

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El conocimiento de las propiedades curativas de las plantas ha sido y es un reto constante que nos ha llevado por los caminos de la investigación para descubrir la cura de enfermedades.

La investigación Fitoquímica e Identificación de Principios Activos en seis especies del Género *Baccharis* permite establecer especies vegetales promisorias, es decir, dar a conocer a la humanidad, el valor curativo que ellas poseen, estimular su cultivo y su aprovechamiento racional, con el propósito de desarrollar y fortalecer la producción de medicamentos naturales (fitofármacos) mucho más rentables para la economía del país así como la exportación de los mismos.

Como consecuencia de este estudio se podrá prevenir la destrucción indiscriminada de bosques nativos y de especies vegetales, que por desconocimiento no son consideradas económicamente rentables, lo que repercute en una desprotección de estas especies.

Aislado el principio activo de todas las especies propuestas en el presente estudio será el marcador químico en el cual se centrará las futuras investigaciones y sus aplicaciones médicas.

1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

Las plantas han sido desde la antigüedad un recurso al alcance del ser humano para su alimentación, prevención e incluso el tratamiento de sus enfermedades. Las plantas empleadas para estos fines son las llamadas plantas medicinales, éstas eran veneradas por las virtudes curativas que se les había reconocido, transmitiéndose éstas de

generación en generación; sin tener un fundamento científico y haber identificado un principio activo que justifique como actúan estas plantas en los tratamientos preventivos y curativos.

En la actualidad cientos de estos vegetales son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna, analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar las diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino para agrupar a las plantas de efectos similares o mediante un marcador químico común, para conocer los principios activos responsables de las curas de enfermedades, de esta forma determinar sus estructuras químicas y procurar su síntesis (Lock 1994).

Considerando que durante los últimos 30 años, se ha logrado avances significativos en la metodología de aislamiento y purificación de los principios activos presentes en los vegetales, que junto con métodos analíticos modernos de separación, elucidación de estructuras y cuantificación hacen factible la identificación de compuestos químicos complejos. Simultáneamente se ha avanzado mucho en el diseño y empleo de bioensayos para detectar una amplia gama de actividades biológicas que permiten la estandarización de las plantas medicinales.

Los extraordinarios avances de la investigación científica en las plantas medicinales han permitido al hombre el conocimiento de secretos que guardan éstas y que son en la actualidad de enorme aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica (Chiriboga *et al.*, 2003).

En el Ecuador existe una variedad de plantas que poseen propiedades farmacológicas con fines terapéuticos, las que pueden ser aprovechadas como materia prima para la producción de extractos; mediante la extracción, aislamiento y purificación de sustancias naturales y la estandarización que permitirá una mejor caracterización analítica de estos compuestos (Sharapin, 2000). He aquí la importancia de esta investigación que se llevó a cabo con el propósito de aislar e

identificar el principio activo (grupo de metabolitos secundarios) de cada especie del género *Baccharis* recolectada, el mismo que servirá como un marcador químico y así poder obtener una estandarización para este Género, además se podrá realizar varios estudios de actividades terapéuticas.

La estandarización del marcador químico permitirá el monitoreo de diferentes especies que pertenecen al género mencionado, el mismo que será utilizado en futuras investigaciones, ya que puede ser el responsable de un posible efecto terapéutico antioxidante, reumático, depurativo, antibacteriano, antiinflamatorio, antiséptico y digestivo (Cytel 1995).

Este marcador nos permitirá su monitoreo en el control de productos farmacológicos de origen natural (fitofármacos), proporcionando un método de control y vigilancia sanitaria por parte de autoridades sanitarias del Ecuador, así como dar a conocer la pureza y concentración de la droga para ser administrada al ser humano.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general

Aislar e identificar el principio activo (grupo de metabolitos secundarios) de seis especies del Género *Baccharis* que servirá como un marcador químico para obtener una estandarización del mencionado Género.

1.3.2. Objetivos específicos

- Recolectar e identificar taxonómicamente las seis especies vegetales del género *Baccharis*, recolectadas en el Cantón Puerto Napo Provincia del Napo, y en el Cantón Quito de la Provincia de Pichincha.

- Identificar los grupos de metabolitos secundarios (alcaloides, esteroides, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, antraquinonas, heterósidos cardiotónicos, sesquiterpenolactonas) en las seis especies recolectadas del Género *Baccharis*.
- Realizar perfiles cromatográficos de las fracciones de los extractos de cada especie estudiada mediante la técnica de Cromatografía en capa fina (TLC).
- Analizar y comparar los resultados obtenidos de los metabolitos secundarios existentes para identificar el principio activo (grupo de metabolitos secundarios).
- Seleccionar el principio activo (grupo de metabolitos secundarios) presente en las seis especies del Género *Baccharis* y fraccionarlo para que sirva como un marcador químico.

1.4 MARCO TEÓRICO

1.4.1 Biodiversidad de Plantas en el Ecuador

El Ecuador está considerado como uno de los 17 países donde está concentrada la mayor biodiversidad del planeta. Su amplia gama de climas en sus cuatro regiones, ha dado lugar al nacimiento de miles de especies de flora y fauna en medio de extensos territorios naturales, muchos de los cuales están protegidos por el Estado.

A pesar de su extensión relativamente pequeña, el Ecuador es considerado como uno de los países más ricos en diversidad de especies y ecosistemas en todo el mundo. Su posición geográfica y la presencia de la cordillera de los Andes determinan la existencia de una enorme variedad de bosques y microclimas, desde los húmedos de la

Amazonía y noroccidente, a los ecosistemas secos del sur; desde las cálidas playas del Pacífico hasta las nieves eternas de los volcanes.

El Ecuador es un país privilegiado en cuanto a la riqueza y la biodiversidad de su flora, siendo utilizada por el hombre hace miles de años, de esta forma se ha creado un valioso conocimiento acerca de la utilidad de las plantas, destacando el valor dado a las mismas en el tratamiento de las enfermedades. La región amazónica, sobre todo, ha sido la fuente de esos ancestrales conocimientos, recogidos por los pueblos indígenas (Villacrés 1995).

1.4.2 Importancia de las PLANTAS MEDICINALES

El nombre de Planta medicinal es un concepto no fácil de definir. Una planta se denomina medicinal cuando al menos una parte de esta posee propiedades curativas. Puede estar contenida en la Farmacopea, pero ésta puede también contener plantas que no siendo medicinales son útiles en farmacia. Una planta no inscrita en la Farmacopea puede constituir un medicamento, incluso aunque no se la considere como planta medicinal (Bruneton 2003).

Desde los más remotos tiempos hasta nuestros días, las plantas han sido empleadas por las diferentes civilizaciones con fines terapéuticos. Indudablemente, la fitoterapia (fito = planta; terapia = curación) es considerada la medicina más ancestral por excelencia.

El conocimiento empírico acerca de las plantas y sus efectos curativos se acumuló durante muchos milenios y posteriormente ser una parte integral de sistemas y tradiciones curativas. La medicina tradicional permitió obtener información sobre principios y prácticas médicas con la finalidad de proteger la salud y tratamiento de enfermedades. Esta información ha sido transmitida de generación en generación (Mangiaterra 2005).

Las plantas resultan extremadamente útiles. Por una parte aportan el oxígeno necesario para poder respirar y además aportan nutrientes útiles en la alimentación. El uso de las plantas como alimento ha permitido una búsqueda desde los inicios de la humanidad de aquellas especies que resultaban comestibles de aquellas que no lo eran. En esta búsqueda el hombre ha experimentado en su propio cuerpo y ha comprobado como lo que pretendía que fuese un alimento se convertía en un mortal veneno. A lo largo de la historia las civilizaciones se han movido en alrededor de las plantas, constituyendo los seres vivos que más han influido en la humanidad. La búsqueda de plantas medicinales, narcóticos o con propiedades afrodisíacas ha movido al hombre a buscar en los lugares más recónditos (Martínez 2006).

Las plantas medicinales contribuyen al fortalecimiento de los programas de salud y también a la economía del país. Son diferentes las formas en que se aprovechan las plantas; como materia prima, extractos alcohólicos o acuosos, en forma semipurificada o también como sustancias puras o semisintéticas. La población usa y seguirá usando las plantas más aún, éstas ocupará un espacio cada vez mayor conforme siga creciendo la población mundial, la cual buscará cada vez más el recurso de las plantas medicinales para satisfacer sus necesidades (Vásconez 1999).

1.4.3 Los Principios Activos

La medicina moderna a través de los análisis clínicos, ha conseguido precisar la validez de aquellas plantas que la tradición había utilizado a base del método de ensayo y error. Muchas resultaron ser validas; otras demostraron ser inocuas y otras potencialmente peligrosas. Han sido precisamente estos análisis fitoquímicos los que han podido determinar cuales son los componentes principales de las plantas medicinales o los llamados principios activos (Martínez 2006).

Los principios activos son muy importantes, su descubrimiento se baso en investigaciones sobre el uso que las culturas tradicionales de diferentes comunidades hacían desde tiempos remotos de ciertas plantas. Se estima que unos 120 productos farmacéuticos son derivados directamente de las plantas medicinales. Se cree también que un 25 % de las medicinas actuales contienen algún principio que deriva o derivó en el pasado directamente de las plantas medicinales. En especial, cabe destacar la aportación de los bosques tropicales en los descubrimientos de nuevas drogas, hasta el punto que un 75 % de las medicinas derivadas de las plantas lo hacen a partir de las que podemos encontrar en estos bosques. La explicación de esta realidad radica no solamente en el hecho de la extremada riqueza vegetal sino en el hecho de que constituye el lugar donde las plantas tienen que desarrollar mayores mecanismos de defensa en contra de sus numerosos depredadores (Martínez 2006).

Los principios activos de los vegetales utilizados en la medicina aparecen en toda la planta, ya sea en las flores, semillas, hojas, tallos o frutos. Estos principios pueden variar a lo largo en una misma especie y en una misma planta de acuerdo a muchos factores como por ejemplo la época del año, características del suelo, su altura, localización geográfica (Chiriboga 2005).

1.4.4 Características del Género *Baccharis*

El género *Baccharis* pertenece a la familia de las Asteraceae. Los miembros de esta familia se caracterizan por ser organismos avanzados en las siguientes características: número de partes definido, ovarios ínferos, pétalos unidos (fusionados), corolas irregulares, en ocasiones cuentan con flores incompletas y a veces flores imperfectas. El rasgo más característico de este grupo es la disposición de sus flores en cabezuelas, cada una de las cuales está rodeada por brácteas que tienen forma más o menos semejante a la de los sépalos. Para un

observador aficionado, o para un insecto, la cabezuela puede parecer una sola flor (Jensen *et al.*, 1988).

Con frecuencia las flores son bisexuales, y los estambres o los pistilos pueden estar ausentes o bien en las flores del radio o en las del disco. En contadas ocasiones se encuentran los sexos en cabezuelas distintas o incluso en flores separadas. Algunos miembros de la familia se polinizan por medio del viento.

Esta familia es la más grande, o tal vez, la segunda más grande de todo el mundo y se encuentra distribuida en todo el planeta. Casi todos los miembros del grupo son especímenes herbáceos, e incluso unos cuantos son árboles.

Los distintos taxónomos dividen a esta familia en 12 o 15 subgrupos llamados tribus. Su clasificación se está revisando en la actualidad mediante trabajos referentes a bioquímica, análisis de polen, microbiología, anatomía y citología de estas plantas (Jensen *et al.*, 1988).

Son arbustos, sufrútices o hierbas perennes. Las hojas son alternas raramente opuestas y a veces bracteiformes y reducidas. Los capítulos son homógamos o heterógamos, discoides, disciformes o subradiados. El involucre puede ser hemisférico, acampanado o cilíndrico, pluri o pauciseriado. El receptáculo suele ser plano, convexo o cónico, liso o alveolado, desnudo o provisto de páleas en algunos capítulos pistilados. Las flores del margen son pistiladas con corola generalmente filiforme de ápice dentado, truncado o levemente ligulado, constituyendo capítulos propios en las plantas dioicas y gino-dioicas: estilo con ramas lineares largas (Giuliano, 2000).

Las flores del disco son perfectas, pero en general funcionalmente estaminadas por atrofia del ovario con corola tubulosa de limbo ensanchado y ápice 5-lobado o 5-secto, conformando capítulos

propios en las plantas dioicas y antro-dioicas; anteras con tecas obtusas en la base; estilo con ramas desarrolladas y separadas o bien breves y adheridas entre sí. Los aquenios de las flores pistiladas son bien desarrollados, glabros o con algún tipo de pubescencia, mientras que los aquenios de las flores estaminadas son rudimentarios.

El papus 1-2 uniseriado formado por pelos escabrosos frecuentemente acrescentes en las flores pistiladas (Giuliano, 2000).

Algunas de las características taxonómicas de las hojas y de las inflorescencias son consideradas herramientas útiles para la sistemática. Varios autores las han utilizado con el fin de establecer una clasificación infragenérica para este género.

Su distribución geográfica es exclusivamente americana, desde el sur de los Estados Unidos de América hasta el extremo austral de Argentina y Chile (Giuliano, 2001).

El género *Baccharis* comprende plantas dioicas, excepcionalmente monoicas o polígamo-dioicas. Se caracteriza por ser arbustos, sufrútices o hierbas, a veces provistos de xilopodios o de raíces gemíferas. Las hojas son alternas (pocas veces opuestas o subopuestas), algunas veces tempranamente caducas o reducidas a brácteas inconspicuas. Los capítulos son solitarios o dispuestos en inflorescencias diversas, discoides (excepcionalmente disciformes) y homógamos (en casos excepcionales heterógamos). En las plantas pistiladas están constituidos por flores pistiladas (raramente puede haber algunas flores estaminadas centrales) y en las plantas estaminadas por flores morfológicamente perfectas. El involucre hemisférico puede ser acampanado o cilíndrico, con filarios dispuestos en varias series, imbricados siendo los exteriores gradualmente menores. El receptáculo plano, convexo o cónico, puede ser liso o alveolado, desnudo o con páleas caducas en algunos capítulos pistilados. Con respecto a las flores pistiladas, su corola es filiforme de ápice dentado, truncado o

brevemente ligulado; estilo exserto, con ramas lineares. Por el contrario, las flores estaminadas presentan una corola tubulosa de limbo ensanchado y ápice 5-lobado o 5-secto; anteras con tecas obtusas en la base; estilo con ramas largas, oblongas y separadas, o bien cortas y adheridas entre sí. Los aquenios de las flores pistiladas son cilíndricos, elipsoides u ovoides y en ocasiones comprimidos 5- (8) 10-costados; los aquenios de las flores estaminadas son rudimentarios. En lo referente al pappus está formado por pelos delgados escabrosos, dispuestos en 1-2 (a veces más) series; en las flores pistiladas con frecuencia acrescentes, en las estaminadas por lo general crespos, ensanchados o no en el ápice (Giuliano, 2000).

1.4.5 Información Etnofarmacológica del Género *Baccharis*

El Ecuador es un país con una flora muy variada y rica en productos naturales que poseen actividades terapéuticas, mucho de las cuales son conocidas y utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de varias enfermedades.

La validación de plantas medicinales constituye una estrategia alternativa para la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos. Es por eso que tanto la información bibliográfica como la popular sirven de base para la indicación de la actividad terapéutica.

La investigación etnofarmacológica ha estado muy activa en todo el mundo desde hace varias décadas, pero el desarrollo de productos a partir de estos hallazgos para devolver la información validada a la comunidad para su uso seguro, es aún incipiente. Desde principios de los 80 se han realizado actividades multidisciplinarias de detección, validación, producción y uso de las plantas medicinales y productos derivados, por parte de instituciones académicas, no gubernamentales y privadas. A finales de los 90 se realizó un proyecto regional de detección y aprovechamiento de plantas medicinales por evaluación etnobotánica y bioprospección, además se hicieron ensayos para estudiar su actividad

biológica y conocer la química responsable de esta actividad. Desde el 2000, un grupo de instituciones de la región está trabajando en el desarrollo de tecnología de cultivo de plantas medicinales nativas que han demostrado preliminarmente que tienen potencial farmacológico, biotecnológico, agrotecnológico y farmacéutico (Cáceres 2000).

Los nativos indígenas han utilizado esta planta durante siglos, especialmente para curar las dolencias comunes. Se grabaron sus usos en la medicina herbaria para la esterilidad en las mujeres e impotencia en los hombres. Además se utiliza para trata las enfermedades más comunes como fortalecer el estómago y la función intestinal.

Es tan eficaz para el hígado y los desórdenes digestivos así como un buen limpiador de sangre y reductor de fiebre. Otros usos populares en la medicina natural sirve como tratamiento para la malaria, úlceras del estómago, garganta, dolores reumáticos y amigdalitis. Se lo considera como analgésico, antiinflamatorio, antirreumático, antiespasmódico, antigripal.

Tradicionalmente se la prepara en forma de infusión normal durante 10 minutos y se lo administra diariamente dos o tres veces al día con las comidas (Dillon *et al.*, 1991).

1.4.6 Descripción Botánica de las Plantas

La descripción botánica de cada especie del Género *Baccharis* estudiada fue descrita por parte de la botánica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Central del Ecuador, luego de lo cual se ratifica dicha clasificación botánica de la especie en el Centro de Biología de la Facultad de Filosofía de la Universidad Central del Ecuador y finalmente se valida por científicos especializados del Herbario Nacional.

Dentro de las divisiones y características taxonómicas que abarca el género *Baccharis* que se encuentra en común para todas las especies son:

SUPER REINO: Eukarya

REINO: Plantae

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

SUBFAMILIA: Asteroideae

TRIBU: Astereae

GENERO: *Baccharis*

1.4.6.1 Descripción Botánica de *Baccharis trinervis* Pers

Arbusto de 1-2 metros de altura, ramosos. Densamente cubierto con puntos glandulosos, con hojas hasta el ápice.

Hojas

Las hojas son simples y alternas, de forma lanceolada y margen entero. Miden 5-8 cm. de largo.

Flores

Flores blancas muy aromáticas. El cáliz es verde claro y pubescente, la corola crema verdoso, estambres, anteras y pistilo de color crema verdoso, Capítulos dispuestos en cimas corimbiformes pluricéfalas. Corteza verde claro y tomentosa, por dentro de color crema.

1.4.6.2 Descripción Botánica de *Baccharis teindalensis* Kunth

Arbusto de 1,5 – 3 metros de altura, ramosos. Glabro, entrenudos de 10 – 30 metros de longitud.

Hojas

Hojas alternas, herbáceas, pecioladas, con pecíolo de 10 – 30 mm de longitud y lámina ovado-lanceolada, atenuada y aguda en el ápice, con base decidua o atenuada, verde brillante por el haz, con tres nervios que salen desde la base pronunciados.

Flores

Capítulos femeninos muy numerosos, peciolados, formando cimas corimbiformes densas con nervadura central oscura; Flores muy numerosas con corola filiforme, aquenios oblongos, glabros de 1,2 mm de largo; papus blanquecino, Capítulos masculinos con involucre, flores numerosas con corola pentalobada, ramas del estilo separadas.

1.4.6.3 Descripción Botánica de *Baccharis latifolia*

Arbusto de 1.5 - 4 metros de altura, ramosos.

Hojas

Hojas 12 -15 cm. de longitud por 3 – 6 cm. de ancho. Pecíolo de 10 - 30 mm de longitud, base cuneada, ápice agudo, margen serrado-dentado, conspicuamente trinervada desde un poco más arriba de la base, glabra en ambas caras.

Flores

Capítulos con 20 -22 flores estaminadas, capítulos femeninos acompañados con 120-130 flores postiladas.

1.4.6.4 Descripción Botánica de *Baccharis buxifolia* (Lam) Pers

Planta arbusiva, hasta 3 metros de altura, dioica.

Hojas

Hojas 1 a 2 cm. de longitud por 0,3 a 1 cm. de ancho, opuestas ovaladas, base cuneada, ápice agudo, margen cerrado, trinervias, glabras y resinosas. Ramos anguloso, resinosos, corimbos terminales, brácteas tubuladas. Pecíolo 1-2 cm. de largo.

Flores

Inflorescencia paniculada, terminal, ramificada, ejes principal y secundarios de la inflorescencia glabros, cabezuelas femeninas 4 mm de largo; corolas de las flores masculinas tubulares, regulares, con limbo 5- partido, anteras obtusas en la base; aquenios de las flores femeninas comprimidos 2 mm de largo; papo o vilano en las flores femeninas formado por aristas largas y abundantes de 4 mm de largo.

1.4.6.5 Descripción Botánica de *Baccharis arbutifolia*

Planta arbusiva, hasta 3 metros de altura, dioica.

Hojas

Hojas 1 a 1.5 cm. de longitud por 0,5 a 1 cm. de ancho, opuestas ovaladas, base cuneada, ápice agudo, borde dentado, glabras y resinosas. Ramos anguloso, corimbos terminales, resinosos, brácteas tubuladas.

Flores

Inflorescencia paniculada, terminal, ramificada, ejes principal y secundarios de la inflorescencia glabros, cabezuelas femeninas 3 mm de largo; corolas de las flores masculinas tubulares con limbo 3- partido, anteras obtusas en la base; aquenios de las flores femeninas comprimidos 1 mm de largo; vilano en las flores femeninas.

1.4.6.6 Descripción Botánica de *Baccharis macrantha* Kunth

Planta arbusiva, hasta 2 metros de altura, ramosa

Hojas

Hojas 10 -13 cm. de longitud por 2 – 5 cm. de ancho. Pecíolo de 8 - 25 mm de longitud, base atenuada, ápice agudo con punta menos prominente y más ancha, margen entero. Hojas alternas. Lámina foliar oblonga.

Flores

Capítulos de 8-10 mm diámetro. Involucro con 30-60 filarias 6-7 seriadas generalmente púrpuras. Flores masculinas 33-85, corola 6-7.3 mm. Flores femeninas 75-125, corola 3.2-4.5 mm.

1.4.7 Material Vegetal

La investigación etnobotánica y etnofarmacológica de las especies vegetales para su posible utilización fitoterapéutica, exige un delicado protocolo de trabajo que incluye toda la escala de pruebas y ensayos que van desde la selección de una determinada planta de acuerdo a una serie de criterios, hasta la realización de una exhaustiva gama de ensayos farmacológicos, químicos, fitoquímicos, toxicológicos y clínicos que permitan la utilización de la planta como medicamento.

El material vegetal aborda ciertos protocolos de trabajo relacionados incluyendo la selección del mismo, descripción de las técnicas utilizadas para la recolección del material vegetal y proceder a su reconocimiento y autenticación, así como los procedimientos de almacenamiento y conservación.

1.4.7.1 Recolección

La recolección es el proceso de cosechar el material vegetal que se utiliza para la investigación, éste se debe recolectar de acuerdo con cada especie, la época de recolección, la naturaleza, cantidad y tipo de principio activo, los mismos que varían

considerablemente de acuerdo a la familia, género y especie de cada planta medicinal.

El material debe ser el exacto y adecuado para ser utilizado en la investigación, y hay que proceder de forma rigurosa a su correcta identificación, posterior preservación, conservación, y preparación (Chiriboga 2005).

1.4.7.2 Identificación

La identificación es el proceso mediante el cual se obtienen todos los elementos necesarios para la correcta caracterización y clasificación taxonómica de las especies vegetales, así como para su preservación y conservación, de modo que se constituyan en una referencia exacta del material utilizado en la investigación (Dy Stasi 2005).

1.4.7.3 Prensado

El prensado es el proceso mediante el cual se comprime en la prensa el material vegetal, este debe ser hecho lo más pronto posible, y de tal forma que permita observar claramente las características morfológicas de las hojas, flores, frutos y tallos (Dy Stasi 2005).

1.4.7.4 Secado

El secado de una planta medicinal tiene por objeto eliminar la suficiente cantidad de humedad que esta contiene, para evitar que se pudran y se pierdan o se alteren los principios activos que contiene; prevenir de la acción de microorganismos como bacterias, mohos, así como la alteración química de los constituyentes, debido a que inhibe la actividad de las enzimas que alteran y modifican los principios activos. Además fija los constituyentes, facilita la molienda,

permite su almacenamiento y la conservación por un tiempo determinado antes de su utilización.

Las muestras montadas en la prensa botánica se someten al proceso de secado, que puede ser secado natural o artificial (Chiriboga 2005).

1.4.7.5 Molienda

La molienda es el proceso mediante el cual se procede a triturar y reducir el material vegetal seco en pequeñas partes permitiendo que todos los componentes se encuentren en la muestra vegetal.

1.4.7.6 Almacenamiento y Conservación

El almacenamiento es el proceso en el cual se reúne y se guarda el material vegetal molido, éste se coloca fundas de papel periódico, cajas de cartón forradas de papel periódico, tomando mucho cuidado de que siempre estén protegidos de la luz y la humedad. Periódicamente se revisa cada 48 horas las muestras vegetales almacenadas, comprobando cualquier alteración en el nivel de humedad, moho, insectos o putrefacción (Dy Stasi 2005).

1.4.8 Métodos de extracción

La extracción es el procedimiento mediante el cual se hace pasar en solución con un disolvente una sustancia contenida en una mezcla sólida, permitiendo separaciones notablemente selectivas. La selección del procedimiento para fraccionar el extracto de las plantas en un Extracto Etanólico Total, depende de las características físicas o químicas de este. Los métodos separativos se lo pueden categorizar como Físico-Químicos.

La aplicación de las metodologías fisicoquímicas persigue el conocimiento más completo de las cualidades terapéuticas de la especie en estudio y tiene como finalidad principal sobre la base del fraccionamiento biodirigido de los extractos, conseguir el aislamiento e identificación de las sustancias responsables de su bioactividad y así poder confirmar la actividad y utilidad de los principios activos una vez purificados (San Feliciano *et al.*, 2005).

1.4.8.1 Maceración

La maceración es una técnica para extraer exhaustivamente los principios activos que se alterarían con el calor, es por eso que se deja la planta molida en etanol al 96°, a una temperatura ambiente durante el tiempo de 48 horas dependiendo de la especie y del tipo de análisis o de investigación que se va a realizar. Se mide exactamente la cantidad del solvente y se agita la mezcla.

1.4.8.2 Reflujo

El reflujo es una técnica experimental de laboratorio para el calentamiento de la muestra permitiendo que se den reacciones que transcurren a temperatura superior a la ambiente y en las que conviene mantener un volumen de reacción constante.

A medida que se procede a la calefacción del matraz, la temperatura aumenta evaporando parte del disolvente. Los vapores del mismo ascienden por el cuello del matraz hasta el refrigerante, donde se condensa (por acción del agua fría que circula por la camisa exterior) volviendo de nuevo al matraz. Esto establece un reflujo continuo de disolvente que mantiene el volumen de la reacción constante (Quiored 2004).

1.4.8.3 Filtración

La filtración persigue el objetivo de obtener una solución o un extracto líquido libre de sólidos (planta seca).

La filtración a vacío es una técnica para separar un producto sólido de un solvente o mezcla de reacción líquida. La mezcla de sólido y líquido se vierte a través de un papel de filtro en un embudo Buchner. El sólido se retiene en el filtro y el líquido es arrastrado a través del embudo hacia el frasco colocado debajo, por un vacío que se crea en este último. Se mide la cantidad de líquido filtrado (Rodríguez 2006).

1.4.8.4 Concentración a Presión Reducida (Rotavapor)

El extracto obtenido de la filtración se concentra para reducir su volumen y evaporar el solvente, quedando como resultado un extracto no volátil.

Para que se cumpla la evaporación se necesita proveer el calor necesario para aumentar la energía cinética de las moléculas para que abandonen la superficie del líquido. La evaporación puede lograrse mediante la Concentración a Presión Reducida (Albornoz 1980).

La concentración a presión reducida, ofrece las ventajas de que se puede recuperar gran parte del solvente y es más rápida. Así mismo cuando el volumen del solvente es considerable.

Se utilizan los rotavapores, donde el balón contenedor de la muestra, rota en ángulo sobre el agua caliente a una temperatura constante, lo que permite que el solvente se esparza sobre las paredes del balón, permitiendo así una buena concentración del extracto.

El sistema del rotavapor trabaja de tal forma que se produce un vacío el cual disminuye la presión y por lo tanto disminuye el punto de ebullición del solvente que se desea evaporar. Esto permite que el solvente sea removido sin la necesidad de aplicar calor excesivo al sistema.

Acoplado al sistema, se encuentra un refrigerante por el que circula un líquido, por lo general agua, que produce la condensación del disolvente que se recoge en un colector. El conjunto constituye un sistema cerrado conectado a una bomba de vacío, bien una trampa de agua o un circuito de vacío (Quiored 2004).

1.4.9 Marcha Fitoquímica

El Extracto Etanólico Total de una planta puede ser separado o discriminado en diversas categorías o grupos de sustancias. Una manera de realizar este proceso es mediante la denominada Marcha Fitoquímica, que consiste en una partición líquido-líquido con solventes

La Fitoquímica estudia las propiedades y estructuras químicas de los productos naturales de las plantas. A través de lo que se conoce como marcha fitoquímica que es una serie de pasos donde se observan reacciones como cambio de color, fluorescencia, reacciones. Se determina la existencia de un tipo de compuesto químico (Albornoz 1980).

La bioactividad trata de descubrir qué parte de la planta es responsable de la actividad biológica importante y propiedades útiles para ser estudiada. Uno de los métodos es fraccionar o separar los distintos compuestos de la planta según una regla de afinidad.

El screening fitoquímico de los extractos vegetales es una secuencia de aislamientos y purificaciones de los compuestos presentes en la muestra vegetal. Permite a su vez que sus moléculas presentes den reacciones con determinados reactivos, afirmando o descartando su presencia.

Dentro de los metabolitos secundarios a analizarse se encuentran: los alcaloides, esteroides, flavonoides, taninos, saponinas, cumarinas, antraquinonas, heterósidos cardiotónicos, sesquiterpenolactonas.

1.4.10 Metabolitos Secundarios

Un aspecto metabólico que distingue el reino animal del vegetal es la capacidad de las plantas para producir sustancias que no son esenciales para su supervivencia. A esas sustancias se les denomina metabolitos secundarios, los animales superiores raramente los producen, si acaso pueden ser encontrados ocasionalmente en insectos y otros invertebrados.

Por tanto, los vegetales, además de metabolitos primarios, tales como carbohidratos, aminoácidos, ácidos grasos, poliaminas, citocromos, clorofilas e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, también producen metabolitos secundarios, es decir, sustancias que no parecen participar directamente en el crecimiento o desarrollo, sustancias que no son necesarias para que un organismo pueda existir como tal, sino que simplemente aportan al individuo que las produce una ventaja para responder a estímulos del entorno.

El metabolismo secundario compromete aquellos procesos químicos que son únicos para una planta dada, y no son universales. Dicho metabolismo es la química que conduce a la formación de un producto natural. Algunas porciones de esta química son comunes para

un número de plantas diferentes o familias de plantas, pero actualmente la química de productos naturales es usualmente diferente de una planta a otra. Precursores químicos comunes pueden conducir a resultados diferentes (Albornoz 1980).

Algunos metabolitos secundarios sólo están presentes en determinadas especies y cumplen una función ecológica específica, como por ejemplo atraer a los insectos para transferirles el polen, o a animales para que éstos consuman sus frutos y así poder diseminar sus semillas; también pueden actuar como pesticidas naturales de defensa contra herbívoros o microorganismos patógenos, también se pueden sintetizar metabolitos secundarios en respuesta a daño en algún tejido de la planta, así como contra la luz UV y otros agentes físicos agresivos, incluso actuar como señales para la comunicación entre plantas con microorganismos simbiotes.

Las plantas están constantemente expuestas a numerosos patógenos microbianos, principalmente hongos. Durante la evolución, algunas plantas han desarrollado diversos sistemas para defenderse de sus atacantes microbianos, tales como sistemas de defensa inducibles y constitutivos o mediante proteínas antifúngicas, polímeros estructurales resistentes a los patógenos y antibióticos. Las plantas también utilizan los metabolitos secundarios como agentes de señalización durante la interacción con patógenos.

Su potencial radica también en la importancia para la defensa de la planta frente a microorganismos, los metabolitos secundarios también permiten atraer a microorganismos simbiotes. Así es el caso de los flavonoides que producen las leguminosas para atraer a las bacterias fijadoras de nitrógeno (Hostettmann *et al.*, 1997).

Las plantas presentan una interacción compleja con los insectos, ya que los requieren para la polinización pero también se han de defender de las plagas. En lo que se refiere a la polinización, los metabolitos secundarios son utilizados como pigmentos de las flores y

aromas atractivos. Respecto a defensa contra insectos, hay metabolitos secundarios que son tóxicos por ingestión para determinadas especies, los hay que incluso actúan antes de que el insecto se pose sobre la planta y la pruebe, como es el caso de algunos terpenoides volátiles.

Las plantas igualmente hacen uso de sus metabolitos secundarios para selectivamente atraer o bien repeler a los animales. Así pues, pueden atraer a los polinizadores y dispersores de semillas utilizando flores o frutos aromáticos y coloreados.

Las plantas han sido utilizadas por el hombre a lo largo de muchos años como fuente para elaborar medicinas, conservantes, aromatizantes o pigmentos. Además de ser importantes como medicamentos, también hay evidencias de que los metabolitos secundarios son importantes para nuestro estado de salud en general.

Algunos metabolitos secundarios tales como los flavonoides y otros compuestos fenólicos, actúan como antioxidantes, capturando especies reactivas de oxígeno previniendo así de la oxidación celular. Otros, tales como los glucosinolatos, parecen ser tóxicos selectivamente sólo para las células precancerosas reduciendo el riesgo de formación de carcinomas (Hostettmann *et al.*, 1997).

1.4.10.1 Alcaloides

Los alcaloides son compuestos orgánicos que contienen uno o más átomos de nitrógeno, generalmente en anillo heterocíclico y con actividad fisiológica específica.

Son sustancias de origen biológico y sobre todo de origen vegetal. Por lo general presentan un nitrógeno heterocíclico, como amina primaria ($R-NH_2$), secundaria ($R'-NH$) o terciaria ($R''-N$).

Son particularmente activos en el Metabolismo vegetal. Se los considera como depósitos para síntesis proteicas y estimulantes

o reguladores de actividades como el crecimiento, metabolismo y reproducción.

Actúan como núcleos de coenzimas u hormonas. Funcionan como fuentes desintoxicantes en procesos de metilación (Albornoz 1980).

1.4.10.2 Esteroles

Los esteroles son alcoholes sólidos con 27 a 20 átomos de carbono, en cuya cadena lateral pueden insertarse radicales metilo o radicales etilo.

Los esteroles están caracterizados por la presencia de una función alcohólica en la posición 3. Tienen una cadena carbonada alifática insaturada y ramificada.

Los esteroles vegetales están presentes de forma natural en pequeñas cantidades en muchas frutas como verduras, semillas, cereales, legumbres, aceites vegetales y otras fuentes similares.

La importancia de los esteroles en fitoterapia radica en el potencial en disminuir el colesterol ya que reducen la absorción intestinal del colesterol (Albornoz 1980).

1.4.10.3 Flavonoides

Los Flavonoides (*lato sensu*) son pigmentos casi universales en los vegetales. Casi siempre hidrosolubles, son responsables de la coloración de las flores, frutos y a veces de las hojas.

Si no son directamente visibles, contribuyen a la coloración por su papel de copigmentos. En algunos casos, la zona de absorción de la molécula se sitúa en el ultravioleta próximo, la coloración se percibe únicamente por los insectos que se sienten así

eficazmente atraídos y guiados hacia el néctar y obligados por lo tanto a asegurar el transporte del polen que condiciona la supervivencia de la especie vegetal (Bruneton 2003).

La biosíntesis justifica la frecuente presencia de al menos tres hidroxilos fenólicos en C-5, C-7 y C-4' de la genina.

La principal actividad atribuida a los flavonoides es la de ser venoactivas, es decir, ser capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y aumentan su resistencia.

Se les atribuye propiedades antibacterianas ya que inhiben la síntesis de peptidoglicano en la membrana celular que le confiere la rigidez. También se le atribuye propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas (Bruneton 2003).

1.4.10.4 Taninos

Los taninos son polímeros polifenólicos producidos en las plantas como compuestos secundarios y que tienen la habilidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas.

Están ampliamente distribuidos en el reino vegetal con una característica en general de tener sabor amargo y astringente.

La importancia de los taninos en el mundo vegetal es su capacidad de proteger a las plantas contra las heridas que sufren y de esta forma protegerlos contra los ataques exteriores (Bruneton 2003).

En los vegetales superiores se distinguen, generalmente dos grupos diferentes de taninos tanto por su estructura como por su origen biogénico:

- Taninos Hidrolizables
- Taninos Condensados

1.4.10.4.1 Taninos Hidrolizables

Son oligo- poliésteres de un azúcar (o de un poliol) y de un número variable de moléculas de ácido fenol. El azúcar, generalmente es la glucosa. El ácido fenol es o bien el ácido gálico (Ácido 3,4,5-trihydroxybenzoic) o el ácido hexahidroxidifénico (Albornoz 1980).

1.4.10.4.2 Taninos Condensados

Los taninos condensados son polímeros flavánicos. Están constituidos por unidades de flavan-3-oles ligadas entre sí por enlaces carbono-carbono generalmente 4 → 8 ó 4 → 6.

Se los conoce también como taninos no Hidrolizables, ya que se hidrolizan con dificultad y por el contrario, el tratamiento con calor y ácidos minerales origina polímeros de alto peso molecular.

Este tipo de taninos se producen en el metabolismo normal de los vegetales por lo que se consideran fisiológicos y se encuentran ampliamente repartidos en el reino vegetal (Albornoz 1980).

Los taninos tienen la propiedad de coagular las proteínas de las mucosas y tejidos, crean una capa aislante y protectora que reduce la irritación y el dolor.

A nivel intestinal es ingerido se combina con la proteínas en el estómago, pero a medida que la acidez aumenta va liberando el tanino del complejo, sin embargo se vuelve a precipitar a nivel del intestino controlando la diarrea.

Son muy útiles para envenenamientos especialmente con alcaloides debido a la producción de precipitados evitando la absorción de los mismos (Renteria *et al.*, 2005).

1.4.10.5 Saponinas

Las saponinas constituyen un amplio grupo de heterósidos muy frecuentes en los vegetales. Se caracterizan por sus propiedades tenso-activas: se disuelven en agua formando disoluciones espumosas. La mayor parte de las saponinas tiene propiedades hemolíticas y son tóxicos para animales de sangre fría como los peces.

Estructuralmente, las saponinas se pueden clasificar en dos grupos según la naturaleza:

- Saponinas con genina esteroídica
- Saponinas con genina triterpénica

Por regla general, las saponinas son hemolíticas. Esta propiedad se atribuye a su interacción con los esteroides de la membrana eritrocitaria. La interacción induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un intercambio de iones entre el sodio y el potasio (Bruneton 2003).

1.4.10.6 Cumarinas

Las cumarinas deben su denominación a la palabra <<coumarou>>, nombre vernáculo del haba tonka. Las cumarinas son 2H-1benzopiran-2-onas que se pueden considerar como las lactosas de los ácidos 2-hidroxi-Z-cinámicos. Se encuentran distribuidas en todo el reino vegetal.

Al igual que otros derivados fenilpropánicos, las cumarinas proceden del metabolismo de la fenilalanina. Las cumarinas libres son solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos.

El interés farmacológico de las drogas con cumarinas es limitado. Algunas furanocumarinas son fotosensibilizantes y, por este motivo, se puedan utilizar en terapéutica para el tratamiento de la soriasis.

La cumarina, conocida por sus propiedades antiedematosas, se ha utilizado en la realización de estudios clínicos en pacientes con cáncer avanzado, es inmunoestimulante y posee actividad citotóxica. Se metaboliza rápidamente a nivel hepático (Bruneton 2003).

1.4.10.7 ANTRAQUINONAS

Las quinonas son compuestos oxigenados que corresponde a la oxidación de compuestos aromáticos, y que se caracterizan por un agrupamiento.

Por su color amarillo a violeta, contribuyen a la pigmentación de numerosos vegetales inferiores como algas, líquenes, y plantas superiores (Renteria *et al.*, 2005).

Las antraquinonas son las más extensamente, la mayoría de las antraquinonas están hidroxiladas en C1 y C2 y con frecuencia están en forma de Glucósidos, los que se hidrolizan durante el aislamiento.

Los derivados antraquinónicos están presentes en los fármacos de acción purgante, actuando directamente sobre la musculatura lisa del colon dificultando la reabsorción de agua. Entre ellos se encuentra la Emodina (1,3,8-trihydroxy-6-methylanthra-9,10-quinone) (Albornoz 1980).

1.4.10.8 Heterósidos Cardiotónicos

Los Heterósidos cardiotónicos constituyen un grupo perfectamente individualizado y de una gran homogeneidad, tanto estructural como farmacológica. Estas moléculas naturales de origen vegetal continúan siendo medicamentos interesantes en el tratamiento a largo plazo de la insuficiencia cardiaca.

Su estructura es sumamente homogénea, esta consta de una genina esteroídica de tipo cardenólido (en C₂₃) o bufadienólido (en C₂₄) y una parte osídica, generalmente oligosídica.

Los heterósidos cardiotónicos ejercen su actividad sobre el corazón a diferentes niveles: fuerza y velocidad de contracción, frecuencia, conductibilidad. Estos efectos se traducen por las modificaciones electrocardiográficas normalmente observadas (Bruneton 2003).

1.4.10.9 Sesquiterpenolactonas

Las lactosas sesquiterpénicas constituyen un grupo numéricamente importantes de sustancias. Se encuentra distribuida en varios hongos y en algunas angiospermas.

Las lactosas sesquiterpénicas poseen estructuras variadas, pero todas relacionadas con el producto de ciclación, ciclodecadienílico, del 2E, 6E-farnesil-pirofosfato.

La medicina popular y la fitoterapia han recurrido a algunas drogas con sustancias amargas para el tratamiento antibacterial, especialmente frente a bacterias Gram positivas. Otros actúan como agentes antiparasitarios y antifúngicos (Trease *et al.*, 1982).

1.4.11 Cromatografía en Capa Fina

La cromatografía es un método de separación que se utiliza para obtener los componentes individuales puros de una mezcla y para determinar la proporción de estos componentes. En la cromatografía las moléculas se distribuyen entre dos fases distintas. Las separaciones se obtienen al introducir compuestos orgánicos en una fase estacionaria y dejando luego que una fase móvil fluya a través de la mezcla. Los componentes unidos con menos fuerza a la fase estacionaria y más soluble en la fase móvil recorren una distancia mayor que los demás componentes.

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son: un adsorbente, placas de vidrio, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas.

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares.

La cromatografía en capa fina presenta una serie de ventajas frente a otros métodos cromatográficos. El tiempo que se necesita para conseguir las separaciones es mucho menor y la separación es generalmente mejor. Pueden usarse reveladores corrosivos, permitiendo observar a simple vista la separación de los componentes. El método es simple y los resultados son fácilmente reproducibles, lo que hace que sea un método adecuado para fines analíticos.

El gel de sílice o ácido silícico es uno de los más utilizados, es débilmente ácido, su pH oscila entre 4-5. Con lo cual no se deberá

utilizar con sustancias que se corrompan con los ácidos. Se emplea placas de sílica GF 254 que representa al factor de fluorescencia y el grosor del gránulo de la placa.

Generalmente lleva incorporado un agente aglomerante, yeso (sulfato de cálcico semihidratado), para proporcionar firmeza al adsorbente. También han sido incorporados dos indicadores del ultravioleta (Bruneton 2003).

1.4.12 Funciones de los metabolitos secundarios del Género *Baccharis*

En un principio se pensaba que los metabolitos secundarios no tenían función alguna para la fisiología de la planta, y que no eran más que sustancias de reserva para el metabolismo primario. De este modo, el carbono, nitrógeno o azufre orgánicos sobrantes se acumularían en forma de metabolitos secundarios, que podrían ser posteriormente reutilizados por la planta para ser utilizados en el metabolismo primario.

No obstante, en la mayoría de las plantas, la cantidad de carbono, nitrógeno o azufre orgánicos presentes en metabolitos secundarios es demasiado bajo como para considerarlos como de reservas para el metabolismo primario (Bruneton 2003).

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

Los flavonoides junto con los diterpenos son los compuestos de mayor concurrencia en el Género *Baccharis* y son descritos como marcadores químicos dentro de la Familia Asteraceae. Estos flavonoides

se pueden encontrarse como agliconas libres. Se hallan presente en todas las partes de la planta, algunas clases se encuentran más ampliamente distribuidas que otras, siendo más comunes las flavonas. Dentro de las actividades biológicas realizadas por parte del Departamento Químico de la Universidad Federal de Santa Catarina en São Paulo-Brasil, en extractos etanólicos de las especies del Género *Baccharis* demostraron que la mayoría de estas actividades terapéuticas son producto de los flavonoides, así como de los diterpenos. Todavía los flavonoides están despertando mucho interés en diversas aplicaciones para la medicina, entre ellas como antioxidantes y actividad anti-HIV (Gonzaga *et, al.*, 2005).

Aunque los flavonoides han sido empleados desde mucho tiempo solo como colorantes, en la actualidad se les atribuye diversas propiedades en las plantas, entre ellos podemos citar protección a los vegetales contra la incidencia de rayos ultravioleta y visible, así como protección contra insectos, hongos virus y bacterias, son atrayentes de insectos con finalidad de polinización, antioxidantes, poseen una control de la acción de las hormonas vegetales, agentes alelopáticas e inhibidora de las enzimas. Por otro lado, estos compuestos poseen también importancia farmacológica, resultado de algunas propiedades importantes como antiinflamatorio, antialérgico, antiulcerogénico, antiviral, anticarcinogénico; y además son utilizados para el tratamiento de la fragilidad capilar, diabetes, y afecciones cardiacas (Lock *et, al.*, 2006).

1.5 HIPÓTESIS

Las especies del género *Baccharis* presentan un principio activo (grupo de metabolitos secundarios) que será utilizado como un marcador químico con fines terapéuticos.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODO

2.1 PARTICIPANTES

La presente investigación se realizó en el Laboratorio de Productos Naturales perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Central del Ecuador.

Como Colaboradora Científica de la investigación por parte del Laboratorio de Productos Naturales fue la Dra. Ximena Chiriboga Pazmiño.

2.2 ZONA DE ESTUDIO

La zona de estudio de esta investigación se realizó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales, localizado en la Facultad de Ciencias Químicas, perteneciente a la Universidad Central de Ecuador. Quito-Ecuador.

El sitio de recolección de la especie *Baccharis trinervis* Pers de la Provincia del Napo, fue en la localidad de Vía Tena – Baeza con las coordenadas: Latitud S 00° 98', Longitud W 77° 81'.

El sitio de recolección de la especie *Baccharis teindalensis* Kunth de la Provincia de Pichincha, fue en la localidad del Mirador de Lloa, Laderas del Pichincha con las coordenadas: Latitud S 00°14'59'', Longitud W 78° 34' 13''.

El sitio de recolección de la especie *Baccharis latifolia* de la Provincia de Pichincha, fue en la localidad de la Reserva Ecológica Lloa, con las coordenadas: Latitud S 00° 14' 46'', Longitud W 78° 34' 87''.

El sitio de recolección de la especie *Baccharis buxifolia* (Lam) Pers (Ver anexo 1) de la Provincia de Pichincha, fue en la localidad de

Lloa, con las coordenadas: Latitud S 00° 14' 59" Longitud W 78° 34' 13".

El sitio de recolección de la especie *Baccharis arbutifolia* de la Provincia de Pichincha, fue en la localidad del Páramo de la Virgen, Vía a Baeza, con las coordenadas: Latitud S 00° 18' 46", Longitud W 78° 12' 68".

El sitio de recolección de la especie *Baccharis macrantha* Kunth de la Provincia de Pichincha, fue en la localidad de la Reserva Ecológica Pululahua, con las coordenadas: Latitud S 00° 14' 34", Longitud W 74° 54' 87".

2.3 PERÍODO DE TIEMPO DE LA INVESTIGACIÓN

El tiempo de duración de la presente investigación fué de diez meses, comenzando en el mes de Septiembre del 2006 y culminando en Junio del 2007.

2.4 DISEÑO

La presente investigación analizó seis plantas del Género *Baccharis*, de las cuales a cada una de las especies se identificó los grupos de metabolitos secundarios (alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, quinonas, heterósidos cardiotónicos, sesquiterpenolactonas), y se obtuvo el principio activo (grupo de metabolitos secundarios) el mismo que servirá como un marcador químico.

De acuerdo a los procedimientos pertenecientes a la Marcha Fitoquímica propuesta por la Federal Drug Administration (FDA) el número de repeticiones fue de tres veces por cada grupo de metabolitos secundarios.

El diseño estadístico para un estudio fitoquímico es descriptivo puesto que resume la información de la muestra. Una vez que se han recogido los valores que toman las variables de nuestro estudio (datos), se procedió al análisis descriptivo de los mismos.

El estudio descriptivo presente en este trabajo se desarrolló el método cualitativo de acuerdo a los resultados obtenidos en la investigación.

2.5 PROCEDIMIENTOS

2.5.1 Material Vegetal Recolectado

2.5.1.1 Recolección

La recolección del material vegetal se realizó, de tal manera que permitió obtener cantidades adecuadas para asegurar la presencia y contenido mayoritario de los principios activos, evitando la mezcla con otras especies o contaminantes. El material recolectado fue de tres quintales por cada especie recolectada ya que esta cantidad es la correcta y adecuada para la investigación. El material vegetal que se recolectó en la investigación fue de las partes aéreas de las plantas, este comprendió a hojas, tallos y flores (Di Stasi 2005).

Las hojas se recolectaron al comienzo de la floración, cuando la fotosíntesis es más activa, ya que contienen mayor cantidad de principios activos. Se eligió siempre las hojas y flores sanas y jóvenes, que no presenten manchas, puesto que son un indicio de la presencia de alguna enfermedad viral, bacteriana o micótica, o signos de infestación parasitaria.

Durante la recolección no se amontonó o arrugó las hojas, ya que se puede ocasionar la alteración de ciertos principios activos.

No es conveniente desprover a la planta de todas las hojas, ya que son los órganos que necesita para la fotosíntesis, permitiendo de esta forma la sobrevivencia de la planta y una fuente asegurada de material vegetal (Di Stasi 2005).

Una vez recolectada la planta, se procedió al secado, molienda y conservación.

2.5.1.2 Secado

El proceso de secado se realizó en forma natural y/o artificial; sea cualquiera de estos dos métodos empleados, se eliminó progresivamente la humedad contenida en el material.

2.5.1.2.1 Secado Natural

Para secar en forma natural se colocó un peso sobre la prensa, en un lugar seco, soleado y con buena aireación. Se cambió los pliegos de papel diariamente.

2.5.1.2.2 Secado Artificial

Para el secado artificial se procedió a colocar la muestra fija en el papel en planchas de aluminio corrugadas, intercalando con láminas o planchas de cartón corrugado, se colocó en la estufa u horno eléctrico, con circulación de aire y a temperatura adecuada (40°C), durante un tiempo de dos a cuatro días.

Cuando están casi secos se sacó de la estufa y se terminó el proceso de secado a temperatura ambiente (Di Stasi 2005).

2.5.1.3 Molienda

Para moler a la muestra con el fin de almacenarlas y conservarla para los estudios de investigación se utilizó un molino eléctrico el cual nos da una muestra homogénea y principalmente no alterando los principios activos de las plantas (Ver anexo 2).

2.5.1.4 Almacenamiento y Conservación

Para el almacenamiento se colocó en papel o cartón, como se trata de cantidades muy representativas se utiliza fundas de papel periódico, cajas de cartón forradas de papel periódico, tomando mucho cuidado de que siempre estén protegidos de la luz y la humedad.

Periódicamente cada 48 horas se revisó las plantas almacenadas, comprobando cualquier alteración en el nivel de humedad, moho, insectos o putrefacción.

2.5.2 Identificación Botánica de las Especies Recolectadas del Género *Baccharis*

Al terminar la recolección se procedió a realizar un prensado preliminar, para lo cual, a las muestras colectadas, se retiraron las partes dañadas, y se colocaron la muestra sobre papel periódico, se acomodó de tal forma que las hojas estén completamente extendidas, unas que muestren el haz y otras el envés permitiendo que se pueda observar con claridad las nervaduras, el pecíolo y la disposición sobre el tallo (Di Stasi 2005).

2.5.2.1 Identificación y clasificación taxonómica

Para la identificación y clasificación taxonómica se utilizaron las muestras del material vegetal, para la elaboración de los voucher (muestras de herbario) los cuales se recolectaron de tal manera que permitió tener todos los elementos necesarios para la correcta

identificación y clasificación taxonómica por parte de la botánica del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Central del Ecuador, luego de lo cual se ratificó dicha clasificación botánica de la especie en el Centro de Biología de la Facultad de Filosofía de la Universidad Central del Ecuador y finalmente se validó por científicos especializados del Herbario Nacional. Esto nos permitió obtener una referencia exacta del material utilizado para la investigación.

2.5.2.2 Elaboración del Voucher:

Para coleccionar el material vegetal que será utilizado en la elaboración de los vouchers, se siguió el siguiente procedimiento:

De la especie vegetal a coleccionar, se seleccionó las ramas que estén enteras, con hojas enteras y desarrolladas, sin ningún tipo de infestación parasitaria con flores y frutos (Chiriboga 2005).

Colectar por lo menos tres muestras de cada una de las especies, las mismas que fueron enviadas a todos los especialistas para su correcta identificación.

Además se incluyó la información de campo e información bibliográfica existente sobre cada una de las especies coleccionadas:

a) Información de campo:

- Nombre del colector o colectores
- Fecha (hora, día, mes año)
- Lugar de recolección
 - País
 - Provincia
 - Localidad
 - Lugar

- Cabecera Cantonal
- Coordenadas

- Altura sobre el nivel del mar
- Hábitat
 - Tipo de bosque
 - Tipo de suelo
 - Humedad

- b) Información sobre la planta (cuando se hace la encuesta)
 - Nombre vulgar
 - Usos medicinales
 - Parte utilizada
 - Forma de preparación, administración y dosis

- c) Datos sobre la planta:
 - Tipo de colección
 - Forma de vida
 - Árbol
 - Arbusto
 - Hierba

 - Tamaño de la planta en metros
 - Distribución de las flores en metros
 - Sencillas
 - Inflorescencias

2.5.3 Método de Extracción

Una vez secado el material vegetal y molido se realizó una extracción exhaustiva de éste con el fin de obtener las sustancias bioactivas presentes en las especies vegetales.

2.5.3.1 Muestra seca y pulverizada

- Pesar 100 gramos de la muestra seca y pulverizada a analizar en un matraz (Ver anexo 3).
- Adicionar el doble del volumen de la muestra de etanol al 95°. Verificar que el sobrenadante tenga el doble de volumen del material vegetal colocado.
- Macerar en un balón de vidrio por 48 horas. Anotar día y hora de la misma.
- Llevar a reflujo cerrado durante dos horas, manteniendo una temperatura constante de ebullición (Ver anexo 5)
- Filtrar al vacío el extracto
- Medir el volumen obtenido.
- Concentrar a presión reducida mediante el rotavapor de marca BUCHI R-205 con una temperatura constante de 50°C y con una rotación de 150 rpm, el filtrado hasta la mitad de su volumen (Ver anexo 4).
- Medir el volumen obtenido. El extracto obtenido se denominará Extracto Etanólico Total (EET)

2.5.4 Marcha Fitoquímica

Una vez efectuada la extracción exhaustiva se realizó bioensayos específicos encaminados a demostrar la presencia de sustancias bioactivas en él y, por otro lado, disponer de materia para obtener cromatogramas.

Con la finalidad de diferenciar las diferentes fases obtenidas en esta marcha se empleó la siguiente nomenclatura:

- Extracto Etanólico Total: EET.
- Extracto para la determinación de alcaloides en fase orgánica: Extracto B.
- Extracto para la determinación de Esteroles en fase orgánica: Extracto C.

- Extracto para la determinación de Flavonoides, Taninos, Saponinas, Antraquinonas en fase acuosa: Extracto D.
- Extracto para la determinación de Cumarinas, Sesquiterpenolactonas, Heterósidos Cardiotónicos en fase orgánica: Extracto E.

Los procesos de fraccionamiento se realizan a través de reacciones cualitativas que determinan la concentración de los metabolitos secundarios que contienen las especies vegetales, así se logró determinar: alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides, quinonas, heterósidos cardiotónicos y sesquiterpenolactonas.

La valoración que se designa según la concentración del principio activo establecida por la Federal Drug Administration (FDA) la cual instaure valores cualitativos es la siguiente:

Tabla 2.5.4 Patrón Positivo de Comparación establecida por la Federal Drug Administration

	Patrón Positivo de Comparación (FDA)
Abundante (++++)	Presencia Abundante
Moderado (+++)	Presencia Moderada
Leve (++)	Presencia Leve
Escaso (+)	Presencia Escasa
Nulo (-)	No existe presencia

2.5.4.1 Investigación de Alcaloides

2.5.4.1.1 Extracción:

- Tomar la cantidad del Extracto EET correspondiente a 15 g de planta.
- Añadir Ácido Clorhídrico al 5% para llevar a pH ácido con un valor aproximado de 5, comprobar con papel tornasol el cambio color del papel.

- Adicionar hidróxido de sodio al 20% para llevar a pH básico con un valor aproximado de 8, comprobar con papel tornasol el cambio color del papel.
- Transferir el extracto alcalinizado a un embudo de separación, extraer con diclorometano, utilizando un volumen igual al del extracto.
- Separar el extracto diclorometano (parte inferior). Este extracto se denominará B.
- El residuo (parte superior) se toma una alícuota, se acidifica con Ácido Clorhídrico al 5% y se realizan las pruebas de identificación de alcaloides, para verificar si existe todavía la presencia de éstos. Si existe la presencia de alcaloides se repite la extracción.

2.5.4.1.2 Identificación:

La identificación se realizó en forma cualitativa. En el extracto B y el residuo (parte superior) se realizó las siguientes pruebas de identificación:

- Prueba de Mayer
 - Alícuota del extracto B + Reactivo de Mayer¹.
 - Resultado Positivo: Precipitado de color blanco, formando flóculos blanquecinos.
- Prueba de Draggendorff
 - Alícuota del extracto B + Reactivo de Draggendorff².
 - Resultado Positivo: Precipitado de color rojo ladrillo.
- Prueba de Wagner
 - Alícuota del extracto B + Reactivo de Wagner³.

¹ 1,36 gr HgCl₂ en 60 ml de H₂O + 5 gr KI en 10 ml de H₂O

² 8 gr Bi(NO₃)₃·5H₂O en 20 ml HNO₃ + 27,2 gr KI en 50 ml de H₂O

³ 1,27 gr I₂ + 2 gr KI en 5 ml de H₂O

- Resultado Positivo: Precipitado de color marrón (café).

2.5.4.1.3 Cromatografía:

En la cromatografía para alcaloides se utilizó el extracto B. Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- (BAW) Butanol : ácido acético : agua (10:2:1)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de alcaloides en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. se observan las manchas fluorescentes.

Para la confirmación de alcaloides se revelará la placa con Dragendorff (acético) y si existe una reacción positiva se observarán manchas de color naranja.

2.5.4.2 Investigación de Esteroles

2.5.4.2.1 Extracción de Esteroles:

- Tomar una cantidad de EET correspondiente a 15 gramos de planta, y colocar en un embudo de separación de 500 mililitros.
- Adicionar una cantidad igual de Éter de Petróleo, separar el extracto etéreo (capa superior).
- Este extracto se denominará C.

- En la fracción acuosa (capa inferior) se hará la extracción de Flavonoides, taninos, saponinas y antraquinonas, y lo denominaremos extracto D.

2.5.4.2.2 Identificación de Esteroles:

En el extracto C se realizarán las siguientes pruebas de identificación:

- Prueba de Lieberman-Buchard
 - 1 ml del Extracto C + 0.5 ml Anhídrido acético + 1 gota de ácido sulfúrico (c).
 - Resultado Positivo: Anillo de color azul clarísimo en el punto de contacto.
- Prueba de ZACK
 - 1 ml de Extracto C + 2 ml de ácido acético + 2 gotas de Cloruro Férrico (Cloruro Férrico (FeCl_3) al 20%).
 - Resultado Positivo: Coloración verde, llevar a baño maría algunos segundos si no aparece el color.

2.5.4.2.3 Cromatografía de Esteroles:

Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria aplicar 1 alícuota del extracto C y como fase móvil se utilizó:

- n-hexano: diclorometano (6:4)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de esteroides en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Como reveladores se utilizó:

- Vainillina: ácido sulfúrico al 50% (1 g en 100 ml). Calentar a 120°.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. se observan las manchas fluorescentes.

2.5.4.3 Investigación de Flavonoides, Antraquinonas, Taninos y Saponinas

2.5.4.3.1 Extracción de Flavonoides, Antraquinonas, Taninos y Saponinas

Para la identificación de Flavonoides se utilizó el residuo etanólico D.

2.5.4.3.2 Identificación de Flavonoides

Se colocó una alícuota del extracto D tratado y se realizó las siguientes reacciones de coloración:

- Prueba de Shinoda
 - 1 ml del Extracto D + 1 ml de Ácido Clorhídrico (HCl) (c) + limaduras de magnesio.
 - Resultado Positivo: Espuma abundante y/o coloración roja intensa.
- Prueba de Cianidina
 - 1 ml de extracto D + 1 ml de solución de alcohol clorhídrico⁴ + 2 o 3 trocitos de magnesio.
 - Resultado Positivo: Coloración rosa a roja.

⁴ Alcohol etílico 50° + ácido clorhídrico (c) 2:1 v/v

- Prueba en Medio Alcalino
 - 1 ml de extracto D + gotas de Hidróxido de Potasio (KOH) (5% en etanol 95°) + 1 ml de solución de alcohol clorhídrico + 2 o 3 trocitos de magnesio.
 - Resultado Positivo: Coloración amarillo-naranja.

- Prueba con Cloruro Férrico (FeCl₃)
 - 1 ml de extracto D + Cloruro férrico al 2%.
 - Resultado Positivo: Coloración azul verdosa.

2.5.4.3.3 Cromatografía de Flavonoides:

Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria aplicar una alícuota de D y como fase móvil se utilizó:

- (BAW) n-butanol : ácido acético : agua (4:1:5).

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de flavonoides en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de punto con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. se observan las manchas fluorescentes.

2.5.4.3.4 Identificación de Antocianos

Se colocó una alícuota del extracto D tratado y se realizó las siguientes reacciones de coloración:

- Prueba en Medio Ácido

- 1 ml de extracto D + 2 gotas de Ácido Clorhídrico (HCl) (c) agitar y dejar en reposo.
 - Resultado Positivo: Coloración roja, en caso positivo adicionar exceso de amoníaco (Color cambia a azul).
- Prueba en la Planta Directa
 - 1 g de planta pulverizada + 10 ml de agua hirviendo, llevar a ebullición 5 minutos, filtrar y realizar la reacción en Medio Ácido.
 - Resultado Positivo: Coloración roja, en caso positivo adicionar exceso de amoníaco (Color cambia a azul).

2.5.4.3.5 Identificación de Antraquinonas

Se colocó una alícuota del extracto D tratado y se realizó la siguiente reacción de coloración:

Reacción de Borntrager modificada por Krauss:

- Tomar una alícuota del extracto D.
- Adicionar 5 ml de Ácido Sulfúrico 1 N.
- Llevar a ebullición por 10 minutos.
- Separar la fase orgánica (parte superior).
- Adicionar 1 ml de hidróxido de amonio.
- Observar la coloración rosa de la capa acuosa (parte inferior).

2.5.4.3.6 Cromatografía de Antraquinonas

Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria aplicar una alícuota de D y como fase móvil:

- n- hexano: diclorometano (6:4)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Antraquinonas en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Como reveladores tanto en Antraquinonas como en Naftoquinonas utilizar:

- Hidróxido de Potasio (KOH) al 10% en metanol. Si existe una reacción positiva se observarán Manchas de color amarillo café que cambian a rojo, violeta, verde o púrpura.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. se observan las manchas fluorescentes.

2.5.4.3.7 Cromatografía de Naftoquinonas

Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria aplicar una alícuota de D y como fase móvil se utilizó:

- n- hexano: diclorometano (5:5)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Naftoquinonas en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

2.5.4.3.8 Identificación de Taninos

Se colocó una alícuota del extracto D tratado y se realizó las siguientes reacciones de coloración:

- Prueba con Cloruro férrico

- 1 ml de extracto D + 2 gotas de Cloruro férrico al 2%.
 - Resultado Positivo: Coloración azul si son hidrolizables, y coloración verde si no son hidrolizables.
- Prueba Gelatina salada
 - 1 ml de extracto D + una cantidad igual a la mitad de la alícuota de reactivo de gelatina salada⁵.
 - Resultado Positivo: Precipitado blanco en forma de flóculos.

Diferenciación de taninos hidrolizables y no hidrolizables:

- Prueba Stiasny
 - 1 ml de extracto D + una cantidad de formol clorhídrico⁶.
 - Resultado Positivo: Taninos condensados precipitan en grandes copos de color rojizo.
- Prueba Ácido Clorhídrico (HCl) concentrado
 - Llevar a ebullición 1 ml del extracto D + gotas de Ácido Clorhídrico (HCl) por 10 minutos.
 - Resultado Positivo: Precipitado y/o rojo.

2.5.4.3.9 Identificación de Saponinas

Se colocó una alícuota del extracto D tratado y se realizó las siguientes reacciones de coloración:

- Prueba con agua
 - 1 ml del extracto D + 1 ml del agua. Agitar.

⁵ 1% de gelatina + 10 de cloruro de sodio

⁶ 100 ml de formol 30% + Ácido Clorhídrico (HCl) (c) 50 ml

- Resultado Positivo: Observar la presencia de espuma que permanece mínimo por 1 minuto.
- Prueba Hemólisis
 - 1 ml del extracto D + 2 gotas de sangre.
 - Resultado Positivo: Observar al microscopio Hemólisis.
- Prueba en la Planta Directa con Agua
 - 1 g de planta pulverizada adicionar agua y agitar.
 - Resultado Positivo: Observar la presencia de espuma que permanece mínimo por 1 minuto.
- Prueba en la Planta Directa con Hemólisis
 - 1 g de planta pulverizada colocar sobre una placa agar sangre. Dejar por un período de 12 a 24 horas.
 - Resultado Positivo: Observar la presencia de un halo de hemólisis.

2.5.4.4 Investigación de Sesquiterpenolactonas, Cumarinas y Heterósidos Cardiotónicos

2.5.4.4.1 Extracción:

Se tomó una alícuota del extracto EET correspondiente a 9 gramos de planta, se precipito con una solución de acetato de plomo al 5%, filtrar y al filtrado extraer con diclorometano (parte inferior).

El extracto de diclorometano tratarlo con sulfato de sodio anhidro, filtrar y concentrar. A este extracto obtenido le denominaremos Extracto E.

2.5.4.4.2 Identificación de Heterósidos Cardiotónicos

Se colocó una alícuota del extracto E tratado y se realizó las siguientes reacciones de coloración:

- Prueba Baljet
 - 1 ml del extracto D + 0.5 ml del reactivo de Baljet⁷ y unas gotas de hidróxido de potasio 10% en etanol.
 - Resultado Positivo: Color rojo naranja inestable.

- Prueba Kedde
 - 1 ml del extracto D + 0.5 ml de reactivo de Kedde⁸ añadir gotas de KOH 10% en etanol.
 - Resultado Positivo: Color rojo – púrpura muy estable.

- Prueba Raymond – Marthoud
 - 1 ml del extracto D + 0.5 ml de reactivo de Raymond-Marthoud⁹, añadir gotas de KOH al 10% en etanol
 - Resultado Positivo: Color violeta fugaz.

2.5.4.4.3 Cromatografía de Heterósidos Cardiotónicos

Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria aplicar una alícuota de extracto E y como fase móvil se utilizó:

- Cloroformo : acetona (9:1)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Heterósidos Cardiotónicos en la placa de sílica gel GF 254 fue a

⁷ Ácido pícrico 1 % en etanol de 50°

⁸ Ácido dinitrobenzoico 1 % en etanol de 96°

⁹ m-dinitrobenzoceno al 1% en alcohol de 96°

una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Como reveladores se va a utilizar:

- Reactivo de Kedde:

1 g de ácido 3.5 dinitrobenzónico se disuelve en una mezcla de 50 ml de metanol y 50 ml de Hidróxido de potasio (KOH) 2N. Si existe reacción positiva se observarán manchas de color violeta azulado.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. se observan las manchas fluorescentes.

2.5.4.4 Cromatografía de Cumarinas y Sesquiterpenolactonas

Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria aplicar una alícuota de extracto E y como fase móvil se utilizó.

- Cloroformo : acetona (9:1)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Cumarinas y sesquiterpenolactonas en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda con un tubo capilar de 0,5 microlitros.

Como reveladores se utilizó:

- Hidróxido de potasio (KOH) 5% en metanol.

Se procede a observar a luz visible, mediante la cámara de ultravioleta con una onda de longitud de 254 nm y 365 nm. se observan las manchas fluorescentes.

2.5.5 Método de Fraccionamiento del Principio Activo

2.5.5.1 Muestra seca y pulverizada

- Pesar 400 gramos de la muestra seca y pulverizada a analizar.
- Adicionar el doble del volumen de la muestra de etanol al 95°. Verificar que el sobrenadante tenga el doble de volumen del material vegetal colocado.
- Macerar en un balón de vidrio por 48 horas.
- Filtrar al vacío el extracto obtenido.
- Medir el volumen obtenido.
- Concentrar a presión reducida mediante el rotavapor de marca BUCHI R-205 con una temperatura constante de 50°C y con una rotación de 150 rpm, el filtrado hasta la mitad de su volumen.
- Medir el volumen obtenido. El extracto obtenido se denominará Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA).

2.5.5.2 Fraccionamiento del Principio Activo

El fraccionamiento del principio activo esta basado en la solubilidad selectiva de los distintos componentes de los extractos en disolventes de diferente polaridad. Es necesario realizar varias extracciones con estos disolventes para obtener una purificación del extracto, es por esto que en cada extracción se realiza una cromatografía en capa fina con el fin de garantizar que existe la presencia de flavonoides y la eliminación de otros metabolitos secundarios que puedan interferir en los resultados finales.

- Colocar en un embudo de separación el Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA). Realizar cromatografía en capa fina.
- Adicionar 30 ml de n-hexano. Mezclar circularmente.
- Separar el Extracto Etanólico del n-hexano. El EEPA se encuentra en la parte inferior del embudo. Realizar cromatografía en capa fina.

- A este Extracto Etanólico adicionar 30 ml de Diclorometano. Mezclar circularmente.
- Separar el Extracto Etanólico del Diclorometano. El EEPA se encuentra en la parte superior del embudo (Ver anexo 6). Realizar cromatografía en capa fina
- A este Extracto Etanólico adicionar 15 ml de Acetato de Etilo. Mezclar circularmente.
- Separar el Extracto Etanólico del Acetato de Etilo. El EEPA se encuentra en la parte inferior del embudo. Realizar cromatografía en capa fina.
- Adicionar 30 ml de n-butanol. Mezclar circularmente.
- Separara el Extracto Etanólico del n-butanol. El EEPA se encuentra en la parte inferior del embudo. Realizar cromatografía en capa fina.

2.5.5.3 Cromatografía en Capa Fina del Fraccionamiento del Principio Activo

- Realizar cromatografía en capa fina del Extracto Etanólico Principio Activo, n-hexano, Diclorometano, Acetato de etilo, n-butanol.

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento del principio activo en la placa de sílica gel GF 254 fue a una distancia de 1.5 cm entre cada uno de ellos. La siembra realizada fue en la forma de punto.

- Utilizando placas de sílica gel GF 254 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:
 - (BAW) Butanol : ácido acético : agua (6:3:1)
- Realizar cromatografía en capa fina de fase inversa n- butanol.

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de n-butanol en la placa de sílica gel GF 18 fue a una distancia de 1.5 cm entre cada uno de ellos. La siembra realizada fue en la forma de punto y en banda.

- Utilizando placas de fase inversa de sílica gel GF 18 como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:
 - Metanol: agua (2:1)

2.6 ANÁLISIS DE DATOS

Como el estudio estadístico es descriptivo se realizó una desviación estándar del promedio de los metabolitos secundarios comunes en cada especie del Género *Baccharis* para observar la desviación instantánea de la posición de equilibrio de cada uno de los metabolitos secundarios que se encuentran presentes en las seis especies estudiadas.

Las variables cualitativas o categóricas son aquellas que no necesitan números para expresarse; cada forma particular en que pueden presentarse se denomina modalidad. En consecuencia, para una variable cualitativa, cada dato no es más que la información de que un determinado elemento de la muestra presenta una determinada modalidad.

El campo de la estadística descriptiva no tiene que ver con las implicaciones o conclusiones que se puedan deducir de conjuntos de datos. La estadística descriptiva sirve como método para organizar datos y poner de manifiesto sus características esenciales con el propósito de llegar a conclusiones.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 RECOLECCIÓN

La recolección del material vegetal se realizó de tal manera que permitió obtener las condiciones adecuadas para asegurar la presencia y contenido mayoritario de los principios activos.

La especie recolectada en la Provincia del Napo es la *Baccharis trinervis* Pers. Mientras que las especies recolectadas en la Provincia de Pichincha son: *Baccharis teindalensis* Kunth, *Baccharis latifolia*, *Baccharis buxifolia* (Lam) Pers, *Baccharis arbutifolia* (Lam), *Baccharis macrantha* Kunth.

3.2 ELABORACIÓN DEL VOUCHER:

Para la identificación y clasificación taxonómica se realizó mediante la elaboración de los voucher (muestras de herbario) lo que permitió tener todos los elementos necesarios para la correcta identificación y clasificación taxonómica.

3.2.1 *Baccharis trinervis* Pers

a) Información De Campo:

Colectora: Gabriela Miño

Fecha de Recolección: 8 de Febrero de 2007

Lugar de Recolección:

País: Ecuador

Provincia: Napo

Localidad: Vía Tena – Baeza

Lugar: Bosque Secundario Húmedo tropical lluvioso.

Cabecera Cantonal: Tena

Capital Provincial: Tena

Coordenadas:

Latitud: S 0.983°

Longitud: W 77.81°

Altura: 599 msnm

Hábitat: Márgenes de Arroyos y ríos, orillas de caminos y parcelas, bosques abiertos.

b) Información Sobre La Planta:

Familia: ASTERACEAE

Nombre Científico: *Baccharis trinervis* Pers.

Referencia: Dra. Consuelo Montalvo

Nombre Común: Chilca, Hierba del Carbonero, Jarilla

Usos: Analgésico, antiinflamatorio, antiespasmódico, antigripal, leña.

Descripción Del Uso: Infusión, emplastos, baños, jugo

Parte Utilizada: Hojas, Flores, Tallo.

Informantes: Dra. Ximena Chiriboga

c) Datos Sobre La Planta:

c.1) Colección: Al azar con información etnobotánica

c.2) Descripción Botánica: Arbusto de 1-2 metros de altura, ramosos. Densamente cubierto con puntos glandulosos, con hojas hasta el ápice. Las hojas son simples y alternas, de forma lanceolada y margen entero. Miden 5-8 cm. de largo. Flores blancas muy aromáticas. El cáliz es verde claro y pubescente, la corola crema verdoso, estambres, anteras y pistilo de color crema verdoso, Capítulos dispuestos en cimas corimbiformes pluricéfalas. Corteza verde claro, por dentro de color crema.

3.2.2 *Baccharis teindalensis* Kunth

a) Información De Campo:

Colectora: Gabriela Miño

Fecha De Recolección: 1 de Marzo de 2007

Lugar De Recolección: Mirador de Lloa, Laderas del Pichincha

País: Ecuador

Provincia: Pichincha

Localidad: Pichincha

Lugar: Mirador de Lloa, Laderas del Pichincha

Cabecera cantonal: Quito

Capital Provincial: Quito

Coordenadas:

Latitud: S 00° 14'59"

Longitud: W 78° 34' 13"

Altura: 3215 msnm

Hábitat: Páramo Andino, Región Altiplano, Montaña y colinas de clima templado frío.

b) Información Sobre La Planta:

Familia: ASTERACEAE

Nombre Científico: *Baccharis teindalensis* Kunth

Referencia: Dra. Consuelo Montalvo

Nombre Común: Chilca redonda

Usos: Analgésico, antiinflamatorio, antirreumático, antiespasmódico, antigripal

Descripción Del Uso: Infusión, emplastos o cataplasmas de las hojas, jugo

Parte Utilizada: Hojas, Flores, Tallo

Informantes: Sr. Arturo Sotomayor, Sr. Hugo Llugcha

c) Datos Sobre La Planta:

c.1) Colección: Al azar con información etnobotánica.

c.2) Descripción Botánica: Arbusto de 1,5 – 3 metros de altura, ramosos. Glabro, entrenudos de 10 – 30 metros de longitud, hojas alternas, herbáceas, pecioladas, con pecíolo de 10 – 30 mm de longitud y lámina ovado-lanceolada, atenuada y aguda en el ápice, con base decidua o atenuada, verde brillante por el haz, con tres nervios que salen desde la base pronunciados, Capítulos femeninos muy numerosos, peciolados, formando cimas corimbiformes densas con nervadura central oscura; Flores muy numerosas con corola filiforme, aquenios oblongos, glabros de 1,2 mm de largo; papus blanquecino, Capítulos masculinos con involucro, flores numerosas con corola pentalobada, ramas del estilo separadas.

3.2.3 *Baccharis latifolia*

a) INFORMACIÓN DE CAMPO:

Colectora: Gabriela Miño

Fecha De Recolección: 1 de Marzo de 2007

Lugar De Recolección: Reserva Ecológica Lloa.

País: Ecuador

Provincia: Pichincha

Localidad: Lloa

Lugar: Reserva Ecológica Lloa.

Cabecera Cantonal: Quito

Capital Provincial: Quito

Coordenadas:

Latitud: S 0° 14' 52,46"

Longitud: W 78° 34' 32,87"

Altura: 2400-3200 msnm

Hábitat: Páramo Andino, Región Altiplano, Montaña y colinas de clima templado frío.

b) Información Sobre La Planta:

Familia: ASTERACEAE

Nombre Científico: *Baccharis latifolia*.

Referencia: Dr. Carlos Cerón

Nombre Común: Chilca de lo alto

Usos: Antidiarreico, Dolores reumáticos, analgésico.

Descripción Del Uso: Infusión, té, baños

Parte Utilizada: Hojas, Flores, Tallo

Informantes: Sr. Hugo Llugcha

c) Datos Sobre La Planta:

c.1) Colección: Sector occidental del sur de Quito (Lloa)

c.2) Descripción Botánica: Arbusto de 1.5 - 4 metros de altura, ramosos. Hojas 12 -15 cm. de longitud por 3 – 6 cm. de ancho. Pecíolo de 10 -30 mm de longitud, base cuneada, ápice agudo, margen serrado- dentado, conspicuamente trinervada desde un poco más arriba de la base, glabra en ambas caras. Capítulos con 20 -22 flores estaminadas, capítulos femeninos acampanados con 120-130 flores postiladas.

3.2.4 *Baccharis buxifolia* (Lam) Pers

a) Información De Campo:

Colectora: Gabriela Miño

Fecha De Recolección: 1 de Marzo de 2007

Lugar De Recolección: Lloa.

Provincia: Pichincha

Localidad: Lloa

Lugar: Reserva Ecológica Lloa

Cabecera cantonal: Distrito Metropolitano de Quito

Capital Provincial: Quito

Coordenadas:

Latitud: S 00° 14' 59"

Longitud: W 78° 34' 13"

Altura: 3600 msnm

Hábitat: Páramo Andino, Región Altiplano, Montaña Y Colinas De
Clima templado frío.

b) Información Sobre La Planta:

Familia: ASTERACEAE

Nombre Científico: *Baccharis buxifolia* (Lam) Pers

Referencia: Dr. Carlos Morales

Nombre Común: Chilca

Usos: Antidiarreico, Dolores reumáticos, analgésico.

Descripción Del Uso: Infusión, té, baños.

Parte Utilizada: Hojas, Flores, Tallo

Informantes: Sr. Hugo Llugcha

c) Datos Sobre La Planta:

c.1) Colección: Sector Occidental Del Sur De Quito (Lloa)

c.2) Descripción botánica: Planta arbusiva, hasta 3 metros de altura, dioica, hojas 1 a 2 cm. de longitud por 0,3 a 1 cm. de ancho, opuestas avaladas, base cuneada, ápice agudo, margen cerrado, trinervias, glabras y resinosas. Ramos anguloso, resinosos, corimbos terminales, brácteas tubuladas. Pecíolo 1-2 cm. de largo; inflorescencia paniculada, terminal, ramificada, ejes principal y secundarios de la inflorescencia glabros, cabezuelas femeninas 4 mm de largo; corolas de las flores masculinas tubulares, regulares, con limbo 5- partido, anteras obtusas en la base; aquenios de las flores femeninas comprimidos 2 mm de largo; papo o vilano en las flores femeninas formado por aristas largas y abundantes de 4 mm de largo.

3.2.5 *Baccharis arbutifolia* (Lam)

a) Información De Campo:

Colectora: Gabriela Miño

Fecha De Recolección: 31 de Marzo de 2007

Lugar De Recolección: Páramo de la Virgen

Provincia: Pichincha

Localidad: Vía Baeza

Lugar: Reserva Ecológica Páramo de la Virgen

Cabecera cantonal: Papallacta- Baeza

Capital Provincial: Quito

Coordenadas:

Latitud S 00° 18' 46''

Longitud W 78° 12' 68''.

Altura: 3200 msnm

Hábitat: Páramo Andino, Región Altiplano, Montaña Y Colinas De
Clima frío.

b) Información Sobre La Planta:

Familia: ASTERACEAE

Nombre Científico: *Baccharis arbutifolia* (Lam)

Referencia: Dr. Carlos Morales

Nombre Común: Chilca del páramo

Usos: Antidiarreico, analgésico

Descripción Del Uso: Infusión, té.

Parte Utilizada: Hojas, Flores, Tallo

Informantes: Sr. Pedro Basantes

c) Datos Sobre La Planta:

c.1) Colección: Sector Páramo de la Virgen

c.2) Descripción botánica: Planta arbusiva, hasta 3 metros de altura, dioica. Hojas 1 a 1.5 cm. de longitud por 0,5 a 1 cm. de ancho, opuestas ovaladas, base cuneada, ápice agudo, borde dentado, glabras y resinosa. Ramos anguloso, corimbos terminales, resinosa, brácteas tubuladas. Inflorescencia paniculada, terminal, ramificada, ejes principal y secundarios de la inflorescencia glabros, cabezuelas femeninas 3 mm de largo; corolas de las flores masculinas tubulares con limbo 3-partido, anteras obtusas en la base; aquenios de las flores femeninas comprimidos 1 mm de largo; vilano en las flores femeninas.

3.2.6 *Baccharis macrantha* Kunth

a) Información De Campo:

Colectora: Gabriela Miño

Fecha De Recolección: 26 de Mayo de 2007

Lugar De Recolección: Pululahua

Provincia: Pichincha

Localidad: Pululahua

Lugar: Reserva Ecológica Pululahua

Cabecera cantonal: Distrito Metropolitano de Quito

Capital Provincial: Quito

Coordenadas:

Latitud S 00° 14' 34''

Longitud W 74° 54' 87''.

Altura: 3950 msnm

Hábitat: Páramo Andino, Región Altiplano, Montaña y Colinas De
Clima templado frío.

b) Información Sobre La Planta:

Familia: ASTERACEAE

Nombre Científico: *Baccharis macrantha* Kunth

Referencia: Dr. Carlos Morales

Nombre Común: Chilca

Usos: Dolores reumáticos, analgésico, antiinflamatorio

Descripción Del Uso: Infusión.

Parte Utilizada: Hojas, Flores, Tallo

Informantes: Sr. Juan Vélez

c) Datos Sobre La Planta:

c.1) Colección: Sector Occidental Reserva Pululahua

c.2) Descripción botánica: Planta arbusiva, hasta 2 metros de altura, ramosa. Hojas 10 -13 cm. de longitud por 2 – 5 cm. de ancho. Pecíolo de 8 -25 mm de longitud, base atenuada, ápice agudo con punta menos prominente y más ancha, margen entero. Hojas alternas. Lámina foliar oblonga. Capítulos de 8-10 mm diámetro. Involucro con 30-60 filarias 6-7 seriadas generalmente púrpuras. Flores masculinas 33-85, corola 6-7.3 mm. Flores femeninas 75-125, corola 3.2-4.5 mm.

3.3 MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

3.3.1 Método de Extracción de *Baccharis trinervis*

Peso de la Planta: 50 gr.

Volumen de Etanol (96°): 400 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Duración del Reflujo (temperatura constante de ebullición): 2 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 290 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 69 ml.

Volumen Extracto Etanólico Total: 69 ml

3.3.2 Método de Extracción de *Baccharis teindalensis*

Peso de la Planta: 100 gr.

Volumen de Etanol (96°): 550 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Duración del Reflujo (temperatura constante de ebullición): 2 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 350 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 102 ml.

Volumen Extracto Etanólico Total: 102 ml

3.3.3 Método de Extracción de *Baccharis latifolia*

Peso de la Planta: 100 gr.

Volumen de Etanol (96°): 600 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Duración del Reflujo (temperatura constante de ebullición): 2 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 375 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 152 ml.

Volumen Extracto Etanólico Total: 152 ml

3.3.4 Método de Extracción de *Baccharis buxifolia*

Peso de la Planta: 100 gr.

Volumen de Etanol (96°): 600 ml

Duración de la Maceración: 48 horas

Duración del Reflujo (temperatura constante de ebullición): 2 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 427 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 120 ml.

Volumen Extracto Etanólico Total: 120 ml.

3.3.5 Método de Extracción de *Baccharis arbutifolia*

Peso de la Planta: 100 gr.

Volumen de Etanol (96°): 550 ml

Duración de la Maceración: 48 horas

Duración del Reflujo (temperatura constante de ebullición): 2 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 395 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 122 ml.

Volumen Extracto Etanólico Total: 122 ml.

3.3.6 Método de Extracción de *Baccharis macrantha*

Peso de la Planta: 100 gr.

Volumen de Etanol (96°): 600 ml

Duración de la Maceración: 48 horas

Duración del Reflujo (temperatura constante de ebullición): 2 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 437 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 156 ml.

Volumen Extracto Etanólico Total: 156 ml.

3.4 RESULTADOS DE MARCHA FITOQUÍMICA

3.4.1 Resultados de Marcha Fitoquímica de *Baccharis trinervis*

ALCALOIDES	
Mayer	+
Draggendorff	+
Wagner	+
ESTEROLES	
Lieberman-Buchard	++
Zack	++
FLAVONOIDES	
Shidona	++++
Cianidina	++++
Medio alcalino	++++
Cloruro férrico	++++
ANTOCIANOS	
Medio Ácido	-
Planta Directa	-
ANTRAQUINONAS	
Borntrager (Krauss)	+
TANINOS	
Cloruro férrico	++
Gelatina salada	++
Hidrolizables	-
No hidrolizables	+++
SAPONINAS	
Agua	-
Hemólisis	-
Planta Directa con Agua	-
Planta Directa hemólisis	-
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	
Baljet	++
Kedde	++
Raymond- Marthoud	++

Tabla 3.4.1 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis trinervis*
Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

Abundante (++++), Moderada (+++), Leve (++), Escaso (+), Nulo (-)

3.4.2 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis teindalensis*

ALCALOIDES	
Mayer	+
Draggendorff	+
Wagner	+
ESTEROLES	
Lieberman-Buchard	+++
Zack	+++
FLAVONOIDES	
Shidona	++++
Cianidina	++++
Medio alcalino	++++
Cloruro férrico	++++
ANTOCIANOS	
Medio Ácido	-
Planta Directa	-
ANTRAQUINONAS	
Borntrager (Krauss)	+
TANINOS	
Cloruro férrico	+++
Gelatina salada	+++
Hidrolizables	-
No hidrolizables	+++
SAPONINAS	
Agua	-
Hemólisis	-
Planta Directa con Agua	-
Planta Directa hemólisis	-
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	
Baljet	+
Kedde	+
Raymound- Marthoud	+

Tabla 3.4.2 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis teindalensis*
Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

Abundante (++++), Moderada (+++), Leve (++) , Escaso (+), Nulo (-)

3.4.3 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis latifolia*

ALCALOIDES	
Mayer	+
Draggendorff	+
Wagner	+
ESTEROLES	
Lieberman-Buchard	+++
Zack	+++
FLAVONOIDES	
Shidona	++++
Cianidina	++++
Medio alcalino	++++
Cloruro férrico	++++
ANTOCIANOS	
Medio Ácido	-
Planta Directa	-
ANTRAQUINONAS	
Borntrager (Krauss)	++
TANINOS	
Cloruro férrico	+++
Gelatina salada	+++
Hidrolizables	-
No hidrolizables	+++
SAPONINAS	
Agua	-
Hemólisis	-
Planta Directa con Agua	-
Planta Directa hemólisis	-
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	
Baljet	++
Kedde	++
Raymound- Marthoud	++

Tabla 3.4.3 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis latifolia*
Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

Abundante (++++), Moderada (+++), Leve (++), Escaso (+), Nulo (-)

3.4.4 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis buxifolia*

ALCALOIDES	
Mayer	+
Draggendorff	+
Wagner	+
ESTEROLES	
Lieberman-Buchard	+++
Zack	+++
FLAVONOIDES	
Shidona	++++
Cianidina	++++
Medio alcalino	++++
Cloruro férrico	++++
ANTOCIANOS	
Medio Ácido	-
Planta Directa	-
ANTRAQUINONAS	
Borntrager (Krauss)	++
TANINOS	
Cloruro férrico	++
Gelatina salada	++
Hidrolizables	-
No hidrolizables	+++
SAPONINAS	
Agua	-
Hemólisis	-
Planta Directa con Agua	-
Planta Directa hemólisis	-
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	
Baljet	+
Kedde	+
Raymound- Marthoud	+

Tabla 3.4.4 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis buxifolia*
Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

Abundante (++++), Moderada (+++), Leve (++), Escaso (+), Nulo (-)

3.4.5 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis arbutifolia*

ALCALOIDES	
Mayer	++
Draggendorff	++
Wagner	++
ESTEROLES	
Lieberman-Buchard	++
Zack	++
FLAVONOIDES	
Shidona	++++
Cianidina	++++
Medio alcalino	++++
Cloruro férrico	++++
ANTOCIANOS	
Medio Ácido	-
Planta Directa	-
ANTRAQUINONAS	
Borntrager (Krauss)	+
TANINOS	
Cloruro férrico	+++
Gelatina salada	+++
Hidrolizables	-
No hidrolizables	+++
SAPONINAS	
Agua	-
Hemólisis	-
Planta Directa con Agua	-
Planta Directa hemólisis	-
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	
Baljet	++
Kedde	++
Raymound- Marthoud	++

Tabla 3.4.5 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis arbutifolia*
Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

Abundante (++++), Moderada (+++), Leve (++), Escaso (+), Nulo (-)

3.4.6 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis macrantha*

ALCALOIDES	
Mayer	+
Dragendorff	+
Wagner	+
ESTEROLES	
Lieberman-Buchard	++
Zack	++
FLAVONOIDES	
Shidona	++++
Cianidina	++++
Medio alcalino	++++
Cloruro férrico	++++
ANTOCIANOS	
Medio Ácido	-
Planta Directa	-
ANTRAQUINONAS	
Borntrager (Krauss)	++
TANINOS	
Cloruro férrico	++
Gelatina salada	++
Hidrolizables	-
No hidrolizables	+++
SAPONINAS	
Agua	-
Hemólisis	-
Planta Directa con Agua	-
Planta Directa hemólisis	-
HETERÓSIDOS CARDIOTÓNICOS	
Baljet	++
Kedde	++
Raymond- Marthoud	++

Tabla 3.4.6 Resultados de la Marcha Fitoquímica de *Baccharis macrantha*
Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

Abundante (++++), Moderada (+++), Leve (++) , Escaso (+), Nulo (-)

3.5 RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

3.5.1 Resultados de la Cromatografía de Alcaloides

3.5.1.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

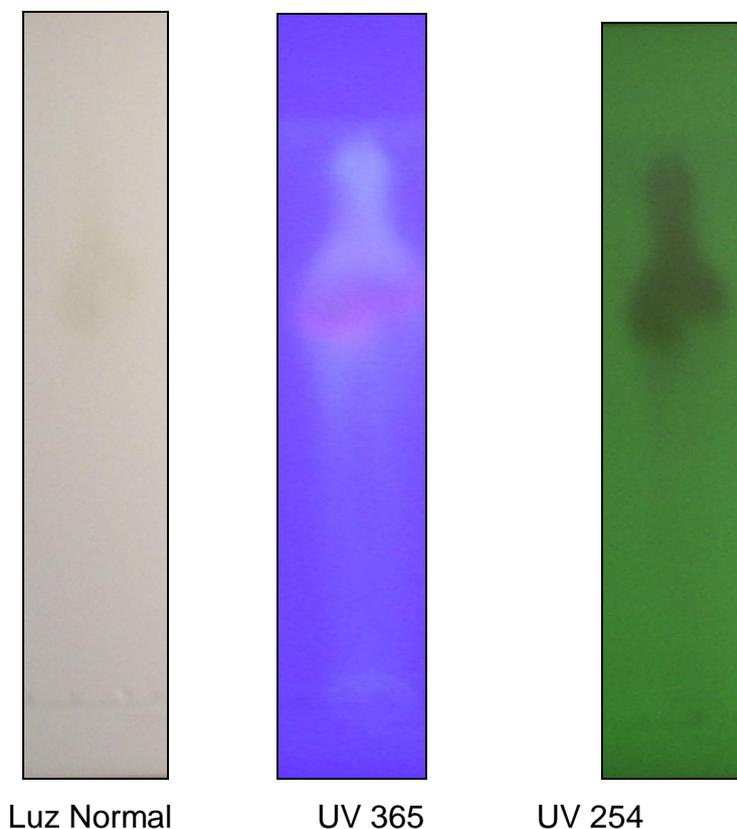


Figura 3.5.1.1 Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.1.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Café Verdes
365 nm	Amarillo Celeste Morado Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.1.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

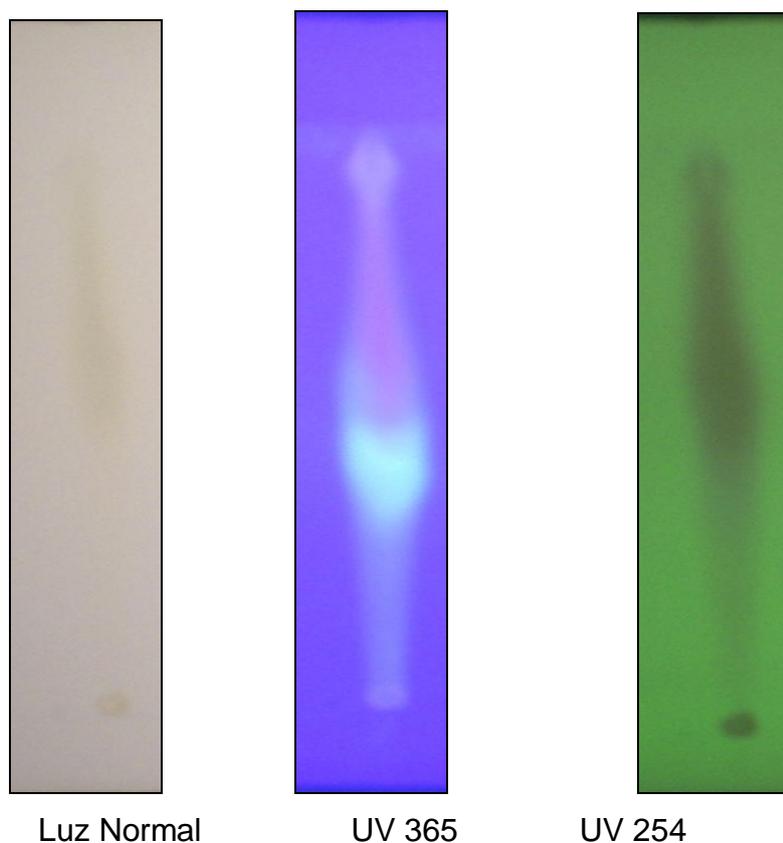


Figura 3.5.1.2 Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.1.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Café Verdes
365 nm	Celeste Morado Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.1.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

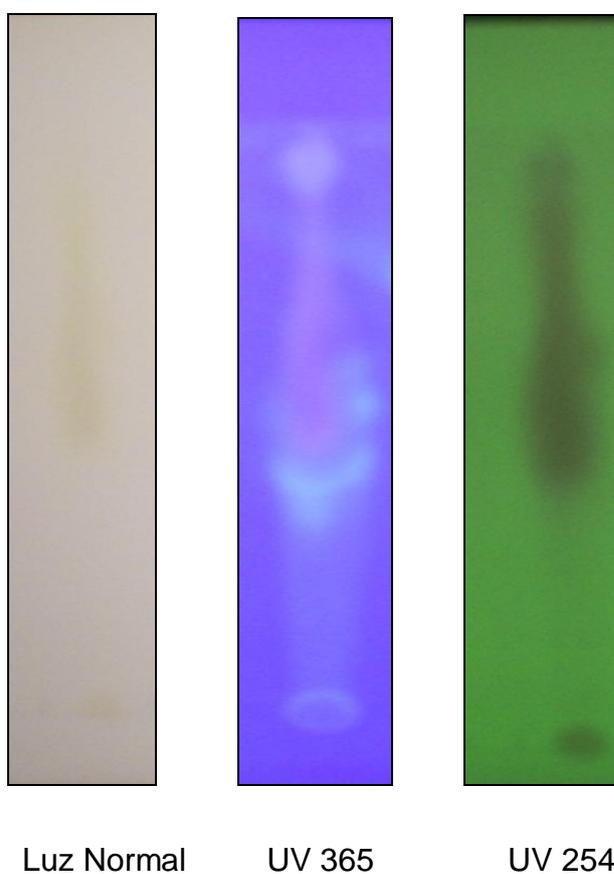


Figura 3.5.1.3 Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.1.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Café Verdes
365 nm	Anarajando Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.1.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

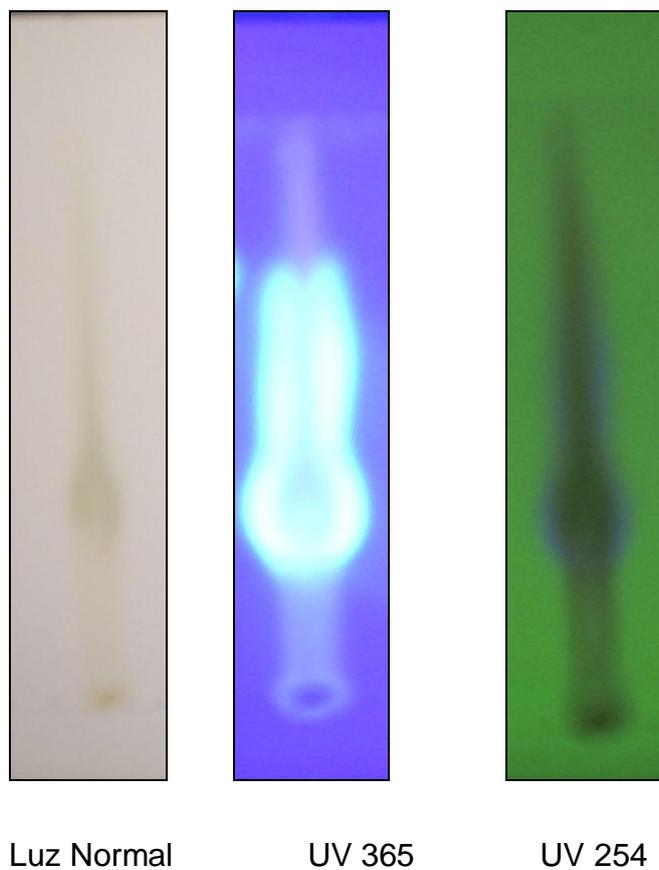


Figura 3.5.1.4 Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.1.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Café Verdes
365 nm	Celeste intenso Verde
254 nm	Celeste Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.1.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

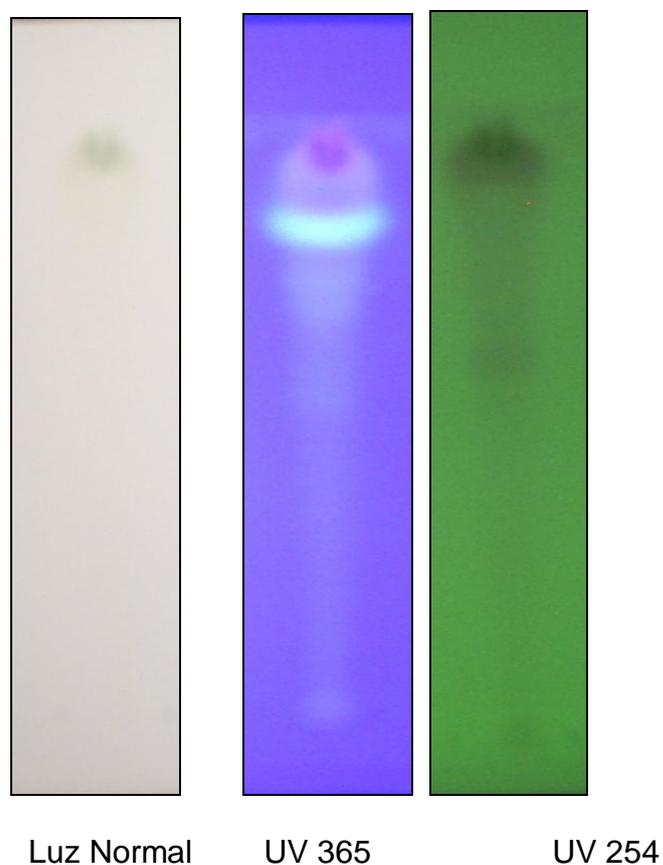


Figura 3.5.1.5 Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.1.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Café Verdes
365 nm	Celeste Morado Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.1.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

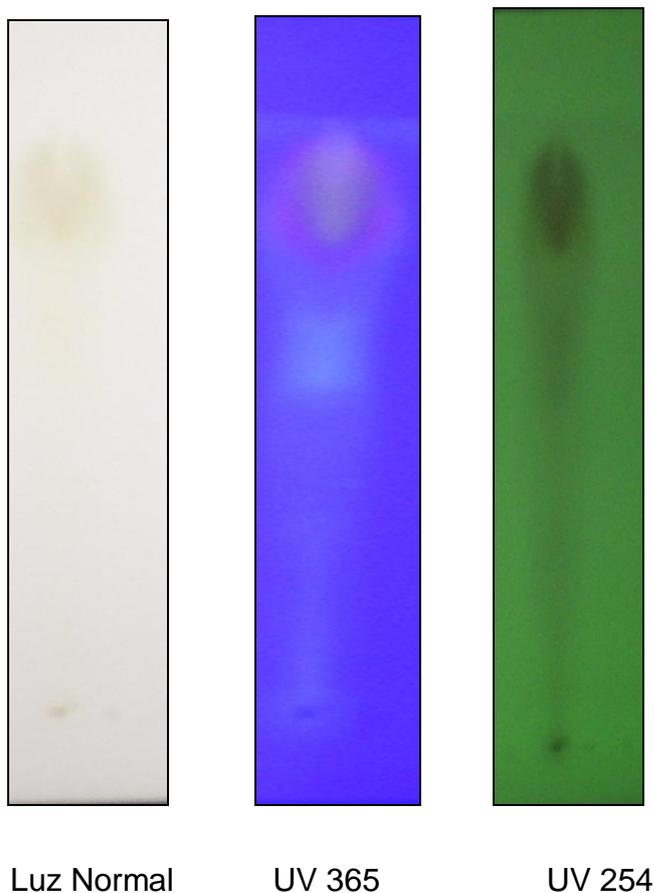


Figura 3.5.1.6 Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.1.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Alcaloides de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Café Verdes
365 nm	Amarillo Anarajando Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.2 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Alcaloides

En la cromatografía para alcaloides se utilizó el extracto B. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- (BAW) Butanol : ácido acético : agua (10:2:1).

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de alcaloides en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de punto.

Para la comprobación de la presencia de alcaloides se han desarrollado un gran número de reactivos de coloración y de precipitación; algunos de ellos son considerados de aplicación específica y se considera que existe presencia de alcaloides si existe reacción positiva, sin embargo se realizó cromatografía en capa fina para comprobar la presencia de este metabolito secundario en las seis especies del Género *Baccharis*.

La forma que se detectó la presencia de alcaloides es mediante el agente revelador que es el reactivo de Dragendorff acético cuya aplicación produce manchas de color naranja (Lock 1994), dentro de las cuales se obtuvo cierta cantidad de alcaloides muy escasa en las seis especies estudiadas a excepción de la especie *Baccharis arbutifolia* en la que se pudo observar una concentración mayor de alcaloides.

A luz normal solo se pudo observar levemente manchas de color café y verde características del extracto, sin embargo a longitud de onda de 365 nm. se pudo observar varias manchas fluorescentes de color celeste, amarillo, morado y anaranjado, que no necesariamente corresponden a alcaloides sino a complejos que se forman con otros metabolitos secundarios.

3.5.3 Resultados de la Cromatografía de Esteroles

3.5.3.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

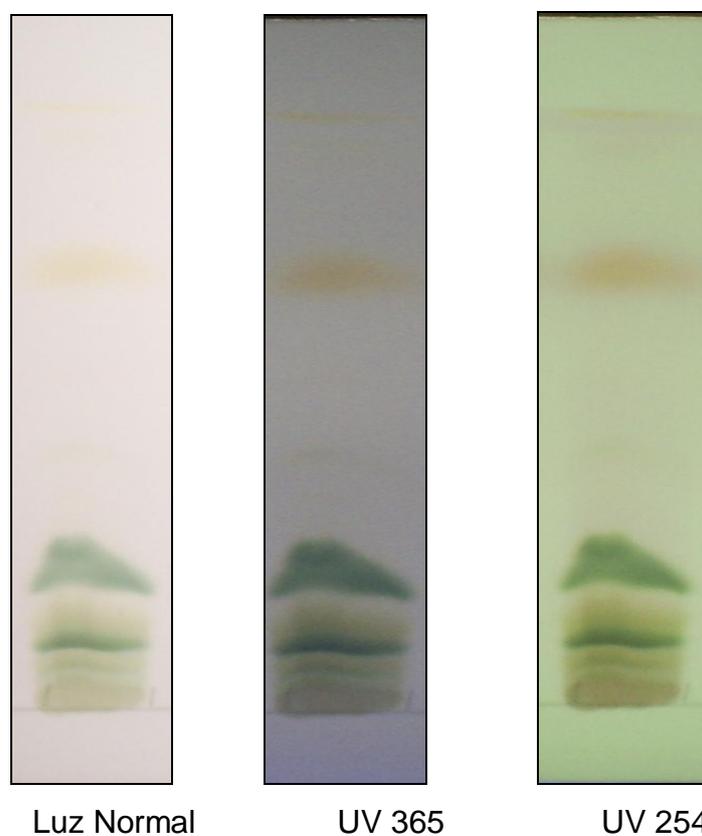


Figura 3.5.3.1 Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.3.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.3.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

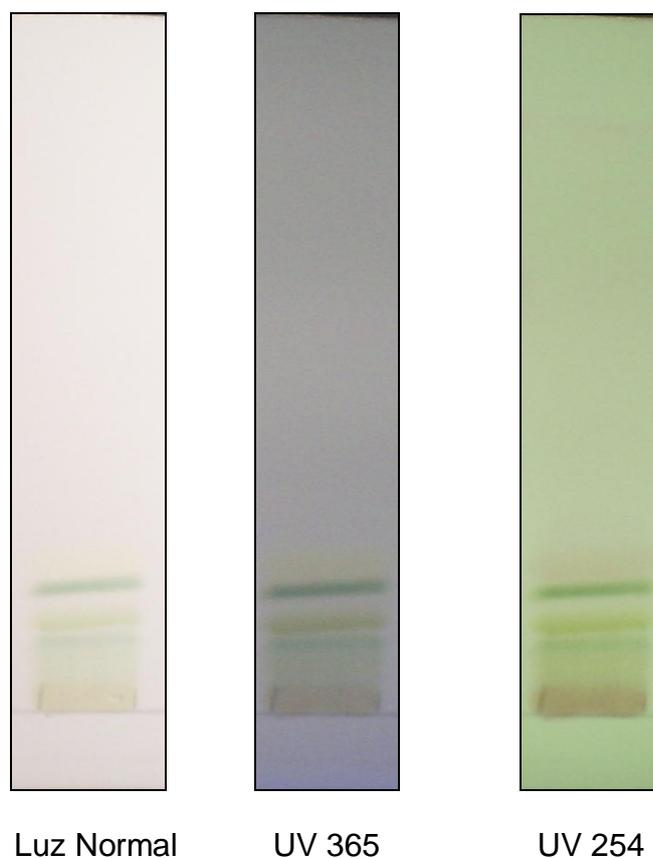


Figura 3.5.3.2 Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.3.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.3.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

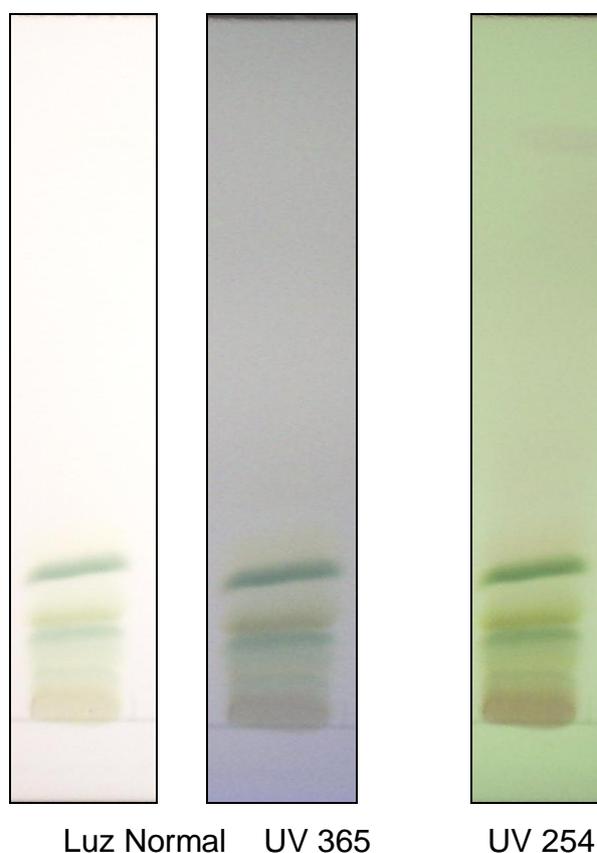


Figura 3.5.3.3 Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.3.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.3.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

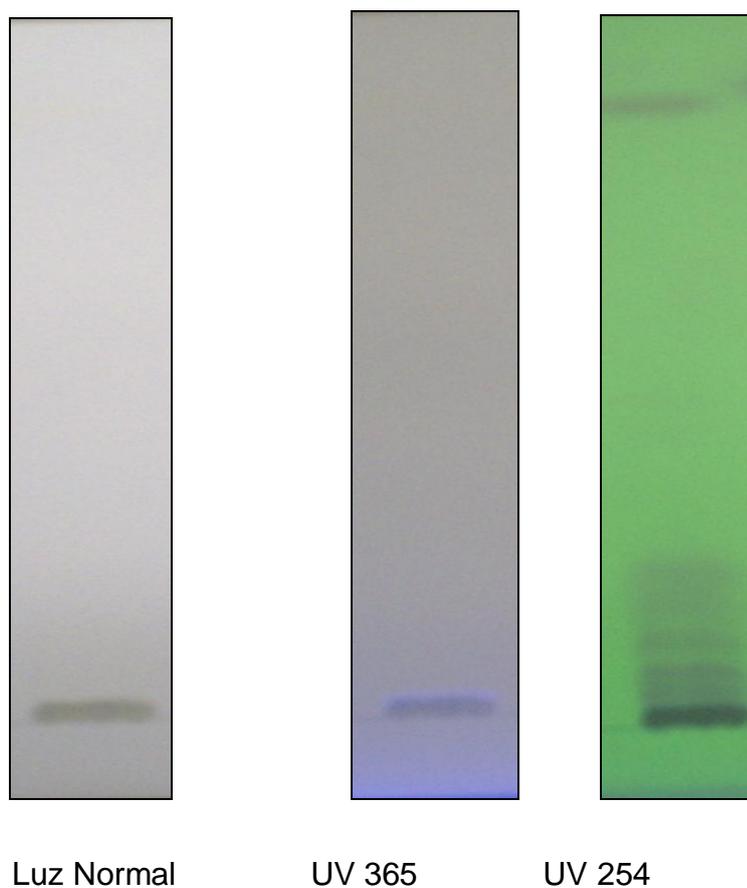


Figura 3.5.3.4 Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.3.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.3.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

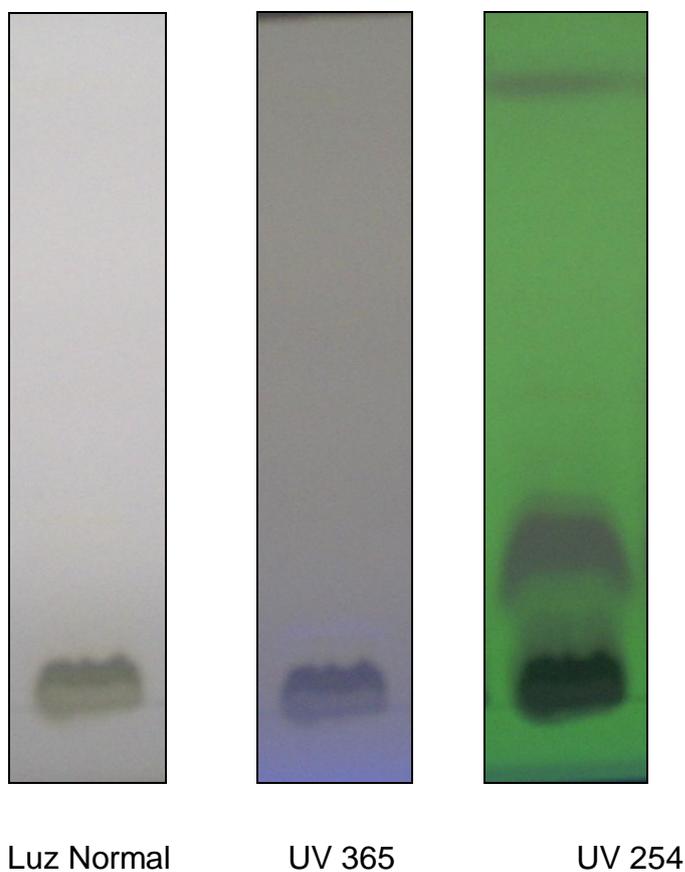


Figura 3.5.3.5 Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.3.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.3.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

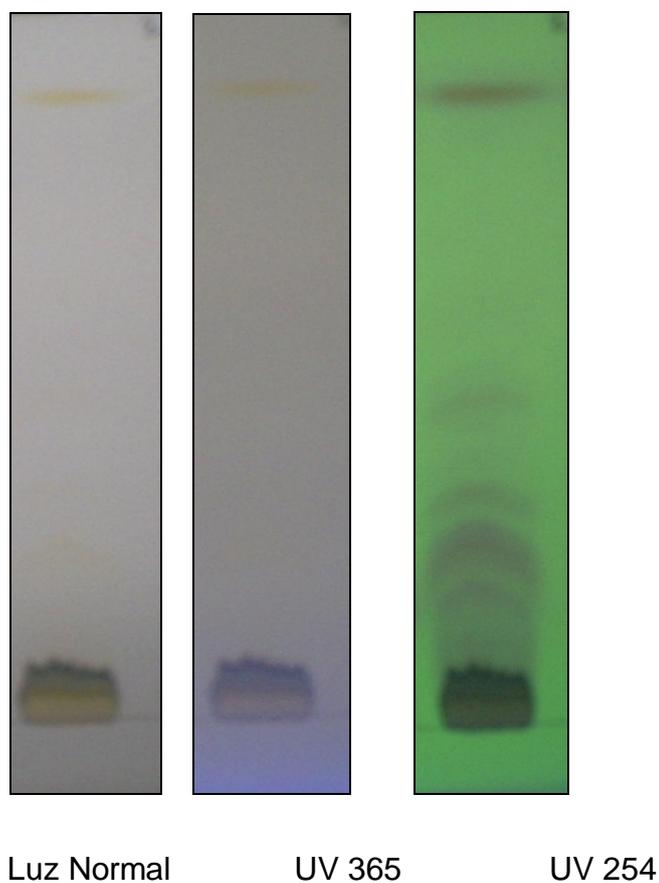


Figura 3.5.3.6 Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.3.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Esteroles de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Verde Morado
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.4 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Esteroles

En la cromatografía para esteroles se utilizó el extracto C. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- n-hexano: diclorometano (6:4)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Esteroles en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda.

Se han propuesto muchas reacciones de coloración para detectar la presencia de estos compuestos, siendo las más usadas y específicas la reacción de Liebermann Burchard y ZACK dando como resultado positivo un anillo de color azul clarísimo en el punto de contacto y coloración verde respectivamente (Lock 1994).

En los resultados de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración moderada de esteroles y se comprueba en la cromatografía en capa fina la presencia de este metabolito secundario, a longitud de onda 365 nm. se observó manchas de color amarillo que confirma la presencia de los esteroles, cabe recalcar que su concentración es moderada por lo que no se puede definir como un marcador químico del Género *Baccharis*. Además se puede observar varias manchas fluorescentes de color celeste y morado, que no necesariamente corresponden a esteroles específicamente sino a complejos que se forman con otros metabolitos secundarios.

3.5.5 Resultados de la Cromatografía de Flavonoides

3.5.5.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

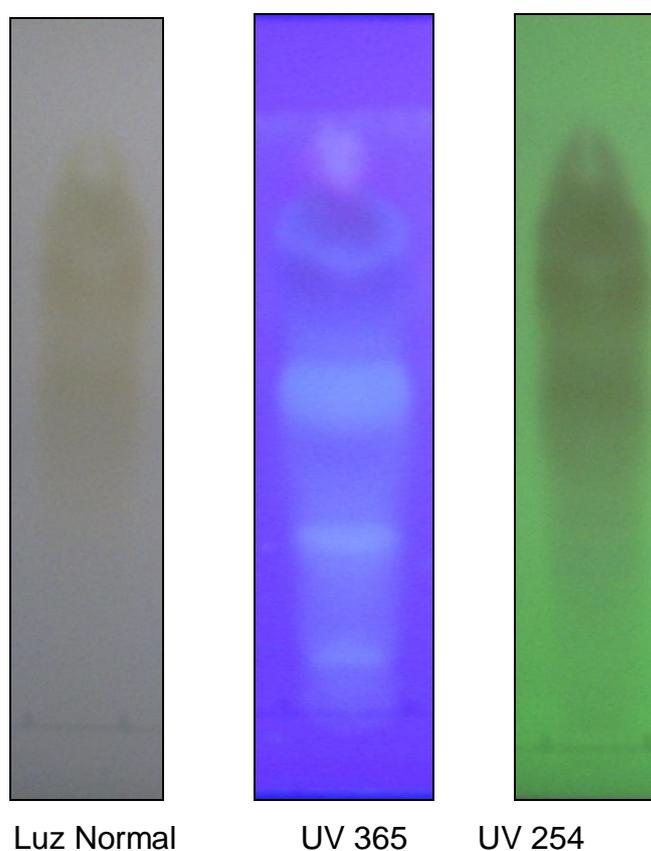


Figura 3.5.5.1 Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.5.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Verde Café
365 nm	Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.5.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

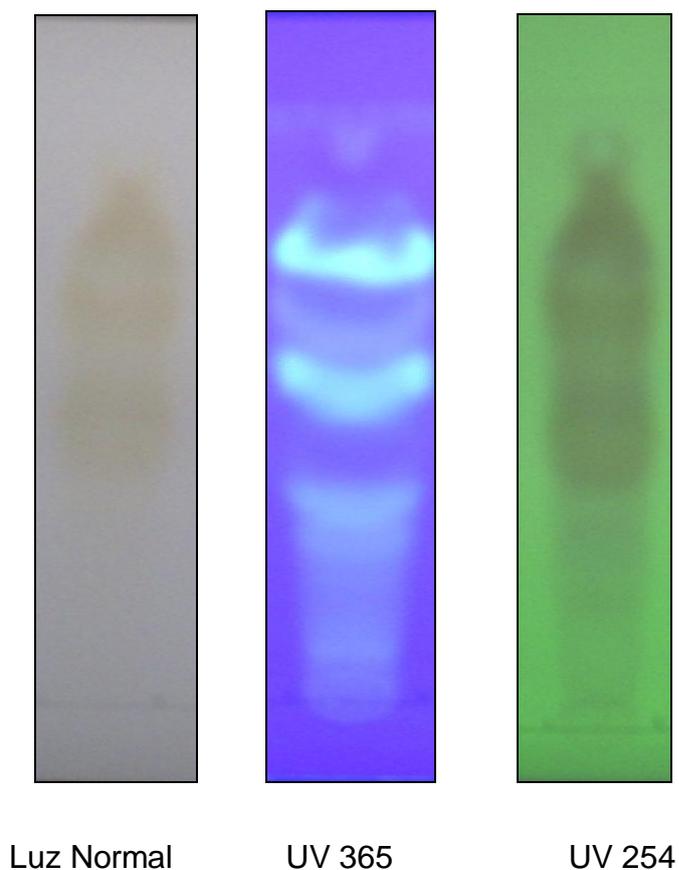


Figura 3.5.5.2 Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.5.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Café
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.5.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

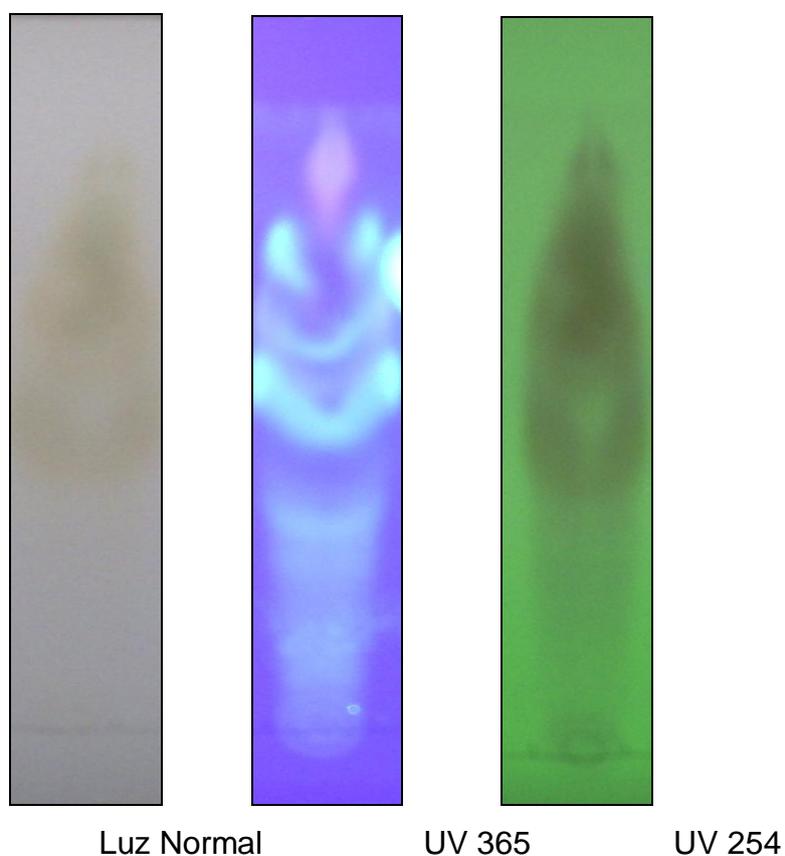


Figura 3.5.5.3 Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.5.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Café
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.5.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

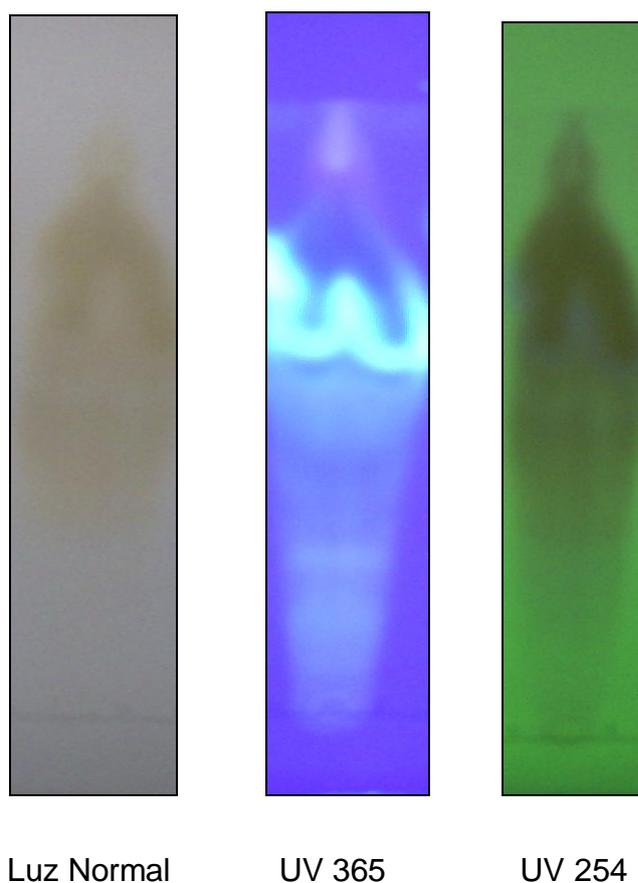


Figura 3.5.5.4 Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.5.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Café
365 nm	Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.5.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

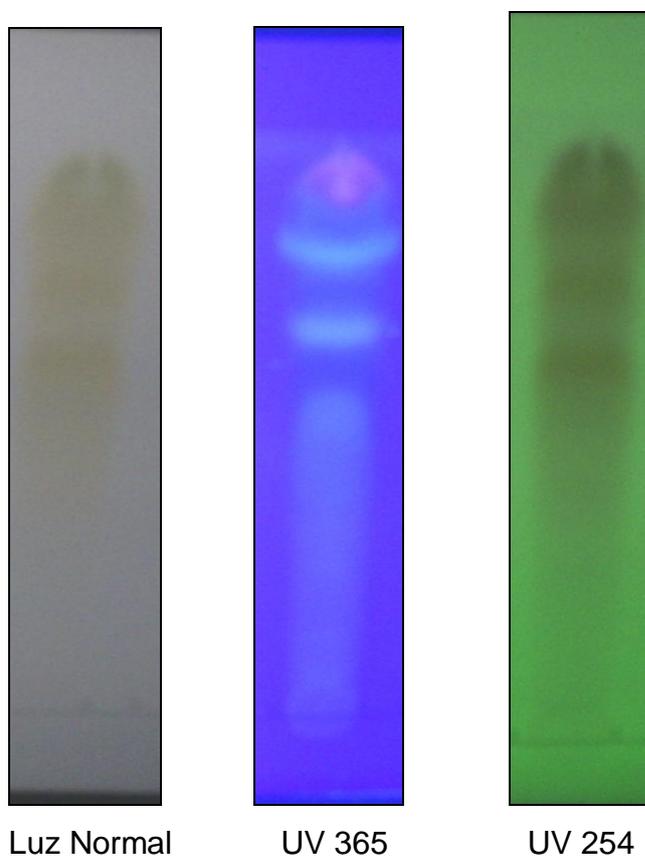


Figura 3.5.5.5 Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.5.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Café
365 nm	Celeste Verde
254 nm	Celeste intenso Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.5.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

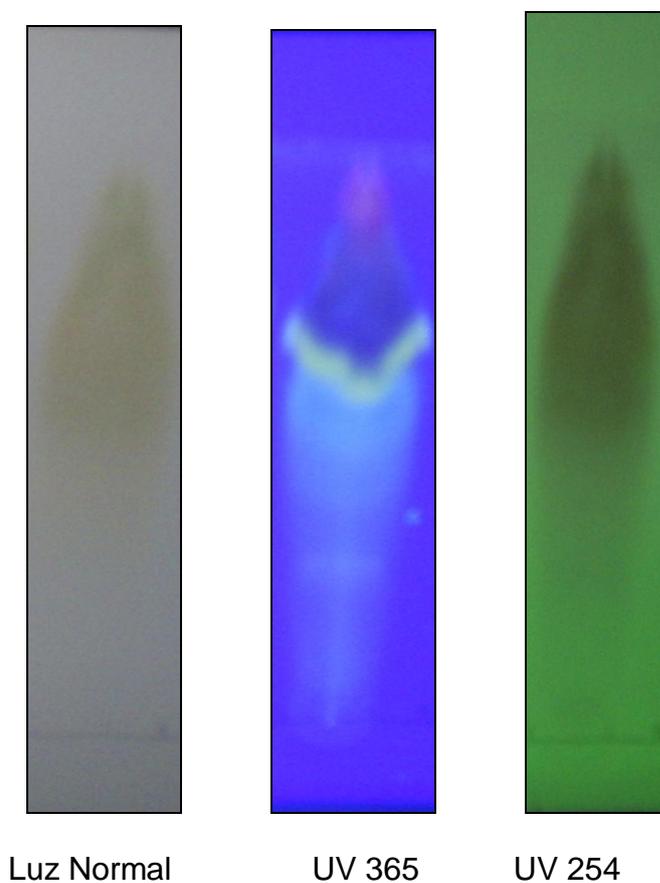


Figura 3.5.5.6 Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.5.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Flavonoides de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Verde
365 nm	Amarillo Verde Celeste
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.6 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Flavonoides

En la cromatografía para esteroides se utilizó el extracto D. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- (BAW) n-butanol : ácido acético : agua (4:1:5).

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de flavonoides en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de punto.

Los flavonoides son pigmentos casi universales en los vegetales, sin embargo esta no es la única función biológica, su acción farmacológica es extensa y variada como espasmolítica, antihepatóxica, estrógeno, diurética entre otras. Dentro de las reacciones de detección de los flavonoides en un extracto de planta es la reacción de Shidona, cianidana, medio alcalino y con cloruro férrico el cual indicó la presencia de este metabolito secundario.

En los resultados de las reacciones de color de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración abundante de flavonoides y se comprobó en la cromatografía en capa fina la presencia de este metabolito secundario, a longitud de onda 365 nm. se observó manchas de color celeste, morado y amarillo que confirman la presencia de éstos.

La cromatografía en capa fina permitió identificar la presencia abundante de flavonoides en las especies analizadas, constituyéndose éste en el posible marcador químico del Género *Baccharis*.

Este análisis nos induce a fraccionar este grupo de metabolitos con el fin de seleccionar el principio activo presente en cada una de las especies analizadas.

3.5.7 Resultados de la Cromatografía de Naftoquinonas

3.5.7.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

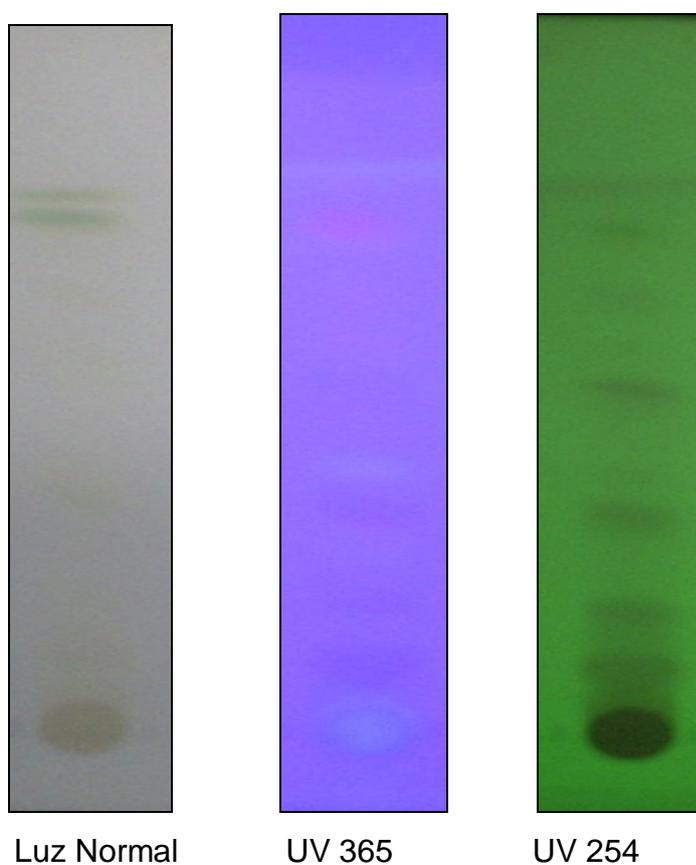


Figura 3.5.7.1 Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.7.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Amarillo Verde
254 nm	Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.7.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

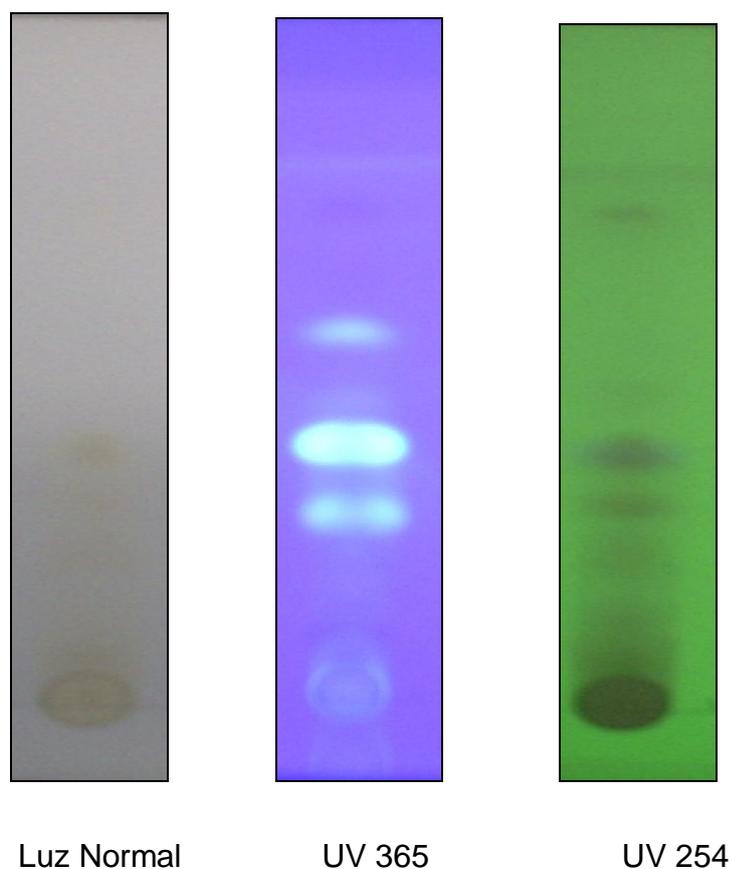


Figura 3.5.7.2 Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.7.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Café Amarillo
365 nm	Celeste Morado Verde
254 nm	Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.7.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

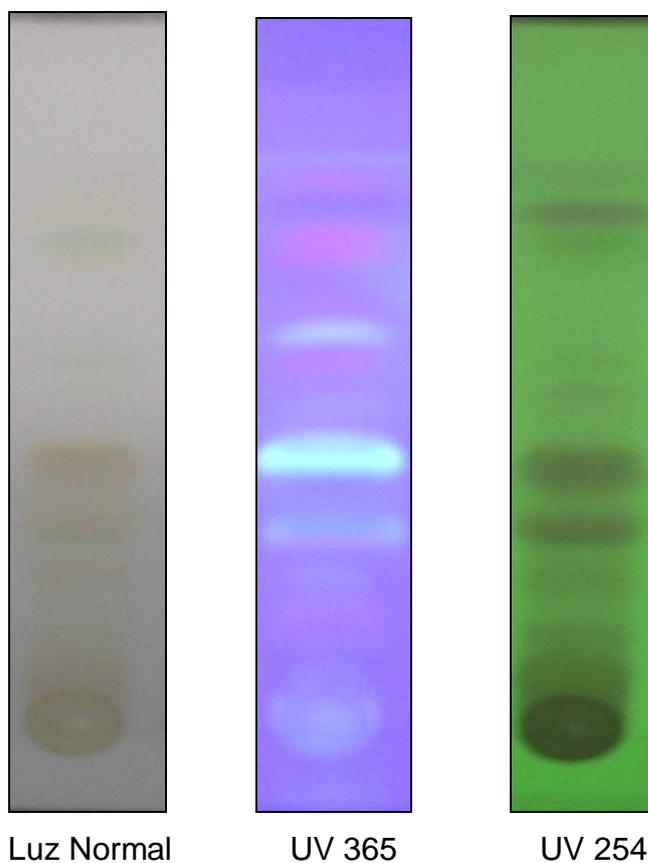


Figura 3.5.7.3 Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.7.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.7.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

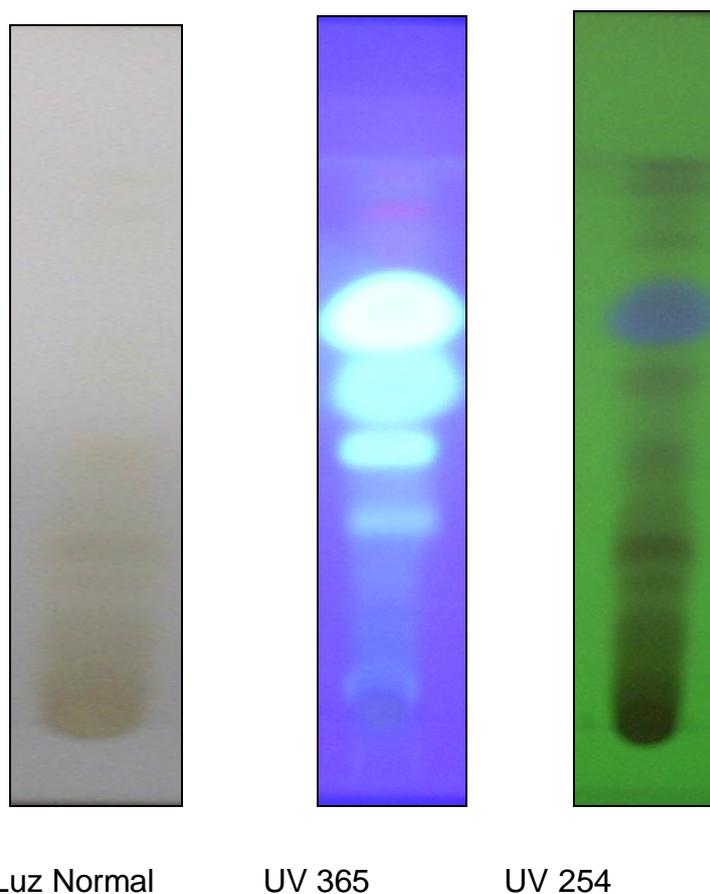


Figura 3.5.7.4 Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.7.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Café Verde Amarillo
365 nm	Celeste Morado Verde
254 nm	Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.7.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

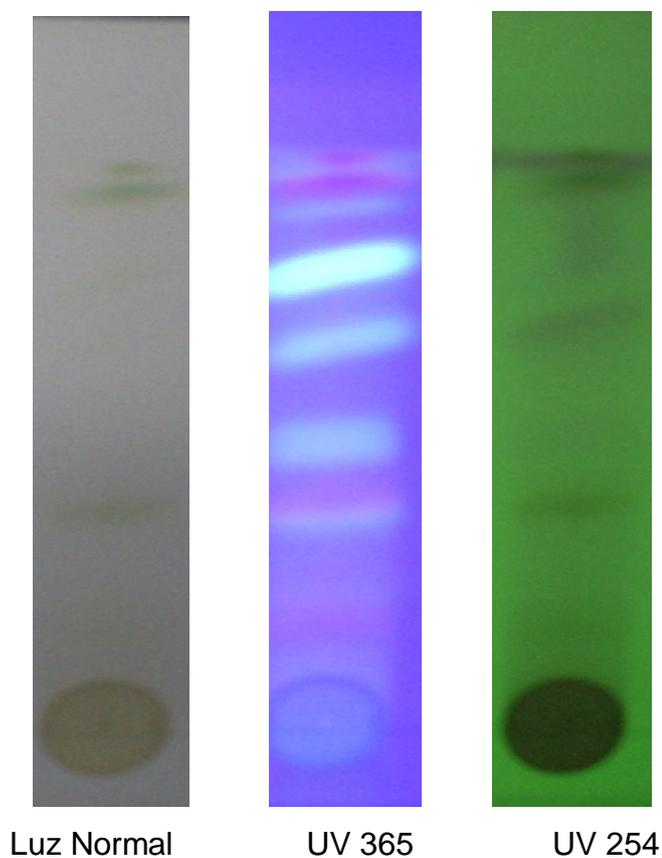


Figura 3.5.7.5 Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.7.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Celeste Verde Café
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.7.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

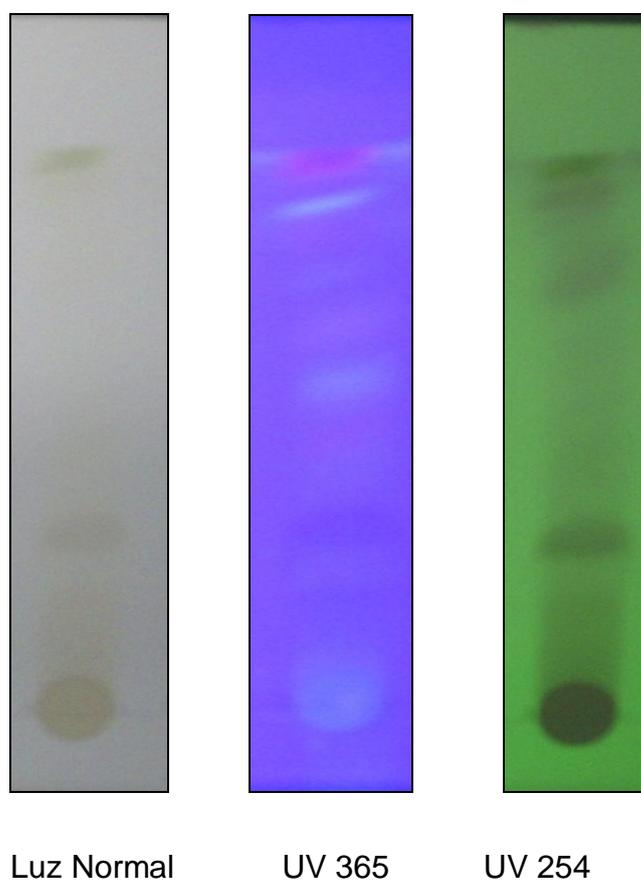


Figura 3.5.7.6 Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.7.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Naftoquinonas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.8 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Naftoquinonas

En la cromatografía para Naftoquinonas se utilizó el extracto D. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- n- hexano: diclorometano (5:5)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Naftoquinonas en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de punto.

Los métodos de extracción utilizados para la identificación de Naftoquinonas dependen de la solubilidad y polaridad, por lo tanto se aprovecha los grupos funcionales para su extracción. La cromatografía en capa fina es un procedimiento general para la separación de las Naftoquinonas ya que éstas se pueden colorear y ser detectadas a luz visible y también ser examinadas a la longitud de onda de 365 nm. y 254 nm. (Lock 1994).

En los resultados de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración moderada de Naftoquinonas y se comprueba en la cromatografía en capa fina la presencia de este metabolito secundario, a longitud de onda 365 nm. se observa manchas de color amarillo, morado, celeste que confirma la presencia de este metabolito, cabe recalcar que su concentración es moderada por lo que no se puede definir como un marcador químico del Género *Baccharis*.

3.5.9 Resultados de la Cromatografía de Antraquinonas

3.5.9.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

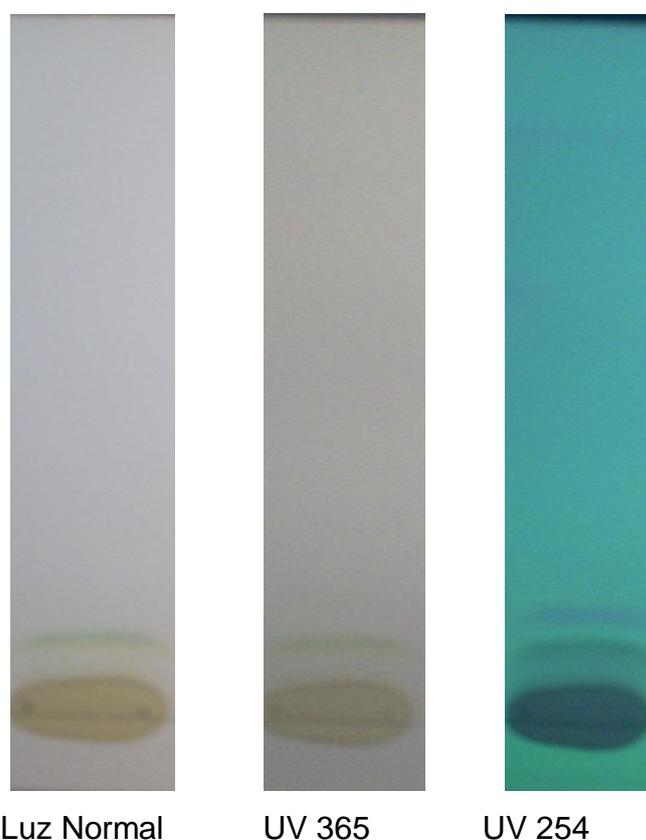


Figura 3.5.9.1 Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.9.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Celeste Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.9.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

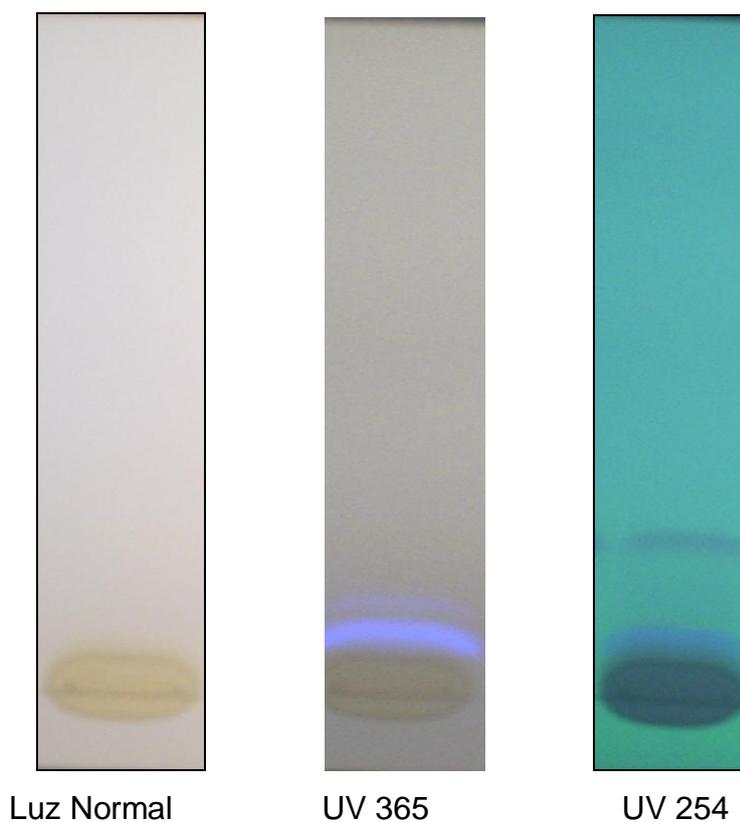


Figura 3.5.9.2 Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.9.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.9.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

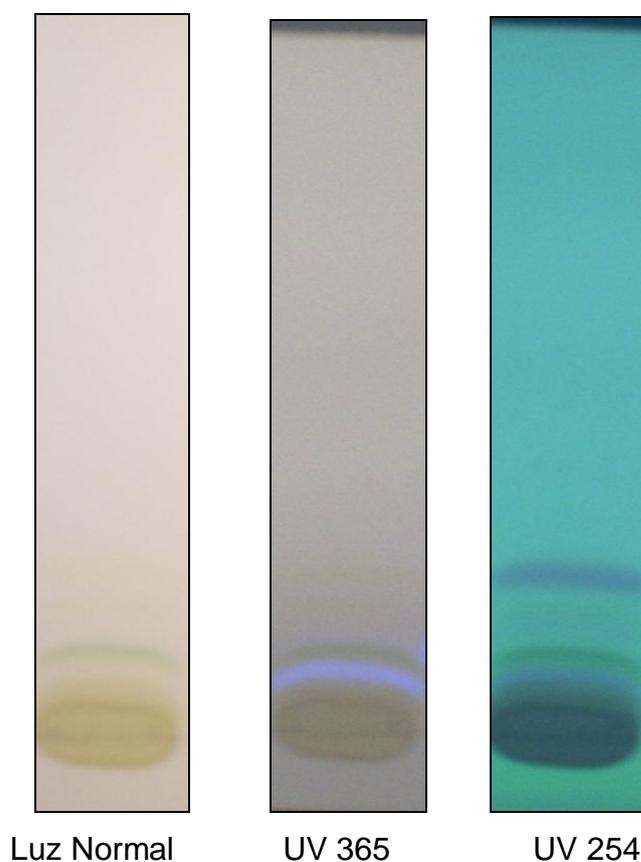


Figura 3.5.9.3 Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.9.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.9.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

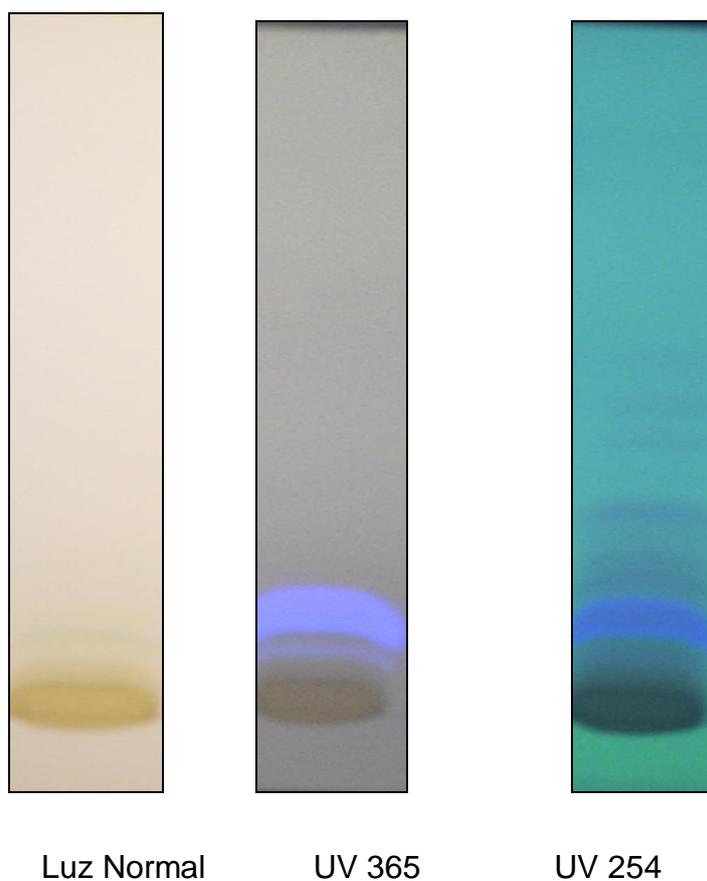


Figura 3.5.9.4 Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.9.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Celeste intenso Verde
254 nm	Celeste intenso

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.9.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

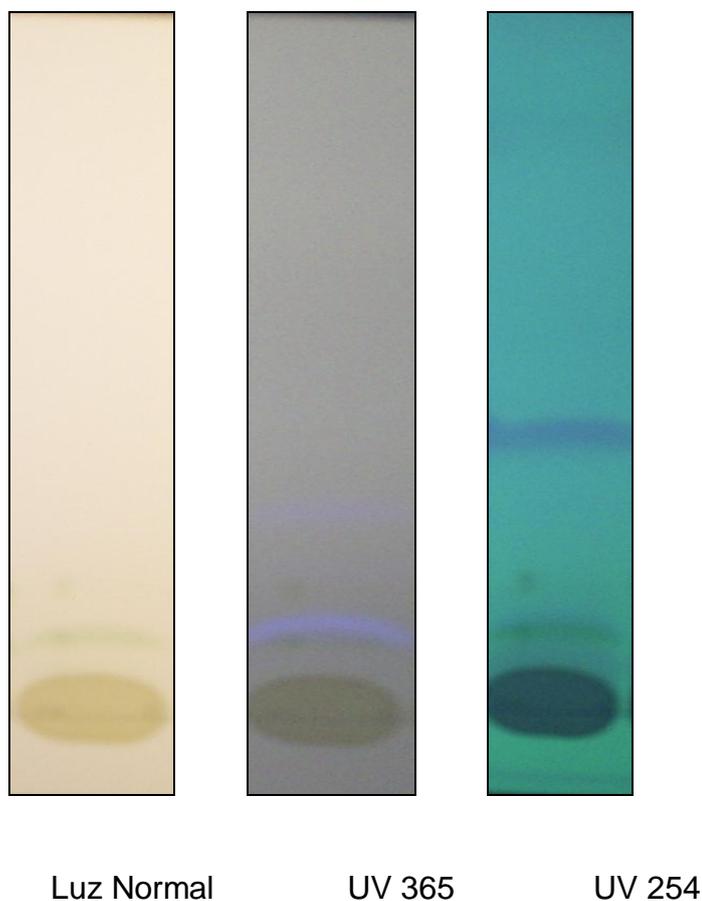


Figura 3.5.9.5 Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.9.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Amarillo Morado Celeste Verde
254 nm	Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.9.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

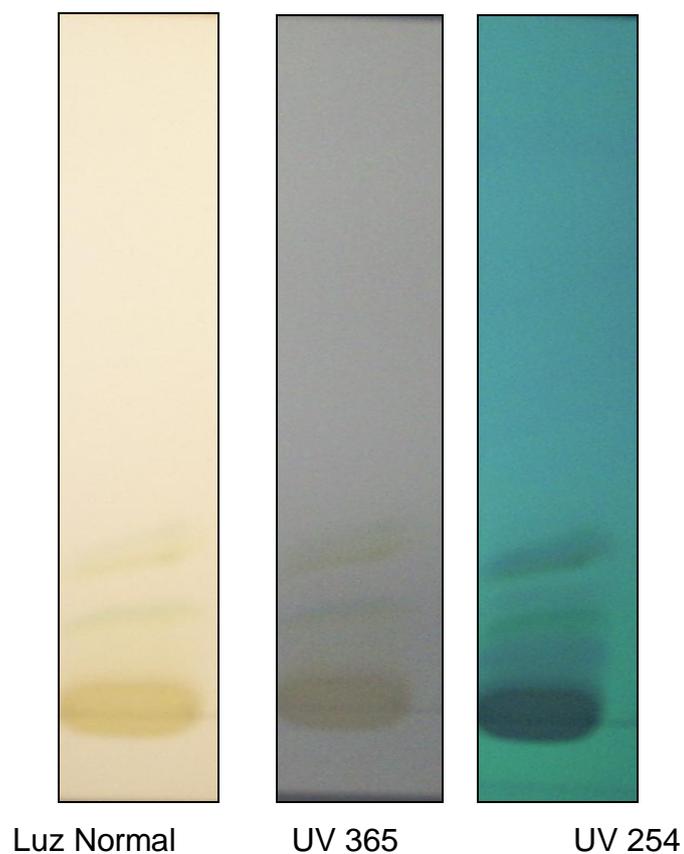


Figura 3.5.9.6 Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.9.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Antraquinonas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Verde Amarillo
365 nm	Morado Celeste Verde
254 nm	Celeste Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.10 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Antraquinonas

En la cromatografía para antraquinonas se utilizó el extracto B. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- n- hexano: diclorometano (6:4)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de antraquinonas en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda.

Al igual que las Naftoquinonas los métodos de extracción utilizados dependen de la solubilidad y polaridad, por lo tanto se aprovecha los grupos funcionales para su extracción.

La cromatografía en capa fina es un procedimiento de separación y se pudo obtener manchas coloreadas que son detectables a luz visible y a longitud de onda 365 nm y 254 nm. (Lock 1994).

En los resultados de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración leve de Antraquinonas y se comprueba en la cromatografía en capa fina la presencia de este metabolito secundario, a longitud de onda 365 nm. se observa manchas de color amarillo, morado, celeste que confirma la presencia de este metabolito, cabe recalcar que su concentración es leve por lo que no se puede definir como un marcador químico del Género *Baccharis*.

3.5.11 Resultados de la Cromatografía de Heterósidos Cardiotónicos

3.5.11.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

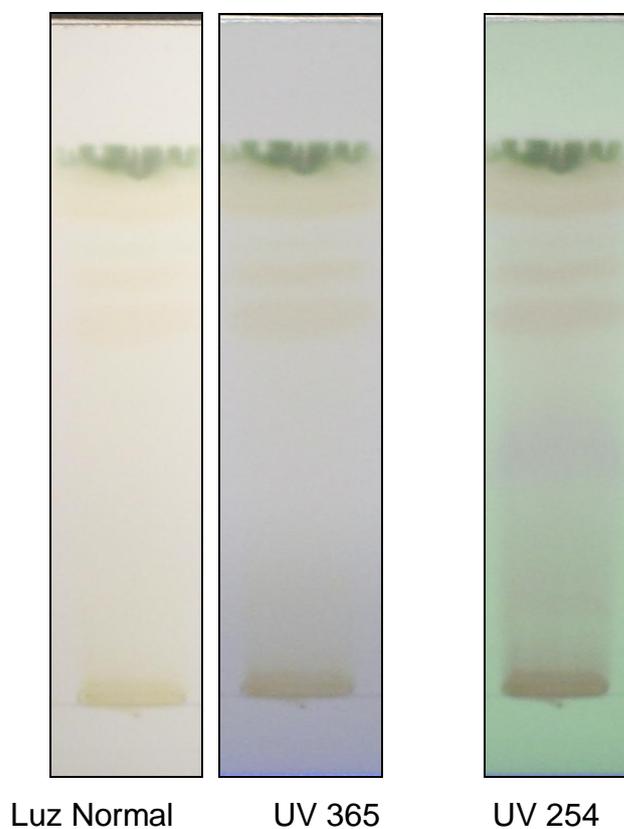


Figura 3.5.11.1 Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.11.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.11.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

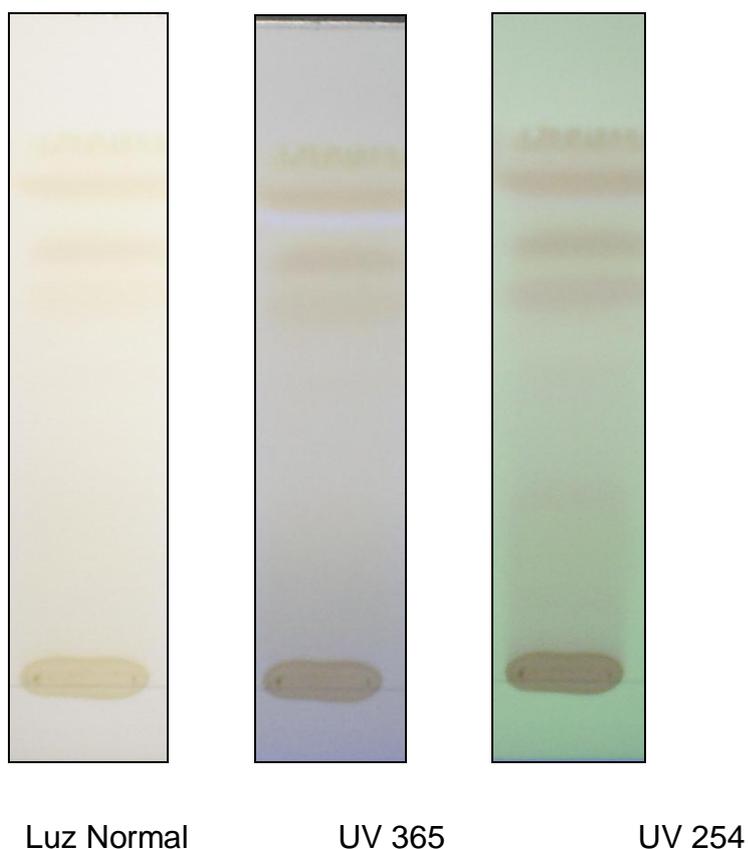


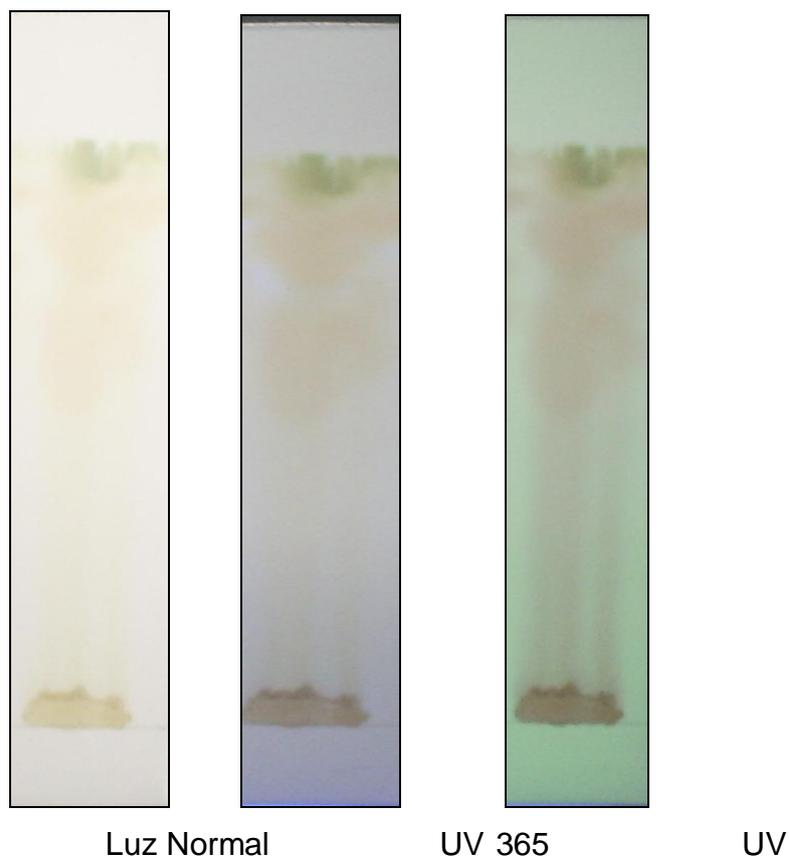
Figura 3.5.11.2 Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.11.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.11.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*



254

Figura 3.5.11.3 Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.11.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Café Morado Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.11.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

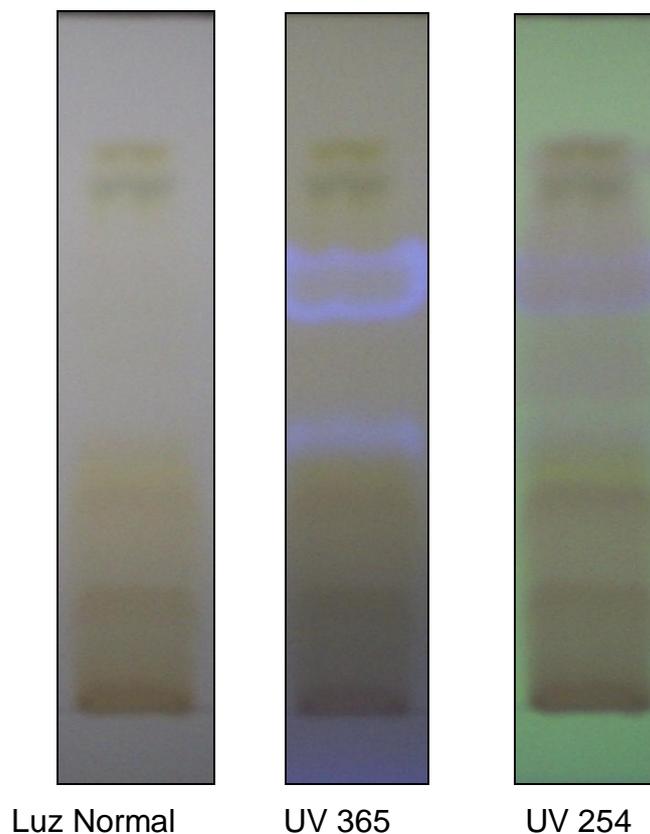


Figura 3.5.11.4 Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.11.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.11.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

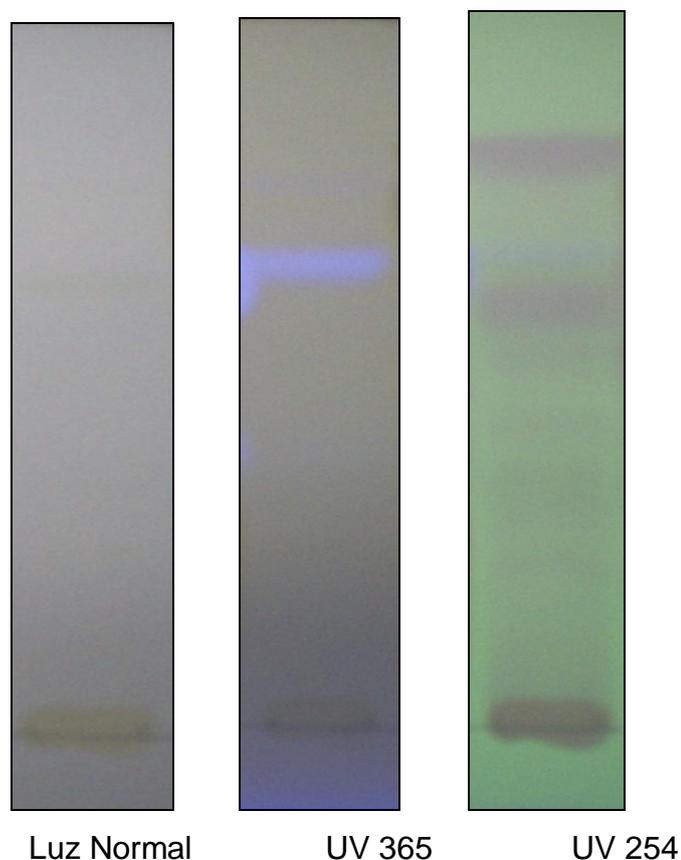


Figura 3.5.11.5 Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.11.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Morado Rosado Celeste Verde
254 nm	Celeste Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.11.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

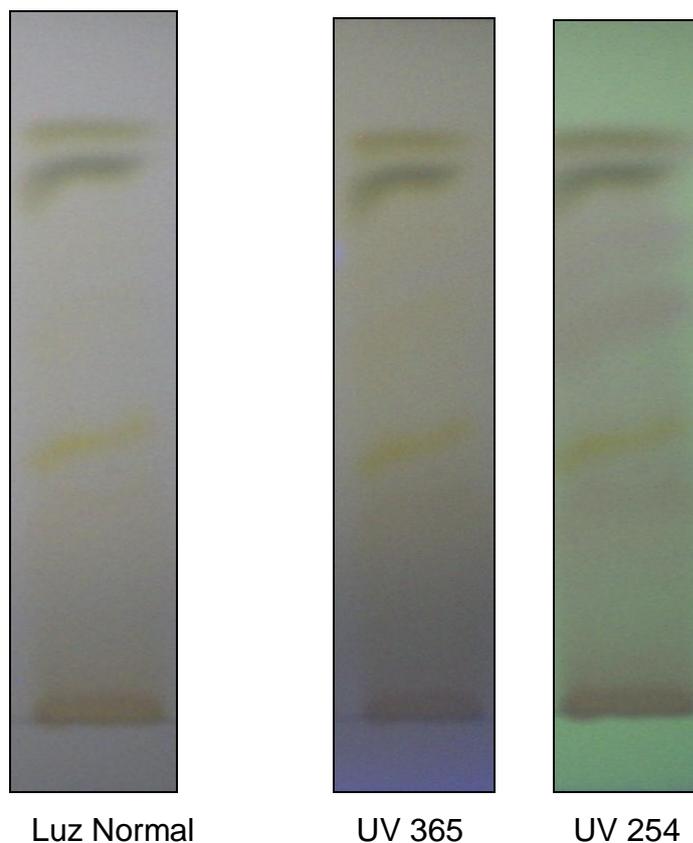


Figura 3.5.11.6 Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.11.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Heterósidos Cardiotónicos de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Morado Celeste Amarillo Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.12 Interpretación de los Resultados de la Heterósidos Cardiotónicos

En la cromatografía para Heterósidos Cardiotónicos se utilizó el extracto E. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- Cloroformo : acetona (9:1)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de heterósidos cardiotónicos en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda.

Para la comprobación de la presencia de Heterósidos Cardiotónicos se han desarrollado un gran número de reacciones de coloración y de precipitación; algunos de ellos son considerados de aplicación específica y se considera que existe presencia de Heterósidos Cardiotónicos si existe reacción positiva, sin embargo se realiza cromatografía en capa fina para comprobar la presencia de este metabolito secundario en las seis especies del Género *Baccharis*

La propiedad física más usual para reconocer una Heterósidos Cardiotónicos es la fluorescencia que ellas desarrollan a luz UV (365 nm), la que es ampliamente utilizada para su detección en la cromatografía en capa fina.

En los resultados de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración leve de Heterósidos Cardiotónicos a longitud de onda 365 nm. se observa manchas de color celeste que confirma la presencia de este metabolito.

3.5.13 Resultados de la Cromatografía de Cumarinas

3.5.13.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

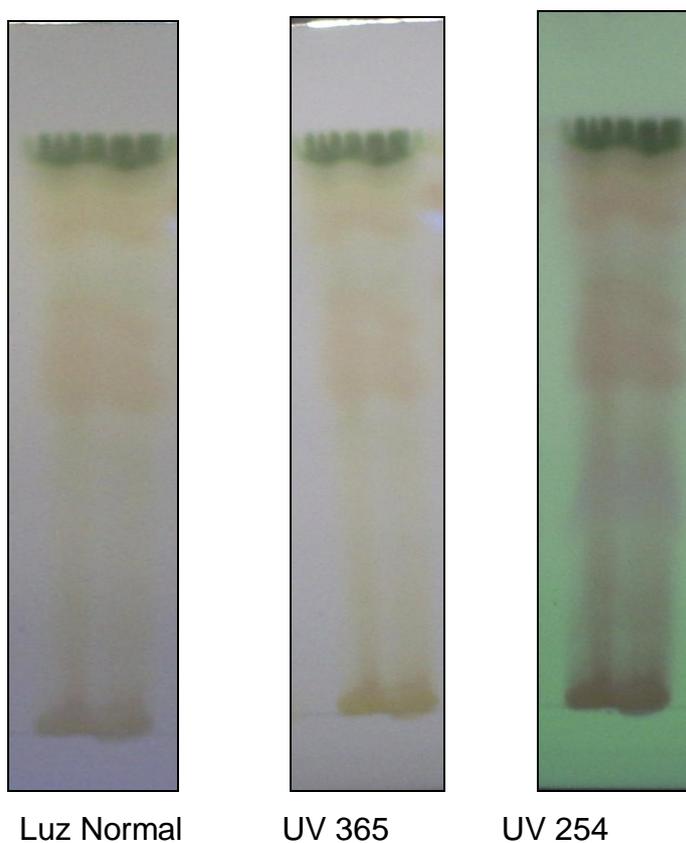


Figura 3.5.13.1 Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.13.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.13.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

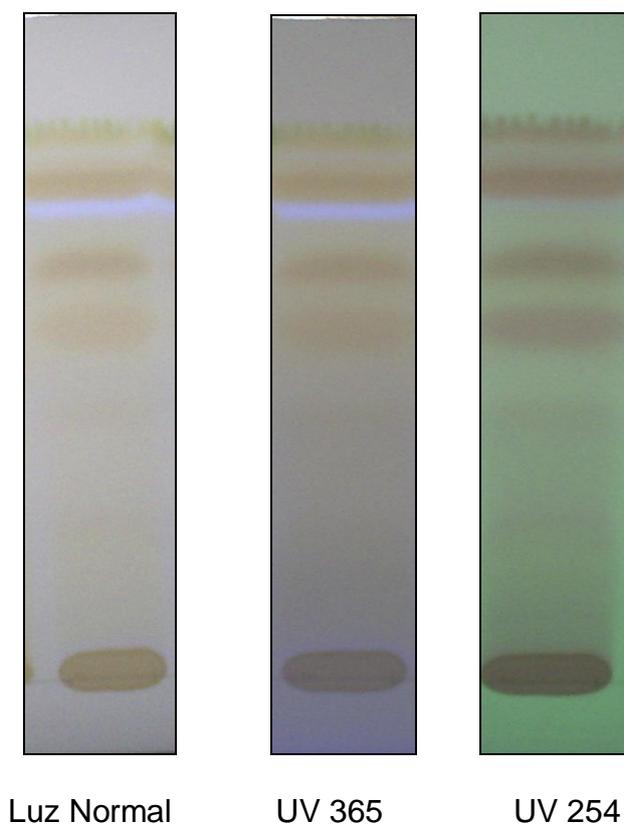


Figura 3.5.13.2 Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.13.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.13.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

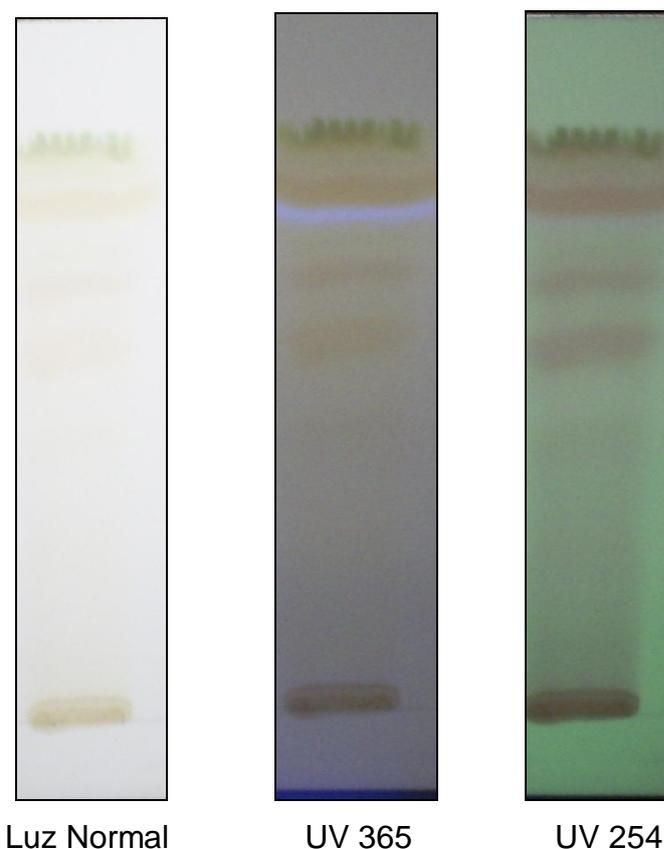


Figura 3.5.13.3 Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.13.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Café Morado Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.13.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

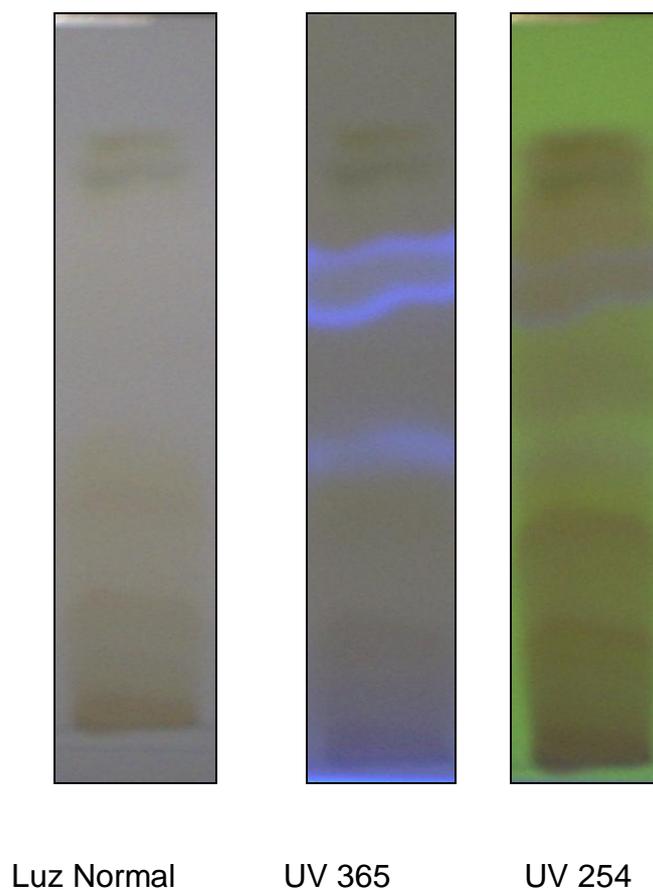


Figura 3.5.13.4 Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.13.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.13.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

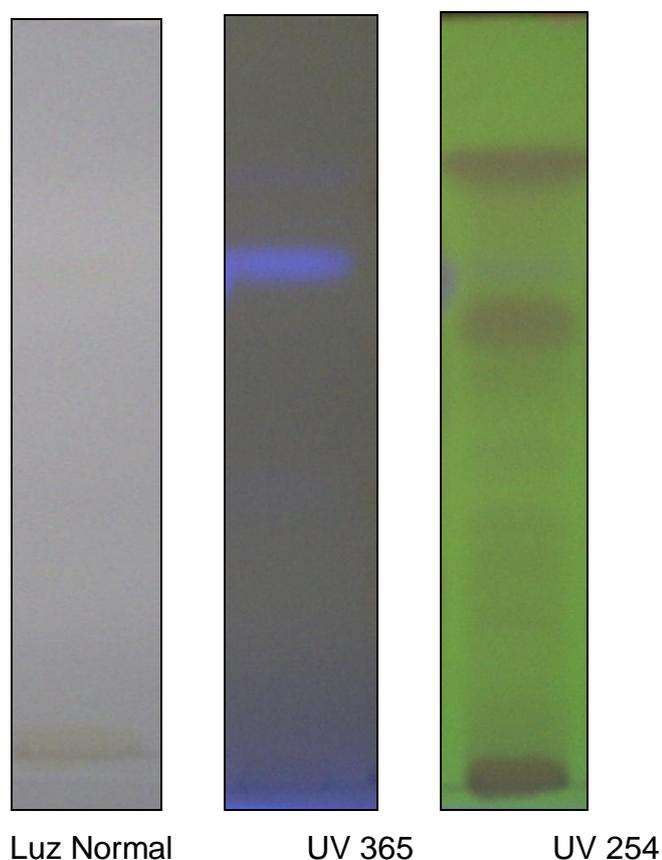


Figura 3.5.13.5 Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.13.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Morado Rosado Celeste Verde
254 nm	Celeste Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.13.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

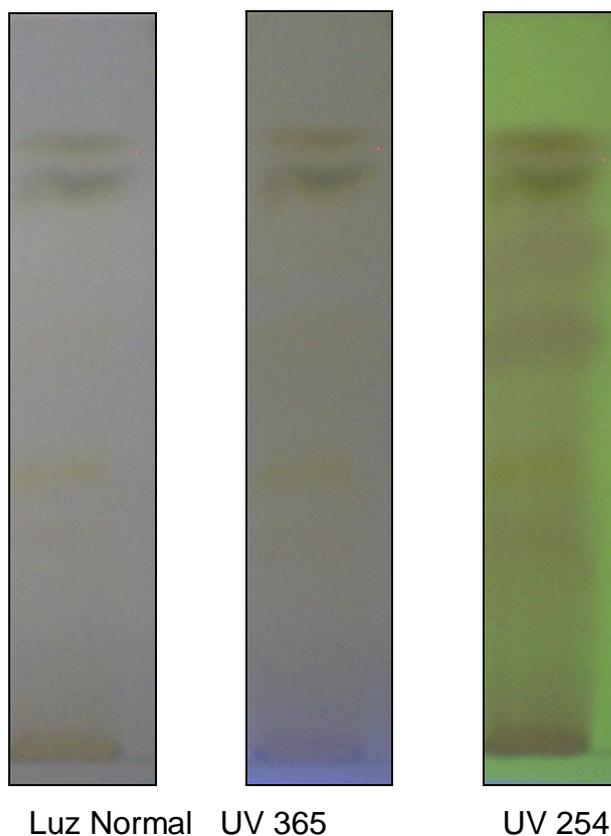


Figura 3.5.13.6 Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.13.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Cumarinas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Morado Celeste Amarillo Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.14 Interpretación de los Resultados de las Cumarinas

En la cromatografía para Cumarinas se utilizó el extracto E. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- Cloroformo : acetona (9:1)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de Cumarinas en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda.

Las cumarinas deben su denominación a la palabra <<coumarou>>, nombre vernáculo del haba tonka. Se encuentran distribuidas en todo el reino vegetal. Presentan una gran importancia por la variada acción biológica debido a que se presentan a menudo como mezcla, en forma libre o como glicósidos.

La propiedad física más usual para reconocer una cumarina es la fluorescencia que ellas desarrollan a la luz UV (365 nm), la que es ampliamente utilizada para su detección en la cromatografía en capa fina. Se puede asignar tentativamente ciertas características a las cumarinas por el color que ellas presentan.

En los resultados de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración moderada de cumarinas a longitud de onda 365 nm. se observó manchas de color celeste que confirma la presencia de este metabolito.

3.5.15 Resultados de la Cromatografía de Sesquiterpenolactonas

3.5.15.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

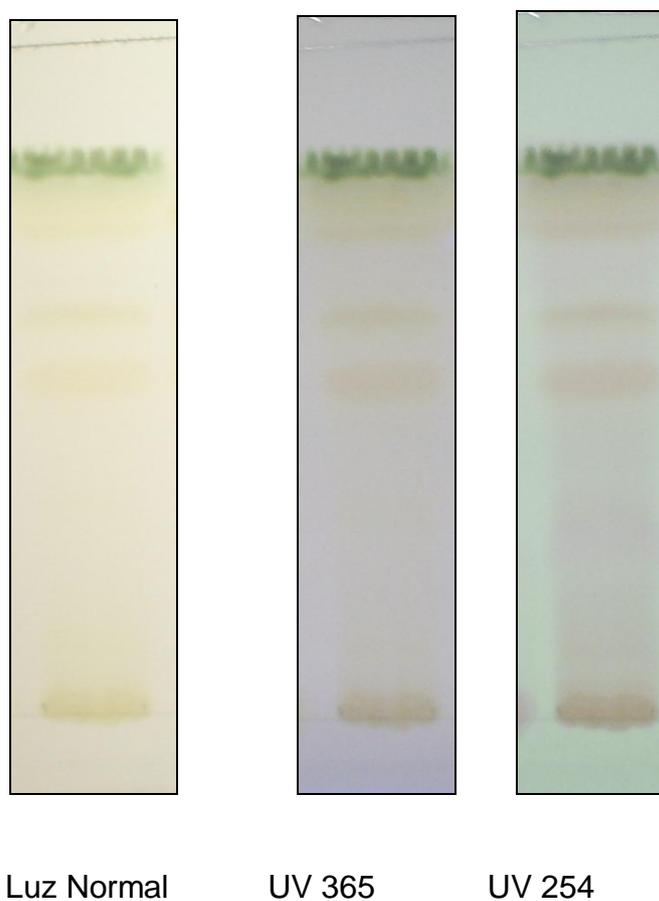


Figura 3.5.15.1 Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.15.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.15.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

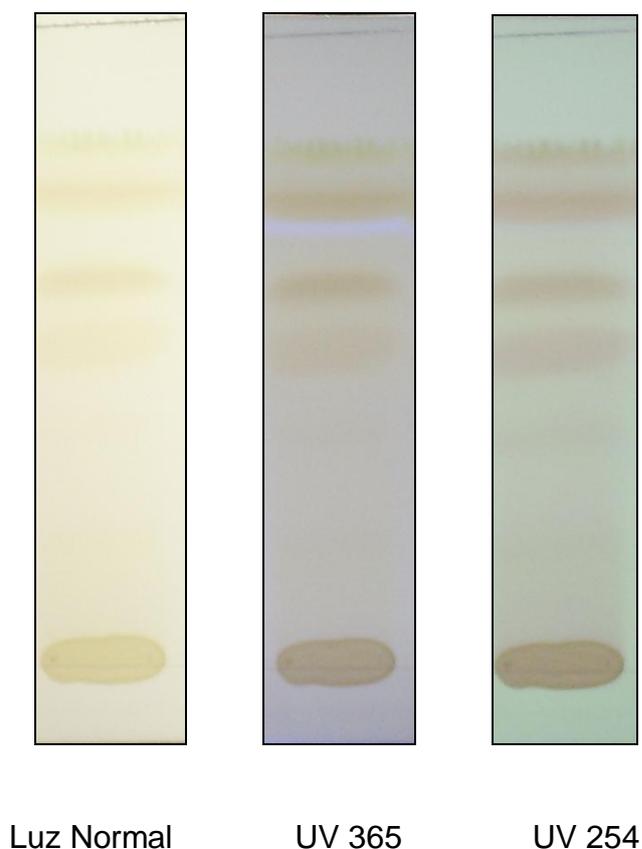


Figura 3.5.15.2 Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.15.2 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.15.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

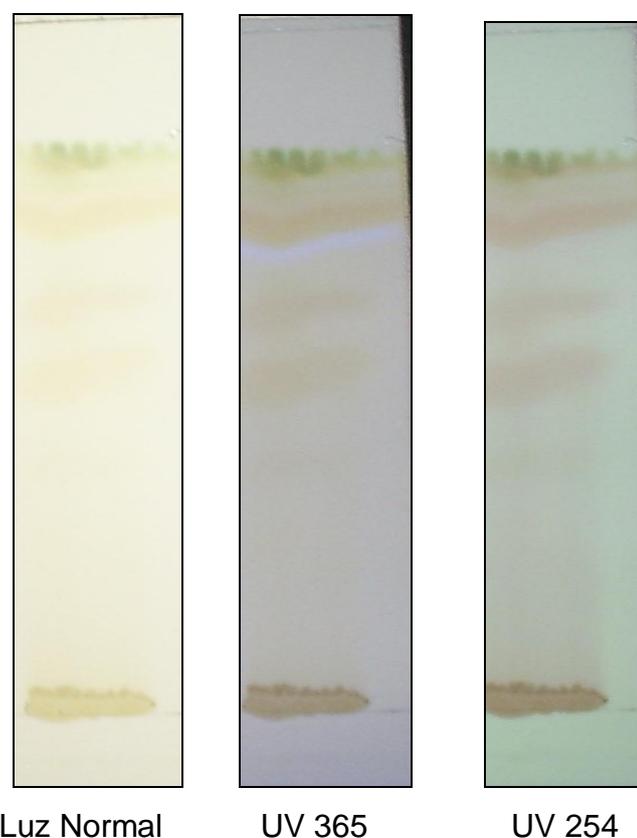


Figura 3.5.15.3 Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.15.3 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Café Morado Celeste Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.15.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

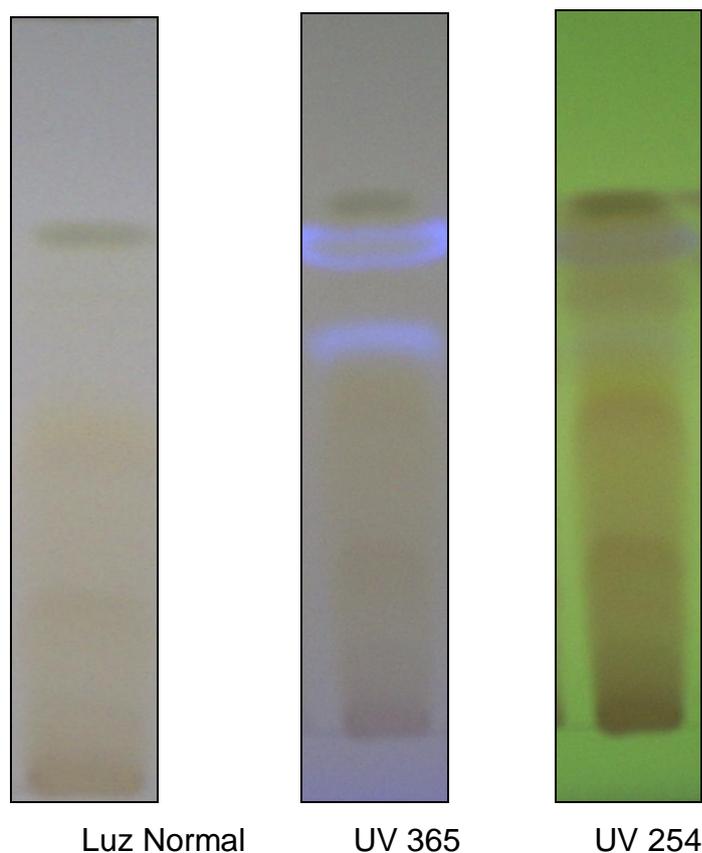


Figura 3.5.15.4 Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.15.4 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Amarillo Celeste Verde
254 nm	Verde Celeste

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007

3.5.15.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

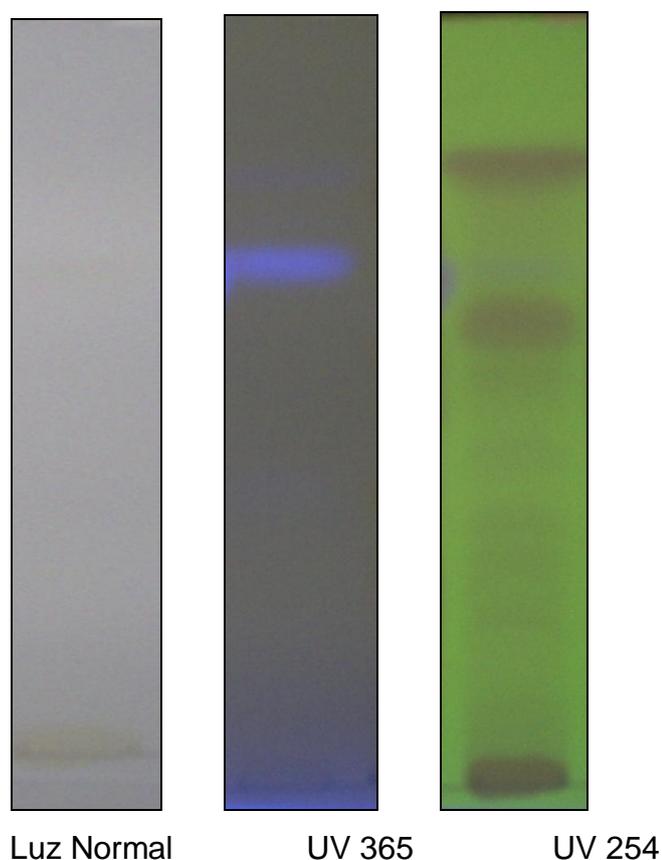


Figura 3.5.15.5 Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.15.5 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LAS MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Morado Rosado Celeste Verde
254 nm	Celeste Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.15.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

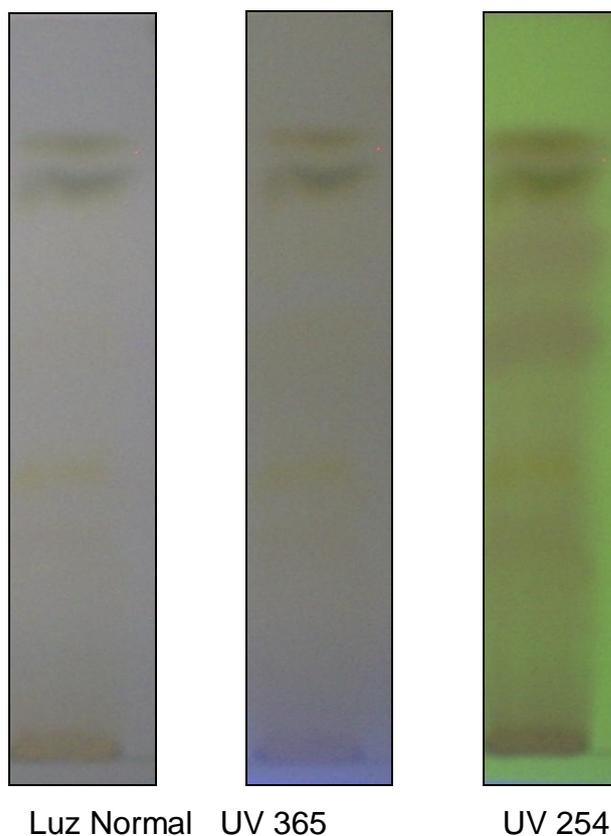


Figura 3.5.15.6 Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 nm y UV 254 nm.

Tabla 3.5.15.6 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de Sesquiterpenolactonas de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

CÁMARA ULTRAVIOLETA	COLOR DE LA MANCHAS
Luz normal	Amarillo Verde
365 nm	Morado Celeste Amarillo Verde
254 nm	Verde

Elaborado por: Gabriela Miño, 2007, 2007

3.5.16 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Sesquiterpenolactonas

En la cromatografía para sesquiterpenolactonas se utilizó el extracto B. Utilizando placas de sílica gel GF 254 (2 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- n- hexano: diclorometano (6:4)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento de sesquiterpenolactonas en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de banda.

Las sesquiterpenolactonas son una clase de productos naturales considerados como sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de la planta. Presentan una gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado.

La cromatografía en capa fina es un procedimiento de separación y se puede obtener manchas amarillas que son detectables a luz visible, manchas celestes a longitud de onda 365 nm. En los resultados de las seis especies del Género *Baccharis* existe una concentración leve de sesquiterpenolactonas y se comprueba en la cromatografía en capa fina la presencia de este metabolito secundario, a longitud de onda 365 nm. se observa manchas de color celeste que confirma la presencia de este metabolito, cabe recalcar que su concentración es moderada pero no se puede definir como un marcador químico del Género *Baccharis*. Además se puede observar varias manchas fluorescentes de color celeste y morado, que no necesariamente corresponden a sesquiterpenolactonas específicamente sino a complejos que se forman con otros metabolitos secundarios.

3.6 RESULTADOS DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO (Ver Anexo 7)

Para la extracción del principio activo se realizó la preparación de un Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA), a fin de obtener una extracción exhaustiva del principio activo de las seis especies del Género *Baccharis*.

3.6.1 Método de Extracción de *Baccharis trinervis*

Peso de la Planta: 400 gr.

Volumen de Etanol (96°): 1000 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 698 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 260 ml.

Volumen Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA): 260 ml

3.6.2 Método de Extracción de *Baccharis teindalensis*

Peso de la Planta: 400 gr.

Volumen de Etanol (96°): 1100 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 525 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 206 ml.

Volumen Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA): 206 ml

3.6.3 Método de Extracción de *Baccharis latifolia*

Peso de la Planta: 400 gr.

Volumen de Etanol (96°): 1300 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 700 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 325 ml.

Volumen Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA): 325 ml

3.6.4 Método de Extracción de *Baccharis buxifolia*

Peso de la Planta: 317 gr.

Volumen de Etanol (96°): 1000 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 470 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 189 ml.

Volumen Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA): 189 ml

3.6.5 Método de Extracción de *Baccharis arbutifolia*

Peso de la Planta: 400 gr.

Volumen de Etanol (96°): 1000 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 537 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 213 ml.

Volumen Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA): 213 ml

3.6.6 Método de Extracción de *Baccharis macrantha*

Peso de la Planta: 400 gr.

Volumen de Etanol (96°): 1100 ml.

Duración de la Maceración: 48 horas

Volumen obtenido después del filtrado: 568 ml.

Volumen obtenido después del Rotavapor: 241 ml.

Volumen Extracto Etanólico Principio Activo (EEPA): 241 ml

3.7 RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DEL PRINCIPIO ACTIVO

El fraccionamiento del principio activo se basó en la solubilidad selectiva de los distintos componentes de los extractos en disolventes de diferente polaridad. Se realizó varias extracciones con estos disolventes para obtener una purificación del extracto, es por esto que en cada extracción se realizó una cromatografía en capa fina con el fin de garantizar la presencia de flavonoides y la eliminación de otros metabolitos secundarios que puedan interferir en los resultados finales.

3.7.1 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis trinervis*

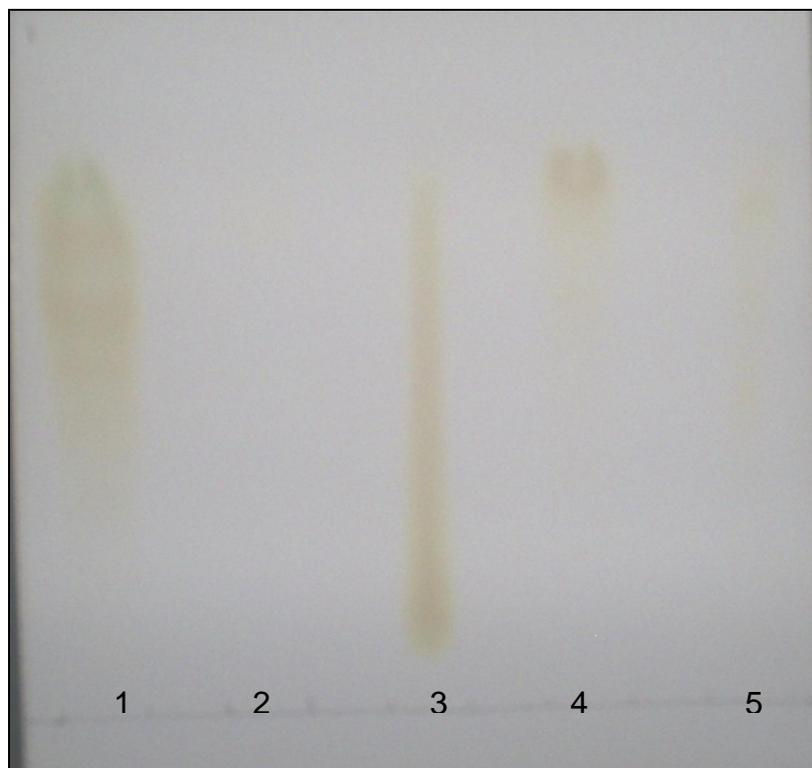


Figura 3.7.1.1 Placa Cromatográfica de *Baccharis trinervis* en Luz Normal

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

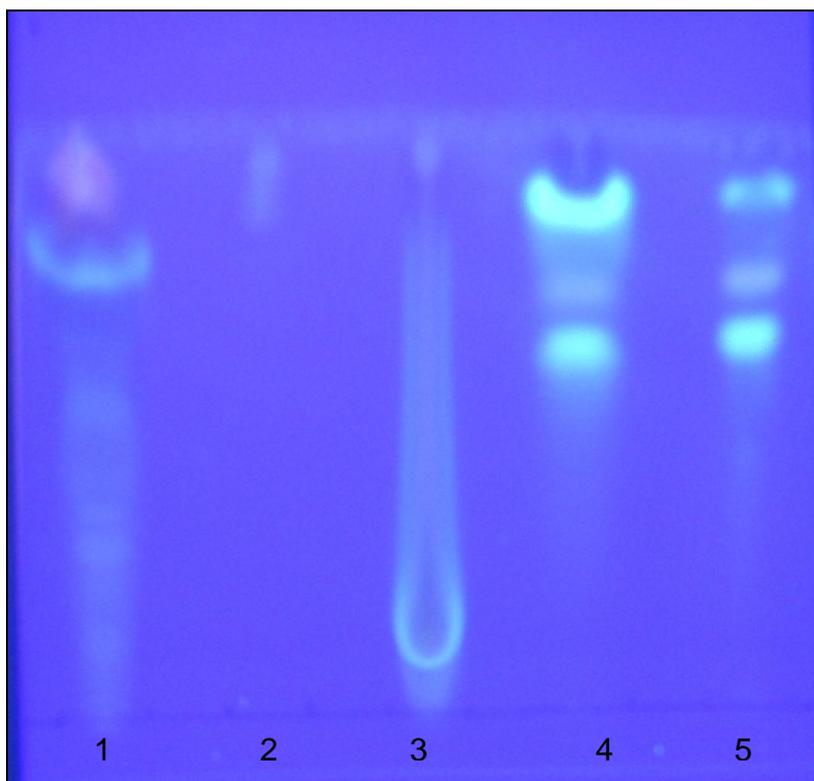


Figura 3.7.1.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis trinervis* en UV 365 nm

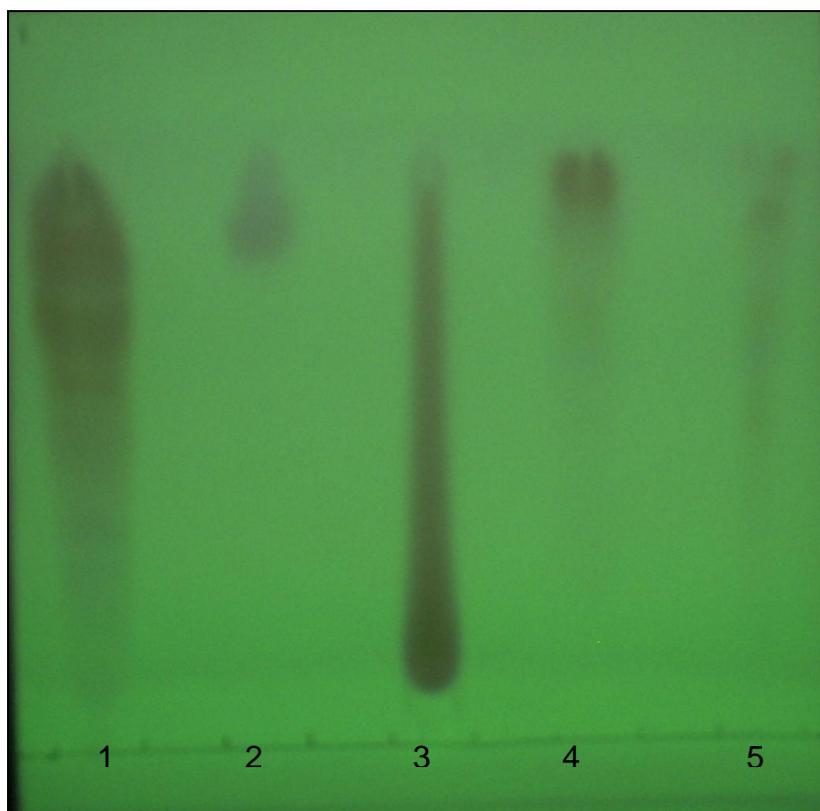


Figura 3.7.1.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis trinervis* en UV 254 nm

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

Tabla 3.7.1.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de *Baccharis trinervis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

	EET	n-hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n-butanol
Luz normal	Verde Café	Amarillo	Café Amarillo	Amarillo Café	Amarillo
365 nm	Celeste Morado Verde	Celeste	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado
254 nm	Verde	Verde	Verde	Celeste Verde	Verde

3.7.2 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis teindalensis*

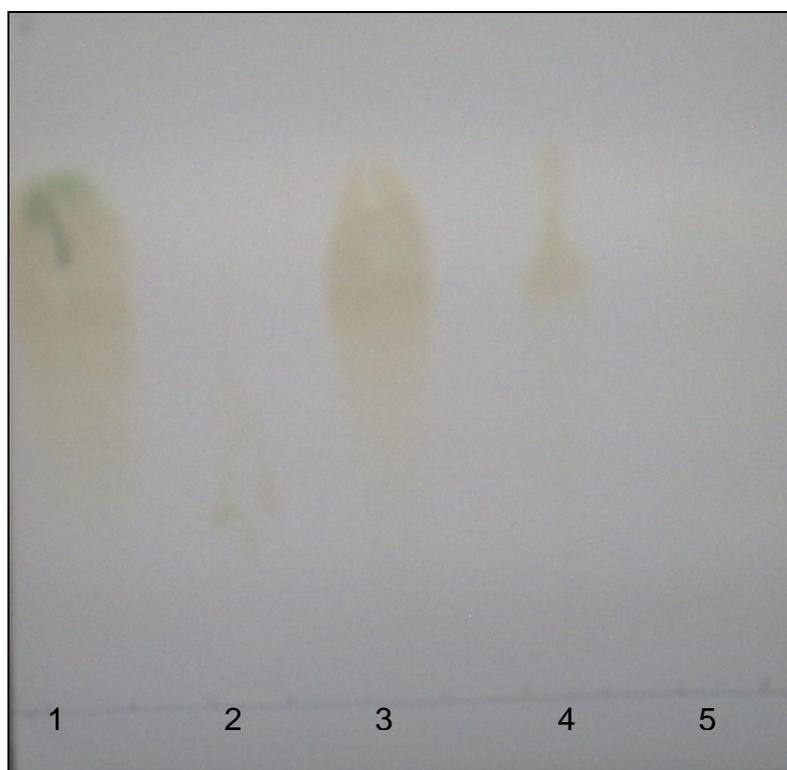


Figura 3.7.2.1 Placa Cromatográfica de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

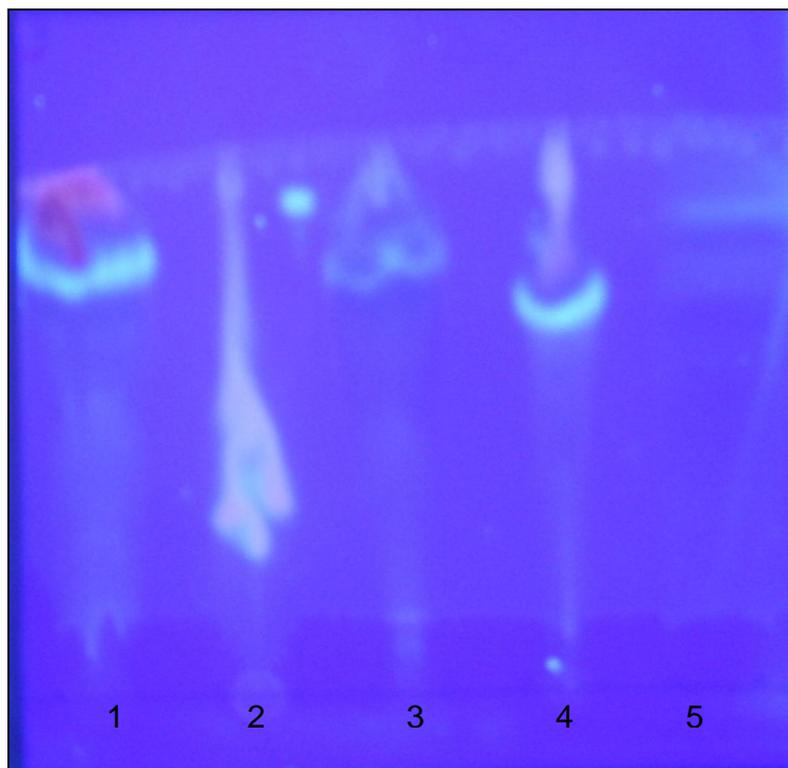


Figura 3.7.2.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis teindalensis* en UV 365 nm

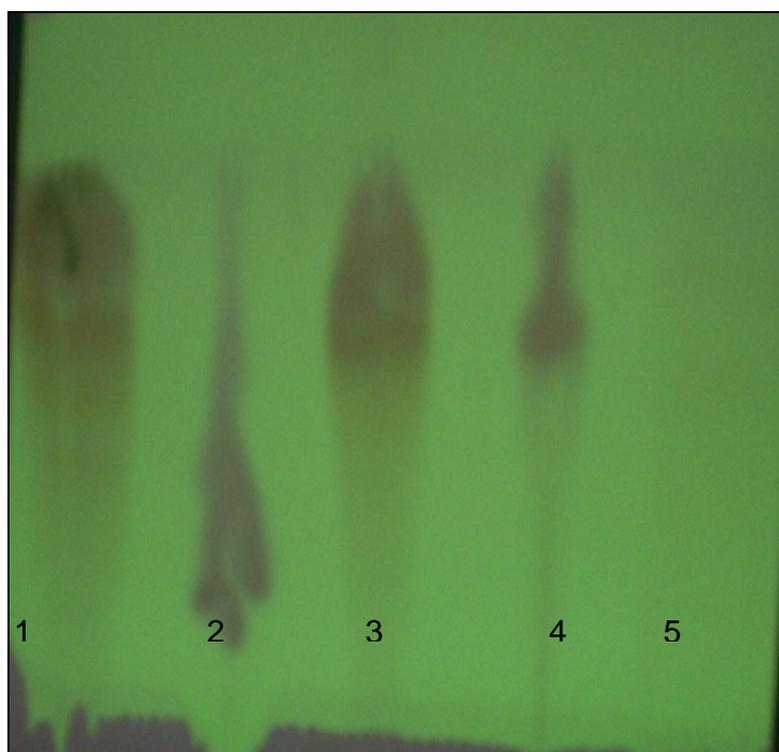


Figura 3.7.2.3 Placa Cromatográfica de *Baccharis trinervis* en UV 254 nm

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

Tabla 3.7.2.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de *Baccharis teindalensis* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

	EET	n-hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n-butanol
Luz normal	Amarillo Verde Café	Verde Café	Café Amarillo Verde	Amarillo Café	Amarillo
365 nm	Celeste Morado Verde	Amarillo Celeste	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado
254 nm	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

3.7.3 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis latifolia*

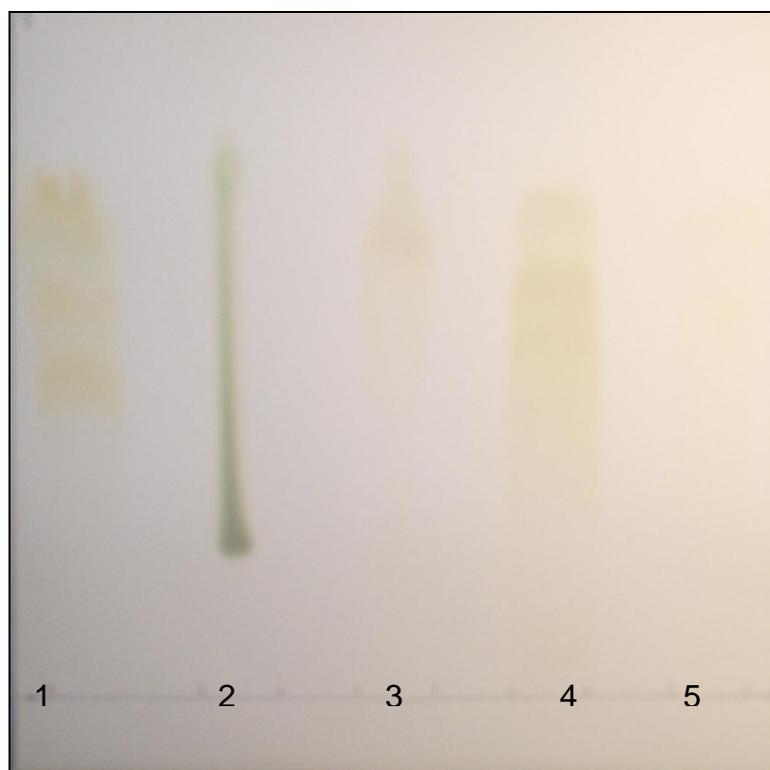


Figura 3.7.3.1 Placa Cromatográfica de *Baccharis latifolia* en Luz Normal

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

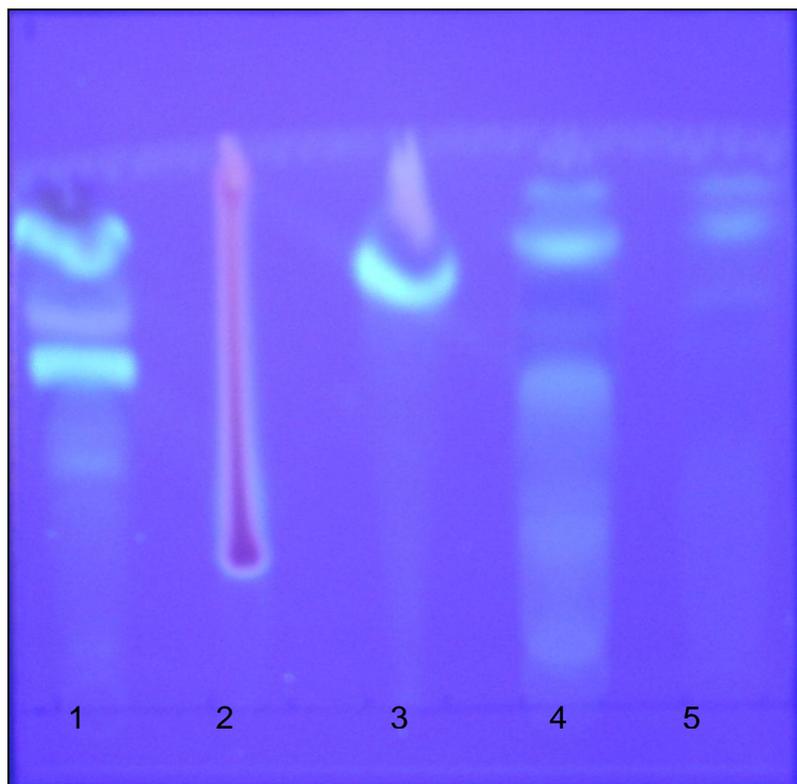


Figura 3.7.3.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis latifolia* en UV 365 nm

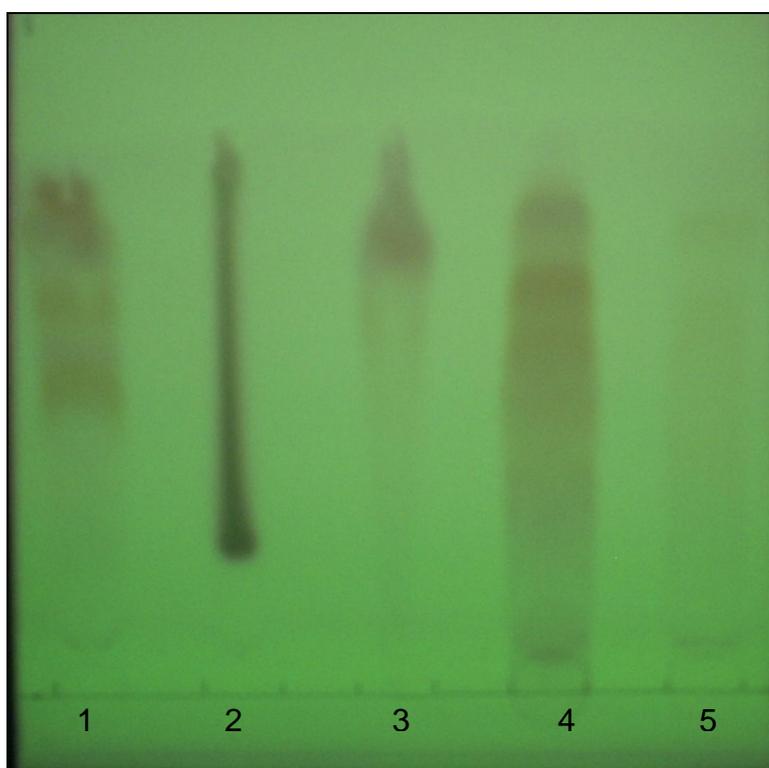


Figura 3.7.3.3 Placa Cromatográfica de *Baccharis latifolia* en UV 254 nm

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

Tabla 3.7.3.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de *Baccharis latifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

	EET	n-hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n-butanol
Luz normal	Amarillo Verde Café	Amarillo Verde	Café Amarillo	Amarillo Café	Amarillo
365 nm	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Verde
254 nm	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

3.7.4 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis buxifolia*

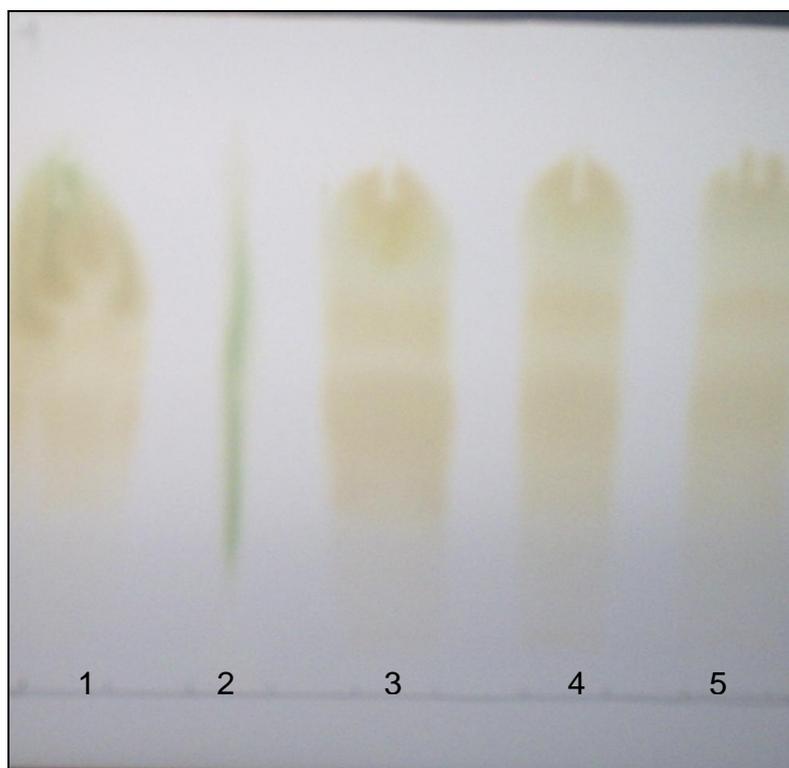


Figura 3.7.4.1 Placa Cromatográfica de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

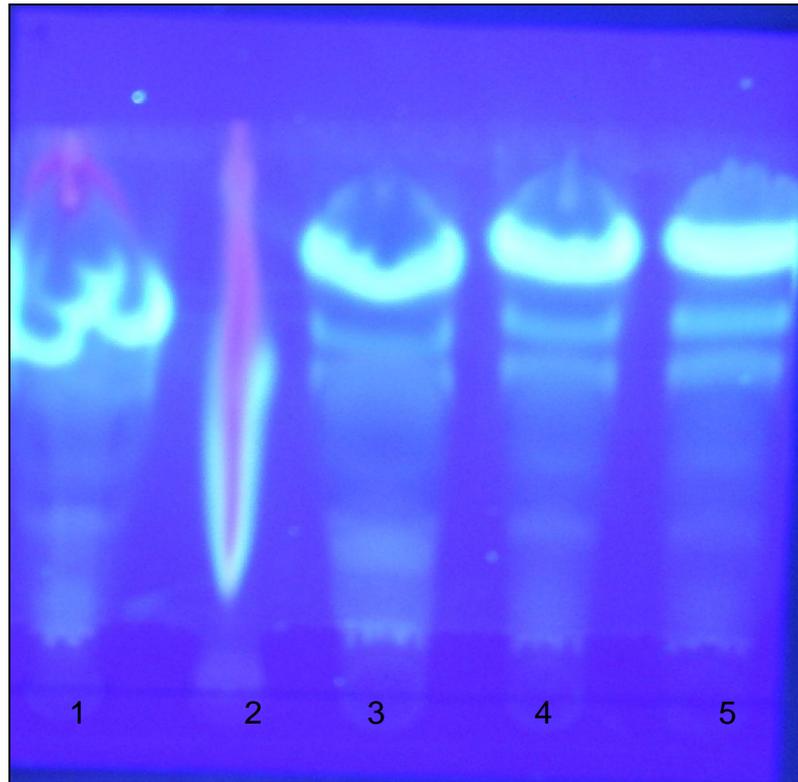


Figura 3.7.4.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis buxifolia* en UV 365 nm

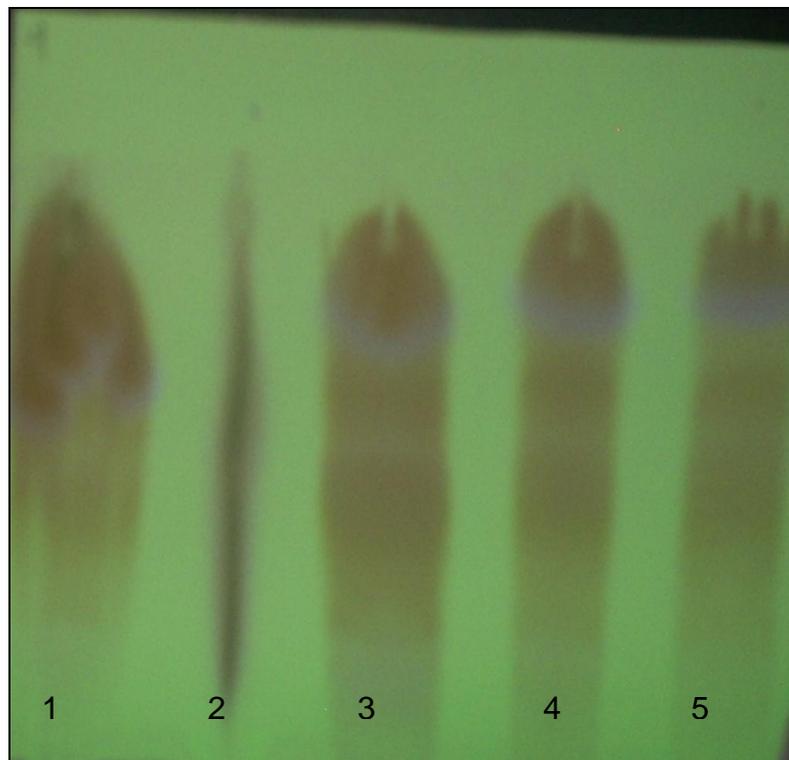


Figura 3.7.4.3 Placa Cromatográfica de *Baccharis buxifolia* en UV 254 nm

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

Tabla 3.7.4.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de *Baccharis buxifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

	EET	n-hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n-butanol
Luz normal	Verde Café	Verde Amarillo	Café Amarillo	Café Amarillo	Amarillo Café
365 nm	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Verde
254 nm	Celeste Verde	Celeste Verde	Celeste Verde	Celeste Verde	Celeste Verde

3.7.5 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis arbutifolia*

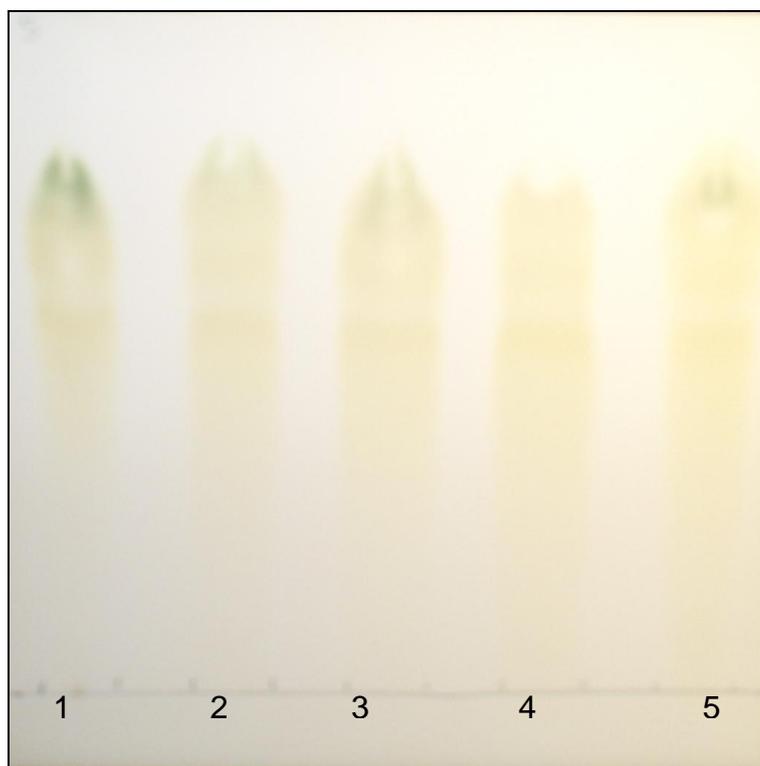


Figura 3.7.5.1 Placa Cromatográfica de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

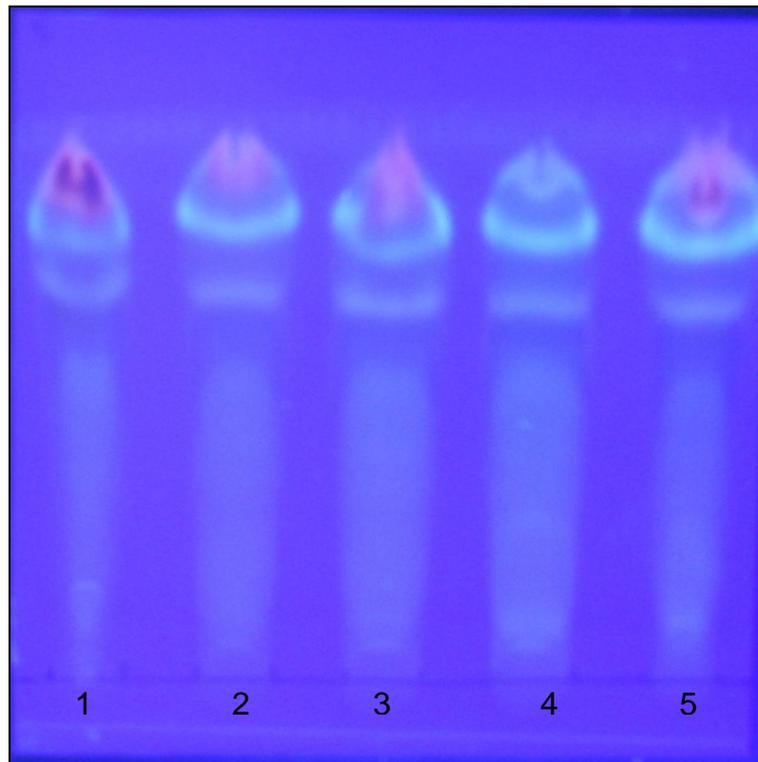


Figura 3.7.5.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis arbutifolia* en UV 365 nm

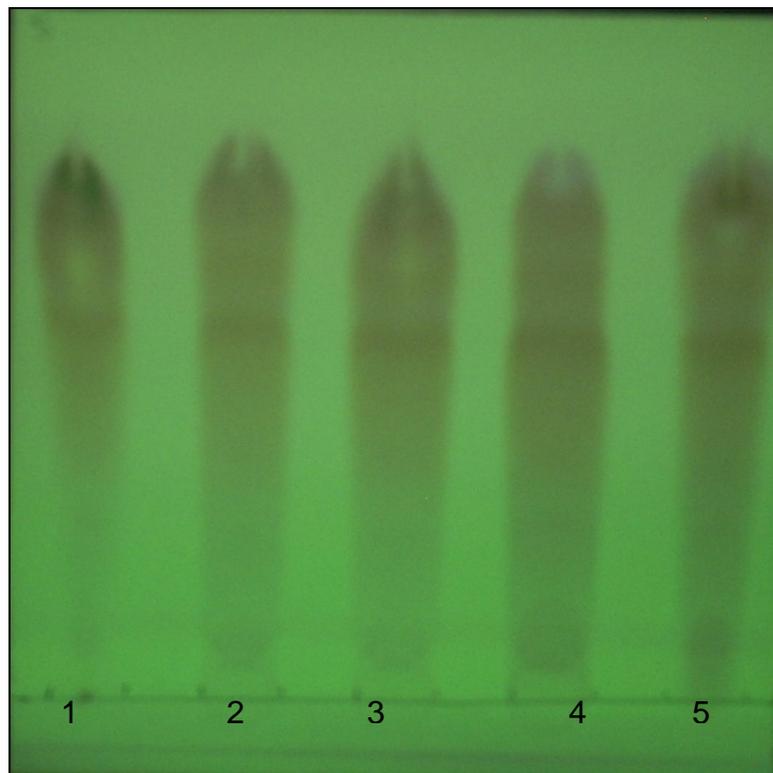


Figura 3.7.5.3 Placa Cromatográfica de *Baccharis arbutifolia* en UV 254 nm

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

Tabla 3.7.5.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de *Baccharis arbutifolia* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

	EET	n-hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n-butanol
Luz normal	Verde Café	Verde Amarillo	Café Amarillo	Café Amarillo	Amarillo Café
365 nm	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Verde
254 nm	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde

3.7.6 Resultados de la Cromatografía de *Baccharis macrantha*

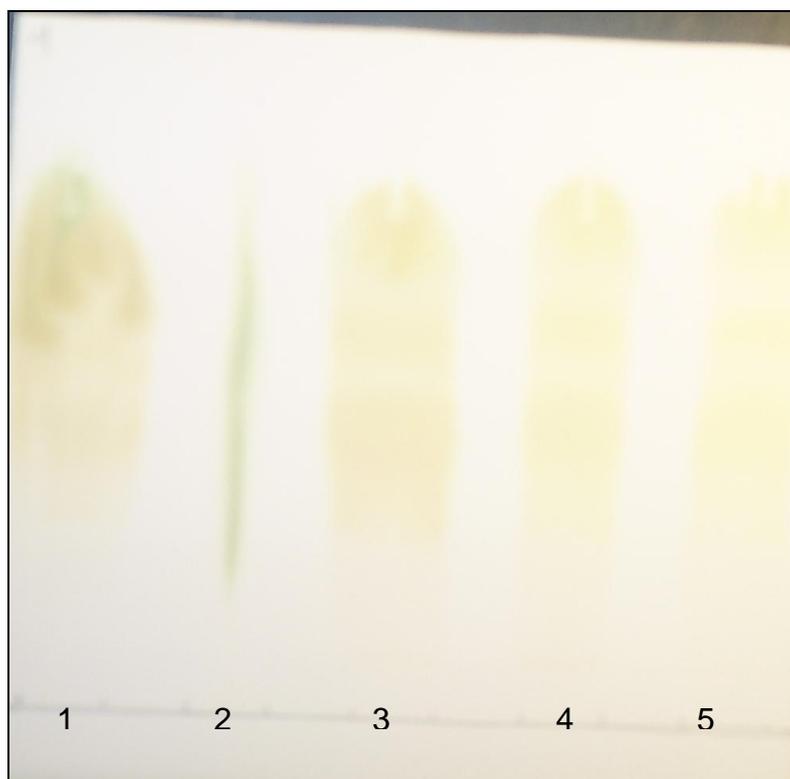


Figura 3.7.6.1 Placa Cromatográfica de *Baccharis macrantha* en Luz Normal

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

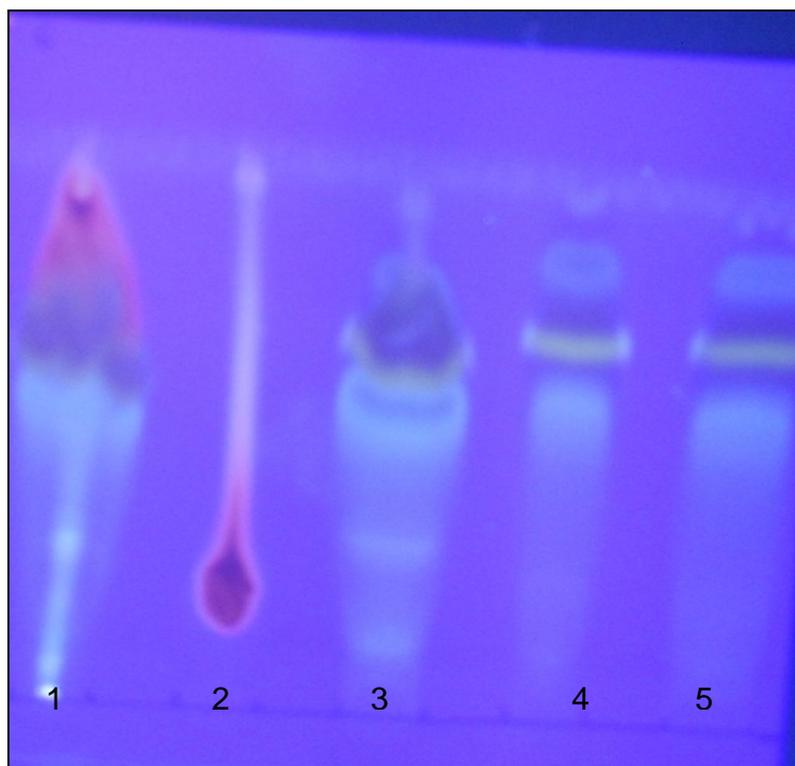


Figura 3.7.6.2 Placa Cromatográfica de *Baccharis macrantha* en UV 365 nm

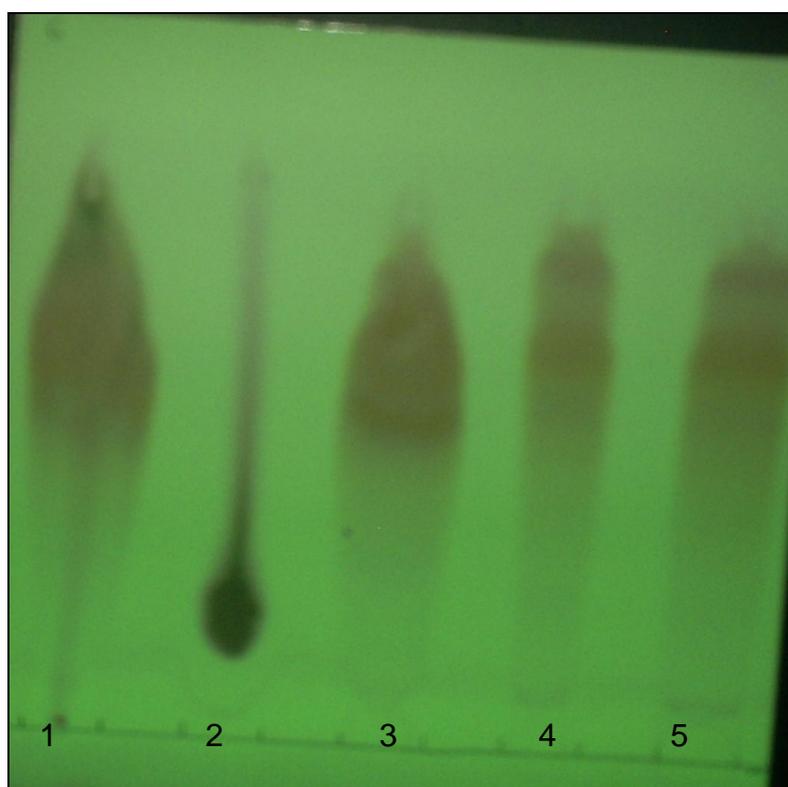


Figura 3.7.6.3 Placa Cromatográfica de *Baccharis macrantha* en UV 254 nm

Extracto Etanólico Total (1), n- Hexano (2), Diclorometano (3), Acetato de Etilo (4), n-butanol (5)

Tabla 3.7.6.1 Color de las Manchas en la Placa Cromatográfica de *Baccharis macrantha* en Luz Normal, UV 365 y UV 254.

	EET	n- hexano	Diclorometano	Acetato de Etilo	n- butanol
Luz normal	Verde Café	Verde Amarillo	Café Amarillo	Café Amarillo	Amarillo Café
365 nm	Celeste Morado Verde	Celeste	Celeste Morado Verde	Celeste Morado	Celeste Morado Amarillo
254 nm	Verde	Verde	Verde	Celeste Verde	Verde

3.7.7 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía del Principio Activo

De los primeros análisis de la marcha fitoquímica preliminar, se decidió que por la abundante concentración (++++) de los flavonoides detectados en las pruebas de coloración y confirmados por cromatografía en capa fina, se procedió a la separación del extracto total de las seis especies vegetales con solventes de diferente polaridad, proceso en el cual se purificó en forma consecutiva hasta obtener una fracción pura en la cual se determinó el marcador químico común en cada una de las seis especies vegetales del Género *Baccharis*.

La utilización de solventes de diferente polaridad permitió que en cada fase orgánica se purifique el Extracto Etanólico Principio Activo, de la forma que en la fracción n- butanol se obtuvo el principio activo más puro, el cual se estableció como el marcador químico común de flavonoides para las seis especies del género *Baccharis*, cuyo resultado positivo corresponde a la

fluorescencia de color celeste a la longitud de onda de 365 nm. y un Ratio Front (R_F) de 0.75 común para las seis especies analizadas.

La detección de los flavonoides en cromatografía de capa fina se pudo realizar por el color que desarrollan en el UV, apareciendo como manchas fluorescentes de color celeste, amarillo, amarillo-naranja, éstas se intensifican o cambian de color luego de su exposición a vapores de amoníaco. Según Geissman y Markham se puede reportar la relación que existe entre los colores y la posible estructura del flavonoide.

En esta investigación el análisis cualitativo del color de la macha se pudo relacionar con la estructura molecular básica de los flavonoides determinando así la factibilidad de estructuras químicas moleculares.

3.8 RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DEL MARCADOR QUÍMICO

El resultado cromatográfico del fraccionamiento del principio activo se basó en la solubilidad selectiva de los distintos componentes de los extractos en disolventes de diferente polaridad. La siembra de éstos extractos se realizó en una placa de sílica gel GF 18, específica para fase inversa y como fase móvil se utilizó: metanol:agua en una proporción de 2:1.

(Siembra en Punto)

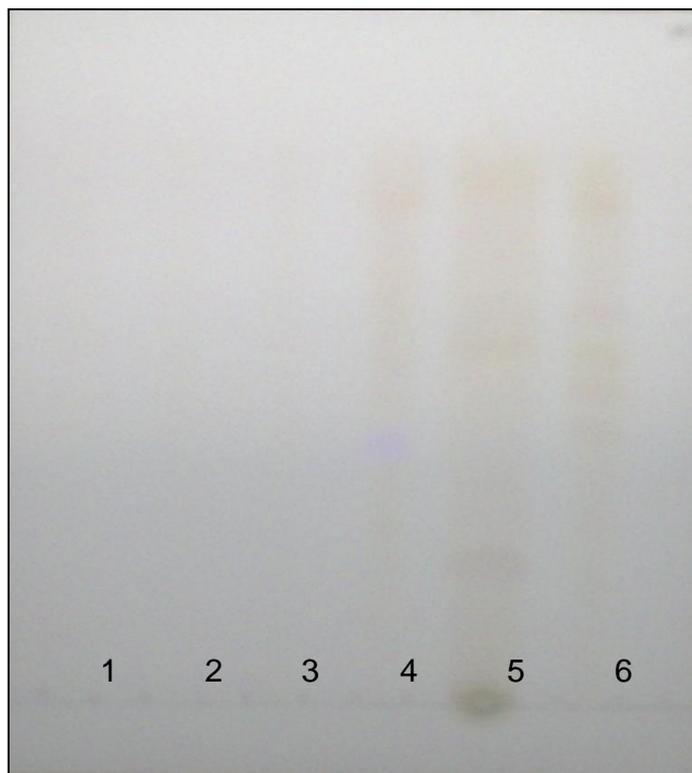


Figura 3.8.1 Placa Cromatográfica del Marcador Químico de las seis especies del Género *Baccharis* en Luz Normal

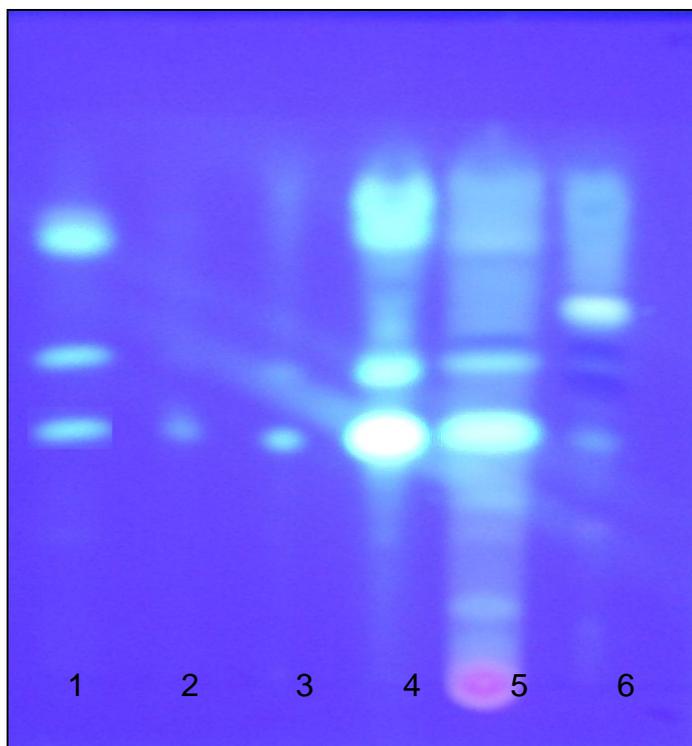


Figura 3.8.2 Placa Cromatográfica del Marcador Químico de las seis especies del Género *Baccharis* en UV 365 nm

B. trinervis (1), *B. Teindalensis*, (2), *B. latifolia* (3), *B. Buxifolia* (4), *B. Arbutifolia* (5), *B. Macrantha* (6)

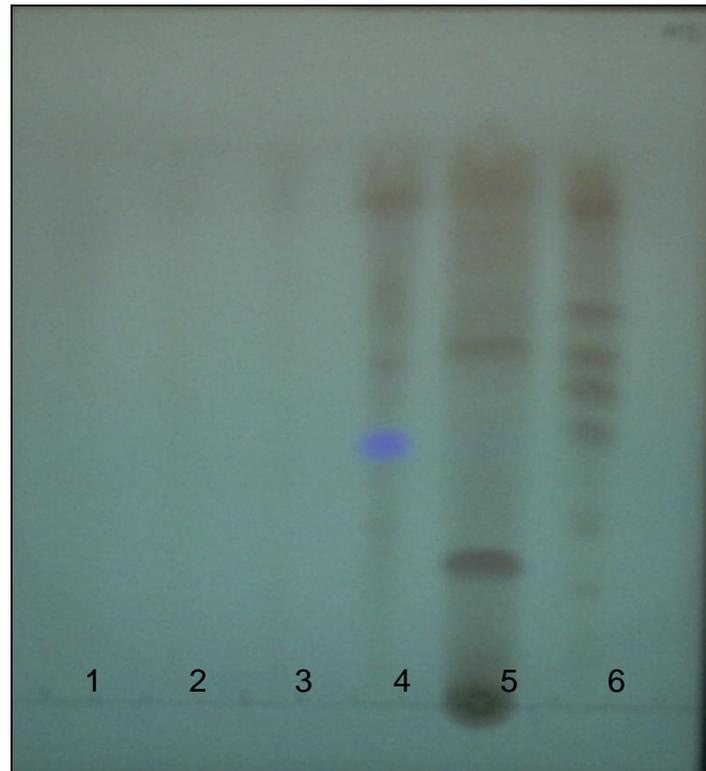


Figura 3.8.3 Placa Cromatográfica del Marcador Químico de las seis especies del Género *Baccharis* en UV 254 nm.

(Siembra en Banda)



Figura 3.9.1 Placa Cromatográfica del Marcador Químico de las seis especies del Género *Baccharis* en Luz Normal

B. trinervis (1), *B. Teindalensis*, (2), *B. latifolia* (3), *B. Buxifolia* (4), *B. Arbutifolia* (5), *B. Macrantha* (6)

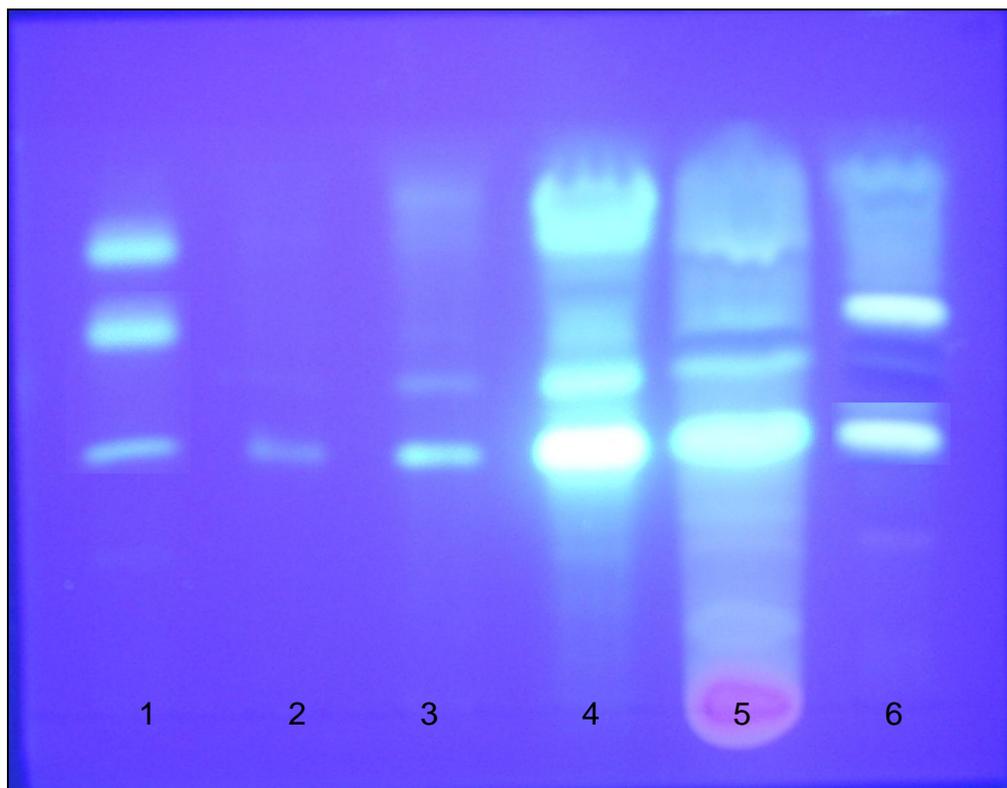


Figura 3.9.2 Placa Cromatográfica del Marcador Químico de las seis especies del Género *Baccharis* en UV 365 nm

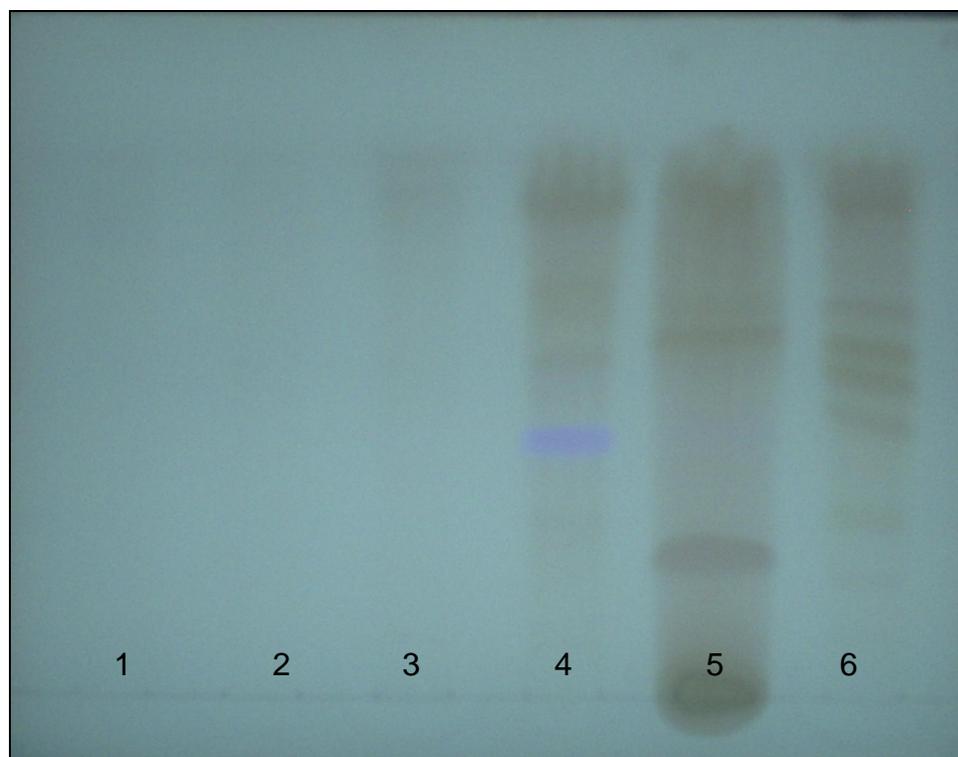


Figura 3.9.3 Placa Cromatográfica del Marcador Químico de las seis especies del Género *Baccharis* en UV 254 nm.

B. trinervis (1), *B. Teindalensis*, (2), *B. latifolia* (3), *B. Buxifolia* (4), *B. Arbutifolia* (5), *B. Macrantha* (6)

3.9 Interpretación de los Resultados de la Cromatografía del Marcador Químico

La cromatografía en capa fina fase inversa para el Marcador Químico se utilizó el extracto n-butanol de las seis especies analizadas. Utilizando placas de sílica gel GF 18 (20 cm de ancho x 10 cm de largo), como fase estacionaria y como fase móvil se utilizó:

- Metanol: agua (2:1)

La siembra de los extractos separados en el fraccionamiento del marcador en la placa de sílica gel fue de 1 cm. La siembra realizada fue en la forma de punto y banda.

A luz normal solo se pudo observar levemente manchas de color café y verde características del extracto, sin embargo a longitud de onda de 365 nm. se pudo observar manchas fluorescentes de color celeste característico de los flavonoides. Se comprobó que la mancha fluorescente de color celeste se encuentra a la misma distancia desde el punto de siembra en todas las seis especies analizadas, tanto en la siembra de punto y banda.

La constante RF (Ratio of Front) mide la retención de un componente en una placa, y mediante esta constante se pudo determinar un marcador común para las seis especies del Género *Baccharis*, es decir que el valor de RF obtenido de 0.5 es el mismo para las seis especies analizadas.

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

Desde la antigüedad las especies del Género *Baccharis* son utilizadas con fines terapéuticos, en la actualidad la ciencia moderna permite analizar, identificar y caracterizar los principios activos responsables de la actividad farmacológica, que juntamente con el desarrollo de modelos biológicos se logra obtener resultados precisos, comparativos y útiles para justificar y demostrar los efectos terapéuticos que estas presentan.

Actualmente la tendencia a nivel mundial está orientada a la obtención de productos terapéuticos que pueden ayudar a solucionar diferentes estados patológicos de salud. Hoy existe una nueva tendencia de la línea verde con gran aceptación, por lo tanto el llegar a obtener un marcador químico presente en todo el género *Baccharis* nos permitirá en futuros análisis, el monitoreo y la estandarización del mencionado Género, así como en los fitofármacos elaborados con estas plantas.

En las seis especies del Género *Baccharis* se realizó el análisis fitoquímico preliminar mediante reacciones de coloración y precipitación, para luego ser sometidas al análisis en cromatografía de capa fina, con el objeto de identificar y seleccionar el grupo de metabolitos secundarios o principios activos presentes en todas las especies del Género *Baccharis*, de esta manera se puede establecer un marcador químico común que puede ser empleado para estandarizar los extractos y monitoriar la presencia de esta especie.

Estos análisis permitieron determinar que el grupo de metabolitos secundarios o principios activos presentes en todas las especies del Género *Baccharis*, son los compuestos flavonoides que están además presentes en una concentración alta, lo que se permite establecer a estos compuestos como el marcador químico común que puede ser empleado para estandarizar e identificar estas especies.

Una vez que se determino y selecciono a los compuestos flavonoides como el marcador químico de las seis especies del Género *Baccharis*, se

realizó la separación y extracción de estos principios activos, mediante un fraccionamiento con disolventes de polaridad creciente, que permite separar los otros principios activos de la planta, para finalmente ser extraer los flavonoides con n-butanol.

En el análisis comparativo de los extractos butanólicos del Género *Baccharis* por cromatografía en capa fina de fase inversa, se puede observar que los compuestos flavonoides aparecen en todos los extractos como manchas con colores particulares, pudiendo presentar fluorescencia, que permite relacionar el color de estas manchas con la estructura básica común para estos compuestos y el diferente grado de hidroxilación, posición y tipo de sustitución que tienen los diferentes compuestos flavonoides.

La estructura básica común para estos compuestos es el anillo del Flavano, determinando los diferentes flavonoides el número y tipo de sustituyentes, instauración y posición de los mismos.

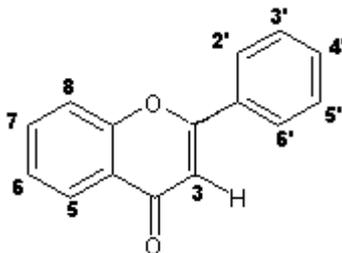


Figura 4.1 Estructura básica de los compuestos Flavonoides

El análisis de los cromatogramas a luz normal, muestra que los compuestos flavonoides aparecen en todos los extractos como manchas de color amarillo, las mismas que difieren en número e intensidad, algunas de estas manchas tienen el mismo Rf de 0.75 y aparecen en todos los extractos, lo que determina que el flavonoide presente es común para las seis especies y otras a Rf diferente lo que es indicativo de la presencia de flavonoides particulares de cada especie.

El análisis de los cromatogramas a luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm, muestra en los extractos butanólicos de las seis especies del

Género *Baccharis*, la presencia de manchas con una coloración celeste fluorescente con un Rf de 0.5, que nos orienta a relacionar con la presencia de una flavona sin 5 – OH libre, o de una flavanona sin 5 - OH libre (Lock, 1994), cuya estructura química básica es:

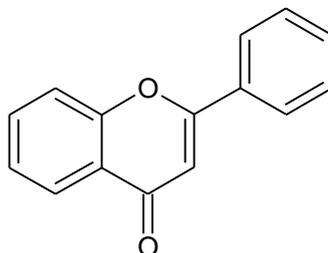


Figura 4.2 Estructura básica de la Flavona sin 5 – OH libre

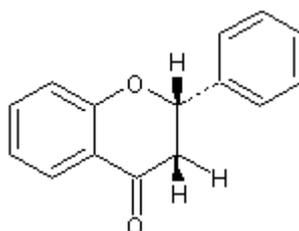


Figura 4.3 Estructura básica de la Flavanona sin 5 – OH libre

El análisis de los cromatogramas a luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm, muestra en los extractos butanólicos de las especie *Baccharis buxifolia* y *Baccharis macrantha* la presencia de manchas con una coloración amarillo fluorescente, que nos orienta a relacionar con la presencia en los extractos de una aurona con un 4' - OH libre, o una chalcona con un 2 o 4 - OH libre (Lock, 1994), Cuya estructura química básica es:

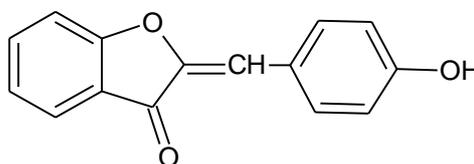


Figura 4.4 Estructura básica de la Aurona 4' OH libre

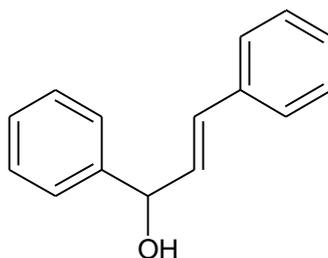


Figura 4.5 Estructura básica de la Chalcona 4 – OH libre

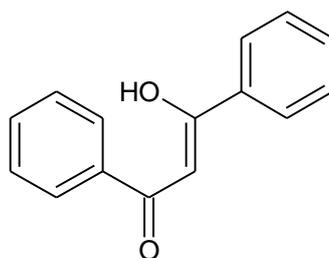


Figura 4.6 Estructura básica de la Chalcona 2 – OH libre

El análisis de los cromatogramas a luz ultravioleta a una longitud de onda de 365 nm, muestra en los extractos butanólicos de las especies *Baccharis buxifolia* y *Baccharis arbutifolia* la presencia de manchas con una coloración amarilla opaca o naranja fluorescente, que nos orienta a relacionar con la presencia en el extracto de un flavonol con 3 – OH libre y con o sin 5 – OH libre (Lock, 1994):

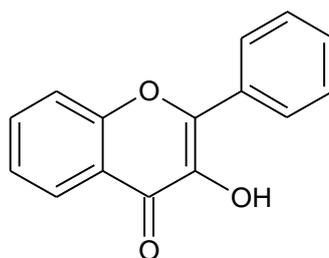


Figura 4.7 Estructura básica de un Flavonol con 3 – OH libre

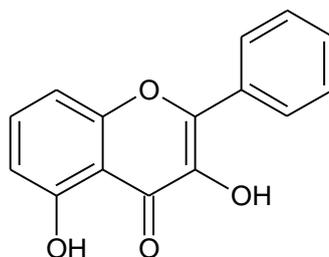


Figura 4.8 Estructura básica de un Flavonol con 5 – OH libre

Cada especie analizada del Género *Baccharis* tiene metabolitos secundarios característicos y diferentes para cada una de ellas, pero presentan también metabolitos que son comunes para los seis géneros analizados, que en este caso son los compuestos flavonoides, sin embargo se encuentran diferentes tipos y diferentes concentraciones en cada una de ellas, esto determina la especificidad, particularidad y diferencia de cada una de las especies.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

- El procedimiento de recolección se llevó a cabo dentro de los parámetros botánicos establecidos, a fin de preservar las especies vegetales, lo que permitió realizar su identificación botánica y el posterior análisis fitoquímico.
- El análisis fitoquímico permitió comprobar la presencia cualitativa de los diferentes grupos de metabolitos secundarios, que son: Alcaloides, Esteroles, Flavonoides, Saponinas, Taninos, Antraquinonas, Naftoquinonas, Heterósidos Cardiotónicos, Cumarinas y Sesquiterpenolactonas, mediante la marcha fotoquímica a través de reacciones de coloración y precipitación.
- Los grupos de metabolitos secundarios identificados en las especies del Género *Baccharis*, fueron: alcaloides, esteroles, flavonoides, Naftoquinonas, Antraquinonas, Heterósidos cardiotónicos, Cumarinas, sesquiterpenolactonas. Por tanto se puede concluir que las especies del género *Baccharis* presentan grupos de metabolitos secundarios son diferentes y otros que son comunes.
- De la investigación fitoquímica y del análisis cromatográfico en capa fina se concluye que, los flavonoides son el grupo de metabolitos secundarios común que está presente en abundante concentración en las seis especies del Género *Baccharis*, los que determina que se seleccione este grupo como el “marcador químico” del género.
- Las extracciones sucesivas con disolventes de polaridad creciente permite la separación de los metabolitos secundarios en orden de polaridad, hasta obtener un extracto purificado que contiene los compuestos flavonoides.
- El fraccionamiento del extracto total para obtener el principio activo se basó en la solubilidad selectiva de los distintos componentes de los extractos en disolventes de diferente polaridad.

- El proceso de fraccionamiento y la purificación de los diferentes extractos se comprueba mediante cromatografía en capa fina, que permite garantizar la separación de los metabolitos secundarios hasta obtener la fracción de flavonoides.
- El análisis en cromatografía de capa fina fase normal del extracto de n-butanol que contiene los compuestos flavonoides muestra que, las seis especies del Género *Baccharis*, presentan una mancha común, con un Referent Front (Rf) de 0.75, lo que permite concluir la presencia de un flavonoide, principio activo común para las seis especies investigadas.
- El análisis en cromatografía de capa fina en fase inversa del extracto n-butanol muestra que las seis especies del Género *Baccharis*, presentan una mancha común, con un Rf de 0.5 confirmando así la presencia de un flavonoide, como principio activo común para las seis especies investigadas, lo que permite determinar que es el marcador químico común de las mismas.
- El resultado del análisis en cromatografía de capa fina del extracto butanólico en fase inversa varía el valor de Rf con respecto al valor de Rf fase normal, a pesar que corresponde al mismo flavonoide o Principio Activo, debido a que la fase estacionaria tiene diferente polaridad, lo que determina que los componentes de la mezcla se separen con diferente velocidad de acuerdo con sus polaridades, que se origina por un diferente grado de afinidad por la fase móvil o la fase estacionaria.
- El análisis cromatográfico se realiza en luz visible, y en luz ultravioleta con longitud de onda de 365 y 254 nm, lo que permite establecer el número de manchas, el color, la fluorescencia, el Rf, que de acuerdo a la variación de estos y la utilización de reactivos cromogénicos, se puede asociar a la presencia de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos.

- Para la identificación de los diferentes flavonoides se relaciona con el color que presentan las placas cromatográficas en luz visible, y en luz ultravioleta con longitud de onda de 365 y 254 nm.
- El análisis permite concluir de acuerdo a la bibliografía que, las manchas que presentan fluorescencia de color celeste corresponden a flavonas y flavanonas sin 5 - OH libre, las manchas que presentan fluorescencia amarilla corresponde a auronas con 4' - OH libre y Charconas 2 o 4 OH, las manchas que presentan fluorescencia amarilla opaca fluorescente o naranja corresponde a flavonoles con 3 OH libre y con 5 OH libre.
- El análisis anterior es un resultado preliminar que únicamente nos orienta a sugerir la posible estructura de los flavonoides presentes en los extractos de las plantas, para obtener las estructuras definitivas de los compuestos y del marcador químico es necesario realizar análisis espectroscópicos como Resonancia Magnética Nuclear, Infra Rojo, Masas, etc. que permiten establecer la estructura exacta de un compuesto.
- La presencia de otras manchas de diferentes colores y fluorescencias en cada una de las especies vegetales, se debe a la presencia de diferentes metabolitos secundarios característicos y particulares de cada una de ellas, determinando la variabilidad de cada una de las especies.
- Las condiciones del hábitat en donde fueron recolectadas cada una de las plantas, así como la especie, determinan características químicas específicas de cada una de ellas, que corresponden a la variación de color observadas en las diferentes longitudes de onda.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

- En el presente estudio se ha logrado identificar el marcador químico de las seis especies vegetales del Genero *Baccharis*, pero es necesario realizar estudios espectroscópico para determinar en forma concreta su estructura molecular, así como también valoraciones cuantitativas que permitan determinar la concentración de dicho marcador.
- Se debe complementar los estudios fitoquímicos con la evaluación de las actividades farmacológicas in Vitro y en vivo, que permitan relacionar la actividad terapéutica atribuida a este género con la presencia de los flavonoides.
- Realizar estudios de toxicidad aguda, subaguda y crónica del extracto acuoso y etanólico total y su marcador químico, en modelos animales de experimentación, como también en líneas celulares establecidas
- Realizar estudios preclínicos que determinaran el efecto terapéutico que es atribuido a los flavonoides o su marcador químico.
- Luego de estos estudios realizar estudios en pacientes de acuerdo a los protocolos establecidos.
- Elaborar un fitofármaco que cumpla con todos los requisitos establecidos en la Ley Orgánica de Salud vigente a nivel nacional y cumplir con las normas internacionales de estudios clínicos.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

1. Albornoz A. (1980). Productos Naturales. Sustancias y Drogas Extraídas de Plantas. Universidad Central de Venezuela. Caracas
2. Bernal H., Correa J. (1989) Especies vegetales promisorias de los países del Convenio Andrés Bello. Secretaria Ejecutiva Permanente del Convenio “Andrés Bello”.
3. Bruneton J. (2003). Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales. Segunda Edición. Editorial ACRIBIA S.A. España
4. Cáceres A. (2000). Desarrollo de tecnología de cultivo de plantas medicinales nativas y producción de fitoterápicos en Centro América. Facultad de CCQQ y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala y Laboratorio Fitofarmacéutico Farmaya, Guatemala.
5. Chiriboga X. (2005). Manual de Técnicas Experimentales utilizadas en el estudio preclínico de Fármacos con Actividad Gastrointestinal. Obtención del Material Vegetal y preparación del material vegetal para la investigación, PROYECTO X. 10, CYTED.
6. Chiriboga X, Miño P (2003), Tesis Del Diplomado Superior, Investigación y Gestión de Proyectos en Ciencia y Tecnología, Centro de Desarrollo e investigación de plantas medicinales.
7. Cytel (1995). Plantas bajo estudio por los grupos de investigadores. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-1 Búsqueda de Principios Bioactivos en plantas.
8. Dillon M, Sagastegui A. (1991). Flora del Perú. Familia Asteracea. Parte V, Editorial Fieldiana Botany.

9. Dy Stasi (2005). Manual de Técnicas Experimentales utilizadas en el estudio preclínico de Fármacos con Actividad Gastrointestinal. Criterios de selección del Material Vegetal, PROYECTO X. 10, CYTED.
10. Giuliano D. (2000). Subtribu *Baccharinae*: *Baccharis*, Editorial Flora Anerogámica Argentina. ProFlora CONICET, 66, 6-67.
11. Giuliano D. (2001). Clasificación Infragénica de las especies de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). Editorial Darwiniana, 39, 137- 138.
12. Gonzaga L, Costa Brighente I, Pizzolatti M (2005). The *Baccharis* genus (Asteraceae): chemical, economic and biological aspects. Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. São Paulo. Brazil
13. Hostettmann K, Wolfender JL (1997). The search for biologically active secondary metabolites. Pesticide Science, 51, 471-482
14. Jensen W, Salisbury F. (1988). Botánica. Segunda Edición. México. Editorial Mc Graw Hill. Pág. 618-619
15. Lock O. (1994). Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos Naturales. Pontificia Universidad Católica del Perú. Fondo Editorial. Segunda Edición.
16. Lock O, Cabello I, Doroteo V. (2006) Análisis de flavonoides en plantas. www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry. Pontificia Universidad Católica del Perú; Departamento de Ciencias – Sección Química. Lima, Perú.
17. Mangiaterra P. (2005). Evaluación de parámetros botánicos y fitoquímicos para el control de calidad de «carqueja». Tesis de Licenciatura en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Belgrano. Argentina (2005).

18. Martínez V. (2006). Importancia de las Plantas Medicinales. El Mundo de las Plantas. <http://www.botanical-online.com/plantasmedicinalesimportancia.htm>
19. Renteria A. Mora J. (2005). Compuestos Fenólicos. Universidad Central del Ecuador.
20. Rodríguez Y. (2006). Universidad Central de las Villas. Filtración al vacío. <http://www.fq.uh.cu/dpto/qf/uclv/techniques/vfiltration.html>
21. Quiored (2004). Operaciones Básicas. Eliminación de solventes a Presión Reducida (Rotavapor). Universidad de Granada. Facultad de Ciencias, Departamento Química Orgánica. http://www.ugr.es/~quiorred/lab/oper_bas/dest_red.htm
22. Quiored (2004). Operaciones Básicas. Montaje de Reflujo. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias, Departamento Química Orgánica. http://www.ugr.es/~quiorred/lab/oper_bas/reflujo.htm
23. San Feliciano A, Lourenço A, Cruz L. (2005). Manual de Técnicas Experimentales utilizadas en el estudio preclínico de Fármacos con Actividad Gastrointestinal. Extracción, Fraccionamiento y Aislamiento de Compuestos Activos, PROYECTO X. 10, CYTED.
24. Sharapin N. (2000). Qualidade da materia prima para produtos fitofarmacéuticos. Conferencia en el I Curso Iberoamericano de Fitoterapia Clínica y III Reunión de Coordinación Internacional de RIPROFITO (Red Iberoamericana de Productos Fitofarmacéuticos). Guatemala.
25. Trease E, Charlef W. (1982). Farmacognosia. Editorial Continental CECSA. México.

26. Vásconez K. (1999). Tesis Doctoral. Análisis Comparativo de 10 Extractos de Plantas Medicinales con efecto Gástrico usadas en Medicina Popular con Fármacos de Referencia.
27. Villacrés V. (1995) Biodiversidad de Plantas Amazónicas. Ediciones Abya-Yala. Universidad Central del Ecuador, Primera Edición. Cayambe-Ecuador.

TABLA DE CONTENIDO

TEMA	i
CERTIFICACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
TABLA DE CONTENIDO	v
LISTADOS DE TABLAS	x
LISTADO DE FIGURAS	xv
LISTADO DE ANEXOS	xxii
RESUMEN	xxiii
ABSTRACT	xxiv
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xxv
CAPÍTULO 1	1
1.1 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA	1
1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4 MARCO TEÓRICO	4
1.4.1 Biodiversidad de Plantas en el Ecuador	4
1.4.2 Importancia de las Plantas Medicinales	5
1.4.3 Principios Activos	6
1.4.4 Características del Género <i>Baccharis</i>	7
1.4.5 Información Etnofarmacológica del Género <i>Baccharis</i>	10
1.4.6 Descripción Botánica de las Plantas	11
1.4.6.1 Descripción Botánica de <i>Baccharis trinervis</i> Pers	12
1.4.6.2 Descripción Botánica de <i>Baccharis teindalensis</i> Kunth	12
1.4.6.3 Descripción Botánica de <i>Baccharis latifolia</i>	13
1.4.6.4 Descripción Botánica de <i>Baccharis buxifolia</i> (Lam) Pers	13
1.4.6.5 Descripción Botánica de <i>Baccharis arbutifolia</i>	14
1.4.6.6 Descripción Botánica de <i>Baccharis macrantha</i> Kunth	14

1.4.7	Material Vegetal	15
1.4.7.1	Recolección	15
1.4.7.2	Identificación	16
1.4.7.3	Prensado	16
1.4.7.4	Secado	16
1.4.7.5	Molienda	17
1.4.7.6	Almacenamiento y Conservación	17
1.4.8	Métodos de extracción	17
1.4.8.1	Maceración	18
1.4.8.2	Reflujo	18
1.4.8.3	Filtración	19
1.4.8.4	Concentración a Presión Reducida (Rotavapor)	19
1.4.9	Marcha Fitoquímica	20
1.4.10	Metabolitos Secundarios	21
1.4.10.1	Alcaloides	23
1.4.10.2	Esteroles	24
1.4.10.3	Flavonoides	24
1.4.10.4	Taninos	25
1.4.10.5	Saponinas	27
1.4.10.6	Cumarinas	27
1.4.10.7	Antraquinonas	28
1.4.10.8	Heterósidos Cardiotónicos	29
1.4.10.9	Sesquiterpenolactonas	29
1.4.11	Cromatografía en Capa Fina	30
1.4.12	Funciones de los metabolitos secundarios del Género <i>Baccharis</i>	31
1.5	HIPÓTESIS	32
 CAPÍTULO 2		33
2.1	PARTICIPANTES	33
2.2	ZONA DE ESTUDIO	33
2.3	PERÍODO DE TIEMPO DE LA INVESTIGACIÓN	34
2.5	PROCEDIMIENTOS	35
2.5.1	Material Vegetal Recolectado	35
2.5.1.1	Recolección	35
2.5.1.2	Secado	36

2.5.2	Identificación Botánica de las Especies Recolectadas del Género <i>Baccharis</i>	37
2.5.2.1	Identificación y clasificación taxonómica	37
2.5.2.2	Elaboración del Voucher:	38
2.5.3	Método de Extracción	39
2.5.3.1	Muestra seca y pulverizada	40
2.5.4	Marcha Fitoquímica	40
2.5.4.1	Investigación de Alcaloides	41
2.5.4.2	Investigación de Esteroles	43
2.5.4.3	Investigación de Flavonoides, Antraquinonas, Taninos y Saponinas	45
2.5.4.4	Investigación de Sesquiterpenolactonas, Cumarinas y Heterósidos Cardiotónicos	50
2.5.5	Método de Fraccionamiento del Principio Activo	53
2.5.5.1	Muestra seca y pulverizada	53
2.5.5.2	Fraccionamiento del Principio Activo	53
2.5.5.3	Cromatografía en Capa Fina del Fraccionamiento del Principio Activo	54
2.6	ANÁLISIS DE DATOS	55
CAPÍTULO 3		56
3.1	RECOLECCIÓN	56
3.2	ELABORACIÓN DEL VOUCHER:	56
3.2.1	<i>Baccharis trinervis</i> Pers	56
3.2.2	<i>Baccharis teindalensis</i> Kunth	59
3.2.3	<i>Baccharis latifolia</i>	62
3.2.4	<i>Baccharis buxifolia</i> (Lam) Pers	65
3.2.5	<i>Baccharis arbutifolia</i> (Lam)	68
3.2.6	<i>Baccharis macrantha</i> Kunth	71
3.3.1	Método de Extracción de <i>Baccharis trinervis</i>	74
3.3.2	Método de Extracción de <i>Baccharis teindalensis</i>	74
3.3.3	Método de Extracción de <i>Baccharis latifolia</i>	74
3.3.4	Método de Extracción de <i>Baccharis buxifolia</i>	75
3.3.5	Método de Extracción de <i>Baccharis arbutifolia</i>	75

3.3.6	Método de Extracción de <i>Baccharis macrantha</i>	75
3.4	RESULTADOS DE MARCHA FITOQUÍMICA	76
3.4.1	Resultados de Marcha Fitoquímica de <i>Baccharis trinervis</i>	76
3.4.2	Resultados de la Marcha Fitoquímica de <i>Baccharis teindalensis</i>	77
3.4.3	Resultados de la Marcha Fitoquímica de <i>Baccharis latifolia</i>	78
3.4.4	Resultados de la Marcha Fitoquímica de <i>Baccharis buxifolia</i>	79
3.4.5	Resultados de la Marcha Fitoquímica de <i>Baccharis arbutifolia</i>	80
3.4.6	Resultados de la Marcha Fitoquímica de <i>Baccharis macrantha</i>	81
3.5	RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	82
3.5.1	Resultados de la Cromatografía de Alcaloides	82
3.5.2	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Alcaloides	88
3.5.3	Resultados de la Cromatografía de Esteroles	89
3.5.4	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Esteroles	95
3.5.5	Resultados de la Cromatografía de Flavonoides	96
3.5.6	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Flavonoides	102
3.5.7	Resultados de la Cromatografía de Naftoquinonas	103
3.5.8	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Naftoquinonas	109
3.5.9	Resultados de la Cromatografía de Antraquinonas	110
3.5.10	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Antraquinonas	116
3.5.11	Resultados de la Cromatografía de Heterósidos Cardiotónicos	117
3.5.12	Interpretación de los Resultados de la Heterósidos Cardiotónicos	123
3.5.13	Resultados de la Cromatografía de Cumarinas	124
3.5.14	Interpretación de los Resultados de las Cumarinas	130
3.5.15	Resultados de la Cromatografía de Sesquiterpenolactonas	131
3.5.16	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía de Sesquiterpenolactonas	137
3.6	RESULTADOS DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DEL PRINCIPIO ACTIVO	138
3.6.1	Método de Extracción de <i>Baccharis trinervis</i>	138
3.6.2	Método de Extracción de <i>Baccharis teindalensis</i>	138

3.6.3	Método de Extracción de <i>Baccharis latifolia</i> _____	138
3.6.4	Método de Extracción de <i>Baccharis buxifolia</i> _____	139
3.6.5	Método de Extracción de <i>Baccharis arbutifolia</i> _____	139
3.6.6	Método de Extracción de <i>Baccharis macrantha</i> _____	139
3.7	RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DEL PRINCIPIO ACTIVO ____	140
3.7.1	Resultados de la Cromatografía de <i>Baccharis trinervis</i> _____	140
3.7.2	Resultados de la Cromatografía de <i>Baccharis teindalensis</i> _____	142
3.7.3	Resultados de la Cromatografía de <i>Baccharis latifolia</i> _____	144
3.7.4	Resultados de la Cromatografía de <i>Baccharis buxifolia</i> _____	146
3.7.5	Resultados de la Cromatografía de <i>Baccharis arbutifolia</i> _____	148
3.7.6	Resultados de la Cromatografía de <i>Baccharis macrantha</i> _____	150
3.7.7	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía del Principio Activo ____	152
3.8	RESULTADOS DE LA CROMATOGRAFÍA DEL MARCADOR QUÍMICO _____	153
	(Siembra en Punto) _____	155
	(Siembra en Banda) _____	155
3.9	Interpretación de los Resultados de la Cromatografía del Marcador Químico _____	157
	CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN _____	158
	CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES _____	163
	CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES _____	166
	CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA _____	167