



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
GRUPO DE INVESTIGACIÓN “BIOMOLÉCULAS ORGÁNICAS”



ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE
Baccharis latifolia

Trabajo presentado como requisito para optar al grado de Licenciado en
Bioanálisis

www.bdigital.ula.ve

Autores:

José Luis Navas Fernández

C.I.:21.256.313

Luis David Rodríguez Contreras

C.I.:23.724.467

Tutor:

Alexis Buitrago Dr.

Co tutor:

Janne Rojas Vera, *Phd*

Mérida, Febrero de 2020

DEDICATORIA

El presente trabajo de grado es dedicado a toda nuestra familia y amigos, principalmente a nuestros padres que han sido un pilar fundamental en nuestra formación profesional, por brindarnos la confianza, consejos, oportunidades y recursos para lograrlo.

Por último, a nuestros amigos y profesores con los que compartimos todos estos años juntos.

www.bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTO

Primeramente, a Dios por permitirnos llegar a hacer realidad esta meta.

A nuestros familiares, por inculcarnos todos los valores que nos inculcaron y el amor por esta carrera, por acompañarnos y apoyarnos.

A nuestro tutor, por su paciencia y amor por su trabajo. Muchas gracias por brindarnos su conocimiento, dedicación, estética y perfeccionismo en este trabajo de grado.

A nuestros amigos, por todos los momentos divertidos e inolvidables que vivimos durante todos estos años.

www.bdigital.ula.ve

ÌNDICE DE CONTENIDO

	pág.
DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTO	IV
INDICE DE CONTENIDO	V
INDICE DE TABLAS	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
RESUMEN	X
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación e Importancia de la Investigación	7
Objetivos de la Investigación	8
<i>Objetivo General</i>	8
<i>Objetivos Específicos</i>	8
Alcances y Limitaciones de la Investigación	8
CAPÍTULO II. MARCO TEORICO	10
Trabajos Previos	10
Antecedentes Históricos	13
Bases Teóricas	15
Ensayo Fitoquímico	15
Extracto Metanólico	16
Maceración	16
Antioxidantes	17
<i>Clases de antioxidantes</i>	18
Radicales Libres	19
Método ABTS*+	20
Familia <i>Asteraceae</i>	20
Genero <i>Baccharis</i>	21

Definición de Términos Básicos	22
Operacionalización del Evento	24
CAPÍTULO III. MARCO METODOLOGICO	25
Tipo de Investigación	25
Diseño de la Investigación	25
Población y Muestra	26
<i>Unidad de Investigación</i>	26
<i>Instrumentos de Recolección de Datos</i>	26
Metodología de la Investigación	27
Estudio de la Capacidad Antioxidante	27
Búsqueda de la Especie	28
Procedimiento Fitoquímico	28
Tamizaje fitoquímico	30
Identificación de Alcaloides	30
Identificación de Antraquinonas	31
Identificación de Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos	31
Identificación de Triterpenoides y Esteroides	32
Identificación de Flavonoides	33
Identificación de Cumarinas	34
Identificación de Sapononas	35
Identificación de Taninos	35
Identificación de Mucílagos	37
Identificación de Compuestos Fenolicos	37
Actividad antioxidante	38
Método ABTS	38
Contenido de fenoles totales	40
Contenido de flavonoides totales	41
Evaluación de los resultados	42
Diseño de análisis	43
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44

Identificación cualitativa de los metabolitos secundarios presentes en la Especie <i>Baccharis latifolia</i>	44
Determinación de la actividad antioxidante del extracto metanólico de la Especie <i>Baccharis latifolia</i>	45
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
ABREVIACIONES	51
BIBLIOGRAFÍAS	52

www.bdigital.ula.ve

ÌNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla N° 1.- Operacionalización del evento de estudio “Actividad antioxidante”.	24
Tabla N° 2.-Metodología de la investigación	27
Tabla N° 3.-Identificación de Alcaloides	30
Tabla N° 4.-Identificación de Antraquinonas	31
Tabla N° 5.-Identificación de Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos	32
Tabla N° 6.- Identificación de Triterpenoides y Esteroides	33
Tabla N° 7.- Identificación de Flavonoides	34
Tabla N° 8.- Identificación de Cumarinas	35
Tabla N° 9.- Identificación de Saponinas	35
Tabla N° 10.- Identificación de Taninos	36
Tabla N° 11.- Identificación de Mucílagos	37
Tabla N° 12.- Identificación de compuestos fenólicos	38
Tabla N° 13.-Tabla de resultados Tamizaje Fitoquímico	45

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Estructura de flavonoide bioactivo (ternatina)	6
Figura 2.- Ejemplos de flavonoides con actividad anti-inflamatoria	6
Figura 3.- Reacción secuestrante del radical ABTS•+	39
Figura 4.- Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu	40
Figura 5.- Mecanismo de acción del tricloruro de aluminio	41
Figura N°6.- Curva de calibración de Trolox para la determinación de la capacidad secuestrante del ABTS*+.	46
Figura N°7.- Curva de calibración de ácido gálico para la determinación del contenido de Fenoles	46
Figura N° 8.- Curva de calibración con Quercetina (QE) para la determinación del contenido de Flavonoides	47



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
GRUPO DE INVESTIGACIÓN “BIOMOLÉCULAS ORGÁNICAS”



**ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE EN EL EXTRACTO METANÓLICO DE
*Baccharis latifolia***

Autores: José Luis Navas Fernández,
Luis David Rodríguez Contreras

Tutor: Alexis Buitrago Dr.

Co tutor: Janne Rojas Vera, *Phd*

Año: 2019

RESUMEN

El uso de los productos naturales ha sido una práctica frecuente en la industria farmacéutica durante décadas. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de *Baccharis latifolia*; a partir del extracto metanólico de las hojas recolectadas en el estado Mérida, se estableció una línea de investigación fitoquímica mediante un estudio cualitativo de los metabolitos secundarios, el mismo permitió determinar la presencia de diversos compuestos químicos, tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glicósidos y taninos. De igual manera se determinó la capacidad antioxidante por el método **ABTS**, Contenido de Fenoles Totales (**CFT**) y Contenido de Flavonoides Totales (**CFIT**). Esta investigación mostró una alta capacidad secuestrante de radicales libres con un promedio de $IC_{50} = 4,38$ μ mol con el método de **ABTS**, un contenido de 780 mg Eq de ácido gálico por 1 gramo de extracto para la determinación de (**CFT**), por último, se obtuvo una concentración de (**CFIT**) de 49,8 mg EQ de quercitina por 1 gramo de extracto.

Palabras claves: *Baccharis latifolia*, Extracto metanólico, Fitoquímica, Metabolitos secundarios.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso para cubrir las necesidades terapéuticas. Hoy en día su estudio se ha convertido en un hecho científico universal que trasciende no solo en beneficio de la salud, sino que también en el sistema productivo y económico de un país (Muñoz, Montes y Wilkomirsky. 2001).

Es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de la salud en múltiples culturas del mundo, transmitidas a través de generaciones. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizando por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta, y que permite además la vigencia de su empleo (Muñoz y cols. 2001).

Los vegetales hacen posible la vida del organismo animal y condicionan su estado de salud, mediante la elaboración de dos clases de componentes químicos complejos, denominados principios inmediatos y principios activos (Muñoz. 2002).

Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante, ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración. No obstante, las determinaciones de la capacidad antioxidante realizadas *in vitro* dan tan sólo una idea aproximada de lo que ocurre en situaciones complejas *in vivo* (Kuskoski, Asuero, Troncoso, Mancini-Filho y Fett. 2005).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los

compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por otra parte, es necesario considerar que los ensayos *in vivo* pueden presentar algunos inconvenientes, como la adaptabilidad en respuesta al aumento del estrés oxidativo (Kuskoski y cols. 2005).

Una de las principales familias de plantas que sintetizan extractos ricos en compuestos fenólicos, un gran grupo de antioxidantes, es la familia Asteraceae. Generalmente, la presencia de estructuras histológicas sobre o en la superficie de las hojas de la planta tiene que ver con la producción de dichos compuestos (Toledo y Kutschker. 2012).

El género *Baccharis* comprende más de 500 especies de las cuales muchas han sido investigadas y demostrado ser fuentes ricas de varios flavonoides. Las especies de *Baccharis* son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional, todas en América, estando muy bien representado en la región andina de América del Sur (Dávila, Stener y Hinojosa. 2013).

En la actualidad la innovación y generación de nuevas alternativas enfocadas en las propiedades de las plantas medicinales es necesaria. La finalidad del presente estudio es evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de la especie *Baccharis latifolia* en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Octubre de 2017 hasta Noviembre de 2019.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El daño oxidativo, también llamado estrés oxidativo, no es más que la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno. Todo esto trae como consecuencia alteraciones de la relación entre la estructura y la función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado; por lo tanto, se reconoce como mecanismo general de daño celular, asociado con la fisiopatología primaria o la evolución de un número creciente de entidades y síndromes de interés médico-social, involucrado en la génesis y en las consecuencias de dichos eventos (Ames, Shigenaga y Hagen. 1993).

Los principales causantes del estrés oxidativo son los radicales libres; desde el punto de vista químico, los radicales libres son todas aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, que les da una configuración espacial inestable, señalado por el punto situado a la derecha del símbolo. Poseen una estructura birradicálica, son muy reactivos, tienen una vida media corta, por lo que actúan cercano al sitio en que se forman y son difíciles de dosificar. Desde el punto de vista molecular son pequeñas moléculas ubicuitarias y difusibles que se producen por diferentes mecanismos entre los

que se encuentran la cadena respiratoria mitocondrial, la cadena de transporte de electrones a nivel microsomal y en los cloroplastos, y las reacciones de oxidación, por lo que producen daño celular (oxidativo) al interactuar con las principales biomoléculas del organismo. Sin embargo, los radicales libres del oxígeno tienen una función fisiológica en el organismo como la de participar en la fagocitosis, favorecer la síntesis de colágeno y prostaglandinas, activar enzimas de la membrana celular, disminuir la síntesis de catecolaminas por las glándulas suprarrenales, modificar la biomembrana y favorecer la quimiotaxis (Cheesman y Slater. 1993).

Los efectos nocivos de los radicales libres ocurren sobre diferentes macromoléculas del organismo. En el caso de los lípidos es donde se produce el mayor daño en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, que afecta a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados, alterando la permeabilidad de la membrana celular, produciendo edema y muerte celular. La peroxidación lipídica o enranciamiento oxidativo representa una forma de daño histórico que puede ser desencadenado por el oxígeno, el oxígeno singlete, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Los ácidos grasos insaturados son componentes esenciales de las membranas celulares, por lo que se cree son importantes para su funcionamiento normal; sin embargo, son vulnerables al ataque oxidativo iniciado por los radicales libres del oxígeno. Una vez que se inicia, el proceso toma forma de “cascada”, con producción de radicales libres que lleva a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos, a partir de los ácidos grasos insaturados; y una vez formados estos radicales libres son los responsables de los efectos citotóxicos (Jerlick, Pitt, Schaur y Spickett. 2002).

En el caso de las proteínas los efectos nocivos se relacionan al haber oxidación de un grupo de aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina; además se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas, y por último hay formación de grupos carbonilos. Mientras en el ADN (Ácido desoxirribonucleico) ocurren fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay

pérdida de expresión o síntesis de una proteína por daño a un gen específico, modificaciones oxidativas de las bases, deleciones, fragmentaciones, interacciones estables ADN-proteínas, reordenamientos cromosómicos y desmetilación de citosinas del ADN que activan genes. El daño se puede realizar por la alteración (inactivación/pérdida) de algunos genes supresores de tumores que pueden conducir a la iniciación, progresión, o ambas de la carcinogénesis. Los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en una base crítica de la secuencia del ADN (Tiskow. 1996).

Considerando lo referido anteriormente, es importante resaltar que hay diversidades de plantas, flores y frutos que poseen capacidad antioxidante, aportando componentes metabólicos secundarios de naturaleza fenólica, denominados polifenoles. Los fenoles, especialmente los flavonoides (Figura 1) y los antocianos, muestran una gran capacidad para captar radicales libres causantes de estrés oxidativo, atribuyéndose a su vez un efecto beneficioso en la prevención de enfermedades cardiovasculares, cancerígenas y neurológicas, además poseen actividades anti-inflamatorias como la Quercetina y Apigenina (Figura 2), antialérgicas, antitrombóticas y antimicrobianas (Harborne y Williams. 1992).

La capacidad antioxidante del reino vegetal ha sido motivo de esta investigación, en el caso particular se evaluó la especie *Baccharis latifolia* perteneciente a la familia Asteraceae del Reino *Plantae*. En la familia Asteraceae se ha determinado la presencia de 5,4'-dihidroxi-3,7,8,3-tetrametoxiflavona (ternatina) fue aislada de *Egletesprostrata* (*Plantae: Asterácea*), y la estructura fue elucidada por interpretación de datos espectroscópicos y por comparación con datos reportados para estructuras modelos. Esta flavona exhibió un fuerte efecto antioxidante determinado mediante inhibición de la oxidación del luminol inducida por peróxido de hidrógeno. El grado de inhibición de la oxidación del luminol determinado fue de 85 a 41% a las concentraciones de 53,5 y 1,07 μM de ternatina,

respectivamente, la cual fue considerada fuerte (Salazar, Henríquez, Crescente, Sevcik, D'Suze y Christophersen. 2014).

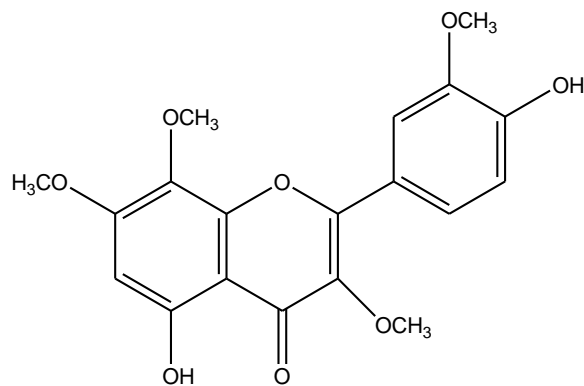


Figura 1. Estructura de flavonoide bioactivo (ternatina)

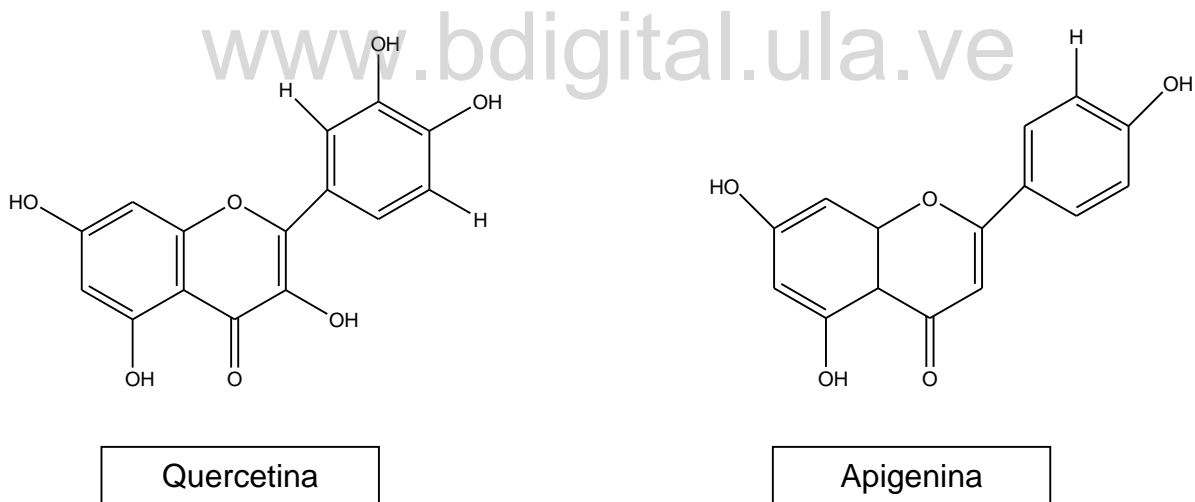


Figura 2. Ejemplos de flavonoides con actividad anti-inflamatoria

Una vez descrita la situación del problema de estudio, los autores elaboraron el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuál será la actividad antioxidante del extracto metanólico en plantas de la especie *Baccharis latifolia*, en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Octubre de 2017 hasta Diciembre del 2019?

Justificación de la Investigación

Es necesario realizar la investigación sobre la actividad antioxidante en la especie *Baccharis latifolia* porque al poseer antioxidantes, éstos actúan sobre los radicales libres que en bajas concentraciones cumplen una importante función en variados procesos homeostáticos como intermediarios en reacciones de oxidación-reducción (redox) esenciales para la vida, pero en altas concentraciones son tóxicos, ya que al oxidar moléculas biológicas las alteran y desencadenan trastornos en el metabolismo celular (Halliwell, 2012).

Los autores seleccionaron este tema de investigación considerando que plantas herbáceas, como en el caso de la especie *Baccharis latifolia*, perteneciente a la familia Asteraceae son conocidos por la presencia de compuestos fenólicos, sin embargo, en el continente no se le da uso comercial a pesar de su gran potencial antioxidante.

Teniendo en cuenta las relaciones entre la especie y la actividad antioxidante, es importante realizar esta investigación, ya que estimula a conocer los distintos metabolitos y medir su capacidad antioxidante. Es decir, para estudiar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios que se obtendrán en el extracto de la especie. En tal sentido es importante también observar la capacidad secuestrante de los metabolitos secundarios obtenidos del extracto metanólico de la especie contra algunos patrones de referencia como ácido ascórbico para su identificación.

Objetivos de la investigación

Objetivo General

Evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico de la especie *Baccharis latifolia* en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Octubre de 2017 hasta Diciembre de 2019.

Objetivos Específicos

- ✓ Realizar extracción metanólica de la especie *Baccharis latifolia* por el método de maceración a temperatura ambiente usando metanol como solvente
- ✓ Identificar cualitativamente los componentes químicos del extracto por el método de Tamizaje fitoquímico
- ✓ Ensayar la actividad antioxidante a través del método ABTS
- ✓ Determinar la concentración de flavonoides totales y fenoles totales

Alcances de la Investigación

El alcance de una investigación se relaciona con la profundidad del conocimiento sobre el fenómeno de estudio. Establece la visión que posee el investigador para lograr los objetivos. Del alcance depende la estrategia de investigación, así, el diseño, los procedimientos y otros componentes del proceso serán distintos en estudios con alcances descriptivo, exploratorio, correlacional (Hernández, Fernández y Baptista, 2010).

La profundidad que se quiere alcanzar es evaluar la correspondencia entre la actividad antioxidante y los metabolitos secundarios presentes en *Baccharis latifolia*. El criterio de estudio estuvo representado por técnicas

fitoquímicas donde el material vegetal se secó y pulverizó para luego macerarlo en un solvente adecuado y a partir de dicho solvente obtener metabolitos secundarios. A lo largo de la investigación se evaluó la actividad antioxidante de la especie.

Limitaciones de la Investigación

Para el desarrollo de esta investigación se presentaron algunas limitaciones tales como los recursos y obtención de material de trabajo debido a sus altos costos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRIO

Trabajos Previos

Guzmán (2018), publicó un trabajo de investigación titulado “Efecto de los compuestos fenólicos totales del extracto etanólico de *Baccharis genistelloides* sobre *Streptococcus mutans*” el cual se basó en la Medicina Tradicional Complementaria (**MTC**), concebida para ayudar a los países a determinar la mejor manera de promover la salud y proteger a los usuarios que desean recurrir a estos productos. Con la finalidad de buscar una alternativa para el control del crecimiento de los microorganismos patógenos, investigó la actividad antimicrobiana de las plantas del género *Baccharis* utilizando extractos apolares y polares de las especies *B. latifolia*, *B. genistelloides*, *B. obtusifolia*, *B. papillosa*, *B. santelicensis*, sobre cepas de *Candida albicans*; observando actividad inhibitoria en los extractos de *B. latifolia*. Los extractos provenientes de las hojas, presentaron un mayor contenido y capacidad antioxidante debido a que los fenoles y flavonoides se encuentran principalmente en la epidermis de las hojas. Una revisión de la literatura sobre la evaluación de los extractos de plantas del género *Baccharis* y los metabolitos secundarios aislados, reveló que muchos estudios sobre sus actividades se han llevado a cabo en los últimos años. Como es el caso del análisis fitoquímico preliminar de las hojas de *B. decusata*, el cual mostró la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, esteroides y triterpenos; donde se encontró que el extracto metanólico crudo y las fracciones de éter de petróleo mostraban actividad antiinflamatoria.

Calle, A, San Martín, A, Melgarejo, M, Flores, Y y Almargo, G. (2017) publicaron un trabajo de investigación titulado “Evaluación del flavonoide y la actividad antibacteriana de cinco especies de *Baccharis* de Bolivia” el cual se basó en el análisis de cinco especies usadas en medicina tradicional (*B. latifolia*, *B. papillosa*, *B. tola*, *B. pentlandii* y *B. boliviensis*) por espectroscopia UV/V y HPLC (Cromatografía líquida de alta eficacia, por sus siglas en inglés) para determinar el contenido de flavonoides. Inicialmente, determinaron el contenido de flavonoides totales, utilizando el método colorimétrico de cloruro de aluminio y empleando como patrón de referencia la Luteolina, mostrando en el extracto de las hojas de *B. latifolia* un alto contenido de flavonoides totales (8,03 mg FT eq Lu/g de hojas). De igual manera los estudios indicaron que el método de extracción utilizado proporcionó extractos con alta concentración de flavonoides entre 53,06 y 85,86 mg FT eq Lu/g de extracto etanólico. Por otra parte, los perfiles cromatográficos obtenidos por HPLC mostraron que el extracto de *B. latifolia*, contiene un mayor contenido de metabolitos secundarios en comparación con los encontrados en el extracto de *B. pentlandii*.

Loja, B, Alvarado, A, Salazar, A, Ramos, E y Jurado, B. (2017), publicaron un trabajo de investigación titulado “Cribado fitoquímico de *Baccharis latifolia* (R&P.) Pers. (Chilca)” el presente trabajo tuvo como objetivo identificar metabolitos secundarios de interés medicinal en las hojas de *B. latifolia*. El tamizaje fitoquímico evaluó la presencia de los siguientes metabolitos: alcaloides, fenoles, flavonoides, carbohidratos, aminoácidos y lípidos. Los metabolitos detectados con alta presencia fueron los fenoles (+++) para todos los extractos, excepto en el extracto hexánico; asimismo, se evidenció la presencia de flavonoides (+++) y alcaloides (+++) en el extracto acidulado. Igualmente, se comprobó la existencia de carbohidratos en todos los extractos excepto en el extracto apolar, sin detectar la presencia de otros metabolitos primarios.

Guerra, P. (2016), publicó un trabajo de investigación titulado “Evaluación de la actividad antioxidante Bioautográfica de dos variedades de aceites esenciales andinos *Clinopodium nubigenum* (Kunt) y *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.)” En la misma, determinó la actividad antioxidante de los aceites esenciales de las especies en estudios, los cuales fueron obtenidos por hidrodestilación. La capacidad captadora de radicales libres fue evaluada por los métodos 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés) y ácido 2,2'-azino-bis-(3- etilbenzo-tiazolina-6 sulfónico) (ABTS, por sus siglas en inglés). El análisis e identificación química de ambos aceites realizado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés), permitió determinar en el aceite de *Clinopodium nubigenum* al menos 55 compuestos, encontrándose en mayor proporción acetato de carvacrol (42,17%), carvacrol (20,66 %), pulegona (6,3%), timol (5,54%) y *p*-cimeno (5,2%). Por su parte, en el aceite esencial de *Baccharis latifolia* identificaron 19 compuestos, entre los cuales se destacan α -felandreno (18,11%), limoneno (17,04%), y andro enecalinalol (5,41%). De los aceites en estudio, *Clinopodium nubigenum* presentó una actividad antioxidante significativa similar al del aceite esencial de *Thymus vulgaris* usado como sustancia de referencia; por otra parte, el efecto secuestrante en el aceite de *Baccharis latifolia* fue moderada.

Prada, J. (2015), publicó un trabajo de investigación titulado “Análisis metabolómico de la especie *Baccharis latifolia* (Asteraceae) en la sabana de Bogotá” en esta investigación a partir del extracto etanólico de hojas, tallos, frutos y flores de la especie *B. latifolia* (Asteraceae) colectada en diferentes lugares, se estableció el perfil químico mediante la cuantificación de fenoles y flavonoides y la capacidad antioxidante (DPPH y FRAP). Se realizó un análisis TLC con el revelador Vainillina con el fin de detectar principalmente terpenoides. De igual forma, tales extractos se analizaron por HPLC-MS para estimar el número de metabolitos secundarios detectables presentes en cada órgano de la planta. El análisis cuantitativo mostró que existe una alta

correlación entre los fenoles y flavonoides con el reactivo FRAP (ccP de 0,84 y 0,76, respectivamente). Con TLC se identificaron 22 compuestos en total, 20 en hojas, 12 en tallos, 11 en flores y 4 en frutos. Con HPLC-MS se detectaron 36 compuestos en total, 36 en hojas, 28 en tallos, 17 en flores y 4 en frutos. Se realizó una identificación tentativa y se encontraron 22 flavonoides, 10 alcaloides, 3 terpenoides y 1 lignano. Finalmente se discriminó mediante análisis OPLS-DA supervisado con FRAP y DPPH y PCA con HCA identificando diferencias y similitudes entre las muestras. En conclusión *B. latifolia* es una planta bastante versátil, mostró cambios en su metaboloma dependiendo del lugar, estado fenológico, composición química, condiciones de la planta y su entorno, ya sea produciendo o no ciertos compuestos que le ayudan a subsistir en tales entornos, como lo son los flavonoides.

Antecedentes Históricos

El estudio con las plantas de la familia Asteraceae se inició en el año 300 a.C. Ya que fue Teofrasto (372- 288 a.C.) quien las describió en su obra de historia plantarum. No obstante, la familia fue fundada con el nombre de Compositae por Paul D. Giseke en 1792. El Código Internacional de nomenclatura botánica permite también el uso del nombre *Asteraceae Dumortier*, nombre asignado en 1822 y que deriva del género tipo, Aster, término que significa estrella y hace alusión a la forma de la inflorescencia (Katinas, 2007). Las contribuciones más importantes al conocimiento y la sistemática de las Asteraceae comienzan con el francés Henri Cassini a través de numerosas publicaciones durante el período de 1812 a 1831, que incluyen descripciones muy detalladas de su morfología.

Otro gran contribuyente al conocimiento de la familia fue George Bentham (1873), quien las describió, junto con Joseph Dalton Hooker, en su monumental obra *Genera Plantarum* (1862-1883). Por su parte, Bentham fue quien estableció 13 tribus, que son las tradicionalmente usadas en la actualidad. En Argentina, el gran botánico español Ángel Lulio Cabrera (1908-1999) fue quien marcó los estudios en esta familia de plantas. Cabrera y autores subsiguientes se basaron en la clasificación de Bentham (1873) para el tratamiento de Asteraceae en las floras locales. En su clave para la determinación de géneros de Asteraceae de Argentina, Cabrera (1961) considera dos subfamilias: Tubuliflorae y Liguliflorae con las tribus *Anthemideae*, *Arctotideae*, *Astereae*, *Calenduleae*, *Cynareae*, *Eupatorieae*, *Helenieae*, *Heliantheae*, *Inuleae*, *Mutisieae*, *Senecioneae* y *Vernonieae*, para la primera y la tribu *Cichorieae* para la segunda. Ésta familia incluye una cantidad de especies útiles desde diversos puntos de vista, las cuales, han ayudado al progreso y sustento de un gran número de pueblos en todo el mundo, satisfaciendo sus necesidades de alimento, forraje, leña, medicinas, entre otros.

Desde el punto de vista económico, unas 40 especies tienen importancia directa en la alimentación humana (hortalizas y semillas oleaginosas) e indirectamente por productos obtenidos por la industria. Otras especies silvestres, tienen potencial nutricional, así como son de interés tecnológico, debido a la cantidad de metabolitos secundarios de uso farmacéutico. Además, numerosas especies tienen un rol destacado en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas (Vitto y Petenatti. 2009).

El conocimiento fitoquímico de la familia Asteraceae ha aportado datos relevantes a la taxonomía y ha explicado o facilitado el empleo de las mismas en las actividades económicas (Vitto & Petenatti, 2009). En general, el grupo está caracterizado por la presencia de ácidos iso- y clorogénico, flavonoides, lactonas quiterpénicas, alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales, alcaloides (Aniszewski. 2007) y diversos derivados acetilénicos,

mientras que carecen de taninos y de iridoides (Bohlmann, 1982), lo que ubica a la familia como una de las más ricas en metabolitos secundarios. Es importante mencionar, la presencia de dos grupos de sustancias que son consideradas como marcadores quimiotaxonómicos para la familia: las lactonas quiterpénicas y los compuestos poliacetilénicos (Bohlmann. 1982; Harborne. 1992).

Bases Teóricas

Ensayos Fitoquímicos

La fitoquímica es la ciencia que tiene como objeto el aislamiento, análisis, purificación, elucidación de la estructura y caracterización de la actividad biológica de diversas sustancias producidas en las plantas. Los ensayos fitoquímicos son de tipo cualitativo permiten la identificación de drogas y el reconocimiento de falsificaciones, se caracterizan principalmente metabolitos secundarios. Los metabolitos primarios son importantes para la vida del vegetal como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, hormonas, mientras que los metabolitos secundarios no cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales tales como los alcaloides, glicósidos, resina, entre otros (Bruneton. 2001).

Tamizaje Fitoquímico

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de sustancias químicas presentes en una planta, lo que permite orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los metabolitos secundarios de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la aplicación de diversas pruebas de reacciones de color y precipitación. Las mismas, permiten la evaluación rápida,

con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y debe interpretarse en conjunto con los resultados del screening farmacológico. El screening fitoquímico proporciona datos preliminares sobre los constituyentes químicos que, junto con los resultados del tamizaje pueden orientar la continuación de los estudios (Sharapin. 2000).

Extracto Metanólico

El extracto metanólico es el resultado obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración en contacto con metanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico. Este proceso es sometido a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. Es una extracción que se realiza a temperatura ambiente, consiste en remojar el material vegetal, debidamente fragmentado en un solvente adecuado, bien sea agua o metanol, se prefiere el metanol puesto que a largos tiempos de extracción el agua puede propiciar la fermentación o la formación de mohos hasta que éste penetre y disuelva las porciones solubles. Se puede utilizar cualquier recipiente con tapa, que no sea atacado por el disolvente; colocándose el material vegetal junto con el disolvente, para luego dejar en reposo durante un período de 15 días. Luego se filtra el líquido, exprime el residuo y recupera el solvente en un rota vapor, para obtener el extracto (González. 2014).

Maceración

El proceso de maceración consiste en colocar la planta en contacto con el solvente, durante varios días. Ocurre un proceso dinámico, que proporciona un equilibrio de concentración entre las sustancias presentes en la planta y el solvente de extracción, el mismo depende de factores inherentes a la planta

como, por ejemplo, naturaleza y el tamaño de la partícula, contenido de humedad, así como, factores que están relacionados con el solvente, como la selectividad y la cantidad (Pardo, Navarro y Oliva. 1994).

Procedimiento de la extracción por maceración

Se corta el material fresco en pequeños trozos para favorecer una buena extracción, dejándose en maceración con un volumen equivalente al 85% del solvente de extracción durante al menos 20 días; agitando diariamente para obtener un mayor rendimiento. Posteriormente el residuo se filtra adicionando una cantidad suficiente de solvente, luego se prensa y se completa el volumen final que se pretende obtener. Finalmente se deja en reposo durante 48 horas, para después filtrar y almacenar la tintura adecuada (Sharapin. 2000).

Extracción continua con soxhlet

La extracción Soxhlet es la técnica de separación sólido-líquido comúnmente usada para la determinación del contenido graso en muestras de diferente naturaleza. Aunque su campo de aplicación es fundamentalmente el agroalimentario, es también de utilidad en el área medioambiental, siendo recomendado como método de análisis para la determinación del aceite y la grasa total recuperable en aguas de vertidos industriales, permitiendo la determinación de hidrocarburos relativamente no volátiles, aceites vegetales, grasas animales, ceras, jabones y compuestos relacionados (Pavia, Lampman y Kriz. 1978).

Antioxidantes

Son sustancias que se encuentran presentes en las plantas, frutas y seres vivos en bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, los cuales, retardan o previenen la oxidación de estos sustratos. Los

antioxidantes se usan para prevenir y mantener su valor nutricional, también para proteger al cuerpo de daños causados por las especies reactivas del oxígeno. Son conocidos por actuar a diferentes niveles en moléculas lipídicas, disminuyendo la concentración de oxígeno y previendo su reacción (Balsano y Alisi. 2009).

Mecanismo de Acción de los Antioxidantes

Los antioxidantes regulan la velocidad de reacción de oxidación en los lípidos, los cuales interfieren con el proceso de oxidación por diferentes mecanismos. Estos involucran la inactividad de los pro-oxidantes en el medio y retrasan el inicio de la oxidación y la extensión del periodo de inducción. Los antioxidantes donan un átomo de hidrogeno o un electrón a los radicales libres, formados en los ácidos grasos insaturados, lo que derivan en productos más estables (Balsano y Alisi. 2009).

Clases de Antioxidantes

Los antioxidantes han sido clasificados dentro de 6 tipos según Frankel, en un estudio realizado en 1995, definiendo cada los mismos en:

Antioxidantes Primarios: Son compuestos que neutralizan a los radicales libres, entre los cuales se encuentran butilhidroxianisol, butilhidroxitolueno y el ter-butilhidroxiquinona. Estos antioxidantes al mezclarse potencia su actividad antioxidante en mayor proporción que cuando actúan de manera individual.

Atrapantes de Oxígeno: son compuestos que remueven el oxígeno de los sistemas cerrados, un ejemplo representativo es el ácido ascórbico y sus derivados, los cuales actúan como sinergistas en la regulación de los antioxidantes primarios.

Antioxidantes Enzimáticos: incluyen varias enzimas como a la glucosa oxidasa, la catalasa, entre otras; las mismas actúan removiendo el oxígeno de los compuestos altamente reactivos.

Agentes Quelantes: son compuestos secuestrantes de iones de complejos metálicos como el cobre o el hierro, que catalizan la oxidación lipídica. Los mejores antioxidantes de este grupo son compuestos fenólicos que se encuentran en las plantas (ácido cítrico).

Antioxidantes Misceláneos: son los minerales presentes en las plantas y animales, estudiados como antioxidantes en aceites de origen vegetal como olivo, algodón, germen de trigo, entre otros. Los misceláneos han demostrado ser buenos antioxidantes, en este grupo se encuentran los flavonoides y derivados del ácido cinámico.

Antioxidantes Sintéticos: definidos por la Administración de Alimentos y Medicinas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés), como conservadores alimenticios, que retardan específicamente el deterioro o decoloración debido a la oxidación lipídica. Los fenoles son las sustancias más comunes en este grupo (Franklen. 1998).

Radicales Libres

Los radicales libres son aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una alta inestabilidad. Esto lo hace muy inestable, altamente reactivo y de corta vida, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como, con la diversidad de moléculas integrantes de las estructuras celulares, tales como: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros derivados (Halliwell. 2012).

Métodos para determinar la actividad antioxidante In Vivo

Inhibidora del radical catión del ácido 2,2'-azinobis-(3- etilbenzotiazolina)-6 sulfónico (ABTS^{•+})

La metodología descrita por Kuskoski, se fundamenta en la formación del radical ABTS^{•+} tras la reacción de ABTS (7 mM) con persulfato potásico (2,45 mM), incubados a la temperatura 25°C y protegida de la luz durante 16 h. Una vez formado el radical ABTS^{•+} se diluye con etanol hasta obtener un valor de absorbancia comprendido entre 0,70 (±0,1) a 754 nm (longitud de onda de máxima absorción). Las muestras filtradas se diluyen con etanol hasta que se produce una inhibición del 20% al 80%, en comparación con la absorbancia del blanco, tras añadir 20 µL de la muestra. A 980 µL de dilución del radical ABTS así generado se le determina la absorbancia a 754nm a 30°C, se añade 20 µL de la muestra (dilución de antocianos) y se mide de nuevo la absorbancia a 754nm pasado 1 minuto. La absorbancia se mide de forma continua transcurridos 7 minutos. El antioxidante sintético de referencia, Trolox, se ensaya a una concentración de 0-15 µM (concentración final) en etanol, en las mismas condiciones, lo que se hace también con el ácido ascórbico (0-20 mg/100 mL). Los resultados se expresan en TEAC (actividad antioxidante equivalente a Trolox). (Kuskoski. 2005).

Familia Asteraceae

La familia Asteraceae, según Bercht y Presl (1820), corresponde al orden Asterales, suborden Asteridae, caracterizada por sus inflorescencias racimosas en capítulos, con flores individuales epíginas rodeadas de una o varias hileras de brácteas involucrales, sobre el receptáculo común en que remata el escapo o rama florífera (Weberling. 1989). En muchas regiones del

mundo las Compuestas llegan a integrar hasta el 10% de la flora vernácula. Se estima su riqueza en aproximadamente 25.000 especies y más de 1.500 géneros (Freire e Iharlegui, 2000). Entre los géneros más importantes de la familia Asteraceae se encuentra el *Senecio* (1.250), *Vermonia* (1.000), *Cousinia* (650), *Eupatorium* (600), *Centauria* (600), *Artemisia* (550), *Baccharis* (500) (Verdi, Costa y Pizzolatti. 2005).

Género *Baccharis*

El género *Baccharis*, son Frútices o árboles de hasta 6 metros de altura, con ramas terminales estriadas, glabras, glandulosas, más o menos viscoso-resinosas. Hojas alternas subcoriáceas, pecíolos de 3 a 8 mm de longitud, complanados y con la base engrosada formando una pequeña vaina; lámina oblongo-elíptica o sublanceolado-elíptica, atenuado-cuneada hacia la base, súbitamente atenuado-aguda hacia el ápice, margen serrulada en la mitad superior, triplinervia de 2 a 6,5 cm de longitud entre 0,8 a 2,4 cm de altura, con puntos glandulosos en ambas caras, viscosa, más o menos brillante y con el nervio medio y los nervios laterales algo conspicuos por el haz, opaca, con el nervio medio, los nervios laterales ascendentes y conspicuos y el retículo prominulo por el envés (Vivas y Ubierno. 2010).

Descripción Botánica de la especie *B. latifolia*

Descripción botánica de la especie *B. latifolia*; Es un arbusto que alcanza una altura de 1,5 a 3 metros. Posee hojas simples alternas, con peciolo de 1,5 a 2 cm de largo, oblongo-lanceolada, de apice acuminado, base cuneiforme, uniformemente aserrada en la margen, (Velásquez 2007), de color verde brillante por el haz, pegajosas y con tres nervios pronunciados que salen desde la base. Las hojas sirven como una característica importante para diferenciarlas taxonómicamente (Hoyos y Yep. 2008). Las ramas son

delgadas, glabras y resinosas (Velásquez 2007). La inflorescencia es blanquecina paniculada, terminal y ramificada (Hoyos y Yep 2008), los capítulos son numerosos dispuestos en los ápices de las ramas. Su involucreo o umbrela es acampanado, las brácteas en tres o más hileras o series de borde hialino (Transparente) (Velásquez 2007). Presenta numerosas flores con corola filiforme; aquenios oblongos, vilano blancuzco de aproximadamente 1,2 mm de largo. Los frutos son de tipo aquenios de color café de 4 a 5 mm de longitud (Hoyos y Yep 2008) y glabros (Velásquez. 2007).

Definición de Términos Básicos

Fitoquímica: la fitoquímica es una especialidad que deriva de la farmacognosia que se dedica al estudio químico de las plantas medicinales. La misma tiene una gran importancia en la determinación de los componentes activos de las plantas medicinales, su cuantificación y análisis de los efectos beneficiosos y perjudiciales para la salud humana (Bruneton. 2001)

La Fitoquímica trata sobre los métodos de obtención de los componentes activos, su clasificación de acuerdo al grupo funcional químico orgánico a la que pertenece, además, estudia los procedimientos analíticos para comprobar su calidad (Domínguez. 1973).

Reacciones de óxido reducción: una reacción de óxido-reducción se caracteriza porque hay una transferencia de electrones, en donde, una sustancia gana electrones y otra sustancia pierde electrones:

En ese sentido, la sustancia que gana electrones, disminuye su número de oxidación y se reduce se le denomina agente oxidante; por su parte, la sustancia reductora es aquella que pierde electrones, aumenta su número de oxidación y se oxida (Zumdahl, Muradás, Bosque y Ortega. 1992).

Plantas ginodioicas: se denominan a la población de plantas poligámicas, en la que unos individuos poseen flores femeninas y la otra

porción presentan flores unisexuales masculinas y femeninas o flores hermafroditas (Güemes. 2001).

Cáliz: conforma la cubierta externa de la flor, está constituido por hojas transformadas llamadas sépalos, que por lo general son de color verde y sirven para proteger a las demás piezas florales. La corola consiste en un número determinado de pétalos, según la especie. Los pétalos son también hojas transformadas, aunque por su color, diseño y forma resultan visualmente muy diferentes de las hojas y su función es la de atraer a los polinizadores (Font. 1953).

Androceo: es el conjunto de órganos masculinos en la flor, denominados estambres que también reciben el nombre de micrófilos. El estambre es la parte de la flor que produce el polen, y está diferenciado en dos partes, una estéril, el filamento, y una fértil, la antera (Font. 1953).

Terófitas: plantas que completan todo su ciclo de desarrollo durante la estación favorable, siendo de periodo anual y que pasan a la estación desfavorable en forma de semilla (Rodríguez. 1991).

Hemicriptófitas: plantas herbáceas con las yemas de recambio en la superficie del suelo o inmediatamente debajo. Pueden ser cespitosos, rosulados, erectos, trepadores (Rodríguez. 1991).

Corola: es la parte más interna de la envoltura floral y por tanto la más próxima a los órganos reproductores. Está formada por un número variable de piezas, llamadas pétalos, que por lo general carecen de clorofila y presentan una coloración variable (Font. 1953).

Operacionalización del Evento

Tabla 2.-Operacionalización del evento de estudio “Actividad antioxidante”.

1. Evento	2. Definición conceptual ¿Qué es?	3. Definición Operacional ¿Qué se mide?'
El evento de estudio de esta investigación será la capacidad antioxidante.	Son sustancias que están presentes en frutas, vegetales o en el cuerpo en bajas concentraciones comparadas con las de un sustrato oxidable, retardan o previenen la oxidación de estos sustratos. Los antioxidantes se usan para prevenir y mantener su valor nutricional, también para proteger al cuerpo de daños causados por las especies reactivas del oxígeno. Son conocidos por actuar a diferentes niveles en moléculas lipídicas, disminuyendo la concentración de oxígeno y previendo su reacción (Decker y cols 2005).	Se realizará la investigación a partir de la evaluación de un extracto metanólico por medio de técnicas fitoquímicas.
4. Dimensiones	5. Indicadores	
Capacidad secuestrante de los metabolitos secundarios.	Presencia o ausencia de la capacidad antioxidante.	

Navas, Rodríguez, Arias (2012) Hernández y cols (2010)

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación

Hurtado (2010) refirió que el tipo de investigación tiene relación con la interrogante de estudio, en la cual se resalta lo que se quiere saber, pues esto marca el logro general que se desea conseguir durante el proceso, identificar el tipo de investigación. En consecuencia, el verbo a utilizar en el objetivo tiene que implicar un logro. Específicamente, en esta investigación se quiere evaluar la actividad antioxidante de los metabolitos secundarios que se obtendrán en el extracto metanólico de la especie *Baccharis latifolia*, en función de un periodo y contexto determinado, por lo tanto, se puede decir que esta investigación es de tipo evaluativa.

Diseño de Investigación

La estrategia que se implementará para recolectar los datos, en un proceso de investigación constituye el diseño (Hurtado, 2010). De tal manera, esta investigación se basa en un diseño experimental, ya que los datos del evento de estudio se recolectaron en el lugar donde ocurrió el fenómeno, específicamente en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Con respecto al tiempo de recolección de datos, esta investigación debe ser contemporánea, debido a que se recolectaron durante el tiempo estipulado para el desarrollo del trabajo.

Población y Muestra

Unidad de Estudio

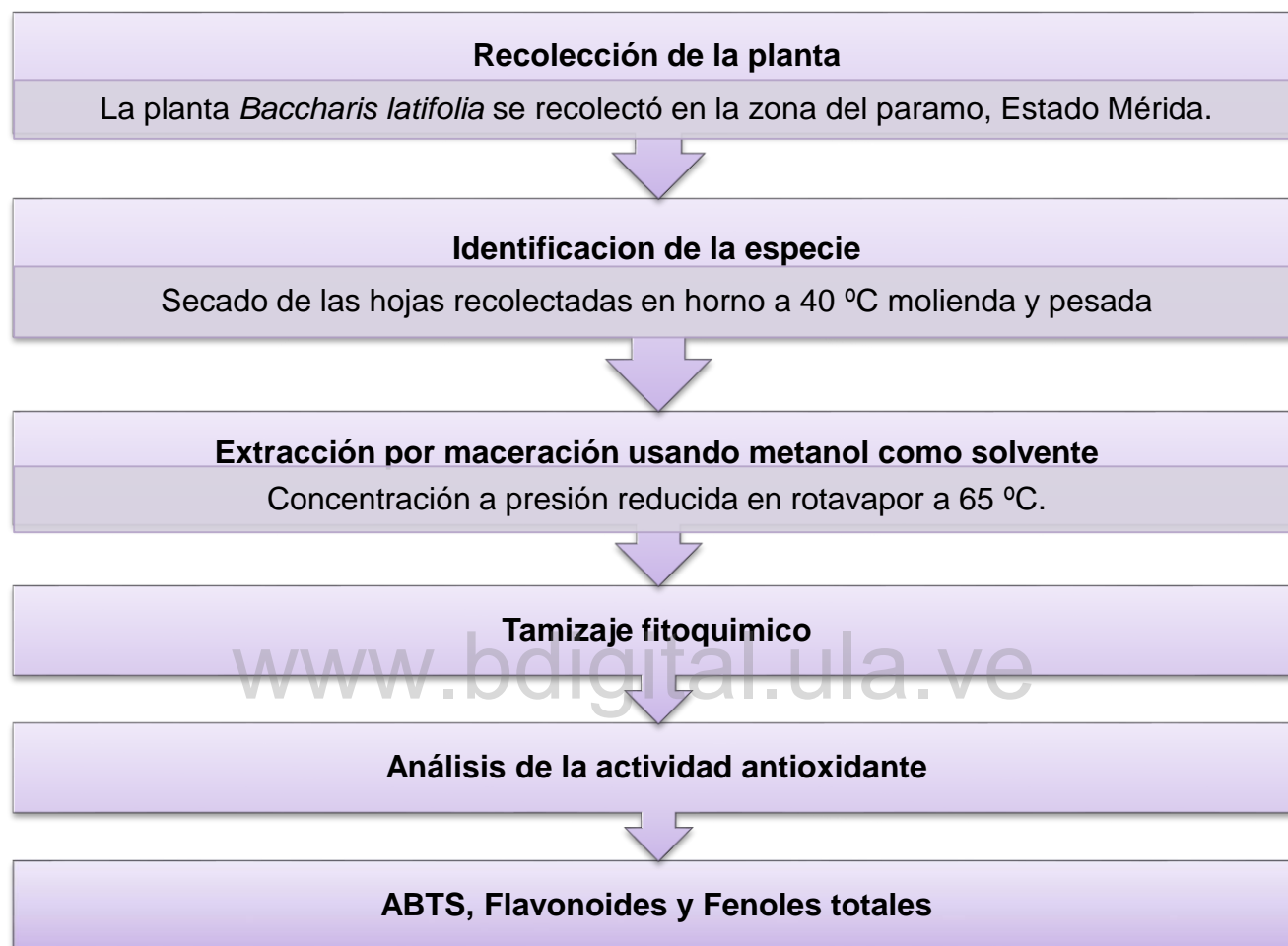
Hernández, Fernández y Baptista (2010), refirieron que una población es el conjunto de todos los casos que concuerdan con una serie de especificaciones. La población conduce hacia el conjunto finito o infinito de elementos que presentan características comunes con el fenómeno que se investiga. En base a lo antes expuesto, la población estudiada es finita, integrada por el género *Baccharis latifolia* que se recolectó en el estado Mérida, en el Collado del Cóndor, a 20 km de la población de Piñango, dicha especie se evaluó en el Laboratorio B “Antonio Morales”, Instituto de Investigación de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Octubre de 2017 hasta Diciembre de 2018.

Instrumento de Recolección de Datos

Los instrumentos que se utilizarán para la obtención de la información deberán ser validados por los expertos, con el objetivo de determinar la validez del contenido. De hecho, se estima que la validez constituye el procedimiento que permite determinar la consistencia interna de los instrumentos en cuanto a que midan lo que se propone cuantificar, de ahí, se dice que la validez, se refiere al grado en que un instrumento realmente mida la variable según Hernández y cols (2010).

Metodología de la Investigación

Tabla II. Metodología de la investigación



Estudio de la capacidad antioxidante

Con los instrumentos aplicados, se podrá determinar ciertos patrones con el evento de estudio, referido al género *Baccharis latifolia*. Permitirá conocer la relación de la capacidad antioxidante del género con los patrones de referencia, tales como: Trolox y antioxidantes comerciales.

Búsqueda de la especie

Recolección de las Especies Botánicas

La especie *Baccharis latifolia* se recolectó en el Collado del Cóndor, a 20 km de la población de Piñango, estado Mérida, ubicado a 4118 msnm.

Determinación Taxonómica de la Planta

Una muestra representativa de *Baccharis latifolia* fue entregada al Profesor Pablo Meléndez para su correspondiente identificación y clasificación botánica, posteriormente un *voucherspecimen* se depositó en el Herbario “Dr. Luis Ruíz Terán”, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes en Mérida, Venezuela.

Selección, División y Preparación del Material Vegetal

El material vegetal recolectado se seleccionó con la finalidad de eliminar impurezas y partes en descomposición (tallos, hojas y frutos). Luego esta muestra se destinó para la preparación del extracto metanólico.

Secado, Molienda y Pesada del Material Vegetal

El material vegetal reservado para la obtención del extracto de *Baccharis latifolia*, se secó en un horno eléctrico ubicado en el herbario “Dr. Luis Ruíz Terán”, a temperatura no superior a 40 °C, durante al menos 72 horas. Transcurrido este tiempo, se verificó que la muestra se encontraba libre de humedad y quebradizas al tacto, para luego realizar un proceso de molienda por separado, para obtener un tamaño de partícula que pueda traspasar un

tamiz de malla número 20. La muestra se pesó, envasó, rotuló y colocó en un lugar seco y fresco.

Extracción por Maceración del Material Vegetal

El material vegetal seco y molido de *Baccharis latifolia* fue sometido a extracción por maceración en frío, usando como solvente metanol, durante un periodo de 10 días dividido en dos ciclos. Ésta técnica de extracción sólido-líquido, consiste en colocar la muestra en un envase con tapa, junto con el solvente orgánico hasta lograr la saturación del mismo y luego ser sustituido, a los 5 días por un nuevo volumen de solvente (Lavabre. 1995). El mismo se realizó en el Laboratorio C de Productos Naturales “Antonio Morales” del Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Profesor Alexis Buitrago.

Filtración del Extracto Metanólico

Al culminar el período de maceración, se procedió a la filtración por gravedad. Procedimiento que consistió en utilizar un embudo cónico que contenía un papel de filtro con tamaño de poro adecuado, lo que permitió en forma simultánea retener la muestra sólida y dejar fluir el extracto metanólico.

Concentración y Obtención del Extracto Crudo

El extracto obtenido para *Baccharis latifolia*, se concentró destilando el metanol a presión reducida, mediante el uso de un rotavapor, a presión reducida, a una temperatura no superior a los 40-50 °C. El producto seco obtenido fue pesado y rotulado.

Tamizaje Fitoquímico

El estudio fitoquímico preliminar del extracto orgánico de *Baccharis latifolia*, se realizó con el propósito de identificar en forma cualitativa la presencia de ciertos metabolitos secundarios, tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glucósidos cardiotónicos, taninos y mucilagos. Los diferentes procedimientos de análisis colorimétricos y cromatográficos reportados en la literatura se realizaron como se describen a continuación.

Alcaloides

Las técnicas de identificación de alcaloides se basan en la formación de una sal doble insoluble al hacer reaccionar la muestra con compuestos que contienen mercurio, oro, bismuto, yodo o platino. En la Tabla N° 3 se especifican los diferentes reactivos disponibles para la identificación de alcaloides (Tiwari, 2011).

Tabla N° 3 Identificación de Alcaloides

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Wagner	Solución de Yodo y yoduro de potasio	Se disolvió una porción del extracto en 2 mL de HCl al 5 %. Luego, se agitó, filtró y se tomó una alícuota, para adicionarle gotas del reactivo. La presencia de un precipitado rojo pardo, blanco amarillento o anaranjado; indica la positividad de la prueba
Mayer	Cloruro de mercurio y yoduro de potasio	
Hager	Solución saturada de ácido pícrico	
Dragendorff	Nitrato de bismuto pentahidratado y yoduro de potasio	

Antraquinonas

Las antraquinonas son compuestos hidroxilados que proporcionan una coloración rojiza característica de la reacción en medio acuoso alcalino, producto del estado de resonancia de los grupos OH fenólicos. Para el caso de los glicósidos, es necesario realizar una hidrólisis para separar el aglicon empleando un solvente orgánico (tolueno o benceno). En la Tabla N° 4 se presentan algunas reacciones de identificación (Tiwari, 2011).

Tabla N° 4 Identificación de Antraquinonas

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Reacción con NH₄OH	Hidróxido de amonio concentrado	Una pequeña porción del extracto se le adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al aparecer una coloración roja en los dos primeros minutos
Reacción con H₂SO₄	Ácido sulfúrico concentrado	Una pequeña porción del extracto se le agregó una gota de ácido sulfúrico concentrado. La formación de una coloración roja indica la presencia de antraquinonas
Reacción de Borntrager	Agua destilada, Hidróxido de potasio al 5 %, cloroformo y peróxido de hidrógeno al 6 %	Una pequeña porción del extracto se diluyó en 3 mL de agua destilada y luego se filtró. Al líquido filtrado se le añadió 3 mL de hidróxido de potasio al 5 % y se calentó hasta ebullición por 3 minutos, una vez fría la solución se realizó una extracción con 3 mL de cloroformo. Se eliminó la fase acuosa y a la fracción clorofórmica se le adicionó 2 mL de hidróxido de potasio al 5 %. Un color rojo indica la presencia de benzoquinonas: si es amarillo verdoso, se adicionó una gota de peróxido de hidrógeno al 6 %. Si la coloración cambia a roja se considera positiva la prueba para derivados de antronas
Reacción con benceno	Benceno y solución de amoníaco al 10 %	Una pequeña porción del extracto se mezcló con 1 mL de benceno. Luego se filtró y al líquido resultante se le adicionó, con agitación, 0,5 mL de amoníaco al 10 %. La presencia de un color rosa, rojo o violeta en la fase amoniacal (inferior) indica la presencia de antraquinonas

Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos

Los glicósidos cardiotónicos son compuestos que presentan un núcleo esteroideo con sustituyentes del tipo lactónico (α , β , γ) insaturado. De igual

manera, presenta una porción glicosídica, sensible a la hidrólisis en medio ácido. En la Tabla N° 5 se presentan las reacciones de identificación para este tipo de compuestos (Tiwari, 2011).

Tabla N° 5 Identificación de Glicósidos y Glicósidos cardiotónicos

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Reacción con hidróxido de sodio	Solución de Hidróxido	A una pequeña porción de los extractos se le adicionó una gota de hidróxido de amonio concentrado. Se considera positiva la prueba para antraquinonas al aparecer una coloración roja en los dos primeros minutos
Keller–Killiani	Ácido sulfúrico concentrado, ácido acético glacial y tricloruro de hierro	Se disolvió los extractos en el reactivo de Keller. Se Adicionó gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. Un anillo de color marrón en la interfaz indica la presencia de azúcares 2-desoxigenadas
Reacción de Legal	Piridina, nitroprusiato de sodio al 5 % e hidróxido de sodio 2 N	Se agregó 2 o 3 gotas de piridina a los extractos, se adicionó una gota de solución de nitroprusiato de sodio al 5 %. Finalmente se añadió 3 gotas de NaOH 2 N. La aparición de un color rojo intenso indica la presencia de lactonas α , β -insaturadas

Triterpenoides y Esteroides

Este grupo de compuestos son derivados principalmente por el epoxiescualeno; presentan un grupo hidroxilo en el carbono número tres que permite la unión a varias moléculas glucosídicas, lo que deriva en la formación de estructuras heterosídicas, siendo las de mayor abundancia en la naturaleza las del tipo triterpeno y esteroideo. Algunas pruebas de coloración son presentadas en la Tabla N° 6 (Tiwari, 2011).

Tabla N° 6 Identificación de Triterpenoides y Esteroides

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Reacción de Lieberman Bouchard	Ácido acético glacial y ácido sulfúrico concentrado	Una porción del extracto se le añadió 2 gotas de CH ₃ COOH anhidro y se esterificó con 2 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. La formación en la interface de un color azul o verde indica la presencia de esteroides, mientras que un color amarillo anaranjado hasta pardo, evidencia la presencia de triterpenoides
Reacción de Rosenthaler Vainillina Triterpenoides	Vainillina y ácido sulfúrico concentrado	A una pequeña porción del extracto se le adicionó 2 gotas del reactivo Rosenthaler, luego 2 gotas de H ₂ SO ₄ concentrado. La formación en la interface de un color violeta mostró la presencia de saponinas triterpenoides
Prueba de Salkowski (Esteroides)	Ácido sulfúrico concentrado	Se disolvió 100 mg del extracto seco en 2 mL de cloroformo, se adicionó cuidadosamente 2 mL de H ₂ SO ₄ hasta formar una doble fase. La formación de un color marrón rojizo en la interface indica la presencia de un anillo esteroideo
Prueba de Komarowsky	A: 25 mL de 4-hidroxibenzaldehído en etanol al 2 % B: 5 mL de ácido sulfúrico y etanol 1:1	Se disolvió el extracto en metanol, para realizarle TLC usando el reactivo de Komarowsky como revelador, y como fase móvil se utilizó la mezcla cloroformo metanol y agua (70:30:5). La positividad de la prueba se manifiesta con la aparición de una mancha de color rojo para triterpenos y verde para esteroides

Flavonoides

Los flavonoides son compuestos fenólicos diaril-propánicos que presentan en su estructura un anillo A, el cual proviene de la ruta de los policetidos y un anillo B proporcionado por la ruta del ácido shikímico. Estos anillos están unidos por tres carbonos provenientes del fenilpropano. La presencia de grupos hidróxilos en su estructura, favorece, en un medio básico, las reacciones de óxido-reducción, así como también, la formación de complejos con algunos iones metálicos, tales como: el cobre (Cu²⁺), hierro (Fe²⁺), magnesio (Mg²⁺) y zinc (Zn²⁺), entre otros. En la Tabla N° 7 se presentan algunas reacciones de identificación para este tipo de compuestos (Trease y Evans, 2002).

Tabla N° 7 Identificación de Flavonoides

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Reacción de Shinoda	Ácido clorhídrico y virutas de magnesio metálico	El extracto se disolvió en 2 mL de etanol absoluto, se adicionó 2 gotas de HCl concentrado. La formación de una coloración roja indica la presencia de auronas o chalconas. En caso de cambiar la coloración, se colocó un trozo de magnesio metálico, la formación de una coloración naranja a rojo, indica la presencia de flavonas, rojo flavonoles y magenta flavononas
Reacción de Pew's	Polvo de zinc y ácido clorhídrico 5 N	A un tubo con extracto diluido, se le agregó polvo de zinc y unas gotas de HCl 5 N. La formación de una coloración rojo púrpura o rojo cereza indicó la presencia dihidroflavonas, por el contrario si es rosa o café indica la presencia de flavanonas, dihidrochalconas y otros flavonoides
Reacción de hidróxido de sodio	Solución de hidróxido de sodio al 10 %	Al extracto colocado en un tubo de ensayo, se le adicionó 3 gotas de hidróxido de sodio al 10 %, si la reacción es positiva se observa una coloración amarilla a rojo (xantonas y flavonas), café a púrpura rojizo (chalconas) y azul para antocianinas
2-aminoetildifenilborato (2-AEDB)	Solución al 2% en MeOH	Se disolvió una pequeña porción del extracto en una solución al 2 % en metanol, posteriormente se realizará TLC utilizando el 2-AEDB como revelador. La aparición de una fluorescencia amarilla intensa a 365 nm indica la positividad de la prueba

Cumarinas

Las cumarinas son compuestos provenientes de las rutas biosintéticas del shikimato y policétido, presenta como núcleo principal el 2H-1-benzopirano-2-ona, una lactona derivada del ácido O-hidroxicinámico con propiedades fluorescentes bajo la luz ultravioleta. La presencia del anillo lactónico favorece su solubilidad en soluciones hidroalcohólicas de NaOH el cual le confiere una coloración amarilla. En la Tabla N° 8 se describe el procedimiento a utilizar para su determinación cualitativa (Trease y Evans, 2002).

Tabla N° 8 Identificación de Cumarinas

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Reacción con hidróxido de amonio	Etanol e hidróxido de amonio concentrado	A una porción del extracto se le adicionó 0,5 mL de etanol y dos gotas de NH ₄ OH concentrado. La prueba se considera positiva si presenta una fluorescencia azul, verde o amarillo a una longitud de onda de 365 nm

Saponinas

Las saponinas son glicósidos esteroidales con un núcleo espiroetano, que presentan la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos y producir abundante espuma cuando se agitan sus soluciones acuosas. La hidrólisis con ácidos minerales, divide la molécula en carbohidrato y sapogenina con esqueleto esteroideo o triterpenico (Marcano y Hasegawa, 2002). La presencia de saponinas se determina mediante los ensayos que se mencionan en la Tabla N° 9.

Tabla N° 9 Identificación de Saponinas

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Prueba de la altura de la espuma	Agua destilada	En un tubo de ensayo se colocó 1 mL de extracto acuoso, se agitó vigorosamente y se midió la altura de la espuma. Se considera positiva una altura de 8 a 10 mm, estable por 30 minutos
Prueba de Bicarbonato de sodio	Bicarbonato de sodio	A 50 mL del extracto acuoso se le añadió una gota de NaHCO ₃ , se mezcló y agitó vigorosamente durante 3 minutos. La formación de espuma en forma de panal de abeja indica la presencia de saponinas

Taninos

Los taninos son compuestos químicos de carácter fenólico con alto peso molecular, que forman con el agua soluciones coloidales. Se distinguen dos

grupos básicos de taninos que difieren por su estructura y su origen biogenético, a saber: taninos hidrolizables y condensados (catéquicos). Los taninos hidrolizables por tratamiento con ácido se descomponen en azúcares y ácidos fenólicos, además, son compuestos reductores que forman sales complejas coloreadas con tricloruro de hierro (FeCl_3) y precipitan con acetato de plomo y alcaloides (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010). Algunos procedimientos que permiten cualificar estos compuestos químicos se describen en la Tabla N° 10.

Tabla N° 10 Identificación de Taninos

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Control	Agua destilada, etanol y cloruro de sodio	Se disolvió 100 mg del extracto en 10 mL de etanol por 5 minutos. Se extrajo con 25 mL de agua destilada llevando a ebullición durante 15 minutos, luego se dejó en reposo hasta temperatura ambiente. Se agregó 0,2 mL de solución de NaCl al 10 % p/v y se filtró. Se adicionó 3 mL del filtrado a 5 tubos de ensayo. Tubo 1: únicamente la alícuota del filtrado de la muestra (tubo control)
Gelatina 1 %	Gelatina	Tubo 2: se agregó 4 o 5 gotas de solución acuosa de gelatina al 1 % p/v. La formación de un precipitado indica la presencia de posibles taninos
Gelatina (1%)–Sal (10%)	Gelatina y cloruro de sodio	Tubo 3: se agregó 4 o 5 gotas de solución de gelatina-sal (1 % gelatina + 10 % sal). La aparición de un precipitado blanco indica la positividad de la prueba
FeCl_3 10%	Tricloruro férrico	Tubo 4: se agregó 3 o 4 gotas de solución de tricloruro férrico al 10 % p/v. El desarrollo de una coloración rojo-vino indica la presencia de compuestos fenólicos, verde intenso es indicativo de taninos pirocatecólicos y azul muestra la presencia de taninos pirogalatánicos
$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 %	Ferricianuro de potasio	Tubo 5: se adicionó 1 gota de ferricianuro de potasio al 1 %. La presencia de una coloración azul muestra la presencia de compuestos fenólicos

Mucílagos

Los mucílagos son considerados un grupo de hidrocoloides, conformados principalmente de polisacáridos y proteínas, que tienen la propiedad de hidratarse al contacto con el agua. Se clasifican en compuestos neutros y ácidos, que precipitan con la presencia de alcohol y metales pesados (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010). En la Tabla N° 11, se explica el ensayo a realizar para este tipo de metabolito.

Tabla N° 11 Identificación de Mucílagos

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Enfriamiento a 0-5 °C	Agua destilada	Se disolvió el extracto semisólido o seco en agua destilada. Se tomó una alícuota del extracto en agua y se enfrió a una temperatura de 0-5 °C. Si la solución toma una consistencia gelatinosa se considera positiva

www.bdigital.ula.ve

Compuestos fenólicos

Los fenoles son compuestos que presentan en su estructura al menos un anillo aromático con funciones hidroxiladas. Son sustratos muy reactivos a la sustitución aromática electrofílica en las posiciones *orto* y/o *para*, condición ideal para las reacciones de halogenación, nitración, sulfonación, entre otras. En ese sentido, la prueba con tricloruro férrico genera un complejo estable de color azul a violeta, que se origina por el ataque del ion cloruro al hidrógeno del grupo hidróxilo, provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenólico al ion férrico (Shyamala-Gowri y Vasantha, 2010). El procedimiento a seguir se resume en la Tabla N° 12.

Tabla N° 12 Identificación de compuestos fenólicos

Ensayo	Reactivo	Procedimiento
Prueba de FeCl₃	Tricloruro férrico, solución de cloruro de sodio 0,9 % m/v y acetato de sodio	A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionó 3 gotas de acetato de sodio para neutralizar y 3 gotas de una solución de FeCl ₃ al 5 % en solución fisiológica. El desarrollo de una coloración rojo vino, verde o azul es indicativo de compuestos fenólicos

Actividad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realizó, en el Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular (ANBIMOL) "Prof. Guillermo López Corcuera", del Departamento de Bioanálisis Clínico, Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, bajo la supervisión de la Dra. Elizabeth Pérez. La actividad antioxidante se determinó con el siguiente ensayo: actividad secuestrante de los radicales libres (**ABTS^{•+}**), para este caso se preparó una solución de 1000 µg/mL en metanol y se envasó en frasco de color ámbar para protegerlo de la luz.

Actividad inhibidora del radical catión del ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfónico (ABTS^{•+})

La técnica implica la producción directa del cromóforo **ABTS^{•+}** de color verde-azul que se presenta en la **Figura 3**, cuando reacciona el ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfónico con el persulfato de potasio (K₂S₂O₈). El radical formado presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm, el cual se decolora hasta ABTS cuando se adiciona un agente antioxidante. El porcentaje de inhibición del radical catión **ABTS^{•+}** dependerá de la concentración, el tiempo de reacción y la relación con el patrón de referencia.

El estudio comenzó con la formación del radical catión **ABTS^{•+}** mezclando ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6 sulfónico 7 mM con persulfato de potasio a una concentración final de 2,45 mM, dejando la reacción en la oscuridad durante al menos 16 h. Se mezclarán 40 μL de la solución de **ABTS^{•+}** con 960 μL de etanol para obtener una solución que proporcione una densidad óptica medida a 734 nm de 0,700 (\pm 0,02), estable durante 30 minutos.

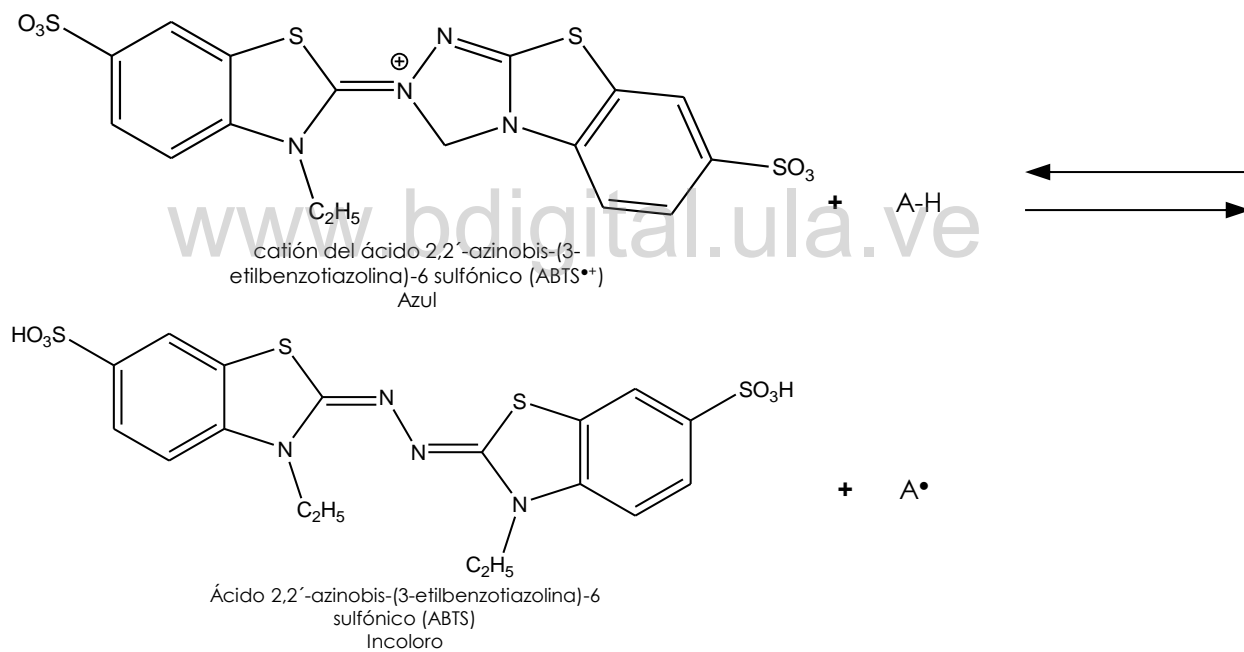


Figura 3. -Reacción secuestrante del radical ABTS^{•+}

Luego se tomaron 10 μL de las diferentes muestras preparadas en etanol y se colocó en la cubeta del espectrofotómetro, adicionando 1 mL de la solución de **ABTS^{•+}** y se procedió a medir la densidad óptica a 734 nm a los tiempos de 1 min y 6 min.

Por otra parte, se preparó una curva de calibración a partir de una solución de 8 mM de Trolox de concentraciones 1, 2, 4 y 8 μM , diluidas en buffer PBS 5 mM a pH 7,4). Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de disminución de color a 734 nm después de 6 min de reacción para cada muestra, utilizando la ecuación de la recta obtenida con las diferentes soluciones del estándar (Re y col., 1999).

Contenido de fenoles totales (método de Folin-Ciocalteu)

El ensayo se fundamenta en la reacción a pH básico entre la solución formada por las sales de wolframato sódico y molibdato sódico con los compuestos fenólicos. En la (Figura 4) se presenta el mecanismo de la reacción redox que origina una nueva especie química de color azul, la cual se determina espectrofotométricamente a 765 nm (Škerget y col., 2005).

El estudio se realizó tomando 0,5 mL del extracto y compuestos aislados y se mezcló con 2,5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu, dejándose reaccionar a temperatura ambiente durante tres minutos. Luego, se adicionó 2 mL de carbonato de sodio 0,71 M; la mezcla se dejó en reposo por cinco minutos protegido de la luz.

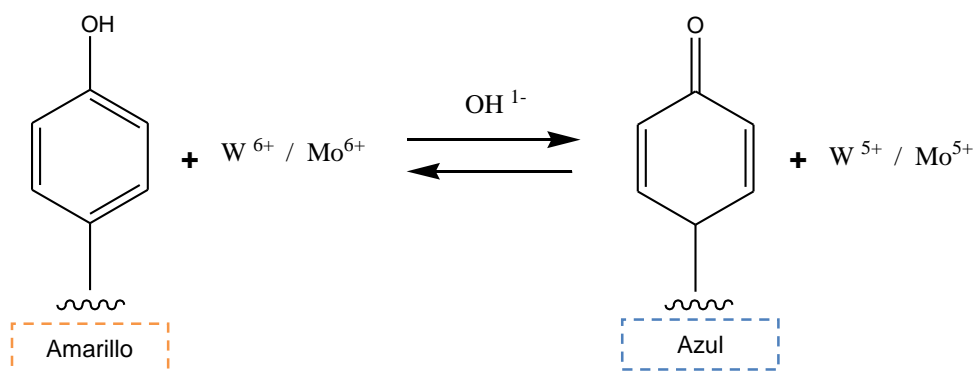
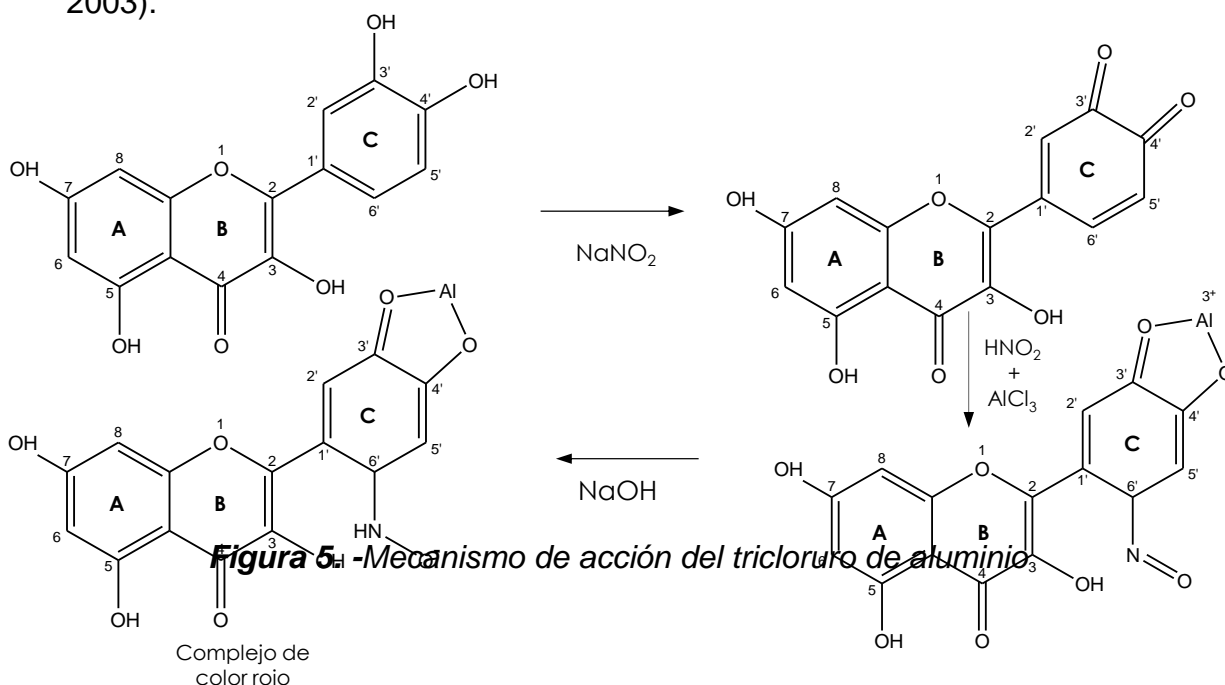


Figura 4. -Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu

Alcanzado el tiempo de incubación, se midieron las absorbancias a la longitud de onda de 765 nm. De igual manera, se preparó una curva de calibración de ácido gálico a las concentraciones entre 2,0 a 16 µg/mL. El Contenido de Fenoles totales se determinó como los miligramos equivalentes de ácido gálico por cada gramo de la muestra (mg Eq AG/g Ext).

Contenido de flavonoides totales

El principio de este método se basa en la reacción de los iones de aluminio con los flavonoides en medio alcalino formando un complejo color rojo. Al medir la absorbancia a 490 nm es posible determinar la concentración de flavonoides totales. La reacción que se detalla en la **Figura 5**, comienza con la oxidación de los grupos hidroxilos en C3' y C4' presentes en el anillo B a carbonilo por la adición del nitrito de sodio. Luego se produce una nitrosilación en el compuesto obtenido por la acción del ácido nitroso y el tricloruro de aluminio, además, el aluminio forma un complejo con los oxígenos de los carbonos oxidados; adquiriendo la solución un color amarillo (Kim y col., 2003).



Finalmente, la adición de hidroxio de sodio, produce la reducción del oxígeno del grupo nitrosilo, lo que proporciona una coloración roja a la solución.

El estudio del contenido de flavonoides, se inició mezclando 0,3 mL de nitrito de sodio 0,72 M y 0,3 mL de cloruro de aluminio 0,75 M, para luego adicionar a 0,5 mL de cada muestra, luego se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante cinco minutos. Posteriormente, se agregaron 2 mL de hidróxido de sodio 1 M y se llevó hasta un volumen de 10 mL con agua destilada. La densidad óptica de las soluciones obtenidas se midió a 510 nm. De igual manera, se preparó una curva de calibración de quercetina en el rango de concentración de 10 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El contenido de flavonoides totales se determinó como los miligramos equivalentes de quercetina por cada gramo de la muestra (mg Eq Q/g Ext).

Las lecturas para cada ensayo se realizaron por triplicado y los valores se expresaron como la media de la desviación estándar (\pm SD). La colección de datos expresados sometida a un análisis de varianza de dos vías (ANOVA) y se determinó la diferencia significativa entre las medidas a través de la prueba de LSD Fisher ($P < 0,05$).

Evaluación de los Resultados

Los resultados mostraron la capacidad secuestrante de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *B. latifolia*. Con las lecturas espectrofotométricas obtenidas con los diferentes patrones utilizados para las diferentes técnicas antioxidantes *In-vitro*, se construyeron las curvas de calibración, las cuales, permitieron determinar el poder secuestrante en el extracto metanólico para la especie en estudio. De igual manera, con los datos obtenidos se aplicaron diferentes pruebas estadísticas.

Diseño de análisis

Hernández y cols (2010), refirieron que existen dos tipos de enfoques en la investigación: cuantitativo y cualitativo. La metodología cuantitativa se basa en métodos de recolección de datos con medición numérica y análisis matemático. En ese sentido, se utilizaron en la presente investigación ya que se evaluó la capacidad secuestrante en el extracto metanólico en la especie *Baccharis latifolia*.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación Cualitativa de los Metabolitos Secundarios Presentes en *Baccharis latifolia*

Inicialmente, se realizó un estudio cualitativo de los metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de *Baccharis latifolia*, el mismo permitió determinar la presencia de algunos compuestos químicos, tales como; alcaloides, cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, antraquinonas, saponinas, glicósidos cardiotónicos, taninos y mucílagos.

Los resultados presentados en la Tabla N° 14 muestran una alta concentración de compuestos fenólicos, flavonoides, antraquinonas y saponinas. Así como, en menor cantidad glicósidos alcaloides, cumarinas y triterpenoides. De igual manera el ensayo realizado para verificar la presencia de mucílagos, no demostró ninguna reacción química, lo que indica la ausencia de este metabolito en el extracto.

Tabla Nº 13.- Tabla de resultados Tamizaje Fitoquímico

METABOLITOS SECUNDARIOS	PRUEBAS	BL
Alcaloides	Dragendorff	(++)
Antraquinonas	NH ₄ OH conc.	(+++)
Glicósidos y GlicosidosCardiotónicos	NaOHconc.	(-)
	KellerKilliani	(+)
Saponinas	Altura de espuma	(+)
	NaHCO ₃	(+++)
Flavonoides	Pew's	(++)
	NaOH 10%	(+++)
Cumarinas	NH ₄ OH	(++)
Taninos	Gelatina 1%	(-)
	Sol. Gelatina-NaCl	(-)
	K ₃ Fe(CN) ₆	(+++)
	FeCl ₃ 10%	(-)
Mucilagos	Enfriamiento 5°C	(-)
Triterpenoides y Esteroides	Rosenthaler	(-)
	Salkowski	(++)
Compuestos fenólicos	FeCl ₃ 5%, NaCl 0,9%	(+++)

BL: *Baccharis latifolia*, Ausente (-), Baja (+), Moderada (++) , Alta (+++)

El género *Baccharis* ha sido objeto de un gran número de estudios fitoquímicos y de actividades biológicas, en ese sentido, se puede mencionar para *B. latifolia* y *B. decusata*, la presencia de antraquinonas, saponina, taninos, glicósidos, entre otros; así como también, se puede destacar una alta concentración de compuestos fenólicos. De igual manera, se evidencia la presencia en menor proporción de flavonoides y alcaloides (Verdi y col, 2005; Guzmán., 2018; Loja y col., 2017; Calle y col., 2017).

Actividad antioxidante de los extractos obtenidos de *Baccharis latifolia*

La capacidad antioxidante para el extracto de *Baccharis latifolia*, obtenido por maceración, utilizando como solvente de extracción el metanol, fue determinada por el método **ABTS**, y la determinación del Contenido de Fenoles totales (**CFT**) y Contenido de Flavonoides Totales (**CFIT**).

Con relación a el ensayo por el método **ABTS**, los resultados obtenidos con la ecuación de regresión lineal ($Y=0,0702X+0,0629$; $R^2=0,9894$), utilizando como estándar el Trolox (Figura 6), permitió establecer la capacidad captadora de radicales libres en **IC₅₀** 4,38 μ mol equivalentes por cada gramo del extracto seco.

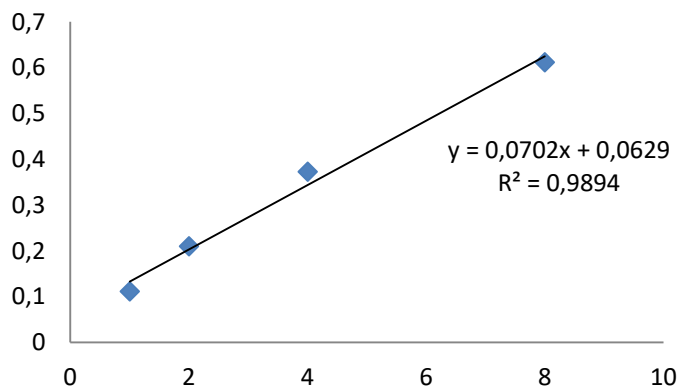


Figura N° 6.-Curva de calibración por el método ABTS

De igual manera se determinó el **CFT**, a través de la ecuación de regresión lineal que se presenta en la Figura 7, utilizado como estándar de calibración el ácido gálico ($Y= 10,139X+0,0147$; $R^2=0,999$); expresado como los mg equivalentes por cada gramo de extracto, en ese sentido, el extracto metanólico de *Baccharis latifolia* contiene 780 mg Eq de ácido gálico/ gramo del extracto.

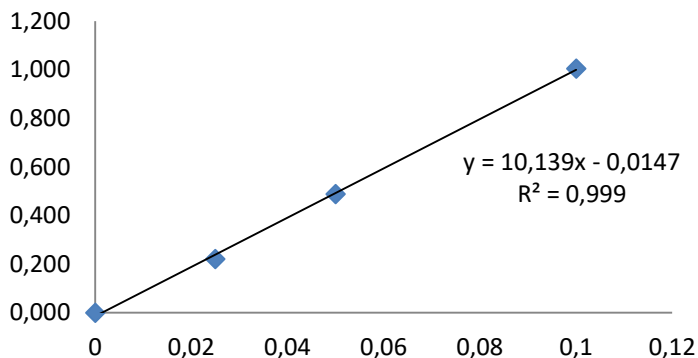


Figura N°7.-Curva de calibración contenido de fenoles.

Por otra parte, el extracto metanólico proporcionó una menor concentración de **CFIT** expresadas como los miligramos equivalentes de quercetina. Los resultados derivados de la ecuación de la recta presentados en la Figura 8 ($Y=0,0143X+0,0178$; $R^2=0,9962$), indican una concentración de 49,8 mg Eq de quercetina/ gramo del extracto.

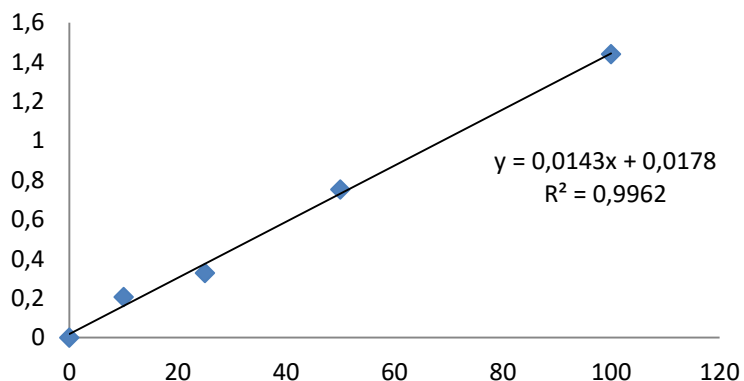


Figura N° 8.-Curva de calibración contenido de Flavonoides.

www.bdigital.ula.ve

La diversidad de compuestos de tipo aromáticos oxigenados obtenidos en las diferentes especies del género *Baccharis*, ha despertado el interés para la obtención de algunos compuestos de fuentes naturales, con la capacidad de actuar sobre ciertos radicales libres, inhibiendo su actividad que propician el desarrollo de algunas enfermedades degenerativas. Prada (2015). Estudió la actividad antioxidante de **BL** por el método **DPPH**, observando que los extractos **Met** obtenidos a partir de las flores fueron los más activos, con un promedio de $IC_{50}=30,27 \mu\text{g/mL}$. Por otra parte, con valores intermedios se encuentran los frutos con un promedio de $IC_{50}= 57,77 \mu\text{g/mL}$; mientras que los tallos y las hojas presentaron la más baja capacidad con un promedio de $IC_{50}=103,90$ y $181,26 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Los resultados antes mencionados establecen una aceptable capacidad secuestrante en comparación al resultado obtenido en la presente investigación, para el extracto **Met** de **BL** por el método **ABTS** que indica una alta capacidad

secuestrante de radicales libres con un promedio de $IC_{50}= 47,84 \mu M$. En otra investigación realizada por Prada y col. (2015); la **CFIT** en el extracto de las hojas (**h**) fue de 199,9 mg EQ / g de extracto seco, mientras que la concentración en los tallos (**t**) fue de $20,4 \pm 0,9$ mg EQ/ g de extracto seco. Para el caso de **CFT** en las (**h**) arrojó niveles de concentración de $522,4 \pm 14,1$ mg de ácido gálico / g de extracto seco, mientras que los (**t**) presentaron una mayor concentración de 332,3mg EAG/g de extracto seco. Como se puede apreciar **BL** es una planta bastante versátil, mostrando cambios en su composición química, condiciones de la planta y su entorno, ya sea produciendo o no ciertos compuestos que le ayudan a subsistir en diferentes entornos, como lo son los flavonoides (Prada. 2015). Por otra parte, los resultados obtenidos en la presente investigación, comparados con las publicaciones anteriormente mencionadas, confirman una alta concentración con valores promedios de **CFT** de 780 mg EÁG/g extracto seco, para el caso de **CFIT** cercanos a 49,8 mg EQ / g extracto seco y con relación a la capacidad secuestrante por el método de **ABTS** se obtuvo un resultado promedio de $IC_{50}= 47,84 \mu M$. Esta propiedad antioxidante es atribuida a la presencia de un número considerable de estructuras aromáticas polihidroxiladas, encontradas en las plantas del género *Baccharis* (Calle y col. 2017).

Tabla 14.- Valores Obtenidos en los ensayos de ABTS, Fenoles y Flavonoides totales para el extracto metanólico de *B. latifolia*

Extracto (Metanol)	ABTS ⁺ (IC_{50}) $\mu g/mL$	Fenoles mg (AG)	Flavonoides mg (QE)
<i>B. latifolia</i>	47,84	780	49,8

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El presente trabajo de investigación es pionero en cuanto al estudio metabolómico de la especie *B. latifolia* (Asteraceae), una planta que demostró tener gran variedad de metabolitos secundarios en cuanto a su composición química, ya que el extracto de esta especie fue analizado mediante ensayos cualitativos revelando compuestos característicos del género tales como: flavonoides, alcaloides, saponinas, cumarinas, taninos, triterpenoides, compuestos fenólicos, antraquinonas y trazas de glicosidos.

Se estudiaron un total de 27 gramos de la planta, colectada en diferentes sitios del páramo Collado del Cóndor del Estado Mérida, analizando un único órgano de la planta (hoja), se generó un perfil químico cualitativo (fenoles totales, flavonoides totales y capacidad de óxido reducción) donde se encontró contenido fenólico en mayor proporción por el ácido gálico (fenoles totales).

Encontrar esta gran variedad de metabolitos secundarios en el extracto de *B. latifolia* abre la puerta para continuar la búsqueda de moléculas que permitan generar y fomentar el desarrollo de compuestos activos como alternativa terapéutica para el control de enfermedades antiparasitarias, anti fúngicas entre muchas otras.

Ahora, lo que queda es continuar la investigación desde el punto de vista cuantitativo ya que de esta manera se llevaría a un posible conocimiento en

composición química más específica en cuanto a los metabolitos presentes en la especie *B. latifolia*.

www.bdigital.ula.ve

ABREVIACIONES

α	Alfa
β	Beta
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A.C	Antes de Cristo
ANBIMOL	Laboratorio de Análisis Biotecnológico y Molecular
ANOVA	Análisis de la varianza
ABTS	2,2'-azino-bis-3-etil benzotiazolina-6-sulfónico
BL	Baccharis latifolia
CFT	Contenido de Fenoles totales
CFIT	Contenido de Flavonoides Totales
DPPH	1,1 difenil-2-picril hidracilo
FDA	Administración de Alimentos y Medicinas
FRAP	Potencial antioxidante reducción férrica
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
HCA	Análisis de agrupación jerárquica
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LSD Fisher	Test de comparaciones múltiples
MTC	Medicina tradicional complementaria
Met	Metanólico
mg Eq AG/g Ext	Miligramos equivalentes de ácido gálico en un gramo de extracto seco.
mg Eq Q/g Ext	Miligramos equivalentes de quercitina en un gramo de extracto seco.
OPLS-DA	Proyecciones ortogonales a estructuras latentes - Análisis discriminante
PCA	Análisis de componentes principales
REDOX	Reacciones de oxidación-reducción
TEAC	Actividad antioxidante equivalente a Trolox
TLC	Cromatografía de capa fina
UV/V	Ultra violeta/ Visible

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, R. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (6ta ed.). Carol Stream IL, USA: Allured Publishing Corporation.
- Álvarez, E., Jiménez, J.G., Posada, M.A., Rojano, B., Gil, J.H., García, C.M., & Durango, D.L. (2008). Actividad antioxidante y contenido fenólico de los extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (Guttiferae). *VITAE, Revista de La Facultad de Química Farmacéutica*, 15(1), 165-172.
- Angiosperm Phylogeny Group. (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161(2), 105-121.
- Aniszewski, T. (2007) *Alkaloids—Secrets of Life Alkaloids Chemistry, Biological Significance Application and Ecological Role*, (Amsterdam, Holanda), Editorial Elsevier 1era Edición.
- Ames, B, Shigenaga, K y Hagen, T. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. (California, Estados Unidos) National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90.
- Arias, F. (2012). *Introducción a la Metodología de la Investigación* (Caracas, Venezuela), Episteme. 5ta edición.
- Bakht, N., Humaira. F., Madiha A., & Haq I. (2015). Recent trends and methods in antimicrobial drug discovery from plant sources. *Austin Journal of Microbiology*, 1(1),1-12.
- Balsano C, Alisi A. (2009). *Antioxidant effects of natural bioactive compounds*. *Curr. Pharm.*

- Bentham, G. (1873). *Notes on the classification, history, and geographical distribution of Compositae*. Botanical journal of the Linnean Society.
- Bercht y J. Presl (1820). *Astereáceae de importancia económica y ambiental: primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial*. Multequina, vol18 2da Edición.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F., & Bergonzi, M.C. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1-14.
- Bilia, A.R., Yusuf, A.W., Braca, A., Keita, A., & Morelli, I. (2000). New prenylated anthraquinones and xanthenes from *Vismia guineensis*. *Journal of Natural Products*, 63, 16-21.
- Botta, B., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Bettolo, M., & Menichini, F. (1986). Vismione H and prenylated Xanthenes from *Vismia guineensis*. *Phytochemistry*, 25, 1217-1219.
- Botta, B., Delle Monache, G., Delle Monache, F., Bettolo, M., & Oguakwa, U. (1983). 3-geranyloxy-6-methyl-1,8-dihydroxy anthraquinone and Vismiones C, D and E from *Psorospermum febrifugum*. *Phytochemistry*, 22, 539-542.
- Bruneton, J. *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza. Acribia S.A, 2001, 1100 Págs., ISBN: 84-200-0956-3.
- Buitrago, A., Rojas, J., Rojas, L., & Peñaloza, Y. (2016). In Vitro antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in Los Andes, Venezuela. *Revista de Biología Tropical*, 6(4), 1431-1439.
- Buitrago, A., Rojas, J., Rojas, L., Velasco, J., Morales, A., Peñaloza, Y., & Díaz, C. (2015). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Vismia macrophylla* leaves and fruits collected in Táchira-Venezuela. *Natural Product Communications*, 10(2), 375-377.

- Buitrago, A., Rojas, J., Cote, V., Bruno-Colmenárez, J., & Díaz de Delgado, G. (2010). NMR elucidation and crystal structure analysis of 1-hydroxy-3,6-dimethoxy-8-methyl-9h-xanthen-9-one (lichexanthone) isolated from *Vismia baccifera* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 9(6), 470-474.
- Buitrago, A., Rojas, L.B., Rojas, J., Buitrago, D., Usubillaga, A., & Morales, A. (2009). Comparative study of the chemical composition of the essential oil of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in two different locations in Merida-Venezuela. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 12(6), 651-655.
- Callacondo-Riva, D., Quispe-Mauricio, A., Lindo-Gamarra, S., & Vaisberg A.J. (2008). Actividad citotóxica del extracto etanólico de *Gnaphalium spicatum* "Keto Keto" en cultivos de líneas celulares tumorales humanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25, 380-385.
- Calle, A, San Martín, A, Melgarejo, M, Flores, Y e Almanza, G. (2017). *Elaboración del contenido de flavonoides y la actividad antibacteriana de cinco especies de Baccharis de Bolivia*, (La Paz, Bolivia), *Revista Boliviana de Química*.
- Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2009). Mecanismos de acción de los antimicrobianos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 27(1), 44-52.
- Camelle, G., Delle Monache, F., Delle Monache, G., Martini Bettolo, B., & Alves de Lima, R. (1982). 2-isoprenylemodin and 5,5'-dimethoxysesamin from *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry*, 21, 417-419.
- Cardona, L., Fernández, I., Pedro, J., Seoane, E., & Vidal, R. (1986). Additional new xanthenes and xanthonolignoids from *Hypericum canariensis*. *Journal of Natural Products*, 49, 95-100.
- Cardoso M., L., Ventrichi M., M., Amorim, A.M., & Bittrich V. (2016). *Vismia atlantica* (Hypericaceae), a new species previously thought to be wellknown from the Brazilian Atlantic Forest. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 143(3), 330-337. CLSI. (Estados Unidos). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th Edition. [Wayne, PA]: Clinical and Laboratory Standards Institute. <

https://www.clsi.org/media/1930/m100ed28_sample.pdf> [Consulta: 28 de enero de 2018].

Crocketta, S.L., & Robson, N.K. (2011). Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 5(1), 1-13.

Chailap, B., Nuanyai, T., Puthong, S., & Buakeaw, A. (2017). Chemical constituents of fruits and leaves of *Cratoxylum cochinchinense* and their cytotoxic activities. *Naresuan University Journal: Science and Technology*, 25(3), 22-30.

Cheesman, K y Slater, T. (1993). *Free Radicals in Medicine*. (Uxbridge, Reino Unido), Brunel University.

Cheng, L., Wang, C., Liu, H., Wang, F., Zheng, L., Zhao, J., Chu, E., & Lin, X. (2012). A novel polypeptide extracted from *ciona savignyi* induces apoptosis through a mitochondrial-mediated pathway in human colorectal carcinoma cells. *Clinical Colorectal Cancer*, 11(3), 207-214.

Chilpa, R., & Huerta R., M. (2009). Compuestos naturales de plantas de la familia Clusiaceae: Inhibidores del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. *Interciencia*, 34, 385-392.

Dávila, M, Stener, O y Hinojosa, N. (2013) *Flavonoids from Baccharis polycephala Weddell*. (Cochabamba, Bolivia), *Revista boliviana de química*, vol. 30 2da edición.

Davies, N. (1990). Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and carbowax 20 M. phases. *Journal of Chromatography A*, 503, 1-24.

Delle Monache, F., Marquina Mac-Quhae, M., Delle Monache, G., Marini, G., & Alves de Lima, R. (1983). Xanthonas, xanthololignoids and others constituents of the roots of *Vismia guaramirangae*. *Phytochemistry*, 22, 227-232.

- Delle Monache, G., Gonzales, J., Delle Monache, F., & Marini, G. (1980). Prenylated benzophenones from *Vismia decipiens*. *Phytochemistry*, 19, 2025-2028.
- Delle Monache, F., Marquina, M., Ferrari, F., & Martini-Bettolo, G. (1979). Ferruginin A and B and Ferruanthrone, New triprenylated anthranoids from *Vismia baccifera* var. *ferruginea*. *Tetrahedron*, 35, 2143-2149.
- Dewick, P.M. (2002). The biosynthesis of C5–C25 terpenoid compounds. *Natural Product Reports*, 19, 181-222.
- Doriguetto, A., Santos, M., Ellena, J., & Nagem, T. (2001). 6-deoxyjacareubin. *Acta Crystallographica C*, 57, 109-1079.
- Decker, E. Warner, K. Richards, M y Shahidi, F. (2005). *Measuring antioxidant effectiveness in food*. (Newfoundland, Canada) *Journal of agricultural and food chemistry*, vol 53, 10ma Edición.
- Domínguez, X. (1973 *Métodos de investigación fotoquímica*. (México: Limusa). págs. 81-226.
- Dos Santos, M., Nagem, T., Da Silva, M., & Silva, L. (2000). Xanthones from *Vismia latifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11, 537-539.
- Epifano, F., Genovese, S., Menghini, L., & Curini, M. (2007). Chemistry and pharmacology of oxyprenylated secondary plant metabolites. *Phytochemistry*, 68, 939-953.
- Ferreira Nobre, V., Marchesine Almeida, D.M., Lucchese, A.M., Lopes Rocha, M., Santos Oliveira, A.T., & Maia Barboza, A.C. (2015). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hexanic extract leaves of *Vismia guianensis* Aubl. in mice. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 14(1), 69-73.
- Figueiredo, A.C., Barroso J.G., Pedro L.G., & ScheffeR, J.J.C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragrance Journal*, 23,213–226.
- Fuller, R., Westergaard, C., Collins, J., Cardellina, J., & Boyd, M. (1999). Vismiaphenones D-G from *Vismia cayennensis*. *Journal of Natural Products*, 62, 57-69.

Font Quer, P. (1953). *Diccionario de botánica*.

Frankel, E (1995) *Natural and Biological antioxidants in foods and biological systems. Their mechanism of action, applications and implications. Lipid technology*.

Freire, S e Iharlegui, L (2000) *Ejemplares tipos de Asteraceae*. (La Plata, Argentina) Departamento científico de plantas vasculares.

Gardini B., L.F., Alcantara, G.B., Cepa M., M.F., Bogo, D., dos Santos Freitas, D., Mitsuko O., N., & Honda, N.K. (2013). Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from Lichens against melanoma cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 61(2), 176-183.

Gómez-Cansino, R., Espitia-Pinzón, C.I., Campos-Lara, M.G., GuzmánGutiérrez, S.L., Segura-Salinas, E., Echeverría-Valencia, G., TorrasClaveria, L., Cuevas-Figueroa, X.M., & Reyes-Chilpa, R. (2015). Antimycobacterial and HIV-1 Reverse transcriptase activity of Julianaceae and Clusiaceae plant species from Mexico. *EvidenceBased Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 1-8.

Gomes, M.J.N., Silva, S.N., Ribeiro, R.M., Abreu, I.C., Borges, R.M.O., & Borges, R.A.C. (2009). Screening farmacológico das folhas de *Vismia reichardtiana* (O. Ktze) Ewan-Guttiferae. *Revista Cadernos de Pesquisa*, 16(1), 5-10.

Goncalves, M., & Mors, W. (1981). Vismiaquinone A. δ -isopentenyl substituted anthraquinone from *Vismia reirchartiana*. *Phytochemistry*, 20, 1947-1950.

Gonzales, J., Delle Monache, F., Delle Monache, G., & Marini Bettolo, G.B. (1980). Chemistry of the genus *Vismia*. VII. Vismione A from the leaves of *Vismia guianensis*. *Planta Medica*, 40, 347-350.

- Goossens, A., Häkkinen, S., Laakso, I., Seppänen Laakso, T., Biondi, S, De Sutter, V., Lammertyn, F., Nuutila, A.M., Söderlund, H., Zabeau, M., Inze, D., & Oksman-Caldentey, K. (2003). A functional genomics approach toward the understanding of secondary metabolism in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 8595-8600.
- Goupy, P., Bautista, A., Fulcrand, H., & Dangles, O. (2009). Antioxidant activity of wine pigments derived from anthocyanins: Hydrogen transfer reactions to the DPPH radical and inhibition of the heme-induced peroxidation of linoleic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5762-5770.
- Gutiérrez, M., A., Pino, B.N., & Cuesta, L.J.A. (2011). Actividad antioxidante y contenido total de fenoles de varios extractos etanólicos de plantas medicinales. *Investigación, Biodiversidad y Desarrollo*, 30(1), 66-73.
- González, K (2014) *Los extractos acuosos y metanólico de Berberis darwinii H. (Berberidaceae) inhiben respuestas celulares innatas en monocitos humanos in vitro.* (Temuco, Chile) *Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas*, Vol. 13, 1era Edición.
- Güemes, J. (2001). *La sexualidad en las plantas.*
- Guerra, P (2016). *Evaluacion dela actividad antioxidante bioautografica de dos variedades de aceites esenciales andinos Clinopodium nubigenum (Kunt) Kuntze y Baccharis latifolia (Ruiz & Pav.) Pers.* (Quito, Ecuador). Universidad Politecnica Salesiana.
- Guzmán, M. (2018). *Efecto de los compuestos fenólicos totales del extracto etanólico de la Baccharis genistelloides sobre Streptococcus mutans,* (Ambato, Ecuador), Editorial repositoria institucional UNIANDES.
- Halliwell, B. (2012). *The antioxidant paradox: less paradoxical now,* (Singapur), Department of Biochemistry, National University of Singapore.

- Harborne, J y Williams, C. (1992) *Advances in flavonoid research since*, (Amsterdam, Holanda), Editorial Elsevier 6ta edición.
- Hernández. S, Fernández. C y Baptista. P. (2010) *Metodología de la Investigación*. (México) McGraw-Hill Interamericana.
- Hokche, O., Berry, P.E., & Huber, O. (2008). Nuevo catálogo de la flora vascular de Venezuela. Caracas, Venezuela: Ediciones Fundación Instituto Botánico de Venezuela "Dr. Tobías Lasser".
- Hoyos, M y Yep, M. (2008) *Diseño de una formulación de aplicación tópica a base de Baccharis latifolia (Chilca), con efecto antiinflamatorio*. (Lima, Perú) Tesis para obtener título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Hussain, H., Hussain, J., Al-Harrasi, A., Saleem, M., Green, I.R., van Ree, T., & Ghulam, A. (2012). Chemistry and biology of genus *Vismia*. *Pharmaceutical Biology*, 50(11), 1448-1462.
- Hussein, A., Bozzi, B., Correa, N., Capson, T., Kursar, T., Coley, P., Solis, P., & Gupta, M. (2003). Bioactive constituents from three *Vismia* species. *Journal of Natural Products*, 66, 858-860.
- Hurtado, J. (2010). *Metodología de la Investigación Holística Guía para la comprensión Holística de la Ciencia*. (Caracas, Venezuela) Sypal, 4ta Edición.
- Islam, R., Ahmed, I., Sikder A.A., Haque, M.R., Al-Mansur, A., Ahmed, M., Rasheed, M., & Rashid, M.A. (2014). Chemical Investigation of *Mesua nagassarium* (Burm. f.) Kosterm. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 10, 124-128.
- Jerlick, Pitt, Schaur y Spickett. (2002) *Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes*. *Rev cubana Med Milit* 2002;31(2).

- Jusoh, S., Din, L.B., & Zakaria, Z. (2015). Xanthenes and an anthraquinone from stem bark and roots of *Cratoxylum arborescens*. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 19(4), 745 -751.
- Katinas, L. (2007). Panorama de la familia Asteraceae en la República Argentina, (Buenos aires, Argentina), sociedad botánica de Argentina.
- Keawsa-Ard, S., Liawruangrath, B., Kongtaweelert, S., & Mai, C. (2015). Bioactive compounds from *Mesua ferrea* stems. *Chiang Mai Journal Science*, 42(1), 185-195.
- Kim, H.M., Lee, J.M., Park, J.Y., Lee, S., Han, S., Kim, H.Y., Son, D., Choi, S.Y., & Lee, S.P. (2008). Phytosterols and Lignans from the Sesame Dregs of *Sesamum indicum*.
- Korean Journal of Plant Resources, 21(6), 420-426. Kim, D. O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y., & Lee, C. (2003). Quantification of phenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6509-6515.
- Kuete, V., Nguemeving, J., Beng, V., Azebaze, A., Etoa, F., Meyer, M., Bodo, B., & Nkengfack, A. (2007). Antimicrobial activity of the methanolic extracts and compounds from *Vismia laurentii* De Wild (Guttiferae). *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 372-379.
- Kuskoski M, Asuero, A, Troncoso, A, Mancini-Filho, J, y Fett, R. (2005). *Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos*. (Sao Paulo, Brasil) 4ta Edición, volumen 25, *Food Science and Technology*.
- Liu, H., Kim, J., Liu, X., & Yook, C. (2013). Studies on chemical constituents from *Acanthopanax henryi* root barks. *Journal of Acupuncture and Herbs*, 1, 48-52.
- Lizcano, L.J., Siles, M., Trepiana, J., Hernández, M.L., Navarro, R.M., RuizLarrea, B., & Ruiz-Sanz, J.I. (2015). Piper and *Vismia* species from Colombian Amazonia

differentially affect cell proliferation of hepatocarcinoma cells. *Nutrients*, 7, 179-195.

Loja, B, Alvarado, A, Salazar, A, Ramos, E y Jurado, B (2017). *Cribado fitoquímico del Baccharis latifolia (R&P). Pers. (Chilca)*. (Lima, Perú). Universidad San Martín de Porres. Vol. 22 1era Edición.

Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica orgánica*. Caracas, Venezuela: Ediciones Vicerrectorado Académico UCV. Mbaveng, A.T., Kuete, V., Nguemeving, J.R., Penlap Beng, V., Nkengfack, A. E., Marion Meyer, J.J., Lall, N., & Krohn, K. (2008). Antimicrobial activity of the extracts and compounds obtained from *Vismia guineensis* (Guttiferae). *Asian Journal of Traditional Medicines*, 3(6), 211-223.

Mbwambo, Z.H., Apers, S., Moshi, M.J., Kapingu, M.C., Van Miert, S., Claeys, M., Brun, R., Cos, P., Pieters, L., & Vlietinck, A. (2004). Anthranoid compounds with antiprotozoal activity from *Vismia orientalis*. *Planta Medica*, 70(8), 706-710.

Menezes de Oliveira, D., da Nova Mussel, W., Duarte, L.P., de Fátima Silva, G.D., Duarte H.A., & de Lima Gomes, E.C. (2012). Combined experimental powder x-ray diffraction and dft data to obtain the lowest energy molecular conformation of friedelin. *Quimica Nova*, 35(10), 1916- 1921.

Micheletti, A.C., Adilson, B., Pires de Lima, D., & Honda N.K. (2009). Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler–isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. *Quimica Nova*, 32(1), 12-20.

Miraglia, M., Mesquita, A., Varejão, M., Gottlieb, O., & Gottlieb, H. (1981). Anthraquinones from *Vismia* species. *Phytochemistry*, 20, 2041-2042.

Mishra, T. (2016). Climate change and production of secondary metabolites in medicinal plants: A review. *International Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 27-30.

Monkodkaew, S., Loetchutinat, C., Nuntasaeen, N., & Pompimon, W. (2009). Identification and antiproliferative activity evaluation of a series of triterpenoids

- isolated from *Flueggea virosa* (Roxb. ex Willd.). *American Journal of Applied Sciences*, 6(10), 1800-1806.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Muna-Ahmed, M.E., Feng-Jie Z., Fei-Fei W., Chun-Hua Z. & Jun, T. (2013). Advances in fruit aroma volatile research. *Molecules*, 18, 8200-8229. Munoz C., D.R., & Cuca S., L.E. (2016). Compuestos citotóxicos de origen vegetal y su relación con proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP). *Revista Colombiana Cancerología*, 20(3):124-134.
- Muñoz, F, (2002) *Plantas medicinales y aromáticas estudio, cultivo y procesado*. (Madrid, España), Mundi-prensa libros (Reimpresión 2002), S.A.
- Muñoz, O, Montes, M y Wilkormisky, T. (2001), *Plantas medicinales de uso en Chile Química y farmacología*, (Santiago, Chile), Editorial universitaria S.A.
- Nagem, T., & Alves, V. (1995). Constituents of *Vismia magnoliaefolia*. *Fitoterapia*, 56(3), 278-280. Nagem, T.J., & Ferreira, M.A. (1993). Constituents of *Vismia micrantha*. *Fitoterapia*, 64, 382-383.
- Nagem, J., & Faria de Jesús, T. (1990). Quinoids and other constituents of *Vismia martiana*. *Phytochemistry*, 29, 3362-3364.
- Nagen, J., & Faustino, F. (1997). Xanthonenes and other constituents of *Vismia parviflora*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 8, 505-508.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L. Coppola, R., & De Feo, V. (2013). Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6, 1451-1474.
- Nguemaving, J., Azebaze, A., Kuete, V., Carly, N., Beng, P., Meyer, M., Blond, A., Bodo, B., & Nkengfack, A. (2006). Laurentixanthonenes A and B, antimicrobial xanthonenes from *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*, 67, 1341- 1346.
- Noungoue, D.T., Chaabi, M., Ngouela, S., Antheaume, C., Boyom, F.F., Gut, J., Rosenthal, P.J., Lobstein, A., & Tsamo, E. (2009). Antimalarial compounds

- from the stem bark of *Vismia laurentii*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64c, 210-214.
- Noungoue, D., Antheaume, C., Chaabi, M., Ndjakou, B., Ngoule, S., Lobstein, A., & Tsamo, E. (2008). Anthraquinones from the fruits of *Vismia laurentii*. *Phytochemistry*, 69, 1024-1028.
- Nuñez, R., Rojas J., Lucena, M., Roa, A., & Meléndez P. (2013). Evaluación de la actividad antibacteriana y efecto citotóxico de extractos obtenidos de la especie *Vismia guianensis* (Aubl.) Pers. (Hypericaceae). *Revista de la Facultad de Farmacia*, 55(2), 29-34.
- Nürk, N.M., Madriñán, S., Carine, M.A., Chase, M.W., & Blattner, F.R. (2013). Molecular phylogenetics and morphological evolution of St. John's wort (*Hypericum*; Hypericaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(1), 1-16.
- Oliveira A., M.F., Rodrigues de Melo, A.C., Belém P., M.L., de Andrade Silva, J.R., & Leão de Souza, A.D. (2011). Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica* (Lecythidaceae). *Química Nova*, 34(7), 1182-1187.
- Pardo, F. Navarro, F y Oliva, J. (1994). *Evolución de los compuestos fenólicos de vinos tintos obtenidos con diferente tiempo de maceración*. *Viticultura y Enología Profesional*. Vol. 34
- Pavia, D, Lampman, G y Kriz, G. (1978) *Química orgánica experimental*. (Barcelona, España) Editorial Universitaria de Barcelona Eunibar.
- Peredo-Luna H.A., Paloua-García E. & López-Malo A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3-1; 24-32.
- Pereira-Camelo, S.R., Silva-Costa, R., Ribeiro-Costa, R.M., Ramos Barbosa, W. L., Vasconcelos, F., dos Santos Vieira, J.M. & Silva Junior, J.O.C. (2011). Phytochemical evaluation and antimicrobial activity of ethanolic extract of *Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2(12), 3224-3229.

- Peres, V., Nagen, T., & Faustino, F. (2000). Tetraoxygentaed naturally occurring xanthonnes. *Phytochemistry*, 55, 683-710. Peres, V., & Nagen, T. (1997). Trioxxygenated naturally occurring xanthonnes. *Phytochemistry*, 44, 191-214.
- Pino-Benitez, N., & Cordoba C., Y. (2007). Actividad antimicrobiana y fotoquímica preliminar de plantas utilizadas como colorantes en el municipio de Quibdó-Chocó. *Scientia et Technica*, 33, 387-390.
- Pinheiro, R., Mac-Quhae, M., Bettolo, M., & Delle Monache, F. (1984). Prenylated antranoids from *Vismia* species. *Phytochemistry*, 23; 1737- 1740.
- Politi, M., Sanogo, R., Ndjoko, K., Guilet, D., Wolfender, J.L., Hostettmann, K., & Morelli, I. (2004). HPLC-UV/PAD and HPLC-MS (n) analyses of leaf and root extracts of *Vismia guineensis* and isolation and identification of two new bianthrones. *Phytochemical Analysis*, 15, 355-364.
- Prada, J (2015). *Análisis metabolómico de la especie Baccharis latifolia (Asteraceae) en la sabana de Bogotá*. (Bogotá, Colombia). Universidad Militar Nueva Granada, Vol. 12 1era edición.
- Ragasa, C.Y., Santos, V.A., Guiao A., E.M., & Shend, C.C. (2015). Chemical constituents of *Cycas vespertilio*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25, 526-528.
- Rahman, A., Choudhary, M.I., & Thomson W.J. (2001). *Bioassay techniques for drug development*. New Jersey, United States: Harwood Academic Publishers.
- Rao, C.V., Kurkjian, C.D., & Yamada, H.Y. (2012). Mitosis-targeting natural products for cancer prevention and therapy. *Current Drug Targets*, 13(14), 1820-1830.
- Rates, S.M.K. (2001). Review. Plants as source of drugs. *Toxicon*, 39, 603-613.
- Reyes-Chilpa, R., Gómez-Cansino, R., Guzmán-Gutiérrez, S.L., HernándezOrtega, S., Campos-Larad, M., Vega-Avila, E., & Nieto-Camacho, A. (2014). Anthraquinones from *Vismia mexicana*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 69, 29-34.

- Ribeiro, A.B., Berto, A., Ribeiro, D., Freitas, M., Chisté, R.C., Visentainer, J.V., & Fernandes, E. (2015). Stem bark and flower extracts of *Vismia cauliflora* are highly effective antioxidants to human blood cells by preventing oxidative burst in neutrophils and oxidative damage in erythrocytes. *Pharmaceutical Biology*, 53(11), 1691-1698.
- Rodríguez, R. (1991). *Fisiología vegetal*. Editorial" Los Amigos del Libro.
- Rojas, J., & Buitrago, A. (2016). Essential Oils and their Products as Antimicrobial Agents: Progress and Prospects. En M.C. Teixeira Duarte & M. Rai (Ed), *Therapeutic medicinal plants from lab to the market*: (pp. 253-278). New York, Estados Unidos: Taylor & Francis Group.
- Ruhfel, B., Bittrich, V., Bove, C., Gustafsson, M., Philbrick, C., Rutishauser, R., Xi, Z., & Davis, C. (2011). Phylogeny of the clusioid clade (Malpighiales): evidence from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany*, 98, 306-325.
- Salazar, Y, Henríquez, W, Crescente, O, Sevcik, C, D'Suze, G y Christophersen, C. (2014). *Actividad antioxidante de 5,4-dihidroxi-3,7,8,3-tetrametoxiflavona aislada de egletes postrata (Plantae: Asteraceae)*, (Cumaná, Venezuela), SABER. *Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente*. vol. 26, núm. 2.
- Salas, F., Velasco, J., Rojas, J., & Morales, A. (2007). Antibacterial activity of the crude extract and constituents of *Vismia baccifera* var. *dealbata* (Guttiferae) collected in Venezuela. *Natural Product Communications*, 2(2), 185-188.
- Salas, F., Ciangherotti, C., Salazar-Bookaman, M., Rojas, J., & Morales, A. (2007). Toxicidad aguda y actividad analgésica del extracto acuoso de hojas de *Vismia baccifera* L. var. *dealbata* (Guttiferae) en animales de experimentación. *Revista de la Facultad de Farmacia*, 49(1), 5-9.
- Salas, F., Rojas, J., Morales, A., & Ramos-Nino, M. (2008). In Vitro cytotoxic activity of sesamin isolated from *Vismia baccifera* var. *dealbata* Triana & Planch (Guttiferae) collected from Venezuela. *Natural Product Communications*, 3, 1705-1708.

- Schultes, R. (1993). Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, 38, 139-135.
- Seo, E., Wani, M., Wall, M., Navarro, H., Mulkherjee, R., Farnsworth, N., & Kinghorn, D. (2000). New bioactive aromatic compounds from *Vismia guianensis*. *Phytochemistry*, 55, 35-42.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*, (Caracas, Venezuela) Convenio. Andrés Bello.
- Shende, J., & Gurdial, S. (1998). Chemical synthesis of shikimic acid and its analogues. *Tetrahedron*, 54, 4697-4753.
- Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B.S. (2010) An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5, 222-247.
- Shyamala-Gowri, S., & Vasantha, K. (2010). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Syzygium cumini* (L.) (Myrtaceae) leaves extracts. *International Journal of PharmTech Research*, 2, 1569-1573.
- Silvestre, R.G., de Moraes, M.M., Lins, A.C.S., Ralph, M.T., Lima-Filho, J.V., Camara, C.A., & Silva, T.M.S. (2012). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil from *Vismia guianensis* fruits. *African Journal of Biotechnology*, 11(41), 9888-9893.
- Simmonds, M., Blaney, W., Delle Monache, F., Marquina, M., & Marini Bettolo, G. (1985). Insect antifeedant propierties of anthanoids from the genus *Vismia*. *Journal of Chemical Ecology*, 11, 1593-1599.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, A. R., Simonič, M., & Knez, Ž. (2005). Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89, 191-198.
- Stevens, P.F. (2007). Hypericaceae. En K. Kubitzki (Ed), *The families and genera of vascular plants*: (pp. 194-201). Berlin, Alemania:

- Springer Verlag. Suffredini, B., Paciencia, M.L.B., Frana, S.A., Varella, A.D., & Younes, R.N. (2007). In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. *Pharmazie*, 62, 798–800.
- Sylvester, P.W. (2011). Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. *Methods in Molecular Biology* 716, 157-168.
- Tala, M.F., Tamokou, J.D., Tchakam, P.D., Tane, P., Kuate, J.R., & Wabo, H.K. (2011). Antioxidant xanthenes, anthraquinones and semi-synthetic derivatives from *Vismia rubescens* and *Vismia laurentii*. *Pharmacologyonline*, 3, 1410-1418.
- Tamokou, J de D., Chouna, J.R., Fischer-Fodor, E., Chereches, G., Barbos, O., Damian, G., Benedec, D., Duma, M., Efouet, A.P., Wabo, H.K., Kuate, J.R., Mot, A., & Silaghi-Dumitrescu, R. (2013). Anticancer and antimicrobial activities of some antioxidant-rich Cameroonian medicinal plants. *PLoS One*, 8(2), 1-14.
- Tamokou, J., Tala, M., Wabo, H., Kuate, J., & Tane, P. (2009). Antimicrobial activities of methanol extract and compounds from stem bark of *Vismia rubescens*. *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 571-575.
- Tchamo, D., Brelot, M., Antheaume, C., Ngouela, S., & Lobstein, A. (2008). Methyl 5,7-dihydroxy-2, 2,9-trimethyl-6,11-dihydro-2H -anthra-[2,3-b] pyran -8-carboxylate. *Acta Crystallographica*, 64, 2414 -2415.
- Tiskow, G. (1996) *Radicales libres en biología y medicina*, (Barquisimeto, Venezuela), Gaceta de ciencias veterinarias.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: A Review. *Internationale Pharmaceutica Scientia*, 1, 98-106.
- Trease, G.E., & Evans, W.C. (2002). *Pharmacognosy*. London, England: Ed. Saunders Publishers. Trópicos org. (Estados Unidos). Missouri Botanical Garden [en línea]: catálogo automatizado. [Saint Louis]: Missouri Botanical Garden. [Consulta: 28 de abril de 2017].
- Toledo, C y Kutschker, A. (2012) *Plantas medicinales en el parque nacional los Alerces*. (Chubut, Argentina), Boletín de la sociedad argentina de botánica, 3era y 4ta Edición.

- Velasco, J., Rojas, J., Salazar, P., Rodríguez, M., Díaz, T., Morales, A., & Rondón, M. (2007). Antibacterial activity of the essential oil of *Lippia oreganoides* against multiresistant bacterial strains of nosocomial origin. *Natural Product Communications*, 2, 85-88.
- Velasco, J., Contreras, E., Buitrago, D., & Velasco, E. (2005). Efecto antibacteriano de *Viola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a Metilina. *Ciencia*, 13(4), 411-415.
- Velásquez, A. (2007) *Actividad Antimicrobiana de Extractos de Franseria artemisioides, Rumex palustris, Baccharis latifolia, Cestrum parqui y Piper asterifolium Frente a Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Enterococcus faecalis*. (La paz, Bolivia) Universidad Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.
- Ventrichi M., M., Hiroaki S., G, Bittrich, V., & Estanislau do Amaral, M. do C. (2018). *Vismia conduplicata* (Hypericaceae), a new species from Mato Grosso, Brazil. *Phytotaxa*, 338(1), 125-129.
- Verdi, G, Costaa, L y Pizzolatti, M (2005) *Genero Baccharis (Asteraceae): aspectos químicos, económicos y biológicos*. (Santiago del Estero, Argentina) Editorial Química nova, vol 28, 1era edición.
- Vizcaya, M., Pérez, C., Rojas, J., Rojas-Fermín, L., Plaza, C., Morales, A., & Pérez, P. (2014). Composición química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34, 86- 90.
- Vizcaya, M., Morales, A., Rojas, J., & Nuñez, R. (2012). Revisión bibliográfica sobre la composición química y actividades farmacológicas del género *Vismia* (Guttiferae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 11(1), 12-34.
- Vitto, L y Petenatti, E. (2009). *Asteracea de importancia económica y ambiental. Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial*. (San Luis, Argentina. Universidad nacional de San Luis, 1era edición.

Vivas, Y y Ubierno, P. (2010). *Asteraceae del valle morrénico de Mucubají*, (Mérida, Venezuela). Revista de la Facultad de Agronomía, vol. 27, 1era Edición.

Weberling, F (1989) *Morphology of flowers and inflorescences* (Amsterdam, Holanda) Nordic Journal of Botany.

Weng-Alemán, Z., Álvarez M., I., Díaz R., O.E., & Rodríguez S., M. (2003). Recobrado de Salmonella sp. conservada por método simple a temperatura ambiente. VacciMonitor, 12(3), 5-10.

Wink, M. (2007) Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. En K. Kayser & Q. Quax (Eds.), Medicinal plant biotechnology. From basic research to industrial application (pp. 97-116). Weinheim, Alemania: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Zumdahl, S. Ortega, M. Muradás, R. Bosque, P y Ortega, C (1992). *Fundamentos de química*. McGraw-Hill.

www.bdigital.ula.ve