

Estudio químico de *Baccharis punctulata*

María Dolores González*, Celia María Luis

Universidad Nacional de Luján. Departamento de Ciencias Básicas, carrera Ingeniería Agronómica, área Química Agrícola. República Argentina.

*Autor a quien dirigir la correspondencia: doloresg@unlu.edu.ar

Resumen

Baccharis L. es un género de distribución exclusivamente americana, el más rico en especies dentro de la tribu Astereae de la familia Compositae (Asteraceae). Apenas la mitad de sus especies ha sido estudiada químicamente. En la Argentina se encuentran 96 especies agrupadas en 15 secciones. *Baccharis punctulata* DC, es una especie nativa, común en la provincia de Buenos Aires y únicamente se encuentra descripta en forma parcial la composición del aceite esencial de sus hojas. El objetivo del trabajo fue investigar los metabolitos secundarios en hojas y flores masculinas y femeninas de *B. punctulata* (dioica). Los materiales vegetales fueron recolectados en los alrededores de Luján (provincia de Buenos Aires). Como métodos de aislamiento se utilizaron las técnicas clásicas de extracción, fraccionamiento y cromatografía en sílicagel y Sephadex LH-20. Los aceites esenciales se obtuvieron por arrastre con vapor y fueron analizados por CG-MS. Los compuestos aislados se identificaron por espectroscopía UV, IR, ¹H- y ¹³C-RMN y experimentos de correlación 2D. El screening inicial mostró la presencia de terpenos y polifenoles y la ausencia de alcaloides pirrolizidínicos. El estudio fitoquímico de los capítulos masculinos de *B. punctulata* condujo a la identificación de algunos de los principales polifenoles en su extracto etanólico: los ácidos 3,4- y 4,5-dicafeoilquínicos y el 3-O- α -L-arabinopiranosido de quercetina (guaijaverina) entre otros glicósidos de quercetina, que se informa por primera vez en el género *Baccharis*. Se demostró la actividad antiplaca dental de guaijaverina, aislada del "guayabo" (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae -). Teniendo en cuenta estos antecedentes se estudió la composición de los aceites esenciales de *B. punctulata* y junto con los otros metabolitos se analizó la actividad antiplaca dental. Se comparó, además, la composición de las flores y de las hojas, en el momento de la floración y en el estado vegetativo, detectándose un interesante compuesto y una notable variación estacional.

Chemical Study of *Baccharis punctulata*

Summary

Baccharis L. is the most species-rich genre inside the tribe Compositae (Astereae) of the family Asteraceae, but scarcely the half of its species has been chemically studied. They are found exclusively in America. In Argentina, 96 species grouped in 15 sections can be found. *Baccharis punctulata* DC is a native, common species in the province of Buenos Aires but only the composition of the essential oil of the leaves has been partially reported. The aim of this work was to investigate the secondary metabolites in leaves and male and

Palabras clave: *Baccharis punctulata* - guaijaverina - agente antiplaca dental - sesquiterpenos volátiles.

Key words: *Baccharis punctulata* - guaijaverin- antiplaque agent - volatile sesquiterpenes.

females flowers of the dioecius species *B. punctulata*. Plant materials were collected in Luján's surroundings (Buenos Aires) and classified. Classic methodology of extraction, fractioning and isolation by chromatography in silicagel and Sephadex LH-20 were used. The essential oils were obtained by steam distillation and analyzed by CG-MS. The isolated compounds were analyzed by UV, IR, ¹H - and ¹³C-NMR and of 2D correlation experiments. The initial screening showed the presence of terpenes and polyphenols and the absence of pirrolizidinic alkaloids. Phytochemical study of the male flowers of *B. punctulata* allowed the identification of some of the main polyphenols of the ethanolic extract: 3,4- and 4,5-dicaffeoylquinic acids and quercetin 3-O- α -L-arabinopiranoside (guajaverin) among other quercetin glycosides, and it is reported for the first time in *Baccharis*. Guajaverin was isolated previously of the guava tree (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae -) and has demonstrated high potential as antiplaque agent. Given these precedents and a possible synergistic action of metabolites in the antiplaque activity, the study of *B. punctulata* went also to the essential oils. Essential oil composition of flowers and leaves in flowering and vegetative stages was compared. An interesting compound and a notable seasonal variation were detected.

Introducción

El género *Baccharis* L. es el más rico en especies dentro de la tribu Astereae de la familia Compositae (Asteraceae) estimándose en 400 a 500 especies, de las cuales sólo aproximadamente la mitad ha sido estudiada químicamente. Su distribución geográfica es exclusivamente americana. En la Argentina se encuentran 96 especies agrupadas en 15 secciones (Giuliano, 2001). Muchos mono-, sesqui- y diterpenos han sido descritos en el género (Zdero y col., 1986; Jakupovic y col., 1990).

Baccharis punctulata DC es una especie nativa, dentro del grupo de plantas que se denominan vulgarmente "chilcas", común en la provincia de Buenos Aires. Sin embargo, de *B. punctulata* se ha reportado, en forma parcial, únicamente la composición del aceite esencial de sus hojas (Schosler y col., 2009).

En la actualidad se buscan metabolitos secundarios de las plantas que puedan ser alternativas naturales para los antibióticos y antifúngicos sintéticos, a los que los microorganismos van desarrollando resistencia. Este tipo de actividades se han encontrado en algunas especies del género *Baccharis* (Rahalison y col., 1995; Johann y col., 2012; Valarezo y col., 2013; Pereira y col., 2016)

Dado que *B. punctulata* es una especie aún no investigada, el objetivo de este trabajo es revisar sus principales familias de metabolitos secundarios, aislar e identificar compuestos, tanto en los extractos como en su aceite esencial y entonces evaluar sus posibles actividades.

Material vegetal

Los ejemplares vegetales fueron recolectados en los alrededores de Luján (provincia de Buenos Aires) y clasificados por el Daniel Giuliano (UNLP), comenzándose con el estudio de hojas y flores de plantas masculinas de *B. punctulata*. La recolección de las flores tuvo lugar en otoño y la de las hojas en primavera y otoño.

Parte experimental

Investigación fitoquímica de las principales familias de compuestos

La presencia de alcaloides se investigó realizando un extracto metanólico de 2 g de flores masculinas, que se concentró, se llevó a pH = 1 y se extrajo con Cl₂CH₂. La solución acuosa ácida se dividió en dos partes. A una de ella se la trató con Zn en polvo (4 horas, con agitación a temperatura ambiente) y se filtró. Luego, las dos soluciones acuosas se llevaron a pH = 11 y se extrajeron con Cl₂CH₂. Los extractos clorofórmicos concentrados se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD) en silicagel, revelando con el reactivo de Dragendorff.

La presencia de polifenoles y terpenos se investigó en un extracto metanólico de 2 g de flores masculinas, concentrado y diluido con agua, al que se le realizaron extracciones sucesivas con Cl₂CH₂, acetato de etilo y n-butanol. La presencia de esos compuestos se verificó por CCD, con distintas fases móviles, de acuerdo con las distintas

polaridades, se reveló con el reactivo FeCl_3 para polifenoles y anisaldehído/ H_2SO_4 , para detectar terpenos.

Obtención de los aceites esenciales de hojas

Los aceites esenciales se obtuvieron por hidrodestilación, analizados por GC (Shimadzu Gas Chromatograph 2010, columna Equity-5, detector de ionización de llama, con temperatura programada) y por CG-MS (Shimadzu QP-2010 Plus, Gas Chromatograph, columna Equity-5), identificando los compuestos según sus espectros de masas y sus índices de retención (IR) (Babushok y col., 2011) respecto a la serie de hidrocarburos normales. La composición porcentual de los aceites se obtuvo por el método de normalización de las áreas de los picos de GC, sin usar factores de corrección.

Identificación de compuestos no volátiles

Se utilizaron técnicas usuales de extracción sobre flores masculinas y hojas frescas (etanol a temperatura ambiente, fraccionamiento posterior por partición agua/ Cl_2CH_2) y cromatografías en sílicagel y Sephadex LH-20. Los polifenoles se identificaron por espectroscopía UV, ^1H y ^{13}C -RMN de 600 MHz y experimentos de correlación 2D (realizado por Lucas Fabián del Servicio de Resonancia Magnética Nuclear, IQUIMEFA. Universidad de Buenos Aires - CONICET.). Las fracciones se analizaron por HPLC-DAD en un HPLC Waters Alliance 2695 (Waters Corp. MA, USA), equipado con un detector de arreglo de diodos PDA 2996, en columna Phenomenex Luna C 18 $5\mu\text{m}$ de 250 mm, con una fase móvil con gradiente de concentración entre A: H_3PO_4 0,25% y B: CH_3CN (Zhu y col., 2013).

Resultados

Los ensayos para alcaloides pirrolizidínicos y sus N-óxidos en las flores masculinas resultaron negativos. Los ensayos para terpenos y polifenoles resultaron positivos.

La investigación comenzó con los polifenoles presentes en la porción acuosa de los extractos metanólicos obtenidos de las flores masculinas. Una de las fracciones cromatográficas purificadas resultó ser una mezcla 3:2 de ácidos 3,5- y 4,5-di-

cafeoilquínicos según señales de RMN de 600 MHz y comparación con bibliografía (Pauli y col., 1998; Wan y col., 2017), observando el desplazamiento a campos más bajos que presenta el protón de la posición esterificada del ácido quínico, debido a la acilación. Varias señales aparecieron parcialmente superpuestas en las mismas regiones, pero el hecho de presentarse ambos compuestos en una mezcla aproximadamente 3:2 favoreció la identificación de las señales.

En otra fracción se identificó quercetina 3-*O*-arabinopiranosido (guaijaverina) según sus espectros ^1H - y ^{13}C -RMN de 600 MHz. Las constantes de acoplamiento observadas, los experimentos de correlación 2D y la comparación con los datos bibliográficos de otros glicósidos con pentosas, tanto en forma piranósica como furanósica, indicaron la unidad arabinopiranosídica. Otras fracciones, que aún no lograron purificarse, se investigaron por HPLC-DAD. En ellas se observa que entre los polifenoles de *B. punctulata* también se encuentra ácido clorogénico (ácido 3-*O*-cafeoilquínico, comparado con estándar) junto a otros picos de igual espectro UV que podrían asignarse inicialmente a otros ácidos monocafooilquínicos, todos a pequeños tiempos de retención en el sistema cromatográfico. A tiempos de retención grandes, además de los 3,5- y 4,5- disustituídos identificados, se detectan otros ácidos dicafooilquínicos, reconocidos tentativamente por su espectro UV. Continúa también en estudio la identificación de otros 3-*O*-glicósidos de quercetina presentes en el cromatograma a tiempos de retención intermedios, detectados por su espectro UV característico.

Quercetina-3-*O*-arabinopiranosido (1). UV: 258 nm, 296 nm (sh), 350 nm. ^1H -RMN, 600 MHz (acetona- d_6): 7,88 (d, J:2Hz, 1H, H-2'); 7,69 (dd, J: 7 y 2Hz, 1H, H-6'); 6,97 (d, J:2Hz, 1H, H-6); 6,89 (d, J:2Hz, 1H, H-8); 6,53 (d, J:7Hz, 1H, H-5'); 5,29 (d, J:6Hz, 1H, H-1''); 3,96 (dd, J=6 y 5,8 Hz, H-2''); 3,86 (m, J=3,5, 3 y 2 Hz, H-4''); 3,81 (dd, J= 3,5 y 12 Hz, H-5''e); 3,74 (dd, J= 3 y 5,8 Hz, H-3''); 3,46 (dd, J= 2 y 12 Hz, H-5''a). Asignaciones corroboradas por experimentos NOESY y HMBC .

Ácido 3,5-dicafooilquínico (2): UV: 245 nm, 298nm (sh), 327 nm, ^1H -RMN, 600 MHz (acetona- d_6): 2,14-2,35 (m, 2H, H-2 ax y H-2ec), 5,13 (da, 1H, H-3), 4,01 (d, 1H, H-4), 5,43 (ddd, 1H, H-5), 2,14-2,35

(m, 2H, H-6 ax y H-6 ec), 7,18 (2 sa, 2H- H 2' y 2''), 6,8 (2 d J=8Hz, 2H, H 5' y 5''), 7,02 (2 d J=8Hz, 2H, H 6' y 6''), 7,62/7,58 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-7' y 7''), 6,34/6,27 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-8' y 8'')

Ácido 4,5-dicafeoilquínico (3): UV: 245 nm, 298 nm (sh), 327 nm, $^1\text{H-RMN}$, 600 MHz (acetona- d_6): 2,16-2,32 (m, 2H, H-2 ax y H-2ec), 4,44 (da, 1H, H-3), 5,18 (d, 1H, H-4), 5,72 (ddd, 1H, H-5), 2,14-2,35 (m, 2H, H-6 ax y H-6 ec), 7,12 (2 sa, 2H- H 2' y 2''), 6,8 (2 d J=8Hz, 2H, H 5' y 5''), 7,0 (2 d J=8Hz, 2H, H 6' y 6''), 7,57/7,52 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-7' y 7''), 6,28/6,21 (2 d, J=16 Hz, 2H, H-8' y 8'')

Se comparó la composición del aceite esencial obtenido de las hojas de *B. punctulata* y *B. dracunculifolia* cosechadas en marzo de 2017 cuando las plantas estaban en flor y la de hojas de *B. punctulata* cosechadas en septiembre de 2017 (sin floración). Los resultados aparecen en la tabla 1. Los compuestos presentes en el aceite esencial de los materiales cosechados en otoño corresponden aproximadamente a los compuestos publicados por otros autores (Schosler y col., 2009). Pero la composición del aceite esencial de las hojas de *B. punctulata* cosechadas en septiembre presentó una composición diferente. Ésta, en comparación, no presenta prácticamente monoterpenos y tiene un 45 % de un compuesto no identificado (M^+ 216 (63,5%) y m/e 201(PB); IR 1562 cm^{-1}), posiblemente un sesquiterpeno monooxigenado ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$), muy poco polar con señal en IR para un grupo furano, este compuesto se encuentra en estudio. En hojas de la misma planta en época de floración (otoño), el 24 % de los componentes son monoterpenos, un 46 % aldehídos y cetonas bencénicas y un 28 % corresponde a sesquiterpenos. Para hoja de *B. dracunculifolia* cosechada en floración, el porcentaje de monoterpenos es 7 % y el de sesquiterpenos, un 90 % (Tabla 1).

Discusión y Conclusiones

B. punctulata es una especie nativa aún no estudiada y por ello, resulta interesante investigar sus metabolitos secundarios y las potenciales actividades de sus extractos, compuestos y aceites esenciales.

El ácido clorogénico y los ácidos 3,4- y 4,5-dicafeoilquínicos se informan en *B. punctulata*

por primera vez, pero fueron encontrados en otras especies del género (Aboy y col., 2012). Otros cafeoil-derivados del ácido quínico de *B. punctulata* se siguen analizando para su completa caracterización.

Este trabajo es el primer reporte de quercetina 3-*O*-arabinopiranosido (guaijaverina) en *B. punctulata* y en el género *Baccharis*, al igual que respecto a otros 3-*O*-pentósidos de quercetina que, según los tiempos de retención y espectros UV por medio de HPLC-DAD, se estiman existen en el extracto estudiado. Guaijaverina ha sido aislada de “guayaba” (*Psidium guajava* L. - Myrtaceae -) y se ha descrito que posee actividad contra *Streptococcus mutans* y los biofilms que producen la placa dental (Prabu y col., 2006). De acuerdo con la bibliografía, el aceite esencial de *B. dracunculifolia* presenta actividad antimicrobiana, en especial, contra los microorganismos responsables de la placa dental (Pereira y col., 2016) y, además, coexiste en el mismo ambiente natural que *B. punctulata*.

El perfil de la composición de los aceites esenciales de ambas especies en época de floración (otoño) es diferente (Tabla 1); nerodiol es el compuesto más abundante en *B. dracunculifolia* mientras que compuestos como acetofenona y metil benzaldehído son los más abundantes en las hojas de *B. punctulata*. Se ha analizado también la composición del aceite esencial de las hojas de *B. punctulata* en estado vegetativo (primavera) donde se advierte un predominio de compuestos sesquiterpénicos y, en particular, de una estructura sesquiterpénica con el 45 % de abundancia, con un espectro de masas particular (M^+ 216 abundante y m/z 201, PB), muy insaturada ($\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}$) y muy poco polar, con una señal en 1562 cm^{-1} en su espectro IR. Las propiedades mencionadas sugieren una estructura furano, como se presenta, por ejemplo, en el verboccidentafurano (Mr 216), furo-cadinano componente del aceite esencial de *Baccharis salicina* Torr. & A.Gray (ex *B. salicifolia* (Ruiz & Pav.) Pers.) (Jakupovic y col., 1990; Loayza y col., 1995). Las variaciones estacionales de la composición de aceite esencial son un fenómeno adaptativo y por ello resulta aún más interesante continuar el análisis de las diferentes composiciones y de las posibles actividades farmacológicas.

Tabla1.- Composición porcentual de los aceites esenciales obtenidos de *Baccaris dracunculifolia* y *B. punctulata*

IR (fase 5% fenil)	Compuestos	<i>B. dracunculifolia</i>		<i>B. punctulata</i>	
		Hoja otoño	Hoja otoño	Hoja otoño	Hoja primavera
928	alfa-pineno	1,43	2,35		nd
972	beta-pineno	4,89	1,85		nd
991	mirceno	0,28	2,71		nd
1029	limoneno	0,88	7,56		0,15
1060	acetofenona	nd	18,71		nd
1063	2-metilbenzaldehído	nd	21,43		nd
1075	3-metilbenzaldehído	nd	6,18		nd
1217	trans-carveol	nd	0,79		nd
1241	carvona	nd	1,55		nd
1338	delta-elemeno	4,52	nd		11,85
1393	beta-elemeno	1,25	nd		4,07
1421	(E)-cariofileno	4,57	nd		1,20
1434	germacreno B	nd	nd		1,22
1457	beta-farneseno	nd	nd		1,82
1483	germacreno D	8,57	1,11		8,14
1498	biciclogermacreno	6,33	0,51		0,86
1501	beta-bisaboleno	nd	nd		3,22
1524	delta-cadineno	nd	nd		1,32
1534	muuroleno	nd	nd		1,13
1560	sesquiterpeno	nd	nd		1,03
1565	nerolidol	20,36	1,10		nd
1569	espatulenol	8,49	4,32		nd
1574	cariofileno oxido	nd	6,50		nd
1595	sesquiterp. oxig.	2,80	nd		nd
1601	6-metil-alfa ionona	nd	nd		2,79
1632	sesquiterp. oxig	nd	3,30		nd
1636	alfa-terpinoleno	nd	nd		4,53
1637	cis-cadin-4-en-7-ol	nd	nd		nd
1646	delta-cadinol	nd	nd		3,50
1654	alfa-cadinol	nd	nd		1,05
1667	sesquiterp oxig.	nd	nd		45,13
1686	alfa-bisabolol	1,72	1,53		1,71
1700	valerenal	nd	nd		3,11
1721	sesquiterp. oxig.	11,04	2,75		nd
1964	sesquiterp. oxig.	7,44	3,04		nd
2077	sesquiterp. oxig.	nd	1,03		nd
2140	sesquiterp. oxig.	2,93	nd		nd
2148	sesquiterp. oxig.	3,30	nd		nd
	TOTAL	90,80	88,30		97,85

Referencias bibliográficas

- Aboy, A.L.; Apel, M.A.; Debenedetti, S.; Francescato, L.; Rosella, M.A.; Henriques, A.T. (2012). "Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography". *J Chromatogr A*. 1219 (6): 147-53.
- Babushok, V.I.; Linstrom, P.J.; Zenkevich, I.G. (2011). "Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils" *J. Phys. Chem. Ref. Data* 40 (4): 043101/47.
- Giuliano D.A. (2001). "Clasificación Infragenérica de las Especies Argentinas *Baccharis* (Asteraceae, Astereae)". *Darwiniana* 39(1-2): 131-54
- Jakupovic, J.; Schuster, A.; Ganzer, U.; Bohlmann, F.; Boldt, P. E. (1990). "Sesqui- and Diterpenes from *Baccharis* Species". *Phytochemistry* 29 (7): 2217-2222.
- Johann, S.; Oliveira, F.B.; Siqueira, E.P.; Cisalpino, P.S.; Rosa, C.A.; Alves, T.M.; Zani, C.L.; Cota B.B. (2012). "Activity of compounds isolated from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) against *Paracoccidioides brasiliensis*". *Med Mycol*. 50(8): 843-51.
- Loayza, I.; Abujder, D.; Aranda, R.; Jakupovic, J.; Collin, G.; Deslauriers, H.; Jean F. (1995). "Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*". *Phytochemistry* 38 (2): 381-385.
- Pauli, G.F.; Poetsch, F.; Nahrstedt, A. (1998). "Structure Assignment of Natural Quinic Acid Derivatives using Proton Nuclear Magnetic Resonance Techniques", *Phytochem. Analysis* 9: 177-185.
- Pereira, C.A.; Pereira Costa, A.C.B.; Liporoni, P.C.S.; Rego, M.A.; Jorge, A.O.C. (2016). "Antibacterial activity of *Baccharis dracunculifolia* in planktonic cultures and biofilms of *Streptococcus mutans*". *J. of Infection and Pub.Health* 9 (3): 324-330.
- Prabu, G.; Gnanamani, A.; Sayeed, S. (2006). "Guaijaverin - A plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*". *J. of Applied Microb* 101:487-495.
- Rahalison, L.; Benathan, M.; Monod, M.; Frenk, E.; Gupta, M.P.; Solis, P.N.; Fuzzati, N.; Hostettmann, K. (1995). "Antifungal principles of *Baccharis pedunculata*". *Planta Medica* 61(4): 360-362.
- Schossler, P.; Schneider, G.L.; Wunsch, D.; Gonçalves Soares, G. L.; Alcaraz Zini, C. (2009). "Volatile Compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using Solid Phase Microextraction and Hydrodistillation". *J. Braz. Chem. Soc.* 20(2): 277-287.
- Valarezo, E.; Rosillo, M.; Cartuche, L.; Morocho, V.; Malagon, O.; Meneses, M.A. (2013). "Chemical composition, antifungal and antibacterial activity of the essential oil from *Baccharis latifolia* (Ruiz & Pav.) Pers. (Asteraceae) from Loja, Ecuador" *J. of Ess.Oil Res.* 25(3): 233-238.
- Wan, C.; Shanshan, L.; Liu, L.; Chen, C.; Fan, S. (2017). "Caffeoylquinic acids from the aerial parts of *Chrysanthemum coronarium*". *Plants* 2017, 6: 10-15.
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R.M.; Robinson, H. (1986). "Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species" *Phytochemistry* 25(12): 2841-2855
- Zhu, Y.; Liu, Y.; Zhan, Y.; Liu, L.; Xu, Y.; Xu, T.; Liu, T. (2013). "Preparative Isolation and Purification of Five Flavonoid Glycosides and One Benzophenone Galloyl Glycoside from *Psidium guajava* by High-Speed Counter-Current Chromatography (HSCCC)". *Molecules*, 2013, 18: 15648-15661.