

Tesis de Doctorado en Química



Lic. Javier Varela Ubillos

Búsqueda de actividad anti-
Trypanosoma cruzi en
plantas del Uruguay

Directores:

Dr. Hugo Cerecetto

Dra. Mercedes González



**Grupo de Química Medicinal, Instituto de Química
Biológica, Facultad de Ciencias, UDELAR.**

Octubre 2016

Índice

1. Introducción	7
1.1. Mal de Chagas: "Tragedia silenciosa"	7
1.2. Plantas medicinales	11
1.3. Plantas del Uruguay	13
1.3.1. <i>Hydrocotyle bonariensis</i>	14
1.3.2. <i>Taraxacum officinale</i>	15
1.3.3. <i>Plantago major</i>	15
1.3.4. <i>Achyrocline satureioides</i>	16
1.3.5. <i>Baccharis trimera</i>	17
1.3.6. <i>Baccharis articulata</i>	18
1.3.7. <i>Baccharis usterii</i>	18
1.4. Metabolómica de plantas	19
2. Objetivos	28
2.1. Objetivo general	28
2.2. Objetivos específicos	28
3. Procedimientos experimentales	29
3.1. Recolección de las plantas	29
3.2. Identificación botánica	29
3.3. Preparación de los extractos	29
3.4. Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
3.5. Ensayo biológico de actividad citotóxica frente a macrófagos murinos J774.1	30
3.6. Ensayo de actividad biológica frente a la forma amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.7. Obtención de los perfiles químicos mediante ¹ H RMN	31
3.8. Metabolómica por ¹ H RMN	32
3.9. Purificación de los principios activos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.10. Caracterización química de los principios activos mediante RMN	33
3.11. Estandarización del perfil químico mediante propagación de cultivo de <i>Baccharis spp</i> mediante clonación por esqueje	33
4. Resultados y discusión	35
4.1. Colecta y preparación de extractos	35
4.2. Evaluación biológica	36
4.3. Metabolómica por ¹ H-RMN	41

4.4. Elucidación estructural de los principios activos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	63
4.5. Estandarización del perfil químico de <i>Baccharis spp</i> mediante propagación del cultivo utilizando clonación por esqueje.	77
5. Conclusiones	81
6. Bibliografía	83
7. Agradecimientos	95

Abreviaturas

AcOEt	Acetato de etilo
Bnz	Benzimidazol
CC	Contribución cruzada
CI ₅₀	Concentración inhibitoria al 50 %
COSY	Acrónimo del inglés de <i>Correlation spectroscopy</i>
CPRG	Rojo-β-D-galactopyranósido de clorofenol
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Acrónimo del inglés de <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EM	Acrónimo del inglés de <i>Efficient Microorganisms</i>
EP	Éter de petróleo
FDA	Acrónimo del inglés de <i>Food and Drug Administration</i>
FID	Acrónimo del inglés de <i>Caída Libre de la Inducción</i>
GC/MS	Cromatografía de gases/Espectrometría de masas
HCA	Acrónimo del inglés de <i>Hierarchical Clustering Analysis</i>
HMBC	Acrónimo del inglés de <i>Heteronuclear Multiple-bond Correlation spectroscopy</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HSQC	Acrónimo del inglés de <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy</i>
IFI	Inmunofluorescencia
IS	Acrónimo del inglés de <i>Internal Standard</i> o índice de selectividad
LB	Línea de base
LC-MS	Cromatografía líquida/Espectrometría de masas
LDA	Acrónimo del inglés de <i>Linear Discriminant Analysis</i>
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
Nfx	Nifurtimox
OPLS-DA	Acrónimo del inglés de <i>Orthogonal Partial Least Squares - Discriminant Analysis</i>
PBS	Acrónimo del inglés de <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC	Acrónimo del inglés de <i>Principal Components</i>
PCA	Acrónimo del inglés de <i>Principal Component Analysis</i>
PCR	Acrónimo del inglés de <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PLS-DA	Acrónimo del inglés de <i>Partial Least Square - Discriminant Analysis</i>
ppm	Partes por millón
QC	Acrónimo del inglés de <i>Quality Control</i>
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RT	Tiempo de retención
SD	Desviación estándar
SOM	Acrónimo del inglés de <i>Self-Organizing Map</i>
spp	Especies
SVM	Acrónimo del inglés de <i>Support Vector Machines</i>
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TLC	Acrónimo del inglés de <i>Thin Layer Chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano

UV Ultravioleta
VIH Virus de la inmunodeficiencia humana

Resumen

Ochenta y dos plantas silvestres se recolectaron de diversos orígenes geográficos y en diferentes épocas del año que se han caracterizado botánicamente y sus extractos etanólicos se evaluaron frente a la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. Las plantas pertenecen a las siguientes especies: *Hydrocotyle bonariensis*, *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata*, *Baccharis usterii*, *Taraxacum officinale*, *Plantago major* y *Achyrocline satureioides*. Se encontró que las muestras de *Hydrocotyle bonariensis*, *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usterii* presentan significativa actividad anti-proliferativa. También se evaluó la actividad citotóxica en células mamíferas de los extractos con relevante actividad antiparasitaria para la determinación de la selectividad de los mismos. Se observó que las tres especies de *Baccharis* eran las que presentaban mejores selectividades. Los extractos que resultaron más activos y selectivos se evaluaron frente a amastigotes, la forma intracelular del parásito, encontrándose una muy buena correlación de actividades. Se observó que la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* varía entre muestras de distinto tipo de suelo, por lo que se buscó determinar en cuales condiciones estas especies presentan mayor actividad biológica. También se encontró que en las diferentes estaciones climáticas de nuestra región las plantas modifican su metabolismo secundario produciendo diferentes compuestos químicos en cantidades también variables. El análisis de los cambios en el perfil metabólico de las plantas se realiza mediante la aplicación de la técnica de metabolómica por Resonancia Magnética Nuclear. Esta técnica permitió identificar los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* sin previo aislamiento de los mismos. A su vez fue posible identificar las condiciones óptimas para la máxima expresión de los principios activos mediante la aplicación de métodos quimiométricos con la información obtenida en metabolómica por RMN. Utilizando los datos obtenidos mediante metabolómica y realizando el fraccionamiento bioguiado se elucidó la estructura del principio activo de *Baccharis articulata*, 7-hidroxi-ent-clerodan-3-en-16-lacton-18-al. También se realizó la estandarización del cultivo de *Baccharis* spp. mediante clonación por esqueje, donde se observó que la técnica empleada es eficaz para la multiplicación y estandarización de cultivos de *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii*. Los resultados obtenidos indican que plantas de nuestra región podrían ser fuente de nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi* para utilizar en el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

1. Introducción

1.1. Mal de Chagas: "Tragedia silenciosa"

“No estalla como las bombas ni suena como los tiros. Como el hambre, mata callando. Como el hambre mata a los callados: a los que viven condenados al silencio y mueren condenados al olvido. Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende. El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que interese a los políticos ni a los periodistas. Elige a sus víctimas en el poverío. Las muere y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas. Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen. Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren.” *Informe clínico*, de Eduardo Galeano, En *Chagas, una tragedia silenciosa*, Médicos Sin Fronteras, Editorial Losada, 2005.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es provocada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se transmite a los humanos por picaduras y la concomitante defecación del insecto vector *Triatoma infestans* ('vinchuca'), que lleva el parásito en sus heces contaminadas. Otras vías de transmisión son la transfusión sanguínea o la infección sanguínea desde la madre infectada a su hijo, o la vía oral por ingestión de alimentos contaminados con parásitos [1]. Se trata de una endemia que afecta a millones de personas generando problemas sanitarios, económicos y sociales en los países afectados [2], está ampliamente difundida en América Central y del Sur, afectando a 21 países en la región. Se ha estimado que la enfermedad afecta entre 9.8 y 11.0 millones de habitantes, mientras que 60.0 millones están en riesgo [3]. Esto obedece a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo o a la residencia en zonas endémicas.

El *Trypanosoma cruzi* presenta un ciclo bastante complejo con distintas formas a lo largo de su ciclo evolutivo. En el insecto vector se pueden observar diferentes estadios. En el estómago del vector ocurre la fase denominada esferomastigote, se caracteriza por presentar una forma redondeada; el estadio epimastigote se encuentra en el intestino del vector, en esta etapa el *Trypanosoma cruzi* se multiplica intensamente por división binaria; y por último se encuentra el estadio tripomastigote metacíclico, que es la forma infectante para el huésped vertebrado [4,5].

Cuando el insecto se alimenta de sangre humana, defeca sobre la piel del hospedero, liberando en las heces parásitos en la forma tripomastigote metacíclicos. Una vez que éstos ingresan al organismo, los tripanosomas se diseminan por vía hemática o linfática, afectando diversos órganos principalmente el corazón, sistema nervioso, músculo y aparato digestivo. Una vez que los parásitos llegan a los tejidos se reproducen, pasando por una etapa no flagelada, denominada amastigote, los cuales son capaces de multiplicarse activamente formando pseudoquistes, en donde se van a transformar a tripomastigotes que luego van a ser liberados (Figura 1) [6].

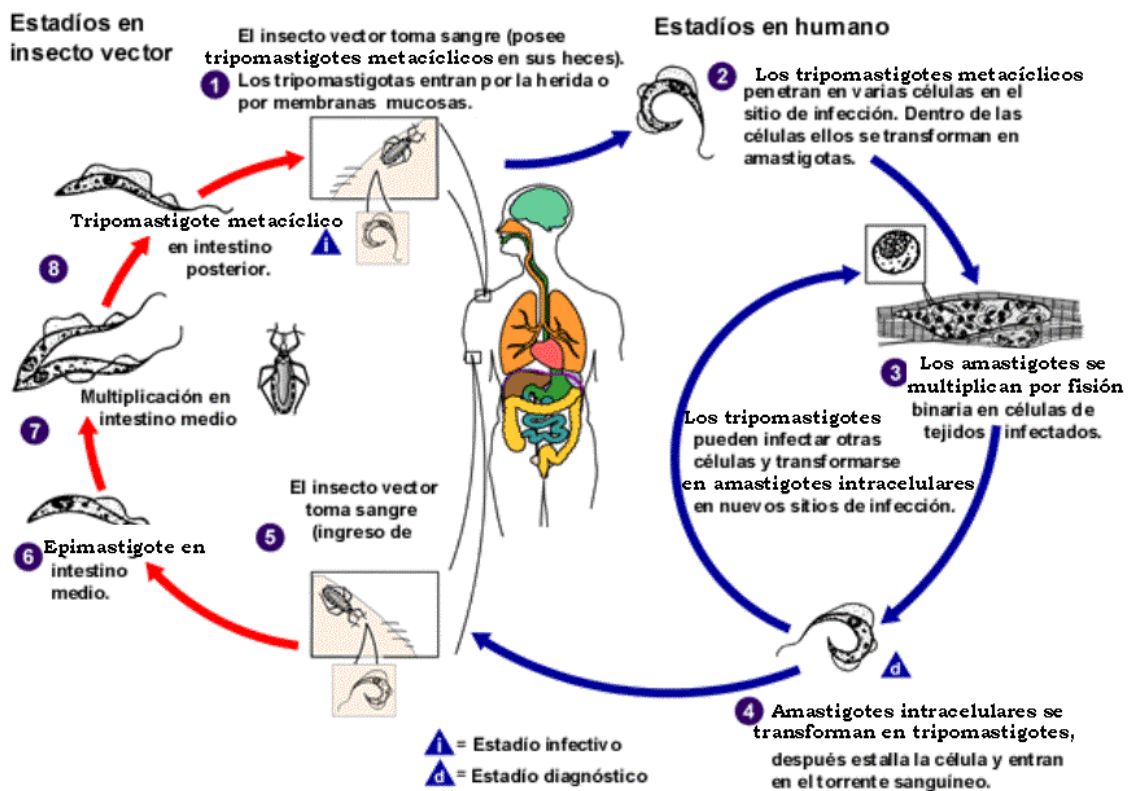


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* [7].

Se estima que el período de incubación de la enfermedad es de entre 5 a 12 días relativo a cada caso, al igual que la aparición de los síntomas y la intensidad de los mismos. Muchas veces no se presenta sintomatología por lo que el diagnóstico a tiempo puede ser muy difícil. En los individuos afectados con el paso del tiempo comienzan a surgir serias afecciones cardíacas y digestivas las cuales pueden derivar en la muerte [8].

Es posible observar tres etapas bien definidas de la enfermedad. La primera de ellas se denomina aguda o inicial, la cual presenta una duración aproximada de dos a cuatro

meses tras la infección. En esta etapa muchas personas no presentan síntomas. La mayoría de los pacientes que presentan síntomas sufren fiebre variable, malestar general, irritabilidad, dolor de cabeza, crecimiento de hígado, bazo y ganglios. Cuando la inoculación es cercana al área ocular se observa el característico chagoma así como un edema unilateral de ambos párpados (Figura 2) [9]. En esta etapa se puede encontrar al parásito en sangre. Algunos casos agudos pueden llegar a ser mortales. Muchos de estos resultan ser niños pequeños y pacientes que están inmunodeprimidos (por ej. personas infectadas con VIH), que pueden desarrollar miocarditis aguda o meningoencefalitis [10].



Figura 2. Fotografía de niño afectado con signo de Romaña [9].

Una segunda etapa indeterminada o también denominada latente, en la cual la parasitemia se vuelve indetectable y suele ser asintomática. Presenta una duración variable. Suele ocurrir entre la semana 8 ó 10 de la fase aguda. Puede durar meses o incluso años. Se estima que aproximadamente el 30% de los individuos que llegan a esta etapa desarrollan problemas digestivos, cardíacos y neurológicos [11].

Por último la fase crónica, la cual aparece de forma tardía. Se caracteriza por presentar problemas cardíacos e intestinales. Puede ocurrir muerte súbita sin que el individuo desarrolle problemas cardíacos [12].

El diagnóstico de esta enfermedad es relativo a la etapa en la que se encuentre el paciente. Se pueden emplear métodos directos (observación microscópica directa, xenodiagnóstico, PCR, etc.) basados en la detección de material genético o de parásitos, o también métodos indirectos (ELISA, IFI, Western blot, etc.) basados en la detección de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, utilizados principalmente en la etapa crónica, ya sea sintomática o asintomática. Estos suelen ser empleados fundamentalmente en la

fase aguda, en el caso de tratarse de personas inmunodeprimidas o menores de 6 meses [13].

A pesar del tiempo transcurrido desde su descubrimiento por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico brasileño que la descubrió en 1909, todavía no se dispone de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la enfermedad [2]. Al igual que otras enfermedades olvidadas, es un importante problema de salud como consecuencia de la terapia inadecuada y la falta de una vacuna eficaz [14]. A pesar de los datos reveladores de la situación actual no ha recibido suficiente atención por parte de la industria farmacéutica, principalmente debido a consideraciones económicas. Los actuales tratamientos farmacológicos se basan en dos compuestos (Figura 3): nifurtimox (Nfx, *N*-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina, Lampit®, recientemente suspendida la producción y venta por parte de la compañía Bayer) y benznidazol (Bnz, *N*-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il)acetamida, Rochagan®, Roche, ahora producido por LAFEPE en Brasil) descubiertos empíricamente hace más de tres décadas atrás. Estos medicamentos son nitroheterociclos que presentan efectos secundarios significativos, por ejemplo, Nfx puede causar la pérdida de peso, erupción cutánea, psicosis, leucopenia, neurotoxicidad, neuropatía periférica, alteraciones del tejido, náuseas y vómitos. Por otra parte, Bnz puede provocar edema, fiebre, erupción cutánea, neuropatía periférica, linfadenopatía, agranulocitosis, púrpura trombocitopénica, dolor articular y muscular. El uso de estos fármacos durante la fase aguda de la enfermedad es ampliamente aceptado, pero su eficacia en la fase crónica es controversial [15].

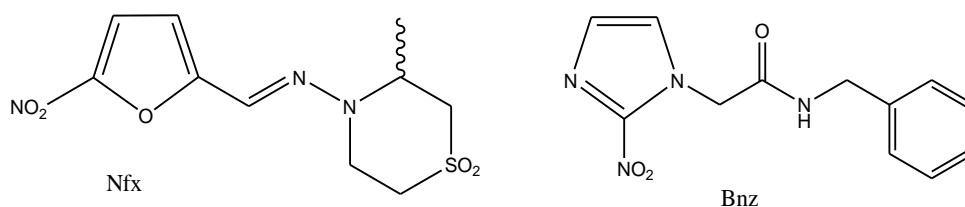


Figura 3. Estructuras químicas de los fármacos nifurtimox (NFX) y benznidazol (Bnz).

La química médica de la enfermedad de Chagas ha utilizado diferentes aproximaciones en la búsqueda de nuevas entidades terapéuticas. Unas orientadas al desarrollo químico (síntesis) de nuevos agentes con mecanismos de acción particulares, como por ejemplo inhibición de rutas biosintéticas específicas del parásito, inhibición o interacción con biomoléculas claves para el parásito, o producción de especies tóxicas

[16,17]. Otras estrategias han estado orientadas a la identificación y aislamiento de nuevos agentes de origen natural [18].

A pesar de estos esfuerzos, aún es de suma importancia el trabajo de investigación en esta área médica olvidada con el objetivo de encontrar nuevas soluciones a un problema que no parece tener fin [15]. Esta investigación busca respuestas en la naturaleza y siempre recuerda la motivación primaria: que las personas afectadas carentes de los recursos necesarios encuentren en su hábitat natural plantas medicinales que provean un posible tratamiento avalado por la ciencia, eficaz y sin efectos secundarios.

En el Uruguay se logró la interrupción vectorial de la enfermedad en 1997, sin embargo son necesarias medidas de control y vigilancia permanente tanto del vector domiciliario *Triatoma infestans* como de Triatomíneos silvestres que continúan siendo reservorios del parásito y comienzan procesos de domiciliación.

1.2. Plantas medicinales

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban. Este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que le ofreció la naturaleza, el ser humano no hubiera sobrevivido. Gradualmente el ser humano, al dominar la naturaleza, ha roto muchos de los lazos que lo unen a ella. Hoy la medicina se vale de fármacos sintéticos para aliviar todas las enfermedades. Muchos de estos fármacos son benéficos, pero también muchos, por mal uso o abuso, han perdido su eficacia y en incontables casos provocan efectos secundarios nocivos [19,20].

En los países latinoamericanos el uso de plantas medicinales es la práctica habitual de los grupos indígenas y es frecuentemente utilizado por ciertos sectores de la sociedad [21]. Esta práctica suele ser una alternativa económica a los precios impuestos por las industrias farmacéuticas y en muchos casos la única posibilidad de tratamiento [21,22]. La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples, debido a la presencia de más de un principio activo. Estos últimos corresponden a compuestos químicos propios de la planta, que están sometidos a variables, tales como humedad del

suelo, condiciones de luz, temperatura, fecha de siembra y cosecha, condiciones de secado, entre otros [23].

Afortunadamente en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, y por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar nuestras afecciones [19].

Los productos naturales continúan siendo una importante fuente de agentes quimioterapéuticos, particularmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas. De las 162 nuevas entidades químicas aprobadas como fármacos anti-infecciosos por las agencias reguladoras en el período 1981-2002, 99 (61%) eran de origen natural (producto natural, o un compuesto sintético derivado de un producto natural) [24]. En las últimas dos décadas, la industria farmacéutica se apartó de la investigación de productos naturales. La atención se desplazó hacia la química combinatoria, que parecía satisfacer la necesidad de bibliotecas de compuestos para mantenerse al día con los ensayos de alto rendimiento basados en dianas moleculares recién descubiertas. Sin embargo, este enfoque no resultó en una mejora de la productividad, ni tampoco en un aumento en el número de nuevos fármacos. El número de nuevas entidades químicas alcanzó un mínimo histórico de 37 en 2001 y sigue disminuyendo. En el mismo año, el número de nuevas solicitudes de medicamentos a la FDA se redujo a sólo 16 [25].

Estas estadísticas enfatizan la importancia de la investigación de productos naturales en el proceso de descubrimiento de fármacos. Además, hay un creciente interés entre los consumidores por el uso de hierbas medicinales. El mercado mundial de agentes fitomedicinales se estimó en 10 billones de dólares en 1997, con un crecimiento anual del 6,5%. Cabe destacar que aún queda mucho por explorar en relación con el uso de plantas como fuente de medicamentos. Se ha estimado que sólo una pequeña fracción de las 250.000 a 500.000 especies de plantas conocidas ha sido objeto de investigaciones fitoquímicas o farmacológicas [26].

Hay muchos incentivos para estudiar los beneficios medicinales de los productos naturales. Para la enfermedad de Chagas, la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos ha llevado en los últimos 15 años a la evaluación de casi 400 especies pertenecientes a más de 100 familias de plantas frente a *T. cruzi*. Muchos procesos de extracción usados

sólo usan un tipo de disolvente y una sola parte de la planta, sin embargo, otras han extraído compuestos de varias partes de la planta y utilizan diferentes disolventes. Por lo general, la parte de la planta sometida al proceso de extracción es el mismo que se utiliza tradicionalmente, pero otras partes pueden ser evaluadas para determinar que parte contiene la mayor concentración de los compuestos activos. Muchos grupos a nivel mundial han obtenido resultados prometedores sobre la exposición al parásito de extractos de varias plantas. Todos estos interesantes resultados podrían conducir posiblemente al descubrimiento de nuevos compuestos activos, especialmente contra las formas intracelulares del parásito. A pesar de la evaluación de cientos de especies, el principal compuesto, sólo se aisló e identificó, y luego se evaluó la actividad antiparasitaria en aproximadamente el 10% de los casos. En la investigación sobre la enfermedad de Chagas, los productos naturales son más a menudo activos contra la forma epimastigote del parásito. Esta forma es más sensible a los medicamentos, y es un modelo fácil para la selección de nuevos derivados de plantas [27].

1.3. Plantas del Uruguay

Dado que numerosos agentes antifúngicos han sido descritos como potentes inhibidores del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* [28], se piensa que plantas de nuestra región con actividad antibacterial y antifúngica ya descrita podrían ser un buen agente para inhibir el crecimiento de este parásito. Este hecho se aplicó en nuestro laboratorio donde se estudió un extracto hidroetanólico de las partes aéreas de *Aristeguietia glutinosa* Lam como tripanosomicida. Se encontró que este extracto descrito anteriormente con actividad antimicrobiana presentó actividad tanto *in vitro* como *in vivo* en un modelo murino agudo de la Enfermedad de Chagas con un mecanismo de acción dual inhibiendo la biosíntesis de esteroides de membrana y las enzimas deshidrogenasas de *T. cruzi*. Además los dos principios activos de este extracto presentaron cada uno de ellos un mecanismo de acción, uno inhibiendo la biosíntesis de esteroides de membrana y el otro las enzimas deshidrogenasas [29,30].

Extractos etanólicos de *Hydrocotyle bonariensis*, *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* han sido descritos como agentes antifúngicos y antibacteriales por grupos de Entre Ríos (Argentina) y San Pablo (Brasil) [31,32]. En particular el extracto etanólico de *Hydrocotyle bonariensis* fue descrito como inhibidor del crecimiento de *Leishmania chagasi*, parásito responsable de la Leishmaniasis [31].

En Uruguay las plantas mencionadas pueden crecer y desarrollarse en distintos tipos de terreno, como ser más arenosos (cerca del mar) o más rocosos (sierras) [32,33], por lo que resulta interesante observar en cuáles condiciones las plantas presentan mayor actividad biológica. A su vez las diferentes estaciones climáticas de nuestra región inciden para que las plantas modifiquen su metabolismo secundario produciendo diferentes compuestos químicos en cantidades también variables, fenómeno que incita a observar en cuáles condiciones climáticas las plantas presentan mayor actividad anti-*Trypanosoma cruzi* [34].

Los metabolitos secundarios difieren de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, acil-lípidos) en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal. Es decir, un metabolito secundario determinado se encuentra con frecuencia en una sola especie vegetal o grupo de especies relacionadas, mientras que los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal [34]. Los metabolitos secundarios incluyen terpenoides, alcaloides, fenilpropanoides y policétidos, entre otros, corresponden a un grupo muy amplio conformado por moléculas pequeñas, que no son estrictamente necesarias para la supervivencia del organismo pero si le ofrecen ciertos beneficios [35].

1.3.1. *Hydrocotyle bonariensis*



Figura 4. Fotografía de *Hydrocotyle bonariensis* en dunas de Punta del Este, Maldonado. (Fotografía: Helena González)

Hierbas perennes, palustres, glabras, tallos rastreros radicantes. Hojas largamente pecioladas, láminas orbiculares peltadas, márgenes lobulado-crenados, de 2 a 10 cm de diámetro. Flores inconspicuas, amarillentas, en umbelas compuestas.

Especie de Sudáfrica, Estados Unidos, Brasil, Uruguay y Argentina. En la región crece en praderas húmedas y pajonales. Florece en verano [34].

1.3.2. *Taraxacum officinale*



Figura 5. Fotografía de *Taraxacum officinale* en Parque Batlle, Montevideo.

(Fotografía: Javier Varela)

Hierbas perennes, acaules, con látex. Hojas arrosetadas, oblongas u oblanceolado-oblongas, glabras. Flores isomorfas, liguladas, amarillas en capítulos de 3 a 5 cm de diámetro, solitarios sobre escapos huecos, desnudos, de la misma longitud o más largos que las hojas, involucreo acampanado.

Especie europea, adventicia y maleza en todo el mundo. En la región es muy común en terrenos modificados. Florece en primavera y verano [34].

1.3.3. *Plantago major*

Hierba perenne que produce rizomas. Sus hojas son arrosetadas, con pecíolos canaliculados de hasta 12 cm de largo, lámina ovada o elíptico-ovada, con o sin pelos, márgenes dentados a sinuados, 3-7 nervios, de hasta 15 cm de largo x hasta 10 cm de ancho. Flores en espigas densas o laxas de hasta 18 cm de largo, dispuestas en los

extremos de ejes que son la continuación del tallo, esos cuerpos tienen hasta 30 cm de largo.

Planta originaria de Europa y Asia. Es naturalizada en toda América. En Uruguay se la encuentra en terrenos bajos y húmedos [33].



Figura 6. Fotografía de *Plantago major* en Cabo Polonio, Rocha. (Fotografía: Helena González)

1.3.4. *Achyrocline satureioides*



Figura 7. Fotografía de *Achyrocline satureioides* en Barra del Chuy, Rocha. (Fotografía: Helena González)

Subarbusto muy ramificado, de 30 a 50 cm de alto, aromáticos, albo-tomentosos. Hojas alternas, enteras, linear-lanceoladas, de 3 a 5 cm de largo por 1,5 a 4 mm de ancho. Flores marginales 4 a 8, femeninas, filiformes, las centrales 1 ó 4, hermafroditas, tubulosas, en capítulos numerosos, en densos glomérulos en los extremos de las ramas; involucre cilíndrico.

Especie del sudeste de Sudamérica. En la región crece en suelos arenosos, secos. Florece en primavera [34].

1.3.5. *Baccharis trimera*



Figura 8. Fotografía de *Baccharis trimera* en Villa Serrana, Lavalleja. (Fotografía: Helena González)

Arbustito dioico, perenne, desprovisto de pelos, glanduloso, de hasta 70 cm de altura, tallos triangularados, carente de hojas o con hojas reducidas. Flores dispuestas en capítulos unisexuados sésiles, de 6-7 mm de altura, en lo alto de las ramillas, en forma de espigas; los capítulos masculinos tienen forma cilíndrica y los femeninos son hemisféricos.

Es una planta del sur de Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. Es muy común en los campos de toda la República. Florece desde fines del verano hasta principios del otoño y a veces hasta bien entrado el invierno [33].

1.3.6. *Baccharis articulata*



Figura 9. Fotografía de *Baccharis articulata* en Villa Serrana, Lavalleja. (Fotografía: Helena González)

Arbustos dioicos, de 0,3-1,5 m de alto, ramas bialadas (alas hasta de 3 mm de ancho), áfilas. Flores en capítulos pequeños, sésiles, en espigas laxas apicales; capítulos masculinos con involucreo acampanado de 3-4 mm de alto, con flores tubulosas; capítulos femeninos con involucreo acampanado de 4-5 mm de alto, con numerosas flores filiformes.

Especie del Brasil austral, Paraguay, Uruguay y norte y centro de Argentina. En la región crece en terrenos altos, bosques y dunas. Florece en primavera [34].

1.3.7. *Baccharis usterii*

Subarbusto ramificado de 0,5-1 m de alto, tallos trialados, con alas planas, glabras, continuas y con 0,5-1,5 cm de largo. Las hojas son ovadas, cortamente pecioladas, trinervadas. Los capítulos están dispuestos en ramos especificiformes, orfenados en panículas amplias; los involucros de los capítulos poseen 5-6 mm de altura y 3-4 mm de diámetro, con brácteas glabras, agudas [37].



Figura 10. Fotografía de *Baccharis usterii* en Villa Serrana, Lavalleja. (Fotografía: Helena González)

1.4. Metabolómica de plantas

La metabolómica se puede definir como la detección y cuantificación de todos los metabolitos de bajo peso molecular en un organismo en un determinado momento y en determinadas condiciones. Pero ajustándose a nuestros propósitos y aplicaciones se puede definir de mejor forma como el área de investigación que busca obtener las huellas digitales metabólicas para detectar las diferencias entre ellas y proponer hipótesis que expliquen las diferencias.

El campo de la metabolómica en la ciencia marca su comienzo cuando Devaux y Horning publican su trabajo de investigación en perfil metabólico donde aplican cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (GC/MS) para el análisis de extractos de tejidos y orina humana [38]. Inmediatamente surge el interés de diferentes grupos en utilizar los perfiles metabólicos para el diagnóstico y seguimiento de distintas patologías [39]. Durante la década de 1970 los estudios en metabolómica se expandieron a un amplio rango de actividades incluyendo: técnicas novedosas para la detección y elucidación de hormonas de insectos [40], identificación de productos naturales de origen marino [41] y agentes quimioterapéuticos derivados de extractos vegetales (ej. *Hyptis tomentosa*) [42]. A comienzos de la década de 1980 surgen los

primeros trabajos en análisis metabólicos automatizados [43] y para mediados de la década se publican los primeros trabajos en investigación de perfiles metabólicos utilizando Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) [44-46]. En 1991, un nuevo enfoque mundial de análisis fue utilizado para estudiar el mecanismo de acción de herbicidas en cebada mediante GC/MS [47]. Para finales del siglo XX la investigación y cooperación entre la comunidad científica permitió el avance en tecnologías aplicadas en metabolómica y en métodos de extracción, promoviendo el desarrollo de bases de datos de metabolitos [48], que permiten acercarnos al desarrollo mundial de los metabolomas completos [49].

En la última década, la metabolómica se ha desarrollado como un importante campo dentro de las Ciencias de las Plantas y la Química de Productos Naturales [50-54]. La huella metabólica, también conocida como perfil metabólico, es un enfoque analítico objetivo que pretende cuantificar un grupo o grupos de compuestos que se encuentran en un organismo o grupo de organismos. El perfil metabólico con cromatografía de gases (GC) y cromatografía de alta performance (HPLC), acoplada a espectrometría de masas, o resonancia magnética de protón (^1H RMN) es útil para el estudio de la bioquímica de la planta, quimiotaxonomía, ecología, farmacología, y control de calidad de plantas medicinales [55,56]. La aplicación de RMN ha sido ya demostrada como un método adecuado y suficiente para llevar a cabo este tipo de análisis, ya que permite la detección simultánea de diversos grupos de metabolitos secundarios, además de abundantes metabolitos primarios [57]. Además la espectroscopia de ^1H NMR posee una gran ventaja sobre las otras técnicas, la intensidad de la señal es dependiente sólo de la concentración molar en la solución, lo que permite la directa comparación de las concentraciones de todos los compuestos presentes en la muestra [58,59]. En los últimos años son varias las publicaciones sobre la evaluación de las diferencias metabólicas en *Cannabis sativa*, *Vanilla planifolia*, *Vitis* spp. y *Catharanthus roseus*, entre otros, y en la clasificación de especies de *Ilex* en base a su metaboloma [58,60,61]. La mayor desventaja en la utilización de espectroscopía de RMN en el análisis metabolómico es la superposición de señales, que sin embargo puede ser resuelto por el uso de diferentes técnicas de 2D-RMN [50,58,61].

Las técnicas empleadas para los análisis metabólicos generan una enorme cantidad de información para responder las preguntas biológicas a las que se las somete [62-65]. Para hacer de la desordenada información metabólica un valioso conocimiento se

requiere una considerable cantidad de etapas de análisis de datos incluyendo pre-procesamiento de datos, análisis estadístico, y el almacenamiento de datos adecuado [66,67]. Hasta ahora, la mejora en tecnologías analíticas hace que los conjuntos de datos de la metabolómica se vuelven gradualmente más grandes y complejos en sus estructuras internas [68]. Esto genera una cobertura completa de la metabolómica, que por ende, demanda más y más quimiometría [69]. Los cuellos de botella de la metabolómica de plantas no sólo son la preparación de la muestra y las plataformas de análisis, sino también e incluso más importante, el análisis de datos. Cambios importantes en la dimensionalidad y complejidad de los conjuntos de datos conducen a un cambio significativo para el descubrimiento de conocimiento. A fin de tener ventajas de los datos de metabolómica la quimiometría se ha convertido en una herramienta fundamental para la extracción de datos valiosos desde la abundante información analítica [68,70]. La quimiometría tiene una completa teoría y metodología para cada paso de la investigación metabolómica, incluidos el muestreo, diseño de experimentos, los datos de tratamiento previo, identificación de metabolitos, la selección de variables y el modelado. La quimiometría coincide perfectamente con el requisito de la investigación metabolómica. La realidad es que la quimiometría es una de las piedras angulares de la metabolómica de plantas. Por otro lado, la complejidad de la metabolómica también propone grandes desafíos en quimiometría para hacer frente a esos datos de alta complejidad [69]. Hoy en día, artículos de revisión y abundantes libros de guía sobre la metabolómica de plantas han sido publicados [71-74] proporcionando valiosa información para los investigadores. Miradas en torno a las habilidades experimentales de la metabolómica, incluyendo la muestra preparación y análisis de metabolitos, también han sido reveladas recientemente [75].

Los instrumentos analíticos no proporcionan listas limpias y comparables de metabolitos y los datos en bruto deben ser procesados para generar una matriz de datos practicable en una variedad de maneras, incluyendo el filtrado de ruido, corrección de línea base, detección de picos, deconvolución, alineación y normalización [76]. El pre-procesamiento de datos es un paso muy importante en el análisis de datos de la metabolómica. El paso clave aquí es la eliminación de la varianza y sesgo en el proceso de análisis de datos para reducir la complejidad y mejorar señales metabólicamente significativas [77]. El desarrollo de algoritmos y herramientas para el procesamiento previo de datos es un tema crítico de la bioinformática y la quimiometría. Como

resultado, muchos algoritmos se han desarrollado y múltiples programas libres se aplican para procesar datos crudos de MS adquiridos por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC/MS) o cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC/MS). Entre estas herramientas, XCMS (<https://xcmsonline.scripps.edu/>) [77,78], MZmine (<Http://sourceforge.net/projects/mzmine/>) [79,80], OpenMS (<http://openms.sourceforge.net/>) [81] y MetAlign (<Http://www.metalign.nl>) [82-85], han atraído atenciones particulares debido a su viabilidad y eficacia. Además, los nuevos programas se han desarrollado de manera constante para aumentar la calidad y la eficiencia del pre-procesamiento de datos, tales como MetSign [86], MSFACTs [87], TagFinder [88,89], IDEA-MET [90], MathDAMP [91] y MetaboliteDetector [92].

El filtrado de ruido está diseñado para separar componentes "señales de fondo procedentes de la matriz química o interferencias instrumentales", quitar la medición de ruidos o errores de línea de base [93]. Convencionalmente, en la corrección de la línea de base de un dato de una vía (cromatográficas o de masa), dos extremos de una señal de pico se señalan manualmente por el analista, a continuación, la aproximación lineal por tramos es aplicada para ajustar una curva a ser la línea de base [94]. Sin embargo, el proceso es manual y requiere mucho tiempo. Su precisión depende en gran medida de las habilidades operativas del usuario [95]. Con el fin de resolver este problema, una gran cantidad de algoritmos se han desarrollado para una mejor estimación de la línea de base. En 1977, Pearson propuso un clásico algoritmo de estimación de corrección de línea de base [96]. Funciona de forma iterativa e inspecciona los puntos en un intervalo específico, tomando en cuenta su desviación estándar. Para este método, la selección de parámetros es extremadamente importante; cualquier pequeño error dará lugar a grandes desviaciones inaceptables. Para superar esta debilidad, numerosas modificaciones se han desarrollado para optimizar el método de corrección de línea de base para que sea más rápido, más robusto y automático. Una gran cantidad de algoritmos por tanto, se propusieron, como la mejora de ajuste de polinomio iterativo [97-102]. Estos algoritmos pueden de forma automática y eficaz corregir la línea de base, independientemente de si es no lineal o lineal. Por otra parte, no requieren experiencias de intervención y conocimiento previo, como la detección de pico, y corren muy rápido y de forma robusta.

La normalización es eliminar la variación de confusión debido a fuentes experimentales, tales como el ruido analítico, el sesgo experimental, y retener la

variación relevante debido a eventos biológicos [76]. Si la señal de la mayoría de todos los metabolitos es estable, una normalización simple y eficiente podría lograrse mediante el cálculo de la proporción relativa de la abundancia de analitos a todos los otros picos, tales como la norma unidad y la mediana de intensidades de normalización [99]. Sin embargo, la asunción de los cambios de concentración, en general insignificantes, es difícil de lograr; las concentraciones totales de analitos pueden cambiar considerablemente debido tanto a errores del sistema de laboratorio como a diferencias de experimentos biológicos a gran escala. En este caso, el escalamiento basado en el cromatograma total puede distorsionar gravemente los datos. Debido a razones analíticas, los errores de medición de metabolitos menores con baja concentración son más grandes que los metabolitos primarios con alta abundancia. Es sabido que los compuestos con concentraciones más bajas serán fácilmente alterados por el ruido analítico. Para hacer que los diferentes metabolitos sean comparables, se requiere realizar escalado para normalizar las varianzas. Diferentes métodos de escalado, tales como autoescala y Pareto se pueden aplicar. Autoescala es el método de normalización más popular utilizado en metabolómica, en la que cada variable tiene igual (unidad) varianza multiplicando por la inversa de la desviación estándar (SD). Pareto es un método más suave que autoescala. Para este método, cada variable se pondera con la inversa de la raíz cuadrada de SD. Se puede aumentar la importancia de los compuestos de baja abundancia sin amplificar significativamente el ruido. Otra estrategia sofisticada para la normalización es el método de estándares internos (ISs), por ejemplo estándares internos marcados isotópicamente y controles de calidad (QC) en cada procedimiento de adquisición de datos [103]. Una normalización integral y representativa basada en estándares internos se basa en un supuesto clave de que la varianza exhibida por los IS únicamente procede con un componente de error sistemático. Desafortunadamente, esta no es siempre la situación real. Tanto la separación cromatográfica insuficiente y la supresión de iones resultará en alteraciones de concentración en uno de los componentes y varianza en la medición de uno diferente. Si tal confusión entre los analitos y los IS se produce, la normalización directa utilizando ISs puede suprimir la señal y dar lugar a la pérdida de información. Hay un principio que dice que el representante que se utiliza para la normalización debe ser similar con el analito, y el error sistemático debe tener un efecto indiscriminado sobre los mismos. El IS es a menudo seleccionado en regiones específicas del tiempo de retención (RT), m/z , o desplazamiento químico (ppm). Sin embargo, el RT

seleccionado, m/z , o ppm, no puede representar a todos los componentes de la matriz ni a todas sus propiedades químicas, lo que redundará en variación de datos con zonas grises [76]. Cualquier IS por sí sólo no puede estimar el error sistemático de una matriz biológica compleja. Por lo tanto, múltiples ISs funcionan mejor en estos casos. Además, el uso de IS debe tratar de disminuir el riesgo de contribución cruzada (CC). Si se seleccionan cuidadosamente las masas que se utilizan para cuantificar el IS, este problema puede ser resuelto fácilmente [104]. Sin embargo, este intento no es trivial en metabolómica porque la muestra biológica es demasiado compleja. Es difícil predecir que iones tendrán CC. La presencia de efectos CC puede causar la pérdida importante de información, especialmente cuando los analitos que interfieren están relacionados con los factores de interés en el conjunto de datos de metabolómica. Redestig y colaboradores presentaron un algoritmo de normalización efectiva que podría compensar los efectos sistemáticos de CC. Es capaz de mejorar la normalización de datos de metabolómica basado en espectrometría de masas [105]. Por otra parte, con el fin de representar la variabilidad global de sistema de medición, se recomienda aplicar el método QC antes de la normalización cuando la visualización de los datos será por PCA (acrónimo del inglés de Análisis de Componentes Principales). Generalmente, QC es un grupo de varios individuos que tienen características similares. Las muestras estudiadas se comparan con QC para evaluar la variabilidad. En el análisis estadístico de multivariantes, como PCA, las muestras de control de calidad deben aparecer estrechamente cercanas en el gráfico de puntuaciones, lo que indica que el sistema analítico tendrá buen rendimiento de reproducibilidad [106].

Para explorar los conjuntos de datos de metabolómica de alta dimensión y descubrir valiosa información sobre eventos biológicos, una serie de métodos de aprendizaje automático son desarrollados para el modelado. Por lo general, estos métodos comienzan con la exploración de datos en ciego y sin supervisión, y luego continúan con el análisis supervisado en el que se utiliza un conocimiento previo de la estructura de datos.

Métodos sin supervisión se utilizan generalmente para explorar la estructura general de un conjunto de datos, la búsqueda de tendencias y agrupaciones dentro del conjunto de datos. Estos métodos aportan una visión imparcial de los datos. Varios métodos no supervisados están disponibles, entre ellos el análisis de componentes principales

(PCA), análisis de conglomerados jerárquico (HCA) y mapeo de auto-organización (SOM) son los ejemplos más utilizados en metabolómica.

PCA es uno de los métodos de análisis estadístico de multivariable más popular en metabolómica [107]. El propósito de PCA es obtener una transformación lineal de las variables de alta dimensión en un pequeño número de factores, llamados componentes principales (PC). Esta transformación define que el primer PC tiene la mayor varianza, y cada siguiente PC tiene a su vez la varianza más grande bajo la restricción de ser ortogonal al PC anterior. PCA produce dos matrices conocidas como puntuaciones (PCs) y cargas. Las puntuaciones muestran la nueva coordinación de la muestras. Las cargas representan el método en el que se combinan las variables originales en PCs lineales. La distribución de muestras puede visualizarse por PCA utilizando un gráfico de las puntuaciones, lo que demuestra la proyección de muestras en un plano abarcado por el primer y segundo PCs. PCA es un método adecuado para resumir los datos de alta dimensión. Sin embargo, este método es incapaz de encontrar la dirección óptima o patrón de variables que puedan separar clases de objetos.

HCA es otro método no supervisado ampliamente utilizado en la modelización de la metabolómica [108]. HCA pretende agrupar muestras que son relativamente similares y aquellas relativamente disímiles estarán en otro grupo. La medida de HCA es una distancia o una matriz de disimilitud (por ejemplo distancias euclidianas, de Mahalanobis o de Minkowski) que representa las diferencias entre las muestras. La elección de la matriz de distancias exhibe significativa influencia en la estructura de la agrupación. Claramente, HCA funciona mejor en los casos donde una estructura jerárquica está disponible. El HCA agrupa los datos que forman un árbol llamado dendrograma. Cuando se utiliza HCA para clasificación, la similitud de corte debe ser decidida en primer lugar. Se puede separar el dendrograma en diferentes grupos. HCA no puede darnos la información acerca de por qué se obtiene una cierta agrupación. Es decir, HCA no puede identificar que metabolitos son correspondientes a las diferencias entre clusters. Este es el principal inconveniente del HCA.

SOM es uno de los algoritmos de redes neurales pertenecientes a la categoría de aprendizaje no supervisado [109]. Para datos de alta dimensión, SOM puede formar una proyección no lineal en una cuadrícula regular, de pocas dimensiones. El agrupamiento

de los datos y las relaciones métricas topológicas de los elementos de datos es claramente visible.

Los métodos supervisados apoyan una estructura previamente conocida de los datos para entrenar a los patrones y normas, utilizándolos para predecir nuevos datos. Una amplia gama de métodos supervisados han sido empleados en metabolómica. La ventaja de estos métodos es que pueden proporcionar variables de información acerca de su capacidad de discriminación entre dos o más clases al modelar; y por lo tanto, son ampliamente utilizados en metabolómica para cribado de biomarcadores. Técnicas supervisadas pueden clasificarse como métodos lineales, tales como mínimos cuadrados parciales - análisis discriminante (PLS-DA), análisis discriminante lineal (LDA), proyecciones ortogonales a las estructuras latentes - análisis discriminante (OPLS-DA), y métodos no lineales, tales como los bosques al azar y máquinas de vectores soporte (SVM). LDA trata de encontrar una función lineal sobre la base de variables originales [108]. Es rápido y potente y no son necesarios los parámetros de optimización. Sin embargo, existen varias limitaciones. LDA utiliza una matriz de covarianza entre clases. Por lo tanto, no siempre es adecuada si la estructura de varianza difiere de varias clases. Además, el número de muestras debe ser mayor que el de las variables [108]. Para la metabolómica de conjunto de datos, es común que el número de muestras sea menor que la de variables. En estos casos, LDA no se puede aplicar directamente. Una posible solución es reducir la dimensión de las variables antes de LDA. Por ejemplo, se puede utilizar un método no supervisado tales como PCA para la reducción de la variable en primer lugar y a continuación aplicar LDA en los PC pertinentes. El número de PCs pueden ser optimizados mediante validación cruzada [111,112].

El método supervisado más utilizado para la clasificación es mínimos cuadrados parciales - análisis discriminante (PLS-DA) [113], que es una combinación de los mínimos cuadrados regresión parcial (PLS) [114] y LDA. Esta técnica es también un enfoque de extracción variable latente, que es similar al PCA. El método supone que los datos podrían ser bien aproximados en un menor subespacio dimensional por variables latentes (LVs). Estos LV se suponen lineales combinados por las variables originales. La primera PC (PC1) se obtiene en la dirección con la mayor varianza de los datos. La primera LV (LV1) de PLS-DA se encuentra en la dirección explicando información de la variación entre clases para los objetos. PLS-DA puede hacer frente a los datos altamente co-lineales. Es una ventaja muy importante de este método. También es

adecuado para los datos de espectrometría. Este método se ha arraigado en la mayoría de softwares comerciales de quimiometría pero todavía es poco conocido por la mayoría de los usuarios [115]. Por ejemplo, el gráfico de proyección de PLS-DA es muy usado para la clasificación en metabolómica porque separa las diferentes clases desde una visión excesivamente optimista [116]. Hay que admitir que hay algunas trampas al usar PLS-DA para modelar los datos de tamaño de las clases desiguales [115]. Sin embargo, PLS-DA puede proporcionar excelentes conocimientos sobre la causa de la discriminación a través de pesos [117], las cargas, coeficientes de regresión [118], VIP [119] y relación de selectividad (SR) [120]; y por lo tanto se ha convertido en una herramienta útil para el descubrimiento de biomarcadores.

La reciente modificación de PLS-DA en proyecciones ortogonales a las estructuras latentes - análisis discriminante (OPLS-DA) [121]. Las variaciones sistemáticas en la matriz de datos X se dividen en dos partes a través de la técnica de corrección de la señal ortogonal (OSC) [122]: una parte exhibe la capacidad de respuesta lineal a la respuesta y otro es linealmente ortogonal a la respuesta. Para OPLS-DA, sólo la variación relacionada con la respuesta es útil para el modelado. Es importante señalar que OPLS-DA tiene similares resultados de predicción que PLS-DA [123]. Pero OPLS-DA tiene mejor visualización y capacidad de interpretación, ya que un menor número de variables latentes están obligadas a explicar la misma variación de los datos en comparación con PLS-DA [124].

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Identificación de nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi* a partir de plantas del Uruguay.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Recolección de *Hydrocotyle bonariensis* (Redondita del agua), *Baccharis trimera* (Carqueja), *Baccharis articulata* (Carqueja), *Baccharis usterii* (Carqueja), *Taraxacum officinale* (Diente de león), *Plantago major* (Llantén), *Achyrocline satureioides* (Marcela), en las cuatro estaciones del año y en los distintos tipos de suelo en los que se encuentran en nuestro país.

2.2.2. Identificación botánica de las muestras recolectadas.

2.2.3. Procesamiento de las muestras (secado, molienda y almacenamiento).

2.2.4. Preparación de extractos etanólicos de todas las muestras.

2.2.5. Evaluación biológica de los extractos obtenidos frente a la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*.

2.2.6. Evaluación biológica de los extractos obtenidos frente a macrófagos murinos. Determinación de índices de selectividad (IS).

2.2.7. Evaluación biológica de los extractos de mayores IS frente a la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi*.

2.2.8. Estudio de los cambios en el perfil químico de los extractos con actividad biológica relevante mediante ^1H RMN.

2.2.9. Identificación de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* y de las condiciones necesarias para su máxima expresión mediante metabolómica por RMN.

2.2.10. Elucidación estructural de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*.

2.2.11. Estandarización del perfil químico de *Baccharis spp* mediante propagación del cultivo utilizando clonación por esqueje.

3. Procedimientos experimentales

3.1. Recolección de las plantas

Las plantas seleccionadas para la recolección son tres especies del género *Baccharis*: *Baccharis trimera*, *Baccharis articulate* y *Baccharis Usterii*; *Hydrocotyle bonariensis*, *Taraxacum officinale*, *Plantago major* y *Achyrocline Satureioides*.

Las plantas seleccionadas se recolectan teniendo en cuenta las siguientes variables:

- Estación climática de recolección. Se colecta en las cuatro estaciones del año.
- Tipo de suelo. Se toman especies de tierra, suelos arenosos y pedregales.
- Parte botánica. Se recoge la totalidad de la planta, las raíces, las hojas y las flores (en los casos de época de floración).

Todas las colectas se realizan entre las 10 y las 12 horas, de forma de no incluir otra variable más al estudio.

3.2. Identificación botánica

La identificación botánica se realiza de acuerdo a los antecedentes fenotípicos de las especies en estudio en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Química, UdelaR. Una parte de las muestras colectadas se conserva en el herbario de nuestro laboratorio y en el herbario de Facultad de Química asignándoles los siguientes números de catálogo: *Baccharis trimera* – N° 4402, *Baccharis articulate* - N° 4403, *Baccharis Usterii* – N° 4404, *Hydrocotyle bonariensis* – N° 4406, *Taraxacum officinale* – N° 4407, *Plantago major* – N° 4408, *Achyrocline Satureioides* – N° 4409.

3.3. Preparación de los extractos

El material vegetal se lava con H₂O destilada y posteriormente se seca en estufa a 40 °C hasta peso constante. Se pesan 10 g del material vegetal seco y se colocan en 150 mL de EtOH (95%) durante 48 h a temperatura ambiente aislado de la luz. Posteriormente se filtra y el material vegetal se coloca nuevamente en 150 mL de EtOH (95%) durante 48 h a temperatura ambiente aislado de la luz. Transcurridas las 48 h se filtra. El material vegetal es desechado, mientras que el extracto etanólico se seca en evaporador rotatorio a vacío a no más de 40 °C, de esta manera se garantiza la conservación de los componentes de la planta [125].

3.4. Ensayo biológico de actividad antiproliferativa anti-*Trypanosoma cruzi*

Cultivos de *T. cruzi*: Epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Tulahuen 2, se cultivan a 28 °C en medio axénico constituido por una infusión cerebro-corazón (33 g/L), triptosa (3 g/L), hemina (0,02 g/L), D-(+)-glucosa (0,3 g/L), estreptomycin (0,2 g/L) y penicilina (200000 U/L) complementado con 10 % de suero bovino fetal. Todos los cultivos, así como todos los ensayos se realizan en condiciones de aerobiosis. En todos los ensayos se trabaja con parásitos en fase exponencial de crecimiento (se utilizan cultivos de 5-7 días de crecimiento, partiendo al día 0 de un repique de 5 millones de parásitos/mL). Ensayo: Se prepara una suspensión de parásitos a una concentración de 4 millones de células/mL y se inocula 0,6 mL/pocillo en una placa de 24 pocillos. Las fracciones a evaluar se preparan en una solución stock de DMSO (solución madre de 12 mg/mL) y se agregan inmediatamente a cada pocillo para dar concentraciones decrecientes (100, 50, 25 µg/mL). Los parásitos son incubados con las fracciones a 28 °C por 5 días. El crecimiento de los parásitos se sigue midiendo el incremento de absorbancia a 610 nm, la cual es proporcional al número de células [126,127]. El porcentaje de inhibición del crecimiento del parásito se calcula de acuerdo a: $\% = \{1 - [(A_p - A_{0p}) / (A_c - A_{0c})]\} \times 100$, donde A_p es A_{610} del cultivo conteniendo el compuesto al día 5; A_{0p} es A_{610} del cultivo conteniendo el compuesto inmediatamente luego de la adición del compuesto (día 0); A_c es A_{610} del cultivo en ausencia de compuesto (control negativo) al día 5; A_{0c} es A_{610} en ausencia del compuesto al día 0. La CI_{50} corresponde a la concentración de extracto o fracción capaz de provocar un 50 % de inhibición de crecimiento. Esta se determina al graficar log (concentración) vs. % Inhibición de crecimiento, ajustando los puntos a una curva Sigmoidea de Boltzmann. Todos los resultados obtenidos son la media de por lo menos tres experimentos independientes.

3.5. Ensayo biológico de actividad citotóxica frente a macrófagos murinos J774.1

Se preparan las soluciones stock en DMSO de los extractos a evaluar. Posteriormente se preparan eppendorfs estériles con medio de cultivo fresco para realizar las diluciones seriadas de los extractos a evaluar. Se toma un volumen de la solución stock tal que en la mayor concentración a ensayar la cantidad de DMSO no supere el 0,5 % y se realizan las diluciones seriadas de los extractos. Se toma una placa de 96 pocillos con macrófagos en confluencia, se quita el medio de cultivo de la placa y se agregan los compuestos diluidos en el medio de cultivo (200 µL por pocillo). Se incuba por 48

horas en estufa a 37°C y 5 % de CO₂. Transcurridas las 48 h se realizan observaciones en microscopio y luego se quita el medio de cultivo. Se prepara una solución de 1 mg de MTT en 10 mL de PBS estéril con 0,2 % glucosa y se coloca en los pocillos, a excepción del blanco de lectura donde se coloca PBS estéril con 0,2 % glucosa sin MTT. Se incuba durante 3 h en estufa a 37°C y 5 % de CO₂. Transcurrido el tiempo indicado se quita el medio de PBS glucosa y se colocan en cada pocillo 180 µL de DMSO y 20 µL de solución tampón de glicina p/MTT para realizar la lectura final en lector de ELISA a 560 nm. El porcentaje de citotoxicidad se calcula de acuerdo a: % = $(1 - \text{Abs muestra}/\text{Abs control "c/DMSO, c/MTT"}) * 100$ [128].

3.6. Ensayo de actividad biológica frente a la forma amastigota de *Trypanosoma cruzi*

Se siembran y se infectan células Vero con tripomastigotes de la cepa Dm28c [129] en una proporción de 10 parásitos por célula. Después de 2 h de la infección de las células Vero, los parásitos no internalizados se lavan y se añaden diferentes concentraciones de los extractos que van desde 5,0 µg/mL a 100 µg/mL. Después de 72 h de la replicación de los amastigotes, las monocapas se lavan y los ensayos se desarrollan usando CPRG como sustrato [130]. El cambio de color se cuantifica midiendo la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas. Los pocillos sin ningún extracto se consideran como el punto de referencia 100% de la replicación de los amastigotes y la CI₅₀ se calcula como el 50% de inhibición de la replicación en comparación con el punto de referencia.

3.7. Obtención de los perfiles químicos mediante ¹H RMN

Se pesan 10 mg de extracto etanólico seco y se disuelven en 600 µL de CD₃OD (99.8 %) + 150 µL de CD₃OD (99.8 % + 0.05% TMS). Los espectros de ¹H-RMN se registraron en espectrómetro Bruker DPX 400 a 22,16 ° C operando a una frecuencia de RMN de protón de 400,13 MHz. Metanol-d₄ fue utilizado para el bloqueo interno. Cada espectro ¹H-NMR consiste de 64 escanes que requieren 10 min y 26 s de tiempo de adquisición con los siguientes parámetros: 0,16 Hz/punto, ancho de pulso (PW) = 30° (11,3 ms), y tiempo de relajación (RD) = 1,5 s. Una secuencia de pre-saturación se utiliza para suprimir la señal de H₂O residual con baja potencia de irradiación selectiva a la frecuencia de H₂O durante el retardo de reciclaje. Se aplica transformada de Fourier sobre FIDs con LB = 0,3 Hz. Se realiza corrección de fase y línea de base de forma

manual sobre los espectros resultantes, y se hace referencia a TMS estándar interno a 0,0 ppm, utilizando el software MestreNova versión 6.0.

3.8. Metabolómica por ^1H RMN

Los espectros de ^1H -RMN se reducen automáticamente a archivos ASCII. Las intensidades espectrales son normalizadas sobre las intensidades totales y se reducen a regiones integradas de igual anchura (0,04 ppm) correspondiente a la región de δ 0,0-10,0 ppm mediante el software AMIX. Las regiones de δ 4,85-4,95 ppm y δ 3,20- 3,40 ppm se excluyen del análisis debido a la señal residual de D_2O y CD_3OD , respectivamente. Análisis de componentes principales (PCA) con escalamiento basado en UV, análisis mínimos cuadrados parciales-análisis discriminante (PLS-DA) y análisis de conglomerados jerárquico (HCA) se realiza con el software SIMCA-P + (v. 12.0, Umetrics, Umea, Suecia) [50].

3.9. Purificación de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*

Se realiza una extracción inicial por gradiente de polaridad a partir de 100 g del material vegetal seco de *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usterii*. Para el gradiente de polaridad se realiza una primera extracción con EP (1 l, 24 h, temperatura ambiente). Transcurridas las 24 h se filtra el material vegetal, se conserva la fracción EP, y el material vegetal es sometido a una extracción con AcOEt (1 l, 24 h, temperatura ambiente). Transcurridas las 24 h se repite el procedimiento y se somete el material vegetal a una última extracción en MeOH (1 l, 24 h, temperatura ambiente). Las tres fracciones son llevadas a sequedad mediante evaporador rotatorio a vacío a no más de 40 °C. Las fracciones obtenidas son evaluadas frente al estadio epimastigote de *Trypanosoma cruzi* (procedimiento en apartado 3.4.), se realiza el espectro de ^1H -RMN de las mismas (apartado 3.6.) y se realiza identificación de grupos químicos principales mediante cromatografía en capa fina (TLC). Como reveladores se utilizan luz UV a 254 nm, revelador Vainillina y Reactivo de Brady. Aquellas fracciones que presentan la mayor actividad biológica son sometidas a cromatografía en capa fina preparativa de sílica gel (Merck, 60-230 mesh) 20 x 20 cm para la purificación de los principios activos. Se utiliza como primer fase móvil una mezcla 1:1:1 de EP:AcOEt: CHCl_3 y como segunda fase móvil una mezcla 1:1:4 de EP:AcOEt: CHCl_3 .

Revelador Vainillina:

Para la preparación del mismo se mezcla 1 g de vainillina en 4 mL de HCl y en 5 mL de H₂SO₄. Se lleva a un volumen final de 100 mL con MeOH. Se rocian las placas y posteriormente se calienta en estufa a 110 °C durante 15 min.

Reactivo de Brady:

Para la preparación del mismo se mezcla 3 g de 2,4-dinitrofenilhidrazina en 15 mL de H₂SO₄. Se añade esta solución, agitando, a 20 mL de H₂O y 70 mL de EtOH (95 %). Se mezcla perfectamente la solución y se filtra.

3.10. Caracterización química de los principios activos mediante RMN

Los espectros de resonancia magnética nuclear se realizan a 22,16 °C en un equipo Bruker DPX 400 que trabaja con el programa Topspin 1.3. Las muestras se preparan en 600 µL de CD₃OD (99.8 %) + 150 µL de CD₃OD (99.8 % + 0.05% TMS). Los espectros de ¹H-RMN se registran operando a una frecuencia de RMN de protón de 400,13 MHz. Metanol-d₄ se utiliza para el bloqueo interno. Cada espectro ¹H-NMR consiste de 64 escanes que requieren 10 min y 26 s de tiempo de adquisición con los siguientes parámetros: 0,16 Hz/punto, ancho de pulso (PW) = 30° (11,3 ms) y tiempo de relajación (RD) = 1,5 s. Se aplica transformada de Fourier sobre FIDs con LB = 0,3 Hz. Se realiza corrección de fase y línea de base de forma manual sobre los espectros resultantes, y se hace referencia a TMS estándar interno a 0,0 ppm, utilizando el software MestreNova versión 6.0. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm y las multiplicidades se designan como: singulete (s), doblete (d), triplete (t), múltiplete (m), doble doblete (dd), doble triplete (dt) y señal ancha (sa). Los ¹³C-RMN se adquieren a 100,033 MHz usando un pulso de 90 °, con un tiempo de adquisición de 1,3664 segundos, abarcando un ancho espectral de 230 ppm. Para los experimentos de correlación homo y heteronuclear COSY, HSQC y HMBC se utilizan las secuencias de pulsos disponibles en el software del equipo.

3.11. Estandarización del perfil químico mediante propagación de cultivo de *Baccharis spp* mediante clonación por esqueje

El suelo armado consta de tierra negra 1/3, humus de lombriz 1/3, arena 1/3. Se arman camas altas colocando fardos en un cantero de 1 x 6 m y por encima de estos la mezcla de tierra, arena y compost. Se utiliza el agregado del fertilizante EM

(microorganismos eficientes) en el riego cada 15 días para la activación biológica del suelo. Se colectan plantas enteras de *Baccharis articulata*, *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii* en la localidad de Villa Serrana (15/03/2015) y son trasladadas hacia el campo experimental. A partir de las plantas madre se realizaron los esquejes de 12-15 cm y se colocaron en la tierra a una profundidad tal que cubra 3 yemas, distribuidos según la especie. A cada uno se le coloca firmemente un vaso invertido transparente de modo de generar un microclima que conserve la humedad evitando así la deshidratación previa al enraizamiento. Se riega una vez por semana con el agregado de EM de manera alternada.

Una vez establecido el cultivo, aproximadamente un año después, se colectan las partes aéreas de las especies y se realizan los extractos etanólicos según apartado 3.3. Posteriormente se obtienen los perfiles químicos de los cultivos desarrollados según apartado 3.7.

4. Resultados y discusión

4.1. Colecta y preparación de extractos

Se seleccionan las plantas nativas uruguayas *Baccharis trimera*, *Baccharis articulate* y *Baccharis Usterii*; *Hydrocotyle bonariensis*, *Taraxacum officinale*, *Plantago major*, *Achyrocline Satureioides* de acuerdo a sus propiedades anti-fúngicas, anti-bacterianas y anti-parasitarios descritas.

Se colectan 82 muestras de las todas las especies en estudio en distintos puntos geográficos del Uruguay (Figura 11). La colecta se realiza siempre antes del mediodía y seleccionando plantas al azar dentro de un espacio físico definido. Como forma de asegurar la especie botánica que se ha recolecta se realiza la identificación botánica de las especies usando las características morfológicas y estructurales de las mismas.



Coordendas geográficas de los puntos de colecta:

Facultad de Ciencias 34° 52' S 56° 7' O

Parque Batlle 34° 53' S 56° 9' O

Barra del Chuy 33° 43' S 53° 22' O

Villa Serrana 34° 19' S 54° 59' O

Santa Teresa 34° 2' S 53° 54' O

Punta del Este 34° 56' S 54° 54' O

Pozos Azules 34° 44' S 55° 18' O

Cuchilla Alta 34° 47' S 55° 29' O

Cabo Polonio 34° 24' S 53° 47' O

Jaureguiberry 34° 46' S 55° 25' O

Figura 11 - Mapa de Uruguay indicando los puntos de colecta y a la derecha se muestra las coordenadas geográficas de los puntos de colecta.

Se realizan los extractos etanólicos de todas las muestras colectadas y se determinan los rendimientos de extracción. Se obtienen rendimientos entre 15 y 18 % en los extractos de plantas del género *Baccharis* y entre 10 y 12 % en muestras de *Achyrocline satureioides*. Cabe destacar que los extractos mencionados anteriormente se preparan con las partes aéreas de las plantas (hojas y flores). Las muestras de *Hydrocotyle bonariensis*, *Taraxacum officinale* y *Plantago major* se dividen en las distintas partes de las plantas. En *Hydrocotyle bonariensis* los extractos de hojas presentan rendimientos de extracción entre 14 y 16 %, los tallos y rizomas entre 6 y 10 %, mientras que las flores entre 5 y 8 %. En *Taraxacum officinale* los extractos de hojas presentan

rendimientos de extracción entre 10 y 12 %, las raíces entre 5 y 8 % y las flores entre 6 y 9 %. Por último en *Plantago major* las hojas presentaron rendimientos de extracción entre 10 y 13 %, las raíces entre 6 y 10 % y las flores entre 8 y 10 %. Se observa que las hojas de todas las especies presentan mayor rendimiento de extracción con la metodología utilizada.

4.2. Evaluación biológica

Posteriormente se evalúa la capacidad antiproliferativa de todos los extractos preparados frente a la forma epimastigote de *Trypanosoma cruzi*. Se observó que las plantas del género *Baccharis* presentan relevante actividad antiproliferativa al igual que *Hydrocotyle bonariensis*. Los extractos de *Taraxacum officinale*, *Achyrocline satureioides* y *Plantago major* no presentan actividad antiparasitaria a una dosis máxima de 100 µg/mL. De acuerdo a estudios previos de extractos naturales con actividad antiparasitaria se elabora un rango para clasificar los extractos según su capacidad de inhibición del crecimiento de *Trypanosoma cruzi* (Tabla 1) [131,132].

Tabla 1 - Clasificación según capacidad de inhibición del crecimiento de *T. cruzi*.

CI ₅₀ (µg/mL) ^a	Actividad anti- <i>T. cruzi</i>
≤ 10	Excelente
10 < CI ₅₀ ≤ 40	Relevante
40 < CI ₅₀ ≤ 100	Buena
> 100	No interesante

^a Concentración que inhibe el 50 % de crecimiento de *T. cruzi*

Los extractos de flores de *Hydrocotyle bonariensis* presentan excelente actividad anti-*T. cruzi* particularmente en el caso de suelo arenoso y en la época de verano, mientras que los extractos de tallos y rizomas de la misma planta mostraron en la mayoría de los casos relevante actividad. No así las muestras de hojas de *Hydrocotyle bonariensis* que salvo alguna excepción no presentaron interesante actividad anti-*Trypanosoma cruzi* (Tabla 2). Las muestras de *Baccharis trimera* presentaron buena actividad antiproliferativa, habiendo además algunos ejemplos de relevante actividad (Tabla 3). Lo mismo sucede con *Baccharis articulata* que presentó buena actividad biológica y también ejemplos de relevante actividad (Tabla 4). La última de las especies del género *Baccharis* en estudio, *Baccharis usterii*, también presentó buena actividad anti-*T. cruzi* con ejemplos de relevante actividad (Tabla 5).

Tabla 2 - Actividad antiproliferativa frente a epimastigotes de *T. cruzi*, citotóxica inespecífica en células mamíferas y selectividad de *Hydrocotyle bonariensis*.

Especie	Fecha, suelo	Lugar de colecta	Parte vegetal	Act anti- <i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (µg/mL) ^a	Citotoxicidad CI ₅₀ (µg/mL) ^b	IS ^c
<i>Hydrocotyle bonariensis</i>	Feb 2012, arena	Santa Teresa	Hojas	23,3 ± 0,4	11,0 ± 1,3	0,5
	Feb 2012, arena	Santa Teresa	Tallos y rizomas	7,6 ± 0,9	12,0 ± 1,2	1,6
	Feb 2012, arena	Santa Teresa	Flores	5,2 ± 1,6	7,8 ± 1,2	1,5
	Jun 2012, rocas/arena	Cuchilla Alta	Hojas	46,5 ± 5,0	37,0 ± 1,3	0,7
	Jun 2012, tierra	Facultad de Ciencias	Tallos y rizomas	55,0 ± 4,2	15,6 ± 1,5	0,3
	Set 2012, arena	Barra del Chuy	Hojas	98,3 ± 2,1	60,0 ± 3,1	0,6
	Set 2012, arena	Barra del Chuy	Tallos y rizomas	56,5 ± 3,8	15,0 ± 1,3	0,3
	Dic 2012, arena	Punta del Este	Tallos y rizomas	61,8 ± 3,1	14,0 ± 0,9	0,2
	Feb 2013, arena	Punta del Este	Hojas	89,6 ± 3,3	13,0 ± 1,1	0,1
	Feb 2013, arena	Punta del Este	Tallos y rizomas	36,7 ± 2,9	14,0 ± 1,3	0,4
	Feb 2013, arena	Punta del Este	Flores	8,6 ± 0,9	7,8 ± 0,8	0,9
	Mar 2013, arena	Barra del Chuy	Tallos y rizomas	44,4 ± 2,9	<7,8	<0,2
	Ago 2013, arena	Punta del Este	Tallos y rizomas	22,3 ± 2,9	<7,8	<0,3
	Ago 2013, arena	Facultad de Ciencias	Tallos y rizomas	24,1 ± 3,2	7,8 ± 0,9	0,3
	Oct 2013, arena	Cabo Polonio	Hojas	91,7 ± 3,2	17,0 ± 1,1	0,2
	Dec 2013, arena	Punta del Este	Hojas	36,2 ± 2,4	31,2 ± 2,4	0,8
	Dec 2013, arena	Punta del Este	Tallos y rizomas	48,1 ± 1,2	45,0 ± 1,3	0,9
	Feb 2014, arena	Punta del Este	Tallos y rizomas	84,0 ± 3,1	13,0 ± 1,2	0,1
	Feb 2014, arena	Punta del Este	Flores	30,9 ± 2,7	<7,8	<0,2
	Feb 2014, arena	Santa Teresa	Tallos y rizomas	61,5 ± 3,1	<7,8	<0,1
Feb 2014, arena	Santa Teresa	Flores	22,4 ± 3,2	<7,8	<0,3	

^a Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de *T. cruzi* ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones, ^b Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de macrófagos murinos J774.1 ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones. ^c Índice de selectividad definido como el cociente entre la CI_{50, citotoxicidad}/CI_{50, T. cruzi}. Como fármaco de referencia se utiliza Nfx IC_{50 T. cruzi} = 7,0 ± 1,0, IC_{50, citotoxicidad} = 316,0 ± 0,5 los valores son µM y son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. IS= 45.

En paralelo con la evaluación de la actividad anti- *T. cruzi* de los extractos se evalúa la actividad citotóxica en células mamíferas de macrófagos murinos J774.1 de los

extractos que presentaron al menos buena actividad biológica y de esa forma determinar la selectividad de los mismos. Para ello se calcula el índice de selectividad (IS) como el cociente entre la actividad citotóxica y la actividad antiparasitaria. Un índice de selectividad por encima de uno indica selectividad del extracto hacia el parásito con respecto a las células de mamífero.

Tabla 3 - Actividad antiproliferativa frente a epimastigotes de *T. cruzi*, citotóxica inespecífica en células mamíferas y selectividad de *Baccharis trimera*.

Especie	Fecha, suelo	Lugar de colecta	Parte vegetal	Act anti- <i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (µg/mL) ^a	Citotoxicidad CI ₅₀ (µg/mL) ^b	IS ^c
<i>Baccharis trimera</i>	Feb 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas y flores	51,5 ± 7,6	67,0 ± 2,1	1,3
	Feb 2012, arena	Punta del Este	Hojas y flores	97,5 ± 3,5	38,0 ± 1,6	0,4
	Feb 2012, arena	Santa Teresa	Hojas y flores	68,9 ± 11,7	37,5 ± 1,3	0,5
	Jun 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas y pocas flores	49,6 ± 2,9	37,0 ± 1,4	0,7
	Jun 2012, rocas/arena	Cuchilla Alta	Hojas y flores	43,4 ± 2,9	73,0 ± 2,4	1,7
	Dic 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas	52,0 ± 2,7	37,0 ± 1,3	0,7
	Feb 2013, arena	Punta del Este	Hojas y flores	68,1 ± 2,0	75,0 ± 2,6	1,1
	Feb 2013, sierras	Pozos Azules	Hojas y flores	13,6 ± 1,2	37,0 ± 1,3	2,7
	Mar 2013, arena	Barra del Chuy	Hojas y flores	43,4 ± 2,7	75,0 ± 2,2	1,7
	Ago 2013, sierras	Villa Serrana	Hojas y pocas flores	86,5 ± 4,9	40,0 ± 1,4	0,5
	Ago 2013, arena	Punta del Este	Hojas y flores	18,3 ± 2,4	75,0 ± 2,5	4,1
	Oct 2013, arena	Cabo Polonio	Hojas	30,9 ± 2,5	> 150	>4,8
	Feb 2014, sierras	Villa Serrana	Hojas y flores	64,7 ± 2,1	> 150	>2,3

^a Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de *T. cruzi* ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones, ^b Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de macrófagos murinos J774.1 ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones. ^c Índice de selectividad definido como el cociente entre la CI_{50, citotoxicidad}/ CI_{50, T. cruzi}. Como fármaco de referencia se utiliza Nfx IC₅₀ *T. cruzi* = 7,0 ± 1,0, IC_{50, citotoxicidad} = 316,0 ± 0,5 los valores son µM y son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. IS= 45.

En el caso de *Hydrocotyle bonariensis*, donde como ya se mencionó se observaron actividades anti- *T. cruzi* de excelentes a buenas, particularmente en muestras de flores, se observó una citotoxicidad en células mamíferas considerable que resulta en IS < 1 en la mayoría de los casos. Sólo se observó una leve selectividad (IS ~1,5) en los extractos de flores de suelo arenoso de febrero de 2012 (Tabla 2).

En el caso de *Baccharis trimera* que presentó de relevantes a buenas actividades anti-*T. cruzi* y baja citotoxicidad en células mamíferas en varios casos. Cabe destacar que se obtuvieron buenos índices de selectividad para varios ejemplos. Algunos de ellos son las colectas de Febrero de 2013 en Pozos Azules (Maldonado), Agosto de 2013 en Punta del Este (Maldonado), Octubre de 2013 en Cabo Polonio (Rocha) y Febrero de 2014 en Villa Serrana (Lavalleja). Lo que en este caso a diferencia del caso de la *Hydrocotyle bonaerensis* no parece importar el tipo de suelo de donde se recolectó la planta (Tabla 3).

Tabla 4 - Actividad antiproliferativa frente a epimastigotes de *T. cruzi*, citotóxica inespecífica en células mamíferas y selectividad de *Baccharis articulata*.

Especie	Fecha, suelo	Lugar de colecta	Parte vegetal	Act anti- <i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (µg/mL) ^a	Citotoxicidad CI ₅₀ (µg/mL) ^b	IS ^c
<i>Baccharis articulata</i>	Feb 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas	23,0 ± 3,0	94,0 ± 2,6	4,1
	Feb 2012, sierras	Jaureguiberry	Hojas	22,5 ± 4,0	78,0 ± 1,7	3,5
	Dic 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas	99,5 ± 2,3	35,0 ± 1,5	0,4
	Feb 2013, arena	Santa Teresa	Hojas	43,6 ± 3,2	30,0 ± 2,4	0,7
	Ago 2013, sierras	Villa Serrana	Hojas y flores	51,9 ± 4,2	60,0 ± 2,1	1,2
	Ago 2013, arena	Punta del Este	Hojas y flores	33,7 ± 2,4	60,0 ± 1,9	1,8
	Dic 2013, arena	Punta del Este	Hojas y flores	59,8 ± 2,7	150,0 ± 2,7	2,5
	Feb 2014, sierras	Villa Serrana	Hojas	16,6 ± 2,0	100,0 ± 2,9	6,0

^a Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de *T. cruzi* ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones, ^b Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de macrófagos murinos J774.1 ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones. ^c Índice de selectividad definido como el cociente entre la CI_{50, citotoxicidad}/CI_{50, T. cruzi}. Como fármaco de referencia se utiliza Nfx IC₅₀ *T. cruzi* = 7,0 ± 1,0, IC_{50, citotoxicidad} = 316,0 ± 0,5 los valores son µM y son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. IS= 45.

Los resultados obtenidos para las muestras de *Baccharis articulata* que al igual que su congénere *Baccharis trimera* mostraron de relevante a buena actividad biológica y baja citotoxicidad inespecífica, resultando también en buenos IS. Algunos ejemplos con buenos IS son las muestras de Febrero de 2012 de Villa Serrana (Lavalleja), Febrero de 2012 de Jaureguiberry (Canelones) y Febrero de 2014 de Villa Serrana (Lavalleja) (Tabla 4).

Las muestras de *Baccharis usterii* también presentaron de relevante a buena actividad anti- *T. cruzi*, pero muestra cierta citotoxicidad que resulta en bajos IS para la mayoría de los casos. Los valores de citotoxicidad fueron similares para las 4 muestras pero si varía su actividad anti-*T. cruzi* por lo que se podría inferir que no son los mismos metabolitos los responsables de ambas actividades. Este hecho se observó en la colecta de Febrero de 2013 de Pozos Azules (Maldonado) donde se obtuvo una relevante actividad biológica resultando en un buen índice de selectividad.

Tabla 5 - Actividad antiproliferativa frente a epimastigotes de *T. cruzi*, citotóxica inespecífica en células mamíferas y selectividad de *Baccharis usterii*.

Especie	Fecha, suelo	Lugar de colecta	Parte vegetal	Act anti- <i>T. cruzi</i> CI ₅₀ (µg/mL) ^a	Citotoxicidad CI ₅₀ (µg/mL) ^b	IS ^c
<i>Baccharis usterii</i>	Dic 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas	55,2 ± 3,9	53,0 ± 2,2	0,9
	Feb 2013, sierras	Pozos Azules	Hojas	21,9 ± 1,7	60,0 ± 1,8	2,7
	Ago 2013, sierras	Villa Serrana	Hojas y flores	87,5 ± 6,2	50,0 ± 2,4	0,6
	Feb 2014, sierras	Villa Serrana	Hojas	78,4 ± 3,6	65,0 ± 2,7	0,8

^a Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de *T. cruzi* ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones, ^b Concentración de extracto que inhibe el 50% de crecimiento de macrófagos murinos J774.1 ± desviación estándar y son el promedio de 3 repeticiones. ^c Índice de selectividad definido como el cociente entre la CI_{50, citotoxicidad}/ CI_{50, T. cruzi}. Como fármaco de referencia se utiliza Nfx IC_{50, T. cruzi} = 7,0 ± 1,0, IC_{50, citotoxicidad} = 316,0 ± 0,5 los valores son µM y son el promedio de 3 repeticiones ± desviación estándar. IS= 45.

Para aquellos extractos de las tres especies del género *Baccharis* que presentaron relevantes IS se realizó la evaluación de la capacidad antiproliferativa de la forma amastigote de *Trypanosoma cruzi*. Los extractos seleccionados fueron para *Baccharis trimera* las colectas de Punta del Este de agosto 2013 (CI_{50, T. cruzi} = 68,1 ± 2,0 µg/mL), Cabo Polonio de Octubre 2013 (CI_{50, T. cruzi} = 30,9 ± 2,5 µg/mL) y Pozos Azules de febrero 2013 (CI_{50, T. cruzi} = 13,6 ± 1,2 µg/mL). Para *Baccharis articulata* fueron seleccionadas las colectas de Villa Serrana de febrero 2012 (CI_{50, T. cruzi} = 23,0 ± 3,0 µg/mL) y Villa Serrana de Febrero 2014 (CI_{50, T. cruzi} = 16,6 ± 2,0 µg/mL). En el caso de *Baccharis usterii* fue seleccionada la colecta de Pozos Azules de Febrero 2013 (CI_{50, T. cruzi} = 21,9 ± 1,7 µg/mL).

Los amastigotes son la forma patógena relevante intracelular del parásito en el huésped humano o animal, por consiguiente una buena actividad de un extracto reafirma la relevancia del mismo como un candidato potencial para la terapia de la enfermedad

de Chagas. Los resultados observados en la forma amastigote están de acuerdo con los hallazgos en la forma epimastigote. Los mejores índices de selectividad encontrados fueron dos extractos de *Baccharis trimera*, de Cabo Polonio y Pozos Azules (Tabla 6). El mejor valor de actividad biológica contra los amastigotes se visualiza en el extracto de *Baccharis trimera* de Pozos Azules ($CI_{50} = 9,9 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$) y la mejor selectividad se puso de manifiesto en el extracto de *Baccharis trimera* de Cabo Polonio ($IS > 5,4$). Los otros extractos mostraron buenos a excelentes índices de selectividad, siempre valores superiores a 2,1.

Tabla 6 - Actividad antiproliferativa frente a la forma amastigote de *T. cruzi* y selectividad.

Especie	Fecha, suelo	Lugar de colecta	Parte vegetal	Act. anti- <i>T.cruzi</i> CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^a	IS ^b
<i>Baccharis trimera</i>	Ago 2013, arena	Punta del Este	Hojas y flores	$18,1 \pm 1,1$	4,1
	Oct 2013, arena	Cabo Polonio	Hojas	$27,9 \pm 2,5$	>5,4
	Feb 2013, sierras	Pozos Azules	Hojas y flores	$9,9 \pm 0,8$	3,7
<i>Baccharis articulata</i>	Feb 2012, sierras	Villa Serrana	Hojas	$39,0 \pm 5,3$	2,4
	Feb 2014, sierras		Hojas	$22,3 \pm 1,1$	4,5
<i>Baccharis usterii</i>	Feb 2013, sierras	Pozos Azules	Hojas	$28,1 \pm 6,9$	2,1

^a Concentración que inhibe el 50% del crecimiento de amastigotes de *T. cruzi*; valores son en $\mu\text{g/mL}$ y son el promedio \pm desviación estándar. ^b Índice de selectividad definido como el cociente entre la CI_{50} citotoxicidad (Tablas 3-5) / CI_{50} *T. cruzi* (amastigotes). Como fármaco de referencia se utiliza Bnz CI_{50} , *T. cruzi* = $0,90 \pm 0,05 \mu\text{M}$ y son el promedio de 3 repeticiones \pm desviación estándar.

4.3. Metabolómica por ¹H-RMN

Con el fin de identificar los metabolitos responsables de la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* y las condiciones requeridas para su máxima expresión se procedió a aplicar la técnica de metabolómica por ¹H-RMN. Antes de comenzar a trabajar con los espectros de ¹H-RMN de todos los extractos obtenidos se realizó una búsqueda bibliográfica para obtener listas de metabolitos descriptos para las especies que mostraron los mejores resultados biológicos:

- En *Baccharis trimera* se han descripto saponinas, diterpenos de tipo *ent*-clerodano y flavonoides como quercetina, gencavanina, circimaritina, hispidulina, apigenina, luteolina, nepetina, rutina y genkwanina [133-137].

- En *Baccharis articulata* fueron descritos flavonoides, taninos y terpenos, siendo los terpenoides los compuestos más abundantes, incluyendo varios triterpenos [138]. Dos diterpenos de tipo neoclerodano, articulina I y acetato de articulina también han sido descritos [139]. Otros componentes descritos fueron el ácido crisosapónico, ácido resínico, ácido oleanólico; el terpeno lupeol y flavonoides como santonina, absintina, luteolina, quercetina, genkwanina, acacetina, 7,4-dimetil-apigenina, circimaritina, salvigenina, jaceidina, jaceosidina, condriasterol [140]. En las flores fueron encontrados un diterpeno furánico, barticulidiol, y un diterpeno clerodano, bacotricuneatina A [141].

- Para *Baccharis usterii* no existe en la bibliografía consultada trabajos que describan la composición química de la planta.

- En *Hydrocotyle bonariensis* existen trabajos que describen que las hojas contienen alcaloides, flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y saponinas [142]. De las partes subterráneas de la planta fueron aislados e identificados algunos triterpenos de tipo oleanano [143].

Nuestros antecedentes en la búsqueda de compuestos naturales como nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi*, indican que generalmente son los compuestos terpenoides los responsables de la actividad biológica. En particular los diterpenos y triterpenos [29,30]. Pero no es posible descartar la acción sinérgica entre varios componentes de los extractos.

Se realizaron los espectros de ^1H -RMN de todas las muestras de las tres especies del género *Baccharis* y de *Hydrocotyle bonaerensis* y toda la información obtenida de los mismos fue sujeta a análisis mediante PCA, PLS-DA, OPLS-DA y HCA con el objetivo de elucidar las diferencias en los perfiles químicos relacionados con la actividad biológica y actividad citotóxica.

Se realizó un PCA de 10 componentes que explica el 91,6% de la varianza, con los 3 primeros componentes explicando el 70,4%, para observar las diferencias entre los perfiles químicos entre las especies del género *Baccharis*. Aunque las muestras se colectaron en diferentes puntos geográficos y diferentes estaciones climáticas, las poblaciones son claramente diferenciables mediante PCA, donde se observan 2 grupos bien separados (Grupo A - *Baccharis trimera*, Grupo B - *Baccharis articulata*). Las

muestras de *Baccharis usterii* se encuentran separadas de ambos grupos pero además con cierta separación entre ellas (Figura 12A). Para una discriminación más fina se realizó un análisis OPLS-DA que permita observar diferencias entre las especies *Baccharis articulata* y *Baccharis trimera*. Como resultado se observó una clara separación entre las dos especies con un valor p de 4.09×10^{-16} (Figura 12B), este valor indica una buena predicción para el modelo empleado [144,145]. El análisis del gráfico de las saturaciones nos permita identificar que las señales de ^1H -RMN de los componentes principales de ambas especies, y que generan las diferencias entre los perfiles químicos, corresponden a diferentes diterpenos que además se correlacionan con señales entre 9 y 10 ppm que indicarían la presencia de grupos aldehídos en los compuestos. La presencia de este tipo de compuestos en los extractos permite vincularlos directamente con la actividad biológica observada para estos extractos dado que en trabajos previos de nuestro grupo se purificó un principio activo de la planta ecuatoriana *Aristeguietia glutinosa* de similar naturaleza química. Este compuesto es un aldehído diterpeno (con excelentes propiedades anti-*T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo* [29,30]).

Para observar si existe una relación entre las diferentes especies congéneres se realizó un análisis por clusters HCA, donde se observó una separación en dos grupos principales (Figura 12C). El grupo 1 está formado por las especies *Baccharis usterii* y *Baccharis articulata*, mientras que el grupo 2 está formado por *Baccharis trimera*. Estos resultados permiten confirmar la similitud entre los perfiles químicos obtenidos en extractos de *Baccharis usterii* y *Baccharis articulata* y que probablemente compartan un antecesor común. La información obtenida de los espectros de ^1H -RMN indica que los terpenoides, particularmente diterpenos, son los componentes principales en los extractos y las diferencias y similitudes entre grupos están directamente relacionadas con la presencia o ausencia de estos compuestos. Es importante destacar que el análisis HCA no permite identificar señales responsables de los agrupamientos resultantes.

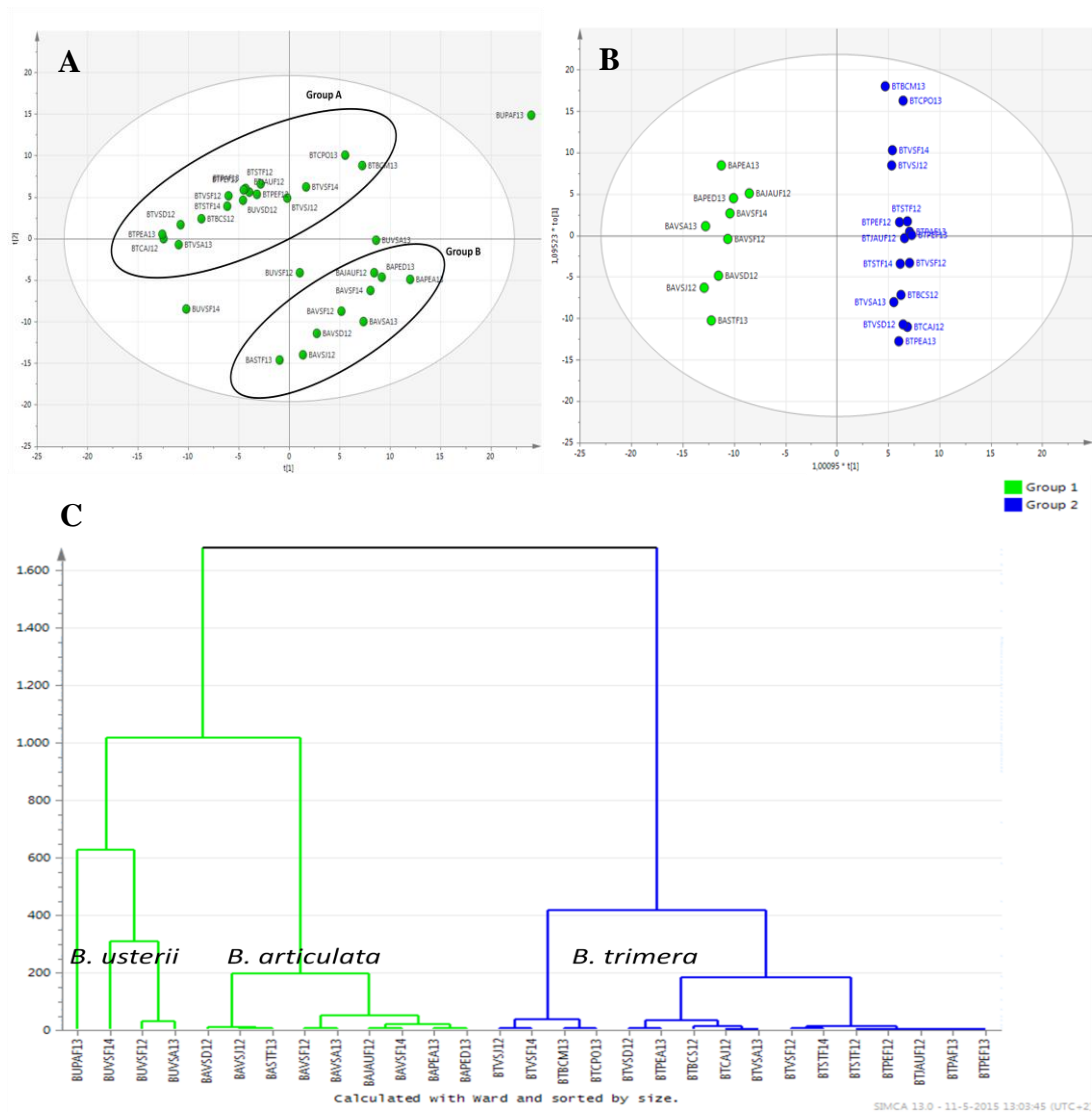


Figura 12 - A) Gráfico de resultados de PCA basado en la información de $^1\text{H-NMR}$ para comparar perfiles químicos de tres especies del género *Baccharis*. B) Gráfico de resultados de OPLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido con toda la información de los $^1\text{H-NMR}$ de *Baccharis* spp. Azul: *Baccharis trimera*. Verde: *Baccharis articulata*. C) Dendrograma de análisis HCA de *Baccharis* spp. Verde: *Baccharis usterii* y *Baccharis articulata*. Azul: *Baccharis trimera*.

Las muestras de *Baccharis trimera* fueron clasificadas según su actividad biológica (ranking establecido en Tabla 1) y se aplicó un análisis de PLS-DA para observar la relación entre los cambios en el perfil químico de los extractos y su actividad biológica. En la Figura 13 se observa como el grupo de muestras de mayor actividad biológica se separa claramente del resto de las muestras. Para los grupos de baja actividad biológica no se obtuvo una buena separación por este método. Se observó que las señales de $^1\text{H-}$

RMN más relacionadas con el grupo rojo y que las separan del resto son: 9,60, 9,40, 6,36, 5,68, 5,24, 5,20, 2,28, 0,80 y 0,68 ppm.

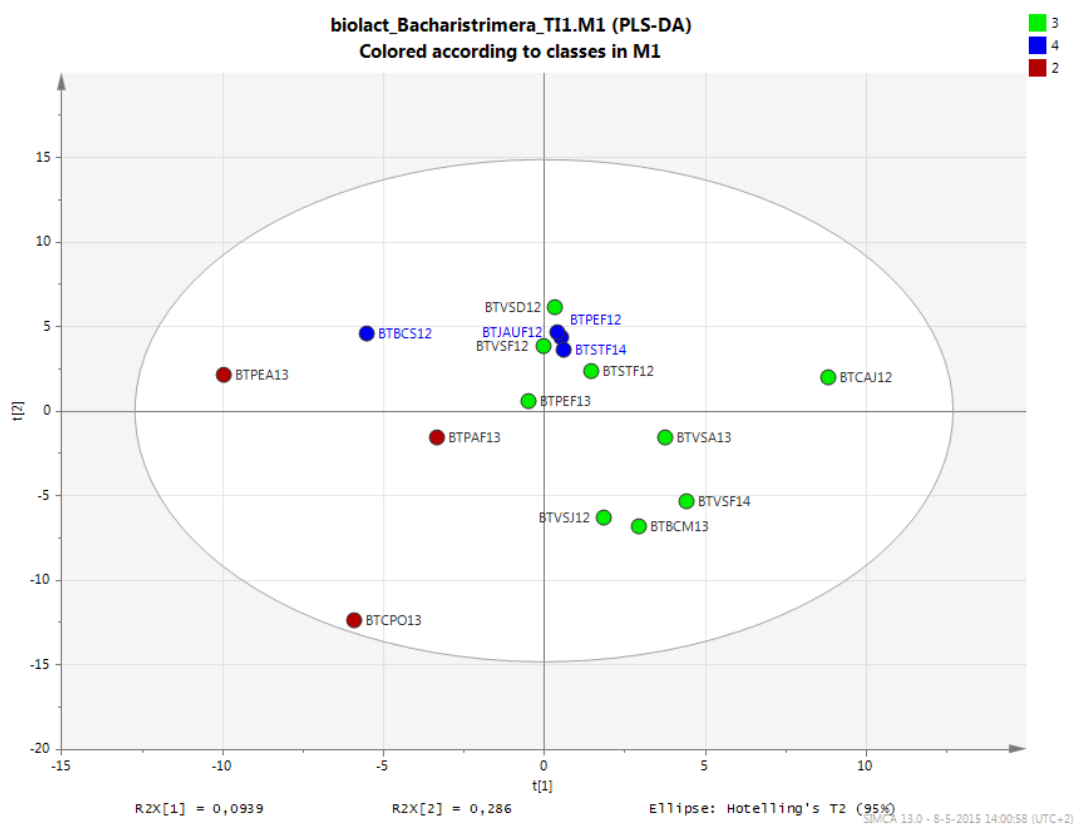


Figura 13 - Gráfico de resultados de PLS-DA mostrando PC1 y PC2 obtenido de la información de todos los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de muestras de *Baccharis trimera* y sus actividades biológicas. Azul: Actividad sin interés. Verde: Buena actividad biológica. Rojo: Relevante actividad biológica.

Para identificar los metabolitos responsables de la actividad citotóxica también se aplicó PLS-DA utilizando la información de actividad citotóxica en células mamíferas como variable. Como se puede observar en la Figura 14, este método no fue eficaz para obtener una buena separación entre grupos, pero si se logró identificar las señales de $^1\text{H-NMR}$ más relacionadas con el grupo que no presenta citotoxicidad. Estas señales son: 9,44, 9,28, 6,36 y 5,72 ppm, y se repiten con las que se identificaron en el grupo de mayor actividad biológica por lo que podríamos inferir que los metabolitos activos frente a *T. cruzi* no presentan citotoxicidad.

Cabe destacar que previo a la aplicación del método PLS-DA se aplicaron otros métodos de análisis como PCA donde tampoco fue posible obtener buena separación entre grupos y por ello se decidió trabajar con el método descrito en los resultados.

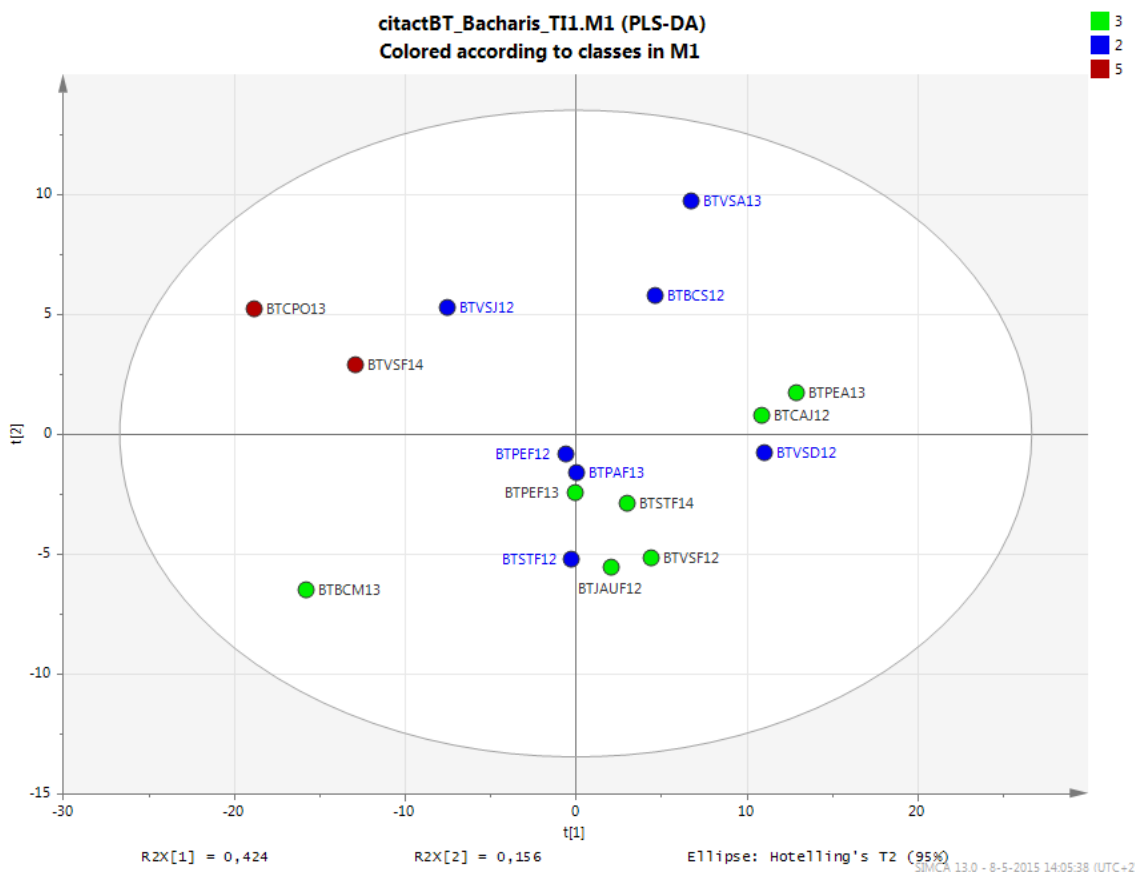


Figura 14 - Gráfico de resultados de PLS-DA mostrando PC1 y PC2 obtenido de la información de todos los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de muestras de *Baccharis trimera* y sus actividades de citotoxicidad. Azul: Relevante citotoxicidad. Verde: Cierta citotoxicidad. Rojo: No citotóxica

El análisis mediante PLS-DA resultó efectivo para la separación de los grupos de muestras de *Baccharis articulata* con diferentes actividades biológicas. En la Figura 15 se puede observar una clara separación entre los 3 grupos de muestras con diferentes actividades biológicas. El análisis de gráfico de saturaciones, por el cual se obtienen las señales más relacionadas con los diferentes grupos, muestra que las señales relacionadas con el grupo de mayor actividad biológica son: 9,72, 9,56, 9,36, 5,44 – 5,28, 5,16, 5,12, 2,8 y 2,08 ppm. Estas señales son muy similares a las encontradas en el grupo de mayor actividad biológica de *Baccharis trimera* por lo que es posible que los principios activos de ambas especies compartan su naturaleza química. Este grupo de señales pueden ser

atribuidas a algunos aldehídos diterpenos descritos por Zdero y colaboradores y Francesca y colaboradores en especies del género *Baccharis* (Figura 16) [146,147].

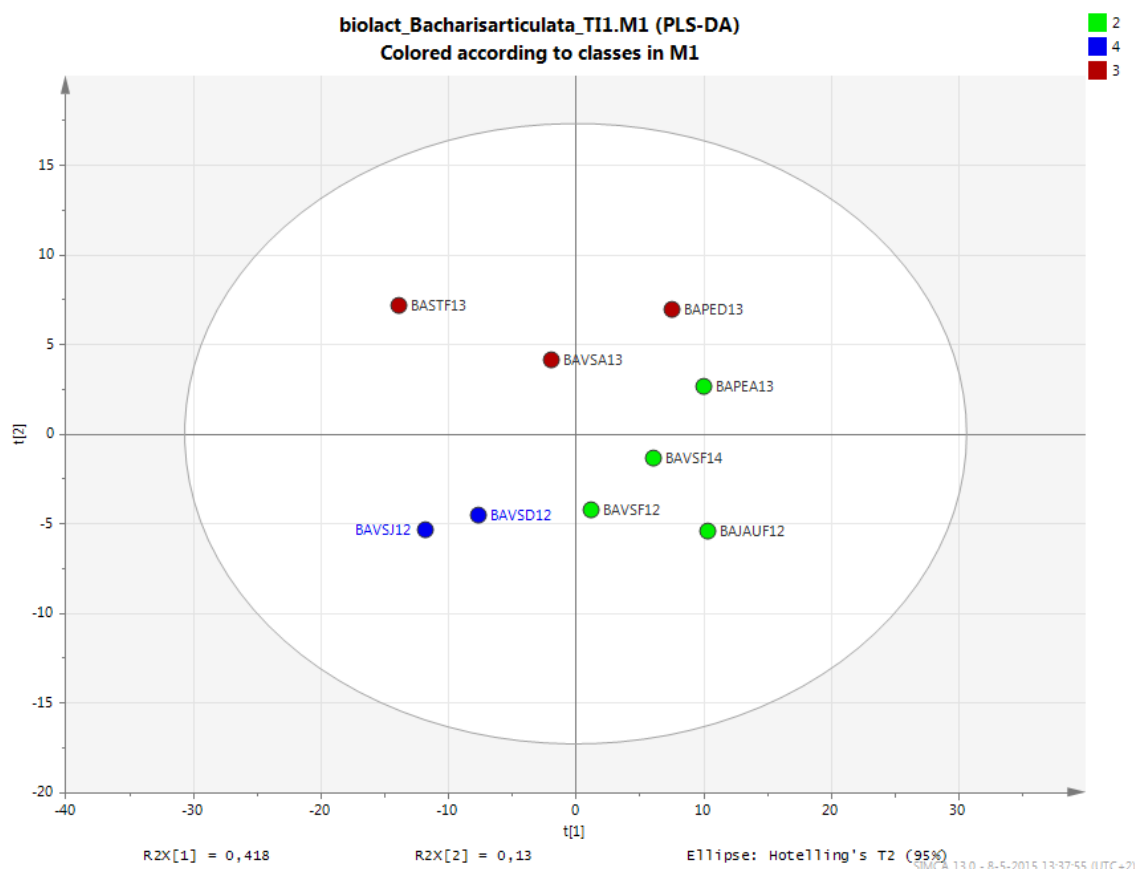


Figura 15 - Gráfico de resultados de PLS-DA mostrando PC1 y PC2 obtenido de la información de todos los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de muestras de *Baccharis articulata* y sus actividades biológicas. Azul: Actividad sin interés. Verde: Relevante actividad biológica. Rojo: Buena actividad biológica.

Para identificar los metabolitos responsables de la citotoxicidad de las muestras de *Baccharis articulata* también se aplicó PLS-DA utilizando la actividad citotóxica como variable. Como se observa en la Figura 17 se obtuvo una buena separación entre grupos de diferente citotoxicidad. Por otra parte, el análisis de los gráficos de saturación se infiere una vez más que los metabolitos responsables de la actividad biológica y la citotoxicidad no son los mismos. Las señales de $^1\text{H-RMN}$ relacionadas con el grupo de mayor citotoxicidad son: 6,64, 5,08, 3,80, 3,08, 2,44 – 2,32, 1,52 y 1,12 – 1,08 ppm. Este grupo de señales pueden ser atribuidas a otros metabolitos descritos en especies del género *Baccharis*, diterpenos de tipo *ent*-clerodano, por Herz y colaboradores y Torres y colaborades en *Baccharis articulata* y *Baccharis trimera* [134,135] (Figura 18).

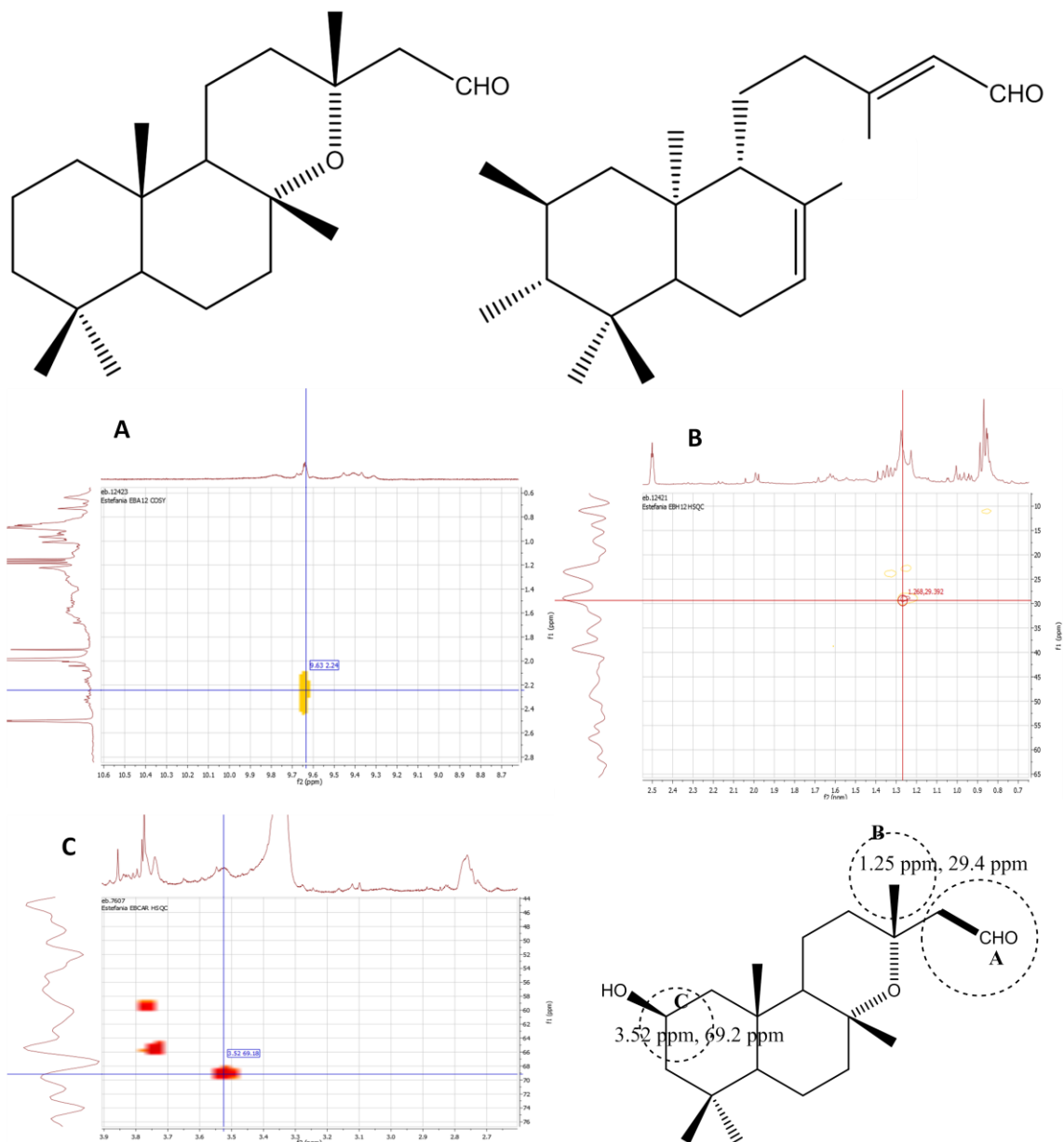


Figure 16 - Aldehídos diterpenos descritos por Zdero y colaboradores y Francesca y colaboradores en especies del género *Baccharis*, y señales identificadas en espectros de 2D-RMN de *Baccharis articulata* relacionadas con aldehídos diterpenos descritos en *Baccharis* spp. [146,147].

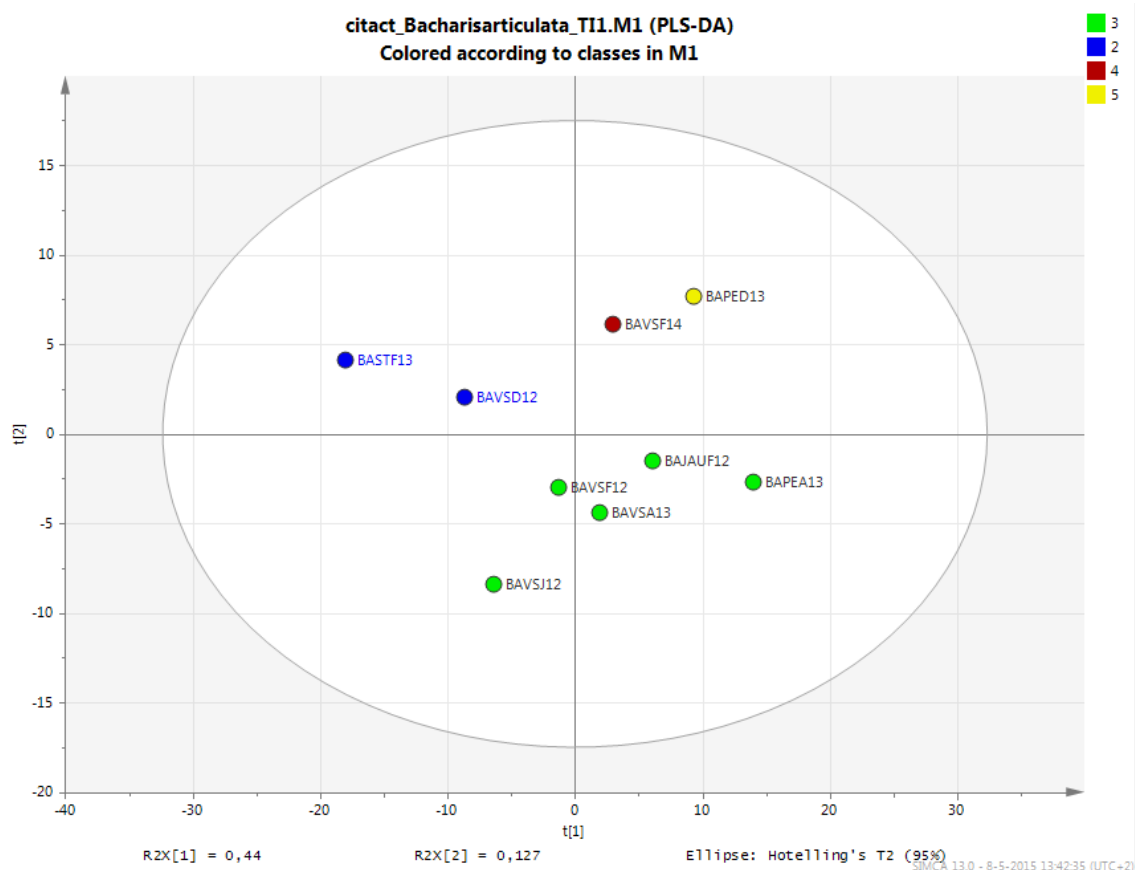


Figura 17 - Gráfico de resultados de PLS-DA mostrando PC1 y PC2 obtenido de la información de todos los espectros de $^1\text{H-NMR}$ de muestras de *Baccharis articulata* y sus actividades de citotoxicidad. Azul: Relevante citotoxicidad. Verde: Cierta citotoxicidad. Rojo: Baja citotoxicidad. Amarillo: No citotóxico.

Para *Baccharis usterii* no se tiene un número suficiente de muestras como para obtener un análisis estadístico robusto con buena predicción pero se realizó PLS-DA utilizando la información de actividad biológica como variable para intentar identificar los principios activos. La información obtenida del análisis del gráfico de saturación relaciona la muestra de mayor actividad biológica con señales de $^1\text{H-RMN}$ en 9,32-9,12 ppm, por lo que es posible inferir que también son aldehídos diterpenos los principios activos. Por otra parte no fue posible realizar PLS-DA utilizando actividad citotóxica como variable por dos factores: 1) Insuficiente número de muestras como para obtener una buena predicción, 2) las pocas muestras que se tienen presentaron la misma citotoxicidad. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, al observar los cambios en la actividad biológica y la constante citotoxicidad se puede inferir que no son los mismos metabolitos los responsables de la actividad anti-*T. cruzi* que los compuestos con actividad citotóxica inespecífica.

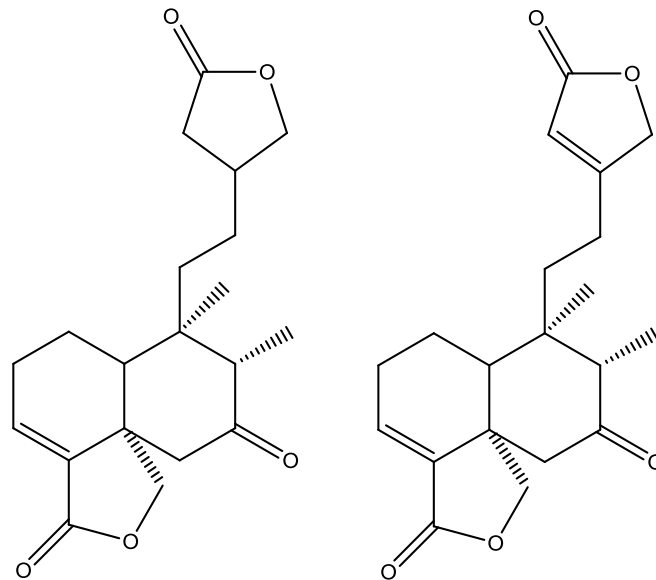


Figura 18 - Diterpenos de tipo *ent*-clerodano descritos por Herz y colaboradores y Torres y colaboradores en *Baccharis articulata* y *Baccharis trimera* [134,135].

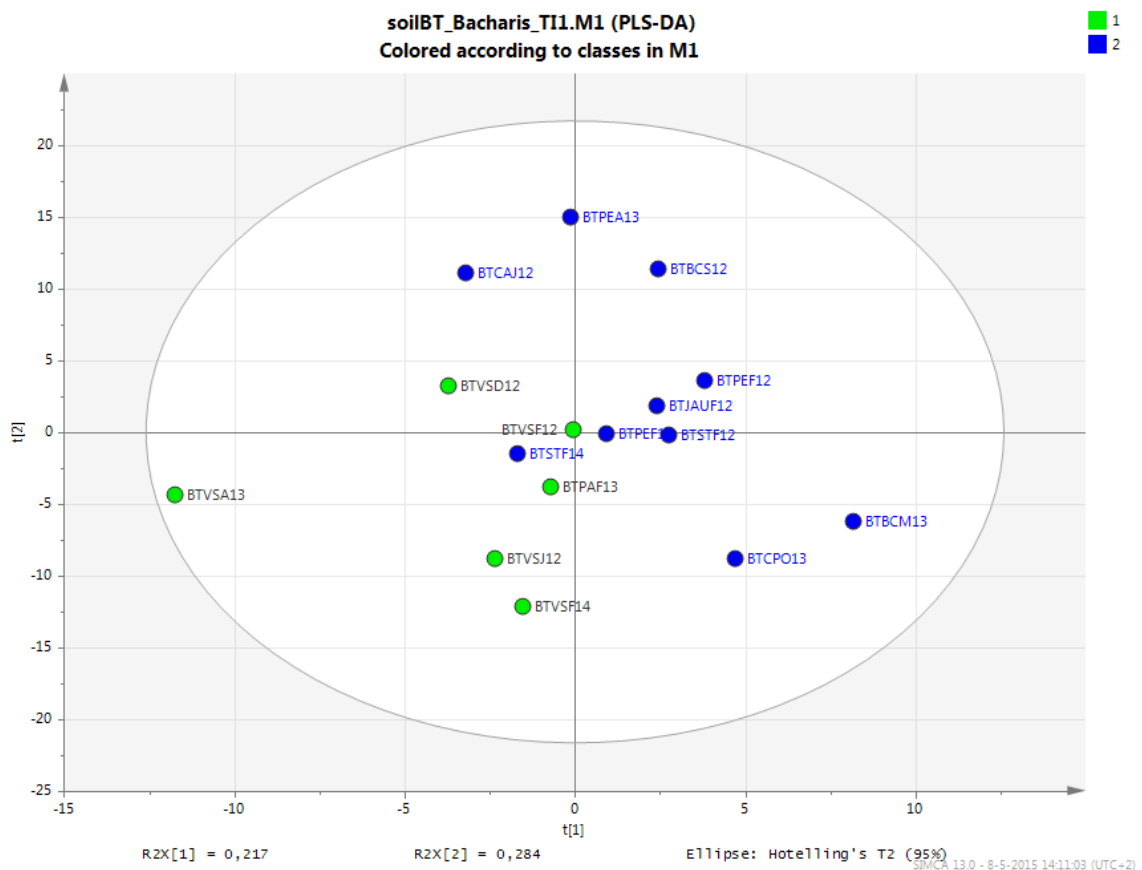


Figura 19 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido con la información de ^1H -RMN de muestras de *Baccharis trimera* y el tipo de suelo. Azul: Suelo arenoso. Verde: Suelo rocoso.

Para identificar las condiciones requeridas para la máxima expresión de los metabolitos activos en *Baccharis trimera* se realizó un análisis PLS-DA utilizando el tipo de suelo como variable. En la Figura 19 se observa la eficacia del método empleado con una clara separación entre los dos grupos correspondientes a muestras con dos tipo de suelo diferentes arenoso y rocoso. El análisis del gráfico de saturación muestra que las señales de ^1H -RMN correspondientes a aldehídos diterpenos (δ : 9,72, 5,68, 5,48, 5,20, 5,16, 3,56, 3,44, 1,24 ppm) están relacionadas con el tipo de suelo rocoso más que con el arenoso. Por otra parte se realizó el análisis PLS-DA de muestras de *Baccharis trimera* utilizando la época del año como variable. Se obtuvo una buena separación entre grupos, donde principalmente las muestras de verano son las más alejadas del resto (Figura 20).

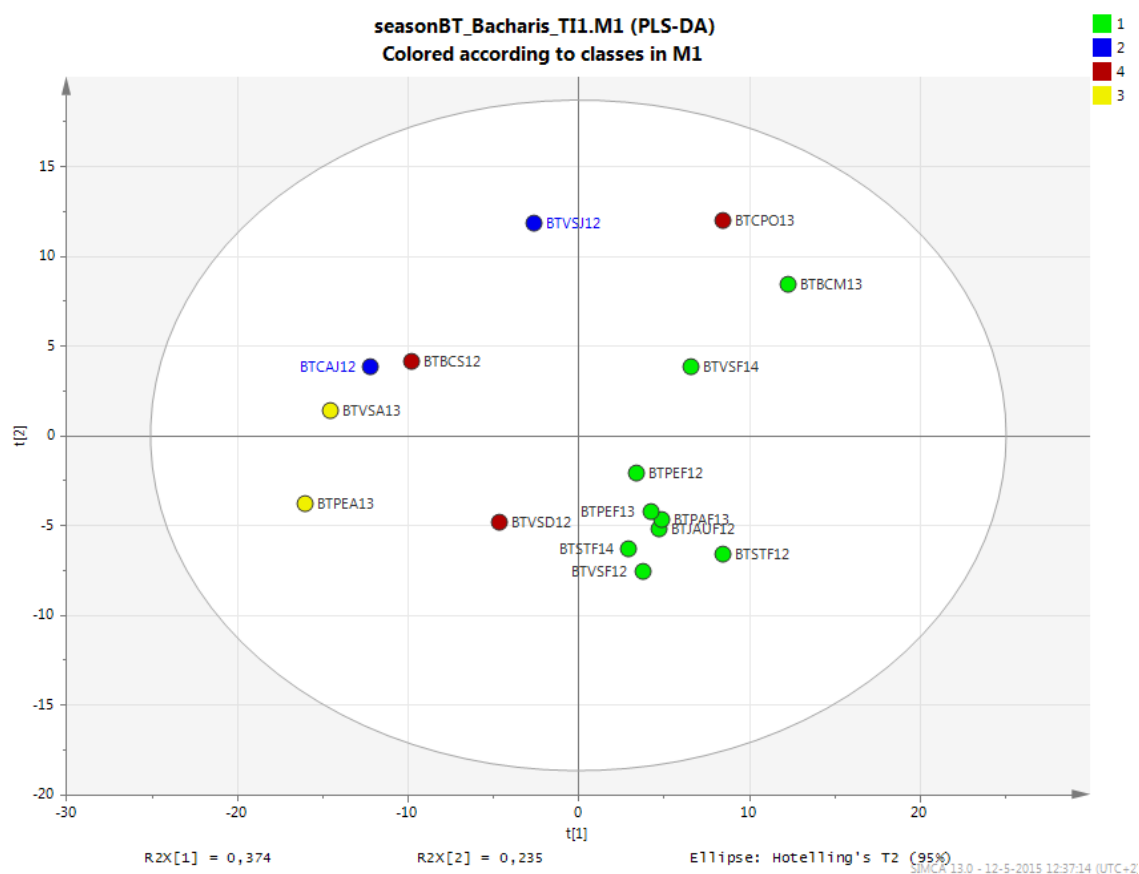
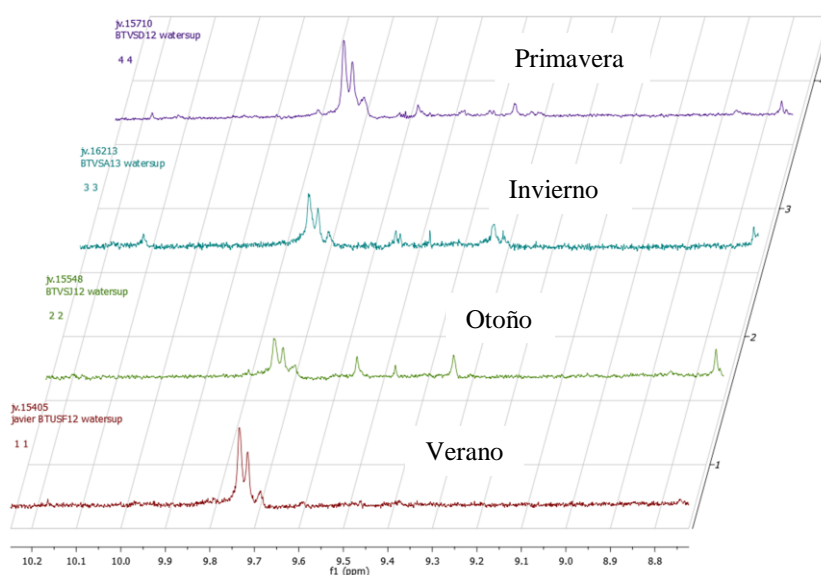


Figura 20 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H RMN de muestras de *Baccharis trimera* y la época de colecta. Azul: Otoño. Verde: Verano. Rojo: Primavera. Amarillo: Invierno.

El análisis del gráfico de saturación indica que las señales de ^1H -RMN de aldehídos diterpenos están estrechamente relacionadas con esta época del año, pero también con

las muestras de primavera. El período de floración de *Baccharis trimera* comienza en primavera y se extiende hasta finales del verano, por lo que este proceso podría estar directamente relacionado con el acumulo de los principios activos en las plantas. Para confirmar esta idea se realizó la integración comparativa de la región 9,76 – 9,70 ppm entre las distintas estaciones del año (Figura 21). Se observa claramente de acuerdo a la integración relativa que en el período de la primavera y en menor medida en el verano es cuando se cuantifican más ^1H de aldehídos lo que está en correlación con las mejores actividades anti- *T. cruzi* observadas en estos períodos.



Muestra	Integración TMS	Integración región aldehído diterpenico
Primavera	10	6,84
Verano	10	3,92
Otoño	10	3,18
Invierno	10	2,45

Figura 21 - Espectros ^1H -NMR apilados de muestras de *Baccharis trimera* correspondientes a cada estación del año amplificadas en la zona de aldehídos y tabla comparativa de la integración de la región 9,76 – 9,70 ppm según la época de colecta, se toma como referencia interna a la señal de TMS ($\delta = 0,1 - 0,1$ ppm).

Es interesante destacar que se observan otras señales correspondientes a protones de aldehídos (δ : 9,57, 9,48, 9,36 ppm) además de la señal mayoritaria en 9,73 ppm. Estas otras señales sugieren que seguramente no sea solo uno el componente responsable de la

actividad biológica. Probablemente una acción sinérgica entre varios componentes del extracto esté teniendo lugar.

Para identificar las condiciones requeridas para la máxima expresión de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* en *Baccharis articulata* se realizó un análisis PLS-DA con la muestra de *Baccharis articulata* y el tipo de suelo como variable. En la Figura 22 se observa como los dos grupos de muestras, suelo rocoso y suelo arenoso, se encuentran claramente separadas. El análisis del gráfico de saturación muestra que las señales de ¹H-RMN correspondientes a aldehídos diterpenos (δ : 9,76, 5,88, 5,72, 5,64, 4,08, 3,96, 3,92, 1,20 ppm) están estrechamente relacionadas con el tipo de suelo rocoso.

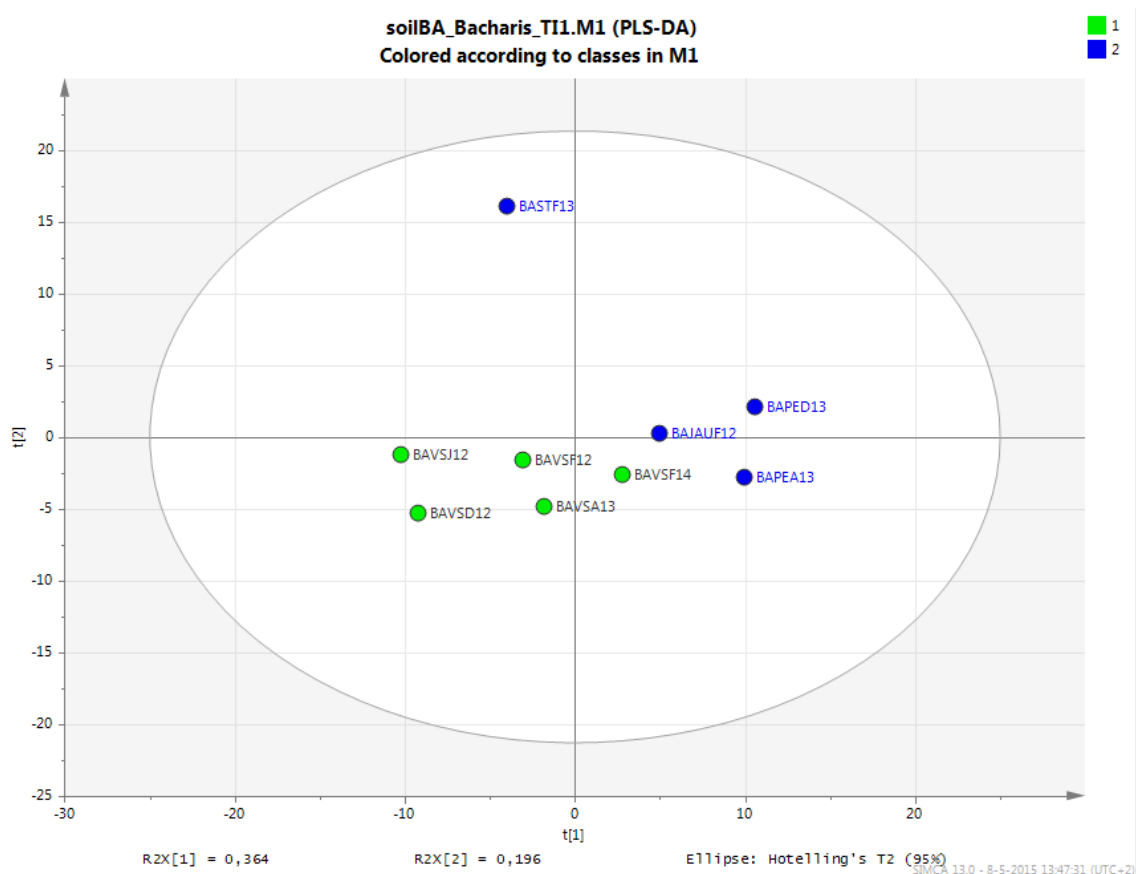


Figura 22 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido con la información de ¹H-RMN de muestras de *Baccharis articulata* y el tipo de suelo. Azul: Suelo arenoso. Verde: Suelo rocoso.

También se realizó un análisis PLS-DA de las muestras de *Baccharis articulata* con la época de colecta como variable para identificar el momento en que los principios activos están en su máxima expresión. En la Figura 23 se observa que los cuatro grupos,

correspondientes a las cuatro estaciones del año, presentan una buena separación entre sí. El análisis del gráfico de saturación indica que es en primavera la época en la cual se observa una estrecha relación con las señales de $^1\text{H-RMN}$ correspondientes a aldehídos diterpenos. El período de floración de *Baccharis articulata* se desarrolla justamente durante esta época del año, por lo que es posible inferir una relación directa entre este proceso y la acumulación de los metabolitos activos. Tal como se muestra en la Figura 24 la acumulación del aldehído es máxima en primavera, disminuye algo durante el verano y se mantiene baja durante el otoño e invierno.

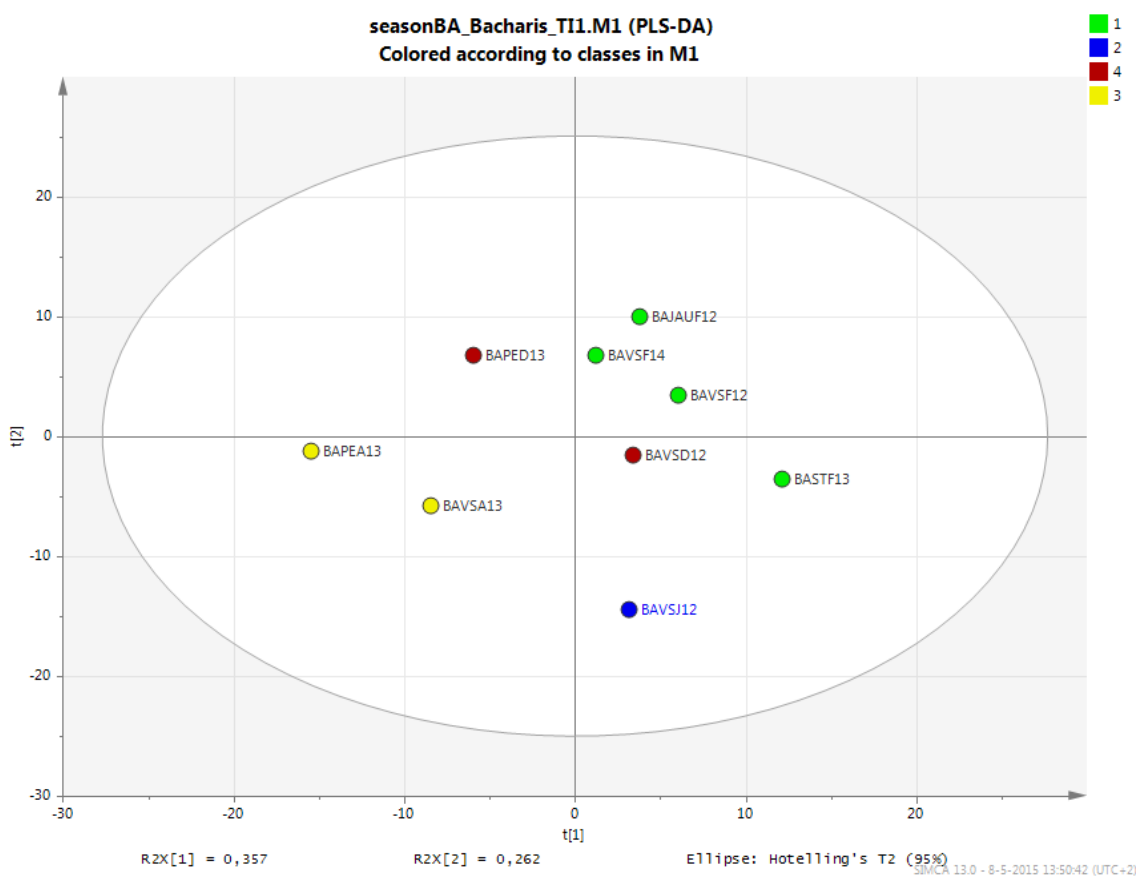
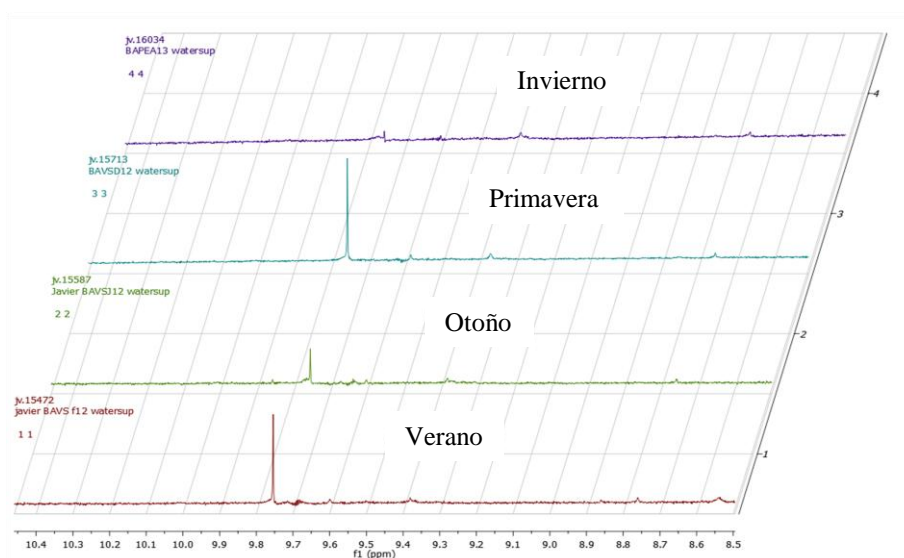


Figura 23 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de $^1\text{H-RMN}$ de muestras de *Baccharis articulata* y la época de colecta. Azul: Otoño. Verde: Verano. Rojo: Primavera. Amarillo: Invierno.

Para las muestras de *Baccharis usterii* no fue posible realizar el análisis PLS-DA utilizando como variables el tipo de suelo o la época de colecta ya que las pocas muestras que se colectaron de esta especie corresponden al mismo tipo de suelo, rocoso, y fueron colectadas todas entre primavera y verano. Cabe destacar que se trata de una especie poco descrita en Uruguay y que sólo fue encontrada y colectada para este

trabajo en la zona de sierras, localidades de Villa Serrana (Lavelleja) y Pozos Azules (Maldonado).

A



B

Muestra	Integración TMS	Integración región aldehído diterpenico
Primavera	10	2,95
Verano	10	1,28
Otoño	10	0,50
Invierno	10	0,64

Figura 24 – A. Espectros $^1\text{H-NMR}$ apilados de muestras de *Baccharis articulata* correspondientes a cada estación del año amplificadas en la zona de aldehídos; B. tabla comparativa de integración de la región 9,76 – 9,70 ppm según la época de colecta, se toma como referencia interna a la señal de TMS ($\delta = 0,1 - - 0,1$ ppm).

En el trabajo con las muestras de *Hydrocotyle bonariensis* se realizó inicialmente un análisis PCA para observar si existía una diferenciación entre los perfiles químicos de las diferentes partes de las plantas (tallos y rizomas, hojas, flores). En este análisis no se observó una clara diferenciación entre los grupos por lo que se realizó un PLS-DA entre las diferentes partes de *Hydrocotyle bonariensis* en el cual se obtienen 3 grupos de muestras correspondientes a las partes mencionadas (Figura 25). El análisis del gráfico de saturación indica que las similitudes y diferencias entre los perfiles químicos en estudio se centran en las regiones correspondientes a flavonoides (δ : 7,80 - 6,00 ppm) y también señales relacionadas con triterpenos ya descriptos para esta especie [143].

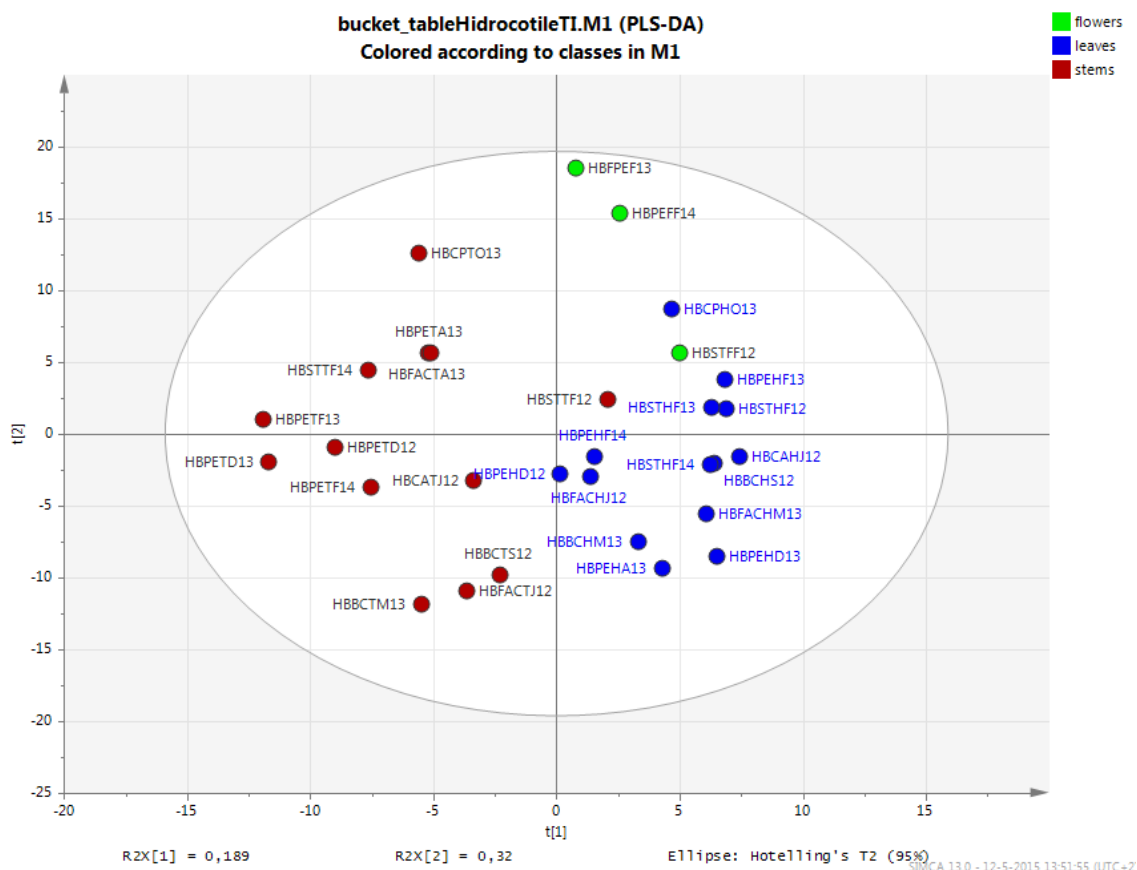


Figura 25 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H -RMN de muestras de *Hydrocotyle bonariensis* y sus correspondientes secciones. Azul: Hojas. Verde: Flores. Rojo: Tallos y rizomas.

Posteriormente se trabajó con las partes de *Hydrocotyle bonariensis* por separado para identificar los metabolitos responsables de la actividad biológica de cada una ya que como se muestra en la Tabla 2 la actividad varía significativamente entre las mismas. En la Figura 26 se muestra el resultado del análisis PLS-DA con las muestras de hojas donde se obtuvo una buena separación entre 3 grupos correspondientes a los grupos con diferente actividad anti-*T. cruzi*. El análisis del gráfico de saturación indica que las señales de ^1H -RMN relacionadas con la actividad biológica son: 7,92, 7,84, 7,76, 7,60, 6,88, 6,60 – 6,48, 6,24, 5,84, 5,76, 5,68, 5,16, 4,92, 4,72, 4,36 – 4,24, 3,56 ppm. Estas señales se pueden diferenciar en 2 grupos, donde el grupo 1 (7,92, 7,84, 7,76, 7,60, 6,88, 6,60 – 6,48, 6,24) se asocia a flavonoides, y el grupo 2 (5,84, 5,76, 5,68, 5,16, 4,92, 4,72, 4,36 – 4,24, 3,56 ppm) a los triterpenos descritos por Tabopda y colaboradores que se muestran en la Figura 27 [143]. Las señales entre 5 y 6 ppm se asocian al protón H-12 de los triterpenos y se piensa que podría también haber insaturaciones a nivel del protón H-2 y H-3 así como en H-6 y H-7 (Figura 27).

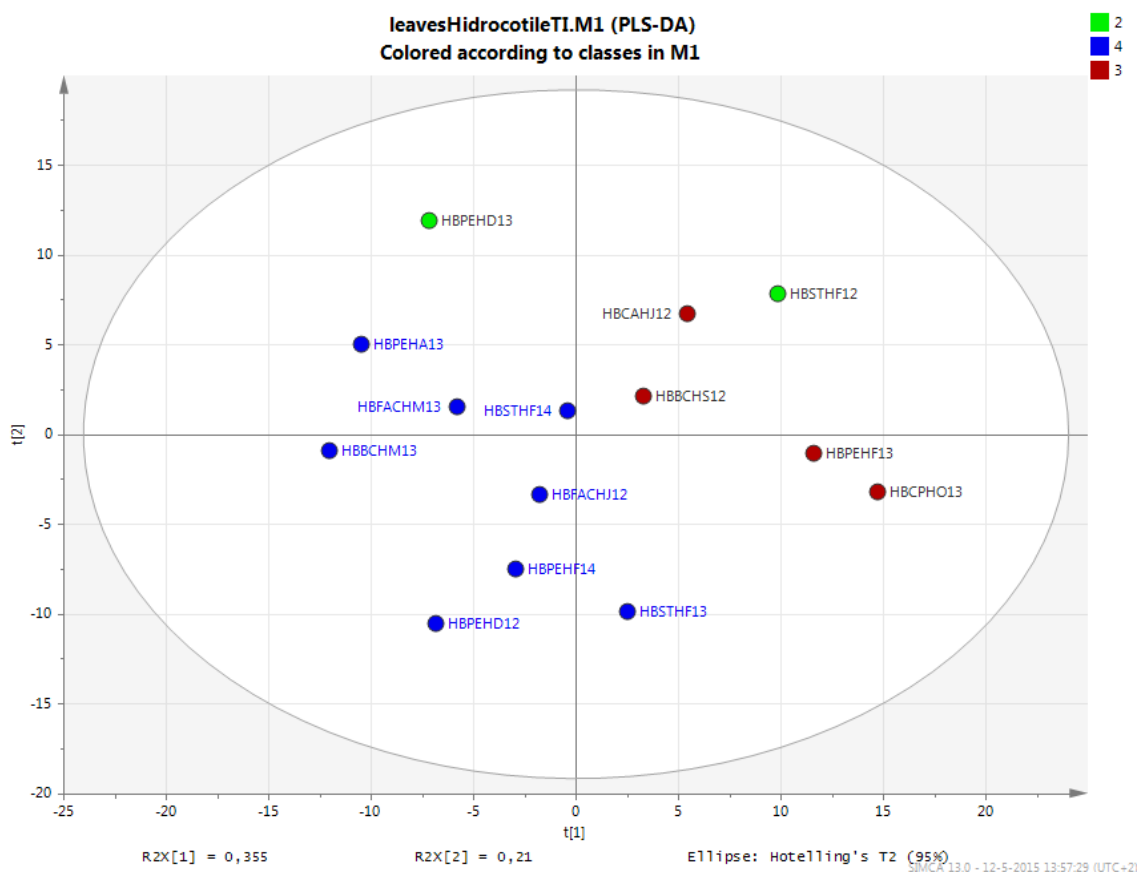


Figura 26 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H -RMN de muestras de hojas de *Hydrocotyle bonariensis* y sus actividades anti-*Trypanosoma cruzi*. Azul: Actividad sin interés. Verde: Relevante actividad biológica. Rojo: Buena actividad biológica.

Las señales entre 3,5 y 5 ppm se asocian a la posible presencia de azúcares unidos a los triterpenos como también a los protones H-3, H-15, H-16, H-22 (Figura 27) unidos a un carbono con un átomo de oxígeno en posición alfa. Para el grupo 1 se realizó una búsqueda de compuestos con las señales características de flavonoides en la base de datos del Grupo de Metabolómica de Plantas de la Universidad de Leiden, Holanda, y no fue posible asignar ningún metabolito específico. Cabe destacar que no existe bibliografía de flavonoides identificados para esta especie.

El análisis PLS-DA de muestras de hojas de *Hydrocotyle bonariensis* y la actividad citotóxica como variable no fue posible de realizar ya que todas las muestras de este grupo presentan similares niveles de citotoxicidad. De esta forma el resultado del estudio no sería estadísticamente robusto como para inferir la identidad de las señales.

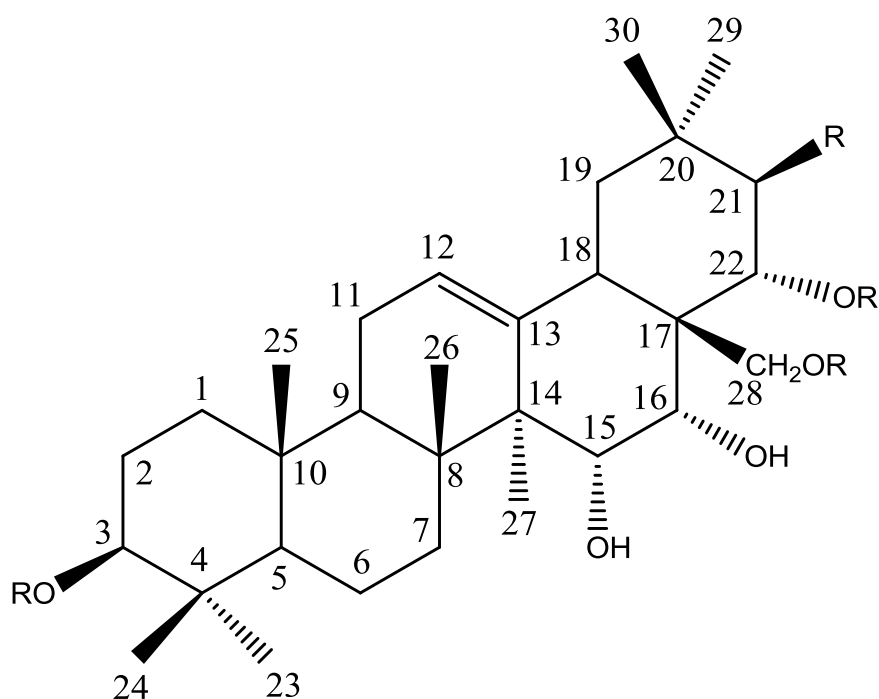


Figura 27 - Estructuras de triterpenos aislados de *Hydrocotyle bonariensis* por Tabopda y colaboradores [143].

Con las muestras de tallos y rizomas de *Hydrocotyle bonariensis* se realizó el análisis PLS-DA utilizando la actividad anti- *T. cruzi* como variable. En la Figura 28 se observa una clara separación de la muestra de mayor actividad biológica y una no tan buena separación entre los otros 3 grupos. Sin embargo fue posible obtener mediante el análisis del gráfico de saturación la lista de señales de ¹H-RMN relacionadas con el grupo de mayor actividad biológica: 7,76, 7,44, 7,16, 7,12, 6,68, 6,64, 6,04, 5,88, 5,36, 5,32, 4,32, 2,92, 2,04, 1,92, 1,68, 1,44, 1,40 ppm. Al igual que en las muestras de hojas es posible dividir estas señales en dos grupos, siendo el grupo 1 (δ : 7,76, 7,44, 7,16, 7,12, 6,68, 6,64, 6,04, 5,88 ppm) las señales relacionadas con flavonoides y el grupo 2 (δ : 5,36, 5,32, 4,32, 2,92, 2,04, 1,92, 1,68, 1,44, 1,40 ppm) las señales asociadas con los triterpenos que se mostraron anteriormente (Figura 27).

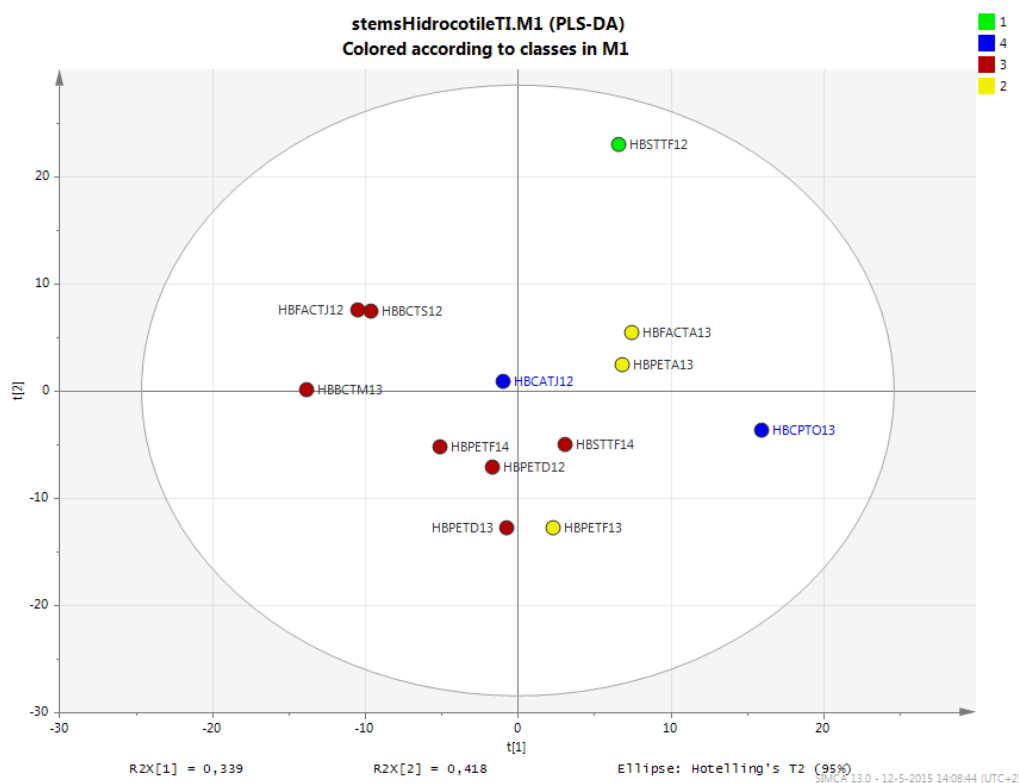


Figura 28 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H -RMN de muestras de tallos y rizomas de *Hydrocotyle bonariensis* y sus actividades anti-*Trypanosoma cruzi*. Azul: Actividad sin interés. Verde: Excelente actividad biológica. Rojo: Buena actividad biológica. Amarillo: Relevante actividad biológica.

Con el objetivo de identificar los metabolitos responsables de la citotoxicidad de las muestras de tallos y rizomas se realizó el análisis PLS-DA con la actividad citotóxica como variable. En la Figura 29 se muestra la obtención de una buena separación entre los 3 grupos con diferentes actividades. Mediante análisis del gráfico de saturación se obtuvo una lista de señales de ^1H -RMN estrechamente relacionadas con la citotoxicidad: 7,76 – 7,64, 7,32, 5,96, 5,84, 5,40, 5,16, 4,84, 4,24 – 4,12, 3,08, 2,12, 1,68, 1,44 – 1,32, 1,24, 0,96, 0,92 ppm. Las señales se asocian a los mismos 2 grupos que se identificaron en los análisis de actividad biológica, siendo el grupo 1 (δ : 7,76 – 7,64, 7,32, 5,96, 5,84 ppm) las señales asociadas a flavonoides y el grupo 2 (δ : 5,40, 5,16, 4,84, 4,24 – 4,12, 3,08, 2,12, 1,68, 1,44 – 1,32, 1,24, 0,96, 0,92 ppm) las señales asociadas a los triterpenos ya descritos. El resultado obtenido infiere que serían los mismos metabolitos los responsables de la actividad biológica anti-*Trypanosoma cruzi* y de la citotoxicidad observada.

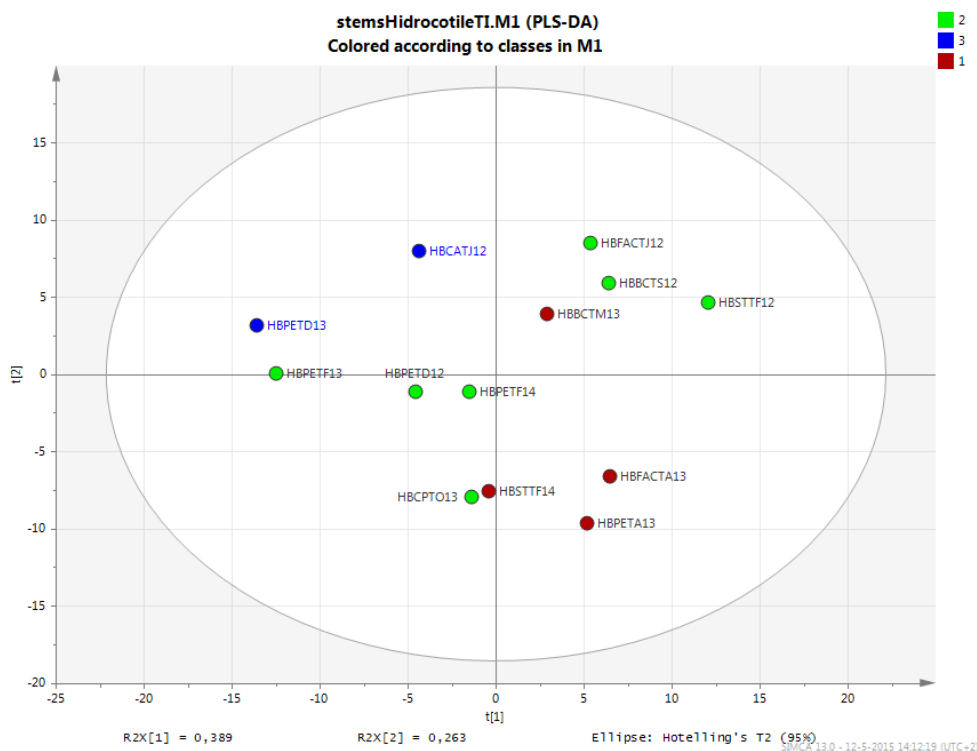


Figura 29 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H -RMN de muestras de tallos y rizomas de *Hydrocotyle bonariensis* y sus actividades anti-*Trypanosoma cruzi*. Azul: Cierta citotoxicidad. Verde: Relevante citotoxicidad. Rojo: Citotóxica.

Con las muestras de flores de *Hydrocotyle bonariensis* no se pudo realizar el análisis PLS-DA con las actividades evaluadas como variables ya que no se tiene un número suficiente de muestras como para obtener un análisis estadístico robusto con buena predicción. Sin embargo al observar el perfil químico obtenido en los espectros de ^1H -RMN con las muestras de flores se pueden observar las mismas señales que caracterizan la zona de flavonoides (δ : 7,80 - 6,00 ppm) y triterpenos descritos. La presencia de estos compuestos explica los resultados biológicos obtenidos para muestras de flores de *Hydrocotyle bonariensis* con excelente actividad anti-*Trypanosoma cruzi* pero también importante citotoxicidad.

Con la finalidad de determinar las condiciones óptimas para la máxima expresión de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* se realizaron análisis PLS-DA con las diferentes partes de *Hydrocotyle bonariensis* utilizando la época del año de colecta como variable. No fue posible realizar el estudio con el tipo de suelo como variable ya que se contaba con un pequeño número de muestras de tipo de suelo diferente al

arenoso y de esta forma el análisis no presentaba la robustez estadística necesaria para una buena predicción.

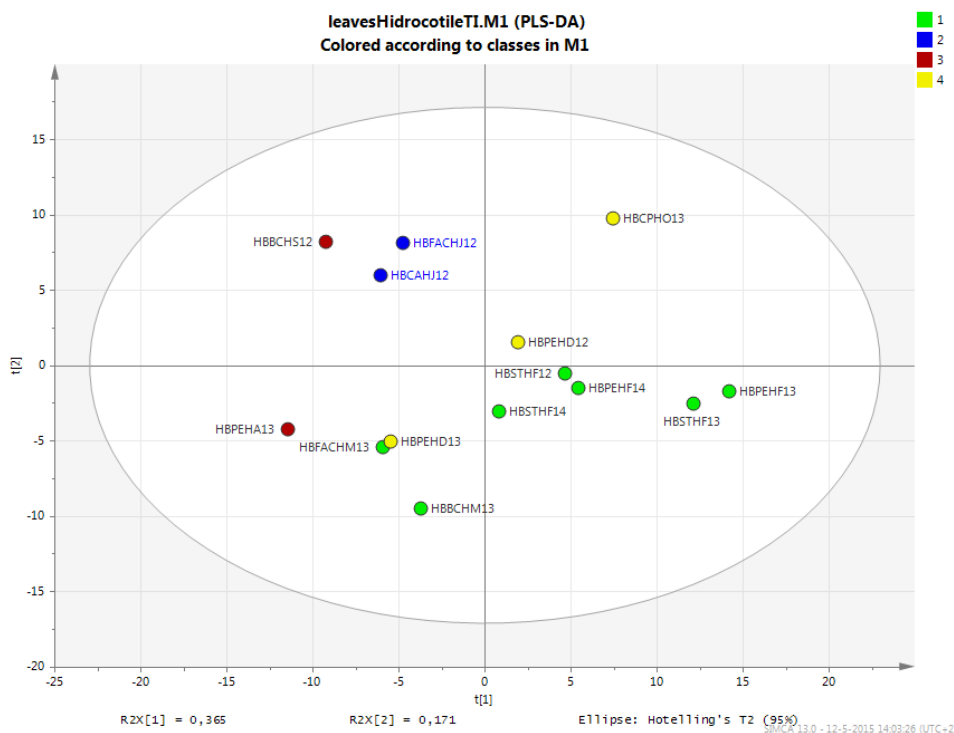


Figura 30 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H -RMN de muestras de hojas de *Hydrocotyle bonariensis* y la época del año de colecta. Azul: Otoño. Verde: Verano. Rojo: Invierno. Amarillo: Primavera.

Del análisis PLS-DA de las muestras de hojas de *Hydrocotyle bonariensis* y la época de colecta como variable se observa una buena separación entre los 4 grupos correspondientes a las 4 estaciones del año (Figura 30). Mediante el análisis del gráfico de saturación se observa que las señales identificadas como importantes para la actividad biológica, correspondientes a los ya mencionados flavonoides y triterpenos, se encuentran estrechamente relacionadas con la muestras colectadas en invierno. Teniendo en cuenta que las muestras de hojas colectadas en invierno presentan buena actividad anti- *T. cruzi* pero también importante citotoxicidad (Tabla 2), el resultado obtenido a partir de perfil químico permite nuevamente inferir la dualidad de actividades de los metabolitos que se identifican como relevantes.

En la Figura 31 se presentan los resultados del análisis PLS-DA de muestras de tallos y rizomas de *Hydrocotyle bonariensis* y la época del año de colecta como variable. La separación obtenida entre los grupos no resulta buena para una discriminación de

señales entre épocas, pero el resultado obtenido infiere que el perfil químico de tallos y rizomas no presenta una dependencia importante con respecto a las estaciones del año. Mediante el análisis del gráfico de saturación se observa que las señales identificadas asociadas a los principios activos, zona flavonoides y zona triterpenos, se encuentran relacionadas con todas las épocas del año y no presentan una estrecha relación con ninguna en particular. Al observar los niveles de actividad biológica de muestras de tallos y rizomas se confirma este resultado obtenido ya que los niveles de actividades no presentan importantes variaciones según la época de colecta (Tabla 2). Lo mismo sucede con la actividad citotóxica de las muestras, por lo que la dualidad de actividades de los principios activos también se infiere con estos resultados.

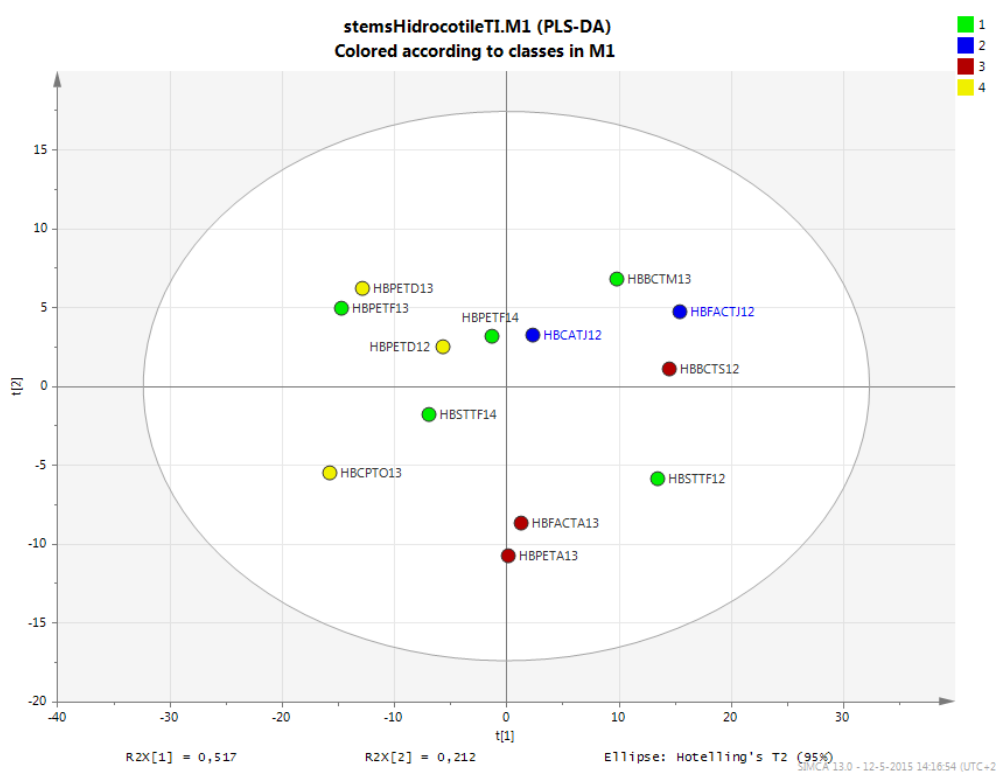


Figura 31 - Gráfico de resultados de PLS-DA, mostrando PC1 y PC2, obtenido de la información de ^1H -RMN de muestras de tallos y rizomas de *Hydrocotyle bonariensis* y la época del año de colecta. Azul: Otoño. Verde: Verano. Rojo: Invierno. Amarillo: Primavera.

Con las muestras de flores de *Hydrocotyle bonariensis* no fue posible realizar los estudios dado que sólo fue posible la colecta de las mismas en verano cuando la planta se encuentra en su período de floración.

4.4. Elucidación estructural de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*

Con la información obtenida mediante metabolómica por Resonancia Magnética Nuclear de la naturaleza química de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* se comenzó la purificación de los mismos. Para ello se realizó un fraccionamiento bioguiado a partir del material vegetal para las plantas que mostraron mejor perfil de actividades, más activo en *T. cruzi* y menos toxicidad, *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usterii*. Inicialmente se hace una extracción de las partes aéreas de las plantas con disolventes de polaridad creciente (EP, AcOEt, MeOH) obteniéndose 3 fracciones para cada especie en estudio (Figure 32). A las 3 fracciones de cada especie se les realizó el espectro $^1\text{H-RMN}$ para identificar la presencia de los aldehídos diterpenos encontrados en el estudio de metabolómica (sección 4.3) y se evaluaron frente a epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*.

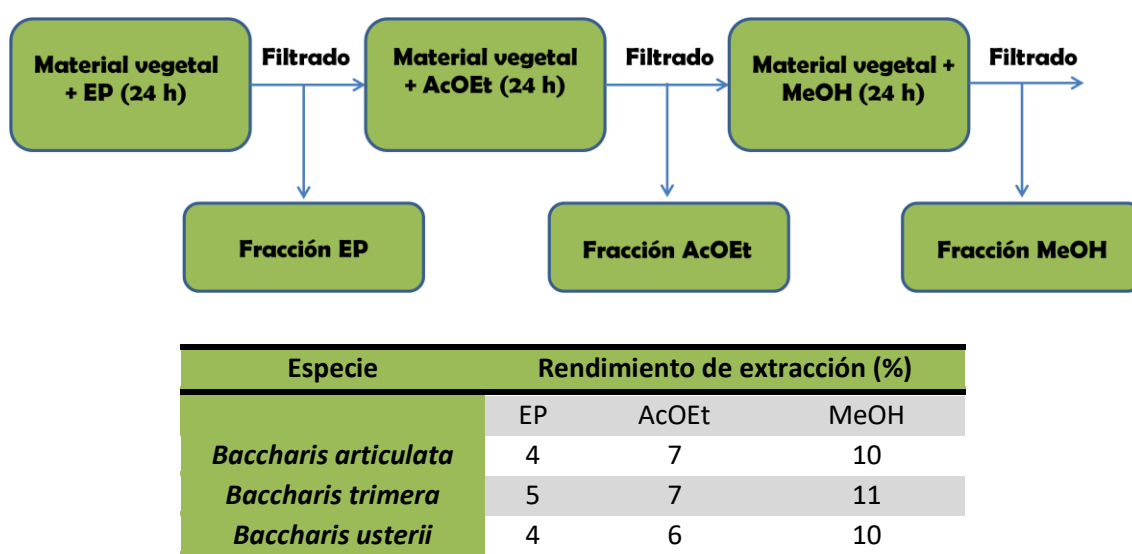


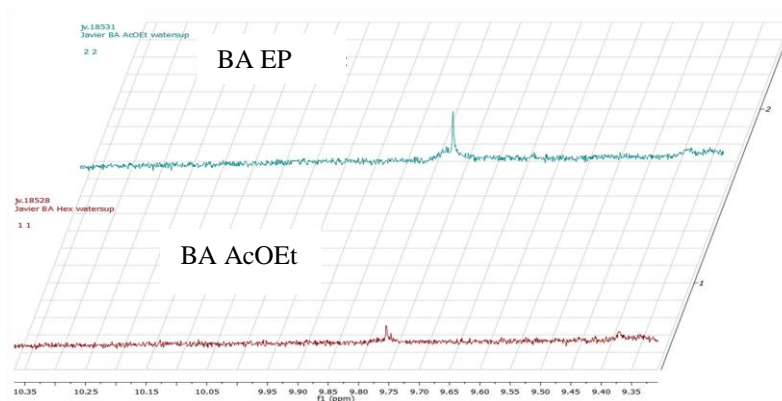
Figura 32 – A. Diagrama de flujo de la extracción para ser utilizado en la purificación de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* en *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata* y *Baccharis usterii*. B. Tabla de rendimientos de extracción para cada una de las fracciones.

Realizados los espectros de $^1\text{H-RMN}$ de cada fracción de cada una de las especies del género *Baccharis* se observa que la mayor acumulación de aldehídos diterpenos se encuentra en las fracciones AcOEt. De esta forma, dado el resultado de la extracción por gradiente de polaridad, podemos inferir que los compuestos de interés presentan una polaridad media. La determinación de la proporción de aldehídos diterpenos en cada fracción estudiada se realizó integrando la señal referencia del TMS con un valor

arbitrario de 10 para relacionar con la señal del protón del aldehído. De cualquier forma es importante destacar que también se observa acumulación de los mismos, pero en menor medida, en las fracciones hexánicas. No así en las fracciones metanólicas (Figuras 33-35).

Tal como se esperaba, por la acumulación del compuesto de interés en las fracciones AcOEt, son estas fracciones las que presentan los mejores valores de actividad biológica anti-*Trypanosoma cruzi* (Figuras 33-35). También se observó significativa actividad en las fracciones EP de las especies en estudio, este resultado se explica en la gran acumulación de sesquiterpenos y diterpenos que presentan las mismas.

A



B

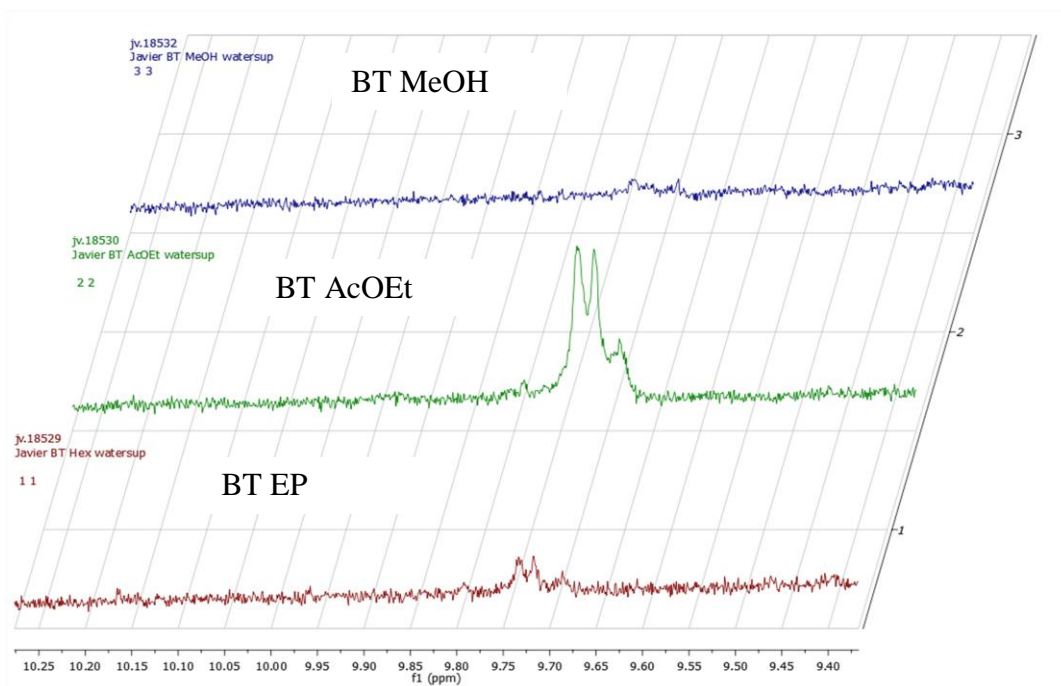
Muestra	Integración TMS	Integración región aldehído diterpenico
BA EP	10	0,34
BA AcOEt	10	1,12
BA MeOH	10	0,06

C

Muestra	Actividad anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> CI ₅₀ ± DS (µg/mL)
BA EP	59,3 ± 2,5
BA AcOEt	55,8 ± 1,9
BA MeOH	83,8 ± 2,3

Figura 33 – A. Espectros ¹H-NMR apilados de muestras de *Baccharis articulata* correspondientes a las fracciones AcOEt y EP amplificadas en la zona de aldehídos. B. Tabla comparativa de integración de la región 9,76 – 9,75 ppm para las fracciones de *Baccharis articulata*, se toma como referencia interna a la integración de la señal de TMS (δ= 0,1 – - 0,1 ppm). C. Tabla de actividad biológica anti-*Trypanosma cruzi* de cada fracción en estudio de *Baccharis articulata*.

A



B

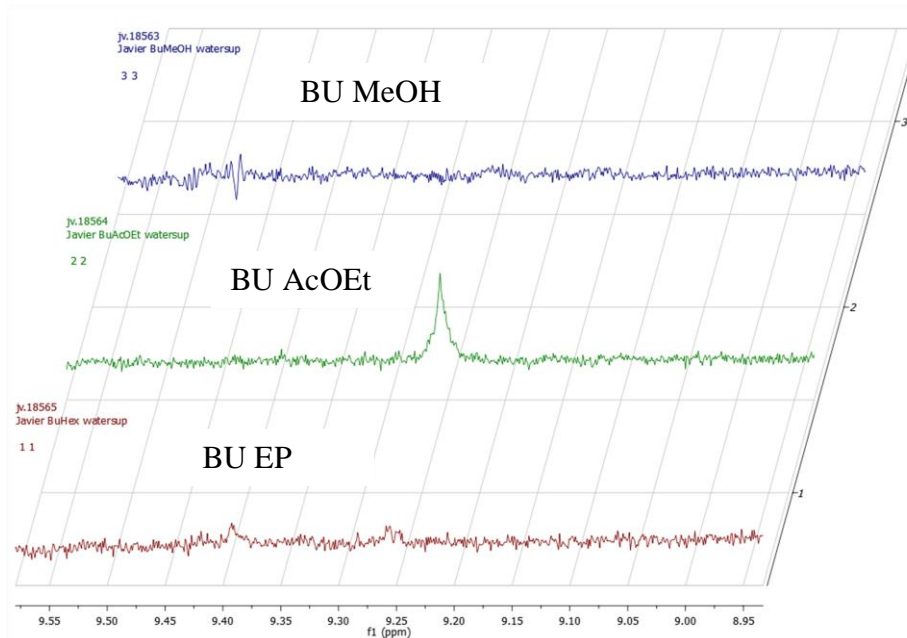
Muestra	Integración TMS	Integración región aldehído diterpenico
BT EP	10	2,93
BT AcOEt	10	8,26
BT MeOH	10	2,24

C

Muestra	Actividad anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> CI ₅₀ ± DS (µg/mL)
BT EP	37,9 ± 2,1
BT AcOEt	33,5 ± 1,6
BT MeOH	57,4 ± 2,4

Figura 34 – A. Espectros ^1H NMR apilados de muestras de *Baccharis trimera* correspondientes a las fracciones AcOEt y EP amplificadas en la zona de aldehídos. B. Tabla comparativa de integración de la región 9,76 – 9,70 ppm para las fracciones de *Baccharis trimera*, se toma como referencia interna a la integración de la señal de TMS ($\delta = 0,1 - - 0,1$ ppm). C. Tabla de actividad biológica anti-*Trypanosoma cruzi* de cada fracción en estudio.

A



B

Muestra	Integración TMS	Integración región aldehído diterpenico
BU EP	10	1,23
BU AcOEt	10	2,70
BU MeOH	10	0,07

C

Muestra	Actividad anti- <i>Trypanosoma cruzi</i> CI ₅₀ ± DS (µg/mL)
BU EP	83,9 ± 3,2
BU AcOEt	81,6 ± 3,6
BU MeOH	> 100

Figura 35 – A. Espectros ¹H-NMR apilados de muestras de *Baccharis usterii* correspondientes a las fracciones AcOEt, EP, MeOH amplificadas en la zona de aldehídos. B. Tabla comparativa de integración de la región 9,27 – 9,24 ppm para las fracciones de *Baccharis usterii*, se toma como referencia interna a la integración de la señal de TMS ($\delta = 0,1 - - 0,1$ ppm). C. Tabla de actividad biológica anti-*Trypanosoma cruzi* de cada fracción en estudio de *Baccharis usterii*.

Paralelamente, se realizó un análisis del perfil químico de las fracciones mediante TLC utilizando luz UV, reactivo de Brady y reactivo Vainillin-Sulfúrico como reveladores. En la TLC correspondiente a *Baccharis articulata* (Figura 36) se observó en la fracción AcOEt (carril central) una mancha cuyo valor de $R_F = 0,44$ presenta revelado positivo con los tres reveladores. Esto confirma nuestra hipótesis de que el compuesto posee estructura terpénica, determinado por el revelado con vainillina; grupo

aldehído, determinado por el revelado con reactivo de Brady; y además presenta dobles enlaces conjugados (dieno) o un doble enlace conjugado a un grupo carbonilo (enona), determinado por el revelado con UV.

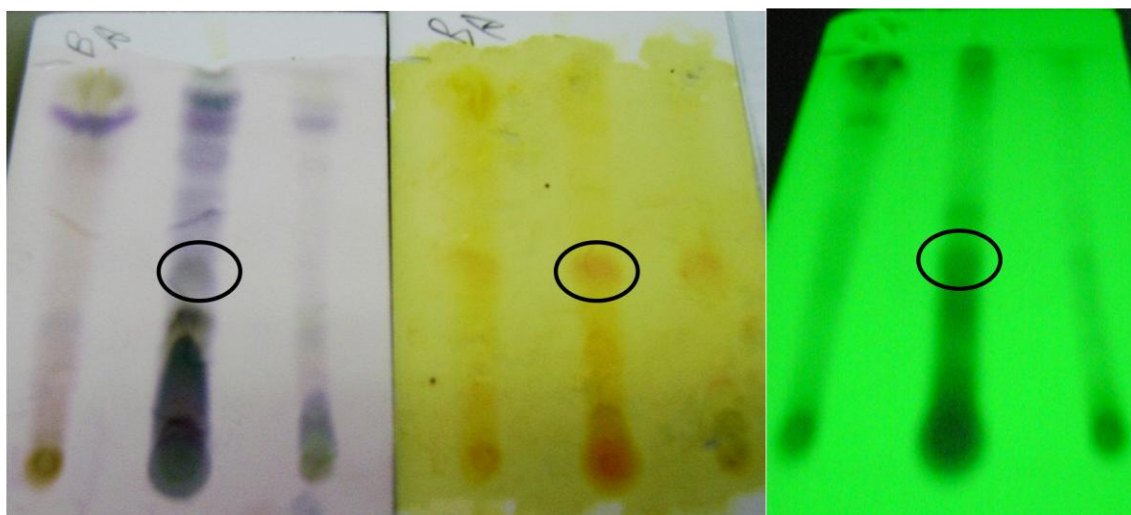


Figura 36 - Cromatografía en capa fina de fracciones de *Baccharis articulata*. Fase móvil: EP/AcOEt/CHCl₃, 1/1/1. Izq.: Vainillin-sulfúrico, centro: Brady, der.: UV. Orden de sembrado de fracciones en cada TLC: izq.: BA EP, centro: BA AcOEt, der.: BA MeOH.

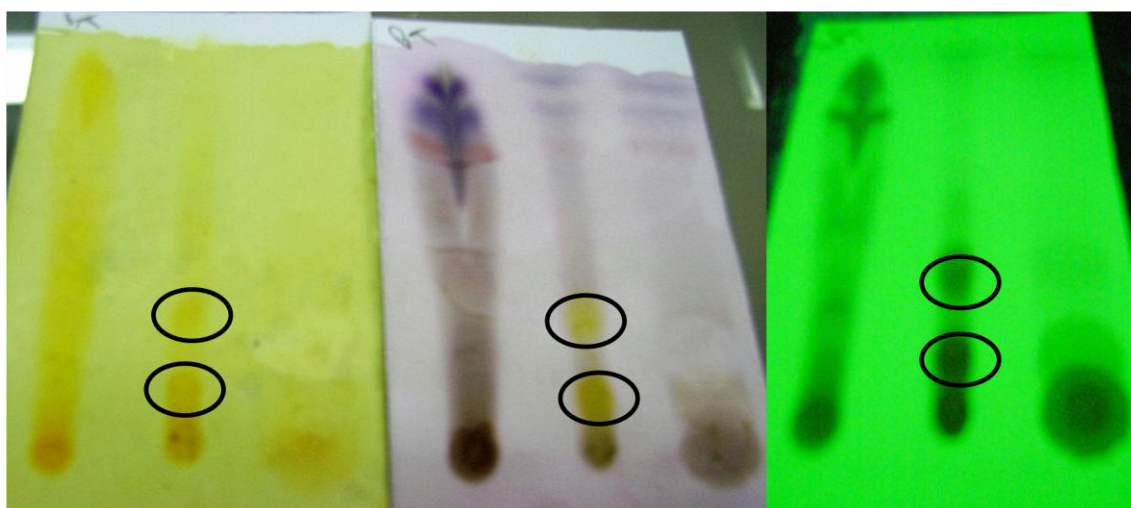


Figura 37 - Cromatografía en capa fina de fracciones de *Baccharis trimera*. Fase móvil: EP/AcOEt/CHCl₃, 1/1/1. Izq. Brady, centro: Vainillin-sulfúrico, der.: UV. Orden de sembrado de fracciones en cada TLC: izq.: BT EP, centro: BT AcOEt, der.: BT MeOH.

En el caso de la cromatografía en capa fina de las fracciones de *Baccharis trimera* se observaron en la fracción AcOEt dos manchas de valores de $R_F = 0,30$ y $0,14$ que

revelan positivo en Brady y UV. Mientras que en el revelado con Vainillin-sulfúrico se observan manchas de coloración amarillo-naranjas que suponen la presencia de flavonoides en la zona. Cabe destacar que en la zona entre 9 y 10 ppm del espectro de $^1\text{H-RMN}$ de *Baccharis trimera* se observan dos señales que podrían corresponder a dos compuestos químicos distintos con grupos aldehídos en sus estructuras.

Finalmente en la TLC de las fracciones de *Baccharis usterii* se observaron resultados similares a *Baccharis trimera*. Tanto en Brady como en UV se observan resultados positivos en el revelado de dos manchas de valores de $R_F = 0,40$ y $0,30$. Mientras que en el revelado con Vainillin-sulfúrico se observan para estas dos manchas coloraciones amarillo-naranjas que también podrían indicar la presencia de flavonoides en la zona. Al igual que en *Baccharis trimera* en la zona entre 9 y 10 ppm del espectro de $^1\text{H-RMN}$ de *Baccharis usterii* se observan dos señales que podrían corresponder a dos compuestos químicos distintos con grupos aldehídos en sus estructuras.

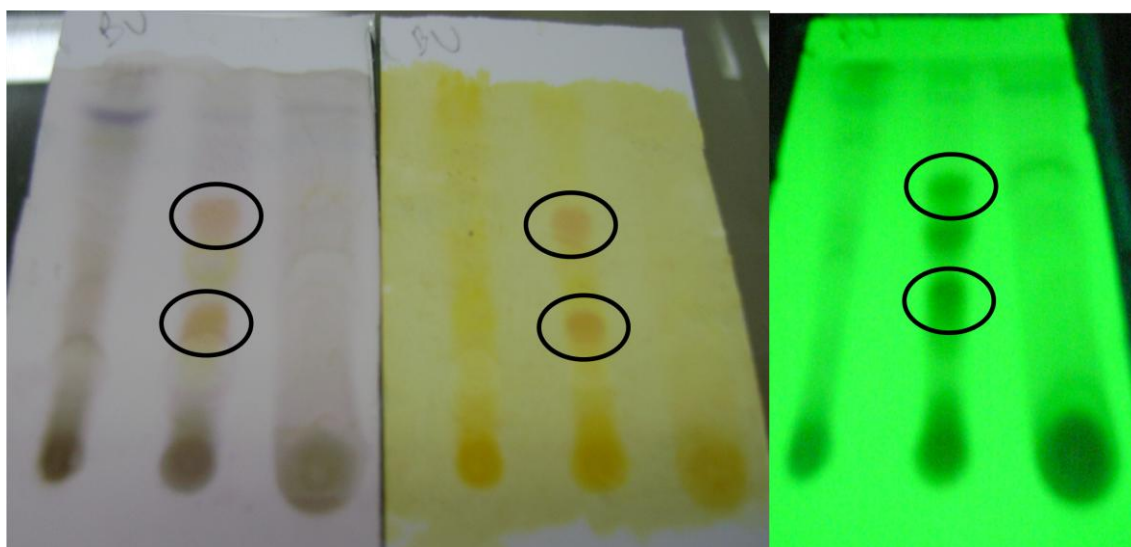


Figura 38 - Cromatografía en capa fina de fracciones de *Baccharis usterii*. Fase móvil: EP/AcOEt/ CHCl_3 , 1/1/1. Izq.: Vainillin-sulfúrico, centro: Brady, der.: UV. Orden de sembrado de fracciones en cada TLC: izq.: BU EP, centro: BU AcOEt, der.: BU MeOH.

Una observación general que surge de las TLCs realizadas es que todos los productos que componen las manchas indicadas presentan una polaridad media ya que sus valores de R_F no son altos habiendo utilizando una mezcla de EP:AcOEt: CHCl_3 (1:1:1) como fase móvil de alta polaridad.

Para la purificación del principio activo se realizaron cromatografías en capa fina preparativas de 20 x 20 cm utilizando como referencia lo observado en las TLCs realizadas anteriormente. Se decidió comenzar con la purificación del aldehído presente en *Baccharis articulata*. Para ello fue seleccionada la fracción de AcOEt que presentó la mayor acumulación del mismo y se sembró por placa una cantidad de 250 mg de fracción. La primer corrida con una mezcla EP:AcOEt:CHCl₃ (1:1:1) como fase móvil, sílica gel como fase estacionaria y posterior revelado con reactivo de Brady muestra el aldehído con un valor de R_F de 0,42, pero al raspar la mancha y extraerla con cloroformo puro se observa que aún persisten los flavonoides en la sección purificada. Por ello se realiza otra corrida con una mezcla de polaridad superior de EP:AcOEt:CHCl₃ (1:1:4) como fase móvil que permite obtener el aldehído con un valor de R_F de 0,42 sin la presencia de flavonoides.

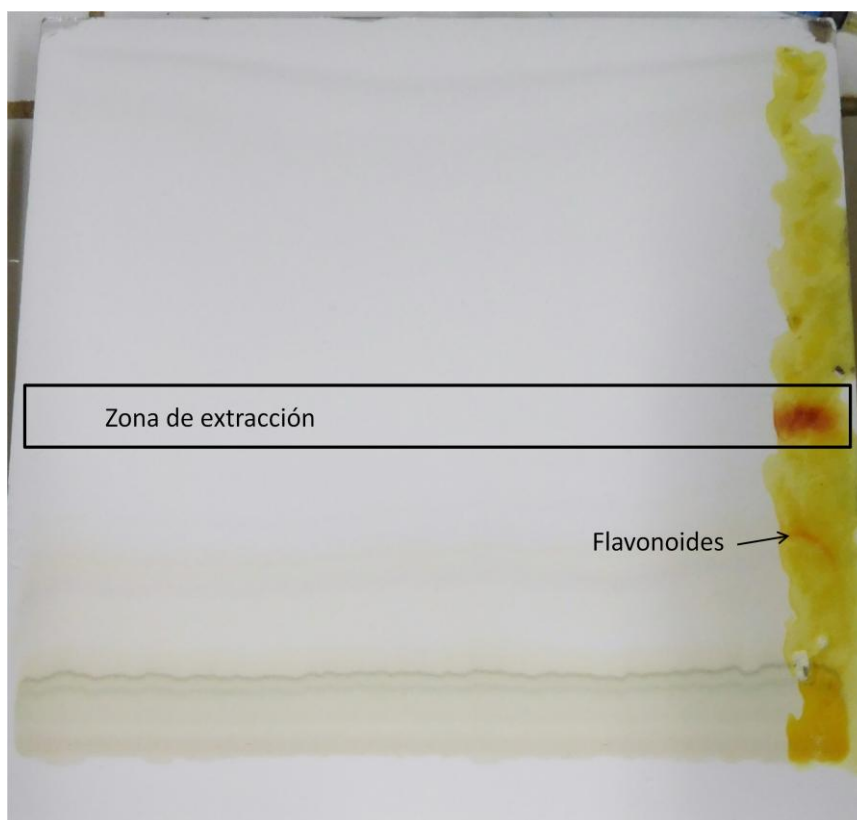
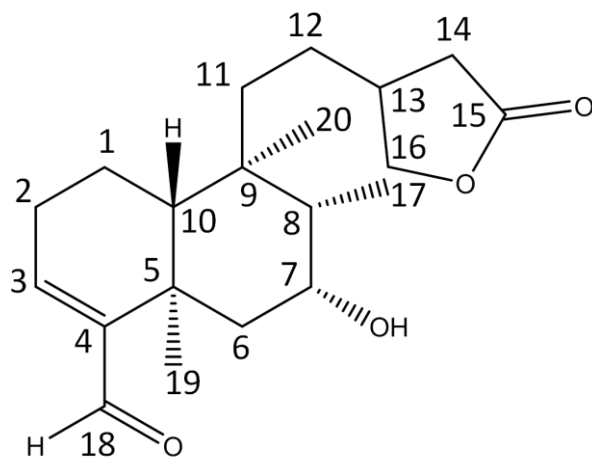


Figura 39 - Cromatografía en capa fina preparativa de la fracción AcOEt de *Baccharis articulata*. El extremo derecho fue revelado con reactivo de Brady y se indica la zona de extracción del aldehído. Fase estacionaria: sílica gel. Fase móvil: EP:AcOEt:CH₃Cl (1:1:4).

Una vez raspada la zona de $R_F = 0,42$ se extrae el compuesto de interés de la sílica utilizando como disolvente cloroformo puro y luego se seca la muestra. Habiendo sembrado 250 mg de fracción AcOEt se obtienen en promedio 2 mg de la fracción purificada. Se realizó la identificación de los componentes presentes en la fracción purificada mediante ^1H -RMN donde se obtuvo una significativa aproximación a la elucidación estructural del aldehído diterpeno que se buscaba. Se utilizaron estudios ^1H , ^{13}C , experimentos bidimensionales homonucleares y heteronucleares para la obtención de la aproximación propuesta. Se encontró que el aldehído forma parte de una lactona diterpénica derivada del sistema *ent*-clerodano. Se propone la estructura y la asignación de las señales de los protones y carbonos del espectro de RMN (Figura 40).

Para la elucidación de la estructura propuesta se combinan estudios de ^1H -RMN, ^{13}C -RMN, bidimensionales homo y heteronuclear, COSY, HSQC y HBMC. Comenzando con el espectro de ^1H -RMN (Figura 41) se fijó la señal del protón del aldehído (9,75 ppm) como referencia de integración equivalente a un protón se integraron de forma manual el resto de las señales presentes en el espectro obtenido. Se observaron en correlación con la señal del aldehído señales muy características, las que pueden ser asignadas a tres grupos metilos ($\delta = 0,84$ ppm, 3H, s; $\delta = 0,89$ ppm, 3H, s; y $\delta = 1,15$ ppm, 3H, s) y un hidrógeno olefínico ($\delta = 5,33$ ppm, 1H, m). Por otro lado, se observa un número importante de señales que por el tipo de multiplicidad y desplazamiento químico (1,0 – 2,5 ppm) podrían corresponder a protones metilénicos. Adicionalmente, por el tipo de integración y multiplicidad en la región 3,4 – 4,5 ppm aparece un grupo de señales que se podrían corresponder con metilenos unidos a grupos desblindantes. Comparando las señales características con compuestos ya descritos para esta especie se encontró una significativa correlación con el trabajo de Dai y colaboradores donde se describió el aislamiento de 16,19-dilactona de 15,18-diácido-8-hidroxi-7-oxo-*ent*-clerod-3-eno y 15,16-epoxi-7,18-dihidroxi-15-metoxi-*ent*-clerod-3-eno (Figura 42) [148].

También se observó la presencia de otros compuestos, además del compuesto de interés, en la fracción purificada. Este hecho no resultaría un inconveniente para la elucidación estructural del compuesto de interés. Podría tratarse de diterpenos de similares características que presentan señales en resonancia magnética nuclear de protón asignables a grupos furanos (6,0 – 7,5 ppm) de compuestos descrito en este género [149].



¹ H	δ_H (ppm), integración	multiplicidad	¹³ C	δ_C (ppm)
H1	1,55, 2H	m	C1	17,6
H2a	2,02, 1H	m	C2	26,4
H2b	2,23, 1H	m		
H3	5,33, 1H	m	C3	129,2
-	-	-	C4	142,0
-	-	-	C5	39,0
H6a	2,21, 1H	m	C6	41,0
H6b	2,45, 1H	m		
H7	3,42, 1H	m	C7	70,5
H8	1,63, 1H	m	C8	38,1
-	-	-	C9	38,0
H10	2,32, 1H	m	C10	41,1
H11	1,10, 2H	m	C11	36,7
H12	1,70, 2H	m	C12	32,2
H13	2,84, 1H	m	C13	41,0
H14a	2,17, 1H	m	C14	35,8
H14b	2,38, 1H	m		
-	-	-	C15	170,6
H16a	4,41, 1H	m	C16	71,5
H16b	4,02, 1H	m		
H17	0,89, 3H	s	C17	12,9
H18	9,75, 1H	s	C18	191,4
H19	1,15, 3H	s	C19	24,9
H20	0,84, 3H	s	C20	18,2

Figura 40 - Estructura propuesta para el compuesto de interés y tabla con las asignaciones de las señales de protones y carbonos de los correspondientes espectros de RMN.

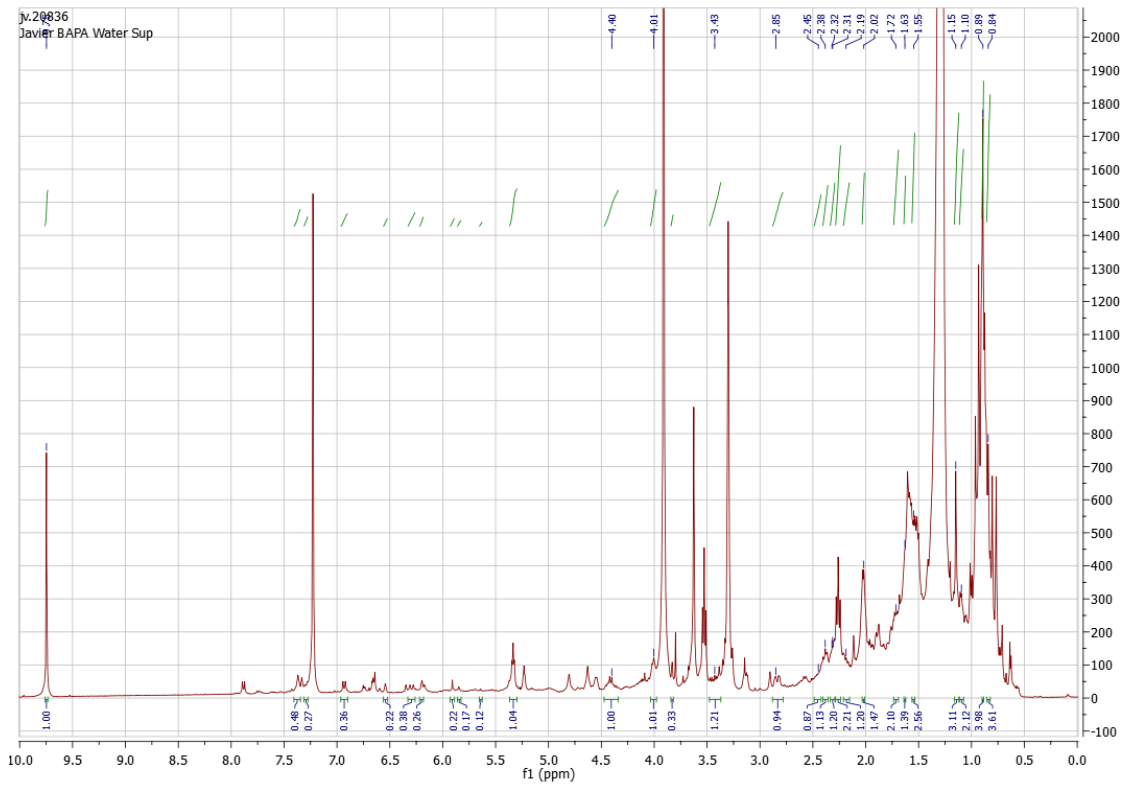


Figura 41 - Espectro ^1H RMN de la fracción purificada.

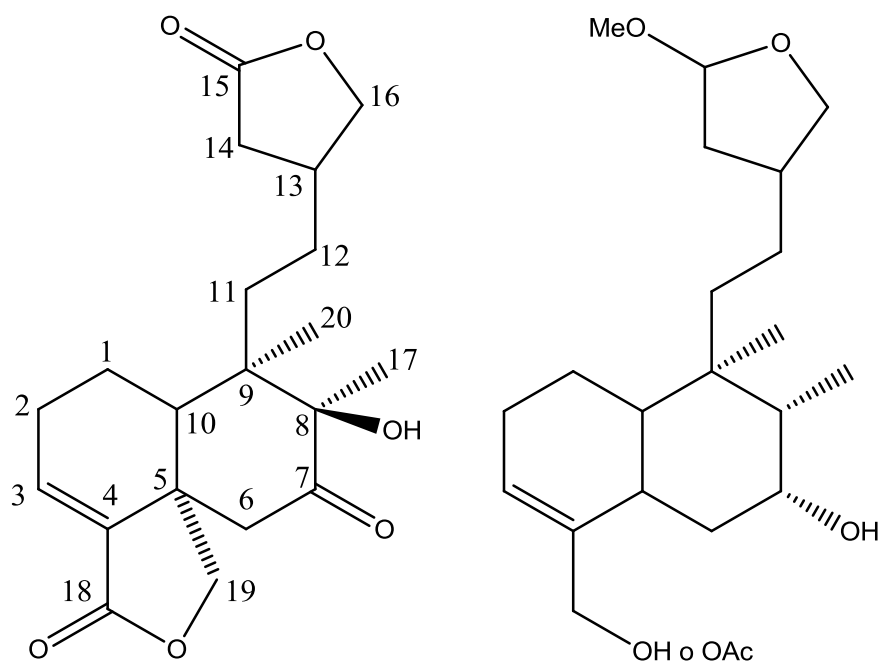


Figura 42 - Diterpenos aislados de *Baccharis articulata* por Dai y colaboradores [148].

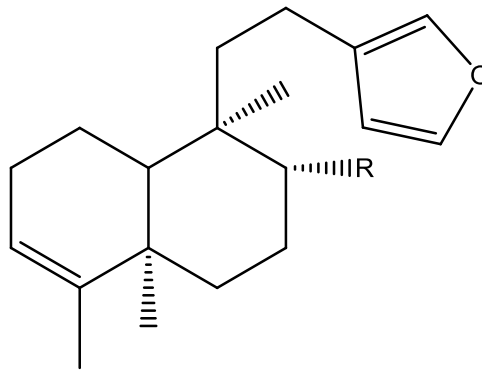


Figura 43 - Furanos diterpenos descrita por Zdero y colaboradores [149].

Continuando con la elucidación estructural del compuesto de interés, partiendo del protón olefínico H2 y a través de los experimentos de RMN homonucleares de COSY (Figura 44) se determinan los hidrógenos vecinos a dicho protón. Paralelamente, este experimento permite reconocer otros grupos de protones acoplados escalaramente. Protones unidos a C1-C2-C3 y protones unidos a C11-C12-C13, según denominación usada en la Figura 40 (Figura 45).

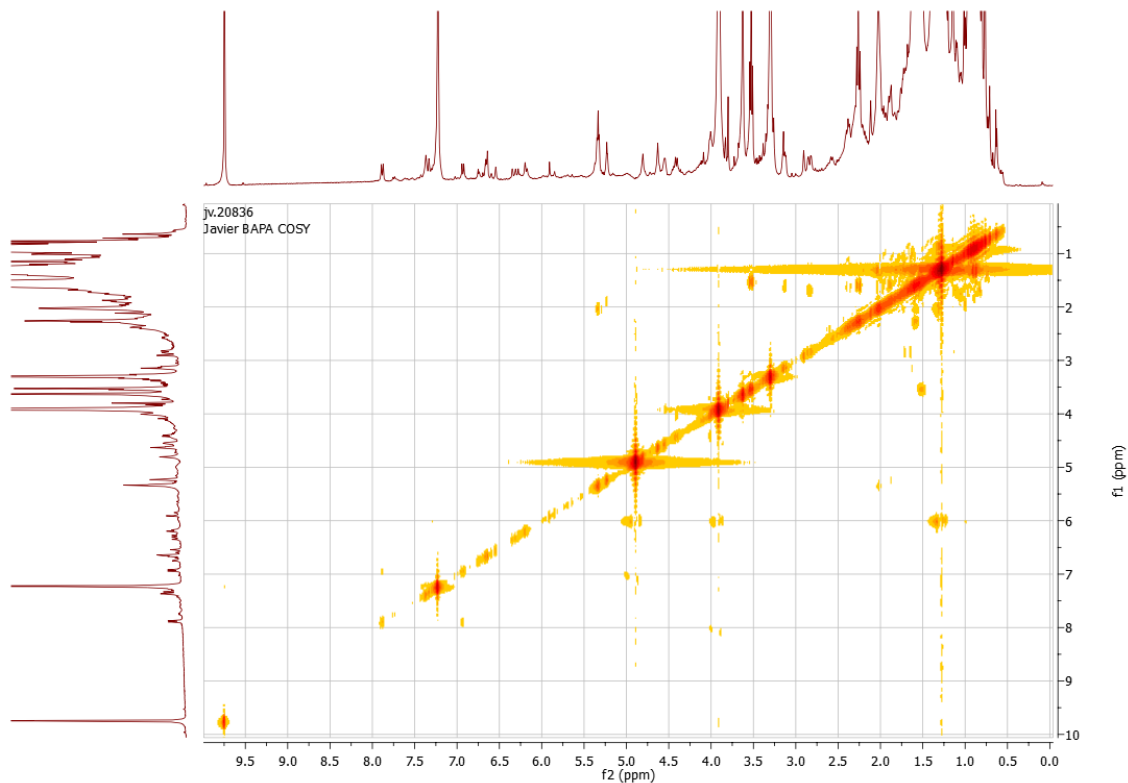


Figura 44 - Experimento COSY de la fracción purificada.

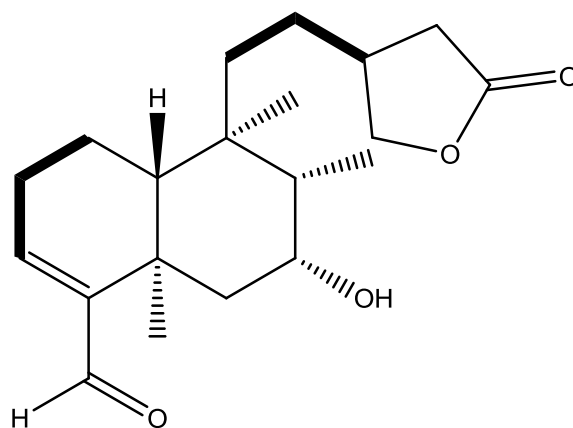


Figura 45 - En línea gruesa se muestran las correlaciones ^1H - ^1H identificadas con el experimento COSY para la estructura propuesta.

Por otro lado, los experimentos de RMN heteronucleares, ^1H - ^{13}C (experimentos HSQC y HMBC) (Figura 46) permiten inferir que la molécula de interés posee tres carbonos metílicos (C17, C19 y C20, denominación según Figura 40), siete carbonos metilénicos (C1, C2, C6, C11, C12, C14 y C16, denominación según Figura 40), cuatro carbonos metínicos (C7, C8, C10 y C13, denominación según Figura 40), dos carbonos carbonílicos (C15 y C18, denominación según Figura 40), dos carbonos alquénicos (C3 y C4, denominación según Figura 40) y dos carbonos cuaternarios sp^3 (C5 y C9, denominación según Figura 40). Estas asignaciones se obtuvieron a través de las correlaciones heteronucleares a distancia que se muestran en la Figura 47.

Combinando la información aportada por estas técnicas (HSQC y HMBC) con los datos de los otros experimentos se llega a la estructura química propuesta para el compuesto de interés, el diterpeno de tipo clerodano 7-hidroxi-*ent*-clerod-3-en-16-lactona-18-al.

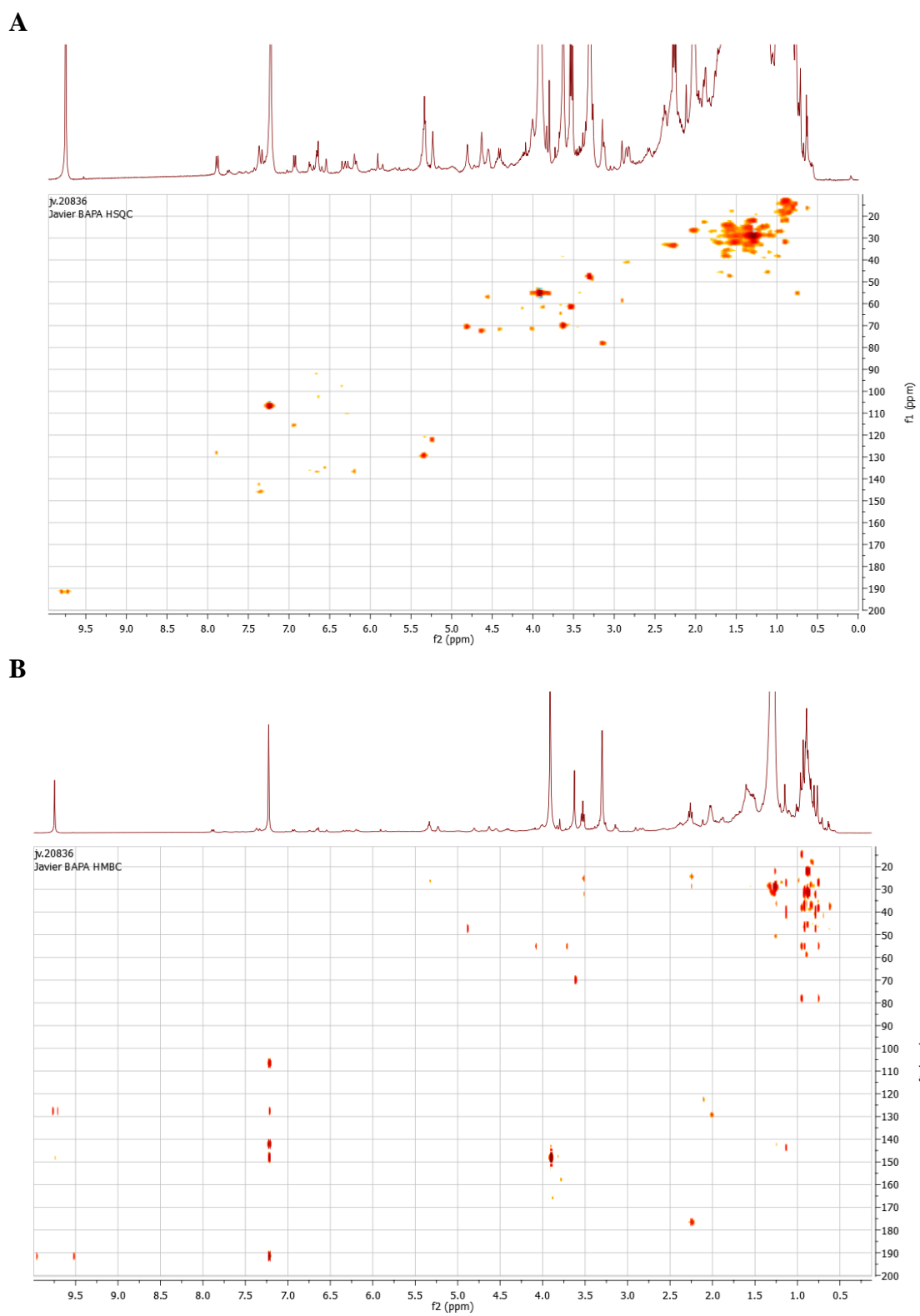


Figura 46 – A. Experimento HSQC de la fracción purificada. B. Experimento HMBC de la fracción purificada.

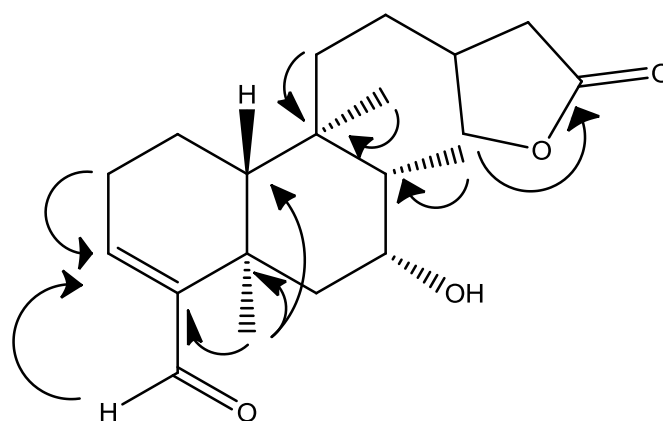


Figura 47 - Representación gráfica de correlaciones heteronucleares identificadas para la estructura propuesta.

En nuestro conocimiento la estructura propuesta no ha sido descrita aún ni para esta planta ni para ninguna otra hasta el momento. El género *Baccharis* se caracteriza por la presencia de diterpenos de tipo *ent*-clerodano [146-149], que se esperaba basado en los antecedentes de nuestro grupo en la búsqueda de nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi*, serían los responsables de la significativa actividad antiproliferativa del parásito. Para la confirmación de nuestra hipótesis se evaluó la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* de la fracción purificada y la misma presentó un valor de CI_{50} de $20,5 \pm 1,1 \mu\text{g/mL}$.

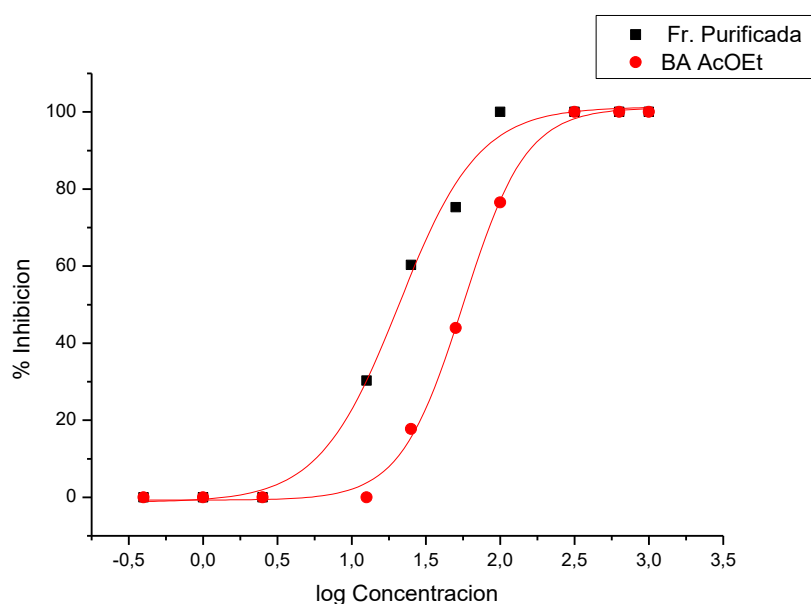


Figura 48 – Gráfico de inhibición de crecimiento de *T. cruzi* en función de la concentración de la BA AcOEt y la Fracción Purificada a partir de la misma.

En la figura 48 se observa el aumento de la actividad biológica anti-*Trypanosoma cruzi* en la fracción purificada que contiene principalmente el compuesto elucidado. Con respecto a la fracción AcOEt original, el CI₅₀ se modificó desde 55.8 µg/mL a 20.5 µg/mL.

4.5. Estandarización del perfil químico de *Baccharis spp* mediante propagación del cultivo utilizando clonación por esqueje.

Este trabajo comenzó con la búsqueda de plantas madre de *Baccharis articulata*, *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii* en la localidad de Villa Serrana, Lavalleja, en época de verano (Figura 49). Se colectaron 2 especímenes de cada especie pero luego fue conservado solamente uno para realizar los esquejes. Se seleccionó el espécimen que mejores características fenotípicas presentara al momento del esquejado.



Figura 49 - Colecta de los especímenes de *Baccharis spp.* en la localidad de Villa Serrana.

Se realizaron los esquejes de los 3 especímenes y se siembran en los carriles de cultivo que ya habían sido preparados (composición del suelo: 1/3 tierra negra, 1/3 compost, 1/3 arena) y cubiertos con mulch con un mes de anterioridad. Cada nuevo plantin se cubrió con un vaso de plástico transparente de 500 mL para conservar la humedad relativa en ese microambiente generado y prevenir la muerte por falta de agua en el proceso de desarrollo de raíces que deberán atravesar los nuevos plantines (Figura 50).



Figura 50 - Carril de cultivo con plantines cubiertos con vasos descartables para la conservación de la humedad.

Durante los primeros tres meses posteriores al esquejado se realiza un seguimiento del cultivo y observación del proceso de enraizamiento. Luego de los tres meses se realizó un relevamiento (Figura 51) y se calculó el porcentaje de sobrevivencia de los esquejes realizados (Tabla 7).



Figura 51 - Aparición de las primeras raíces que se están desarrollando en los esquejes sembrados.

Se observó que la técnica empleada permitió desarrollar con éxito la propagación del cultivo de *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii*. No así para *Baccharis articulata* que al ser una planta de hoja fina seguramente presente menor cantidad de reservas para sobrevivir al proceso de desarrollo de raíces antes de obtener nuevos nutrientes exógenos.

Tabla 7 - Porcentajes de sobrevivencia de los esquejes realizados de *Baccharis* spp.

Especie	N° de esquejes inicio	N° de plantas final	Porcentaje sobrevivencia (%)
<i>Baccharis articulata</i>	36	3	8
<i>Baccharis trimera</i>	82	69	84
<i>Baccharis usterii</i>	58	54	93

Luego de un año de cuidado del cultivo las plantas presentan un aspecto muy bueno como se observa en la Figura 52. En este momento, un año después del esquejado, se realiza una cosecha de partes aéreas de *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii* para la observación de la estandarización del perfil químico.

El material cosechado se dividió en tres lotes por especie y se realizaron los extractos etanólicos de cada lote. Se realizó el análisis de los perfiles químicos de cada extracto obtenido mediante $^1\text{H-RMN}$. Se observa que la acumulación del aldehído entre lotes es similar, resultado que demuestra la eficiencia del método de clonación para la estandarización del perfil químico de las plantas en estudio (Tabla 8).



Figura 52 - Fotografía del cultivo de *Baccharis* spp. un año después de la siembra de los esquejes.

Los resultados obtenidos en el proceso de estandarización permiten pensar en escalar el cultivo para la preparación de considerables cantidades de extractos que puedan ser evaluados en modelos *in vivo* de eficacia y seguridad para validar su uso como nuevo tratamiento para la enfermedad de Chagas.

Tabla 8 - Resultados de análisis por ^1H -RMN de los tres lotes de *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii* cosechados del cultivo generado por clonación.

Muestra	Integración TMS ^a	Integración región aldehído diterpenico ^b
BT^c 1	10	2,01
BT 2	10	2,35
BT 3	10	2,23
BU^d 1	10	1,23
BU 2	10	1,51
BU 3	10	1,39

^a Se utiliza la integración de la señal de TMS ($\delta= 0,1 - - 0,1$ ppm) como referencia. ^b Se utiliza la región de 9.76 – 9.70 ppm para BT y de 9.27 – 9.24 para BU. ^c BT, *Baccharis trimera*. ^d BU, *Baccharis usterii*

5. Conclusiones

En la búsqueda de nuevos agentes anti-*Trypanosoma cruzi* en plantas del Uruguay se ha encontrado que *Baccharis trimera*, *Baccharis articulata*, *Baccharis usterii* e *Hydrocotyle bonariensis* presentan relevante actividad biológica destacándose la selectividad hacia el parásito en el caso de las tres especies del género *Baccharis*.

Mediante metabolómica por Resonancia Magnética Nuclear se analizaron los cambios en el perfil químico de las plantas y su relación con la actividad biológica o citotóxica. Se determinó la naturaleza química de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi* y de los componentes citotóxicos frente a células mamíferas. En las plantas del género *Baccharis* se identificó a diterpenos con grupos aldehídos en su estructura como los responsables de la actividad biológica deseada, mientras que en *Hydrocotyle bonariensis* se infiere el efecto sinérgico de triterpenos y flavonoides. En cuanto a la citotoxicidad frente a células mamíferas en *Hydrocotyle bonariensis* los mismos metabolitos con actividad anti-*Trypanosoma cruzi* presentan importante citotoxicidad hacia células mamíferas, mientras que en *Baccharis* spp. se atribuyen los bajos niveles de citotoxicidad a otros diterpenos de tipo *ent*-clerodano. También fue posible inferir las condiciones necesarias, tipo de suelo y época de año de la colecta, para su máxima expresión en la planta. En el género *Baccharis* se observó una relación directa entre el período de floración y la acumulación de diterpenos aldehídos en las plantas, a su vez el suelo rocoso también incide de forma favorable para la acumulación de los mismos.

Mediante el fraccionamiento bioguiado se observó que para las tres especies del género *Baccharis* la acumulación de los compuestos de interés se da en la fracción de polaridad media, fracción AcOEt. Se realizó para *Baccharis articulata* la purificación del compuesto de interés y se obtuvo la estructura propuesta para el mismo, 7-hidroxi-*ent*-clerod-3-en-16-lactona-18-al.

También se realizó la estandarización del cultivo de *Baccharis* spp. mediante clonación por esqueje y se obtuvieron muy buenos porcentajes de sobrevivencia para *Baccharis trimera* y *Baccharis usterii*. Para estas dos especies se comprobó que la metodología empleada permitió la estandarización del perfil químico entre todas las plantas del cultivo. Cabe destacar que se trabaja con especies silvestres, con alto

potencial de valor agregado para un futuro desarrollo biotecnológico, tal como sugieren los resultados obtenidos hasta el momento.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten pensar en nuevos tratamientos para la enfermedad de Chagas en base a extractos enteros de *Baccharis* spp. Siendo necesario pasar a etapa de ensayos *in vivo* de eficacia y seguridad para continuar con el desarrollo del mismo.

6. Bibliografía

1. Maya, J.D.; Orellana, M.; Ferreira, J.; Kemmerling, U.; López-Muñoz, R.; Morello, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. *Biol. Res.* **2010**, 43, 323 - 331.
2. de Castro, S.L.; Pinto, M.C.F.R.; Pinto, A.V. Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. *Microbios* **1994**, 78, 83 – 90.
3. Álvarez, G.; Aguirre-López, B.; Varela, J.; Cabrera, M.; Merlino, A.; López, G.V.; Lavaggi, M.L.; Porcal, W.; Di Maio, R.; González, M.; Cerecetto, H.; Cabrera, N.; Pérez-Montfort, R.; Gómez Puyou, A. Massive screening yields novel and selective *T. cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5767 - 5772.
4. Storino, R.; Milei, J. Introducción. Enfermedad de Chagas. *Editorial Mosby-Doyma*, Argentina. **1994**, 1, 1-7.
5. Storino, R. Enfermedad de Chagas. En Medicina, Mautner B y col. *Centro Editor Fundación Favalaro*, Buenos Aires. **1998**, 25, 774-783.
6. Storino, R.; Milei, J. Estudio clínico, con métodos complementarios no invasivos y correlación anatomopatológica da la enfermedad de Chagas. Premio Federico Guillermo Scholottman. **1985**.
7. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.
8. Barr, S.C.; Gossett, K.A.; Klei, T.R. Clinical, clinicopathologic, and parasitologic observations of trypanosomiasis in dogs infected with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Amer. J. Vet. Res.* **1991**, 52(6), 954-960.
9. Kirchhoff, L.V. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Clinical Presentation. Departments of Internal Medicine (Infectious Diseases) and Epidemiology, Carver College of Medicine and College of Public Health, University of Iowa. 2011.
10. de Rosa, M. Período indeterminado de la enfermedad de Chagas. *Rev. Argent. Cardiol.* **2002**, 70 (1).
11. Organización Panamericana de la Salud. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. EUA, Washington DC. 2003, 27-39.
12. Schettino, S.; Paz, M.; Perera, R.; Hernandez, R. Chagas Disease as a Cause of Symptomatic Chronic Myocardopathy in Mexican Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2009**, 28, 1011-1013.

13. Botero, D.; Restrepo, M. Parasitosis humanas. Colombia. Corporación para las Investigaciones Biológicas, 2003, 220-224.
14. Tekiel, V.; Alba-Soto, C.D.; González Cappa, S.M.; Postan, M.; Sánchez, D.O. Identification of novel vaccine candidates for Chagas' disease by immunization with sequential fractions of a trypomastigote cDNA expression library. *Vaccine* **2009**, *27*, 1323-1332.
15. Cerecetto, H.; González, M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: Compounds at the final stage of "Hit-to-Lead" phase. *Pharmaceuticals* **2010**, *3*, 810-838.
16. Merlino, A.; González, M., Cerecetto, H. Targets for anti-*T. cruzi* drugs in the post-genomic era. *Curr. Enz. Inhib.* **2010**, *6* (4), 195-210.
17. Cerecetto, H.; González, M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr. Topics Med. Chem.* **2002**, *2* (11), 1187-1213.
18. Fournet, A.; Muñoz, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs. *Curr. Topics Med. Chem.* **2002**, *2* (11), 1215-1237.
19. Hernandez Magaña, R.; Gally Jorda, M. Plantas Medicinales. Editorial Árbol, México **1981**, 7-8.
20. Salas, C.; Pérez-Vera, P.; Frías, S. Genetic abnormalities in leukemia secondary to treatment in patients with Hodgkin's disease. *Rev. Invest. Clin.* **2011**, *63* (1), 53-63.
21. Bussmann, R.W.; Sharon, D. Traditional medicinal plant use in Loja province, Southern Ecuador. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 2-44.
22. Bussmann, R.W.; Sharon, D. Traditional plant use in Northern Peru: tracking two thousand years of healing culture. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* **2006**, *2*, 47-65.
23. Bravo Díaz, L. Farmacognosia. Ed. Elsevier, España **2006**, 1-9.
24. Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002 *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022-1037.
25. Salem, M.; Werbovetz, K. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Curr. Med. Chem.* **2006**, *13*, 2571-2598.
26. Rates, S.M. Plants as source of drugs. *Toxicol* **2001**, *39*, 603-613.
27. Izumi, E.; Ueda-Nakamura, T.; Prado Dias, B.; Veiga, V.F.; Vataru-Nakamura, C. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 809.

28. Olivieri, B.P.; Molina, J.T.; de Castro, S.L.; Pereira, M.C.; Calvet, C.M.; Urbina, J.A.; Araújo-Jorge, T.C. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *36*, 79-83.
29. Varela, J.; Lavaggi, M.L.; Cabrera, M.; Rodríguez, A.; Miño, P.; Chiriboga, X.; Cerecetto, H.; González, M. Bioactive-guided identification of labdane diterpenoids from aerial parts of *Aristeguietia glutinosa* Lam. as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Nat. Prod. Comm.* **2012**, *7*(9), 1139 - 42.
30. Varela, J.; Serna, E.; Torres, S.; Yaluff, G.; Vera de Bilbao, N.; Miño, P.; Chiriboga, X.; Cerecetto, H.; González, M. *In Vivo* Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Hydro-Ethanollic Extract and Isolated Active Principles from *Aristeguietia glutinosa* and Mechanism of Action Studies. *Molec.* **2014**, *19*, 8488 - 502.
31. Tempone, A.G.; Sartorelli, P.; Teixeira, D.; Prado, F.; Calixto, I.; Lorenzi, H.; Melhem, M. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2008**, *103*, 443-449.
32. Vivot Lupi, E.; Sánchez Brizuela, C.; Cacik Jeifetz, F.; Sequin Acosta, C. Screening of antifungal activity of extracts present in Entre Ríos flora species. *Rev. Cubana Farm.* **2009**, *43*, 74-84.
33. Alonso Paz, E.; Bassagoda, M.J.; Ferreira, F. Yuyos: uso racional de las plantas medicinales. *Ed. Fin de Siglo* **2007**, 48-49, 85.
34. Lahitte, H.; Hurrell, J.; Belgrano, M.; Jankowski, L.; Haloua, P.; Mehlreter, K. Biota Rioplatense II, Plantas Medicinales Rioplatenses. *Ed. Literature of Latin America* **1998**, 40-41, 52, 104, 138-140, 146.
35. Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiología vegetal. *Ed. Publicacions de la Universitat Jaume I* **2006**, 533-545.
36. Sarker, S.D.; Gray, A.I.; Latif, Z. Natural products isolation. *Human Press*, New Jersey. **1998**, 1.
37. Da Silva Luz, S. *Universidade Federal de Santa Catarina*, Tesina de Posgraduación en Farmacia, **2003**, 28.
38. Devaux, P.; Horning, M.; Horning, E. Benzyloxime derivatives of steroids. A new metabolic profile procedure for human urinary steroids human urinary steroids. *Anal. Lett.* **1971**, *4*, 151-160.

39. Cunnick, W.; Cromie, J.; Cortell, R.; Wright, B.; Beach, E.; Seltzer, F.; Miller, S. Value of biochemical profiling in a periodic health examination program: analysis of 1,000 cases. *Bull. N. Y. Acad. Med.* **1972**, 48, 5–22.
40. Judy, K.J.; Schooley, D.A.; Dunham, L.L.; Hall, M.; Bergot, B.J.; Siddall, J.B. Isolation, structure, and absolute configuration of a new natural insect juvenile hormone from *Manduca sexta*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1973**, 70, 1509–1513.
41. Sims, J.J.; Donnell, M.S.; Leary, J.V.; Lacy, G.H. Antimicrobial agents from marine algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1975**, 7, 320–321.
42. Kingston, D.G.; Rao, M.M.; Zucker, W.V. Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *J. Nat. Prod.* **1979**, 42, 496–499.
43. Vrbanac, J.; Braselton, W.; Holland, J.; Sweeley, C. Automated qualitative and quantitative metabolic profiling analysis of urinary steroids by a gas chromatography mass spectrometry-data system, *J. Chromatogr.* **1982**, 239, 265–276.
44. Nicholson, J.; O'Flynn, M.P.; Sadler, P.; Macleod, A.; Juul, S.; Sonksen, P. Proton nuclear magnetic resonance studies of serum, plasma and urine from fasting normal and diabetic subjects. *Biochem. J.* **1984**, 217, 365–375.
45. Bales, J.R.; Higham, D.P.; Howe, I.; Nicholson, J.K.; Sadler, P.J. Use of high-resolution proton nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid multi-component analysis of urine. *Clin. Chem.* **1984**, 30, 426–432.
46. Bales, J.; Bell, J.; Nicholson, J.; Sadler, P.; Timbrell, J.; Hughes, R.; Bennett, P.; Williams, R. Metabolic profiling of body fluids by proton NMR: self-poisoning episodes with paracetamol (acetaminophen). *Magn. Reson. Med.* **1988**, 6, 300–306.
47. Sauter, H.; Lauer, M.; Fritsch, H. Metabolic profiling of plants: a new diagnostic technique. *ACS Symp. Ser. Am. Chem. Soc.* **1991**, 443, 288–299.
48. Smith, C.A.; O'Maille, G.; Want, E.J.; Qin, C.; Trauger, S.A.; Brandon, T.R.; Custodio, D.E.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. METLIN: a metabolite mass spectral database. *Ther. Drug Monit.* **2005**, 27, 747–751.
49. Sumner, L.W.; Duran, A.L.; Huhman, D.V.; Smith, J.T. Chapter three metabolomics: a developing and integral component in functional genomic studies of *Medicago truncatula*. *Recent Adv. Phytochem.* **2002**, 36, 31–61.
50. Kim, H.K.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. NMR-based metabolomics analysis of plants. *Nat. Protocols* **2010**, 5, 536 - 549.
51. Fiehn, O.; Kopka, J.; Dörmann, P.; Altmann, T.; Trethewey, R.; Willmitzer, L. Metabolic profiling for plant functional genomics. *Biotechnol.* **2000**, 18, 1157-1161.

52. Rochfort, S. Metabolomics revisited: a new "omics" platform technology for systems biology and implications for natural products research. *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1813-1820.
53. Hall, R.D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytol.* **2006**, 169, 453-468.
54. Verpoorte, R.; Alfermann, A.W.; Johnson, T.S. Applications of plant metabolic engineering. *Phytochem. Rev.* **2007**, 6, 3-14.
55. Fishedick, J.T.; Hazekamp, A.; Erkelens, T.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic fingerprinting of *Cannabis sativa* L., cannabinoids and terpenoids for chemotaxonomic and drug standardization purposes. *Phytochem.* **2010**, 71, 2058-2073.
56. Van der Kooy, F. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Med.* **2009**, 75, 763-775.
57. Georgiev, M.I. *Phytochem.* Metabolic differentiations and classification of *Verbascum* species by NMR-based metabolomics. **2011**, 72, 2045-2051.
58. Kim, H.; Khan, S.; Wilson, E.G.; Prat Kricun, S.D.; Meissner, A.; Göröler, S.; Deelder, A.M.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. Metabolic classification of south American *Ilex* Species by NMR-based metabolomics. *Phytochem.* **2010**, 71, 773-784.
59. Verpoorte, R.; Choi, Y.H.; Mustafa, N.R.; Kim, H.K. Metabolomics: back to basics. *Phytochem.* **2008**, 7, 525-537.
60. Choi, Y.H.; Tapias, E.C.; Kim, H.K.; Lefeber, A.W.; Erkelens, C.; Verhoeven, J.T.; Brzin, J.; Zel, J.; Verpoorte, R. *Plant Physiol.* Metabolic discrimination of *Catharanthus roseus* leaves infected by phytoplasma using ¹H-NMR spectroscopy and multivariate data analysis. **2004**, 135, 2398-2410.
61. Ali, K.; Maltese, F.; Fortes, A.M. Monitoring biochemical changes during grape berry development in Portuguese cultivars by NMR spectroscopy. *Food Chem.* **2010**, 124, 1760-1769.
62. Allwood, J.W.; Goodacre, R. An introduction to liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. *Phytochem. Anal.* **2010**, 21, 33-47.
63. Allwood, J.W.; Parker, D.; Beckmann, M.; Draper, J.; Goodacre, R. Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for plant metabolite profiling and metabolite identification. *Methods Mol. Biol.* **2012**, 860, 157-76.
64. Kim, H.K.; Choi, Y.H.; Verpoorte, R. NMR-based plant metabolomics: where do we stand, where do we go? *Trends Biotechnol.* **2011**, 29, 267-75.

65. Kueger, S.; Steinhauser, D.; Willmitzer, L.; Giavalisco, P. High resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole cell analysis to subcellular metabolite distributions. *Plant J.* **2012**, *70*, 39-50.
66. Allwood, J.W.; Ellis, D.I.; Goodacre, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. *Physiol. Plant.* **2008**, *132*, 117-35.
67. Goodacre, R.; Vaidyanathan, S.; Dunn, W.B.; Harrigan, G.G.; Kell, D.B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnol.* **2004**, *22*, 245-52.
68. Boccard, J.; Rudaz, S. Harnessing the complexity of metabolomic data with chemometrics. *J. Chemom.* **2014**, *28*, 1-9.
69. van der Greef, J.; Smilde, A.K. Symbiosis of chemometrics and metabolomics: past, present, and future. *J. Chemom.* **2005**, *19*, 376-86.
70. Wolfender, J.L.; Rudaz, S.; Choi, Y.H.; Kim, H.K. Plant metabolomics: from holistic data to relevant biomarkers. *Curr. Med. Chem.* **2013**, *20*, 1056-90.
71. Banimustafa, A.H.; Hardy, N.W. A strategy for selecting data mining techniques in Metabolomics. *Methods Mol. Biol.* **2012**, *860*, 317-333.
72. Hall, R.D. Annual Plant Reviews, Biology of Plant Metabolomics: John Wiley & Sons. **2011**.
73. Kim, H.K.; Verpoorte, R. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochem. Anal.* **2010**, *21*, 4-13.
74. Villas-Boas, S.G.; Mas, S.; Akesson, M.; Smedsgaard, J.; Nielsen, J.; Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, *24*, 613-46.
75. Ernst, M.; Silva, D.B.; Silva, R.R.; Vêncio, R.Z.; Lopes, N.P. Mass spectrometry in plant metabolomics strategies: from analytical platforms to data acquisition and processing. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*(6), 784-806.
76. Castillo, S.; Gopalacharyulu, P.; Yetukuri, L.; Orešič, M. Algorithms and tools for the preprocessing of LC–MS metabolomics data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2011**, *108*, 23-32.
77. Smith, C.A.; Want, E.J.; O'Maille, G.; Abagyan, R.; Siuzdak, G. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 779-87.

78. Benton, H.; Wong, D.; Trauger, S.; Siuzdak, G. XCMS2: processing tandem mass spectrometry data for metabolite identification and structural characterization. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6382-9.
79. Katajamaa, M.; Miettinen, J.; Orešič, M. MZmine: tool for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics.* **2006**, *22*, 634-6.
80. Pluskal, T.; Castillo, S.; Villar-Briones, A.; Orešič, M. MZmine 2: modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* **2010**, *11*, 395.
81. Sturm, M.; Bertsch, A.; Gropl, C.; Hildebrandt, A.; Hussong, R.; Lange, E. OpenMS-An open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics.* **2008**, *9*.
82. De Vos, R.C.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.J.; Bino, R.J.; Hall, R.D. Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nat. Protocol.* **2007**, *2*, 778-91.
83. Keurentjes, J.J.; Fu, J.; De Vos, C.R.; Lommen, A.; Hall, R.D.; Bino, R.J. The genetics of plant metabolism. *Nat. Genet.* **2006**, *38*, 842-9.
84. Moco, S.; Bino, R.J.; Vorst, O.; Verhoeven, H.A.; de Groot, J.; van Beek, T.A. A liquid chromatography-mass spectrometry-based metabolome database for tomato. *Plant Physiol.* **2006**, *141*, 1205-18.
85. Tikunov, Y.; Lommen, A.; de Vos, C.R.; Verhoeven, H.A.; Bino, R.J.; Hall, R.D. A novel approach for nontargeted data analysis for metabolomics. Large-scale profiling of tomato fruit volatiles. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1125-37.
86. Wei, X.; Sun, W.; Shi, X.; Koo, I.; Wang, B.; Zhang, J. MetSign: A computational platform for high-resolution mass spectrometry-based metabolomics. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 7668-75.
87. Duran, A.L.; Yang, J.; Wang, L.; Sumner, L.W. Metabolomics spectral formatting, alignment and conversion tools (MSFACTs). *Bioinform.* **2003**, *19*, 2283-93.
88. Luedemann, A.; Strassburg, K.; Erban, A.; Kopka, J. TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography—mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinform.* **2008**, *24*, 732-7.
89. Luedemann, A.; von Malotky, L.; Erban, A.; Kopka, J. TagFinder: Preprocessing software for the fingerprinting and the profiling of gas chromatography—mass spectrometry based metabolome analyses. *Plant Metabolomics: Springer* **2012**, 255-86.

90. Lei, Z.; Li, H.; Chang, J.; Zhao, P.X.; Sumner, L.W. MET-IDEA version 2.06; improved efficiency and additional functions for mass spectrometry-based metabolomics data processing. *Metabolomics*. **2012**, *8*, 105-10.
91. Baran, R.; Kochi, H.; Saito, N.; Suematsu, M.; Soga, T.; Nishioka, T. MathDAMP: a package for differential analysis of metabolite profiles. *BMC Bioinformatics*. **2006**, *7*, 530.
92. Hiller, K.; Hangebrauk, J.; Jager, C.; Spura, J.; Schreiber, K.; Schomburg, D. MetaboliteDetector: comprehensive analysis tool for targeted and nontargeted GC/MS based metabolome analysis. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3429-39.
93. Katajamaa, M.; Orešič, M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr. A*. **2007**, *1158*, 318-28.
94. Zhang, Z.M.; Chen, S.; Liang, Y.Z. Baseline correction using adaptive iteratively reweighted penalized least squares. *Analyst*. **2010**, *135*, 1138-46.
95. Jirasek, A.; Schulze, G.; Yu, M.; Blades, M.; Turner, R. Accuracy and precision of manual baseline determination. *Applied Spectrosc.* **2004**, *58*, 1488-99.
96. Pearson, G.A. A general baseline-recognition and baseline-flattening algorithm. *J. Magn. Reson.* **1977**, *27*, 265-72.
97. Gan, F.; Ruan, G.; Mo, J. Baseline correction by improved iterative polynomial fitting with automatic threshold. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2006**, *82*, 59-65.
98. Shao, X.G.; Leung, A.M.; Chau, F.T. Wavelet: a new trend in chemistry. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36*, 276-83.
99. Wang, W.; Zhou, H.; Lin, H.; Roy, S.; Shaler, T.A.; Hill, L.R. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4818-26.
100. Eilers, P.H. Parametric time warping. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 404-11.
101. Boelens, H.F.; Dijkstra, R.J.; Eilers, P.H.; Fitzpatrick, F.; Westerhuis, J.A. New background correction method for liquid chromatography with diode array detection, infrared spectroscopic detection and Raman spectroscopic detection. *J. Chromatogr. A*. **2004**, *1057*, 21-30.
102. Liu, X.; Zhang, Z.; Sousa, P.F.; Chen, C.; Ouyang, M.; Wei, Y. Selective iteratively reweighted quantile regression for baseline correction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 1-14.

103. Gika, H.G.; Theodoridis, G.; Extance, J.; Edge, A.M.; Wilson, I.D. High temperature-ultra performance liquid chromatography–mass spectrometry for the metabonomic analysis of Zucker rat urine. *J. Chromatogr. B.* **2008**, 871, 279-87.
104. Liu, R.; Lin, D.; Chang, W.; Liu, C.; Tsay, W.; Li, J. Issues to address when isotopically labeled analogues of analytes are used as internal standards. *Anal. Chem.* **2002**, 74, 618-26.
105. Redestig, H.; Fukushima, A.; Stenlund, H.; Moritz, T.; Arita, M.; Saito, K. Compensation for Systematic Cross-Contribution Improves Normalization of Mass Spectrometry Based Metabolomics Data. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 7974-80.
106. Gika, H.G.; Macpherson, E.; Theodoridis, G.A.; Wilson, I.D. Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography–TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. *J. Chromatogr. B.* **2008**, 871, 299-305.
107. Pearson, K. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philos. Mag.* **1901**, 2, 559-72.
108. Webb, A.R. Statistical pattern recognition: John Wiley & Sons. **2003**.
109. Kohonen, T.; Maps, S.O. Springer series in information sciences. *Self-organizing maps.* **1995**, 30.
110. Bishop, C.M. Pattern recognition and machine learning. *Springer New York*, **2006**.
111. Stone, M. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *J. R. Stat. Soc. B.* **1974**, 111-47.
112. Wold, S. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal components models. *Technometrics.* **1978**, 20, 397-405.
113. Barker, M.; Rayens, W. Partial least squares for discrimination. *J. Chemometr.* **2003**, 17, 166-73.
114. Wold, S.; Sjostrom, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, 58, 109-30.
115. Brereton, R.G.; Lloyd, G.R. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J. Chemometr.* **2014**, 28, 213-25.
116. Westerhuis, J.A.; Hoefsloot, H.C.; Smit, S.; Vis, D.J.; Smilde, A.K.; van Velzen, E.J. Assessment of PLS-DA cross validation. *Metabolomics.* **2008**, 4, 81-9.
117. Hoskuldsson, A. Variable and subset selection in PLS regression. *Chemometr. Intell. Lab.* **2001**, 55, 23-38.

118. Centner, V.; Massart, D.L.; de Noord, O.E.; de Jong, S.; Vandeginste, B.M.; Sterna, C. Elimination of uninformative variables for multivariate calibration. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 3851-8.
119. Wold, S.; Johansson, E.; Cocchi, M. PLS: Partial Least Squares Projections to Latent Structures. 3D QSAR in Drug Design. Springer. **1993**, 523-50.
120. Rajalahti, T.; Arneberg, R.; Kroksveen, A.C.; Berle, M.; Myhr, K.M.; Kvalheim, O.M. Discriminating Variable Test and Selectivity Ratio Plot: Quantitative Tools for Interpretation and Variable (Biomarker) Selection in Complex Spectral or Chromatographic Profiles. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2581-90.
121. Trygg, J.; Wold, S. Orthogonal projections to latent structures (O-PLS). *J. Chemometr.* **2002**, 16, 119-28.
122. Wold, S.; Antti, H.; Lindgren, F.; Öhman, J. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemometr. Intell. Lab.* **1998**, 44, 175-85.
123. Tapp, H.S.; Kemsley, E.K. Notes on the practical utility of OPLS. *Trac-Trend Anal. Chem.* **2009**, 28, 1322-7.
124. Verron, T.; Sabatier, R.; Joffre, R. Some theoretical properties of the O-PLS method. *J. Chemometr.* **2004**, 18, 62-8.
125. Souza, T.; Morais-Braga, M.; Saraiva A.; Rolón, M.; Vega, C.; de Arias, A.; Costa, J.; Menezes, I.; Coutinho, H. Evaluation of the anti-Leishmania activity of ethanol extract and fractions of the leaves from *Pityrogramma calomelanos*. *Nat. Prod. Res.* **2012**, DOI: 10.1080/14786419.2012.686911.
126. Ancizu, S.; Moreno, E.; Torres, E.; Burguete, A.; Pérez-Silanes S.; Benítez, D.; Villar, R.; Solano B.; Marín, A.; Aldana, I.; Cerecetto, H.; González, M.; Monge, A. Heterocyclic-2-carboxylic acid (3-cyano-1,4-di-N-oxide quinoxalin- 2-yl) amide derivatives as hits for the development of neglected disease drugs. *Molecules* **2009**, 14, 2256 - 72.
127. Aguirre, G.; Cerecetto, H.; Di Maio, R.; González, M.; Porcal, W.; Seoane, G.; Ortega, M.A.; Aldana, I.; Monge, A.; Denicola, A. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential antitrypanosomal drugs. Structure-activity relationships. Part II. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. **2002**, 335, 15-21
128. Benitez, D.; Cabrera, M.; Hernández, P.; Boiani, L.; Lavaggi, M.; Di Maio, R.; Yaluff, G.; Serna, E.; Torres, S.; Ferreira, M.E.; Vera de Bilbao, N.; Torres, E.; Pérez-Silanes, S.; Solano, B.; Moreno, E.; Aldana, I.; López de Ceráin, A.; Cerecetto, H.; González, M.; Monge, A. 3-Trifluoromethylquinoxaline *N,N*-dioxides as anti-

trypanosomatid agents. Identification of optimal anti-*T. cruzi* agents and mechanism of action studies. *J. Med. Chem.* **2011**, 54, 3624 - 36.

129. Faral-Tello, P.; Liang, M.; Mahler, G.; Wipf, P.; Robello, C. Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, 43, 262 - 8.

130. Buckner, F.; Verlinde, C.; La Flamme, A.; Van Voorhis, W. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1996**, 40, 2592 - 2597.

131. Valencia, L.; Muñoz, D.; Robledo, S.; Echeverri, F.; Arango, G.; Vélez, I.; Triana, O. Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas colombianas. *Biomédica* **2011**, 31, 552 - 9.

132. Molina, Z.; Bazaldúa, A.; Quintanilla, R.; Galavitz, L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 10 medicinal plants used in northeast Mexico. *Acta Trop.* **2014**, 136, 8 - 14.

133. Gené, R.; Cartaña, C.; Adzet, T.; Marín, E.; Parella, T.; Cañigüeral, S. Anti-inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: Identification of its Active Constituents. *Planta Med.* **1996**, 62, 232 - 35.

134. Herz, W.; Pillotti, A. M.; Soderholm, A. C.; Shuhama, I. K.; Vichnewski, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *J. Org. Chem.* **1977**, 42(24), 3913 - 17.

135. Torres, L.; Gamberini, M.; Roque, N.; Landman, M.; Souccar, C.; Lapa, A. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochem.* **2000**, 55, 617 - 19.

136. Nakasugi, T.; Komai, K. Antimutagens in the Brazilian Folk Medicinal plant carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *J. Agr. Food Chem.* **1998**, 46, 2560 - 64.

137. Soicke, H.; Leng-Peschlow, E. Characterization of flavonoids from *Baccharis trimera* and their antihepatotoxic properties. *Planta Med.* **1987**, 53, 37 - 39.

138. Siqueira, N. et al. Análise comparativa dos óleos essenciais de *Baccharis articulata* (Lam) Pers. e *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Compositae), espécies espontâneas no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farm.* **1985**, 3, 36 - 39.

139. Simoes, C. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFRGS. **1986**, 186.

140. Alonso, J.R. *Tratado de Fitomedicina: bases, clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: Isis, **1998**, 350 - 4.

141. Gianello, J.; Giordano, O. Barticulidiol, um nuevo furano diterpeno aislado de *Baccharis articulata* Lam. (Persoon). *Rev Latinoam. Quím.* **1982**, 13, 76 - 8.
142. Adebawo, O.; Oladipo, A.; Obaseki, O.; Adesequn, O.; Gisarin, O.; Anyasor, G.; Osilesi, O. Gas chromatographic-mass spectroscopic identification of the bioactive compounds in *Hydrocotyle bonariensis*. *FASEB J.* **2014**, 28(1), 794 - 8.
143. Tabopda, T.; Mitaine-Offer, A.; Miyamoto, T.; Tanaka, C.; Mirjolet, J.; Duchamp, O.; Tchaleu Ngadjui, B.; Lacaille-Dubois, M. Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Phytochem.* **2012**, 73, 142 - 7.
144. Yuliana, N.; Khatib, A.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Comprehensive extraction method integrated with NMR metabolomics: a new bioactivity screening method for plants, Adenosine A1 receptor binding compounds in *Orthosiphon stamineus* benth. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 6902 - 6.
145. Ali, K.; Iqbal, M.; Yuliana, N.; Lee, Y.J.; Park, S.; Han, S.; Lee, J.W.; Lee, H.S.; Verpoorte, R.; Choi, Y.H. Identification of bioactive metabolites against adenosine A1 receptor using NMR-based metabolomics. *Metabolomics* **2013**, 9, 778 - 85.
146. Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer, H. An unusual dimeric sesquiterpene and other constituents from Chilean *Baccharis* species. *Phytochem.* **1991**, 30, 1597- 601.
147. Francesca, C.; Castillo, M. Diterpenoids from Chilean *Baccharis* species. *Phytochemistry* **1990**, 29, 324- 5.
148. Dai, J.; Suttisri, R.; Bordas, E.; Soejarto, D.; Kinghorn, A. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochem.* **1993**, 34, 1087-90.
149. Zdero, C.; Bohlmann, F.; Solomon, J.; King, R.; Robinson, H. Ent-clerodanes and other constituents from bolivian *Baccharis* species. *Phytochem* **1989**, 28(2), 531-542.

7. Agradecimientos

En primer lugar a mis directores de tesis por el apoyo constante desde que comencé mis trabajos en el Grupo de Química Medicinal en el año 2010. Al Lic. Eduardo Alonso Paz por su colaboración en la identificación botánica de las especies en estudio. Al grupo del Dr. Young Hae Choi del Laboratorio de Productos Naturales de la Universidad de Leiden, Holanda, por su colaboración en mi capacitación en la técnica de metabolómica por RMN. A Paula Faral del Instituto Pasteur por la realización de los ensayos con amastigotes. Al Ing. Agr. Daniel Fernández por su colaboración en la estandarización en los cultivos de las plantas de *Baccharis*. A Horacio Pezaroglo por la realización de los espectros de RMN y a todos los integrantes que han pasado por el Grupo de Química Medicinal en este período.