos U.T.F.S.M. Valparaíso Chile, 1992, 1er. Simposio Internacional, Pág. 7

<sup>5</sup> Laitinen M-L, Julkunen-Tiitto R, Rousi M (2000) Variation in phenolic compounds within a birch (*Betula pendula*) population. *J Chem Ecol* 26: 1609–1622

<sup>6</sup> Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology and Therapeutics*, 96, 67–202.

<sup>7</sup> Ma A, Qi S, Chen H: Antioxidant therapy for prevention of inflammation, ischemic reperfusion injuries and allograft rejection. *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008, 6: 20-43.

<sup>8</sup> Nakajima H, Kakui N, Ohkuma K, Ishikawa M, Hasegawa T. A newly synthesized poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor, DR2313 [2-methyl-3,5,7,8-tetrahydrothiopyrano[4,3-d]-pyrimidine-4-one]: pharmacological profiles, neuroprotective effects, and therapeutic time window in cerebral ischemia in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 312:472–481

estrés oxidativo causa la expresión de la ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LOX) genes que desempeñan un papel en la iniciación de mediadores inflamatorios, en el que los flavonoides han demostrado actuar como compuestos anti-inflamatorios<sup>9 10</sup>. Por lo tanto, existe interacción entre el estrés oxidativo y la inflamación y entre la actividad antioxidante y anti-inflamatoria.<sup>11</sup> El estrés oxidativo está relacionado a diversas enfermedades como la arteroesclerosis, la insuficiencia renal, la pancreatitis, la catarata senil y el cáncer.

En este sentido el Laboratorio de Bioorgánica de la Carrera de Ciencias Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz-Bolivia) trabaja en la investigación de extractos y compuestos con actividad antioxidante y antiinflamatoria de plantas nativas de Bolivia, con el objetivo de que los mismos puedan utilizarse en productos fitoterapéuticos o fármacos para el alivio o prevención de diversas enfermedades de la población. Por lo que en el presente trabajo se desarrolla la investigación de extractos y flavonoides de las especies *Baccharis latifolia* (chilca) y *Arachis hypogaea* (maní) investigaciones que se muestran en la presente memoria divididas en dos partes:

- Parte I. Contribución al estudio de flavonoides en *Baccharis latifolia* (Chilca)
- Parte II. Contribución al estudio del flavonoide luteolina en *Arachis hypogaea* (Maní)

Con el objetivo de realizar una evaluación química y farmacológica de flavonoides y extractos enriquecidos en flavonoides de *B. latifolia* y *A. hypogaea* para su potencial aplicación medicinal.

---

<sup>9</sup> Harris GK, Qian Y, Leonard SS, Sbarra DC, Shi X. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *J. Nutr.* 2006; 136:1517–1521.

<sup>10</sup> Prasad NS, Raghavendra R, Lokesh BR, Naidu KA. Spice phenolics inhibit human PMNL 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 2004; 70:521–528.

<sup>11</sup> Chanput W, Krueyos N, Ritthiruangdej P. Anti-oxidative assays as markers for anti-inflammatory activity of flavonoids. *Int Immunopharmacol.* 2016; 40:170–175.

## PARTE I (*Baccharis latifolia*)

### 1.1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEORICO

#### 1.1.1. Plantas Medicinales

Durante muchos años las plantas han sido utilizadas en muchos campos, como la medicina, nutrición, saborizantes, bebidas, repelentes, fragancias, cosméticos y otros. Siendo estas principalmente la base para casi todas las terapias medicinales, ya que realizando preparados con estas plantas, se han llegado a curar una variedad de enfermedades que aquejaban antiguamente al hombre. Poco a poco y con el avance de la tecnología se fue realizando pruebas a estas drogas crudas encontrando el compuesto o los compuestos activos, obteniéndolos posteriormente de forma sintética.

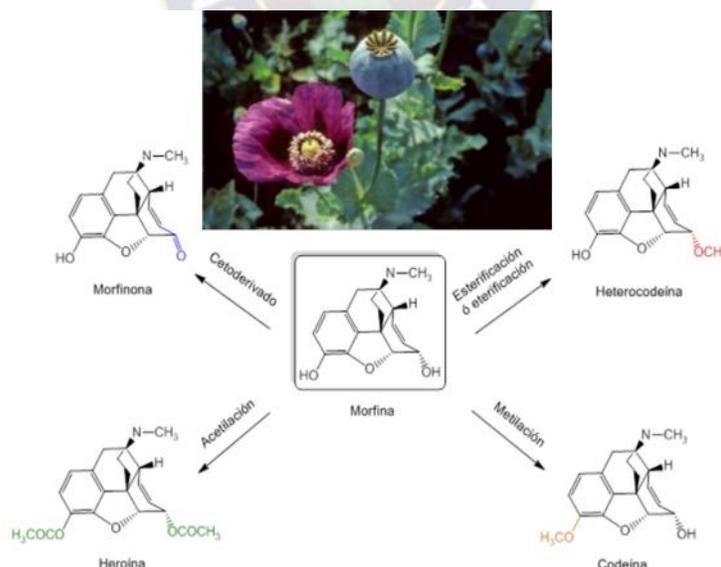


**Figura 1. 1.** Plantas medicinales y remedios herbales  
Fuente: Plantas medicinales, 2017

Según estimaciones recientes de la Organización Mundial de la Salud, más de 3.500 millones de personas en el mundo en desarrollo dependen de las plantas como componentes de su atención primaria de salud (Balick y Cox, 1997), por lo que varios científicos pusieron su atención en ellas implementándose el estudio del área de la farmacognosia, que se refiere a estudios sobre drogas de productos naturales, teniendo como resultado al incremento en el uso de remedios herbales (fitomedicamentos) en la práctica de la farmacéutica moderna. Particularmente, en los países en desarrollo, la disponibilidad de medicamentos para la cura de muchas enfermedades está sujeto a su economía, razón por la cual el hombre ha optado por utilizar extractos vegetales, ya sea en forma de preparaciones

o como principios activos puros. Durante la última mitad del siglo XX, la farmacognosia evolucionó de ser un sujeto botánico descriptivo a uno con un enfoque más químico y biológico. El estudio sistemático de los remedios herbales ofrece a los grupos de farmacognosia un nuevo campo de investigación que abarca desde la investigación de los principios biológicamente activos hasta los fitomedicamentos, estudiando desde su modo de acción y posibles interacciones medicamentosas hasta el control de calidad y la participación en ensayos clínicos. (Farnsworth, *et al.*, 1985; Kinghorn, 2001)

Los fitoquímicos (químicos de productos naturales) preparan extractos de los materiales vegetales, los cuales son sometidos una serie de pruebas fitoquímicas preliminares, escogiendo así las especies que presentan los mejores resultados, de este modo se escogen las plantas y se comienza el proceso de aislamiento, identificación y evaluación de la actividad biológica del (de los) compuesto (s) activo (s), estudios con los cuales se logró aislar e identificar compuestos activos como la codeína, morfina, quinina, penicilina entre otros, compuestos que aún se utilizan como principios activos de diversos medicamentos (Balunas, & Kinghorn, 2005; Newman, *et al.*, 2000) y que en algunos casos sirvieron de base para obtener derivados más activos, como la heroína a partir de la morfina (**Figura 1.2**)

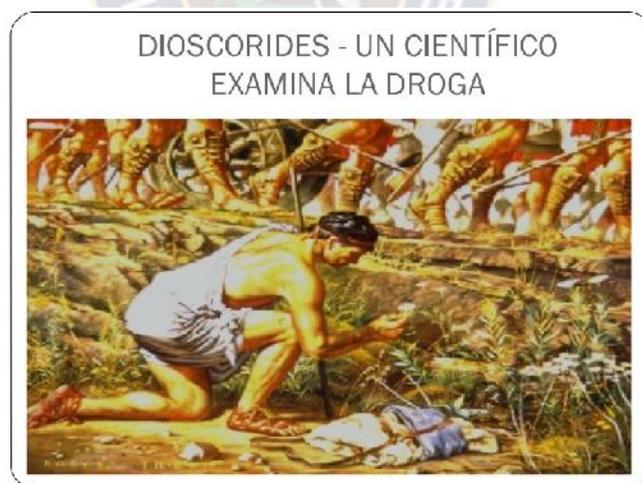


**Figura 1. 2.** Alcaloides obtenidos a partir de la morfina  
Fuente: Elaboración propia

### 1.1.2. Productos Fitoterapéuticos

La palabra “fitoterapéutico” proviene de la combinación del término phyto (que significa “planta” en griego) con el vocablo “terapéutico” que significa curación, remedio, tratamiento. Por lo que se trata de plantas, o productos de ellas, que curan o tratan algún tipo de enfermedad. (Bueno, 2016). En comparación con la medicina alopática, que recomienda sólo las sustancias extraídas de plantas, la fitoterapia utiliza plantas en forma de extractos totales. Estas preparaciones o drogas crudas, fáciles de preparar, usualmente tratan enfermedades funcionales o fases incipientes de las enfermedades. (Grigorescu E., *et al.*, 2001).

Los primeros que expresaron una relación entre la concepción filosófica de la enfermedad, la salud del hombre y las plantas, fueron los filósofos griegos Alcmenon de Crotona y Diogenes de Apolonia, entre otros. Pero el verdadero padre de la fitoterapia es Dioscorides que escribe el primer tratado completo de fitoterapia: “Plantas y Remedios Medicinales”. En su libro, Dioscorides describe todas las plantas conocidas en su época y su forma de uso como remedios medicinales. En total describe 824 plantas, distribuidas en 5 libros. (Bueno, 2016).



**Figura 1. 3.** Dioscorides, padre de la Fitoterapia  
Fuente: Bueno, 2016

La historia de la medicina y en particular de la fitoterapia, marca el uso de las plantas como recurso terapéutico, utilizado principalmente por shamanes, sacerdotes, curanderos,

herbolarios y otros. La farmacopea vegetal todavía es empleada y es considerada como una de las más importantes del mundo. En Bolivia, hay una gran tradición en fitoterapia, las etnias, sobre la base de sus tradiciones milenarias, usan partes de especies vegetales en forma directa o de preparaciones semi-elaboradas, las mismas no están dosificadas, ni identificadas botánicamente en la mayoría de los casos, pero son base para la cura de diversas dolencias de la población (Univalle, 2011).

### 1.1.3. Género *Baccharis*

*Baccharis* es el género más grande de la familia Compositae, con más de 500 especies distribuidas por los continentes de Norte y Sudamérica. Las especies de este género se distribuyen principalmente en las regiones cálidas, templadas y tropicales de Brasil, Bolivia, Argentina, Colombia, Chile y México (Abad & Bermejo, 2007).

En Bolivia, este género se encuentra ampliamente distribuido siendo abundante en regiones de elevación media o alta de los Andes, especialmente en los Yungas y las regiones de valle seco. Las especies que se encuentran en el centro y el sur de Bolivia se encuentran a menudo restringidas a los Andes del noroeste de Argentina, estas regiones incluyen un sorprendente número de especies que también están en el sureste de Brasil y áreas adyacentes. La distribución de los diferentes grupos infragénicos sugiere que el lado este de los Andes entre el norte de Bolivia y la región central de Argentina es el centro original del género. La flora boliviana incluye 59 especies de *Baccharis* (casi 1/5 del género), incluyendo 31 subespecies y variedades; De estas, 13 especies y 10 taxones infraespecíficos son endémicos del país (Müller, 2006).

El género *Baccharis* es una importante fuente de medicamentos naturales. Según la literatura, más de 100 especies de *Baccharis* han sido investigadas para revelar que contienen muchas clases de metabolitos secundarios. Los compuestos más difundidos reportados son diterpenoides de clerodano y labdano, así como triterpenoides de la serie de oleanano. Además, los diterpenoides de kaurano, los ésteres del ácido cinámico, los derivados cumarínicos y los flavonoides, son metabolitos secundarios comunes. Durante la investigación intensiva de los componentes químicos del género *Baccharis*, se ha prestado mucha atención a sus componentes bioactivos, los cuales fueron evaluados principalmente

por sus propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas (Abad & Bermejo, 2007).



**Figura 1. 4.** *Baccharis* que se encuentran en los predios del Campus Universitario  
Fuente: San Martín, 2017

#### 1.1.4. Especie vegetal *Baccharis latifolia*

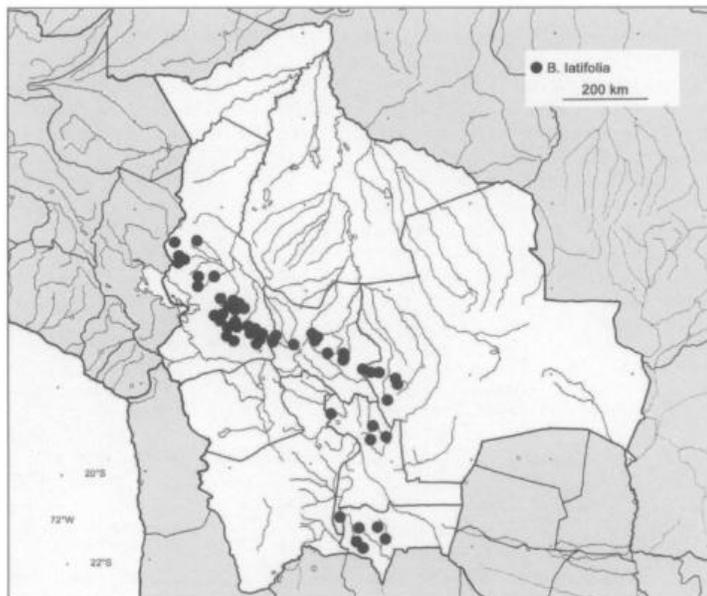
La especie *Baccharis latifolia* es un arbusto o sufrutice de 0,5 – 2,5 m de alto, dioico, con ramificación simpódica, tallos laterales verdes o con coloración rojizas. Hojas alternas, coriáceas o subcoriáceas, muy resinosas, haz brillante de 5 – 12 cm de alto por 1,7 – 3,5 cm de ancho, elíptica, ovada, de ápice agudo y borde dentado, con dientes agudos, con tres nervios visibles, que nacen cerca de la base atenuada. Capítulos pedunculados, en panículas corimbosas terminales; los capítulos masculino y femenino acampanados se diferencian por la cantidad de flores. Capítulos masculinos con 15 – 45 flores pseudohermafroditas, con corolas tubulares de 3 – 6 mm. Estambres tan largos como la corola y anteras apicales. Capítulo femenino con 100 a 150 flores hermafroditas o solo femeninas, corola apicalmente truncada y con dos o varias series de pelos, estilo de 3 – 5 mm. Aquenios de aproximadamente 2 cm de largo, de color café claro, comprimidos lateralmente, 5 – 8 costados. Pappus uniseriado o biseriado de pelos rectos, escabrosos y delgados de color blanco o pajizo (Valenzuela, 2012)



**Figura 1. 5.** Especie vegetal *Baccharis latifolia*  
Fuente: San Martín, 2017

En Bolivia, se encuentra desde regiones húmedas hasta valles secos y zonas altas 1800 a 3900 m.s.n.m., pero existen reportes en alturas comprendidas entre 500 y hasta más de 4000 m.s.n.m. Se tiene colectas de La Paz (Prov. Murillo, Larecaja, Aroma, Bautista Savedra, Loayza, Nor y Sud Yungas, Inquisivi, Franz Tamayo); Cochabamba (Prov. Ayopaya, Carrasco, Chapare); Chuquisaca (J. Mendoza, Oropeza); Tarija (Prov. Mendez, O'Connor); Santa Cruz (Prov. Valle Grande, Florida, Caballero) (Valenzuela, 2012)

Según estudios de suelos, esta especie se desarrolla con preferencia en laderas con pendientes superiores a 55%, donde el agua puede escurrir rápidamente, además de crecer en material de reciente remoción y de naturaleza pedregosa (Amurrio, 2012)



**Figura 1. 6.** Distribución de *B. latifolia* en Bolivia  
Fuente: Muller, 2006

#### **1.1.5. Antecedentes etnobotánicos de *B. latifolia***

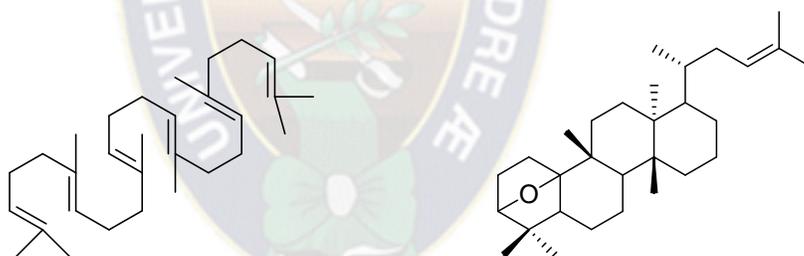
La especie *Baccharis latifolia*, conocida como chilca en Argentina; algodoncillo, buéntsamo, buétsemo, chilca, chilca blanca, chilca negra, chilca rucia, chilco, chilco blanco, chilco negro, chilquilla negra teñidora, chirca, chirco, gurrubo en Colombia; chilca, chilca negra, chiza, yana chilca en Ecuador; chilka en Perú; botonera, niquitao en Venezuela y chilca, aurauchu o yurak-chilka en Bolivia, es tradicionalmente usada en forma de cataplasma, en varias regiones rurales y urbanas de los departamentos de La Paz, Cochabamba y Tarija, el cual actúa contra inflamaciones, luxaciones y hernias. En algunas regiones las hojas con flores, frescas o secas, son utilizadas en decocción para el reumatismo, la tos y bronquitis, también las hojas secas son molidas y mezcladas con grasa de llama, formando pomadas que son desinfectantes de heridas (Freire, Urtubey, & Giuliano, 2007; Girault, 1987). En Sudamérica las hojas y/o tallos de la especie *B. latifolia* tienen varias propiedades curativas reportadas en medicinas tradicionales como analgésico, para tratar la diarrea, reumatismo, para flatulencia, ardor de estómago, antidiabético, para dolor estomacal, dolor hepático, fracturas, gangrena, insomnio, afecciones del hígado, heridas, úlceras, para tratar inflamaciones internas y externas, utilizada en forma de decocciones y cataplasmas (Abad & Bermejo, 2007; Tene *et al.*, 2007; Sequeda-Castañeda, Célis, & Luengas-Caicedo, 2015).

### 1.1.6. Antecedentes químicos de *B. latifolia*

Los metabolitos secundarios de plantas pueden definirse como compuestos que no tienen un papel reconocido en los procesos vitales de las plantas que los sintetizan, pero sí tienen un papel importante en la interacción de la planta con su medio ambiente, ya que cumplen un papel clave en la supervivencia de los seres vivos, proporcionando sustancias de defensa, atracción u otros compuestos fisiológicamente importantes (Galbis, 2004). Sobre la base de sus orígenes biosintéticos, los metabolitos secundarios de las plantas pueden estructuralmente dividirse en cinco grupos principales: policétidos, isoprenoides, alcaloides, fenilpropanoides y flavonoides (Oksman-Caldentey & Inzé, 2004).

Los metabolitos secundarios encontrados en *B. latifolia* fueron inicialmente reportados por Bohlmann *et al.*, (1979 y 1981) y Zdero *et al.*, (1989), quienes reportaron los siguientes compuestos, que se encontraban en las raíces y partes aéreas de la especie vegetal (**Figura 1.7**):

#### Triterpenos:



#### *p*-Hidroxiacetofenonas:

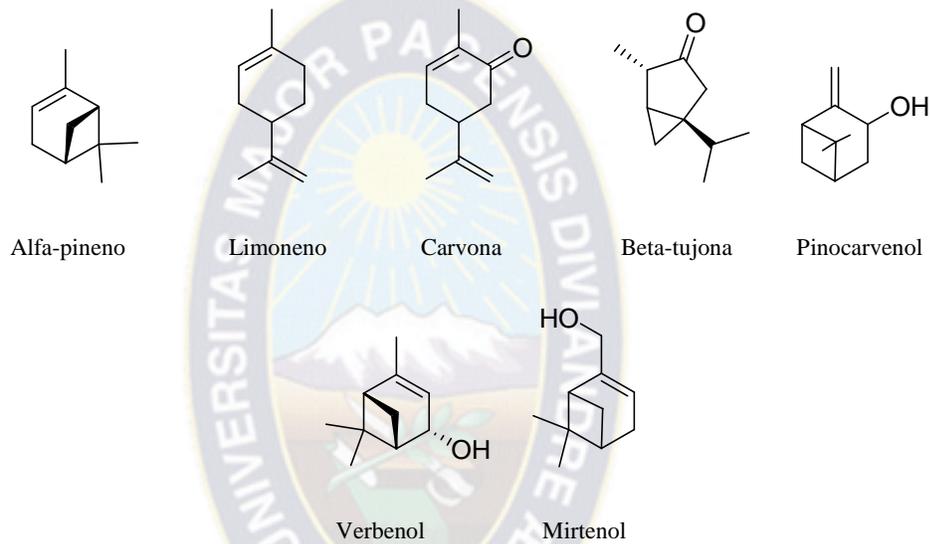


R: H  
R: OH

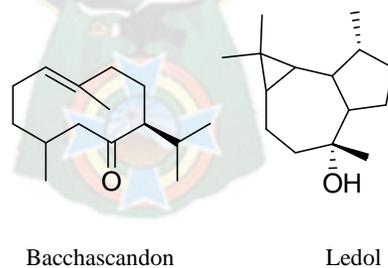


Años después, investigadores bolivianos identificaron alrededor de 100 compuestos en el aceite esencial de *B. latifolia*, de especímenes colectados en tres localidades de Cochabamba, donde los monoterpenos mayoritarios fueron el alfa-pineno, el limoneno, el beta-tujeno, pinocarvenol, verbenol, mirtenol, mirtenal y carvona, además de sesquiterpenos importantes como el germacrieno D y el ledol (Loayza, *et al.*, 1995), entre otros (**Figura 1.8**).

### Monoterpenos



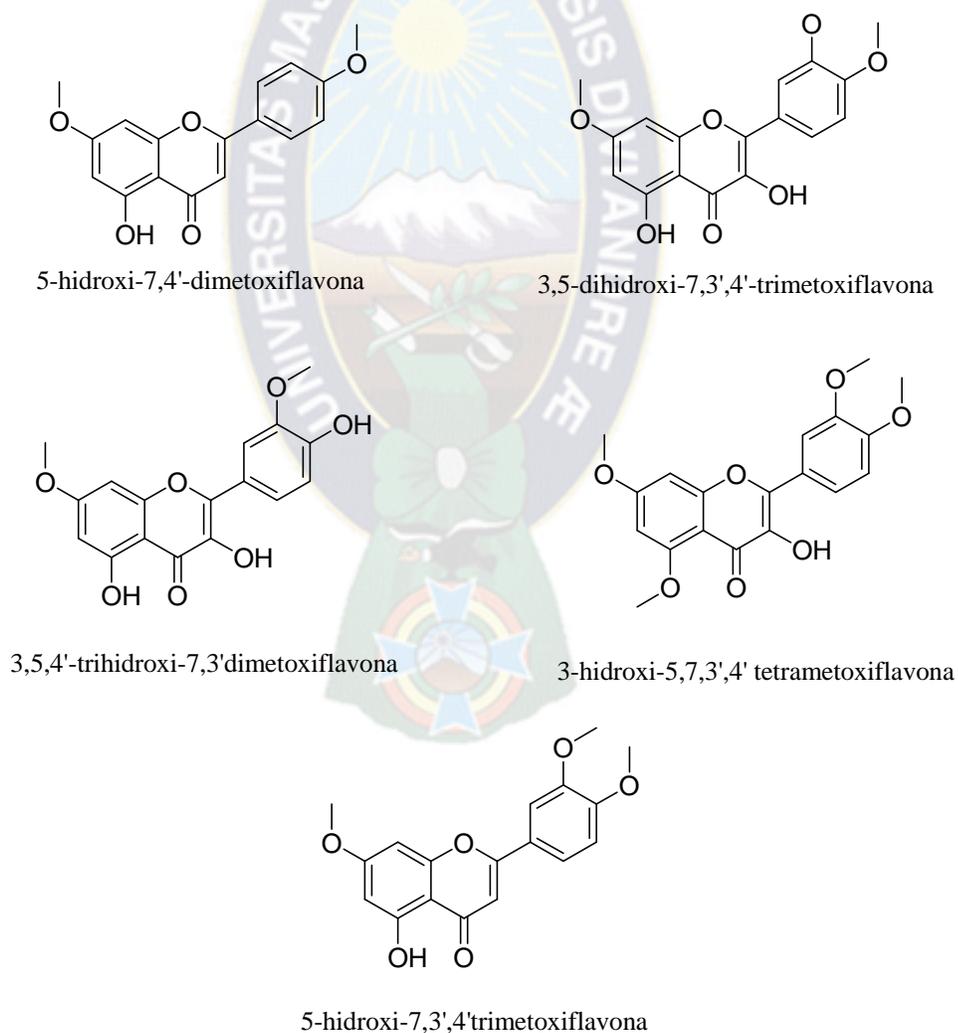
### Sesquiterpenos



**Figura 1. 8.** Monoterpenos y sesquiterpenos determinados en el aceite esencial de *B. latifolia*  
Fuente: Loayza, *et al.*, 1995

Según revisiones bibliográficas, años más tarde se empezó a estudiar los compuestos fenólicos, ya que estos compuestos presentan actividades biológicas importantes como:

antimicrobiana (Puupponen-Pimia, *et al.*, 2001), antibacteriana (Vaquero, Alberto, & de Nadra, 2007), antioxidante (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1997; Shahidi, Janitha, & Wanasundara, 1992) por la inhibición de radicales libres debido a la gran cantidad de grupos hidroxilos fenólicos presentes en su estructura (Kumarappan, Thilagam, & Mandal, 2012) y antiinflamatoria (Kazłowska, *et al.*, 2010), por lo que Salcedo, Sterner, & Almanza, 2001 y Salcedo, *et al.*, 2003), integrante de nuestro grupo de investigadores, hizo un estudio de estos compuestos, logrando aislar cinco flavonoides de la especie *B. latifolia* 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, 3,5,4'-trihidroxi-7,3'dimetoxiflavona o rhamnazin, 3,5-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, 5-hidroxi-7,3',4'trimetoxiflavona y la 3-hidroxi-5,7,3',4' tetrametoxiflavona (**Figura 1.9**)



**Figura 1. 9.** Flavonoides aislados de *B. latifolia*  
Fuente: Salcedo, *et al.*, (2001 y 2003)

Según bibliografía, dos compuestos presentaron las siguientes actividades biológicas: La **5-hidroxi-7, 4'-dimetoxiflavona**, mostro moderada actividad hepatoprotectora in vivo (Chaipech, *et al.*, 2012); moderadamente potente inhibidor de la producción de TNF inducida por el PS (Tseng, 2013); muestra actividad antiviral contra el rotavirus humano (Savi, 2010) y actividad frente a cepas de *Staphylococcus aureus* que poseen mecanismos de eflujo de resistencia (Oluwatuyi, Kaatz, & Gibbons, 2004) y el **3,4',5-Trihidroxi-3',7'-dimetoxiflavona** fue reportado como agente citotóxico contra tres líneas celulares cancerígenas TK-10, MCF-7 y UACC-62 (López-Lázaro, Martín-Cordero, & Ayuso, 1999; López-Lázaro, *et al.*, 2000)

#### **1.1.7. Antecedentes farmacológicos de *B. latifolia***

Según su uso medicinal, se realizaron varios estudios en Ecuador y Colombia del aceite esencial de *B. latifolia* el cual mostro tener una buena actividad antifúngica y antibacteriana, (Valarezo, *et al.*, 2013; Martínez, *et al.*, 2010; Zapata, *et al.*, 2010). Ensayos antiinflamatorios *in vitro* de los extractos hexánico, diclorometánico y etanólico de la especie demostraron actividad frente a diversos mediadores de inflamación como COX-2 (Abad *et al.*, 2006).

#### **1.1.8. Efectos farmacológicos de flavonoides**

Los flavonoides ejercen múltiples efectos biológicos benéficos a la salud humana, como su capacidad antioxidante debida a la inhibición de radicales libres. Se encuentran naturalmente en verduras, bayas, frutas, vino y cerveza, siendo la quercetina uno de los compuestos predominantes. Además, investigaciones han informado que presentan actividad antiinflamatoria, antiviral o antialérgica y un papel protector en las enfermedades cardíacas, el cáncer y diferentes patologías (Martínez-Flórez, *et al.*, 2002).

#### **Actividad antioxidante de flavonoides**

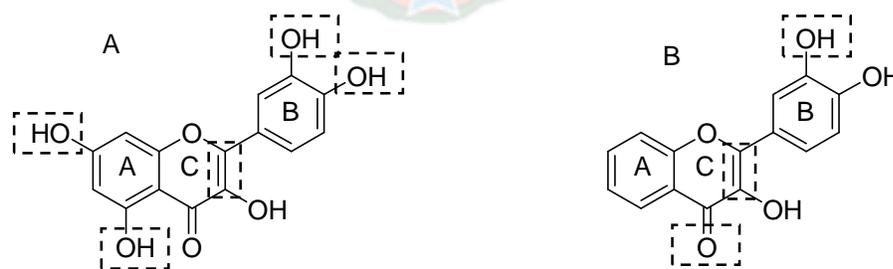
La oxidación representa una parte esencial de la vida aeróbica y de nuestro metabolismo (Davies, 1995). Sin embargo, pueden surgir problemas cuando el flujo de electrones se desacopla, generando radicales libres en exceso. Como las especies reactivas de oxígeno

(ROS), que incluyen al superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ), peroxi ( $ROO^{\cdot}$ ), alcoxi ( $RO^{\cdot}$ ) y óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) (Gulcin, 2012), que pueden generar reacciones oxidativas dañinas para la salud.

La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes *in vitro* ha sido objeto de varios estudios en los últimos años y se han establecido importantes relaciones estructura-actividad sobre la actividad antioxidante (Hanasaki, Ogawa, & Fukui, 1994; Firuzi, *et al.*, 2005; Dugas *et al.*, 2000; Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996). Además, los flavonoides absorbidos pueden mostrar una actividad antioxidante *in vivo*, que se evidencia experimentalmente por el aumento del estado antioxidante del plasma, el efecto ahorrador sobre la vitamina E de las membranas eritrocitarias y las lipoproteínas de baja densidad, además de la preservación de la membrana eritrocitaria poliinsaturada de ácidos grasos (Pietta, 2000).

Los mecanismos de la acción antioxidante de los flavonoides pueden incluir la eliminación directa de radicales libres reactivos, la quelación de iones metálicos traza implicados en la formación de radicales libres, la inhibición de enzimas implicadas en la producción de radicales libres y la regeneración de antioxidantes unidos a membrana (Heim, Tagliaferro, & Bobilya, 2002; Nijveldt *et al.*, 2001; Ferrali *et al.*, 1997; Hirano, 2001)

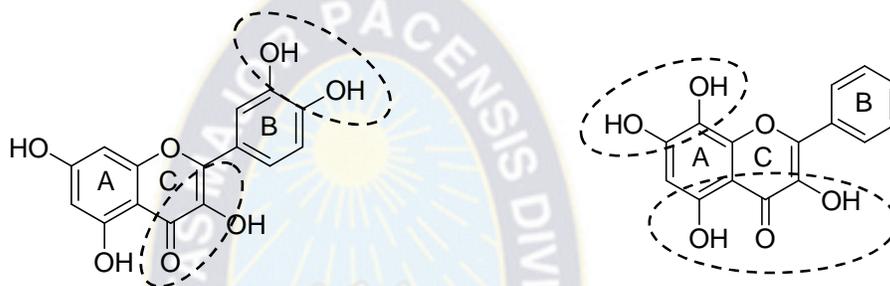
Los flavonoides inhiben las enzimas responsables de la producción de aniones superóxido, como la xantina oxidasa (Hanasaki, *et al.*, 1994; Hayashi, *et al.*, 1988; Lin, *et al.*, 2002) (**Figura 1.10**) y la proteína quinasa C (Ferriola, Cody, & Middleton, 1989; Ursini, *et al.*, 1994), estudios reportados demostraron además los requerimientos estructurales importantes para esta actividad (Amic, *et al.*, 2007).



**Figura 1. 10.** Requerimientos estructurales para A) Inhibición de la xantina oxidasa y B) Inhibición de la lipoxigenasa  
Fuente: Amic, *et al.*, 2007

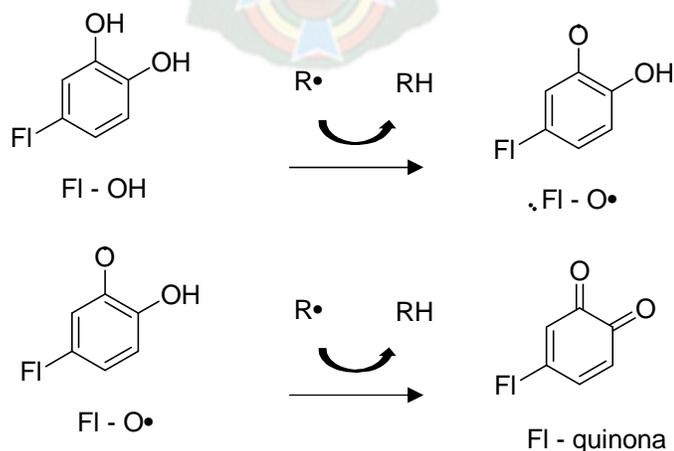
Las principales características estructurales de los flavonoides para la inhibición eficiente de radicales libres son (Croft, 1998; Bors, Heller, & Michael, 1990) (**Figura 1.11**):

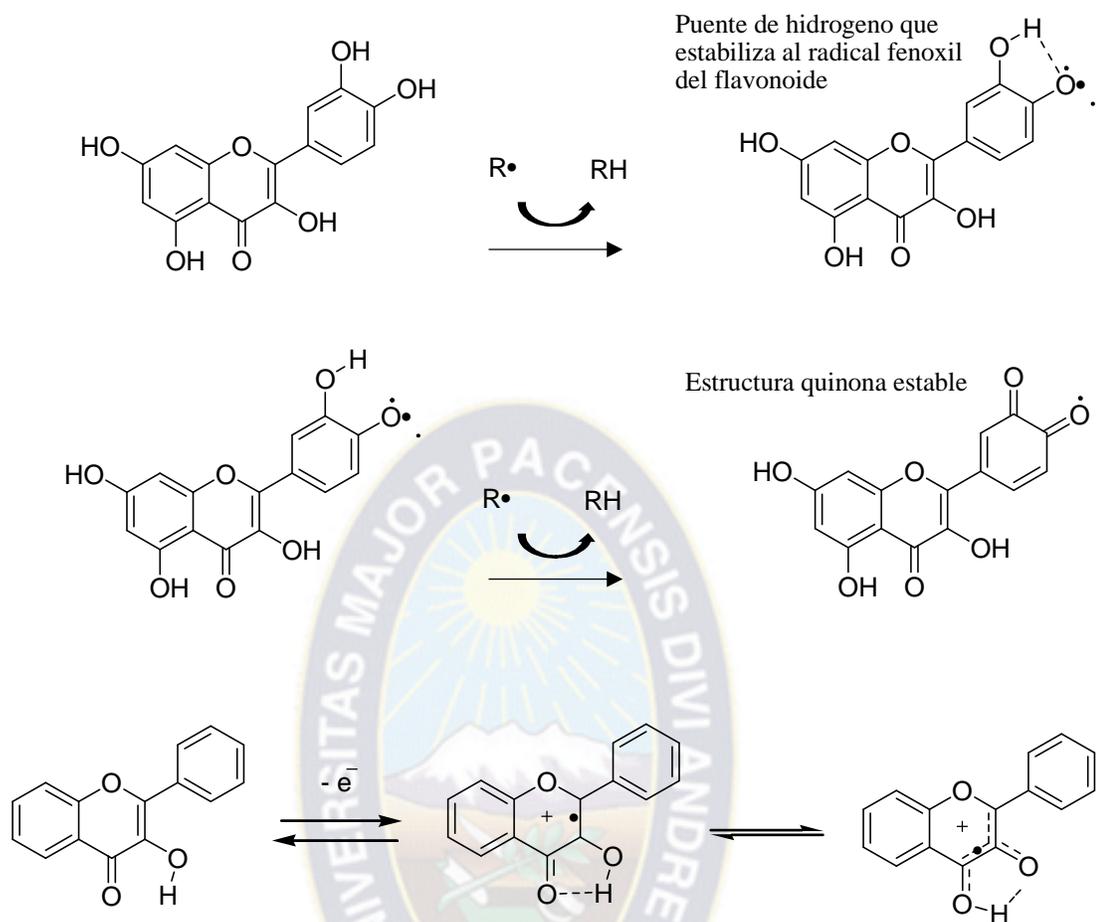
- (1) Una estructura orto-dihidroxi (catecol) en el anillo B, para la deslocalización de electrones.
- (2) 2,3 doble enlace en la conjugación, con una función 4-ceto, proporciona deslocalización de electrones del anillo C.
- (3) grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 5 que proporcionan enlace de hidrógeno al grupo ceto.



**Figura 1. 11.** Características estructurales de flavonoides con alta actividad antioxidante  
Fuente: Katz, *et al.*, 2011

Debido a los potenciales de reducción favorables de los radicales fenoxilo,  $E_7 = 0,56-0,7$  V, los flavonoides pueden actuar como antioxidantes eficaces de los radicales superóxido, peróxido, alcoxilo e hidroxilo por donación de átomos de hidrógeno (Jovanovic, *et al.*, 1994, Katz, Doughty, & Ali., 2011), ya que forman radicales fenoxilo estabilizados por diversos mecanismos (**Figura 1.12**):



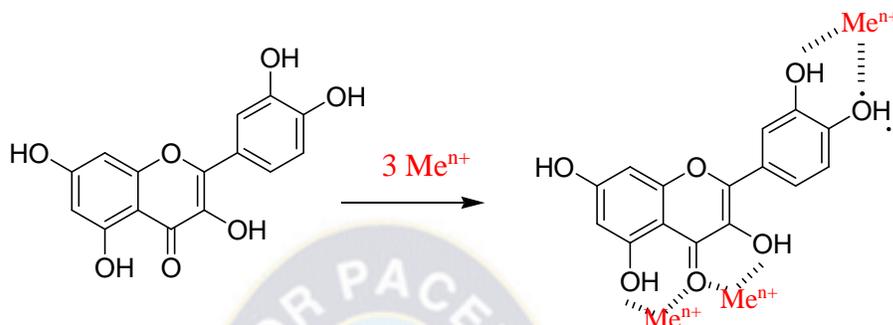


**Figura 1. 12.** Mecanismos de actividad antioxidante, inhibidora de Radicales Libres  
Fuente: Amic, *et al.*, 2007

Además, se ha demostrado que un gran número de flavonoides son quelantes eficientes de iones metálicos, como  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{+}$  que juegan un papel importante en el metabolismo del oxígeno y la formación de radicales libres (Pietta, 2000). El hierro libre (II) y el cobre (I) ayudan a la formación de especies reactivas del oxígeno, por la reducción del peróxido de hidrógeno (reacción de Fenton) con la generación del radical hidroxilo altamente agresivo:



Pietta (2000), propuso los sitios de unión con metales en los flavonoides con grupos hidroxilo en el anillo B, los grupos 3-hidroxilo y 4-oxo en el anillo heterocíclico, así como los grupos 4-oxo y 5-hidroxilo de los anillos C y A (**Figura 1.13**).



**Figura 1. 13.** Sitios de unión con metales de los flavonoides  
Fuente: Pietta, 2000

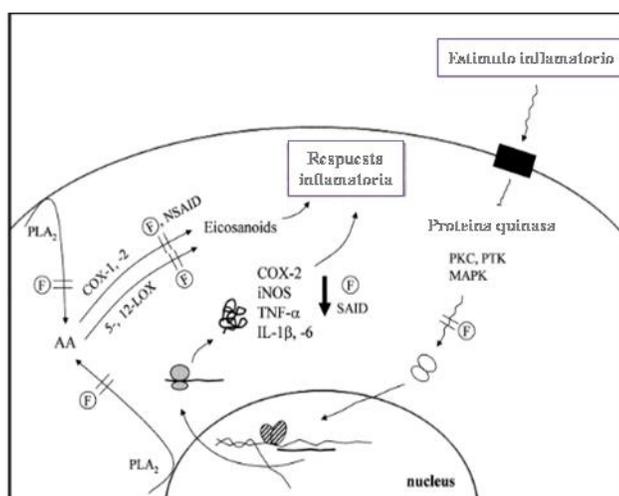
Además de eliminar los radicales libres directamente y de quelar los iones metálicos de transición enmascarando sus acciones pro-oxidantes, los flavonoides también se comportan como antioxidantes a través de la inhibición de las enzimas pro-oxidantes. Este mecanismo parece ser el principal responsable de sus efectos *in vivo*.

### Actividad antiinflamatoria de flavonoides

Se realizó varios estudios sobre la actividad antiinflamatoria de flavonoides (Clavin, *et al.*, 2007; Benavente-García & Castillo, 2008; Zhang, *et al.*, 2006); donde se propuso que probablemente existen múltiples mecanismos celulares que actúan en varios sitios del sistema celular.

Las actividades de una serie de enzimas reguladoras (por ejemplo, proteínas tirosina quinasa, proteína quinasa C, fosfodiesterasa, fosfolipasa A2, lipoxigenasa y ciclooxigenasa) son esenciales para la inflamación y la respuesta inmune. Estas enzimas son centrales para la activación de células endoteliales y otras células especializadas implicadas en la inflamación, es significativo que en muchos casos las acciones antiinflamatorias de los flavonoides pueden estar asociadas con su inhibición de estas enzimas. La ciclooxigenasa (COX) es una enzima que desempeña un papel importante

como mediador inflamatorio y está implicada en la liberación de ácido araquidónico, que es un precursor de la biosíntesis de eicosanoides como prostaglandinas y prostaciclina. La liberación de ácido araquidónico puede considerarse como punto de partida para una respuesta inflamatoria general. La prostaglandina y la biosíntesis de óxido nítrico están implicadas en la inflamación, y las isoformas de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y de la ciclooxigenasa (COX-2) son responsables de la producción de una gran cantidad de estos mediadores (Rathee, *et al.*, 2009).

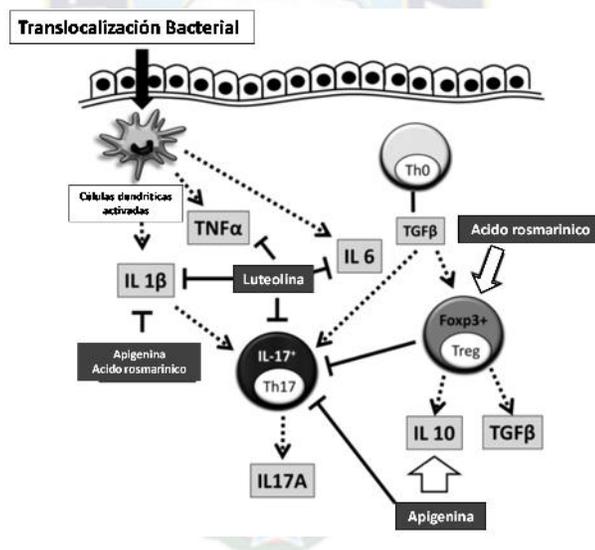


**Figura 1. 14.** Propuesta de mecanismo de acción antiinflamatorio de flavonoides (F)  
Fuente: Kim, *et al.*, 2004

De los experimentos realizados para evaluar el efecto antiinflamatorio en varios flavonoides, se puede decir que las estructuras químicas óptimas, fueron las flavanonas, flavonas y flavonoles que tienen sustitución en 3',4'-dihidroxilo o 3',4'-hidroxilo/metoxilo. Los resultados sugirieron fuertemente que los grupos 3', 4'-dihidroxilo (tipo catecol) o 3', 4'-hidroxilo/metoxilo (tipo guaiacol) eran importantes para inhibir la inflamación granulomática. Además el doble enlace entre C-2 y C-3 es importante, por la conjugación con el carbonilo en C-4. Estos hallazgos son significativos porque los flavonoides activos informados sobre los modelos inflamatorios crónicos son limitados. La actividad *in vivo* también depende de los patrones y números de hidroxilación/metoxilación, especialmente de los grupos 5,7-dihidroxilo en el anillo A y 3', 4'-catecol en el anillo B (Kim, *et al.*, 2004). Sin embargo, por vía oral, generalmente son menos activos, presumiblemente por su baja biodisponibilidad y/o metabolismo rápido, como nos dice Panthong, *et al.*, 1994, quien

estudio catorce flavonoides para determinar las características estructurales necesarias para que posean actividad antiinflamatoria usando de forma oral carragenina-inducida en pata de ratas, mostrando que al parecer las características estructurales necesarias son grupos metoxilo en los carbonos C5 y C7 del anillo A y el anillo pirano B en la molécula flavonoide, ya que se encontraron actividades antiinflamatorias insignificantes o muy bajas en los derivados de chalcona.

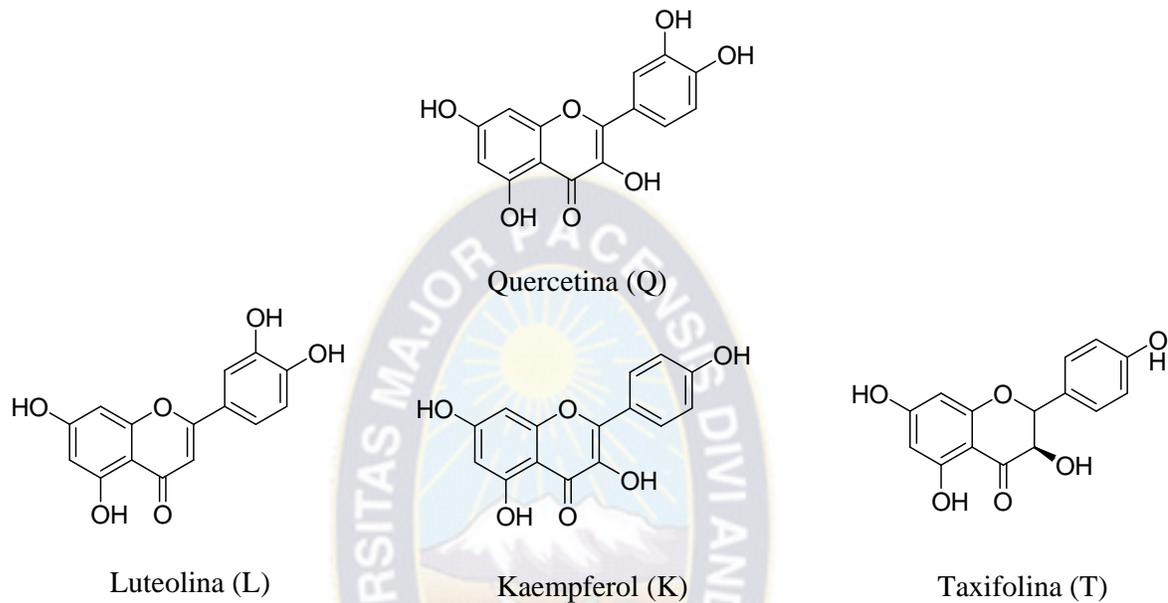
Ciertos flavonoides inhiben las enzimas generadoras de eicosanoides, así como inhiben la expresión de genes proinflamatorios. Estos efectos pueden ser favorables para los trastornos inflamatorios crónicos en el uso a largo plazo, ya que se ha demostrado que la inflamación crónica está cada vez más implicada en el inicio y desarrollo de varios trastornos patológicos como la arteriosclerosis, la obesidad, la diabetes, las enfermedades neurodegenerativas e incluso el cáncer (García-Lafuente, *et al.*, 2009; Guardia, *et al.*, 2001).



**Figura 1. 15.** Inhibición de citoquinas proinflamatorias e inducción de citoquinas antiinflamatorias de algunos flavonoides  
Fuente: Urushima, *et al.*, 2015

Según estudios realizados cuando se hizo una comparación de la quercetina con sus análogos estructurales luteolina, kaempferol y taxifolina, (**Figura 1.15**), se observó que el grupo hidroxilo 3'-OH situado en el anillo B juega un rol importante en la inhibición del LTB<sub>4</sub> para la actividad antiinflamatoria y que el grupo 3-OH del anillo C, no tiene una

contribución significativa para la actividad. Estos resultados también demuestran que el 2,3-doble enlace dentro del anillo C es un requisito estructural esencial para la inhibición de la producción de LTB<sub>4</sub> en los neutrófilos, ya que su ausencia (como en la taxifolina) disminuyó totalmente la acción inhibidora



**Actividad antiinflamatoria:** (L) Fuerte, similar a la Q, (K) Poca actividad y (T) No actividad  
**Actividad antioxidante:** (L) Mucha menor actividad que la Q, (K) Moderada actividad y (T) Fuerte actividad

**Figura 1. 16.** Aspectos estructurales para actividad antiinflamatoria (inhibición de LTB<sub>4</sub>) y antioxidante  
 Fuente: Loke, *et al.*, 2008

Para la determinación de los posibles mecanismos de acción antiinflamatoria, son indispensables pruebas *in vitro* contra mediadores de inflamación, para determinar el poder de inhibición de los compuestos puros, como los descritos en la **Tabla 1.1** (Kumar, Cotran, & Robbins, 2008):

**Tabla 1. 1.** Acciones de los principales mediadores de inflamación y su función en las diferentes reacciones de inflamación.

Mediador	Origen	Principales acciones
<b>Derivados de células</b>		
Histamina	Mastocitos, basófilos, plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular
Prostaglandinas	Mastocitos, leucocitos	Vasodilatación, dolor, fiebre
Leucotrienos	Mastocitos, leucocitos	Aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis, adhesión y activación leucocitarias
Factor activador de plaquetas	Leucocitos, células endoteliales	Vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, adhesión leucocitaria, quimiotaxis, desgranulación, estallido oxidativo
Metabolitos del oxígeno	Leucocitos	Destrucción de microbios, daño tisular
Oxido nítrico	Endotelio, macrófagos	Vasodilatación, Relajación del músculo liso vascular, destrucción de microbios, daño tisular
Citosinas (p. ej., TNF, IL-1)	Macrófagos, linfocitos, células endoteliales, mastocitos	Activación endotelial local (expresión de moléculas de adhesión), respuesta de la fase aguda sistémica; en infecciones graves, fiebre, shock séptico
Quimiocinas	Leucocitos, macrófagos activados	Quimiotaxis, activación leucocitaria
<b>Derivados de las proteínas plasmáticas</b>		
Complemento	Plasma (producido en el hígado)	Quimiotaxis y activación leucocitaria, vasodilatación (estimulación de mastocitos)
Cininas	Plasma (producido en el hígado)	Aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, vasodilatación, dolor
Proteasas activadas durante la coagulación	Plasma (producido en el hígado)	Activación endotelial, reclutamiento de leucocitos

Por lo que se cree que incluir una dieta alta en flavonoides tiene beneficios para la salud, posiblemente debido a propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias. Sin embargo, muchos estudios *in vitro* que examinaron la bioactividad de los flavonoides no han tenido en cuenta los efectos de la transformación metabólica de los flavonoides. Por otra parte, los estudios que comparan la captura de radicales libres, la actividad antioxidante y la producción de eicosanoides demuestran que existen diferentes requisitos estructurales para la actividad antioxidante y anti-inflamatoria (Loke, *et al.*, 2008).

## 1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Seleccionar un método de obtención de extractos ricos en flavonoides de *B. latifolia*
- 2) Aislar e identificar flavonoides de *B. latifolia*
- 3) Cuantificar flavonoides seleccionados en extractos de *B. latifolia*
- 4) Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de extractos y compuestos seleccionados de *B. latifolia*.

## 1.3. PARTE EXPERIMENTAL

### 1.3.1. Equipos y reactivos

Los solventes utilizados fueron purificados por destilación antes de su uso. Los extractos obtenidos fueron llevados a sequedad en un rotaevaporador Heidolph acoplado a una bomba de membrana.

Para el aislamiento de compuestos se utilizó Cromatografía Líquida al Vacío (VLC), Cromatografía en Columna (CC) abierta con Sílicagel G-60 (Merck) y Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich). El seguimiento se realizó por cromatografía en capa fina (TLC) con placas de sílicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck) reveladas con ácido sulfúrico al 3% y cloruro férrico al 5%. Para la identificación de compuestos se empleó un equipo Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker de 300 MHz Avance II.

Para el análisis de flavonoides totales por quelación con AlCl<sub>3</sub> se utilizó un Espectrofotómetro UV/Vis marca Thermo Scientific, serie Genesys 10S y cubetas de cuarzo de 1 cm.

Para la identificación y cuantificación de compuestos se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC Agilent 1100, que comprende un desgasificador de vacío (G1322 A), un sistema de suministro de disolvente (Quat Pump-G1311A), un horno de columna (Colcom-G1316A) y un detector de arreglo de diodos (G1315B), con una columna eclipse de fase reversa Agilent plus C18 (150 x 4,6 mm) protegida por una precolumna de 10 mm. Los solventes utilizados Acetonitrilo grado HPLC, Metanol grado HPLC, Ácido fosfórico p.a. y Agua miliQ.

### 1.3.2. Material vegetal *Baccharis latifolia* (R y P) Pers.

Partes aéreas de la especie *B. latifolia* (R y P) Pers. fueron colectadas en Lluto en el mes de junio de 2014. Otra colecta fue realizada en Apaña en septiembre de 2014.

### 1.3.3. Obtención de extractos

#### Extracto etanólico

La materia vegetal fue secada en un ambiente libre de rayos solares por el lapso de tres semanas, luego se seleccionaron las partes de interés (hojas). Las hojas fueron molidas manualmente, se pesó 300g sometiendo la muestra a un proceso de maceración por el lapso de 15 minutos a temperatura ambiente en una relación 1:15 (peso: volumen), en etanol de 96 °. Los extractos obtenidos fueron filtrados a gravedad con papel filtro Whatman #4 y concentrados por rotaevaporación hasta sequedad.

Finalmente, para eliminar por completo el solvente atrapado, fueron secados por dos horas en una bomba de alto vacío, obteniendo así los extractos secos y el rendimiento de cada extracto respecto al material seco.

#### Extracto Rico en Compuestos Fenólicos

Para determinar los parámetros óptimos para la obtención del ERCF se tomaron 300 g de planta seca y se obtuvo inicialmente el extracto etanólico explicado en el anterior apartado, al cual se le realizaron las siguientes pruebas:

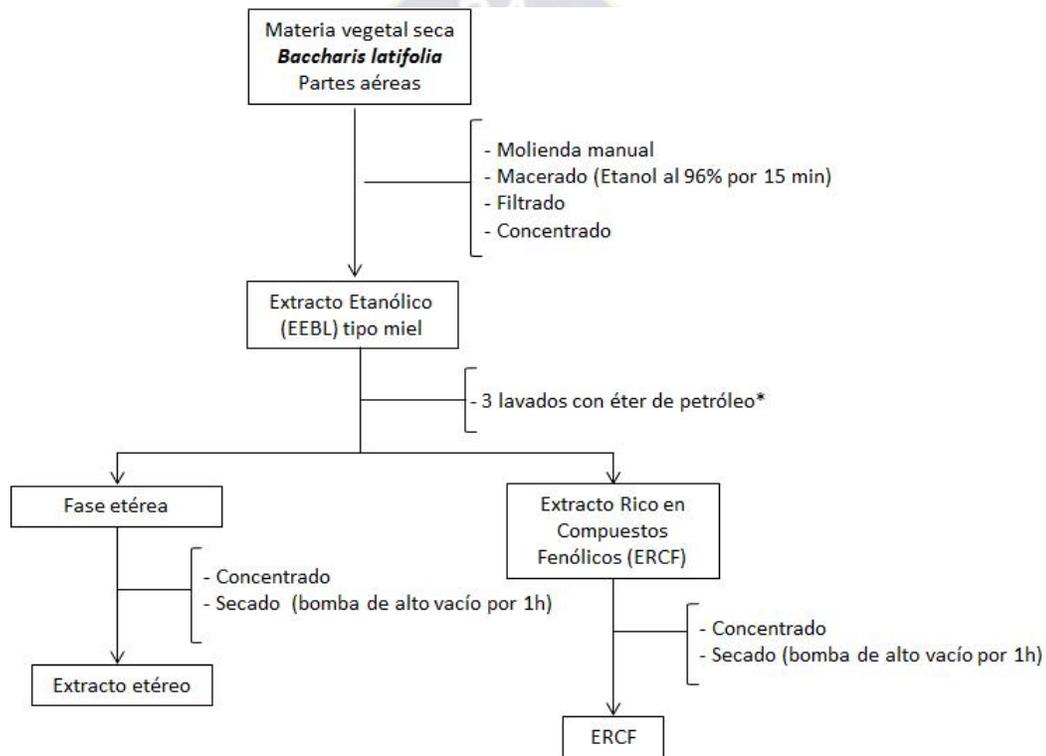
**Primera prueba:** Al extracto etanólico obtenido, se le añadió 200 ml de éter de petróleo de la fracción 40-60 °C, y se la dejó a 54 rpm en el rota evaporador sin baño María por 60 min. Esta operación se la repitió 2 veces más.

**Segunda prueba:** Al extracto etanólico obtenido, se le añadió 200 ml de éter de petróleo de la fracción 40-60 °C, y se la dejó a 54 rpm en el rota evaporador en baño María a 45 °C por 60 min. Esta operación se la repitió 2 veces más.

**Tercera prueba:** Al extracto etanólico obtenido, se le añadió 200 ml de éter de petróleo de la fracción 60-80 °C, y se la dejó a 54 rpm en el rota evaporador en baño María a 45 °C por 60 min. Esta operación se la repitió 2 veces más.

**Cuarta prueba:** Al extracto etanólico obtenido, se le añadió 200 ml de éter de petróleo de la fracción 60-80 °C, y se la dejó a 54 rpm en el rota evaporador en baño María a 45 °C por 60 min. Esta operación se la repitió 2 veces más, al extracto resultante se le añadió 100 ml de agua destilada y se la dejó en baño María a 45 °C por 30 min. Esta operación se la repitió 2 veces más.

Todos los extractos obtenidos en las pruebas descritas se llevaron a una bomba de alto vacío por el lapso de 1 hora para eliminar todo el solvente que podía quedar atrapado en el extracto.



\*Las fracciones de éter de petróleo utilizadas como solvente varían en las pruebas realizadas, por lo que se especifica en cada prueba realizada.

**Figura 1. 17.** Procedimiento para la obtención de los extractos etanólico y Extracto Rico en Compuestos Fenólicos (ERCF)  
Fuente: Elaboración Propia

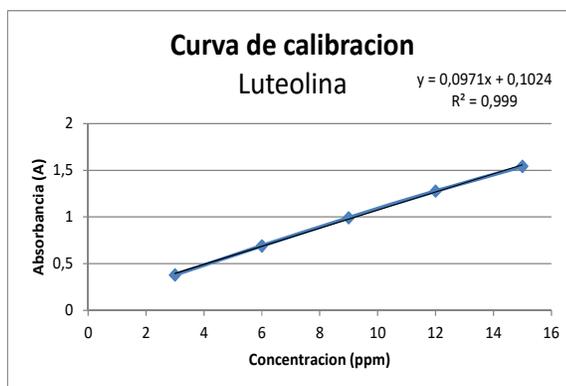


**Figura 1. 18.** Extractos obtenidos del proceso de desengrase para la obtención del ERCF;  
A: extracto etanólico; B: extractos etéreos y C: extracto etéreo y ERCF  
Fuente: San Martín, 2017

El control cualitativo para determinar las mejores condiciones para la obtención del ERCF fue mediante placas cromatográficas (TLC) utilizando como revelador Ácido sulfúrico al 3% y Cloruro férrico al 5% y la cuantificación de flavonoides totales respecto a la luteolina por quelación con  $\text{AlCl}_3$

#### 1.3.4. Cuantificación relativa del contenido de flavonoides totales por quelación con $\text{AlCl}_3$

Para poder determinar el mejor método de extracción en la obtención del Extracto Rico en Compuestos Fenólicos (ERCF), se realizó la curva de calibración con un estándar de luteolina (98% puro Sigma Aldrich), utilizando el método Mammen, & Daniel, 2012, donde se empleó como el patrón de luteolina a 30, 60, 90, 120 y 150 ppm (**ANEXO 1.1**). 0,5 ml de las disoluciones de los estándares, se mezcló con 1,5 mL de etanol del 95%, 0,1 mL de cloruro de aluminio del 10%, 0,1 mL de acetato de potasio 1 M y 2,8 mL de agua destilada. La solución resultante fue incubada a temperatura ambiente por 40 minutos, tiempo óptimo de quelación determinado en pruebas realizadas a 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 90 minutos (**ANEXO 1.2**). Finalmente se midió la absorbancia al  $\lambda_{\text{max}}$  406 nm y con los resultados obtenidos se graficó la Absorbancia Vs Concentración en ppm obteniéndose una curva con alta linealidad ( $y = 0,0971X + 0,1024$ ;  $R^2 = 0,999$ ) (**Figura 1.19**)

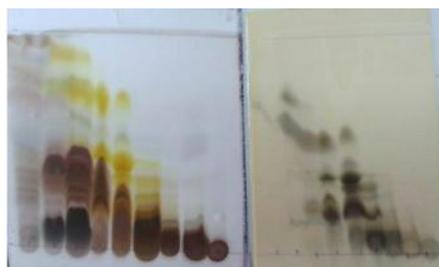


**Figura 1. 19.** Curva de calibración del estándar luteolina  
Fuente: Elaboración propia

Para determinar la mejor metodología a seguir en la obtención del ERCF se realizó la determinación relativa a luteolina del contenido de flavonoides totales, mediante el proceso de quelación a todos los extractos obtenidos, midiendo la absorbancia a la  $\lambda_{\max}$  406 nm y determinando la concentración en ppm con la recta de calibración del estándar luteolina. Además para observar el efecto batocrómico, se realizó barridos en el UV/Vis de 250nm a 500nm (ANEXO 1.2).

### 1.3.5. Aislamiento de Flavonoides

Para el aislamiento de flavonoides de *B. latifolia* se tomaron 150 g de ERCF realizando 5 columnas de cromatografía VLC, de 30 g cada una, a partir de las cuales se obtuvieron 9 fracciones (**Figura 1.20**) de la unión de fracciones iniciales que contenían los mismos compuestos, de las cuales se realizaron sucesivas separaciones obteniéndose 13 flavonoides (**Figura 1.21**)



1 2 3 4 5 6 7 8 9    1 2 3 4 5 6 7 8 9

Fraccion	Peso(g)
F1	3,1
F2	2,8
F3	11,4
F4	56,1
F5 y F6	37,5
F7, F8 y F9	34,8

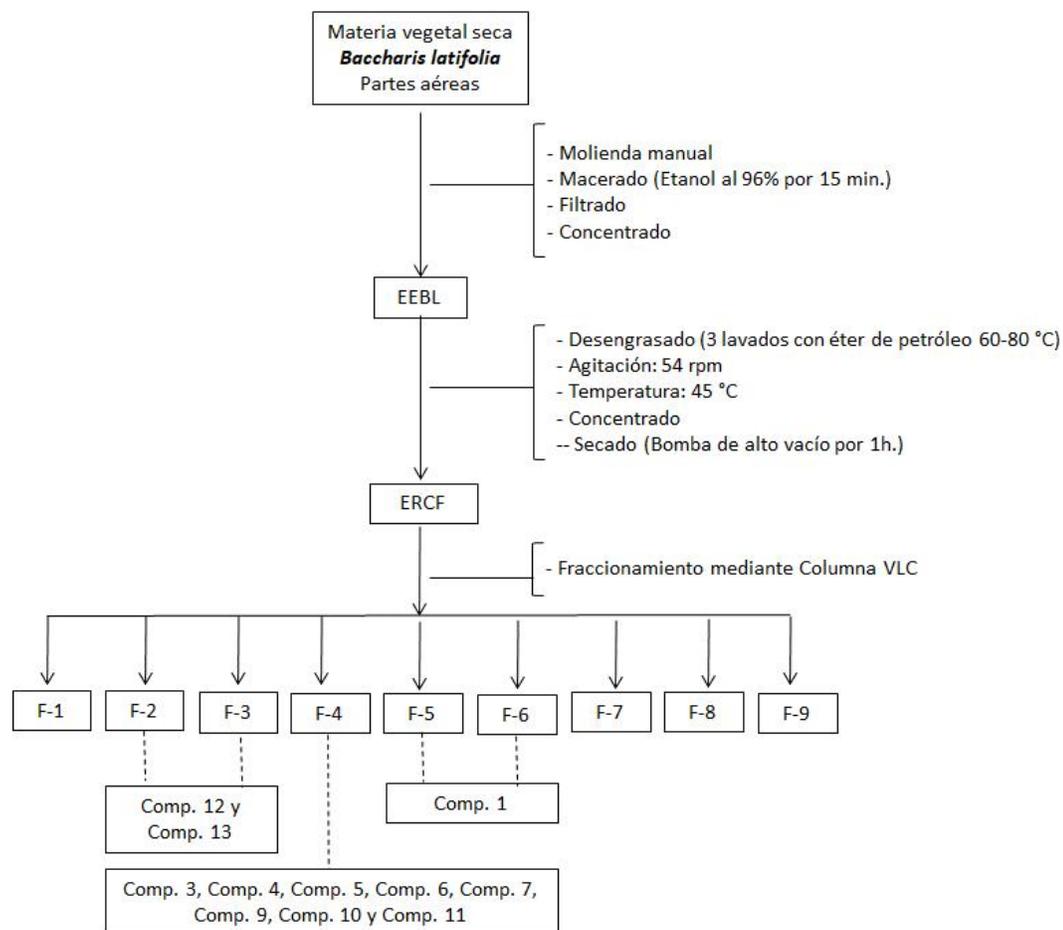
**Figura 1. 20.** Placas TLC del primer fraccionamiento del ERCF, reveladas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub>  
Fuente: San Martín, 2017

Como se puede observar en las placas cromatográficas TLC, la primera fracción no contiene los compuestos de nuestro interés, pues no se observa compuestos revelados en amarillo con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ni cafés o verdes en  $\text{FeCl}_3$ , por lo que esta fracción no fue tomada en cuenta.

**Fracción 2:** Se pesó 2 g de esta fracción y se disolvió en metanol, mediante cromatografía por exclusión molecular Sephadex LH-20, con metanol como eluyente, y técnicas de recristalización, se obtuvo 10 mg del **Compuesto 12** y 1,4 mg del **Compuesto 13**.

**Fracción 3:** Se pesó 10g de esta fracción, que fue fraccionada mediante cromatografía de adsorción en una Columna de Silicagel G-60, utilizando como eluyentes una gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo, se escogió una fracción que contenía predominantemente nuestros compuestos de interés, llevándola a una columna de exclusión molecular Sephadex LH-20 y finalmente a recristalización, a partir de lo cual se obtuvo 28,3 mg del **Compuesto 12** y 7,1 mg del **Compuesto 13**.

**Fracción 4:** Se pesó 20 g de esta fracción, que fue fraccionada mediante cromatografía de adsorción en una Columna de Silicagel G-60, utilizando como eluyentes una gradiente de éter de petróleo y acetato de etilo, se escogieron las fracción de interés llevándolas a sucesivas columnas de exclusión molecular Sephadex LH-20 y re-cristalización, obteniéndose 3,6 mg del **Compuesto 3**, 8.9 mg del **Compuesto 4**, 9,1 mg del **Compuesto 5**, 2,4 mg del **Compuesto 6**, 5,3 mg del **Compuesto 7**, 4,8 mg del **Compuesto 8**, 3,2 mg del **Compuesto 9**, 1,8 mg del **Compuesto 10** y 3,2 mg del **Compuesto 11**.



**Figura 1. 21.** Proceso para la separación de flavonoides presentes en *B. latifolia*  
Fuente: Elaboración propia

**Fracción 5 y 6:** Se pesó 1g de la unión de estas fracciones, se realizó sucesivas columnas de exclusión molecular Sephadex LH-20 y técnicas de recristalización, obteniéndose 7.1 mg del **Compuesto 1** y una mezcla del **Compuesto 1** con el **compuesto 2** (13 mg), de la que luego se identificó el **Compuesto 2**.

### 1.3.6. Identificación de Flavonoides

Para la identificación de compuestos se empleó un equipo Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker de 300 MHz Avance II, para el cual se pesó 3 mg del compuesto aislado que se disolvieron en solventes deuterados, principalmente  $\text{CDCl}_3$  y DMSO. En el caso de los compuestos minoritarios, de los cuales se obtuvo menos de 5 mg, se pesó la cantidad total que se obtuvo. Mediante la obtención y análisis de los espectros RMN 1D y 2D

(ANEXO 1. 3) se determinó la estructura química. Los datos obtenidos se muestran a continuación:

**Compuesto 1 (3,4,5,7-Tetrahidroxiflavona, Luteolina):** RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) 7.41 (1H, *dd*, *J*= 8.1; *J*= 1.5 Hz, H-6'), 7.40 (1H, *d*, *J*= 1.5 Hz, H-2'), 6.89 (1H, *d*, *J*= 8.1 Hz, H-5'), 6.67 (1H, *s*, H-3), 6.44 (1H, *brs*, H-8), 6.19 (1H, *brs*, H-6). RMN<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) 182.1 (C-4), 164.3 (C-7), 164.6 (C-2), 161.9 (C-5), 157.7 (C-9), 150.2 (C-4'), 146.2(C-3'), 121.9 (C-1'), 119.4 (C-6'), 116.5 (C-5'), 113.8 (C-2'), 104.1 (C-10), 103.3 (C-3), 99.3 (C-6), 94.3 (C-8).

**Compuesto 2 (3,4,5,7-Tetrahidroxiflavonol, Quercetina)** la mezcla del compuesto 1 y 2 fue analizada por RMN 1D y HPLC, determinándose que el compuesto 2 es quercetina, <sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 12.50 (1H, *s*, 5-OH), 7.70 (1H, *d*, *J*= 2.1 Hz, H-2'), 7.56 (1H, *dd*, *J*= 8.5; *J*= 2.1 Hz, H-6'), 6.90 (1H, *d*, *J*= 8.5 Hz, H-5'), 6.40 (1H, *d*, *J*= 1.8 Hz, H-8), 6.20 (1H, *d*, *J*= 1.8 Hz, H-6), <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>): 176.1 (C-4), 164.1 (C-7), 161.0 (C-5), 156.4 (C-9), 148.0 (C-4'), 147.1 (C-2), 145.3 (C-3'), 136.0 (C-3), 122.2 (C-1'), 120.2 (C-6'), 115.9 (C-5'), 115.3 (C-2'), 103.3 (C-10), 98.4 (C-6), 93.6 (C-8).

**Compuesto 3 (5,7,4'-Tetrahidroxi-3'-metoxiflavonol, Isorhamnetina):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 7.76 (1H, *dd*, *J*= 1.9 Hz, H-2'), 7.70 (1H, *dd*, *J*= 1.9; *J*=8.5 Hz, H-6'), 6.94 (1H, *d*, *J*= 8.5, H-5'), 6.47 (1H, *d*, *J*= 1.3, H-8), 6.19 (1H, *d*, *J*= 1.3, H-6) 3.84 (*s*, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 175.7 (C-4), 164.0 (C-7), 160.6 (C-9), 156.1 (C-5), 148.7 (C-4'), 147.3 (C-3'), 146.5(C-2), 135.9(C-3), 121.9(C-1'), 121.6(C-6'), 115.5(C-5'), 111.7(C-2'), 102.8(C-10), 98.1(C-6), 93.6(C-8), 55.7 (OCH<sub>3</sub>)

**Compuesto 4 (3,3,4,5-Tetrahidroxi-7-metoxiflavona, Rhamnetina):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 7.74 (1H, *brs*, H-2'), 7.60 (1H, *dd*, *J*= 7.5 Hz; *J*= *brs* Hz, H-6'), 6.91 (1H, *d*, *J*= 7.2 Hz, H=5'), 6.72 (1H, *brs*, H-6), 6.36 (1H, *brs*, H-8), 3.87 (*s*, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 176.4 (C-4), 165.3 (C-7), 160.8 (C-9), 156.5 (C-5), 148.5 (C-4'), 147.8 (C-2), 145.6 (C-3'), 136.6 (C-3), 122.2 (C-1'), 120.5 (C-6'), 116.1 (C-5'), 115.7 (C-2'), 104.5 (C-10), 97.9 (C-6), 92.3 (C-8), 56.5 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 5 (5,7-Dihidroxi-4 -metoxiflavona, Acacetina):**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)

12.94 (s, OH-5), 8.02 (2H, *d*,  $J = 8.9$  Hz, H-2', 6'), 7.10 (2H, *d*,  $J = 8.9$  Hz, H-3', 5'), 6.86 (1H, s, H-3), 6.49 (1H, *d*,  $J = 1.7$  Hz, H-8), 6.19 (1H, *d*,  $J = 1.7$  Hz, H-6), 3.87 (s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO) 182.2 (C-4), 164.7 (C-7), 163.7 (C-2), 162.8 (C-4'), 161.9 (C-9), 157.8 (C-5), 128.8 (C-2' y C-6'), 123.3 (C-1'), 115.0 (C-3' y C-5'), 104.2 (C-10), 103.9 (C-3), 99.4 (C-6), 94.5 (C-8), 56.0 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 6 (5, 4 -Dihidroxi-7-metoxiflavona, Genkwanina):**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)

7.97 (2H, *d*,  $J = 8.9$  Hz, H-2', 6'), 6.94 (2H, *d*,  $J = 8.9$  Hz, H-3', 5'), 6.86 (1H s, H-3), 6.79 (1H, *d*,  $J = 1.7$  Hz, H-8), 6.39 (1H, *d*,  $J = 1.7$  Hz, H-6), 3.87 (s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO) 182.4 (C-4), 167.1 (C-2), 163.7 (C-7), 161.9 (C-4'), 161.7 (C-9), 157.8 (C-5), 129.0 (C-2' y C-6'), 123.3 (C-1'), 116.5 (C-3' y C-5'), 105.8 (C-10), 104.2 (C-3), 99.5 (C-6), 94.6 (C-8), 56.5 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 7 (3,5,7-Trihidroxi, 4'-metoxiflavona, Kaemferide):**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

8.10 (2H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-2', 6'), 6.96 (2H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-3', 5'), 6.37 (1H, *brs*, H-8), 6.21 (1H, *brs*, H-6), 3.83 (s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 175.4 (C-4), 164.0 (C-7), 160.9 (C-4'), 160.6 (C-5), 156.9 (C-9), 145.9 (C-2), 135.6 (C-3), 129.4 (C-2' y C-6'), 123.4 (C-1'), 113.9 (C-3' y C-5'), 103.3 (C-10), 98.6 (C-6), 94.0 (C-8), 55.3 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 8 (3,4 ,5-Trihidroxi-3 ,7-dimetoxiflavona, Rhamnazin):**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

7.70 (1H, *d*,  $J = 1.2$  Hz, H-2'), 7.65 (1H, *dd*,  $J = 8.5$  Hz;  $J = 1.2$  Hz, H-6'), 6.87 (1H, *d*,  $J = 8.5$  Hz, H-5'), 6.40 (1H, *d*,  $J = 1.5$  Hz, H-8), 6.24 (1H, *d*,  $J = 1.5$  Hz, H-6), 3.86 (s, OCH<sub>3</sub>), 3.78 (s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 175.1 (C-4), 165.8 (C-7), 160.8 (C-5), 156.8 (C-9), 147.7 (C-4'), 147.1 (C-2), 146.7 (C-3'), 135.6 (C-3), 122.9 (C-1'), 121.8 (C-6'), 114.6 (C-5'), 110.3 (C-2'), 103.9 (C-10), 97.9 (C-6), 92.2 (C-8), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 55.6 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 9 (3,5,4'-Trihidroxi-7-metoxiflavona, Rhamnocitrina):**  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz, DMSO)

8.18 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-2', 6'), 7.05 (2H, *d*,  $J = 8.8$  Hz, H-3', 5'), 6.73 (1H, *d*,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 6.34 (1H, *d*,  $J = 1.8$  Hz, H-6), 3.94 (s, OCH<sub>3</sub>).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz, DMSO) 175.8 (C-4), 165.7 (C-7), 161.2 (C-5), 159.3 (C-4'), 156.9 (C-9), 145.4 (C-2),

136.0 (C-3), 114.0 (C-3' y C-5'), 122.4 (C-1'), 129.7 (C-2' y C-6'), 103.9 (C-10), 97.4 (C-6), 91.8 (C-8), 55.5 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 10 (5-Hidroxi-4',6',7-trimetoxiflavona, Salvigenina):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO) 8.06 (2H, *d*, *J*= 8.9 Hz, H-2', 6'), 7.15 (2H, *d*, *J*= 8.9 Hz, H-3', 5'), 6.89 (1H, *s*, H-3), 6.74 (1H, *brs*, H-8), 4.00 (*s*, OCH<sub>3</sub>), 3.93 (*s*, OCH<sub>3</sub>), 3.81 (*s*, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, DMSO) 182.6 (C-4), 164.1 (C-2), 162.9 (C-4'), 159.3 (C-7), 153.1 (C-9), 152.8 (C-5) 132.6 (C-6), 128.2 (C-2' y C-6'), 123.4 (C-1'), 114.5 (C-3' y C-5'), 105.6 (C-10), 103.5 (C-3), 91.1 (C-8), 59.6 (OCH<sub>3</sub>), 55.9 (OCH<sub>3</sub>), 55.1 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 11 (3,5-Dihidroxi-3', 4', 7-trimetoxiflavona):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 7.87 (1H, *dd*, *J*= 8.9 Hz; *J*= 2.3 Hz, H-6'), 7.80 (1H, *d*, *J*= 2.3 Hz, H-2'), 7.03 (1H, *d*, *J*= 8.9 Hz, H-5'), 6.52 (1H, *d*, *J*= 2.1 Hz, H-8), 6.40 (1H, *d*, *J*= 2.1 Hz, H-6), 4.01 (*s*, OCH<sub>3</sub>), 3.99 (*s*, OCH<sub>3</sub>), 3.92 (*s*, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 176.6 (C-4), 165.5 (C-7), 160.8 (C-5), 156.6 (C-9), 148.8 (C-4'), 147.1 (C-2), 147.1 (C-3'), 137.1 (C-3), 123.7 (C-1'), 122.1 (C-6'), 115.1 (C-5'), 111.3 (C-2'), 104.5 (C-10), 98.0 (C-6), 92.6 (C-8), 56.5(OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>), 56.1 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 12 (5-Hidroxi-4',7-dimetoxiflavona):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 12.84 (*s*, OH-5), 7.87 (2H, *d*, *J*= 8.8 Hz, H-2', 6'), 7.04 (2H, *d*, *J*= 8.8 Hz, H-3', 5'), 6.61 (1H, *s*, H-3), 6.51 (1H, *d*, *J*= 1.6 Hz, H-8), 6.39 (1H, *d*, *J*= 1.6 Hz, H-6), 3.92(*s*, OCH<sub>3</sub>), 3.91 (*s*, OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 182.4 (C-4), 165.4 (C-7), 164.03 (C-2), 162.6 (C-4'), 162.2 (C-5), 157.7 (C-9), 128.1 (C-2' y C-6'), 123.6 (C-1'), 114.5 (C-3' y C-5'), 105.6 (C-10), 104.4 (C-3), 98.0 (C-6), 92.6 (C-8), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 55.5 (OCH<sub>3</sub>).

**Compuesto 13 (3,5-Dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona):** <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 11.76 (*s*, OH-5), 8.20 (2H, *d*, *J*= 8.2 Hz, H-2', 6'), 7.06 (2H, *d*, *J*= 8.2 Hz, H-3', 5'), 6.62 (*s*, OH-3), 6.52 (1H, *brs*, H-8), 6.40 (1H, *s*, H-6), 3.91 (*s*, 2 OCH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) 175.1 (C-4), 165.7 (C-7), 161.2 (C-4'), 160.8 (C-5), 156.8 (C-9), 145.7 (C-2), 135.7 (C-3), 129.4 (C-2' y C-6'), 123.2 (C-1'), 114.1 (C-3' y C-5'), 104.0 (C-10), 97.9 (C-6), 92.2 (C-8), 55.8 (OCH<sub>3</sub>), 55.4 (OCH<sub>3</sub>).

### 1.3.7. Análisis de flavonoides aislados por cromatografía de alta eficiencia HPLC

Utilizando un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC Agilent 1100, se realizó un análisis del contenido de flavonoides del ERFC. El volumen de inyección de las muestras fue de 25  $\mu$ L a un caudal de 0,6 ml / min. La fase móvil fue un sistema de disolvente binario que consiste en (A) 0.1% de ácido fosfórico y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado fue 25% B a 0 min, 28% B después de 5 min, 30% B después de 10 min, 32.8% B después de 17 min, 36% B después de 20 min, 42% B después de 25 min, 44.8% B después de 33 min, 53.5% B después de 40 min y 100% B después de 60 min hasta los 65 min. La absorbancia UV del eluato se registró utilizando un detector de arreglo de diodos múltiple a 210 nm, 280 nm y 360 nm.

En el cromatograma a 360 nm se identificó el tiempo de retención de cada compuesto, haciendo correr el compuesto aislado por el mismo método y comparando los espectros UV obtenidos del compuesto en el extracto y del compuesto puro (**ANEXO 1.4**).

### 1.3.8. Cuantificación de 6 flavonoides por HPLC (método Patrón Interno)

Los compuestos mayoritarios, de los que contábamos con más de 3mg, fueron sometidos a una evaluación cuantitativa utilizando un método con patrón interno. El patrón interno seleccionado fue el flavonoide Xanthomicrol que presenta una señal perfectamente distinguible en el cromatograma HPLC a 360 nm.

#### Curva de calibración

Para la cuantificación, se realizó inicialmente una curva de calibración de los compuestos seleccionados, para lo que se procedió a preparar, soluciones con 90 ppm del Patrón Interno, Xanthomicrol (5, 4'-dihidroxi-6, 7, 8-trimetoxiflavona) y diferentes concentraciones del analito a cuantificar, **compuestos 1, 5, 8, 11, 12 y 13** a 30, 60, 90, 120 y 150 ppm aforando toda la solución a 1 ml. En base a una representación gráfica de la relación de alturas de analito/patrón interno Vs concentración del analito/patrón interno se obtuvo las siguientes curvas de calibración (**Figura 1.22**) (**ANEXO 1.5**).

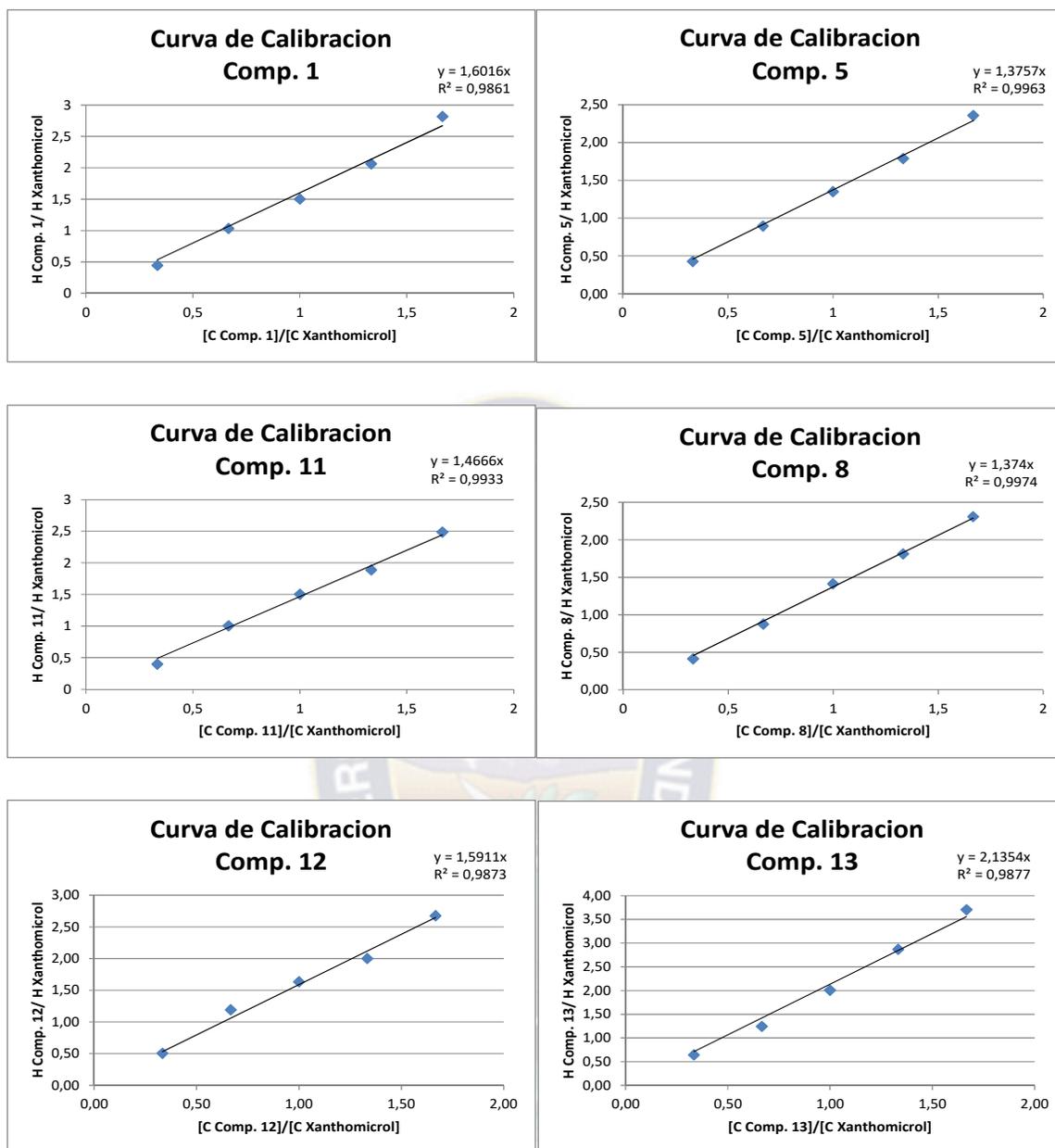


Figura 1. 22. Curvas de calibración de los compuestos aislados 1, 5, 8, 11, 12 y 13

Fuente: Elaboración propia

Como se puede observar las Curvas de Calibración de los compuestos seleccionados presentan buena linealidad

### 1.3.9. Evaluación de Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos y compuestos se realizó en colaboración con la Dra. Marcela Melgarejo del IIQ, donde, se utilizó dos métodos de ensayos de inhibición de radicales libres, el método DPPH que es el más rápido, simple y es el de menor costo en comparación con otros modelos. Y el ensayo de decoloración ABTS<sup>+</sup> que se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam, Bristi, & Rafiquzzaman, 2013).



Además, se realizó la determinación de polifenoles totales empleando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, determinación también directamente relacionada al efecto antioxidante inhibidor de radicales libre (Magalhães, *et al.*, 2008; Prior, Wu, & Schaich, 2005)

#### - Método DPPH

Según Wright, Johnson, & DiLabio, (2001) la acción antioxidante de compuestos fenólicos (generalmente ArOH) es interrumpir la reacción en cadena de acuerdo con:

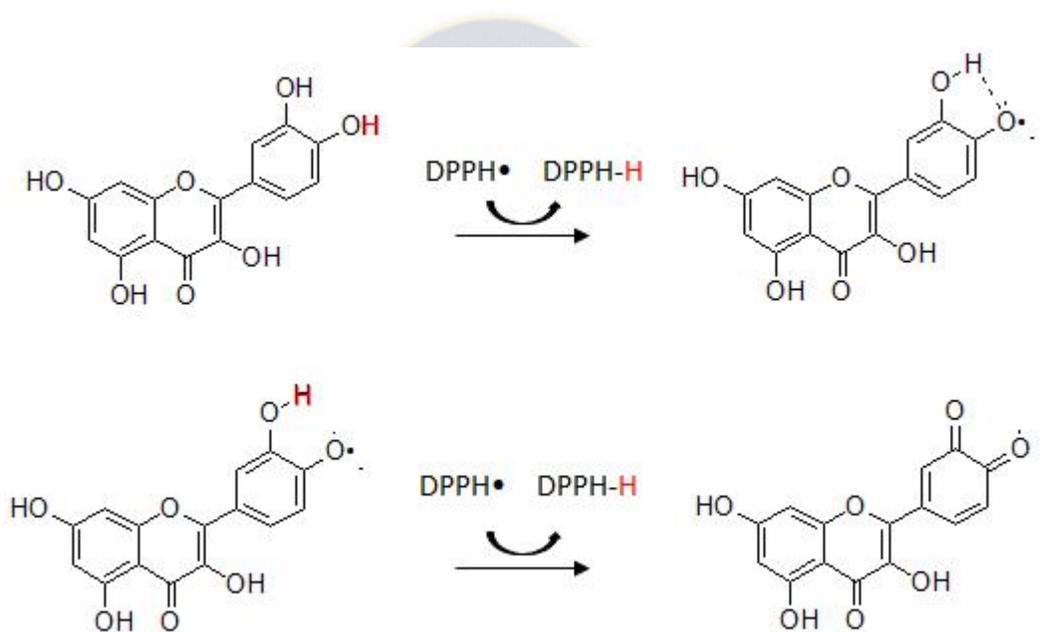


Donde se tiene dos mecanismos ya aceptados, nombrados como: transferencia de átomos de hidrógeno (HAT) y el mecanismo secuencial de transferencia de electrones por pérdida de protones (SPLET): (Litwinienko & Ingold, 2004)



El grupo 7-OH en los flavonoides juega un papel importante como el sitio de ionización y de transferencia de electrones de acuerdo con la transferencia secuencial de electrones por pérdida de protones (SPLET).

Desde el punto de vista de la acción antioxidante, el resultado neto de SPLET es el mismo que en los mecanismos HAT para radicales libres. Por ejemplo, a continuación se dan los posibles mecanismos para la reacción de quercetina con DPPH en la **Figura 1.23** (Gülçin, 2012)



**Figura 1. 23.** Posibles mecanismos de acción inhibitoria de radicales DPPH de la quercetina  
Fuente: Gülçin, 2012

#### - Método ABTS

El método espectrofotométrico de radicales ABTS puede evaluarse en un amplio rango de pH, lo cual es útil para estudiar el efecto del pH sobre los mecanismos antioxidantes de una gran variedad de compuestos alimenticios o medicinales. Además, el radical  $ABTS^+$  es soluble en agua y disolventes orgánicos, permitiendo la determinación de la capacidad antioxidante tanto de compuestos hidrófilos como lipófilos. (Magalhães *et al.*, 2008).

El ensayo de barrido original de ABTS fue desarrollado por Miller, *et al.*, (1993), inicialmente fue desarrollado para medir la capacidad antioxidante total de fluidos

corporales y soluciones de fármacos, este fue basado en la absorbancia del catión radical  $ABTS^+$ . Esta técnica es una técnica colorimétrica en la que el radical se genera directamente en una forma estable antes de la reacción con antioxidantes putativos. Generalmente, el  $ABTS^+$  es generado por oxidación de ABTS con  $K_2S_2O_8$ . Este ensayo se basa en la inhibición de la absorbancia del catión radical  $ABTS^+$ , que tiene un espectro de absorción de longitud de onda característico a 734 nm. Donde el aclarado de una solución formada por el catión radical  $ABTS^+$  azul-verde es la forma de evaluar la capacidad antioxidante de mezclas complejas y compuestos individuales y la reacción del radical formado con los captadores de radicales libres puede monitorearse fácilmente siguiendo el decaimiento de la absorbancia de la muestra a 734 nm (Re, *et al.*, 1990).

El método ABTS usa ambos mecanismos anteriormente ya descritos el HAT y SET para el DPPH (Prior, *et al.*, 2005).

Las muestras evaluadas fueron: el EEBL (Extracto Etanólico de *B. latifolia*), el ERCF (Extracto Rico en Compuestos Fenólicos), **Compuesto 1** (3,4,5,7-Tetrahidroxiflavona, luteolina), **Compuesto 5** (5,7-Dihidroxi-4-metoxiflavona, acetina), **Compuesto 7** (3,5,7-Trihidroxi, 4'-metoxiflavona, kaemferide), **Compuesto 8** (3,4,5-Trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, rhamnazin), **Compuesto 11** (3,5-Dihidroxi-3', 4', 7-trimetoxiflavona), **Compuesto 12** (5-Hidroxi-4,7-dimetoxiflavona) y **Compuesto 13** (3,5-Dihidroxi-4,7-dimetoxiflavona)

### 1.3.10. Evaluación de Actividad antiinflamatoria

La actividad antiinflamatoria se realizó en colaboración del Instituto IIFB perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés, dirigido por el Dr. Eduardo Gonzales. Donde, mediante la modulación de las sustancias que median el proceso inflamatorio como las prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) y citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL) y el factor tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en macrófagos expuestos a extractos o compuestos puros obtenidos de la especie de *B. latifolia*, se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

Numerosos estudios señalan la importancia del reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio para realizar estudios de actividad antiinflamatoria. Sin embargo, una rápida respuesta requiere células centinelas estacionadas en los tejidos. Los macrófagos y especialmente los mastocitos, cumplen tal función, los mastocitos sintetizan rápidamente metabolitos bioactivos de ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos. Los mastocitos perivasculares responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas, liberando histamina, triptasa, TNF- $\alpha$  preformados, eicosanoides (prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos), citoquinas proinflamatorias (favorecen la inflamación, siendo prototípicas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y quimioquinas neoformadas. Donde la histamina, eicosanoides y triptasas causan vasodilatación y extravasación responsables del calor o rubor inflamatorios y del tumor o edema inflamatorio, respectivamente (García, 2008).

Concretamente, se realizó la evaluación de la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de macrófagos, la producción de Interleucina 6 (IL-6) por ELISA, TNF- $\alpha$  por ELISA, Leucotrieno C4 por ELISA y Prostaglandina E2 mediante el ensayo de EIA, de los extractos y compuestos seleccionados de *B. latifolia*. (Abad, *et al.*, 2006).

Las muestras evaluadas fueron: el EEBL (Extracto Etanólico de *B. latifolia*), el ERCF (Extracto Rico en Compuestos Fenólicos), **Compuesto 1** (3,4,5,7-Tetrahidroxiflavona, luteolina), **Compuesto 5** (5,7-Dihidroxi-4-metoxiflavona, acacetina), **Compuesto 12** (5-Hidroxi-4,7-dimetoxiflavona) y **Compuesto 13** (3,5-Dihidroxi-4,7-dimetoxiflavona)

## 1.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.4.1. Material vegetal *Baccharis latifolia* (R y P) Pers.

La materia vegetal fue colectada en Lluto en el mes de junio de 2014 seleccionando solo las hojas obteniendo 1309,2 g de planta seca. Posteriormente, otra colecta fue realizada en Apaña en septiembre de 2014 obteniéndose 981,3 g de planta seca. En ambas colectas muestras de herbario fueron identificadas por la Lic. Esther Valenzuela del Jardín Botánico del Herbario Nacional de Bolivia.

### 1.4.2. Obtención de extractos

#### Extracto etanólico

Los extractos etanólicos fueron obtenidos mediante una maceración rápida (15 min) con EtOH de 96°, metodología ya estandarizada en el Laboratorio de Bioorgánica del IIQ.

Para determinar el rendimiento de la extracción, se realizó 9 repeticiones del proceso obteniéndose un promedio del rendimiento del extracto etanólico (**Tabla 1.2**)

**Tabla 1. 2.** Rendimiento del proceso de extracción con EtOH de hojas de *B. latifolia*

Masa planta seca (mg)	Peso extracto etanólico seco (mg)	Rendimiento %
150,9	17,7	11,7
150,5	18,4	12,2
152,1	14,6	9,6
154,3	16,3	10,6
150,7	16,2	10,8
152,7	15,4	10,1
150,4	14,6	9,7
152,1	14,3	9,4
150,9	16,7	11,1
Promedio		10,6

#### Extracto Rico en Compuestos Fenólicos

Anteriores estudios, realizados en el Laboratorio de Bioorgánica del IIQ, de extractos EtOH de *B. latifolia*, mostraron que contienen grasas, clorofila y terpenoides, además de flavonoides y derivados de ácido cinámico (Calle, *et al.*, 2017). Por lo que para separar grasas, clorofila y parte de terpenoides se decidió hacer una extracción con éter de petróleo (lavado) del extracto EtOH.

Se realizaron 4 pruebas donde se cambiaron tiempos de extracción agitación y temperatura, como se describió en el **Apartado 1.3.3. (Obtención de extractos)**:

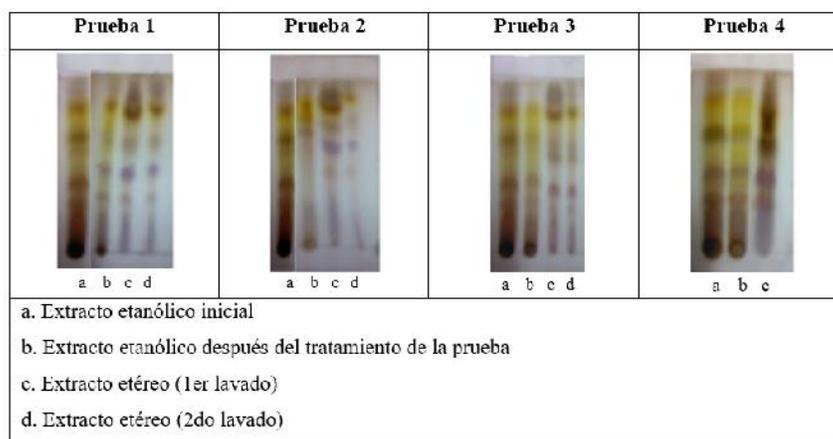
**Primera prueba:** éter de petróleo 40-60 °C, a 54 rpm, temperatura ambiente, 60 min.

**Segunda prueba:** éter de petróleo 40-60 °C, a 54 rpm temperatura 45 °C, 60 min.

**Tercera prueba:** éter de petróleo 60-80 °C, 54 rpm, temperatura 45 °C , 60 min.

**Cuarta prueba:** éter de petróleo 60-80 °C, 54 rpm temperatura 45 °C, 60 min. Esta operación se la repitió 2 veces, al extracto resultante, agua destilada temperatura 45 °C.

Los resultados de las pruebas fueron analizados cualitativamente mediante placas TLC, dando los siguientes resultados:



**Figura 1. 24.** Análisis por TLC de las 4 pruebas realizadas para la obtención de ERFC  
Fuente: Elaboración propia

En la **Figura 1.24** se puede observar, que la mayor parte de flavonoides y otros compuestos fenólicos quedan en el extracto etanólico resultante, no pasan a los extractos etéreos, sólo en la prueba 4 se vio que una buena cantidad de fenólicos pasa a el extracto etéreo.

Luego, se determinaron los rendimientos de los ERFC y de los extractos etéreos, dando los resultados mostrados en la **Tabla 1.3.**

**Tabla 1. 3.** Rendimientos de los ERFC y Extractos etéreos de 4 pruebas de separación de compuestos apolares

Prueba	Masa ERFC (g)	Rendimiento ERFC (%)	Masa extracto etéreo	Rendimiento extracto etéreo (%)
1ª prueba	23	7,7	3,4	1,1
2ª prueba	19,8	6,6	9,5	3,2
3ª prueba	19,3	6,4	8,7	2,9
4ª prueba	8,9	2,97	8,6	2,9

### Determinación del contenido de flavonoides totales

Para determinar cuál era la mejor metodología para la obtención del ERCF, se realizó la determinación del contenido de flavonoides totales por el método de quelación con  $AlCl_3$ , en los extractos etanólico ya tratados con éter de petróleo, nombrándolos como ERCF 1 (Extracto Rico en Compuestos Fenólicos, prueba 1) y así sucesivamente ERCF 2, ERCF 3 y ERCF 4, según la prueba realizada y comparándolos con el extracto etanólico inicial que se obtenía EEBL (Extracto Etanólico de *B. latifolia*).

Los resultados se muestran en mg de Flavonoides Totales equivalentes a Luteolina (estándar utilizado), por gramo de extracto (**Tabla 1.4**)

**Tabla 1. 4.** Flavonoides Totales equivalentes a Luteolina por gramo de hojas secas o gramo de ERCF resultante de las pruebas con éter de petróleo.

Prueba	Extracto	Flavonoides totales (FT mg equivalente de lu /g de extracto)
	EEBL	24,59 ± 2,04
Prueba 1	ERCF 1	32,01 ± 1,29
Prueba 2	ERCF 2	33,12 ± 0,09
Prueba 3	ERCF 3	35,47 ± 1,94
Prueba 4	ERCF 4	33,82 ± 2,43

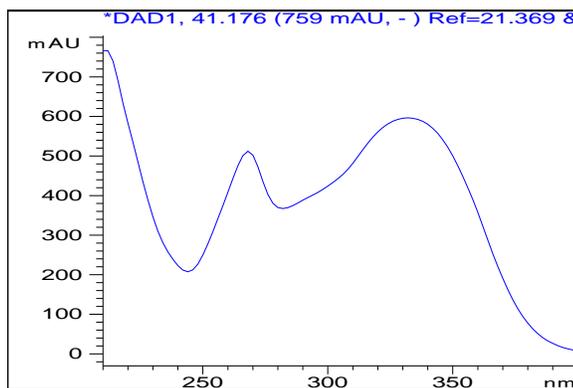
Como se puede observar en la **Tabla 1.4**, la mayor cantidad de flavonoides totales se determinaron en el extracto procesado de la prueba 3, el producto presenta físicamente un aspecto totalmente seco (en polvo), que al pesar tiene menos problemas que el EEBL, que tiene una consistencia tipo miel y es difícil de secar completamente.

Por tanto, para la obtención de un Extracto Rico en Compuestos Fenólicos se eligió la prueba 3.

### Análisis por cromatografía HPLC de flavonoides en extractos de *B. latifolia*.

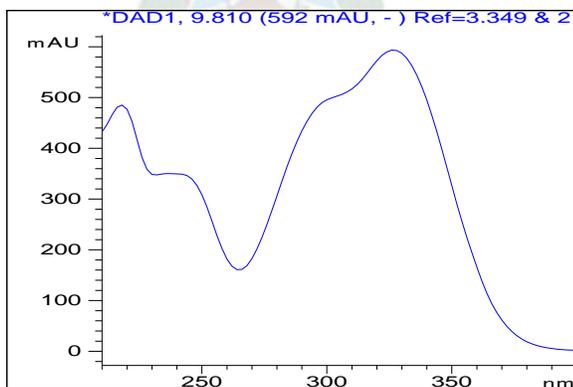
Para realizar una mejor evaluación de los flavonoides contenidos en los extractos etanólicos (EEBL) y ERFC, se determinó un método de cromatografía HPLC, descrito en el **Aparatado 1.2.7. (Análisis de flavonoides aislados por cromatografía de alta eficiencia**

HPLC) de la parte experimental, que permite distinguir más de 25 flavonoides con tiempos de retención por encima de los 18 min (**Figura 1.27**). Las señales fueron asignadas a flavonoides de acuerdo a los espectros UV, que muestran las dos bandas características de este tipo de compuestos (**Figura 1.25**)



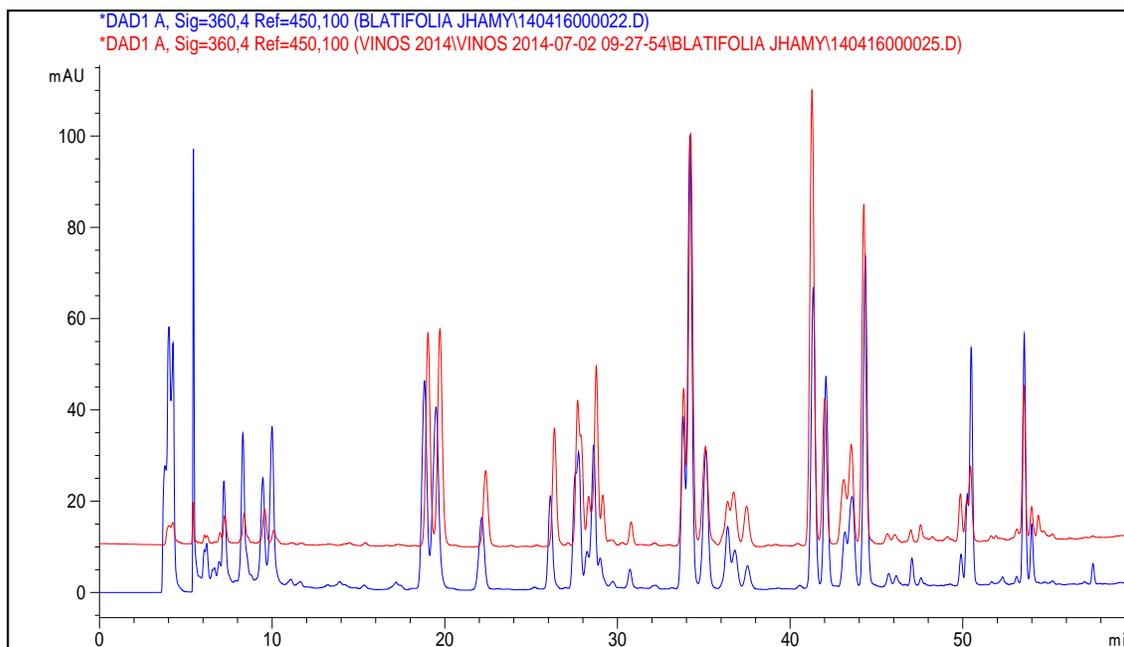
**Figura 1. 25.** Bandas UV características de los flavonoides (Acacetina).  
Fuente: San Martín, 2017

Además, para verificar si el proceso de desengrase incrementaba la concentración de los flavonoides en el ERCF obtenido, se realizó una comparación con el EEBL por cromatografía HPLC (**Figura 1.27**), donde se observa que la mayor parte de los compuestos con tiempos de retención menores a 12 min, pasaron a la fase etérea del proceso para obtener el ERFC. De acuerdo a los espectros UV de estos compuestos, estos pertenecen mayoritariamente a derivados de ácido cinámico, que tienen una banda ancha característica alrededor de 315 nm (**Figura 1.26**).



**Figura 1. 26.** Banda característica de un derivado de ácido cinámico  
Fuente: San Martín, 2017

Por otra parte, se observa que la mayoría de los compuestos sobre 18 min permanecen en el extracto, compuestos identificados como flavonoides, finalmente se puede ver que varios de estos compuestos incrementan su concentración en el extracto ERCF, ya que se observa un claro incremento de la absorbancia en estos tiempos de retención.



**Figura 1. 27.** Análisis HPLC de los extractos EEBL y ERFC de *B. latifolia*  
Fuente: San Martín, 2017

Por tanto, se puede concluir que el proceso de separación de compuestos apolares con Eter de petróleo de la Prueba 3 da un extracto más rico en flavonoides ERFC y menos complejo, por lo que fue el utilizado para el proceso de aislamiento de flavonoides.

### 1.4.3. Aislamiento e Identificación de Flavonoides

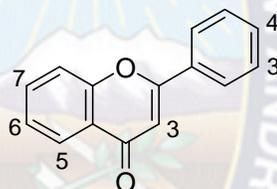
Una vez seleccionada la metodología para la obtención del ERFC se utilizó ésta en las muestras de *B. latifolia* colectadas de Lluto y Apaña, obteniéndose más de 160 g de ERFC como se muestra en la **Tabla 1.5.**

**Tabla 1. 5.** Obtención del ERFC de las muestras colectadas de *B. latifolia* en Lluto y Apaña

Lugar de Colecta	Peso planta seca (g)	Masa ERFC(g)	Rendimiento ERFC%	Masa extracto etéreo	Rendimiento extracto etéreo%
Lluto	600	78.1	8.68	28.73	3.19
Apaña	600	84.6	9.40	35.3	3.92

Los extractos de especímenes colectados en Lluto y Apaña fueron comparados por cromatografía HPLC, no observándose diferencias significativas, por lo que fueron unidos y tomándose 150 g para el aislamiento de flavonoides. En el proceso de separación se utilizaron diversas técnicas cromatográficas, como cromatografía líquida al vacío VLC, cromatografía en columna abierta CC y cromatografía de exclusión molecular Sephadex LH-20, lográndose aislar 13 flavonoides, los cuales fueron identificados mediante un análisis de sus datos de RMN 1D y 2D, en comparación con datos de compuestos previamente aislados en laboratorios y datos reportados en bibliografía.

Los flavonoides aislados e identificados se muestran a continuación (**Tabla 1.6**), entre los cuales los **compuestos 1, 4, 5, 8, 11, 12, 13**, ya fueron anteriormente reportados en *B. latifolia*, mientras que los **compuestos 2, 3, 6, 7, 9, 10**, son reportados en esta especie vegetal gracias al presente trabajo.

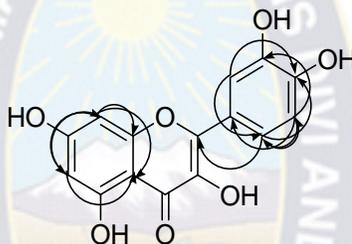


**Tabla 1. 6.** Flavonoides identificados en el extracto EtOH de hojas de *B. latifolia*

Nº	<i>t<sub>R</sub></i>	3	5	6	7	3'	4'	Referencias
1	18,7	H	OH	H	OH	OH	OH	Flores, Salcedo & Almanza, 2012
2	19,5	OH	OH	H	OH	OH	OH	Jørgensen, <i>et al.</i> , 1998
3	28,6	OH	OH	H	OH	OMe	OH	Lee, <i>et al.</i> , 2008
4	34,1	OH	OH	H	OMe	OH	OH	Flores, <i>et al.</i> , 2012
5	41,3	H	OH	H	OH	H	OMe	Flores, <i>et al.</i> , 2012
6	42,0	H	OH	H	OMe	H	OH	Ayatollahi, <i>et al.</i> , 2011
7	43,1	OH	OH	H	OH	H	OMe	Lee, <i>et al.</i> , 2008
8	44,3	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	Salcedo, <i>et al.</i> , 2001
9	44,3	OH	OH	H	OMe	H	OH	Luân, <i>et al.</i> , 2011
10	49,8	H	OH	OMe	OMe	H	OMe	Alwahsh, Khairuddean, & Chong, 2015
11	50,4	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	Salcedo, <i>et al.</i> , 2001
12	53,5	H	OH	H	OMe	H	OMe	Salcedo, <i>et al.</i> , 2001
13	53,9	OH	OH	H	OMe	H	OMe	Flores, <i>et al.</i> , 2012

La identificación de los compuestos anteriormente reportados en *B. latifolia* fue previamente publicada (Flores, *et al.*, 2012), por lo que a continuación solo se describe la identificación de los compuestos reportados por primera vez en esta especie.

**Compuesto 2**, el espectro de RMN<sup>13</sup>C muestra 15 carbonos, 14 de ellos en la zona característica de carbonos sp<sup>2</sup> y el correspondiente al carbonilo C-4, mostrando una estructura característica de flavonoide, sin grupos metoxilos, pero si con varias funciones oxigenadas. El espectro de RMN<sup>1</sup>H, muestra claramente un sistema *meta* en el anillo A y una sustitución *meta*, *meta-orto*, *orto*, para el anillo B, no hay protón en C-3, por lo que los datos se asignaron a la quercetina, comprobándose las asignaciones hechas en el espectro HMBC y por comparación con datos bibliográficos (**Tabla 1.7**)

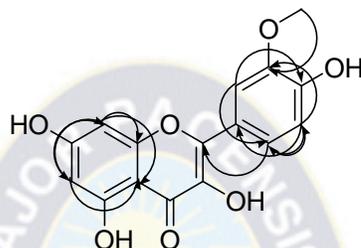


**Tabla 1. 7.** Datos de RMN 1D y 2D para el **Compuesto 2**

No.	<sup>13</sup> C exp [ppm]	<sup>13</sup> C bib [ppm]*	HSQC	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>1</sup> H-COSY	HMBC
2	146.6	146.7				
3	135.8	135.6				
4	175.7	175.8				
5	160.8	160.6	OH-5	12.50 s		
6	98.2	98.1	H-6	6.23 <i>d</i> (1.5)		C-5, C-7, C-8, C-10
7	163.9	163.8				
8	93.4	93.3	H-8	6.45 <i>d</i> (1.5)		C-6, C-7, C-9, C-10
9	152.4	156.1				
10	103.2	102.9				
1'	122.0	121.9				
2'	115.0	115.0	H-2'	7.72 <i>d</i> (1.7)		C-3', C-4', C-6'
3'	145.0	145.0				
4'	147.5	147.6				
5'	115.6	115.5	H-5'	6.93 <i>d</i> (8.3)	H-6'	C-1', C-3', C-4'
6'	120.1	119.9	H-6'	7.58 <i>dd</i> (1.7; 8.3)	H-5'	C-2, C-2', C-4'

En CDCl<sub>3</sub>; RMN a 300 MHz Avance II (Bruker), u en ppm \* Jørgensen, *et al.*, 1998

El **Compuesto 3**, muestra señales de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, similares a las del compuesto 2, pero en este caso se observa la presencia de un grupo metoxilo (OMe), el cual fue asignado en el C-3' debido a que los protones del OMe acoplan a dos enlaces con el C-3', y el C-3' muestra una correlación a 3 enlaces con el H-5', que claramente corresponde al sistema *meta*, *meta-orto*, *orto*, del anillo B. Por lo que se le asignó la estructura correspondiente al **5,7,4'-Tetrahidroxi-3'-metoxiflavonol, Isorhamnetina**.



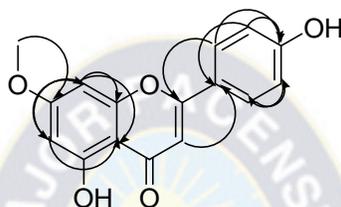
**Tabla 1. 8.** Datos de RMN 1D y 2D para el **Compuesto 3**

No.	<sup>13</sup> C exp [ppm]	<sup>13</sup> C bib [ppm]*	HSQC	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>1</sup> H-COSY	HMBC
2	146.5	146.7				
3	135.9	135.9				
4	175.7	175.9				
5	160.6	160.7				
6	98.1	98.3	H-6	6.19 <i>d</i> (1.3)		C-5, C7, C-8, C-10
7	164.0	164.0				
8	93.6	93.7	H-8	6.47 <i>d</i> (1.3)		C-6, C-7, C-9, C-10
9	156.1	156.2				
10	102.8	103.1				
1'	121.9	122.1				
2'	111.7	111.8	H-2'	7.76 <i>dd</i> (1.9)		C-2, C-4', C-6'
3'	147.3	147.4	H-3'			
4'	148.7	148.9				
5'	115.5	115.6	H-5'	6.94 <i>d</i> (8.5)	H-6'	C-3', C-1'
6'	121.6	121.8	H-6'	7.70 <i>dd</i> , (1.9; 8.5)	H-5'	C-2, C-4'
OMe	55.7	55.8	OMe-3'	3.84 <i>s</i>		C-3'

En CDCl<sub>3</sub> RMN a 300 MHz Avance II (Bruker), u en ppm \* Lee, et al., 2008

Para el **Compuesto 6**, se observa también 15 carbonos característicos de una flavona, pero con menos sustituciones oxigenadas que en los anteriores compuestos descritos, además de un grupo metoxilo. El espectro de RMN<sup>1</sup>H muestra un sistema *meta* para el anillo **A**, un

sistema *orto* correspondiente a 4 protones del anillo **B**, y el protón en C-3. Por lo que las sustituciones oxigenadas se localizaron en los carbonos C-5, C-7 y C-4'. Entre estas, el grupo metoxilo fue asignado al C-7 por las correlaciones heteronucleares a larga distancia de los protones del OMe con el C-7 y de este carbono con el H-8, que acopla en <sup>1</sup>H COSY con el H-6. Por tanto, la estructura del **compuesto 6** corresponde a la **5, 4 -Dihidroxi-7-metoxiflavona, Genkwanina, (Tabla 1.9)**.



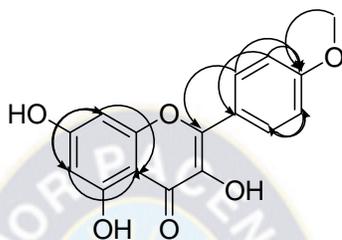
**Tabla 1. 9.** Datos de RMN 1D y 2D para el **Compuesto 6**

No.	<sup>13</sup> C <sub>exp</sub> [ppm]	<sup>13</sup> C <sub>bib</sub> [ppm]*	HSQC	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>1</sup> H-COSY	HMBC
2	167.1	167.8				
3	104.2	103.4	H-3	6.86 s		C-1'
4	182.4	183,8				
5	157.8	157.7				
6	99.5	99.1	H-6	6.39 <i>d</i> (1.7)		C-5, C-8, C-10
7	163.7	167.2				
8	94.6	93.3	H-8	6.79 <i>d</i> (1.7)		C-6, C-7, C-10
9	161.7	159.2				
10	105.8	105.9				
1'	123.3	118.8				
2'	129.0	129.2	H'2'	7.97 <i>d</i> (8.9)	H-3'	C-2, C-2', C-4'
3'	116.5	116.3	H-3'	6.94 <i>d</i> (8.9)	H-2'	C-1', C-3', C4'
4'	161.9	161.8				
5'	116.5	116.3	H-5'	6.94 <i>d</i> (8.9)	H-6'	C-1', C-3', C4'
6'	129.0	129.2	H-6'	7.97 <i>d</i> (8.9)	H-5'	C-2, C-2', C-4', C-6'
OMe	56.5	55.8	OMe-7			C-7

En CDCl<sub>3</sub> RMN a 300 MHz Avance II (Bruker), u en ppm \* Ayatollahi, et al., 2011

Las señales de RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del **Compuesto 7** son similares a las del **Compuesto 6**, aunque en este caso no se observa el H-3, por lo que se trata de un flavonol, pero con sustituciones oxigenadas en C-5, C-7 y C-4', como en el anterior caso. También se observa

un grupo metoxilo, pero este fue asignado al carbono C-4' gracias al análisis del espectro de correlación heteronuclear a larga distancia HMBC, donde se observa la correlación  $J_2$  de los protones del metoxilo con C-4' y la correlación  $J_3$  de este carbono con los protones H-2' y H-6' (Tabla 1.10), por lo que la estructura del **compuesto 7** corresponde a la **3,5,7-Trihidroxi, 4'-metoxiflavona, Kaemferide**.



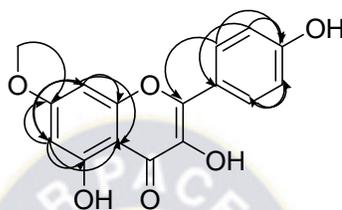
**Tabla 1. 10.** Datos de RMN 1D y 2D para el **Compuesto 7**

No.	$^{13}\text{C}$ exp [ppm]	$^{13}\text{C}$ bib [ppm]*	HSQC	$^1\text{H}$ [ppm]	$^1\text{H}$ -COSY	HMBC
2	145,9	146,3				
3	135,6	136,1				
4	175,4	176,1				
5	160,6	160,8				
6	98,6	98,3	H-6	6,21		C-10, C-8
7	164,0	164,1				
8	94,0	93,6	H-8	6,37		C-6
9	156,9	156,3				
10	103,3	103,7				
1'	123,4	123,3				
2'	129,4	129,4	H'2'	8,23 d (9,02)	H-3'	C-2, C-4', C-6'
3'	113,9	114,1	H-3'	7,12 d (8,92)	H-2'	C-1', C-4'
4'	160,9	160,6				
5'	113,9	114,1	H-5'	7,12 d (8,92)	H-6'	C-1', C-4'
6'	129,4	129,4	H-6'	8,23 d (9,02)	H-5'	C-2, C-4', C-2'
OMe	55,3	55,4	OMe-4'			C-4'

En DMSO RMN a 300 MHz Avance II (Bruker), u en ppm \* Lee, et al., 2008

El **Compuesto 9**, también muestra señales similares a las de los dos anteriores flavonoides, con el mismo tipo de sustitución en los anillos A y B, y el C-3 sustituido por lo que también se trata de un flavonol. Por otra parte, también se observa un grupo metoxilo, el cual fue

asignado al C-7 debido a que los protones del metoxilo correlacionan a dos enlaces con el C-7 y este carbono correlaciona con el H-6. Por lo que la estructura propuesta para el **Compuesto 9** corresponde a la **3,5,4'-Trihidroxi-7-metoxiflavona, Rhamnocitrina**, confirmándose la asignación hecha por comparación con datos bibliográficos (**Tabla 1.11**)



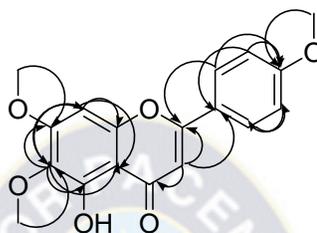
**Tabla 1. 11.** Datos de RMN 1D y 2D para el **Compuesto 9**

No.	<sup>13</sup> C exp [ppm]	<sup>13</sup> C bib [ppm]*	HSQC	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>1</sup> H-COSY	HMBC
2	146,4	147,2				
3	136,0	135,9				
4	175,8	176,0				
5	161, 2	160,4				
6	97,4	97,4	H-6	6,34 d (1,9)		C-8, C-10, C-7, C-5
7	165,7	164,9				
8	91,8	92,0	H-8	6,73 d (1,9)		C-6, C-10, C-9
9	156,9	156,1				
10	103,9	104,0				
1'	122,4	121,6				
2'	129,7	129,6	H'2'	8,18 d (8,5)	H-3'	C-2, C-4', C-6'
3'	114,0	115,4	H-3'	7,05 d (8,6)	H-2'	C-1',C-4'
4'	159,3	159,3				
5'	114,0	115,4	H-5'	7,05 d (8,6)	H-6'	C-1',C-4'
6'	129,7	129,6	H-6'	8,18 d (8,5)	H-5'	C-2, C-4', C-6'
OMe	55,5	55,6	OMe-7	4,01		C-7

En Acetona RMN a 300 MHz Avance II (Bruker), u en ppm \*Luân, et al, 2011

Finalmente, el **Compuesto 10**, muestra un sistema de sustitución en el anillo A, diferente a la del resto de compuesto aislados en esta especie vegetal. Así, su espectro de RMN<sup>1</sup>H muestra un sistema *orto* correspondiente a 4 protones para el anillo B, un singulete a 6,74 asignado al H-3 y un singulete más a 8,89, asignado al H-8, la última asignación fue

confirmada por sus correlaciones heteronucleares a larga distancia con los carbonos C-7, C-9, C-6 y C-10. Por otra parte, el compuesto muestra 3 grupos metoxilo, asignados a los carbonos C-6, C-7 y C-4' por sus correspondientes correlaciones en el HMBC y comparación con datos bibliográficos (Tabla 1.12). Por lo que la estructura asignada al compuesto 10 corresponde a la **5-Hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, Salvigenina**.



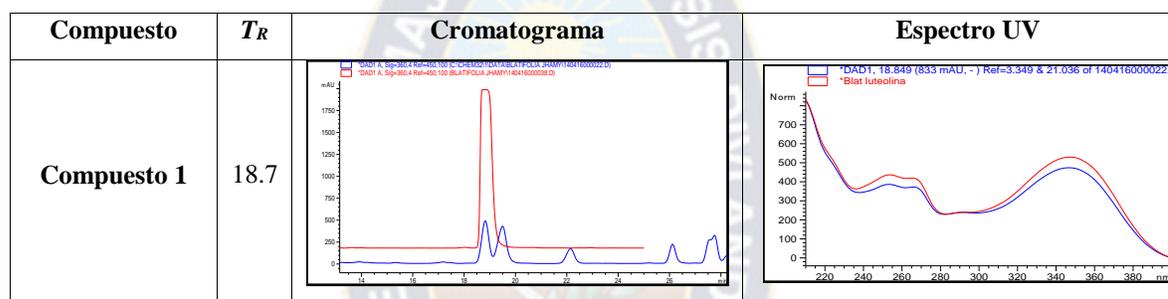
**Tabla 1. 12.** Datos de RMN 1D y 2D para el **Compuesto 10**

No.	<sup>13</sup> C <sub>exp</sub> [ppm]	<sup>13</sup> C <sub>bib</sub> [ppm]*	HSQC	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>1</sup> H-COSY	HMBC
2	164,3	164,0				
3	103,5	104,2	H-3	6,74 s		C-4, C-2, C-1', C-10
4	182,8	182,7				
5	152,8	153,1				
6	132,6	132,7				
7	159,5	158,7				
8	91,1	90,6	H-8	6,89 s		C-7, C-9, C-6, C-10
9	153,2	153,2				
10	105,7	106,2				
1'	123,4	123,6				
2'	128,2	128,0	H-2'	8,06 d (8,8)	H-3'	C-4', C-2
3'	114,7	114,5	H-3'	7,15 d (8,8)	H-2'	C-4', C-1'
4'	163,0	162,6				
5'	114,7	114,5	H-5'	7,15 d (8,8)	H-6'	C-4', C-1'
6'	128,2	128,0	H-6'	8,06 d (8,8)	H-5'	C-4', C-2
OMe	59,6	60,8	OMe-6	3,81 s		C-6
OMe	55,9	56,3	OMe-7	4,00 s		C-7
OMe	55,1	55,5	OMe-4'	3,93 s		C-4'

En Acetona RMN a 300 MHz Avance II (Bruker), u en ppm \* Alwahsh, et al., 2015

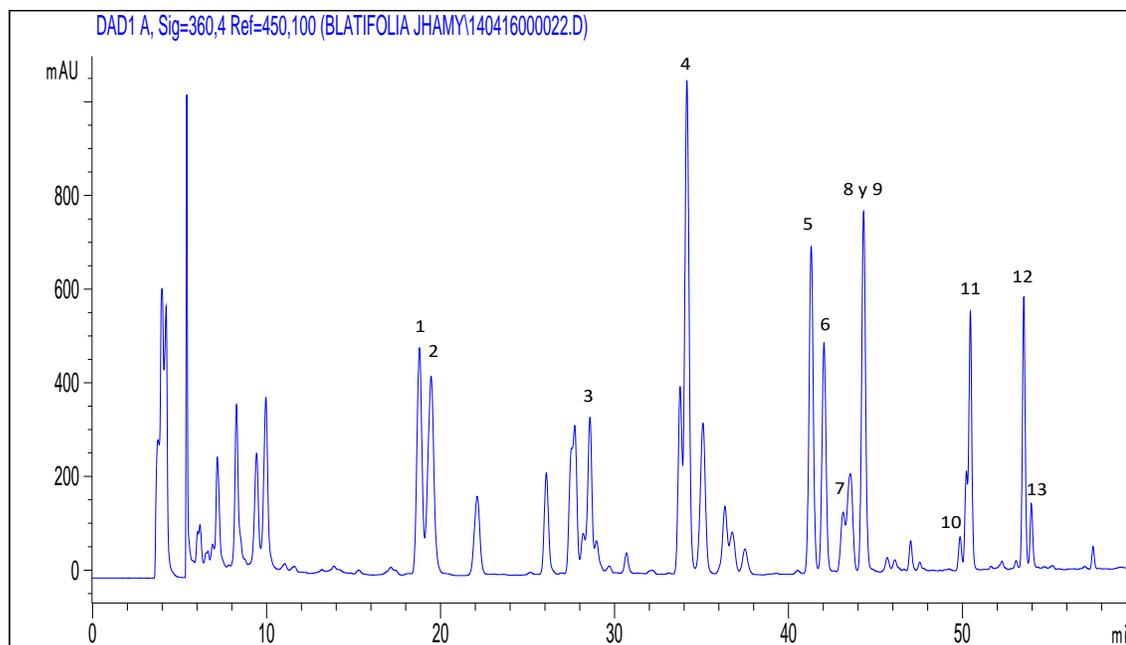
### Determinación de tiempos de retención de flavonoides identificados en cromatogramas HPLC

Todos los compuestos fueron analizados mediante HPLC, para identificar su tiempo de retención en los cromatogramas HPLC. Para esto, se hizo correr el compuesto aislado en el mismo método HPLC que el extracto, determinándose su tiempo de retención, luego se comparó los espectros UV del compuesto aislado y del compuesto en el extracto para confirmar la identidad del compuesto. Así, por ejemplo, para el compuesto **1** el  $t_R$  es 18,7 min (**Figura 1.28**) tanto para el compuesto aislado, en rojo, como para el compuesto en el extracto, en azul; y sus espectros UV son coincidentes mostrando que se trata del mismo flavonoide **1**.



**Figura 1. 28.** Determinación del tiempo de retención del **Compuesto 1** en cromatografía HPLC  
Fuente: San Martín, 2017

Así, fueron analizados todos los flavonoides aislados, determinándose sus respectivos tiempos de retención mostrados en la **Figura 1.29**. El compuesto **2**, fue comparada con un estándar de quercetina, adquirido de Sigma-Aldrich.

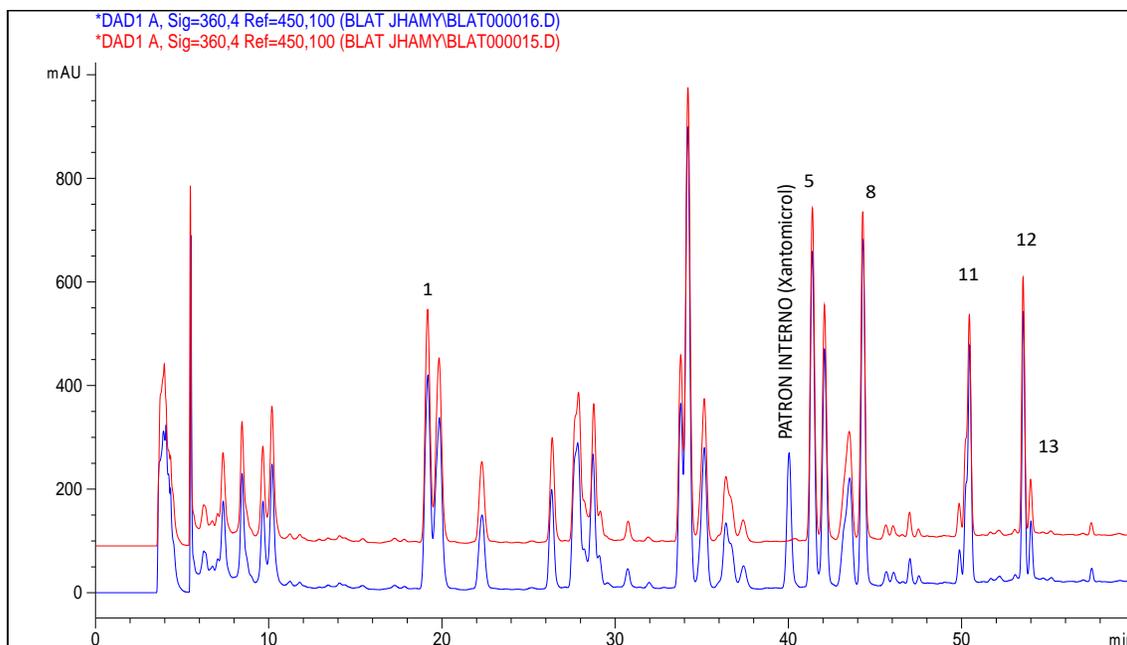


**Figura 1. 29.** Cromatograma HPLC-DAD del extracto EtOH de hojas de *B. latifolia*, obtenido a  $\lambda = 360$  nm, donde se muestran las señales correspondientes a los flavonoides identificados  
Fuente: San Martín, 2017

La **Figura 1.29** además muestra que se identificaron la mayor parte de los flavonoides mayoritarios del extracto etanólico de hojas de *B. latifolia*, ya que las señales por debajo de los 12 min corresponden a derivados de ácido cinámico, como lo discutimos anteriormente. Sin embargo, todavía existen flavonoides sin identificar, pero estos flavonoides están en menos concentración, por lo que este aspecto unido a la gran complejidad en flavonoides que tiene esta especie vegetal, dificulta su análisis.

#### 1.4.4. Cuantificación de 6 flavonoides por HPLC (método Patrón Interno)

Una vez identificados los compuestos en los cromatogramas HPLC, se procedió a cuantificar 6 compuestos, seleccionados en base a la cantidad aislada y a la facilidad del proceso de su purificación (**Compuesto 1, 5, 8, 11, 12 y 13**) (**Figura 1.30**).



**Figura 1. 30.** Cromatograma de los extractos EEBL con y sin el Patrón Interno, para la cuantificación de compuestos  
Fuente: San Martín, 2017

El método seleccionado para la cuantificación de los flavonoides mencionados, es un método con patrón interno, porque de acuerdo a varios autores es mejor que el método con patrón externo, ya que compensa errores de manipulación como se pesada de pequeñas cantidades y evaporación de solvente, además que la relación de altura o área entre el analito y el patrón interno por este método se mantiene constante. (Snyder, Kirkland & Dolan, 2010).

El xantomicro fue seleccionado como patrón interno porque es también un flavonoide y su tiempo de retención no coincide con ninguno de los flavonoides de la *B. latifolia* como se puede observar en la **Figura 1.30**, donde en azul se muestra el cromatograma del extracto con el patrón interno y en rojo sin el patrón interno.

Para la cuantificación de cada compuesto se realizó una curva de calibración, en base a una representación gráfica de la relación de alturas de analito/patrón interno Vs concentración del analito/patrón interno, obteniéndose en todos los casos curvas de calibración con alta linealidad ( $R^2 \sim 0.99$ ) con ecuación correspondiente a rectas, como se puede ver en el

**Apartado 1.3.8. Cuantificación de 6 flavonoides por HPLC (método Patrón Interno)**  
de la Parte Experimental de este capítulo.

Mediante las ecuaciones obtenidas para cada compuesto aislado, se procedió a su cuantificación, obteniéndose las siguientes cantidades (**Tabla 1.13**):

**Tabla 1.13.** Cuantificación de 6 compuestos identificados, en los extractos EEBL y ERCF, mediante el método HPLC con Patrón Interno

Compuesto	mg/1g de EEBL	mg/1g de ERCF
Compuesto 1	4,25 ± 0,30	6,22 ± 0,13
Compuesto 5	7,89 ± 0,16	16,05 ± 0,47
Compuesto 8	8,35 ± 0,01	12,68 ± 0,13
Compuesto 11	5,96 ± 0,42	2,90 ± 0,34
Compuesto 12	6,17 ± 0,38	5,45 ± 0,63
Compuesto 13	1,10 ± 0,04	0,97 ± 0,12

Como se puede observar en el análisis de cuantificación (**Tabla 1.13**), los **Compuestos 1, 5 y 8**, aumentan su concentración en el ERCF, mientras que los **Compuestos 11, 12 y 13** disminuyen su concentración. La disminución o incremento no son homogéneas, ya que, por ejemplo, el **Compuesto 5** se incrementa en aproximadamente un 100%, mientras que el **Compuesto 11**, disminuye casi en un 50%, las otras variaciones son menos significativas. En general se puede decir que en el extracto ERCF, si se ve un aumento en las concentraciones de algunos flavonoides, mientras que otros se mantienen casi constantes, a excepción de uno que es el **Compuesto 11** el cual es el único que sufre una considerable disminución en su concentración, de los flavonoides cuantificados.

**1.4.5. Evaluación de la Actividad Antioxidante**

La capacidad antioxidante *in vitro* de los flavonoides ha sido objeto de estudio de varios grupos de investigación, determinándose diversos mecanismos de acción e importantes relaciones estructura-actividad (Hanasaki *et al.*, 1994; Firuzi *et al.*, 2005; Dugas *et al.*, 2000; Rice-Evans *et al.*, 1996). Entre las características estructurales y mecanismos de acción estudiados, están aquellos relacionados a la eficiente inhibición de radicales libres que presentan varios flavonoides (Croft, 1998; Bors *et al.*, 1990). Considerando estos antecedentes, se evaluó la inhibición de radicales libres, mediante los métodos de DPPH y

ABTS, de extractos y compuestos mayoritarios de *B. latifolia*. Esta inhibición, está ampliamente relacionada a la presencia de hidroxilos fenólicos en los flavonoides, por lo que, además se cuantificó la cantidad de fenólicos totales mediante el método de Folin-Ciocalteu. Los resultados se muestran en la **Tabla 1.14** en comparación con la quercetina, adquirida como estándar.

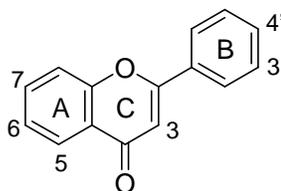
**Tabla 1. 14.** Actividad inhibitoria de radicales libres DPPH, ABTS y determinación de fenólicos totales por Folin-Ciocalteu de extractos y compuestos seleccionados de *B. latifolia*.

Muestra	DPPH 1/IC50	ABTS (mmol Q/g)	FC (mgQ/g)
<b>Quercetina como estándar</b>	<b>4.46</b>		
<b>EEBL</b>	0.62	0.27	29.90
<b>ERCF</b>	0.51	0.33	28.00
<b>Compuesto 1</b>	3.60	2.09	78.05
<b>Compuesto 5</b>	0,01	0.02	49.43
<b>Compuesto 7</b>	0.44	0.71	47.10
<b>Compuesto 8</b>	3.24	1.06	50.92
<b>Compuesto 11</b>	1.99	0.82	56.62
<b>Compuesto 12</b>	0.02	0.04	30.43
<b>Compuesto 13</b>	1.46	0.55	25.20

Los resultados determinados para los extractos EEBL y ERCF son similares, esto quiere decir que el proceso de desengrase no incrementa de manera significativa su capacidad antioxidante. Esto puede deberse a que, según los resultados de cuantificación de flavonoides aislados en ambos extractos, algunos compuestos activos, como el **compuesto 1**, se incrementan en el ERCF, mientras que otros, como el **compuesto 11**, también activo, disminuyen su concentración en el ERCF (Ver **Tablas 1.13** y **1.14**)

Realizando un análisis de todos los compuestos evaluados, vemos que el **Compuesto 1** presenta la mejor actividad y en orden decreciente se tiene: **Compuesto 1 > Compuesto 8 > Compuesto 11 > Compuesto 13 > Compuesto 7 > Compuesto 12 > Compuesto 5**. Para analizar los resultados obtenidos, considerando los antecedentes encontrados (Croft, 1998; Bors *et al.*, 1990), se cuantificó la cantidad de hidroxilos fenólicos presentes en cada anillo de la estructura base de un flavonoide (**Tabla 1.15**), esto para determinar si hay una

relación de la posición de los grupos hidroxilos con su actividad antioxidante, como proponen los autores anteriormente mencionados.



**Tabla 1. 15.** Flavonoides evaluados en su capacidad antioxidante y determinación de OH fenólicos

Flavonoides en orden decreciente de actividad	Anillo C		Anillo A			Anillo B		
	3	Nº OH	5	7	Nº OH	3'	4'	Nº OH
<b>Compuesto 1</b>	H	0	OH	OH	2	OH	OH	2
<b>Compuesto 8</b>	OH	1	OH	OMe	1	OMe	OH	1
<b>Compuesto 11</b>	OH	1	OH	OMe	1	OMe	OMe	0
<b>Compuesto 13</b>	OH	1	OH	OMe	1	H	OMe	0
<b>Compuesto 7</b>	OH	1	OH	OH	2	H	OMe	0
<b>Compuesto 12</b>	H	0	OH	OMe	1	H	OMe	0
<b>Compuesto 5</b>	H	0	OH	OH	2	H	OMe	0

El **Compuesto 1** es el que presenta la mayor actividad antioxidante, esto podría deberse a los cuatro hidroxilos fenólicos presentes en su estructura, dos OH en el anillo **B** y dos OH en el anillo **A**, particularmente la estructura *orto*-dihidroxi (catecol) en el anillo **B** resulta muy importante para la actividad, observándose una clara disminución de la actividad cuando ésta no existe, comparando con **compuesto 7**, cumpliendo así con las principales características estructurales requeridas para la eliminación eficiente de radicales libres (Croft, 1998; Bors, *et al.*, 1990). Según estudios teóricos de actividad antioxidante celular, se realizaron cálculos de las entalpías de disociación de los enlaces hidroxilo, determinando que los grupos OH en la posición OH 4' y OH 3', son más estables que los OH 3, 5 y 7 (Rong, *et al.*, 2012). Los sitios de unión propuestos para que los metales traça se quelen con los flavonoides son el resto catecol en el anillo B, los grupos 3-hidroxilo, 4-oxo en el anillo heterocíclico y los grupos 4-oxo, 5-hidroxilo entre el anillo heterocíclicos y el anillo A. Sin embargo, la principal contribución a la quelación de metales se debe al resto catecol, con el desplazamiento batocrómico más pronunciado, como ocurre en la quelación

de cobre y quercetina en comparación con el de kaempferol (similar en estructura a quercetina excepto que carece del grupo de catecol en el Anillo B) (Van Acker, *et al.*, 1996; Pietta, 2000).

En conclusión, se puede decir que la sustitución oxigenada en los carbonos C-3' y C-4', dando una estructura tipo *orto*-dihidroxi (catecol) en el anillo B, es muy importante para la actividad, pero la presencia de grupos OH en C-3 y C-5, también contribuye a la actividad, el grupo OH en C-7, no tiene mayor incidencia en la actividad si no tiene otro OH en *orto*, todo esto es coincidente con las principales características estructurales importantes para la inhibición eficiente de radicales libres, previamente reportadas (Croft, 1998; Bors *et al.*, 1990)

#### **1.4.6. Evaluación de Actividad Antiinflamatoria**

Teniendo en cuenta los antecedentes de actividad antiinflamatoria de *B. latifolia*, según medicina tradicional, pruebas *in vivo* y pruebas *in vitro* realizadas en algunos extractos (Abad, *et al.*, 2006, Almanza & Salcedo, 2012), además de otros antecedentes farmacológicos antiinflamatorios que presentan los flavonoides, se determinó evaluar la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de macrófagos, la producción de Interleucina 6 (IL-6) por ELISA, TNF- $\alpha$  por ELISA, Leucotrieno C4 por ELISA y Prostaglandina E2 mediante el ensayo de EIA, de los extractos y cuatro compuestos de *B. latifolia*.

#### **Medida de la producción de óxido nítrico en los sobrenadantes de macrófagos**

En cuanto a la producción de óxido nítrico se obtuvo los resultados mostrados en la **Tabla 1.16**.

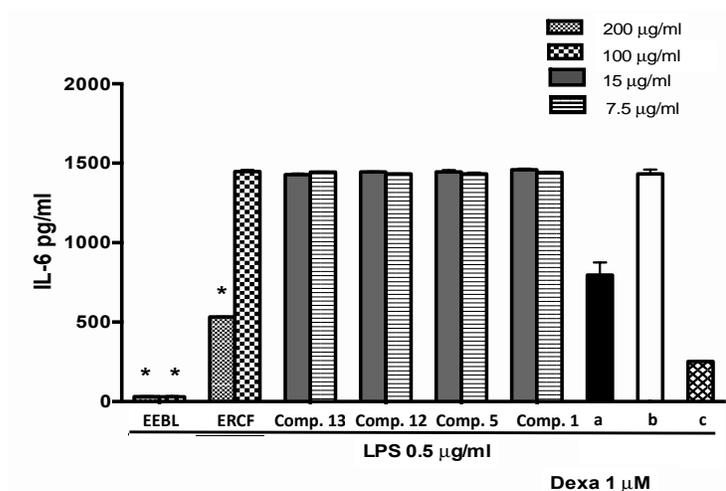
**Tabla 1. 16.** Producción de óxido nítrico en los sobrenadantes de macrófagos de tratamientos con extractos y compuesto de *B. latifolia*

Tratamiento	Óxido Nítrico $\mu\text{M}$					
	200 $\mu\text{g/ml}$		100 $\mu\text{g/ml}$		50 $\mu\text{g/ml}$	
<i>Baccharis latifolia</i>						
<b>EEBL</b>	18,03	$\pm 11,58$	14,09	$\pm 1,11$	7,95	$\pm 3,32$
<b>ERCF</b>	3,16	$\pm 1,49$	3,16	$\pm 1,09$	3,04	$\pm 0,71$
	15 $\mu\text{g/ml}$		7.5 $\mu\text{g/ml}$		3.75 $\mu\text{g/ml}$	
<b>Compuesto 1</b>	5,28	$\pm 1,26$	6,08	$\pm 2,15$	5,20	$\pm 0,24$
<b>Compuesto 5</b>	5,77	$\pm 0,79$	9,22	$\pm 1,41$	3,48	$\pm 0,37$
<b>Compuesto 12</b>	11,24	$\pm 1,16$	15,91	$\pm 2,45$	9,72	$\pm 0,66$
<b>Compuesto 13</b>	14,31	$\pm 3,47$	14,01	$\pm 1,53$	14,15	$\pm 2,17$
NC + LPS	24,81	$\pm 9,26$				
<b>Dex</b> <b>Dexametasona</b>	1,60	$\pm 0,42$				

mo los promedios  $\pm$  S.E. El análisis estadístico fue realizado empleando ANOVA de una vía y la significancia estadística fue considerada para P- valores  $< 0.05$

Los extractos y compuestos aislados de *B. latifolia* mostraron inhibir la producción de óxido nítrico cuantificado mediante la reacción de Griess, comparando su efecto frente al control NC+ LPS. El extracto ERCF mostro ser más activo que el extracto EEBL, probablemente por el incremento en concentración de varios compuestos activos como los **compuestos 1 y 5** (Tabla 1.13). Haciendo un análisis de los compuestos aislados evaluados, los **Compuestos 1 y 5** fueron los más activos, por lo que para esta actividad la sustitución de grupos OH en los carbonos C-5 y C-7, puede ser importante.

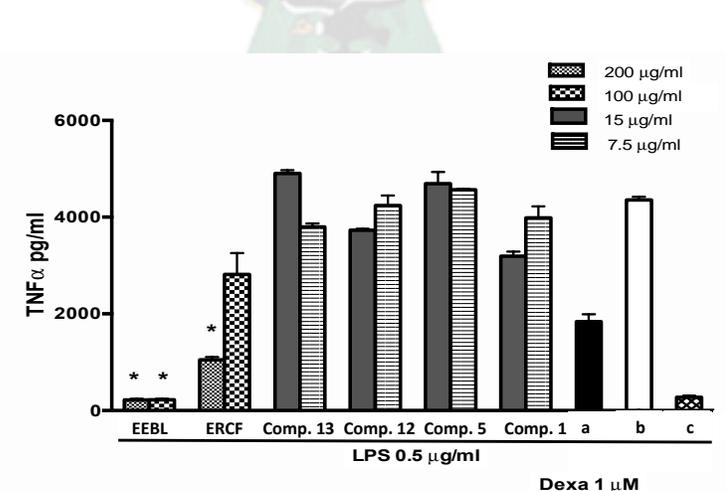
### Detección y cuantificación de Interleucina 6 (IL-6) por ELISA



**Figura 1. 31.** Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de *B. latifolia* sobre la producción de Interleucina 6 (IL-6) a: dexametasona 1 µM, b: LPS 0.5 µg/ml, c: control negativo  
Fuente: Gonzales, 2016

La **Figura 1.31** muestra que los extractos de *B. latifolia* (EEBL; ERCF) inhiben la producción de IL-6, siendo esta estadísticamente significativa frente al control NC+LPS (b). Los compuestos aislados no mostraron efecto sobre la producción de IL-6. Lo que induce a pensar que los flavonoides presentes en el extracto EEBL, no son los responsables de esta actividad

### Cuantificación de TNF- por ELISA

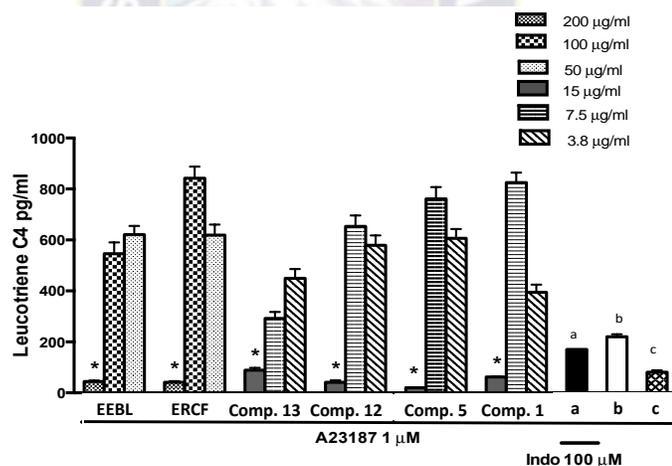


**Figura 1. 32.** Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de *B. latifolia* sobre la producción de Factor de Necrosis tumoral alfa (TNF- ) a: dexametasona 1 µM, b: LPS 0.5 µg/ml, c: control negativo  
Fuente: Gonzales, 2016

En la **Figura 1.32** se puede observar que los extractos de *B. latifolia* (EEBL; ERCF) inhiben la producción de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), siendo esta inhibición significativa. Los compuestos aislados no mostraron efecto sobre la producción de TNF- $\alpha$ . Lo cual indica que el efecto de inhibición de los extractos de este factor no se debe a los flavonoides ya que el ERCF muestra menos actividad que el extracto total y los flavonoides aislados no son activos. Sin embargo, según revisión bibliográfica de la luteolina (**Comp.1**) muestra varios antecedentes de actividad frente a TNF- $\alpha$  (Seelinger, Merfort & Schempp, 2008), también para el caso de la acacetina (**Comp. 5**) que se reporta como fuertemente efectiva en la inhibición de la producción TNF- $\alpha$  (Tanigawa, *et al.*, 2013), por lo que consideramos necesario que este ensayo se repita para confirmar los resultados.

### Cuantificación de Leucotrieno C4 por ELISA

Muestra: sobrenadante del cultivo de macrófagos tratados con Ionóforo de calcio y extractos o compuestos de *B. latifolia*.



**Figura 1. 33.** Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de *B. latifolia* sobre la producción Leucotrieno C4 pg/ml a: dexametasona 1  $\mu$ M, b: LPS 0.5  $\mu$ g/ml, c: control negativo  
Fuente: Gonzales, 2016

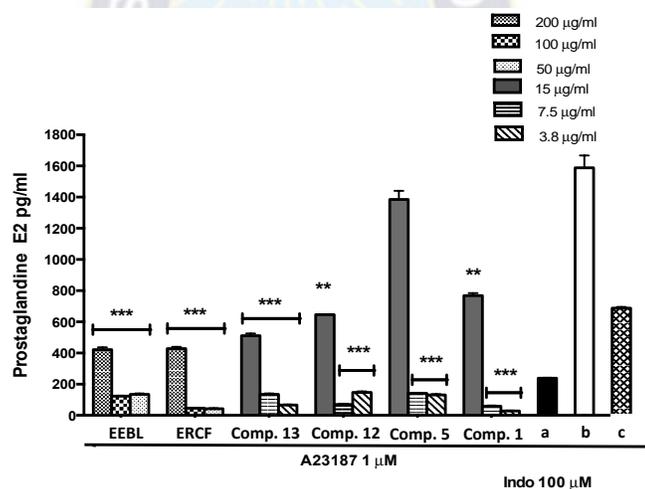
En este caso, tanto los extractos de *B. latifolia* como el **Compuesto 1**, **Compuesto 5** y el **Compuesto 12** mostraron efecto sobre la producción de LC-4 pero a concentración elevadas, siendo esta actividad significativa. Por lo que se puede decir que contra este mediador el efecto del extracto se debe principalmente a los flavonoides presentes en *B. latifolia*.

### Cuantificación de Prostaglandina E2 express mediante el ensayo de EIA

Muestra: sobrenadante del cultivo de macrófagos tratados con ionóforo de calcio y muestras de *B. latifolia*.

Finalmente contra la producción de Prostaglandina E2 es donde mejor se observa el efecto de los flavonoides, ya que el ERCF y el **Compuesto 1** son muy efectivos, más que el extracto etanólico inicial, lo cual es concordante con reportes previos de actividad antiinflamatoria de la luteolina (**Compuesto 1**).

Cabe resaltar que todas las muestras, tanto los extractos como los compuestos puros mostraron efecto sobre la producción de PG-E2, evaluado mediante Reacción Inmuno Enzimática, siendo la actividad de los compuestos estadísticamente significativa frente al grupo control NC+Calcio ionoforo, a concentraciones menores a los 10 µg/mL.



**Figura 1. 34.** Efecto de extractos etanólicos y compuestos aislados de *B. latifolia* sobre la producción Prostaglandina E2 pg/ml a: dexametasona 1 µM, b: LPS 0.5 µg/ml, c: control negativo

Fuente: Gonzales, 2016

Por lo que se puede decir que el EEBL en general presenta una actividad inhibitoria significativa tanto frente al agente pro-inflamatorio NO, como frente a los mediadores de procesos inflamatorios IL-6, TNF- $\alpha$ , LC-4 y PG-2; mientras que los flavonoides en algunos casos son efectivos (NO, LC-4 y PG-2) pero en otros casos no (IL-6 y TNF- $\alpha$ ), por lo que la actividad del extracto no se debe solamente a la presencia de flavonoides y tiene

un espectro más amplio de acción contra procesos inflamatorios que los flavonoides aislados.

Abad, *et al.*, 2006, realizó el estudio de actividad antiinflamatoria en macrófagos peritoneales de ratón estimulados con ionóforo de calcio A23187 que se validaron como fuente de ciclooxigenasa-1 (COX-1) (prostaglandina E2, PGE2) y 5-lipoxigenasa (5-LOX) (leucotrieno C4, LTC) y macrófagos peritoneales de ratón estimulados con lipopolisacáridos de *Escherichia coli* (LPS) para ensayar la actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2) (PGE4), óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral (TNF- ) en diferentes extractos de *Baccharis*, en el estudio el extracto etanólico de *B. latifolia* muestra actividad significativa contra la generación de NO, la inhibición de LTC4 y PGE2, mientras que para el factor de necrosis tumoral (TNF- ) no muestra una actividad significativa. Sin embargo, no sólo el extracto etanólico muestra un efecto inhibitorio frente a a estos mediadores de inflamación, sino también los extractos diclorometánico y hexánico, aunque no contra todos los mediadores. Esto sugiere que compuestos menos polares, como los diterpenos previamente reportados en esta especie (Bohlmann *et al.*, (1979 y 1981); Zdero *et al.*, (1989), también pueden ser responsables de las propiedades antiinflamatorias de esta interesante especie vegetal.

## 1.5. CONCLUSIONES

- J Se seleccionó una metodología, para la obtención del ERCF, en base al análisis de flavonoides totales de cuatro pruebas de desengrase a las cuales fue sometido el EEBL, donde la prueba 3 (éter de petróleo 60-80 °C, agitación constante de 54 rpm y temperatura 45 °C) dio un extracto ERFC que presentó una mayor cantidad de flavonoides totales.
- J Ambos extractos, el EEBL y el ERCF seleccionado, fueron llevados a análisis por cromatografía HPLC, donde se puede distinguir más de 25 flavonoides con tiempos de retención por encima de los 18 min. Las señales fueron asignadas a flavonoides de acuerdo a los espectros UV, que muestran las dos bandas características de este tipo de compuestos. Comparando los cromatogramas para ambos extractos, se observa que los flavonoides permanecen e incluso varios incrementan su

concentración en el ERCF y que los derivados de ácido cinámico se separan en el proceso, obteniéndose un extracto menos complejo.

- J) Una vez obtenida la metodología para la obtención del ERCF, se aisló (mediante técnicas cromatográficas y de purificación) e identifico (por RMN y HPLC) 12 flavonoides **Compuesto 1** (3,4,5,7-Tetrahidroxiflavona, luteolina; 7.1 mg), **Compuesto 3** (5,7,4'-Tetrahidroxi-3'-metoxiflavonol, isorhamnetina; 3.6 mg), **Compuesto 4** (3,3,4,5-Tetrahidroxi-7-metoxiflavona, rhamnetina; 8.9 mg), **Compuesto 5** (5,7-Dihidroxi-4 -metoxiflavona, acacetina; 9.1 mg), **Compuesto 6** (5, 4 -Dihidroxi-7-metoxiflavona, genkwanina; 2.4 mg), **Compuesto 7** (3,5,7-Trihidroxi, 4'-metoxiflavona, kaemferide; 5.3 mg), **Compuesto 8** (3,4,5-Trihidroxi-3,7-dimetoxiflavona, rhamnazin 4.8 mg), **Compuesto 9** (3,5,4'-Trihidroxi-7-metoxiflavona, rhamnocitrina; 3.2 mg), **Compuesto 10** (5-Hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, salvigenina; 1.8 mg), **Compuesto 11** (3,5-Dihidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona; 3.2 mg), **Compuesto 12** (5-Hidroxi-4,7-dimetoxiflavona; 28.3 mg) y **Compuesto 13** (3,5-Dihidroxi-4,7-dimetoxiflavona 7.1 mg). El **Compuesto 2** (3,4,5,7-Tetrahidroxiflavonol, quercetina), no fue aislado, pero sí identificado en el extracto, por comparación de  $t_R$  con un patrón y asignación de señales de RMN 1D y 2D, en una mezcla de los compuestos **1** y **2**.
- J) De los compuestos aislados, se seleccionó 6 flavonoides, para su cuantificación por el método de Patrón Interno, utilizando al flavonoide xanthomicrol como Patrón Interno, en los extractos EEBL y ERCF. Obteniéndose que los **Compuestos 1, 5** y **8**, aumentan su concentración en el ERCF, mientras que los **Compuestos 11, 12** y **13** disminuyen su concentración. La disminución o incremento no son homogéneas, ya que, por ejemplo, el **Compuesto 5** se incrementa en aproximadamente un 100%, mientras que el **Compuesto 11**, disminuye casi en un 50%, las otras variaciones son menos significativas. Por lo que se puede decir que el extracto ERCF, si presenta un aumento en las concentraciones de algunos flavonoides, mientras que otros se mantienen casi constantes y algunos, como el **Compuesto 11** disminuyen considerablemente su concentración en el proceso de obtención del ERCF.
- J) Los resultados obtenidos sobre la actividad antioxidante, demuestran que los extractos EEBL y ERCF tienen capacidad antioxidante similares, esto quiere decir

que el proceso de desengrase no incrementa de manera significativa su actividad. En cuanto a los flavonoides aislados tenemos que el **Compuesto 1** presenta la mejor actividad y en orden decreciente se tiene: **Compuesto 1 > Compuesto 8 > Compuesto 11 > Compuesto 13 > Compuesto 7 > Compuesto 12 > Compuesto 5**. Se realizó un análisis estructura-actividad cuantificándose la cantidad de hidroxilos fenólicos presentes en cada anillo de la estructura base de un flavonoide, esto para determinar si hay una relación de la posición de los grupos hidroxilos con su actividad antioxidante, donde se determinó que la estructura *orto*-dihidroxi (catecol) en el anillo **B**, resulta muy importante para que la molécula tenga una considerable actividad antioxidante, aunque también la presencia de OH en C-3 y C-5 contribuyen a la actividad. Con estos resultados se confirma las principales características estructurales requeridas para que un flavonoide sea eficiente en la eliminación de radicales libres dadas en reportes previos (Croft, 1998; Bors, *et al* 1990).

- J) Por último en la evaluación de la actividad antiinflamatoria tenemos que el EEBL en general presenta una actividad inhibitoria significativa tanto frente al agente pro-inflamatorio NO, como frente a los mediadores de procesos inflamatorios IL-6, TNF- $\alpha$ , LC-4 y PG-2; mientras que los flavonoides en algunos casos son efectivos (NO, LC-4 y PG-2) pero en otros casos no (IL-6 y TNF- $\alpha$ ), por lo que la actividad del extracto no se debe solamente a la presencia de flavonoides y tiene un espectro más amplio de acción contra procesos inflamatorios que los flavonoides aislados.

## 1.6. RECOMENDACIONES

- J) Según los resultados obtenidos, se sugiere continuar con el análisis químico composicional de esta especie, para poder determinar que compuestos le atribuyen sus propiedades medicinales y así obtener parámetros químicos de control de calidad para la elaboración de productos con alto potencial farmacológico.
- J) Se recomienda realizar nuevamente ensayos con los mediadores IL-6, TNF- $\alpha$  y LC-4, ya que los resultados obtenidos no son consistentes con datos encontrados en bibliografía

- J) Por último, se sugiere someter a los extractos EEBL, ERCF y compuestos puros a otras pruebas biológicas, con el fin de obtener mayor información de sus propiedades farmacológicas.

## 1.7. BIBLIOGRAFIA

- ✓ Abad, M. J., & Bermejo, P. (2007). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(7), 76-96.
- ✓ Abad, M. J., Bessa, A. L., Ballarín, B., Aragón, O., Gonzales, E., & Bermejo, P. (2006). Anti-inflammatory activity of four Bolivian Baccharis species (Compositae). *Journal of ethnopharmacology*, 103(3), 338-344.
- ✓ Alam, M. N., Bristi, N. J., & Rafiqzaman, M. (2013). Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2), 143-152.
- ✓ Almanza, G.R., Salcedo L. 2012. De la planta al medicamento. Investigaciones de Baccharis latifolia (Chilca). La Paz-Bolivia: Académica Española.
- ✓ Alwahsh, M. A. A., Khairuddean, M., & Chong, W. K. (2015). Chemical constituents and antioxidant activity of Teucrium barbeyanum Aschers. *Records of Natural Products*, 9(1), 159.
- ✓ Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., & Trinajstić, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current medicinal chemistry*, 14(7), 827-845.
- ✓ Amurrio, P. J., (2012). Estudio de suelos. En Almanza, G.R., Salcedo L. (Ed.). *De la planta al medicamento. Investigaciones de Baccharis latifolia (Chilca)*. (pp. 113-140). La Paz-Bolivia: Académica Española.
- ✓ Ayatollahi, S. A., Shojaii, A., Kobarfard, F., Mohammadzadeh, M., & Choudhary, M. I. (2010). Two flavones from Salvia leriaefolia. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 179-184.
- ✓ Balick, M. J., & Cox, P. A. (1997). Ethnobotanical research and traditional health care in developing countries. *Medicinal plants for forest conservation and health care*, 92, 12-23.

- ✓ Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences*, 78(5), 431-441.
- ✓ Benavente-García, O., & Castillo, J. (2008). Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(15), 6185-6205.
- ✓ Bohlmann, F., Knauf, W., King, R. M., & Robinson, H. (1979). Ein neues diterpen und weitere inhaltsstoffe aus Baccharis-arten. *Phytochemistry*, 18(6), 1011-1014.
- ✓ Bors, W., Heller, W., & Michael, M. (1998). Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. Edited by CA Rice, E Vans and L Packer.
- ✓ Bueno, M. J., (2016). [www.biosalud.org/archivos/noticias/4311Fitoterapia.pdf](http://www.biosalud.org/archivos/noticias/4311Fitoterapia.pdf). Extraído en julio de 2016
- ✓ Calle, A., San Martín, A., Melgarejo, M., Flores, Y. & Almanza, G. R. (2017) Evaluation of flavonoid contents and antibacterial activity of five bolivian baccharis species, *Revista boliviana de química*
- ✓ Chaipech, S., Morikawa, T., Ninomiya, K., Yoshikawa, M., Pongpiriyadacha, Y., Hayakawa, T., & Muraoka, O. (2012). Structures of two new phenolic glycosides, kaempferiosides A and B, and hepatoprotective constituents from the rhizomes of *Kaempferia parviflora*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 60(1), 62-69.
- ✓ Clavin, M., Gorzalczany, S., Macho, A., Muñoz, E., Ferraro, G., Acevedo, C., & Martino, V. (2007). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnotianum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(3), 585-589.
- ✓ Croft, K. D. (1998). The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 854(1), 435-442.
- ✓ Davies, K. J. (1995, November). Oxidative stress: the paradox of aerobic life. In *Biochemical Society Symposia* (Vol. 61, pp. 1-31). Portland Press Limited.
- ✓ Dugas, A. J., Castañeda-Acosta, J., Bonin, G. C., Price, K. L., Fischer, N. H., & Winston, G. W. (2000). Evaluation of the total peroxy radical-scavenging capacity of flavonoids: structure– activity relationships. *Journal of Natural Products*, 63(3), 327-331.

- ✓ Farnsworth, N. R., Akerele, O., Bingel, A. S., Soejarto, D. D., & Guo, Z. (1985). Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the world health organization*, 63(6), 965.
- ✓ Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini, L., Ciccoli, L., Giachetti, D., & Comporti, M. (1997). Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS letters*, 416(2), 123-129.
- ✓ Ferriola, P. C., Cody, V., & Middleton, E. (1989). Protein kinase C inhibition by plant flavonoids: kinetic mechanisms and structure-activity relationships. *Biochemical pharmacology*, 38(10), 1617-1624.
- ✓ Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., & Saso, L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1721(1), 174-184.
- ✓ Flores, Y., Salcedo, L. & Almanza, G. R. (2012). Estudios químicos. En Almanza, G.R., Salcedo L. (Ed.). *De la planta al medicamento. Investigaciones de Baccharis latifolia* (Chilca). (pp. 169-224). La Paz-Bolivia: Académica Española.
- ✓ Freire, S. E., Urtubey, E., & Giuliano, D. A. (2007). Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*, 29(1), 23-38.
- ✓ Galbis Pérez, J. A. (2004). Panorama actual de la química farmacéutica. (p. 206). Universidad de Sevilla. Sevilla-España.
- ✓ García B., P. 2008. IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica: inflamación; *Revista Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. (Esp; Vol. 102, N°. 1, p. 91 – 159)
- ✓ García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58(9), 537-552.
- ✓ Girault, L. (1987). Kallawaya: Curanderos itinerantes de los Andes. In *Kallawaya: Curanderos itinerantes de los andes*. Quipus.
- ✓ Grigorescu, E., Laz r, M., St nescu, U., Ciulei I., 2001. Index fitoterapeutic. Edit.

- ✓ Guardia, T., Rotelli, A. E., Juárez, A. O., & Pelzer, L. E. (2001). Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II farmaco*, 56(9), 683-687.
- ✓ Gülçin, I. (2012). Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Archives of toxicology*, 86(3), 345-391.
- ✓ Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- ✓ Hanasaki, Y., Ogawa, S., & Fukui, S. (1994). The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(6), 845-850.
- ✓ Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M., & Morita, N. (1988). Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *Journal of natural products*, 51(2), 345-348.
- ✓ Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(10), 572-584.
- ✓ Hirano, R., Sasamoto, W., Matsumoto, A., Itakura, H., Igarashi, O., & Kondo, K. (2001). Antioxidant ability of various flavonoids against DPPH radicals and LDL oxidation. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 47(5), 357-362.
- ✓ Jørgensen, L. V., Cornett, C., Justesen, U., Skibsted, L. H., & Dragsted, L. O. (1998). Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring. *Free radical research*, 29(4), 339-350
- ✓ Jovanovic, S. V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., & Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 116(11), 4846-4851.
- ✓ Katz, D. L., Doughty, K., & Ali, A. (2011). Cocoa and chocolate in human health and disease. *Antioxidants & redox signaling*, 15(10), 2779-2811.
- ✓ Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C. C., Yang, W. C., & Tsai, G. J. (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 123-130.

- ✓ Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 229-245.
- ✓ Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53(2), 135-148.
- ✓ Kumar, V., Cotran, R. S., & Robbins, S. L. (2008). *Patología humana*. Elsevier Health Sciences.
- ✓ Kumarappan, C. T., Thilagam, E., & Mandal, S. C. (2012). Antioxidant activity of polyphenolic extracts of *Ichnocarpus frutescens*. *Saudi journal of biological sciences*, 19(3), 349-355.
- ✓ Lee, E. J., Moon, B. H., Park, Y., Hong, S. W., Lee, S. H., Lee, Y. G., & Lim, Y. H. (2008). Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 29(2), 507-510.
- ✓ Lin, C. M., Chen, C. S., Chen, C. T., Liang, Y. C., & Lin, J. K. (2002). Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 294(1), 167-172.
- ✓ Litwinienko, G., & Ingold, K. U. (2004). Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. *The Journal of organic chemistry*, 69(18), 5888-5896.
- ✓ Loayza, I., Abujder, D., Aranda, R., Jakupovic, J., Collin, G., Deslauriers, H., & Jean, F. I. (1995). Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 38(2), 381-389.
- ✓ Loke, W. M., Proudfoot, J. M., Stewart, S., McKinley, A. J., Needs, P. W., Kroon, P. A., Hodgson, J. M. & Croft, K. D. (2008). Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin: lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. *Biochemical pharmacology*, 75(5), 1045-1053.
- ✓ López-Lázaro, M., Martín-Cordero, C., & Ayuso, M. J. (1999). Flavonoids of *Retama sphaerocarpa*. *Planta medica*, 65(08), 777-778.

- ✓ López-Lázaro, M., Martín-Cordero, C., Cortés, F., Piñero, J., & Ayuso, M. J. (2000). Cytotoxic activity of flavonoids and extracts from *Retama sphaerocarpa* Boissier. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(1-2), 40-43.
- ✓ Luân, N. Q., Hnh, N. N., & Châu, N. N. (2011). PHÂN L P VÀ NH N DANH C U TRÚC HAI FLAVONOL T D CH CHI T ETHYL ACETATE C A CÂY C LÀO-EUPATORIUM ODORATUM L. *T p chí Khoa h c Tr ng i h c C n Th*, 20, 250-257.
- ✓ Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*, 613(1), 1-19.
- ✓ Mammen, D., & Daniel, M. (2012). A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food chemistry*, 135(3), 1365-1368.
- ✓ Martínez, S., Terrazas, E., Alvarez, T., Mamani, O., Vila, J., & Mollinedo, P. (2010). Actividad antifúngica in vitro de extractos polares de plantas del género *baccharis* sobre fitopatógenos. *Revista Boliviana de Química*, 27(1), 13-18.
- ✓ Martinez-Florez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., & Tuñón, M. J. (2002). Flavonoids: properties and anti-oxidizing action. *Nutrición Hospitalaria*, 17(6), 271.
- ✓ Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84(4), 407-412.
- ✓ Muller, J. (2006). Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia, including an overview of the genus. *Systematic Botany Monographs*, 76.
- ✓ Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Natural product reports*, 17(3), 215-234.
- ✓ Nijveldt, R. J., Van Nood, E. L. S., Van Hoorn, D. E., Boelens, P. G., Van Norren, K., & Van Leeuwen, P. A. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American journal of clinical nutrition*, 74(4), 418-425.

- ✓ Oksman-Caldentey, K. M., & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science*, 9(9), 433-440.
- ✓ Oluwatuyi, M., Kaatz, G. W., & Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry*, 65(24), 3249-3254.
- ✓ Panthong, A., Kanjanapothi, D., Tuntiwachwuttikul, P., Pancharoen, O., & Reutrakul, V. (1994). Antiinflammatory activity of flavonoids. *Phytomedicine*, 1(2), 141-144.
- ✓ Pietta, P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- ✓ Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- ✓ Puupponen Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 494-507.
- ✓ Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., & Kohli, K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)*, 8(3), 229-235.
- ✓ Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- ✓ Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine*, 20(7), 933-956.
- ✓ Rice-Evans, C., Miller, N., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- ✓ Rong, Y., Wang, Z., Wu, J., & Zhao, B. (2012). A theoretical study on cellular antioxidant activity of selected flavonoids. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 93, 235-239.

- ✓ Salcedo, L., Pillco, A., Rodrigo, G., Sterner, O., & Almanza Vega, G. R. (2003). Aislamiento de flavonoides y estudio de la actividad tóxica y antibacteriana de extractos de *Baccharia latifolia*. *Revista Boliviana de Química*, 20, 43-48.
- ✓ Salcedo, L., Sterner, O., & Almanza, G. R., (2001) “Estudio Fitoquímico de *Baccharis latifolia* L.”, *Revista Boliviana de Química*, Vol. 18, N°1, Pag. 43-48
- ✓ Savi, L. A., Caon, T., de Oliveira, A. P., Sobottka, A. M., Werner, W., Reginatto, F. H., Schenkel, E. P., Barardi, C. R. M. & Simões, C. M. O. (2010). Evaluation of antirotavirus activity of flavonoids. *Fitoterapia*, 81(8), 1142-1146.
- ✓ Seelinger, G., Merfort, I., & Schempp, C. M. (2008). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta medica*, 74(14), 1667-1677.
- ✓ Sequeda-Castañeda, L. G., Célis, C., & Luengas-Caicedo, P. E. (2015). Phytochemical and therapeutic use of *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.(Asteraceae). *Pharmacology Online*, 14-17
- ✓ Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67-103.
- ✓ Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to modern liquid chromatography*. (pp. 520-527). Third edition, 2010, Hoboken, New Jersey-USA, Wiley & Sons.
- ✓ Tanigawa, N., Hagiwara, M., Tada, H., Komatsu, T., Sugiura, S., Kobayashi, K., Kato, Y., Ishida, N., Nishida, K., Ninomiya, M., Koketsu, M., & Matsushita K. (2013). Acacetin inhibits expression of E-selectin on endothelial cells through regulation of the MAP kinase signaling pathway and activation of NF- B. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 35(4), 471-477.
- ✓ Tene, V., Malagon, O., Finzi, P. V., Vidari, G., Armijos, C., & Zaragoza, T. (2007). An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipec, Ecuador. *Journal of ethnopharmacology*, 111(1), 63-81.
- ✓ Tseng, M., Su, Y. S., Cheng, M. J., Liu, T. W., Chen, I. S., Wu, M. D., Chang, H. S. & Yuan, G. F. (2013). Chemical constituents from a soil derived actinomycete, *actinomyces miaoliensis* BCRC 16873, and their inhibitory activities on

- lipopolysaccharide induced tumor necrosis factor production. *Chemistry & biodiversity*, 10(2), 303-312.
- ✓ Univalle, 2011.  
<http://www.univalle.edu/publicaciones/brujula/brujula17/pagina08.htm>. Extraído en julio de 2016
  - ✓ Urushima, H., Nishimura, J., Mizushima, T., Hayashi, N., Maeda, K., & Ito, T. (2015). Perilla frutescens extract ameliorates DSS-induced colitis by suppressing proinflammatory cytokines and inducing anti-inflammatory cytokines. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 308(1), G32-G41.
  - ✓ Ursini, F., Maiorino, M., Morazzoni, P., Roveri, A., & Pifferi, G. (1994). A novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology and Medicine*, 16(5), 547-553.
  - ✓ Valarezo, E., Rosillo, M., Cartuche, L., Malagón, O., Meneses, M., & Morocho, V. (2013). Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from Baccharis latifolia (Ruiz & Pav.) Pers.(Asteraceae) from Loja, Ecuador. *Journal of essential oil research*, 25(3), 233-238.
  - ✓ Valenzuela, E., (2012). Características botánicas. En Almanza, G.R., Salcedo L. (Ed.). *De la planta al medicamento. Investigaciones de Baccharis latifolia (Chilca)*. (pp. 79-112). La Paz-Bolivia: Académica Española.
  - ✓ Van Acker, S. A., Tromp, M. N., Griffioen, D. H., Van Bennekom, W. P., Van Der Vijgh, W. J., & Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(3), 331-342.
  - ✓ Vaquero, M. J. R., Alberto, M. R., & de Nadra, M. C. M. (2007). Influence of phenolic compounds from wines on the growth of Listeria monocytogenes. *Food Control*, 18(5), 587-593.
  - ✓ Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173-1183.

- ✓ Zapata, B., Durán, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Mesa-Arango, A. C. (2010). Antifungal activity, cytotoxicity and composition of essential oils from the Asteraceae plant family. *Revista iberoamericana de micología*, 27(2), 101-103.
- ✓ Zdero, C., Bohlmann, F., Solomon, J. C., King, R. M., & Robinson, H. (1989). Ent-cloerodanes and other constituents from Bolivian Baccharis species. *Phytochemistry*, 28(2), 531-542.
- ✓ Zhang, X., Hung, T. M., Phuong, P. T., Ngoc, T. M., Min, B. S., Song, K. S., Seong, Y. H. & Bae, K. (2006). Anti-inflammatory activity of flavonoids from *Populus davidiana*. *Archives of pharmacal research*, 29(12), 1102-1108.



## PARTE II (*Arachis hypogaea* L.)

### 2.1. INTRODUCCIÓN Y MARCO TEORICO

#### 2.1.1. El Maní

El maní (*Arachis hypogaea* L.) es una planta alimenticia, cultivada en regiones cálidas y tropicales del Mundo. Esta especie domesticada fue creada por el hombre y depende exclusivamente de su mano para sobrevivir, tiene sus orígenes en la región del Chaco de Bolivia y norte de Argentina.

El maní ha tenido un enorme impacto en la historia humana, según Bertioli este cultivo será aún más importante a medida que luchemos por alimentar al mundo durante el próximo siglo. Este cultivo híbrido se extendió por toda América del Sur en tiempos precolombinos, llegando a las costas del Atlántico y el Pacífico e incluso hacia Centroamérica y México, (Cardona). Después de la colonización fue llevado a África, Asia, América del Norte y Australia, sitios donde se convirtió en un cultivo importante.

En la actualidad el maní se constituye en el cuarto cultivo de oleaginosa en el mundo y es cultivada por varios países, siendo China el mayor productor con el 40%, seguida por la India con el 14% de la producción mundial que alcanza 43.2 MM de toneladas (USDA).

En 2016, Bolivia tuvo una producción de 25.951 toneladas (INE). Los cultivos se concentran principalmente en los valles de Chuquisaca, Tarija y Santa Cruz, aunque también está presentes en La Paz, Cochabamba, Beni y Potosí (INE, 2017).

La semilla de maní, es la materia prima para la obtención de aceite maní, un producto importante por el contenido de la materia grasa de la semilla (40-50%) y por sus propiedades beneficiosas. Otro producto, es la harina de maní que presenta de un 25 al 32% de proteína. Además, el maní es consumido en forma directa como fruta seca y está presente en varios productos comunes. Así mismo, se lo utiliza como alimento balanceado.

En el proceso de obtención de la semilla de maní, se pela la vaina generándose un subproducto agroindustrial. Aproximadamente el 35% del peso de la vaina del maní corresponde a la cascara de maní. Existen varios estudios para darle un uso a la cascara de

maní, entre ellos están, la obtención a bioetanol, conversión a fertilizante y la obtención de compuestos fenólicos.

### **2.1.2. Género *Arachis***

Se estima que el género *Arachis* consta de más de 60 especies, endémicas y distribuidas en diferentes regiones de América del Sur. Se encuentran miembros de este género en las tierras bajas al sur del río Amazonas (Krapovickas & Gregory, 1994). Todas las especies tienen frutos subterráneos sostenidos por una prolongación del ovario que el agricultor llama "clavo" por la forma de enterrarse en el suelo. La capacidad de dispersión es muy limitada y constituyen por lo general poblaciones pequeñas. Además, todas las especies son autógamas. Los casos de cruzamientos naturales se deben a visitas ocasionales de insectos polinizadores como abejas pero, por el aislamiento de las poblaciones, el flujo de genes es muy reducido. *A. hypogaea* es una especie alotetraploide y sólo se hibridará con los miembros de la sección *Arachis*.

### **2.1.3 *Arachis hypogaea* L.**

El maní (*Arachis hypogaea* L.) tiene sus orígenes en el sureste de Bolivia (Krapovickas, 1994, 2004). En 2016, investigadores de la Universidad de Georgia (UGA) y de la Iniciativa Internacional del Genoma del Maní realizaron el estudio del ADN, concluyendo que *Arachis ipaensis* y *Arachis duranensis*, son los progenitores del Maní, confirmando así varios estudios que indicaban que el maní era un híbrido de estas dos especies. Además, gracias al estudio de Bertoli 2016, se evidenció la relación entre el maní y los primeros habitantes de América del Sur, pues existía coincidencia cuando las dos especies se polinizaron y los datos sobre la migración de los primeros pueblos de América del Sur.

Los incas cultivaban el maní en todas las regiones costeras del Perú. Garcilaso de la Vega (1609) describe al maní como otro vegetal que crece bajo el suelo, llamado por los indios *ynchic*. Y se informa que los españoles introdujeron el nombre *maní* de las Antillas para designar al vegetal que crecía bajo la tierra en Perú. Los maníes fueron transportados a Europa, África, Asia y más tarde a América del Norte, viajando hasta el actual Sureste de los Estados Unidos, pero del momento y lugar de su introducción aun no fue documentado. (Hammons, 1982).

### **Clasificación taxonómica**

En 1753 Linneo describió al maní con el nombre de *Arachis hypogaea*. La clasificación taxonómica actual, es la siguiente:

- Reino Plantae
- División Magnoliophyta
- Clase Magnoliopsida
- Subclase Rosidae
- Orden Fabales
- Familia Fabacea
- Género *Arachis*
- Especie *Arachis hypogaea* L.

### **Descripción Botánica de *Arachis hypogaea* L.**

El maní es una leguminosa herbácea anual, auto-polinizante. El fruto es una vaina con una a cinco semillas que se desarrolla bajo tierra dentro de una estructura similar a una aguja llamada clavija o clavo, una estructura ovárica alargada. Las hojas son alternas y pinnadas con cuatro folíolos (dos pares de folíolos por hoja). La planta de maní puede estar erguida o postrada (6 a 24 pulgadas de altura o más) con una raíz fuerte bien desarrollada y muchas raíces y nódulos laterales. Las plantas desarrollan tres tallos principales, es decir, dos tallos de los cogollos axilares cotiledonarios de tamaño igual al tronco central durante el crecimiento temprano.

Las flores son amarillas brillantes con partes masculinas y femeninas se localizan en las inflorescencias que se asemejan a puntos en las axilas de las hojas. Una o varias flores pueden estar presentes en cada nodo y son generalmente más abundantes en los nodos inferiores. Las primeras flores aparecen entre 4 y 6 semanas después de la siembra y la producción máxima de flores ocurre 6 a 10 semanas después de la siembra. (Putnam, *et al.*, 1991)

#### **2.1.4. Variedades de Maní en Bolivia**

A. Krapovickas postuló que Bolivia es el país de origen del maní cultivado (*Arachis hypogaea* L.) debido a su alta diversidad de razas primitivas y por la ocurrencia de las

especies silvestres de *Arachis* más cercanamente emparentadas con el cultivo. En 2009 se pudieron diferenciar para Bolivia 62 razas de maní cultivado de las cuales: 42 pertenecen a *A. hypogaea* subsp. *hypogaea* L. var. *Hypogaea*, 17 a *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* Waldron var. *Fastigiata*, 1 a *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *vulgaris* C. Harz y 2 a *A. hypogaea* subsp. *fastigiata* var. *peruviana* Krapov. & W.C. Gregory (Krapovickas, *et al.*, 2009).

**Tabla 2. 1.** Algunas especies de mayor producción en Bolivia

Fuente: Maníes nativos cultivados de Chuquisaca, 2015



En varios casos reportados, los agricultores también tratan de mantener la integridad de las variedades por razones culturales o para usos específicos, en Bolivia los maníes son seleccionados específicamente por su precocidad, ya que se prefieren aquellos que pueden ser cosechados antes de que los ríos comiencen a subir de nuevo, al comienzo de la estación lluviosa (Williams, 1989).



**Figura. 2. 1.** Municipios con mayor producción de maní en Bolivia  
Fuente: Elaboración Propia, 2017

Los cultivos se concentran principalmente en los valles de Chuquisaca, Tarija y Santa Cruz, en la **Figura 2.1** se muestran los principales municipios del Chaco boliviano productores de Maní (Proagro Bolivia, 2016), aunque también está presentes en La Paz, Cochabamba, Beni y Potosí (INE, 2017).

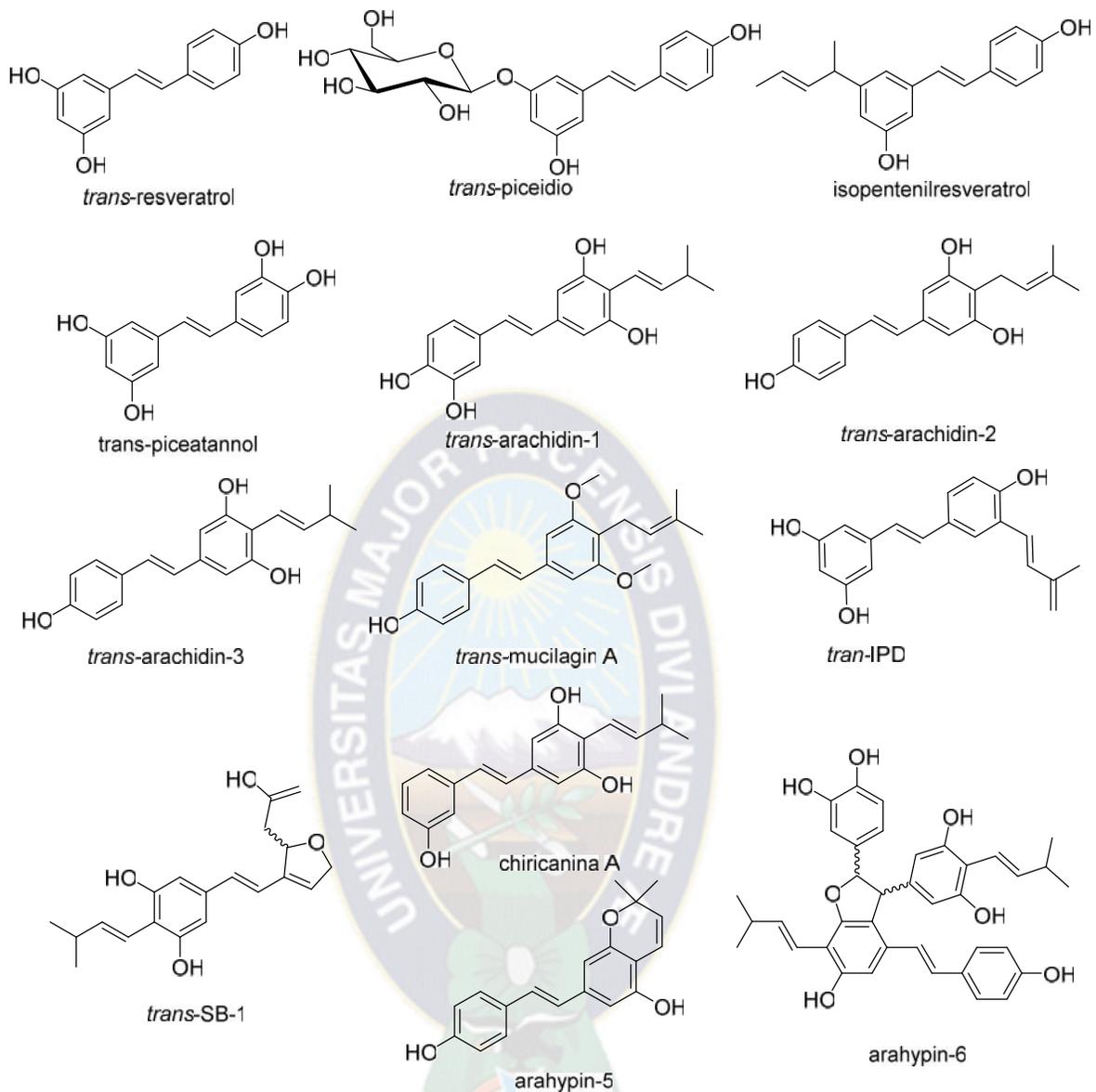
### 2.1.5. Química de *Arachis hypogaea* L.

Se han realizado varios estudios fitoquímicos de *Arachis hypogaea* L, encontrándose varios tipos de metabolitos secundarios, estas sustancias de bajo peso molecular, no son esenciales para la subsistencia de la planta, pero tienen funciones muy importantes como ser mecanismos de defensa químicos contra los diferentes tipos de stress que puede sufrir la planta. La habilidad para la biosíntesis de los metabolitos es seleccionada a lo largo de la evolución, produciéndose metabolitos específicos en determinadas especies. (Dudareva, & Pichersky, 2000). Muchos vegetales son fuentes de metabolitos secundarios que son utilizados para fines medicinales e industriales, entre otros (Karuppusamy, 2009).

Se ha realizado una revisión bibliográfica de los metabolitos secundarios aislados en la *A. hypogaea* y principalmente se reportan derivados de fenilpropanoides, entre los que destacan los estilbenos y flavonoides. Este tipo de compuestos están presentes en todos los

órganos de la planta y están involucrados en mecanismos de defensa químicos contra contaminación microbiana, daños provocados por insectos y radiación ultravioleta. (Lee, *et al.*, 2008, Lopes, *et al.*, 2011).

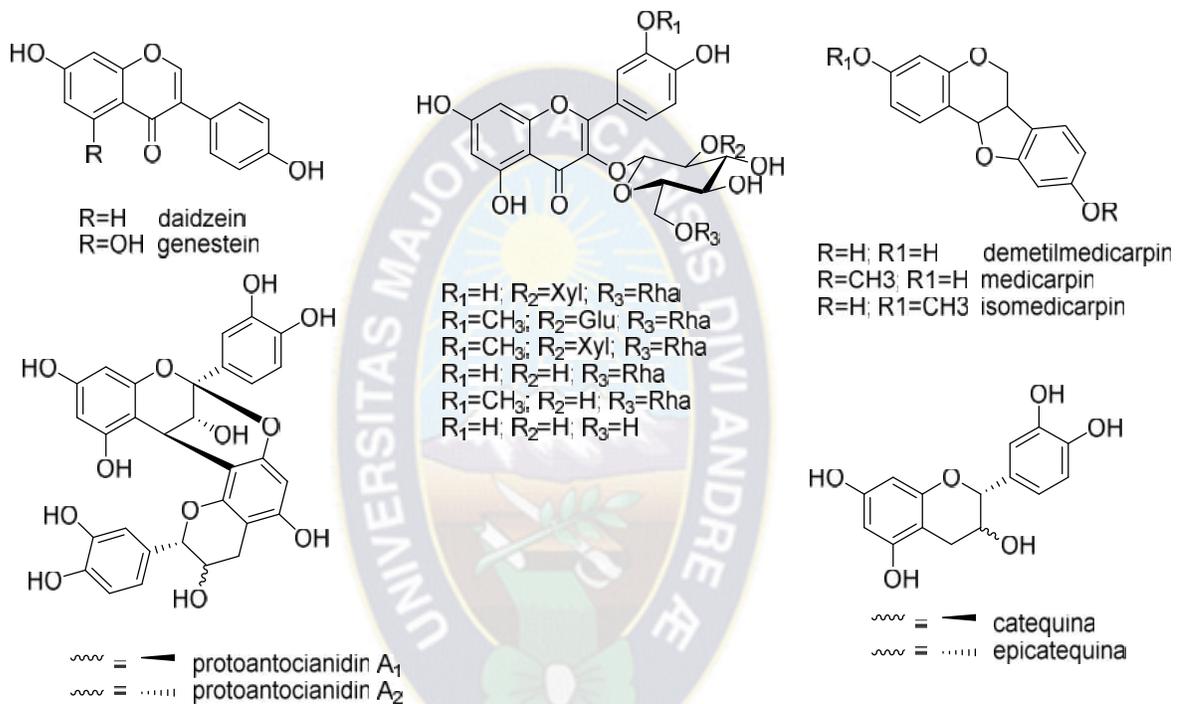
Los estilbenos conocidos como fitoalexinas son producidos por *Arachis hypogaea* cuando la planta tiene problemas fúngicos (**Figura 2.2**) y están presentes como isómeros trans (Sobolev, *et al.*, 1999, 2006, 2008, 2011; Medina-Bolivar, *et al.*, 2007), la mayoría de los estilbenos posee un grupo prenilo en su estructura que aumenta la bioactividad del compuesto (Condori, *et al.*, 2010). Este tipo de compuestos fueron reportados en los diferentes órganos de la planta como hojas (Chung, *et al.*, 2003), raíces (Chen *et al.*, 2002) y semilla. Entre los estilbenos más interesantes podemos mencionar al trans-resveratrol, el trans-piceidio (Sales, & Resurreccion, 2009), el isopentenilresveratrol (Ku, *et al.*, 2005), el piceatanol, el araquidin-1, el araquidin-2, el araquidin-3 y el trans-SB-1 (**Figura 2.2**) (Sobolev, *et al.*, 2009). El contenido de este tipo de compuestos en la semilla de maní es inferior al encontrado en las uvas, pero el contenido de resveratrol y compuestos similares es mayor en las hojas, raíces y piel de los cacahuets (Chung *et al.*, 2003). Lee *et al.*, (2005) informaron que el contenido de resveratrol en el maní dependía del procesamiento post-cosecha, con un aumento de 45 a 65 veces después de un tratamiento de 20 horas de remojo y 66 horas de secado. Otros estudios de Rudolf & Resurreccion, (2006) informaron incrementos significativos (de 0,48  $\mu\text{g/g}$  a 3,96  $\mu\text{g/g}$ ) en el contenido de resveratrol con estrés abiótico.



**Figura 2. 1.** Estilbenos aislados en *Arachis hypogaea*  
Fuente: Elaboración propia

Otro grupo importante de metabolitos secundarios aislados de *Arachis hypogaea* son flavonoides. En 1998 Mazur *et al.*, reportó en las semillas la presencia de dos isoflavonoides, daidzeína y genisteína, en concentración de 49,7  $\mu\text{g}/100\text{g}$  y 82,6  $\mu\text{g}/100\text{g}$  respectivamente. En la cascara de maní se reportó la presencia de luteolina, 5,7-dihidroxicromona, el eriodictol y la 3',4',7-trihidroxiflavanona (Pendse, *et al.*, 1973; Wee,

*et al.*, 2007). De la piel de las semillas de maní se aislaron flavonoides glicosilados, derivados de isoflavonas. En la parte área de *Arachis hypogaea* se aislaron derivados isoflavonicos como la demetilmedicarpin, la medicarpin y la isomedicarpin. También se aislaron catequinas de la piel de la semilla del maní como la catequina y la epicatequina y sus productos condensados como proantocianidina A<sub>1</sub> y la proantocianidina A<sub>2</sub> (**Figura 2.3**).



**Figura 2. 2.** Flavonoides y derivados de flavonoides aislados en *Arachis hypogaea*  
 Fuente: Elaboracion propia

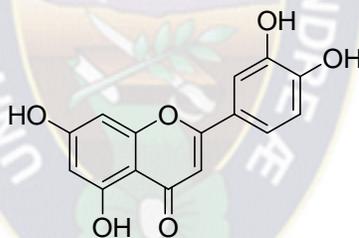
### 2.1.6. Luteolina

Como se indicó en la sección anterior, se aislaron varios flavonoides de los órganos de *Arachis hypogaea*, sin embargo, en la cascara externa del maní, residuo generado en grandes cantidades, el metabolito secundario mayoritario es la luteolina (Qiu, *et al.*, 2012; Win, *et al.*, 2011).

La luteolina (3', 4', 5,7-tetrahidroxiflavona, **Figura 2.4**), es un miembro importante de la familia de los flavonoides, está presente en diversas frutas y vegetales. Se le atribuye propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, antialérgicas, antiespasmódicas y antitusivas (Seelinger, *et al.*, 2008; Perez-Garcia, *et al.*, 2000; Xagorari, *et al* 2001 y 2002; Ueda, *et*

*al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2004; Kim, & Jobin, 2005; Kimata, *et al.*, 2000; Fleer, & Verspohl, 2007). Además, se reportó su actividad antitumoral en ratones (Hong, *et al.*, 2014; Ueda, *et al.*, 2003) y mostro actividad anti-HIV (Hu, *et al.*, 1994). Tiene potencial como nutracéutico (Nordeen, *et al.*, 2013) y presenta actividad contra *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* (Lu, *et al.*, 1999). En adición, existen varios estudios que demuestran sus propiedades anticancerígenas (Chin, *et al.*, 2013; Horinaka, *et al.* 2005; Lee, *et al.*, 2005; Chowdhury, *et al.*, 2002; Ko, *et al.*, 2002; Lin, *et al.*, 2008).

Las propiedades antiinflamatorias de la luteolina, han quedado demostradas tanto *in vitro* como *in vivo*, aunque el mecanismo de acción aún no está comprendido totalmente. (Kim, & Jobin, 2005). Según varias pruebas realizadas al flavonoide, tiene una fuerte capacidad antioxidante para inhibir la expresión génica asociada a la inflamación (TNF- , IL-6, iNOS y COX-2), además de suprimir la activación de NF- B y AP-1 dependientes de procesos redox, dando como resultado efectos anti-inflamatorios, todo lo cual indica que la luteolina es un potencial fármaco para tratar enfermedades inflamatorias. (Chen, *et al.*, 2007)



**Figura 2. 3.** Estructura química de la luteolina  
Fuente: Elaboracion propia

Finalmente es importante mencionar que la luteolina puede tener ser utilizada en forma oral tanto por sus propiedades antiinflamatorias y antialérgicas (Ueda, *et al.*, 2002), porque se ha demostrado que se absorbe desde el intestino detectándose en el suero humano (Shimoi, *et al.*, 1998)

## 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Obtener extractos de cáscaras de *A. hypogaea* que contengan luteolina
- 2) Cuantificar luteolina en extractos obtenidos de cáscaras de maní de diferentes cultivares (mayores productores en Bolivia)
- 3) Aislar e identificar luteolina de un cultivar seleccionado
- 4) Evaluar la termoestabilidad de extractos seleccionados y luteolina
- 5) Evaluar la actividad antioxidante y/o antiinflamatoria de extractos seleccionados y/o luteolina.

## 2.3. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.3.1. Equipos y reactivos

Los equipos más importantes utilizados en el presente trabajo fueron:

- Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker de 300 MHz Avance II
- HPLC Agilent 1100 que comprende un desgasificador de vacío (G1322 A), un sistema de suministro de disolvente (Quat Pump-G1311A), un horno de columna (Colcom-G1316A) y un detector de arreglo de diodos (G1315B), con una columna eclipse de fase reversa Agilent plus C18 (150 x 4,6 mm) protegida por una precolumna de 10 mm.
- Espectrofotómetro marca Thermo Scientific, serie Genesys 10S con cubetas de cuarzo de 1cm.

Los solventes utilizados fueron purificados por destilación antes de su uso. Los extractos obtenidos fueron llevados a sequedad en un rotaevaporador Heidolph acoplado a una bomba de membrana.

Para la separación de la luteolina se utilizó Cromatografía en Columna (CC) abierta con Sílicagel G-60 (Merck), haciendo el seguimiento por cromatografía en capa fina (TLC) con placas sílicagel 60 F254 (Merck) reveladas con Ácido sulfúrico al 3% y Cloruro férrico al 5%. Para la purificación de la luteolina se utilizó la Cromatografía por exclusión molecular con Sephadex LH-20 (Sigma Aldrich). Para la identificación de la luteolina se empleó un equipo Resonancia Magnética Nuclear (RMN) Bruker de 300 MHz Avance II.

Para la cuantificación de la luteolina se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia HPLC Agilent 1100, que comprende un desgasificador de vacío (G1322 A), un sistema de suministro de disolvente (Quat Pump-G1311A), un horno de columna (Colcom-G1316A) y un detector de arreglo de diodos (G1315B), con una columna eclipse de fase reversa Agilent plus C18 (150 x 4,6 mm) protegida por una precolumna de 10 mm. Los solventes utilizados Acetonitrilo grado HPLC, Metanol grado HPLC, Ácido fosfórico p.a. y Agua miliQ.

Finalmente, para el seguimiento de la termoestabilidad se utilizó una termocupla y un Espectrofotómetro marca Thermo Scientific, serie Genesys 10S con cubetas de cuarzo de 1 cm.

### 2.3.2. Material vegetal

La materia prima fue principalmente proporcionada por el Banco de Germoplasma de la Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca (BIORENA, USFX) el Instituto Superior Tecnológico Agroindustrial de Monteagudo (ISTAM) a través de acuerdos de colaboración con el Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés (IIQ, UMSA).

Las muestras de cultivares no procesados fueron proporcionadas por dos institutos de Chuquisaca, el Instituto de Agroecología y Seguridad Alimentaria y

Información de las muestras en estudio se encuentra en la **Tabla 2.2** donde las muestras de 19 cultivares fueron proporcionadas por BIORENA (1, 6-13, 23, 25-27, 30-34 y 37), quienes realizaron las colectas a partir del año 2013, principalmente en áreas productoras de maní dentro el Departamento de Chuquisaca también mostradas en la **Tabla 2.2**. Una vez colectadas las mismas fueron almacenadas a -5 °C en el Banco de Germoplasma de BIORENA dependiente de la USFX. El material genético conservado fue cultivado en el Municipio de El Villar durante los años 2014 a 2015, habiéndose obtenido rendimientos en estas accesiones de hasta 7,47 Tn/ha, mientras que el promedio nacional se encuentra muy por debajo de esos rendimientos. Las muestras fueron identificadas por el personal del mismo instituto, quienes además dieron los datos de los lugares de colecta. Una muestra de

cada cultivar y la información correspondiente a su localización y producción se encuentran en el BIORENA, USFX.

Por otra parte, los restantes 18 cultivares, de la **Tabla 2.2**, se obtuvieron en colaboración del Ingeniero Eloy Blanco del ISTAM, la colecta de los cultivares de maníes se realizó en comunidades de los municipios de Villa Vaca Guzmán (Muyupampa), Monteagudo y Padilla. Además, el Ing. Blanco proporcionó algunas variedades que poseía en el Instituto. Los cultivares colectados, fueron secados por el lapso de un mes a temperatura ambiente, en un ambiente debidamente ventilado del IIQ UMSA, protegiéndolos de los rayos del sol. La identificación de los cultivares fue realizada por el Ing. Blanco quien además posee en el ISTAM muestras de todos los cultivares proporcionados.

Finalmente, las muestras 38 al 41 fueron obtenidas en los mercados de Sucre, para poder realizar una comparación entre las muestras procesadas (tostadas) y no procesadas (sin tostar), las muestras ofrecidas en los mercados de Sucre fueron monitoreadas por personal del BIORENA e ISTAM. El nombre común de los cultivares y de la localidad de colecta fueron otorgados por las vendedoras del mercado. Muestras de estos cultivares se encuentran en el IIQ, UMSA.

### **2.3.3. Obtención de extractos**

#### **Extracto etanólico**

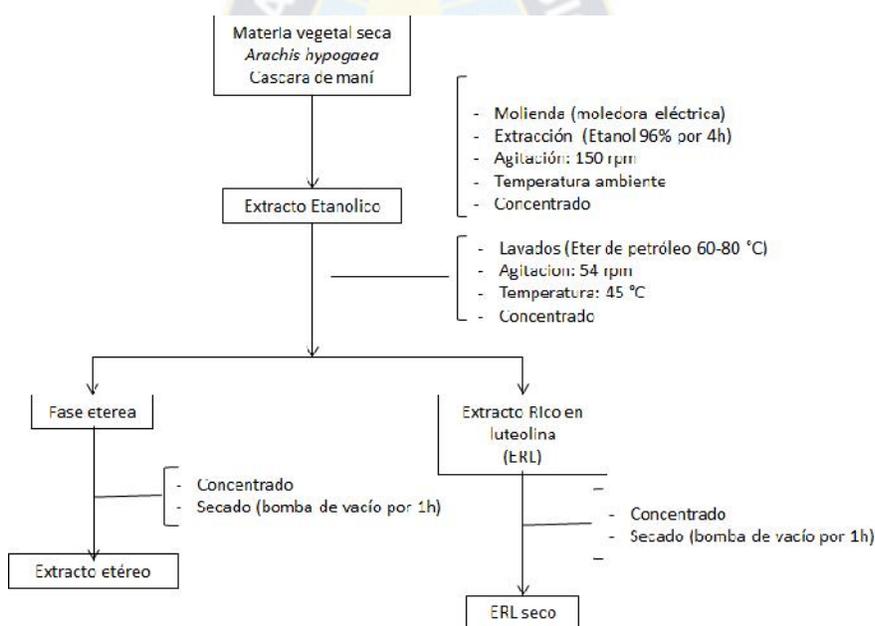
Una vez obtenidas las muestras de cascara de maní secas, se las llevó a triturar con ayuda de una moladora eléctrica, evitando pulverizarlas totalmente. Se pesó la cantidad de cascara de maní con la que se contaba, posteriormente se adicionó etanol de 96 ° en una relación 1:15 (peso: volumen), sometiendo a las muestras a un proceso de maceración con agitación constante de 150 rpm, por el lapso de 4 horas a temperatura ambiente. Los extractos obtenidos fueron filtrados a gravedad con papel filtro Whatman #4 y concentrados por rotaevaporación hasta sequedad.

Finalmente, para eliminar por completo el solvente atrapado, fueron secados por una hora más en una bomba de alto vacío, obteniendo así los extractos secos y el rendimiento de cada extracto respecto al material seco.

### Extracto rico en luteolina

Los extractos etanólicos obtenidos fueron analizados mediante placas TLC determinándose que además de luteolina tenían compuestos apolares, aparentemente grasas, por lo que se procedió al desengrasado, para esto se pesó 8 g de extracto al que se le añadió 200 ml de éter de petróleo (60-80 °C), dejándolo por un lapso de una hora en baño María a 45 °C y con agitación constante de 54 rpm. Esta operación se la repitió 2 veces más. Separando el extracto etéreo con grasas del extracto etanólico resultante (extracto rico en luteolina) y realizando placas TLC para su control. El extracto etanólico desengrasado con mayor concentración de luteolina (ERL) también fue secado y pesado (**Figura 2.5**).

#### FLUJOGRAMA DEL PROCEDIMIENTO



**Figura 2. 4.** Procedimiento de la obtención de los extractos etanólico y Extracto Rico en Luteolina (ERL)

Fuente: San Martín, 2017

### 2.3.4. Aislamiento e identificación de luteolina

Para el aislamiento de luteolina se pesó 1 g de extracto etanólico obtenido del cultivar “larguillo” tostado de Icla, el cual se lo disolvió en MeOH y se pasó por un “cadrigé” (DPA-6S) para separar algunas impurezas, después de este proceso se obtuvo 329,5 mg del extracto tratado, que se sembró en una columna Sephadex LH-20 obteniéndose en las

últimas fracciones 29,2 mg de luteolina pura por comparación con el estándar del compuesto.

Para confirmar su identificación se realizaron espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obteniéndose los siguientes resultados, que confirmaron la estructura propuesta.

RMN $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO) 7.43 (1H, *dd*,  $J = 8.1, 1.5$  Hz, H-6'), 7.39 (1H, *d*,  $J = 1.5$  Hz, H-2'), 6.88 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.67 (1H, *s*, H-3), 6.43 (1H, *s*, H-8), 6.18 (1H, *s*, H-6)

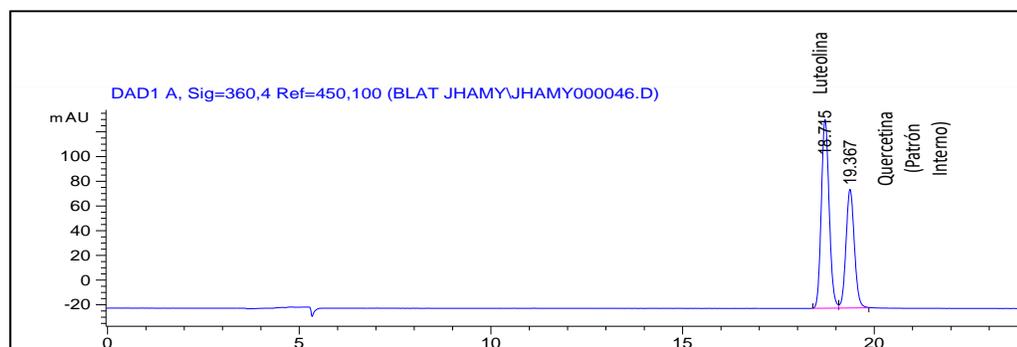
RMN $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO) 182.1 (C-4), 164.3 (C-7), 164.6 (C-2), 161.9 (C-5), 157.7 (C-9), 150.1 (C-4'), 146.2 (C-3'), 121.9 (C-1'), 119.4 (C-6'), 116.4 (C-5'), 113.8 (C-2'), 104.1 (C-10), 103.3 (C-3), 99.2 (C-6), 94.3 (C-8).

### 2.3.5. Cuantificación de luteolina por HPLC (método Patrón Interno)

#### Curva de calibración

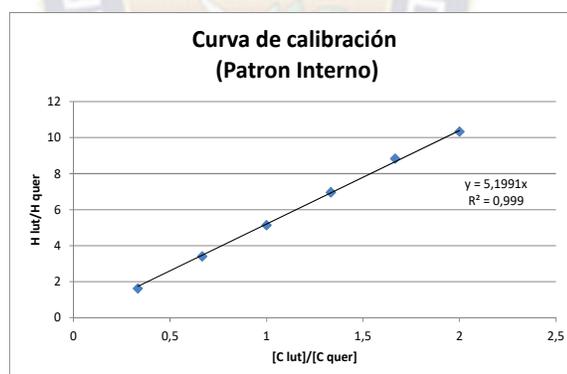
Para la curva de calibración de la luteolina se procedió a preparar, soluciones con 20 ppm del Patrón Interno, quercetina y diferentes concentraciones del analito a cuantificar, luteolina, de 30, 60, 90, 120, 150 y 180 ppm aforando toda la solución a 1 ml. De la cual se obtuvo la curva de calibración (**ANEXO 2.1**).

El volumen de inyección de las muestras fue de 25  $\mu\text{L}$  a un caudal de 0,6 ml / min. La fase móvil fue un sistema de disolvente binario que consiste en (A) 0.1% de ácido fosfórico y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado fue 25% B a 0 min, 28% B después de 5 min, 30% B después de 10 min, 32,8% B después de 17 min, 36% B después de 20 min y 100% B después de 22 min hasta los 25 minutos. La absorbancia UV del eluato, se registró utilizando un detector de arreglo de diodos múltiple a 210 nm, 280 nm y 360 nm. Las señales de la luteolina y quercetina fueron determinadas del cromatograma a 360 nm a los tiempos de retención del analito de 18,7 min y la quercetina de 19,4 min (**Figura 2.6**)



**Figura 2. 5.** Cromatograma HPLC-DAD del estándar de luteolina (30 ppm) con el estándar de quercetina (20 ppm)  
Fuente: San Martín, 2017

La curva de calibración se realizó con la relación de alturas de la señal de la luteolina respecto a la señal de la quercetina Vs la relación de las concentraciones de la luteolina, respecto a la quercetina. La curva elaborada (**Figura 2.7**) sigue la ecuación  $Y = 5,1991X$  ( $R^2 = 0,999$ ) observándose una buena linealidad.



**Figura 2. 6.** Curva de calibración de luteolina usando el Método HPLC de Patrón Interno  
Fuente: San Martín, 2017

### **Cuantificación de luteolina presente en las diferentes variedades de *Arachis hypogaea* (maní)**

La cantidad de luteolina fue determinada utilizando la curva de calibración descrita.

Para esto, se pesó aproximadamente de 500 a 200 mg de cada muestra, haciendo este proceso por triplicado, dejando en agitación constante con el solvente por el lapso de 4 horas, según la metodología ya establecida, y filtrando posteriormente a gravedad. El extracto obtenido fue concentrado a sequedad con ayuda de una bomba de alto vacío y pasado a viales de HPLC que ya contenían el patrón interno, previa disolución con 1 mL de metanol grado HPLC y separación fina de impurezas con filtros especiales de 0.45µm, para el análisis de HPLC.

Todas las muestras fueron analizadas por triplicado reportándose el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

### 2.3.6. Termoestabilidad

La evaluación de la termoestabilidad de los extractos obtenidos y del compuesto aislado luteolina, se realizó tomando un alícuota de 3 ml de los extractos a una concentración de 60 ppm y de la luteolina a una concentración de 5 ppm. Todos fueron sometidos a calentamiento con una termocupla por lapsos de 1, 3, 7, 24, 48 y 72 h, a 50°C, 60°C y 80°C. Después de cada lapso de tiempo se realizó un espectro de barrido UV entre 250 y 450 nm, midiéndose la absorbancia en el  $\lambda_{\text{max}}$  de 352 nm, con estos datos luego se realizó la gráfica de Absorbancia Vs Tiempo que muestra la termoestabilidad de la luteolina (**Apartado 2.4.5. Termoestabilidad**).

### 2.3.7. Evaluación de Actividad farmacológica de luteolina

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos y compuestos se realizó en colaboración con la Dra. Marcela Melgarejo del IIQ, donde, se utilizó dos métodos de ensayos de inhibición de radicales libres, el método DPPH que es el más rápido, simple y es el de menor costo en comparación con otros modelos. Y el ensayo de decoloración ABTS<sup>•+</sup> que se puede aplicar a antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos (Alam *et al.*, 2012).



Además, se realizó la determinación de polifenoles totales empleando el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, determinación también directamente relacionada al efecto antioxidante inhibidor de radicales libre (Magalhães *et al.*, 2008; Prior *et al.*, 2005). Metodologías ya descritas en el **Apartado 1.3.9 Evaluación de la Actividad Antioxidante (Parte I)**

Por otro lado la evaluación de la actividad antiinflamatoria de la luteolina se realizó en colaboración del Instituto IIFB perteneciente a la Universidad Mayor de San Andrés, dirigido por el Dr. Eduardo Gonzales. Donde, mediante la modulación de las sustancias que median el proceso inflamatorio como las prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT) y citoquinas proinflamatorias como la interleucina (IL) y el factor tumoral alfa (TNF- ) en macrófagos expuestos a extractos o compuestos puros obtenidos de la especie de *B. latifolia*, se determinó la actividad antiinflamatoria *in vitro*.

Numerosos estudios señalan la importancia del reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio para realizar estudios de actividad antiinflamatoria. Sin embargo, una rápida respuesta requiere células centinelas estacionadas en los tejidos. Los macrófagos y especialmente los mastocitos, cumplen tal función, los mastocitos sintetizan rápidamente metabolitos bioactivos de ácido araquidónico, prostaglandinas y leucotrienos. Los mastocitos perivascuales responden a los neuropéptidos liberados por las terminaciones nerviosas dañadas y estimuladas, liberando histamina, triptasa, TNF- preformados, eicosanoides (prostaglandinas inflamatorias, tromboxanos y leucotrienos), citoquinas proinflamatorias (favorecen la inflamación, siendo prototípicas IL-1, IL-6 y TNF- ) y quimioquinas neoformadas. Donde la histamina, eicosanoides y triptasas causan vasodilatación y extravasación responsables del calor o rubor inflamatorios y del tumor o edema inflamatorio, respectivamente (García, 2008).

Concretamente, se realizó la evaluación de la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de macrófagos, la producción de Interleucina 6 (IL-6) por ELISA, TNF- por ELISA, Leucotrieno C4 por ELISA y Prostaglandina E2 mediante el ensayo de EIA, de los extractos y compuestos seleccionados de *B. latifolia*. (Abad, *et al.*, 2006)

## 2.4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 2.4.1. Material vegetal

El material vegetal para este estudio, son cáscaras de maní, subproducto generado en el proceso de beneficiado del maní, que corresponde aproximadamente al 35% de su peso. Considerando que Bolivia tiene una producción aproximada de 26.000 Tn/año, la cantidad anual que se genera de este subproducto es de aproximadamente 9.000 Tn/año, residuos que en su mayor parte no se utilizan.

Estudios previos de cáscaras de maní demostraron que tiene como metabolito mayoritario luteolina (Qiu, *et al.*, 2012; Win, *et al.*, 2011), un flavonoide de diversas propiedades farmacológicas (Seelinger, *et al.*, 2008; Perez-Garcia, *et al.*, 2000; Xagorari, *et al.* 2001 y 2002; Ueda, *et al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2004; Kim, & Jobin, 2005; Kimata, *et al.*, 2000; Fleeer, & Verspohl, 2007; Hong, *et al.*, 2014; Ueda, *et al.*, 2003; Hu, *et al.*, 1994).), por lo que este estudio está centrado en la cuantificación de luteolina en diversos cultivares de maní de Bolivia y en la evaluación farmacológica de extractos enriquecidos en este compuesto, así como del compuesto mismo, con el objetivo de determinar un potencial producto fitoterapéutico a partir de cáscaras de cultivares de maní de Bolivia con alto contenido de luteolina.

Para esto, se estableció colaboración con dos institutos del departamento de Chuquisaca, el Instituto de Agroecología y Seguridad Alimentaria de la Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca (BIORENA, USFX), y el Instituto Superior Tecnológico Agroindustrial de Monteagudo (ISTAM), quienes proporcionaron las muestras de los cultivares no procesados para este estudio, los cuales provienen de centros del Chaco chuquisaqueño con alta diversidad de maní (**Figura 2.8**).



**Figura 2. 7.** Regiones de mayor producción de maní en Bolivia  
Fuente: Proagro Bolivia, 2016

**Tabla 2. 2.** Muestras de diferentes cultivares obtenidas de las regiones de mayor producción de Bolivia.

No	Nombre Común del Cultivar	Nombre científico	Lugar de Colecta
<b>Provincia Azurduy (Chuquisaca)</b>			
1	Mani arbolito	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Kanalla
<b>Provincia Hernando Siles (Chuquisaca)</b>			
2	Colorado de Azero Norte	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Azero Norte.
3	Tubito Bayo	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Bartolo
4	Tubito colorado	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Candua.
5	Coloradito chiquitano	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	El Bañado.
6	Maní colorado	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	El Zapallar.
7	Overo pecho blanco	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Monteagudo.
8	Patillo	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Monteagudo.
9	Chaucha oclliri	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Monteagudo.
10	Caspeado	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Monteagudo.
11	Pico y loro	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Monteagudo.
12	Carmino	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Monteagudo.
13	Yungueño	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Monteagudo.
14	Colorado Roldana	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Roldana.
<b>Provincia Luis Manuel Calvo (Chuquisaca)</b>			
15	Colorado de Iboperenda	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Cerrillos.
16	Chiquitano Coloradito	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Sauce Mayu.
17	Colorado	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Sauce Mayu.
18	Guano de Oveja	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Sauce Mayu.
19	Overo Bola	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Sauce Mayu.
<b>Provincia San Pablo de Huacareta (Chuquisaca)</b>			
20	Overo Bola	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Atirimbía.
21	Colorado Ingre	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Rosario del Ingre.
22	Overo Guarayo	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Rosario del Ingre.
<b>Provincia Tomina (Chuquisaca)</b>			
23	Oclliri colorado	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	El Villar.
24	Colorado de Iboperenda	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Padilla.
25	Guano de oveja	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Padilla.
26	Oscó	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Padilla.
27	Phiti cintura ladrillo	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Padilla.
28	Lastha Oclliri	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Pili Pili.
29	Pili-Pili	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Pili Pili.
30	Chaucha roja	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Tiyumayu.
31	Chaucha blanca	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Tiyumayu.
32	Fusilero	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Tiyumayu.
33	Mani blanco	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Tiyumayu.
34	Larguillo	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	Villa Alcalá.
<b>Provincia Jose Ballivian (Beni)</b>			
35	Blanco Paradito	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Carmen Florida.
36	Coloradito Paradito	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>fastigiata</i>	Carmen Florida.
<b>Provincia de Yamparaez (Potosí)</b>			
37	Phiti cintura colorado	<i>Arachis hypogaea</i> subsp. <i>hypogaea</i>	Oronqota.
<b>Muestras de los diferentes mercados de Sucre</b>			
38	Larguillo Icla (Sin tostar)	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	
39	Larguillo Icla (Tostado)	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	
40	Overo (Sin tostar)	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	
41	Overo (Tostado)	<i>Arachis hypogaea</i> subsp <i>hypogaea</i>	

La **Tabla 2.2** muestra que la mayor parte de las muestras corresponden a la subespecie *Arachis hypogaea* subsp *hypogaea* y provienen de las provincias Tomina y Hernando Siles del Departamento de Chuquisaca

#### 2.4.2. Obtención de extractos

Mediante el proceso de maceración con EtOH, descrito anteriormente, se procedió a obtener los extractos con sus respectivos rendimientos (**Figura 2.9**).



**Figura 2. 8.** Extracto etanólico de cáscaras de maní  
Fuente: Chui, 2016

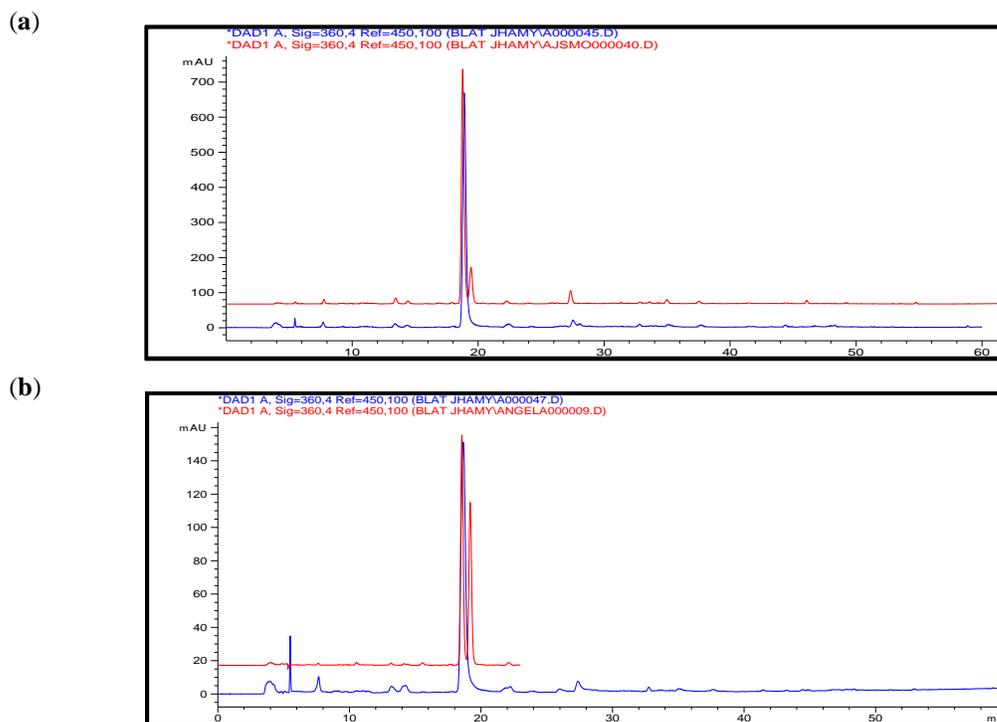
**Tabla 2. 3.** Rendimiento del extracto EtOH respecto a la materia seca, de cultivares de maní de Bolivia.

No	Nombre Común del Cultivar	Rendimiento extracto (%)	No	Nombre Común del Cultivar	Rendimiento extracto (%)
<b>Provincia Azurduy (Chuquisaca)</b>			<b>Provincia Tomina (Chuquisaca)</b>		
1	Maní arbolito	3,160	23	Oclliri colorado	1,325
<b>Provincia Hernando Siles (Chuquisaca)</b>			24	Colorado de Iboperenda	
2	Colorado de Azero Norte	1,038	25	Guano de oveja	1,715
3	Tubito Bayo	0,791	26	Oscos	1,625
4	Tubito colorado	0,616	27	Phiti cintura ladrillo	0,564
5	Coloradito chiquitano	1,487	28	Lastha Oclliri	1,306
6	Maní colorado	1,470	29	Pili-Pili	1,248
7	Overo pecho blanco	2,033	30	Chaucha roja	1,411
8	Patillo	1,346	31	Chaucha blanca	1,538
9	Chaucha oclliri	1,236	32	Fusilero	0,863
10	Caspeado	3,750	33	Mani blanco	1,853
11	Pico y loro	1,192	34	Larguillo	5,117
12	Carmino	2,243	<b>Provincia Jose Ballivian (Beni)</b>		
13	Yungueño	2,565	35	Blanco Paradito	0,767
14	Colorado Roldana	0,889	36	Coloradito Paradito	1,001
<b>Provincia Luis Manuel Calvo (Chuquisaca)</b>			<b>Provincia de Yamparaez (Potosí)</b>		
15	Colorado de Iboperenda	0,707	37	Phiti cintura colorado	0,844
16	Chiquitano Coloradito	0,526	<b>Muestras de los diferentes mercados de Sucre</b>		
17	Colorado	0,235	38	Larguillo Icla (Sin tostar)	1,101
18	Guano de Oveja	1,030	39	Larguillo Icla (Tostado)	2,366
19	Overo Bola	1,862	40	Overo (Sin tostar)	0,901
20	Overo Bola	0,834	41	Overo (Tostado)	1,906
21	Colorado Ingre	2,914			
22	Overo Guarayo	4,097			

Como se puede observar en la **Tabla 2.3** las muestras 34 larguillo, 22 overo guarayo y 10 caspeado, son las que muestran mejor rendimiento con 5,117%, 4,097% y 3,750% respectivamente. Y las muestras con menor rendimiento son la 17 colorado y 16 chiquitano coloradito con rendimientos del 0,235% y 0,526%.

### 2.4.3. Cuantificación de luteolina por HPLC

Para la cuantificación de luteolina se eligió un método con patrón interno, porque de acuerdo a varios autores es mejor que el método con patrón externo, ya que compensa errores de manipulación como en pesada de pequeñas cantidades y evaporación de solvente, además que la relación de altura o área entre el analito y el patrón interno por este método se mantiene constante. (Snyder, *et al.*, 2010). La quercetina fue seleccionada como patrón interno porque su tiempo de retención es cercano al de la luteolina pero ambas señales se distinguen (**Figura 2.6**), dando una curva de calibración ( $y = 5,199x$ ) con alta linealidad ( $R^2 = 0.999$ ) al graficar la relación de alturas de la señal de la luteolina respecto a la señal de la quercetina Vs la relación de las concentraciones de la luteolina respecto a la quercetina. Además, la quercetina es estable, no es reactiva en las condiciones de experimentación, tiene una estructura similar y por lo tanto de comportamiento equivalente a la del analito, y no está presente en las muestras de cáscara de maní, como se puede observar en la **Figura 2.10**. Por lo tanto, cumple con todos los requisitos para ser un patrón interno (Snyder, *et al.*, 2010)



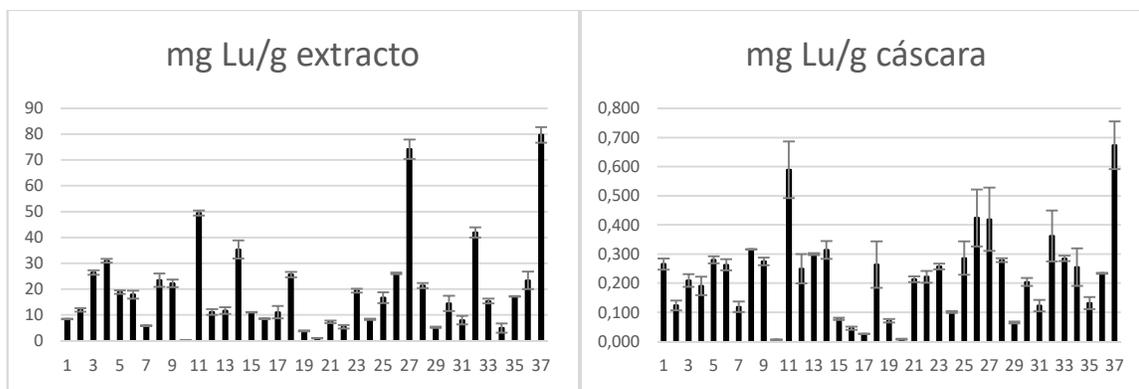
**Figura 2. 9.** Cromatogramas de 2 muestras de cáscaras de maní: (a) Tubito Bayo y (b) Chiquitano Coloradito; usando el método desarrollado HPLC-DAD con patrón interno y sin patrón interno.

Fuente: San Martín, 2017

El contenido de luteolina fue evaluado en los diferentes cultivares en estudio (**Tabla 2.4 y Figura 2.11**)

**Tabla 2. 4.** Contenido de luteolina en cáscaras y extractos de los diferentes cultivares de maní no procesados de Bolivia

No	Nombre Cultivar	Común del Lugar de Colecta	de Rendimiento extracto (%)	mg Lu/g extracto	mg Lu/g cáscaras
<b>Provincia Azurduy (Chuquisaca)</b>					
1	Maní arbolito	Kanalla	3,16	8,41 ± 0,10	0,27 ± 0,019
<b>Provincia Hernando Siles (Chuquisaca)</b>					
2	Colorado de Azero Norte	Azero Norte.	1,04	11,94 ± 0,62	0,12 ± 0,02
3	Tubito Bayo	Bartolo	0,79	26,41 ± 0,86	0,21 ± 0,02
4	Tubito colorado	Candua.	0,62	31,00 ± 0,76	0,19 ± 0,03
5	Coloradito chiquitano	El Bañado.	1,49	18,83 ± 0,69	0,28 ± 0,01
6	Maní colorado	El Zapallar.	1,47	17,89 ± 1,56	0,26 ± 0,02
7	Overo pecho blanco	Monteagudo.	2,03	5,85 ± 0,13	0,12 ± 0,02
8	Patillo	Monteagudo.	1,35	23,48 ± 2,60	0,32 ± 0,001
9	Chaucha oclliri	Monteagudo.	1,24	22,24 ± 1,45	0,28 ± 0,01
10	Caspeado	Monteagudo.	3,75	0,16 ± 0,05	0,01 ± 0,001
11	Pico y loro	Monteagudo.	1,19	49,43 ± 0,99	0,59 ± 0,10
12	Carmino	Monteagudo.	2,24	11,14 ± 1,13	0,25 ± 0,05
13	Yungueño	Monteagudo.	2,56	11,70 ± 1,34	0,30 ± 0,003
14	Colorado Roldana	Roldana.	0,89	35,32 ± 3,51	0,31 ± 0,03
<b>Provincia Luis Manuel Calvo (Chuquisaca)</b>					
15	Colorado de Iboperenda	Cerrillos.	0,71	11,03 ± 0,14	0,08 ± 0,004
16	Chiquitano Coloradito	Sauce Mayu.	0,53	8,56 ± 0,12	0,04 ± 0,005
17	Colorado	Sauce Mayu.	0,24	11,06 ± 2,42	0,03 ± 0,001
18	Guano de Oveja	Sauce Mayu.	1,03	25,63 ± 0,99	0,26 ± 0,08
19	Overo Bola	Sauce Mayu.	1,86	3,81 ± 0,16	0,07 ± 0,01
<b>Provincia San Pablo de Huacareta (Chuquisaca)</b>					
20	Overo Bola	Atirimbia.	0,83	0,96 ± 0,05	0,01 ± 0,002
21	Colorado Ingre	Rosario del Ingre.	2,91	7,34 ± 0,51	0,21 ± 0,010
22	Overo Guarayo	Rosario del Ingre.	4,10	5,42 ± 0,64	0,22 ± 0,020
<b>Provincia Tomina (Chuquisaca)</b>					
23	Oclliri colorado	El Villar.	1,32	19,40 ± 0,74	0,26 ± 0,01
24	Colorado de Iboperenda	Padilla.	1,21	8,34 ± 0,28	0,10 ± 0,003
25	Guano de oveja	Padilla.	1,72	16,67 ± 2,08	0,29 ± 0,06
26	Osco	Padilla.	1,62	26,09 ± 0,34	0,42 ± 0,10
27	Phiti cintura ladrillo	Padilla.	0,56	74,19 ± 3,75	0,42 ± 0,11
28	Lastha Oclliri	Pili Pili.	1,31	21,36 ± 0,98	0,28 ± 0,01
29	Pili-Pili	Pili Pili.	1,25	5,21 ± 0,25	0,06 ± 0,003
30	Chaucha roja	T'iyumayu.	1,41	14,46 ± 2,97	0,20 ± 0,01
31	Chaucha blanca	T'iyumayu.	1,54	8,00 ± 1,65	0,12 ± 0,02
32	Fusilero	T'iyumayu.	0,86	41,93 ± 1,96	0,36 ± 0,09
33	Mani blanco	T'iyumayu.	1,85	15,38 ± 0,88	0,28 ± 0,01
34	Larguillo	Villa Alcalá.	5,12	4,98 ± 1,78	0,26 ± 0,06
<b>Provincia Jose Ballivian (Beni)</b>					
35	Blanco Paradito	Carmen Florida.	0,77	17,21 ± 0,09	0,13 ± 0,02
36	Coloradito Paradito	Carmen Florida.	1,00	23,39 ± 3,41	0,23 ± 0,002
<b>Provincia de Yamparaez (Potosí)</b>					
37	Phiti cintura colorado	Oronqota.	0,84	79,73 ± 3,04	0,67 ± 0,08



**Figura 2. 10.** Contenido de luteolina en extractos y cáscaras de los diferentes cultivares de maní no procesados  
Fuente: Elaboración propia

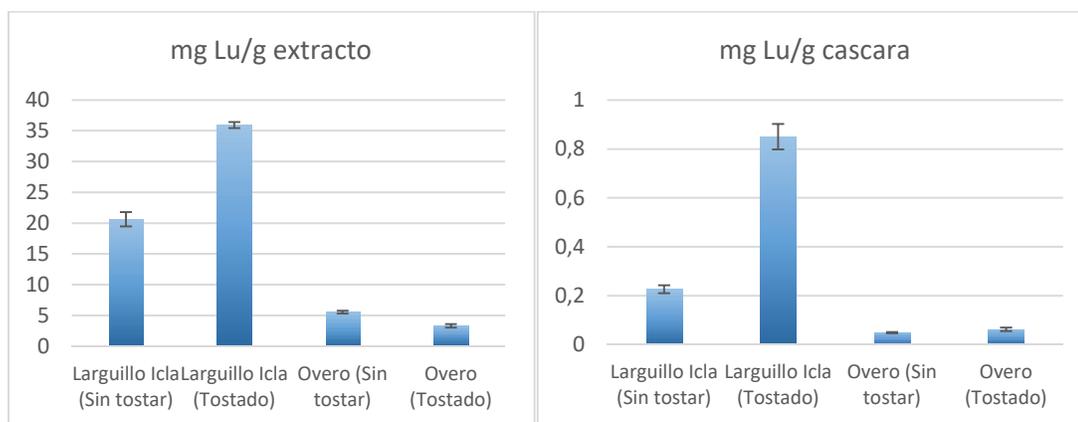
resultados muestran que las cáscaras y extractos con mayor contenido de luteolina pertenecen a los cultivares “phiti cintura colorado” de Oronqota, Potosí ( $0,67 \pm 0,08$  mg Lu/g de cáscara;  $79,73 \pm 3,04$  mg Lu/g de extracto), “pico y loro” de Monteagudo, Chuquisaca ( $0,59 \pm 0,10$ mg Lu/g de cáscara;  $49,43 \pm 0,99$  mg Lu/g de extracto) y “phiti cintura ladrillo” de Padilla, Chuquisaca ( $0,42 \pm 0,11$  mg Lu/g de cáscara;  $74,19 \pm 3,75$  mg Lu/g de extracto), por lo que se sugiere que de estos cultivares se hagan estudios más profundos para el desarrollo de potenciales suplementos para la salud en base a sus cáscaras. Por otra parte, es importante observar que la desviación estándar, en la cuantificación de luteolina en extractos y cáscaras, en algunos casos es elevada, errores atribuibles principalmente a errores manuales en el pesado de muestras.

Adicionalmente, se realizó un estudio preliminar de muestras procesadas (tostadas) y no procesadas (sin tostar) ofrecidas en los mercados de la ciudad de Sucre para determinar el efecto del proceso de tostado en el contenido de luteolina. Los resultados muestran que las cáscaras tostadas del cultivar conocido como Larguillo de Icla tienen un alto contenido de luteolina ( $0,85 \pm 0,05$  mg Lu/g de cáscara) mayor al determinado en las muestras sin procesar, siendo este similar a otros reportados en bibliografía que están en el rango de 0,55 a 4,48 mg/g de cascara de maní (Yen, & Duh, 1995; Qiu, *et al.*, 2012; Win, *et al.*, 2011b; Radhakrishnan, *et al.*, 2013). (Tabla 2.5 y Figura 2.12).

Estos resultados sugieren que la luteolina es estable a las temperaturas de tostado (80°C, según informantes del mercado), lo que posteriormente se comprobó con estudios de termoestabilidad, y que la concentración de luteolina se incrementa por la pérdida de agua y otros en el proceso de tostado. Por tanto, se podrían utilizar cáscaras tostadas (principal forma en la que se encuentran estos residuos) para la obtención de extractos ERL o luteolina pura.

**Tabla 2. 5.** Contenido de luteolina en cultivares procesados y sin procesar del mercado de Sucre

No	Nombre Común del Cultivar	Rendimiento extracto (%)	mg Lu/g extracto	mg cáscaras	Lu/g
38	Larguillo Icla (Sin tostar)	1,10	20,62 ± 1,17	0,23 ± 0,02	
39	Larguillo Icla (Tostado)	2,37	35,93 ± 0,47	0,85 ± 0,05	
40	Overo (Sin tostar)	0,90	5,55 ± 0,24	0,05 ± 0,003	
41	Overo (Tostado)	1,90	3,31 ± 0,29	0,06 ± 0,01	



**Figura 2. 11.** Luteolina en extractos y cáscaras de cultivares procesados y no procesados del mercado de Sucre  
Fuente: Elaboración propia

Es importante mencionar, que estudios previos mostraron que no sólo la luteolina pura tiene propiedades farmacológicas, sino también los extractos metanólicos de cáscaras de maní, los cuales además de luteolina tienen otros compuestos de carácter fenólico como la 5,7-dihidroxicromona, el eriodictol y la 3',4',7-trihidroxi flavanona (Wee, *et al.*, 2007). La extracción que se realizó en este trabajo fue con EtOH, otro alcohol de propiedades similares a las del MeOH pero menos tóxico, por lo que es probable que los extractos etanólicos también presenten propiedades antioxidantes y antiinflamatorias (Yen, & Duh,

1995; Win, *et al.*, 2011b) debido a la presencia de compuestos fenólicos, así como propiedades antimutagénicas reportadas previamente para los extractos metanólicos, los cuales se los puede obtener fácilmente (Yen, & Duh, 1996). Además, para fines de uso como suplemento para la salud, es importante mencionar que tanto la luteolina como los extractos metanólicos se absorben desde el intestino detectándose en el suero humano (Shimoi, *et al.*, 1998), por lo que pueden ser utilizados en suplementos de administración oral (Ueda, *et al.*, 2002).

#### 2.4.4. Aislamiento e identificación de luteolina

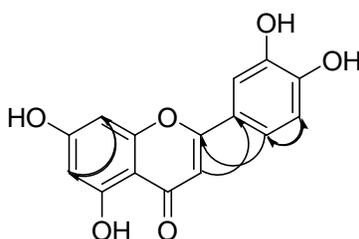
Para someter al compuesto puro luteolina a estudios farmacológicos y de termoestabilidad se realizó su aislamiento partiendo del extracto etanólico de uno de los cultivares que presento mayor concentración del compuesto, Larguillo Icla tostado. Se pesó 1 g de extracto etanólico, el cual se lo disolvió en MeOH y se pasó por un “cadrige” (DPA-6S) para separar algunas impurezas, después de este proceso se obtuvo 329,5 mg del extracto tratado, que se sembró en una columna Sephadex LH-20 obteniéndose 5 fracciones, entre las cuales mediante técnicas de re-cristalización se logró aislar 29,2 mg de luteolina pura de la última fracción (**Figura 2.13**).



H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5%    FeCl<sub>3</sub> al 3%

**Figura 2. 12.** Placas TLC del proceso de aislamiento de luteolina  
Fuente: San Martín, 2017

Para confirmar su identificación se realizaron espectros de RMN de 1D y 2D (**ANEXO 2.2**) obteniéndose los resultados de la **Tabla 2.6**, que confirmaron la estructura propuesta.



**Tabla 2. 6.** Datos de RMN 1D y 2D de luteolina aislada de la cascara de maní.

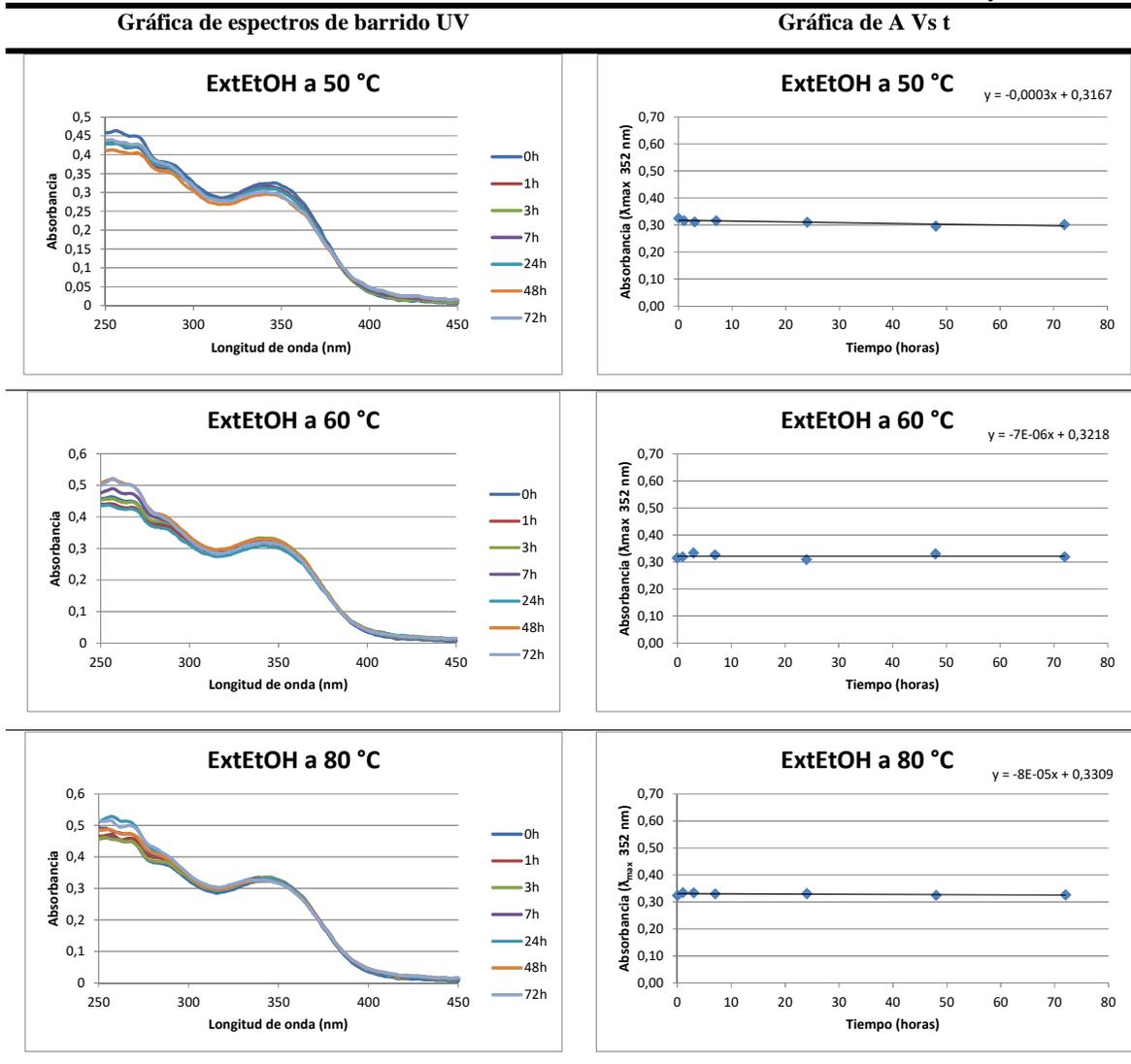
No.	Cexp	CBib *	HSQC [ppm]	<sup>1</sup> H [ppm]	<sup>1</sup> H-COSY	HMBC
2	164.6	<b>165.1</b>				
3	103.3	<b>103.9</b>	H-3	6.67 <i>s</i>		C-2, C-4, C-10, C-1'
4	182.1	<b>182.6</b>				
5	161.9	<b>161.6</b>	OH-5			
6	99.2	<b>99.9</b>	H-6	6.18 <i>br.s</i>	H-8	C-5, C-7, C-8, C-10
7	164.3	<b>164.3</b>	OH-7			
8	94.3	<b>94.9</b>	H-8	6.43 <i>br.s</i>	H-6	C-6, C-7, C-9, C-10
9	157.7	<b>158.2</b>				
10	104.1	<b>104.8</b>				
1'	121.9	<b>123.1</b>				
2'	113.8	<b>114.4</b>	H-2'	7.39 <i>d</i> (1.5)		C-3', C-4', C-6'
3'	146.2	<b>146.0</b>				
4'	150.1	<b>149.8</b>				
5'	116.4	<b>117.0</b>	H-5'	6.88 <i>d</i> (8.1)	H-6'	C-1', C-3', C-4'
6'	119.4	<b>120.1</b>	H-6'	7.43 <i>dd</i> (8.1; 1.5)	H-5'	C-2, C-2', C-4'

En DMSO, RMN de 300 MHz Avance II (Bruker), en ppm, J en Hz; \* Markham, et al., 1978

#### 2.4.5. Termoestabilidad

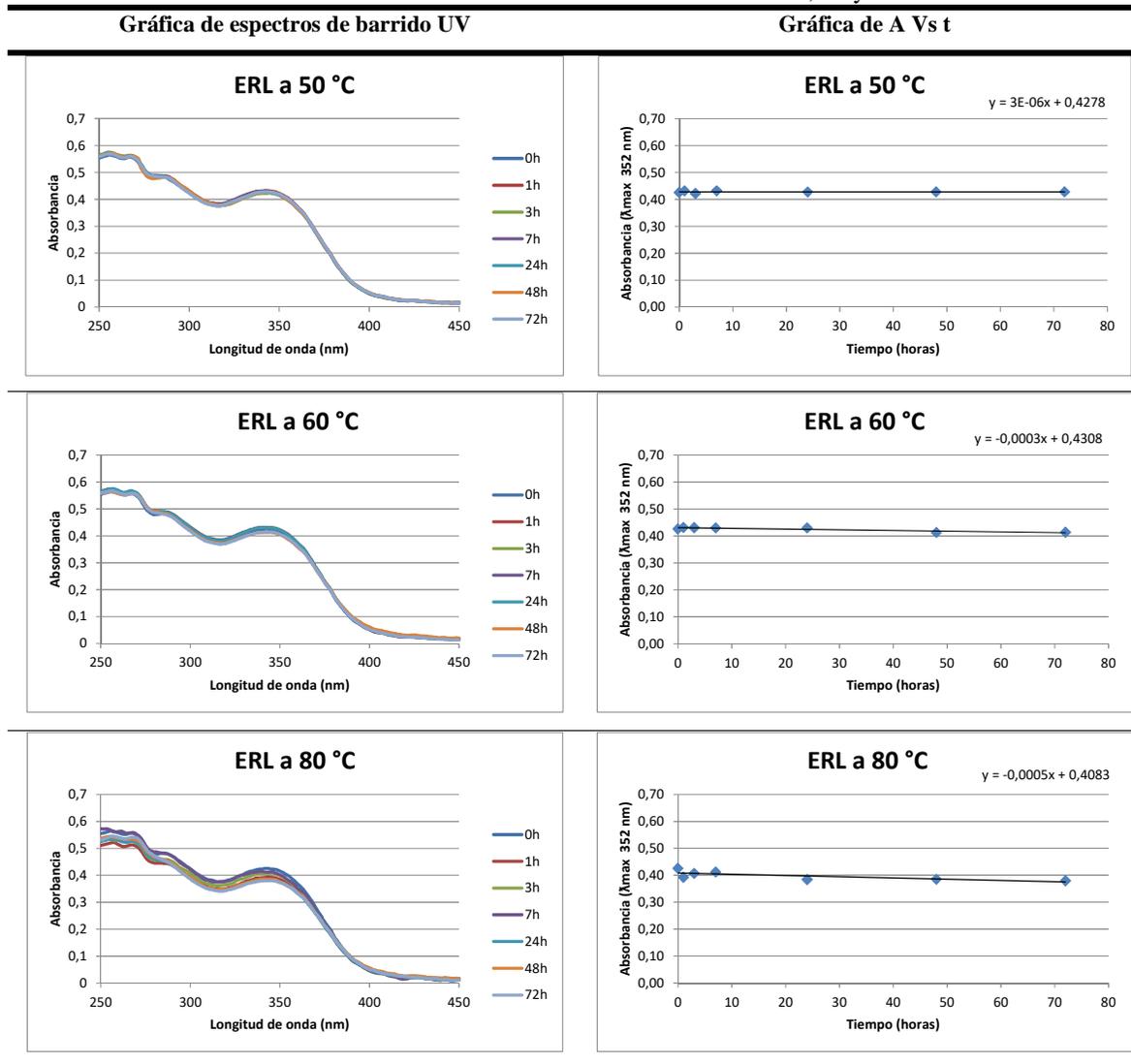
Para la determinación de la termoestabilidad se sometió soluciones de los extractos y de la luteolina pura a calentamiento con termocuplas a 50, 60 y 80 °C por determinados periodos de tiempos (1, 3, 7, 24, 48 y 72 h) (Tablas 2.7, 2.8 y 2.9), llevando la solución después de cada periodo a análisis por espectroscopía UV, donde se obtuvo los espectros de absorción de 250 a 450 nm y se midió la absorbancia al max de 352 nm, para hacer el estudio de termoestabilidad

**Tabla 2. 7.** Gráficas del estudio de termoestabilidad de los extractos etanólicos a 50, 60 y 80 °C.



Los estudios de termoestabilidad del extracto etanólico muestran que el extracto es estable hasta los 80°C ya que no muestra variaciones significativas en la absorbancia UV durante las 72 h evaluadas.

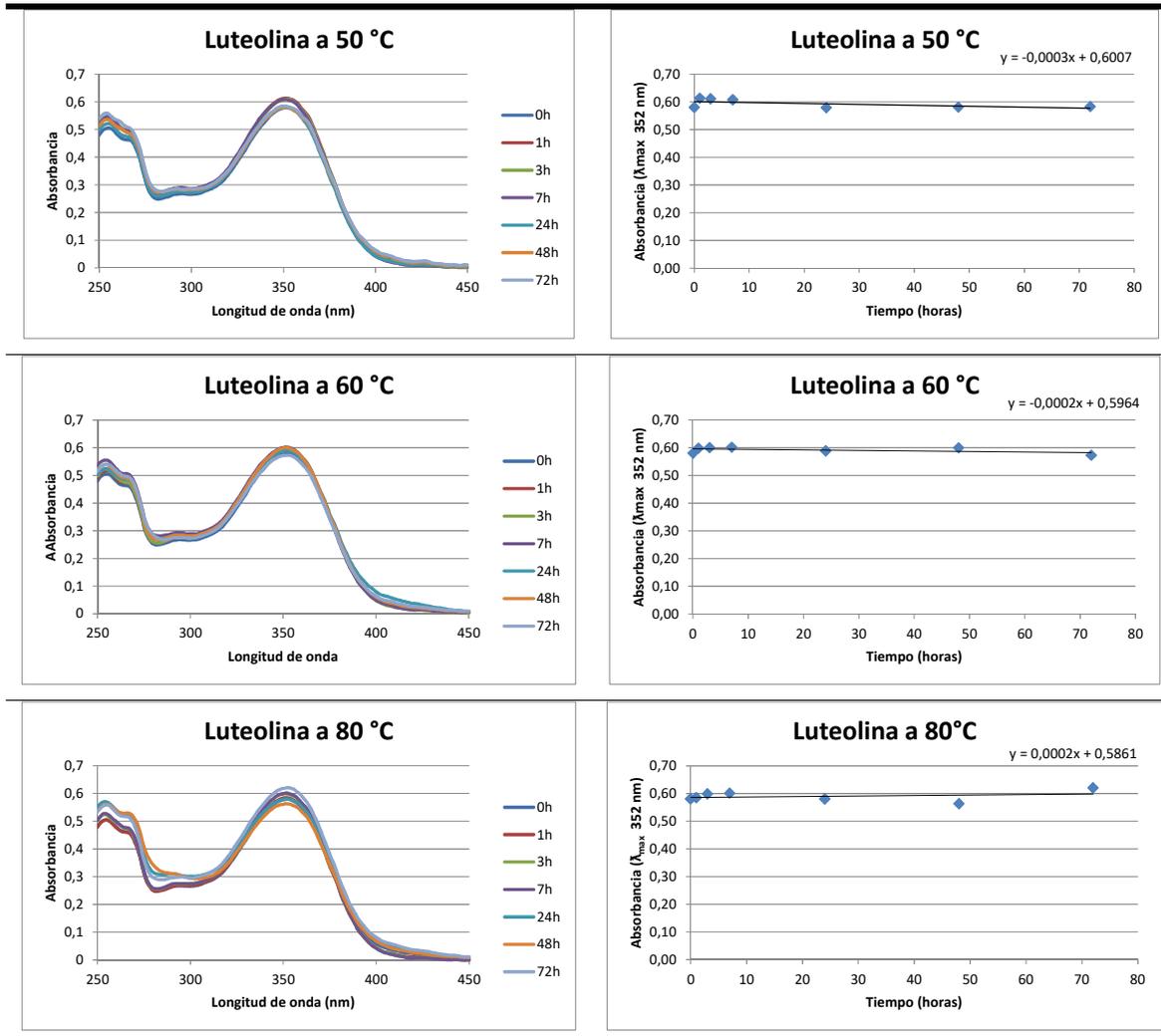
**Tabla 2.8.** Gráficas del estudio de termoestabilidad de los ERL a 50, 60 y 80 °C.



De la misma manera, la **Tabla 2.8** muestra que los Extractos Ricos en Luteolina (ERL), son estables hasta los 80°C y finalmente, la **Tabla 2.9** muestra que la luteolina pura, es termoestable entre 50 y 80°C durante los tres días de estudio.

2.9. Gráficas del estudio de termoestabilidad de la luteolina a 50, 60 y 80 °C.

Termoestabilidad de la luteolina a 50 °C, 60 °C y 80 °C



Por tanto, los resultados de termoestabilidad, muestran que tanto los extractos como el compuesto aislado, a los diferentes tiempos y temperaturas evaluados (50, 60 y 80°C), son termoestables, por lo que se puede concluir que la luteolina, es termoestable a la temperatura de tostado 80 °C, este resultado es concordante con otros estudios previamente realizados con este compuesto (Fischer, *et al.*, 2011; Murakami, *et al.*, 2004). Por lo tanto, el proceso de tostado no afecta al compuesto, y se pueden utilizar las cáscaras de maní tostado generadas como residuos en diferentes lugares de Bolivia, para obtener luteolina o Extractos Ricos en Luteolina (ERL).

## 2.4.6. Evaluación de Actividad farmacológica de luteolina

### Actividad Antioxidante

Se realizó el análisis de inhibición de radicales libres mediante los métodos ABTS y DPPH de los extractos obtenidos y del compuesto luteolina, además de la cuantificación de fenoles totales por medio del método Folin-Ciocalteu obteniéndose los siguientes resultados:

**Tabla 2. 10.** Determinación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos y la luteolina

Muestra	ABTS (mmol Q/g)	DPPH 1/IC50	FC (mgQ/g)
<b>Quercetina como estándar</b>		4.46	
Extracto etanólico cascara de maní	0.27	0.37	17.57
ERL	0.39	0.49	38.29
Luteolina	1.91	3.60	78.76

En la **Tabla 2.10** se muestran los resultados de la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos obtenidos y de la luteolina, como se puede observar la actividad antioxidante se incrementa en el ERL respecto al extracto etanólico, por lo tanto se puede decir que el proceso de desengrasado mejora la actividad antiradicalaria, probablemente por el incremento de luteolina. Esto es concordante, con el hecho de que la actividad se incrementa mucho más en el compuesto aislado, luteolina, lo que confirma su actividad antioxidante ya reportada anteriormente por varios grupos (Cai, Q. Y., *et al.*, 1997; Seelinger G., *et al.*, 2008). Por tanto, tanto los extractos obtenidos como el compuesto puro tienen una potencial aplicación como productos antioxidantes.

### Actividad Antiinflamatoria

La luteolina, tiene varios antecedentes como agente antiinflamatorio, en el presente estudio se hizo una evaluación frente a los mediadores pro-inflamatorios evaluando la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de macrófagos, la producción de Interleucina 6 (IL-6) por ELISA, TNF- $\alpha$  por ELISA, Leucotrieno C4 por ELISA y Prostaglandina E2 mediante el ensayo de EIA, donde se determinó que la luteolina presenta una actividad inhibitoria significativa tanto frente al agente pro-inflamatorio NO, como frente a los mediadores de procesos inflamatorios LC-4 y PG-2, mientras que para los mediadores IL-6, TNF- $\alpha$  no

presenta actividad significativa, como se puede observar en los resultados ya expuestos para *B. latifolia*, en el **Apartado 1.8.9. Evaluación de la Actividad antiinflamatoria.**

Los resultados obtenidos fueron comparados con análisis antiinflamatorios, anteriormente realizados, determinando que la luteolina es activa frente al agente pro-inflamatorio NO y frente al mediador de inflamación PG-2 (Kim, *et al.*, 2006; Choi, 2007), mientras que para los mediadores de inflamación LC-4, IL-6 y TNF- $\alpha$ , se sugiere realizar nuevos ensayos, ya que los resultados comparados con datos bibliográficos no son consistentes (Seelinger, *et al.*, 2008; Comalada, *et al.*, 2006; Hirano, *et al.*, 2004; Hougee, *et al.*, 2005)

Estos resultados muestran concordancia con los análisis de la relación estructura-actividad donde se determinó que cuatro hidroxilaciones en las posiciones 5, 7, 3' y 4', junto con el doble enlace en C2-C3 y la posición del anillo B en 2, parecen ser necesarias para que los flavonoides posean un efecto antiinflamatorio (Seelinger, *et al.*, 2008). Por lo que tanto el compuesto puro, como los ERL, presentan una potencial aplicación en productos de carácter antiinflamatorio.

## 2.5. CONCLUSIONES

- J Se ha obtenido extractos etanolicos con luteolina de cáscaras 41 cultivares de mani proporcionados por los Institutos IASA e ISTAM, además de 4 muestras obtenidas de los diferentes mercados de Sucre
- J Se realizó el análisis cuantitativo de luteolina en los 41 cultivares de mani, determinándose que las cáscaras y extractos con mayor contenido de luteolina pertenecen a los cultivares “phiti cintura colorado” de Oronqota, Potosí ( $0,67 \pm 0,08$  mg Lu/g de cáscara;  $79,73 \pm 3,04$  mg Lu/g de extracto), “pico y loro” de Monteagudo, Chuquisaca ( $0,59 \pm 0,10$  mg Lu/g de cáscara;  $49,43 \pm 0,99$  mg Lu/g de extracto) y “phiti cintura ladrillo” de Padilla, Chuquisaca ( $0,42 \pm 0,11$  mg Lu/g de cáscara;  $74,19 \pm 3,75$  mg Lu/g de extracto).
- J Por otra parte, se realizó un estudio preliminar de muestras procesadas (tostadas) y no procesadas (sin tostar) ofrecidas en los mercados de la ciudad de Sucre, el que nos mostró que las cáscaras tostadas del cultivar conocido como Larguillo de Icla

tienen un alto contenido de luteolina ( $0,85 \pm 0,05$  mg Lu/g de cáscara), mayor al determinado en las muestras sin procesar, esto puede deberse a que el proceso de tostado no afecta a la luteolina, incrementándose su concentración en la cáscara probablemente por la pérdida de agua y otros en el proceso. Por tanto, se puede utilizar cáscaras tostadas para la obtención de ERL o luteolina pura.

- J Se aisló luteolina del cultivar larguillo de Icla (tostado), con una cantidad de 29.8mg, a partir de 1g de extracto etanolico. La identificación se realizó mediante un análisis de sus datos de RMN 1D y 2D, además de la comparación de datos con un estándar de luteolina adquirido de Sigma Aldrich.
- J Los estudios de termoestabilidad fueron realizados tanto en los extractos como en el compuesto aislado, mostrando que a los diferentes tiempos y temperaturas evaluados (50, 60 y 80°C), son termoestables, por lo que se puede concluir que el compuesto aislado luteolina, es termoestable a la temperatura de tostado 80 °C, lo que corrobora la posibilidad de utilizar cáscaras tostadas en la obtención de un producto con potencial farmacológico.
- J Las actividades farmacológicas evaluadas nos muestran que tanto los extractos como el compuesto aislado, tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias. Incrementándose la actividad antiradicalaria en el extracto desengrasado (ERL) respecto al extracto EtOH y más aún en el compuesto aislado luteolina. Por lo tanto el compuesto puro, como los ERL, obtenidos de la cascara de maní, muestran ser bases potenciales para la elaboración de productos con actividad antioxidante y antiinflamatoria.

## 2.6. RECOMENDACIONES

- J Según los resultados obtenidos se sugiere utilizar las cáscaras de maní tostado generadas como residuos en diferentes lugares de Bolivia, para obtener luteolina o ERL, para su uso como potencial producto farmacológico con actividad antioxidante y antiinflamatoria.
- J Se recomienda realizar diferentes formulaciones experimentales con luteolina o extractos ricos en luteolina, así como las evaluaciones de toxicidad y actividad

farmacológica de las mismas, para su uso como potencial producto farmacológico con actividad antioxidante y antiinflamatoria.

- J) Se sugiere someter al ERL y al compuesto aislado a otras pruebas de actividad biológica, con el fin de obtener mayor información de sus beneficios medicinales.

## 2.7. BIBLIOGRAFIA

- ✓ Chen, C. Y., Peng, W. H., Tsai, K. D., & Hsu, S. L. (2007). Luteolin suppresses inflammation-associated gene expression by blocking NF- B and AP-1 activation pathway in mouse alveolar macrophages. *Life sciences*, 81(23), 1602-1614.
- ✓ Chen, R. S., Wu, P. L., & Chiou, R. Y. Y. (2002). Peanut roots as a source of resveratrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1665-1667.
- ✓ Chin, Y. W., Kong, J. Y., & Han, S. Y. (2013). Flavonoids as receptor tyrosine kinase FLT3 inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 23(6), 1768-1770.
- ✓ Choi, E. M. (2007). Modulatory effects of luteolin on osteoblastic function and inflammatory mediators in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Cell biology international*, 31(9), 870-877.
- ✓ Chowdhury, A. R., Sharma, S., Mandal, S., Goswami, A., Mukhopadhyay, S., & Majumder, H. K. (2002). Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I. *Biochemical Journal*, 366(2), 653-661.
- ✓ Chung, I. M., Park, M. R., Chun, J. C., & Yun, S. J. (2003). Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science*, 164(1), 103-109.
- ✓ Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Sanchez de Medina, F., & Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. *Biochemical pharmacology*, 72(8), 1010-1021.
- ✓ Condori, J., Sivakumar, G., Hubstenberger, J., Dolan, M. C., Sobolev, V. S., & Medina-Bolivar, F. (2010). Induced biosynthesis of resveratrol and the prenylated

- stilbenoids arachidin-1 and arachidin-3 in hairy root cultures of peanut: Effects of culture medium and growth stage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 310-318.
- ✓ Dudareva, N., & Pichersky, E. (2000). Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant physiology*, 122(3), 627-634
  - ✓ Fischer, F., Zufferey, E., Bourgeois, J. M., Héritier, J., & Micaux, F. (2011). UV-ABC screens of luteolin derivatives compared to edelweiss extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103(1), 8-15.
  - ✓ Fleer, H., & Verspohl, E. J. (2007). Antispasmodic activity of an extract from *Plantago lanceolata* L. and some isolated compounds. *Phytomedicine*, 14(6), 409-415.
  - ✓ Hammons, R. O. (1994). The origin and history of the groundnut. In *The Groundnut Crop* (pp. 24-42). Springer Netherlands.
  - ✓ Hirano, T., Higa, S., Arimitsu, J., Naka, T., Shima, Y., Ohshima, S., Fujimoto, M., Yamadori, T., Kawase, I. & Tanaka, T. (2004). Flavonoids such as Luteolin, Fisetin and Apigenin Are Inhibitors of Interleukin-4 and Interleukin-13 Production by Activated Human Basophils. *International archives of allergy and immunology*, 134(2), 135-140.
  - ✓ Hong, Z., Cao, X., Li, N., Zhang, Y., Lan, L., Zhou, Y., Pan, X., Shen, L., Yin, Z., & Luo, L. (2014). Luteolin is effective in the non small cell lung cancer model with L858R/T790M EGF receptor mutation and erlotinib resistance. *British journal of pharmacology*, 171(11), 2842-2853.
  - ✓ Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraishi, T., Nakata, S., Wakada, M., Nakanishi, R., Nishino, H., Matsui, H., & Sakai, T. (2005). Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells. *Oncogene*, 24(48), 7180.
  - ✓ Hougee, S., Sanders, A., Faber, J., Graus, Y. M., van den Berg, W. B., Garssen, J., Smit, H. F. & Hoijer, M. A. (2005). Decreased pro-inflammatory cytokine production by LPS-stimulated PBMC upon in vitro incubation with the flavonoids apigenin, luteolin or chrysin, due to selective elimination of monocytes/macrophages. *Biochemical pharmacology*, 69(2), 241-248.

- ✓ Hu, C. Q., Chen, K. E., Shi, Q., Kilkuskie, R. E., Cheng, Y. C., & Lee, K. H. (1994). Anti-aids agents, 10. Acacetin-7-O- -D-galactopyranoside, an anti-HIV principle from *Chrysanthemum morifolium* and a structure-activity correlation with some related flavonoids. *Journal of natural products*, 57(1), 42-51.
- ✓ INE (2017) <http://www.ine.gov.bo/index.php/estadisticas-por-actividad-economica/industria-manufacturera-y-comercio-4>
- ✓ Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(13), 1222-1239.
- ✓ Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of pharmacological sciences*, 96(3), 229-245.
- ✓ Kim, J. S., & Jobin, C. (2005). The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide induced NF  $\kappa$ B signalling and gene expression by blocking I  $\kappa$ B kinase activity in intestinal epithelial cells and bone marrow derived dendritic cells. *Immunology*, 115(3), 375-387.
- ✓ Kim, J. S., Lee, H. J., Lee, M. H., Kim, J., Jin, C., & Ryu, J. H. (2006). Luteolin inhibits LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in BV-2 microglial cells. *Planta medica*, 72(01), 65-68.
- ✓ Kimata, M., Inagaki, N., & Nagai, H. (2000). Effects of luteolin and other flavonoids on IgE-mediated allergic reactions. *Planta medica*, 66(01), 25-29.
- ✓ Ko, W. G., Kang, T. H., Lee, S. J., Kim, Y. C., & Lee, B. H. (2002). Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells. *Phytotherapy Research*, 16(3), 295-298.
- ✓ Krapovickas, A. (2004). Consideraciones prehistóricas sobre el origen del maní cultivado. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Buenos Aires-Argentina. Tomo LVIII. ISSN0317-8093. Pag. 220-223
- ✓ Krapovickas, A., & Gregory, W. C. (1994). Taxonomía del género " *Arachis* (Leguminosae)". *Bonplandia*, 1-186.
- ✓ Krapovickas, A., Vanni, R. O., Pietrarelli, J. R., Williams, D. E., & Simpson, C. E. (2009). Las razas de maní de Bolivia. *Bonplandia*, 95-189.

- ✓ Ku, K. L., Chang, P. S., Cheng, Y. C., & Lien, C. Y. (2005). Production of stilbenoids from the callus of *Arachis hypogaea*: a novel source of the anticancer compound piceatannol. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 3877-3881.
- ✓ Lee, H. J., Wang, C. J., Kuo, H. C., Chou, F. P., Jean, L. F., & Tseng, T. H. (2005). Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK. *Toxicology and applied pharmacology*, 203(2), 124-131.
- ✓ Lee, S. S., Seo, S. J., Lee, B. Y., Lee, H. B., & Lee, J. (2005). Optimization for the Post-Harvest Induction of trans-Resveratrol by Soaking Treatment in Raw Peanuts. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 34(4), 567-571.
- ✓ Lin, Y., Shi, R., Wang, X., & Shen, H. M. (2008). Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy. *Current cancer drug targets*, 8(7), 634-646.
- ✓ Lopes, R. M., Agostini-Costa, T. D. S., Gimenes, M. A., & Silveira, D. (2011). Chemical composition and biological activities of *Arachis* species. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(9), 4321-4330.
- ✓ Lu, H., Hu, J., Zhang, L. X., & Tan, R. X. (1999). Bioactive constituents from *Pteris multifida*. *Planta medica*, 65(06), 586-587.
- ✓ Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A. M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S.F., Bennett, S., Dolan, M. C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.
- ✓ Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., & Atoba, T. M. (2004). Effects of thermal treatment on radical scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds. *Journal of food science*, 69(1).
- ✓ Nordeen, S. K., Bona, B. J., Jones, D. N., Lambert, J. R., & Jackson, T. A. (2013). Endocrine disrupting activities of the flavonoid nutraceuticals luteolin and quercetin. *Hormones and Cancer*, 4(5), 293-300.
- ✓ Pendse, R., Rao, A. R., & Venkataraman, K. (1973). 5, 7-Dihydroxychromone from *Arachis hypogaea* shells. *Phytochemistry*, 12(8), 2033-2034.

- ✓ Pérez-García, F., Adzet, T., & Cañigueral, S. (2000). Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free radical research*, 33(5), 661-665.
- ✓ Proagro Bolivia (2016) <http://www.proagro-bolivia.org/wp-content/uploads/2016/12/Manual-Man%C3%AD-Bolivia-PPP-Intersnack.pdf>
- ✓ Putnam DH, Oplinger ES, Teynor TM, Oelke EA, Kelling KA, Doll JD. 1991. Peanut. *Alternative Field Crops Manual*. Extraído el 09/07/2017
- ✓ Qiu, J., Chen, L., Zhu, Q., Wang, D., Wang, W., Sun, X., Liu, X., & Du, F. (2012). Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH–HPLC–DAD–TOF/MS methods. *Food chemistry*, 135(4), 2366-2371.
- ✓ Radhakrishnan, R., Pae, S. B., Lee, B. K., & Baek, I. Y. (2013). Evaluation of luteolin from shells of Korean peanut cultivars for industrial utilization. *African Journal of Biotechnology*, 12(28).
- ✓ Rudolf, J. R., & Resurreccion, A. V. (2005). Elicitation of resveratrol in peanut kernels by application of abiotic stresses. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(26), 10186-10192.
- ✓ Sales, J. M., & Resurreccion, A. V. A. (2009). Maximising resveratrol and piceid contents in UV and ultrasound treated peanuts. *Food chemistry*, 117(4), 674-680.
- ✓ Seelinger, G., Merfort, I., & Schempp, C. M. (2008). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta medica*, 74(14), 1667-1677.
- ✓ Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H., & Kinae, N. (1998). Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O glucoside in rats and humans. *FEBS letters*, 438(3), 220-224.
- ✓ Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan, J. W., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, Third edition, (2010), Hoboken, New Jersey-USA, Wiley & Sons., pp. 520-527.
- ✓ Sobolev, V. S., & Cole, R. J. (1999). trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(4), 1435-1439.

- ✓ Sobolev, V. S., Neff, S. A., & Gloer, J. B. (2008). New stilbenoids from peanut (*Arachis hypogaea*) seeds challenged by an *Aspergillus caelatus* strain. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(1), 62-68.
- ✓ Sobolev, V. S., Potter, T. L., & Horn, B. W. (2006). Prenylated stilbenes from peanut root mucilage. *Phytochemical analysis*, 17(5), 312-322.
- ✓ Sobolev, V.S., Khan, S.I., Tabanca, N., Wedge, D.E., Mainly, S.P., Cutler, S.J., Coy, M.R., Neff, S.A., Gloer, J.B. (2011). Biological activity of peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and selected natural and synthetic stilbenoids. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(5), 1673-1682.
- ✓ Ueda, H., Yamazaki, C., & Yamazaki, M. (2002). Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(9), 1197-1202.
- ✓ Ueda, H., Yamazaki, C., & Yamazaki, M. (2003). Inhibitory effect of *Perilla* leaf extract and luteolin on mouse skin tumor promotion. *Biological and pharmaceutical bulletin*, 26(4), 560-563.
- ✓ Wee, J. H., Moon, J. H., Eun, J. B., Chung, J. H., Kim, Y. G., & Park, K. H. (2007), Isolation and identification of antioxidants from peanut shells and the relationship between structure and antioxidant activity, *Food Science and Biotechnology*, 16, 116–122.
- ✓ Williams, D.E., 1989. Exploration of Amazonian Bolivia yields rare peanut landraces. *Diversity* 5(4): 12–13.
- ✓ Win, M. M., Abdul-Hamid, A., Baharin, B. S., Anwar, F., Sabu, M. C., & Pak-Dek, M. S. (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour. *Pak. J. Bot*, 43(3), 1635-1642.
- ✓ Xagorari, A., Roussos, C., & Papapetropoulos, A. (2002). Inhibition of LPS stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin. *British journal of pharmacology*, 136(7), 1058-1064.
- ✓ Yen, G. C., & Duh, P. D. (1995). Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72(9), 1065.

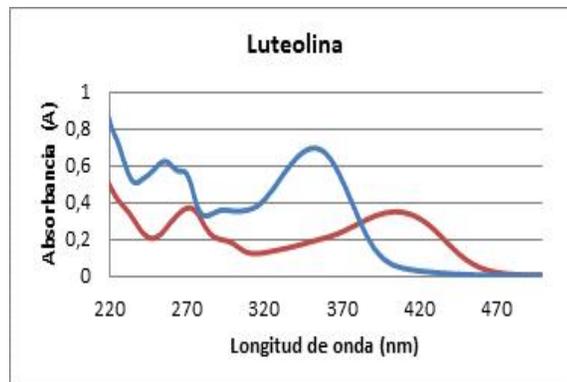
- ✓ Yen, G. C., & Duh, P. D. (1996). Antimutagenic effect of methanolic extracts from peanut hulls. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 60(10), 1698-1700

# ANEXOS

## ANEXO 1.1

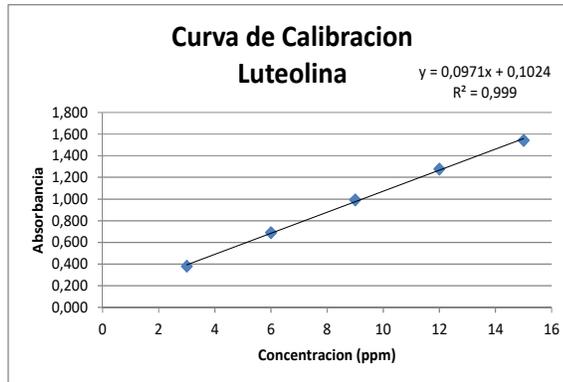
### Curva de calibración de Luteolina, para la determinación de Flavonoides Totales (FT) por quelación con $AlCl_3$

Para obtener la curva de calibración, para la estimación de cantidad de FT se preparó soluciones del estándar Luteolina a 30, 60, 90, 120 y 150 ppm, de las cuales se tomó alícuotas de 0.5 ml, añadiendo 1.5 ml de etanol 96°, 2.8ml de agua destilada, 0.1ml de cloruro de aluminio y finalmente 0.1 ml de acetato de potasio, este proceso se lo realizó por triplicado, obteniéndose así una dilución a 5 ml de los estándares añadidos, de la cual se determinó la curva de calibración a las nuevas concentraciones obtenidas de 3, 6, 9, 12 y 15 ppm, midiendo la absorbancia a  $\lambda_{max}$  406 nm, de acuerdo al espectro UV del compuesto quelado.



Concentración (ppm)	Absorbancia	SD
3	0,380	0,01
6	0,690	0,03
9	0,993	0,06
12	1,277	0,01
15	1,543	0,01

La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 0.0971X + 0.1024$  ( $R^2 = 0.999$ ) observándose una buena linealidad.



## ANEXO 1.2

### Determinación del tiempo óptimo de quelación para la cuantificación de FT

Para poder determinar el tiempo óptimo de quelación se tomó 500 mg de planta seca, a los cuales se les sometió a las pruebas descritas en el **Apartado 1.3.3. (Obtención de extractos)**, donde se obtuvieron los extractos EEBL, ERCF 1, ERCF 2, ERCF 3 y ERCF 4 (**Tabla. a**), según la prueba realizada, llevando a sequedad los extractos obtenidos, disolviéndolos en 25 ml, de donde se tomó alícuotas de 0.5 ml de cada extracto, se le añadió 1.5 ml de etanol 96°, 2.8 ml de agua destilada, 0.1 ml de cloruro de aluminio y finalmente 0.1ml de acetato de potasio, este proceso se lo realizó por quintuplicado, observándose a los 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 minutos y 1 hora y 30 minutos, controlando mediante espectroscopia UV la variación de absorbancia a  $\lambda_{max}$  406 nm en el transcurso del tiempo.

**Tabla. a.** Condiciones de las diferentes pruebas de desengrase

CONDICIONES			
Extracto	Solvente	Temperatura	Agitación
ERCF 1	Éter de petróleo 40-60 °C	Ambiente	54rpm
ERCF 2	Éter de petróleo 40-60 °C	45 °C	54rpm
ERCF 3	Éter de petróleo 60-80 °C	45 °C	54rpm
ERCF 4	Éter de petróleo 60-80 °C y agua	45 °C	54rpm

### EEBL

20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min	1 hora 30 min
0,325	0,326	0,327	0,327	0,327	0,327	0,327	0,330	0,330	0,333
0,311	0,312	0,313	0,313	0,313	0,313	0,313	0,327	0,327	0,313
0,311	0,311	0,311	0,312	0,312	0,312	0,317	0,320	0,315	0,312
0,315	0,316	0,317	0,317	0,317	0,318	0,318	0,318	0,318	0,318
0,311	0,312	0,314	0,314	0,314	0,314	0,314	0,317	0,317	0,315

### ERCF 1

20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min	1 hora 30 min
0.504	0.505	0.506	0.507	0.507	0.508	0.508	0.510	0.510	0.512
0.489	0.490	0.491	0.492	0.492	0.493	0.493	0.494	0.497	0.498
0.489	0.490	0.512	0.492	0.492	0.500	0.513	0.514	0.514	0.518
0.495	0.497	0.498	0.499	0.499	0.499	0.500	0.500	0.501	0.505
0.503	0.505	0.506	0.506	0.507	0.507	0.508	0.509	0.509	0.513

### ERCF 2

20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min	1 hora 30 min
0.517	0.521	0.520	0.523	0.523	0.523	0.523	0.524	0.525	0.528
0.517	0.497	0.520	0.522	0.522	0.522	0.522	0.524	0.525	0.528
0.501	0.505	0.509	0.509	0.509	0.509	0.508	0.510	0.510	0.510
0.501	0.508	0.509	0.509	0.509	0.510	0.510	0.512	0.512	0.513
0.492	0.496	0.496	0.500	0.500	0.500	0.500	0.501	0.501	0.502

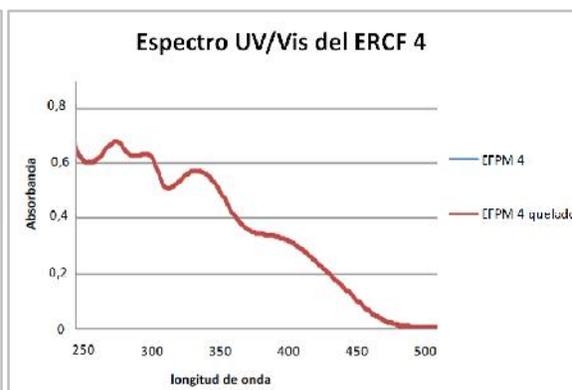
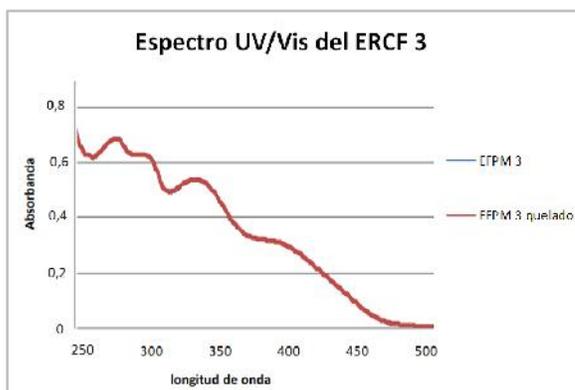
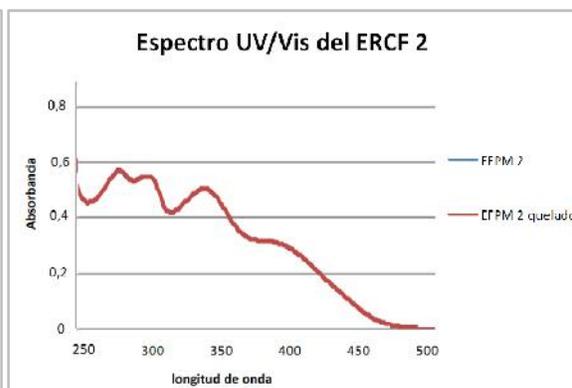
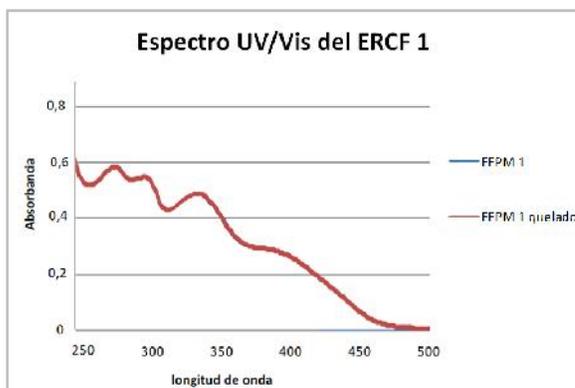
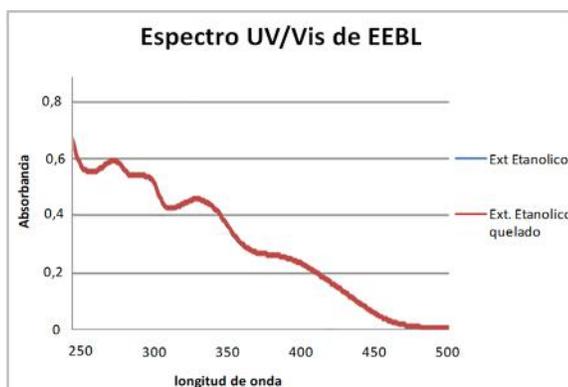
### ERCF 3

20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min	1 hora 30 min
0.493	0.494	0.495	0.496	0.496	0.497	0.497	0.498	0.498	0.502
0.478	0.480	0.481	0.482	0.482	0.483	0.483	0.484	0.498	0.486
0.479	0.480	0.481	0.482	0.482	0.483	0.484	0.484	0.485	0.486
0.471	0.473	0.474	0.475	0.475	0.475	0.476	0.476	0.477	0.479
0.476	0.478	0.479	0.480	0.481	0.481	0.482	0.482	0.482	0.485

### ERCF 4

20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min	1 hora 30 min
0.554	0.555	0.556	0.556	0.557	0.557	0.558	0.558	0.559	0.562
0.554	0.558	0.559	0.559	0.559	0.559	0.558	0.561	0.559	0.566
0.549	0.551	0.559	0.559	0.559	0.560	0.55	0.561	0.555	0.559
0.556	0.551	0.565	0.567	0.567	0.568	0.568	0.569	0.569	0.574
0.556	0.557	0.560	0.560	0.560	0.560	0.561	0.561	0.561	0.565

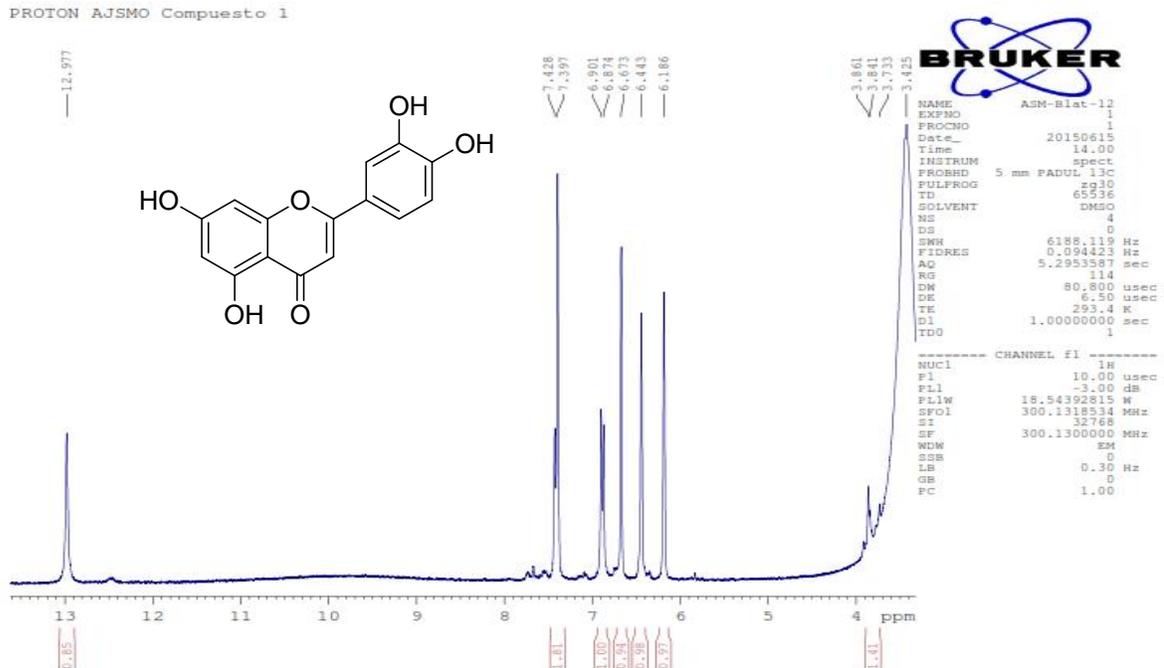
En las siguientes gráficas se observa los espectros de barrido UV/Vis del extracto etanólico EEBL y los extractos ricos en compuesto fenólicos ERCF 1, 2, 3 y 4 donde se puede observar el efecto batocrómico en la última banda en rojo que muestra un  $\lambda_{max}$  cercano a los 406 nm.



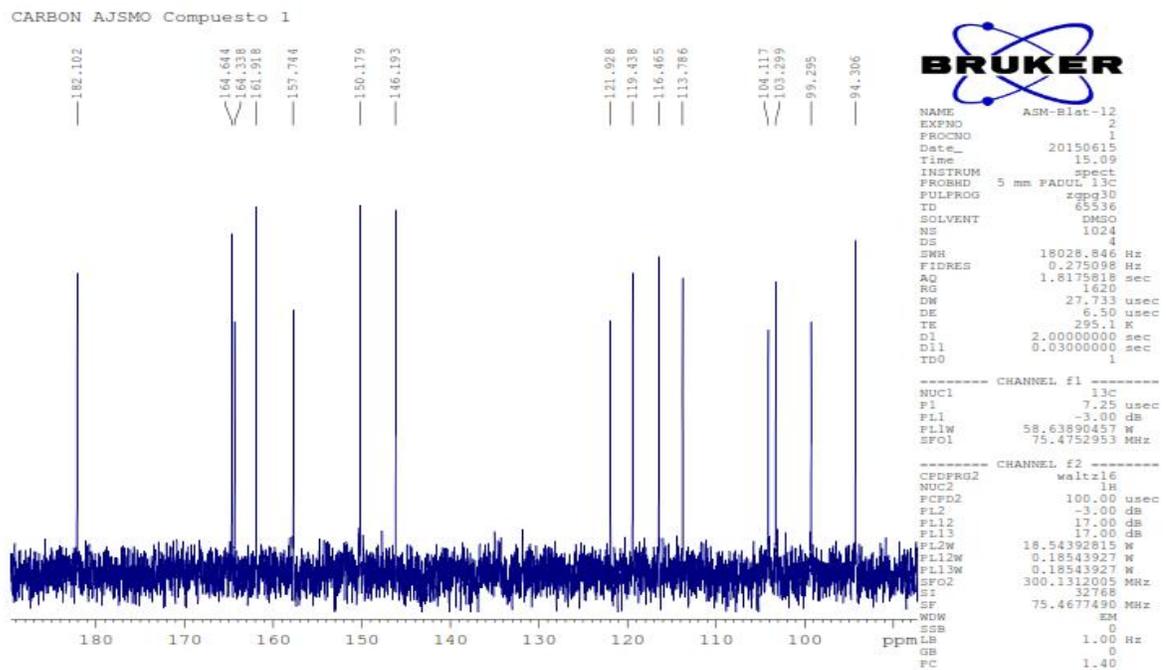
## ANEXO 1.3

### Espectros RMN de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ de los compuestos aislados

#### Espectro $^1\text{H}$ Compuesto 1

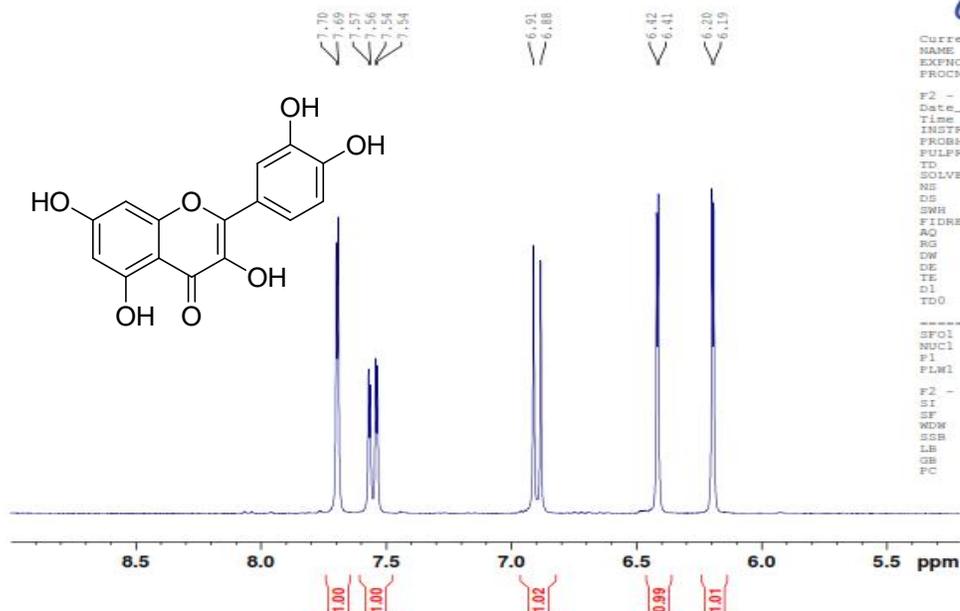


#### Espectro $^{13}\text{C}$ Compuesto 1



### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 2

PROTON AJSMO Compuesto 2



```
Current Data Parameters
NAME      AJSMO - Blat-13
EXPNO    1
PROCNO   1

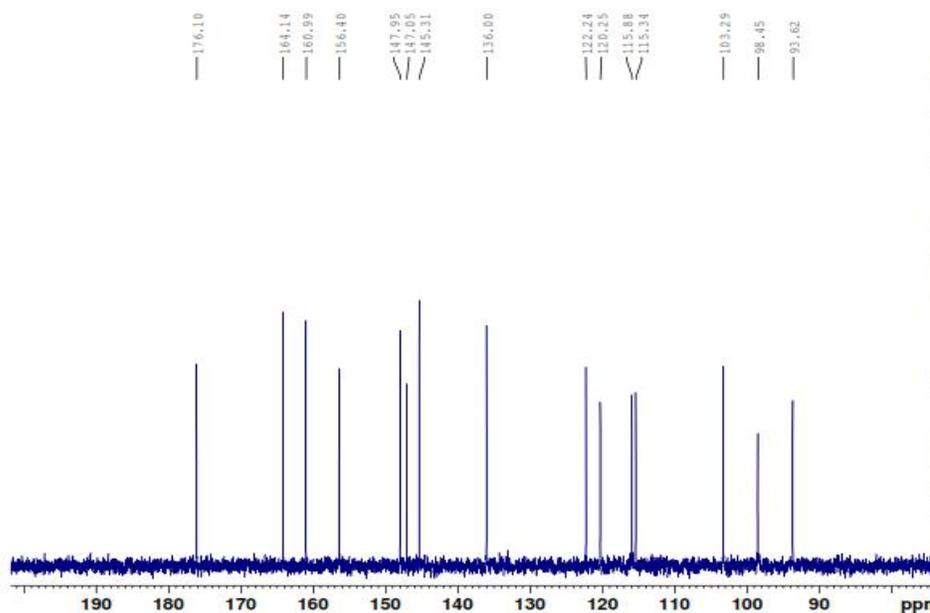
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20160601
Time     14.54
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABUL 13C
PULPROG  zg30
TD       65536
SOLVENT  DMSO
NS       16
DS       2
SWH      6009.615 Hz
FIDRES   0.091699 Hz
AQ       5.4525952 sec
RG       301
RG       301
DW       83.200 usec
DE       6.50 usec
TE       296.4 K
D1       1.0000000 sec
TD0      1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1    300.1318534 MHz
NUC1    1H
P1      10.00 usec
PLW1    19.27499962 W

F2 - Processing parameters
SI      65536
SF      300.1300000 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB      0.30 Hz
GB      0
PC      1.00
```

### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 2

CARBONO AJSMO Compuesto 2



```
Current Data Parameters
NAME      AJSMO - Blat-13
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20160601
Time     14.57
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABUL 13C
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  DMSO
NS       135
DS       4
SWH      18028.846 Hz
FIDRES   0.275098 Hz
AQ       1.8175317 sec
RG       575
RG       575
DW       27.733 usec
DE       6.50 usec
TE       296.4 K
D1       2.0000000 sec
D11      0.03000000 sec
TD0      1

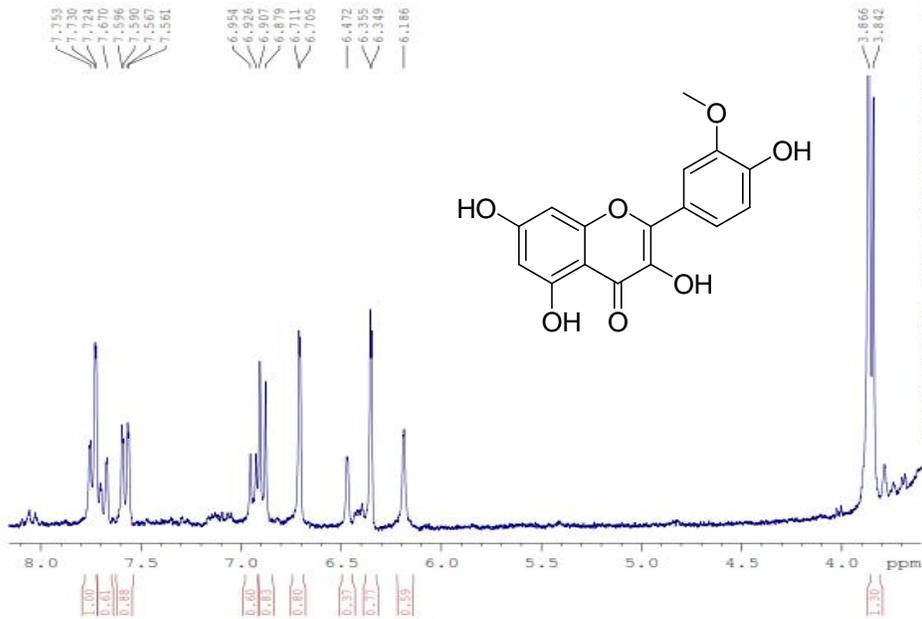
----- CHANNEL f1 -----
SFO1    75.4752949 MHz
NUC1    13C
P1      10.50 usec
PLW1    35.00000000 W

----- CHANNEL f2 -----
SFO2    300.1312005 MHz
NUC2    1H
CPCPRG2  waltz16
PCPD2   90.00 usec
PLW2    19.27499962 W
PLW12   0.23796000 W
PLW13   0.11969000 W

F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      75.4677629 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB      1.00 Hz
GB      0
PC      1.40
```

### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 3

PROTON AJSMO Compuesto 3



```

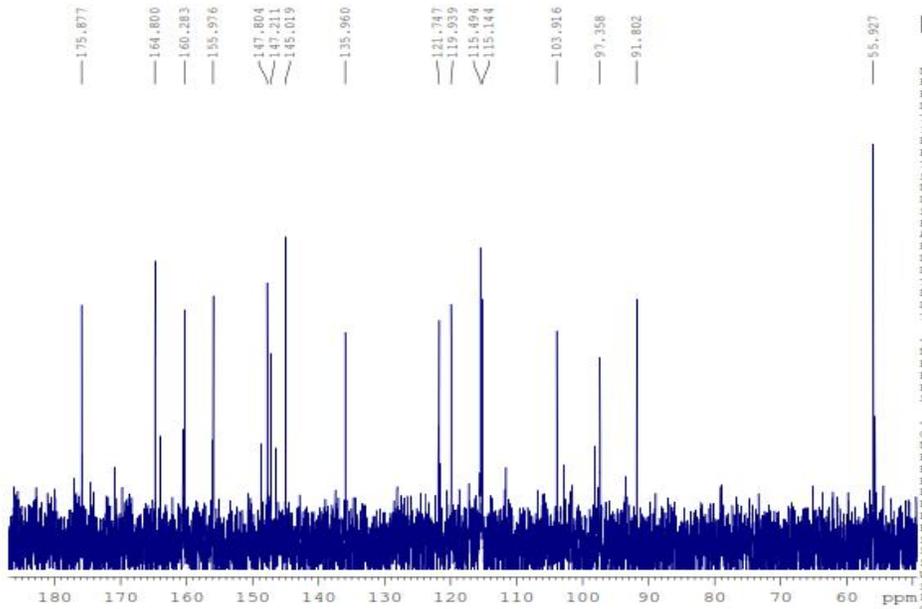
NAME ASMO-BLat-11-2016
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20160328
Time 16.04
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PADUL 13C
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 16
DS 2
SWH 6188.119 Hz
FIDRES 0.094423 Hz
AQ 5.2953587 sec
RG 328
DW 80.800 usec
DE 6.50 usec
TE 295.9 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1
    
```

```

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 13.40 usec
PL1 0.00 dB
PL1W 9.29397964 M
SFO1 300.1318534 MHz
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
FC 1.00
    
```

### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 3

CARBONO AJSMO Compuesto 3



```

NAME ASMO-BLat-11-2016
EXPNO 6
PROCNO 1
Date_ 20160401
Time 7.18
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PADUL 13C
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 12288
DS 4
SWH 18028.846 Hz
FIDRES 0.275098 Hz
AQ 1.8175818 sec
RG 812
DW 27.733 usec
DE 6.50 usec
TE 296.5 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1
    
```

```

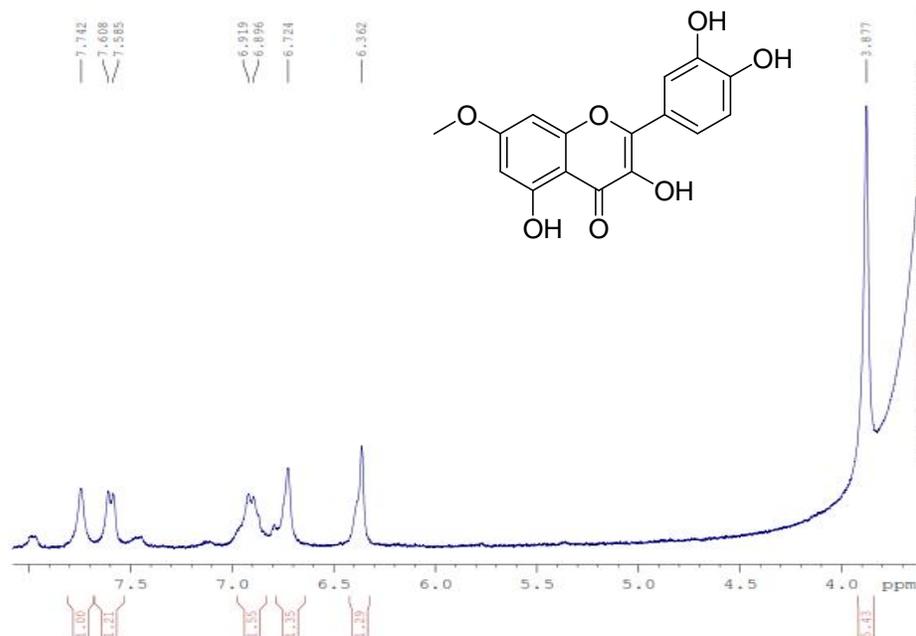
----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P1 7.25 usec
PL1 -3.00 dB
PL1W 58.63890457 M
SFO1 75.4752953 MHz
    
```

```

----- CHANNEL f2 -----
CFDPRG2 maltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 0.00 dB
PL2W 17.48 dB
PL3 18.00 dB
PL2W 9.29397964 M
PL12W 0.16680221 M
PL13W 0.14729965 M
SFO2 300.1312005 MHz
SI 32768
SF 75.4677902 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
FC 1.40
    
```

### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 4

PROTON AJSMO Compuesto 4



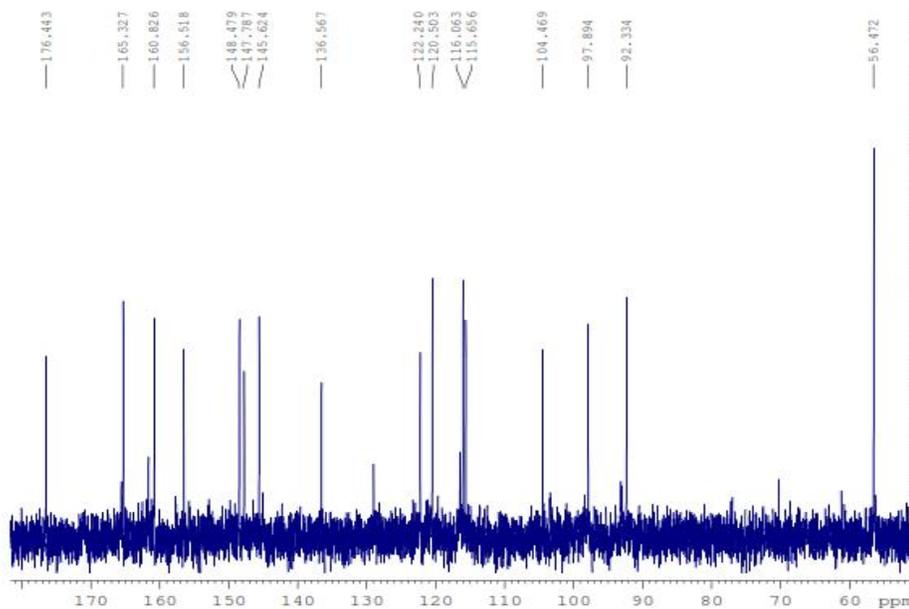
```

NAME ASM-Biat-11
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20150616
Time 9.37
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm FADUL 13C
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 4
DS 0
SWH 6188.119 Hz
FIDRES 0.094423 Hz
AQ 3.2953587 sec
RG 114
DW 80.800 usec
DE 6.50 usec
TE 290.9 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
P1 10.00 usec
PL1 -3.00 dB
PL1W 18.54392815 W
SFO1 300.1318534 MHz
SI 32768
SF 300.1300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
FC 1.00
    
```

### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 4

CARBON AJSMO Compuesto 4



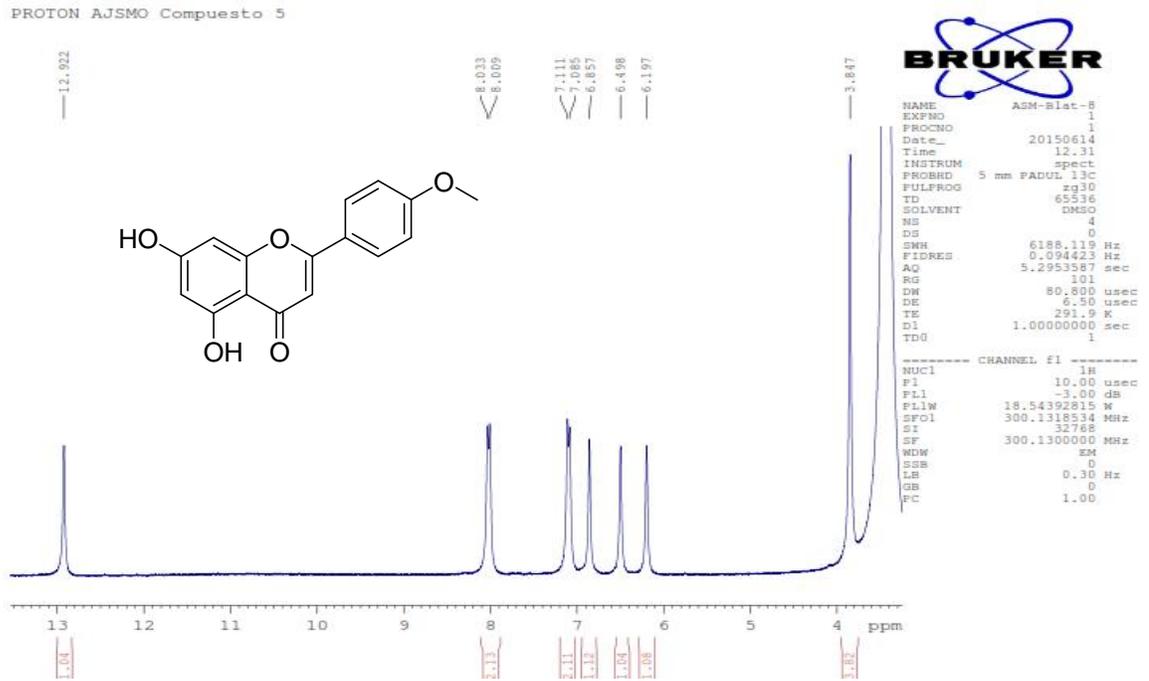
```

NAME ASM-Biat-11
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20110616
Time 22.31
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm FADUL 13C
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT DMSO
NS 7168
DS 4
SWH 18028.846 Hz
FIDRES 0.275098 Hz
AQ 1.6175818 sec
RG 2050
DW 27.733 usec
DE 6.50 usec
TE 295.1 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

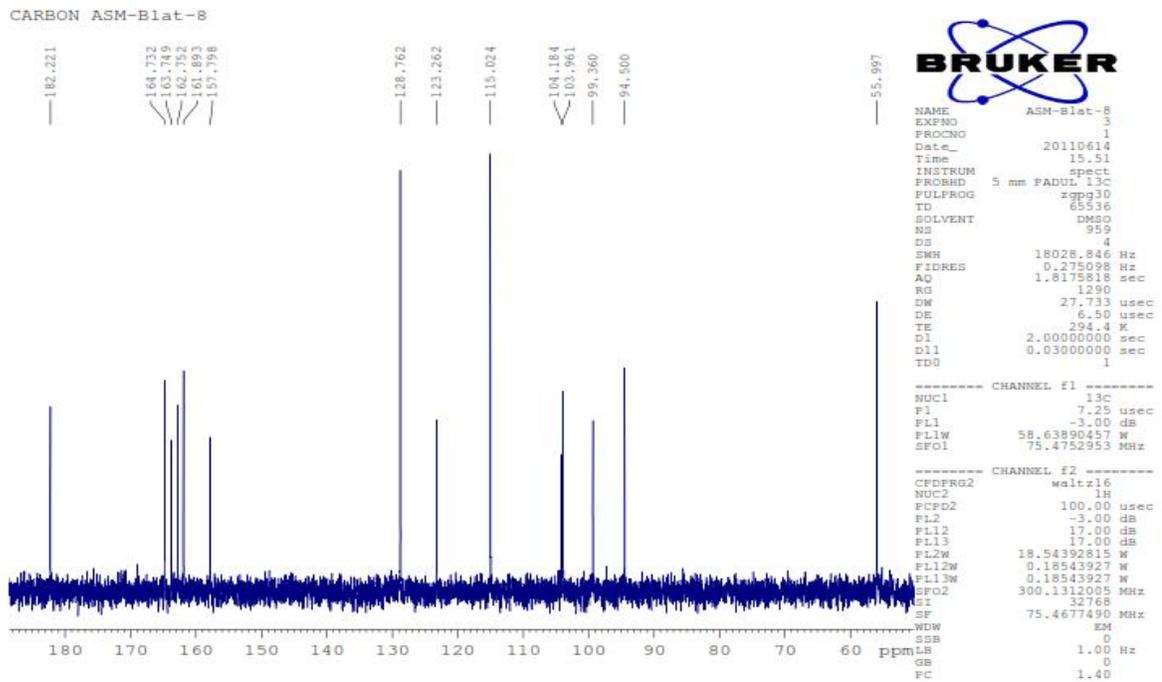
----- CHANNEL f1 -----
NUC1 13C
P1 7.25 usec
PL1 -3.00 dB
PL1W 58.63890457 W
SFO1 75.4752953 MHz

----- CHANNEL f2 -----
CFDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 100.00 usec
PL2 -3.00 dB
PL12 17.00 dB
PL13 17.00 dB
PL2W 18.54392815 W
PL12W 0.18543927 W
PL13W 0.18543927 W
SFO2 300.1312005 MHz
SI 32768
SF 75.4677490 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
FC 1.40
    
```

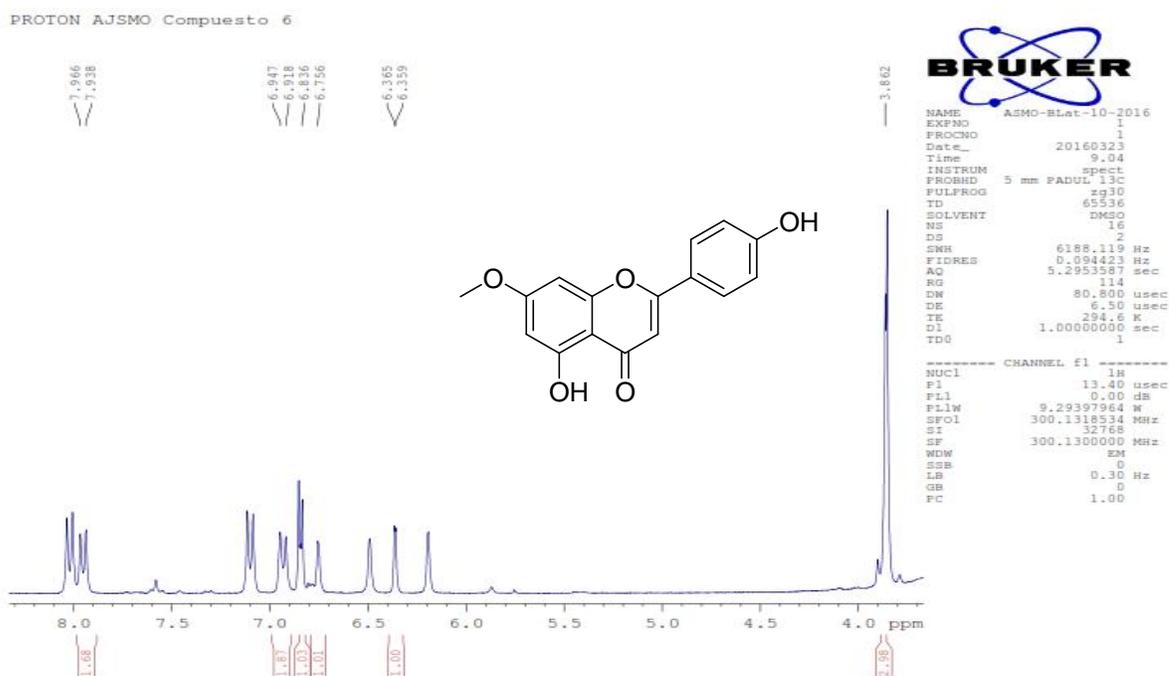
**Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 5**



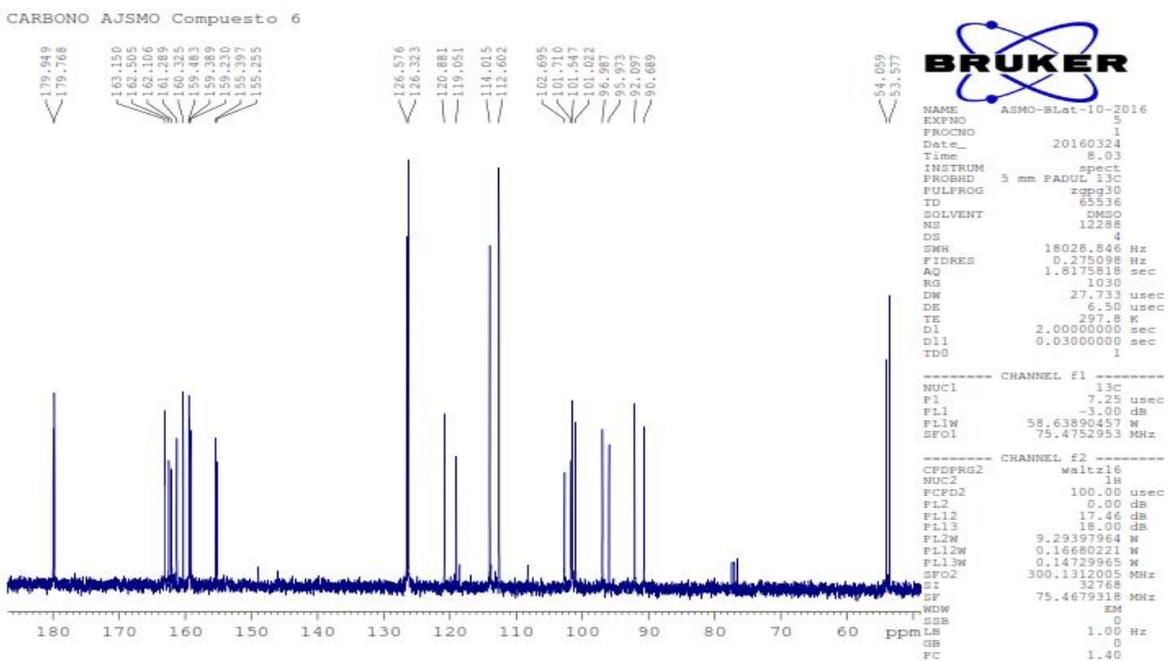
**Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 5**



### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 6

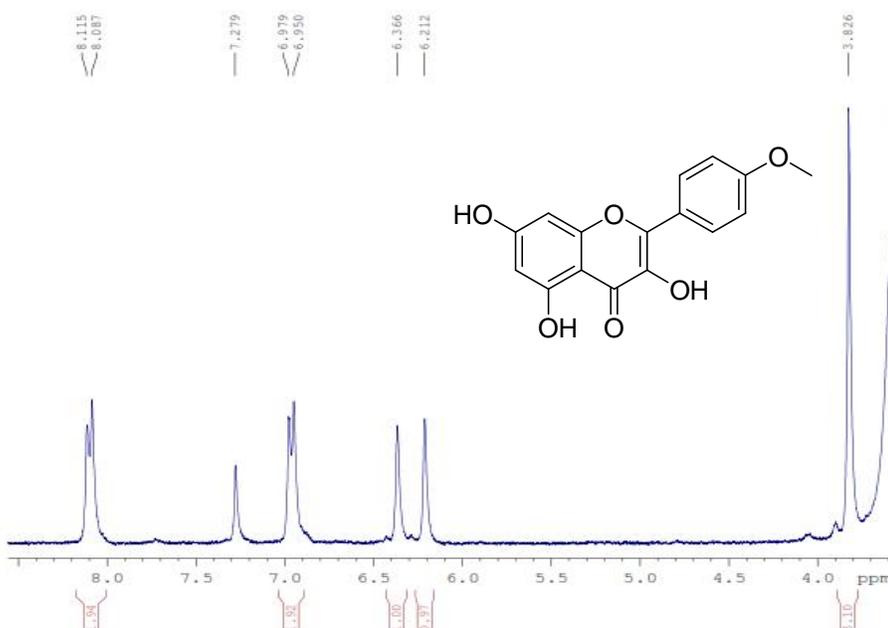


### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 6



### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 7

PROTON AJSMO Compuesto 7

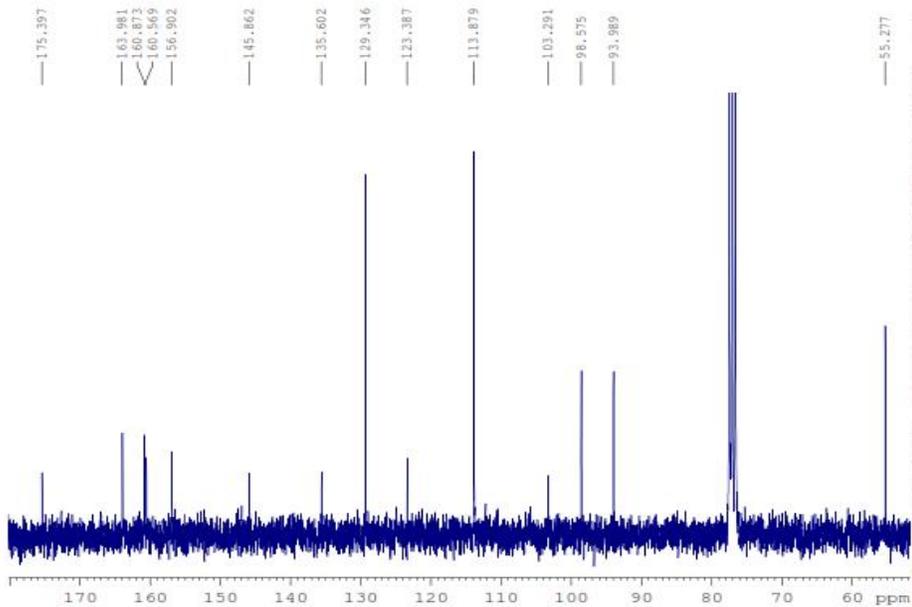


```

NAME      ASM-Blat-8-1
EXPNO     1
PROCNO    1
Date_     20150825
Time      21.05
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PADUL 13C
PULPROG   zg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         4
DS         0
SWH        6188.119 Hz
FIDRES     0.094423 Hz
AQ         5.2953587 sec
RG         257
DW         80.800 usec
DE         6.50 usec
TE         293.3 K
D1         1.0000000 sec
D11        1
TD0        1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       1H
P1         13.40 usec
PL1        0.00 dB
PL1W       9.29397964 W
SF01       300.1318534 MHz
SI         32768
SF         300.1300000 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
    
```

### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 7

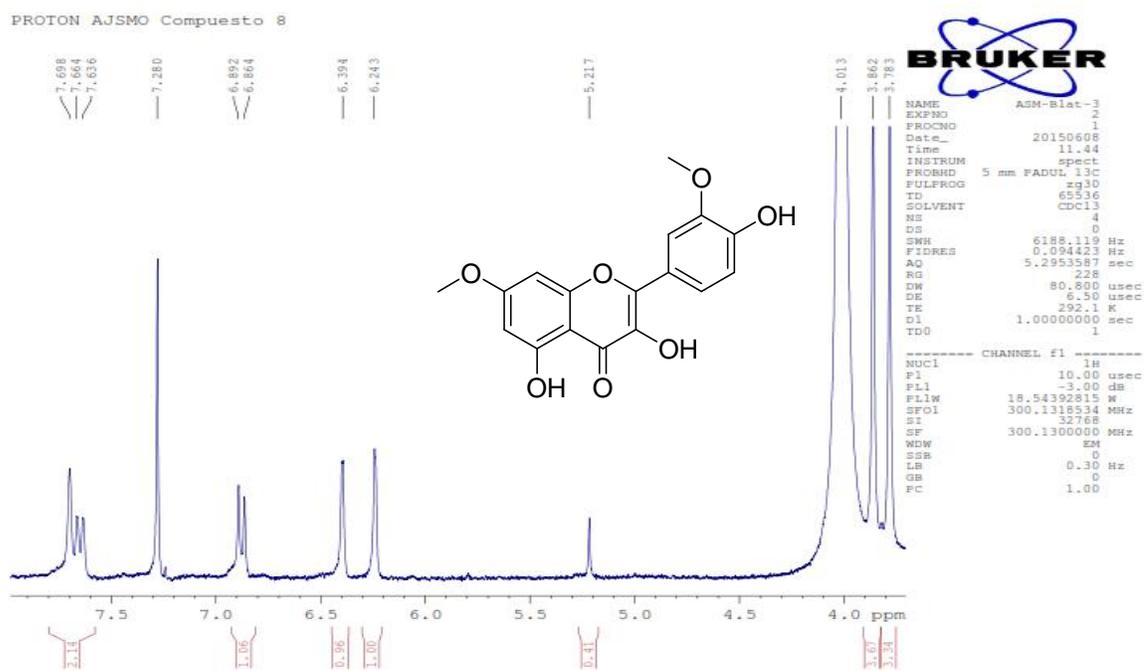
CARBONO AJSMO Compuesto 7



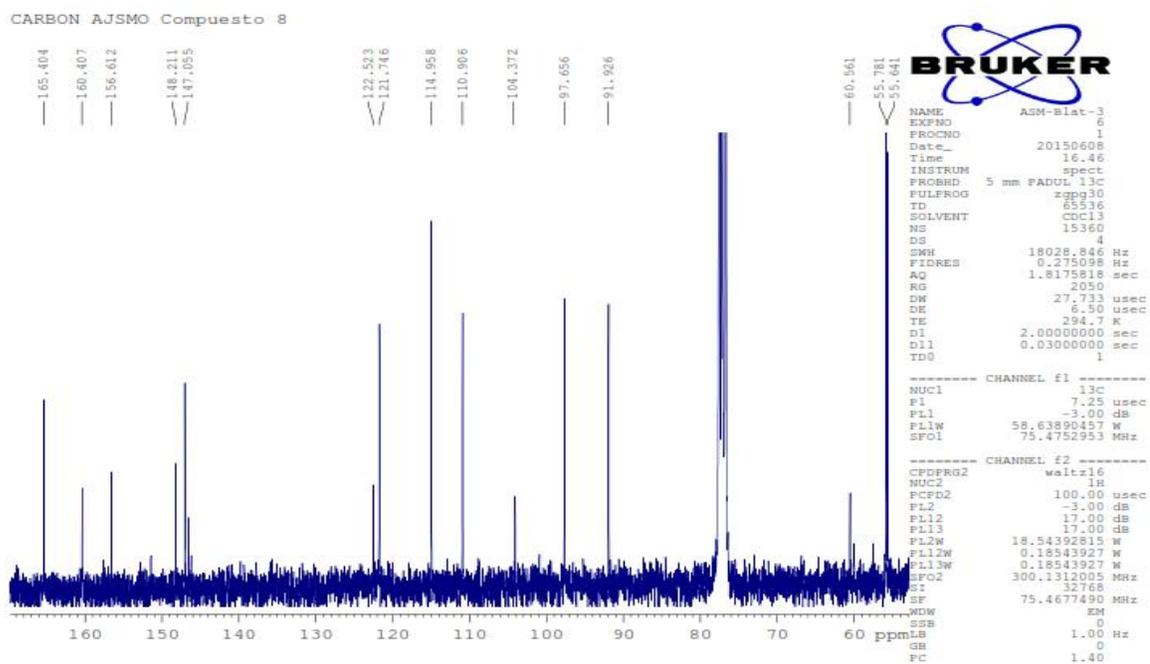
```

NAME      ASM-Blat8-1
EXPNO     4
PROCNO    1
Date_     20150825
Time      0.58
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PADUL 13C
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         3072
DS         4
SWH        18028.846 Hz
FIDRES     0.275098 Hz
AQ         1.8175818 sec
RG         2050
DW         27.733 usec
DE         6.50 usec
TE         297.7 K
D1         2.0000000 sec
D11        0.03000000 sec
TD0        1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1       13C
P1         7.25 usec
PL1        -3.00 dB
PL1W       58.63890457 W
SF01       75.4752953 MHz
----- CHANNEL f2 -----
CPDPRG2   waltz16
NUC2       1H
PCPD2     100.00 usec
PL2        0.00 dB
PL12       17.46 dB
PL13       18.00 dB
PL2W       8.29397964 W
PL12W     0.16680221 W
PL13W     0.14729965 W
SFO2       300.1312005 MHz
SI         32768
SF         75.4677490 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
    
```

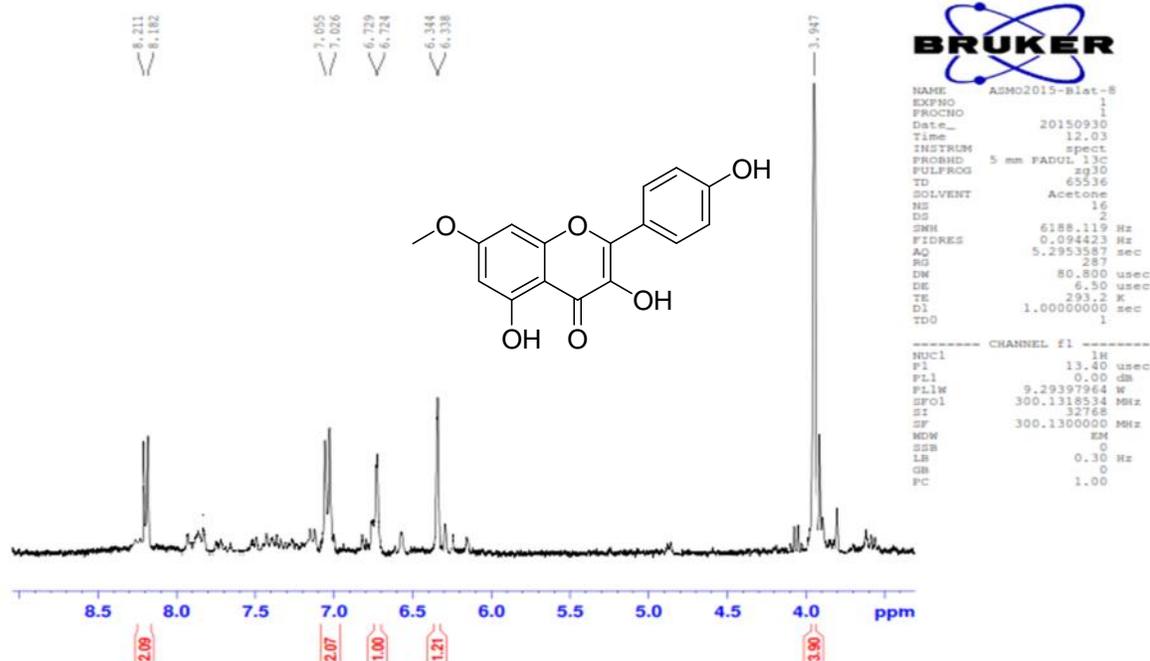
### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 8



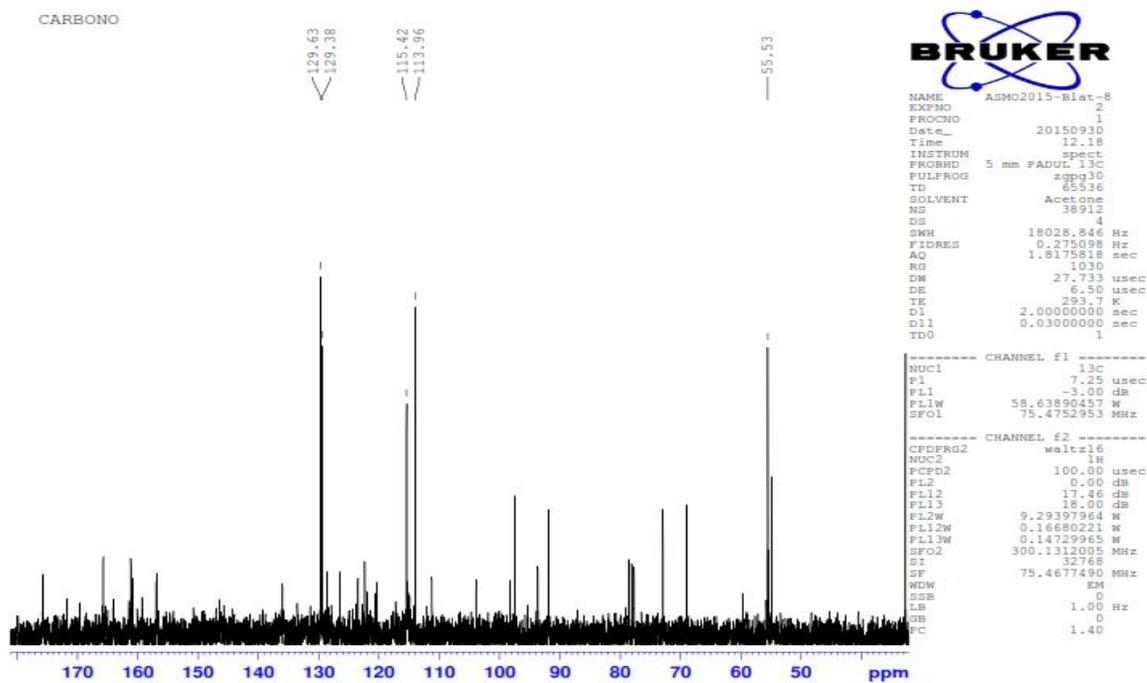
### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 8



**Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 9**

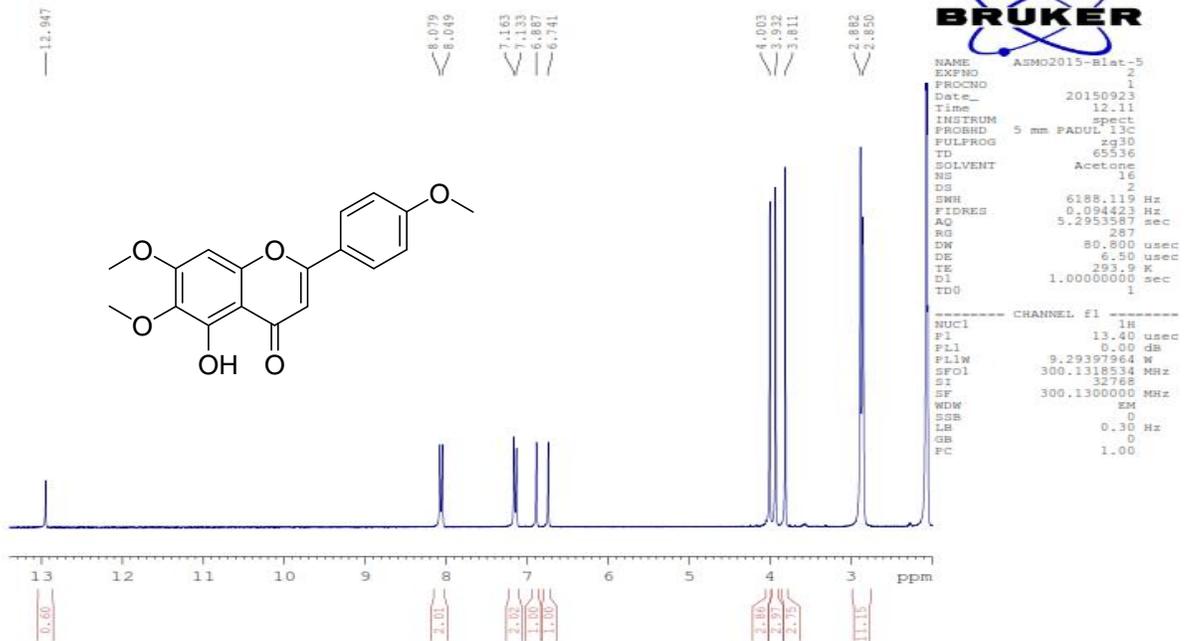


**Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 9**



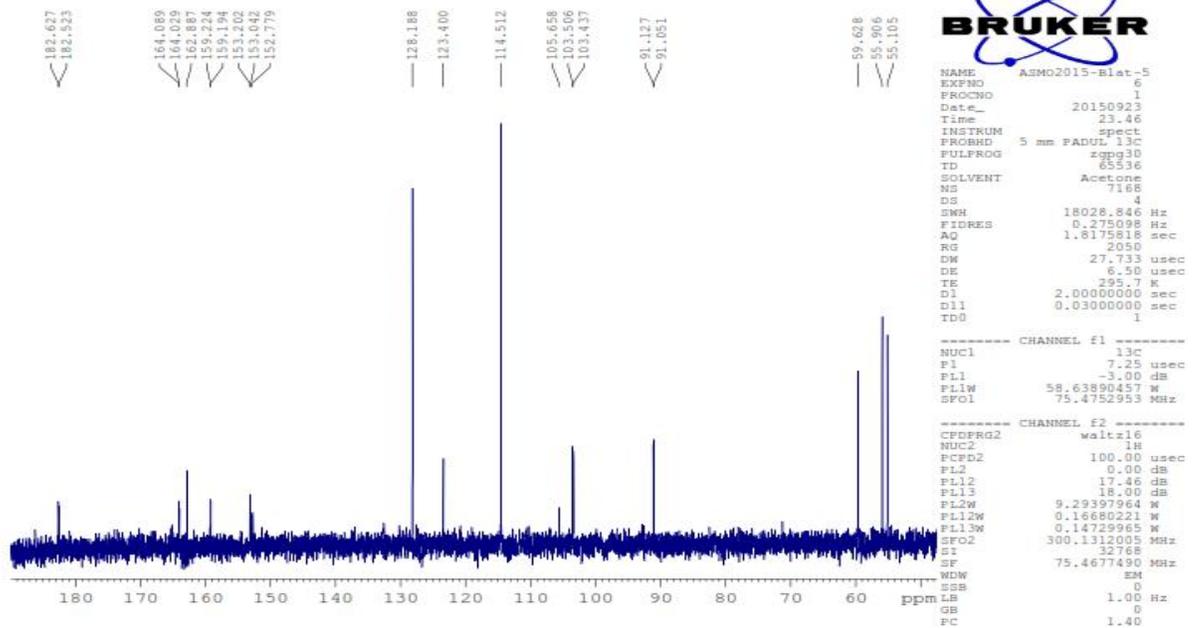
### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 10

PROTON AJSMO Compuesto 10



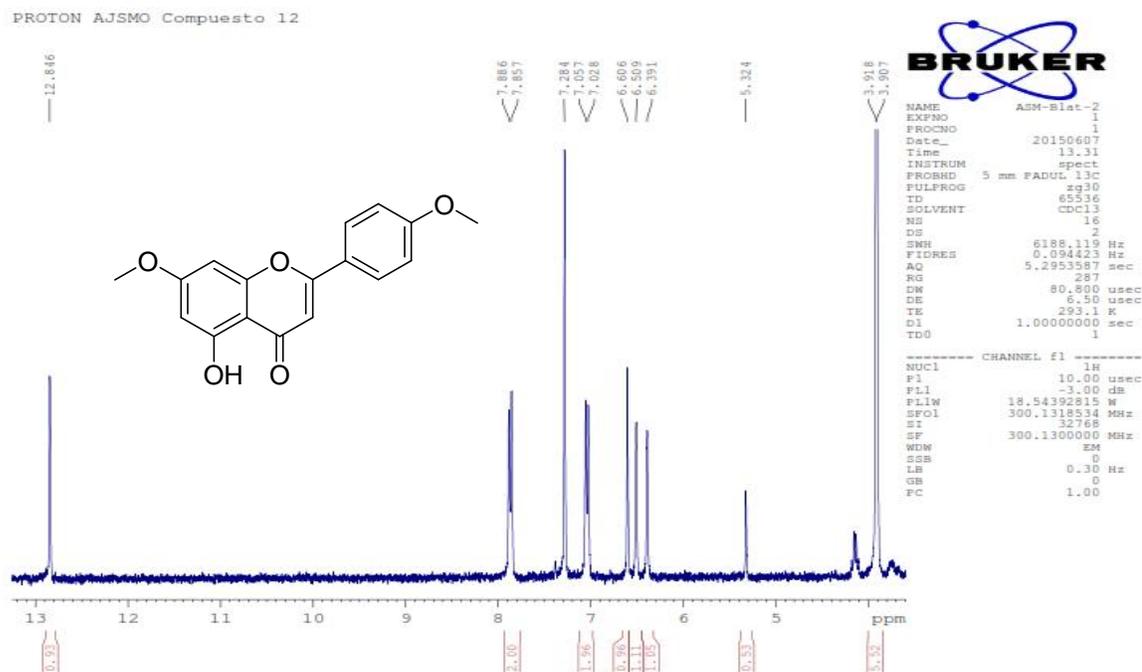
### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 10

CARBONO AJSMO Compuesto 10

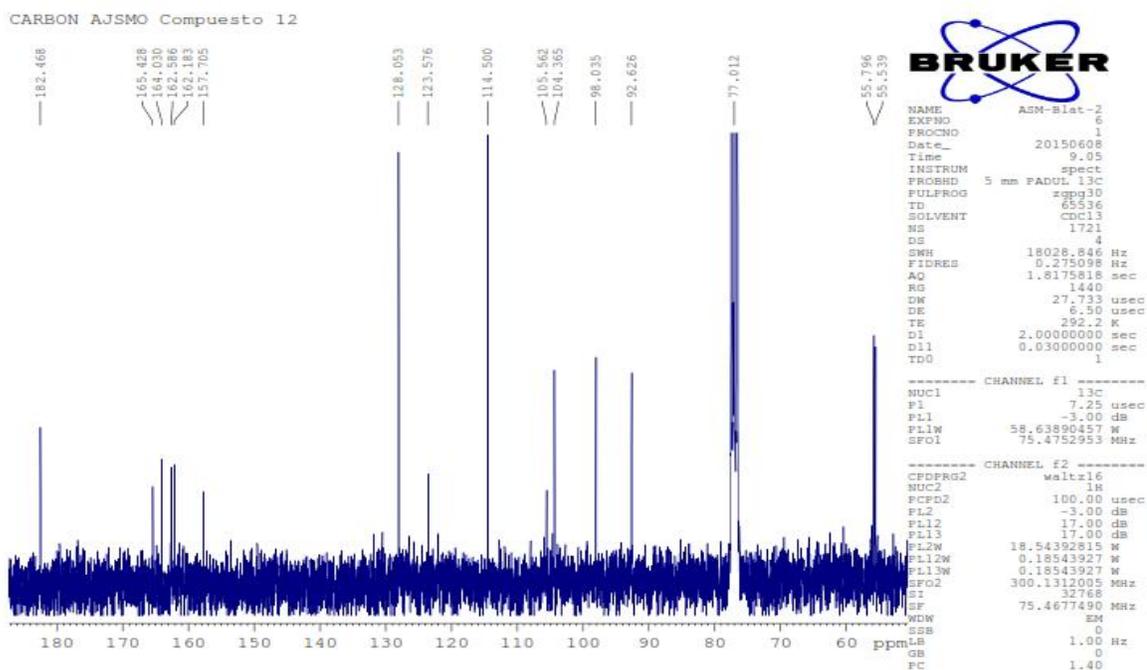




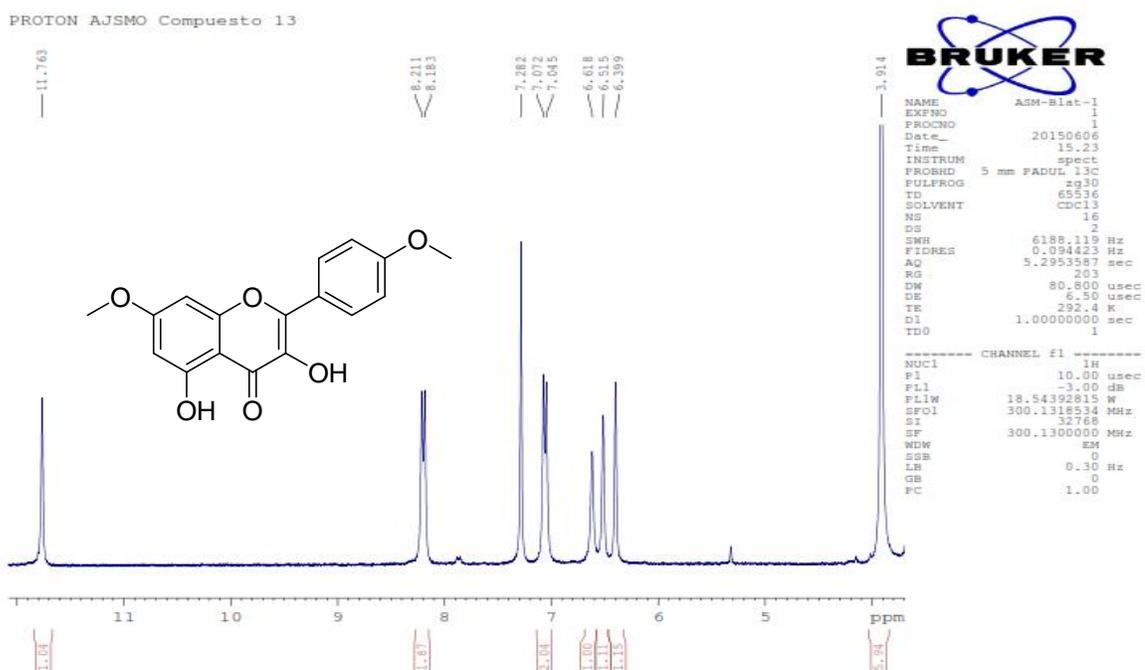
## Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 12



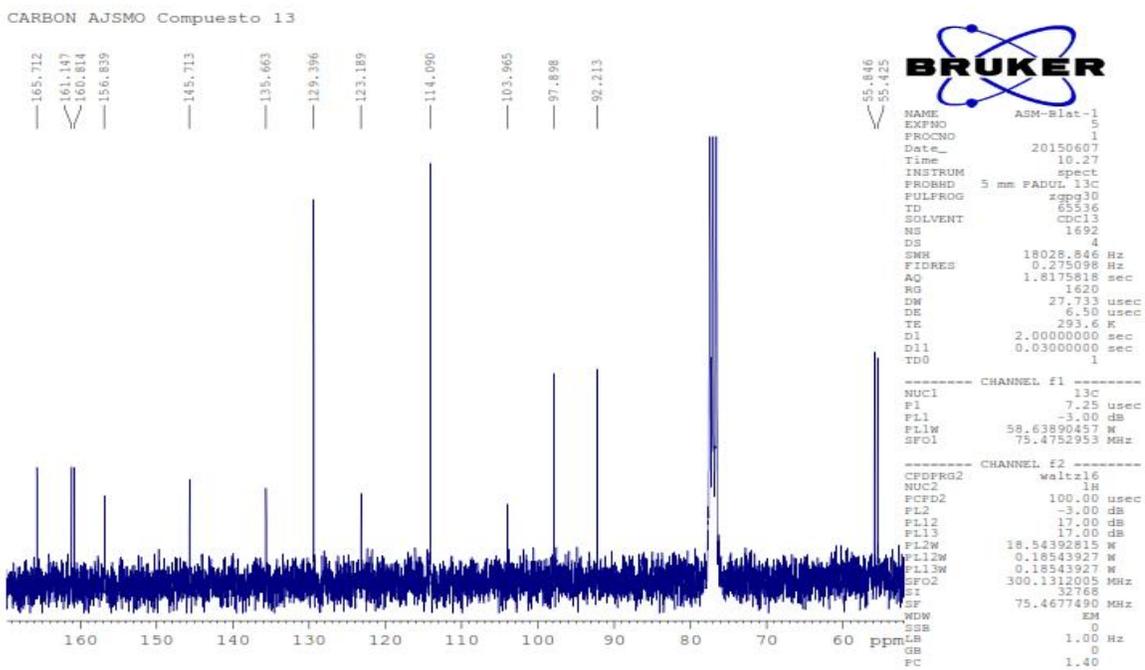
## Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 12



### Espectro <sup>1</sup>H Compuesto 13



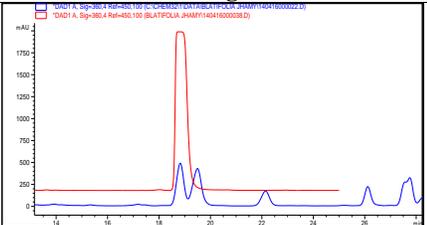
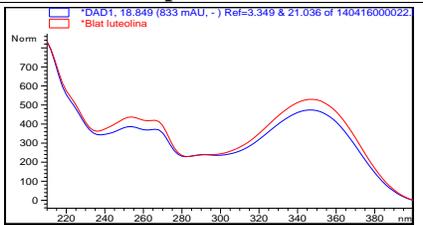
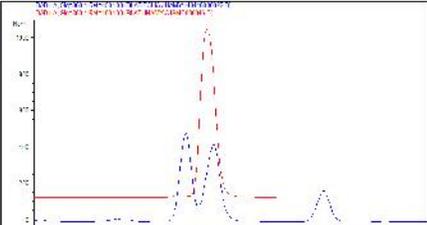
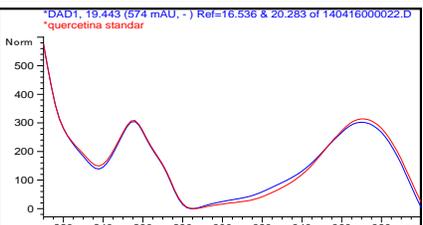
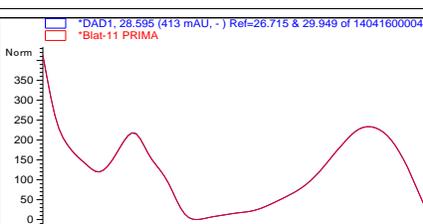
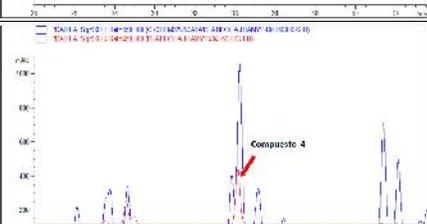
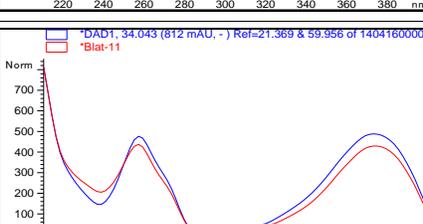
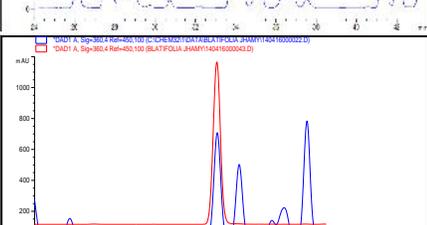
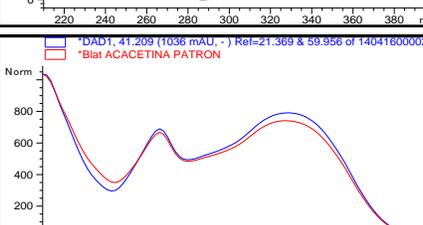
### Espectro <sup>13</sup>C Compuesto 13



ANEXO 1.4

Determinación de  $t_R$  de compuestos de *B. latifolia* por HPLC

Se procedió a identificar los compuestos mediante su tiempo de retención con los estándares y compuestos aislados, previamente elucidados. Los estándares se muestran en rojo

Compuesto	$T_R$	Cromatograma	Espectro UV
Compuesto 1	18.7		
Compuesto 2	19.4		
Compuesto 3	28.6		
Compuesto 4	34.1		
Compuesto 5	41.3		

Continuación

Compuesto	$T_R$	Cromatograma	Espectro UV
Compuesto 6	42.0		
Compuesto 7	43.1		
Compuesto 8	44.3		
Compuesto 9	44.3		
Compuesto 10	49.8		
Compuesto 11	50.4		

Continuación

Compuesto	$T_R$	Cromatograma	Espectro UV
Compuesto 12	53.5	<p>Chromatogram for Compound 12 showing two peaks at 21.369 and 53.516 minutes. The y-axis is mAU (0-1600) and the x-axis is minutes (0-60).</p>	<p>UV spectrum for Compound 12 comparing DAD1 (53.616 min) and EXT ETOH BLAT. The y-axis is Norm (0-600) and the x-axis is nm (220-380).</p>
Compuesto 13	53.9	<p>Chromatogram for Compound 13 showing two peaks at 21.369 and 53.963 minutes. The y-axis is mAU (0-800) and the x-axis is minutes (0-60).</p>	<p>UV spectrum for Compound 13 comparing DAD1 (53.963 min) and Blat-1. The y-axis is Norm (0-120) and the x-axis is nm (220-380).</p>

## ANEXO 1.5

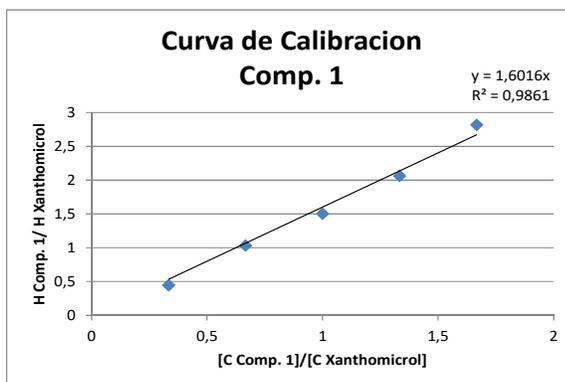
### Curva de calibración de los compuestos aislados para la cuantificación por HPLC (Método Patrón Interno)

La curva de calibración se realizó con la relación de alturas de la señal del analito respecto a la señal del xanthomicrol Vs la relación de las concentraciones del analito, respecto al xanthomicrol.

#### Compuesto 1

Concentración Compuesto 1 (ppm)	Concentración xanthomicrol (ppm)	[C Compuesto 1]/ [C xanthomicrol]	H Compuesto 1/ H xanthomicrol]
30	90	0.33	0.44
60	90	0.67	1.03
90	90	1.00	1.50
120	90	1.33	2.06
150	90	1.67	2.82

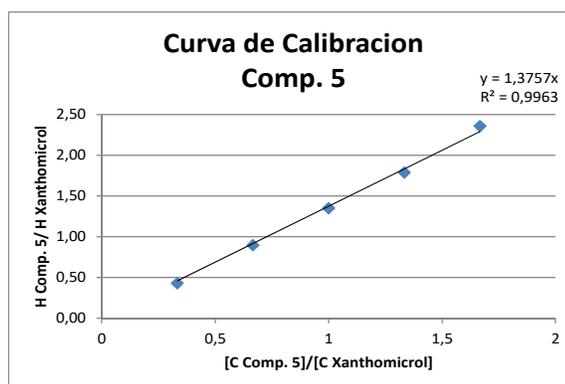
La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 1.6016X$  ( $R^2 = 0.9861$ ) observándose una buena linealidad.



### Compuesto 5

Concentración Compuesto 5 (ppm)	Concentración xanthomicrol (ppm)	[C Compuesto 5]/ [C xanthomicrol]	H Compuesto 5/ H xanthomicrol]
30	90	0.33	0.43
60	90	0.67	0.90
90	90	1.00	1.35
120	90	1.33	1.76
150	90	1.67	2.36

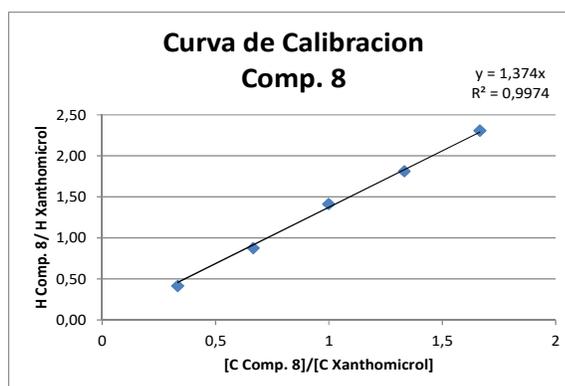
La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 1.3757X$  ( $R^2 = 0.9963$ ) observándose una buena linealidad.



### Compuesto 8

Concentración Compuesto 8 (ppm)	Concentración xanthomicrol (ppm)	[C Compuesto 8]/ [C xanthomicrol]	H Compuesto 8/ H xanthomicrol]
30	90	0.33	0.41
60	90	0.67	0.88
90	90	1.00	1.41
120	90	1.33	1.81
150	90	1.67	2.31

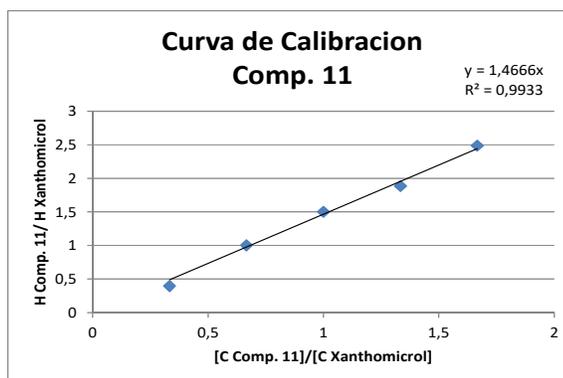
La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 1.3740X$  ( $R^2 = 0.9974$ ) observándose una buena linealidad.



### Compuesto 11

Concentración Compuesto 11 (ppm)	Concentración xanthomicrol (ppm)	[C Compuesto 11]/ [C xanthomicrol]	H Compuesto 11/ H xanthomicrol]
30	90	0.33	0.40
60	90	0.67	1.00
90	90	1.00	1.50
120	90	1.33	1.89
150	90	1.67	2.49

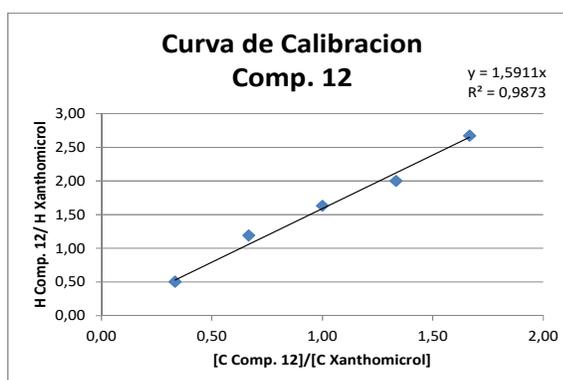
La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 1.4666X$  ( $R^2 = 0.9933$ ) observándose una buena linealidad.



### Compuesto 12

Concentración Compuesto 12 (ppm)	Concentración xanthomicrol (ppm)	[C Compuesto 12]/ [C xanthomicrol]	H Compuesto 12/ H xanthomicrol]
30	90	0.33	0.51
60	90	0.67	1.19
90	90	1.00	1.63
120	90	1.33	2.00
150	90	1.67	2.68

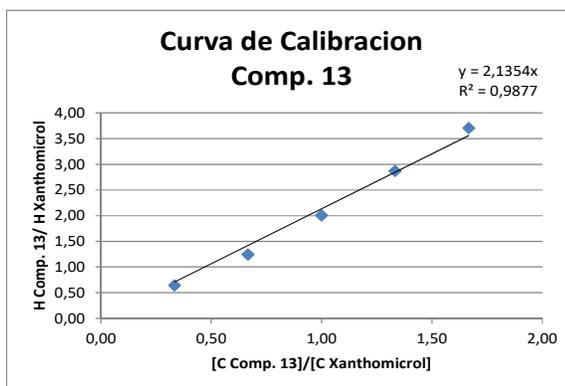
La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 1.5911X$  ( $R^2 = 0.9873$ ) observándose una buena linealidad.



### Compuesto 13

Concentración Compuesto 13 (ppm)	Concentración xanthomicrol (ppm)	[C Compuesto 13]/ [C xanthomicrol]	H Compuesto 12/ H xanthomicrol]
30	90	0.33	0.64
60	90	0.67	1.25
90	90	1.00	2.01
120	90	1.33	2.87
150	90	1.67	3.70

La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 2.1354X$  ( $R^2 = 0.9877$ ) observándose una buena linealidad.



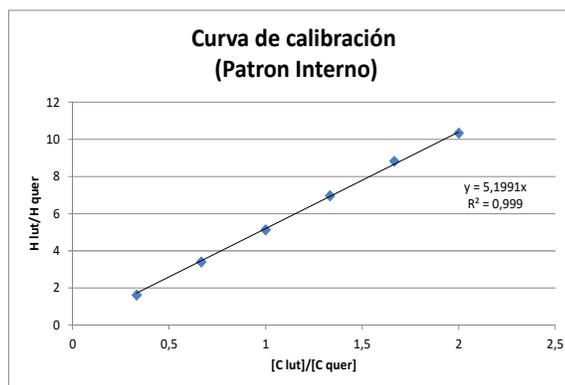
## ANEXO 2.1.

### Curva de calibración de la Luteolina por HPLC (Método Patrón Interno)

La curva de calibración se realizó con la relación de alturas de la señal de la luteolina respecto a la señal de la quercetina Vs la relación de las concentraciones de la luteolina, respecto a la quercetina.

Concentración luteolina (ppm)	Concentración quercetina (ppm)	[C luteolina]/[C quercetina]	H luteolina/H quercetina
30	20	0,33	1,62
60	20	0,67	3,40
90	20	1,00	5,12
120	20	1,33	6,96
150	20	1,67	8,82
180	20	2,00	10,33

La curva elaborada sigue la ecuación  $Y = 5,1991X$  ( $R^2 = 0,999$ ) observándose una buena linealidad.

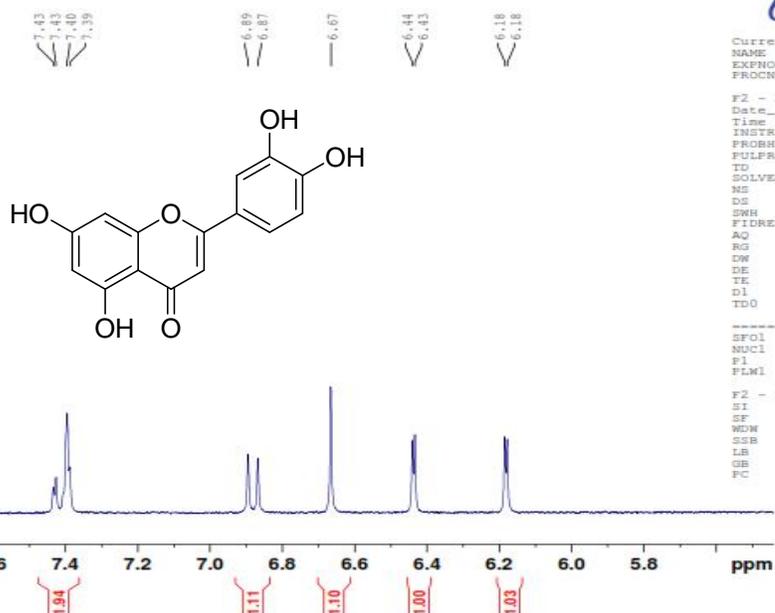


## ANEXO 2.2.

### Espectros RMN de 1D y 2D de la Luteolina

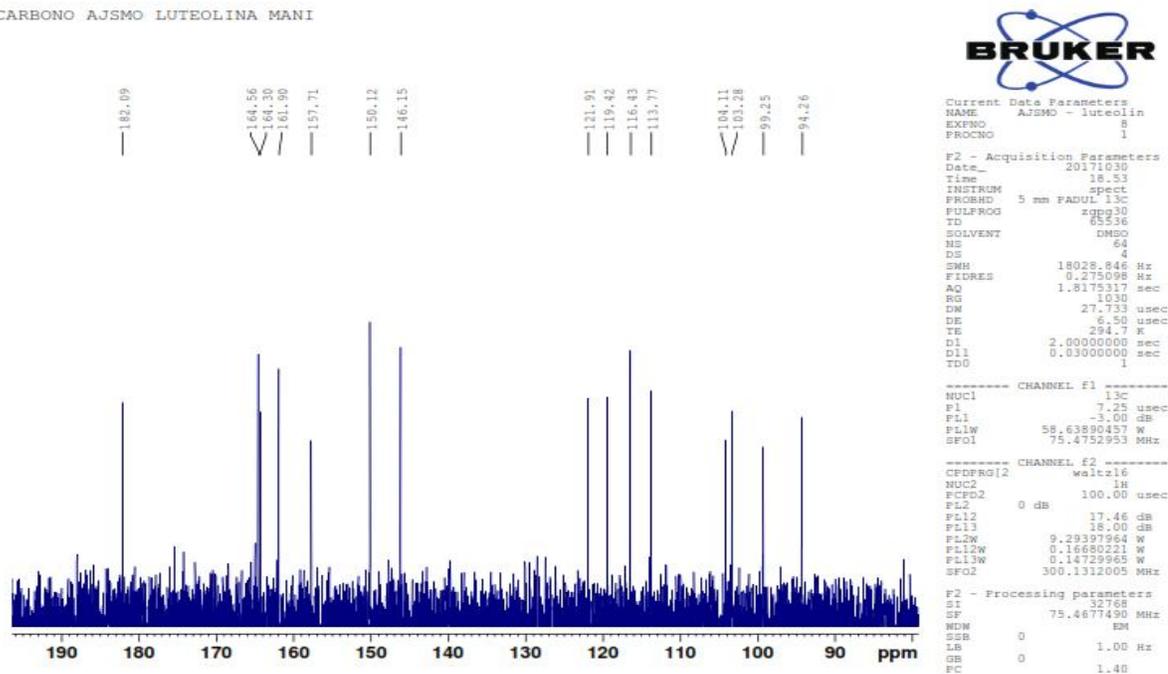
#### Espectro <sup>1</sup>H

PROTON AJSMO LUTEOLINA MANI



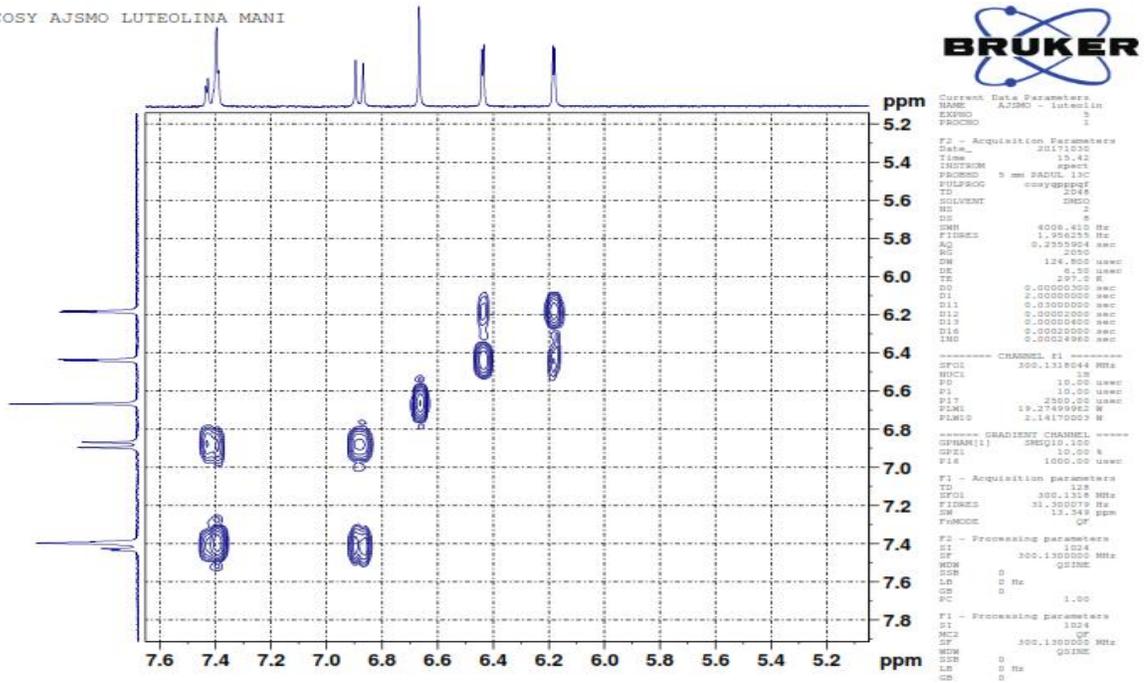
#### Espectro <sup>13</sup>C

CARBONO AJSMO LUTEOLINA MANI



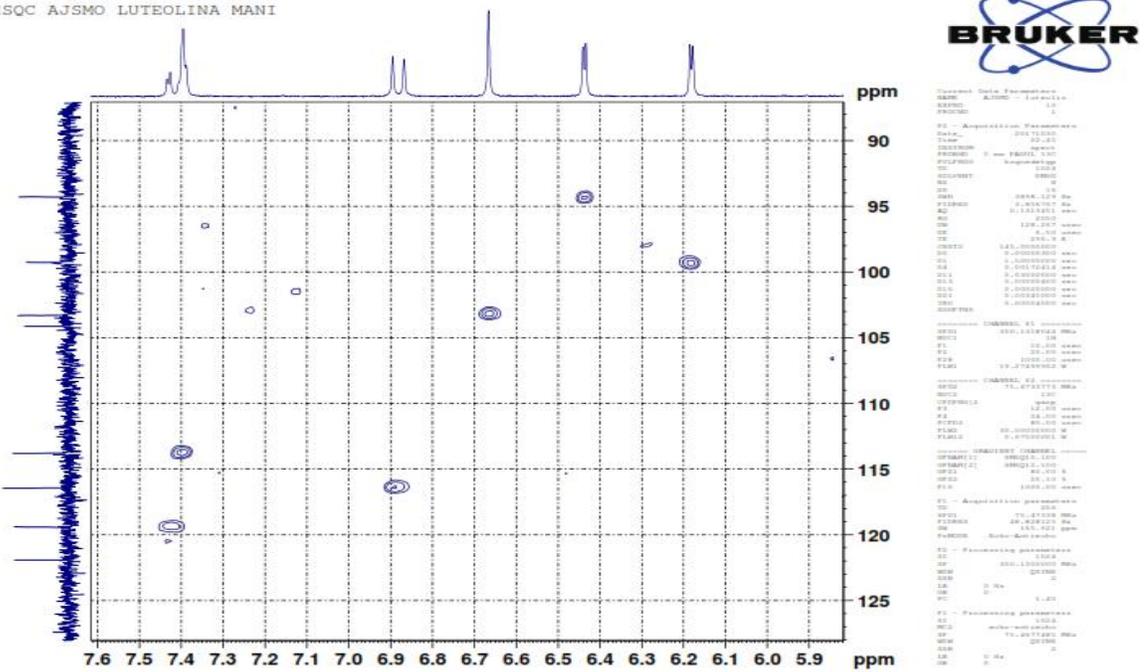
### COSY

COSY AJSMO LUTEOLINA MANI



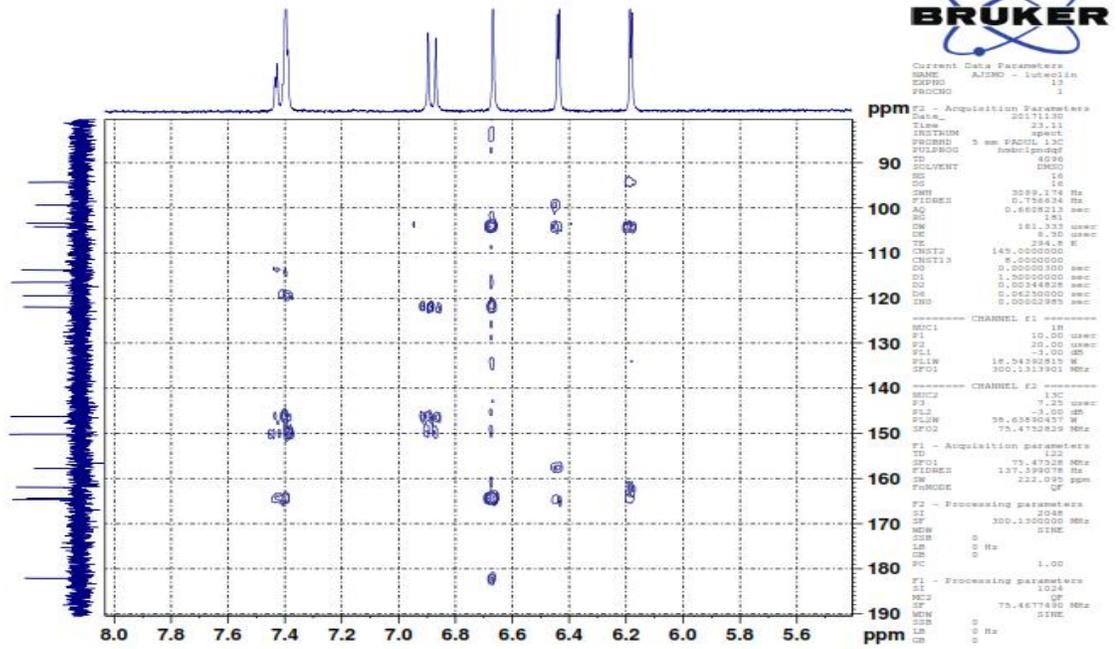
### HSQC

HSQC AJSMO LUTEOLINA MANI



# HMBC

HMBC AJSMO LUTEOLINA MANI



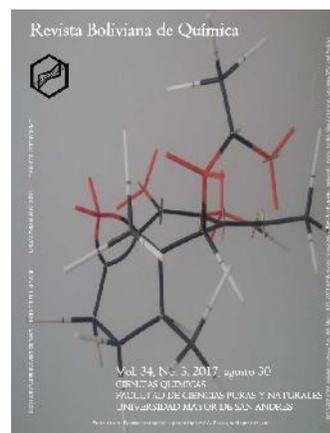


## LUTEOLIN IN PEANUTS' SHELLS (ARACHIS HYPOGAEA) IN CULTIVARS OF BOLIVIA

## LUTEOLINA EN CÁSCARAS DE MANÍ (ARACHIS HYPOGAEA) EN CULTIVARES DE BOLIVIA

Received 07 29 2017  
Accepted 08 29 2017  
Published 08 30 2017

Vol. 34, No.3, pp. 79-88, Jul./Ago. 2017  
34(3), 79-88, Jul./Aug. 2017  
Bolivian Journal of Chemistry



Full original paper

Angela San Martín<sup>1</sup>, Gilberto Chui<sup>1</sup>, Aleida S. Romero<sup>2</sup>, Roberto Acebey<sup>2</sup>, Eloy Blanco<sup>3</sup>, Yonny Flores<sup>1</sup>, Giovanna R. Almanza<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas IIQ, Ciencias Químicas, Facultad de Ciencias Puras y Naturales FCPN, Universidad Mayor de San Andrés UMSA, P.O. Box 303, Calle Andrés Bello s/n, Ciudad Universitaria Cota Cota, phone +59122772269, La Paz, Bolivia, galmanza3@umsa.bo, www.umsa.bo

<sup>2</sup>Instituto de Biodiversidad y Recursos Naturales Aplicados al Desarrollo BIORENA Universidad Mayor Real y Pontificia de San Francisco Xavier de Chuquisaca USFX, Sucre, Chuquisaca, Bolivia

<sup>3</sup>Instituto Superior Tecnológico Agroindustrial de Monteagudo ISTAM, Monteagudo, Chuquisaca, Bolivia

Keywords: Luteolin, *Arachis hypogaea*, Peanuts shells, HPLC quantification, Chuquisaca, Bolivia.

### ABSTRACT

Peanut shells are a residue generated in big quantities in Bolivia. This residue contains luteolin, which is a flavonoid with demonstrated pharmacological properties as antioxidant, anti-inflammatory and antimutagenic. In this study, we analyzed the luteolin content in 41 samples of peanuts shells obtained from different cultivars mainly in the department of Chuquisaca, Bolivia. The luteolin content was quantified by an HPLC-DAD method using quercetin as internal standard. Results showed that content varies between 0.006 to 0.850 mg Lu/g of shells. Samples with the highest concentration of luteolin were: *Larguillo Icla* (roasted) (0,850 mg Lu/g of shells) sample obtained in the market of Sucre city, *Phiti cintura colorado* from Oroncota in Potosi with 0.673 mg Lu/g of shells and *Pico y Loro* obtained from Monteagudo in Chuquisaca with 0.589 mg Lu/g of shells. On the other hand, the EtOH extracts, which also showed interesting pharmacological properties, were also analyzed in their luteolin contents, determining concentrations of 79,728 and 74,188 mg Lu/g of extract in the cultivars *Phiti cintura colorado* from Oroncota in Potosi and *Phiti cintura ladrillo* from Padilla in Chuquisaca, respectively. Finally, it was determined that roasting temperature (80 ° C) does not affect luteolin.



\*Corresponding author: [giovyalmanza@gmail.com](mailto:giovyalmanza@gmail.com), [galmanza3@umsa.bo](mailto:galmanza3@umsa.bo)

## RESUMEN

Las cáscaras de maní son un residuo generado en grandes cantidades en Bolivia. Este residuo contiene luteolina, que es un flavonoide con demostradas propiedades farmacológicas como antioxidante, antiinflamatorio y antimutagénico. En este estudio, se analizó el contenido de luteolina en 41 muestras de cáscaras de maní obtenidos en diferentes cultivares principalmente del departamento de Chuquisaca, Bolivia. El contenido de luteolina se cuantificó por un método de HPLC-DAD utilizando como patrón interno quercetina. Los resultados mostraron que el contenido varía entre 0,006 y 0,850 mg Lu/g de cáscaras. Las muestras con mayor concentración de luteolina fueron: *Larguillo Icla* (tostado) (0,850 mg Lu/g de cáscaras) obtenida en el mercado de la ciudad de Sucre, *Phiti cintura colorado* de Oroncota en Potosí con 0,673 mg Lu/g de cáscaras y *Pico y Loro* obtenido de Monteagudo en Chuquisaca con 0,589 mg Lu/g de cáscaras. Por otra parte, los extractos de EtOH que también presentan propiedades farmacológicas interesantes, fueron también analizados en su contenido de luteolina, determinando concentraciones de hasta 79,728 y 74,188 mg Lu/g de extracto en los cultivares de *Phiti cintura colorado* de Oroncota en Potosí y *Phiti cintura ladrillo* de Padilla en Chuquisaca, respectivamente. Finalmente se determinó que la temperatura de tostado (80°C) no afecta a la luteolina.

## INTRODUCCION

La luteolina (3', 4', 5,7-tetrahidroxiflavona) (Lu) es un flavonoide producido por muchos alimentos y plantas medicinales. Tiene muchos usos como suplemento para la salud debido a sus propiedades farmacológicas [1]. Estas propiedades permiten considerar a la luteolina como un agente antiinflamatorio, neuroprotector y antialérgico [2-3], así como un agente con interesantes actividades antioxidantes [4-5] y anticáncer [6-11].

Las cáscaras de maní son una de las fuentes comerciales más importantes de luteolina, estas cáscaras son de bajo costo ya que son un residuo de maní procesado [12].

El maní, *Arachis hypogaea* (Fabaceae), es un cultivo alimenticio producido en zonas tropicales y subtropicales [13]. Esta leguminosa es una planta domesticada que depende exclusivamente de la mano del hombre para sobrevivir, es endémica de América del Sur y algunos estudios indican que el origen de *Arachis hypogaea subsp hypogaea* es el sureste de Bolivia [14-15].

Bolivia es el cuarto exportador de maní en América Latina, con 25.951 toneladas producidas el 2016. Los cultivos se concentran principalmente en los valles de Chuquisaca, Tarija y Santa Cruz, aunque también está presentes en La Paz, Cochabamba, Beni y Potosí [16]. Para su venta en los mercados, el maní es tostado y descascarado (35% en peso) [17] generando grandes cantidades de residuos no utilizados o subutilizados, que son la materia prima de este estudio, por su contenido de luteolina.

En el presente trabajo se realizó la cuantificación de luteolina en 41 muestras de cáscaras de maní de cultivares obtenidos mayoritariamente en los valles mesotérmicos y zonas subtropicales de Chuquisaca (Muyupampa, Monteagudo y Padilla), así como en extractos etanólicos de las cáscaras. En adición, se realizó la cuantificación de luteolina, en muestras procesadas (tostadas) y no procesadas (sin tostar) de cáscaras obtenidas en los mercados de Sucre para determinar si el proceso de tostado afecta a la luteolina. Todo esto fue realizado con el objetivo de contribuir al potencial uso de estos residuos en suplementos para la salud, con base en el compuesto puro o el extracto etanólico rico en luteolina.



Fuente: A. San Martín

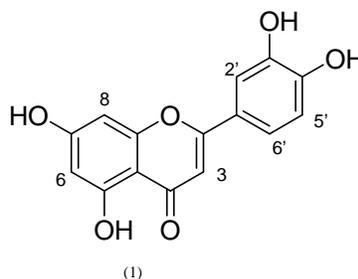


Figura 1. luteolina (1) el principal metabolito fenólico en cáscaras de maní



## RESULTADOS Y DISCUSION

La materia prima fue principalmente proporcionada por el Banco de Germoplasma BIORENA de la USFX de Sucre y por el Instituto de Monteagudo (ISTAM). Las muestras se colectaron entre los años 2013 y 2016. Sólo cuatro muestras se han adquirido en los mercados de la ciudad de Sucre el 2016.

Los extractos de cáscaras de maní se obtuvieron con etanol como disolvente y el contenido de luteolina en los extractos se cuantificó usando un método HPLC-DAD con patrón interno desarrollado en nuestro laboratorio con base en un método previamente establecido para flavonoides en *Baccharis* [18]. La curva de calibración se realizó utilizando estándar de luteolina (98% puro) como analito y estándar de quercetina (95% puro) como patrón interno.

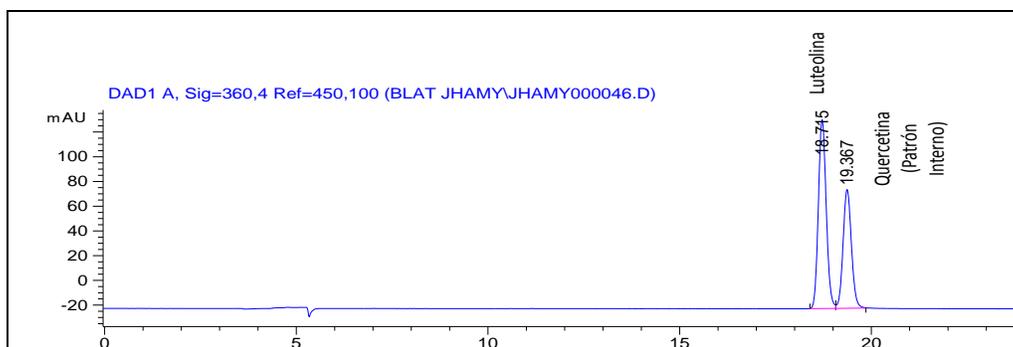


Figura 2. Cromatograma HPLC-DAD del estándar de luteolina (30 ppm) con el estándar de quercetina (90 ppm)

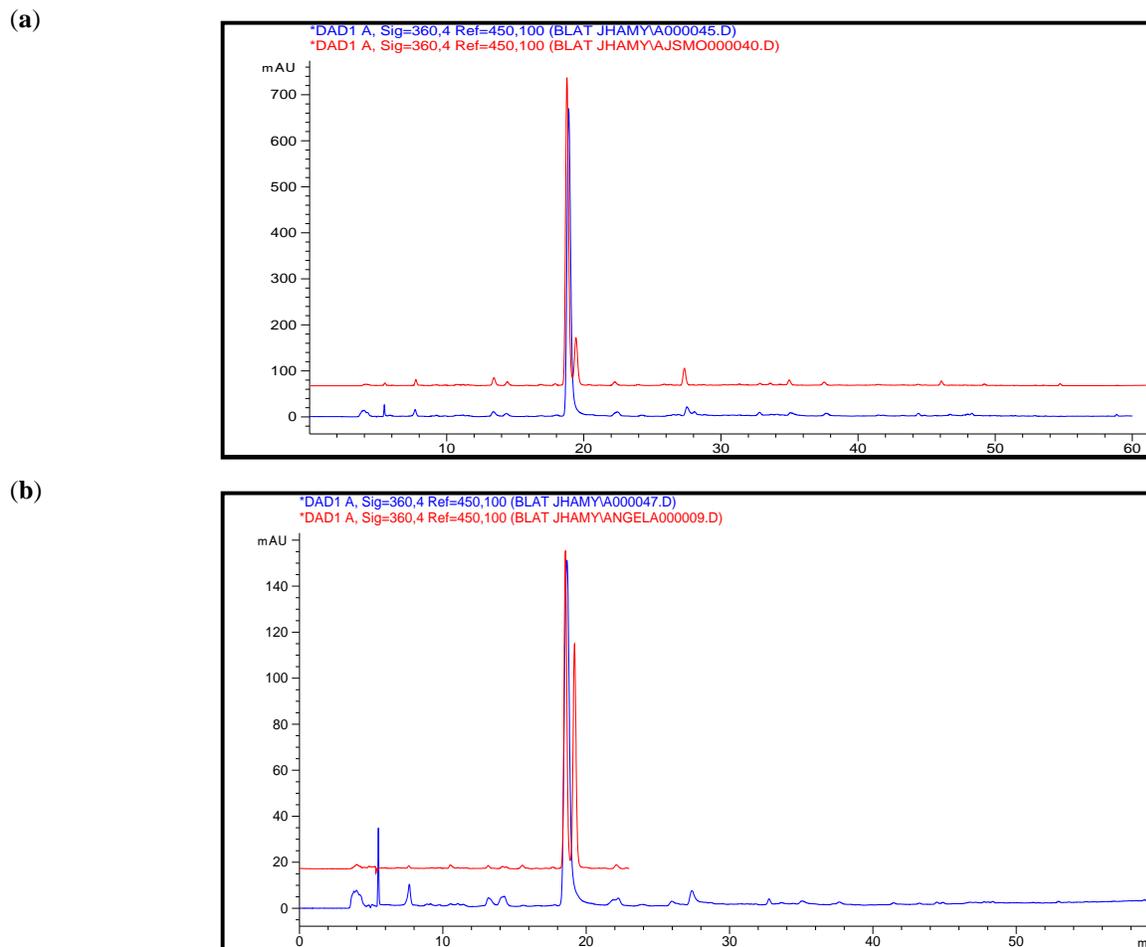
Se eligió un método con patrón interno, porque de acuerdo a varios autores es mejor que el método con patrón externo, ya que compensa internamente el efecto de variaciones menores sobre el tamaño del pico, como las comunes fluctuaciones debidas al peso o tamaño de la muestra. [19]

La quercetina fue seleccionada como patrón interno porque su tiempo de retención es cercano al de la luteolina pero ambas señales se distinguen (Figura 2), dando una curva de calibración ( $y = 5,1991x$ ) con alta linealidad ( $R^2 = 0,999$ ) al graficar la relación de alturas de la señal de la luteolina respecto a la señal de la quercetina Vs la relación de las concentraciones de la luteolina respecto a la quercetina. Además, la quercetina es estable, no es reactiva en las condiciones de experimentación, tiene una estructura similar y por lo tanto de comportamiento equivalente a la del analito, y no está presente en las muestras de cáscara de maní, como se puede observar en la Figura 3 donde se muestran cromatogramas HPLC-DAD de dos cultivares de maní. Por lo tanto, cumple con todos los requisitos para ser un patrón interno [19].

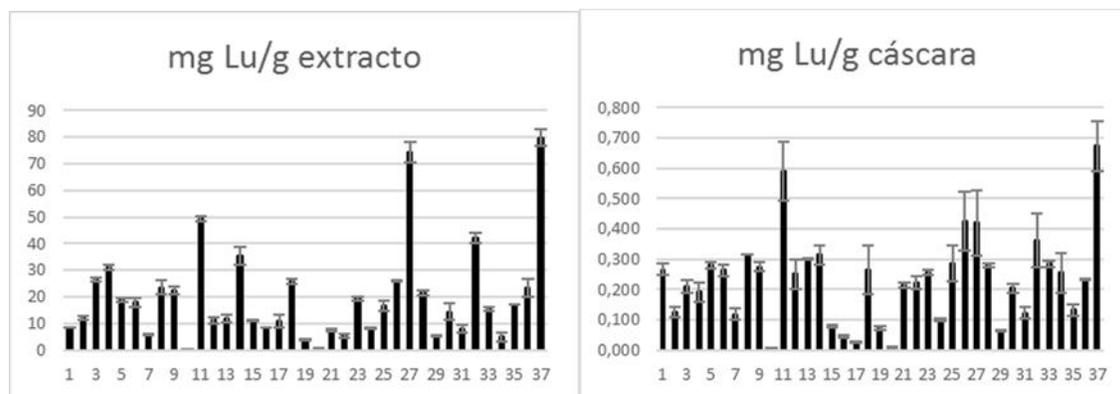
Para la cuantificación de luteolina por el método desarrollado, los extractos secos se disolvieron con metanol (HPLC) y se analizaron por triplicado a 360 nm donde la luteolina aparece a un tiempo de retención de 18,7 min y la quercetina a 19,4 min (Figura 2 y Figura 3).

La Tabla 1 muestra los resultados del contenido de luteolina en extractos etanólicos y cáscaras de diversos cultivares de maní no procesados otorgados por los institutos BIORENA e ISTAM. La mayor parte de los cultivares (30 cultivares) pertenecen a la subespecie *Arachis hypogaea subsp hypogaea* mientras que sólo siete muestras (“maní arbolito”, “fusilero”, “guano de oveja”, “coloradito paradito”, “tubito bayo”, “tubito colorado” y “blanco paradito”) pertenecen a la subespecie *Arachis hypogaea subsp fastigiata*. Las muestras fueron recolectadas principalmente de las provincias Tomina y Hernando Siles de Chuquisaca que son grandes centros de producción de maní en Bolivia.

La Tabla 1 y la Figura 4 muestran que las cáscaras y extractos con mayor contenido de luteolina pertenecen a los cultivares “phiti cintura colorado” de Oronqota, Potosí ( $0,673 \pm 0,082$  mg Lu/g de cáscara;  $79,728 \pm 3,037$  mg Lu/g de extracto), “pico y loro” de Monteagudo, Chuquisaca ( $0,589 \pm 0,097$  mg Lu/g de cáscara;  $49,427 \pm 0,994$  mg Lu/g de extracto) y “phiti cintura ladrillo” de Padilla, Chuquisaca ( $0,419 \pm 0,109$  mg Lu/g de cáscara;  $74,188 \pm 3,748$  mg Lu/g de extracto), por lo que se sugiere que de estos cultivares se hagan estudios más profundos para el desarrollo de potenciales suplementos para la salud en base a sus cáscaras. Por otra parte, es importante observar que la desviación estándar, en la cuantificación de luteolina en extractos y cáscaras, en algunos casos es elevada, errores atribuibles principalmente a errores manuales en el pesado de muestras.



**Figura 3.** Cromatogramas de 2 muestras de cáscaras de maní: (a) Tubito Bayo y (b) Chiquitano Coloradito; usando el método desarrollado HPLC-DAD con patrón interno y sin patrón interno.



**Figura 4.** Contenido de luteolina en extractos y cáscaras de los diferentes cultivares de maní no procesados



Tabla 1. Contenido de luteolina en cáscaras y extractos de los diferentes cultivares de maní no procesados

No	Nombre Común del Cultivar	Lugar de Colecta	Rendimiento extracto (%)	mg Lu/g extracto	mg Lu/g cáscaras
<b>Provincia Azurduy (Chuquisaca)</b>					
1	Maní arbolito	Kanalla	3,160	8,408 ± 0,102	0,266 ± 0,019
<b>Provincia Hernando Siles (Chuquisaca)</b>					
2	Colorado de Azero Norte	Azero Norte.	1,038	11,943 ± 0,624	0,124 ± 0,017
3	Tubito Bayo	Bartolo	0,791	26,41 ± 0,855	0,209 ± 0,022
4	Tubito colorado	Candua.	0,616	30,999 ± 0,763	0,191 ± 0,032
5	Coloradito chiquitano	El Bañado.	1,487	18,833 ± 0,694	0,28 ± 0,012
6	Maní colorado	El Zapallar.	1,470	17,887 ± 1,556	0,263 ± 0,019
7	Overo pecho blanco	Monteagudo.	2,033	5,852 ± 0,131	0,119 ± 0,018
8	Patillo	Monteagudo.	1,346	23,484 ± 2,602	0,316 ± 0,001
9	Chaucha oclliri	Monteagudo.	1,236	22,244 ± 1,447	0,275 ± 0,013
10	Caspeado	Monteagudo.	3,750	0,16 ± 0,047	0,006 ± 0,001
11	Pico y loro	Monteagudo.	1,192	49,427 ± 0,994	0,589 ± 0,097
12	Carmino	Monteagudo.	2,243	11,145 ± 1,13	0,25 ± 0,050
13	Yungueño	Monteagudo.	2,565	11,698 ± 1,34	0,3 ± 0,003
14	Colorado Roldana	Roldana.	0,889	35,322 ± 3,51	0,314 ± 0,031
<b>Provincia Luis Manuel Calvo (Chuquisaca)</b>					
15	Colorado de Iboperenda	Cerrillos.	0,707	11,034 ± 0,142	0,078 ± 0,004
16	Chiquitano Coloradito	Sauce Mayu.	0,526	8,557 ± 0,124	0,045 ± 0,005
17	Colorado	Sauce Mayu.	0,235	11,057 ± 2,418	0,026 ± 0,000
18	Guano de Oveja	Sauce Mayu.	1,030	25,628 ± 0,994	0,264 ± 0,080
19	Overo Bola	Sauce Mayu.	1,862	3,814 ± 0,159	0,071 ± 0,006
<b>Provincia San Pablo de Huacareta (Chuquisaca)</b>					
20	Overo Bola	Atirimbia.	0,834	0,959 ± 0,046	0,008 ± 0,002
21	Colorado Ingre	Rosario del Ingre.	2,914	7,344 ± 0,513	0,214 ± 0,010
22	Overo Guarayo	Rosario del Ingre.	4,097	5,419 ± 0,639	0,222 ± 0,020
<b>Provincia Tomina (Chuquisaca)</b>					
23	Oclliri colorado	El Villar.	1,325	19,397 ± 0,736	0,257 ± 0,010
24	Colorado de Iboperenda	Padilla.	1,211	8,338 ± 0,276	0,101 ± 0,003
25	Guano de oveja	Padilla.	1,715	16,673 ± 2,076	0,286 ± 0,057
26	Oscó	Padilla.	1,625	26,093 ± 0,343	0,424 ± 0,098
27	Phiti cintura ladrillo	Padilla.	0,564	74,188 ± 3,748	0,419 ± 0,109
28	Lastha Oclliri	Pili Pili.	1,306	21,355 ± 0,979	0,279 ± 0,007
29	Pili-Pili	Pili Pili.	1,248	5,208 ± 0,252	0,065 ± 0,003
30	Chaucha roja	T'iyumayu.	1,411	14,459 ± 2,971	0,204 ± 0,013
31	Chaucha blanca	T'iyumayu.	1,538	7,995 ± 1,651	0,123 ± 0,019
32	Fusilero	T'iyumayu.	0,863	41,933 ± 1,958	0,362 ± 0,087
33	Maní blanco	T'iyumayu.	1,853	15,382 ± 0,883	0,285 ± 0,010
34	Larguillo	Villa Alcalá.	5,117	4,983 ± 1,785	0,255 ± 0,064
<b>Provincia Jose Ballivian (Beni)</b>					
35	Blanco Paradito	Carmen Florida.	0,767	17,207 ± 0,086	0,132 ± 0,021
36	Coloradito Paradito	Carmen Florida.	1,001	23,386 ± 3,406	0,234 ± 0,002
<b>Provincia de Yamparaz (Potosí)</b>					
37	Phiti cintura colorado	Oronqota.	0,844	79,728 ± 3,037	0,673 ± 0,082

Por otra parte, se realizó un estudio preliminar de muestras procesadas (tostadas) y no procesadas (sin tostar) ofrecidas en los mercados de la ciudad de Sucre (Tabla 2 y Figura 5), el que nos mostró que las cáscaras tostadas del cultivar conocido como Larguillo de Icla tienen un alto contenido de luteolina ( $0,850 \pm 0,052$  mg Lu/g de cáscara) mayor al determinado en las muestras sin procesar, siendo este similar a otros reportados en bibliografía que están en el rango de 0,547 a 4,485 mg/g de cascara de maní [12,17,20,21].



Tabla 2. Contenido de luteolina en cultivares procesados y sin procesar del mercado de Sucre

No	Nombre Común del Cultivar	Rendimiento extracto (%)	mg Lu/g extracto	mg Lu/g cáscaras
38	Larguillo Icla (Sin tostar)	1,101	20,616 ± 1,169	0,227 ± 0,016
39	Larguillo Icla (Tostado)	2,366	35,932 ± 0,470	0,850 ± 0,052
40	Overo (Sin tostar)	0,901	5,548 ± 0,238	0,050 ± 0,003
41	Overo (Tostado)	1,906	3,305 ± 0,293	0,063 ± 0,007

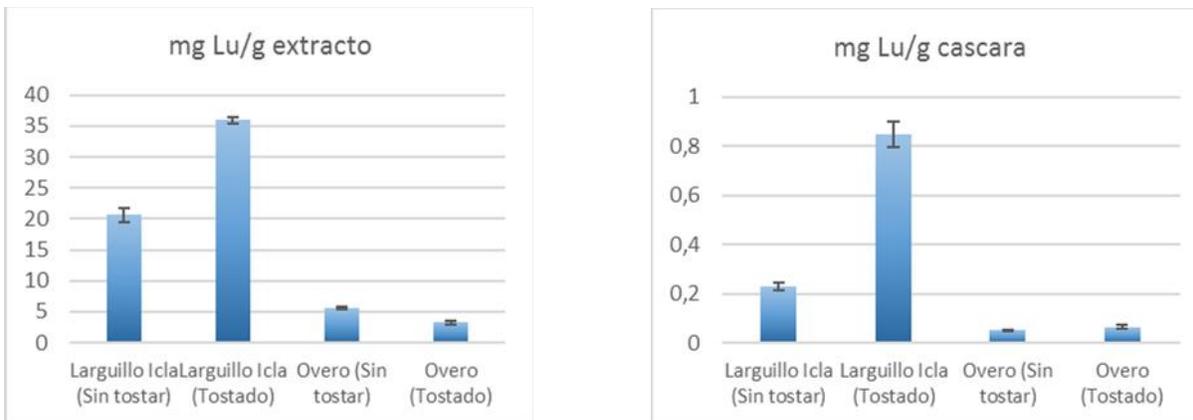


Figura 5. Luteolina en extractos y cáscaras de cultivares procesados y no procesados del mercado de Sucre

De acuerdo a los resultados de las cáscaras sin tostar (no procesadas) y tostadas (procesadas), el proceso de tostado no afecta a la luteolina, incrementándose su concentración en la cáscara probablemente por la pérdida de agua y otros en el proceso de tostado. Por tanto, el proceso inclusive resultaría beneficioso y esto es positivo considerando que la mayor parte de las cáscaras que se encuentran como residuos ya están tostadas. Para comprobar esto se realizó un estudio de termoestabilidad de la luteolina hasta una temperatura de 80°C, temperatura a la cual, de acuerdo a informantes de Padilla, se realiza el proceso de tostado. El estudio de termoestabilidad fue realizado con luteolina aislada de la muestra de cáscara de maní tostado Larguillo Icla del mercado de Sucre (Figura 5) sometiendo a la muestra disuelta en EtOH a una temperatura de 80°C y realizando el control de la luteolina por espectroscopía UV cada cierto tiempo hasta llegar a las 72 h. La Figura 6 muestra que la luteolina es estable a esta temperatura, mostrando resultados concordantes con otros estudios previamente realizados con este compuesto [22,23].

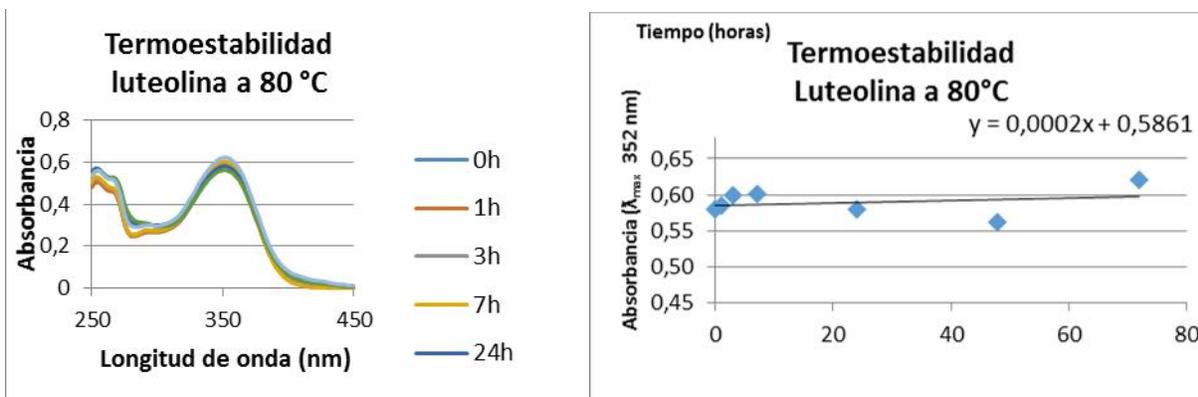


Figura 6. Estudio de termoestabilidad de la luteolina a 80°C



Finalmente, es importante mencionar, que estudios previos mostraron que no sólo la luteolina pura tiene propiedades farmacológicas, sino también los extractos metanólicos de cáscaras de maní, los cuales además de luteolina tienen otros compuestos de carácter fenólico como la 5,7-dihidroxicromona, el eriodictol y la 3',4',7-trihidroxi-flavanona [24]. La extracción que se realizó fue con EtOH, otro alcohol de propiedades similares a las del MeOH pero menos tóxico, por lo que es probable que los extractos etanólicos también presenten propiedades antioxidantes y antiinflamatorias [20,21] debido a la presencia de compuestos fenólicos, así como propiedades antimutagénicas reportadas previamente para los extractos metanólicos [25]. Además, para fines de uso como suplemento para la salud, es importante mencionar que tanto la luteolina como los extractos metanólicos se absorben desde el intestino detectándose en el suero humano [26], por lo que pueden ser utilizados en suplementos de administración oral [3].

## EXPERIMENTAL

### *Material vegetal*

Las muestras de cultivares no procesados fueron proporcionadas por dos institutos de Chuquisaca, el Instituto de Agroecología y Seguridad Alimentaria de la Universidad San Francisco Xavier de Chuquisaca (BIORENA, USFX), y el Instituto Superior Tecnológico Agroindustrial de Monteagudo (ISTAM) a través de acuerdos de colaboración con el Instituto de Investigaciones Químicas de la Universidad Mayor de San Andrés (IIQ, UMSA).

Muestras de 19 cultivares fueron proporcionadas por el BIORENA (1, 6-13, 23, 25-27, 30-34 y 37), quienes realizaron las colectas a partir del año 2013, principalmente en áreas productoras de maní dentro el Departamento de Chuquisaca mostradas en la **Tabla 1**. Una vez colectadas las mismas fueron almacenadas a -5 °C en el Banco de Germoplasma del BIORENA dependiente de la USFX. El material genético conservado fue cultivado en el Municipio de El Villar durante los años 2014 a 2015, habiéndose obtenido rendimientos en estas accesiones de hasta 7,47 Tn/ha, mientras que el promedio nacional se encuentra muy por debajo de esos rendimientos. Las muestras fueron identificadas por el personal del mismo instituto, quienes además dieron los datos de los lugares de colecta. Una muestra de cada cultivar y la información correspondiente a su localización y producción se encuentran en el BIORENA, USFX.

Por otra parte, los restantes 18 cultivares, de la **Tabla 1**, se obtuvieron en colaboración del ingeniero Eloy Blanco del ISTAM, la colecta de los cultivares de maníes se realizó en comunidades de los municipios de Villa Vaca Guzmán (Muyupampa), Monteagudo y Padilla. Además, el Ing. Blanco proporcionó algunas variedades que poseía en el Instituto. Los cultivares colectados, fueron secados por el lapso de un mes a temperatura ambiente, en un ambiente debidamente ventilado del IIQ UMSA, protegiéndolos de los rayos del sol. La identificación de los cultivares fue realizada por el Ing. Blanco quien además posee en el ISTAM muestras de todos los cultivares proporcionados.

Finalmente, las muestras 38 al 41 fueron obtenidas en los mercados de Sucre, para poder realizar una comparación entre las muestras procesadas (tostadas) y no procesadas (sin tostar), así como de las muestras ofrecidas en los mercados de Sucre con las monitoreadas por personal del BIORENA e ISTAM. El nombre común de los cultivares y de la localidad de colecta fueron otorgados por las vendedoras del mercado. Muestras de estos cultivares se encuentran en el IIQ, UMSA.

### *Extracción*

Una vez obtenidas las muestras secas, fueron trituradas con ayuda de una moledora eléctrica, evitando ser totalmente pulverizadas, posteriormente se tomó de 200 a 500 mg de cada muestra, adicionándoles etanol de 96° en la relación 1:15 (peso: volumen), sometiendo las muestras a un proceso de maceración con agitación constante, por el lapso de 4 horas a temperatura ambiente. Los extractos así obtenidos fueron filtrados a gravedad con papel filtro Whatman #4 y concentrados por rotaevaporación hasta sequedad. Finalmente, para eliminar por completo el solvente atrapado, fueron secados por 15 minutos más, en una bomba de alto vacío, obteniendo así los extractos secos y el rendimiento de cada extracto respecto al material seco. Esta operación se repitió por triplicado para cada muestra analizada.

### *Análisis por HPLC*

Para la identificación y cuantificación de luteolina, se utilizó un equipo HPLC Agilent 1100 series acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD (G1315B) Agilent. La columna utilizada fue una Agilent Technologies EclipsePlus C-18 (4.6×250mm×5µm) con una pre-columna de 0.5 µm. El compartimiento de la columna fue calentada a 40 °C. Los solventes utilizados fueron acetonitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich), ácido fosfórico al 85%



(Merck) y agua Ultrapurificada a 18.3 M de resistencia, la cual fue filtrada con papel filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  en un sistema de filtración, Sartorius Stedim Biotech, antes de su uso.

#### Curva de calibración

Para la curva de calibración se prepararon soluciones con 90 ppm del patrón interno, quercetina y diferentes concentraciones del analito a cuantificar, luteolina, 30, 60, 90, 120 y 150 ppm aforando cada solución a 1 ml. Con estas muestras se procedió al análisis por HPLC detectando el analito al tiempo de retención de 18,7 min y la quercetina a 19,4 min (Figura 2) y con la relación de alturas de la señal de la luteolina respecto a la señal de la quercetina Vs la relación de las concentraciones de la luteolina, respecto a la quercetina, se realizó la curva que sigue la ecuación  $Y = 5,1991X$  ( $R^2 = 0,999$ ).

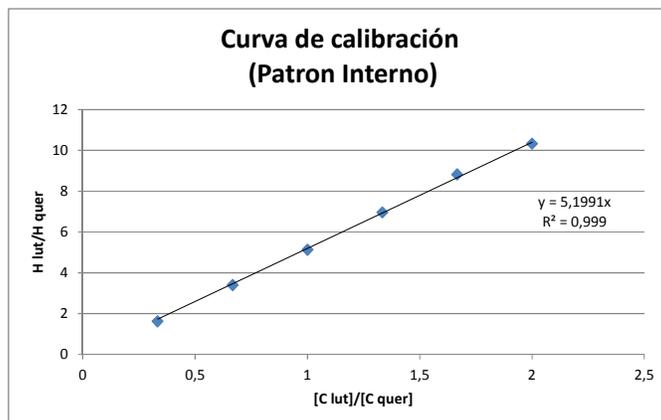


Figura 7. Curva de calibración de luteolina usando el Método HPLC de Patrón Interno

#### Cuantificación de la luteolina

Para la cuantificación de luteolina, se procedió a disolver el total del extracto seco obtenido con 1 ml de metanol grado HPLC, filtrándolo previamente en membrana PTFE especiales de 0.45 $\mu\text{m}$ , para el análisis de HPLC. El extracto final fue trasvasado a los viales HPLC que ya contenían el patrón interno, quercetina.

El volumen de inyección de las muestras fue de 25  $\mu\text{L}$  a un caudal de 0,6 ml / min. La fase móvil fue un sistema de disolvente binario que consiste en (A) 0.1% de ácido fosfórico y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado fue 25% B a 0 min, 28% B después de 5 min, 30% B después de 10 min, 32,8% B después de 17 min, 36% B después de 20 min y 100% B después de 22 min hasta los 25 minutos. La absorbancia UV del eluato, se registró utilizando un detector de arreglo de diodos múltiple a 210 nm, 280 nm y 360 nm. Las señales de la luteolina y quercetina fueron determinadas en el cromatograma a 360 nm a los tiempos de retención antes señalados y la cantidad de luteolina fue cuantificada utilizando la curva de calibración descrita. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado reportándose el promedio  $\pm$  la desviación estándar.

#### Aislamiento e identificación de la luteolina

Para el aislamiento de luteolina se pesó 1 g de extracto etanólico obtenido del cultivar “larguillo” tostado de Icla, el cual se lo disolvió en MeOH y se pasó por un “cadrige” (DPA-6S) para separar algunas impurezas, después de este proceso se obtuvo 329,5 mg del extracto tratado, que se sembró en una columna Sephadex LH-20 obteniéndose en las últimas fracciones 29,2 mg de luteolina pura por comparación con el estándar del compuesto.

Para confirmar su identificación se realizaron espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obteniéndose los siguientes resultados, que confirmaron la estructura propuesta.

RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz, DMSO) 7.41 (1H, *dd*,  $J = 8.1, 1.9$  Hz, H-6'), 7.38 (1H, *d*,  $J = 1.9$  Hz, H-2'), 6.87 (1H, *d*,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.65 (1H, *s*, H-3), 6.42 (1H, *d*,  $J = 1.8$  Hz, H-8), 6.17 (1H, *d*,  $J = 1.8$  Hz, H-6).

RMN  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, DMSO) 182.1 (C-4), 164.6 (C-7), 164.3 (C-2), 161.9 (C-9), 157.7 (C-5), 150.1 (C-4'), 146.2 (C-3'), 121.9 (C-6'), 119.4 (C-1'), 116.4 (C-5'), 113.8 (C-2'), 104.1 (C-3), 103.3 (C-10), 99.2 (C-6), 94.3 (C-8).



### Termoestabilidad de la luteolina

Para la evaluación de la termoestabilidad, se preparó una solución de 5 ppm del compuesto aislado luteolina en EtOH al 96 °G, de esta solución se tomó una alícuota de 3 ml que fue sometida a calentamiento con una termocupla a 80°C por tiempos controlados de 1, 3, 7, 24, 48 y 72 h, después de cada lapso de tiempo se realizó un espectro de barrido UV entre 250 y 450 nm, midiéndose la absorbancia en el  $\lambda_{\max}$  de 352 nm, con estos datos luego se realizó la gráfica de Absorbancia Vs Tiempo (Figura 6) que muestra la termoestabilidad de la luteolina.

## RECONOCIMIENTOS

Los investigadores agradecen al proyecto “Productos fitoterapéuticos y cosmecéuticos a partir de residuos agroindustriales” financiado por fondos ASDI concursables. Así como al proyecto “Bases científicas para el desarrollo de productos naturales con valor agregado a partir de residuos de café y maní” financiado por recursos IDH-UMSA.

Así mismo agradecen a los institutos BIORENA de la USFX, ISTAM e IIQ de la UMSA, por el apoyo en infraestructura, carga horaria de investigadores y equipos para la realización del presente trabajo.

## REFERENCIAS

1. López-Lázaro M. **2009**, Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin; *Mini Rev Med Chem*. 9(1), 31-59.
2. Nabavi, S.F., Braidly, N., Gortzi, O., Sobarzo-Sanchez, E., Daglia, M., Skalicka-Wojcik, K., Nabavi, S.M., **2015**, Luteolin as an anti-inflammatory and neuroprotective agent: A brief review, *Brain Res Bull*. 119(Pt A), 1-11.
3. Ueda, H.; Yamazaki, C.; Yamazaki, M., **2002**. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol. Pharm. Bull.* 25(9), 1197-202.
4. Pérez-García, F., Adzet, T., Cañigual, S., **2000**, Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes; *Free Radical Research* 33(5), 661-665.
5. Seelinger, G., Merfort, I., Schempp, C.M., **2008**. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin, *Planta Med.* 74(14), 1667-1677
6. Horinaka, M., Yoshida, T., Shiraiishi, T., Nakata, S., Wakada, M., Nakanishi, R., Nishino, H., Matsui, H., Sakai, T., **2005**, Luteolin induces apoptosis via death receptor 5 upregulation in human malignant tumor cells; *Oncogene* 24(48), 7180-7189.
7. Lee, H.J., Wang, C.J., Kuo, H.C., Chou, F.P., Jean, L.F., Tseng, T.H., **2005**, Induction apoptosis of luteolin in human hepatoma HepG2 cells involving mitochondria translocation of Bax/Bak and activation of JNK, *Toxicology and Applied Pharmacology*; 203(2), 124-131.
8. Chowdhury, A.R., Sharma, S., Mandal, S., Goswami, A., Mukhopadhyay, S., Majumder, H.K., **2002**, Luteolin, an emerging anti-cancer flavonoid, poisons eukaryotic DNA topoisomerase I, *Biochemical Journal* 366 (2), 653-661
9. Ko, W.G., Kang, T.H., Lee, S.J., Kim, Y.C., Lee, B.H., **2002**, Effects of luteolin on the inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human myeloid leukaemia cells; *Phytotherapy research* 16(3), 295-298.
10. Lin, Y., Shi, R., Wang, X., Shen, H.M., **2008**, Luteolin, a Flavonoid with Potential for Cancer Prevention and Therapy, *Current Cancer Drug Targets*, 8(7), 634-646.
11. Yasukawa, K., Takido, M., Takeuchi, M., Nakagawa, S., **1989**, Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation in mice. *Chem Pharm Bull*, 37(4), 1071-1073.
12. Qiu, J., Chen, L., Zhu, Q., Wang, D., Wang, W., Sun, X., Liu, X., Du, F., **2012**, Screening natural antioxidants in peanut shell using DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS methods, *Food Chemistry*, 135 (4), 2366-2371
13. Bertoli, D.J., Seijo, G., Freitas, F.O., Valls, J.F.M., Leal-Bertoli S.C.M., Moretzsohn, M.C., **2011**, An overview of peanut and its wild relatives; *Plant Genetic Resources*, 9(1), 134-149..
14. Krapovickas, A., Gregory, W.C., **1994**, Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae), *Bonplandia* 8(1-4): 1-186.
15. Krapovickas A., Consideraciones prehistóricas sobre el origen del maní cultivado , **2004**, Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional del Nordeste - Corrientes Sesión Pública del 5 de Noviembre de 2004
16. <http://www.ine.gov.bo/index.php/estadisticas-por-actividad-economica/industria-manufacturera-y-comercio-4>, 30/7/2017.
17. Radhakrishnan, R., Pae, S-B., Lee, B-K., In-Youl, B., **2013**, Evaluation of luteolin from shells of Korean peanut cultivars for industrial utilization, *African Journal of Biotechnology*, 12(28), 4477-4480.
18. Almanza, G.R., Salcedo, L. **2012**. De la planta al medicamento. Parte I Investigaciones de *Baccharis latifolia* (Chilca). Ed. I. Editorial Académica Española, Saarbrücken, Alemania, 174-190.
19. Snyder, L.R., Kirkland J.J., Dolan, J.W., **2010**, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Third edition, Hoboken, New Jersey-USA, Wiley & Sons., pp. 520-527.
20. Yen, G.C., Duh, P.D., **1995**. Antioxidant activity of methanolic extracts of peanut hulls from various cultivars. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 72 (9), 1065-1067.
21. Mar, M.W., Azizah, A-H., Badlishah, S.B., Farooq, A., Nazamid, S., **2011**, Phenolic compounds and antioxidant activity of peanut's skin, hull, raw kernel and roasted kernel flour, *Pakistan Journal of Botany*, 43(3), 1635-1642.
22. Fischer, F., Zufferey, E., Bourgeois, J-M., Héritier, J., Micaux, F., **2011**. UV-ABC screens of luteolin derivatives compared to edelweiss extract, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 103(1), 8-15.
23. Murakami, M., Yamaguchi, T., Takamura, H., Matoba, T., **2004**, Effects of thermal treatment on radical-scavenging activity of single and mixed polyphenolic compounds, *Journal of Food Science*, 69 (1), 7-10.



24. Wee, J. H., Moon, J. H., Eun, J. B., Chung, J. H., Kim, Y. G., & Park, K. H. **2007**, Isolation and identification of antioxidants from peanut shells and the relationship between structure and antioxidant activity, *Food Science and Biotechnology*, *16*, 116–122.
25. Yen, G.C., Duh, P.D., **1996**. Antimutagenic effect of methanolic extracts from peanut shells. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, *60*(10), 1698–1700.
26. Shimoi, K., Okada, H., Furugori, M., Goda, T., Takase, S., Suzuki, M., Hara, Y., Yamamoto, H., Kinae, N., **1998**, Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.* *438*(3), 220–224

# Cambios por altitud y posición de flavonoides totales en hojas de *Baccharis latifolia* (chilca) y su correlación con propiedades fisicoquímicas del suelo

## Changes by altitude and position of total flavonoids in *Baccharis latifolia* (chilca) leaves and its correlation with physicochemical properties of soils

Soledad Enríquez<sup>1,2</sup>, Angela San Martín<sup>3</sup>, Ruth E. Quispe<sup>4</sup>, Patricia Amurrio<sup>1</sup>, Juan Carlos Peñaranda<sup>4</sup>, Alberto Calle<sup>3</sup> y Giovanna R. Almanza<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Unidad de Suelos, Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia

<sup>2</sup> Carrera de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

<sup>3</sup> Laboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas, Universidad Mayor de San Andrés, Campus Universitario de Cota Cota, P.O. Box. 303, La Paz, Bolivia

<sup>4</sup> Jardín Botánico "La Paz", Herbario Nacional de Bolivia, Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia.

Contactos/Contacts: Giovanna R. Almanza – email: [giovyalmanza@gmail.com](mailto:giovyalmanza@gmail.com), [galmanza3@umsa.bo](mailto:galmanza3@umsa.bo)

### ABSTRACT

*Baccharis latifolia*, commonly known as Chilca, is a plant with recognized anti-inflammatory activity at both traditional and scientific levels. The responsible of part of this activity are the flavonoids, whose production varies by diverse environmental aspects. This paper was focused on characterizing and quantifying flavonoids of *B. latifolia* leaves in dry season. A total of 12 flavonoids were identified using NMR and HPLC-DAD techniques. The quantification of total flavonoids was done by quelation with AlCl<sub>3</sub> respect to Luteolin, comparing the total flavonoid contents in apical middle and basal leaves, at three heights in the hillside of Lluto, La Paz (4187, 4000 and 3825 m.a.s.l.), determining that the leaves with the highest concentration of flavonoids are the apical and that, in this season, there is not a clear correlation between the studied altitudes and the production of flavonoids. Additionally, we analyzed the correlation between some physicochemical properties of soils and the production of flavonoids, determining that richer soils, with the highest percentage of nitrogen, reduces the concentration of flavonoids, while the pH, electrical conductivity and the percent of clay has a directly proportional relationship with the production of flavonoids.

**Keywords:** *Baccharis latifolia*, chilca, total flavonoids, altitudinal gradient, apical leaves, soils

### RESUMEN

*Baccharis latifolia*, comúnmente conocida como Chilca, es una especie de reconocida actividad antiinflamatoria tanto a nivel tradicional como científico. Los responsables de parte de esta actividad son los flavonoides, cuya producción varía por diversos aspectos medioambientales. Este trabajo se centró en la caracterización y cuantificación de flavonoides de hojas de *B. latifolia* en época seca. Un total de 12 flavonoides fueron identificados mediante técnicas de RMN y HPLC-DAD. La cuantificación de flavonoides totales, se realizó por quelación con AlCl<sub>3</sub> respecto a la Luteolina, en hojas apicales, medias y basales; a tres alturas de la ladera de Lluto, La Paz (4187, 4000 y 3825 m.s.n.m), determinando que las hojas con mayor concentración de flavonoides son las apicales y que, en esta estación, no hay una clara correlación entre las alturas estudiadas y la producción de flavonoides. Adicionalmente, analizamos la correlación entre algunas propiedades fisicoquímicas de los suelos y la producción de flavonoides, determinando que en suelos más ricos, con mayor porcentaje de nitrógeno, la concentración de flavonoides disminuye, mientras que el pH, la conductividad eléctrica y el porcentaje de arcilla tienen una relación directamente proporcional con la producción de flavonoides.

**Palabras clave:** *Baccharis latifolia*, chilca, flavonoides totales, gradiente altitudinal, hojas apicales, suelos

## INTRODUCCION

*Baccharis latifolia*, conocida como chilca, es una especie vegetal utilizada desde tiempos pre-colombinos (Acosta, 1992). Ha sido bastante difundida entre los habitantes de la zona Andina llegando incluso a ser considerada como una planta sagrada, por los efectos terapéuticos que se le atribuían (Acosta, 1992). En La Paz, Bolivia, es una especie ampliamente conocida por la población, que la utiliza principalmente para aliviar inflamaciones externas, fracturas, dislocaciones y dolores reumáticos (Abad & Bermejo, 2007; Salcedo & Almanza, 2011). Sobre esta base, nuestro equipo multidisciplinario realizó varios estudios que demostraron la presencia de flavonoides en las partes aéreas de la planta (Salcedo *et al.*, 2001; 2003), los cuales mostraron actividad antiinflamatoria en otros estudios (Seelinger *et al.*, 2008; Fourie & Snyckers, 1984; Hämäläinen *et al.*, 2007), por lo que son considerados principios activos de la planta. Por otra parte, esta especie fue sometida a estudios de genotoxicidad por el método SMART (Pillco, 2005), demostrando que el extracto orgánico no es genotóxico y estudios de actividad antiinflamatoria *in vivo* (Gonzales *et al.*, 2007), que demuestran una actividad antiinflamatoria significativa, así como una evaluación de toxicidad pre-clínica aguda en animales de experimentación (Loza *et al.*, 2011), estudios que junto a ensayos clínicos y otros trabajos complementarios promovieron el uso de esta planta en una crema antiinflamatoria y analgésica comercializada en Bolivia con el nombre de Chillkaflam (Almanza & Salcedo, 2012).

Al ser una especie de potencial interés económico, por sus efectos terapéuticos, se deben hacer estudios sobre su producción y sobre la relación de la producción de principios activos (flavonoides) con diferentes factores medioambientales. *B. latifolia* es dioica crece en suelos sueltos, deteriorados con algo de materia orgánica y humedad; pendientes suaves a moderadas; ocasionalmente en cañadas, en potreros compactos y en terrazas de canteras (Amurrio & Poma, 2015). En cuanto al requerimiento de suelos esta planta no es exigente, puesto que por su rusticidad tiene una gran tolerancia a suelos pobres, se adapta a cualquier textura y habita lugares con alta pedregosidad y con carencias de agua (Beck & García, 1991). Se distribuye en Latinoamérica desde Venezuela a Bolivia y norte de Argentina (Prada *et al.*, 2016) su rango altitudinal esta observado entre 1600 a 3800 m sobre el nivel del mar (msnm), aunque se han encontrado algunos especímenes sobre los 3.800 msnm.

Conociendo que la producción de flavonoides en una planta puede variar por diferentes aspectos, como la altitud, los niveles de radiación UV y la estación del año (Bernal *et al.*, 2013; Sartor *et al.*, 2013), entre otros, y que de acuerdo a estudios previos (Almanza & Salcedo, 2012), los flavonoides de *B. latifolia* se encuentran principalmente en las hojas, en el presente trabajo primero se identificó y analizó los flavonoides mayoritarios presentes en un extracto etanólico, por HPLC-DAD, luego se determinó cuanto de masa foliar y flavonoides totales se producen en hojas apicales, medias y basales, de especímenes de *B. latifolia* desarrollados en tres puntos de diferente altitud de la ladera noroeste de la comunidad de Lluto, una región del Valle de La Paz con alta producción natural de esta especie vegetal, y finalmente se hizo una caracterización fisicoquímica de los suelos donde se desarrolla esta especie para conocer la influencia de éste factor, en la producción de flavonoides. Todo el trabajo fue realizado el mes de Junio (invierno, época seca), en el que la radiación UV solar es más baja que en verano (época húmeda).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Zona de estudio y régimen de muestreo*

La zona de estudio seleccionada fue la ladera noroeste de la localidad de Lluto; provincia Mecapaca, departamento de La Paz, Bolivia. La región fue seleccionada porque presenta una gradiente altitudinal bastante pronunciada (entre 3450 y 4200 msnm), una alta producción natural de *B. latifolia* y ausencia de contaminación ambiental urbana que incida en el crecimiento de las plantas estudiadas.

El estudio fue realizado en el mes de junio de 2015, caracterizado por ser una época seca y fría (invierno). Inicialmente se localizaron tres zonas de estudio en función a las poblaciones más representativas de *B. latifolia* (zona 1: 4187 msnm; zona 2: 4000 msnm; zona 3: 3825 msnm) donde se determinaron la altura,

pendiente, coordenadas y la dosis de radiación UV solar (UVA, 320 - 400 nm y UVB 290 -320 nm) (Tabla 2). La georeferenciación de los puntos se realizó con GPS GARMIN 64s, la altitud se midió con altímetro Barigo model 39, la pendiente se midió con clinómetro SUUNTO PM5/360PC. Para la medición de la dosis de radiación UVA y UVB se realizaron tres medidas por zona en un día casi totalmente despejado (con nubosidad leve), a medio día (12:00-13:00), utilizando para ello un dosímetro Gigahertz-Optick XD-9501.

En cada una de las zonas se identificaron 10 plantas (individuos por zona), tomándose los siguientes parámetros de cada una de las plantas: altura de planta, diámetro de tallo (rodal), diámetro de copa y número de ramas (Tabla 3). Adicionalmente se tomaron muestras de cada zona de hojas apicales, medias y basales para los estudios químicos. El muestreo se realizó al azar de los individuos seleccionados. Finalmente, en cada una de las zonas se realizaron calicatas de 100 cm de profundidad para tomar muestras de suelos para los análisis fisicoquímicos.

Los especímenes vegetales colectados fueron identificados por Ruth Eliana Quispe y Esther Valenzuela del Jardín Botánico “La Paz” del Herbario Nacional de Bolivia (JBLP), donde son conservados para realizar comparaciones e identificaciones posteriores.

### ***Obtención de extractos***

Las hojas colectadas de *B. latifolia* fueron secadas a temperatura ambiente y luego trituradas de forma manual. El material vegetal seco así obtenido fue extraído por maceración con EtOH de 96°, previamente destilado, durante 15 min a temperatura ambiente. Los extractos fueron filtrados y concentrados hasta sequedad por rotaevaporación para ser guardados a temperatura ambiente en lugares secos y oscuros hasta su uso.

### ***Identificación de flavonoides***

Para la identificación de flavonoides 300 g de hojas secas de individuos de la zona 2, fueron sometidas al proceso de extracción descrito dando 31,4 g de extracto etanólico seco. Este extracto, fue desengrasado con Éter de Petróleo (60-80°C) dando 19,3 g de un extracto con gran cantidad y variedad de flavonoides de acuerdo al análisis en placas cromatográficas (TLC) de Silicagel 60 F<sub>254</sub> (Merck) reveladas con ácido sulfúrico al 5% y FeCl<sub>3</sub> al 3%. El extracto desengrasado fue sometido a un primer fraccionamiento grueso utilizando Cromatografía Líquida al Vacío (VLC) en soporte de Silicagel G-60 (Merck), utilizando como eluyentes mezclas de Éter de Petróleo (40-60°C) y Acetato de Etilo en orden creciente de polaridad. Las fracciones obtenidas fueron analizadas en placas de Sílicagel y sometidas a posteriores separaciones cromatográficas utilizando técnicas de cromatografía de adsorción en columna abierta con soporte de Sílicagel G-60 y cromatografía de exclusión molecular utilizando Sephadex LH-20, además de técnicas de purificación por re-cristalización en mezclas de MeOH-DCM y MeOH-AcOEt lográndose aislar los flavonoides: **1** (7,1 mg), **3** (3,6 mg), **4** (9,1 mg), **5** (8,9 mg), **6** (2,4 mg), **7** (5,3 mg), **8** (4,8 mg), **9** (3,2 mg), **10** (1,8 mg), **11** (3,2 mg), **12** (28,2 mg) y **13** (7,1 mg) (**Tabla 3**), los cuales fueron identificados realizando un análisis de sus espectros de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, obtenidos en un equipo Bruker de 300 MHz utilizando mezclas de MeOD y CDCl<sub>3</sub> como solventes, en comparación con datos previamente obtenidos en el Laboratorio de Bioorgánica y datos bibliográficos. El flavonoide **2** no fue aislado, sólo fue identificado por comparación con un patrón de quercetina en cromatogramas HPLC-DAD.

### ***Análisis de flavonoides por HPLC-DAD***

Para el análisis de flavonoides por cromatografía de alta eficiencia, se utilizó un equipo HPLC Agilent 1100 series acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD (G1315B) Agilent. La columna utilizada fue una columna Agilent Technologies EclipsePlus C-18 (4.6×250mm×5µm) con una pre-columna de 0.5 µm. El compartimiento de la columna fue calentado a 40 °C. Los solventes utilizados fueron acetonitrilo grado HPLC (Sigma-Aldrich), ácido fosfórico al 85% (Merck) y agua Ultrapurificada a 18.3 M de resistencia,

la cual fue filtrada con papel filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  en un sistema de filtración, Sartorius Stedim Biotech, antes de su uso.

El método HPLC-DAD utilizado fue el siguiente: El volumen de inyección de las muestras fue de 25  $\mu\text{L}$  a un caudal de 0,6 ml / min. La fase móvil fue un sistema de disolvente binario que consiste en (A) 0.1% de solución acuosa de ácido fosfórico y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado fue 25% B a 0 min, 28% B después de 5 min, 30% B después de 10 min, 32.8% B después de 17 min, 36% B después de 20 min, 42% B después de 25 min, 44.8% B después de 33 min, 53.5% B después de 40 min y 100% B después de 60 min hasta los 65 min. La absorbancia UV del eluato se registró utilizando un detector de arreglo de diodos múltiple a 210 nm, 280 nm y 360 nm.

### ***Cuantificación de flavonoides totales***

Para la cuantificación de flavonoides totales en extractos y material vegetal seco se utilizó el método colorimétrico por quelación con  $\text{AlCl}_3$  descrito por Chang *et al.* (2002). Como flavonoide estándar se utilizó la Luteolina, uno de los flavonoides mayoritarios de *B. latifolia* de reconocido efecto antiinflamatorio (Seelinger *et al.*, 2008), porque el máximo de absorbancia del flavonoide quelado mostraba alta coincidencia con los de los extractos luego del proceso de quelación. Para la curva de calibración se prepararon 0,5 ml de soluciones a 30, 60, 90, 120 y 150 ppm de Luteolina, con 1,5 ml de etanol destilado 96°, a los cuales se adicionó 2,8 ml de agua destilada, 0,1 ml de 10% de solución de  $\text{AlCl}_3$  (m/v), y 0,1 ml de 1 mol/L de solución de acetato de potasio, causando la formación de un complejo amarillo intenso. La solución se incubó durante 30 a 40 min y después se sometió a análisis espectral en el rango de 200 a 500 nm. La absorbancia máxima ( $\lambda_{\text{max}}$ ) se observó a 406 nm, utilizando esta longitud de onda para su respectiva recta de calibración, que tiene como ecuación  $y = 0,082x$  con un  $R^2 = 0,9988$ .

Para la cuantificación de flavonoides en las hojas se tomaron 30  $\mu\text{L}$  de una solución muestra (extracto obtenido de 1g de hojas extraídas con 15 mL de EtOH, concentrado y aforado a 5 mL), se añadió 1970  $\mu\text{L}$  de etanol 96°GL y luego se siguió el procedimiento descrito en el párrafo anterior a partir de la adición de  $\text{H}_2\text{O}$  midiéndose la absorbancia luego de la formación del complejo a 406 nm.

Los flavonoides totales en las hojas fueron calculados respecto a la Luteolina usando la curva de calibración, expresando el contenido de flavonoides en equivalentes de Luteolina (mg Luteolina/g material seco). Los datos se obtuvieron por triplicado.

### ***Determinación de propiedades fisicoquímicas del suelo***

Las propiedades físico-químicas del suelo se determinaron mediante los siguientes métodos: Textura o porcentaje de arcilla, se analizó con el método del hidrómetro de Bouyoucos, que permite cuantificar las proporciones de arena, limo y arcilla. A través de estos datos, con el triángulo textural del USDA se determina la clase textural correspondiente (Dewis & Freitas, 1984); Acidez (pH), la medición del pH se realizó en agua destilada, en una relación de suelo agua 1:2,5 (Gavlak *et al.*, 2005); Conductividad eléctrica (CE), se midió con el método del potenciómetro, que mide la cantidad de sales presentes en el suelo. Este parámetro fue medido en una relación suelo agua de 1:2,5 (Gavlak *et al.*, 2005); Materia Orgánica (MO), se determinó mediante el método de combustión húmeda que cuantifica la cantidad de carbono orgánico según lo descrito en Black *et al.* (1965) y Page *et al.*, (1982); Nitrógeno (N), fue determinado por el método de Kjeldahl; Fósforo (P) disponible fue cuantificado por el método de Olsen modificado, realizando la extracción de fósforo de las muestras en una solución de bicarbonato de sodio pH 8,5 (Muñoz, *et al.*, 2000; Cochrane & Barber, 1993); Finalmente los cationes intercambiables (calcio, sodio, magnesio y potasio), fueron determinados mediante el método espectrofotométrico de Absorción Atómica (Gavlak *et al.*, 2005).

### ***Análisis estadístico***

Para las variables de concentración de flavonoides se realizó un análisis estadístico con el programa SPSS statistics versión 2.0. y con los datos tomados de una población de diez plantas por zona se realizó un análisis de varianza.

Para los análisis estadísticos de los parámetros físicos químicos de suelos de la capa superficial del suelo (% de arcilla, pH, conductividad eléctrica, % de materia orgánica, % de nitrógeno y contenido de fósforo disponible), se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis.

Para determinar el nivel de correlación entre las propiedades fisicoquímicas y la producción de flavonoides se utilizó el análisis de correlación de Pearson

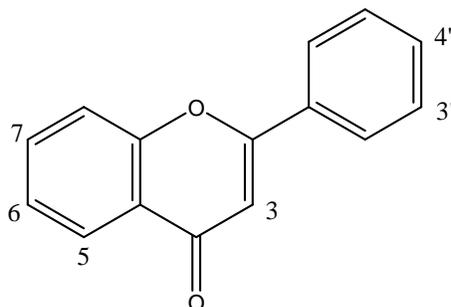
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La especie *B. latifolia*, objeto del presente estudio, es una planta medicinal con varios antecedentes de propiedades farmacológicas (Almanza & Salcedo, 2012; Abad & Bermejo, 2007), que han dado las bases científicas para el desarrollo de una crema antiinflamatoria y analgésica comercializada en Bolivia desde marzo de 2016 con el nombre de Chillkaflam. Al ser una especie utilizada en un producto industrializado, son necesarios estudios sobre su producción y sobre la relación de la producción de principios activos con diferentes factores medioambientales, campo en el cual pretende contribuir el presente trabajo.

### Identificación y análisis HPLC-DAD de flavonoides

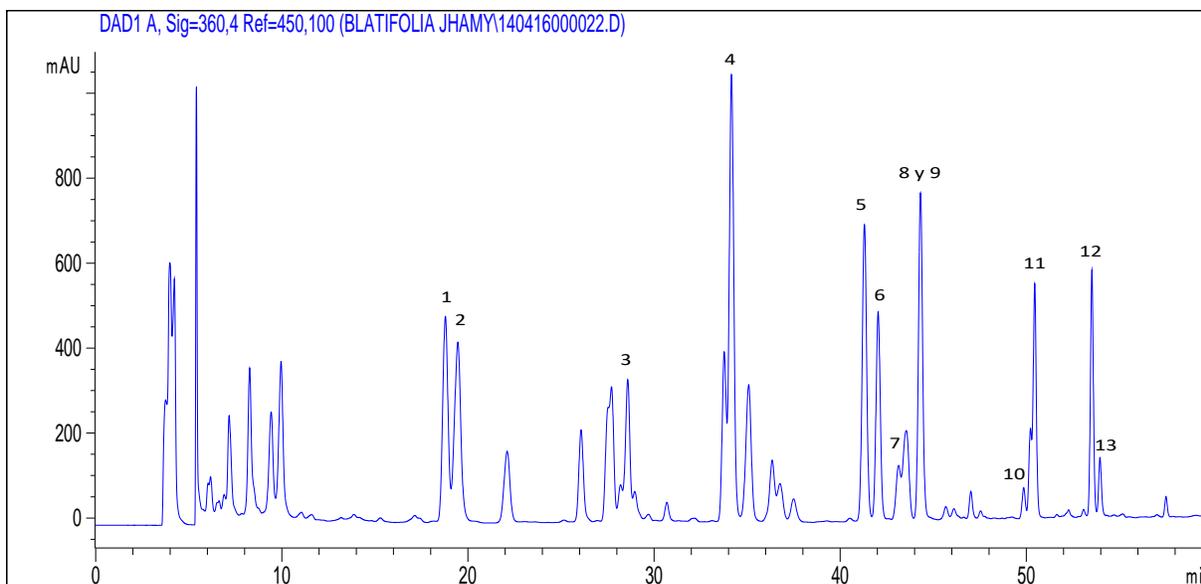
De acuerdo a los estudios previos, esta especie vegetal tiene flavonoides los cuales son importantes principios antiinflamatorios (Almanza & Salcedo, 2012; Ueda *et al.*, 2002; Kanadaswami *et al.*, 2005; Pinzon *et al.*, 2011) por lo que el presente trabajo se centró en el análisis de flavonoides en la planta.

Para su análisis se realizó la identificación de 13 flavonoides del extracto etanólico de *B. latifolia*, para ello se aisló la mayoría de ellos utilizando técnicas cromatográficas de adsorción en CC y VLC de Silicagel G-60, para luego utilizar técnicas de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , para su identificación.



**Tabla 1.** Flavonoides identificados en el extracto EtOH de hojas de *B. latifolia*

Nº	$t_R$	3	5	6	7	3'	4'	Referencias
1	18,7	H	OH	H	OH	OH	OH	Flores <i>et al.</i> , 2012
2	19,5	OH	OH	H	OH	OH	OH	
3	28,6	OH	OH	H	OH	OMe	OH	Cao <i>et al.</i> , 2009.
4	34,1	OH	OH	H	OMe	OH	OH	Flores <i>et al.</i> , 2012
5	41,3	H	OH	H	OH	H	OMe	Flores <i>et al.</i> , 2012
6	42,0	H	OH	H	OMe	H	OH	Isaev <i>et al.</i> , 2011.
7	43,1	OH	OH	H	OH	H	OMe	Lee <i>et al.</i> , 2008.
8	44,3	OH	OH	H	OMe	OMe	OH	Flores <i>et al.</i> , 2012
9	44,3	OH	OH	H	OMe	H	OH	Lee <i>et al.</i> , 2008.
10	49,8	H	OH	OMe	OMe	H	OMe	Alwahsh <i>et al.</i> , 2015
11	50,4	OH	OH	H	OMe	OMe	OMe	Flores <i>et al.</i> , 2012
12	53,5	H	OH	H	OMe	H	OMe	Flores <i>et al.</i> , 2012
13	53,9	OH	OH	H	OMe	H	OMe	Flores <i>et al.</i> , 2012



**Figura 1.** Cromatograma HPLC-DAD del extracto EtOH de hojas de *B. latifolia*, obtenido a  $\lambda = 360$  nm, donde se muestran las señales correspondientes a los flavonoides identificados

La mayoría de los flavonoides aislados (**1, 4, 5, 8, 11, 12, 13**) ya fueron anteriormente encontrados y reportados en la misma especie por nuestro grupo de investigación (Flores *et al.*, 2012) por lo que se contaba con espectros y patrones de comparación. Los que no se reportaron anteriormente en esta especie, fueron identificados mediante un análisis de sus espectros de RMN1D y 2D, así como por comparación de sus datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  con otros reportados previamente para el compuesto (Tabla 1). Sólo el compuesto **2** (quercetina) no fue aislado y sólo fue identificado por comparación, del  $t_R$  y espectro UV, con un patrón en el cromatograma HPLC-DAD (Figura 1).

El análisis de espectros UV de cada compuesto en el cromatograma HPLC-DAD mostró que los compuestos por debajo de un  $t_R$  de 12 min no son flavonoides, sino compuestos fenólicos simples o derivados de ácido cinámico, pues muestran solo una banda de absorción con un  $\lambda_{\text{max}}$  entre 300 y 315 nm, mientras que los compuestos con  $t_R$  mayores a 18 min son flavonoides, pues muestran las dos bandas UV características de este tipo de compuestos. Adicionalmente, se puede ver en el cromatograma HPLC-DAD de la figura 1, que esta especie vegetal tiene una gran cantidad de flavonoides, alrededor de 25, de los cuales solo logramos identificar 13, la mayoría flavonas y flavonoles con las típicas sustituciones en los carbonos C-5, C-7, C-3' y C-4' (Tabla 1), todos muy parecidos entre sí, lo cual dificulta mucho su aislamiento.

#### ***Cuantificación de flavonoides totales en hojas apicales, medias y basales de especímenes de B. latifolia en tres niveles altitudinales***

Una vez que determinamos que esta especie vegetal contiene gran cantidad y variedad de flavonas y flavonoles quisimos hacer un estudio cuantitativo de la variación de flavonoides totales en hojas apicales, medias y basales de *B. latifolia* en tres niveles altitudinales de la ladera noroeste de la comunidad de Lluto, La Paz, Bolivia, para ver la influencia de diversos factores medioambientales en la producción de flavonoides. En la tabla 2 se observan los datos de altura, pendiente, coordenadas, radiación UVA y UVB solar en las zonas de estudio, donde se puede ver que la diferencia de alturas entre las zonas 1 y 2, así como 2 y 3 es menor a 200 m, lo que afecta la radiación UV solar en cada zona, pero solo levemente. Además hay considerar que el estudio se realizó en Junio, invierno en Bolivia, época seca caracterizada por cielos despejados o poco nublados, con menor porcentaje de radiación UV solar que en verano.

**Tabla 2. Datos de Altura, Pendiente, Coordenadas, UVA y UVB de las 3 zonas de estudio en Lluto**

Área de Estudio	Altura (msnm)	Pendiente	Coordenadas	UVA (W/m <sup>2</sup> )	UVB (W/m <sup>2</sup> )
Zona 1	4187	38%	Lat. Sur 16°37'23,3" Long. Oeste 68°01'8,4"	51,36 ± 0,81	1,54 ± 0,03
Zona 2	4000	30%	Lat. Sur 16°35'24,6" Long. Oeste 68°00'5,1"	45,52 ± 0,68	1,40 ± 0,02
Zona 3	3825	26%	Lat. Sur 16°35'20,8" Long. Oeste 68°01'10"	45,39 ± 1,05	1,20 ± 0,13

En cada una de las zonas se identificaron 10 plantas (individuos), tomándose los parámetros agronómicos mostrados en la Tabla 3, donde se puede observar que los individuos de la zona 2 son más grandes que los de las zonas 1 y 3, probablemente porque son ejemplares de mayor edad

**Tabla 3. Datos de parámetros agronómicos de *B. latifolia* en las tres zonas de estudio de la Ladera de Lluto.**

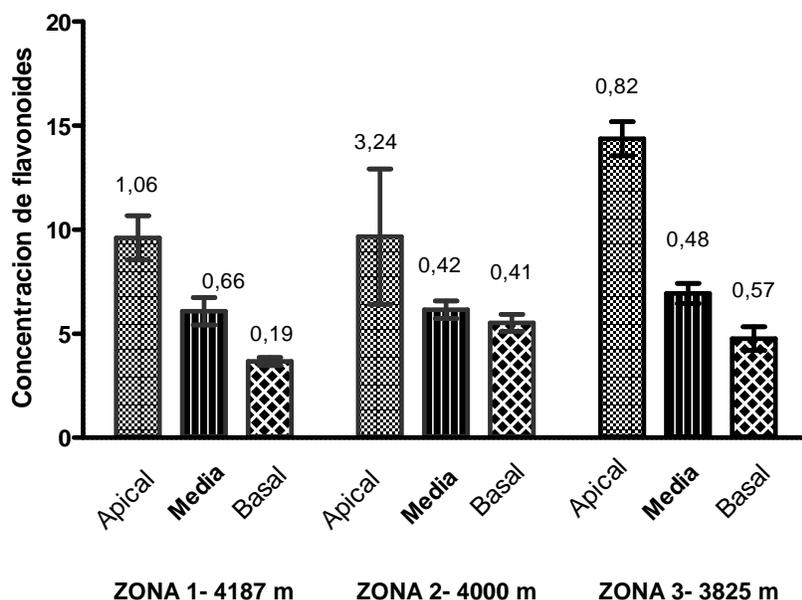
Área de Estudio	Altura de Planta (cm)	Diámetro de Tallo (cm)	Diámetro de copa (cm)	Número de Ramas
Zona 1 (4187 m)	121	16,0	71,3	13
Zona 2 (4000 m)	139	26,9	97,1	21
Zona 3 (3825 m)	135	17,1	71,1	19

Adicionalmente se tomaron muestras de hojas apicales, medias y basales, de cada una de las zonas, para la determinación de flavonoides totales. En la Tabla 4 y Figura 2, se muestran los resultados obtenidos para las tres zonas, observándose una mayor concentración de flavonoides totales en las hojas apicales, lo que se puede deber a tres factores, primero a que las hojas apicales son las más tiernas y las más susceptibles al ataque de herbívoros, si consideramos los flavonoides como un mecanismo de defensa, estas hojas requerirán mayor concentración de estos compuestos como defensa como indican Taiz & Zeiger (1991), Coley (1980), Turner (2001) y Calatayud (2010). Por otra parte, los flavonoides juegan un papel de fotoprotección frente a la Radiación UV solar, las hojas apicales son las más expuestas a la radiación UV solar por lo que también este factor influiría en una mayor concentración de flavonoides en estas hojas (Taiz & Zeiger, 1991; Mazza, 1999).

Por último, también pueden influir los procesos fisiológicos de la planta, estudios realizados por Strack (1997) y Lavola (1998), reportaron que durante la formación del brote y la etapa de desarrollo temprano de las hojas, es la luz ultravioleta que induce la síntesis fenólica, produciendo un aumento de la concentración de los compuestos fenólicos totales. Ocurre un fenómeno contrario durante el crecimiento tardío de la hoja, que se manifiesta en un incremento de materia seca, lo que daría lugar a un efecto de dilución disminuyendo las concentraciones de los compuestos fenólicos (Jones & Hartley, 1999).

**Tabla 4. Concentración de flavonoides totales en mg equivalentes de Luteolina/g de planta seca en hojas de *B. latifolia* colectadas en la Ladera de Lluto a tres niveles altitudinales**

Hojas	Zona 1 (4187 m)	Zona 2 (4000 m)	Zona 3 (3825 m)
Apicales	9,66 ± 1,06	9,66 ± 3,24	14,37 ± 0,82
Medias	6,07 ± 0,66	6,15 ± 0,42	6,96 ± 0,48
Basales	3,66 ± 0,19	5,51 ± 0,41	4,78 ± 0,57



**Figura 2.** Concentración de flavonoides totales en mg equivalentes de Luteolina/g de planta seca en hojas apicales, medias y basales de *B. latifolia* entre niveles altitudinales de la Ladera de Lluto, La Paz, Bolivia.

Por otro lado, no se encontró una correlación directa entre la concentración de flavonoides totales y la altitud, solo se nota un incremento claro de flavonoides en las hojas apicales de la zona 3 (parte baja de la ladera). Este resultado no era el esperado, ya que debido a que la Radiación UV solar se incrementa con la altura, se esperaba una mayor concentración de flavonoides en la zona 1, sin embargo parece que las diferencias en altura entre las tres zonas de estudio no son lo suficientemente grandes como para observar el cambio de estos compuestos por la radiación UV, la cual si bien se incrementa con la altura, no muestra un cambio significativo (**Tabla 2**). Otros estudios, tampoco mostraron una respuesta consistente de la variación de flavonoides totales respecto a la variación altitudinal (Bernal *et al.*, 2013), donde sugirieron que la variación del contenido de flavonoides totales y compuestos fenólicos no solo es causa de los cambios en la radiación UV por el gradiente altitudinal, sino que hay muchos otros factores abióticos más, como la temperatura, precipitación pluvial y características de los suelos, entre otros, que afectan y pueden explicar la variación en el contenido de flavonoides y otros compuestos fenólicos (Bernal *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, el factor que parece predominar en esta época del año es la humedad, pues durante el mes de Junio en las zonas de estudio existe menor radiación UV solar y mayor sequedad medioambiental. La zona alta es la zona más expuesta al viento y la zona más seca (**zona 1**: 7,37% de humedad en suelos; respecto a **zona 3**: 11,13% de humedad en suelos), el porcentaje de materia seca en las hojas apicales de los individuos de ésta zona es considerablemente mayor a la de los individuos de las zonas 2 y 3 (Tabla 5), por lo que las plantas de la zona 1 pueden haber respondido a una necesidad de inversión de energía en sobrevivencia y no así en defensa, invirtiendo su energía en la producción de rebrotes foliares y disminuyendo la energía para la producción de flavonoides, lo que concuerda con lo expuesto por Kitamura *et al.* (2007).

**Tabla 5. Porcentaje de materia seca en hojas de *B. latifolia* a tres niveles altitudinales**

Hojas	Zona 1 (4187 msnm)	Zona 2 (4000 msnm)	Zona 3 (3825 msnm)
<b>Apicales</b>	27,38%	22,34%	21,89%
<b>Medias</b>	12,74%	31,38%	25,05%
<b>Basales</b>	13,11%	25,5%	20,74%

**Relación de parámetros fisicoquímicos de suelos con la concentración de flavonoides.**

La tabla 6 muestra los resultados obtenidos para los parámetros edáficos estudiados en las tres zonas de estudio, para ello se realizó la toma de muestras de suelo superficial (0-30 cm), que fueron sometidas a análisis físicos, para determinar el % de arena, limo y arcilla (%Arcilla); así como a análisis químicos para la concentración de cationes intercambiables (CIC), porcentaje de materia orgánica (MO), % de nitrógeno y fósforo, además de su pH y conductividad eléctrica (CE.).

**Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos de suelos de las tres zonas en estudio**

ZONA	Sexo	PARAMETRO										
		% Arcilla	pH	uS/cm CE	meq/100 g SS					%		ppm P
					Ca	Mg	Na	K	CIC	MO	N	
Zona 1 -	F	16,6	6,6	31,4	4,7	5,3	0,012	0,28	10,3	2,2	0,3	2,5
	M	15,6	6,9	25,5	4,8	4,1	0,015	0,38	9,3	2,2	0,3	2,6
Zona 2 -	F	18,4	7,1	74,5	5	2,4	0,011	0,27	7,7	2,6	0,3	2,8
	M	15,7	6,8	38,7	3,8	1,3	0,004	0,28	5,4	2,1	0,3	4,9
Zona 3 -	F	18,4	7,5	84,7	3,5	4	0,014	0,27	7,8	0,8	0,1	7,7
	M	22,3	8	91,9	3,5	4,7	0,26	0,36	8,8	1,1	0,1	3,7

Para determinar la posible relación de los parámetros edáficos estudiados con la concentración de flavonoides se realizó un análisis de correlación de Pearson, determinándose que los parámetros que tienen significancia en la producción de flavonoides, son: pH, Conductividad Eléctrica (CE), % de Nitrógeno y % de Arcilla, pues son los que presentan un valor más bajo (Tabla 7).

**Tabla 7. Correlación entre parámetros fisicoquímicos con la concentración de flavonoides**

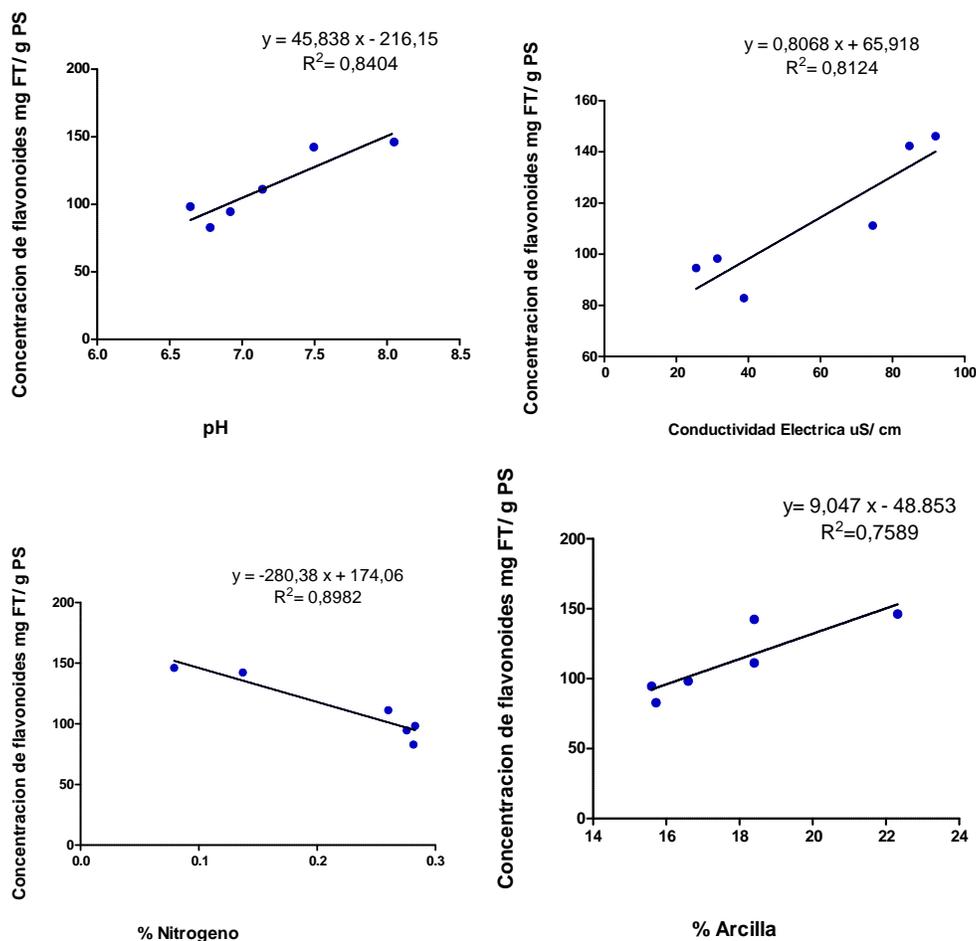
PARAMETRO DE SUELO	NIVEL DE CORRELACION DE PEARSON
pH	0,010*
CE	0,014 *
MO	- 0,048
% N	-0,004 *
P	0,356
CIC	0,711
Ca	0,239
Mg	0,387
K	0,861
Na	0,167
Ca/Mg	0,176
% Arcilla	0,024 *

\* Correlación significativa

En la Tabla 7 y la Figura 3, se puede observar una correlación positiva (directamente proporcional) entre el pH, la conductividad eléctrica y el porcentaje de arcilla de los suelos con la producción de flavonoides totales en *B. latifolia*. Mientras que, se observa una correlación negativa (inversamente proporcional) con

el nitrógeno total. Adicionalmente, es importante mencionar que también existe una correlación negativa con la Materia Orgánica (MO) aunque esta correlación no es muy significativa.

La zona 3, donde se encontró una mayor producción de flavonoides totales en hojas apicales, es la zona que cuenta con un mayor pH, una mayor conductividad eléctrica y un mayor porcentaje de arcilla en suelos, por lo que estos factores también podrían explicar el alto contenido de flavonoides encontrados en hojas de *B. latifolia* en esta zona.



**Figura 3.** Correlación de parámetros físicoquímicos de suelos con la concentración de flavonoides: A) pH, B) Conductividad Eléctrica, C) % de Nitrógeno, D) % de arcilla

## CONCLUSIÓN

Por lo anteriormente expuesto, entre las hojas apicales, medias y basales las que presentan mayor contenido de flavonoides son las apicales lo cual puede deberse a aspectos de fotoprotección, herbivoría y fisiológicos. En cuanto a los diferentes niveles altitudinales en los que se realizó el estudio (4187, 4000 y 3825 m.s.n.m), en junio época seca, no se observó una correlación directa entre la producción de flavonoides totales y la altura. Finalmente, determinamos la correlación entre algunas propiedades fisicoquímicas de los suelos y la producción de flavonoides, observando una relación inversamente proporcional de la concentración de flavonoides con el porcentaje de Nitrógeno de los suelos; mientras que el pH, la conductividad eléctrica y el porcentaje de arcilla muestran una relación directamente

proporcional con la producción de flavonoides, lo cual también justifica la mayor producción de estos metabolitos en la zona 3 (3825 m.s.n.m)

## RECONOCIMIENTOS

Los autores de este artículo agradecen el financiamiento otorgado por la UMSA a través de los fondos IDH a los proyectos “Desarrollo de productos fitoterapéuticos y cosméticos a partir de plantas nativas de Bolivia (Parte IV)” e “Influencia de las variaciones meteorológicas y ecológicas en la producción de metabolitos secundarios con potencial fitoterapéutico y cosmeceútico de *Baccharis* sp en el distrito de Hampaturi de La Paz”. Así como a los otros miembros del equipo multidisciplinario de Productos Fitoterapéuticos establecido en la UMSA (L. Salcedo, Y. Flores, E. Valenzuela, E. Gonzales, F. Ghezzi y G. Rodrigo), que dieron las bases para este estudio particular en hojas de *Baccharis latifolia*.

## REFERENCIAS

- Abad MJ, Bermejo P. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. **Arkivoc** VII: 76-96.
- Acosta M. 1992. Plantas medicinales del Ecuador. En Acosta, Vademecun de Plantas Medicinales del Ecuador. Ed. I Abya-Yala Fundación Ecuatoriana de Estudios Sociales, Quito, Ecuador, pp. 50-62.
- Almanza GR, Salcedo L. 2012. De la planta al medicamento. Parte I Investigaciones de *Baccharis latifolia* (Chilca). Ed. I. Editorial Académica Española, Saarbrücken, Alemania pp. 1-293.
- Alwahsh MAA, Khairuddean M, Chong WK. 2015. Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. **Rec Nat Prod** 9: 159–163.
- Amurrio P, Poma V, 2015. Propiedades físicoquímicas y variación estacional de los suelos en un transecto altitudinal en la localidad de Lluto, La Paz-Bolivia. **Rev Boliv Quim** 32(4): 74-81.
- Arteaga J. 2012. Diseños Experimentales, Ed. Agaetra, La Paz-Bolivia, pp. 1-110.
- Beck S, García E. 1991. Flora y vegetación en los diferentes pisos altitudinales. En: Forno E, Baudoin M. (Eds.), Historia Natural de un Valle de los Andes: La Paz, Ed. I Instituto de Ecología, Universidad Mayor de San Andrés, La Paz, Bolivia, pp. 65-108.
- Bernal M, Llorens L, Julkunen-Tiitto R, Badosa J, Verdaguer D. 2013. Altitudinal and seasonal changes of phenolic compounds in *Buxus sempervirens* leaves and cuticles. **Plant Physiol Biochem** 70: 471-482.
- Black CA, Evans DD, White JL, Ensminger LE, Clark FE. 1965. Methods of Soil Analysis (Part 1). Physical and mineralogical properties, including statistics of measurement and sampling. Agronomy Series Number 9. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp. 361-372.
- Cao X, Wei Y, Ito Y. 2009. Preparative isolation of isorhamnetin from stigma maydis using high-speed countercurrent chromatography. **J Liq Chromatogr Relat Technol** 32: 273–280
- Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **J Food Drug Anal** 10(3): 178–182.
- Cochrane TT, Barber RG. 1993. Análisis de Suelos y plantas tropicales, Ed. CIAT., Santa Cruz, Bolivia, pp. 35-52.
- Coley PD. 1980. Effects of leaf age and plant life history patterns on herbivory. **Nature**, 284: 545-546.
- Dewis J, Freitas F. 1984. Métodos físicos y químicos de análisis de suelos y aguas. Ed. FAO-ONU Roma, Italia, pp. 1-252
- Fourie TG, Snyckers FO. 1984. A flavone with antiinflammatory activity from the roots of *Rhus undulata*. **J Nat Prod** 47(6): 1057-1058.
- Gavlak R, Horneck D, Miller RO, Kotuby-Amacher J. 2005. Soil, plant and water reference methods for the western region. WCC-103 Publication, WREP-125, 3<sup>rd</sup> Edition, USA, pp. 1-184.

- Gonzales E, Villca T, Loza R. 2007. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *Baccharis*: *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. ulcina*, *B. latifolia*, *B. pentlandii*, *B. obtusifolia*, *B. subalata*. **Rev Boliv Quim** 16: 5-8.
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E. 2007. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF- B activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF- B activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators Inflamm** 2007: 1-10.
- Isaev IM, Agzamova MA y Isaev MI. 2011. Genkwanin and iridoid glycosides from *Leonurus turkestanicus*. **Chem Nat Comp** 47(1): 132-134.
- Jones CG, Hartley YE. 1999. A protein competition model of phenolic allocation. **Oikos** 86:27-44.
- Kanadaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. 2005. The antitumor activities of flavonoids. **In Vivo** 19: 895-909
- Kitamura M, Nakamura T, Hattori K, Ishida TA, Shibata S, Sato H, Kimura MT. 2007. Among-tree variation in leaf traits and herbivore attacks in a deciduous oak, *Quercus dentata*. **Scand J Forest Res** 22(3): 211-218.
- Lavola, A. 1998. Accumulation of flavonoids and related compounds in birch induced by UV-B irradiance. **Tree Physiol.** 18:53-58.
- Loza R, Guarachi L, López Y, Mamani M, Arias JL, Almanza GR, Gonzales E, Bermejo P. 2011. Evaluación de la toxicidad de los extractos etanólicos de *Baccharis latifolia* y *Baccharis papillosa* en animales de experimentación. **Biofarbo** 19(1): 22-27.
- Lee E, Moon B, Par Y, Hong S, Lee S, Lee Y, Lim Y, 2008. Effects of hydroxy and methoxy substituents on NMR data in flavonols. **Bull Korean Chem Soc**, 29: 507-510.
- Mazza CA, Zavala J, Scopel AL, Ballaré CL. 1999. Perception of solar UVB radiation by phytophagous insects: behavioral responses and ecosystem implications. **Proc Natl Acad Sci** 96(3): 980-985.
- Muñoz JD, Martínez LJ, Giraldo R. 2006. Variabilidad espacial de propiedades edáficas y su relación con el rendimiento en un cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). **Agron Colomb**, 24(2): 355-366.
- Page AL, Miller RH, Keeney DR. 1982. Methods of soil analysis (Part 2). Chemical and Microbiological Properties, Agronomy, No. 9, Soil Science Society of America, Madison, pp. 570-575.
- Pillco A, Rodrigo G. 2005. Genotoxicidad/antigenotoxicidad de *Baccharis latifolia*. **Biofarbo** 13: 95-101.
- Pinzon LC, Uy MM, Sze KH, Wang M, Chu IK. 2011. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. **J Med Plants Res**, 5 (13): 2729-2735.
- Prada J, Ordúz-Díaz LL, Coy-Barrera E. 2016. *Baccharis latifolia*: Una Asteraceae poco valorada con potencialidad química y biológica en el Neotrópico. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, 12(1): 92-105.
- Salcedo L, Sterner O, Almanza G. 2001. Estudio fitoquímico de *Baccharis latifolia*. **Rev Boliv Quím** 18: 43-48.
- Salcedo L, Pillco A, Rodrigo G, Sterner O, Almanza GR. 2003. Estudio de la actividad tóxica y antibacteriana de extractos de *Baccharis latifolia*. **Rev Boliv Quím** 20: 43-47.
- Salcedo L, Almanza GR. 2011. Uso de *Baccharis latifolia* (Chilca) en La Paz, Bolivia, **Biofarbo** 19(1): 59-63.

- Sartor T, Xavier VB, Falcão MA, Mondin CA, Dos Santos MA, Cassel E, Astarita LV, Santarém ER. 2013. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Ind Crops Prod** 51: 355– 359.
- Seelinger G, Merfort I, Schempp CM. 2008. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. **Planta Med** 74(14): 1667-1677.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB (Eds). *Plant Biochemistry*. Academic Press, London, pp. 387–416.
- Taiz L, Zeiger E. 1991. Surface Protection and Secondary Defense Compounds. In *Plant Physiology*. California. The Benjamin/Cummings Publishing Company. pp. 318-345.
- Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. **Biol Pharm Bull** 25: 1197–2202.

# EVALUATION OF FLAVONOID CONTENTS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF FIVE BOLIVIAN *BACCHARIS* SPECIES

## EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE FLAVONOIDES Y LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CINCO ESPECIES DE *BACCHARIS* DE BOLIVIA

Alberto Calle, Ángela San Martín, Marcela Melgarejo, Yonny Flores and  
Giovanna R. Almanza\*

Laboratorio de Bioorgánica, Instituto de Investigaciones Químicas, Universidad Mayor de San Andrés,  
Campus Universitario Calle 27 Cota Cota, La Paz-Bolivia

Keywords: Flavonoids, antibacterial activity, *Baccharis latifolia*, *Baccharis papillosa*, *Baccharis boliviensis*, *Baccharis tola*, *Baccharis pentlandii*.

### ABSTRACT

Five Bolivian *Baccharis* species (*Baccharis latifolia*, *B. papillosa*, *B. tola*, *B. pentlandii* and *B. boliviensis*) used in the folk medicine were analyzed by UV/Vis spectroscopy and HPLC to evaluate the flavonoid contents. First, using aluminium chloride colorimetric method, the total flavonoids (TF) contents respect of Luteolin was determined, showing that *B. latifolia* (8,03 mg TF eq Lu/g of leaves) presents the major quantity of total flavonoids in their leaves. Furthermore, our studies indicate that the method used for extraction gives extracts with high concentration of flavonoids between 53,06 and 85,86 mg TF eq Lu/g of EE (Ethanolic Extract) and that this concentration is increased in the last Sephadex LH-20 fractions, giving contents between 260,43 and 397,12 mg TF eq Lu/g of EFS (Enriched Fraction by Sephadex). On the other hand, the HPLC profiles of those extracts showed that the *B. latifolia* extract is the most complex; while the simplest is the *B. pentlandii* extract. Finally, the antibacterial activity was evaluated by agar well diffusion method, against nine bacteria ATCC and one bacterium clinical isolate, determining that all the EE have activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 sensible) and *S. aureus* (ATCC 29213 resistant), but the major activity was observed in *B. tola* EFS (65,2 % of inhibition against *S. aureus* ATCC 25923 sensible).

### RESUMEN

Cinco *Baccharis* de Bolivia usadas en medicina tradicional (*B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. tola*, *B. pentlandii* y *B. boliviensis*) fueron analizadas por espectroscopia UV/Vis y HPLC para determinar el contenido de flavonoides. Primero, usando el método colorimétrico de cloruro de aluminio, el contenido de flavonoides totales fue determinado respecto a la Luteolina, mostrando que *B. latifolia* (8,03 mg FT eq Lu/g de hojas) presenta la mayor cantidad de flavonoides totales en sus hojas. Además, nuestros estudios indicaron que el método de extracción utilizado da extractos con alta concentración de flavonoides entre 53,06 y 85,86 mg FT eq Lu/g de EE (Extracto Etanólico) y que esta concentración se incrementa en las últimas fracciones de Sephadex LH-20, dando contenidos entre 260,43 y 397,12 mg FT eq Lu/g de EFS (Fracción Enriquecida por Sephadex). Por otra parte, los perfiles de HPLC mostraron que el extracto de *B. latifolia* es el más complejo mientras que el extracto más simple es el de *B. pentlandii*. Finalmente, la actividad antibacteriana fue evaluada, por el método de difusión en agar, contra nueve bacterias ATCC y una bacteria aislada clínicamente, determinando que todos los EE tienen actividad contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 sensible) y *S. aureus* (ATCC 29213 resistente), pero la mayor actividad se observó en el EFS de *B. tola* (65,2% de inhibición frente a *S. aureus* ATCC 25923 sensible).

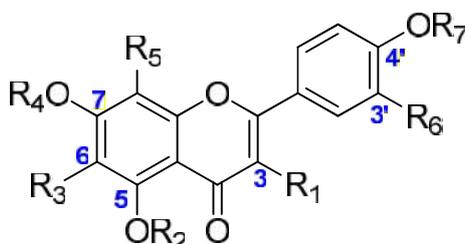
\*Corresponding author: [giovvalmanza@gmail.com](mailto:giovvalmanza@gmail.com), [galmanza3@umsa.bo](mailto:galmanza3@umsa.bo)

## INTRODUCTION

Bolivia has a high plant biodiversity and a high cultural diversity with many ethnic groups that possess an extensive knowledge in traditional medicine, whose main expression is in the use of plants. Herbal medicines are an important element of indigenous medical system in Bolivia as well as in other countries of South America. According to Gimenez & Ibish [1] about 3000 Bolivian medicinal plants are known, identified and stored in various herbal institutions [2].

*Baccharis* is the largest genus in the family Compositae, with over 500 species distributed throughout American continent, mainly in the warm temperate [3]. In particular, in Bolivia many species of *Baccharis* genus grow in the highland region (3000-4000 m.a.s.l) where most of them are used as herbal medicines [4, 5].

The phytochemical research in *Baccharis* genus determined mainly diterpenoids and phenolic compounds as major components [3]. Some of those compounds and several *Baccharis* extracts were pharmacologically investigated for diverse properties as antioxidant [6, 7, 8], anti-inflammatory [9, 10] or antimicrobial [11, 12]. Moreover, several Bolivian *Baccharis* species have been investigated by our group and other research groups determining some antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties [13, 14, 15, 16], as well as flavonoids and cinnamic acid derivatives as major components [17, 18, 19, 20, 21, 22, 23].



**Table 1** Flavones and flavonols reported in Bolivian *Baccharis*

No.	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	Name	Source
1	OMe	H	H	H	H	OH	H	Quercetin 3-methyl ether	<i>B. papillosa</i> [23]
2	OMe	H	H	H	H	H	Me	Ermanine	<i>B. papillosa</i> [23]
3	OMe	H	H	H	H	H	H	Isokaempferide	<i>B. papillosa</i> [23]
4	H	H	OMe	Me	OMe	OMe	H	8-Methoxycirsi-lineol.	<i>B. pentlandii</i> [18]
5	H	H	OMe	Me	OMe	OH	H	Sideriti flavone	<i>B. pentlandii</i> [18]
6	H	H	OMe	Me	OMe	H	H	Xanthomicrol	<i>B. pentlandii</i> [18]; <i>B. boliviensis</i> [17]
7	H	H	OH	H	H	OH	H	6-Hydroxyluteolin	<i>B. boliviensis</i> [17]
8	OH	H	H	Me	H	OMe	Me	Quercetin 3',4',7-trimethyl ether	<i>B. latifolia</i> [22]
9	OH	H	H	Me	H	OMe	H	Rhamnazine	<i>B. latifolia</i> [22]
10	OH	H	H	Me	H	OH	H	Rhamnetin	<i>B. latifolia</i> [22]
11	OH	H	H	Me	H	H	H	Kaempferol 4',7-dimethyl ether	<i>B. latifolia</i> [22]
12	H	Me	H	H	H	H	Me	Apigenin 4',5-dimethyl ether	<i>B. latifolia</i> [22]
13	H	H	H	Me	H	OH	H	Apigenin 4',7-dimethyl ether	<i>B. latifolia</i> [22]
14	H	H	H	Me	H	OMe	Me	Gonzalitosin	<i>B. latifolia</i> [22]
15	H	H	H	H	H	H	Me	Acacetin	<i>B. latifolia</i> [22]
16	H	H	H	H	H	OH	H	Luteolin	<i>B. latifolia</i> [22]

Based on that, for this study, we selected five Bolivian *Baccharis* species (*B. latifolia*, *B. tola*, *B. boliviensis*, *B. papillosa* and *B. pentlandii*) widely distributed in the La Paz Valley, whose leaves are used in the folk Bolivian medicine for the treatment of rheumatism, liver diseases, infectious problems, wounds and ulcers

[14, 5]. Four of them, were previously studied by our research group reporting sixteen flavonoids: *B. papillosa* (1-3) [23], *B. pentlandii* (4-7) [18], *B. latifolia* (8-16) [22] and *B. boliviensis* (6, 7) [17] See **Table 1**. These flavonoids could be in part responsible of their antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties [24, 25, 26, 27, 28, 29].

As part of our research of Bolivian *Baccharis* species, the present paper was undertaken in order to quantify the total flavonoid contents in the leaves; as well as to investigate the flavonoid contents in EtOH extracts, both qualitatively and quantitatively by UV/Vis spectroscopy and HPLC, because this extraction method is related to their traditional and industrial uses [4]. Finally, we determine the antibacterial activity to contribute in the scientific support of these EtOH extracts widely used in the Bolivian folk medicine.

## EXPERIMENTAL SECTION

### *Plant material*

Aerial parts of five *Baccharis* species (Asteraceae): *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers; *Baccharis boliviensis* (Wedd.) Cabrera; *Baccharis papillosa* subsp. *papillosa* Rusby; *Baccharis tola* subsp. *santelicensis* (Phil.) Joch. Müll; *Baccharis pentlandii* DC syn. *Baccharis densiflora*; were collected on March, 2014 in Cota Cota (3600 m.a.s.l), located on the outskirts of the city of La Paz, Bolivia. The plants were identified by Esther Valenzuela at the JBLP (*Jardín Botánico del Herbario Nacional de Bolivia*) where the voucher specimens are kept.

**Apparatus, Chemicals and Culture media** UV absorption spectra were performed in an UV/Vis Thermo Scientific spectrometer, Genesys 10S, using methanol from Sigma-Aldrich as solvent. HPLC chromatograms were obtained in Agilent 1100 Series equipment with a quaternary pump, a diode array detector DAD and a RP-Silica C18 250 \* 4.6 mm E10174 column. All solvents used were HPLC grade and the ultra-pure water was obtained by ultrafiltration equipment Sartorius Stedim brand. The extractions and fractionations were performed with commercial solvents previously purified by distillation. The preliminary phytochemical analysis was performed using Sigma-Aldrich reagents. The standard compound for determination of total flavonoid content, luteolin was acquired from Sigma – Aldrich as well as the aluminum chloride and potassium acetate. All solutions were stored in a dark flask and refrigerated until use. The antibacterial assays were carried out using Mueller Hinton agar and Mueller Hinton broth purchased from BBL™ trademark of Becton, Dickinson and Company. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) was purchased from Sigma-Aldrich Corporation.

### *Preparation of EtOH extracts (EE)*

The collected plant materials were cleaned and air dried at room temperature, then the leaves were separated from the stems to proceed to a manual grinding for maceration.

The dried leaves of the five *Baccharis* species (*B. latifolia*, *B. tola*, *B. boliviensis*, *B. papillosa* and *B. pentlandii*) were extracted by maceration 1:15 (w/v) for 15 min at room temperature, with EtOH 96<sup>oo</sup> (distilled). The extracts were filtered and the solvents were evaporated using a rotatory evaporator (Heidolph). The dried crude extracts were stored at room temperature until use.

### *Preparation of enriched fractions in flavonoids and cinnamic acid derivatives (EFS)*

A portion of EtOH crude extract (100 mg) was fractionated on Sephadex LH-20 employing MeOH as solvent. The fractions were controlled by TLC stained with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub> and UV lamp at 312 and 360 nm, selecting the fractions with yellow spots (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), brown spots (FeCl<sub>3</sub>) and spots with highest intensities under UV lamp. So, the last fractions were selected and joined together to give the fraction enriched in flavonoids and derivatives of cinnamic acid, called EFS (Enriched Fraction by Sephadex)

### *Preliminary phytochemical analysis*

Sterols and triterpenes were identified by the Liebermann-Burchard reaction. Phenolic compounds were qualitatively determined by examining the redox reaction between the ethanolic extracts (diluted 10 times) and a solution of ferric chloride (300 µM). Flavonoids were identified by Shinoda's reaction, alkaloids by the Dragendorff reagent and saponins by shaking (2 min) the ethanolic extract (diluted 10 times) and observing the formation of stable foam [30].

### ***Determination of total flavonoid content***

The total flavonoid (TF) content of leaves, EE and EFS were determined using the colorimetric method of aluminum chloride [31] modified, using Luteolin as standard compound. According to this modification, 0.5 ml of the sample was mixed with 1.5 ml of EtOH 96° (distilled). This was followed by the addition of 2.8 ml distilled water, 0.1 ml of 10% AlCl<sub>3</sub> (w/v) solution, and 0.1 ml of 1 mol/L solution of potassium acetate. The solution was incubated for 30 - 40 min and then subjected to spectral analysis in the range of 200 to 500 nm. The samples turn to pink whose absorbance was measured at 406 nm.

The calibration curve was made by preparing solutions at 30, 60, 90, 120 and 150 ppm of standard compound and recording the absorbance at  $\lambda_{max} = 406$  nm, where the Luteolin showed a good linearity ( $Y = 0.0823X$ ,  $R^2 = 0.9988$ ). The TF respect of Luteolin was calculated using the calibration equation.

### ***Statistical analysis***

The results were recorded after repeating the experiments three times. The experimental results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) of (3n) measurements. The statistical analysis of the data were carried out using Kruskal-Wallis t-test and the results were considered significant when  $p < 0.05$ .

### ***Chromatography***

The HPLC method employed in this work was based in a established method by Angela San Martin for analysis of *B. latifolia* extracts described below.

The samples were prepared dissolving 20 mg of the EFS in 1 ml of MeOH and then, filtered with a 0.45  $\mu$ m membrane filter. The column was operated at 40°C and the injection volume was 25  $\mu$ l. The UV spectra were scanned between 200 and 600 nm and the wavelengths of 315 nm and 370 nm were chosen for cinnamic derivatives and flavonoids detection, respectively. The mobile phase components consisted of A= 0.1% aq. H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and B= CH<sub>3</sub>CN. Linear gradient elution was performed at a flow rate of 0.6 ml/min as follows: Initial, 0 min, 25% of B; 5 min, 28% of B; 10 min, 30% of B; 17 min, 32.8% of B; 20 min, 36% of B; 25 min, 42% of B; 33 min, 44.8% of B; 40 min, 53.5% of B and after 60 min, 100% of B.

### ***Microorganisms employed***

The microbial strains studied were *Escherichia coli* ATCC 25922 (sensible), *Escherichia coli* ATCC 35218 (resistant), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (sensible), *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (resistant), *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, *Pseudomona aeruginosa* ATCC 27853 (sensible), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70063 (resistant), *Bacillus subtilis* ATCC 6636, *Shigella flexneri* ATCC 12022 and *Salmonella typhi* (clinical isolate) and were obtained from INLASA (*Instituto Nacional de Laboratorios en Salud*) of Bolivia.

### ***Antibacterial assay***

Fresh pure bacteria suspensions were obtained from overnight cultures in Muller Hinton Broth cultivated at 37°C for 24 h. The bacterial suspensions were adjusted to an inoculum size 10<sup>8</sup> cells/mL for inoculation of the agar plates.

After the medium Mueller Hinton Agar (25 mL approximately) was solidified in the plates, the test strain (50  $\mu$ L) was inoculated into the media. Care was taken to ensure proper homogenization. The suspensions were spread on the medium. Four ditches were made in the plates with the help of a cup-borer. For the *in vitro* studies, extracts and fractions were dissolved in 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) and water 1:1. One ditch was used with 200  $\mu$ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) and water 1:1 as solvent control, and anotherone was used with 200  $\mu$ L of gentamicin as antibacterial control. The test samples, the DMSO and water 1:1 and the gentamicin were introduced in each ditch and the plates were incubated at 37°C for 24 h. Microbial growth was determined by measuring the diameter of the zone of inhibition in millimeters (IH) and the percent of inhibition (%I) was calculated comparing the extract zone inhibition respect of the positive control zone inhibition using the follow equation. All tests were performed in triplicate

$$\%I = [(IH_{\text{sample}} - IH_{\text{negative control}})/(IH_{\text{positive control}} - IH_{\text{negative control}})] \times 100$$

## RESULTS AND DISCUSSION:

### *Preliminary phytochemical screening*

The preliminary phytochemical screening of the five Bolivian *Baccharis* species reveals high amounts of flavonoids and a clear presence of phenols.

The results are shown in **Table 2**.

**Table 2.** Preliminary phytochemical screening of EtOH extracts from 5 Bolivian *Baccharis*.

Trial/ Metabolite	<i>B. latifolia</i>	<i>B. papillosa</i>	<i>B. boliviensis</i>	<i>B. pentlandii</i>	<i>B. tola</i>
Dragendorff/ Alkaloids	(±)	(±)	(±)	(+)	(±)
Lieberman Buchard / Triterpenes/ Sterols	(+++)	(+++)	(++)	(++)	(+++)
Borntrager/Quinones	(-)	(-)	(±)	(++)	(+++)
FeCl <sub>3</sub> / Phenols	(+++)	(++)	(+++)	(++)	(+++)
Foam / Saponins	(-)	(±)	(-)	(-)	(±)
Shinoda/ Flavonoids	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)

(-) Absent, (±) Doubt presence (+) Traces, (++) Presence, (+++) High amounts

### *Evaluation of flavonoid contents*

The present study was conducted to obtain and evaluate extracts and fractions with high concentration of flavonoids, because several, of this type of compound, have been reported by their anti-inflammatory, antioxidant and/ or antimicrobial activities, properties close related to their traditional uses in the Bolivian folk medicine.

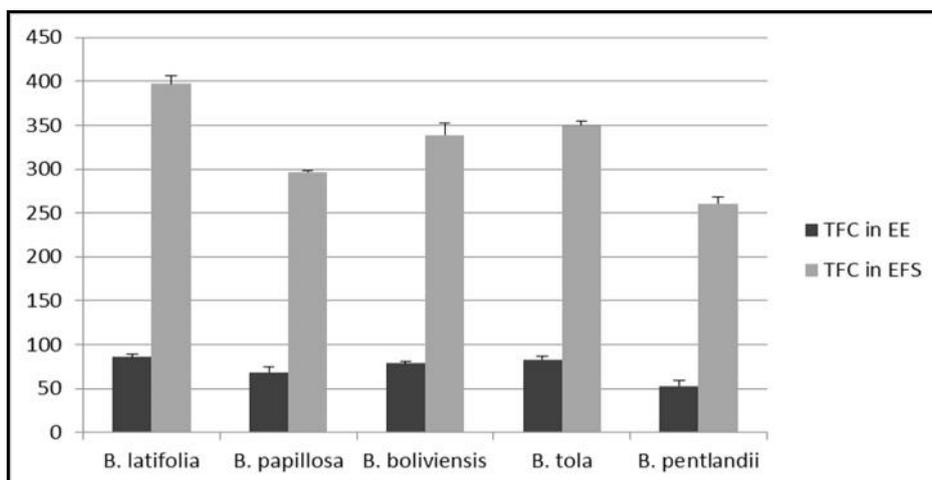
Our previous studies in these species suggested that a fast extraction (15 min) by maceration with EtOH of the leaves produce extracts with high concentration of flavonoids and acid cinnamic derivatives [4]. In addition, it is known that these compounds normally are concentrated in the last fractions of a Molecular Exclusion Chromatography Sephadex LH-20, because of their lower molecular weight respect of the other secondary metabolites.

Based on that and the preliminary phytochemical screening, evaluation of the total flavonoid contents (TF) was done in the leaves, EtOH extracts and the last fractions of Sephadex LH-20. For this, the colorimetric method was selected using AlCl<sub>3</sub>. The calibration curve was prepared with Luteolin instead of Quercetin, like in other similar studies, because its  $\lambda_{\text{max}}$  after the reaction with AlCl<sub>3</sub> is more similar to those of EtOH *Baccharis* extracts. So the TF contents is expressed in mg of luteolin equivalents per g of leaves or extracts. See **Table 3** and **Figure 1**.

**Table 3.** Quantification of total flavonoids in mg of Luteolin equivalent per 1 g of leaves, EE and EFS, from the five Bolivian *Baccharis* species

Sample	Leaves (mg TF/g)	EE (mg TF/g)	EFS (mg TF/g)
<i>B. latifolia</i>	8,03 ± 0,31	85,86 ± 3,35	397,12 ± 8,89
<i>B. papillosa</i>	4,22 ± 0,24	68,45 ± 5,90	296,68 ± 2,99
<i>B. boliviensis</i>	6,23 ± 0,17	78,57 ± 2,45	338,80 ± 12,98
<i>B. tola</i>	7,69 ± 0,47	82,83 ± 4,48	349,33 ± 5,84
<i>B. pentlandii</i>	2,63 ± 0,11	53,06 ± 6,32	260,43 ± 8,20

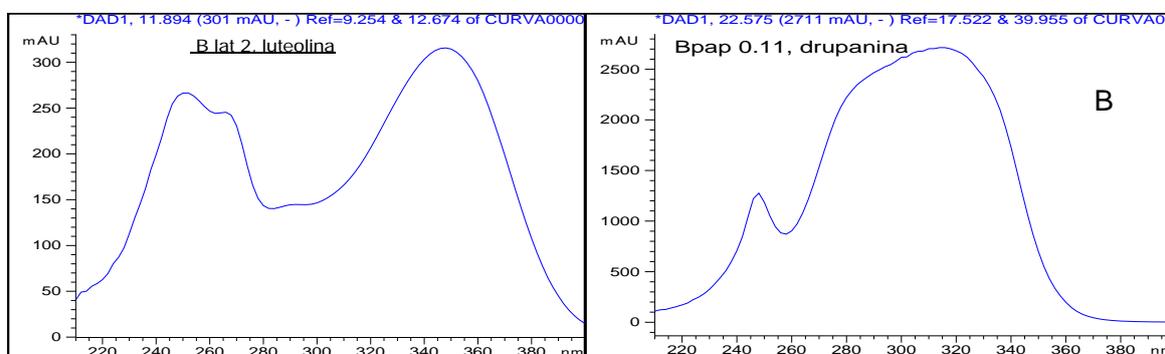
Values are expressed as mean ± SE mg of Luteolin equivalent per g or 100 g of dry sample



**Figure 1** Quantification of TFC (Total Flavonoids Contents) in the 5 Bolivian *Baccharis* expressed in mg of Luteolin equivalent per g of EtOH Extracts (EE) and Enriched Fraction by Sephadex LH-20 (EFS).

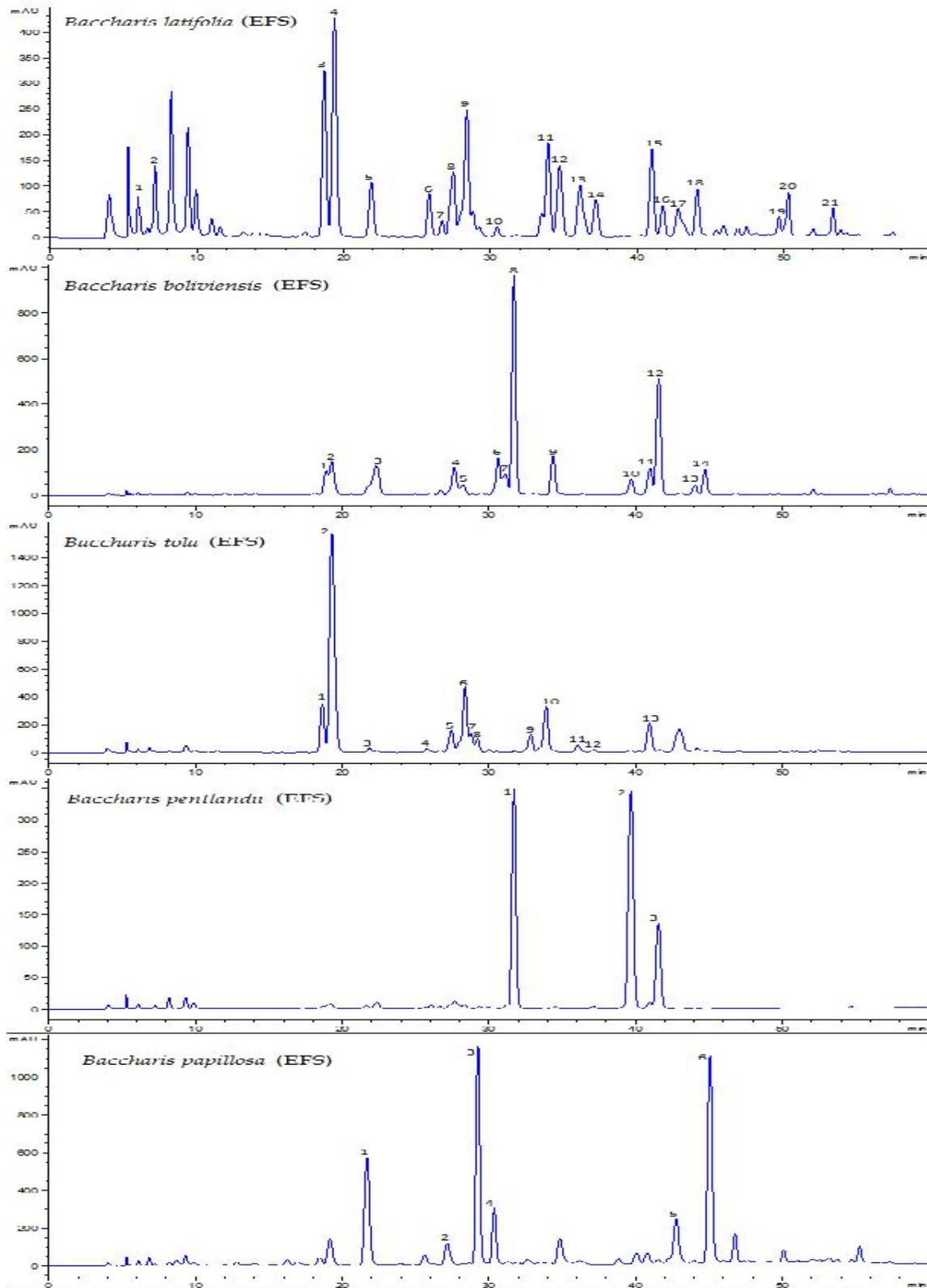
The results showed that *B. latifolia* is the species with the major quantity of flavonoids followed by *B. tola* and *B. boliviensis*. The TF contents in extracts showed the same relation demonstrating that the flavonoid content is highly increased by Sephadex LH-20 fractionation.

On the other hand, HPLC chromatograms were carried out to analyze the complexity of the samples for the five *Baccharis*. The EFS chromatograms were analyzed at two wavelengths because of the chemical antecedents for this species [17, 18, 22, 23]: At  $\lambda = 370$  nm to analyze mainly the flavonoids that showed the typical two bands in UV spectroscopy, as example Luteolin (**Figure 2**) and at  $\lambda = 315$  nm to analyze cinnamic acid derivatives whose showed one broad band around 315 nm as can be seen for Drupanine (**Figure 2**).

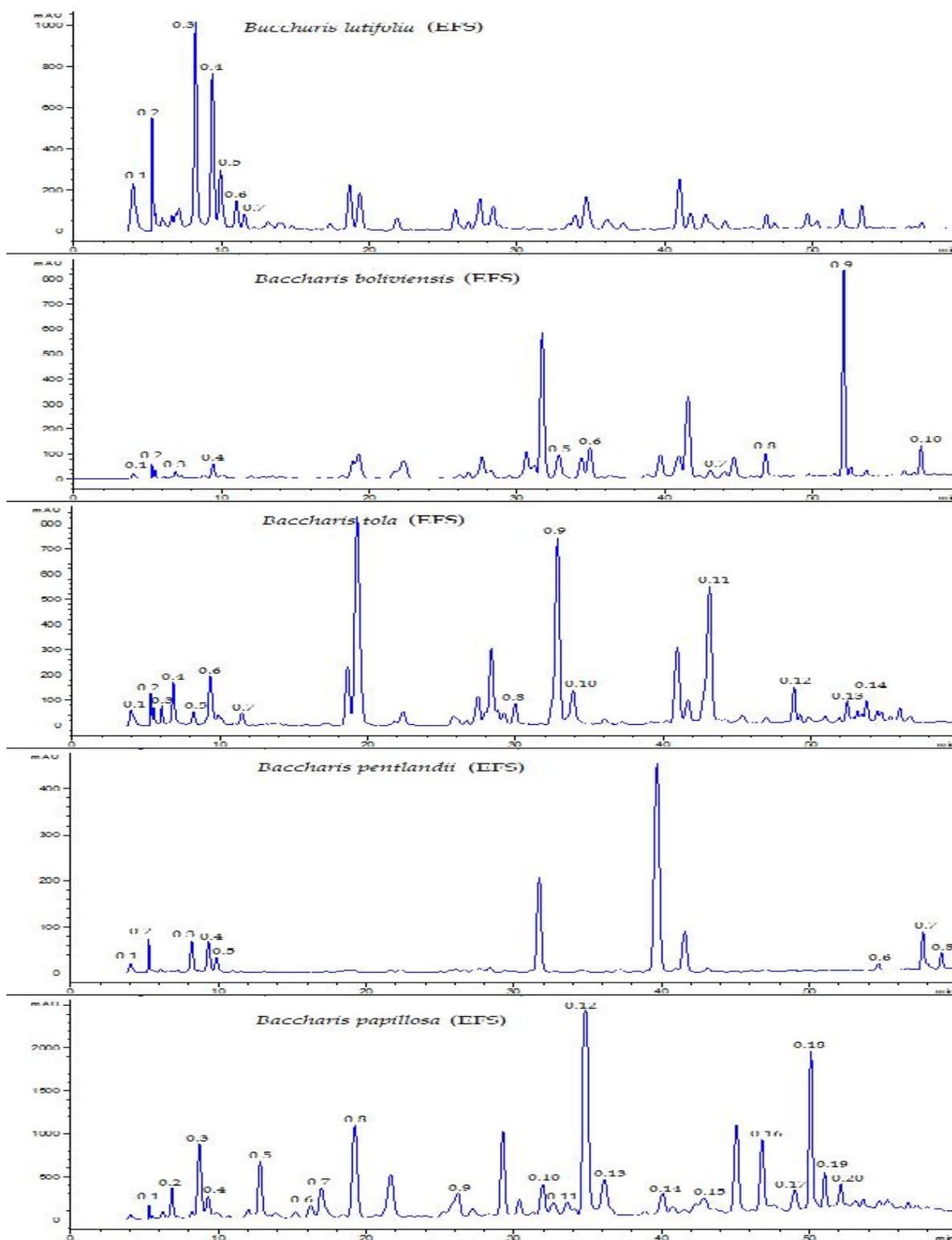


**Figure 2.** UV spectra of a flavonoid Luteolin (**16**) from *B. latifolia* (A) and a cinnamic acid derivative Drupanine from *B. papillosa* (B).

The used HPLC method was established taking into account the *B. latifolia* extract, because of its complexity. **Figure 3** showed the HPLC chromatograms of the EFS at 370 nm, where mainly the flavonoids are shown. The analysis of UV spectra from each signal in the chromatograms led to assign each peak to a flavonoid (two typical bands) or cinnamic derivatives (one broad band). So, the flavonoids in the chromatograms of **Figure 3** were numbered observing more complexity in the follow order: *Baccharis latifolia* > *Baccharis tola* > *Baccharis boliviensis*, > *Baccharis papillosa* > *Baccharis pentlandii*.



**Figure 3.** Chromatograms at 370 nm of fractions enriched by Sephadex LH-20 (EFS) for the five Bolivian *Baccharis*, showing with numbers the signals for flavonoids.



**Figure 4.** Chromatograms at 315 nm of enriched fractions by Sephadex LH-20 (EFS) for the five Bolivian *Baccharis*, showing with numbers the signals for cinnamic acid derivatives.

In addition, **Figure 4** showed the HPLC chromatogram of EFS at 315 nm, where mainly cinnamic acid derivatives appear, which were numbered with a 0 previous the number to distinguish these numbers of the numbers for flavonoids. The analysis of cinnamic acid derivatives showed clearly more quantity of this type of compounds for *B. papillosa* followed by *B. tola* and *B. boliviensis*.

In conclusion, the evaluation of flavonoid contents in EE and EFS for *B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. tola*, *B. pentlandii* and *B. boliviensis* showed that *B. latifolia* present the highest concentration and the largest number of flavonoids. On the other hand, the simplest extract is that of *B. pentlandii* which presents only 3 flavonoids already identified by our group [18]. In addition, we determined that the extraction process also gives a good proportion of cinnamic acid derivatives, analyzed at 315 nm, and that the species with the largest number of this type of compounds is *B. papillosa*.

#### Antibacterial study

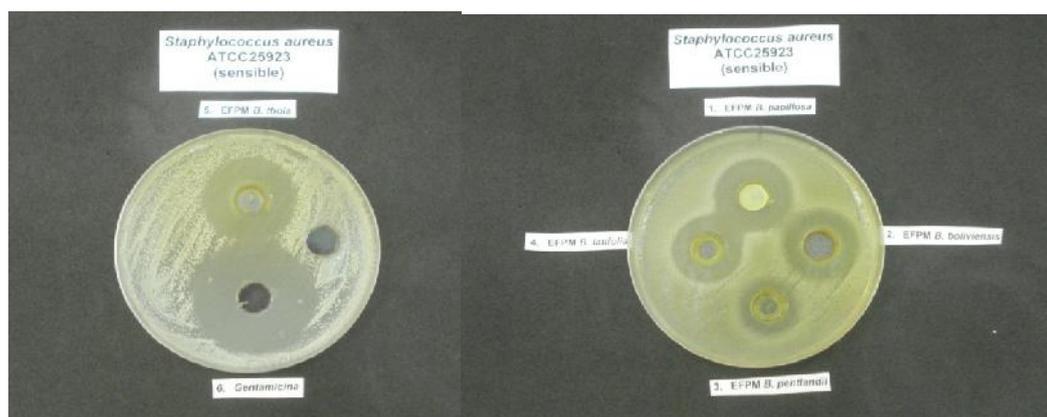
Bacterial multidrug resistance represents a major hurdle in the treatment of infectious diseases. In this study, we tested a panel of bacterial strains. The EE for *B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. tola*, *B. pentlandii* and *B. boliviensis* were assayed against nine bacteria ATCC and one bacterium clinical isolate, using Gentamicin as positive control and the solvent as negative control. The results at (10 mg/0,2 mL) of the EE showed good activity for all the extracts only against to *S. aureus* ATCC 25923 (sensible) and *S. aureus* ATCC 29213 (resistant) and they do not show antibacterial activity against: *S. flexneri* ATCC 12022, *L. monocytogenes* ATCC 7644, *E. coli* ATCC 35218 (resistant), *P. aeruginosa* ATCC 27853 (sensible), *B. subtilis* ATCC 6633, *S. typhi* (clinical isolated), *E. coli* ATCC 25922 (sensible) and *K. pneumoniae* ATCC 700603, as we can see in **Table 4**.

**Table 4.** Antibacterial activity of EE from five Bolivian *Baccharis* against nine bacteria ATCC and one bacterium clinical isolate

BACTERIA	<i>B. latifolia</i> 50 mg/mL	<i>B. papillosa</i> 50 mg/mL	<i>B. boliviensis</i> 50 mg/mL	<i>B. pentlandii</i> 50 mg/mL	<i>B. tola</i> 50 mg/mL	Gentamicin 0.8 mg/mL	Solvent control DMSO:Water (1:1) 0.2 mL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (sensible)	24	15	26	21	25	40	-
<i>S. flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-			35	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 7644	-	-	-			-	-
<i>E. coli</i> ATCC 35218 (resistant)	-	-	-			38	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (sensible)	-	-	-			43	-
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	-			40	-
<i>S. typhi</i> (clinical isolate)	-	-	-			40	-
<i>E. coli</i> ATCC 25922 (sensible)	-	-	-			40	-
<i>S. aureus</i> ATCC 29213 (resistant)	23	20	24	21	24	38	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 (resistant)	-	-	-			35	-

\* Diameter of inhibition zone in mm

Finally, the inhibition of EFS was analyzed by agar-disc diffusion method against *S. aureus* (sensible). **Figure 5** showed the inhibition zone for the five extracts compared with Gentamicine (positive control) and solvent (negative control). The evaluation showed that all the EFS analyzed are active against this bacterium, but the most active is the EFS of *B. tola* followed by the EFS of *B. boliviensis* (**Table 5**).



**Figura 5.** Antibacterial evaluation against *S. aureus* (sensible) of: **A)** EFS of *B. tola* (above); Gentamicine, positive control (down); pure solvent, negative control (right); **B)** EFS of *B. papillosa* (above); EFS of *B. latifolia* (left); EFS of *B. boliviensis* (right); EFS of *B. pentlandii* (down).

**Table 5.** Inhibition of *S. aureus* (ATCC 25923) sensible strain by EFS from five Bolivian *Baccharis*

Sample	<i>B. latifolia</i>	<i>B. papillosa</i>	<i>B. boliviensis</i>	<i>B. pentlandii</i>	<i>B. tola</i>	Gentamicine	Solvent
% Inhibition	47,83	52,17%	60,87%	34,78%	65,22%	100,00%	0,00%
IH inhibition zone*	20	21	23	17	24	32	9 <sup>†</sup>

\* Diameter of inhibition zone in mm; <sup>†</sup>Diameter of hole

In conclusion, the antibacterial study showed that all the EE have activity against *S. aureus* ATCC 25923 (sensible) and *S. aureus* ATCC 29213 (resistant). In addition, the EFS from the five Bolivian *Baccharis* possessed activity *S. aureus* (sensible), contributing the study to the great potential of these medicinal plants used in Bolivian ethnomedicine. The antibacterial activity of flavonoids is being increasingly documented, other *Baccharis* species also showed good antibacterial activity and this activity could be related to their flavonoid and acid cinnamic derivatives [32, 33]. The EFS of *B. tola* was the most active against *S. aureus* (sensible), this species is widely distributed in the Bolivian Highlands and it does not have chemical studies, so it is recommendable to carry out more chemical and biological studies of this species.

## ACKNOWLEDGEMENT

We are indebted to SIDA Swedish Agency for the financial support of the project “Biomolecules of industrial and medicinal interest. Anticancer”. We also would like to thank to funds IDH/UMSA for the financial support of the project “Development of cosmeceutic products” and to Botanical Garden of National Bolivian Herbarium (JBLP) for the identification of plant material.

## REFERENCES

1. Giménez, A., Ibisch, P.L. **2003**. Uso de la biodiversidad como recurso genético. In Ibisch, P.L., Mérida, G. Biodiversidad: La Riqueza de Bolivia. Estado de Conocimiento y Conservación. Ministerio de Desarrollo Sostenible, Editorial FAN, Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, 313-323.
2. Vidaurre, P.J. **2006**. Plantas medicinales en los Andes de Bolivia. In Moraes, M., Øllgaard, B., Kvist, L.P., Borchsenius, F., Balslev, H. Botánica Económica de los Andes Centrales UMSA, La Paz, Bolivia, 268-284

3. Abad, M.J., Bermejo, P. **2007**. *Baccharis* (Compositae): a review update, *ARKIVOC* VII, 76-96.
4. Almanza, G.R., Salcedo, L. **2012**. De la planta al medicamento; Parte I Investigaciones de *Baccharis latifolia* (Chilca). Editorial Académica Española, Saarbrücken, Germany, 55-75.
5. Salcedo, L., Almanza, G.R. **2011**. Uso de *Baccharis latifolia* (Chilca) en La Paz, Bolivia, *Biofarbo* 19(1), 59-63.
6. De Oliveira, S.Q., Kappel, V.D., Pires, V.S., Lencina, C.L., Sonnet, P., Moreira, J.C., Gosmann, G. **2014**. Antioxidant properties of phenolic compounds from *Baccharis articulata* and *B. usterii*. *Nat. Prod. Commun.* 9(7), 941-2.
7. Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas, A., Saavedra, G., Murcia, M.A., Jiménez, A.M., Codina, C. **2003**. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. *Life Sci.* 73, 1667-1681.
8. Vieira, T.O., Seifriz, I., Charão, C.T., De Oliveira, S.Q., Creczynski-Pasa, T.B. **2011**. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger, *Rev Bras Farmacogn.* 21(4), 601-607.
9. Pádua, B.C., Rossoni, J.V., Magalhães, C.L., Chaves, M.M., Silva, M.E., Pedrosa, M.L., De Souza, G.H., Brandão, G.C., Rodrigues, I.V., Lima, W.G., Costa, D.C. **2014**. Protective effect of *Baccharis trimera* extract on acute hepatic injury in a model of inflammation induced by acetaminophen. *Mediators Inflamm.* 2014:196598. doi: 10.1155/2014/196598
10. Florão, A., Budel, J.M., Duarte, M.R., Marcondes, A., Rodrigues, A., Ferreira, R.A., Nova, M.V., De Moraes, C.A., Weffort-Santos, A.M. **2012**. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. *J Essent Oil R.* 24(6), 561-570.
11. Nuño, G., Zampini, I.C., Ordoñez, R.M., Alberto, M.R., Arias, M.E., Isla, M.I. **2012**. Antioxidant/antibacterial activities of a topical phytopharmaceutical formulation containing a standardized extract of *Baccharis incarum*, an extremophile plant species from Argentine Puna. *Phytother Res.* 26(11), 1759-1767.
12. Rodríguez, M.V., Sortino, M.A., Ivancovich, J.J., Pellegrino, J.M., Favier, L.S., Raimondi, M.P., Gattuso, M.A., Zacchino, S.A. **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.
13. Mollinedo, P., Salcedo, L., Vila, J.L., Ferreira, M., Dajas, F., Almanza, G.R. **2001**. Evaluación de la capacidad antioxidante de tres especies bolivianas. *Rev Bol Quim.* 18(1), 59-64.
14. Abad, M.J., Bessa, A.L., Ballarin, B., Aragon, O., Gonzales, E., Bermejo, P. **2006**. Anti-inflammatory activity of four Bolivian *Baccharis* species (Compositae). *J Ethnopharmacol.* 103, 338-344.
15. Loza, R., Neri, L., López, Y., Mamani, M., Arias, J.L., Almanza, G.R., Gonzales, E., Bermejo, P. **2011**. Evaluación de la toxicidad de los extractos etanólicos de *Baccharis latifolia* y *Baccharis papillosa* en animales de experimentación. *Biofarbo.* 19, 22-27.
16. Martínez, S., Mollinedo, P., Mamani, O., Almanza, G.R., Terrazas, E. **2011**. Estudio *in vitro* de la actividad antifúngica de extractos vegetales del género *Baccharis* sobre *Candida albicans*. *Rev Bol Quim.* 28, 35-40
17. Calle, A., Yupanqui, J., Flores, Y., Almanza, G.R. **2012**. Flavonoids of *Baccharis boliviensis*. *Rev Bol Quim.* 29(2), 158-163.
18. Tarqui, S., Flores, Y., Almanza, G.R. **2012**. Polyoxygenated flavonoids from *Baccharis pentlandii*, *Rev Bol Quim.* 29(1): 10-14.
19. Salcedo, L., Pillco, A., Rodrigo, G., Sterner, O., Almanza, G.R. **2003**. Aislamiento de flavonoides y estudio de la actividad tóxica y antibacteriana de extractos de *Baccharis latifolia*. *Rev Bol Quim.* 20(1): 1-6.
20. Salcedo, L., Sterner, O., Almanza, G.R. **2001**. Estudio fitoquímico de *Baccharis latifolia*. *Rev Bol Quim.* 18(1): 43-48.
21. Villagómez, J.R., Mollinedo, P., Almanza, G.R. **2006**. (E)-3-prenil-4-hidroxicinamato de metilo de *Baccharis santeliciis*, *Rev Bol Quim.* 23(1), 13-18.
22. Flores, Y., Salcedo, L., Almanza, G.R. **2012**. *Estudios químicos de Baccharis latifolia*. In Almanza, G.R., Salcedo, L.: De la planta al medicamento; Parte I Investigaciones de *Baccharis latifolia* (Chilca). Editorial Académica Española, Saarbrücken, Germany, 169-223.
23. Escobar, Z., Flores, Y., Tejada, L., Alvarado, J.A., Sterner, O., Almanza, G.R. **2009**. Phenolic compounds from *Baccharis papillosa* subsp. *papillosa*, *Rev Bol Quim.* 26(2), 111 - 117.
24. Kanadaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., Lee, M.T. **2005**. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo.* 19, 895-909.
25. Brahmachari, G., Gorai, D. **2006**. Progress in the Research on Naturally Occurring Flavones and Flavonols: An Overview. *Curr Org Chem.* 10(8), 873-898.
26. Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J., Ho, C.T. **2006**. Acacetin suppressed LPS-induced up expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochem Pharmacol.* 72, 1293-1303.
27. Pietta, P.G. **2000**. Flavonoids as antioxidants, *J Nat Prod.* 63(7), 1035-1042.

28. Pinzon, L.C., Uy, M.M., Hong, K., Wang, M., Keung, I. **2011**. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. *J Med Plants Res.* 5(13). 2729-2735.
29. Tapia, A., Rodriguez, J., Theoduloz, C., Lopez, S., Feresin, G.E., Schmeda-Hirschmann, G. **2004**. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *J Ethnopharmacol.* 95, 155–161.
30. Harborne, A.J. **1998**. Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis. 3rd Ed., Springer Science & Business Media, Netherlands, 1-302.
31. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *JFDA.* 10(3): 178–182
32. Morales, G., Paredes, A., Sierra, P., Loyola, L.A. **2008**. Antimicrobial activity of three *Baccharis* species used in the traditional medicine of northern Chile, *Molecules* 13, 790-794.
33. Saravanakumar, A., Venkateshwaran, K., Vanitha, J., Ganesh, M., Vasudevan, M., Sivakumar, T. **2009**. Evaluation of antibacterial activity, phenol and flavonoid contents of *Thespesia populnea* flower extracts, *Pak. J. Pharm. Sci.*, 22(3), 282-286.