

Esta página está disponible en los siguientes idiomas:



# Abstract Licencia Creative Commons

**Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0  
Internacional (CC BY-NC-SA 4.0)**

Este es un resumen legible por humanos de (y no un sustituto) de la licencia .

## Usted es libre de:

**Compartir** — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

**Adaptar** — remezclar, transformar y construir a partir del material

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

## Bajo los siguientes términos:



**Atribución** — Usted debe dar crédito de manera adecuada , brindar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios . Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



**NoComercial** — Usted no puede hacer uso del material con propósitos comerciales .



**CompartirIgual** — Si remezcla, transforma o crea a partir del material, debe distribuir su contribución bajo la misma licencia del original.

**No hay restricciones adicionales** — No puede aplicar términos legales ni medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

## Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una excepción o limitación aplicable .

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como publicidad, privacidad o derechos morales pueden limitar la forma en que utilizan el material.



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Universidad Nacional de Córdoba - Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Salta - Facultad de Ciencias Exactas

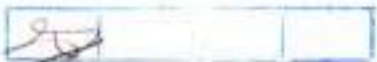
Trabajo de Tesis de Posgrado presentado para la obtención del Grado de  
Doctor en Ciencias Químicas

**Estudio fitoquímico de plantas pertenecientes a la  
familia Asteraceae del noroeste argentino.  
Quimiotaxonomía. Actividad Biológica.**

María Guadalupe Reyes

2014

## BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Division: *B-T*Top: *589.55*Sub: *A*ID: *12622*Author: *del Autor*Editor: *del Autor*Publisher: *del Autor*Editorial: *del Autor*Country: *del Autor*Language: *del Autor*Library: *del Autor*Keywords: *del Autor*Fecha de ingreso: *22-06-2015*

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el marco del Doctorado Cooperativo, en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de Salta y en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, a través de las becas de posgrado Tipo I y Tipo II otorgadas por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

**Directora de tesis**  
**Universidad Nacional de Córdoba**



Dra. Virginia Estela Sosa

**Directora de tesis**  
**Universidad Nacional de Salta**



Dra. María Laura Uriburu

**Miembros de la Comisión**  
**Evaluadora de Tesis**



Dra. Gloria E. Barboza (UNC)



Dra. Juana R. de la Fuente (UNSa)



Dra. Susana C. Núñez Montoya (UNC)



*A Gabriel,*

*por su amor, paciencia,*

*y por compartir conmigo las alegrías y tristezas de cada día.*

*A mis soles, Candelaria y Vicente, por iluminar mi vida.*

## Agradecimientos

*"La gratitud no es la única virtud, pero es la madre de todas las demás"*

Este camino recorrido tuvo muchas subidas y bajadas, idas y vueltas, pero siempre acompañada de personas maravillosas que me tendieron una mano cuando la necesité, que llenaron mis días de risas y alegrías, que supieron darme aliento... a ellas quiero agradecer.

A Laura, mi directora de tesis en la Universidad Nacional de Salta, por su estímulo permante, por su interés en el éxito de mi trabajo, por enseñarme, guiarme y quererme como una madre, por sus consejos, por hacerme ver que la vida es maravillosa siempre, por su gran amistad. Gracias por estar.

A la Dra Virginia Sosa, directora por la Universidad de Córdoba, por su constante apoyo científico, por haber contado con ella las veces que fueron necesarias.

A la Dra. de la Fuente, por guiarme en mis primeros pasos de formación científica y por invitarme a ser parte del grupo de Productos Naturales.

A la Dra. Carina Audisio, por la enseñanaza y colaboración en los ensayos biológicos, por hacerme ver que aunque tenga resultados negativos, siguen siendo resultados y de esos se aprende.

A las Dras. Gloria Barboza y Teresa Cosa por la recolección del material vegetal de *F. tortuosa*.

A la Dra. Carmen Viturro, por el análisis de muestras en CG/masa.

A la Dra. Mirta Daz por el tan esperado HPLC, a la Dra Mariela Finetti por su colaboración en el modelado molecular, al Dr. José Molina por acudir siempre a los gritos desesperados cuando la tecnología no funcionaba.

A mi gran amigo y compañero Pablo, por su apoyo incondicional, por estar cuando lo necesité, por hacerme reir aun en los momentos más difíciles. Agradezco a Dios que lo haya puesto en mi camino.

A los "de acá": Carito, Tiki, Guadalo, Maju, Fany, Eli, Ali, Viki, Chechu, Mariana, por su apoyo constante y por su amistad.



A los "de allá": Manu, Eze, Ariel, Gaby, Guido, Cari, Anita, Fati, Flor, Vivi, Gloria, Adri y el Doc.

A mi primita, María, por abrirme las puertas de su casa en Córdoba, por compartir conmigo mi estadía allá, por sus palabras y por estar conmigo siempre. A Jesi, por brindarme su amistad y por sus consejos.

Y especialmente quiero agradecer a mi familia, que estuvo siempre, incondicionalmente, apoyándome en todas mis decisiones y proyectos, dándome aliento constante. A mi mamá Irma, mis hermanos Mari y Diego, a mis sobrinos por su amor y por enseñarme a salir siempre adelante. A Ana María, que fue un pilar muy importante, gracias por su cariño; a mis cuñadas-hermanas Eleo, Vero y Nati, por estar siempre a mi lado.

A Gabriel, mi negro, por su amor, comprensión, paciencia y por compartir la vida conmigo. A mi Cande, por haber entendido la ausencia de su mamá, por sus besos y abrazos constantes. A mi Vicente, por haber llegado en el momento que más lo necesitaba, por darme ese empujon que faltaba. ¡Gracias por la familia que tenemos!

*"En la caridad el dinero se purifica. Con el servicio se purifican nuestras acciones. Con la música se purifican nuestras emociones y con el Conocimiento se purifica nuestro intelecto."*

Sri Sri Ravi Shankar

## Abreviaturas

[ $\alpha$ ]	rotación específica
Acetona- $d_6$	Acetona deuterada
AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American type culture collection
ca	cerca, aproximadamente
CC	Cromatografía en columna
CCD	Cromatografía en capa delgada
CCDP	Cromatografía en capa delgada preparativa
CCF	Cromatografía columna flash
CCR	Cromatografía centrífuga radial
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía gaseosa acoplada con Espectrómetro de masas
CLV	Cromatografía líquida de vacío
CIM	Concentración inhibitoria mínima
COSY	Correlation Spectroscopy
$\delta$	Desplazamiento químico expresado en ppm
<i>d</i>	doblete
<i>da</i>	doblete ancho
<i>dd</i>	doblete de doblete
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DOSY	Difusion Ordered Spectroscopy
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
E	Extracto
ECC	Extracto clorofórmico de <i>F. campestris</i>
EEF	Extracto éter etílico de <i>F. fiebrigii</i>
EER	Extracto éter etílico de <i>F. riparia</i>
ECT	Extracto clorofórmico de <i>F. tortuosa</i>
EHC	Extracto hexano de <i>F. campestris</i>
EHR	Extracto hexano de <i>F. riparia</i>
EHT	Extracto hexano <i>F. tortuosa</i>
EM	Espectrometría de masa

ESI	Electro Spray Ionization
EtOH	Alcohol etílico
F	Fracción
F <sub>B</sub>	Fracción de <i>Barnadesia odorata</i>
F <sub>F</sub>	Fracción de <i>Flourensia tortuosa</i>
F <sub>W</sub>	Fracción de <i>Aspilia aurantiaca</i>
CCRev	Cromatografía en columna en fase reversa
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovats
IR	Espectroscopía infrarroja
J	Constante de acoplamiento expresada en Hz
<i>m</i>	multiplete
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
M <sup>+</sup>	Ión Molecular
MCNS	Museo de Ciencias Naturales de Salta
Me	Grupo metilo
MeOH	Alcohol metílico
MeOD	Metanol deuterado
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
MS	Espectrometría de masa
msnm	metros sobre el nivel del mar
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
<i>s</i>	singlete
<i>sa</i>	singlete ancho
Sph	Sephadex LH-20
ppm	partes por millón

TMS

UFC

Tetrametil silano

Unidades formadoras de colonias



## Resumen

En el marco del presente trabajo de tesis se realizaron estudios fitoquímicos y de actividad antibacteriana en plantas pertenecientes a la familia Asteraceae, de los géneros *Barnadesia*, *Wedelia*, y *Flourensia* que crecen en el noroeste argentino, con el fin de aportar datos a la clasificación taxonómica de las especies.

El estudio fitoquímico de *Barnadesia odorata* comprendió el análisis de diferentes estados de crecimiento de la planta. Se aislaron e identificaron los compuestos lupeol (3.1),  $\beta$ -amirina (3.2), acetato de lupeolo (3.3), ácido 4-metóxicinámico (3.4), 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (3.5), apigenina (3.6) y apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido (3.7). A través del análisis del aceite esencial de *B. odorata* mediante cromatografía gaseosa/espectrometría de masa se identificaron seis componentes que constituyen el 97.09 % de los metabolitos volátiles.

En *Flourensia tortuosa* se aislaron e identificaron 4-hidroxiacetofenona (4.1), 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (4.2), enecalina (4.3), 2,2-metil cromeno (4.4), tremetona (4.5), metoxitremetona (4.6), 2,5-diacetilbenzofurano (4.7), 2-acetil-6-metoxibenzofurano (4.8), escopoletina (4.9) y 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona (4.10).

En *Wedelia aurantiaca* se aislaron e identificaron los compuestos ácido cafeico (5.1), 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (5.2) y (+)-espatulenol (5.3).

La comparación de los extractos de *F. tortuosa* con tres especies del género *Flourensia* mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), logró establecer una composición química uniforme del género, compuesta por dihidrobenzofuranos, benzofuranos, cromenos, dihidroflavonoles, flavanonas; entre estos dos últimos grupos, algunos prenilados pueden servir como marcadores quimiotaxonómicos del género. En todas las especies se determinaron flavanonas 5-desoxi, compuestos que son raros en la naturaleza, ya

que desde el punto de vista de la biosíntesis el grupo 5-hidroxilo es característico en los flavonoides.

A partir del modelado molecular empleando métodos de dinámica molecular se propone para el compuesto 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (3.5) la configuración 7*R*,8*S*.

Se investigaron los extractos de todas las plantas estudiadas como potenciales agentes bioactivos frente a diferentes cepas de microorganismos, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), *Listeria monocytogenes*.

Se realizó el estudio de inhibición de *Paenibacillus larvae* con extractos y productos puros obtenidos a partir de diferentes especies de *Flourensia* con el fin de encontrar alternativas naturales para combatir la infección causada por esta bacteria en larvas de la abeja melífera.



## Índice

	Pág.
Introducción	21
Objetivos	25
<b>Capítulo 1 Consideraciones botánicas y químicas</b>	<b>27</b>
<b>1.1 Generalidades</b>	<b>29</b>
<b>1.2 Familia Asteraceae</b>	<b>29</b>
<b>1.3 <i>Barnadesia odorata</i> Griseb.</b>	<b>33</b>
1.3.1 Consideraciones botánicas	33
1.3.2 Descripción botánica	34
1.3.3 Distribución y hábitat	35
1.3.4 Usos populares	36
1.3.5 Antecedentes químicos	36
1.3.6 Actividad biológica	38
<b>1.4 <i>Flourensia tortuosa</i> Griseb.</b>	<b>39</b>
1.4.1 Consideraciones botánicas	39
1.4.2 Descripción botánica	41
1.4.3 Distribución y hábitat	42
1.4.4 Usos populares	43
1.4.5 Antecedentes químicos	44
1.4.6 Actividad biológica	55
<b>1.5 <i>Wedelia aurantiaca</i> Griseb.</b>	<b>58</b>
1.5.1 Consideraciones botánicas	58
1.5.2 Descripción botánica	58
1.5.3 Distribución y hábitat	59
1.5.4 Usos populares	59
1.5.5 Antecedentes químicos	60
1.5.6 Actividad biológica	62
<b>Capítulo 2 Materiales y métodos</b>	<b>65</b>
<b>2.1 Material vegetal</b>	<b>67</b>
<b>2.2 Solventes y métodos de extracción</b>	<b>68</b>
<b>2.3 Métodos espectroscópicos</b>	<b>69</b>

2.3.1 Espectroscopia Infrarroja (IR)	69
2.3.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	69
2.3.3 Espectrometría de masa (EM)	69
2.4 Métodos cromatográficos	70
2.4.1 Cromatografía gaseosa/Espectrometría de masas (CG/EM)	70
2.4.2 Cromatografía en columna	70
2.4.3 Cromatografía centrifuga radial (CCR)	74
2.5 Actividad biológica	74
2.5.1 Microorganismos indicadores y condiciones de cultivo	74
2.5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana	76

### Capítulo 3 Estudio fitoquímico de *Barnadesia odorata* 79

3.1 Metabólitos aislados	81
3.2 Material vegetal número de herbario <b>MCNS 9947</b>	83
3.2.1 Extracción	83
3.2.2 Purificación de los sub-extractos	85
3.3 Material vegetal número de herbario <b>MCNS 10253</b>	86
3.3.1 Extracción	86
3.3.2 Purificación de <b>E5</b>	87
3.4 Material vegetal número de herbario <b>MCNS 11342</b>	88
3.4.1 Extracción	88
3.4.2 Purificación de <b>E7</b>	90
3.5 Determinación estructural de los compuestos aislados	91
3- $\beta$ -lupeol y 3- $\beta$ -amirina (3.1 y 3.2)	91
3- $\beta$ -acetato de lupeolo (3.3)	94
Ácido 4-metoxicinámico (3.4)	97
3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (3.5)	98
Apigenina (3.6)	102
Apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido (3.7)	103
3.6 Análisis de compuestos volátiles	107

### Capítulo 4 Estudio fitoquímico de *Flourensia tortuosa* 111

4.1 Metabólitos aislados	113
4.2 Material vegetal número de herbario <b>Delbón 2</b>	115

4.2.1 Extracción	115
4.2.2 Purificación de los sub-extractos	116
4.3 Determinación estructural de los compuestos aislados	117
4-hidroxiacetofenona (4.1)	117
3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (4.2)	118
Encecalina (4.3), 2,2-dimetilcromeno (4.4), tremetona (4.5), 6-metoxitremetona (4.6)	120
2,5-diacetilbenzofurano (4.7)	129
2-acetil-6-metoxibenzofurano (4.8)	133
7-O-dimetil-alil-escopoletina (4.9)	137
2-C-metil-D-treono-1,4-lactona (4.10)	140
<b>Capítulo 5 Estudio fitoquímico de <i>Wedelia aurantiaca</i></b>	143
5.1 Metabolitos aislados	145
5.2 Material vegetal número de herbario MCNS 12975	146
5.2.1 Extracción	146
5.2.2 Purificación de E11	146
5.3 Determinación estructural de compuestos aislados	148
Ácido 3,4-dihidroxicinámico (5.1)	148
3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (5.2)	150
(+)-11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano (5.3)	152
<b>Capítulo 6 Actividad biológica</b>	157
6.1 Introducción	159
6.2 <i>Barnadesia odorata</i>	160
6.2.1 Determinación de actividad antimicrobiana	161
6.2.2 Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM)	166
6.2.3 Actividad inhibitoria de compuestos puros aislados de <i>B. odorata</i>	168
6.3 <i>Flourensia tortuosa</i> , <i>F. campestris</i> , <i>F. riparia</i> y <i>F. fiebrigii</i>	169
6.3.1 Actividad antimicrobiana de diferentes especies de <i>Flourensia</i>	170
6.3.2 Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM)	173
6.3.3 Actividad anti- <i>Paenibacillus larvae</i>	174
6.4 <i>Wedelia aurantiaca</i>	178

---

<b>Capítulo 7 Cromatografía líquida de alta resolución</b>	181
7.1 Introducción	183
7.2 Resultados	186
7.2.1 Análisis de los tiempos de retención de los compuestos puros	189
7.2.2 Análisis de los sub-extractos	189
7.3 Discusión	193
<b>Conclusiones</b>	197
<b>Bibliografía</b>	211

## Introducción

Un producto natural es una sustancia aislada de fuentes naturales vivas, ya sean bacterias, hongos, plantas, organismos marinos o animales (Nakanishi, 1999). Estos compuestos químicos son el resultado de la actividad metabólica, por eso es frecuente denominarlos también metabolitos (Gros y col., 1985).

Los seres vivos sintetizan *metabolitos primarios* que son el resultado de una serie de reacciones interrelacionadas mediadas por enzimas en los procesos catabólicos, anfibólicos y anabólicos. Estas reacciones proporcionan intermediarios biosintéticos y energía que son capaces de convertir precursores en macromoléculas esenciales utilizadas por los seres vivos para su propio crecimiento como ADN, ARN, proteínas, lípidos, carbohidratos, entre otros.

El metabolismo secundario comprende un conjunto de procesos cuya distribución está limitada en la naturaleza; en los mismos, se generan sustancias conocidas como *metabolitos secundarios* y son encontrados solamente en organismos específicos o grupo de organismos, siendo una expresión de la individualidad de las especies. Se sabe también que estos metabolitos se producen en una fase de desarrollo posterior al crecimiento, es decir que no tienen ninguna función durante el crecimiento, tienen una estructura química inusual y variada y constituyen a menudo una mezcla de productos estrechamente relacionados entre sí (Demian et al., 2000).

El metabolismo primario es básicamente el mismo para todos los seres vivos mientras que el metabolismo secundario es generalmente específico en cada espécimen en particular.

La función o beneficio de los *metabolitos secundarios* no han sido establecidos con seguridad, sin lugar a dudas los mismos desempeñan un papel importante en los organismos que los sintetizan. En particular, las plantas biosintetizan una gran variedad de compuestos químicos que almacenan tanto en raíces como en partes aéreas, algunos de ellos cumplen con un objetivo ecológico

relacionado a la defensa contra depredadores, insectos fitopatógenos y agentes microbianos en general, otros cumplen la función de prevenir la pérdida de agua en ambientes áridos o de proteger a la planta de los efectos de la luz solar.

Los productos naturales han sido investigados y utilizados para aliviar y curar enfermedades desde hace cientos de años. A comienzos del Siglo XX, el 80 % de todas las medicinas utilizadas eran obtenidas de raíces, tallos y hojas de plantas (McChesney et al., 2007). Los estudios clínicos, farmacológicos y químicos de estas medicinas tradicionales, derivadas principalmente de plantas, llevaron al descubrimiento de compuestos conocidos, tales como la aspirina, la digitoxina, la morfina, la quinina, entre otros. El descubrimiento de la penicilina en 1928 y los estudios posteriores hasta llegar a su comercialización, revolucionó la investigación del descubrimiento de nuevas drogas. Las compañías farmacéuticas y los grupos de investigación pronto se lanzaron al descubrimiento de nuevos antibióticos (Butler, 2004). Miles de plantas han sido ensayadas sobre cientos de bacterias *in vitro*, y varias plantas medicinales son activas frente a un amplio rango de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Sin embargo, comparativamente son pocas las que se ensayaron sobre animales y humanos para demostrar seguridad y eficacia.

En la actualidad los productos naturales continúan siendo una de las principales fuentes de drogas para proporcionar tratamientos terapéuticos para una gran variedad de enfermedades, ya sea como agentes de curación o paliativos (especialmente frente al dolor) (Njuguna et al., 2011). Se utilizan para obtener aceites esenciales, jugos, gomas, resinas, diferentes tipos de extractos como así también compuestos químicos puros bioactivos, denominados principios activos (PAs). Todos estos productos vegetales e inclusive las drogas vegetales crudas pueden ser usados en la preparación de Medicamentos Herbarios.

Por todo esto, se debe reconocer que los productos naturales ofrecen una amplia diversidad de compuestos con estructuras variadas. La búsqueda constante de nuevos productos con algún tipo de actividad biológica se hace necesaria por la resistencia que llegan a desarrollar los microorganismos

(bacterias, hongos, virus y algunos parásitos) a productos químicos ya existentes, como también los efectos secundarios adversos que pueden presentar estos últimos.

## Objetivos

Los **objetivos generales** de este trabajo de tesis son:

- Formar un profesional con capacidad de progreso independiente.
- Desarrollar habilidades concernientes a la purificación e identificación de productos de origen vegetal.
- Aplicar técnicas sencillas para la determinación de actividad biológica.

Los **objetivos específicos** que se plantean para lograrlos son los siguientes:

- Estudio fitoquímico de plantas de la Familia Asteraceae
  - Aislar metabolitos secundarios a partir de las especies: *Barnadesia odorata* Griseb., *Wedelia aurantiaca* Griseb., *Flourensia tortuosa* Griseb.
  - Purificar los metabolitos aislados utilizando diferentes técnicas cromatográficas y caracterizarlos estructuralmente a través de métodos espectroscópicos (Ultravioleta-Visible, Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear multidimensional y multinuclear, y espectrometría de masa).
- Realizar estudios de modelado molecular cuando la estructura así lo requiera.
- Aplicar ensayos biológicos, especialmente antimicrobianos, a extractos y compuestos puros.
- Investigar la relevancia taxonómica de los compuestos identificados.



## **Capítulo 1**

### **Consideraciones botánicas y químicas**

## 1.1 Generalidades

Los seres vivos evolucionaron dando lugar a una gran variedad de plantas y animales, cada uno de los cuales está adaptado para vivir en una clase particular de ambiente. No sólo se adaptaron al ambiente físico, adquiriendo tolerancia a ciertos límites de humedad, temperatura y otros parámetros, sino también al ambiente biótico, representado por todas las plantas y animales que viven en la misma región.

Los biólogos debieron clasificar las innumerables formas de vida y describir sus caracteres. Los botánicos adoptaron sistemas de clasificación basados en las relaciones naturales, colocando en un mismo grupo a los organismos estrechamente relacionados por su origen evolutivo. Una **Familia** agrupa el conjunto de géneros que poseen diversos caracteres comunes entre sí, las familias se pueden agrupar en **órdenes**, los órdenes en **clases** y las clases en **phyla**. La **subfamilia** es el desmembramiento que se realiza en las familias y que agrupa a las tribus y subtribus. Las **tribus** son las partes en las que se divide una subfamilia y que contiene a las subtribus o a los géneros muy afines. El **género** es la escala jerárquica que agrupa a las especies. Una **especie** puede definirse como una población de individuos semejantes en sus caracteres estructurales y funcionales.

## 1.2 Familia Asteraceae

Las plantas vasculares pueden reunirse en plantas con semillas y plantas sin semillas. A su vez, las plantas con semillas se clasifican en dos grandes grupos, las **Angiospermas** o plantas con semillas en el interior de frutos y las **Gimnospermas** que presentan semillas al descubierto. Las Angiospermas son el grupo de plantas más abundante en la actualidad, con cerca de 235.000 especies que se dividen en dos clases, las **Dicotiledóneas**, que son las que poseen semillas con dos cotiledones y constituyen un alto porcentaje de todas las Angiospermas y las **Monocotiledóneas**.

La familia Asteraceae (también conocida como *Compositae*) es una de las más numerosas dentro de las Angiospermas. Es fácilmente diferenciable por su inflorescencia elemental en capítulos. Incluyen desde pequeñas hierbas de 1 cm de

altura hasta árboles de más de 30 m (Katinas et al., 2007). Su nombre deriva de las cabezuelas compactas que asemejan flores individuales, pero que en realidad están constituidas por flores más pequeñas, tubulares en el centro y liguladas en la zona marginal; por lo tanto, lo que parece ser una sola flor es en realidad un conjunto de flores. Es una familia cosmopolita, con más de 1500 géneros y cerca de 24000 especies, distribuidas por todos los continentes, excepto la Antártida (Freire, 2014). No existen especies marinas y las de agua dulce son muy escasas. Escasean en las zonas tropicales bajas y son numerosas y diversas en zonas montañosas y en regiones áridas. En Argentina crecen unos 227 géneros y 1490 especies espontáneas convirtiéndose en la familia más numerosa en nuestro país (Katinas et al., 2007).

El botánico francés Henri Cassini describió detalladamente la morfología de las Asteráceas, y fue uno de los primeros contribuyentes al conocimiento y a la sistemática de esta familia. Otro gran colaborador fue George Bentham que en el año 1897 estableció la clasificación de 13 tribus (Katinas et al., 2007).

Harold Robinson y Robert King (King & Robinson, 1970) estudiaron los microcaracteres (caracteres anatómicos, citológicos y químicos) en lugar de los macrocaracteres para tomar decisiones taxonómicas.

En 1987, Jansen y Palmer, mediante estudios moleculares de ADN, realizaron aportes más significativos a la clasificación y filogenia de esta familia. Con estos estudios ubicaron a la subtribu Barnadesiinae, muy representada en la Argentina, en el rango de subfamilia Barnadesioideae y la consideraron como taxón basal en el árbol evolutivo de la familia.

En el mismo año, el botánico Kane Bremer produjo el primer cladograma de las Asteráceas basándose en caracteres morfológicos; unos años después escribió un tratado sobre la familia (Bremer, 1994). Estos estudios van en paralelo con el avance de los análisis moleculares que llevaron en años recientes a la disgregación en numerosas tribus o subfamilias de la mayoría de las tribus tradicionales (Funk et al., 2005; Panero & Funk, 2002).

Recientemente, fue propuesta una nueva clasificación para la familia donde se consideran 13 subfamilias, sobre la base del análisis de 14 marcadores moleculares del cloroplasto (Panero et al., 2014); en esta propuesta, la subfam. Barnadesioideae es la más basal (Figura 1.1).

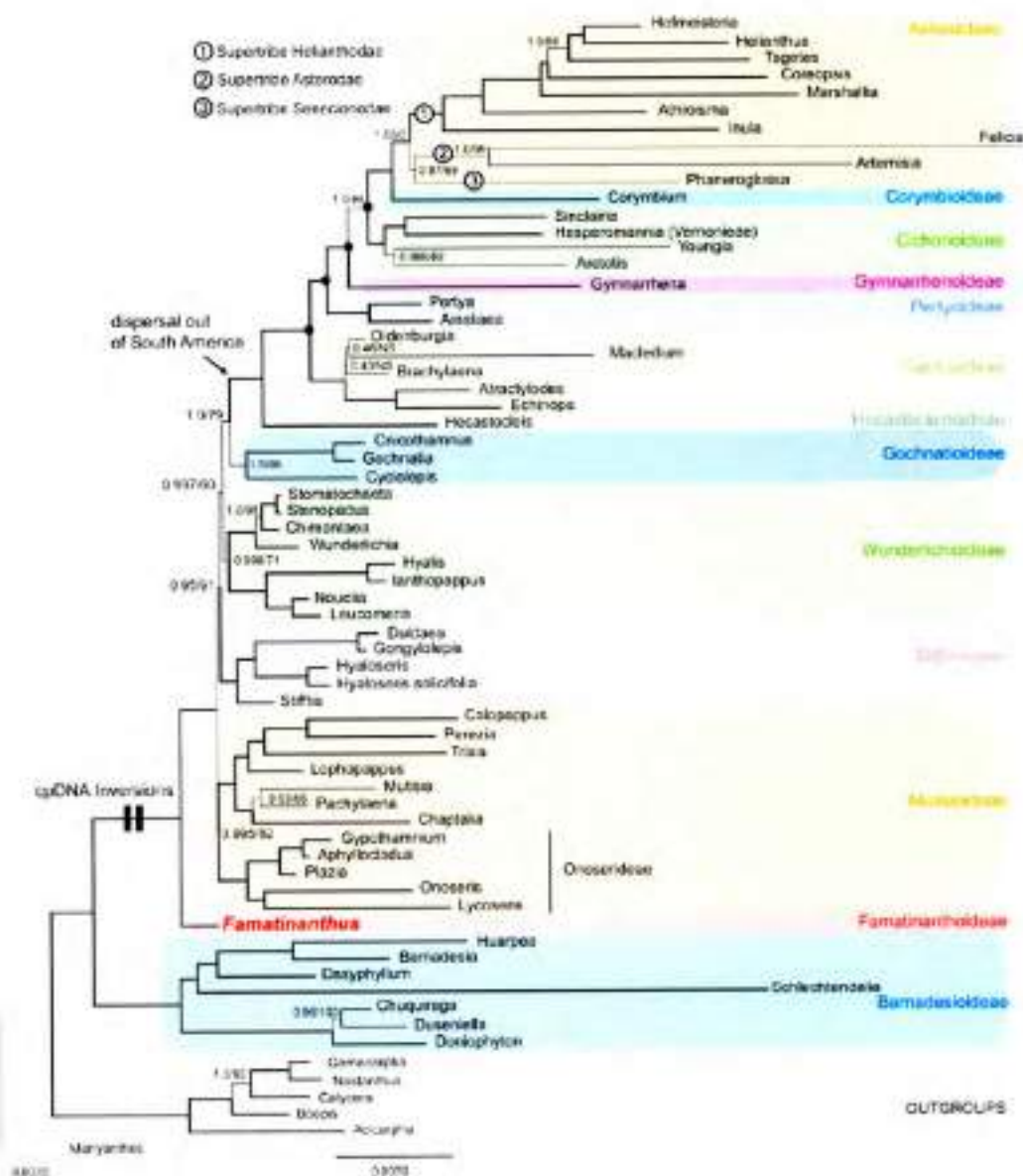


Figura 1.1 Clasificación de la Familia Asteraceae, según Panero et al. (2014)

En nuestro país, Ángel L. Cabrera (1908-1999) fue el precursor en los estudios de la familia Asteraceae. Cabrera y autores posteriores se basaron en la clasificación de Bentham en las distintas floras regionales (Cabrera, 1963, 1971, 1974, 1978; Cabrera & Zardini, 1978).

En la reciente aparición del tratamiento de Asteraceae para Argentina, se aplican estos criterios de clasificación con ligeras modificaciones, reconociéndose 16 tribus para nuestro país: Anthemideae, Arctotideae, Astereae, Barnadesieae, Calenduleae, Cardueae, Eupatorieae, Gnaphalieae, Helenieae, Heliantheae, Inuleae, Lactuceae, Liabeae, Mutisieae, Senecioneae y Vernonieae (Freire, 2014).

### 1.3 *Barnadesia odorata* Griseb.

#### 1.3.1 Consideraciones botánicas

La subfamilia Barnadesioideae es una de las entidades más pequeña de Asteraceae; está comprendida por 9 géneros y ca. 90 especies que crecen exclusivamente en Sudamérica, a lo largo de los Andes desde Venezuela hasta la Patagonia en Santa Cruz. En la Argentina, crecen 7 géneros con 26 especies (Urtubey, 2014).

Los géneros de esta subfamilia se distinguen del resto de la familia por la presencia de espinas axilares, pelos del tipo barnadesioides sobre estructuras florales y foliares, tipos peculiares de la epidermis de la testa y diversos tipos de polen (Gruenstaeudl et al., 2009).

#### Subfamilia Barnadesioideae-Tribu Barnadesieae

*Arnaldoa* Cabrera

*Barnadesia* Mutis ex L. f.

*Chuquiraga* Juss.

*Dasyphyllum* Kunth

*Doniophyton* Wedd.

*Duseniella* K. Schum.

*Fulcaldea* Poir.

*Huarpea* Cabrera

*Schletendalia* Less.

Las especies de *Barnadesia* se encuentran distribuidas a lo largo de la cordillera de los Andes y en los bosques de Argentina, Brasil y Paraguay. El género está formado por 18 especies, de las cuales la mayoría crece en alturas comprendidas entre 400-5000 msnm (Urtubey, 2014).

En un principio *Barnadesia* estuvo en una subtribu dentro de la tribu Mutiseae, pero actualmente se encuentra ubicado en una subfamilia propia con una única tribu (Panero et al., 2014).

Jansen y Palmer, mediante estudios moleculares de ADN, observaron que todos los géneros muestreados de Asteráceas poseían una inversión de 22 kilobases en el genoma cloroplástico, excepto en tres géneros de la subtribu Barnadesiinae (perteneciente en ese momento a la tribu Mutisieae): *Barnadesia*, *Chuquiraga* y *Dasyphyllum* (Jansen & Palmer, 1988, 1987). Estos resultados dieron lugar a una reevaluación de las relaciones filogenéticas dentro de la familia. Ellos descartaron la posibilidad de que la inversión haya ocurrido en el ancestro común de la familia y que se haya revertido en los géneros pertenecientes a Barnadesiinae.

La ausencia de la inversión en estos géneros llevó a la conclusión de que esta subtribu representa un linaje primitivo en la familia. Esto, combinado con datos morfológicos, sugirió elevar a la subtribu Barnadesiinae al rango de subfamilia Barnadesioideae (Bremer, 1994). En la actualidad es considerado el taxón basal en el árbol evolutivo de la familia (Panero et al., 2014).

*Barnadesia* es considerado el género más evolucionado de la subfamilia por su polinización por colibríes y por la presencia de un determinado tipo de polen.

### 1.3.2 Descripción botánica

La clasificación taxonómica es:

**Familia:** Asteraceae

**Subfamilia:** Barnadesioideae

**Tribu:** Barnadesieae

**Género:** *Barnadesia* Mutis ex L. f.

**Especie:** *Barnadesia odorata* Griseb.

*Barnadesia odorata* es un árbol o arbusto de 1-3 m de altura, **tallos** con espinas axilares geminadas hasta de 35 mm de longitud, densamente ramoso, con ramas glabras. Posee **hojas** alternas o en fascículos, corta- a largamente pecioladas; láminas elípticas de ápice acuminado, mucronado o espinoso, de 30-70 mm de longitud por 15-25 mm de anchura. Los **capitulos** son sésiles, terminales, solitarios o geminados; involucro acampanado de 20-29 mm de longitud por 10-16 mm de diámetro; brácteas involucrales dispuestas en 7-9 series. Las **flores** son blancas, rosadas o liláceas (**Figura 1.2**); flores marginales 13, con corola bilabiada (4+1), densamente pubescente en el tercio medio, de 18-23 mm de longitud y con anteras de 5,8-7,1 mm de longitud, filamentos libres entre sí, papus plumoso formado por cerdas amarillas, de 9,5-12,0 mm long. Flores centrales 3, con corola ligulada, pubescencia similar a las flores marginales, de 13,8-19,8 mm de longitud, anteras 5, de 5,5-6,8 mm de longitud, papus simple formado por cerdas iguales o algo más cortas que el tubo de la corola (Novara, 1995; Urtubey, 2014). Algunos de sus capitulos exhalan un delicado perfume mientras que otros son totalmente inodoros.



**Figura 1.2** (a) Capitulum y espinas; (b) Capitulos y hojas de *B. odorata* Griseb.  
\*Fotos Dr. Guillermo Ellenreider (Novara, 1995)

### 1.3.3 Distribución y hábitat

Esta especie crece en las laderas de montaña y en el borde de los bosques de transición del noroeste argentino (Jujuy, Salta y Tucumán) y Bolivia (Dpto. Tarija, Cochabamba y Santa Cruz), entre los 400-2500 msnm. Florece de junio a enero, estado en el que no presenta hojas. Novara la describe como una especie agresiva



en pastizales serranos sobrepastoreados e invasora y molesta cuando hay mal manejo de hacienda.

**Nombres vulgares:** "Clavel, clavelillo, clavillo, alfiler, alfilerillo, alfilerero".

#### 1.3.4 Usos populares

*Barnadesia odorata* no ha sido considerada como una planta de gran interés para el hombre, excepto por su alto poder calórico para utilizarse como combustible (Fournet et al., 1994). Se la emplea también para la confección de cercos precarios en campos de cultivo por sus ramas con espinas. Los tallos huecos, rectos y livianos, a veces se utilizan como cañas para colgar las hojas de tabaco durante el estufado, pero por ser muy débiles son de baja calidad y duración (Novara, 1995). Aparentemente los animales no la comen y es una especie de índice ideal en la evaluación del impacto de herbívoros en praderas naturales.

#### 1.3.5 Antecedentes químicos

En estudios químicos de la subfamilia Barnadesioideae se observa un perfil muy simple de flavonoides. En los géneros *Arnaldoa*, *Barnadesia*, *Chuquiraga*, *Dasyphyllum*, *Doniophyton*, *Fulcaldea* y *Schlechtendalia* predominan los derivados 3-O-glucósidos y 3-O-rutinósidos de los flavonoles kaempferol (1.1) y quercetina (1.2) (Bohm & Stuessy, 1995).

En la **Tabla 1.1** se muestran compuestos aislados por Bohm & Stuessy (1995) de 12 especies del género *Barnadesia*.

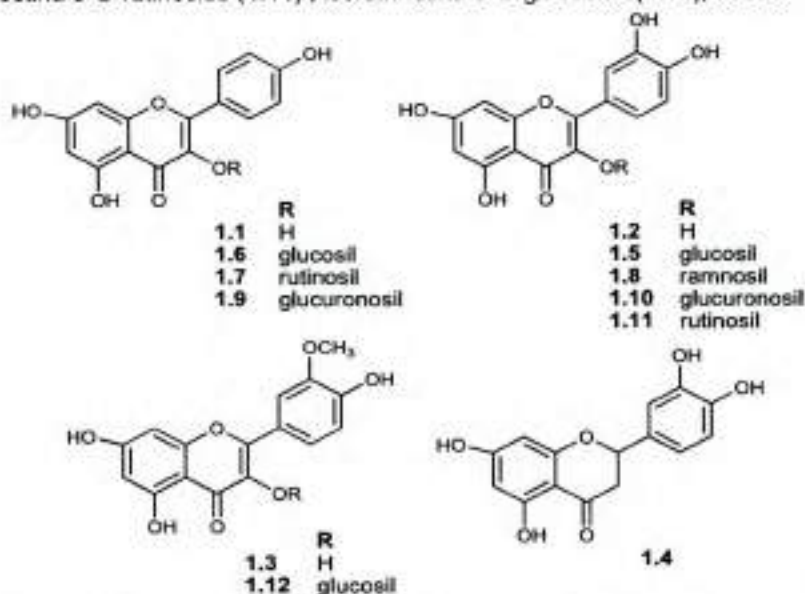
Es interesante destacar que *Barnadesia* es el único género dentro de la subfamilia capaz de producir los flavonoides isorhamnetina (1.3) (*B. parviflora*) y eriodictiol (1.4) (*B. aculeata*, *B. arborea*, *B. parviflora*) (Bohm & Stuessy 1995).

*Barnadesia odorata* también fue estudiada por Mendiondo et al. (1997) quienes informaron la presencia de los flavonoides quercetina-3-O-glucósido (1.5), kaempferol-3-O-glucósido (1.6) y kaempferol-3-O-rutinósido (1.7). En la **Figura 1.3**, los compuestos 1.1 a 1.4 corresponden a las agliconas y desde 1.5 a 1.12 a los derivados glicosilados de las mismas.

Tabla 1. 1 Flavonoides aislados del género *Barnadesia* (Bohm & Stuessy, 1995)

Especies	Compuestos aislados*							
	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9/1.10	1.11	1.12
<i>B. aculeata</i>	t	+	+	+			+	
<i>B. arborea</i>	+	+	+			+	+	
<i>B. dombeyana</i>		+	+		+	+	+	
<i>B. cf. dombeyana</i>		+	+		+			
<i>B. hutchinsoniana</i>		+	+	+		+	+	
<i>B. jelskii</i>		+	+	+		+	+	
<i>B. kingii</i>		+	+	+	+	+	+	
<i>B. lehmannii</i>		+	+	+	+	+	+	
<i>B. cf. lehmannii</i>		+	+	+	+	+	+	
<i>B. odorata</i>		+	+	+			+	
<i>B. parviflora</i>	+	+	+	+		+	+	+
<i>B. spinosa</i>		+	+	+	+		+	

eriodictiol (1.4); quercetina 3-O-glucósido (1.5); kaempferol 3-O-glucósido (1.6); kaempferol 3-O-rutinósido (1.7); quercetina 3-O-rhamnósido (1.8); kaempferol y/o quercetina 3-O-glucurónido (1.9, 1.10); quercetina 3-O-rutinósido (1.11); isoramnetina 3-O-glucósido (1.12); trazas.

Figura 1.3 Compuestos aislados previamente del género *Barnadesia*

### 1.3.6 Actividad biológica

Es importante destacar que para la especie objeto de estudio en este trabajo de tesis (*B. odorata*) no existen antecedentes previos en actividad biológica.

Sólo dos especies de *Barnadesia* presentan antecedentes en actividad biológica. Las flores de *B. arborea* son utilizadas para tratar la dermatitis y la gripe (Tene et al., 2007). *Barnadesia dombeyana* es considerada una planta medicinal en Ancash, Perú, para el tratamiento de gripe, resfríos, bronquitis, dolor e inflamación de las articulaciones y dolores reumáticos (Gonzales de la Cruz et al., 2014).

## 1.4 *Flourensia tortuosa* Griseb.

### 1.4.1 Consideraciones botánicas

El género *Flourensia* DC. se encuentra exclusivamente en el continente americano. Está compuesto por 32 especies (Ariza Espinar, 2000). Tiene una distribución anfitropical con 13 taxones en América de Norte, principalmente en México, donde dos especies, *F. cernua* y *F. pringlei*, se extienden hasta el sudoeste de los Estados Unidos; en América del Sur habitan 20 taxones, 12 de ellos crecen en Argentina, de las cuales 6 habitan en la zona central del país (Ariza Espinar, 2000). Su importancia se debe a que todas son endémicas de esa región y presentan distribución restringida. Habitan en zonas serranas, en ambientes caracterizados por un clima semiárido y suelos empobrecidos (Ariza Espinar, 2000; Delbón et al., 2012).

*Flourensia* es uno de los géneros para el cual existen grandes discrepancias en lo que respecta a su clasificación. Durante décadas varios autores ubicaron a *Flourensia* en diferentes subtribus de acuerdo a estudios morfológicos y químicos.

Hoffman (1894), colocó a este género dentro de la subtribu Verbesininae, entre los géneros *Lipochaeta* y *Spilanthes*. Luego, Blake, en 1913, observó que *Flourensia* se relacionaba con los géneros *Helianthus*, *Viguiera*, *Simsia*, *Encelia*, *Enceliopsis*, *Geraea*, *Helianthella* y *Verbesina*, pertenecientes a la subtribu Helianthinae. Recién en 1977, Stuessy incluyó a *Flourensia* dentro de esta subtribu, basándose en las siguientes características morfológicas: arbustos con hojas alternas, flores marginales asexuadas y flores del disco fértiles, páleas conducidas y receptáculos convexos.

A pesar de que la subtribu Helianthinae es químicamente uniforme, caracterizándose por la presencia de eudesmanólidos lactonizados en C-8 entre otros metabolitos secundarios (germacranólidos, derivados del kaurano y acetilenos C-17), Robinson (1981) ubicó a *Flourensia* dentro de otra subtribu denominada Ecliptinae junto con *Encelia*, *Enceliopsis*, *Gerea* y *Phoebanthus*, criterio también seguido por Dillon (1984). Sobre la base que algunos géneros de esta subtribu (particularmente *Encelia*) presentan lactonas sesquiterpénicas del tipo

eudesmanólido y elemanólidos con un grupo metilo en la posición inusual 10- $\alpha$  (Bohlmann, 1990). Así *Flourensia* se ubicó junto a *Encelia* dentro de esta subtribu por la presencia de eudesmanólidos lactonizados en C-8.

Panero (2005), mediante estudios comparativos de secuencias de ADN del cloroplasto, ubicó a los géneros *Flourensia*, *Encelia*, *Enceliopsis*, *Gerea* y *Helianthella* dentro de una nueva subtribu Enceliinae.

Dillon (1984) propuso un esquema de relaciones interespecíficas en *Flourensia* basado fundamentalmente en caracteres exomorfológicos: morfología de los capítulos, incluyendo el tamaño y forma de filarias, y presencia y número de flores marginales. También consideró el tamaño y forma de las hojas, pubescencia, tipo de inflorescencia, preferencias ecológicas y ubicación geográfica para la delimitación de los grupos. Entre los taxones de América del Sur, se reconocieron tres grupos poco diferenciados.

Uno de ellos está compuesto por *F. macrophylla*, *F. angustifolia*, *F. peruviana* y *F. policephala*, todas ellas distribuidas en los Andes del norte al sur de Perú. Comparten similar inflorescencia y morfología capitular y poseen preferencias ecológicas similares. *Flourensia thurifera* está relacionada a este grupo a través de *F. macrophylla* ya que ambas tienen hojas e involucros similares.

*Flourensia tortuosa* junto con *F. suffrutescens*, *F. macroligulata* y *F. oolepis* integran otro grupo caracterizado por capítulos grandes con filarias anchas y 13 a 21 flores marginales. *Flourensia heterolepis* parece estar en transición entre este grupo y el último y está más relacionada con *F. polycephala*.

*Flourensia riparia*, *F. campestris*, *F. leptopoda*, *F. niederleinii*, *F. hirta*, *F. fiebrigii* y *F. blakeana* exhiben todas una tendencia hacia pocas flores marginales. La mayoría de estas especies tiene entre 5 a 8 flores marginales. *Flourensia hirtissima*, con capítulo solitario, se acerca más a algunos individuos de *F. fiebrigii* y es, probablemente, un producto de aquella línea. Este linaje está claramente relacionado al anterior pero tiende a ocupar ambientes más áridos a bajas alturas.

### 1.4.2 Descripción botánica

La clasificación taxonómica de *F. tortuosa* es:

**Familia:** Asteraceae

**Subfamilia:** Asteroideae

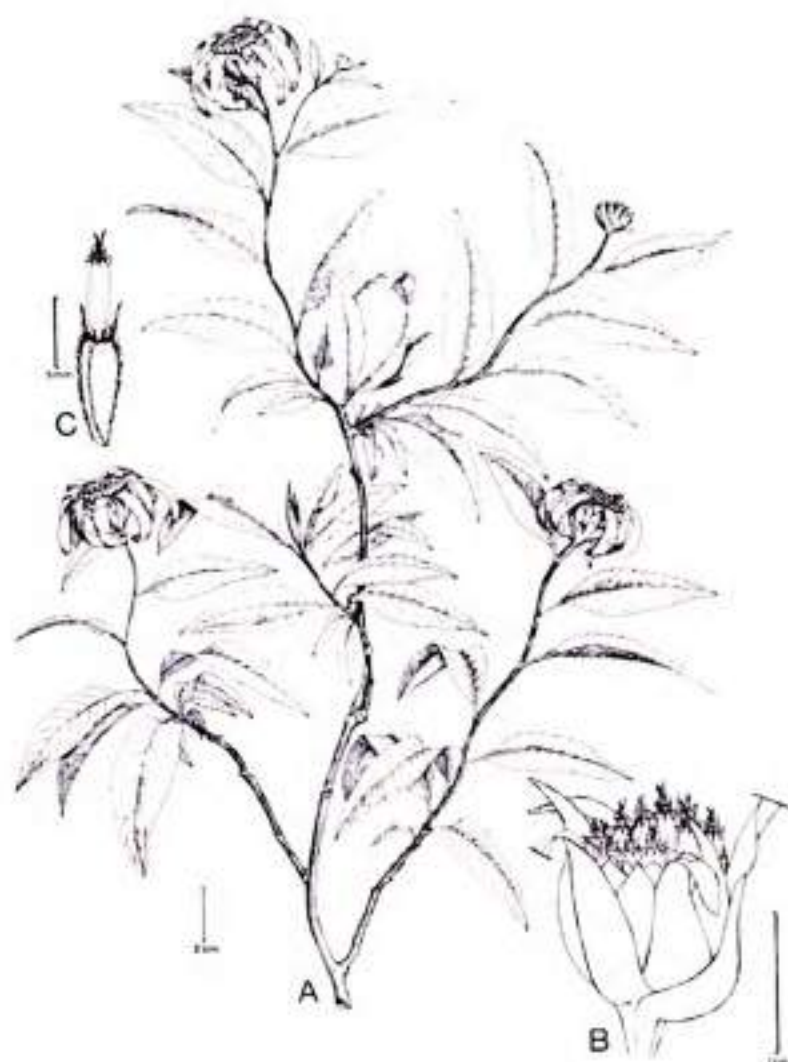
**Tribu:** Heliantheae

**Subtribu:** Encelliinae

**Género:** *Flourensia* DC.

**Especie:** *Flourensia tortuosa* Griseb.

*Flourensia tortuosa* es un arbusto hasta de 2 metros de altura; posee **tallos** ascendentes. **Hojas** lanceoladas a ovoides, (-3) 5-9 cm long, 1,5-3,5 (-5) cm de ancho, base cuneada a redondeada, ápice acuminado a obtuso, márgenes enteros; pecíolos de 3-17 mm long. **Inflorescencias** solitarias o laxamente cimosas, 2-3 cabezuelas, pedúnculos 1-4 cm long, puberulento, bracteado. **Capítulo** radiado, 10-15 mm alto, 10-20 mm ancho; involucreo hemisférico, a menudo con brácteas calciculadas; filarios en 2-3 series, iguales o subiguales, a menudo ovados a oblongo-lanceolados, (-5) 7-15 mm long, (-2) 3-7 mm de ancho, herbáceos; flores liguladas ca. 10, las ligulas a menudo oblongas, 18-30 mm long, 7-10 mm ancho, tubo ca. 8 mm long, glabro; flores tubulosas 30-50, las corolas cilíndricas, 4-6 mm long, tubo ca. 1 mm long, lóbulos ca. 0,7 mm long. Aquenios obcónicos, 5-6 mm long, márgenes seríceos, caras seríceas a glabrescentes; papus con 2 aristas, ca. 3,5 mm long, a menudo bifido, persistente o caduco (**Figura 1.4**) (Dillon, 1984).



**Figura 1.4** *F. tortuosa* A: rama florífera; B: capitulo; C: flor del disco.  
Reproducido de Dillon (1984)

### 1.4.3 Distribución y hábitat

La especie en estudio crece entre 1200-3100 msnm, en suelos arenosos. Se encuentra en Catamarca, entre las Sierras de Zapata, Aconquija y Belén. Se observan poblaciones dispersas en Salta y Tucumán (**Figura 1.5**). Presenta hojas variables, aparentemente en función de la humedad disponible en sus respectivos hábitats. Sus filarios también son variables: individuos de Tucumán y Salta tienen

filarios estrechos y oblongo- lanceolados; en cambio, en Catamarca son más anchos y ovados

Esta especie no posee nombres vulgares.

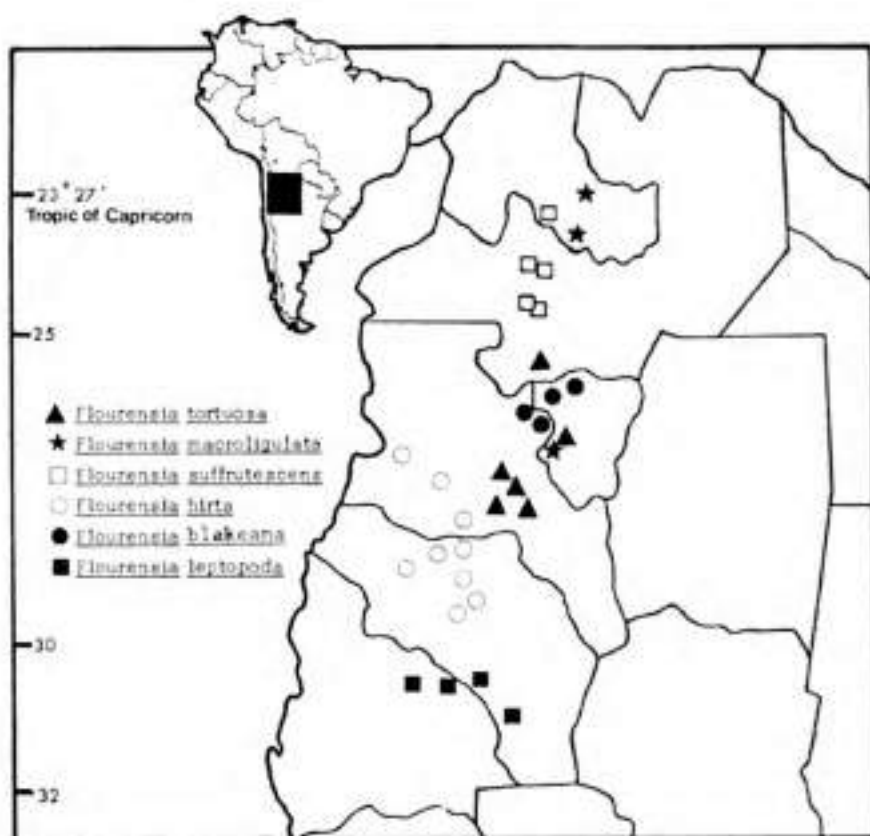


Figura 1.5 Distribución geográfica de *F. tortuosa* en Argentina (Dillon, 1984)

#### 1.4.4 Usos populares

En literatura no existen registros de usos para la especie *F. tortuosa*.

Sin embargo, algunas especies de *Flourensia* son reconocidas en medicina popular ya que se las utiliza para aliviar diversas enfermedades gastrointestinales, como purgante, expectorante y antirreumática; otras, en cambio, son usadas como incienso, aromáticas y tintóreas (Delbón et al., 2012).



### 1.4.5 Antecedentes químicos

Mediante el estudio fitoquímico de once especies del género *Flourensia*, se aislaron metabolitos derivados de la ruta del mevalonato, del acetato y compuestos derivados de la ruta del ácido shikímico. Éstas son:

- F. campestris* Griseb.
- F. cernua* DC.
- F. fiebrigii* S.F. Blake
- F. heterolepis* S.F. Blake
- F. ilicifolia* Brandege
- F. macrophylla* S.F. Blake
- F. oolepis* S.F. Blake
- F. resinosa* S.F. Blake
- F. retinophylla* S.F. Blake
- F. riparia* Griseb.
- F. thurifera* (Molina) DC.

No existen antecedentes bibliográficos de estudio fitoquímico para la especie en estudio (*F. tortuosa*).

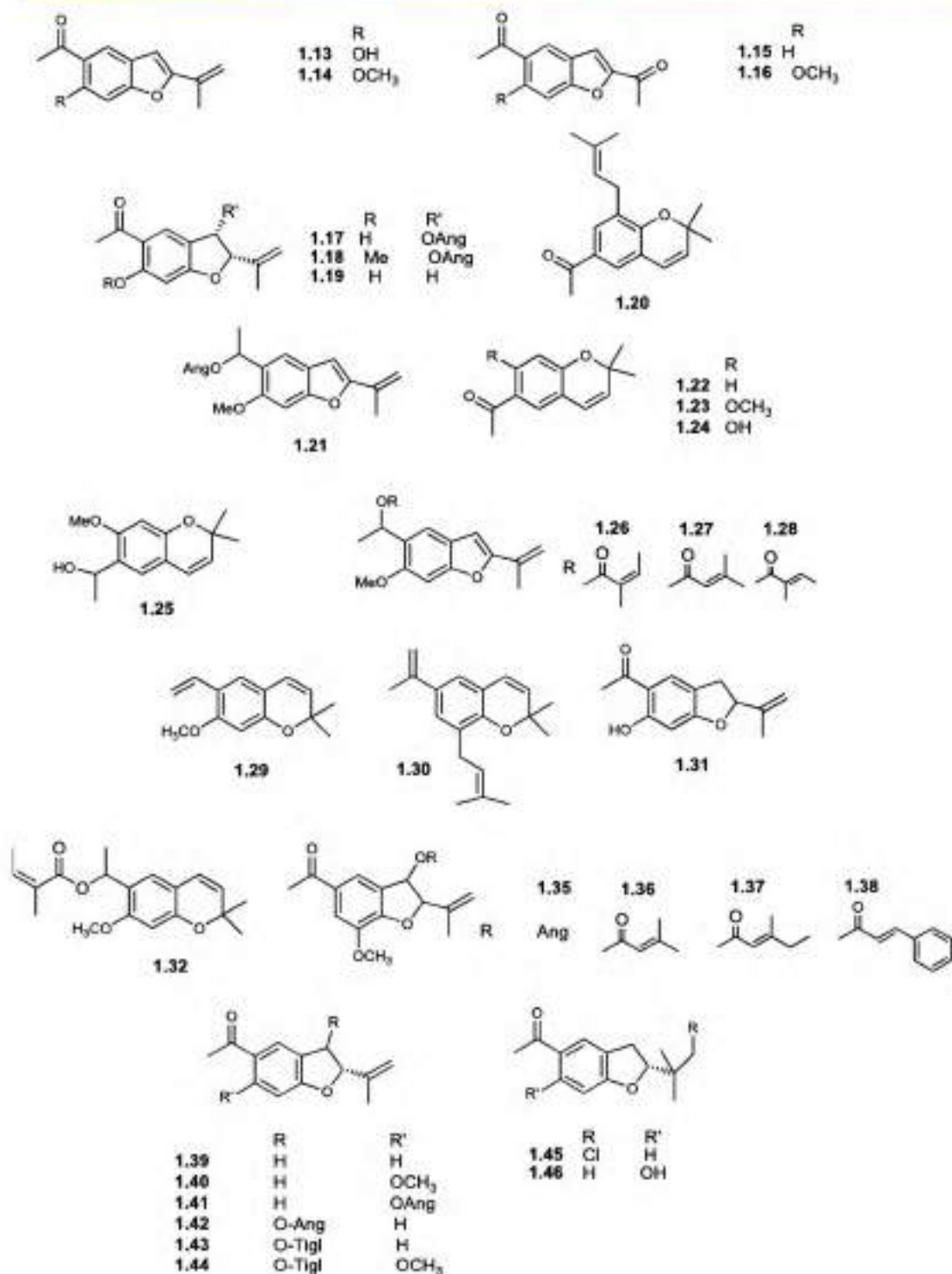
El género *Flourensia* se caracteriza por la presencia de benzofuranos, cromenos, sesquiterpenos sobre todo de núcleo eudesmano, lactonas sesquiterpénicas y flavonoides, entre otros compuestos menos predominantes (Rios et al., 2013).

A partir de nueve de las 11 especies estudiadas se aislaron benzofuranos y cromenos de estructuras variadas, metabolitos que derivan de la ruta del acetato a través de p-hidroxiacetofenona. Estas especies son *F. campestris*, *F. cernua*, *F. fiebrigii*, *F. heterolepis*, *F. macrophylla*, *F. oolepis*, *F. resinosa*, *F. riparia* y *F. thurifera* (Tabla 1.2, Figura 1.6). Esta clase de compuestos no se han reportado en *F. ilicifolia* y *F. retinophylla*.

Tabla 1.2 Benzofuranos y cromenos aislados de especies de *Flourensia*

Especies	Compuestos aislados	Referencias
<i>F. campestris</i>	Metoxieuparona 1.16*	Uriburu et al., 2004
<i>F. cernua</i>	Euparina 1.13, 6-acetil-2,2-dimetil cromeno 1.22, 7-hidroxi encecalina 1.24, 6-(1-hidroxietyl)-7-metoxi-2,2-dimetil-2H-cromeno 1.25, 7-metoxi-2,2-dimetil-6-vinil-2H-cromeno 1.29, 6-acetil-2,2-dimetil-8-(3-metil-2-butenil)-2H-cromeno 1.30, 2,3-dihidro euparina 1.31, 6-[1-(angeloiloxi) etil]-7-metoxi-2,2-dimetil-2H-cromeno 1.32, 4-metoxi-2,3-dihidro euparina 1.33, 6-acetil-8-metoxi-2,2-dimetil-2H-cromen-5-ol 1.34, cernuanon-angelicato 1.35, cernuanon-senecioato 1.36, cernuanon-(trans-3-metil-2-pentenoato) 1.37, cernuanon-cinamato 1.38	Bohlmann & Grenz, 1977
<i>F. fiebrigii</i>	Tremetona 1.39, 6-metoxitremetona 1.40, 2-isopropenil-3-oxiangeloil-5-acetil-cis-2,3-dihidrobenzofurano 1.41, 5-acetil-2,3-dihidro-2 $\alpha$ -propenil-3 $\alpha$ -oxi-angeloil-benzofurano 1.42, 5-acetil-2,3-dihidro-2 $\alpha$ -propenil-3 $\alpha$ -oxi-tigloil-benzofurano 1.43, 5-acetil-2,3-dihidro-2 $\alpha$ -propenil-3 $\alpha$ -oxi-tigloil-6-metoxibenzofurano 1.44	Uriburu, 2002 Uriburu et al., 2007
<i>F. heterolepis</i>	3 $\alpha$ -angeloiloxi-6-hidroxi tremetona 1.17, 3 $\alpha$ -angeloiloxi-6-metoxi tremetona 1.18, 6-hidroxi tremetona 1.19, 6-acetil-8-(3,3-dimetilalil)-2,2-dimetilcromeno 1.20, 2-isopropenil-5-(1'-angeloiloxietil)-6-metoxibenzofurano 1.21, 6-acetil-2,2-dimetil cromeno 1.22, 7-hidroxi encecalina 1.24, 6-(1-hidroxietyl)-7-metoxi-2,2-dimetil-2H-cromeno 1.25	Bohlmann & Jakupovic, 1979
<i>F. macrophylla</i>	Euparina 1.13, metoxi-euparina 1.14, 3 $\alpha$ -angeloiloxi-6-hidroxi tremetona 1.17, 3 $\alpha$ -angeloiloxi-6-metoxi tremetona 1.18, 6-acetil-8-(3,3-dimetilalil)-2,2-dimetilcromeno 1.20	Bohlmann et al., 1984*
<i>F. oolepis</i>	Euparina 1.13	Guerreiro et al., 1979
<i>F. resinosa</i>	Flourensianol angelicato 1.26, flourensianol senecioato 1.27, flourensianol tiglato 1.28	Bohlmann & Grenz, 1977
<i>F. riparia</i>	Euparona 1.15, metoxieuparona 1.16, encecalina 1.23, 6-metoxitremetona 1.40, 5-acetil-2,3-dihidro-2-(2-[1-cloro-2-hidroxiopropil])-benzofurano 1.45, 2,3-dihidro-11,12-dihidroieuparina 1.46	Uriburu et al., 2004 Uriburu et al., 2005
<i>F. thurifera</i>	Euparina 1.13, encecalina 1.23, 7-hidroxi encecalina 1.24	Faini et al., 1997

\*los números no son correlativos debido a que los compuestos están agrupados por familia de compuestos, según se observa en la Figura 1.6


 Figura 1.6 Benzofuranos y cromenos aislados de especies de *Flourensia*

Ocho de las 11 especies analizadas químicamente incluyen metabolitos derivados de la ruta del mevalonato (Tabla 1.3 y Figura 1.7). Éstos son sesquiterpenos de diferentes núcleos tales como eudesmanos, eremofilanos, aromadendranos, germacranos, bisabolenos y lactonas sesquiterpénicas del tipo eudesmanólido. También se informó la presencia de triterpenos en *F. resinosa* (Rodríguez Hahn & Rodríguez, 1973), *F. macrophylla* (Bohlmann et al., 1984 a) y *F. heterolepis* (Bohlmann & Jakupovik, 1979)

La presencia de lactonas sesquiterpénicas es bastante común dentro de la subtribu Enceliinae; sin embargo, en *Flourensia* se han aislado sólo a partir de *F. riparia* (Uriburu et al., 2004) y *F. macrophylla* (Bohlmann et al., 1984a). Los compuestos 4- $\beta$ -hidroxi-4,10 $\alpha$ -dimetil-7 $\alpha$ H,8 $\alpha$ H-eudesman-11-dien-8,12-ólido (1.53) y 10 $\alpha$ -metil-7 $\alpha$ H,8 $\alpha$ H-eudesman-4,11-dien-8,12-ólido (1.56) tienen grupo CH<sub>3</sub>-10 en posición  $\alpha$ ; esta estereoquímica es característica de la subtribu Ecliptinae.

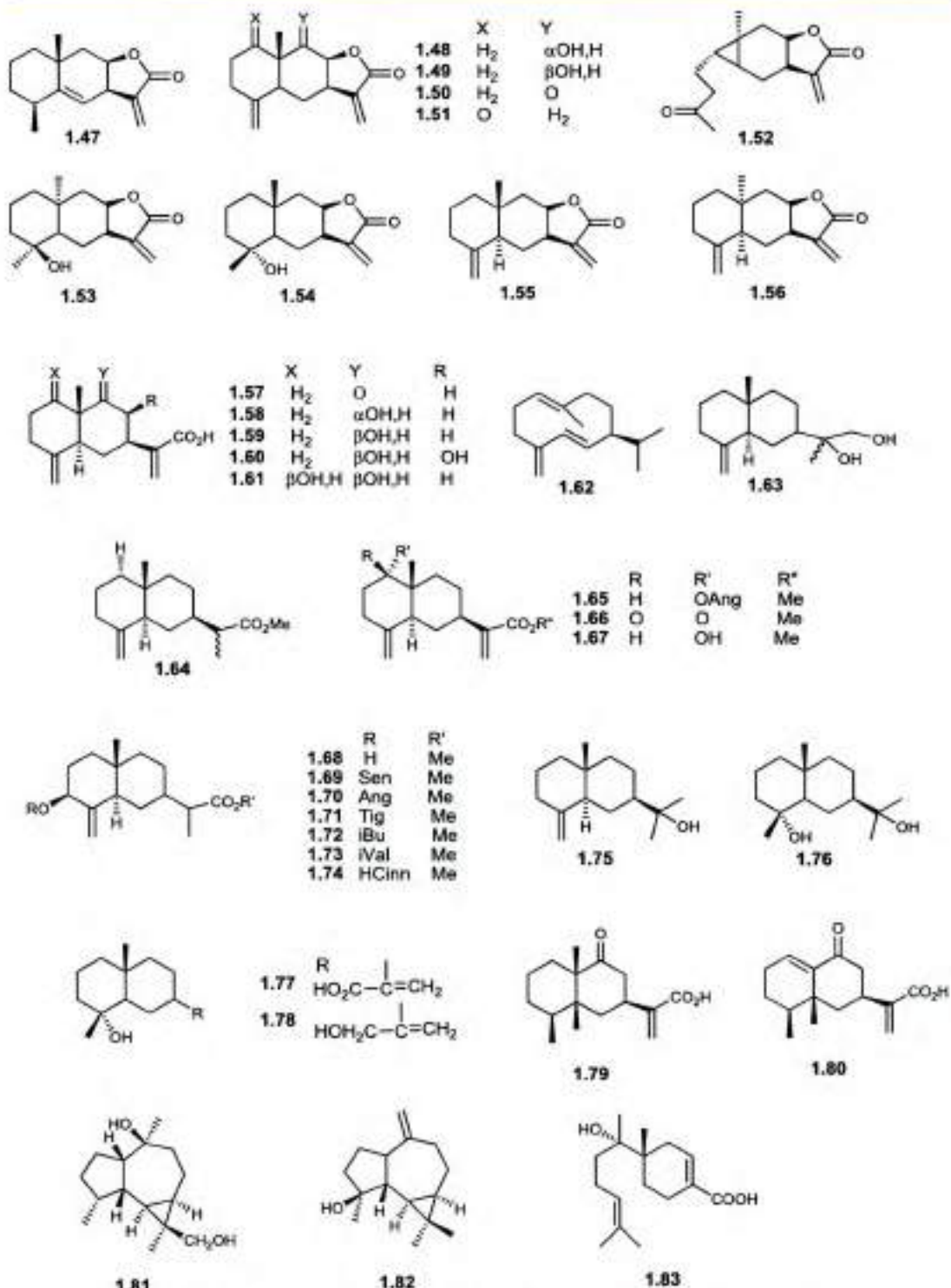
Tabla 1.3 Sesquiterpenos aislados de especies de *Flourensia*

Especies	Compuestos aislados	Referencias
<i>F. campestris</i>	(4S,8S)-7-carboxi-8-hidroxi-1(2),12(13)-dien-bisaboleno 1.83	Silva et al., 2012
<i>F. cernua</i>	Ácido flourénsico 1.79, ácido dehidroflourénsico 1.80, flourensadiol 1.81	Kingston et al., 1975 Mata et al. 2003
<i>F. fiebrigii</i>	(4S,8S)-7-carboxi-8-hidroxi-1(2),12(13)-dien-bisaboleno 1.32	Uriburu, 2002
<i>F. heterolepis</i>	Germacreno D 1.62, 11-hidroxi-12,13-dihidrocostol 1.63, ésteres metílico de los ácidos 11,13-dihidrocóstico 1.64, 1 $\alpha$ -hidroxicóstico 1.65, 1-oxocóstico 1.66, 1 $\alpha$ -angeloiloxicóstico 1.67, 3 $\beta$ -hidroxi-11,13-dihidrocóstico 1.68, 3 $\beta$ -senecioloixi-11,13-dihidrocóstico 1.69, 3 $\beta$ -hidrocinnamoiloxi-11,13-dihidrocóstico 1.70, 3 $\beta$ -tiglinoiloxi-11,13-dihidrocóstico 1.71, 3 $\beta$ -isobutiriloxi-11,13-dihidrocóstico 1.72, 3 $\beta$ -isovaleriloxi-11,13-dihidrocóstico 1.73, 3 $\beta$ -angeloiloxi-11,13-dihidrocóstico 1.74	Bohlmann & Jakupovik, 1979
<i>F.</i>	Alantolactona 1.47, 9 $\alpha$ -hidroxialantolactona 1.48, 9 $\beta$ -hidroxialantolactona 1.49, 9-oxo-alantolactona 1.50, 1-oxo-	Bohlmann et al.,

<i>macrophylla</i>	alantolactona <b>1.51</b> , ácido 9-oxo cóstico <b>1.57</b> , ácido 8 $\beta$ ,9 $\beta$ -dihidroxi cóstico <b>1.58</b> , ácido 9 $\beta$ -hidroxi cóstico <b>1.59</b> , ácido 9 $\alpha$ -hidroxi cóstico <b>1.60</b>	1984 <sup>a</sup>
<i>F. oolepis</i>	Ácido ilícico <b>1.77</b> , ilicol <b>1.78</b>	Guerreiro et al., 1979  Diaz Napal & Palacios, 2013
<i>F. resinosa</i>	Éster metílico del ácido cóstico <b>1.61</b> , $\beta$ eudesmol <b>1.75</b> , ácido ilícico <b>1.76</b> , criptomeridiol <b>1.77</b>	Rodríguez Hahn & Rodríguez, 1973  Ríos et al., 2013
<i>F. riparia</i>	Carabrona <b>1.52</b> , 4- $\beta$ -hidroxi-4,10 $\alpha$ -dimetil-7 $\alpha$ H,8 $\alpha$ H-eudesman-11-dien-8,12-ólido <b>1.53</b> , septuplinólido <b>1.54</b> , isoalantolactona <b>1.55</b> , 10 $\alpha$ -metil-7 $\alpha$ H,8 $\alpha$ H-eudesman-4,11-dien-8,12-ólido <b>1.56</b>	Uriburu, 2002  Uriburu et al., 2004

Continuación **Tabla 1.3**

<sup>a</sup>los números no son correlativos debido a que los compuestos están agrupados por familia de compuestos, según se observa en la **Figura 1.7**


 Figura 1.7 Sesquiterpenos aislados de especies de *Flourensia*

Todas las especies de *Flourensia* estudiadas sintetizan flavonoides. Los compuestos informados que pertenecen a la ruta del ácido shikímico son flavanonas, dihidroflavonoles, flavonas, flavonoles, cumarinas y una chalcona. (Tabla 1.4, Figura 1.8). Los compuestos 8-prenil-flavanonas y 8-prenil-flavonoles fueron descritos en *F. fiebrigii* y *F. riparia*, y al menos dos tipos de estos flavonoides se incluyen en *F. campestris*.

Tabla 1.4 Flavonoides aislados de *Flourensia*

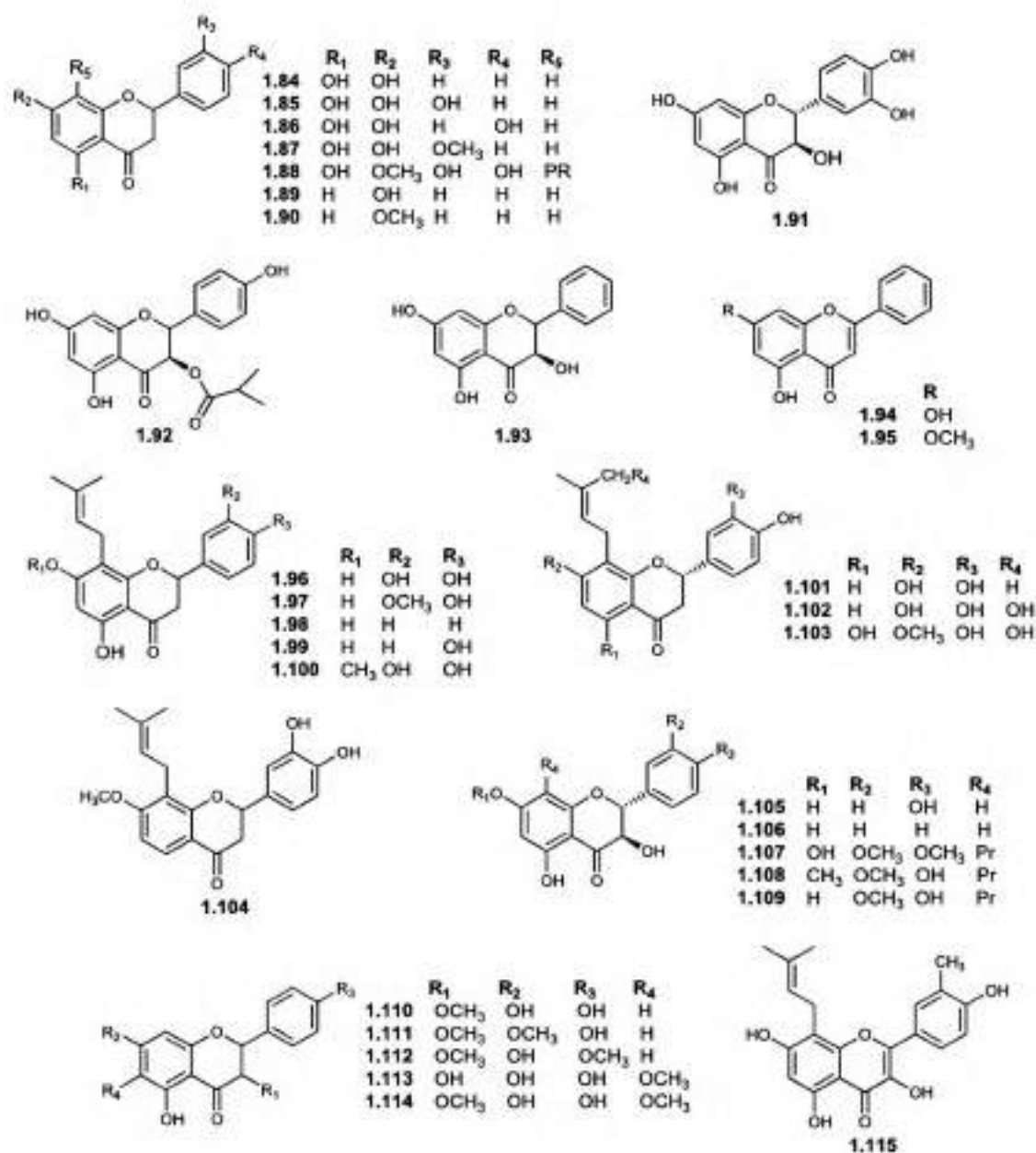
Especies	Compuestos aislados	Referencias
<i>F. campestris</i>	7,3',4'-trimetoxi-flavona <b>1.129</b> , 8-Pr-eriodictiol <b>1.96</b> , 5,3'-dihidroxiisobavachina-7-O-metil éter <b>1.88</b> , 8-prenil-3',4'-dihidroxi-7-metoxi flavanona <b>1.104</b> , 8-C-Pr-dihidroisoramnetina <b>1.109</b> , Galetin 3,6-dimetileter <b>1.114*</b>	Dillon & Mabry, 1977  Uriburu et al., 2004
<i>F. cernua</i>	3,7-dimetilkaempferol <b>1.111</b> , 6,8-di-C-glucosil apigenina (vicenina-2) <b>1.119</b> , 6-C-xilosil 8-C-glicosil apigenina (vicenina-1) <b>1.120</b> , 6-C-arabinopiranosil 8-C-glucosil apigenina (isoschaftosido) <b>1.121</b> , 6-C-glucosil 8-C-arabinopiranosil apigenina (schaftosido) <b>1.122</b> , 6-C-glucosil 8-C-arabinosil apigenina (neoschaftosido) <b>1.123</b> , 3-metoxi quercetina <b>1.135</b> , 5,4'-dihidroxi-6,7-dimetoxiflavona (cirsimaritina) <b>1.138</b> , 5,7,4'-trihidroxi-6-metoxiflavona (hispidulina) <b>1.139</b> , ermenina <b>1.130</b>	Rao et al., 1970  Dillon et al., 1976  Mata et al., 2003
<i>F. fiebrigii</i>	5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter <b>1.88</b> , (2S)-8-(3'-metilbut-2''-enil)-7,3',4'-trihidroxiflavanona <b>1.101</b> , (2S)-8-(3'-metil-4''-hidroxi-but-2''-enil)-7,3',4'-trihidroxiflavanona <b>1.102</b> , (2S)-8-(3'-metil-4''-hidroxi-but-2''-enil)-5,3',4'-trihidroxi-7-metoxiflavanona <b>1.103</b>	Uriburu et al., 2007
<i>F. heterolepis</i>	5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter <b>1.88</b> , 7-hidroxiflavanona <b>1.89</b> , 7-metoxiflavanona <b>1.90</b> , 2',4'-dihidroxichalcona <b>1.140</b>	Bohlmann & Jakupovik, 1979
<i>F. ilicifolia</i>	Pinocembrina (5,7-dihidroxiflavanona) <b>1.84</b> , 3-metilkaempferol <b>1.110</b> , Galetin (6-metil éter kaempferol) <b>1.113</b> , Galetin 3,6-dimetileter <b>1.114</b> , Quercetagetina 3,6-dimetil éter (axillarina) <b>1.136</b> , Quercetagetina 3,6,3'-trimetil éter (jaceidina) <b>1.137</b>	Dillon & Mabry, 1977
<i>F. macrophylla</i>	5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter <b>1.88</b> Escopoletina <b>1.141</b> , Escoparona <b>1.142</b> , Escopoletina-(3'-metil-but-2''-en-1''-il)-éter <b>1.143</b>	Bohlmann et al., 1984a

<i>F. oolepis</i>	2',4'-dihidroxichalcona <b>1.140</b> , 7-hidroxiflavanona <b>1.189</b> , Pinocebrina (5,7-dihidroxiflavanona) <b>1.84</b> , naringenina <b>1.86</b> , catequina <b>1.91</b> , quercetina <b>1.125</b>	Guerreiro et al., 1979 Diaz Napal & Palacios, 2009
<i>F. resinosa</i>	Pinobanksina <b>1.93</b> , Chrisina <b>1.94</b> , 7-metilchrisina <b>1.95</b> , 3-metilkaempferol <b>1.110</b> , 3,7-dimetilkaempferol <b>1.111</b> , 3,4'-dimetilkaempferol <b>1.112</b> , Galetina (6-metil eter kaempferol) <b>1.113</b> , Galetina 3,6-dimetileter <b>1.114</b> , Apigenina <b>1.116</b> , 7-metilapigenina <b>1.117</b> , 7,4'-dimetilapigenina <b>1.118</b> , Galangina <b>1.131</b> , 3-metilgalangina <b>1.132</b> , 7-metilgalangina <b>1.133</b> , 3,3'-dimetilquercetina <b>1.13</b>	Wollenweber & Yatskievych, 1985 Rios et al., 2013
<i>F. retinophylla</i>	Pinocebrina (5,7-dihidroxiflavanona) <b>1.84</b> , 5,7,3'-trihidroxiflavanona <b>1.85</b> , 5,7-dihidroxi-3'-metoxiflavanona <b>1.87</b> , 5,7,3'-trihidroxi-3-isobutiroiflavanonol <b>1.92</b>	Dillon & Mabry, 1977 Stuppner & Müller, 1994
<i>F. riparia</i>	5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona <b>1.127</b> , 8-prenil-3,5,7,4'-tetrahidroxi-3'-metoxi flavona <b>1.115</b> , 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxi flavona <b>1.128</b> , Exiguaflavanona K <b>1.97</b> , Glabranina <b>1.98</b> , 8-Pr-naringenina <b>1.99</b> , 5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter <b>1.88</b> , Glepidoptina B <b>1.105</b> , Pinobanksina <b>1.93</b> , 8-prenil-3,5,7-trihidroxi,3',4'-dimetoxi-flavanona <b>1.107</b> , escariosina <b>1.108</b> , 8-C-Pr-dihidroisoramnetina <b>1.109</b>	Uriburu, 2002 Uriburu et al., 2004
<i>F. thurifera</i>	Quercetina 7-metil éter <b>1.126</b> , prenilatina <b>1.143</b> , capensina <b>1.144</b>	Faini et al., 1997

Continuación **Tabla 1.4**

\*los números no son correlativos debido a que los compuestos están agrupados por familia de compuestos, según se observa en la **Figura 1.8**




 Figura 1.8 Flavonoides aislados de *Flourensia*

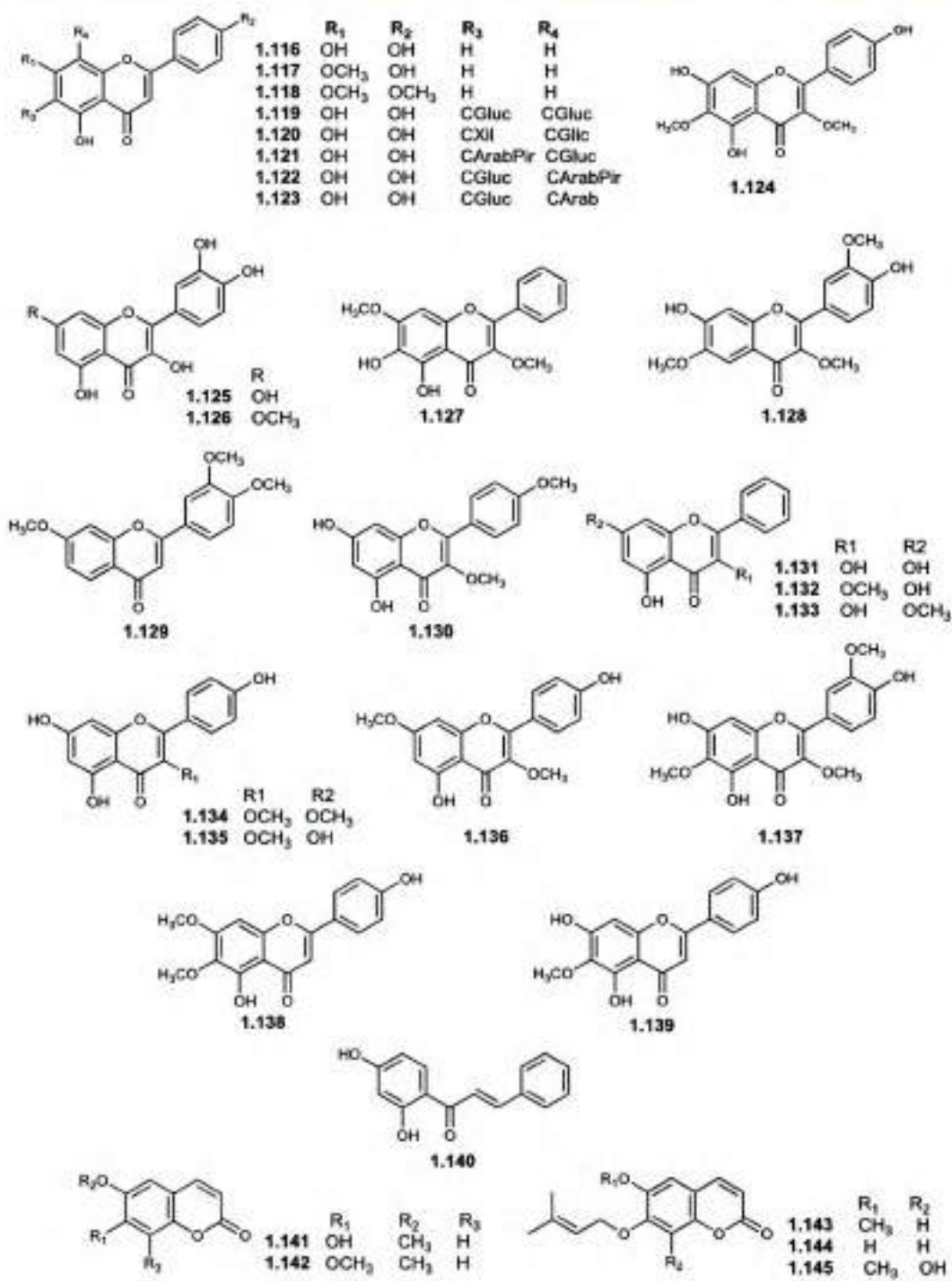


Figura 1.8 (continuación) Flavonoides aislados de *Flourensia*

También se aislaron derivados de la acetofenona a partir de tres especies de *Flourensia* (Figura 1.9). El compuesto 3,5-bis-(3,3-dimetilalil)-4-hidroxi acetofenona (1.147) se encontró en: *F. cernua*, *F. heterolepis* y *F. macrophylla* (Bohlmann & Grenz, 1977; Bohlmann & Jakupovic, 1979; Bohlmann & Jakupovic, 1984a). En *F. heterolepis* y *F. macrophylla* se encontró 4-hidroxiacetofenona (1.146) (Bohlmann & Jakupovic, 1979; Bohlmann & Jakupovic, 1984a); los compuestos 1.148, 1.149 y 1.150 fueron descritos en *F. cernua* y 1.151, 1.152 y 1.153 en *F. macrophylla* (Bohlmann & Grenz, 1977).

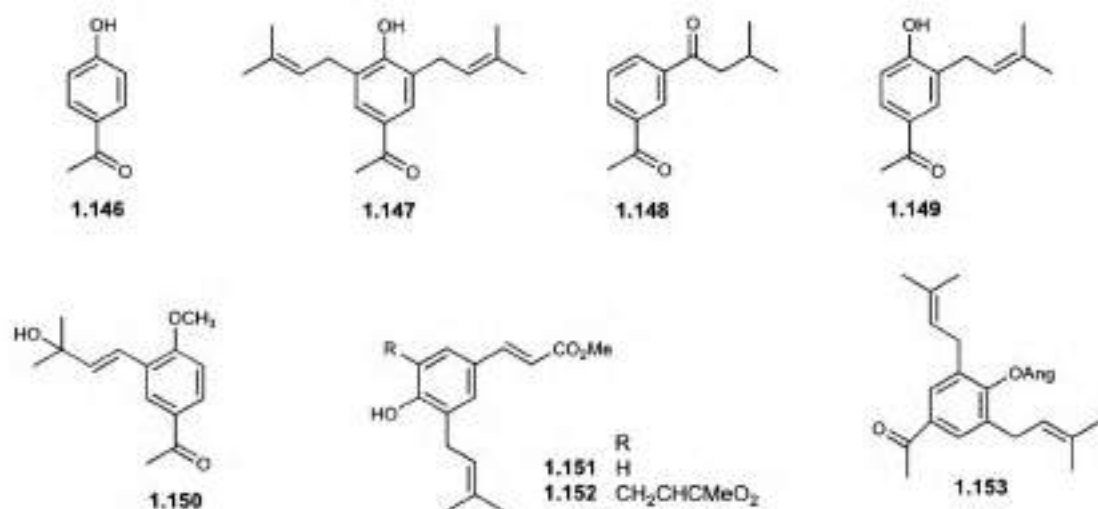


Figura 1.9 Derivados de acetofenona aislados de *Flourensia*

Se informaron, además, otras clases de compuestos. A partir de *F. cernua* se aislaron tiofenos, polienos,  $\gamma$ -lactonas entre otros (Bohlmann y Grenz, 1977; Kingston et al., 1975; Mata et al., 2003). Tanto en *F. heterolepis* como en *F. resinosa* se encontraron polienos y triterpenos (Bohlmann & Jakupovic, 1979; Bohlmann & Grenz, 1977; Rodríguez Hahn & Rodríguez, 1973). En *F. thurifera* se encontraron monoterpenos, diterpenos e hidrocarburos (Urzúa et al., 2007).

De las especies relacionadas desde el punto de vista botánico con *F. tortuosa*, sólo *F. oolepis* fue estudiada químicamente, aislándose los sesquiterpenos ácido ilícico (1.77) e ilícicol (1.78), el benzofurano euparina (1.13), 7-hidroxiflavanona (1.189) y 2',4'-dihidroxichalcona (1.140) (Guerreiro et al., 1979).

#### 1.4.6 Actividad biológica

Desde el punto de vista biológico se han evaluado diferentes especies del género *Flourensia*, no así *F. tortuosa*.

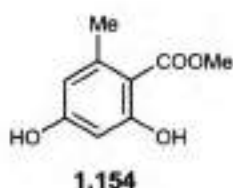
Se estudiaron extractos y compuestos puros en cuanto a sus efectos antifúngicos, antimicrobianos e insecticidas, entre otros. Hasta el momento la especie más estudiada desde el punto de vista biológico es *F. cernua*.

*Flourensia cernua*, conocida comúnmente como "tarbush", es un arbusto que crece en el desierto de Chihuahua en México. Esta especie tiene una composición de nutrientes similar a la alfalfa (Estell et al., 1996), pero puede producir toxicidad en animales. Se ha reportado hepatotoxicidad en un grupo de ovejas alimentado con alfalfa y un complemento de *F. cernua*, los principios activos responsables de este efecto no fueron determinados (Fredrickson et al., 1994). Se comprobó además acción antifúngica de la resina obtenida con metanol en un aparato soxhlet, sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora infestans* (Gamboa-Alvarado et al., 2003). La actividad bactericida se evaluó frente a *Mycobacterium tuberculosis*, bacteria causante de la tuberculosis. Las cepas utilizadas eran resistentes y sensibles a estreptomycin, isoniazida, rifampina, etambutol, y pirazinamida. La evaluación de los extractos etanólico, hexano, acetato de etilo y metanólico de las hojas de *F. cernua*, demostró que el extracto de hexano es el que presenta mayor actividad frente a este patógeno (Concentración inhibitoria mínima, CIM 50 ppm) (Molina-Salinas et al., 2006).

Mendez et al. (2012) estudiaron el efecto de extractos obtenidos con solventes convencionales (agua y etanol) y solventes orgánicos alternativos (lanolil y manteca de cacao) de *F. cernua* frente a *Staphylococcus aureus*. El extracto etanólico es el que presentó mayor inhibición en el crecimiento de este patógeno.

Las actividades antifúngica, antialgal y antitermita de los extractos hexano, dietil éter y etanol de *F. cernua* fueron investigadas por Téllez et al. (2001). El aceite esencial obtenido a partir de la fracción de hexano mostró actividad antifúngica sobre *Colletotrichum fragariae*, *C. gloeosporioides*, y *C. accutatum*. La fracción de éter dietílico mostró actividad selectiva en las cianobacterias *Oscillatoria perornata*, *O. agardhii*, y *Selenastrum capricornutum*. Los tres extractos también revelaron un alto grado de actividad termiticida después de cinco semanas sobre *Reticulitermes sp.*

Por otra parte, Mata et al. (2003) aislaron tres compuestos fitotóxicos: ácido dehidroflourensico (**1.80**), flourensadiol (**1.81**) y metil orsellinato (**1.154**) del extracto crudo de *F. cernua*. Estos compuestos indujeron una inhibición significativa en el crecimiento radicular de *Amaranthus hypochondriacus* y *Echinochloa crus-galli*.



Otra especie que cuenta con estudios biológicos es *F. oolepis*. El extracto etanólico de las partes aéreas mostró una marcada actividad antialimentaria frente a *Epilachna paenulata*, con un índice antialimentario de 99.1% a 100  $\mu\text{cm}^2$ . Mediante una purificación bioguiada se aisló la flavanona pinocembrina (**1.84**) como principio activo (Díaz Nepal & Palacios, 2009)

Se identificaron los componentes del aceite esencial de *F. oolepis* (García et al., 2007) y se comprobó su efecto bactericida *in vitro* frente a *Listeria monocytogenes* (Vaca Ruiz et al., 2006). Se evaluó también efecto repelente y tóxico sobre tres especies de insectos adultos. Se observó inhibición sobre *Tribolium castaneum*, actuando como una toxina de contacto y frente a *Myzus persicae* y *Leptinotarsa decemlineata* (García et al., 2007).

Sobre *F. thurifera* se demostró que el extracto de resina de las hojas y los tallos exhibe actividad citotóxica frente a *Artemia salina* y actividad antialimentaria

frente a *Spodoptera littoralis*. La purificación bio-guiada del extracto condujo al aislamiento de nueve compuestos aromáticos conocidos, incluyendo cumarinas, cromenos, un benzofurano, un flavonoide y derivados de ácido *p*-cumárico. Los resultados mostraron que enecalina (**1.23**) fue el compuesto más activo frente a larvas de *S. littoralis* (Faini et al., 1997).

Por su parte, Jasso de Rodríguez et al. (2007) reconocieron el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de *F. microphylla*, *F. cernua* y *F. retinophylla* frente a agentes patógenos que atacan los cultivos comerciales: *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum*. Las tres especies inhibieron los tres patógenos a 1500  $\mu$ L/L. La inhibición total se observó con *F. cernua* y *F. retinophylla* en 1000  $\mu$ L/L de *R. solani*.

Cabe destacar que hasta el momento no se realizaron estudios de actividad biológica de *F. tortuosa*.

## 1.5 *Wedelia aurantiaca* Griseb.

### 1.5.1 Consideraciones botánicas

El género *Wedelia* Jacq. está compuesto por unas 100 especies subcosmopolitas. Se distribuyen en regiones tropicales de todos los continentes. Alrededor de 60 especies se encuentran en América de las que sólo 6 llegan a la Argentina. Sólo unas pocas están presentes en el continente africano (Ganzer, 1992).

La tribu Heliantheae fue revisada a nivel de tribu y subtribu por diferentes autores (Robinson, 1984; McVaugh, 1984; Turner, 1992), llegando todos a la conclusión que *Aspilia* es sinónimo de *Wedelia*. Fue Turner (1992) quien concluyó que es imposible separarlos como dos géneros distintos efectivizando la sinonimia de *Aspilia* bajo *Wedelia*.

### 1.5.2 Descripción botánica

La clasificación taxonómica es:

**Familia:** Asteraceae

**Subfamilia:** Asteroideae

**Tribu:** Heliantheae

**Subtribu:** Ecliptinae

**Género:** *Wedelia* Jacq.

**Especie:** *Wedelia aurantiaca* Griseb.

***Wedelia aurantiaca*** es un sufrutice de hasta 1,20 m de altura, muy ramificado. Presenta **tallos** delgados, hispídos, ascendentes. **Hojas** opuestas, decusadas, simples, brevemente pecioladas a subsésiles, lámina estrigosa con ápice agudo, bordes aserrados, de 3-13 cm long. x 1-5 cm lat. **Capitulos** apicales en cada rama, largamente pedunculados, de 10-15 mm long. y lat. Filarios en 3 series, alternos. Flores amarillas, las marginales con ligula de 15-20 mm long., las

centrales con tubo superiormente engrosado, de 0,7 mm. Aquenios pubérulos, de 4-6 mm long. Pappus coroniforme, biaristado (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10** Hojas y flores de *W. aurantiaca*.  
\*Foto de L. J Novara. (Novara, 2010)

### 1.5.3 Distribución y hábitat

La especie en estudio crece en Bolivia y en el noroeste argentino. En el valle de Lerma es frecuente en pastizales serranos bajos y húmedos. (**Figura 1.11**). En la provincia de Salta sólo se encontró la variedad típica. La variedad *vulcanica* Cabrera, se encontró en pastizales serranos de Jujuy. Todavía no fue hallada en el valle de Lerma en la provincia de Salta.

Esta especie no posee nombres vulgares

### 1.5.4 Usos populares

*Wedelia aurantiaca* no presenta antecedentes sobre usos populares. Puede confundirse a campo con otras especies correspondientes a los géneros *Flourensia*, *Vigulera*, *Zexmenia* y *Simsia*. Se separan fácilmente por las características del pappus.



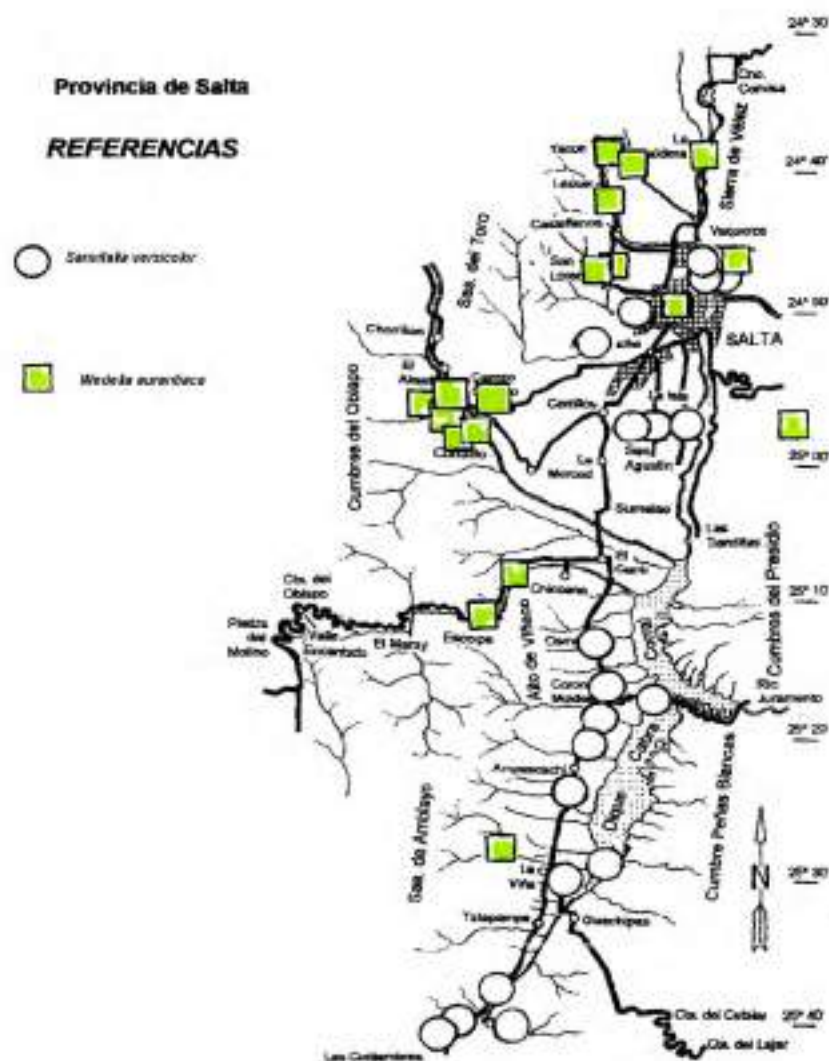


Figura 1.11 Distribución *W. aurantiaca* en la Provincia de Salta (Novara, 2010)

### 1.5.5 Antecedentes químicos

Se realizó una búsqueda bibliográfica de antecedentes químicos de especies del género *Aspilia* (ahora denominados *Wedelia*). En bibliografía se encuentran descritos metabolitos secundarios aislados de 14 especies del género *Aspilia*.

- A. bishoplecta* H. Robins.
- A. cupulata* S.F. Blake
- A. eenii* S. Moore
- A. hirsuta* Benth. & Hook.
- A. hispidantha* H. Robins.
- A. jolyana* Barr.
- A. laevissima* Baker
- A. mossambicensis* (Oliv.) Wild.
- A. ovalifolia* (DC) Baker
- A. riedelii* Baker
- A. silphioides* Benth.
- A. floribunda* (Gardner) Baker
- A. montevidensis* (Spreng.) Kuntze
- A. africana* (Pers.) C.D. Adams

Además de las semejanzas morfológicas que llevan a la conclusión que *Aspilia* es sinónimo de *Wedelia*, estos géneros también presentan semejanzas químicas. Se informaron derivados del ácido ent-kaurénico, especialmente aquellos con funciones oxigenadas en C-15 con orientación  $\alpha$ - y  $\beta$ -, y derivados del germacrano en ambos géneros (Bohlmann et al., 1977, 1980 Steriactina, 1981, 1982, 1984b; Bellini et al., 1999; Ganzer et al., 1992). También se aislaron lactonas sesquiterpénicas, sobre todo del tipo eudesmanólido con el grupo metilo de C-10 en posición  $\alpha$ . La presencia de estos compuestos tanto en *Aspilia* (1.155-1.162) (Bohlmann et al., 1983) como en *Wedelia* (1.162-1.164,1.56) (Herz & Kulanthavel, 1984; Herz & Sosa, 1986) (Figura 1.12) muestra la estrecha relación entre ambas géneros.

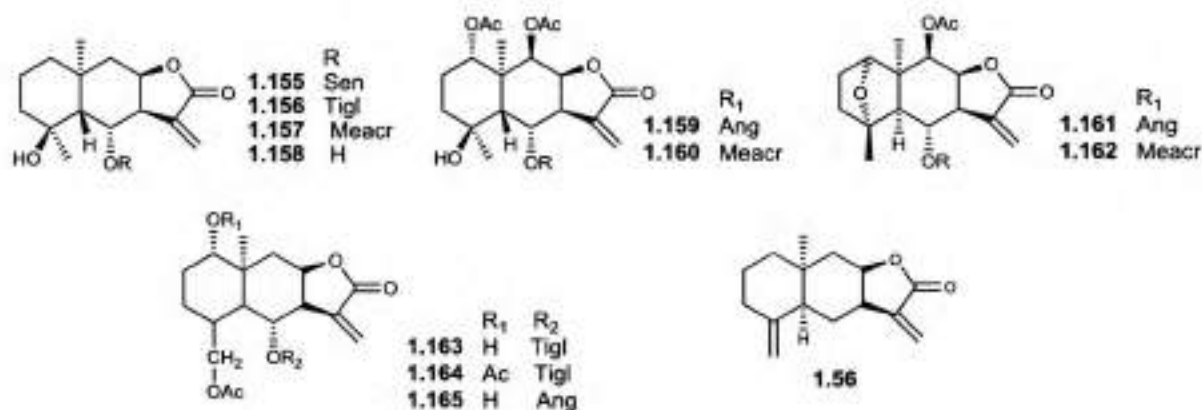


Figura 1.12 Lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Aspilia* y *Wedelia*

### 1.5.6 Actividad biológica

Sólo tres especies del género presentan antecedentes de actividad biológica.

*Wedelia africana* (*A. africana*) es una planta muy utilizada en medicina popular en el noroeste de África. Las hojas frescas de esta especie se colocan sobre heridas para detener la sangre, por eso es conocida como "planta de la hemorragia". Se evaluó la actividad anticoagulante del extracto salino de las hojas de *W. africana*, los resultados muestra que se produce una pérdida del efecto hemostático si se obtiene el extracto a partir de hojas secas (Hanna & Nemetz, 1987).

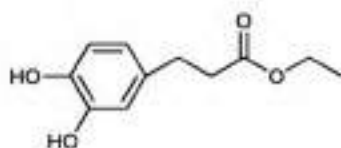
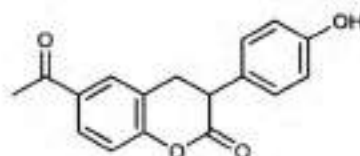
La actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos metanólico y acuoso de las hojas de *W. africana* fue evaluada frente a tres bacterias Gram-positivas y tres Gram-negativas: *Aerobacter aerogenes*, *Agrobacterium tumefacens*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. El extracto metanólico mostró un amplio espectro antibacteriano ya que inhibió el crecimiento de todas las bacterias testeadas (CIM 0,1 g/mL) (Macfoy & Cline, 1990).

Se evaluó, además, la actividad antimalárica del extracto etanólico de las hojas frente al parásito *Plasmodium falciparum*. El efecto antimalárico observado se atribuye a la presencia de alcaloides, flavonoides y terpenos en el extracto

(Christian et al., 2012). Esta actividad también fue evaluada por Waako et al. (2005) y Okokon et al. (2006).

Okoli et al. (2006) probaron el efecto antiinflamatorio del extracto de hexano en roedores; para ello indujeron edemas en patas y orejas. Los resultados sugieren que las hojas de *W. africana* poseen actividad antiinflamatoria y esto deriva de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, la inhibición de aumento de la permeabilidad vascular, la inhibición de la migración de neutrófilos en los tejidos inflamados y la estimulación de la acumulación de linfocitos, lo que puede mejorar la reparación de tejidos y la curación. La presencia de compuestos terpenoides en las hojas pueden ser los responsables de esta actividad.

En el trabajo realizado por Jide & Abiodun (2012) se evaluó la actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* de dos diterpenos aislados de esta especie: trans etil-3-(3,4-dihidroxifenil) acrilato (**1.166**) y 3-(4-hidroxifenil)-2-oxo-2H-cromeno-6-carbaldehído (**1.167**). Para estudiar el potencial antioxidante se utilizó el ensayo con DPPH, mientras que la actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Pseudomona aureginosa* fue llevada a cabo utilizando el método de difusión en agar y biotografía. Los resultados mostraron que el compuesto **1.166** presenta una fuerte actividad antioxidante ( $14.49 \pm 0,84 \mu\text{M}$ ) en comparación con el ácido L-ascórbico ( $13.18 \pm 0,63 \mu\text{M}$ ) utilizado como estándar. Se observó, además, una marcada actividad antibacteriana de este compuesto frente a *B. subtilis*.

**1.166****1.167**

Otras investigaciones sobre la bioactividad en *W. africana* fueron reportadas por Nquelefack et al (2005) y Ubaka et al. (2009) que evaluaron el efecto antiulceroso de extractos de esta especie.

*Wedelia plathyphylla* (*A. platyphylla*) presenta actividad anti-tripanosoidal. Las fracciones solubles en diclorometano a partir de los extractos clorofórmico y etanólico fueron activas frente a *Trypanosoma cruzi*. Según los autores esta actividad puede estar relacionada con la composición de diterpenos presentes en estas fracciones (Veneziani et al., 2007)

Otra especie estudiada fue *W. mossambicenses* que presenta una actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Salmonella typhi*, *Streptococcus pyogenes* y una cepa de *Aspergillus niger* (Musyimi et al., 2008).

# Capítulo 2

## Materiales y métodos

## 2.1 Material vegetal

Los ejemplares de herbario de *Barnadesia odorata* Griseb. en sus diferentes estados de crecimiento y el de *Wedelia aurantica* Griseb. fueron identificados por el Ing. Lázaro Novara y depositados en el museo de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Salta (MCNS) con los números de herbario correspondientes que se indican más abajo. El ejemplar de *Flourensia tortuosa* Griseb. fue identificado por el Dr. Luis Ariza Espinar y depositado en el Museo Botánico de Córdoba (CORD). Los materiales correspondientes fueron secados en condiciones de luz y humedad apropiadas. Posteriormente fueron molidos en un molino a paletas.

***Barnadesia odorata*:** Las muestras se recolectaron en la localidad de Vaqueros a 2,5 km al oeste de la ruta provincial 9, en el Departamento La Caldera, Provincia de Salta. Los estudios fitoquímicos se realizaron con material vegetal recolectado en diferentes estados de crecimiento de la planta dando lugar a tres números de herbarios diferentes:

- Material vegetal estéril (hojas y tallos). Febrero 2007. **MCNS 9947 (Figura 2.1a)**
- Flores y tallos. Agosto 2008. **MCNS 10253 (Figura 2.1b)**
- Material vegetal estéril (hojas y tallos). Marzo 2009. **MCNS 11342**

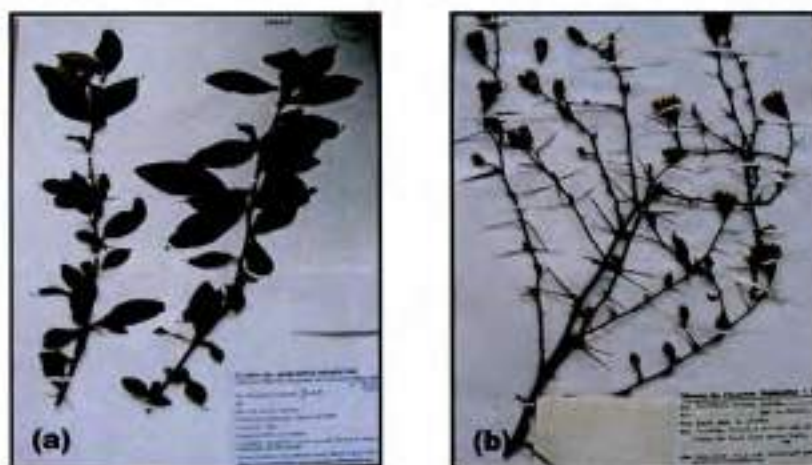


Figura 2.1 Material vegetal de *B. odorata* (a) MCNS 9947; (b) MCNS 10253

***Flourensia tortuosa***: El material vegetal fue recolectado por las Doctoras María Teresa Cosa y Gloria Barboza de la Universidad Nacional de Córdoba, en camping La Aguadita, Andalgalá, Provincia de Catamarca (27°32' S, 66°17' W, 1246 msnm). Febrero 2009, con número de herbario **Delbón 2**.

***Wedelia aurantiaca***: La parte aérea de la planta (hojas, tallos y flores) fue recolectada en la localidad de Campo Quijano, camino a Corralito, en el Departamento Rosario de Lerma, Provincia de Salta, en Febrero de 2008. **MCNS 12975** (Figura 2.2).



**Figura 2.2** Material vegetal de *W. aurantiaca* **MCNS 12975**

## 2.2 Solventes y métodos de extracción

En los procesos de extracción y purificación se utilizaron benceno, ciclohexano, cloroformo, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Todos fueron de grado analítico y destilados antes de su uso.



El material vegetal de cada especie estudiada fue extraído como se detalla en cada caso en los capítulos correspondientes.

Con todas las especies se empleó primero el método tradicional con acetato de plomo, cuyo objetivo es la eliminación de sustancias apolares por precipitación (De la Fuente et al., 1997). Cuando el método anterior no dio buenos resultados, se empleó el método de partición con solventes de polaridad creciente.

## 2.3 Métodos espectroscópicos

### 2.3.1 Espectroscopia Infrarroja (IR)

Los espectros de absorción en el infrarrojo se determinaron en un equipo Spectrum GX-FTIR Perkin Elmer. En algunos casos las muestras fueron homogeneizadas con KBr anhidro formando una pastilla. En otros, los productos se disolvieron en cloroformo grado espectroscópico y se aplicaron en forma de película sobre una pastilla de KBr. Los valores de las señales se expresan en número de onda ( $\nu$ ), en  $\text{cm}^{-1}$ .

### 2.3.2 Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , en una y dos dimensiones fueron registrados a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ), en un espectrómetro Bruker Avance II AV-400, utilizando campos de 400,13 MHz para  $^1\text{H}$  y 100,3 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Las muestras fueron disueltas en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), acetona deuterada ( $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) y metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) según se indica en cada caso. Se utilizó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) o  $\delta$  respecto a la resonancia del TMS (0,00 ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hz.

### 2.3.3 Espectrometría de masa (EM)

Los espectros de masa de baja resolución se llevaron a cabo en un espectrómetro LCT premier XE Micromass y Finnigan 3300 F-100 mediante la técnica de inyección directa por impacto electrónico (con potenciales de ionización

15-70 eV). Las señales se describen en unidades de masa/carga ( $m/z$ ) y entre paréntesis se indica la intensidad relativa de cada señal respecto al pico base.

## 2.4 Métodos cromatográficos

### 2.4.1 Cromatografía gaseosa/Espectrometría de masas (CG/EM)

El estudio de metabolitos secundarios volátiles se realizó utilizando un equipo GC CLARUS 600 MS-Perkin Elmer, equipado con un detector Claurus 600 T en el modo de impacto electrónico (Energía de ionización: 70 eV), con un rango de masas de 40,00 a 480,00 uma. Se empleó una columna capilar DB-5MS de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor. La temperatura del horno se mantuvo a 60 °C durante 1 min, aumentando luego a una velocidad de 4 °C/min hasta una temperatura final de 280 °C (14 min). Se utilizó  $\text{H}_2$  como gas portador con un flujo constante de 1,0 mL/min. La muestra se disolvió en  $\text{CHCl}_3$ . La inyección se realizó a modo Split a una temperatura de 250 °C.

Los compuestos volátiles fueron identificados por una combinación de datos de espectrometría de masa (MS), datos de índices de retención calculados según Kovats (IK) y comparación con patrones. Se calcularon los porcentajes de cada uno de los compuestos en la mezcla (%), por el método de normalización áreas.

### 2.4.2 Cromatografía en columna

#### a. Cromatografía líquida de vacío (CLV)

Las cromatografías CLV en fase normal y en fase reversa se realizaron con embudos con placa filtrante de vidrio sinterizado de diferentes tamaños, según la cantidad de muestra y haciendo vacío para acelerar el paso del solvente. Como relleno y para armar la pastilla se empleó Silica gel H (Merck), Silica gel 60 Merck (0,063 - 0,200 mm) o Silica gel de Fase reversa C-18 Aldrich, según cada caso. Los solventes de elución se indican en cada experimento en particular.

#### b. Cromatografía en columna en fase normal (CC)

Esta cromatografía se realizó utilizando Silica gel 60 (0,040 - 0,063 mm) 70-230 Mesh ATSM Merck, o Silica gel 60 (0,063 - 0,200) 230-400 Mesh ATSM Merck

(Cromatografía en columna flash, **CCF**). El gel de sílice fue suspendido en el solvente de elución utilizado, el cual se indica en cada experiencia. En **CCF** se aplicó presión de aire para acelerar el paso del solvente.

**c. Cromatografía en columna en fase reversa (CCRev)**

Se utilizó Silica gel C18 Aldrich o Silica gel Octadecyl Endcapped como fase estacionaria para las cromatografías en fase reversa convencionales. En los casos donde la masa de las fracciones a purificar era escasa, se emplearon cartuchos de fase reversa ODS-C18 J y W Scientific.

**d. Cromatografía de exclusión por tamaño (Sephadex)**

En la separación por geles se empleó Sephadex LH-20 (25-100  $\mu$  Sigma) en metanol como fase estacionaria y los solventes de elución indicados en cada caso. El gel se preparó por suspensión del polímero en metanol durante 24 horas, estas columnas pueden volver a ser utilizadas tras lavarse con metanol y estabilizarse con el eluyente a utilizar.

**e. Cromatografía en capa delgada y cromatografía en capa delgada preparativa (CCD y CCDP)**

Las técnicas cromatográficas en capa delgada analítica (**CCD**) y en capa delgada preparativa (**CCDP**) se realizaron sobre cromatofolios de Silica gel 60 F<sub>254</sub> y RP-18 F<sub>254</sub> Merck de 0,2 mm de espesor.

Las placas analíticas se visualizaron bajo luz ultravioleta, utilizando una longitud de onda de 254 nm, luego se pulverizaron con solución de vainillina en etanol al 3%, óleum (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-EtOH 1:4) y posterior calentamiento a 120°C.

En las placas preparativas se sembró una cantidad máxima de 40 mg y empleando diferentes mezclas de solventes como eluyentes. El revelado sólo se realizó con luz ultravioleta.

#### f. Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

El análisis comparativo de diferentes especies de *Flourensia* mediante cromatografía líquida de alta resolución se llevó a cabo utilizando los extractos de la **Tabla 2.1**; entre paréntesis la bibliografía donde se encuentra el método de obtención de los mismos y los compuestos puros se muestran en la **Tabla 2.2**. Los extractos y compuestos puros de *F. riparia*, *F. fiebrigii* y *F. campestris* fueron estudiados previamente por la Dra. María Laura Uriburu.

**Tabla 2.1** Extractos utilizados de diferentes especies de *Flourensia* para análisis por CLAR

**Tabla 2.1** Extractos utilizados de diferentes especies de *Flourensia* para análisis por CLAR

Especies	Extractos
<i>F. campestris</i>	hexano (Uriburu et al., 2004)
	CHCl <sub>3</sub> (Uriburu et al., 2004)
<i>F. fiebrigii</i>	éter etílico (Uriburu et al., 2007)
<i>F. riparia</i>	hexano (Uriburu et al., 2004)
	éter etílico (Uriburu et al., 2005)

Tabla 2.2 Compuestos puros previamente aislados de especies de *Flourensia*

Especies	Compuestos puros
<i>F. campestris</i>	8-prenileriodictiol encecalol metil éter
<i>F. fiebrigii</i>	Tremetona 5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxiiflavanona (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxiiflavanona (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-5,7,3',4'-trihidroxiiflavanona 8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,4'-trihidroxiiflavanona
<i>F. riparia</i>	Isoalantolactona Carabrona Escopoletina 4 $\beta$ -hidroxi-4,10 $\alpha$ -dimetil-7 $\alpha$ H,8 $\alpha$ H-eudesman-11-8,12-ólido 8-prenilnaringenina exiguaflavanona K glepidotina B Escariosina 8-prenil-3,5,7-trihidroxi,3',4'-dimetoxi-flavona 10,12-dihidroxitremetona 6,10,12-trihidroxitremetona Euparona Encecalina 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'trimetoxiflavona glabranina pinobanksina
<i>F. riparia</i> y <i>F. campestris</i>	6-metoxieuparona 8-prenildihidroisoramnetina
<i>F. riparia</i> y <i>F. fiebrigii</i>	6-metoxitremetona

Las muestras se corrieron en un cromatógrafo Gilson 234 Autoinjector, (Inc., USA), con detector UV-VIS Gilson 118 (Inc., USA), columna analítica de fase reversa Phenomenex Spheredclone 5u ODS 250 x 4,60 mm (tamaño de partícula 5u microm), precolumna 30 x 4.60 mm. Los solventes, MeOH:H<sub>2</sub>O se prepararon en una proporción 4:1, se filtraron a través de membranas de celulosa de 0,4 µm de tamaño de poro. Se trabajó a una longitud de onda de 260 nm. El flujo aplicado fue de 0,8 mL/min mediante una bomba Gilson Model 307 Piston Pump, (Gilson SAS, France).

### 2.4.3 Cromatografía centrífuga radial (CCR)

Se utilizó un cromatógrafo radial marca Cromatotrón Modelo 7924T de Harrison Research. Se prepararon discos de 1 mm de espesor con silicagel 60 PF<sub>254</sub> (que contiene yeso como ligante). Los discos fueron activados en estufa a 120°C. La fase móvil se especifica en cada experimento.

## 2.5 Actividad biológica

Además de los extractos de cada una de las plantas en estudio de este trabajo de tesis, para el estudio de actividad antimicrobiana se utilizaron los extractos vegetales que se indican en la **Tabla 2.1**, además de los sub-extractos hexano de *F. fiebrigii* y CHCl<sub>3</sub> de *F. riparia* (Uriburu et al., 2004).

### 2.5.1 Microorganismos indicadores y condiciones de cultivo

Las bacterias empleadas como microorganismos indicadores en el estudio de actividad antimicrobiana se citan en las Tablas **2.3** y **2.4**. El medio de cultivo para el crecimiento de todas las cepas incluidas en estas tablas fue Mueller-Hilton (Britania, Argentina). Las condiciones de incubación fueron 37°C por 24 h, sin atmósfera especial. La concentración de células después de la incubación durante toda la noche fue de 1x10<sup>8</sup> ufc/mL. Todas las cepas indicadoras fueron conservadas a -20°C en medio Mueller-Hinton con glicerol (10% v/v). Las cepas de *Paenibacillus larvae* tuvieron un tratamiento diferente, se activaron en MYPGP. Este medio está conformado por 1.5% extracto de levadura, 1% caldo Mueller-Hinton (Britania), 0.2% glucosa, 0.3% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.1% piruvato de sodio; pH 7.0; 1.5 % agar, (Dingman y Stahly, 1983), a 37 °C por 72 h sin atmósfera especial.

Tabla 2.3 Cepas indicadoras Gram (+)

Cepas	Origen
<i>Listeria monocytogenes</i>	
99/287s	CA
99/287 RB6	CA
99/267	CA
01/155	CA
<i>Listeria spp.</i>	
00/110	CA
99/320	CA
00/270	CA
01/01	CA
<i>Staphylococcus aureus</i>	
29213	ATCC
CS	CA
25923	ATCC
6538P	ATCC
<i>Bacillus cereus</i>	
MBC1	INEI -ANLIS. Malbrán
MBC2	INEI -ANLIS. Malbrán
MBC3	INEI -ANLIS. Malbrán
MBC4	INEI -ANLIS. Malbrán
MBC5	INEI -ANLIS. Malbrán
MBC6	INEI -ANLIS. Malbrán
MBC7	INEI -ANLIS. Malbrán
BAC1	MM
<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	
C4	CA
Cachi 2	CA
Mori2	CA
Juli3	CA
<i>Enterococcus faecium</i>	
1385	CRL
CA 12	CA
SM21	CA
<i>Enterococcus hirae</i>	CA

CA: Dra. Carina Audisio, INIQUI-CONICET, UNSa; ATCC: American Type Culture Collection; INEI -ANLIS-Malbrán, Instituto de Microbiología "Dr. Carlos G. Malbrán", Bs. As; Argentina; MM: Dra. María Morea (Milán, Italia); CRL: Centro de referencia para lactobacilos (CERELA-CCT-CONICET, Tucumán)

Tabla 2.4 Cepas indicadoras Gram (-)

Cepas	Origen
<sup>a</sup> <i>Salmonella Typhimurium</i>	
29/08	Ganglio mesentérico de cerdo
CUB 03/28	Ganglio mesentérico de cerdo
CUB 40/08	Hígado cerdo órgano gde. XLD
<sup>b</sup> <i>S. Gallinarum</i>	
CUB 954	Órgano de ave
69/12	Órgano de ave
<sup>c</sup> <i>S. Enteritidis</i>	
77/80	Maple huevo M594 XLD
CUB 22/10	Maple huevo M594 XLD
<i>Escherichia coli</i>	
0157:H7	RR
CS	CA
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	CA
<i>Klebsiella</i> spp.	CA

RR: Dr. Raúl Raya (CERELA-CCT-CONICET, Tucumán); CA: Carina Audisio, INIQUI-CONICET, UNSa

<sup>a</sup> *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium)

<sup>b</sup> *Salmonella enterica* serovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum)

<sup>c</sup> *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis)

Las cepas de *Paenibacillus larvae* Azul, 1 y III fueron provistas por el Dr. Terzolo y el Ing. Borracci del INTA Balcarce y la cepa 35A (Río Negro) fue adquirida del CIDEFI.

Como control positivo se utilizó tetraciclina (*P. larvae*), clindamicina (*S. aureus*), ampicilina (*Listeria* spp.) y cloranfenicol (*B. cereus*). Los antibióticos estaban (Britania) soportados en discos de papel.

## 2.5.2 Determinación de la actividad antimicrobiana

### a. Técnica de Difusión en disco

La actividad antimicrobiana de extractos y productos puros se evaluó mediante la técnica de difusión en disco (Mutai et al., 2009). Se colocaron 10µL de las muestras a ensayar en concentraciones variadas sobre discos estériles de papel de



filtro de 5 mm de diámetro y se dejó evaporar el solvente. Se colocaron 100  $\mu$ L de las células indicadoras a utilizar, en placas de Petri estériles y se agregaron 10 mL de agar Mueller-Hinton, lo que dio lugar a una concentración final de aproximadamente  $1 \times 10^8$  ufc/mL. Como control se impregnaron papeles con los solventes en que fueron disueltas las muestras. Los discos de papel se depositaron en el césped de bacterias, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 8 h para favorecer la difusión y luego se colocaron en estufa a 37 °C. Después de 24 h de incubación se determinó actividad por la presencia de zonas de inhibición alrededor de las muestras analizadas.

### **b. Técnica de Bioautografía**

Es un bioensayo simple que permitió detectar compuestos antimicrobianos a través de cromatografía en capa delgada (CCD). Las muestras se sembraron en una placa cromatográfica y se desarrollaron en un solvente adecuado, se secó para remover el solvente de elución y se colocó en una placa de Petri. Se preparó un cultivo del microorganismo indicador en el medio agarizado correspondiente y éste se volcó sobre la la placa de Petri. Se dejó la placa de Petri a temperatura ambiente durante 2 horas para favorecer la difusión, posteriormente se la colocó en estufa a 37 °C durante 20 horas para permitir el crecimiento de las bacterias y después de este período se visualizaron las zonas de inhibición en la placa cromatográfica. Las placas fueron desarrolladas por duplicado; una se reveló con solución de oleum para emplearla como referencia cromatográfica y la otra fue utilizada para Bioautografía (Chomnawang et al., 2005).

### **c. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIMM) por difusión en disco**

La CIM se define como la concentración más baja de una muestra necesaria para inhibir el crecimiento de un microorganismo (NCCLS, 2000). Este valor se determinó para los extractos que resultaron más activos sobre las cepas indicadoras utilizadas en los dos métodos anteriores. A partir de la solución madre se realizaron

diluciones seriadas decrecientes de los distintos extractos. Se depositaron discos de papel impregnados con las diferentes concentraciones sobre la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo. Las placas se dejaron a temperatura ambiente para favorecer la difusión y luego se incubaron a 37°C durante 24 h y se determinó la presencia de halos de inhibición claros y bien definidos alrededor de los extractos analizados. Como control se impregnaron papeles con los solventes en que fueron disueltas las muestras.

#### **d. Determinación de la CIM mediante la técnica de dilución en agar**

Esta técnica se utilizó para la determinación de la CIM de extractos y de compuestos puros aislados de diferentes especies de *Flourensia* frente a cepas de *Paenibacillus larvae*.

En una placa de petri estéril se colocaron diferentes diluciones de los extractos y compuestos puros (rango de concentración desde 2500 a 100 ppm) junto con 10 mL de agar MYPGP. Sobre la superficie seca del agar se sembraron 10µL de cultivo de cada cepa y se incubaron durante 24 h a una temperatura de 37 °C. Se realizó un control del crecimiento de *P. larvae* sólo con agar MPYGP y cultivo. La CIM se tomó como la mayor dilución donde no se observó crecimiento de la bacteria (Sabaté et al., 2012).

## Capítulo 3

### Estudio fitoquímico de *Barnadesia odorata*

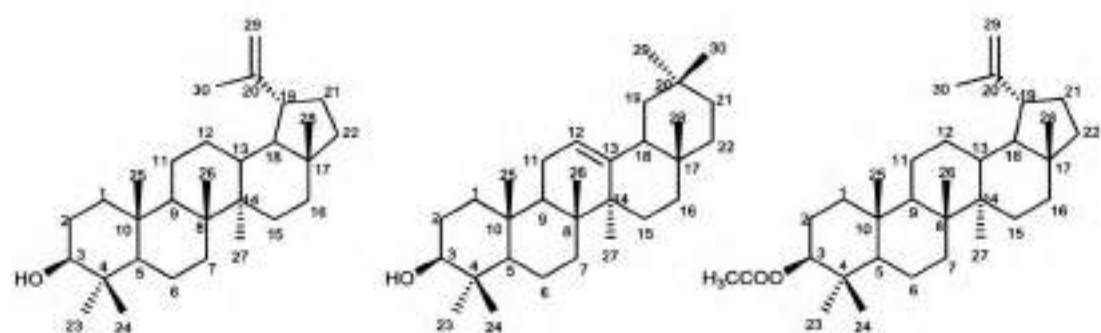
*Barnadesia odorata* es una planta endémica que crece en el noroeste argentino. De estudios químicos previos (Bhom & Stuessy, 1995, Mendiondo et al., 1997) sólo se aislaron compuestos del tipo flavonoides (**Tabla 1.1**), por lo que resulta interesante realizar un estudio más completo para identificar otros tipos de compuestos presentes.

El estudio fitoquímico de *B. odorata* consistió en la obtención del material vegetal en diferentes estadios de la planta, el aislamiento, purificación e identificación estructural de los metabolitos secundarios presentes.

### 3.1 Metabolitos aislados

A partir de *B. odorata* se aislaron e identificaron (**Figura 3.1**):

- tres triterpenos derivados de la ruta biosintética del mevalonato: lupeol (**3.1**),  $\beta$ -amirina (**3.2**) y acetato de lupeolo (**3.3**);
- dos derivados de la ruta biosintética del shikimato: ácido 4-metóxicinámico (**3.4**) y el derivado 7,8-epoxi del alcohol coniferílico, 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (**3.5**);
- dos derivados de las rutas combinadas del acetato y del shikimato: apigenina (**3.6**) y apigenina-7-O-glucósido (**3.7**)



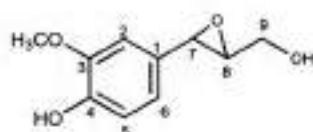
3.1 3-β-lupeol

3.2 3-β-amirina

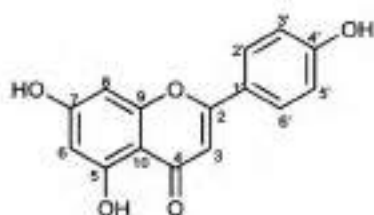
3.3 3-β-acetato de lupeolo



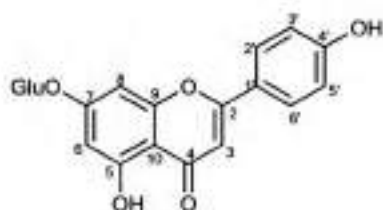
3.4 ácido 4-metoxicinámico



3.5 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol



3.6 apigenina



3.7 apigenina-7-O-β-glucósido

Figura 3.1 Compuestos aislados de *B. odorata*

## 3.2 Material vegetal número de herbario MCNS 9947

El material vegetal estéril (solamente hojas y tallos, sin flores) recolectado en Febrero de 2007, con número de herbario **MCNS 9947** fue analizado como se detalla a continuación.

### 3.2.1 Extracción

El material vegetal recolectado (465 g) se extrajo por maceración con etanol (95%) a temperatura ambiente, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida; este proceso se repitió tres veces.

El extracto obtenido se solubilizó en MeOH dejando un residuo gomoso soluble en hexano (**E1**). La fracción soluble en MeOH se particionó con Hexano:MeOH:H<sub>2</sub>O en una relación 10:3:1. La fase orgánica se separó de la fase acuosa y por evaporación de la primera se obtuvo el sub-extracto de hexano (**E2**). Después de evaporar el MeOH a presión reducida, la fase acuosa se extrajo con CHCl<sub>3</sub> varias veces obteniéndose el sub-extracto clorofórmico (**E3**). Por extracción de la fase acuosa con AcOEt, se obtuvo el sub-extracto de acetato de etilo (**E4**). El esquema de obtención de los extractos se muestra en la **Figura 3.2**.

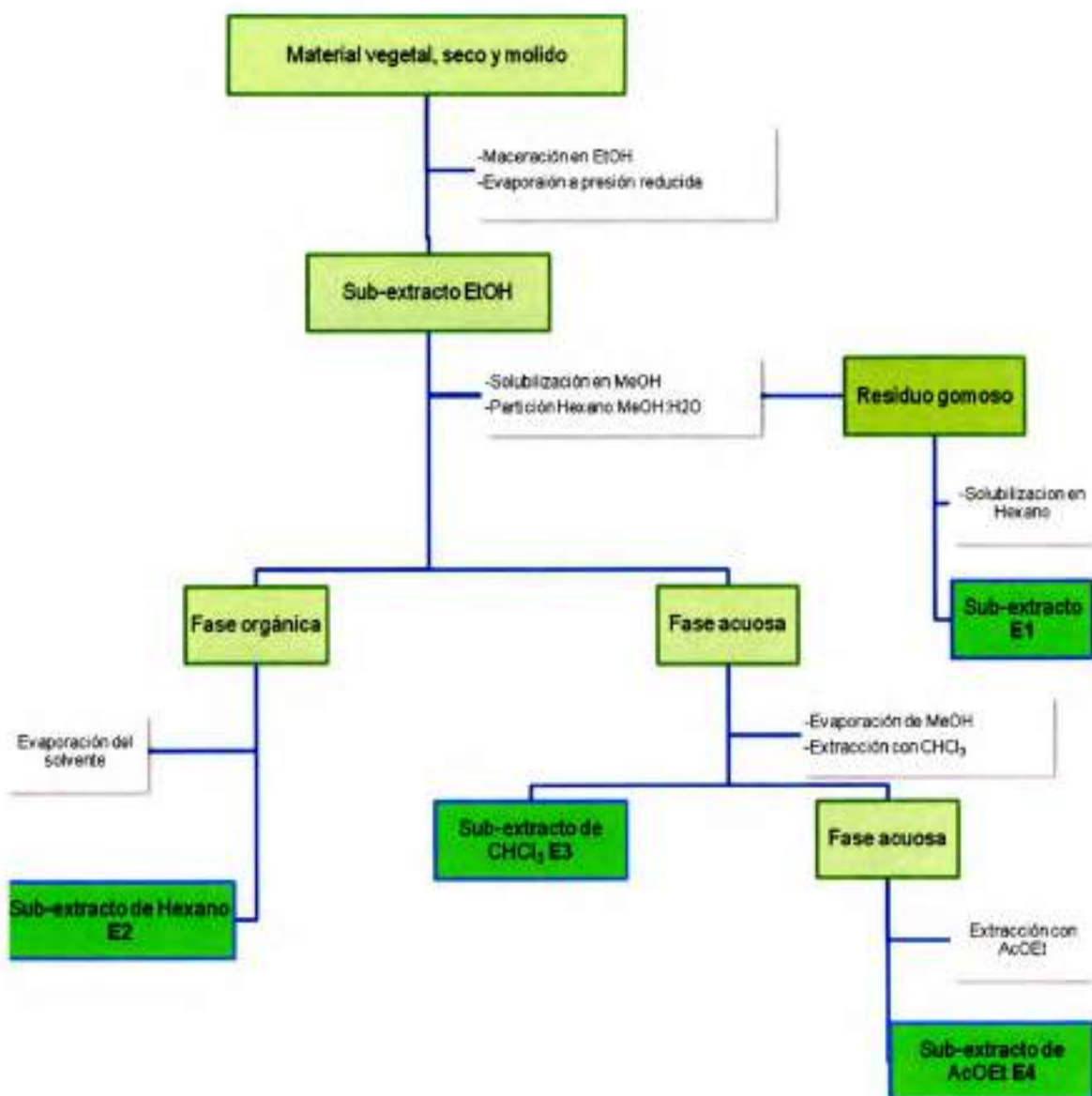


Figura 3.2 Esquema del procedimiento de extracción de *B. odorata* MCNS 9947

### 3.2.2 Purificación de los sub-extractos

- **Purificación de E1**

El residuo gomoso (2,2 g) soluble en hexano (**E1**) fue purificado mediante cromatografía en columna (CC), utilizando sílica gel 230-400 Mesh. Para el proceso de elución se utilizaron mezclas de hexano:AcOEt en diferentes proporciones. Se recogieron fracciones de 10 mL, las que se reunieron en 11 fracciones (**FB<sub>1</sub>** a **FB<sub>11</sub>**) de acuerdo a su comportamiento en cromatografía en capa delgada (CCD), reveladas con luz UV (254 nm), solución de vainillina y oleum. En la fracción **FB<sub>8</sub>** (hexano:AcOEt 1:1) se identificaron, en mezcla, los compuestos 3- $\beta$ -lupeol (**3.1**) y 3- $\beta$ -amirina (**3.2**) cuya elucidación estructural se encuentra más adelante.

- **Purificación de E2**

El sub-extracto de hexano (**E2**) (2,7 g) se purificó mediante cromatografía líquida de vacío (CLV) utilizando sílica de fase reversa. Se eluyó con MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1, MeOH y acetona. La fracción MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1 fue purificada posteriormente por cromatografía flash en columna (CCF) utilizando sílica gel 230-400 Mesh. Los sistemas de elución utilizados fueron benceno:AcOEt:MeOH en las proporciones (4:1:0,25) y (1:1:0,5), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1) y MeOH. Se reunieron 10 fracciones (**FB<sub>12</sub>**-**FB<sub>21</sub>**) analizadas mediante CCD. La fracción **FB<sub>18</sub>** se purificó por Sephadex LH-20 (MeOH:CHCl<sub>3</sub> 4:1) obteniéndose un compuesto que fue identificado como ácido 4-metoxicinámico (**3.4**).

- **Purificación de E3**

El sub-extracto de CHCl<sub>3</sub> (**E3**) (5,9 g) fue purificado mediante CC, empleando como soporte sílica gel 70-230 Mesh. La columna fue eluida utilizando hexano; mezclas de hexano:AcOEt en diferentes proporciones; AcOEt; AcOEt:Acetona 1:1; acetona y MeOH. Se obtuvieron 187 fracciones que por su similitud en CCD se reunieron en 10 fracciones (**FB<sub>22</sub>**-**FB<sub>31</sub>**). La fracción **FB<sub>28</sub>** fue purificada por CC en fase reversa utilizando como sistema de solvente MeOH:H<sub>2</sub>O



(4:1). A partir de una purificación posterior por cromatografía en capa delgada preparativa (CCDP) se obtuvo 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (**3.5**).

#### • Purificación de E4

El sub-extracto de acetato de etilo (**E4**) (1,2 g) se purificó por cromatografía en columna de fase reversa utilizando como sistema de elución MeOH:H<sub>2</sub>O 7:3 y luego MeOH. Se reunieron 10 fracciones de comportamiento semejante (**FB<sub>32</sub>**-**FB<sub>41</sub>**).

La **Tabla 3.1** resume los compuestos purificados e identificados en algunas fracciones obtenidas.

**Tabla 3.1** Compuestos aislados de *B. odorata* MCNS 9947

Fraciones (sistema de elución)	Purificaciones posteriores	Productos aislados
<b>FB<sub>6</sub></b> (Hexano:AcOEt 1:1)	-	Mezcla de 3-β-lupeol y 3-β-amirina <b>3.1</b> y <b>3.2</b> (3,1 mg)
<b>FB<sub>16</sub></b> (Benceno:AcOEt:MeOH1:1:0,5)	Sephadex LH 20	Ácido 4-metoxicinámico <b>3.4</b> (1,6 mg)
<b>FB<sub>29</sub></b> (Hexano:AcOEt 3:7)	CCRev CCP	3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol <b>3.5</b> (0,7 mg)

### 3.3 Material vegetal número de herbario MCNS 10253

El material vegetal recolectado en estado de floración, en Agosto de 2008, con número de herbario **MCNS 10253** fue analizado como se detalla a continuación.

#### 3.3.1 Extracción

El material fresco recolectado (1186 g) se separó en dos partes, una se destinó a la extracción de metabolitos secundarios volátiles (580 g) y otra parte del material (606 g) al estudio de compuestos no volátiles.

- Compuestos no volátiles de *B. odorata*

El material vegetal molido (587 g) se maceró en EtOH (95%) a temperatura ambiente. Luego de sucesivas extracciones, el solvente se evaporó a presión reducida para la obtención del extracto etanólico. Éste fue solubilizado en  $\text{CHCl}_3$  y luego en MeOH caliente (45 °C) para obtener los sub-extractos clorofórmico (**E5**) y metanólico respectivamente (**E6**).

- Compuestos volátiles de *B. odorata*

La extracción de metabolitos secundarios volátiles se realizó mediante la técnica de destilación por arrastre con vapor de agua usando un colector tipo Clevenger. El aceite esencial incoloro obtenido (53,9 mg) fue separado del agua y mantenido a -5°C hasta su análisis por CG-EM. Los compuestos fueron identificados por una combinación de datos de espectrometría de masa (EM), datos de índices de retención y comparación con patrones. El estudio fue realizado con la colaboración de la Dra. Carmen Viturro de la Universidad Nacional de Jujuy. Se identificaron seis componentes que constituyen el 97.09 % de los metabolitos volátiles: benzoato de bencilo, tigolato de bencilo, salicilato de bencilo, octadecanol, hexadecanol y ácido hexadecanoico. La identificación de los mismos se encuentra descripta en el apartado 3.6.

### 3.3.2 Purificación de E5

El sub-extracto clorofórmico (**E5**) (3,2 g) se purificó por CCF usando sílica gel 230-400 Mesh; como solventes de elución se utilizaron  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3$ :Acetona aumentando la polaridad en un 10% y MeOH. Las fracciones obtenidas se analizaron por su comportamiento en CCD frente a diferentes sistemas de solventes revelando con lámpara UV, vainillina y óleum. Se reunieron 20 fracciones (**FB<sub>42</sub>**-**FB<sub>62</sub>**).

En la fracción **FB<sub>42</sub>** se identificó 3- $\beta$ -acetato de lupeolo (**3.3**) (2,1 mg).

La fracción **FB<sub>43</sub>** se purificó por cromatografía en columna utilizando sílica gel 70-230 Mesh, se aisló un compuesto que por su perfil en el espectro de resonancia magnética nuclear se identificó como un triterpeno triacetilado. De la

fracción **FB<sub>50</sub>** se purificó mediante CCDP una mezcla de compuestos aromáticos. Los compuestos no fueron identificados estructuralmente debido a la escasa masa obtenida.

El sub-extracto **E6** no fue estudiado durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

### 3.4 Material vegetal número de herbario MCNS 11342

#### 3.4.1 Extracción

El material vegetal estéril fue molido (426 g) y se extrajo por maceración exhaustiva con etanol a temperatura ambiente, se evaporó el solvente a presión reducida a una temperatura de 45°C. La extracción se realizó mediante el método de precipitación con acetato de plomo para eliminar las sustancias apolares (clorofilas, grasas, ceras, triterpenos y algunos flavonoides). Para ello, el extracto etanólico fue disuelto en 700 mL de etanol caliente (40°C), se agregó igual volumen de una solución de acetato de plomo al 4% p/v y 14 mL de ácido acético. Se dejó en reposo durante una noche, se filtró y el solvente orgánico se evaporó a presión reducida; la fase acuosa se extrajo cinco veces con 100 mL de CHCl<sub>3</sub> cada vez y tres veces con 200 mL de acetato de etilo. Estas fases orgánicas se secaron con sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y por evaporación del solvente orgánico se obtuvieron los sub-extractos de cloroformo (**E7**) y de Acetato de etilo (**E8**). Este procedimiento dio como resultado un extracto más libre de impurezas apolares

El esquema de obtención de los extractos se muestra en la **Figura 3.3**.

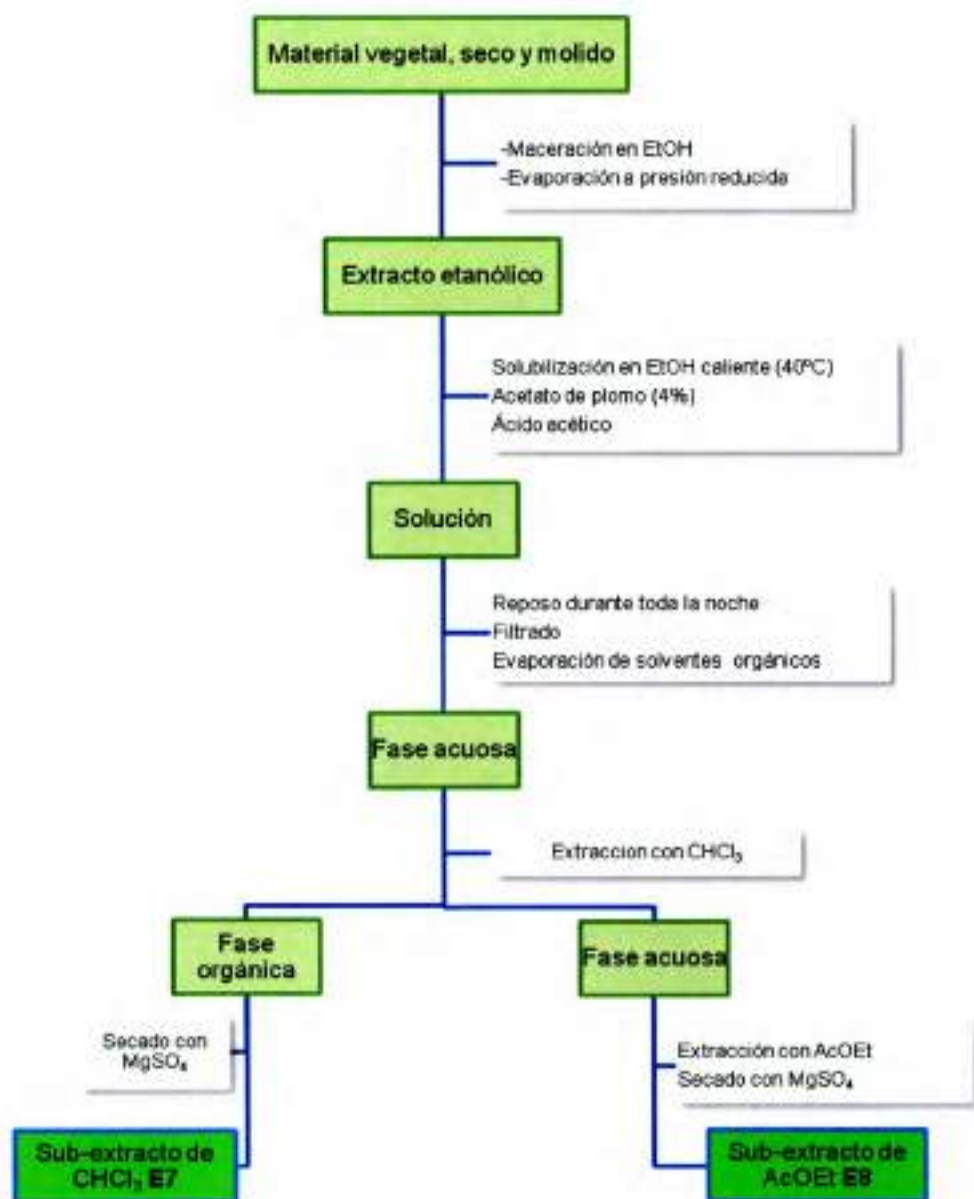


Figura 3.3 Esquema de procedimiento de extracción de *B. odorata* MCNS 11342

### 3.4.2 Purificación de E7

El sub-extracto de cloroformo **E7** (4,9 g) fue purificado por CC, en sílica gel 70-230 Mesh. Se eluyó con benceno y mezclas de benceno:AcOEt y CHCl<sub>3</sub>:MeOH aumentando la polaridad progresivamente en un 5%. Se obtuvieron 54 fracciones (**FB<sub>83</sub>-FB<sub>117</sub>**) agrupadas por su comportamiento por CCD. La fracción **FB<sub>69</sub>** se purificó por CCF eluyendo con mezclas de hexano:AcOEt 5:1 y 1:1, obteniéndose los compuestos en mezcla lupeol y β-amirina (**3.1** y **3.2**). A partir de la fracción **FB<sub>106</sub>** y por purificación con CLV de fase reversa (MeOH:H<sub>2</sub>O 4:1) y posterior purificación mediante CCP (CHCl<sub>3</sub>:MeOH) se obtuvo apigenina (**3.6**). A partir de la purificación de la fracción **FB<sub>110</sub>** por Sephadex LH-20 se aisló el compuesto apigenina-7-O-β-glucósido (**3.7**).

En la **Tabla 3.2** se detallan las purificaciones que se realizaron de algunas de las fracciones obtenidas en cada extracto para la obtención de los compuestos aislados e identificados

**Tabla 3.2** Compuestos aislados de *B. odorata* MCNS 11342

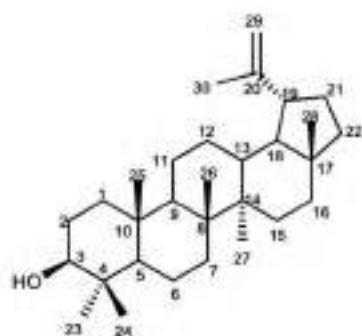
Fracciones	Purificaciones posteriores	Productos aislados
<b>FB<sub>69</sub></b> (Benceno:AcOEt 85:15)	CCF	Mezcla de 3-β lupeol y β- amirina ( <b>3.1</b> y <b>3.2</b> ) (2,1 mg)
<b>FB<sub>106</sub></b> (CHCl <sub>3</sub> :MeOH 4:1)	CCRev CCPD	Apigenina <b>3.6</b> (1,3 mg)
<b>FB<sub>110</sub></b> (CHCl <sub>3</sub> :MeOH 4:1)	Sph LH-20	apigenina-7-O-β-glucósido ( <b>3.7</b> ) (0,9 mg)

El sub-extracto **E8** no fue estudiado durante el desarrollo de este trabajo de tesis.

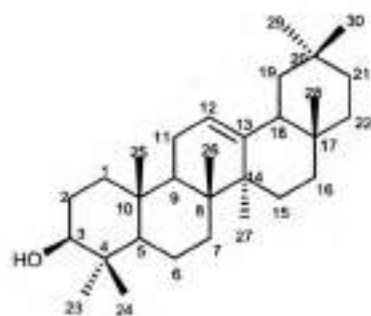
### 3.5 Determinación estructural de los compuestos aislados

La determinación estructural de los compuestos se realizó principalmente por métodos espectroscópicos: de infrarrojo, de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masa.

#### 3- $\beta$ -lupeol y 3- $\beta$ -amirina (3.1 y 3.2)



3- $\beta$ -lupeol (3.1)

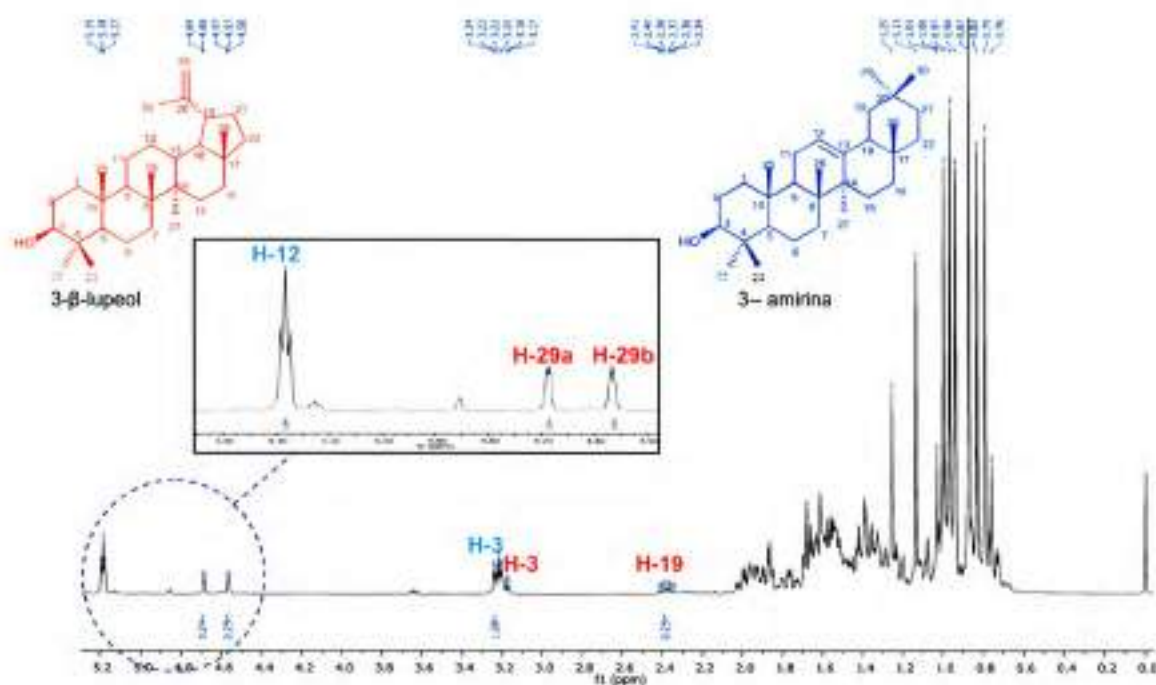


3- $\beta$ -amirina (3.2)

A partir de la fracción **FB<sub>8</sub>** (Tabla 3.1) se aislaron 3,1 mg de una mezcla de 3- $\beta$ -lupeol (3.1) y 3- $\beta$ -amirina (3.2) en una proporción 1: 4.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 3.4) se observa la señal del hidrógeno vinílico de 3- $\beta$ -amirina a  $\delta$  5,18 ppm (H-12), las señales de los ocho grupos metilos aparecen a  $\delta$  0,79; 0,83; 0,87 (6H); 0,93; 0,96; 0,99 y 1,13 ppm (Gealt, 1983). La señal de H-3 se observa a  $\delta$  3,20 ppm como un multiplete, superpuesta con la señal de H-3 del 3- $\beta$ -lupeol.

Las señales de los protones del doble enlace exocíclico del 3- $\beta$ -lupeol aparecen a  $\delta$  4,69 y  $\delta$  4,56 ppm (H-29a y H-29b). Los datos del triterpeno son coincidentes con los que se informan en bibliografía para 3- $\beta$ -lupeol (Fotie et al., 2006).



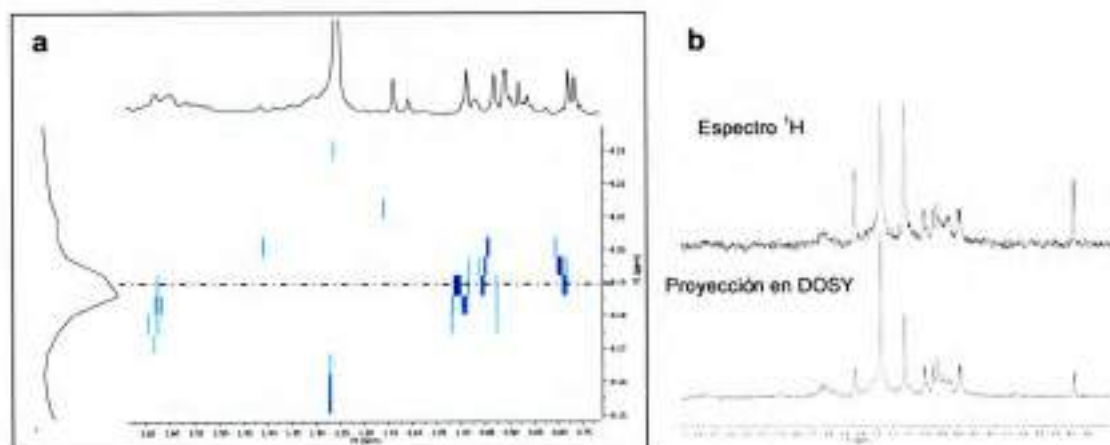
**Figura 3.4** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla **3- $\beta$ -lupeol**, **3.1** y **3- $\beta$ -amirina**, **3.2** (en  $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Al tratarse de compuestos en mezcla y con el objetivo de poder asignar inequívocamente las señales de los grupos metilo de ambos compuestos, se realizó un experimento DOSY (*Difusion Ordered Spectroscopy*). Éste es un método analítico no invasivo utilizado para la identificación de componentes moleculares en mezclas.

El espectro de RMN de una mezcla de compuestos es equivalente a la superposición de los espectros individuales de cada uno de estos compuestos y las proporciones de las señales dependen de las concentraciones relativas. Como los picos de un mismo compuesto presentan el mismo valor de coeficiente de difusión ( $D$ ), es posible utilizar los experimentos de difusión para separar e identificar las señales de compuestos diferentes de una misma mezcla. El método DOSY consiste en la adquisición y el procesado automático de una serie de

espectros de difusión adquiridos con un incremento en la intensidad del gradiente. En el procesado se aplica la transformada de Fourier en la dimensión directa y el resultado es la serie de espectros de  $^1\text{H}$ , a los cuales se les aplica una transformada de Laplace inversa (Morris et al., 1994). El resultado final es un mapa 2D con el espectro de RMN en el eje  $x$  y  $D$  en el eje  $y$ . En una mezcla de varios componentes en solución existen especies con diferentes velocidades de difusión, por lo tanto las señales pertenecientes a las moléculas más pequeñas se atenúan más rápidamente que las pertenecientes a moléculas grandes debido a que se mueven más rápido en solución. Las señales de RMN  $^1\text{H}$  correspondientes a cada una de estas especies aparecen en distintas líneas horizontales del espectro DOSY.

Mediante este experimento se pudo observar que los compuestos presentan coeficientes de difusión muy próximos entre sí y que no hay atenuación de señal, por lo cual las señales de los grupos metilo correspondientes a cada compuesto no pudieron ser identificados mediante este método. Lo que sí se pudo confirmar es que se trata de una mezcla de compuestos con características y pesos moleculares muy similares entre sí (Figura 3.5).



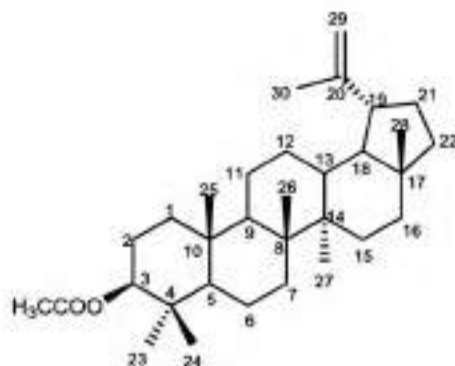
**Figura 3.5** (a) Espectro DOSY de la mezcla de 3- $\beta$ -lupeol (3.1) y 3- $\beta$ -amirina (3.2) ( $\text{CDCl}_3$ ). (b) Espectro  $^1\text{H}$  y traza 1D correspondiente a las señales del compuesto que aparecen en la fila marcada con la línea discontinua en (a)



A partir del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de la mezcla y por comparación con los datos informados en bibliografía (Mahato & Kundu, 1994) se asignaron las señales de los átomos de carbono de cada compuesto (**Tabla 3.3**).

Las señales a  $\delta$  121,8 y  $\delta$  145, 1 corresponden a los C-12 y C-13 del doble enlace de la 3- $\beta$  amirina, a diferencia de los C del 3- $\beta$  lupeol que se encuentran en 25,2 ppm (C-12) y 38,1 ppm (C-13) debido a la ausencia de este doble enlace. Los C-25 y C-26 pueden ser intercambiables en ambos compuestos.

### 3- $\beta$ -acetato de lupeoilo (3.3)



A partir de la fracción **FB<sub>42</sub>** obtenida de la purificación de **E5** se aisló 3- $\beta$ -acetato de lupeoilo (**3.3**).

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  se observan siete señales singletes correspondientes a los grupos metilos. Las señales de los protones olefinicos aparecen a  $\delta$  4,70 ( $J = 2,2$  Hz) y 4,59 ppm ( $J = 2,2$  Hz). La señal multiplete a  $\delta$  4,50 ppm se adjudica a H-3 y el singlete a  $\delta$  2,06 ppm al grupo metilo del resto acetilo. La estructura se confirmó por comparación con datos de bibliografía de RMN  $^{13}\text{C}$  (Mahato y col., 1994) (**Tabla 3.3**).

El espectro de IR presenta señales por debajo de los  $3000\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a las frecuencias de estiramientos simétricas y asimétricas de compuestos alifáticos. El pico a  $1736\text{ cm}^{-1}$  es propio del estiramiento de un grupo carbonilo de un éster, a  $1246\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento del enlace C-O de

dicho grupo. Las deformaciones fuera del plano de grupos metileno y metilo aparecen a  $1454\text{ cm}^{-1}$  y  $1381\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Estos datos confirman los obtenidos por los métodos de RMN y permitieron confirmar la estructura del triterpeno (**Figura 3.6**).

En la **Tabla 3.3** se indican los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los tres triterpenos aislados.

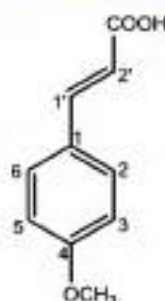
**Tabla 3.3** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de los triterpenos 3- $\beta$ -lupeol **3.1**, 3- $\beta$ -amirina **3.2** y 3- $\beta$ -acetato de lupeolo **3.3** ( $\text{CDCl}_3$ )

Carbono	3.1	3.2	3.3
1	38,6	38,6	38,4
2	27,3	27,3	27,4
3	78,9	79,1	80,9
4	38,7	38,7	37,8
5	55,3	55,3	55,4
6	18,5	18,5	18,2
7	34,2	32,8	34,2
8	40,7	38,8	40,9
9	50,4	47,7	50,4
10	37,2	37,2	37,1
11	20,9	23,5	20,9
12	25,2	121,8	25,1
13	38,1	145,1	38,1
14	42,4	41,5	42,9
15	26,2	26,2	23,7
16	35,4	27,0	35,6
17	42,8	32,5	43,0
18	48,2	47,4	48,3
19	47,9	46,7	48,0
20	151,0	31,1	150,9
21	30,0	34,7	29,8
22	40,0	37,0	40,0
23	28,0	28,2	27,9
24	15,4	15,4	16,0
25	16,1	15,6	16,5
26	15,8	16,9	16,1
27	14,4	26,1	14,5
28	18,0	28,4	18,0
29	10,3	33,3	109,3
30	19,2	23,7	19,3
C=O	-	-	171,0
CH <sub>3</sub>	-	-	21,3



Figura. 3.6 Espectro de IR de 3- $\beta$ -acetato de lupeolo (3.3)

### Ácido 4-metoxicinámico (3.4)



A partir de la fracción **FB<sub>16</sub>** (Tabla 3.1) se aisló e identificó ácido 4-metoxicinámico.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 3.7) se observan dos dobletes a  $\delta$  7,72 y  $\delta$  6,31 ppm ( $J = 16,0$  Hz) correspondientes a los protones vinílicos de la cadena lateral (H-1' y H-2') y dos dobletes característicos de la sustitución *para* en un anillo aromático a  $\delta$  7,50 y  $\delta$  6,92 ppm ( $J = 8,8$  y  $3,2$  Hz). El grupo 4-metoxi produce un singlete a  $\delta$  3,85 ppm que integra para tres hidrógenos.

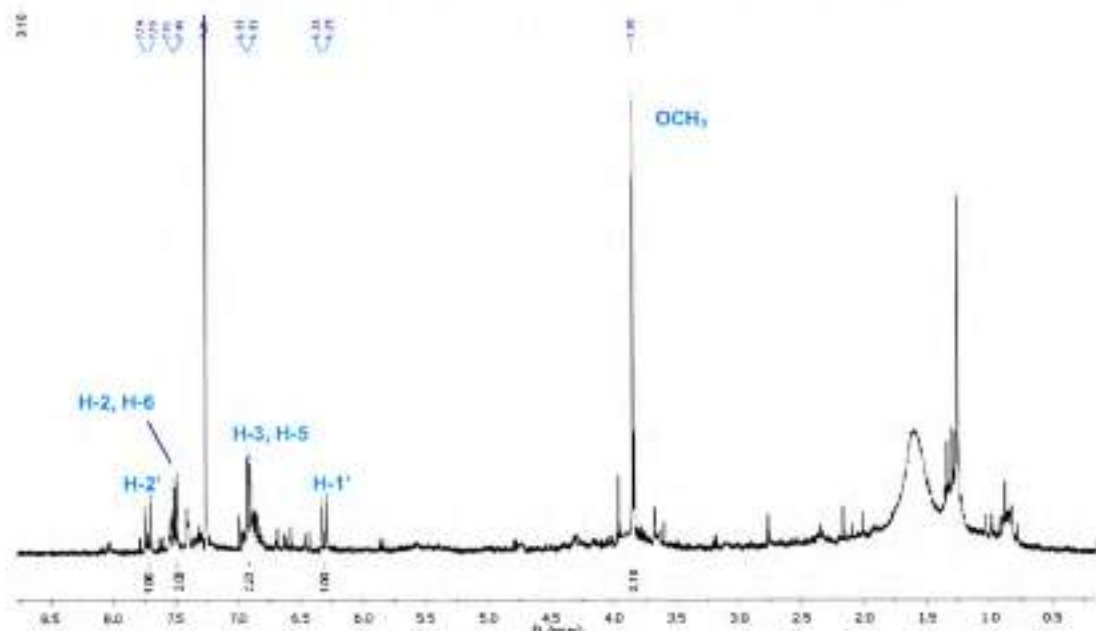
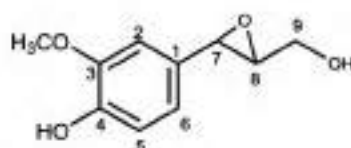


Figura 3.7. Espectro de RMN <sup>1</sup>H de ácido 4-metoxicinámico 3.4 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

La estructura fue confirmada por el experimento COSY, los espectros de correlación HSQC, HMBC y por el espectro de masa, en el cual, el ion molecular a  $m/z$  178 corresponde al pico base (Pouchert & Behnke, 1993).

### 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (3.5)



A partir de sucesivas purificaciones de la fracción **FB<sub>28</sub>** (Tabla 3.1) se aisló el compuesto **3.5**.

Por el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear mono y bidimensionales se adjudicaron las señales de los protones aromáticos a  $\delta$  6,85 (*dd*,  $J = 8,0$  y  $1,7$  Hz; H-6),  $\delta$  6,91 (*d*,  $J = 8,0$  Hz; H-5) y  $\delta$  6,92 (*d*,  $J = 1,7$  Hz; H-2). Los hidrógenos del grupo oxirano dan lugar a las señales a  $\delta$  4,75 (H-7) y  $\delta$  3,11 (H-8) acoplados con una  $J = 4,4$  Hz entre ambos y éste último acoplado con los protones de C-9 ( $\delta$  4,28 y  $\delta$  3,89 ppm) ( $J = 7,3$  y  $3,8$  Hz). La señal a 3,95 ppm que integra para 3H corresponde al grupo metoxi unido a C-3 (Figura 3.8).

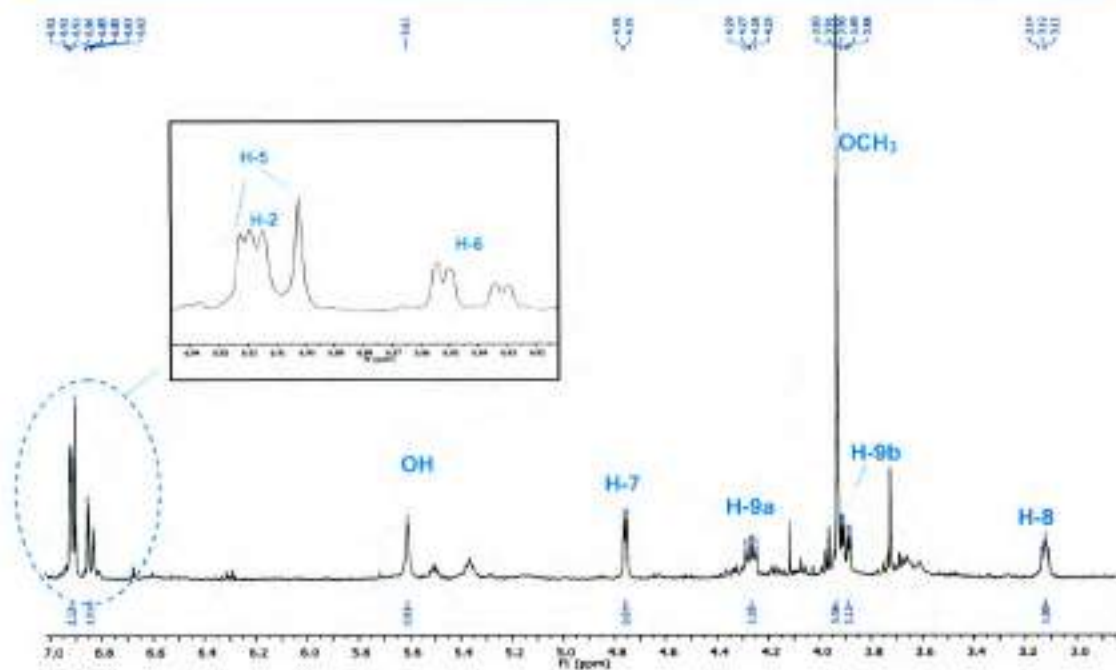


Figura 3.8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3.5 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

En la Figura 3.9 se observa el espectro ampliado bidimensional homonuclear COSY-45 que correlaciona H-H, en la que se destacan los picos de cruce entre las señales de H-7 y H-8; y entre H-8 y los H-9a y H-9b.

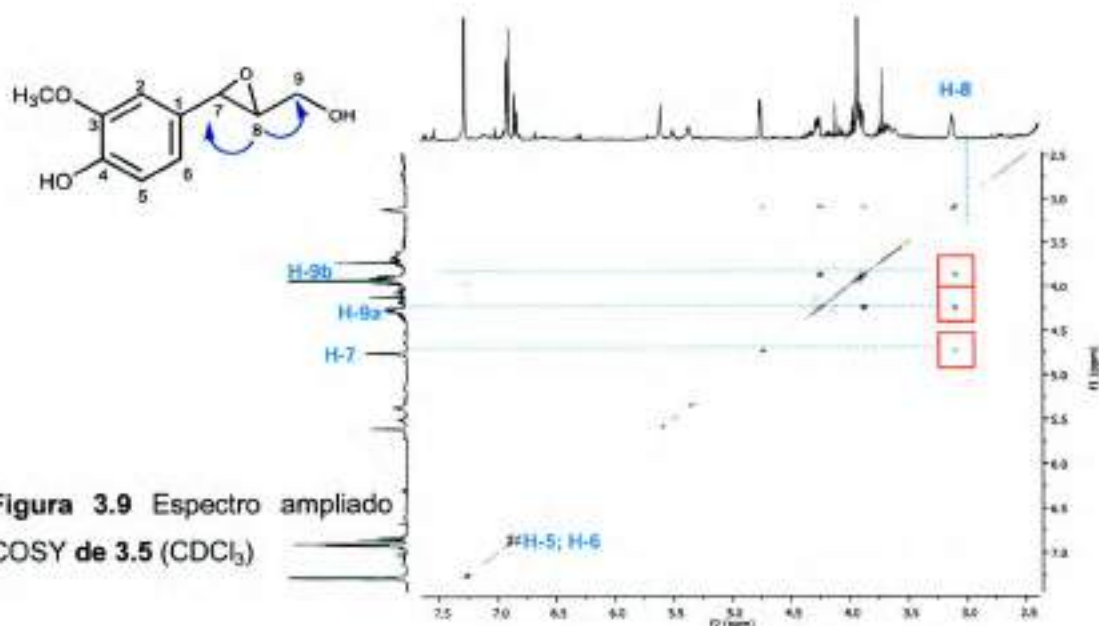


Figura 3.9 Espectro ampliado COSY de 3.5 ( $\text{CDCl}_3$ )

En espectrometría de masa por impacto electrónico, se observa un fragmento con  $m/z=151$  debido a la pérdida de 45 uma ( $C_2H_4OH$ ), que corresponde al pico base.

A partir del análisis de los datos espectroscópicos y espectrométricos se propone la estructura 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (**3.5**). Para este compuesto no se encontraron antecedentes bibliográficos de haber sido aislado previamente. Los valores de desplazamiento químico son similares a los del compuesto guaiacil glicerol (Comte et al., 1997). A diferencia del compuesto informado en bibliografía en donde el valor de desplazamiento químico de C-8 es de 82,7 ppm, se plantea para **5.3** la presencia de un anillo oxipirano en función del valor de desplazamiento químico del C-8 a 54,02 ppm.

En colaboración con la Dra. Mariela Finetti de la Universidad Nacional de Salta, se realizó el modelado de la especie propuesta 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol. A partir de las estructuras posibles, teniendo en cuenta las diferentes configuraciones R/S para los carbonos C-7 y C-8, se realizó una inspección del espacio conformacional de cada una de ellas empleando métodos de dinámica molecular. Se seleccionaron los conformeros de menor energía para optimizar la geometría y simular los espectros RMN a nivel DFT (B3LYP, 6-311++G (d,p)). Los isómeros de menor energía encontrados se muestran en la **Figura 3.10**. Las simulaciones del espectro RMN se llevaron a cabo en  $CHCl_3$ , introduciendo el efecto del solvente mediante un modelo continuo (CPCM). La referencia empleada para los desplazamientos fue TMS calculado en las mismas condiciones.

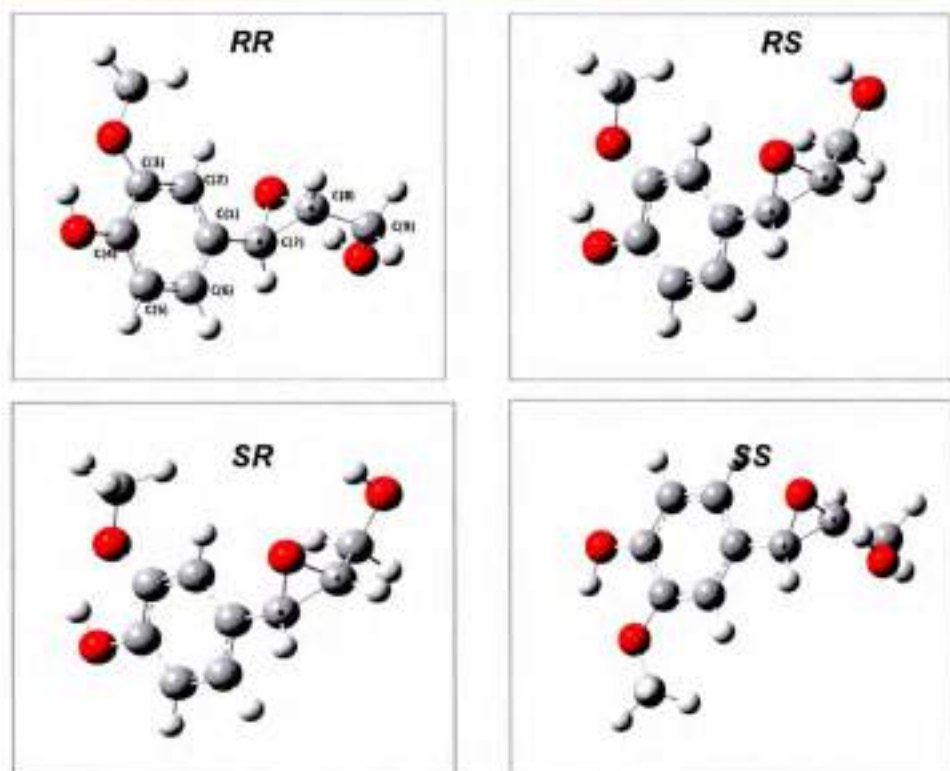


Figura 3.10 Isómeros de menor energía del compuesto 3.5

En la **Tabla 3.4** se observan los valores de las constantes de acoplamiento calculados para los H-7, H-8, H-9a y H-9b. Los resultados muestran que el valor experimental de  $J_{7-8}$  ( $J=4,4$  Hz) es coincidente con el valor de  $J$  de los isómeros *cis* **RS** y **SR** (**Figura 3.10**). Por otra parte, el valor experimental de  $J_{8-9b}$  (3,80 Hz) es del mismo orden de la  $J_{8-9b}$  para el isómero **RS** calculado. Estos resultados permiten proponer como probable el isómero **7R, 8S**.

**Tabla 3.4** Valores de constantes de acoplamientos calculadas para los isómeros **RR**, **RS**, **SR** y **SS** del compuesto 3.5

J	Experimental 3.5	Isómeros			
		RR	RS	SR	SS
7-8	4,40	1,78	4,37	4,87	1,80
8-9a	7,00	3,92	10,30	2,64	2,42
8-9b	3,80	2,28	3,68	10,30	2,24
9a-9b	10,50	14,35	13,55	14,24	14,30

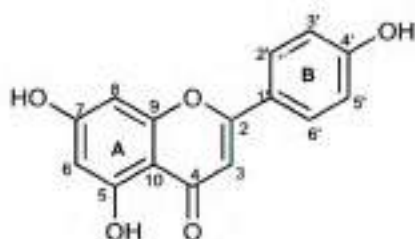


En la **Tablas 3.5** se representan los valores calculados de  $\delta_H$  para los isómeros *RR*, *RS*, *SR* y *SS*.

**Tabla 3.5** Valores de  $\delta_H$  calculados para los isómeros *RR*, *RS*, *SR* y *SS* del compuesto **3.5**

Hidrógeno	Experimental 3.5	Isómeros			
		<i>RR</i>	<i>RS</i>	<i>SR</i>	<i>SS</i>
7	4,75	4,02	4,14	4,21	3,93
8	3,11	2,91	3,26	3,34	2,95
9a	3,89	3,92	3,37	3,34	3,93
9b	4,28	4,11	3,90	3,62	4,10
OCH <sub>3</sub>	3,95	3,94	3,95	3,97	3,95

### Apigenina (3.6)



A partir de la fracción **FB<sub>106</sub>** se aisló el compuesto 5,7,4'-trihidroxi-flavona, conocido comúnmente como apigenina (**3.6**). Su estructura se determinó por el análisis de los espectros de RMN en una y dos dimensiones (**Tabla 3.4**).

En el espectro protónico que se muestra en la **Figura 3.11**, se observan las señales de los protones aromáticos del anillo A de la flavona a  $\delta$  6,18 (s ancho) y  $\delta$  6,56 ppm (s ancho) que corresponden a H-6 y H-8 respectivamente. La señal a  $\delta$  6,57 ppm se adjudica H-3, corrimiento químico típico para las flavonas. El pico a 12,95 ppm es característico de flavonas 5-hidroxi sustituidas. Esta señal

corresponde al hidrógeno del grupo hidroxilo, que forma puente hidrógeno con el grupo carbonilo de C-4.

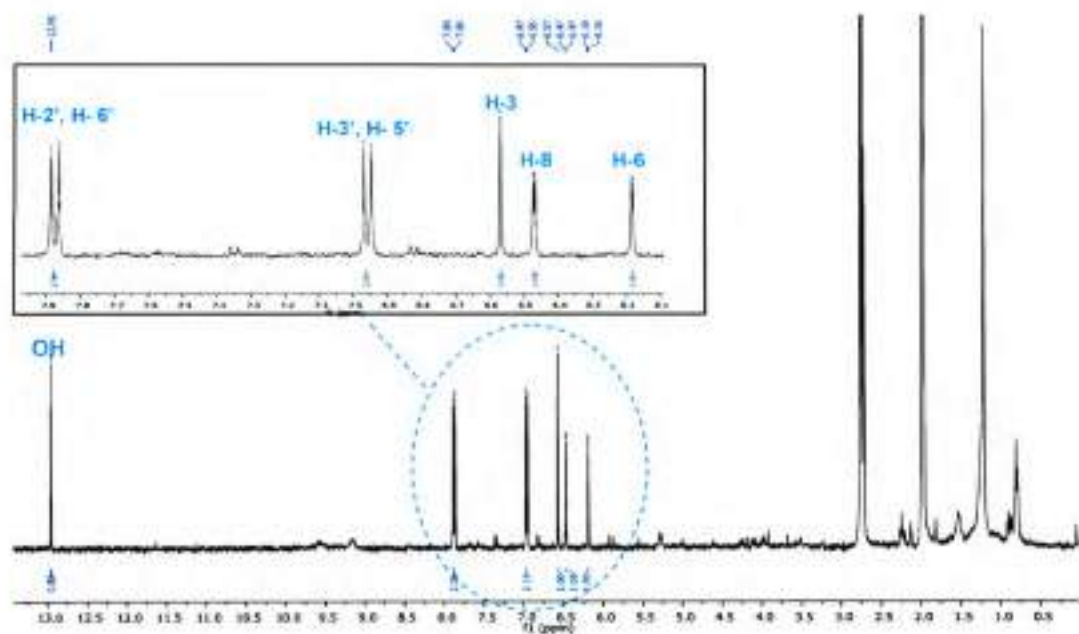
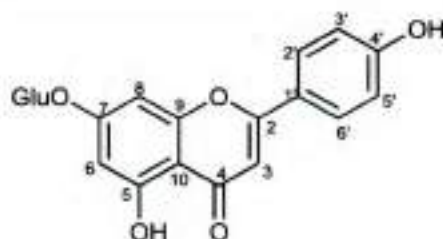


Figura 3.11 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de apigenina (3.6) (*acetona-d\_6*, 400MHz)

### Apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido (3.7)



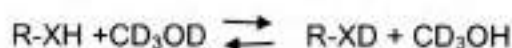
A partir de la fracción **FB<sub>110</sub>** (Tabla 3.2) se aisló e identificó el compuesto apigenina 7-O- $\beta$ - glucósido (3.7).

En general, en las flavonas, en Resonancia Magnética Nuclear los protones del anillo A se encuentran poco influenciados por el patrón de sustitución del anillo B. Para una flavona que presenta 5,7-dihidroxi sustitución los rangos de

desplazamiento químico para los H-6 y H-8 son 6,16-6,25 ppm y 6,39-6,56 ppm respectivamente. Si ocurre una metilación o glucosilación en la posición 7-OH, las señales de estos protones aparecen a campos más bajos, entre 6,33-6,48 para H-6 y 6,71-6,93 para H-8 (Harborne, 1994). En los espectros de RMN del compuesto **3.7** se observan señales características de los átomos de hidrógenos de azúcares (**Tabla 3.6**) y el desplazamiento de las señales de los H-6 y H-8 a campos más bajos en comparación con datos espectroscópicos informados en bibliografía del compuesto **3.6** en DMSO (Alwahsh et al., 2015).

Los espectros del compuesto **3.7** se realizaron en dos solventes distintos: metanol deuterado (MeOD) y DMSO, lo que permitió observar el efecto que éstos producen sobre las señales del compuesto aislado.

Los protones ácidos (XH, X= O, N, S) pueden ser identificados en espectros de RMN  $^1\text{H}$  mediante el uso de intercambio de deuterio.



Después del intercambio con deuterio, la señal de XH en el espectro desaparece y aparecen las correspondientes al  $\text{CD}_3\text{OH}$  (Breitmaier, 2001).

En la **Figura 3.12**, se observa este efecto. En el espectro protónico realizado en DMSO (**Figura 3.12a**, **Tabla 3.6**) aparecen las señales de los átomos de hidrógeno aromáticos de la aglicona desplazados a mayores frecuencias que los de **3.6** (Alwahsh et al., 2015) debido a la sustitución por glucosilación en C-7. Se observa además la señal correspondiente al átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo en C-5. Las señales de los átomos de hidrógeno del glúcido se encuentran solapadas con la señal de  $\text{H}_2\text{O}$  residual del solvente, por lo que en la **Tabla 3.6** se informa un rango de  $\delta$  (3,00-4,00 ppm) para estos hidrógenos.

En el espectro realizado en MeOD (**Figura 3.12b**, **Tabla 3.6**) la señal de OH en C-5 no se observa, lo cual se debe al rápido intercambio del hidrógeno por deuterio, como se explicó anteriormente. En este caso en particular, una de las ventajas de usar MeOD como solvente es que pueden observarse las señales correspondientes a los hidrógenos de glúcidos.

Los datos espectroscópicos del compuesto 3.7 fueron coincidentes con los informados para apigenina 7-O- $\beta$ - glucósido (Redaelli et al., 1980).

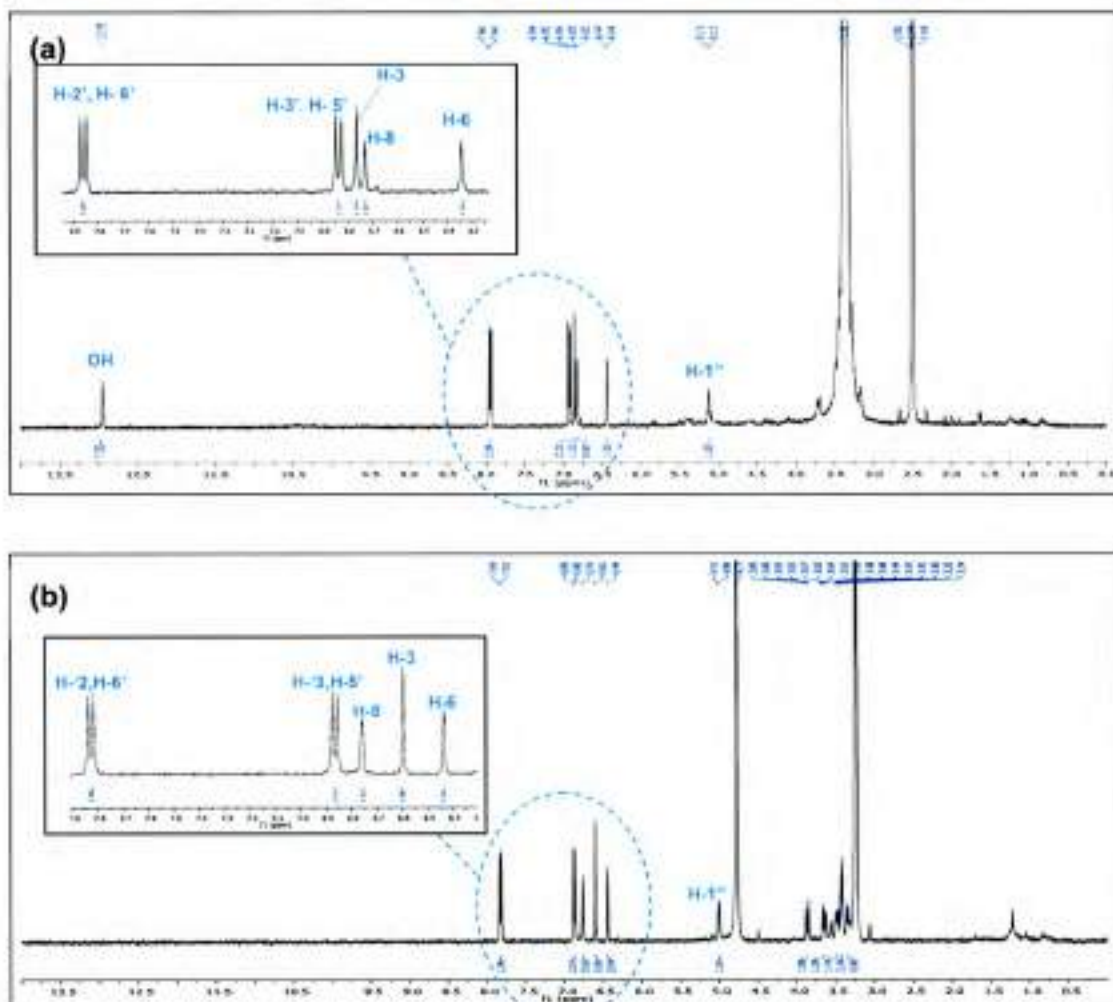
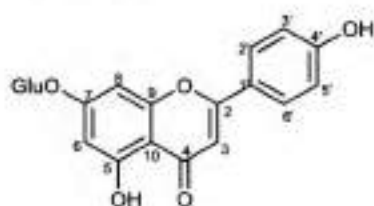


Figura 3.12 Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de 3.7 (a) en DMSO; (b) MeOD (400 MHz)

Tabla 3.6 Datos de RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C de los compuestos 3.6 y 3.7 (ppm)

	3.6 (Acetona-d <sub>6</sub> )				3.7 (DMSO-d <sub>6</sub> )				3.7 (MeOD)			
Aglicona	DEPT	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	J(Hz)	DEPT	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	J(Hz)	DEPT	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	J(Hz)
2	C	163,75	-	-	C	164,83	-	-	C	165,3	-	-
3	CH	102,82	6,57	-	CH	102,39	6,86	-	CH	102,9	6,60	-
4	C	181,74	-	-	C	182,56	-	-	C	182,0	-	-
5	C	161,42	-	-	C	161,47	-	-	C	161,0	-	-
6	CH	98,80	6,18	2,3	CH	99,77	6,44	2,1	CH	99,8	6,44	2,6
7	C	164,27	-	-	C	162,67	-	-	C	163,0	-	-
8	CH	93,99	6,56	2,3	CH	94,14	6,83	2,1	CH	94,7	6,76	2,6
9	C	157,31	-	-	C	156,28	-	-	C	154,7	-	-
10	C	103,85	-	-	C	105,82	-	-	C	105,6	-	-
1'	C	121,27	-	-	C	120,25	-	-	C	123,0	-	-
2'	CH	128,53	7,93	8,3	CH	128,99	7,95	7,4	CH	128,1	7,83	8,4
3'	CH	115,97	6,91	8,3	CH	116,23	6,93	7,4	CH	115,5	6,87	8,4
4'	C	161,20	-	-	C	160,86	-	-	C	161,0	-	-
5'	CH	115,97	6,91	8,3	CH	115,23	6,93	7,4	CH	115,6	6,87	8,4
6'	CH	128,53	7,93	8,3	CH	128,99	7,95	7,4	CH	128,1	7,83	8,4
C5-OH	-	-	12,95	-	-	-	12,95	-	-	-	-	-
Glúcido	DEPT	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	J(Hz)	DEPT	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	J(Hz)	DEPT	δ <sub>C</sub>	δ <sub>H</sub>	J (Hz)
1''	-	-	-	-	CH	99,32	5,12	6,1	CH	100,62	5,00	7,4
2''	-	-	-	-	CH	73,48	3,00-4,00	-	CH	72,21	3,00-4,00	-
3''	-	-	-	-	CH	77,14	3,00-4,00	-	CH	78,47	3,00-4,00	-
4''	-	-	-	-	CH	69,24	3,00-4,00	-	CH	71,2	3,00-4,00	-
5''	-	-	-	-	CH	76,70	3,00-4,00	-	CH	76,74	3,00-4,00	-
6''	-	-	-	-	CH <sub>2</sub>	60,34	3,00-4,00	-	CH <sub>2</sub>	60,79	3,00-4,00	-

### 3.6 Análisis de compuestos volátiles

La ISO (*Internacional Standard Organization*) define los aceites volátiles (aceites esenciales, AE) como los productos obtenidos de plantas a través de destilación por arrastre con vapor de agua, como así también a los productos obtenidos por expresión de los pericarpios de los frutos cítricos. Según el Simposio Internacional de AE, se puede considerar también como AE los extraídos con fluidos super críticos y con microondas.

Desde el punto de vista quimiotaxonómico los AE raramente son hallados en las Gimnospermas con excepción de las coníferas, y en las Angiospermas monocotiledóneas con excepción de algunas gramíneas como *Cymbopogon* y *Vetiveria*. Las familias en las que se pueden encontrar los AE son las Angiospermas dicotiledóneas: Asteraceae, Lamiaceae, Myrtaceae, Rutaceae, entre otras. Los AE pueden encontrarse en distintos órganos de los vegetales según los géneros: hojas (*Mentha*, *Cymbopogon*), raíces (*Vetiveria*), frutos (*Pimpinella*). También otros órganos de una planta pueden contener AE, pero en general su composición depende de la localización, como es el caso de los AE de los *Citrus* donde difieren según provengan de pericarpio, de hojas o de flores (Di Giacomo, 1981).

La gran mayoría de los AE están constituidos químicamente por terpenos y en menor proporción por derivados fenilpropanoides. Los compuestos terpénicos más frecuentemente encontrados son monoterpenos y en menor medida sesquiterpenos. Otros terpenoides, como los diterpenos, pueden encontrarse cuando los AE son extraídos con solventes orgánicos.

*B. odorata* es una especie cuya parte aérea posee un perfume agradable y persistente, por eso se consideró de interés para realizar el estudio químico de los metabolitos volátiles. Además, es interesante destacar que no se registra bibliografía en el género *Barnadesia* de estudios referidos a AE.

Los componentes del AE fueron determinados por CG y EM. Las características específicas y condiciones de trabajo se describen en el **Capítulo 2** de Materiales y Métodos.

Los compuestos volátiles se identificaron por una combinación de datos de EM (Adams, 2001; Jennings & Shibamoto, 1980) valores de índices de retención (Ramidi & Ali, 1998; Velazco-Neuquerela et al., 1998; Andrade et al., 1998; Poliana et al., 1998; Adams et al., 1998) y comparación con patrones internos.

El aceite esencial de *B. odorata* tiene un perfume similar al de la parte aérea del material vegetal, muy agradable.

La composición química se presenta en la **Tabla 3.7**. Los compuestos se tabulan por orden de elución desde la columna capilar DB-5MS indicando los índices de retención calculados según Kovats (IK) y porcentajes de cada uno de ellos en la mezcla. La concentración de los componentes se midió por integración de las áreas correspondientes a cada pico en los diferentes cromatogramas sin factor de corrección.

**Tabla 3.7** Composición química del aceite esencial de *B. odorata*

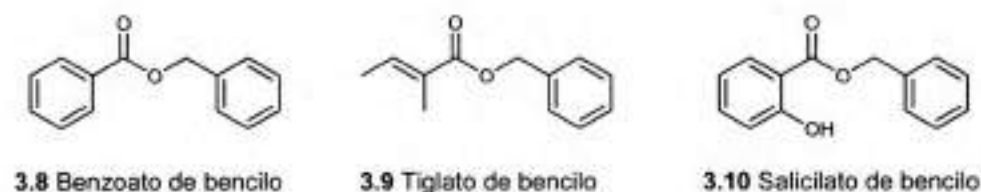
N° de pico	t <sub>r</sub> (min)	Compuesto	IK	Porcentaje
1	19,83	Tiglato de bencilo	1488	13,65
2	27,13	Benzoato de bencilo	1752	74,20
3	29,08	MS1	1828	0,78
3	29,56	Salicilato de bencilo	1847	4,84
4	29,96	hexadecanol	1863	2,04
5	32,04	Ácido hexadecanoico	1949	0,30
6	34,71	octadecanol	2064	2,06
8	39,28	MS2	2275	0,69
9	43,21	MS3	2366	0,90
10	46,84	MS4	2530	0,52

Los compuestos MS1, MS2, MS3 y MS4 no pudieron ser identificados por espectrometría de masa.

Los componentes del AE pueden agruparse en dos grupos: derivados de la ruta del ácido shikímico y derivados de la ruta del acetato.

- **Derivados de la ruta del ácido shikímico**

El AE de la planta en estudio está caracterizado por una alta proporción de derivados del ácido benzoico (compuestos  $C_6C_1$ ) provenientes de la ruta del ácido shikímico (**Tabla 3.7**). Las estructuras de los compuestos identificados se encuentran en la **Figura 3.12**



**Figura 3.12** Compuestos derivados del ácido benzoico, aislados del AE de *B. odorata*

El producto mayoritario corresponde a benzoato de bencilo (**3.8**), con un 74,20 % sobre el total del AE. Este compuesto es utilizado principalmente como escabicida (Regis et al., 2003; Giardelli & Larralde de Luna, 2001) y pediculicida (Giardelli & Larralde de Luna, 2001). Otro compuesto identificado derivado de esta ruta biosintética es el salicilato de bencilo (**3.10**), que es utilizado en cosmética como un componente fijador de perfumes (Curtis & Williams, 2009) y presenta un aroma floral agradable. Ambos compuestos tienen actividad estrogénica frente a una línea celular de cáncer de mama (Charles & Darbre, 2009).

- **Derivados de la ruta del acetato**

Los compuestos en menor proporción dentro de la composición del AE corresponden a un ácido graso (**3.13**) y dos alcoholes de cadena larga (**3.11** y **3.12**) (**Figura 3.13**).

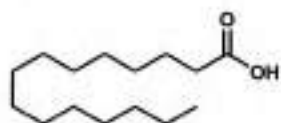




3.11 octadecanol



3.12 hexadecanol



3.13 Ácido hexadecanoico

Figura 3.13 Compuestos derivados de la ruta del acetato, aislados del AE de *B. odorata*

## Capítulo 4

**Estudio fitoquímico de *Flourensia tortuosa***

La elección de *Flourensia tortuosa* como planta de estudio en este trabajo de tesis se llevó a cabo no solamente para determinar su composición química, sino también por la posibilidad de realizar un estudio comparativo con otras especies del género estudiadas previamente por el grupo de trabajo.

El estudio fitoquímico de *F. tortuosa* consistió en la recolección del material vegetal, el aislamiento, purificación y elucidación estructural de los metabolitos secundarios encontrados.

#### 4.1 Metabolitos aislados

A partir del sub-extracto clorofórmico de *F. tortuosa* se aislaron e identificaron:

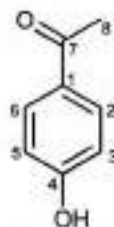
- Compuestos derivados de la ruta del acetato: 4-hidroxiacetofenona (4.1), 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (4.2)

- Compuestos de la ruta del mevalonato: dos cromenos formados por la combinación de *p*-hidroxiacetofenona y una unidad de isopreno: enecalina (4.3) y 2,2-metil cromeno (4.4), dos dihidrobenzofuranos: tremetona (4.5) y metoxitremetona (4.6), dos benzofuranos: 2,5-diacetilbenzofurano (4.7), 2-acetil-6-metoxibenzofurano (4.8) y una cumarina.

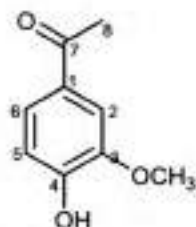
-Un derivado de la vía del shikimato en combinación con una unidad de isopreno: escopoletina (4.9).

-Una  $\gamma$ -lactona producto de la condensación de un alcohol y un ácido carboxílico de una misma molécula: 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona (4.10).

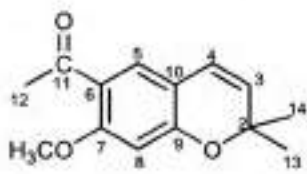
En la **Figura 4.1** se indican las estructuras de los compuestos identificados en el sub-extracto clorofórmico.



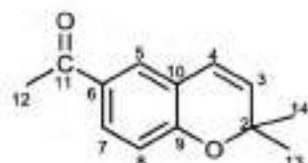
4.1 4-hidroxiacetofenona



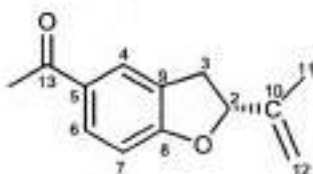
4.2 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona



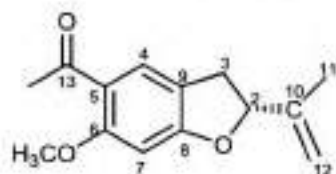
4.3 enecalina



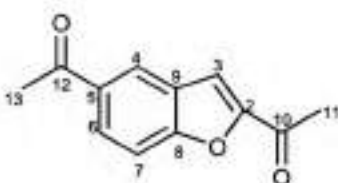
4.4 2,2 dimetilcromeno



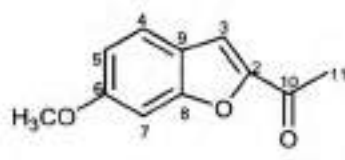
4.5 tremetona



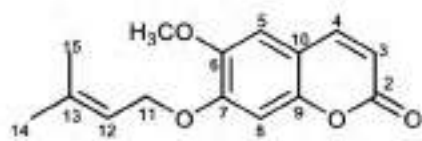
4.6 metoxitremetona



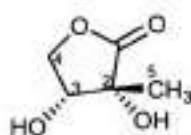
4.7 2,5 diacetilbenzofurano



4.8 2-acetil-6-metoxibenzofurano



4.9 7-O-dimetil-aliescopoletina



4.10 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona

Figura 4.1 Compuestos identificados en *F. tortuosa*

## 4.2 Material vegetal número de herbario Delbón 2

### 4.2.1 Extracción

El material vegetal seco y molido de *F. tortuosa* (632 g) se extrajo por maceración con etanol (95%) a temperatura ambiente, se filtró y el solvente se evaporó a presión reducida, este proceso se repitió tres veces. Con esta especie no se logró obtener un extracto adecuado con el método de precipitación con acetato de plomo, ya que el extracto obtenido contenía gran proporción de componentes lipofílicos. Por esta razón se siguió con el método de partición: el extracto se suspendió en una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1), y se extrajo con hexano, obteniéndose el sub-extracto de hexano (E9). La fase MeOH:H<sub>2</sub>O se concentró y se extrajo con cloroformo, para obtener el sub-extracto clorofórmico (E10). El esquema de obtención de los extractos se muestra en la **Figura 4.2**.

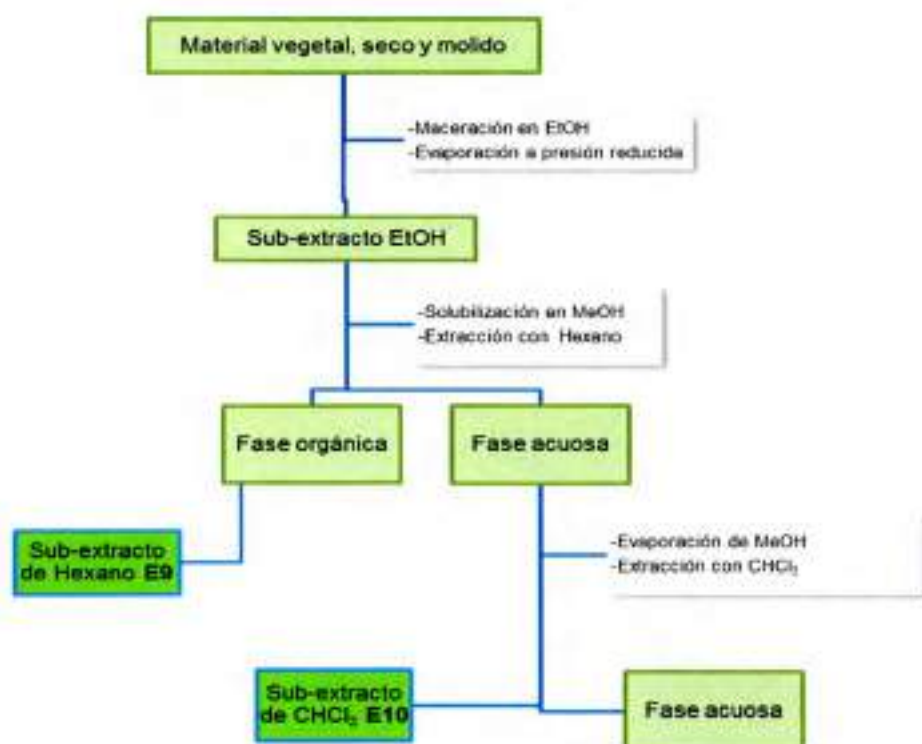


Figura 4.2 Esquema de procedimiento de extracción de *F. tortuosa*

#### 4.2.2 Purificación de los sub-extractos

- Purificación de E9

El estudio químico del sub-extracto hexano de *F. tortuosa* (E9) se realizó mediante comparación de compuestos patrones por Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) (Capítulo 7), además se realizaron ensayos de actividad biológica (Capítulo 6) frente a bacterias de interés clínico y alimentario.

- Purificación de E10

El sub-extracto clorofórmico (E10) (3,2 g) se purificó por CLV en sílica gel de fase normal utilizando como solventes de elución ciclohexano, ciclohexano:AcOEt en diferentes proporciones (4:1 y 1:1) y finalmente acetato de etilo. La fracción ciclohexano:AcOEt 1:1 se purificó por CCF (sílica gel 230-400 Mesh y como eluyente Ciclohexano y Ciclohexano:AcOEt aumentando la polaridad en un 10%). Se reunieron doce fracciones (FF<sub>1</sub>-FF<sub>12</sub>) de acuerdo a su comportamiento en CCD. En la **Tabla 4.1** se detallan las purificaciones que se realizaron de algunas de las fracciones obtenidas para la obtención de los compuestos identificados.

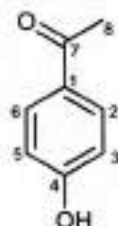
**Tabla 4.1** Compuestos aislados de *F. tortuosa*

Fracciones	Purificaciones posteriores	Productos aislados
FF <sub>6</sub> (Hexano:AcOEt 4:1)	Sph LH-20 CF	2,5-diacetil-benzofurano <b>4.7</b> (3,2 mg) 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona <b>4.10</b> (1,1 mg)
FF <sub>7</sub> (Hexano:AcOEt 4:1)	Sph LH-20 CCF	4-hidroxiacetofenona <b>4.1</b> (2,3 mg)
FF <sub>8</sub> (Hexano:AcOEt 7:3)	CCF	3-metoxi-4-hidroxiacetofenona <b>4.2</b> (2,6 mg) 2-acetil-6-metoxibenzofurano <b>4.8</b> (1,2 mg)
FF <sub>9</sub> (Hexano:AcOEt 7:3)	FRev CCDP	7-O-dimetil-alil-escopoletina <b>4.9</b> (2,1 mg)
FF <sub>10</sub> (Hexano:AcOEt 7:3)	FRev CCF	4-hidroxiacetofenona <b>4.1</b> (1,2 mg) 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona <b>4.2</b> (3,1 mg)
FF <sub>11</sub> (Hexano:AcOEt 3:2)	CCF FRev	Mezcla de Cromenos y dihidrobenzofuranos: <b>4.3, 4.4, 4.5, 4.6</b> (4,1 mg)

### 4.3 Determinación estructural de los compuestos aislados

La determinación estructural de los metabolitos aislados se basó fundamentalmente en la interpretación de los espectros realizados por técnicas espectroscópicas de RMN (mono- y bidimensionales) y de IR.

#### 4-hidroxiacetofenona (4.1)



El compuesto 4-hidroxiacetofenona (4.1) aislado de la fracción **FF<sub>7</sub>** es un precursor en la ruta del acetato para la formación de cromenos y benzofuranos.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 4.3) las señales a δ 7,91 (d, J= 8,4) y δ 6,88 ppm (d, J= 8,4), que integran para 1 H cada una, corresponden a los protones aromáticos H-2,6 y H-3,5. Los singletes a δ 2,55 (3H) y δ 5,53 ppm (1H) se adjudican al grupo metilo del resto acetil y al hidrógeno del grupo hidroxil respectivamente.

Los datos espectroscópicos fueron coincidentes con los informados por bibliografía (Tabla 4.2) (Pouchert & Behnke, 1993).

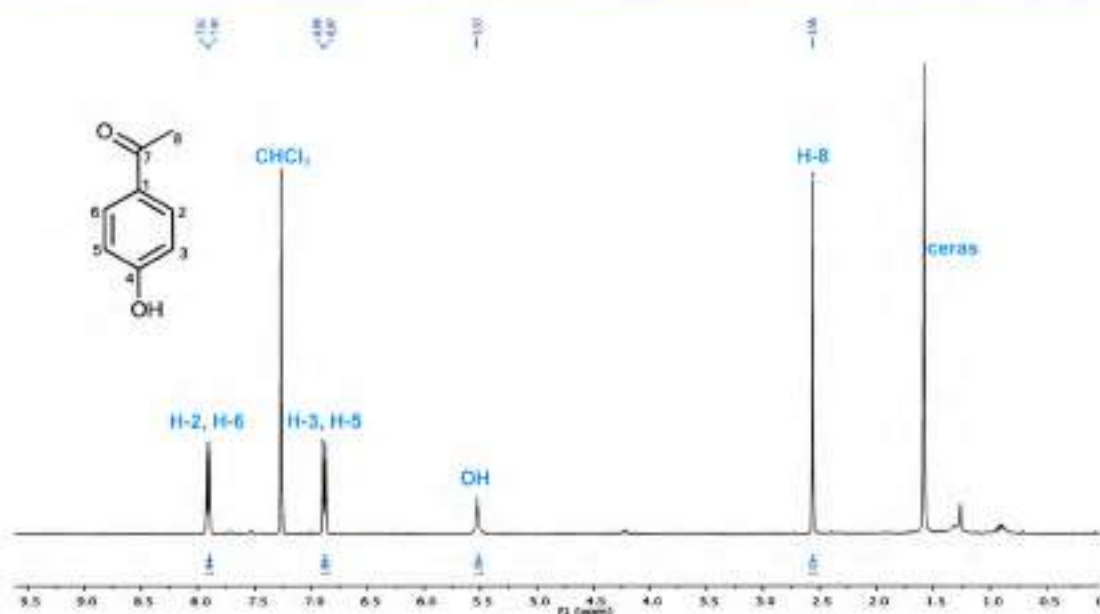
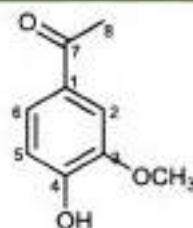


Figura 4.3 Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de 4-hidroxiacetofenona **4.1** (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

### 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (**4.2**)



A partir de la fracción **FF<sub>8</sub>** se aisló el compuesto 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (**4.2**), también conocido como acetovainillona.

Los datos espectroscópicos coinciden con los informados en bibliografía (Pouchet & Behnke, 1993).

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H se muestra en la **Figura 4.4**. Las señales de los protones aromáticos se observan a  $\delta$  7,50 (*d*,  $J=1,9$  Hz),  $\delta$  7,50 ppm (*dd*,  $J=8,8$ ; 1,9 Hz) y 6,91 (*d*,  $J=8,8$ ) correspondientes a los H-2, H-6 y H-5 respectivamente. El anillo aromático está sustituido por un resto acetilo, un grupo metoxilo y un grupo hidroxilo, cuyas señales singletes se encuentran a  $\delta$  2,52 (3H),  $\delta$  3,92 (3H) y  $\delta$  6,00 ppm (1H) (**Tabla 4.2**).



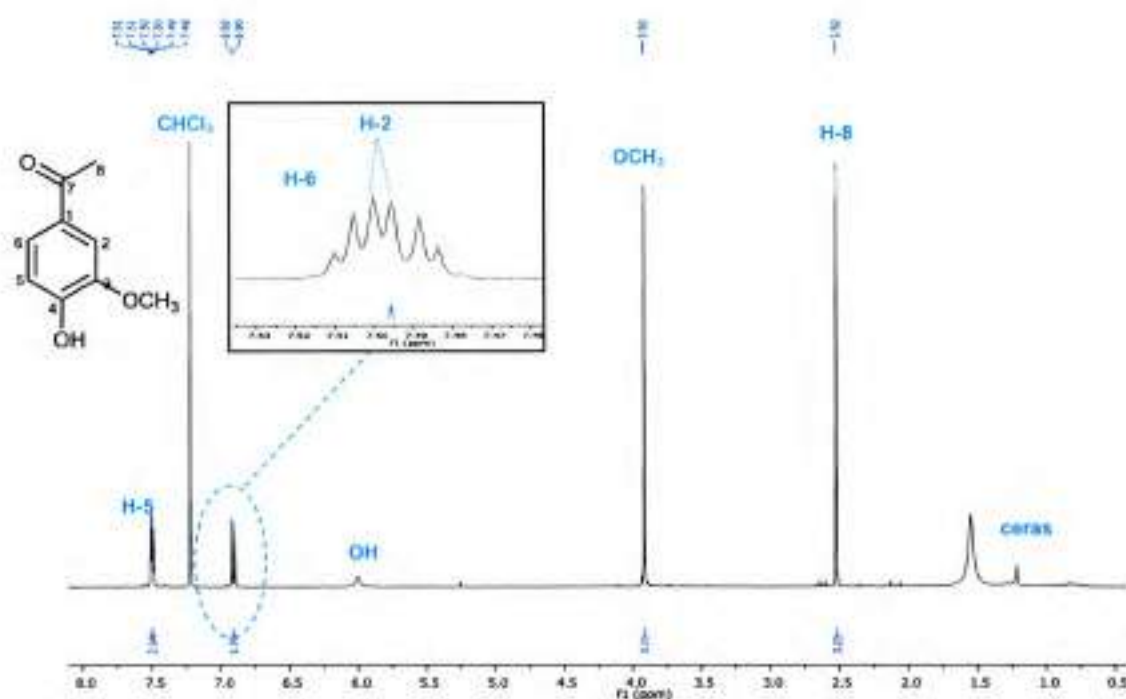
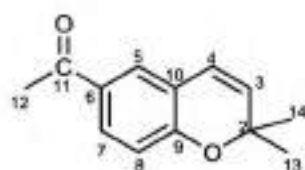


Figura 4.4 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona **4.2** ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

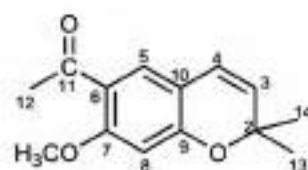
Tabla 4.2 Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de compuestos **4.1** y **4.2** ( $\delta$  en ppm, en  $\text{CDCl}_3$ )

	4.1		4.2	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1	129,20	-	129,92	-
2	131,45	7,91 (1H, <i>da</i> , J= 8,4)	111,11	7,50 (1H, <i>d</i> , J= 1,9)
3	115,77	6,88 (1H, <i>da</i> , J= 8,4)	147,05	-
4	162,10	-	150,84	-
5	115,77	6,88 (1H, <i>da</i> , J= 8,4)	113,83	6,91 (1H, <i>d</i> , J= 8,8)
6	131,45	7,91 (1H, <i>da</i> , J= 8,4)	125,48	7,50 (1H, <i>dd</i> , J= 8,8; 1,9)
7	199,50	-	197,37	-
8	26,24	2,56 (3H, <i>s</i> )	27,79	2,52 (3H, <i>s</i> )
OH	-	5,53 (1H, <i>s</i> )	-	6,00 (1H, <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub>	-	-	56,79	3,92 (3H, <i>s</i> )

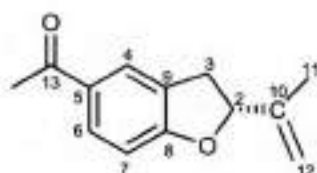
**Encecalina (4.3), 2,2-dimetilcromeno (4.4), tremetona (4.5), 6-metoxitremetona (4.6)**



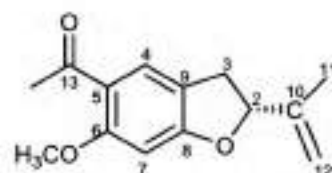
4.3



4.4



4.5

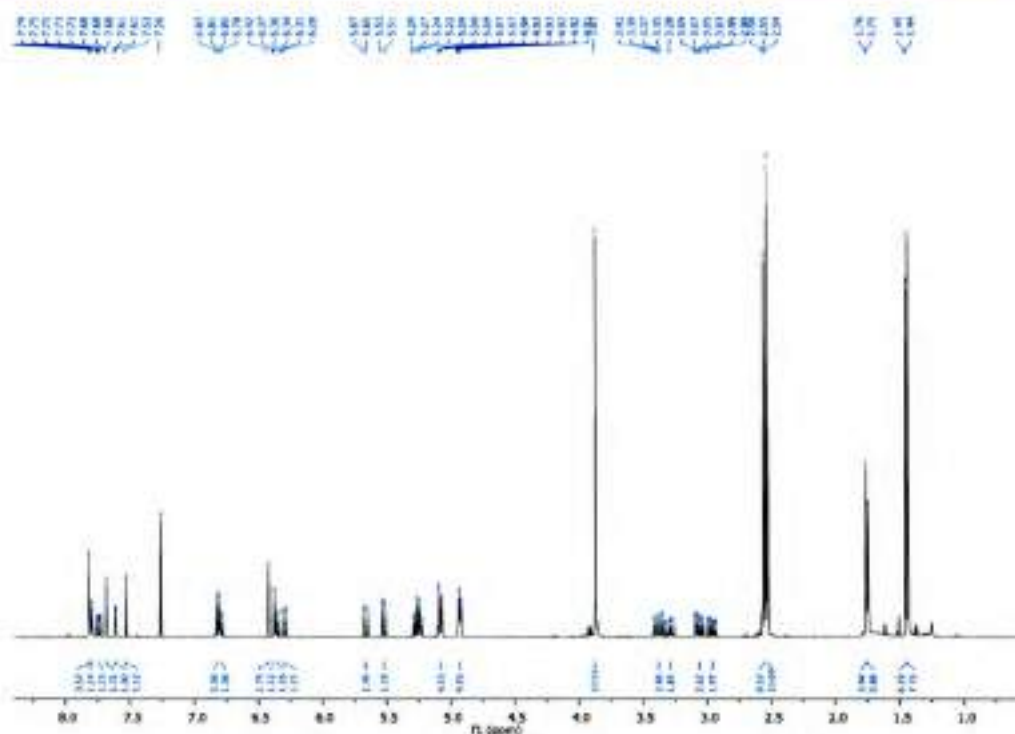


4.6

Los compuestos 4.3 a 4.6 fueron obtenidos en mezcla. El análisis de espectros en una y dos dimensiones permitió la asignación de las señales como se detalla a continuación.

A partir de la  $FF_{11}$  se identificaron en mezcla los cromenos: encecalina (4.3) y 2,2-dimetilcromeno (4.4) y los dihidrobenzofuranos: tremetona (4.5) y 6-metoxitremetona (4.6).

En la **Figura 4.5** se muestra el espectro de RMN  $^1H$  de la mezcla mencionada. El mismo se analizará por partes, asignando las señales por separado, de acuerdo al tipo de estructura, cromenos y dihidrobenzofuranos.



**Figura 4.5** Espectro RMN-<sup>1</sup>H de mezcla de cromenos (4.3, 4.4) y dihidrobenzofuranos (4.5, 4.6) . (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

#### • Cromenos

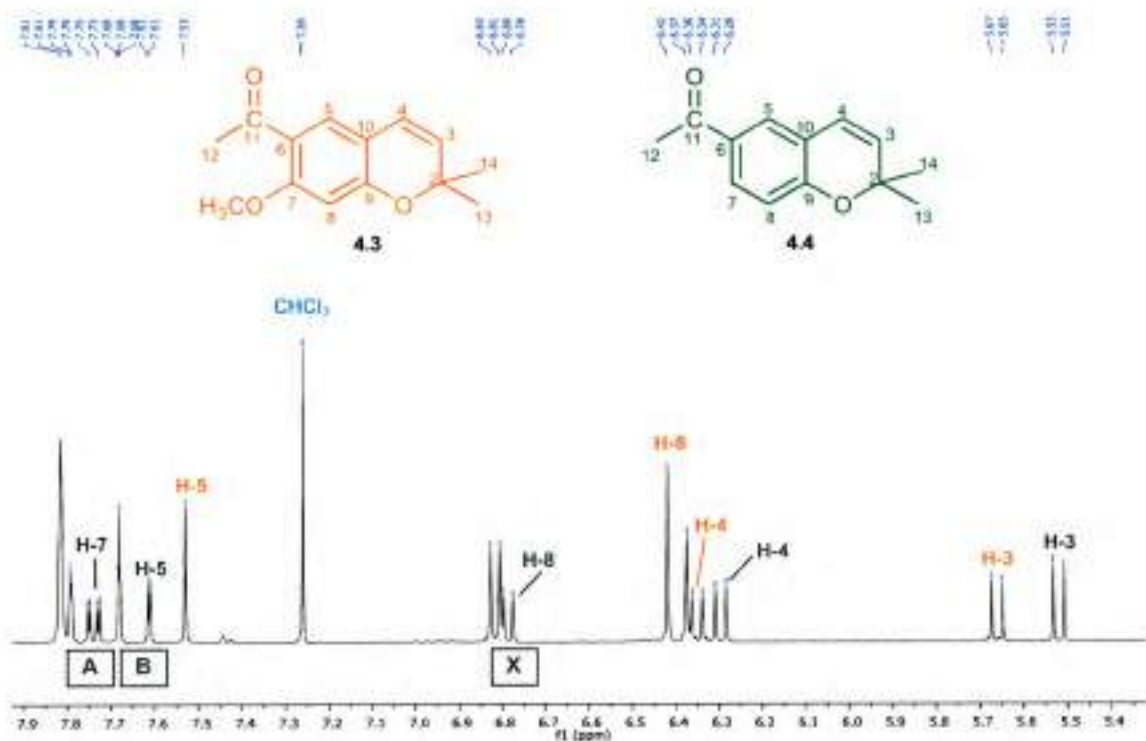
En general, en los espectros de RMN-<sup>1</sup>H de los cromenos se observan señales características: dos dobletes entre  $\delta$  5-7 correspondientes a los protones vinílicos H-3 y H-4 que forman un sistema de acoplamiento AB y una señal singlete de los dos grupos metilo equivalentes Me-13 y Me-14.

En la **Figura 4.6** se grafica el espectro ampliado de RMN-<sup>1</sup>H en el se pueden identificar las señales correspondientes a los cromenos 4.3 y 4.4.

Los singletes a  $\delta$  7,53 (H-5) y 6,42 ppm (H-8) se adjudican a los hidrógenos aromáticos de **encecalina** (4.3). Los H-3 y H-4 producen dos dobletes a  $\delta$  5,66 y  $\delta$  6,35 ppm; mientras que las señales del grupo metoxilo y acetilo aparecen a  $\delta$  3,87 y 2,55 ppm, respectivamente. La señal singlete a  $\delta$  1,45 ppm y que integra para 6H, corresponde a los 2 grupos CH<sub>3</sub> sobre C-2.

Las señales de los protones H-5, H-7 y H-8 del **2,2-dimetilcromeno (4.4)** se adjudican al sistema ABX a  $\delta$  7,61 (da,  $J = 2,2$  Hz),  $\delta$  7,74 (dd,  $J = 8,4; 2,2$  Hz) y  $\delta$  6,79 (d,  $J = 8,4$  Hz) respectivamente. Las señales de H-3 y H-4 se observan a  $\delta$  5,52 y  $\delta$  6,30 ppm y el singlete (6H) a  $\delta$  1,44 ppm se adjudica a los 2 grupos  $\text{CH}_3$  sobre C-2. Los hidrógenos del grupo acetilo aparecen como un singlete a  $\delta$  2,53 ppm (3H).

Los acoplamientos homonucleares entre los hidrógenos de los compuestos presentes en la mezcla se observan en el espectro COSY-45 (H-H) (Figuras 4.7 y 4.8).



**Figura 4.6** Señales de encocalina (4.3) y 2,2-dimetilcromeno (4.4) en espectro ampliado  $\text{RMN-}^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

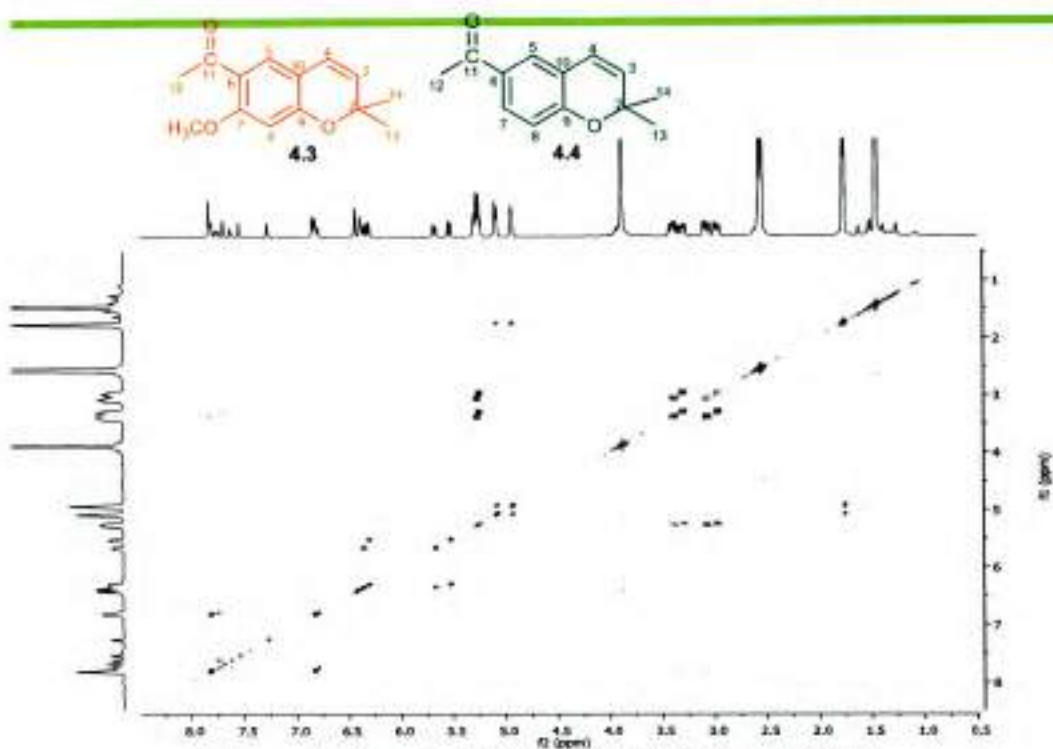


Figura 4.7 Espectro COSY-45 (H-H) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

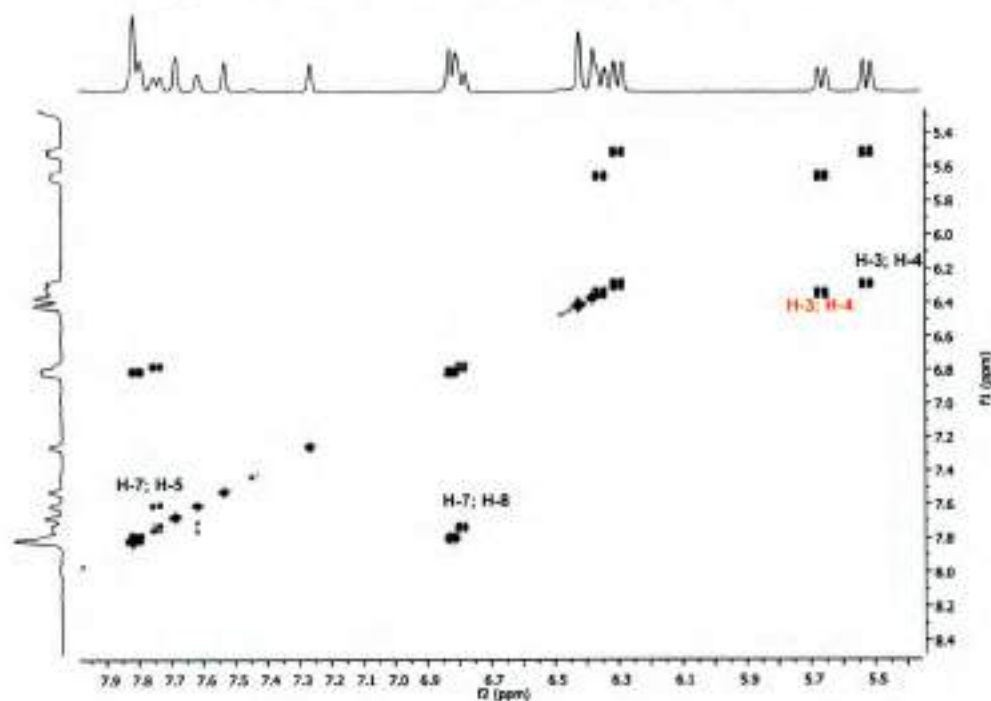


Figura 4.8 Espectro ampliado de COSY-45 (H-H). Señales de **enecalina** (4.3) y 2,2-dimetilcromeno (4.4) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Tabla 4.3 Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de compuestos 4.3 y 4.4 ( $\delta$  en ppm, en  $\text{CDCl}_3$ )

	4.3		4.4	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
2	196,76	-	196,67	-
3	131,21	5,66 (1H, d, J= 9,7)	128,50	5,52 (1H, d, J= 10,3)
4	121,69	6,35 (1H, d, J= 9,7)	121,36	6,30 (1H, d, J= 10,3)
5	129,08	7,53 (1H, s)	126,63	7,61 (1H, d, J= 2,2)
6	121,35	-	120,79	-
7	161,70	-	130,08	7,74 (1H, dd, J= 8,8; 2,2)
8	93,21	6,42 (1H, s)	116,00	6,79 (1H, d, J= 8,8)
9	164,02	-	161,70	-
10	116,14	-	120,64	-
11	197,67	-	197,20	-
12	31,89	2,55 (3H, s)	26,26	2,53 (3H, s)
13	28,43	1,45 (3H, s)	28,43	1,44 (3H, s)
14	28,43	1,45 (3H, s)	28,42	1,44 (3H, s)
OCH <sub>3</sub>	55,78	3,87 (3H, s)	-	-

#### • Dihidrobencofuranos

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los dihidrobencofuranos muestran señales características de los protones aromáticos y del anillo heterocíclico con sistemas de acoplamiento del tipo ABX o AB.

En el espectro ampliado de RMN- $^1\text{H}$ , **Figura 4.9**, se destacan las señales correspondientes a los dihidrobencofuranos integrantes de la mezcla obtenida.

Las señales de los protones aromáticos H-4, H-6 y H-7 de **tremetona (4.5)** se observan a  $\delta$  7,81 (sa),  $\delta$  7,80 (dd, J= 8,8; 2,3 Hz) y  $\delta$  6,82 (d, J= 8,8 Hz) respectivamente. Los protones H-2, H-3a y H-3b conforman un sistema del tipo ABX cuyas señales se observan a  $\delta$  5,26 (dd, J= 8,5; 7,8 Hz),  $\delta$  3,38 (dd, J= 15,7; 9,5 Hz) y  $\delta$  3,06 (dd, J= 15,7; 8,5 Hz). El resto isoprenilo está caracterizado por las

señales del grupo metilo sobre carbono  $sp^2$  a  $\delta$  1,76 y los protones del grupo metileno en C-12 a  $\delta$  5,09 y 4,93 ppm (Tabla 4.4).

Las señales correspondientes a 6-metoxitremetona (4.6) son similares a las del compuesto 4.5 (Tabla 4.4), excepto en la zona correspondiente a los hidrógenos aromáticos en la que se observan singletes a  $\delta$  7,68 (H-4) y 6.37 ppm (H-7) debido a la sustitución del grupo  $OCH_3$  ( $\delta$  3,87 ppm, s) en C-6.

En el espectro COSY 45 (H-H) se observan, para los dos dihidrobenzofuranos, los picos de cruce entre H-2, H-3a y H-3b; H-12a y H-12b; y además el acoplamiento homoalílico entre los protones del doble enlace y los hidrógenos del grupo metilo en C-11 (Figura 4.10).

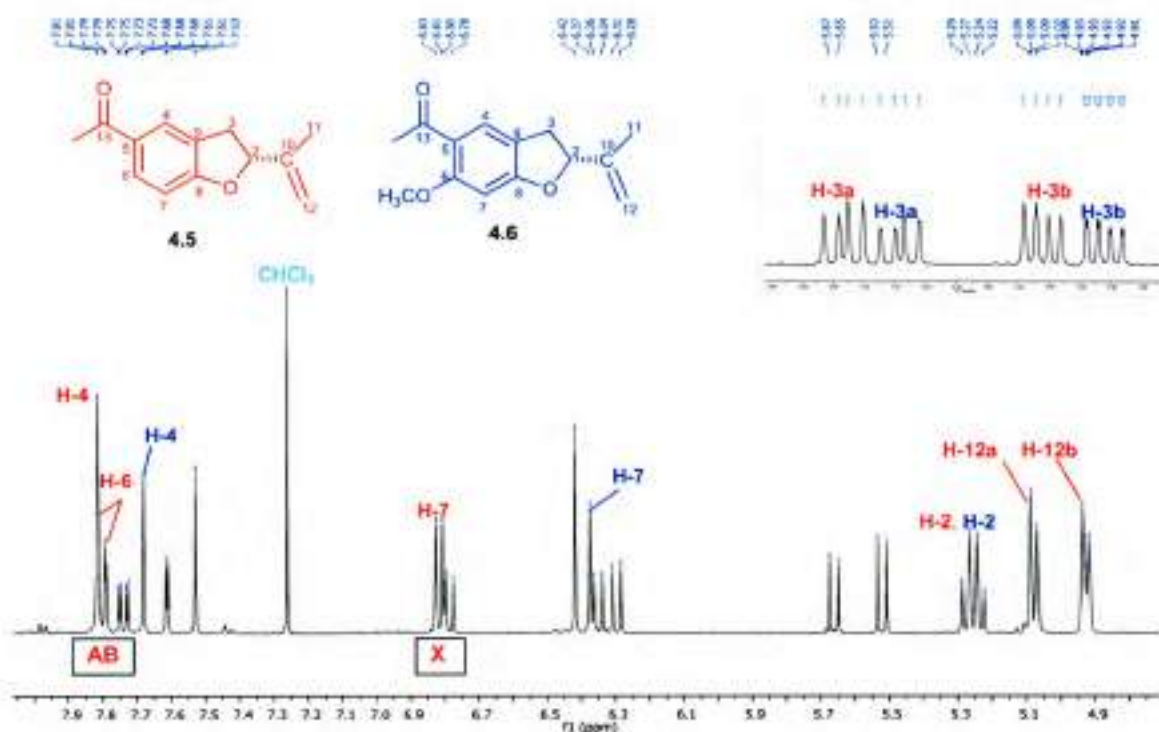


Figura 4.9 Señales de tremetona (4.5) y 6-metoxitremetona (4.6) en espectro ampliado  $RMN\text{-}^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz)

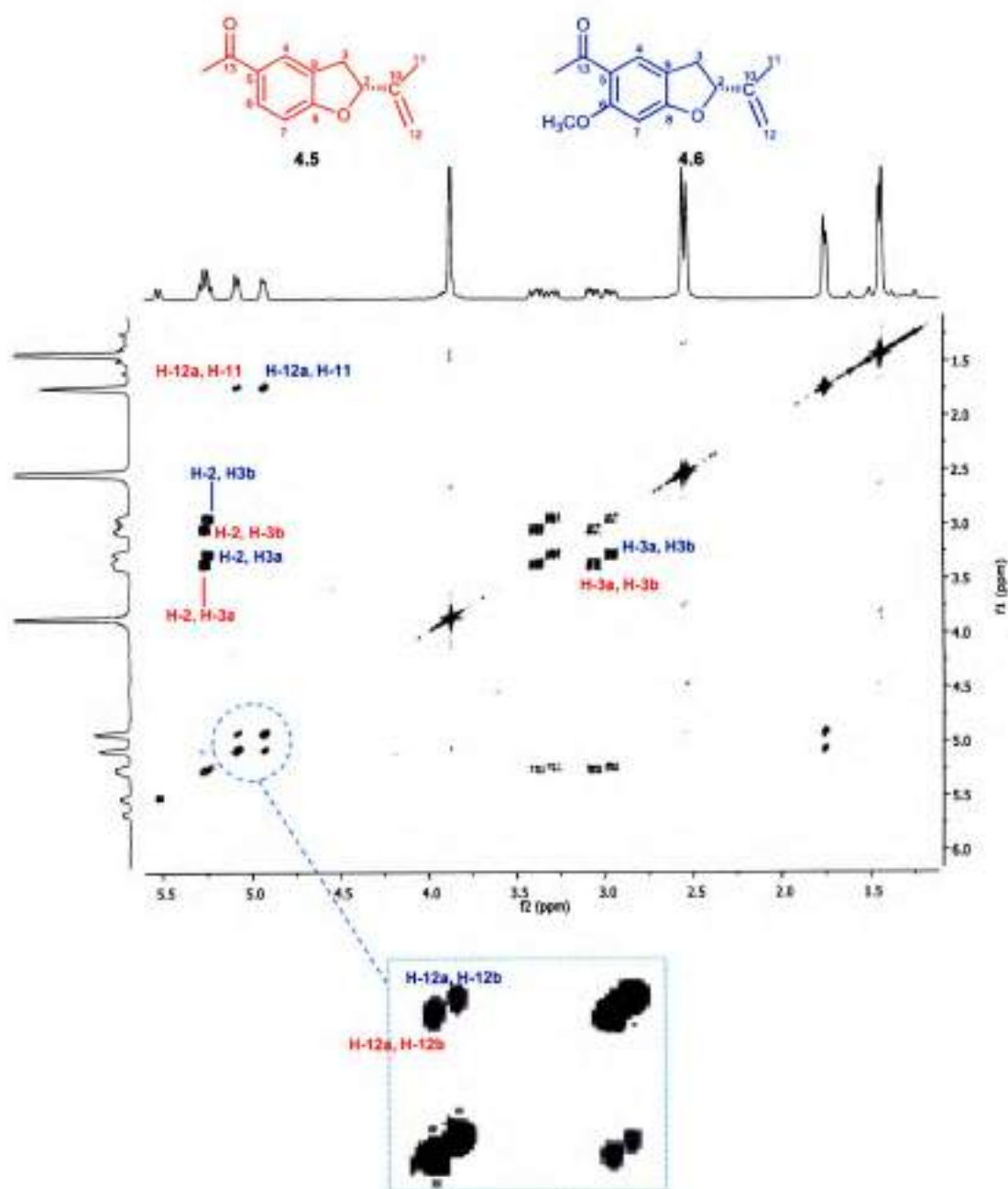


Figura 4.10 Espectro ampliado de COSY-45 (H-H). Señales de tremetona (4.5) y 6-metoxitremetona (4.6) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



Tabla 4.4 Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de compuestos 4.5 y 4.6 (ppm, en  $\text{CDCl}_3$ )

	4.5		4.6	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
2	86,94	5,26 (1H, <i>dd</i> , J= 9,5; 8,5)	86,94	5,26 (1H, <i>dd</i> , J= 9,5; 8,5)
3a	34,00	3,38 (1H, <i>dd</i> , J= 15,7; 9,5)	33,38	3,29 (1H, <i>dd</i> , J= 15,2; 9,5)
3b	34,00	3,06 (1H, <i>dd</i> , J= 15,7; 8,5)	33,38	2,96 (1H, <i>dd</i> , J= 15,2; 8,5)
4	125,48	7,81 (1H, <i>sa</i> )	126,91	7,68 (1H, <i>s</i> )
5	130,53	-	128,41	-
6	130,74	7,80 (1H, <i>dd</i> , J= 8,5; 2,5)	161,69	-
7	108,80	6,82 (1H, <i>d</i> , J= 8,5)	99,66	6,37 (1H, <i>s</i> )
8	164,32	-	165,10	-
9	126,09	-	118,92	-
10	143,31	-	143,46	-
11	17,10	1,76 (3H, <i>sa</i> )	17,10	1,74 (3H, <i>s</i> )
12a	112,60	5,09 (1H, <i>sa</i> )	112,45	5,07 (1H, <i>sa</i> )
12b	112,60	4,93 (1H, <i>sa</i> )	112,45	4,92 (1H, <i>sa</i> )
13	196,67	-	196,76	-
14	31,93	2,56 (3H, <i>s</i> )	26,46	2,54 (3H, <i>s</i> )
OCH <sub>3</sub>	-	-	55,78	3,87 (3H, <i>s</i> )

Las asignaciones para la mezcla de cromenos e hidrobenzofuranos fueron confirmadas por los espectros RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 4.11) y los experimentos bidimensionales COSY-45 (Figuras 4.7; 4.8 y 4.10) y HSQC (Figura 4.12), y por correlación con datos de bibliografía (Bjeldanes & Geissman, 1969; Bohlmann, et al., 1977b; Zalkow, et al., 1979 y Castañeda, et al., 1996).

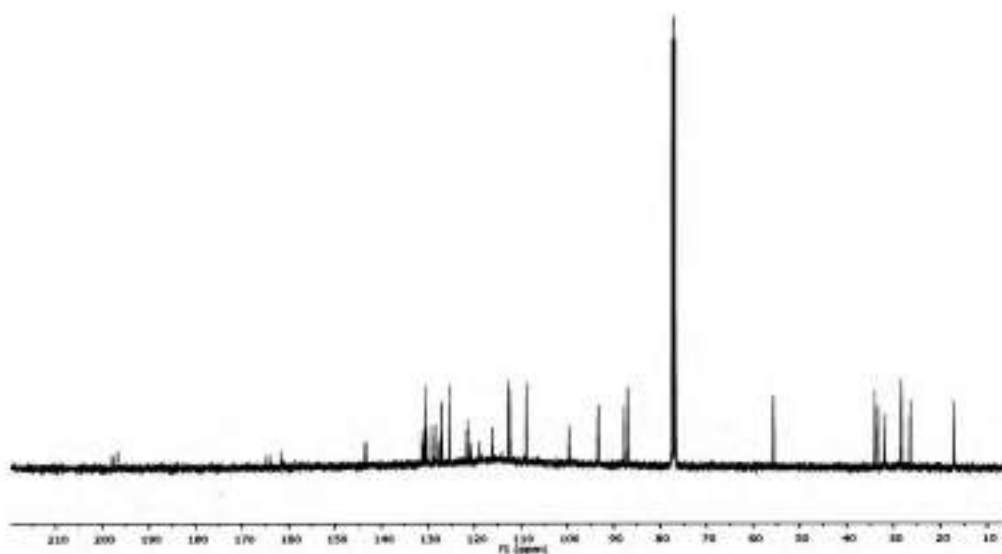


Figura 4.11 Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

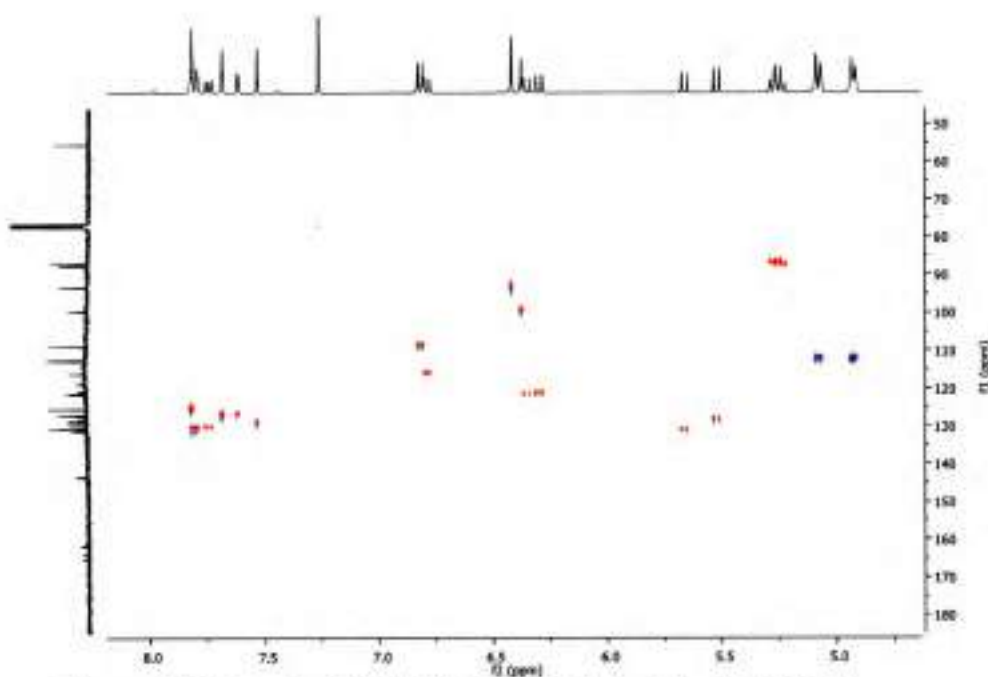
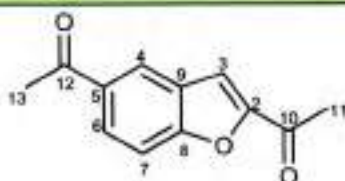


Figura 4.12 Espectro HSQC-DEPT de 4.3, 4.4, 4.5 y 4.6 ( $\text{CDCl}_3$ )

## 2,5-diacetilbenzofurano (4.7)



A partir de la fracción FF<sub>6</sub> se aislaron 3.2 mg del compuesto 2,5-diacetilbenzofurano (4.7).

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 4.13), se observan señales a δ 8,36 (*d*, *J*= 1,4 Hz), 8,14 (*dd*, *J*= 8,8; 1,4 Hz) y 7,64 ppm (*d*, *J*= 8,8 Hz) que corresponden a los protones aromáticos H-4 H-6 y H-7, respectivamente. El H-3 (δ 7,52) está desprotegido por la presencia de un grupo acetilo en C-2, al igual que el H-4 y H-6 por el grupo acetilo en C-5, señales características de los benzofuranos.

En el espectro COSY-45 (H-H) se observan los picos de cruce entre los protones aromáticos y además un acoplamiento homoalílico entre H-7 y H-3 (Figura 4.14 y 4.15)

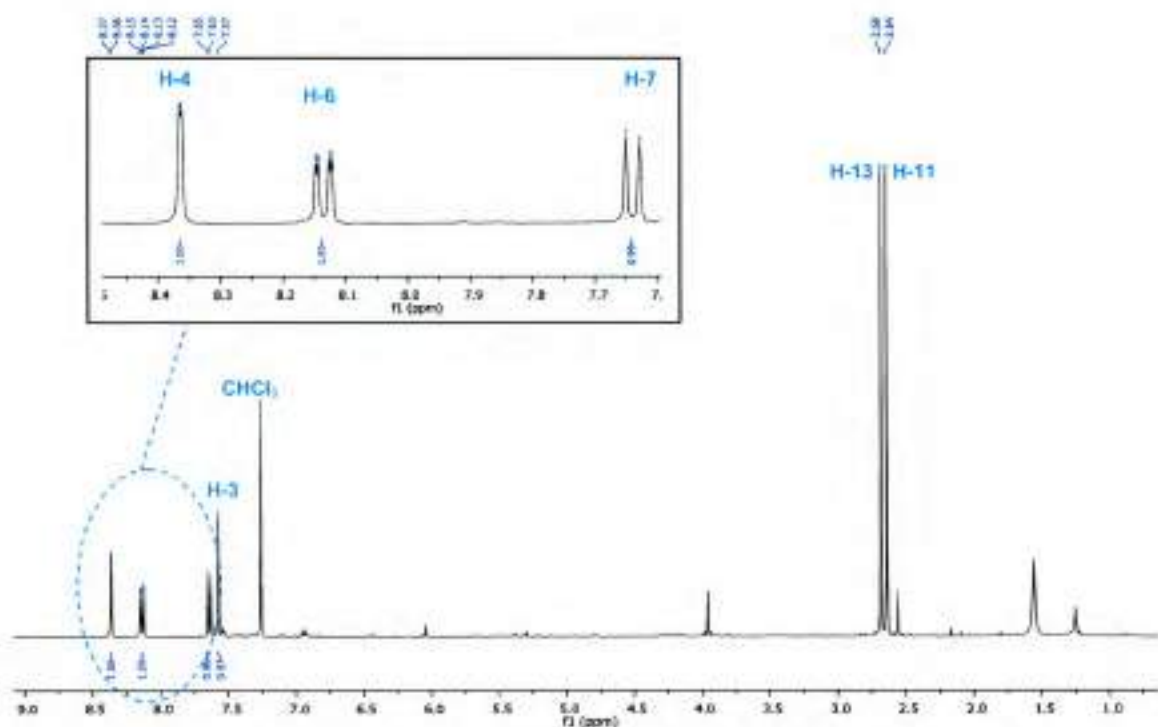


Figura 4.13 Espectro RMN-<sup>1</sup>H del compuesto 4.7 (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz)

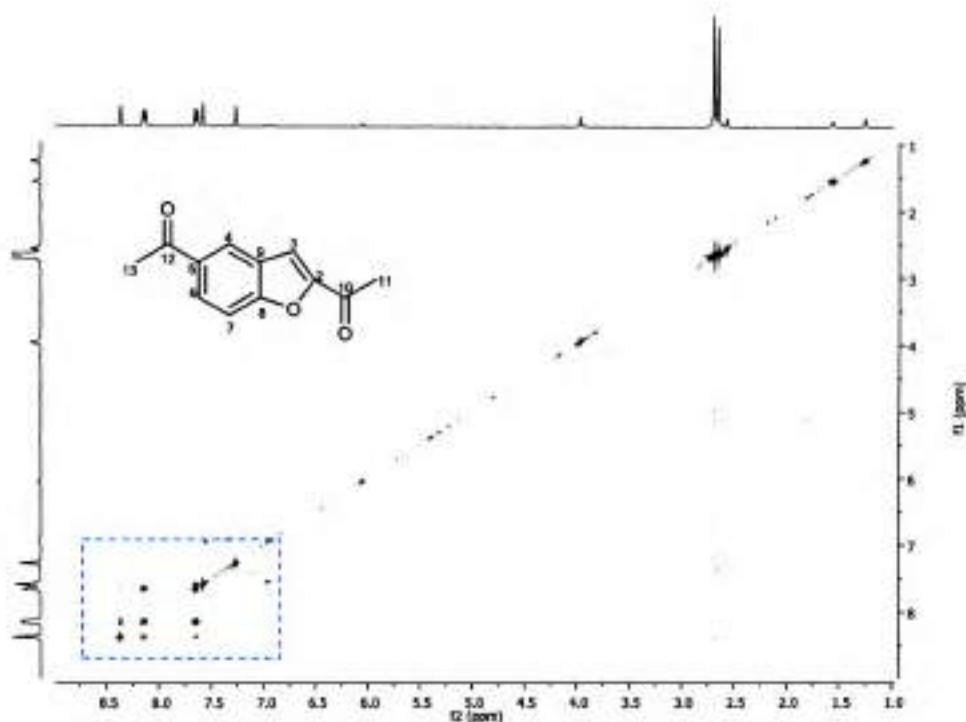


Figura 4.14 Espectro COSY-45 (H-H) de 4.7 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

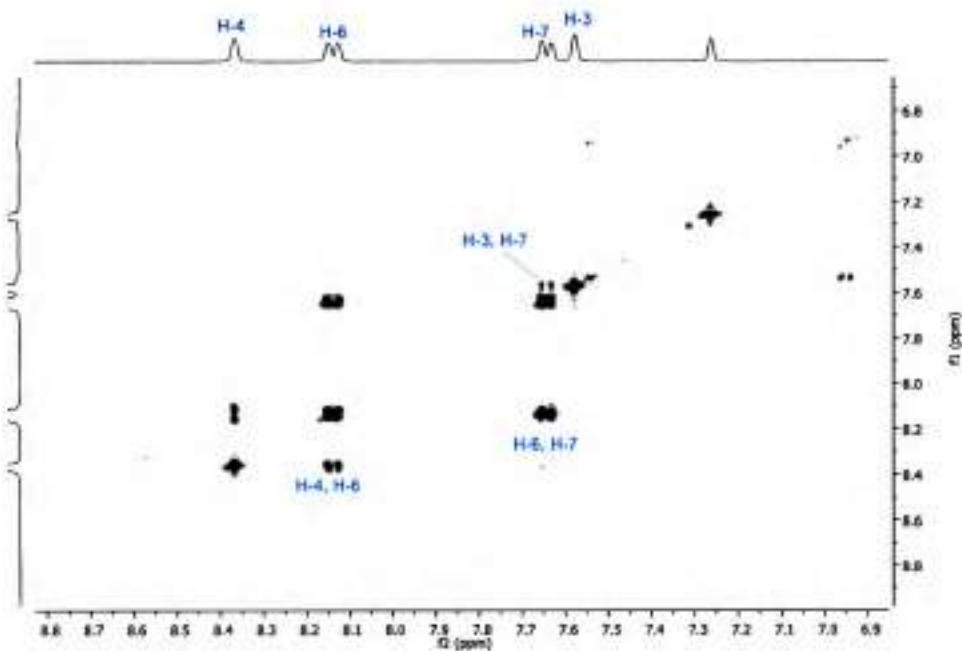


Figura 4.15 Espectro ampliado COSY-45 (H-H) de 4.7 (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 4.16, Tabla 4.3) muestra doce señales correspondientes a átomos de carbono. La señal a  $\delta$  188,42 ppm corresponde a C-10, confirmando la presencia de un sustituyente acetilo en C-2 ( $\delta$  153,96). El resto de las asignaciones se realizó teniendo en cuenta los espectros de HSQC (Figura 4.17) y HMBC (Figura 4.18)

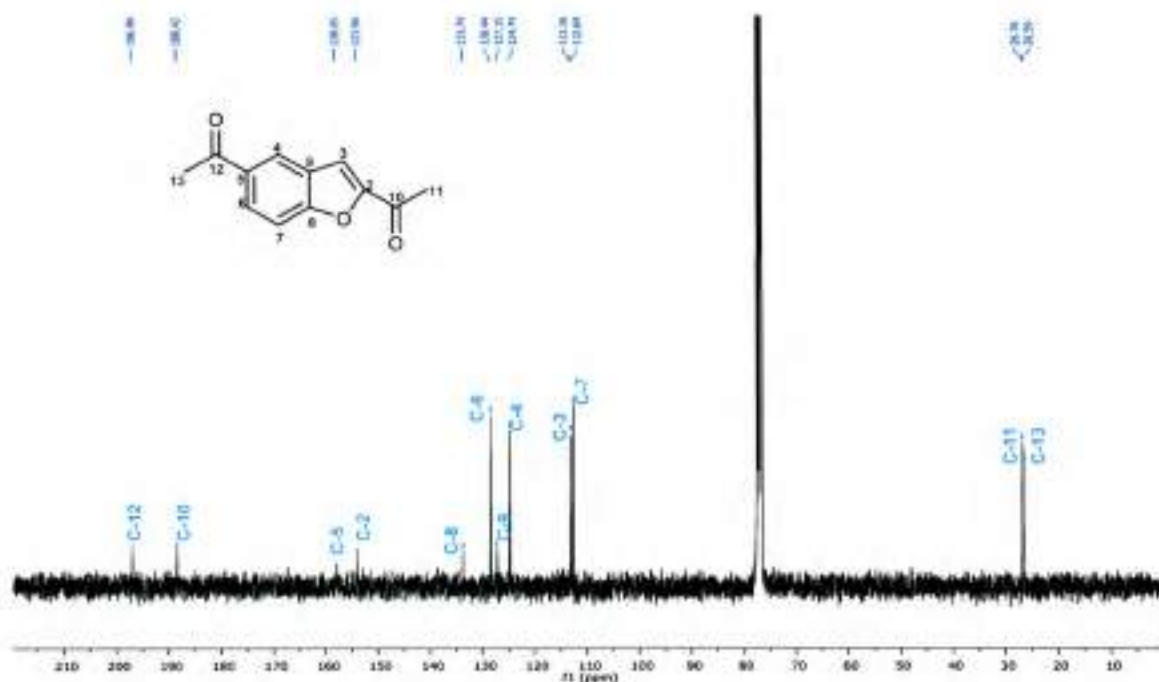


Figura 4.16 Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de 4.7 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)

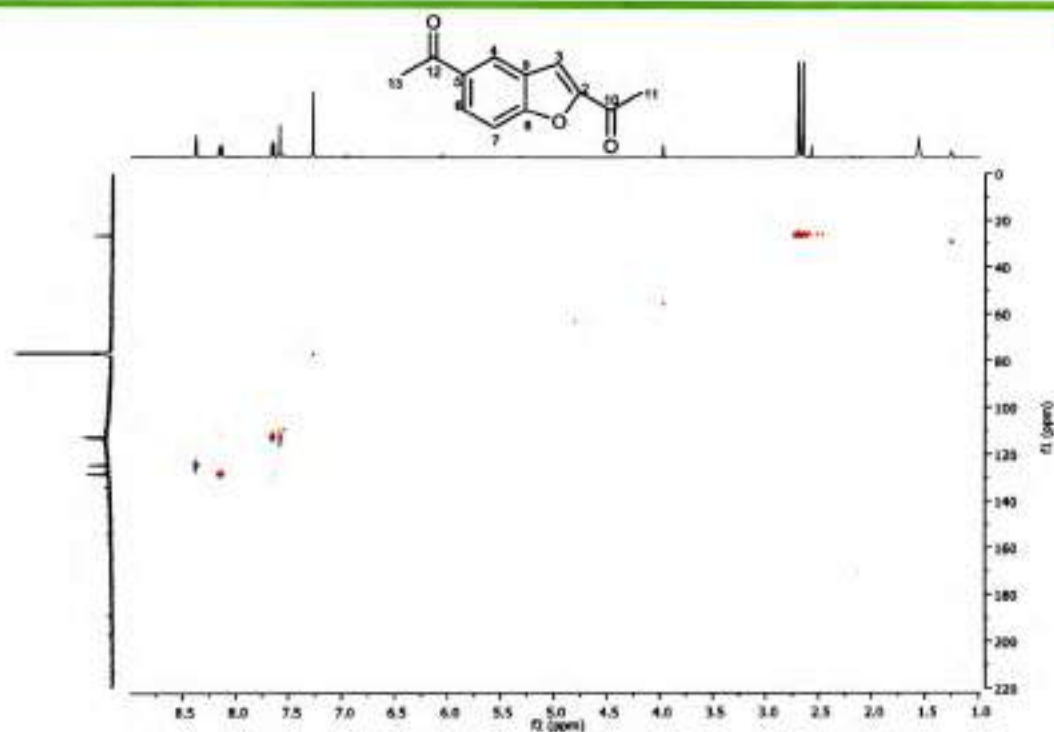


Figura 4.17 Espectro HSQC-DEPT de 4.7 ( $\text{CDCl}_3$ )

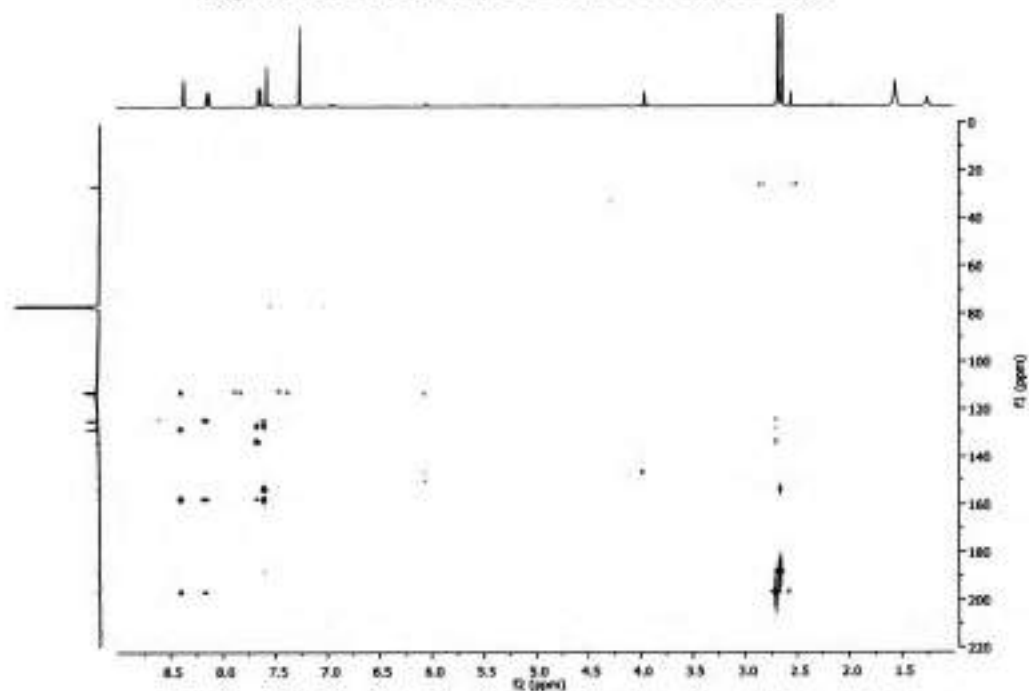


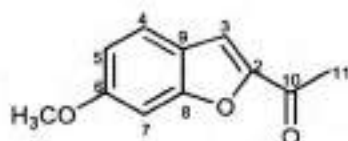
Figura 4.18 Espectro HMBC de 4.7 ( $\text{CDCl}_3$ )

**Tabla 4.3** Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **4.7** ( $\delta$  en ppm, en  $\text{CDCl}_3$ )

	$\delta_c$	$\delta_H$ (J en Hz)
<b>2</b>	153,96	-
<b>3</b>	113,16	7.57 (1H, <i>sa</i> )
<b>4</b>	124,74	8,36 (1H, <i>d</i> , $J= 1,4$ )
<b>5</b>	158,05	-
<b>6</b>	128,44	8.14 (1H, <i>dd</i> , $J= 8,7; 1,4$ )
<b>7</b>	112,64	7.60 (1H, <i>da</i> , $J= 8,7$ )
<b>8</b>	133,74	-
<b>9</b>	127,15	-
<b>10</b>	188,42	-
<b>11</b>	26.59	2.64 (3H, <i>s</i> )
<b>12</b>	196,99	-
<b>13</b>	26.76	2,69 (3H, <i>s</i> )

La comparación de estos datos con los informados en bibliografía permitió identificar a este compuesto como 2,5-diacetilbenzofurano (**4.7**) (Zalkow y col., 1979).

**2-acetil-6-metoxibenzofurano (4.8)**



El compuesto **4.8** fue aislado a partir de la fracción  $\text{FF}_8$  (Tabla 4.1). A partir de la correlación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de **4.8** (Figura 4.19) con el del diacetilbenzofurano **4.7** (Figura 4.13), se determina la ausencia de un grupo acetilo en C-5, el cual es característico en este tipo de compuestos derivados de *p*-hidroxiacetofenona de la ruta biosintética del acetato. De la búsqueda

bibliográfica realizada en Chemical Abstract no se encontraron registros de haber sido aislado como producto natural.

Para la determinación estructural se analizaron los espectros de RMN mono y bidimensionales. El espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.19) presenta señales características del anillo de benzofurano y un solo grupo acetilo unido al núcleo. Las señales a  $\delta$  6,91 (d,  $J=8,4$  Hz),  $\delta$  7,54 (d,  $J=2,0$  Hz) y  $\delta$  7,57 ppm (dd,  $J=8,4$ ; 2,0) corresponden a protones aromáticos con un sistema de acoplamiento ABX. Se observa un singlete a  $\delta$  8,43 ppm que integra para un hidrógeno típico del protón del anillo benzofurano, H-3.

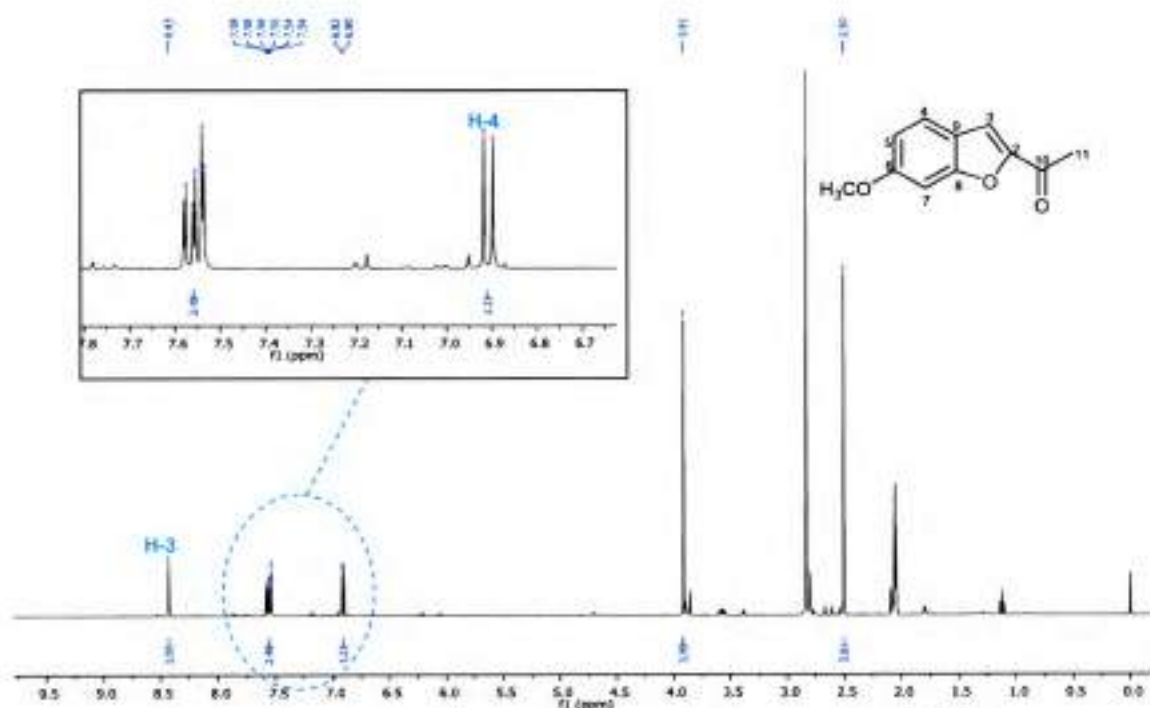


Figura 4.19 Espectro RMN- $^1\text{H}$  del compuesto 4.8 (Acetona- $d_6$ , 400MHz)

De acuerdo al análisis del espectro de RMN- $^1\text{H}$  existe la posibilidad de que el compuesto 4.8 sea 2-acetil-5-metoxibenzofurano (I) o 2-acetil-6-metoxibenzofurano (II) (Figura 4.20). Si se tratase del compuesto (I), la señal de H-4 se debería observar como un doblete con  $J_{meta}$  que corresponde a la señal  $\delta$



7,54, en cambio en el compuesto (II) la señal de H-4 se observaría como un doblete con  $J_{orto}$  ( $\delta$  6,91 ppm).

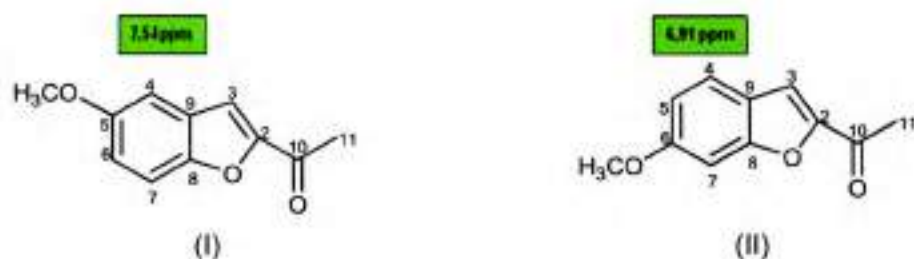
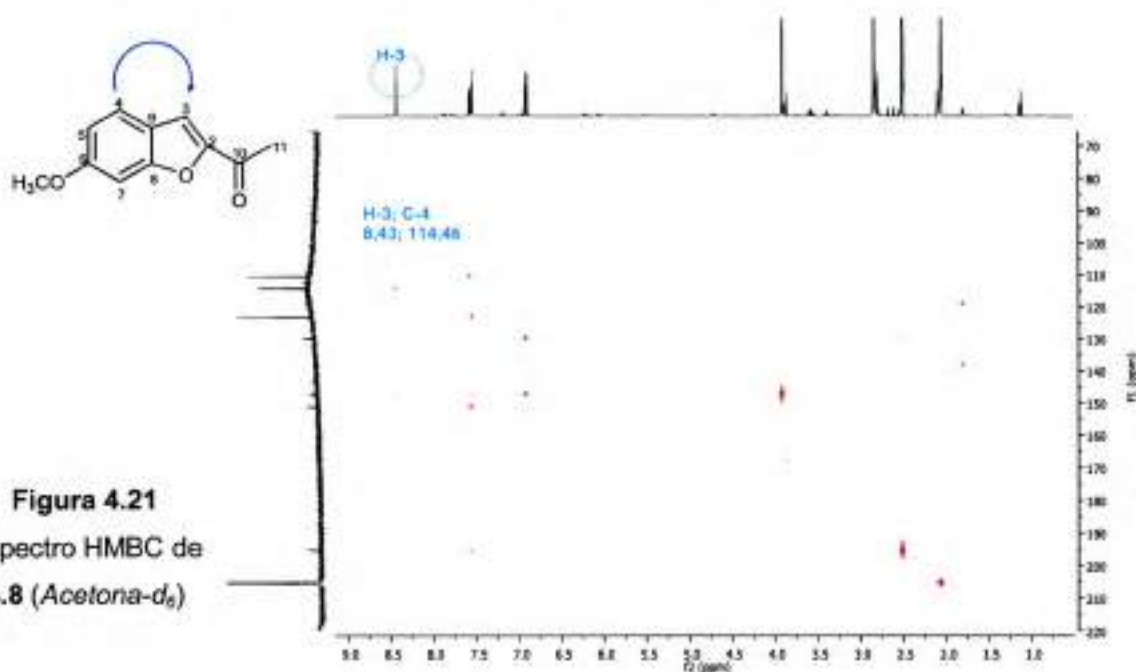


Figura 4.20

En el espectro de HMBC (Figura 4.21) se observa correlación a  $J^3$  entre H-3 y un átomo de carbono con corrimiento a  $\delta$  114,46 ppm que, de acuerdo al análisis de los espectros RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 4.22) y HSCQ (Figura 4.23) corresponde a C-4 del compuesto (II). Por lo tanto, por el análisis de los datos espectroscópicos la estructura de **4.8** es 2-acetil-6-metoxibenzofurano.



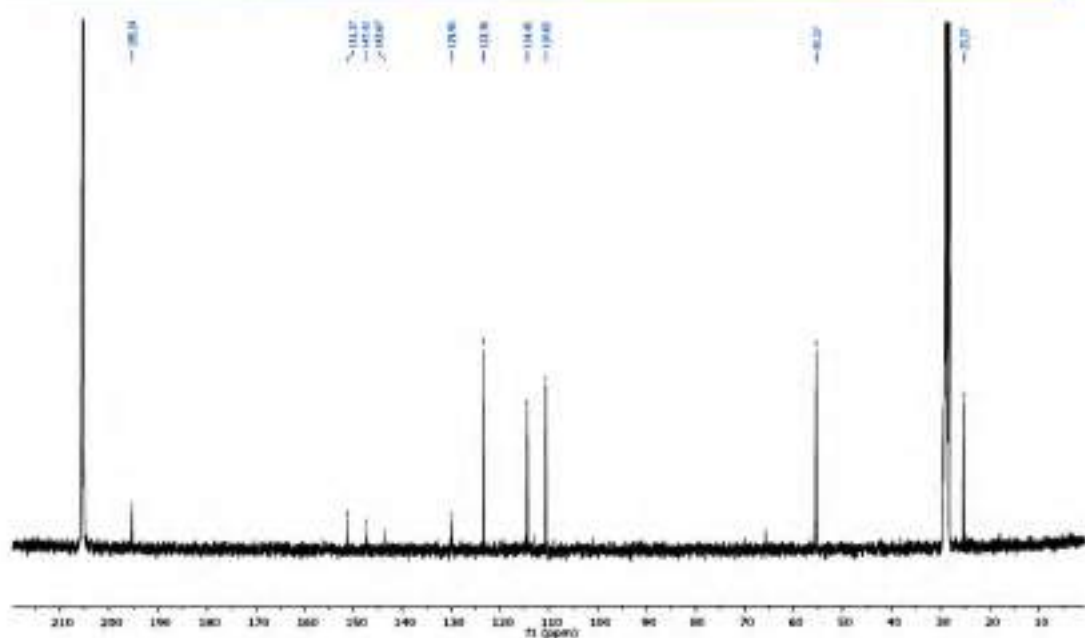


Figura 4.22 Espectro RMN- $^{13}\text{C}$  de 4.8 (*Acetona-d\_6*, 100 MHz)

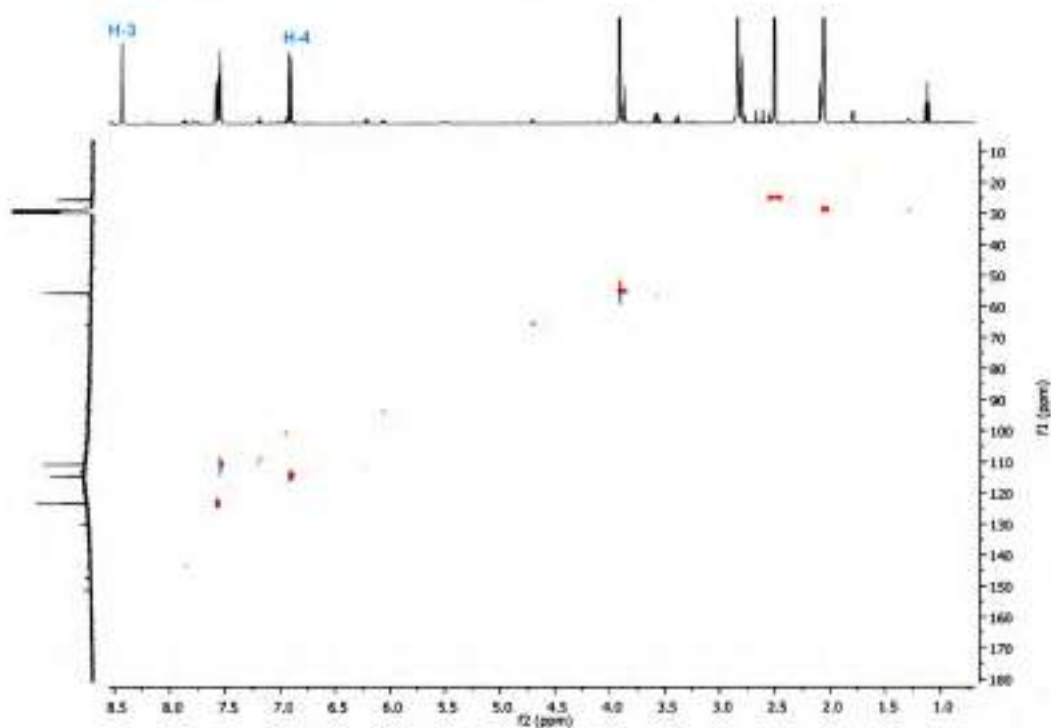
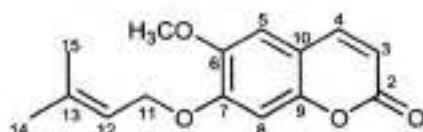


Figura 4.23 Espectro HSQC-DEPT de 4.8 (*Acetona-d\_6*)

## 7-O-dimetil-alil-escopoletina (4.9)



El compuesto **4.9**, aislado a partir de **FF<sub>9</sub>** (Tabla 4.1), es un derivado de la vía del ácido shikímico.

En el espectro RMN-<sup>1</sup>H (Figura 4.24, Tabla 4.4) se observan señales a  $\delta$  7,62 (d, J= 8,9 Hz) y  $\delta$  6,29 (d, J= 8,9 Hz) correspondientes a H-3 y H-4. Las señales singletes a  $\delta$  6,83 y  $\delta$  6,84 ppm se adjudican a H-5 y H-8. El protón vinílico de la cadena lateral presenta un desplazamiento a  $\delta$  5,47 (dd, J=6,5 Hz, H-12) acoplado a los protones del grupo metileno cuyas señales aparecen a  $\delta$  4,65 ppm (d, J=6,5 Hz, H-11). Los grupos metilo unidos al doble enlace se observan a  $\delta$  1,80 y 1,78 ppm como singletes debido al acoplamiento con el H-12.

Los acoplamientos fueron confirmados por la presencia de los picos de cruce correspondientes observados en el espectro COSY 45 (H-H) (Figura 4.25). Las asignaciones de todas las señales de los átomos de carbono se realizaron mediante el análisis de los espectros HSQC (Figura 4.26) y HMBC (Figura 4.27).

Los datos obtenidos del análisis de los espectros mono y bidimensionales de RMN coinciden con lo informado por Herz et al. (1970).

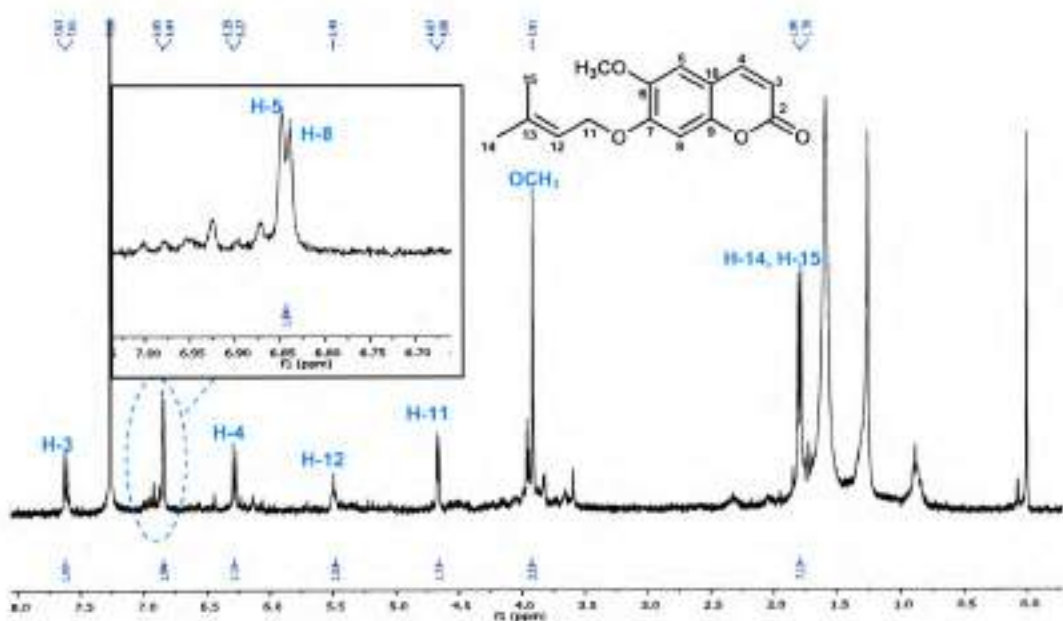


Figura 4.24 Espectro RMN- $^1\text{H}$  de 4.9 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

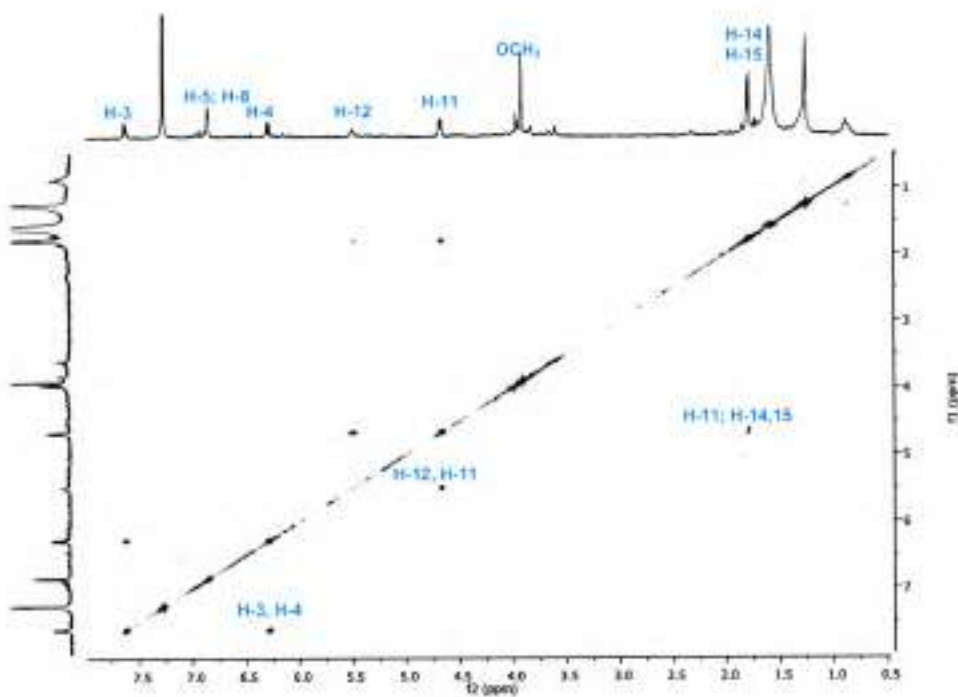
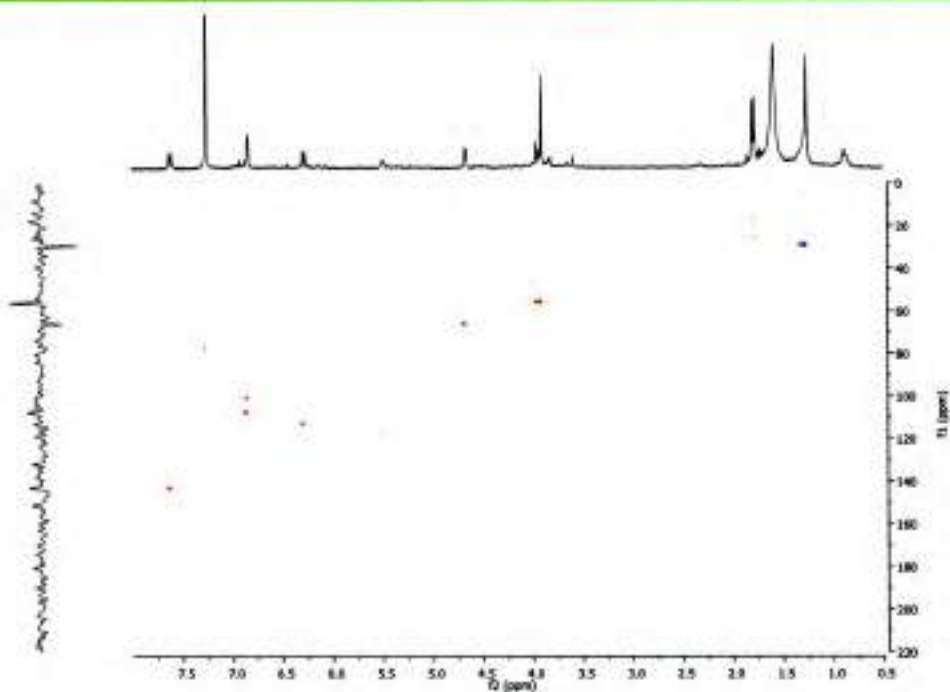
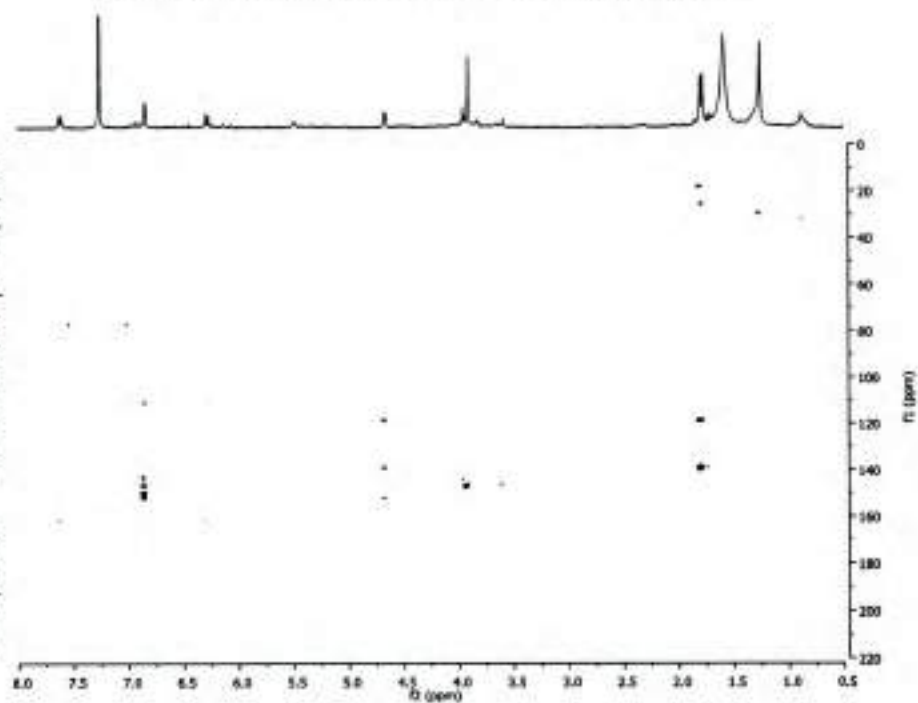


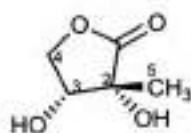
Figura 4.25 Espectro COSY-45 (H-H) de 4.9 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Figura 4.26 Espectro HSQC-DEPT de 4.9 ( $\text{CDCl}_3$ )Figura 4.27 Espectro HMBC de 4.9 ( $\text{CDCl}_3$ )

**Tabla 4.3** Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de compuestos **4.9** ( $\delta$  en ppm, en  $\text{CDCl}_3$ )

	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
<b>2</b>	161,73	-
<b>3</b>	142,90	7,62 (1H, d, J= 8,9)
<b>4</b>	113,90	6,28 (1H, d, J= 8,9)
<b>5</b>	107,83	6,84 (1H, sa)
<b>6</b>	146,65	-
<b>7</b>	152,17	-
<b>8</b>	100,99	6,83 (1H, sa)
<b>9</b>	150,14	-
<b>10</b>	111,09	-
<b>11</b>	65,92	4,65 (2H, d, J= 6,5)
<b>12</b>	118,51	5,47 (1H, dd, J= 6,5)
<b>13</b>	139,10	-
<b>14</b>	17,91	1,79 (3H, d, J= 7,2)
<b>15</b>	17,91	1,79 (3H, d, J= 7,2)
<b>OCH<sub>3</sub></b>	56,19	3,91 (3H, s)

**2-C-metil-D-treono-1,4-lactona (4.10)**



El compuesto 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona (**4.10**) se aisló de la fracción **FF<sub>6</sub>** (Tabla 4.1).

El espectro IR (Figura 4.28) muestra una banda característica de grupo OH a  $3452,10\text{ cm}^{-1}$  y una intensa a  $1773,49\text{ cm}^{-1}$  típica de un C=O de un éster.

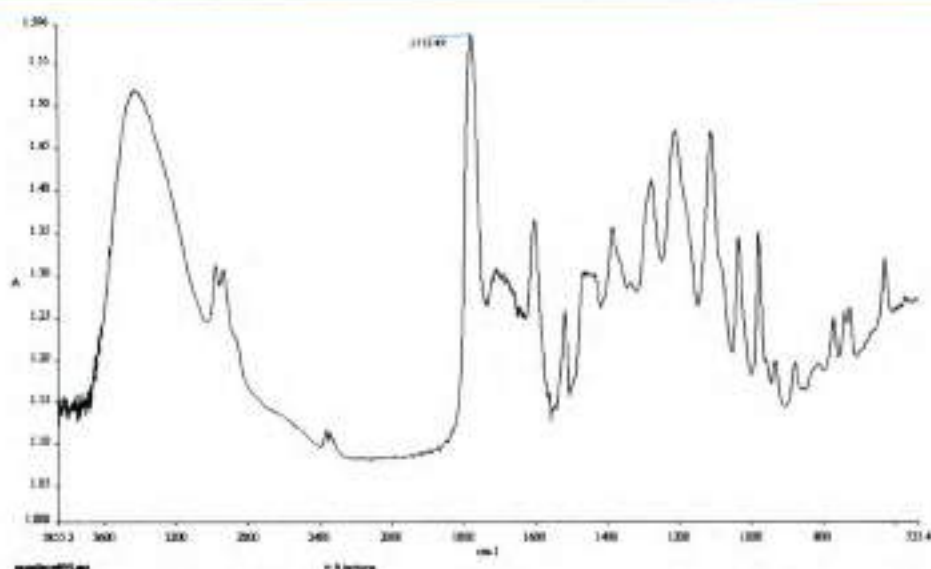


Figura 4.28 Espectro de IR de 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona 4.10 en pastilla de KBr

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.29) se observa un doblete de doblete a  $\delta$  4,43 ppm (1H) que corresponde a H-3, acoplado con el multiplete a  $\delta$  4,11 ppm (2H) de H-4. Un singlete a campos altos que integra para 3H se adjudica a los hidrógenos del grupo metilo (C-5).

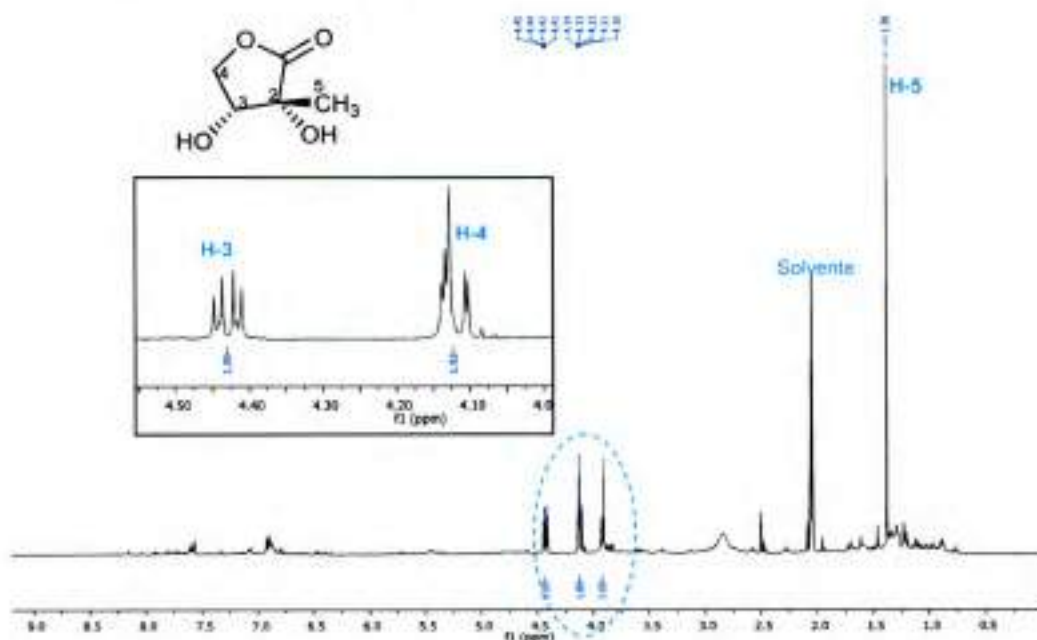
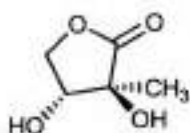
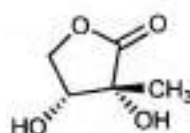


Figura 4.29 Espectro RMN- $^1\text{H}$  de 4.10 (*Acetona-d<sub>6</sub>*, 400 MHz)

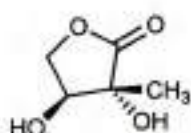
De acuerdo a la configuración de C-2 y C-3, existen cuatro posibles diastereómeros (Figura 4.30):



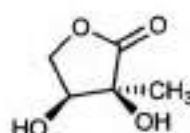
2-C-metil-D-treono-1,4-



2-C-metil-D-eritrano-1,4-



2-C-metil-L-treono-1,4-



2-C-metil-L-eritrano-1,4-

Figura 4.30 Diastereómeros de 2-C-metil-1,4-lactona

Según Hotchkiss et al. (2007) los diastereómeros son fáciles de diferenciar por sus espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ , ya que el corrimiento químico del grupo metilo unido a C-2 de los isómeros eritrano *cis*-diol ( $\delta_{\text{C}}$  19,9) originan señales a campos significativamente más bajos que los isómeros treono *trans*-diol ( $\delta_{\text{C}}$  16,6).

De acuerdo al espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del compuesto 4.10, la señal de los de grupo metilo se encuentra a  $\delta$  20.8, por lo que el compuesto es uno de los isómeros *cis* diol. Los datos espectroscópicos fueron coincidentes con los publicados por Ford (1981) para 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona.



## **Capítulo 5**

### **Estudio fitoquímico de *Wedelia aurantiaca***

El estudio de *Wedelia aurantiaca* se lleva a cabo con el propósito de aislar metabolitos del tipo eudesmano que podrían utilizarse como marcadores quimiotaxonómicos para relacionar a este género con *Flourensia*. Según la propuesta de Bohlmann (1990), en algunos géneros de la subtribu Ecliptinae, a la que pertenecía *Flourensia*, se determinó la presencia de eudesmanólidos y elemanólidos con un grupo metilo en posición poco usual 10- $\alpha$ . Este tipo de compuestos fueron encontrados en géneros como *Aspilia*, *Steiractinia*, *Wedelia*, *Zexmenia* y *Zinnia*.

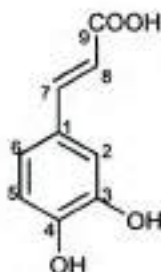
El estudio fitoquímico de *W. aurantiaca* consistió en la obtención del material vegetal, el aislamiento, purificación e identificación estructural de los metabolitos secundarios obtenidos.

### 5.1 Metabolitos aislados

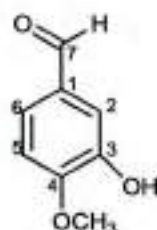
A partir del estudio fitoquímico de *W. aurantiaca* se aislaron e identificaron:

-dos derivados de la ruta biosintética del shikimato: ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico) (5.1) y 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (5.2)

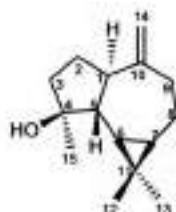
-un derivado de la ruta biosintética del mevalonato: 11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano ((+)-espatulenol) (5.3).



5.1 3,4-dihidroxicinámico



5.2 3-hidroxi-4-metoxi benzaldehído



5.3 11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano

Figura 5.1 Compuestos aislados de *W. aurantiaca*

## 5.2 Material vegetal número de herbario MCNS 12975

### 5.2.1 Extracción

El material vegetal seco y molido (561,32 g) se extrajo por maceración exhaustiva con etanol a temperatura ambiente, se evaporó el solvente a presión reducida a una temperatura de 45°C. El extracto etanólico fue disuelto en 500 mL de etanol caliente (40°C), precipitando un sólido blanco, separado e identificado como ácido cafeico (**5.1**). Se agregó 500 mL de una solución de acetato de plomo al 4% p/v y 14 mL de ácido acético para precipitar sustancias apolares, según se describe en el ítem 3.4.1. (**Figura 5.1**)

Luego de este procedimiento se obtuvieron el sub-extracto clorofórmico (**E11**) y el sub-extracto de acetato de etilo (**E12**).

### 5.2.2 Purificación de E11

El sub-extracto clorofórmico **E11** (3,4 g) se purificó por CCF utilizando sílica gel 230-400 Mesh y como solventes de elución Ciclohexano y Ciclohexano:AcOEt aumentando la polaridad en un 10%. Las fracciones se reunieron en **FW<sub>1</sub>** a **FW<sub>11</sub>** por su comportamiento en CCD. A partir de **FW<sub>1</sub>** (eluida con ciclohexano) se identificó (+)-espatulenol (**5.3**). En la fracción **FW<sub>4</sub>** (ciclohexano:AcOEt 1:1) se obtuvo 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (**5.2**). En la **Tabla 5.1** se detallan las purificaciones que se realizaron de algunas de las fracciones obtenidas para la obtención de los compuestos aislados e identificados.

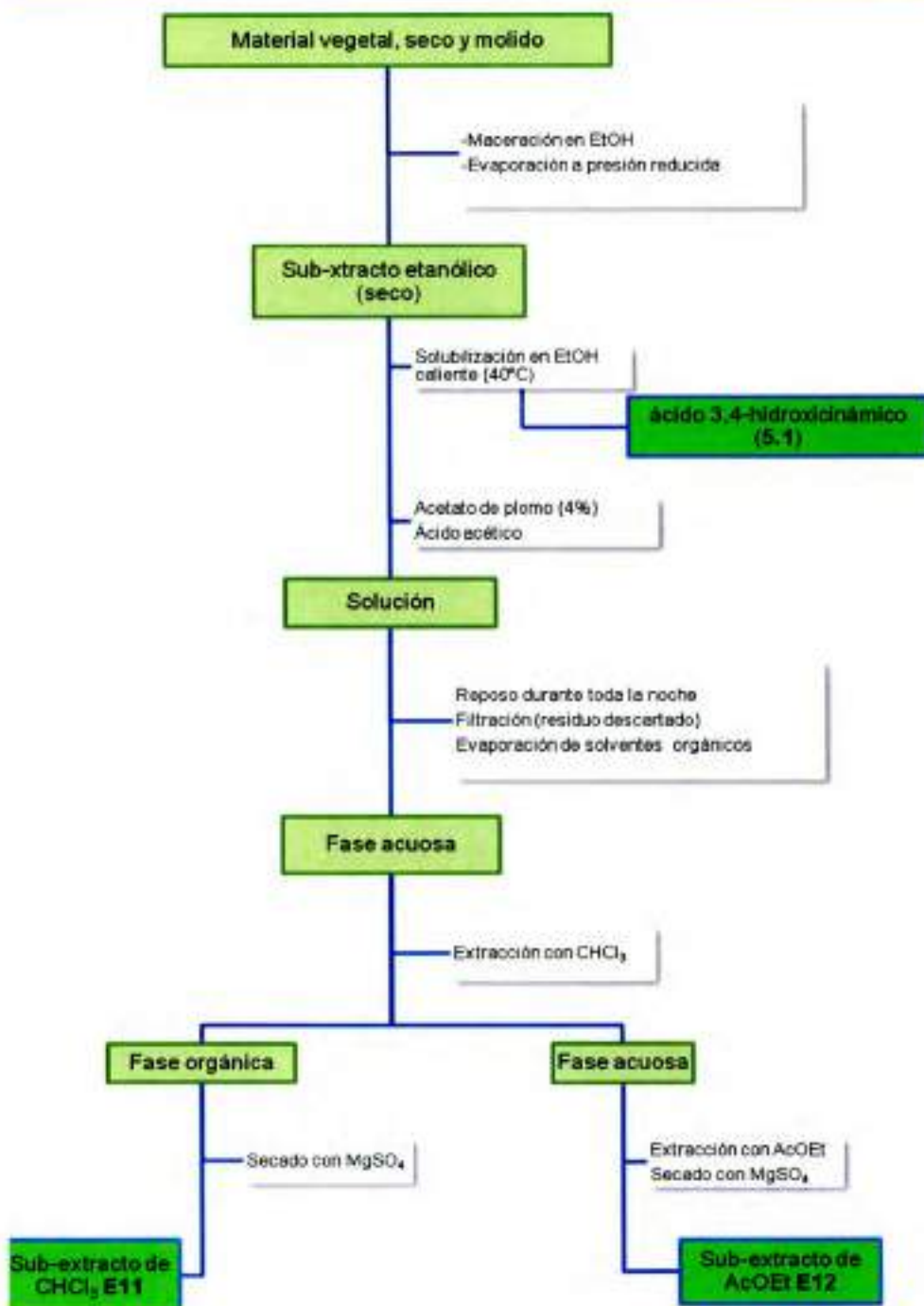


Figura 5.1 Esquema de procedimiento de extracción de *W. aurantiaca*

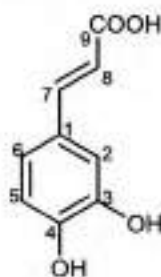
Tabla 5.1 Compuestos aislados de *W. aurantiaca*

Fracciones	Purificaciones posteriores	Productos aislados
Extracto etanólico (seco)	-	Ácido 3,4-dihidroxicinámico 5.1 (1,6 mg)
FW <sub>1</sub> (ciclohexano)	-	(+)-espatulenol 5.3 (1,8 mg)
FW <sub>4</sub> (ciclohexano:AcOEt 1:1)	CCF	3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído 5.2 (8,4 mg)

### 5.3 Determinación estructural de compuestos aislados

Las estructuras de los compuestos aislados de *W. aurantiaca* fueron determinadas fundamentalmente por espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H y comparación de datos bibliográficos.

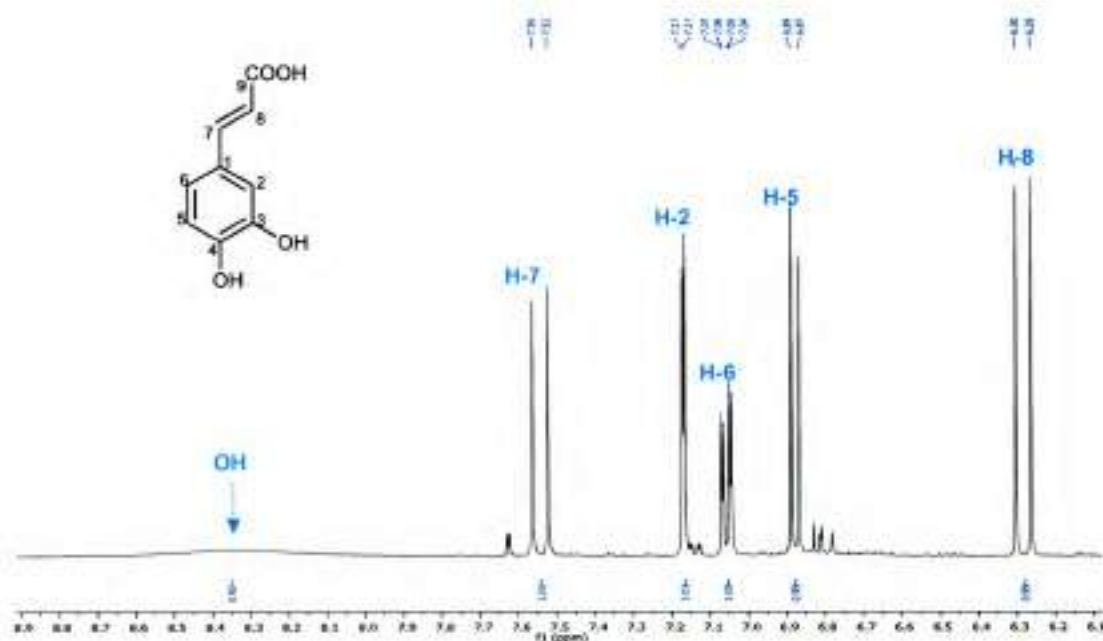
#### Ácido 3,4-dihidroxicinámico (5.1)



A partir del extracto etanólico se identificó un compuesto del grupo de los ácidos cinámicos proveniente de la ruta del ácido shikímico: el ácido 3,4-dihidroxicinámico (5.1) (ácido cafeico).

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Figura 5.2) las señales de los hidrógenos aromáticos se encuentran a  $\delta$  7,15 (*d*, *J* = 2,0 Hz),  $\delta$  7,05 (*dd*, *J* = 8,0; 2,0 Hz) y  $\delta$  6,88 ppm (*d*, *J* = 8,0 Hz). Las señales de H-7 y H-8 se observan a  $\delta$  7,54 (*d*, *J* =

15,8 Hz) y  $\delta$  6,28 (d,  $J = 15,8$  Hz) respectivamente. La señal ancha a  $\delta$  8,36 integra para 1H y corresponde al protón del ácido carboxílico C-9. Los datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se muestran en **Tabla 5.2**. Los acoplamientos fueron confirmados mediante el análisis del espectro COSY 45 (H-H) (**Figura 5.3**). Los datos espectroscópicos obtenidos fueron coincidentes con datos de bibliografía (Pouchert & Behnke 1993).



**Figura 5.2** Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  de ácido 3,4-dihidroxicinámico 5.1 (Acetona- $d_6$ , 400MHz)

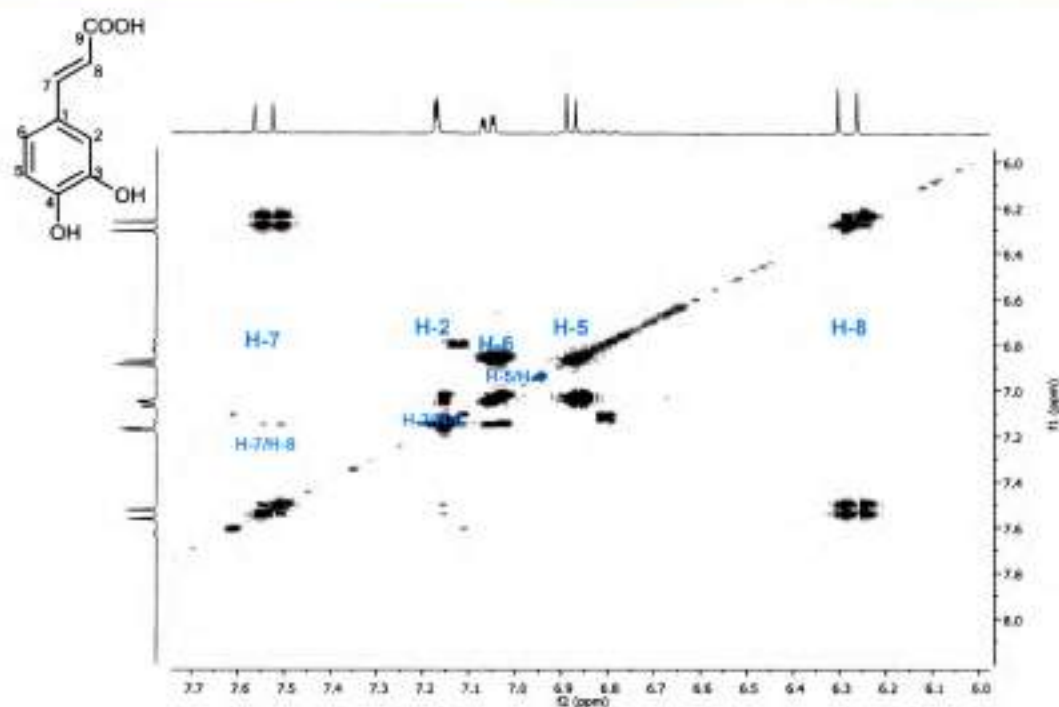
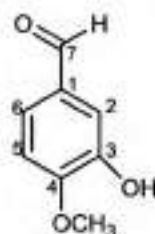


Figura 5.3 Espectro COSY 45 de ácido 3,4-dihidroxicinámico 5.1 en acetona- $d_6$

### 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (5.2)



A partir de la purificación de la fracción  $FW_4$  se obtuvo el compuesto 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (5.2).

En el espectro de RMN  $^1H$  (Figura 5.4, Tabla 5.2) se observan las señales correspondientes a los hidrógenos aromáticos a  $\delta$  7,04 (*d*,  $J = 7,6$  Hz);  $\delta$  7,43 (*da*,  $J = 7,6$  Hz) y  $\delta$  7,46 (*sa*). La señal del hidrógeno perteneciente al grupo aldehído aparece a  $\delta$  9,83 (*s*, 1H) y la señal a  $\delta$  3,97 que integra para 3 H corresponde al

grupo metoxilo (Pouchert & Behnke, 1993). El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (Figura 5.5) muestra ocho señales, entre las que se destaca la del grupo carbonilo de aldehído a  $\delta$  191,2 el y a  $\delta$  56,1 la del átomo de carbono del grupo metoxilo.

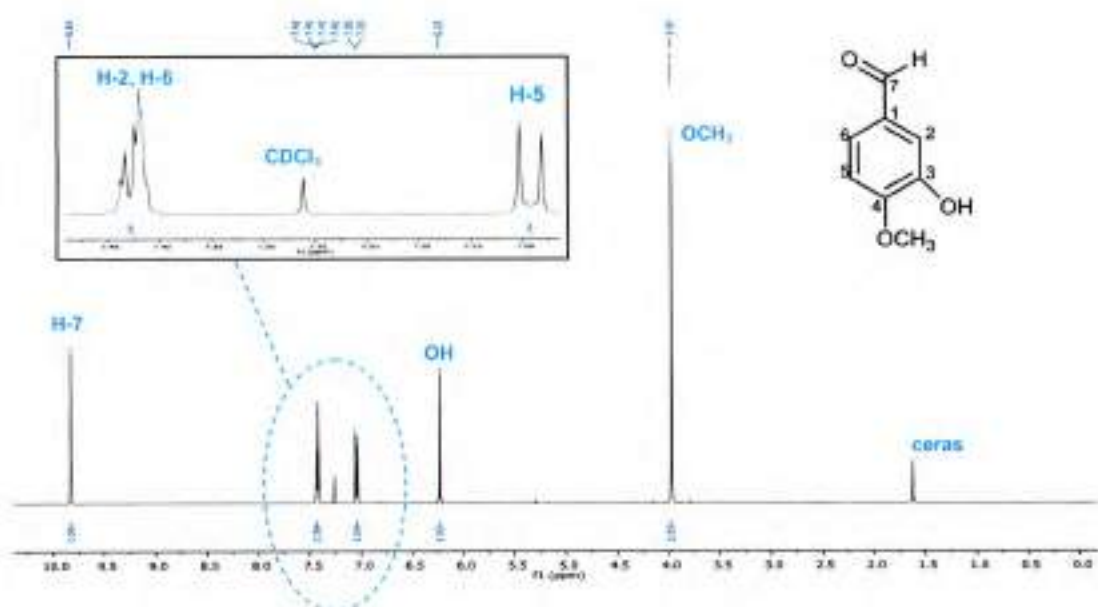


Figura 5.4 Espectro RMN  $^1\text{H}$  de 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído 5.2 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

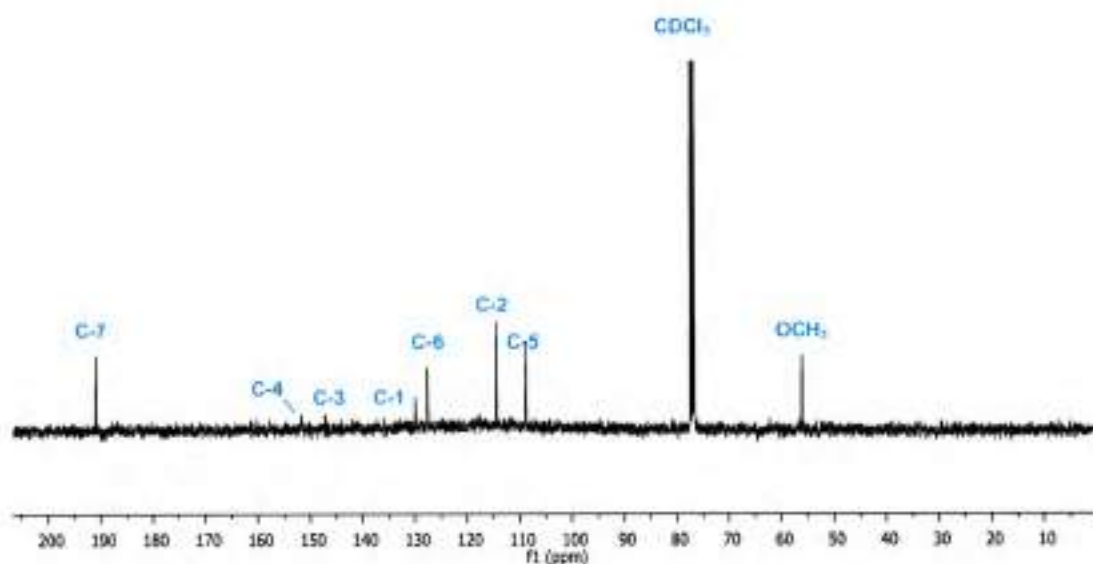
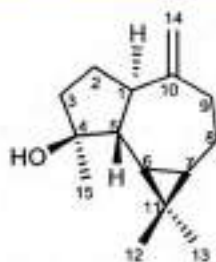


Figura 5.5 Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído de 5.2 ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)



**Tabla 5.2** Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de compuestos ácido 3,4-dihidroxicinámico **5.1** y 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído **5.2** (ppm)

Carbono	5.1 (Acetona- $d_6$ )		5.2 ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1	128,70	-	129,91	-
2	114,28	7,15 (1H, <i>d</i> , 2,0)	114,38	7,42 (1H, <i>d</i> , 1,7)
3	147,85	-	147,15	-
4	145,38	-	151,68	-
5	115,47	6,88 (1H, <i>d</i> , 8,0)	108,75	7,04 (1H, <i>d</i> 7,6)
6	114,28	7,05 (1H, <i>dd</i> , 8,0; 2,0)	127,56	7,43 (1H, <i>dd</i> , 7,6; 1,7)
7	144,62	7,54 (1H, <i>d</i> , 15,8)	191,22	9,83 (1H, <i>s</i> )
8	114,89	6,28 (1H, <i>d</i> , 15,8)	-	-
9	166,50	-	-	-
$\text{OCH}_3$	-	-	56,07	3,97 (3H, <i>s</i> )

**(+)-11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano (5.3)**

Mediante la purificación de la fracción **FW<sub>1</sub>**, se aisló e identificó el sesquiterpeno de núcleo aromadendrano, estructuralmente caracterizado por un anillo dimetil-ciclopropano unido a un anillo de siete miembros.

En el espectro RMN- $^1\text{H}$  (**Figura 5.6**, **Tabla 5.3**) las señales que aparecen a  $\delta$  4,69 y  $\delta$  4,66 como singletes anchos son características de protones del doble enlace exocíclico (C-14). Las correspondientes a los grupos metilos se observan como singletes a  $\delta$  1,28,  $\delta$  1,05 y  $\delta$  1,04 en donde cada una integra para 3H. El

doblete de doblete a  $\delta$  0,71 y el multiplete a  $\delta$  0,47, por su corrimiento químico son típicas de los átomos de hidrógeno de un anillo de ciclopropano por lo que se asignan a H-6 y H-7, respectivamente (Figura 5.7).

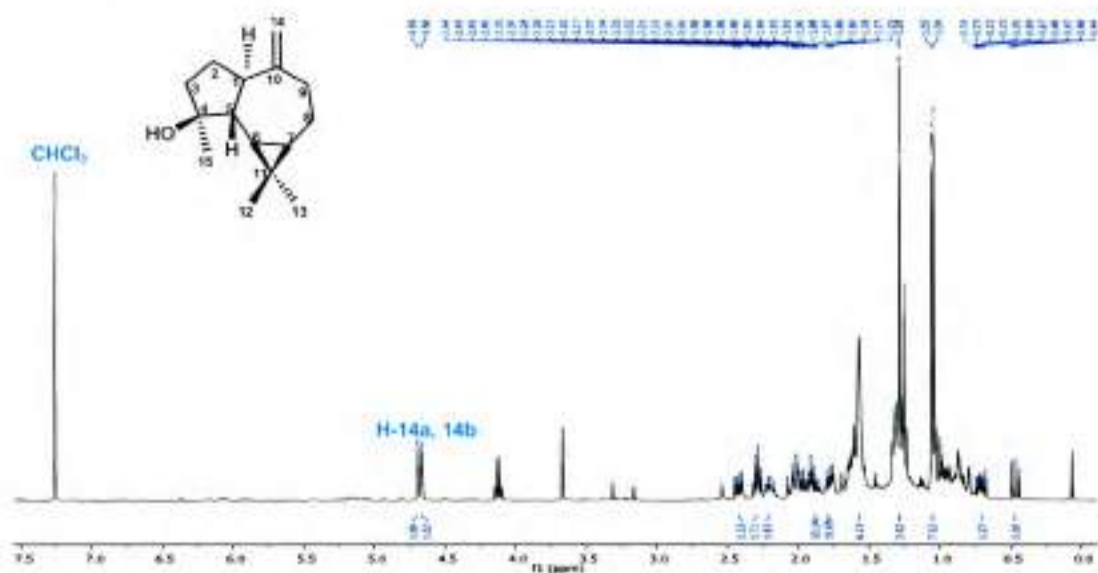


Figura 5.6 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de 5.3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz)

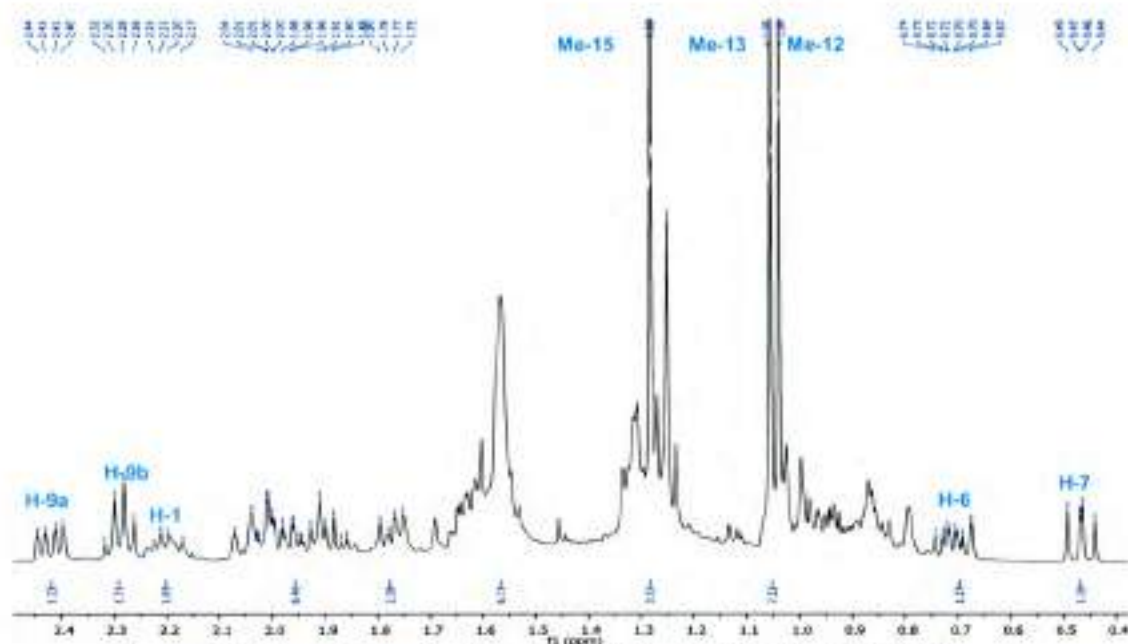
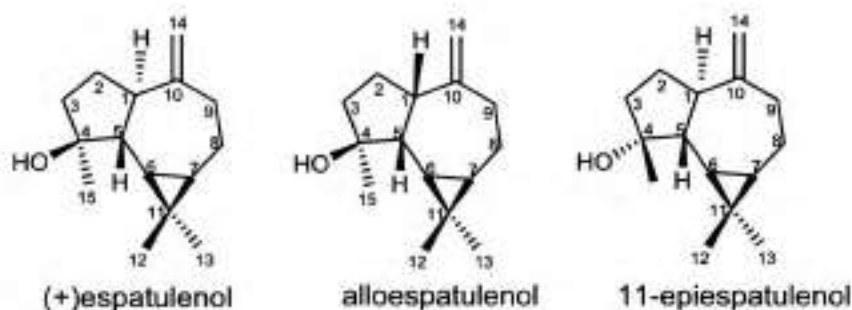


Figura 5.7 Espectro ampliado de RMN  $^1\text{H}$  de 5.3 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)

Por el perfil del espectro de RMN  $^1\text{H}$  existía la posibilidad de que el compuesto **5.3** se tratase de alguno de los tres isómeros: 11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano [(+)-espatulenol], 11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\beta$ -aromadendrano (alloespatulenol) y 11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano (11-epiespatulenol) (Figura 5.8).



**Figura 5.8** Isómeros de núcleo aromadendrano

La posibilidad que el compuesto **5.3** se tratase de allo-espatulenol fue descartada en base a las diferencias entre los datos de RMN- $^1\text{H}$  del compuesto aislado y los reportados para allo-espatulenol (Gijzen et al., 1992). Los isómeros 11-epiespatulenol y (+)-espatulenol se diferencian por la esteoquímica del C-11, cuyo desplazamiento químico es de  $\delta$  74,7 (Tringali et al., 1995) y  $\delta$  81,0 (Krebs et al., 1990) respectivamente. La señal de C-11 en el compuesto aislado en este trabajo de tesis coincide con la de (+)-espatulenol.

Se midió además la rotación óptica para este compuesto dando como resultado  $[\alpha]_D^{25} = 3,5$  en una concentración 0,5 mg/mL en  $\text{CHCl}_3$ .

Por el análisis y comparación de estos datos con los informados en bibliografía (Krebs et al., 1990), se determinó que el compuesto **5.3** corresponde a (+)-espatulenol.

Este compuesto fue aislado de partes aéreas de otras especies de *Wedelia*, (bajo el nombre *Aspilia*): *W. eonii* (*A. eonii*) (Ganzer et al., 1992), *W. laevissima* (*A. laevissima*) (Ganzer et al., 1992), y *W. parviflora* (*A. parviflora*) (Bohlmann et al.,

1981). En el aceite esencial de *W. africana* (*A. africana*) también se encontró este sesquiterpeno y fue descrito en varias especies de *Wedelia*. (Bohlmann et al., 1981, 1982, 1984b, Garg, et al., 2005, Dai et al., 2013.)

**Tabla 5.3** Datos de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de compuestos **5.3** (ppm)

Carbono	5.3 ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J en Hz)
1	52,15	2,,20 m
2	25,48	2,0-1,0 m
3	41,29	2,0-1,0 m
4	80,12	-
5	54,60	2,0-1,0 m
6	29,24	0,71 (1H,m)
7	25,97	0,47 (1H, dd, 11,1; 9,7)
8	24,74	2,0-1,0 m
9a	38,71	2,42 (1H, dd 14,3; 7,1)
9b	38,71	2,29 m
10	154,22	-
11	20,47	-
Me-12	26,17,	1,04 (3H, s)
Me-13	15,47	1,05 (3H, s)
14a	105,20	4,69 (1H, sa)
14b	105,20	4,66 (1H,sa)
Me-15	27,94	1.28 (3H,s)

## **Capítulo 6**

### **Actividad Biológica**

## 6.1 Introducción

Desde hace cientos de años las plantas medicinales tienen un importante rol en el tratamiento de una amplia gama de afecciones, incluyendo las infecciosas (Mahady, 2008). La mayoría de los estudios que se encuentran en bibliografía relacionados a antimicrobianos derivados de plantas involucran actividad antibacteriana, como así también actividad antioxidante (Cueva et al., 2010; Negi, 2012; Tajkarimi et al., 2010).

Algunos compuestos químicos de origen natural sirvieron como modelo para un gran porcentaje de medicamentos ya probados clínicamente, y muchos están siendo evaluados como agentes antimicrobianos (Mahady et al., 2008). Newmann et al., (2007) analizaron el número de drogas de origen natural en comparación con otras de origen sintético que fueron aprobadas para el tratamiento de enfermedades, lo que indica que los productos naturales continúan jugando un rol importante en el descubrimiento de nuevas drogas. Estos autores señalan, además, que el progreso en tecnología e instrumentos ha incrementado la velocidad de determinación estructural de productos activos, obtenidos a partir de ensayos bio-guiados, lo que permite competir con los compuestos de origen sintético.

Una de las razones principales de la búsqueda constante de compuestos naturales bioactivo es que las enfermedades infecciosas siguen siendo la causa más importante de mortalidad en el mundo (World Health Report, 2003) y que los microorganismos tienden a desarrollar resistencia a las drogas empleadas para su tratamiento habitual (Mahady et al., 2008).

Los principales grupos de compuestos responsables de actividad antimicrobiana provenientes de plantas incluyen compuestos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides y alcaloides (Ciocan & Bara, 2007; Lai & Roy, 2004). La variación en la estructura y composición química de estos compuestos produce una diferencia en la acción antimicrobiana (Savoia, 2012).

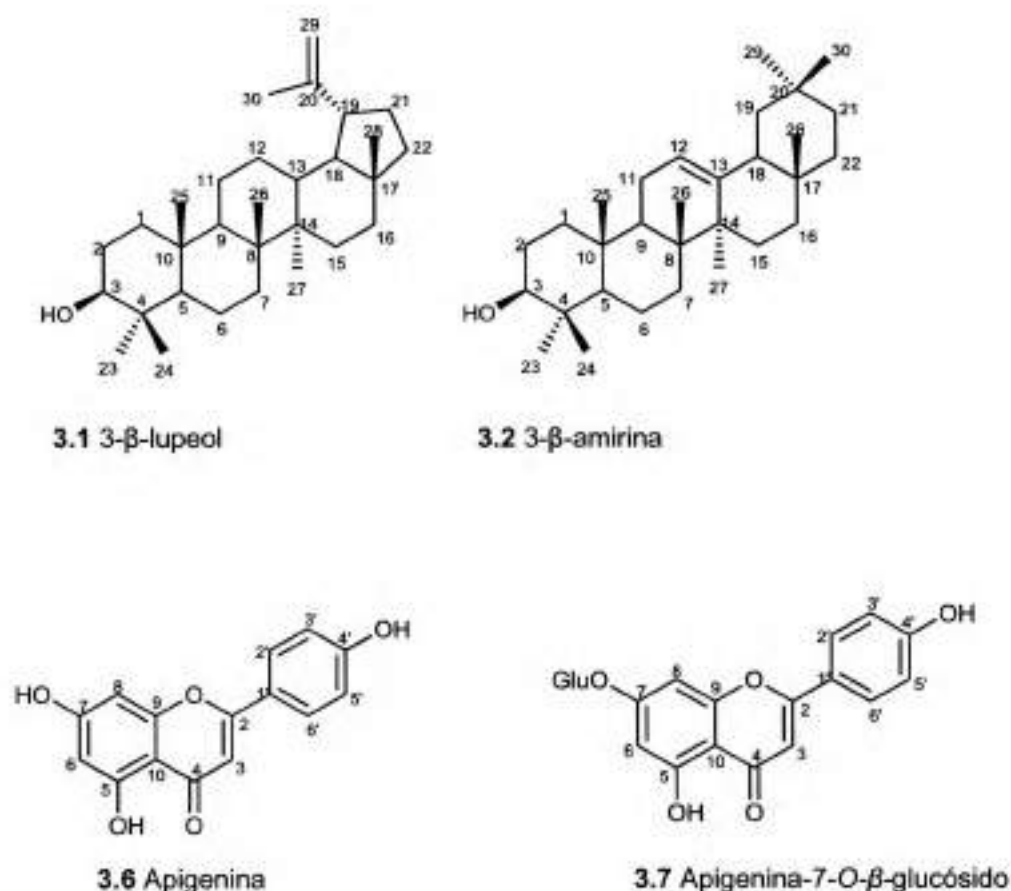
El **objetivo** de este capítulo de tesis fue evaluar la actividad inhibitoria de extractos y compuestos puros de las plantas en estudio frente a diferentes bacterias patógenas; incluyendo cepas que habitualmente contaminan alimentos, y por esta razón poseen un importante impacto en la salud humana. Se seleccionaron, además, los extractos que presentaron mayor actividad antibacteriana y se cuantificó dicho efecto frente a las cepas patógenas que resultaron más sensibles, mediante el método de difusión en disco.

Se determinó también la actividad antimicrobiana de extractos de especies de *Flourensia* frente a *Paenibacillus larvae*, bacteria que causa una infección conocida como loque americana en la cría de la abeja melífera. Esta es una de las enfermedades más importantes en apicultura, ya que ocasiona grandes pérdidas económicas para los productores de miel. Por tal motivo es de interés la búsqueda de compuestos activos

## 6.2 *Barnadesia odorata*

Para recordar, se estudió la actividad antimicrobiana *in vitro* frente a un amplio espectro de bacterias Gram+ y Gram-, ya informadas en el capítulo 2 (Tablas 2.3 y 2.4), en donde también se describió la metodología aplicada.

Se emplearon los sub-extractos hexano **E2**, clorofórmicos **E3** y **E7**, y aquellos compuestos aislados que fueron obtenidos en masas suficientes para los ensayos realizados: 3- $\beta$ -lupeol **3.1** y 3- $\beta$ -amirina **3.2** en mezcla, apigenina **3.6** y apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido **3.7** (**Figura 6.1**). Cabe destacar que no existen antecedentes de actividad antimicrobiana de ninguna especie del género *Barnadesia*.



**Figura 6.1** Compuestos aislados de *B. odorata* utilizados en estudios de actividad antibacteriana

### 6.2.1 Determinación de actividad antimicrobiana

La técnica de difusión en disco permitió realizar un análisis rápido de la actividad antimicrobiana de los extractos frente a un número considerable de bacterias. Los sub-extractos hexano y clorofórmicos se solubilizaron previamente en cloroformo y acetona, respectivamente. Se ajustó su concentración en 30.000 ppm.



En la **Tabla 6.1** se muestra la susceptibilidad de las cepas indicadoras Gram-positivas a los extractos de *B. odorata* ensayados. El sub-extracto **E2** presentó un importante espectro antibacteriano, ya que inhibió a todas las cepas de *B. cereus* estudiadas y fue el único extracto que presentó inhibición sobre *E. faecium* (**Tabla 6.1**). El sub-extracto **E7** presentó una moderada actividad, ya que logró inhibir a todas las cepas de *B. cereus* pero en menor efecto. Por otro lado el sub-extracto **E3** mostró una baja actividad, inhibiendo sólo a 3 cepas de *Bacillus*, siendo más activo sobre *B. subtilis*.

El análisis de la actividad antibacteriana de los extractos frente a bacterias indicadoras Gram-negativas reveló que solo *Salmonella* Typhimurium 29/08 es sensible a extractos de *B. odorata* (**Tabla 6.2**).

**Tabla 6.1.** Actividad antibacteriana de extractos de *B. odorata* frente a cepas indicadoras Gram-positivas

Cepas indicadoras		Extractos de <i>B. odorata</i> (30000 ppm)		
		E2	E3	E7
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	++ <sup>a</sup>	N/T	+++
	ATCC 25923	++	+	+++
	ATCC6538P	+	-	+++
<i>E. faecium</i>	CRL 1385	+	-	-
	CA12	-	-	-
	SM 21	N/T	-	-
<i>B. cereus</i>	BAC1	+	+	+
	MBC1	+++	-	+
	MBC2	+++	-	+
	MBC3	+++	+	+
	MBC4	+++	-	++
	MBC5	++	-	+
	MBC6	+++	-	++
	MBC7	++	+	+
<i>L. monocytogenes</i>	99/287 RB6	+	-	N/T
	99/287 S	+	-	N/T
	01/155	-	-	-
	99/267	+	-	-
<i>B. subtilis</i>	C4	+	+	+
	Cachi2	+	+	N/T
	Mori2	-	+	-
	Juli3	N/T	-	-

<sup>a</sup>Halo de inhibición, +: inhibición leve (< 3.0 mm) , ++: inhibición moderada (3.0-6.0 mm), +++: inhibición fuerte (> 6.0 mm) , -: sin inhibición. N/T: no testeado.

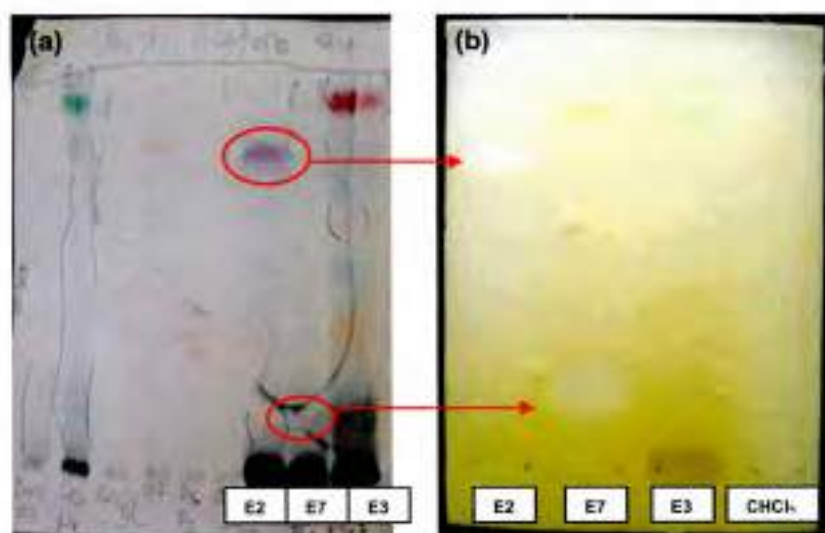
**Tabla 6.2.** Actividad antibacteriana de sub-extractos de *B. odorata* frente a cepas indicadoras Gram-negativas

Cepas indicadoras		Extractos de <i>B. odorata</i> (30000 ppm)		
		E2	E3	E7
<i>S. Typhimurium</i>	29/08	+	-	-
<i>S. Enteritidis</i>	CUB 22/10	-	-	-
<i>E. coli</i>	0157:H7	-	-	-
	CS	-	-	-
<i>Pseudomonas aureginosa</i>		-	-	-
<i>Klebsiella spp.</i>		-	-	-

<sup>a</sup>Halo de inhibición, +: inhibición leve (< 3.0 mm), ++: inhibición moderada (3.0 – 6.0 mm), +++: inhibición fuerte (> 6.0 mm), -: sin inhibición, N/T: no testeado

Los diferentes sub-extractos de *B. odorata* también fueron analizados mediante la técnica de **Bioautografía** (ver inciso 2.5.2 b). Se sembraron 10 µL de **E2** (15.000 ppm), **E3** (30.000 ppm) y **E7** (2.000 ppm) en placas que luego fueron desarrolladas en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Acetona (9:1), esto permitió separar los componentes de los sub-extractos de acuerdo a su afinidad con el solvente. Como resultado se pudo determinar la presencia de inhibición para algunos compuestos por comparación de las fracciones que generaron inhibición con las placas de referencia cromatográfica.

En el sub-extracto hexano **E2** se observó que un compuesto con una relación de frente alto (Rf alto) podría ser el causante de la actividad antibacteriana del extracto frente a *B. cereus* MBC1. Por el contrario, en el extracto **E7** el compuesto activo se encuentra en una Rf más baja. En el sub-extracto **E3** no se observó actividad antibacteriana frente a la cepa utilizada (**Figura 6.2 (a) y (b)**).



**Figura 6.2** (a) Cromatogramas de los sub-extractos E2, E3 y E7 revelados con óleum (b) Bioautografía sobre CCD de los sub-extractos frente a *B. cereus* MBC1

Según Cushnie & Lamb (2005) se pueden presentar discrepancias en los resultados al utilizar diferentes técnicas para determinar actividad antimicrobiana debido a las diferentes variables involucradas, como cantidad de inóculo y velocidad de difusión, entre otras. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis al aplicar dos técnicas diferentes: difusión en disco y bioautografía mostraron que ambas aportan datos comparables y que pueden ser utilizadas en forma independiente, pero su uso en conjunto complementa la información obtenida, al poder establecer los probables compuestos responsables de la actividad exhibida por los extractos. La técnica de difusión en disco permite realizar un barrido rápido de un amplio espectro de bacterias patógenas visualizando de manera simultánea y semicuantitativa la capacidad inhibitoria de los diferentes extractos estudiados. Por otra parte, la técnica de bioautografía aporta además datos útiles si se desea realizar un estudio bio-guiado mediante el empleo de diferentes técnicas cromatográficas de purificación.

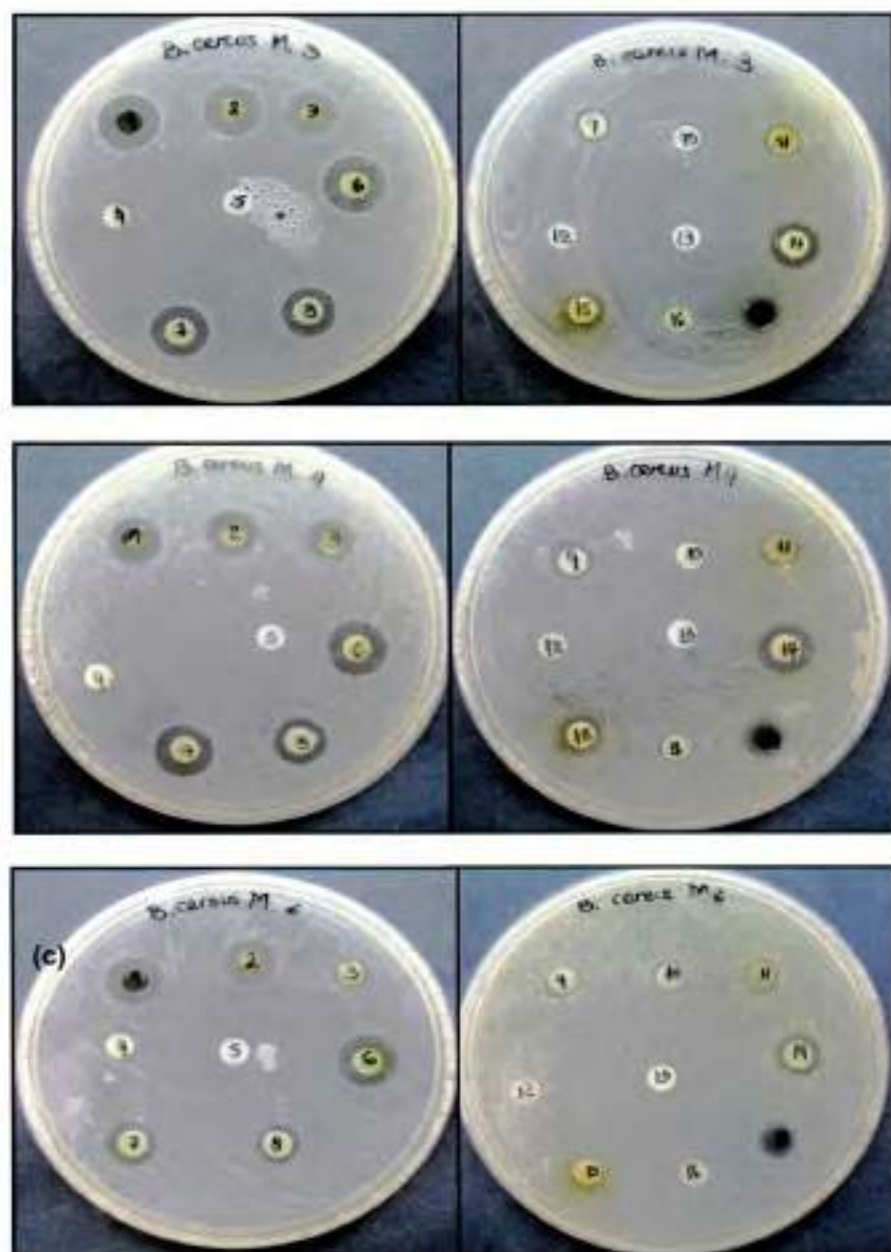
### 6.2.2 Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM)

A partir de los resultados de actividad inhibitoria obtenidos, se eligió el sub-extracto hexano **E2** y el sub-extracto clorofórmico **E7**, para la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) mediante la técnica de difusión en disco. Para preparar la solución madre y las diluciones seriadas se solubilizó el extracto **E2** en cloroformo y **E7** en acetona. El rango de concentraciones de los sub-extractos estaba comprendido entre los 30.000 ppm y los 500 ppm. Los resultados obtenidos se encuentran resumidos en la **Tabla 6.3**.

Del análisis se observó que la CIM depende de cada cepa indicadora. Para el sub-extracto **E2**, la CIM fue de 500 ppm frente a las cepas MBC3, MBC4 y MBC6 (**Figura 6.3**), mientras que para el resto de cepas testeadas la CIM fue de 2.500 ppm. El sub-extracto **E7** es menos activo, ya que sólo presentó una CIM de 2.500 ppm para 6 de las 8 cepas utilizadas (**Tabla 6.3**).

**Tabla 6.3** Diámetros de los halos de inhibición (mm) de sub-extractos de **E2** y **E7** de *B. odorata* frente a diferentes cepas de *B. cereus* en la determinación de CIM

Cepas <i>B. cereus</i>	Sub-Extracto E2 (ppm)					Sub-Extracto E7 (ppm)				
	30000	15000	9000	2500	500	30000	15000	9000	2500	500
BAC1	2.5	2.0	1.0	0.7	-	2.0	2.0	1.5	1.0	-
MBC1	6.0	4.0	3.5	3.0	-	1.5	1.5	1.5	1.0	-
MBC2	6.5	5.0	4.5	3.5	-	9.0	4.0	3.0	2.0	-
MBC3	7.0	6.0	5.0	2.0	2.0	7.0	6.0	5.0	1.0	-
MBC4	7.0	6.0	5.0	3.0	2.0	5.0	4.0	3.0	1.0	-
MBC5	5.0	4.0	3.0	1.0	-	5.0	4.0	2.0	-	-
MBC6	7.5	4.0	3.5	2.0	1.5	6.0	4.0	-	-	-
MBC7	6.0	5.0	3.5	1.5	-	7.5	5.0	4.5	1.5	-



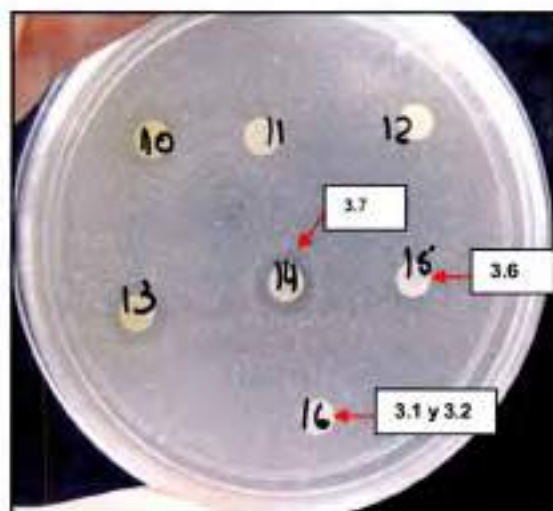
**Figura 6.3** Halos de inhibición de sub-extractos E2 y E7 sobre césped de (a) *B. cereus* MBC3, (b) *B. cereus* MBC4 y (c) *B. cereus* MBC6. Referencias: 1-5: sub-extracto E7, 6-10: sub-extracto E2 en diferentes concentraciones (30.000, 15.000, 9.000, 2.500 y 500 ppm), 13: control de solvente; 12 y 14-17: extractos de otras especies no correspondientes a este trabajo.

### 6.2.3 Actividad inhibitoria de compuestos puros aislados de *B. odorata*

De acuerdo a los resultados antes mencionados, se evaluó la actividad antibacteriana de compuestos aislados de *B. odorata* frente a 8 cepas de *B. cereus*: la mezcla de 3- $\beta$  lupeol (3.1) y 3- $\beta$  amirina (3.2), apigenina (3.6) y apigenina-7-O-glucósido (3.7), aislados del sub-extracto E7. Todos los compuestos se disolvieron en  $\text{CHCl}_3$  para obtener una concentración de 6.900, 1.500 ppm y 1.400 ppm.

De los resultados se observó que el compuesto apigenina-7-O-glucósido (3.7) presenta efecto sobre la cepa MBC2 con un halo de inhibición 3.0 mm (Figura 6.4), mientras que su respectivo aglicón 3.6 presenta leve inhibición sobre la misma cepa. Las restantes cepas ensayadas no fueron inhibidas por ningún compuesto.

La actividad de 3.7, en comparación con 3.6, puede deberse a que la sustitución por el glucósido en C-7 hace al compuesto más polar y, por lo tanto, mejora la difusión en el agar.



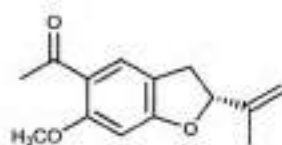
**Figura 6.4** Actividad antibacteriana de compuestos aislados de *B. odorata* sobre *B. cereus* MBC2 Referencias: 14-16: 3- $\beta$ -lupeol (3.1) y 3- $\beta$ -amirina (3.2) en mezcla, apigenina (3.6) y apigenina-7-O-glucósido (3.7); 12: control de solvente; 10,11 y 13: extractos de otras especies no correspondientes a este trabajo.

### 6.3 *Flourensia tortuosa*, *F. campestris*, *F. riparia* y *F. fiebrigii*

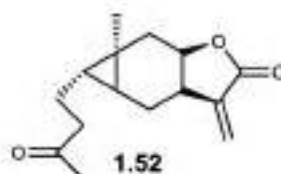
Se determinó la actividad antimicrobiana y la CIM de los sub-extractos de hexano (**E9**) y clorofórmico (**E10**) de *F. tortuosa* junto con los sub-extractos de hexano (**EHC**) y clorofórmico (**ECC**) de *F. campestris*; hexano (**EHR**), clorofórmico (**ECR**) y éter etílico (**EER**) de *F. riparia*; hexano (**EHF**) y éter etílico (**EEF**) de *F. fiebrigii* (**EEF**) obtenidos previamente en nuestros laboratorios (Uriburu et al., 2004, 2007).

Los compuestos puros utilizados en este análisis fueron aislados a partir de *F. riparia* y *F. fiebrigii* (Uriburu et al., 2004, 2007) (Ver **Tabla 2.2**, Capítulo 2). Se utilizaron lactonas sesquiterpénicas (carabrona **1.52** e isoalantolactona **1.55**), benzofuranos (6-metoxitremetona **1.40**), cumarinas (escopoletina **1.143**, compuesto aislado también en *F. tortuosa*), flavanonas (8-prenilnaringenina **1.99**, 8-prenileriodictiol **1.96**, 5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter **1.88**, exiguaflavanona K **1.97** y (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroflavanona **1.101**), y dihidroflavonoles (glepidotina B **1.105**, 8-prenildihidroisoramnetina **1.109** y escariosina **1.108**) (**Figura 6.5**). La mayoría de los compuestos fueron aislados a partir del sub-extracto clorofórmico de *F. riparia* (Uriburu et al., 2004), mientras que isolantolactona y 6-metoxitremetona fueron observados en el sub-extracto hexano. El sub-extracto de éter etílico de *F. fiebrigii* reveló 6-metoxi-tremetona, 8-prenileriodictiol, 5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter y (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroflavanona (Uriburu et al., 2007). Este último compuesto solo fue observado en los extractos de éter etílico de estas especies.

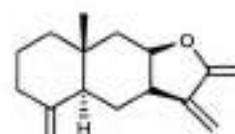




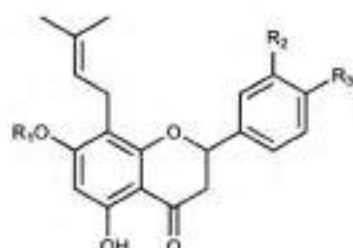
1.40



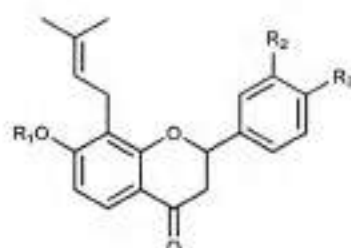
1.52



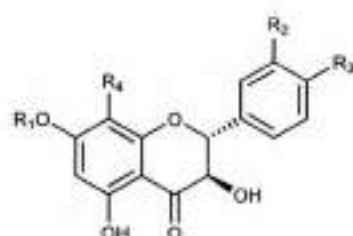
1.55



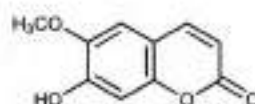
	R1	R2	R3
1.88	OCH3	OH	OH
1.96	H	OH	OH
1.97	H	OCH <sub>3</sub>	OH
1.99	H	H	OH



	R1	R2	R3
1.101	H	OH	OH



	R1	R2	R3	R4
1.105	H	H	OH	H
1.108	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH	Pr
1.109	H	OCH <sub>3</sub>	OH	Pr



1.143

**FFigura 6.5** Compuestos puros previamente aislados de *Flourensia*, utilizados para ensayos de actividad antimicrobiana.

### 6.3.1 Actividad antimicrobiana de diferentes especies de *Flourensia*

La actividad inhibitoria de diferentes extractos de *Flourensia* se evaluó frente a bacterias Gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. faecium*, *E. hirae*) y Gram-negativas (*S. Enteritidis*, *S.*

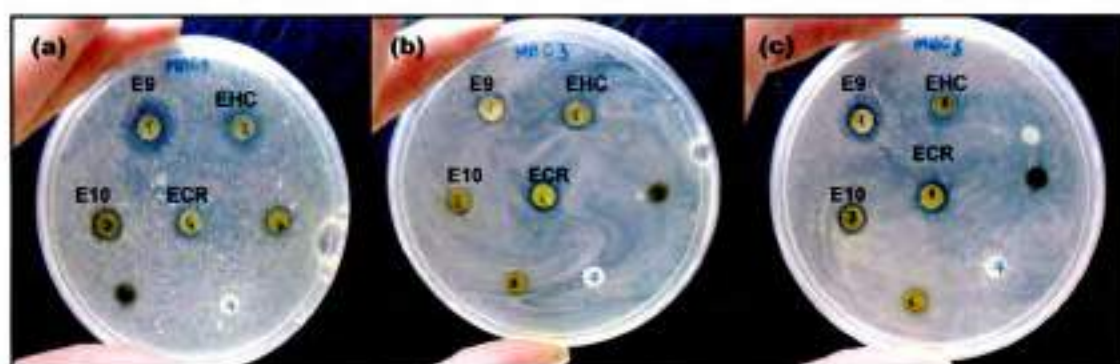
*gallinarum*, *S. Typhimurium*, *E. coli*). Los sub-extractos fueron disueltos en cloroformo y acetona ajustando sus concentraciones entre 35.000-25.000 ppm.

En la **Tabla 6.4** se observan los resultados de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram-positivas. Se observó efecto inhibitorio de todos los sub-extractos ensayados frente a *B. cereus*, *S. aureus* y *B. subtilis*. Los sub-extractos **E9** y **E10** de *F. tortuosa* y los sub-extractos **EHC** de *F. campestri* y **ECR** de *F. riparia* presentaron mayor actividad antimicrobiana frente a las cepas de *B. cereus* y *B. subtilis* empleadas. Se destaca el efecto producido por los extractos de hexano (**E9**) y clorofórmico (**E10**) de *F. tortuosa* comparados con los otros sub-extractos de igual polaridad frente a cepas de *B. cereus* de orígenes diferentes (alimentario y clínico) (**Figura 6.6**). Esta variación del efecto inhibitorio podría deberse a una composición química diferente entre las especies estudiadas. Por tal motivo, se planteó el estudio mediante la técnica de **Cromatografía líquida de alta resolución** (CLAR) para comparar los metabolitos secundarios producidos por diferentes especies del género *Flourensia* y determinar la presencia de compuestos que podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana (**Capítulo 7**).

**Tabla 6.4.** Actividad antibacteriana de sub-extractos de *Flourensia* frente a cepas Gram-positivas

Cepas indicadoras		Extractos de <i>Flourensia</i> (35000-25000 ppm)							
		<i>F. tortuosa</i>		<i>F. campestris</i>		<i>F. fiebrigii</i>		<i>F. riparia</i>	
		E9	E10	EHC	ECC	EHF	EEF	EHR	ECR
<i>B. cereus</i>	BC1	++	++	+	+	-	+	-	++
	MBC1	+++	++	++	+	+	++	+	++
	MBC2	+++	+++	+++	++	+	+	+	++
	MBC3	+	+	+	+	+	+	+	+
	MBC5	++	+	+	+	+	+	+	+
	MBC7	+++	+++	++	+	+	++	++	+++
<i>B. subtilis</i>	C4	+++	+++	++	+	+	+	+	+++
	Mcri2	++	+++	+++	+	-	+	+	++
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	++	++	++	+	+	+	+	++
<i>L. monocytogenes</i>	99/287	-	-	-	+	-	-	-	-
	00/270	-	-	-	-	-	-	-	-
	01/155	-	+	-	+	-	+	-	-
	99/320	-	-	-	-	-	-	-	+
	00/110	-	-	-	-	-	+	-	-
	01/01	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i>	CRL 1385	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>		-	-	-	-	-	-	-	-

<sup>a</sup>Halo de inhibición, +: inhibición leve (< 3.0 mm), ++: inhibición moderada (3.0-6.0 mm), +++: inhibición fuerte (> 6.0 mm), -: sin inhibición.



**Figura 6.6** Halos de inhibición de sub-extractos E9, E10, EHC y ECR sobre césped de *B. cereus* (a) MBC1, (b) MBC3, (c) MBC5. Referencias: 1-4: sub-extractos; 7: control de solvente; 5 y 6: extractos de otras especies no correspondientes a este trabajo.

Ninguno de los sub-extractos de las diferentes especies dió resultados satisfactorios frente a las bacterias Gram-negativas ensayadas.

### 6.3.2 Determinación de la Concentración inhibitoria mínima (CIM)

A los sub-extractos de *F. tortuosa* (E9 y E10) se les determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a cepas de *B. cereus* mediante la técnica de difusión en disco. Los resultados obtenidos se encuentran en la **Tabla 6.5**. Las diluciones seriadas se prepararon disolviendo los sub-extractos en cloroformo, abarcando un rango de concentraciones entre los 30.000 ppm y los 500 ppm.

Para el sub-extracto E10 la CIM fue de 1.500 ppm frente a las cepas MBC3, MBC5 y MBC7, mientras que para el sub-extracto E9 presentó valores bajos CIM (1.500 ppm) solo frente a MBC5. La cepa MBC2 es la menos sensible, ya que no presenta inhibición a ninguna concentración del sub-extracto clorofórmico E10 y solo hasta 15.000 ppm con el sub-extracto E9.

**Tabla 6.5** Diámetros de los halos de inhibición (mm) de sub-extractos de E9 y E10 de *F. tortuosa* frente a diferentes cepas de *B. cereus* en la determinación de CIM

Cepas <i>B. cereus</i>	E9 (ppm)					E10 (ppm)				
	25000	15000	7500	3000	1500	22400	11200	5600	2800	1400
MBC1	9.0	7.0	6.0	5.0	-	3.0	1.0	-	-	-
MBC2	5.0	3.0	-	-	-	-	-	-	-	-
MBC3	5.0	5.0	2.0	1.0	-	4.0	4.0	1.0	1.0	1.0
MBC4	2.0	1.0	1.0	-	-	4.0	2.0	2.0	-	-
MBC5	9.0	9.0	6.0	5.0	4.0	4.0	2.0	2.0	1.0	1.0
MBC6	4.0	3.0	1.0	-	-	3.0	2.0	1.0	-	-
MBC7	3.0	2.0	1.0	-	-	4.0	3.0	2.0	1.0	1.0
BAC1	5.0	3.0	2.0	-	-	4.0	2.0	2.0	-	-

### 6.3.3 Actividad anti-*Paenibacillus larvae*

Las abejas melíferas (*Apis mellifera*) no sólo son importantes por la miel que producen, sino también son vitales como polinizadores de cultivos agrícolas y hortícolas. Las larvas de estas abejas son susceptibles a *Paenibacillus larvae*, el agente etiológico de loque americana (AFB, American foulbrood), una enfermedad letal para las colonias (Genersch, 2010). Las larvas jóvenes son afectadas por la ingesta de esporas que se encuentran en el alimento larval provisto por las abejas adultas; cuando ocurre la esporulación las larvas mueren. Las esporas se transmiten por toda la colmena. La solución más utilizada por los productores para controlar la AFB es la quema de colmenares, generando con esto grandes pérdidas económicas. Sin embargo, la estrategia más empleada para la prevención y tratamiento de esta enfermedad es el uso de antibióticos (Antunez et al., 2008), pero la desventaja de sus usos son los residuos en el producto final.

El empleo de extractos vegetales es una alternativa natural para combatir esta infección; por tal motivo se planteó el estudio de extractos y compuestos puros aislados de diferentes especies de *Flourensia* frente a esta bacteria.

Se evaluaron los sub-extractos **E9** y **E10** de *F. tortuosa* y los sub-extractos de hexano (**EHR**, **EHF**, **EHC**), clorofórmicos (**ECR**, **ECC**) y de éter etílico (**EER**, **EEF**) de la parte aérea *F. riparia*, *F. fiebrigii* y *F. campestris* frente a tres cepas diferentes de *P. larvae* con la técnica de difusión en disco en agar MPYGP. Los sub-extractos clorofórmicos, éter etílico y compuestos puros fueron disueltos en metanol, mientras que los de hexano se disolvieron en cloroformo. Las concentraciones finales de las muestras analizadas fueron para los sub-extractos entre 50.000-100 ppm y para los compuestos puros fue de 2 500-100 ppm.

El análisis de la actividad antimicrobiana mediante el halo de inhibición de los sub-extractos reveló que todos ellos, en diferente grado, mostraron efecto inhibitorio (**Tabla 6.6**). A las concentraciones ensayadas (rango entre 50.000-40.000 ppm), los extractos **E9** y **E10** de *F. tortuosa* inhibieron a *P. larvae* I y *P. larvae* III en un grado comparable. Los sub-extractos de *F. riparia*, **ECR** y **EER**, también presentaron halos de inhibición destacando que frente a *P. larvae* Azul el

efecto es mayor que el observado en los extractos de *F. tortuosa*. Cabe destacar que **ECR** es el único de los sub-extractos ensayados que presenta inhibición frente a la cepa *P. larvae* 35A. Los extractos de *F. fiebrigii* son comparables a los extractos de *F. riparia* observándose una mínima diferencia en la actividad frente a *P. larvae* 1 y *P. larvae* III. Los extractos de *F. campestris* presentan menor inhibición. No se observó efecto en los solventes usados como controles negativos.

**Tabla 6.6** Efectos anti-*P. larvae* de diferentes extractos de especies de *Flourensia* (rango de concentración: 50.000–40.000 ppm)

Especies		Cepas de <i>P. larvae</i>			
		35 A	Azul	1	III
<i>F. tortuosa</i>	E9	-	+	++	++
	E10	-	+	++	++
<i>F. riparia</i>	EHR	-	+	-	++
	EER	-	++	++	++
	ECR	++	++	++	++
<i>F. fiebrigii</i>	EHF	-	++	+	++
	EEF	-	++	+	+
<i>F. campestris</i>	EHC	-	+	+	+
	ECC	-	+	+	+

++: Zona de inhibición 1,0–2,6 cm. +: zona de inhibición 0,5–0,9 cm. -: No inhibición.

Para la determinación de la CIM se eligieron eligieron los sub-extractos de cloroformo (**ECR**) y éter etílico (**EER**) de *F. riparia* por presentar mayor efecto inhibitorio sobre *P. larvae*; además, se ensayó el sub-extracto de éter etílico (**EEF**) de *F. fiebrigii* porque a pesar que no fue tan activo como **EHF**, se pretendió comparar con el **EER** en cuanto a efecto biológico y composición química. Este estudio se realizó empleando la técnica de difusión en agar (ver inciso **2.5.2 d**, **Capítulo 2**). Los resultados mostraron que **ECR** presentó valores de CIM más bajos frente *P. larvae* Azul y *P. larvae* 1 (250 ppm para ambos); por el contrario,

los valores de CIM para **EEF** fueron mayores, incluso en comparación al **EER** (Tabla 6.7).

**Tabla 6.7** Concentración inhibitoria mínima de los sub-extractos seleccionados de especies de *Flourensia* frente a cepas de *P. larvae*

Especies		CIM (ppm)			
		35 A	Azul	1	III
<i>F. riparia</i>	EER	2000	250	500	2000
	ECR	2500	250	250	2000
<i>F. fiebrigii</i>	EEF	N/T	1250	2500	5000

N/T: no testeado

En la **Tabla 6.8** se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana de los compuestos puros frente a dos cepas de *P. larvae*; en este caso se eligió una cepa de referencia (35A) y otra aislada (Azul). Los compuestos aislados del sub-extracto **ECR** mostraron resultados variables en su actividad. Exiguaflavanona **K (1.97)** y 8-prenilidihidroisoramnetina (**1.109**) fueron activas frente a las dos cepas de *P. larvae* con valores de CIM de 625 ppm y 500 ppm respectivamente. A partir del sub-extracto **EEF**, el compuesto (2S)-8-(3''-metilbut-2''-enyl)-7,3',4'-trihidroxiflavanona (**1.101**) fue el más activo con una CIM igual a 500 ppm frente a los dos cepas estudiadas de *P. larvae*. Los resultados también mostraron que 8-prenileriodictiol (**1.96**) tiene mayor efecto inhibitor sobre *P. larvae* Azul (CIM 500 ppm) que frente a *P. larvae* 35 A (CIM 1.000 ppm). Finalmente, los compuestos 5,3'-dihidroxiisobavachin-7-O-metil éter (**1.88**) y 6-metoxitremetona (**1.40**), aislados de *F. riparia* y *F. fiebrigii* presentaron valores de CIM de 2000 ppm.

Entre los compuestos puros ensayados frente a *P. larvae*, se observa que los flavonoides **1.96**, **1.97**, **1.101** y **1.109** presentan efecto inhibitor. Existen antecedentes en bibliografía donde informan que las flavanonas son potentes inhibidores de ciertas bacterias Gram-positivas, pero sólo cuando contienen grupos 5,7-dihidroxi, 5,7,4'-trihidroxi ó 2'-hidroxi y 2',4'-dihidroxi (Tsuchiya et al., 1996 ; Alcaráz et al, 2000). Sin embargo, el presente estudio determinó que (2S)-8-(3''-metilbut 2 enil )-7,3',4'-trihidroxiflavanona (**1.101**) presenta efecto inhibitor

sin tener el grupo 5-OH ni los otros patrones de sustitución mencionados. Los compuestos con efecto inhibitor 8-prenil-eriodictiol **1.96**; exiguaflavanona K **1.97** y 8-prenildihidroisoramnetina **1.109** contienen en sus estructuras uno o más de los sustituyentes requeridos para ser considerados compuestos con actividad.

**Tabla 6.8** Concentración inhibitoria mínima de diferentes compuestos puros aislados de especies de *Flourensia* frente a *P. larvae*

Especies	Compuestos puros	CIM (ppm)	
		35 A	Azul
<i>F. riparia</i>	Carabrona ( <b>1.52</b> )	-	-
	Isoalantolactona ( <b>1.55</b> )	-	-
	Escopoletina ( <b>1.143</b> )	-	-
	8-prenilnaringenina ( <b>1.99</b> )	-	-
	exiguaflavanona K ( <b>1.97</b> )	625	625
	Glepidotina B ( <b>1.105</b> )	-	-
	8-prenildihidroisoramnetina ( <b>1.109</b> )	500	500
	Escariosina ( <b>1.108</b> )	-	-
<i>F. fiebrigii</i>	8-prenieriodictiol ( <b>1.96</b> )	1000	500
	(2S)-8-(3''-metilbut-2''-enyl)-7,3',4'-trihidroflavanona ( <b>1.101</b> )	500	500
<i>F. riparia</i> y <i>F. fiebrigii</i>	6-metoxitremetona ( <b>1.40</b> )	2000	2000
	5,3'-dihidroisobavachin-7-O-metil éter ( <b>1.88</b> )	2000	2000

El Dr. Maggi de la Universidad Nacional de Mar del Plata evaluó, según la técnica de exposición completa, la toxicidad en abejas de los extractos que resultaron más activos. Los ensayos de toxicidad demostraron que aún las concentraciones más elevadas analizadas (250.000 ppm) no mostraron efectos letales sobre las abejas expuestas (Reyes et al., 2013).



#### 6.4 *Wedelia aurantiaca*

El estudio de actividad antimicrobiana de *W. aurantiaca* frente a cepas de *B. cereus*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* se realizó empleando la técnica de difusión en disco. Se evaluó el sub-extracto **E11** en dos concentraciones: 30.000 ppm y 25.000 ppm.

En la **Tabla 6.9** se muestran los resultados de inhibición. El extracto clorofórmico **E11**, a una concentración de 30.000 ppm, dio resultado positivo sobre cepas de *B. cereus* y *S. aureus* pero con una baja actividad inhibitoria, de acuerdo al pequeño halo de inhibición observado. A su vez, no presentó actividad sobre las cepas de *Listeria*. A la concentración de 25.000 ppm no se observa efecto antibacteriano. Por lo expuesto, se sugiere que la CIM de este sub-extracto frente a cepas de *B. cereus* y *S. aureus* se encuentra entre los valores 30.000-25.000 ppm.

**Tabla 6.9.** Actividad antibacteriana de sub-extracto clorofórmico de *W. aurantiaca* frente a cepas indicadoras Gram-positivas

Cepas indicadoras		E11 (ppm)	
		30000	25000
<i>B. cereus</i>	BAC1	+ <sup>2</sup>	-
	MBC1	+	-
	MBC2	+	-
	MBC3	+	-
	MBC4	+	-
	MBC5	+	-
	MBC6	+	-
	MBC7	+	-
<i>S. aureus</i>	ATCC 29213	+	-
	<i>L. monocytogenes</i> 99/287	-	-
	00/270	-	-
	01/155	-	-

<sup>2</sup>Halo de inhibición, +: inhibición leve (< 3.0 mm) , ++: inhibición moderada (3.0-6.0 mm), +++: inhibición fuerte (> 6.0 mm) , -: sin inhibición.

Los extractos ensayados frente a bacterias Gram-negativas: *Salmonella* Typhimurium, *S. Enteritidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aureginosa* y *Klebsiella* spp.) no presentaron efecto inhibitorio.

## **Capítulo 7**

# **Cromatografía líquida de alta resolución**

Los objetivos de este capítulo fueron:

-Utilizar la técnica de **Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)** para realizar una comparación de la composición química de los extractos de diferentes especies del género *Flourensia*.

-Determinar la presencia de compuestos que podrían ser responsables de la actividad antimicrobiana frente a diferentes bacterias.

-Completar el análisis químico del extracto clorofórmico de *F. tortuosa* y llevar a cabo un estudio preliminar de los extractos de hexano de todas las especies de *Flourensia*, ya que ninguno de ellos fue estudiado con anterioridad.

## 7.1 Introducción

Para el análisis comparativo entre especies se utilizaron extractos y compuestos puros aislados e identificados de *F. riparia*, *F. fiebrigii* y *F. campestris*, cedidos por el grupo de trabajo de la Dra. María Laura Uriburu de la Universidad Nacional de Salta.

En este trabajo de tesis se abordó el estudio fitoquímico y de actividad antibacteriana de *F. tortuosa* Griseb. Del análisis de la composición química de *F. tortuosa* se determinaron: 4-hidroxiacetofenona (4.1), 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (4.2), enecalina (4.3), 2,2-metil cromeno (4.4), tremetona (4.5), 6-metoxitremetona (4.6), 2,5-diacetilbenzofurano (4.7), 2-acetil-6-metoxibenzofurano (4.8), escopoletina (4.9) y 2-metil-2,3,4-ácido trihidroxibutanoico-1,4-lactona (4.10). (Figura 4.1, Capítulo 4).

Como se describe en el **Capítulo 6**, la actividad antibacteriana de los extractos se realizó con la colaboración de la Dra. Carina Audisio (INIQUI-CONICET, UNSa). Se comparó la actividad de los extractos de hexano, éter etílico y cloroformo de las cuatro especies de *Flourensia*: *F. riparia*, *F. fiebrigii*, *F. campestris* y *F. tortuosa*. Se observó efecto inhibitorio de los extractos de hexano (E9) y cloroformo (E10) de *F. tortuosa*, extracto hexano de *F. campestris* (EHC) y clorofórmico de *F. riparia* (ECR), frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y

*B. subtilis*. Los extractos de *F. tortuosa* presentaron una mayor actividad antimicrobiana frente a las diferentes cepas de *B. cereus*, comparados con las otras especies de *Flourensia* ensayadas (Ver **Tabla 6.4, Capítulo 6**).

Se evaluó también la actividad inhibitoria frente a cuatro cepas de *Paenibacillus larvae* (**Tabla 6.6**). Todos los extractos inhibieron en distinto grado algunas de las cepas ensayadas. Los extractos más activos en orden decreciente de actividad fueron **ECR > EER > E9 = E10 =EHF >EEF**. Los compuestos puros que presentaron actividad frente a dos cepas de *P. larvae* fueron: exiguaflavanona **K (1.97)**, 8-prenileriodictiol (**1.96**), (2S)-8-(3'-metilbut-2'-enil)-7,3',4'-trihidroflavanona (**1.101**) y 8-prenildihidroisoramnetina (**1.107**). Este último dihidroflavonol no fue caracterizado por CLAR por no disponer de masa suficiente para su análisis.

Los sub-extractos analizados por CLAR fueron los sub-extractos hexano y cloroformo de *F. tortuosa* (en este capítulo nombrado como **EHT y ECT**) y los que se muestran en la **Tabla 2.1**. Los compuestos puros considerados como testigos fueron los aislados de *F. tortuosa*: tremetona (**1**), 6-metoxieuparona (**5**), encecalina (**6**), escopoletina (**22**) y los compuestos que se describen en la **Tabla 2.2 del Capítulo 2**, la cual se vuelve a mostrar a continuación con una numeración diferente con el fin de amenizar la discusión. Esta numeración corresponde a una agrupación según el tipo de compuestos: dihidrobenzofuranos, benzofuranos, cromenos, flavonoles, flavanonas, flavonas y otros, independientemente de la especie de la que fueron aislados, como se describen en la **Tabla 7.1**.

**Tabla 2.1 del Capítulo 2.** Extractos ensayados de diferentes especies de *Flourensia*

Especies	Extractos
<i>F. campestris</i>	hexano (Uriburu et al., 2004)
	CHCl <sub>3</sub> (Uriburu et al., 2004)
<i>F. fiebrigii</i>	éter etílico (Uriburu et al., 2007)
<i>F. riparia</i>	hexano (Uriburu et al., 2004)
	éter etílico (Uriburu et al., 2005)

**Tabla 2.2 del Capítulo 2.** Compuestos puros aislados previamente de especies de *Flourensia*, usados como testigos en CLAR

Especies	Compuestos puros
<i>F. campestris</i>	8-prenilneriodictiol (13) encecalol metil éter (7)
<i>F. fiebrigii</i>	Tremetona (1) (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi flavanona (16) (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi flavanona (17) (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-5,7,3',4'-trihidroxi flavanona (18) 8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,4'-trihidroxi flavanona (19)
<i>F. riparia</i>	Isoalantolactona (23) Escopoletina (22) 8-prenilnaringenina (12) exiguaflavanona K (14) glepidotina B (8) Escariosina (9) 8-prenil-3,5,7-trihidroxi,3',4'-dimetoxi-flavona (10) 10,12-dihidroxitremetona (3) Euparona (4) Encecalina (6) 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona (20) 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxiflavona (21) Glabranina (15) Pinobanksina (11)
<i>F. riparia</i> y <i>F. campestris</i>	6-metoxieuparona (5)
<i>F. riparia</i> y <i>F. fiebrigii</i>	6-metoxitremetona (2)

## 7.2 Resultados

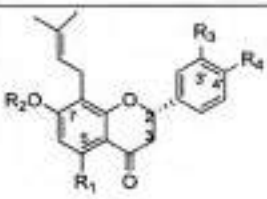
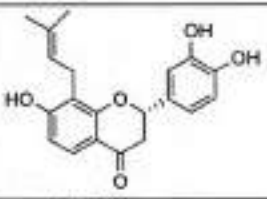
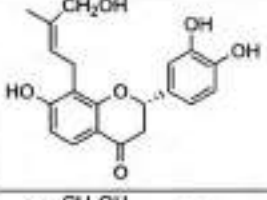
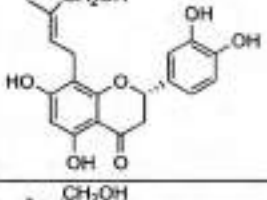
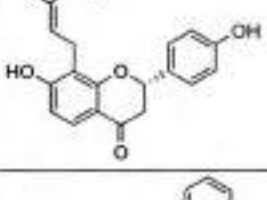
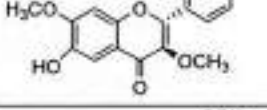
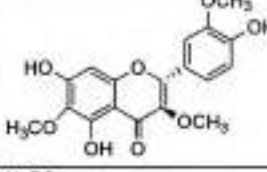
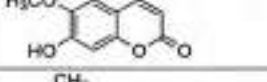
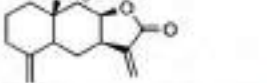
Los cromatogramas de los extractos y compuestos puros se realizaron en las condiciones especificadas en el **Capítulo 2**. Se procedió al análisis comparativo de los tiempos de retención y del área de los picos para determinar la presencia y la proporción relativa de los compuestos puros presentes en los extractos.

La **Tabla 7.1** muestra los tiempos de retención y las estructuras de los compuestos puros usados como patrones, los que se agruparon de acuerdo al grupo estructural al que corresponden.

Tabla 7.1. Estructuras y tiempos de retención de patrones ( $t_R$ ) en minutos.

Compuestos puros						$t_R$ (min)	
Dihidro benzofuranos	1. tremetona					4,53	
	2. 6-metoxitremetona					4,71	
	3. 10,12-dihidroxitremetona					4,16	
Benzofuranos	4. Euparona					9,15	
	5. 6-metoxieuparona					7,52	
Cromenos	6. Encecalina					19,90	
	7. Encecalol metil eter					19,70	
flavononoles		$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$		
	8. glepidolina B	Prenilo	H	H	H		19,00
	9. scariosina	Prenilo	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OH		22,00
	10. 8-prenil-3,5,7-trihydroxy, 3',4'-dimetoxi-flavona	Prenilo	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		13,00
	11. pinobanksina	H	H	H	H		5,90



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>			
<b>Flavanonas</b>	12. 8-prenilnaringenina	OH	H	H	OH		11,30
	13. 8-prenileriodictiol	OH	H	OH	OH		10,54
	14. exiguaflavanona K	OH	H	OCH <sub>3</sub>	OH		11,18
	15. glabranina	OH	H	H	H		12,82
	16. (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona						
17. (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona						4,93	
18. (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-5,7,3',4'-trihidroxi-flavanona						5,91	
19. (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,4'-trihidroxi-flavanona						5,88	
<b>Flavonas</b>	20. 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi-flavona						18,00
	21. 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxi-flavona						9,66
<b>Otros</b>	22. Escopoletina						4,40
	23. isosalantolactone						3,40

### 7.2.1 Análisis de los tiempos de retención de los compuestos puros

En la **Tabla 7.1** se observa que, dentro del grupo de los dihidrobenzofuranos, el compuesto **3** presenta un menor tiempo de retención ( $t_R$ : 4,16 min), probablemente debido a la presencia de dos grupos OH en la cadena sobre C-2 que harían al compuesto **3** más polar que **1** (4,53 min) y **2** (4,71 min).

Los benzofuranos **4** y **5** presentan  $t_R$  con buena resolución, ya que el compuesto **4** al tener un grupo hidroxilo presenta un  $t_R$  mayor, posiblemente debido a la formación de enlace puente hidrógeno intramolecular. Los cromenos **6** y **7** presentan el mismo  $t_R$ .

Los dihidroflavonoles utilizados en este estudio presentan una sustitución de grupo prenilo en C-8, los  $t_R$  tienen valores comparables, excepto pinobanksina (**11**) que no posee la cadena lateral.

Las flavanonas **12** a **15** están sustituidas con un resto isoprenilo en C-8 y un grupo OH en C-5. El 8-prenil-eriodictiol es el compuesto más polar de estas flavanonas, ya que presenta mayor cantidad de grupos OH en su estructura, teniendo menor  $t_R$ .

Las flavanonas **17** a **19** presentan en C-8 una cadena de isoprenilo oxidada y los compuestos **16**, **17** y **19** no poseen el característico grupo 5-OH. Dentro de este grupo se observa que el compuesto **16** tiene el mayor  $t_R$ , debido a que es el menos polar.

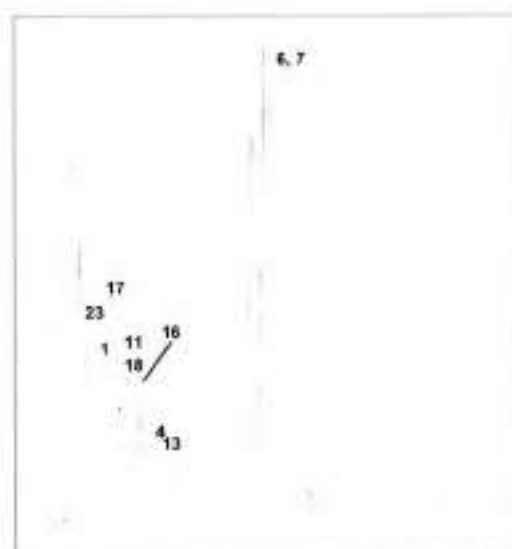
Se utilizaron, además, durante este análisis las flavonas **20** y **21**; y los derivados de la ruta del mevalonato, **22** y **23**.

### 7.2.2 Análisis de los sub-extractos

Los sub-extractos se prepararon en una concentración de 0,05 mg/mL con el fin de realizar una estimación del porcentaje de un determinado compuesto presente en los mismos. La distribución de los compuestos puros en los diferentes sub-extractos y el porcentaje estimado, se muestra en la **Tabla 7.2**.

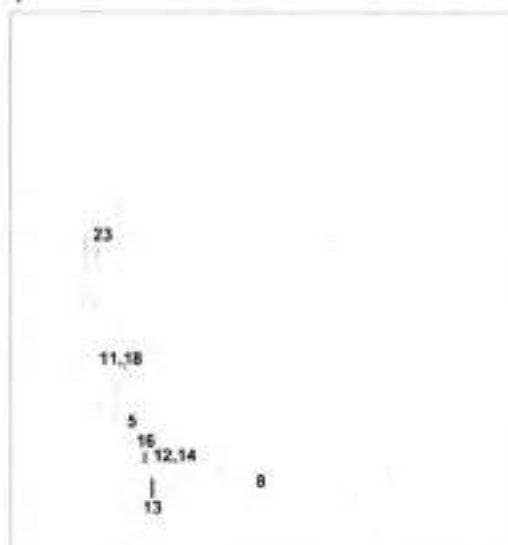
En primer lugar, se comparan los sub-extractos etílicos de *F. riparia* y *F. febriglia*. En el cromatograma de EER (**Figura 7.1**), se identificaron tremetona (**1**), euparona (**4**), pinobanksina (**11**), 8-prenileriodictiol (**13**), las flavanonas 5-desoxi **16** y **17**, y (2S)-8-(3°-metil-4°-hidroxi-but-2°-enil)-5,7,3',4'-trihidroxi-flavanona (**18**). Se

observa un pico ancho probablemente por la superposición de los cromenos enecalina **6** y enecalol metileter **7** con un  $t_R$  de 20,1 min, con un elevado porcentaje dentro del extracto (30,1 %).



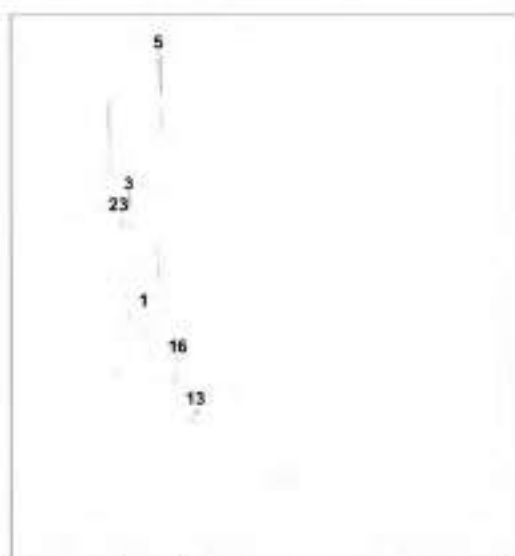
**Figura 7.1** Cromatograma de sub-extracto de éter etílico de *F. riparia* (EER)

En el cromatograma de EEF (**Figura 7.2**) se determinó la presencia de los compuestos: 6-metoxieuparona (**5**), glepidoptina B (**8**), pinobanksina (**11**), 8-prenilnaringenina (**12**), exiguaflavanona K (**14**), las flavanonas 5-desoxi **16** y **18**, e isoalantolactona (**23**).



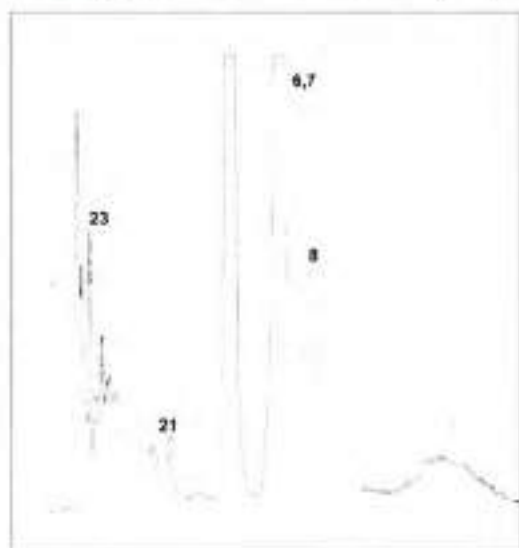
**Figura 7.2** Cromatograma de sub-extracto de éter etílico de *F. fiebrigii* (EEF)

En segundo lugar se comparan los sub-extractos clorofórmicos de *F. campestris* y *F. tortuosa*. En el extracto **ECC** se observan los picos correspondientes a tremetona (**1**), 10,12-dihidroxitremetona (**3**), 6-metoxieuparona (**5**), (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxiflavanona (**16**) e isoalantolactona (**23**) (**Figura 7.3**).



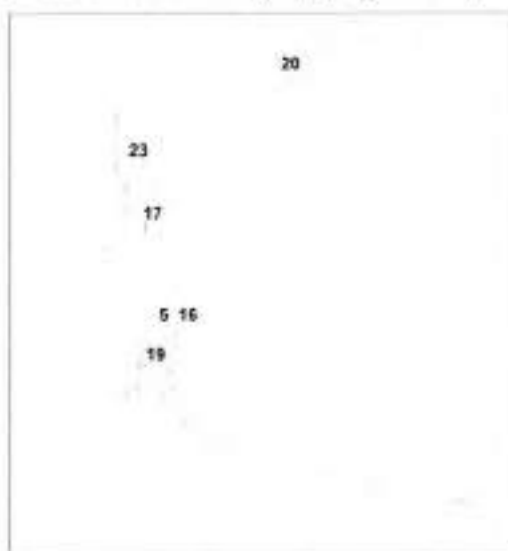
**Figura 7.3** Cromatograma de sub-extracto de cloroformo de *F. campestris* (**ECC**)

En el sub-extracto de  $\text{CHCl}_3$  de *F. tortuosa* (**E10**), se determinó la presencia de 6-metoxieuparona (**5**), enecalina (**6**), enecalol metil éter (**7**), glepidoptina B (**8**), 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxiflavona (**21**) e isoalantolactona (**23**). (**Figura 7.4**).



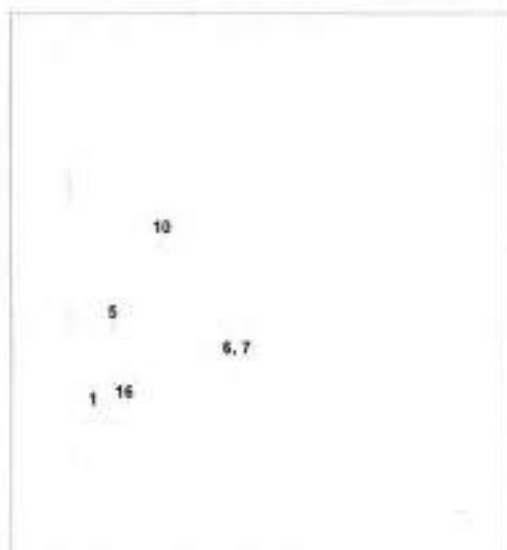
**Figura 7.4** Cromatograma de sub-extracto de cloroformo de *F. tortuosa* (**E10**)

Finalmente se analizan los cromatogramas de los sub-extractos hexánicos de *F. riparia*, *F. campestris* y *F. tortuosa*. En el **EHR** se identificaron 6-metoxieuparona (**5**), las flavanonas 5-desoxi (**16**), (**17**), (**19**), 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxiflavona (**20**), e isocalantolactona (**23**). (**Figura 7.5**).



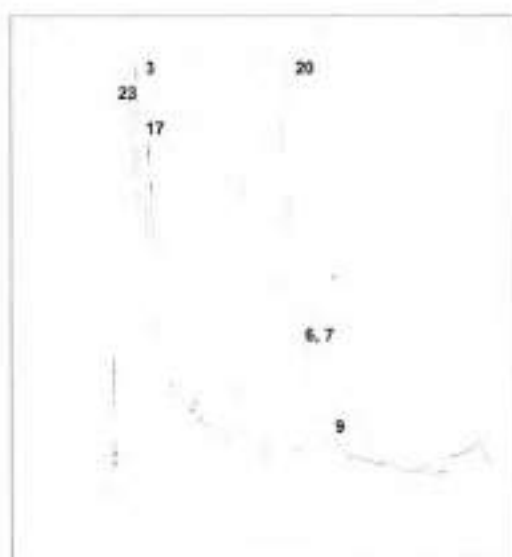
**Figura 7.5** Cromatograma de sub-extracto de hexano de *F. riparia* (**EHR**)

En el sub-extracto **EHC** se observan los picos correspondientes a tremetona (**1**), 6-metoxieuparona (**5**), encecalina (**6**), encecalol metil éter (**7**), 8-prenil-3,5,7-trihidroxi,3',4'-dimetoxi-flavona (**10**), (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxiflavanona (**16**) (**Figura 7.6**).



**Figura 7.6** Cromatograma de sub-extracto de hexano de *F. campestris* (**EHC**)

En el sub-extracto **EHT** se identificaron 10,12-dihidroxitretona (**3**), enecalina (**6**), enecalol metil éter (**7**), scariosina (**9**), pinobanksina (**11**), (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona (**17**), (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-5,7,3',4'-trihidroxi-flavanona (**18**), 8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,4'-trihidroxi-flavanona (**19**) y 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona (**20**). Los compuestos **11**, **17**, **18** y **19** tienen  $t_R$  parecidos y aparecen dentro de una señal ancha. (**Figura 7.7**).



**Figura 7.7** Cromatograma de sub-extracto de hexano de *F. tortuosa* (**E9**)

### 7.3 Discusión

El sub-extracto clorofórmico de *F. tortuosa* dió como resultado la identificación de seis compuestos adicionales: 6-metoxieuparona (**5**), enecalina (**6**), enecalol metil éter (**7**), glepidoptina B (**8**), 5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxiflavona (**21**) e isoalantolactona (**23**), a los diez informados en el **Capítulo 4, Figura 4.1** (compuestos **4.1** a **4.10**).

El análisis comparativo de los sub-extractos de hexano que no habían sido estudiados previamente por métodos clásicos de cromatografía; permitió identificar

en todos ellos la presencia de los grupos de compuestos informados para *Flourensia*: dihidrobenzofuranos, benzofuranos, cromenos, dihidroflavonoles, flavanonas; entre otros.

Por esta técnica se determinó la presencia de los compuestos enecalina (**6**) y enecalol metil éter (**7**) en todos los sub-extractos que fueron más activos frente a *B. cereus* (**EHT**, **ECT**, **ECR** y **EHC**, en orden decreciente de actividad, **Tabla 7.2**). Siendo los extractos de *F. tortuosa* los de mayor actividad, se podría suponer que 7-*O*-dimetil-alil-escopoletina (**4.9**) y 2-acetil-6-metoxibenzofurano (**4.8**), identificados en esta especie, serían los responsables del efecto de actividad frente a *B. cereus*, ya que estos compuestos no han sido informados en otras especies de *Flourensia*. Hasta el momento, este análisis no pudo realizarse en esta etapa por la escasa cantidad de masa aislada de estos compuestos.

El análisis por CLAR de los sub-extractos éter etílico de *F. riparia* y *F. fiebrigii*, que presentaron efecto inhibitorio frente a *P. larvae* (**Tabla 6.6** y **6.7**), mostró la presencia de los compuestos que resultaron activos: 8-prenileriodictiol (**13**), exiguaflavanona K (**14**) y (2*S*)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxiflavanona (**16**) en los dos extractos. La actividad positiva frente a *P. larvae* del extracto Hexano de *F. riparia*, puede deberse a la presencia del compuesto **16**, también determinado por CLAR. Se puede concluir que los compuestos activos están presentes en ambas especies.

Tabla 7.4 Compuestos puros presentes en extractos de diferentes polaridades obtenidos de distintas especies de *Flourensia*

Compuestos puros	Extracto éter etilico de <i>F.</i> <i>riparia</i> EER	Extracto éter etilico de <i>F.</i> <i>flebrigii</i> EEF	Extracto CHCl <sub>3</sub> , <i>F.</i> <i>campestris</i> ECC	Extracto CHCl <sub>3</sub> , <i>F.</i> <i>tortuosa</i> ECT	Extracto hexano <i>F.</i> <i>riparia</i> EHR	Extracto hexano <i>F.</i> <i>campestris</i> EHC	Extracto hexano <i>F.</i> <i>tortuosa</i> EHT
	% <sup>a</sup>	%	%	%	%	%	%
tremetona (1)	5,1	-	3,8	-	-	0,6	-
6-metoxitremetona (2)	-	-	-	-	-	-	-
10,12-dihidroxitremetona (3)	-	-	7,3	-	-	-	9,3
euparona (4)	1,2	-	-	-	-	-	-
6-metoxieuparona (5)	-	0,3	14,8	0,1	1,3	5,8	-
encecalina (6)	30,1	-	-	7,2	-	5,5	5,4
encecalol metil éter (7)	30,1	-	-	7,2	-	5,5	5,4
glepidotina B (8)	-	0,5	-	39,2	-	-	-
scarlosina (9)	-	-	-	-	-	-	0,2
8-prenil-3,5,7-trihidroxi-3',4'-dimetoxi-flavona (10)	-	-	-	-	-	2,5	-
pinobanksina (11)	8,7	3,4	-	-	-	-	2,8
8-prenilnaringenina (12)	-	0,7	-	-	-	-	-
8-prenilerodictiol (13)	1,2	0,6	0,3	-	-	-	-
exiguaflavanona K (14)	-	0,6	-	-	-	-	-
glabranina (15)	-	-	-	-	-	-	-
(2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona (16)	2,9	0,6	4,0	-	3,6	2,9	-
(2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona (17)	5,4	-	-	-	1,3	-	1,6
(2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-5,7,3',4'-trihidroxi-flavanona (18)	8,7	3,4	-	-	-	-	2,8
8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,4'-trihidroxi-flavanona (19)	-	-	-	-	6,1	-	3,6
5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona (20)	-	-	-	-	31,3	-	13,7
5,7,4'-trihidroxi-3,6,3'-trimetoxi-flavona (21)	-	-	-	0,5	-	-	-
Escopoletina (22)	-	-	-	-	-	-	-
isoalantolactona (23)	5,3	24,0	4,4	0,8	3,0	-	-

<sup>a</sup> %: porcentaje estimado de compuesto puro en el extracto





# Conclusiones





En este trabajo de tesis se realizaron estudios fitoquímicos y de actividad antibacteriana de plantas pertenecientes a géneros de la familia Asteraceae: *Barnadesia*, *Wedelia* y *Flourensia* que crecen en el noroeste argentino.

### Estudio fitoquímico de *Barnadesia odorata*

Se realizó el estudio químico de *B. odorata* en diferentes estadios de crecimiento de la planta:

- En material vegetal estéril (hojas y tallos) con número de herbario **MCNS 9947** se aislaron e identificaron los triterpenos lupeol (**3.1**),  $\beta$ -amirina (**3.2**), ácido 4-metóxicinámico (**3.4**), un derivado del ácido coniferílico: 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (**3.5**). Del material vegetal **MCNS 11342** obtenido por otro método de extracción se determinó la presencia de apigenina (**3.6**) y apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido (**3.7**) y nuevamente **3.1** y **3.2**.
- De flores y tallos (**MCNS 10253**) se determinó la presencia del triterpeno acetato de lupeolo (**3.3**).

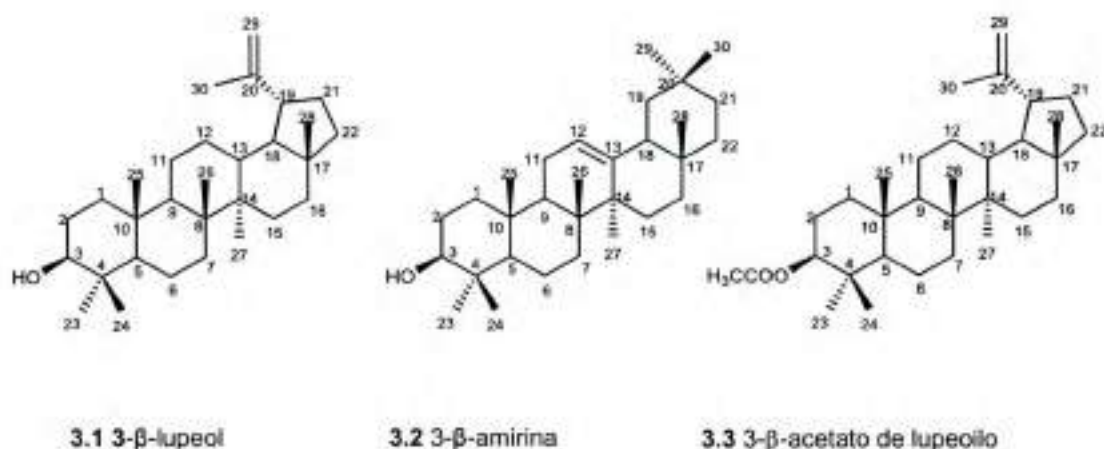
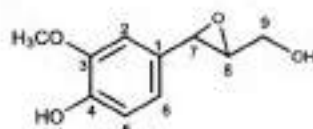


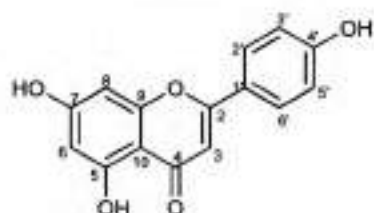
Figura 3.1 del Capítulo 3 Compuestos aislados de *B. odorata*



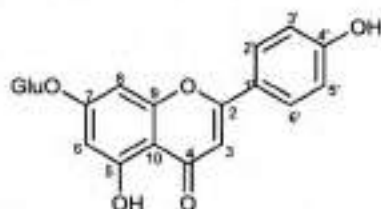
3.4 ácido 4-metoxicinámico



3.5 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol



3.6 apigenina



3.7 apigenina-7-O-β-glucósido

**Figura 3.1 del Capítulo 3** Compuestos aislados de *B. odorata* (continuación)

Las muestras de material vegetal estéril extraídos con diferentes métodos, no presentan una diferencia significativa en el tipo de productos obtenidos; por lo que no se puede concluir que uno sea más conveniente que otro.

El compuesto 3-metoxi-4-hidroxi-fenilpropano-7,8-epoxi-9-ol (3.5) no presenta antecedentes en bibliografía, por lo que se trataría de un compuesto de estructura novedosa.

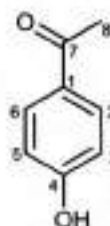
Se realizó modelado molecular de 3.5 empleando métodos de dinámica molecular, en donde se observan que los valores de las constantes de acoplamiento  $J_{7-8}$  y  $J_{8-9b}$  es coincidente con los valores calculados para uno de los isómeros *cis*, por lo que se propone para este compuesto la configuración 7*R*,8*S*.

El estudio fitoquímico de *B. odorata* revela que los metabolitos aislados no se informaron en otras especies de *Barnadesia*, lo cual es un aporte químico

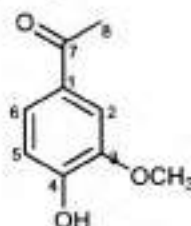
dentro del género. Cabe recordar que en estudios previos en otras especies de este género (Bhom & Stuessy ,1995; Mendiando et al., 1997) se informaron flavonoides, pero en ningún caso apigenina (3.6) y apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido (3.7) compuestos aislados en este trabajo de tesis

### Estudio fitoquímico de *Flourensia tortuosa*

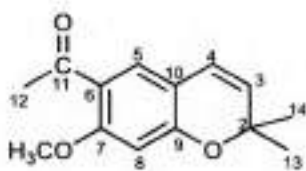
Mediante el estudio fitoquímico de las partes aéreas de *Flourensia tortuosa*, recolectada en la Provincia de Catamarca, se aislaron e identificaron 4-hidroxiacetofenona (**4.1**), 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona (**4.2**), enecalina (**4.3**), 2,2-dimetil cromeno (**4.4**), tremetona (**4.5**), metoxitremetona (**4.6**), 2,5-diacetilbenzofurano (**4.7**), 2-acetil-6-metoxibenzofurano (**4.8**), escopoletina (**4.9**) y 2-metil-2,3,4-ácido trihidroxibutanoico-1,4-lactona (**4.10**).



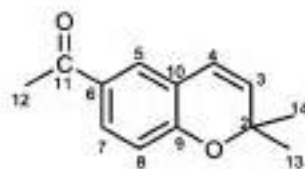
**4.1** 4-hidroxiacetofenona



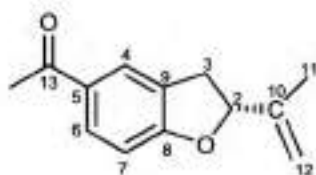
**4.2** 3-metoxi-4-hidroxiacetofenona



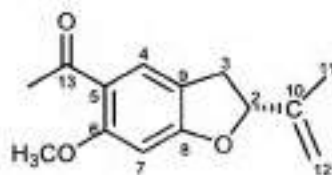
**4.3** enecalina



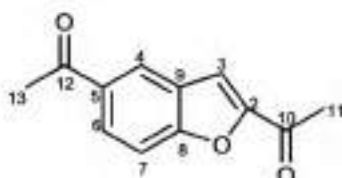
**4.4** 2,2 dimetilcromeno



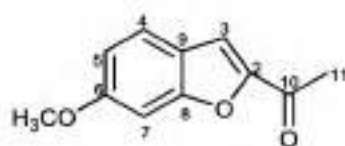
**4.5** tremetona



**4.6** metoxitremetona

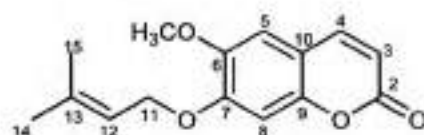


**4.7** 2,5 diacetilbenzofurano

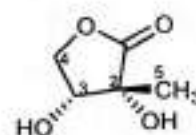


**4.8** 2-acetil-6-metoxibenzofurano

**Figura 4.1 del Capítulo 4** Compuestos aislados de *F. tortuosa*



4.9 7-O-dimetil-alilescofetina



4.10 2-C-metil-D-treono-1,4-lactona

**Figura 4.1 del Capítulo 4** continuación, Compuestos aislados de *F. tortuosa* (continuación)

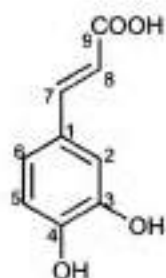
Luego de una extensa búsqueda bibliográfica se concluye que el compuesto 2-acetil-6-metoxibenzofurano (**4.8**), no ha sido aislado hasta el momento como producto natural. A pesar que el resto de compuestos identificados en este estudio ya fueron reportados para el género *Flourensia*, los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un aporte al perfil de compuestos presentes en especies del género *Flourensia*.

Dillon (1984) relacionó a *F. tortuosa* con *F. suffrutensces*, *F. macroligulata* y *F. oolepis* desde el punto de vista morfológico. De estas especies solo *F. oolepis* fue estudiada químicamente, informándose compuestos que no fueron aislados en este trabajo de tesis en la especie en estudio. Con los resultados obtenidos se puede relacionar, desde el punto de vista químico a *F. tortuosa* con *F. riparia*.

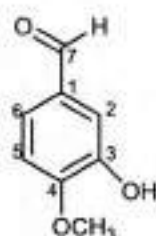


### Estudio fitoquímico de *Wedelia aurantiaca*

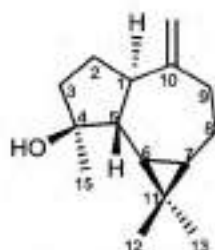
Se estudiaron las partes aéreas de *W. aurantiaca*, recolectada en la Provincia de Salta. Se aislaron ácido cafeico (3,4-dihidroxicinámico) (5.1) y 3-hidroxi-4-metoxibenzaldehído (5.2) y (+)-espatulenol (5.3).



5.1 3,4-dihidroxicinámico



5.2 3-hidroxi-4metoxi benzaldehído

5.3 11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendrano

**Figura 5.1 del Capítulo 5** Compuestos aislados de *W. aurantiaca*

Los compuestos aislados en este trabajo de tesis son los primeros descritos para *W. aurantiaca*. Sería necesario seguir con la investigación sobre ésta y otras especies del género, con el fin de obtener un panorama más amplio sobre el metabolismo secundario de este taxón; y así poder encontrar marcadores quimiotaxonómicos que permitan corroborar la sinonimia de *Aspilia* bajo *Wedelia* no sólo morfológicamente sino también químicamente.

Con el estudio fitoquímico realizado no se pudo detectar la presencia de eudesmanos con el grupo metilo de C-10 en posición  $\alpha$ , los cuales podrían haber aportado datos para relacionar este género con *Flourensia*. La presencia de este tipo de metabolitos también informados en *Aspilia*, *Steiractinia*, *Zexmenia* y *Zinnia*, géneros de la subtribu Ecliptinae, podrían servir como marcadores para relacionar a *Wedelia* con *Flourensia* según la propuesta de Bohlmann (1990).

## Actividad biológica

Se realizó el estudio de actividad antimicrobiana *in vitro* de diferentes extractos de *B. odorata*, *F. tortuosa* y *W. aurantiaca* frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.

En *B. odorata* se observó que el sub-extracto de hexano **E2** presenta mayor efecto inhibitorio frente a bacterias Gram-positivas (**Tabla 6.1**) y es el único de los sub-extractos estudiados que presenta efecto inhibitorio frente a una cepa Gram-negativa: *Salmonella* Typhimurium, a una concentración de 30000 ppm (**Tabla 6.2**). Este resultado es de interés ya que muy pocos productos naturales inhiben a bacterias Gram-negativas.

Los diferentes sub-extractos de *B. odorata* también fueron analizados mediante la técnica de Bioautografía. En el sub-extracto hexano **E2** se observó que un compuesto con una relación de solvente alto ( $R_f$  alto) podría ser el causante de la actividad antibacteriana del extracto frente a *B. cereus*, en cambio en el extracto **E7** el compuesto activo se encuentra en una  $R_f$  más baja, los cuales no han sido identificados. El uso de dos técnicas diferentes que se aplicaron a los extractos, como son la bioautografía y la difusión en disco, dieron resultados comparables a pesar del gran número de variables involucradas (Cushnie et al., 2005).

Mediante la determinación de la Concentración inhibitoria mínima se estableció que **E2** es activo frente a diferentes cepas de *B. cereus* hasta una concentración de 500 ppm (**Tabla 6.3**). Lamentablemente, el compuesto puro aislado de **E2** (ácido 4-metoxicinámico, **3.4**) no se probó por su escasa masa para las pruebas como se aclara en el ítem **6.2**, del **Capítulo 6**.

El compuesto apigenina-7-O- $\beta$ -glucósido (**3.7**), aislado del extracto **E7** presenta actividad inhibitoria frente a cepas de *B. cereus*, por lo que se podría indicar que este compuesto es el causante del efecto antimicrobiano que se observa en dicho sub-extracto.

En cuanto al estudio de actividad antimicrobiana de *F. tortuosa*, los resultados muestran que los extractos de esta especie (**E9**: hexano y **E10**: cloroformo) presentan un efecto antibacteriano similar frente a diferentes cepas de *B. cereus*, *B. subtilis* y *S. aureus*, sólo **E10** exhibe una leve inhibición sobre *L. monocytogenes* 01/155 (**Tabla 6.4**). En orden decreciente de actividad, le siguen extractos de otras especies de *Flourensia* como los sub-extractos clorofórmico de *F. riparia* (**ECR**) y hexano de *F. campestris* (**EHC**).

Se evaluó también la actividad inhibitoria frente a cuatro cepas de *Paenibacillus larvae*, (**Tabla 6.6**). Todos los extractos inhibieron en distinto grado algunas de las cepas ensayadas. Los extractos más activos en orden decreciente de actividad fueron **ECR > EER > E9 = E10 = EHF > EEF**.

En el sub-extracto **ECR** se identificaron Exiguaflavanona K (**1.97**) y 8-prenilhidroisoramnetina (**1.109**) los cuales resultaron activos frente a dos cepas de *P. larvae* ensayadas (**Tabla 6.8**). Le siguen en orden de actividad los extractos *F. tortuosa*, cuyos componentes puros no fueron ensayados. A partir del sub-extracto **EEF** se identificaron los compuestos 8-prenileriodictiol (**1.96**) y (2*S*)-8-(3'-metilbut-2'-enyl)-7,3',4'-trihidroxiflavanona (**1.101**) que presentan actividad (**Tabla 6.8**). También se observaron resultados positivos, pero con menor efecto inhibitorio (**Tabla 6.8**) para los compuestos 6-metoxitremetona (**1.40**) y 5,3'-dihidroxiisobavachin-7-*O*-metil éter (**1.88**), ambos identificados en **ECR** y **EEF**.

El efecto inhibitorio de *W. aurantica* frente a bacterias Gram-positivas (**Tabla 6.9**) y Gram-negativas es bajo, con un halo de inhibición leve sobre *Bacillus* spp. y *S. aureus*.

En función de los resultados obtenidos el efecto inhibitorio que presentan todos los extractos estudiados sobre bacterias patógenas de importancia clínica para el ser humano y desde el punto de vista de la inocuidad de alimentos, permite sugerir que estos extractos podrían tener un uso potencial como bioprotectores.

### Cromatografía líquida de alta resolución

La comparación de los extractos de cuatro especies del género *Flourensia*: *F. tortuosa*, *F. campestris*, *F. fiebriggi* y *F. riparia*, logró establecer una composición química uniforme del género, compuesta por dihidrobenzofuranos (1-3), benzofuranos (4 y 5), cromenos (6 y 7), dihidroflavonoles (8-11), flavanonas (12-15) (Tabla 7.1), entre estos dos últimos grupos, algunos prenilados pueden servir como marcadores quimiotaxonómicos del género (Bolhmann, 1990). En todas las especies se determinaron 5-desoxi compuestos (16-20) que son comunes en la Familia Leguminosae, con algunos compuestos informados para la Familia Asteraceae (Uriburu et al, 2007) y desde el punto de vista de la biosíntesis no es común la ausencia del grupo 5-hidroxilo en flavonoides (Dewick, 1977).

Es de destacar que mediante esta técnica se pudo hacer un análisis químico de extractos que no habían sido estudiados previamente por métodos clásicos de cromatografía, como son los extractos de hexano; en todos ellos fue posible determinar la presencia de los grupos de compuestos antes mencionados (tremetona (1), 10,12-dihidroxitremetona (3), 6-metoxiuparona (5), enecalina (6), enecalol metil éter (7), scariosina (9), 8-prenil-3,5,7-trihidroxi,3',4'-dimetoxi-flavona (10), pinobanksina (11), (2S)-8-(3"-metilbut-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona (16), (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,3',4'-trihidroxi-flavanona (17), (2S)-8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-5,7,3',4'-trihidroxi-flavanona (18), 8-(3"-metil-4"-hidroxi-but-2"-enil)-7,4'-trihidroxi-flavanona (19), 5,6-dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona (20) e isoalantolactona (23), Capítulo 7, Tabla 7.2).

Se completó el estudio del extracto clorofórmico de *F. tortuosa* abordado en este trabajo de tesis, que dio como resultado la identificación de seis compuestos adicionales: 6-metoxieuparona (5), enecalina (6), enecalol metil éter (7),

glepidoptina B (8), 5,7,4'- trihidroxi-3,6,3'trimetoxiflavona (21) e isoalantolactona (23) (Capítulo 7, Tabla 7.2).

El análisis por CLAR de los sub-extractos de especies de *Flourensia* permitió hacer una comparación de la composición química e inferir algunas relaciones de esta composición con la actividad antibacteriana que presentaron estos extractos frente a *B. cereus* y *P.larvae*.

La técnica de CLAR es una manera conveniente para llevar a cabo la comparación de extractos y, si se dispone de patrones, es una metodología rápida para realizar la identificación de compuestos. Como proyección a los estudios presentados, se propone incrementar el número de compuestos testigo para lograr la identificación de todos los picos en los cromatogramas obtenidos.

**Bibliografía**

- Adams, R.P., Zanoni, T., van Beek, T., Posthumus, M.A., van de Haar, C. 1998. Essential leaf oil of *Amyrisdiatrypa sprengel* from the Dominican Republic. *J. Essent Oil Res.*, **10**:170-175.
- Adams, R.P. 2001. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publ. Corp., Carol Stream, I.L.
- Andrade, E.H., Santos, A.S., Zoghbi, M., Maia, J.G. 1998. Essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *P. regnellii* (MIQ)CDC. *J. Essent Oil Res.*, **10**: 465-467.
- Alcaráz, L.E., Blanco, S.E., Puig, O.N., Tomad, F., Ferretti, F.H., 2000. Antibacterial activity of flavonoids against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Bio.l.*, **205**: 231-240.
- Antúnez, K., Harriet, J., Gende, L., Maggi, M., Eguaras, M., Zunino, P., 2008. Efficacy of natural propolis extract in the control of American Foulbrood. *Vet. Microbiol.*, **131**: 324-331.
- Alwahsh, M.A.A., Khairuddean, M., Chong, W.K (2015). Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschrs. *Rec. Nat. Prod.*, **9**:159-163.
- Ariza Espinar, L. 2000. Tribu Heliantheae. Prodrómo de la Flora Fanerógámica de Argentina Central, **2**: 1-111.
- Bellini, A.A., Camilo, D., de Oliveira, R., Vichnewski, W., 1999. Steroidal saponin, 7-oxostigmasterol and diterpenes from *Aspilia montevidensis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, **27**: 317-319.
- Bjeldanes, L.F., Geissman, T.A., 1969. Euparinoid constituents of *Encelia californica*. *Phytochemistry*, **8**: 1293-1296.
- Bohlmann, F., Burkhardt, T., Zdero, C., 1973. Naturally occurring acetylenes. Academic Press. London.
- Bohlmann, F., Grenz, M. 1977a. Über Inhaltsstoffe der Gattung *Flourensia*. *Chem. Ber.*, **110**: 295-300.

- Bohlmann, F.; Mahanta, P.K.; Suwita, A.; Natu, A.A.; Zdero, C.; Dorner, W.; Ehlers, D.; Grenz, M.; 1977b. "Neue sesquiterpenlactone und andere inhaltsstoffe aus vertretern der *Eupatorium* gruppe". *Phytochemistry*, **16**: 1973-1981.
- Bohlmann, F., Jakupovic, J. 1979. Neue sesquiterpene, triterpene, flavanone und andere aromatische verbindungen aus *Flourensia heterolepis*. *Phytochemistry*, **18**: 1189–1194.
- Bohlmann, F., Knoll, K.H., Robinson, H., King, R.M. 1980. *Neue eudesmonolide aus Steriactinia mollis*. *Phytochemistry*, **19**: 971.
- Bohlmann, F., Ziesche, J., King, R.M., Robinson, H. 1981. Eudesmanolides and diterpenes from *Wedelia trilobata* and an *ent*-kaurenic acid derivative from *Aspilia parvifolia*. *Phytochemistry*, **20**: 751.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R.M., Robinson, H. 1982. Eudesmanolides and kaurene derivatives from *Wedelia hookeriana*. *Phytochemistry*, **21**: 2329.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Jakupovic, J., Ates (Gdren) N., King R.M., Robinson, H. 1983. Steriactinolide aus *Aspilia* und *Wedeb.* Arten. *Liebigs Ann. Chem.*, **2**: 1257-1266
- Bohlmann, F., Jakupovic, J., Schuster, A., King, R.M., Robinson, H. 1984a. Eudesmanolides and costic acid derivatives from *Flourensia macrophylla*. *Phytochemistry*, **23**: 1445–1448.
- Bohlmann, F., Gerke, T., Jakupovic, J., Borthaukur, N.; King, R.M.; Robinson, H. 1984b. Diterpene lactones and other constituents from *Wedelia* and *Aspilia* species. *Phytochemistry*, **23**: 1673-1676.
- Bohlmann, F. 1990. Chemistry of Heliantheae (Compositae). *Pl. Syst.Evol.*, **4**: 67-75.
- Bohm, B.A.; Stuessy, T.F. 1995. Flavonoid chemistry of Barnadesioideae (Asteraceae). *Systematic Botany*, **20**: 22-27.
- Bremer, K. 1994. Asteraceae Cladistics and Classification. Timber Press Inc., Portland, Oregon.
- Breitmaier, E. 2001. Structure elucidation by NMR in Organic Chemistry: A practical Guide. John Wiley & Sons, Ltd.



- Butler M.S. 2004. The Role Of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *J. Nat. Prod.*, **67**: 2141-2153.
- Cabrera, A. L. 1963. *Compositae. Flora Prov. Buenos Aires, Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.*, **4(6a)**: 1-443.
- Cabrera, A. L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, **14**: 1-42.
- Cabrera, A. L. 1974. *Compositae. Flora. II. Entre Rios. Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropec.*, **6**: 106-554.
- Cabrera, A. L. 1978. *Compositae, Flora. Prov. Jujuy, Colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropec.*, **13**: 1-726.
- Cabrera, A. L., Freire, S. E., Ariza Espinar, L. 1999. Asteraceae, parte 13. Tribu VIII. Senecioneae. Tribu VIII bis. Liabeae, *Flora Fanerogámica Argentina*, **62**: 3-180.
- Cabrera A.L.; Zardini, E.M., 1978. Manual de la flora de los alrededores de Bs. As. Segunda Edición, Ed. ACME, Bs. As.
- Cardellina, J.H. 1988. In Potential Use in Agriculture (Cutler H.G. ed.), ACS Symposium Series, **380**: .305. Washington D.C.
- Carrizo Flores, R.; Vaca, L.; Donade, O.; Laciari, A., Tonn, C. 2005. Antibacterial effect of *Baccharis salicifolia* and *Flourensia culepis* essential oils on *Listeria monocytogenes*. *Biocell*, **29**: 357-366.
- Castañeda, P., Gomez, L., Mata, R., 1996. Phyto-growth-inhibitory and antifungal constituents of *Helianthella quinquenervis*. *J. of Natural. Products.*, **59**: 323-326.
- Charles, A.K., Darbre, P.P. 2009. Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cell in vitro. *J. Appl. Toxicol.*, **29**: 422-432.
- Chomnawang M.T., Surassmo S., Nukoolkarn V.S., Gritsanapan W. 2005. Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria. *J. of Ethnopharmacol.*, **101**: 330-333.
- Comte G.; Vercauteren, J.; Chulia, A.J.; Allais, D.P.; Delage, C.; 1997. Phenylpropanoids from leaves of *Juniperus phoenicea*. *Phytochemistry*, **45**: 1679-1682.

- Christian, A.G.; Dick, E.A.; Mfon, A.G.; David-Oku, E.; Linus, A.J.; Chukwuma, E.B. 2012. Antimalarial potency of the leaf extract of *Aspilia africana* (Pers.) C.D. Adams. *Asian Pacific J. Trop. Med.*, **5**: 126-129.
- Cueva, C., Moreno-Arribas, M., Martín-Alvarez, P. J., Bills, G., Vicente, M. F., Basilio, A. 2010. Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria. *Research in Microbiology*, **161**: 372-382.
- Curtis, T.; Williams, D.G. 2009. An Introduction to Perfumery. 2<sup>nd</sup> Edition.
- Ciocan, I. D., & Bara, I. 2007. Plant products as antimicrobial agents. Universitatii Ale Satiintifice. Analele Alexandru Ioan Cuza. Tom VIII.
- Cushnie T.P, Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **26**: 343-356.
- Dai, J., Zhu, L., Yang, L., Qiu, J. 2013. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil from *Wedelia prostrata*. *EXCLI Journal*, **12**: 479-490.
- De la Fuente, J.R.; Novara, L.; Alarcón, S.R.; Díaz, O.J.; Uriburu, M.L.; Sosa, V.E. 1997. Chemotaxonomy of Parthenium: *P.hysterophorus*, *P. glomeratum*. *Phytochemistry*, **45**: 1185-1188.
- Delbón, N., Teresa, M., Bernardello, G. 2012. Exomorfología y anatomía de órganos vegetativos aéreos en especies de *Flourensia* DC (Asteraceae) con importancia fitoquímica. *Acta Bot. Brasilica*, **26**: 2-10.
- Dewick P. M., "Medicinal Natural Products- A Biosynthetic Approach". 1977. John Wiley and Sons, N.Y.
- Diaz Napal, G.N., Carpinella, M.C., Palacios, S.M. 2009. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. *Biores. Technol.*, **100**: 3669-3673.
- Diaz Napal, G. N., Palacios S. M. (2013) Phytotoxicity of Secondary Metabolites Isolated from *Flourensia oolepis* S.F.Blake. *Chem. Biodiv.*, **10**: 1295-1304.
- Di Giacomo, A. 1981. Química y Tecnología de los *Citrus* y sus derivados. PNAYS, CONICET, Universidad Nacional del Litoral, Argentina. *Bioresour. Technol.*, **100**: 3669-3673.

- Dillon M. O., Mabry T. J., Besson E., Bouillant M. L., Chopin J. (1976) New flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **15**: 1085–1086.
- Dillon M. O., Mabry T. J., 1977. Flavonoid Aglycones From *Flourensia*. *Phytochemistry*, **16**: 1318-1319.
- Dillon, M. 1984. A systematic study of *Flourensia* (Asteraceae, Heliantheae). *Fieldiana Bot.*, **16**: 1–66.
- Dingman, D.W., Stahly, D.P., 1983. Medium promoting sporulation of *Bacillus larvae* and metabolism of medium components. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 860–869.
- Donadel, O.; Guerreiro, E.; Wendel, M.; Enriz, G.; Guiordano, R., Tonn, C. 2005. Gastric cytoprotective activity of illicic aldehyde: Structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**: 547-550.
- Estell, R.E., Fredrickson, E.L., Havstad, K.M., 1996. Chemical composition of *Flourensia cernua* at four growth stages. *Grass and Forage Science*, **51**: 434–441.
- Faini F, Labbe, C. Salgado I., Coll J. 1997. Chemistry, Toxicity and Antifeedant Activity of the Resin of *Flourensia thurifera*. *Biochem. System. Ecol.*, **25**: 189-193.
- Fredrickson E., Thilsted J., Estell R., Havstad K., 1994. Effect of chronic ingestion of tarbush (*Flourensia cernua*) on ewe lambs. *Vet. Human Toxicol.*, **36**: 409-415.
- Freire, S. E. (coord.) 2014. Asteraceae. En Zuloaga, F.O., Belgrano, M.J. & Anton, A. M. (eds.), *Flora Argentina*, **7**: 1-546.
- Ford, C.W. 1981. A new lactone from water-stressed chickpea. *Phytochemistry*, **20**: 2019-2020.
- Fotie, J., Bhole, S.D., Leimanis, M.L., Georges, E., Rukunga, G., Nkengfack, A.E. 2006. Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*. *J. of Nat. Prod.*, **69**: 62-67.
- Fournet, A., Barriosb, A.A., Muñiozb, A. 1994. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, **41**: 19–37.

- Funk, V.A., Bayer, R.J., Chan, R., Watson, L., Gemeinholzer, B., Schilling, E., Panero, J.L., Baldwin, B.G., García-Jacas, N., Susanna, A., Jansen, R., 2005. Everywhere but Antarctica: Using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biol. Skr.*, **55**: 343–374.
- Gamboa-Alvarado, R.; Hernandez-Castillo, F.; Gerrero-Rodrigues, E., Sanchez-Arizpe, A. 2003. Inhibición del crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn. y *Phytophthora infestans* Mont. (De Bary) con extractos vegetales metanólicos de Hojas en (*Flourensia cernua* DC.) Mejorana (*Origanum mejorana* L.) y Trompetilla (*Bouvardia ternifolia*). Schelecht. *Revista Mexicana de Fitopatología*, **21**: 13-18.
- Ganzer, U., Jakupovic, J., Bohlmann, F., King, R.M. 1992. A highly oxygenated germacrane from *Aspilia eonii* and Constituents from other *Aspilia* species. *Phytochemistry*, **31**: 209-212.
- García, M., Gonzalez-Coloma, A., Donadel, O.J., Ardanaz, C.E., Tonn, C.E., Sosa, M.E. 2007. Insecticidal effects of *Flourensia oolepis* Blake (Asteraceae) essential oil. *Biochem. Syst. Ecol.*, **35**: 181–187.
- Garg, S.N., Gupta, D., Jain, S.P. 2005. Volatile constituents of the aerial parts of *Wedelia chunensis* Merrill from the North Indian Plains. *Essential oil Res.*, **17**: 364-365.
- Gealt, M. A. 1983. Isolation of  $\beta$ -amyrin from the Fungus *Aspergillus nidulans*. *J. of General Microb.*, **129**: 543-546.
- Giardelli, M., Larralde de Luna, M. 2001. Comité Nacional de Dermatología Pediátrica. Pediculosis y Escabiosis. *Arch. Argent Pediatr.*, **99**: 68-74.
- Genersch, E. 2010. American Foulbrood in honeybees and its causative agent, *Paeni-bacillus* larvae. *J. Invertebr. Pathol.*, **103**: S10–S19
- Gonzales de la Cruz, M., Baldeón Malpartida, S., Beltrán Santiago, H., Jullian, V., Bourdy, G. 2014. Hot and cold: Medicinal plant uses in Quechua speaking communities in the high Andes (Callejón de Huaylas, Ancash, Perú). *J. Ethnopharmacol.* **155**, 1093–117.
- Gruenstaeudl, M., Urtubey, E., Jansen, R.K., Samuel, R., Barfuss, M.H.J., Stuessy, T.F. 2009. Phylogeny of Barnadesioideae (Asteraceae) inferred from DNA sequence data and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **51**: 572–87.

- Guerreiro E., Kavka J., Giordano O.S., Gros E.G. 1979. Sesquiterpenoids and Flavonoids from *Flourensia oolepis*. *Phytochemistry*, **18**: 1235-1237.
- Hanna, M.M., Nemetz, J. 1987. Studies on the anticoagulant action of *Aspilia africana*. *Thrombosis Res.*, **47**: 401-107.
- Harborne, J.B. 1994. The flavonoids. Advances in research since 1986. Chapman & Hall, London.
- Herz, W.; Bttat, S.V.; Santhanam, P.S. 1970. "Coumarins of *Artemisa dracunculoides* and 3', 6-dimethoxy-4'5,7-trihydroxyflavone in *A. artica*". *Phytochemistry*, **9**: 891-894.
- Herz, W.; Kulanthaivel, P. 1984. Ent-kauranes and 10 $\alpha$ -methyl-eudesman-8 $\alpha$ H,12-olides from *Wedelia calycina* and *Wedelia hispida*. *Phytochemistry*, **23**: 2271-2275.
- Herz, W.; Sosa, V.E. 1986. 10 $\alpha$ -methyl-eudesman-8 $\alpha$ H,12-olides and other constituents from *Wedelia pinetorum*. *Phytochemistry*, **25**: 1481-1483.
- Hotchkiss, D.J, y col.; Green aldose isomerisation: 2-C-methyl-1,4-lactones from reation of Amadori ketoses with calcium hudroxide. 2007. *Tetrahedron Letters*, **48**: 517-520.
- Jansen, R.K., Palmer, J.D. 1987. A chloroplast DNA inversion marks an ancient evolutionary split in the sunflower family (Asteraceae). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **84**: 5818-5822.
- Jansen, R.K., Palmer, J.D. 1988. Phylogenetic implications of chloroplast DNA restriction site variation in the Mutisieae (Asteraceae). *Amer. J. Bot.*, **75**: 753-766.
- Jasso de Rodríguez D., Hernández-Castillo D., Angulo-Sánchez J.L, Rodríguez-García R, Villarreal Quintanilla J.A., Lira-Saldivar R.H. 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Ind. Crops Prod.*, **25**: 111-116.
- Jennings, W., Shibamoto, T. 1980. Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volátiles by Capillary GC. Academic Press, New York.
- Jide, F.F., Abiodun, O.O. 2012. Evaluation of antioxidant and microbial activities of two isolates from *Aspilia africana* [Pers.] C.D. Adams. *J. of. Pharm*, **3**: 135-138.

- Joray, M.; del Rollán, M.; Ruiz, G.; Palacios, S., Carpinella, M. 2011. Antibacterial Activity of Extracts from Plants of Central Argentina—Isolation of an Active Principle from *Achyrocline satureioides*. *Planta Medica*, **77**: 95-100
- Katinas, L., Gutierrez, D.G., Grossi, M.A., Crisci, J. V. 2007. Panorama de la familia Asteraceae (=Compositae) en la República Argentina. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, **42**: 113–130.
- King, R.M., Robinson, H., 1970. The new synantherology. *Taxon*, **19**: 6-11.
- Kingston D.G.I., Rao M.M., Spittler T.D., Pettersen R.C., Cullen D.L. 1975 Sesquiterpenes from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **14**: 2033–2037.
- Krebs, H. C., Rakotoarimanga, V., Habermehl G. G. 1990. Isolation of Spatulenol and (-)-CaryophylleneOxide from *Vernonia mollissima* Don and <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Reassignment by Two-Dimensional NMR Spectroscopy. *Mag. Res. Chem*, **28**: :124-128.
- Lai, P., & Roy, J. 2004. Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*, **11**: 1451:1460.
- Macfoy, C.A., Cline, E.I. 1990. In vitro antibacterial activities of three plants used in traditional medicine in Sierra Leone. *J. Ethnopharm.*, **28**: 323-327.
- McVaugh, R. 1984. *Wedelia*, in *Flora. Novo-Galiciana*, **12**: 1080-1092.
- Mahady, G.B; Huang, G.; Doyle, B.J.; Locklear. T. 2008, Natural Products as Antibacterial Agents. *Studies in Natural Products Chemistry*. Ed. Atta-ur-Rahman, **35**: 423-444.
- Mahato, S.B., Kundu, A.P. 1994. <sup>13</sup>C NMR Spectra pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, **37**: 1517-1575.
- Mata R., Bye R., Linares E., Macías M., Rivero I., Pérez O., Timmermann B.N. 2003 Phytotoxic compounds from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **64**: 285-291.
- Mendez, M., Rodriguez, R., Ruiz, J., Morales Adame, D., Castillo, F., Hernández Castillo, F.D., Aguilar, C.N. 2012. Antibacterial activity of plant extracts obtained with alternative organics solvent againts food-borne pathogen bacteria. *Ind. Crops and Prod.*, **37**: 445-450.

- Mendiondo, M.E, Juárez, B.E., Seeligman, P. 1997. Flavonoid patterns of some Barnadesioideae (Asteraceae). Eventual chemosystematic significance. *Biochem. System. Ecol.*, **25**: 673-674.
- Molina-Salinas, G.; Ramos-Guerra, M.; Vargas-Villarreal, J.; Mata-Cárdenas, B.; Becerril-Montes, P., Said-Fernández, S. 2006. Bactericidal Activity of Organic Extracts from *Flourensia cernua* DC against Strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch.Med. Res.*, **37**: 45-49.
- Morris, K.F., Stilbs, P., Johnson, C.S. 1994. Analysis of Mixtures Based on Molecular Size and Hydrophobicity by Means of Diffusion-Ordered 2D NMR. *Analytical Chemistry*, **66**: 211-215.
- Musyimi, D.M., Ogur, J.A., Muema, P.M. 2008. Phytochemical compounds and antimicrobial activity of Extracts of *Aspilia* Plant. (*Aspilia mossambicensis*)[Oliv.] Wid. *Int. J. of Botany*, **4**: 56-61.
- Mutai C., Bii C., Vagias C., Abatis D., Roussis V. 2009. Antimicrobial activity of *Acacia mellifera* extracts and lupane triterpenes. *J. of Ethnopharmacology*, **123**: 143-148.
- NCCLS, 2000. Documento M2-A7: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 7° ed. NCCLS, Pennsylvania, EE UU.
- Negi, P. S. 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, **156**: 7:17.
- Novara, L.J. 1995. *Asteraceae* Bercht. & J. Presl-*Mutisieae* Cass., Flora del valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta, Ser. Flora.* 1-86.
- Novara, L.J. 2010. *Asteraceae* Bercht. & J. Presl- *Heliantheae* Cass., Flora del valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta, Ser. Flora.* 1-201.
- Nquelefack, T.B, Watcho, P., Wansi, S.L., Mbounh, N.M., Ngamga, D., Tane, P., Kamanyi, A. 2005. The antiulcer effects of the methanol extract of the leaves of *Aspilia africana* (Asteraceae) in rats. *Afr. J. Trad.*, **2**: 233-237.
- Newman D.J., Cragg G.M. 2007. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.*, **70**: 461-477.
- Okokon, J.E., Nwidw, L.L., Essiet, G.A. 2006. Evaluation of in vivo Antiplasmodial activity of *Aspilia africana*. *Int. J. of Pharm*, **2** : 348-351.

- Okoli, C.O., Akah, P.A., Nwafor, S.V., Anisiobi A.I., Ibegunam I.N., Erojikwe O. 2007. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia africana* C.D. Adams. *J. of Ethnopharmacol.*, **109**: 219–225
- Panero, J.L. 2005. New Combinations and infrafamilial taxa in the Asteraceae. *Phytologia*, **87**: 1–34.
- Panero, J.L., Funk, V.A. 2002. Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae). *Proc. Biol. Soc. Washingt.*, **115**: 909–922.
- Panero, J. L. Freire, S. E., Ariza Espinar, L., Crozier, B., Barboza, G. E. & Cantero, J. J. 2014. A new basal lineage and resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny to study early evolution of Asteraceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **80**: 43-53.
- Poiana, M., Sicari, V., Mincione, B. (1998). A comparison between the chemical composition of the oil, solvent extract and supercritical carbon dioxide extract of *Citrus medica* L. cv. Diamante. *J. of Essent. Oil Res.*, **10**: 145–152.
- Pouchert, C.J.; Behnke, J.; 1993. The Aldrich library of  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  FT NMR spectra. Aldrich Chemical Company, INC. Vol II.
- Ramidi, R., Ali, M., Velasco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M.J.1998. Chemical composition of the Seed Oil of *Zanthoxylum alatum* Roxb. *J. Essent. Oil Res.*, **10**: 127-130
- Rao M.M., Kingston D.G.I., Spittler T. D. (1970) Flavonoids from *Flourensia cernua*. *Phytochemistry*, **9**: 227–228.
- Regis, A., Pancorbo, J., Lanchipa, P., Regis R., Agüero, M. 2003. Tratamiento y reinfestación por escabiosis humana: estudio comparativo entrew permetrina al 5% vs benzoato de bencilo al 25%. *Dermatol. Perú*, **13**: 30-33.
- Reyes, M.G, Torres, M.J, Maggi, M.D, Marioli, J.M, Gil, R., Sosa, V:E,Uriburu, M.L., Audisio, M.C. 2013. In vitro inhibition of *Paenibacillus larvae* by different extracts and pure compounds from *Flourensia* spp. *Ind. Crops. Prod.*,**50**: 758-763.
- Robinson H. A. 1981. Revision of the Tribal and Subtribal Limits of the *Heliantheae* (Asteraceae). *Smithsonian Contributions to Botany*, **51**: 1-102.
- Robinson, H. 1984. Studies in the Heliantheae (Asteraceae). New species of *Aspilia* from Brazil. *Phytologia*, **56**: 262-286.



- Rodriguez Hahn, L., Rodriguez, J. 1973. Resinona, Un nuevo triterpeno aislado de *Flourensia resinosa*. *Rev. Latinoamer. Quim.*, **3**: 148-153.
- Rios, M.Y., Estrada-Soto, S., Flores-Morales, V., Aguilar, M.I. 2013. Chemical constituents from *Flourensia resinosa* S.F. Blake (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **51**: 240-242.
- Sabaté, D.C., Gonzalez, M.J., Porrini, M., Eguaras, M.J., Audisio, M.C., Marioli, J.M. 2012. Synergistic effect of surfactin from *Bacillus subtilis* C4 and *Achyrocline satureioides* extracts on the viability of *Paenibacillus larvae*. *World J Microbiol Biotechnol.*, **28**:1415-1422.
- Savoia, D. 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*, **7**: 979:990.
- Silva M.P., Piazza L. A., López D., López Rivilli M. J., Turco M.D., Cantero J.J., Tourna M.G., Scopela A.L. 2012. Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-) hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry*, **77**: 140-148.
- Strother, J. 1991. Taxonomy of Complaya, Elaphandra, Jefeá, Wam. alchitamia, Zexmenia (Compositae-Heliantheae-Ecliptinae). *Syst. Bot. Monographs*, **33**: 1-111.
- Stuessy, T. F. 1977. Heliantheae systematic review. *Biology and Chemistry of the Compositae* 1,621-671. Heywood V.H, Harbone J.B. &, Turner B.L. eds. London: Academic Press.
- Stuppner H., Müller E.P. 1994. Rare Flavonoid Aglycones from *Flourensia retinophylla*. *Phytochemistry*, **37**: 1185-1187.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S., & Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, **21**: 1199-1218.
- Téllez M., Estell R., Fredrickson E., Powell J., Wedge D., Schrader K. , Kobaisy M. 2001. Extracts of *Flourensia cernua*: volatile constituents and antifungal, antialgal, and antitermite bioactives. *J. Chem. Ecol.*, **27**: 2263-2274.
- Tene, V., Malagón, O., Finzi, P.V., Vidari, G., Armijos, C., Zaragoza, T. 2007. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Loja and Zamora-Chinchipe, Ecuador. *J. Ethnopharmacol.*, **111**: 63-81.

- Tringali, C.; Piattelli, M.; Spatafoa, C. 1995. Sesquiterpenes and geranylgeranylglycerol from the brown algae *Taonia lancheana* and *Taonia atomaria* f. *ciliata*: their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, **40**: 827-831.
- Tsuchiya, H., Sato, M., Miyazaki, T., Fujiwara, S., Tanigaki, S., Ohyama, M., Tanaka, T., Inuma, M., 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Ethnopharmacol.*, **50**: 27-34.
- Turner, B.L. 1992. New names and combinations in New World *Wedelia* (Asteraceae, Heliantheae). *Phytologia*, **72**: 391.
- Ubaka M.C., Ukwé V.C., Okoye C.T., Adibe O.M. 2010. Investigation into the Anti-ulcer Activity of the Aqueous Leaf Extract of *Aspilia africana* C.D. Adam. *Asian J. of Medical Sciences*, **2**: 40-43.
- Uriburu, M.L. 2002. Estudio químico y de actividad biológica de especies de *Flourensia*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de Salta.
- Uriburu, M.L., de la Fuente, J.R., Palermo, J., Gil, R.R., Sosa, V.E. 2004. Constituents of two *Flourensia* species. *Phytochemistry*, **65**: 2039-2043.
- Uriburu, M.L., de la Fuente, J.R., Palermo, J., Sosa, V.E. 2005. A chlorinated dihydrobenzofuran from *Flourensia riparia*. *J. Argén. Chem. Soc.*, **93**: 161-164.
- Uriburu, M.L., Gil, R.R., Sosa, V.E., de la Fuente, J.R., 2007. Prenylflavonoids from *Flourensia fiebrigii*. *Phytochemistry*, **68**: 1295-1299.
- Urtubey, E. 2014. Tribu Barnadesieae. En Freire, S. E. (coord.), Asteraceae. Flora Argentina. **7**: 246-247.
- Urzúa J., Santander R., Echeverría J. 2007. Analysis of surface and volatile compounds of flower heads of *Flourensia thurifera* (MOL) D.C. *J. Chil. Chem. Soc.*, **52**: 1244-1245.
- Vaca Ruiz, M.; Laciari, A.; Donadel, O.; Saad, J. & Carrizo Flores, R. 2006. Antilisterial activity of plant essential oils from western region of Argentina. *Annals of Microbiology*, **56**: 369-371.
- Velazco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M.J., Palá-Paul, J., Camacho, A., Fernandez Ocaña, A.M., Fernández López, C., Altrajeros, J., Garcia Vallejos, M.C. Waako, P.J., Smith, P., Folb, P. 2005. Chemical composition of the

- essential oils from the aerial parts of *Bupleurum gibraltarium* Lam. *J. Essent Oil Res.* **10**: 9-19.
- Veneziani, R.C.S., De Olivera, D.C., Albuquerque, S., Cunha, W.R. 2007. *In vitro* trypanocidal activity and chemical constituents of *Aspilia platyphylla* (Baker) Blake. *J. Chil. Chem. Soc.* **52**.
- Waako, P.J., Smith, P., Folb, P. 2005. *In vitro* interactions of *Aspilia africana* (Pers.) C.D. Adams, a traditional antimalarial medicinal plant, with artemisinin against *Plasmodium falciparum*. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 262-268.
- Wollenweber, E., Yatskievych, G. 1985. Flavonoides en la resina foliar de *Flourensia resinosa*, Compuesta endémica de Hidalgo, México. *Rev. Latinoam. Quim.*, **16**: 45-46.
- World Health Report, 2003. World Health Organization: Geneva, Switzerland: 1-50.
- Zalkow, L.H., Ekpo, B.A., Gelbaum, R.N., Harris, III, Keinan, E., Novak, J.R., Ramming, C.T., Van Derveer, D. 1979. The benzofurans of *Isocoma wrightii*. Structure and stereochemistry. *J. of Natural Products*, **42**: 203-219.