

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**PROGRAMA DE POSTGRADO**



**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE AQUENIOS Y VILANOS DE LA ESPECIE  
VEGETAL *Conyza trihecatactis* Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
BIOLOGICA**

**HEIDI KAROL MENDEZ PRADO**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial para optar el título de  
MAGISTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**PROGRAMA DE POSGRADOS**  
**BOGOTÁ D.C**

**2017**

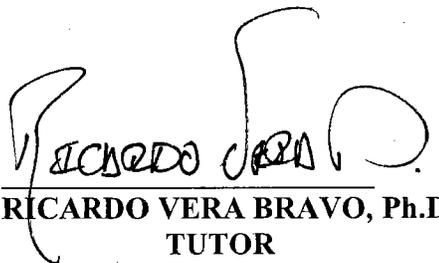
## **NOTA DE ADVERTENCIA**

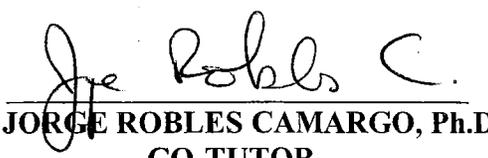
Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque la tesis no contenga ataques personal contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

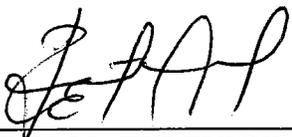
**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE AQUENIOS Y VILANOS DE LA ESPECIE  
VEGETAL *Conyza trihecatactis* Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
BIOLOGICA**

**HEIDI KAROL MENDEZ PRADO**

  
RICARDO VERA BRAVO, Ph.D  
TUTOR

  
JORGE ROBLES CAMARGO, Ph.D  
CO-TUTOR

  
JHON HERNANDEZ MONTAÑO, Ph.D  
JURADO

  
JAVIER ANDRÉS MATULEVICH PELAEZ, MSc.  
JURADO

  
HUGO DIEZ ORTEGA, Ph.D  
JURADO

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE AQUENIOS Y VILANOS DE LA ESPECIE  
VEGETAL *Conyza trihecatactis* Y DETERMINACIÓN DE SU ACTIVIDAD  
BIOLOGICA**



**HEIDI KAROL MENDEZ PRADO**

---

**Concepción Judith Puerta, Ph.D**  
Decana  
Facultad de Ciencias

---

**Alba Alicia Trespalacios, Ph.D**  
Directora de Posgrado  
Facultad de Ciencias

## **DEDICATORIA**

A ti Dios mío por colocar tantas personas bondadosas y situaciones en mi camino, para volverme un ser humano más fuerte, capaz de enfrentar muchos retos, por eso la gloria y las gracias infinitas son para ti.

Este trabajo es para ti hija mía las muchas veces que te deje sola mientras montaba mis experimentos. Madre, tú me levantaste más de una vez cuando me sentía derrotada y me enseñaste a creer en mí. Padre, hermana, cuñado, sobrinos este esfuerzo es también de ustedes mi incondicional familia.

## **AGRADECIMIENTOS**

Pontificia Universidad Javeriana por darme la oportunidad de profundizar en mis estudios académicos y prestar sus instalaciones para finalizar este trabajo.

Doctor Ricardo Vera Bravo y Doctor Jorge Eliecer Robles Camargo por sus sugerencias y aportes en el desarrollo de la investigación.

Doctor Freddy Gamboa, por su colaboración para efectuar los ensayos de actividad antimicobiana. Doctor Oscar Rodríguez, por brindarme sus conocimientos para realizar mis experimentos.

Fundación Juan N. Corpas , Doctor Luis Miguel Pombo por su apoyo constante en el desarrollo de mi investigación.

Universidad Militar Nueva Granada, Doctor Erickson Coy , Lorena Orduz, William Celis, Camilo Guerrero por los análisis de HPLC su amabilidad y colaboración.

Doctor Juan Martínez Valderrama por brindarme su conocimiento y orientarme en la elucidación de mis espectros.

Paola Borrego, Gloria Numpaque y Camila Muñoz mis compañeras de lucha, por su ayuda incansable y sus palabras de aliento durante todo este proceso.

Compañeros del laboratorio de Fitoquímica Milton Hernández y auxiliares de laboratorio Jaime Gonzales por contribuir con su amistad en esta investigación.

Personal del laboratorio de Microbiología de la Pontificia Universidad Javeriana por facilitarme los materiales para la determinación de la actividad antimicrobiana.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION .....	1
JUSTIFICACION .....	3
1. OBJETIVO GENERAL.....	4
1.1. Objetivos específicos.....	4
2. ESTADO DEL ARTE.....	5
2.1. Generalidades del género <i>Conyza</i> .....	5
2.1.1.Taxonomía y ecofisiología del género <i>Conyza</i> .....	5
2.1.2 Características botánicas y taxonómicas de la especie <i>Conyza trihecatactis</i> .....	8
2.1.2.1 Hábitat y distribución geográfica.....	9
2.1.2.2 Ubicación geográfica de la especie <i>Conyza trihecatactis</i> en Cundinamarca a través del tiempo.....	10
2.1.2.3 Descripción botánica de aquenios y vilanos.....	10
2.1.3 Clasificación taxonómica de <i>Conyza trihecatactis</i> (Blake) Cuatrecasas (Herbario Universidad Nacional) .....	11
2.2 . Etnofarmacología de algunas especies pertenecientes al género <i>Conyza</i> .....	12
2.3 Metabolitos secundarios aislados del género <i>Conyza</i> .....	13
2.3.1 Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal <i>Conyza trihecatactis</i> .....	15
2.4 Actividad Biológica del género <i>Conyza</i> .....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	17
3.1. Recolección y preparación del material vegetal .....	17
3.2. Identificación taxonómica de la planta .....	17
3.3. Extracción del material vegetal .....	18
3.4 Tratamiento de los extractos y el residuo.....	19
3.4.1 Análisis de los extractos E-EDP y E-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> por Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) .....	19
3.4.2 Extracto etanólico (E-EtOH) .....	20
3.4.3 Residuo etanol-agua (R-EtOH-H <sub>2</sub> O) .....	22
3.5. Caracterización y elucidación estructural .....	24
3.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo por el método de difusión en pozo.....	25

3.7 . Screening de la capacidad antioxidante de los extractos y el residuo (tratamientos). .....	27
3.7.1 Capacidad Antioxidante (CA) de extractos y residuo. ....	27
3.7.2 Análisis estadístico .....	28
4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS .....	30
4.1. Obtención de los extractos y el residuo etanol-agua.....	30
4.2 Análisis de la composición química del extracto en éter de petróleo (E-EDP) y el extracto en diclorometano (E-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ).....	32
4.3 Caracterización y elucidación estructural .....	37
4.3.1 Sólido proveniente del extracto etanólico MF12 <sub>s</sub> .....	37
4.3.2 Sólido proveniente del Residuo etanol-agua F2 <sub>s</sub> .....	49
4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo por el método de difusión en pozo.....	55
4.5.1 Capacidad Antioxidante de extractos y residuo .....	56
CONCLUSIONES .....	62
RECOMENDACIONES .....	63

## ABREVIATURAS

<b>%AOX</b>	Porcentaje de captación de radicales libres
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>AcOH</b>	Ácido Acético
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>CC</b>	Cromatografía en columna abierta
<b>CCD</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>CCP</b>	Cromatografía en capa fina preparativa
<b>CD<sub>3</sub> OD</b>	Metanol deuterado
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva para la captación de radicales libres al 50%
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy. Espectroscopia que correlaciona pares de protones
<b>CLV</b>	Cromatografía líquida al vacío
<b>DAD</b>	Detector de arreglo de diodos
<b>E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></b>	Extracto en diclorometano
<b>E-EDP</b>	Extracto éter de petróleo
<b>E-EtOH</b>	Extracto etanólico
<b>MF12<sub>s</sub></b>	Mezcla de la fracción 12 del extracto etanólico
<b>ESI</b>	ionización por electrospray
<b>EtOH</b>	Etanol
<b>F<sub>153-158</sub></b>	Fracción proveniente del R-EtOH-H <sub>2</sub> O
<b>F2s</b>	Sólido de la fracción 2 del residuo etanol-agua
<b>HCOOH</b>	Acido fórmico
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation. Experimento bidimensional empleado para identificar acoplamiento a larga distancia entre protones y carbonos
<b>HPLC-MS</b>	Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation. Experimento

	bidimensional de correlación heteronuclear.
<b>Me<sub>2</sub>CO</b>	Acetona
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>NP</b>	Difenilboriloxietilamina
<b>Ø</b>	Diámetro
<b>PEG</b>	Polietilenglicol 400 (PEG)
<b>R-EtOH-H<sub>2</sub>O</b>	Residuo etanol-agua
<b>Rf</b>	Relación entre las distancias recorridas por el soluto y por el eluyente desde el origen de la placa.

## RESUMEN

El objetivo principal de esta investigación fue realizar un estudio fitoquímico y la determinación de la posible actividad biológica de extractos obtenidos de los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*. A partir del extracto etanol-agua se obtuvo un residuo etanol-agua (R-EtOH-H<sub>2</sub>O) de donde se logró aislar e identificar un compuesto tipo flavonol, quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona), cuya elucidación estructural se llevó a cabo mediante análisis por RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC, HMBC); este metabolito se reporta por primera vez en los vilanos y aquenios de la especie en mención. Así mismo del extracto etanólico se obtuvo una mezcla de dos flavonoides Luteolina y Quercetina. La capacidad antioxidante del extracto etanólico (E-EtOH) y el residuo etanol-agua (R-EtOH-H<sub>2</sub>O) se determinó por dos métodos DPPH• (2,2-difenil-1-picrihidracil) y ABTS<sup>+</sup>• (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolín)-6- sulfónico), la mejor concentración efectiva para la captación de radicales libres al 50% (CE<sub>50</sub>) la presentó el extracto etanólico. La actividad antimicrobiana se probó por el método de difusión en pozos sobre los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 70063 y *Candida albicans* ATCC 90028. Los extractos y el residuo no mostraron actividad sobre las cepas evaluadas.

## INTRODUCCION

El género *Conyza*, propuesto por Linneo en 1737 y redefinido por Lessing en 1832, es uno de los más complejos de la familia Asterácea, no sólo por su carácter cosmopolita, sino por la cantidad de especies que lo forman, algunas de las cuales han sido interpretadas de diversas maneras por diferentes autores. En el caso colombiano, la revisión fue hecha por Cuatrecasas en 1969, donde fueron definidas 13 especies y se presentó una clave taxonómica para las mismas. Con posterioridad, algunos investigadores han estudiado el grupo global, segregando algunas especies y adicionando a las demás diferentes nombres (Díaz y Correa, 2001).

La palabra *Conyza* proviene del griego “Konudza” que significa sarna. Son plantas herbáceas anuales o perennes que alcanzan 1-2 metros de altura. Su fruto es un aquenio de una sola semilla (Raven P., Evert, R., Eichhorn, S., 1992).

En aquenios de Asteráceas como el *Carduus marianus* L. se han reportado la presencia de Silimarina (1,5-3%), flavonoides como quercetina, naringenina, kampferol, apigenina entre otros. Además de una elevada proporción de ácidos grasos (Fonnegra, R. y Jiménez, S., 2007). Algunas especies de diferentes familias de plantas, cuyo fruto es un aquenio, exhiben altas concentraciones de antioxidantes fenólicos (Soltana, H., Tekaya, M., Amri, Z., El-Gharbi, S., Nakbi, A., Harzallah, A., & Hammami, M., 2016).

La especie vegetal *Conyza trihecatactis*, hace parte de ese grupo de plantas cuyo fruto es un aquenio; de esta planta en particular el grupo de investigación Fitoquímica de la Universidad Javeriana (GIFUJ) ha realizado diferentes estudios principalmente en tallos y hojas. Se aislaron dos diterpenos tipo labdano: ent-Sclareol y ent-3 $\beta$ -hidroximanol y dos xilósidos de diterpeno: ent-Manool 13-O- $\beta$ -D-xilopiranosido y

ent-Sclareol 13-O- $\beta$ -D-xilopiranosido (Torrenegra, R., Robles, J., Waibel, R., Löwel, M., & Achenbach, H., 1993). Así mismo se logró determinar su actividad antiinflamatoria y citotóxica en la línea celular OCI-AML 3 (Hernández, M., 2014).

El conocimiento que se tiene acerca de la composición química y actividad Biológica de los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis* es escaso; ahondar en estos aspectos fueron los objetivos centrales de esta investigación. Respecto a la actividad biológica se seleccionó la capacidad antioxidante que ha sido reportada en otras especies del género *Conyza* y la actividad antimicrobiana. De esta manera se complementan los estudios realizados anteriormente a la planta y se hace un aporte a la búsqueda de principios activos de medicamentos iniciada desde tiempos anteriores.

## JUSTIFICACION

A partir del año 1987 el grupo GIFUJ de la Pontificia Universidad Javeriana, inicia el estudio de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*. Las siguientes investigaciones continuaron con la exploración fitoquímica de tallos y hojas, de esta especie perteneciente a la familia de las Asteráceas.

Basados en los resultados de los metabolitos secundarios, aislados de la *Conyza trihecatatactis*, la línea de investigación en macromoléculas en asocio con la línea de productos naturales (ambas pertenecientes al grupo GIFUJ), deciden indagar acerca de los compuestos vegetales presentes en aquenios y vilanos.

Como primera medida, se busca aislar e identificar metabolitos secundarios, para determinar si los aquenios y vilanos presentan los mismos terpenos y flavonoides, separados en tallos y hojas o se puede encontrar algún compuesto novedoso. Posteriormente se evaluará la actividad biológica de los extractos, con el fin de obtener resultados promisorios en la búsqueda de principios activos para ser usados como antibióticos, antimicóticos y/o antioxidantes.

El material vegetal será recolectado en el Paramo de Sumapaz en diferentes etapas de la investigación, se aplicara la maceración dinámica como técnica de extracción y diferentes métodos de cromatografía para la obtención de los compuestos vegetales presentes en aquenios y villanos. Se espera obtener información en un periodo de dos años, tiempo en el cual se conseguirán resultados tendientes a enriquecer los hallazgos del grupo GIFUJ y el conocimiento de nuestra flora colombiana.

## **1. OBJETIVO GENERAL**

Identificar metabolitos secundarios presentes en los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis* y evaluar en los extractos de diferentes polaridades su posible actividad biológica.

### **1.1. Objetivos específicos**

- Obtener extractos y/o fracciones, de diferentes polaridades, a partir de los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*.
- Elucidar la estructura de los metabolitos secundarios aislados.
- Evaluar en los extractos de baja, media y alta polaridad la actividad antimicrobiana.
- Determinar la capacidad antioxidante de los extractos de diferentes polaridades provenientes de aquenios y vilanos.

## 2. ESTADO DEL ARTE

### 2.1. Generalidades del género *Conyza*

El género *Conyza* pertenece a la familia de las Asteráceas. El género cuenta con cerca de 60 a 100 especies en América tropical y subtropical; incluyendo un número de especies colonizadoras (Thébaud y Abbott 1995). *Conyza* es muy similar a *Erigeron* debido a que pertenecen a la misma familia (Asteráceas) y a la subfamilia (Asteroideae) caracterizada por flores desde una hasta muchas y las periféricas son liguladas; estos dos géneros han estado estrechamente relacionados por mucho tiempo (Cronquist 1943; Zardini 1976; Mc Vaugh 1984, Nesom 1994). *Conyza* se ha distinguido de *Erigeron* por un número mayor de flores pistiladas con finas lígulas delgadas y reducidas. Adicionalmente, en *Conyza* los sépalos usualmente tienen tres nervaduras, los flósculos son menos numerosos con cortas corolas, y los vilanos en la madurez a veces aumentan. Las densas inflorescencias en forma de panícula y cabezas cilíndricas de algunas especies de *Conyza* no son características de *Erigeron*. La separación de *Laennecia* (otro género de la familia Asteráceas) de *Conyza* (Zardini 1981; Nessom 1990a) ha permitido una mejor definición de este último (Nessom 1990b), muchas especies han sido descritas desde Suramérica en los últimos 40 años y todo el grupo es objeto de estudio. En el viejo mundo se identificaron especies de *Conyza* relacionadas con géneros fuera de la *Conyziae* (subtribu de la subfamilia Asteroideae perteneciente a las Asteráceas), como sugiere Nesom (1990) y tentativamente confirmado por estudios moleculares Noyes 2000; Noyes y Rieseberg 1999 (Nesom, G.L., 2000).

#### 2.1.1. Taxonomía y ecofisiología del género *Conyza*

El género *Conyza* tiene gran capacidad de adaptación en diferentes condiciones climáticas y suelos (Lazaroto et al., 2008; Santos et al., 2014; Circunvis et al, 2014).

Estas hierbas alcanzan hasta 2 metros de altura, con tallos simples o ramificados pero siempre pubescentes (Burkart, 1969).

Las hojas son alternas, sencillas; totales o pinnatífidas (Ariza y Novara, 2005). Los capítulos se disponen en cimas panículadas, corimbiformes ó espiciforme, desde pocos a muchos. El tamaño de las secciones depende de la cantidad de semillas que forman, no hay diferencias en las cantidades de diferentes especies (Thebaud y Abbott, 1995; Urdampilleta et al., 2005). El fruto es una pequeña cipsela, ligero, comprimido con márgenes engrosadas, formado por vilanos que consisten en numerosos pelos finos. El vilano es una modificación del cáliz de una flor que facilita la dispersión de las semillas por el viento (Green, 2010; sancho et al., 2013). El hecho de que las semillas sean muy ligeras hacen que puedan permanecer suspendidas en el aire (Green, 2010).

Son plantas muy prolíficas, con rendimientos altos de semilla por planta. Hay una estrecha relación entre la altura de la planta y la cantidad de semillas que puede producir, por ejemplo una planta de 0,40 metros puede tener una producción de semillas de 2000, pero una planta de 1.50 metros puede producir más de 230 mil semillas (Regehr y Bazzaz, 1979; Weaver, 2001; Lazaroto et al., 2008). La floración se ve favorecida por fotoperiodos largos de más de 14 horas (Green, 2010).

Se auto fecundan y no son polinizadas por insectos, se puede suponer que hay autogamia o polinización por el viento (Thébaud et al., 1996; Loux et al., 2004; Circunvis et al., 2014). Una vez celebrada la fertilización, la maduración de semilla se produce 3 semanas después del evento (Thébaud et al., 1996; Fenner, 1983; Lazaroto et al., 2008).

La propagación se da únicamente por semilla, que puede dispersarse fácilmente por el viento y agua (Camacho Calero, 2004; Sancho et al, 2013). Cuando se produce la dispersión por el viento, puede recorrer grandes distancias (en algunos casos más de

500 m), mientras que el 99% de ellos se encuentra en un radio de 100 metros (Dauer et al., 2007).

Las semillas no tienen dormancia y germinan fácilmente cuando las condiciones de temperatura, luz y humedad son favorables (Lazaroto et al, 2005; Sancho et al, 2013). Son especies fotoblásticas positivas; pero la germinación ocurre en presencia de luz (Vidal et al., 2007; Yamashita, 2010; Sancho et al, 2013). La temperatura influye en la velocidad de absorción del agua, y en todas las reacciones bioquímicas que intervienen en la germinación. La temperatura óptima de germinación es de 20 a 30°C (Vidal et al., 2007; Yamashita, 2010).

La mayoría de especies de *Conyza* tienen el hipocotilo y epicotilo muy cortos, formando una roseta basal (Vidal et al., 2007; Olivella et al., 2014). En este estado de roseta la planta puede pasar el invierno y continuar realizando la fotosíntesis para obtener suficiente energía y desarrollar el tallo cuando las temperaturas son favorables de nuevo (Regehr y Bazzaz, 1979) y tolerar condiciones de déficit de agua (Nandula et al., 2006). De hecho son capaces de seguir creciendo y producir semillas en condiciones estresantes (Sancho et al, 2013).

El género *Conyza* no presenta dificultades en suelos pesados; sin embargo, germina mejor en suelos con un pH 6.10 (Yamashita, 2010).

La aparición de diferentes especies asociadas a *Conyza* es común y a menudo se presentan problemas y dudas sobre la diferenciación de las especies. Para la correcta identificación es importante elegir apropiadamente la mejor estrategia de control, reducir la selección de biotipos y esto puede ser productivamente sostenible (Olivella, J., Panigo, E., Dellaferrera, I. M., Perreta, M. G., y UNL-CONICET, F. C. A 2015).

### **2.1.2 Características botánicas y taxonómicas de la especie *Conyza trihecatactis***

Esta especie (Figura 1) se caracteriza por ser una hierba sufruticosa generalmente en la base, parcamente hirsútula o glabra, raramente hirsuta, con ramas erectas terminadas por una panícula corimbosa modesta, generalmente densa. Capítulos 5-7 mm alto x 10-14 mm diám. Ramas hasta 40-100 cm, arqueadas en la base o ± prostradas y radicales, luego erectas, violáceas o verdosas, estriadas, rígidas, hírsutas con pelos ascendentes o páculos, o glabras, copiosamente foliosas, solo ramificadas en el extremo florífero.

Hojas sésiles, linear-lanceoladas, oblongas o lineares, súbitamente angostadas en el ápice, subagudas, mucronuladas, angostadas hacia la base, subamplectentes, margen con 3-4 dientes ascendentes, a veces íntegra, nervio medial conspicuo, los secundarios poco visibles; hírtulas con pelos agudos, subpátulos, copiosos o escasos; 2-9 x 0.15-1.2 cm, hacia arriba gradualmente menores, más lanceoladas y más anchas en la base, convirtiéndose gradualmente en brácteas.

Panículas 2-7 cm diám, con 5-40 capítulos, foliosas en la base, con ramas ascendentes, ± hírtulas o hispídas, raramente glabras; brácteas lineares o linear, lanceoladas, agudas, semiamplectentes, hírtulas. Pedícelos ± 5 mm, hírtulos, engrosados en el extremo. Capítulos semigloboso-campanulados 5-7mm altos, 4-5 mm diám (aplanados 10-14 mm). Involucro 4.5-6 mm, generalmente violáceo; filarias triseriadas, linearlanceoladas, agudas, margen escarioso, dorso hítulo, raramente glabro, las interiores (4-)5-6 x 0.8-1.2 mm, las externas 3-4.5 x 0.6-0.8 mm.

Flores ♀ 50-140, (excep. 244); corola 3.2-4.2 mm, tubo capilar 2.5 – 3.2 mm, glabro o con escasos pelos, lígula blanquecina o lilácea, oblongo-elíptica, íntegra o 2-3 dentadas, 0.5-1 mm larga, sobrepasando poco el estilo. Flores hermafroditas 6-30;

corola amarillenta 3.4-4.2 mm, algo pilósula en la parte media, túbulo 1.5-2 mm, limbo tubuloso, dientes 0.5-0.7 mm, triangular-oblongos.

Ovarios comprimidos, marginados, con pelos esparcidos. Aquenios oblongoelípticos con ápice truncado y base cuneada, comprimidos, costado-marginados con pelos esparcidos o muy escasos. Receptáculo plano, alveolado, desnudo (Cuatrecasas, J. 1969). El número cromosómico haploide para esta especie es  $n=27$ .



**Figura 1.** Imágenes de la especie vegetal *Conyza trihecatactis* a. flor b. tallo-hojas

### **2.1.2.1 Hábitat y distribución geográfica**

*Conyza trihecatactis* (Figura 2) tan sólo es conocida en Colombia. Su centro de distribución lo constituye la Sabana de Bogotá con los cerros que la circundan, de donde se extiende a Boyacá y los Santanderes. Existe una colección proveniente de la Cordillera Central en el Departamento del Cauca. El nombre vulgar con el que se conoce esta especie es “Venadillo”, fitónimo aplicado a varias especies de *Conyza* y *Achyrocline* (Instituto de Cooperación Iberoamericana- Instituto Colombiano de Cultura Hispanica., 1989).



**Figura 2.** Dibujo de la especie vegetal *Conyza trihecatactis* tomado de la obra: Flora de La Real Expedición Botánica Del Nuevo Reino de Granada Instituto de Cooperación Iberoamericana- Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. , 1989.

### 2.1.2.2 Ubicación geográfica de la especie *Conyza trihecatactis* en Cundinamarca a través del tiempo

**Tabla 1.** Ubicación geográfica de la especie vegetal *Conyza trihecatactis* a través del tiempo.

Municipio <sup>1</sup>	Lugar	m.s.n.m (metros a nivel del mar)	Año
Bogotá	Monserate	3170	1939 <i>Cuatrecasas, J</i>
	Quebrado el Chicó	2670	1939 <i>Cuatrecasas, J</i>
	Cerro de Suba, La Conejera	2600	1987 <i>Díaz, S</i>
		2700	1946 <i>Duque J.M</i>
	Usme	2700	1956 <i>King, R.M.</i>
	Fuquene	2600	1930 <i>Pérez, E</i>
Mosquera	Laguna de la Herrera	2600	1965 <i>Cuatrecasas, J</i>

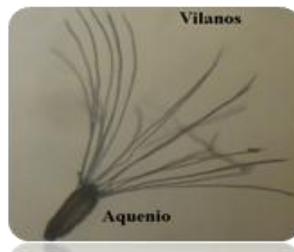
1. Instituto de Cooperación Iberoamericana- Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. , 1989.

### 2.1.2.3 Descripción botánica de aquenios y vilanos

Muchas especies de plantas tienen frutos llamados aquenios procedentes de flores con ovario ínfero (el receptáculo es bien cóncavo donde sepálos, pétalos estambres están arriba del ovario) monocarpelares, monospermicos, y su semilla flota en el interior de

él. Los aquenios son generalmente frutos pequeños que tienen estructuras pilosas o tricomas que ayudan a su dispersión por ejemplo los vilanos (Figura 3). Las Asteráceas tienen este tipo de fruto y de ahí su capacidad de distribución en la naturaleza (Plitt, J., 2006).

Como se expresó en el párrafo anterior los aquenios presentan una sola semilla; además son frutos secos, simples e indehiscentes (no se abren espontáneamente al llegar a la madurez para liberar la semilla). En las Asteráceas los aquenios técnicamente reciben el nombre de cipsela (Raven, P., Evert, R. y Eichhorn, S., 1992).



**Figura 3.** Aquenio y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*.  
Fuente: el autor, 2015.

### 2.1.3 Clasificación taxonómica de *Conyza trihecatactis* (Blake) Cuatrecasas (Herbario Universidad Nacional)

Nombre Científico	: <i>Conyza trihecatactis</i>	
Reino	: Plantae	
Phylum	: Magnoliophyta	
Clase	: Magnoliopsida	
Orden	: Asterales	
Familia	: Asteraceae	
Género	: Conyza	
Epíteto específico	: trihecatactis	
Autor Epíteto específico: (S.F. Blake) Cuatrecasas		

## 2.2 . Etnofarmacología de algunas especies pertenecientes al género *Conyza*

Los usos tradicionales de las plantas son estudiados por la etnofarmacología, que Bruhn y Holmstedt, 1981, definen como: La exploración científica interdisciplinaria de los agentes biológicamente activos empleados u observados tradicionalmente por el hombre. Conviene subrayar, modificando la definición, que no siempre existen unos principios activos identificables que justifiquen determinados usos de las plantas dentro de la farmacopea popular (Obón de Castro, C., Rivera, D. ,1991).

En diferentes regiones del mundo, varias especies del género *Conyza* han sido usadas en medicina tradicional y popular. En la tabla 2 observada a continuación se describe el uso y propiedades de algunas de esas especies.

**Tabla 2.** Usos y propiedades de diferentes especies del género *Conyza* en medicina tradicional

ESPECIE	NOMBRE VULGAR	LUGAR	USOS Y PROPIEDADES
<i>C. aegyptia</i> (Kpegba, K., et al., 2011)	Bolo mundi	África	Esterilidad femenina, diabetes, obesidad, enfermedades cardiovasculares.
<i>C. bonariensis</i> (Chifa, C. R., et al., 2004)	Yerba camicera	Provincia del Chaco (Argentina)	Uso interno: digestivo, béquico (contra la tos), diurético, hepatoprotector. Uso externo: dérmico.
<i>C. canadensis</i> Yan, M. M., et al., 2010)	Hierba del caballo, erigeron del Canadá	China	Diarrea, otitis, conjuntivitis.
<i>C. deserticola</i> (Villagrán, et al., 2003)	Anojarjinchu, oreja de perro	Chile	En forma de té para la matriz
<i>C. filaginoides</i> (Rojas, A., et al., 1995) (Ramírez, M., 1987)	Simonilla, Zacachichíc	Colombia	Dolores de estómago
		México	
<i>C. sumatrensis</i> (Boniface, P., et al., 2015)	Zamarraga	Camerún (Africa)	Tratamiento para la malaria
<i>C. trihecatactis</i>	“Venadillo”, fitónimo aplicado a varias especies de <i>Conyza</i> y <i>Achyrocline</i>	Colombia	Hasta el momento no se ha reportado usos ni propiedades tradicionales. Los reportados han sido para la <i>C. filaginoides</i> (Ramírez, M., 1987)

### 2.3 Metabolitos secundarios aislados del género *Conyza*

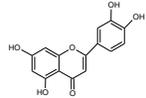
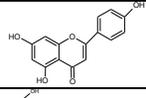
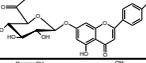
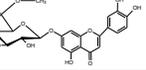
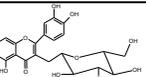
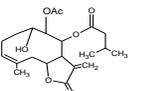
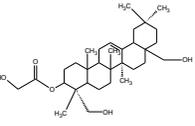
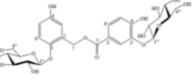
El género conyza pertenecen a la familia de las asteráceas tal como se explicó en la sección 1.1 de este documento. Aunque no hay una sola clase de constituyente para la familia; las Asteráceas se diferencian de otras familias por la presencia de sesquiterpenlactonas, alcoholes triterpénicos, ácidos grasos derivados de compuestos acetilénicos, flavonoles metilados y flavonas, fructanos como la inulina y ácidos grasos en las semillas son constituyentes comunes de muchas especies y predominan en la composición química de la familia.

Aceites esenciales y diterpenos también están ampliamente distribuidos. Alcaloides, glicosidos cianogénicos, amidas, cumarinas y varios tipos de constituyentes fenólicos presentan una distribución más limitada en las Asteraceas (Csupor-Löffler, B. 2012). A continuación se presentan dos tablas en la primera se menciona metabolitos secundarios aislados de aquenios (tabla 3) y en la segunda tabla se muestran algunos metabolitos secundarios aislados de diferentes especies del género *Conyza* (tabla 4).

**Tabla 3.** Metabolitos secundarios aislados de aquenios

ESPECIE	FAMILIA	COMPUESTOS AISLADOS
<i>Helichrysum arenarium</i> (Vrkoč, J., et al., 1973)	Asteracea	*3,5-Dihidroxi-6,7,8-trimetoxiflavona *Kaempferol *Galangina *Naringenina *Flavonas glicosiladas *Flavanonas
<i>Tripterygium wilfordii</i> (Takaishi, Y., et al., 1991)	Celastraceas	Sesquiterpenos (triptogelin)
<i>Cirsium taxa</i> (Ozcan, M., et al., 2016)	Asteracea	* Acido esteárico * Acido palmítico * Acido oleico

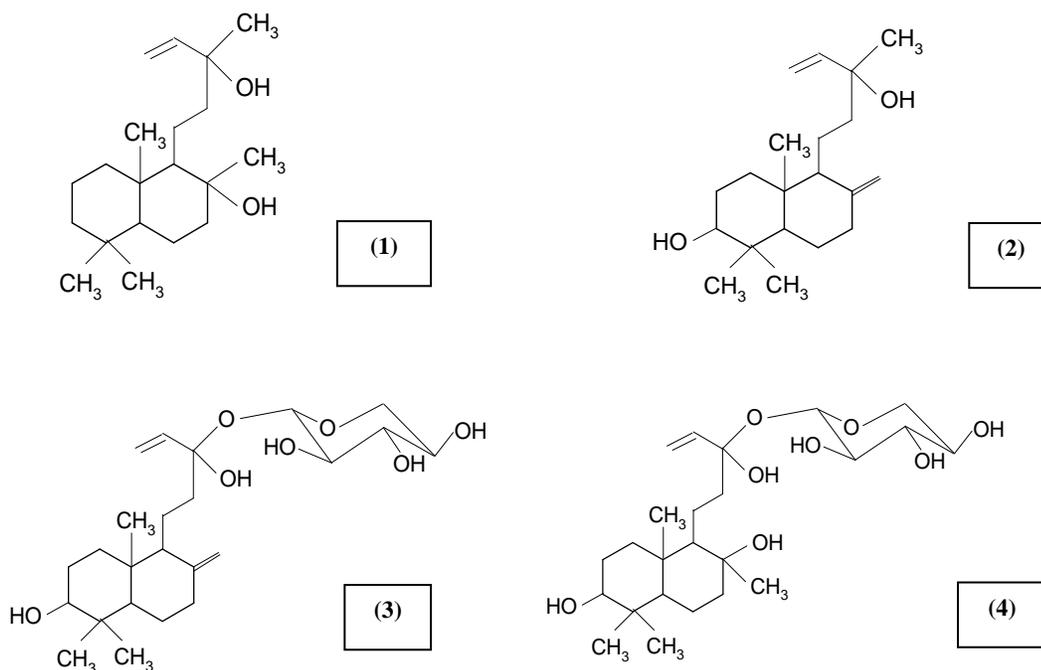
**Tabla 4.** Metabolitos secundarios aislados de diferentes especies de *Conyza*

ESPECIE	PARTE DE LA PLANTA UTILIZADA	EXTRACTO Y/O FRACCION	COMPUESTOS AISLADOS		
<i>C. sumatrensis</i> (Chai, X., et al., 2008)	Planta completa	Extracto AcOEt	Flavonas	Luteolina	
				Apigenina	
		Extracto BuOH	Flavonoides glicosilados	Scutellarina	
				Luteolina-7-O-β-D-glucuronopiranosido-6''-metil ester	
				Quercetina-3-O-β-D-glucopiranosido	
<i>C. lobata</i> (Trujillo, S., et al., 2005)	hojas	-	Lactonas sesquiterpénicas	Lobatina A Lobatina B	
	raíces	-	flavonoides	Derivados del kaempferol, quercetina y luteolina	
<i>C. canadensis</i> (Yan, M. M., et al., 2010)	hojas	Extracto etanólico	Derivado de triterpeno	Erigenol (3-O-(hidroxi-acetil)-23,28-dihidroxi-β-amirina)	
	Toda la planta	Extracto etanólico	Flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> <li>• quercetina-7-O-beta-D-galactopiranosido</li> <li>• quercetina,</li> <li>• luteolina</li> <li>• apigenina,5,7,4'-trihidroxi-3'-metoxiflavona,</li> <li>• quercetina-3-alpha-ramnopiranosido</li> </ul>	
<i>C. bonarensis</i> (Zahoor, A., et al., 2010)	-	-	glucopiranosidos	4-(1-O-β-D-glucopiranosido)-hidroxi-bencil-4'-(3'-O-β-D-glucopiranosido)-hidroxibenzoato	

### 2.3.1 Metabolitos secundarios aislados de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*

En el año 1987 se inicia el estudio químico de la planta; se logra identificar dos compuestos tipo labdano (ent-sclareol y un glicósido de diterpeno), en el extracto éter de petróleo de tallos y hojas. Además se obtuvo una mezcla de terpenos (Mayulli, R., 1987).

El aislamiento y elucidación de la estructura de los compuestos mayoritarios presentes en el extracto éter de petróleo se complementó en el año 1993 (Torrenegra, R., Robles, J., Waibel, R., Löwel, M., & Achenbach, H., 1993) donde se obtuvieron: *ent-esclareol* (1), *ent-3β-Hidroximanol* (2), *ent-Manool 13-O-β-D-xilopiranosido* (3), *ent-Sclareol 13-O-β-D-xilopiranosido* (4). Tres de estas estructuras fueron confirmadas más adelante (Hernández, M., 2014) a partir de un análisis de las hojas en la fracción AcOEt del extracto éter de petróleo. En la figura 4 se muestran las estructuras químicas.



**Figura 4.** Compuestos aislados de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*

## 2.4 Actividad Biológica del género *Conyza*

En este trabajo el estudio de la actividad Biológica se centra en la actividad antimicrobiana y actividad antioxidante de aquenios y vilanos; por ello la revisión de antecedentes se centra en estos tipos de actividades (tabla 5). Sin embargo, vale la pena comentar que en el caso de la *Conyza trihecatactis* se han llevado a cabo estudios con extractos y compuestos aislados y sus efectos antiinflamatorios y citotóxicos (Hernández, 2014) entre otros.

**Tabla 5.** Actividad Biológica de algunas especies del género *Conyza*.

Especie	Actividad	Resultados
<i>C. trihecatactis</i> (Ramírez, 1987)	Antimicrobiana	Se empleó el método difusión en discos (Kirby-Bauer) para evaluar la actividad del extracto etanólico y extracto en éter de petróleo contra las bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomona sp.</i> Ninguno de los extractos presentó actividad.
<i>C. bonariensis</i> (Thabit, R. A. S., et al., 2015)	Antimicrobiana	El estudio se realizó en las cepas <i>Shygella dysenteriae</i> CMCC51302, <i>Escherichia coli</i> ATCC 25923, <i>Streptococcus pyrogenes</i> ATCC 12334 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 mostrando actividad para estas bacterias.
	Antioxidante	La actividad antioxidante del extracto etanólico fue determinada por DPPH* y BCB con 94.57 % y 92.47% respectivamente.
<i>C. sumatrensis</i> (Mabrouk, S., et al., 2013)	Antimicrobiana	Los resultados indican que el aceite de hoja de exhibió significativa actividad antibacteriana in vitro contra <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , y <i>Proteus mirabilis</i> y los aceites de la <i>C. sumatrensis</i> aisladas a partir de las partes aéreas presentan inhibición de alto crecimiento micelial de <i>Candida albicans</i> y de los hongos filamentosos analizados.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Recolección y preparación del material vegetal

El material vegetal (flores) fue recolectado en el Predio El Hato, sector La Playa- Río Chisacá; cuenca alta del Río Tunjuelo; cerca al Páramo de Sumapaz. Los datos de ubicación geográfica se describen en la figura 5.



**Figura 5.** Datos de ubicación geográfica de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*

Las flores fueron secadas al ambiente. Del material vegetal seco se retiraron los aquenios y vilanos (368 g), estos se pulverizaron en nitrógeno líquido.

#### 3.2. Identificación taxonómica de la planta

Una muestra testigo fue enviada al Herbario Nacional de Colombia la cual fue identificada bajo el número COL2766158.

### 3.3. Extracción del material vegetal

El material vegetal fue extraído mediante la técnica de maceración dinámica (Sharapin, N., 2000) durante un periodo de 20 días. En un frasco ámbar se introdujo el material vegetal pulverizado (348 g) y se agregó éter de petróleo; agitando y cambiando diariamente el solvente con el fin de evitar la saturación del mismo. Al finalizar el proceso, el extracto éter de petróleo (E-EDP), fue concentrado en un rotaevaporador.

Después de la extracción con éter de petróleo, el material desengrasado se dejó secar (marco I) y se maceró con diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Todo el proceso se efectuó de forma similar al expuesto con el extracto éter de petróleo. De esta manera se obtuvo el extracto en diclorometano (E-  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Nuevamente el material vegetal se dejó secar (marco II) y se maceró con etanol al 95% obteniendo así el extracto etanólico (E-EtOH).

Para la obtención del extracto etanol-agua, se realizó un reflujo por 24 horas al marco III, al cual, se le agregó una mezcla de etanol-agua (1:1). Es importante aclarar, que en esta etapa se reunieron todos los marcos III (405,2 g) resultado de otras extracciones realizadas a recolectas anteriores de vilanos y aquenios.

El extracto etanol-agua, obtenido en el proceso de reflujo, se concentró a baño de María. Adicionalmente a este extracto se le agregaron 100 mL de metanol, calentando posteriormente y filtrando, luego se concentró a baño de María, obteniendo de este modo, una fracción metanólica y un residuo etanol-agua (R-EtOH- $\text{H}_2\text{O}$ ).

El análisis fitoquímico preliminar (Anexo A) se realizó con el extracto etanólico total; obtenido de la maceración de 20 g de material vegetal (pulverizado en nitrógeno líquido) con etanol al 95%.

La metodología general se puede observar en la figura 6.

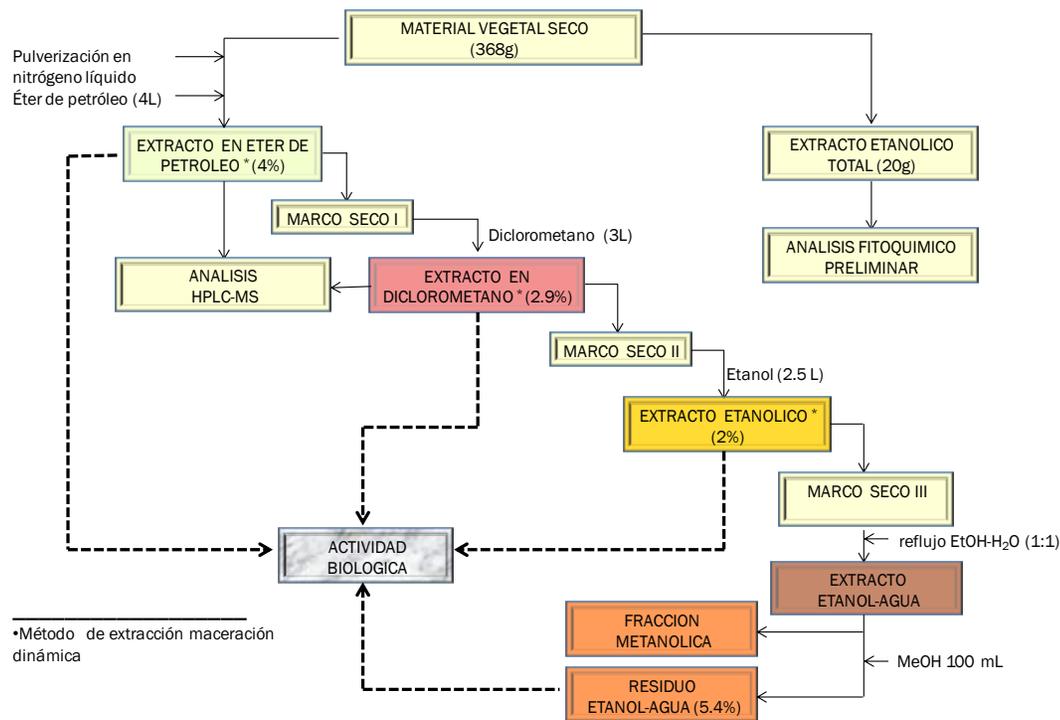


Figura 6. Metodología general para la obtención de los extractos y residuo de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*

### 3.4 Tratamiento de los extractos y el residuo

En total, del proceso de extracción se obtuvieron tres extractos (E-EDP, E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y E-EtOH) y el residuo (R- EtOH-H<sub>2</sub>O). El análisis de la composición química de cada uno de ellos se realizó a partir de diferentes técnicas explicadas a continuación.

#### 3.4.1 Análisis de los extractos E-EDP y E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> por Cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS)

A los extractos E-EDP y E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se les realizó un perfil por HPLC-MS. Se utilizó un equipo LC-MS marca Shimadzu QP2020 y LC-DAD del Laboratorio de Química

Bioorgánica de la Universidad Militar Nueva Granada; cada muestra se pasó por un filtro PTFE de 0.2  $\mu\text{m}$ . La separación de los componentes se llevó a cabo en una columna Phenomenex Sinergy RP-C18 (150 mm x 4,6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) utilizando el sistema de LC-MS, que consta de un módulo de separación, equipado con un detector de masas, con analizador cuadrupolar. El caudal fue de 0,6 mL/min. Las fases móviles empleadas fueron ácido fórmico ( $\text{HCOOH}$ ) al 0,1%, agua como eluyente A y acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) como eluyente B, las cuales se determinaron en ensayos previos para la obtención de perfiles con buena resolución y selectividad. El tiempo total de ejecución fue de 35 min usando el siguiente gradiente lineal de múltiples etapas: 0 min 10% B, 20 min 70% B, 22-23 min 80% B, 26-28 min 100% B, 31 min 50% B, y finalmente 33-35 min, 10% B. El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$ . Las muestras se chequearon con una longitud de onda entre 190-800 nm, las longitudes de onda de monitoreo seleccionadas fueron de 190 y 270 nm. Para la detección por espectrometría de masas, se utilizó un espectrómetro Shimadzu LC2020, interfase de ionización electrospray, ESI, modo positivo (SCAN 50- 800 m/z), bloque de calentamiento 450°C, temperatura de línea de solvatación 300°C, voltaje del detector 1,25kV, flujo de gas de nebulización ( $\text{N}_2$ ) 1,3 L/min y gas de secado ( $\text{N}_2$ ) 9,0 L/min.

### **3.4.2 Extracto etanólico (E-EtOH)**

El fraccionamiento del E-EtOH (6,1 g) se llevó a cabo por la técnica de cromatografía líquida al vacío (CLV); se tomaron 4,05 g del extracto y se solubilizaron en MeOH. La columna ( $h=7\text{cm}$ ,  $\text{Ø}=6,5\text{ cm}$ ) se empacó con 54g de sílica RP-18. Los sistemas de elución utilizados fueron  $\text{H}_2\text{O}$ ; mezclas de  $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$  (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1);  $\text{CH}_3\text{CN}$ ;  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1);  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se finalizó con n-Hexano. El total de fracciones recolectadas fue de 30 con un volumen final de 100 mL cada una (Figura 7).

En las fracción 12 del extracto etanólico se observó un sólido amarillo. Se procedió entonces a realizar la filtración de esta fracción, raspando el papel filtro para retirar el sólido. Este se lavó con una mezcla de H<sub>2</sub>O- CH<sub>3</sub>CN (1:1) y de nuevo se volvió a filtrar para retirar impurezas.

El sólido se redisolvió en MeOH y se evaluó por CCD. La fase estacionaria fue Sílica RP-18 F<sub>254s</sub> y fase móvil H<sub>2</sub>O-MeOH (6:4). La detección y visualización de la placa se efectuó mediante luz ultravioleta de 254 nm (onda corta) y 366 nm (onda larga). También se utilizó revelador específico para flavonoides NP/PEG (Anexo B); primero se asperjó con el revelador y luego se observó al ultravioleta. Después de la observación de la placa, el sólido (3,4 mg) proveniente de la fracción 12 (**MF12<sub>s</sub>**) se analizó por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

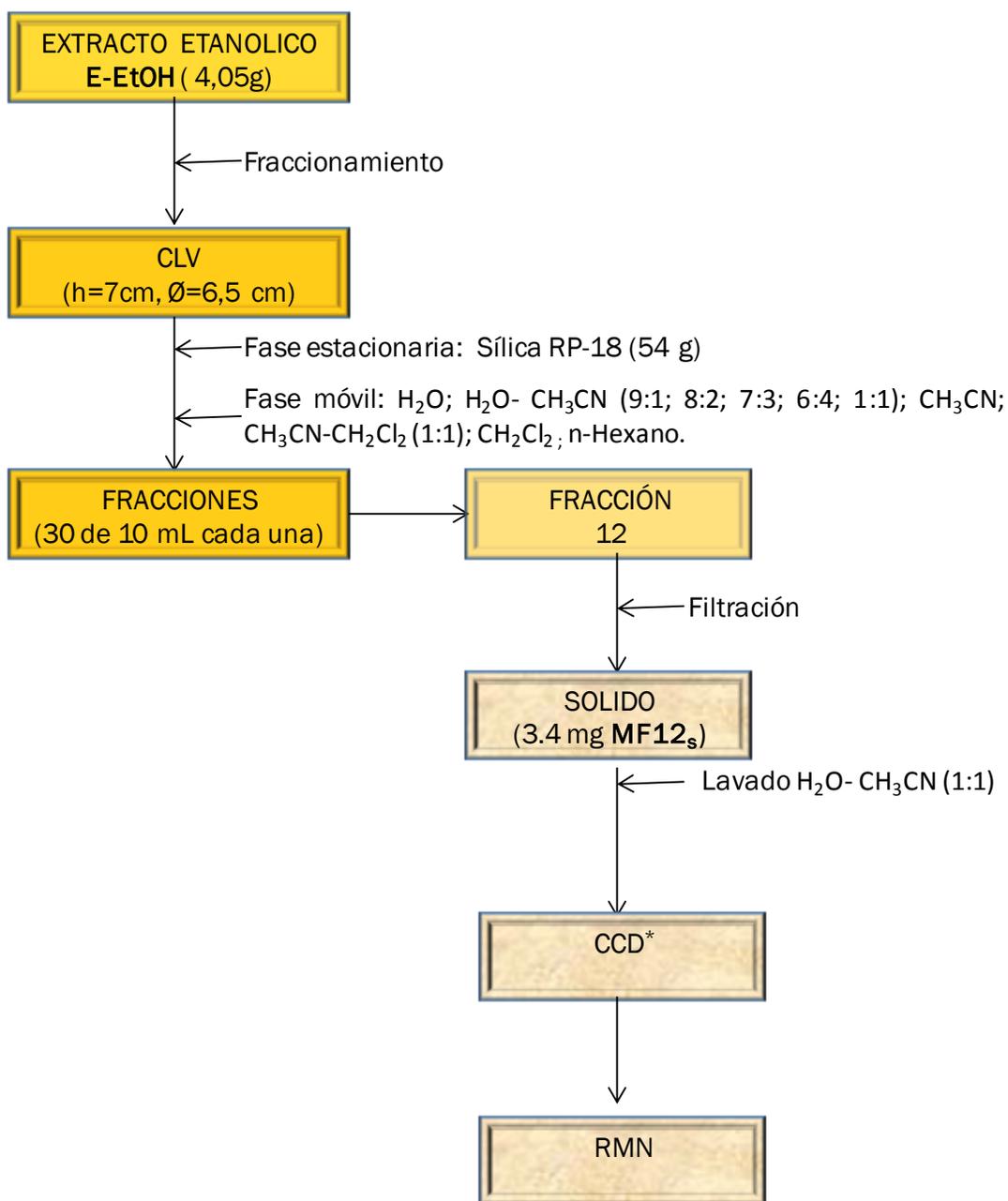


Figura 7. Metodología utilizada para la obtención de MF12s

### 3.4.3 Residuo etanol-agua (R-EtOH-H<sub>2</sub>O)

Una parte del residuo (8.2 g) se disolvió en una mezcla EtOH-H<sub>2</sub>O (1:1). La papilla se colocó en una columna (h=7 cm x Ø= 6.5 cm) para cromatografía líquida al vacío

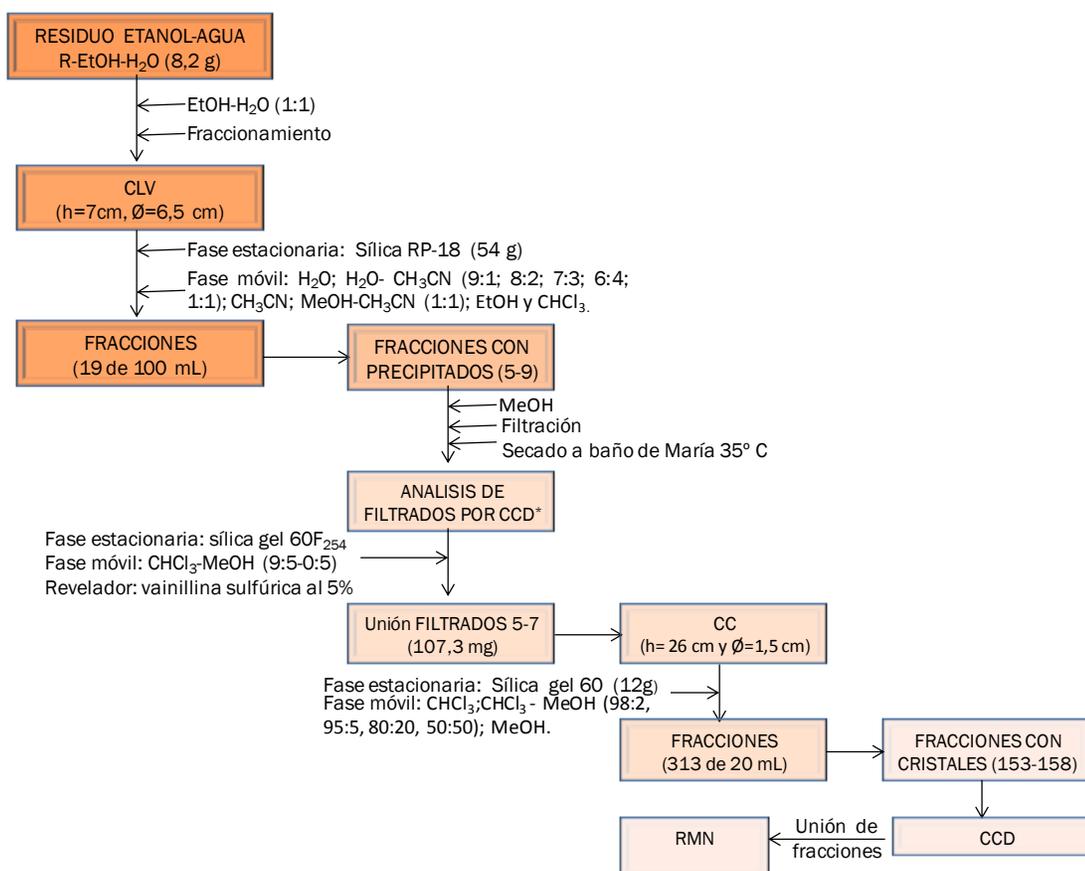
(CLV) empacada con sílica RP-18 (54g). La elución de la muestra se realizó en gradiente, utilizando las siguientes relaciones de fases móviles: H<sub>2</sub>O; H<sub>2</sub>O- CH<sub>3</sub>CN (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 1:1); CH<sub>3</sub>CN; MeOH-CH<sub>3</sub>CN (1:1), EtOH y CHCl<sub>3</sub>. En total se recolectaron 19 fracciones de 100 mL cada una.

En las fracciones 5-9 se observaron precipitados; se procedió a agregar MeOH y filtrar. Los filtrados se secaron a baño de María, estos fueron monitoreados en sílica gel 60F<sub>254</sub> (0.063-0.200µm) Merck con una fase móvil CHCl<sub>3</sub>-MeOH (9:5-0:5) y revelador vainillina sulfúrica al 5%. Por perfil cromatográfico se unieron las fracciones 5-7 (107,3 mg) y posteriormente se realizó una cromatografía de columna abierta (CC). La columna (h= 26 cm y Ø=1,5 cm) se cargó con 12g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm); la muestra se eluyó en gradiente con las fases móviles CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>- MeOH (98:2, 95:5, 80:20, 50:50) y se finalizó con MeOH. Las fracciones obtenidas fueron 313 de 20 mL cada una.

En las fracciones 153-158 se observaron cristales amarillos; estos fueron analizados por cromatografía en capa delgada (CCD) mediante el uso de placas Sílica gel 60F<sub>254</sub> y fase móvil CHCl<sub>3</sub>- MeOH (9:1). El revelador empleado fue NP/PEG. Al observar su comportamiento en placa se decide unir las fracciones (F<sub>153-158</sub>). Después de analizar esta fracción por RMN, se decidió realizar una cromatografía preparativa en capa fina (CCP). Previamente a la aplicación de esta técnica se efectuó una CCD empleando como fase estacionaria sílica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil Tolueno-AcOEt-AcOH (60:30:6) y revelador NP/PEG.

La CCP se realizó en una placa de vidrio de 20x20 cm; con espesor de 2 mm y adsorbente sílica gel 60 F<sub>254</sub>. La muestra (30 mg) se disolvió en Me<sub>2</sub>CO y se utilizó como fase móvil la seleccionada por CCD. A partir de esta técnica se logró separar de la franja 2 un sólido amarillo (**F2<sub>s</sub>**) cuyo estudio se efectuó por RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, HSQC y HMBC). Por otra parte se realizó una comparación por CCD del sólido (**F2<sub>s</sub>**) con un estándar SIGMA de Quercetina (3,3',4',5',7 Pentahidroxi flavona), la fase

estacionaria fue sílica gel 60 F<sub>254</sub>, fase móvil Tolueno-AcOEt-AcOH (60:30:6) y revelador NP/PEG. La metodología empleada para la separación del sólido (F<sub>2s</sub>) se puede observar en la Figura 8.



**Figura 8.** Metodología empleada para la separación del sólido (F<sub>2s</sub>).

### 3.5. Caracterización y elucidación estructural

La elucidación estructural de los sólidos MF12<sub>s</sub> y F<sub>2s</sub> fue realizada mediante análisis por Resonancia magnética Nuclear (RMN-<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C). También se llevaron a cabo experimentos bidimensionales y de correlación heteronuclear (HSQC, HMBC). Los espectros se realizaron en un equipo Bruker Avance III del laboratorio de RMN de la Pontificia Universidad Javeriana; los análisis se realizaron a 300 MHz para <sup>1</sup>H, 75

MHz para  $^{13}\text{C}$ . Se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y como disolvente metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Los datos de corrimiento químico se expresaron en la escala delta ( $\delta$ ) en ppm y la frecuencia en MHz.

### 3.6. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo por el método de difusión en pozo

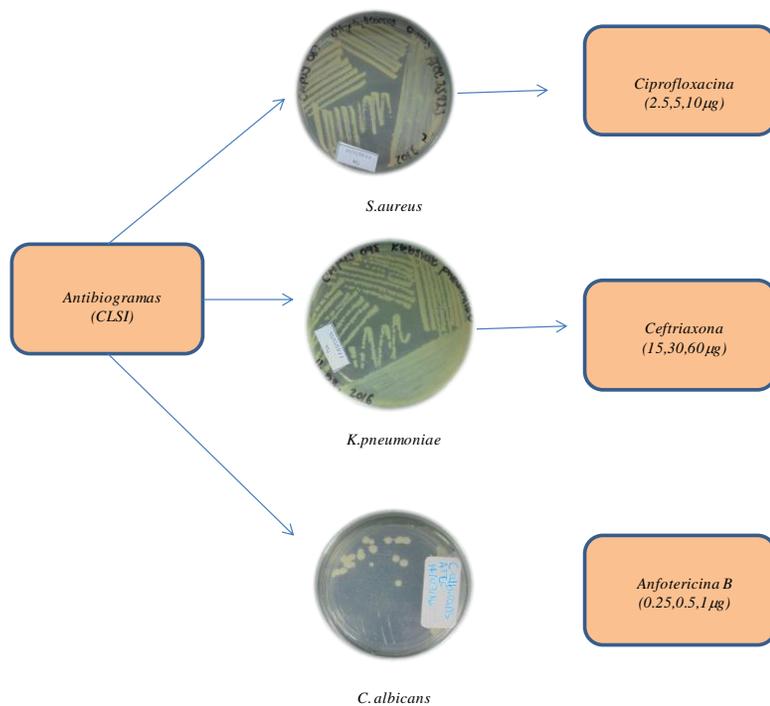
Para la evaluación de la actividad antimicrobiana se utilizaron las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 70063 y *Candida albicans* ATCC 90028 (ver Anexo F).

La actividad antimicrobiana se determinó por el método de difusión en pozos (Ramírez, L. C., Castañeda, A. C., & Vargas, A. M., 2013). Los parámetros del experimento se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6.** Condiciones de cultivo e incubación de los microorganismos utilizados en el método de difusión en pozo.

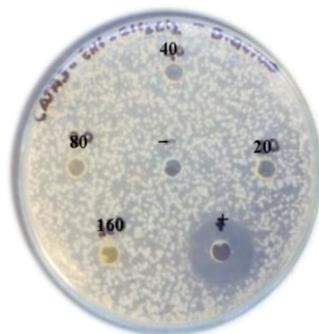
MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO	TAMAÑO DEL INOCULO (UFC/mL)	CONDICIONES DE INCUBACION	DURACION DE INCUBACION (h)
<i>S.aureus</i>	Agar Mueller-Hinton	$1,5 \times 10^6$	$37^\circ\text{C}$ ; aire	24
<i>K. pneumoniae</i>				
<i>C. albicans</i>			$27^\circ\text{C}$ ; aire	48

Previo al experimento con los extractos y el residuo se realizaron antibiogramas para cada cepa con el fin de determinar la mejor concentración a la cual evaluar el control positivo (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013) y para la levadura como se observa en la figura 9.



**Figura 9.** Controles positivos y sus concentraciones para la realización de los antibiogramas

El agar fue perforado con hoyos de 6mm de diámetro (Figura 10) a cada uno se le adicionó 100µL de la muestra. Los extractos E-EDP, E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E-EtOH y el residuo R-EtOH-H<sub>2</sub>O fueron evaluados a concentraciones de 20, 40, 80, 150 mg/mL. Como blanco se utilizó el DMSO y como controles positivos de acuerdo a los resultados de los antibiogramas; ciprofloxacina 5µg/mL, ceftriaxona 30µg/mL; Anfotericina B 0.5µg/mL. Las cajas fueron incubadas a 37 °C para las bacterias y para la levadura a 27°C. Cada uno de los experimentos se realizó por triplicado.



**Figura 10.** Ejemplo del montaje de las cajas de Petri para la determinación de la actividad antimicrobiana.

### **3.7 . Screening de la capacidad antioxidante de los extractos y el residuo (tratamientos).**

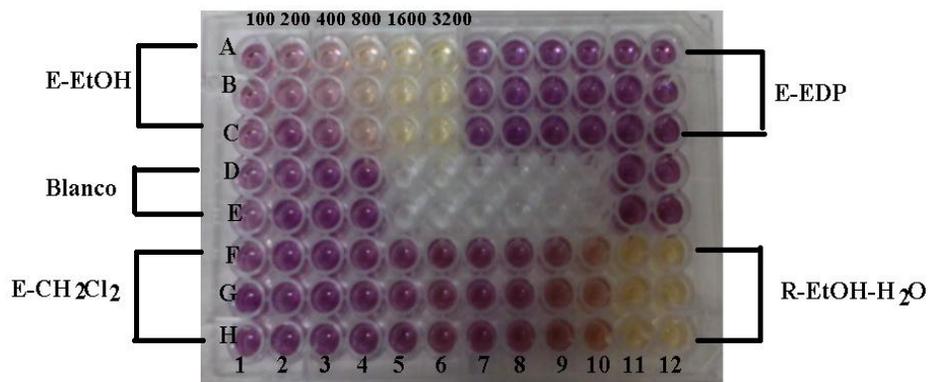
Para la selección de tratamientos a evaluar la capacidad antioxidante por los métodos DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>+•</sup>, se tomó como criterio, medir el porcentaje de captación de radicales libres % AOX de los extractos y el residuo a la máxima concentración (3200 ppm), escogiendo los tratamientos que presentaron % AOX  $\geq$ 50%.

#### **3.7.1 Capacidad Antioxidante (CA) de extractos y residuo.**

La CA de los extractos y el residuo fue determinada por los métodos DPPH<sup>•</sup> ( 2,2-difenil-1-picrihidracil) (Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T., 1995) y ABTS<sup>+•</sup> (Ácido 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolín)-6- sulfónico) (Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C.,1999). De acuerdo a los resultados reportados en el screening se prepararon concentraciones de 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 ppm del E-EtOH y R-EtOH-H<sub>2</sub>O usando como solvente MeOH a partir de una solución Stock de 5000 ppm. La solución Stock de ABTS<sup>+•</sup> fue preparada solubilizando 20 mg de ABTS<sup>+•</sup> en 10 mL de agua desionizada, leyendo las diferentes concentraciones a una longitud de onda de 740

nm. De manera similar 10 mg del radical DPPH• fueron solubilizados en 10 mL de EtOH las diferentes concentraciones se leyeron a una longitud de onda de 520 nm.

La capacidad antioxidante se midió en una placa de 96 pozos (Figura 11), referencia Corning Costar, en el equipo lector de placas FLUOstar ÓPTIMA (BMG LABTECH, Alemania), con intervalos de 5 minutos por 1 hora. Las mediciones se hicieron por cuadruplicado.



**Figura 11.** Placa CornigStar con los extractos y residuos para la determinación de la capacidad antioxidante

### 3.7.2 Análisis estadístico

Se aplicó la estadística descriptiva que incluyó el valor promedio y desviación estándar. Para el procesamiento de los datos, se utilizó el modelo ANOVA unifactorial, para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y la actividad biológica mediante un test de Tukey, con un nivel de significancia del 5%. Para relacionar los métodos entre sí, se implementó la correlación de Pearson ( $p < 0,05$ ;  $r^2 \approx 0,928$ ).

Para el análisis de los datos se realizó la comprobación de supuestos utilizando las pruebas de rachas, Normalidad y Homocedasticidad. En el diseño experimental se planteó el siguiente modelo para el tratamiento de datos:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \epsilon_{ij}$$

Donde  $Y_{ij}$  es la actividad biológica medida en cada observación,  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto del factor y  $\epsilon_{ij}$  es el efecto de error aleatorio. Se plantean la hipótesis para probar los efectos de cada factor y de la interacción de estos.

$$H_0: \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0$$

$$H_1: \text{al menos un } \alpha_i \neq 0$$

## 4. RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS

### 4.1. Obtención de los extractos y el residuo etanol-agua

La cantidad de material vegetal seco (aquenios y vilanos) se tomó como base para reportar el rendimiento (tabla 7) de los extractos (E-EDP, E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E-EtOH) y el residuo (R-EtOH-H<sub>2</sub>O). En la sección 3.3 de este documento se aclara porqué se parte de una cantidad diferente de material vegetal inicial para los extractos y el utilizado para el residuo.

**Tabla 7.** Rendimiento de los extractos (E-EDP, E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E-EtOH) y residuo (R-EtOH-H<sub>2</sub>O) de los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*

CANTIDAD DE MATERIAL VEGETAL	CANTIDAD DE EXTRACTO/RESIDUO		RENDIMIENTO (%)	
348 g	Extracto	E-EDP	13,9 g	4
		E-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9,97 g	2.9
		E-EtOH	6,92 g	2
405,2 g	Residuo R-EtOH-H <sub>2</sub> O		22 g	5.4

El extracto en éter de petróleo (E-EDP) presentó el mayor rendimiento, siendo menor el del extracto etanólico (E-EtOH). Los anteriores resultados no es posible compararlos con el rendimiento obtenido para el residuo etanol-agua (R-EtOH-H<sub>2</sub>O) puesto que se parte de una cantidad inicial de material vegetal diferente.

En el análisis químico preliminar (Anexo A) ; al extracto total etanólico de aquenios y vilanos (20g) se le realizó ensayos para alcaloides, terpenos, flavonoides, taninos, cumarinas, glicósidos cardiotónicos y quinonas. Los resultados fueron positivos en todas las pruebas, excepto, en el ensayo del hidrosulfito de sodio para quinonas, donde se obtuvo un resultado dudoso.

Es importante recordar, que los resultados de este análisis, deben ser tomados con precaución, pues están hechos de un crudo que contiene gran variedad de compuestos, muchas veces altamente coloreados. Todo ello interfiere en los resultados de las reacciones indicadas, porque un mismo reactivo puede responder a más de un grupo de sustancias y además se debe considerar que, generalmente se trata de compuestos polifuncionales y por otra parte, la coloración del crudo puede enmascarar las reacciones de color (Marcano, D., Hasegawa, M. , 2002).

Retomando lo anterior, en el caso de los reactivos para detectar alcaloides, deben manejarse con cuidado, porque pueden ocurrir resultados positivos ó negativos falsos. Por ejemplo, algunas proteínas dan resultados positivos con los reactivos para alcaloides aunque muchos aminoácidos no reaccionan. El reactivo de Dragendorff, por ejemplo, se usa para la detección de otros compuestos de nitrógeno heterocíclico y aminas cuaternarias. En la identificación cualitativa de los terpenos, la reacción de Liebermann-Burchard da positiva con esteroides, metil-esteroides, glicósidos cardiotónicos, di y triterpenos, saponinas esteroidales y esteroalcaloides (Bilbao, María del Rosario., 1997).

El ensayo de shinoda, realizado para detectar flavonoides, dió como resultado una coloración anaranjada característica de las flavonas (Domínguez, Xorge A., 1985). La prueba con cloruro férrico es en general para polifenoles, particularmente en el caso del extracto etanólico de aquenios y vilanos se obtuvo una coloración azul oscura característica de taninos derivados del ácido gálico, es decir taninos hidrolizables (Bilbao, María del Rosario., 1997).

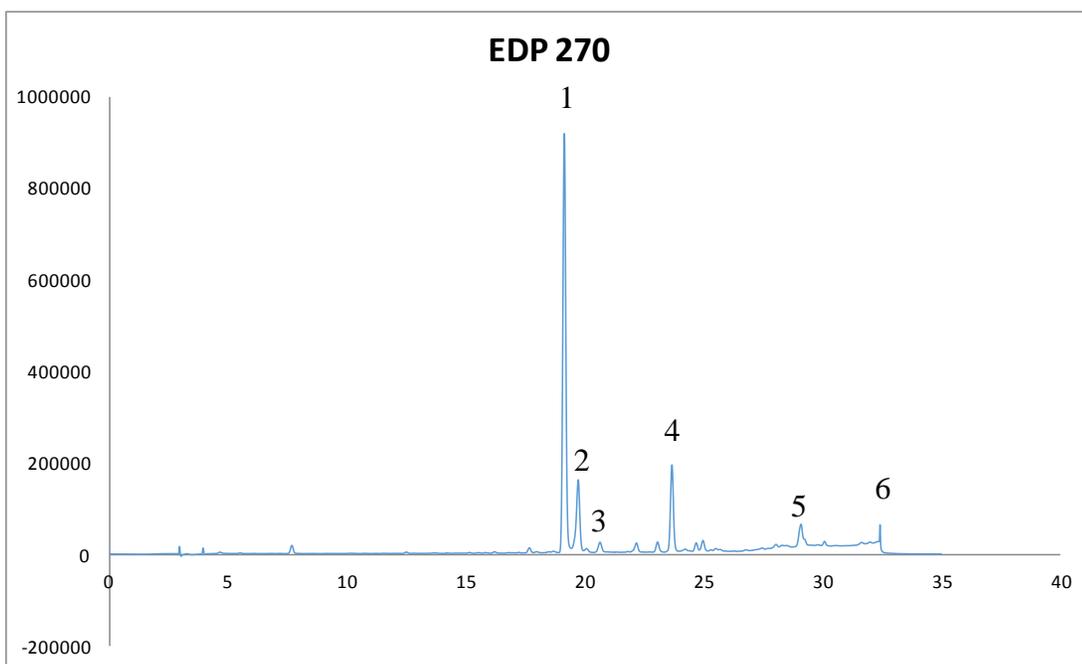
La prueba del hidroxamato férrico no es exclusiva para cumarinas, este ensayo, en general, da positivo en todas las sustancias con funcionalidad éster ó lactona (Universidad de Antioquia., 2001). Por otra parte la prueba de Baljet realizada para los glicósidos cardiotónicos se enfoca en reconocer el anillo láctónico de dichos compuestos; se utiliza como patrón la Dedalera (*Digitalis purpúrea*) debido a que en

esta especie vegetal se encuentra la Digitoxigenina una aglicona cardiotónica. Otros compuestos como las sesquiterpenlactonas dan positivos los dos anteriores ensayos; estos compuestos se han encontrado en extractos de flores o partes aéreas de las asteráceas (Domínguez, Xorge A., 1985).

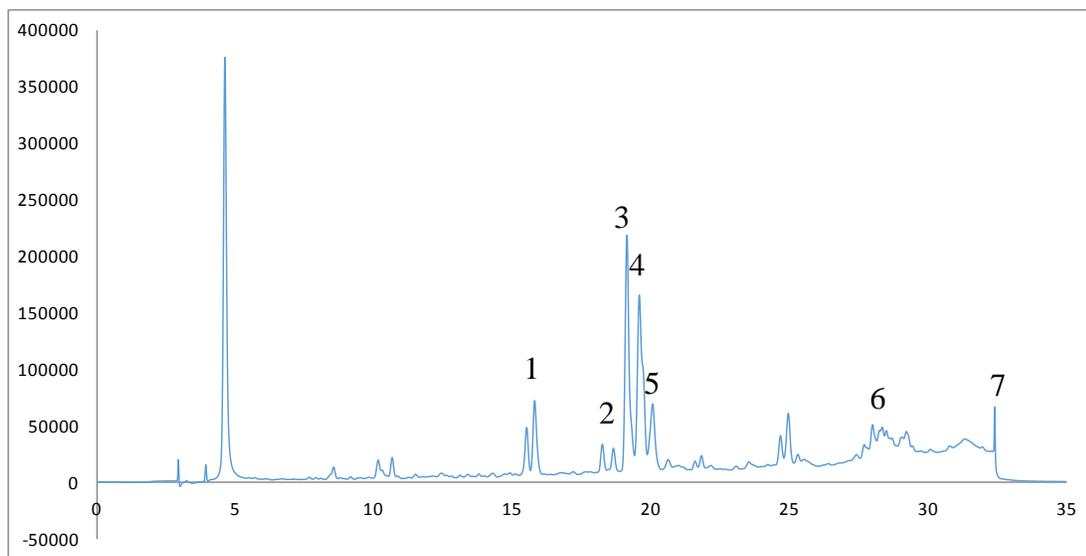
En especies de *Conyza*, como la *Conyza bonariensis*, se ha reportado en el tamizaje fitoquímico presencia de triterpenos-esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, quinonas, entre otros (Manzano Santana, P., et al., 2011). En la *Conyza filaginoides* triterpenos, esteroides y flavonoides (Mata, R., et al., 1997).

#### **4.2 Análisis de la composición química del extracto en éter de petróleo (E-EDP) y el extracto en diclorometano (E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)**

El análisis por HPLC-MS permitió identificar a 270 nm 6 picos mayoritarios para el E-EDP y 7 picos mayoritarios para el E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (Figura 12); de cada uno de estos picos se analizó su espectro de masas y se realizó una búsqueda en base de datos (i.e, MassBank) pudiendo identificar tentativamente compuestos (anexo B).



a

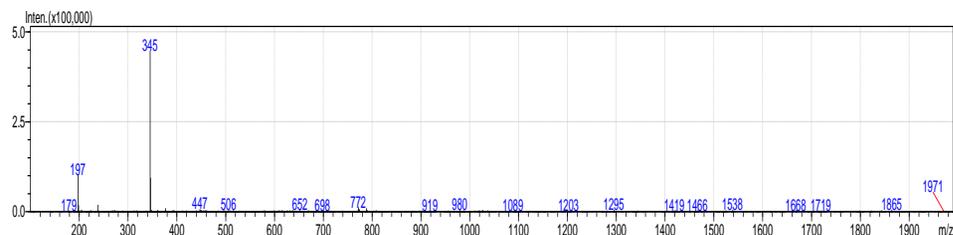


b

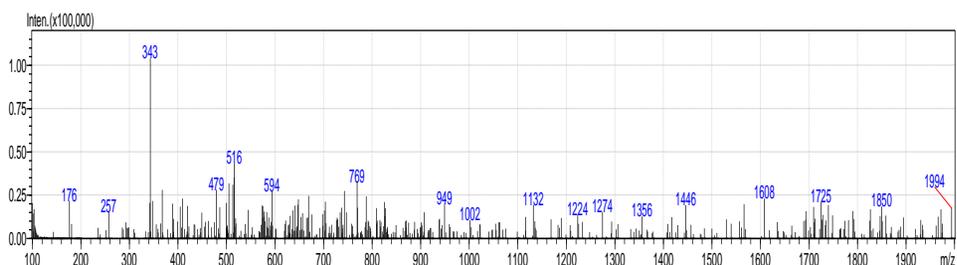
**Figura 12.** Cromatogramas por HPLC-MS a 270 nm a. E- EDP (extracto éter de petróleo) b. E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (extracto en diclorometano)

Por medio de los espectros de masa en modo positivo y/o modo negativo; en el E-EDP se logró realizar una identificación tentativa del pico 2 (Figura 13) donde se

presentan tres isómeros con Mw= 344. Estos compuestos son: Herbacetina 3,8,4´trimetileter (flavonoide), lactona Isochiliolide (sesquiterpenlactona) y 3- $\alpha$ -4 $\alpha$ -epoxi-6-oxo-15,16-epoxi-8- $\beta$ -1-0 $\beta$ -H-cis-clerodano-13(16),14-dien-20,12-olide (Diterpeno) .



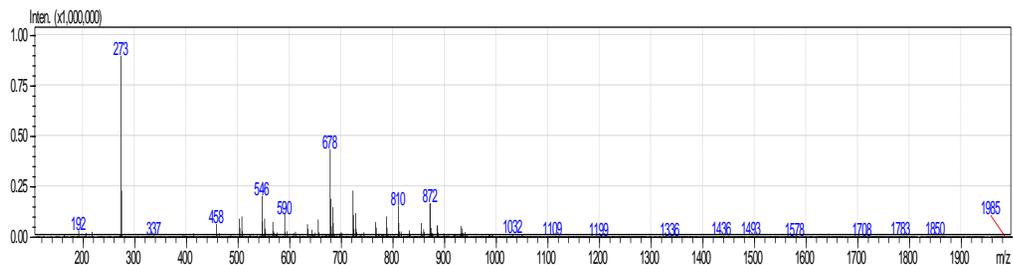
a



b

**Figura 13.** Espectros de masas del E-EDP pico 2 por HPLC-MS modo de ionización por electrospray  
a. Espectro m/z [M+H] de los isómeros b. Espectro m/z [M-H] de los isómeros

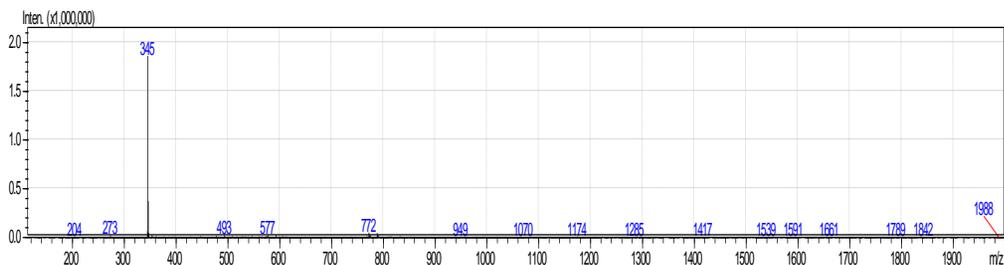
Otro compuesto determinado tentativamente en este extracto fue el del pico 5; acetato de betamirina (terpeno) con una Mw=468 (Figura 14). El análisis de los espectros de masas de los picos 1,3,4,6 por búsqueda en la base de datos MassBank para el género *Conyza* no arrojó ningún resultado.



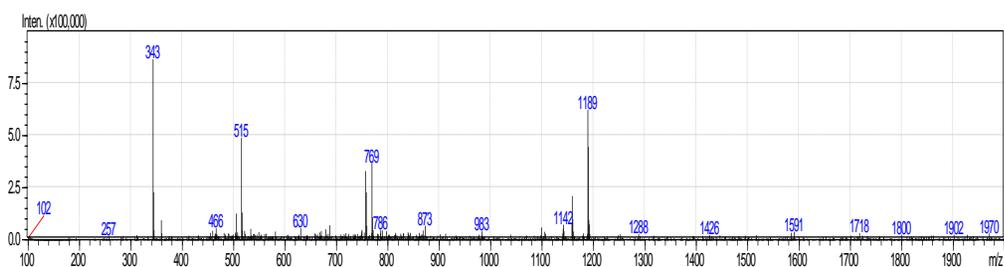
**Figura 14.** Espectro de masas m/z [M+H] del E-EDP pico 5 acetato de betamirina por HPLC-MS

La Herbacetina 3,8,4´trimetileter (flavonoide) es una flavona reportada en la *Conyza stricta* (Harborne, J., Baxter, H., 1999). El acetato de betamirina (triterpeno) se ha identificado en la *Conyza aegyptica* (Hammouda F. M., *et al.*, 1978). En esta última especie, *Conyza aegyptica*, se identificó también la lactona Isochililoide, así mismo, el diterpeno (3- $\alpha$ -4 $\alpha$ -epoxi-6-oxo-15,16-epoxi-8- $\beta$ -1-0 $\beta$ -H-cis-clerodane-13(16),14-dien-20,12-olide) es un compuesto presente en la *Conyza pyrifolia* (Zdero C., *et al.*, 1999).

Respecto al E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, la identificación tentativa de la señal 4 corresponde al análisis presuntivo realizado para el pico 2 en el E-EDP, cuya Mw= 344; esta corresponde a tres isómeros. Los espectros de masa en *scan* positivo y *scan* negativo se observan en la figura 15.



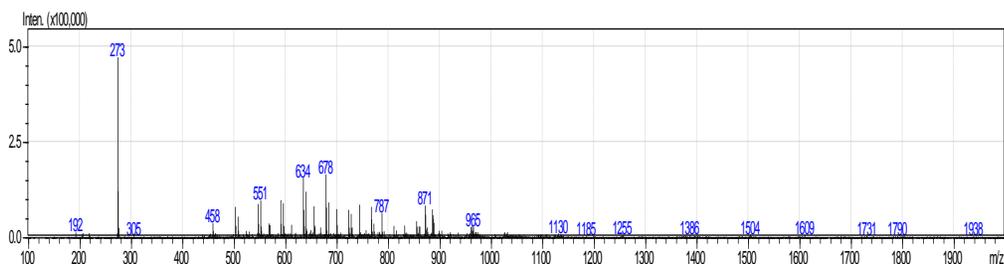
a



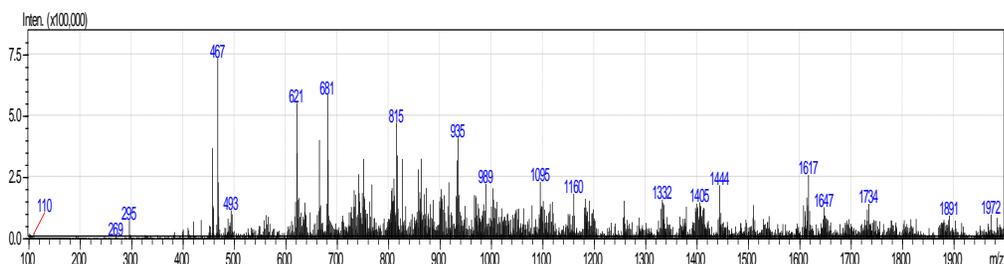
b

**Figura 15.** Espectros de masas del E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pico 4 por HPLC-MS a. Espectro m/z [M+H] de los isómeros b. Espectro m/z [M-H] de los isómeros

Por otra parte, el compuesto identificado tentativamente para el pico 5, en el extracto E-EDP, coincide con el compuesto identificado en el pico 6 en el E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (figura 16). Al igual que el E-EDP en el E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> los picos 1,2,3,5,7 no fue posible su identificación en la base de datos MassBank.



a



b

**Figura 16.** Espectros de masas del E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> pico 6 por HPLC-MS a. Espectro m/z [M+H] del acetato de betamirina b. Espectro m/z [M-H] del acetato de betamirina

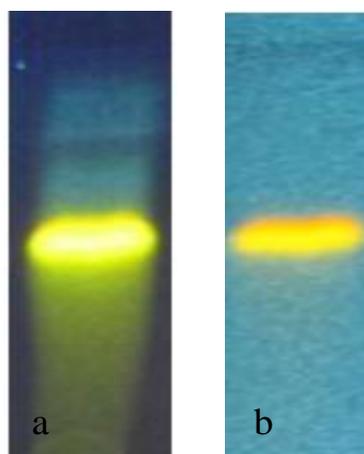
En estudios previos, los extractos E-EDP y E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> fueron sometidos a un análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) con el fin de realizar un *screening* químico de los mismos. En el E-EDP se identificaron más de 19 compuestos pertenecientes a hidrocarburos y terpenos siendo los de mayor abundancia el ácido octadecanoico y el ácido eicosanoico. Por otra parte en el E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> se observan picos mayoritarios de ácidos grasos e hidrocarburos.

### 4.3 Caracterización y elucidación estructural

En el E-EtOH se logró obtener un sólido amarillo **MF12<sub>s</sub>** soluble en Me<sub>2</sub>CO y MeOH; parcialmente soluble en H<sub>2</sub>O. Estas propiedades físicas, fueron también observadas en el compuesto **F2<sub>s</sub>**, aislado del R-EtOH-H<sub>2</sub>O. En ambos casos se realizó un análisis mediante el uso de RMN.

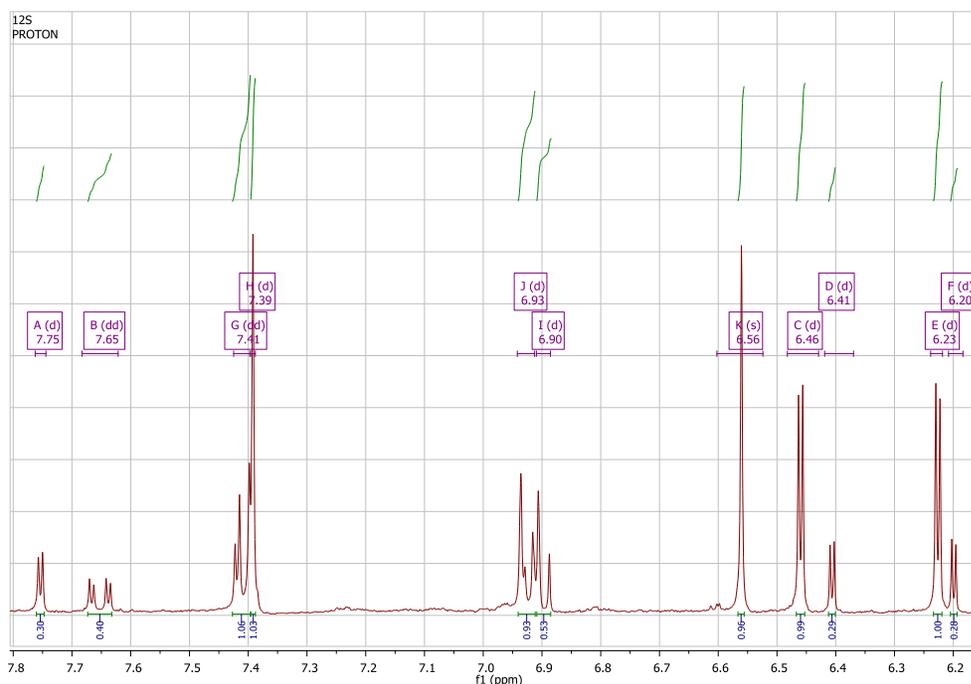
#### 4.3.1 Sólido proveniente del extracto etanólico MF12<sub>s</sub>

El sólido MF12<sub>s</sub>, fue analizado por CCD utilizando como fase móvil H<sub>2</sub>O-MeOH (6:4); fase estacionaria Sílica RP-18 F<sub>254s</sub> y revelador NP/PEG (Anexo C). En la placa se observó una sola mancha con una fluorescencia amarilla a 254 y 365 nm (Figura 17 a-b).



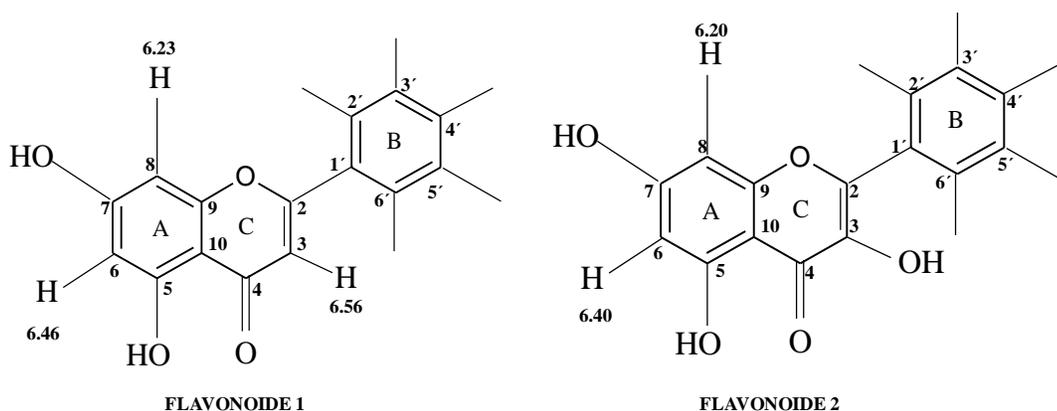
**Figura 17.** CCD del sólido MF12<sub>s</sub>, a. Cromatoplaqa vista a la luz UV de 254nm b. Cromatoplaqa vista a la luz UV de 365nm

En el espectro de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del sólido **MF12**, presentado en la figura 18, se observan señales correspondientes a protones aromáticos en la región de 6 a 8 ppm. La presencia para dos protones acoplados meta a  $\delta$  6.23 ( $J = 2.1$  Hz, H-6) y  $\delta$  6.46 ( $J = 2.1$  Hz, H-8) y otros dos protones acoplados meta a  $\delta$  6.20 ( $J = 2.1$  Hz, H-6) y  $\delta$  6.40 ( $J = 2.1$  Hz, H-8), puede indicar una mezcla de dos compuestos tipo flavonoide; estos se les denominará por ahora flavonoide 1 y flavonoide 2.



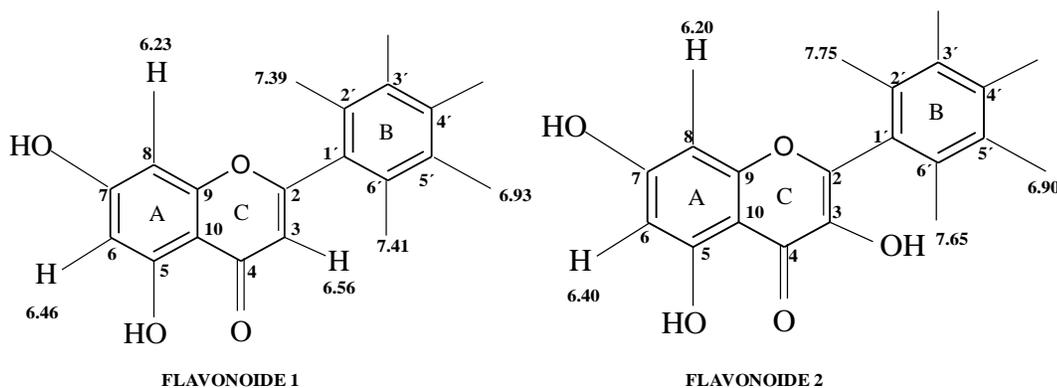
**Figura 18.** Espectro RMN  $^1\text{H}$  (300 Hz, MeOD) MF12<sub>s</sub>

En el anillo A del flavonoide 1; las señales  $\delta$  6.23 ( $d$ ,  $J = 2.1$  Hz,  $1H$ ) y  $\delta$  6.46 ( $d$ ,  $J = 2.1$  Hz,  $1H$ ) se asignan a los hidrógenos 6 y 8 respectivamente. Así mismo, en el anillo A del flavonoide 2 se asignan el  $\delta$  6.20 ( $d$ ,  $J = 2.1$  Hz,  $1H$ ) al H-6 y el  $\delta$  6.40 ( $d$ ,  $J = 2.1$  Hz,  $1H$ ) al H-8. El  $\delta$  6.56 conforme a su multiplicidad singlete no acopla con ningún hidrógeno por tanto se asigna al H-3 del flavonoide 1 (Figura 19).



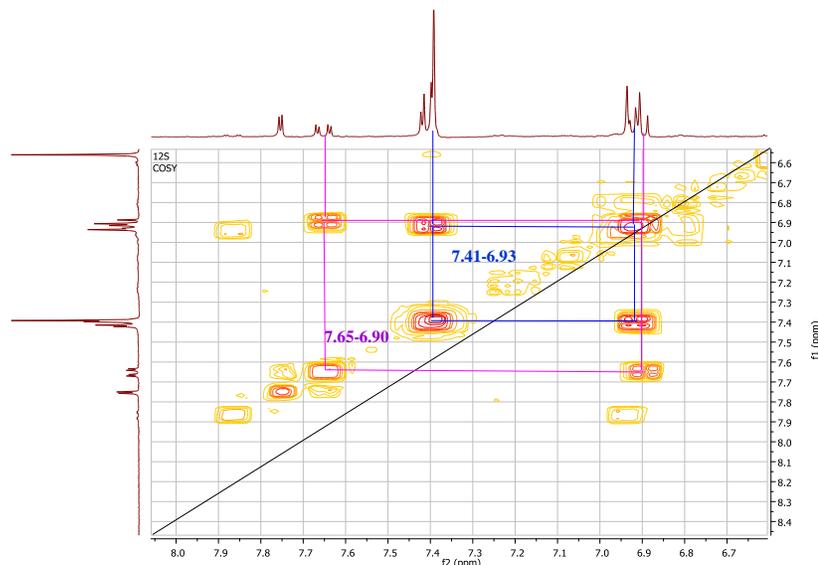
**Figura 19.** Asignación de algunas señales en el anillo A y C del flavonoide 1 y el flavonoide 2 presentes en MF12S

Continuando con la elucidación del flavonoide 1, las señales  $\delta 7.41$ ,  $\delta 7.39$  y  $\delta 6.93$  se asignan a los protones H-6', H-2' y H-5' respectivamente en el anillo B. En el flavonoide 2 las señales el  $\delta 7.75$  se asigna al H-2', el  $\delta 7.65$  al H-6' y el  $\delta 6.90$  al H-5' del anillo B (Figura 20). El espectro de  $^1\text{H}$  completo del sólido MF2<sub>2</sub> se observa en el anexo D.



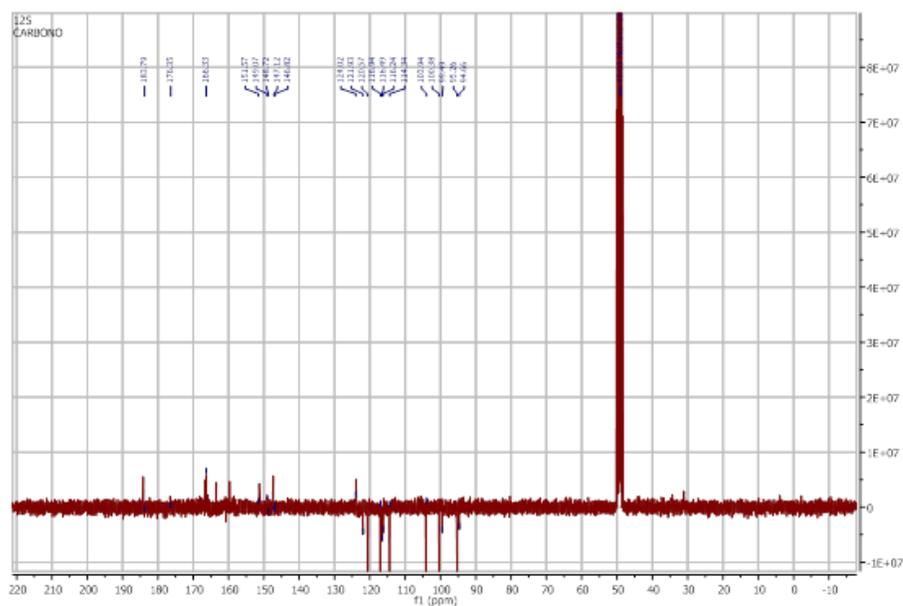
**Figura 20.** Asignación de algunas señales en el anillo B del flavonoide 1 y el flavonoide 2 presentes en MF12S

El experimento COSY permitió corroborar las correlaciones entre los protones del anillo B en ambos flavonoides. De este modo, los protones con  $\delta 7.41$ ,  $\delta 6.93$  correlacionan en el flavonoide 1, así mismo, el protón  $\delta 7.65$  correlaciona con el  $\delta 6.90$  en el flavonoide 2 (Figura 21).



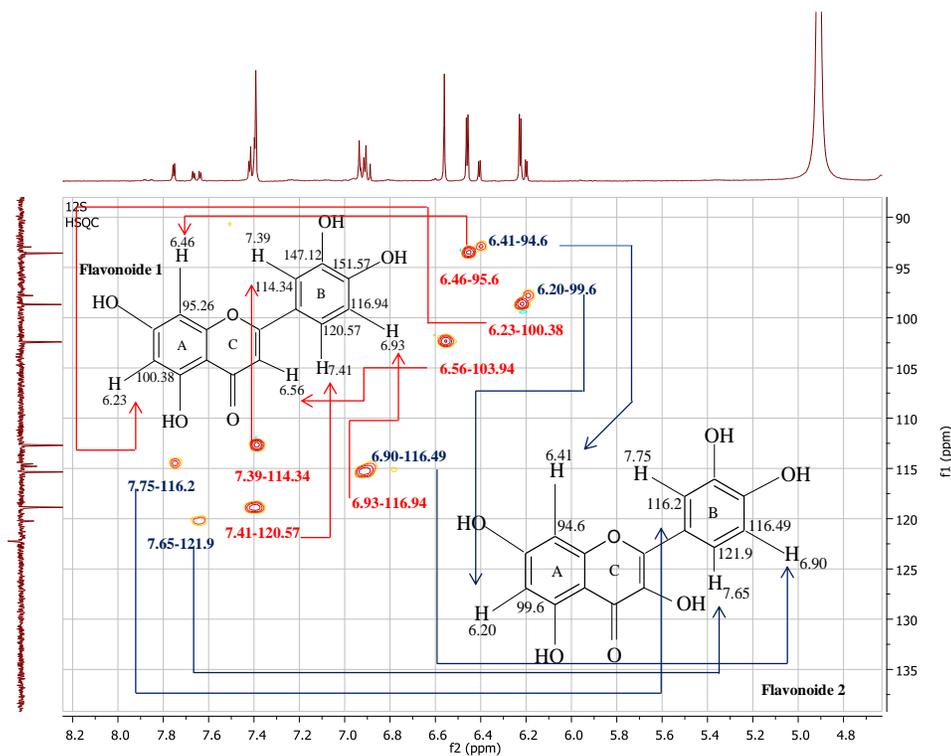
**Figura 21.** Experimento COSY de MF12<sub>s</sub> (región de 6.6 a 8.0 ppm)

En el espectro de <sup>13</sup>C, experimento *J-MOD*, se observan 11 carbonos metínicos (CH) y 9 cuaternarios (figura 22). De estos se resaltan dado su desplazamiento químico los  $\delta$  183.79 y  $\delta$  176.35 correspondientes a la señal del grupo cetona presente en los anillos tipo pirano (C<sub>4</sub>). Otro desplazamiento a destacar, es el  $\delta$  103.94 señal característica en el anillo C (C-3) de las flavonas. Las señales  $\delta$  94.66, 95.26, 99.49, 110.38, 114.34, 116.24, 116.49, 116.94, 120.57, 121.93, 124.02, 146.82, 147.12, 148.72, 149.07, 151.57, 166.33 corresponden a carbonos aromáticos.



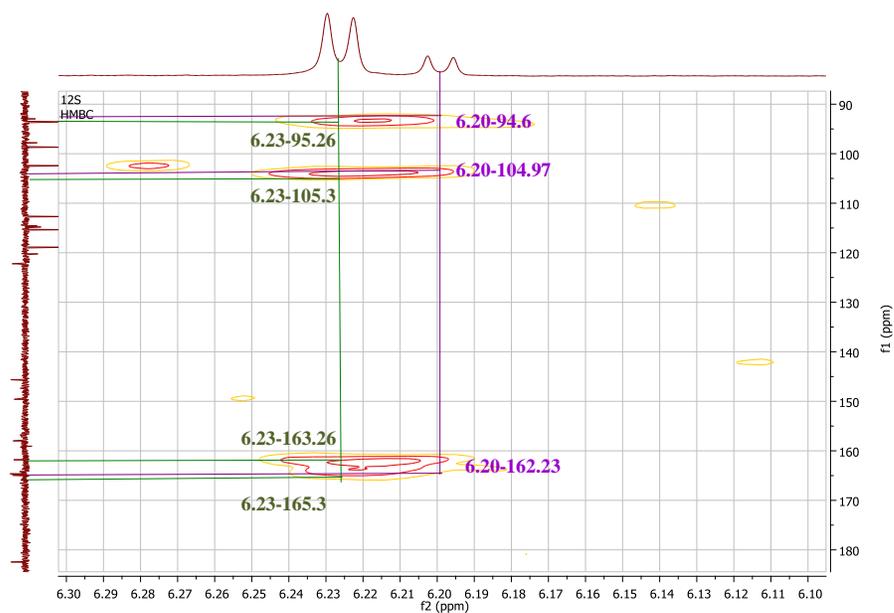
**Figura 22.** Espectro <sup>13</sup>C experimento *J-MOD* de MF12<sub>s</sub>

En el espectro HSQC (Figura 23) del **MF12s**, se pueden observar las conectividades del hidrógeno y el carbono con el que se encuentra unido. El Flavonoide 1, presenta las correlaciones,  $\delta$  6.23 ( $\delta$  100.38, C-6),  $\delta$  6.46 ( $\delta$  95.26, C-8),  $\delta$  6.93 ( $\delta$  116.94, C-5'),  $\delta$  6.56 ( $\delta$  103.94, C-3),  $\delta$  7.39 ( $\delta$  114.34, C-2'),  $\delta$  7.41 ( $\delta$  120.57, C-6'). En el caso del Flavonoide 2 las conectividades se asignan de la siguiente manera: el  $\delta$  6.20 ( $\delta$  99.6, C-6),  $\delta$  6.41 ( $\delta$  94.6, C-8),  $\delta$  6.90 ( $\delta$  116.49, C-5'),  $\delta$  7.65 ( $\delta$  121.9, C-6'),  $\delta$  7.75 ( $\delta$  116.2, C-2').



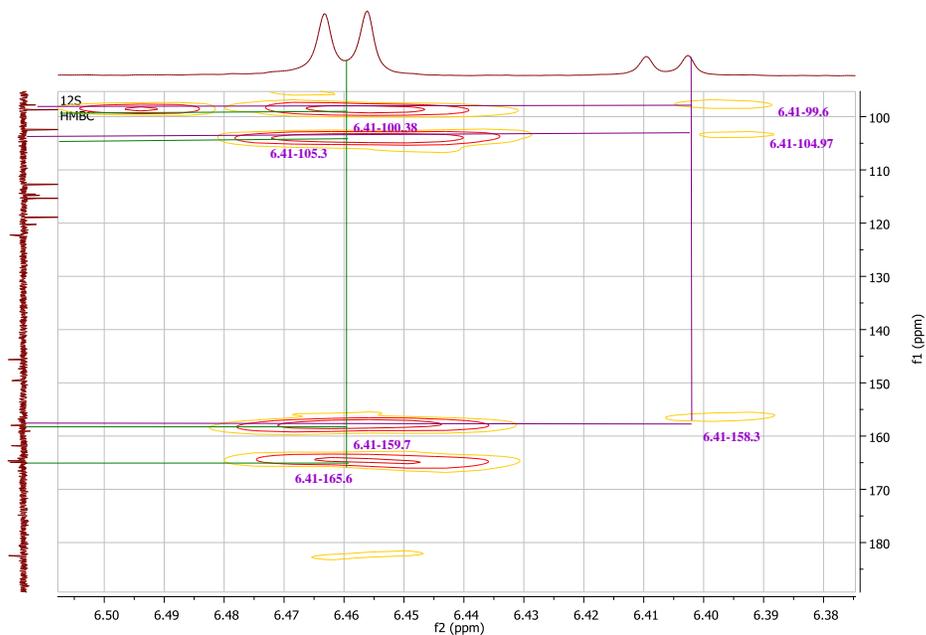
**Figura 23.** Espectro HSQC del sólido MF2<sub>s</sub>

El análisis del espectro HMBC se realizó inicialmente en la región comprendida entre 6.0 ppm y 6.30 ppm (Figura 24). El  $\delta$  6.23 del flavonoide 1 correlaciona con los desplazamientos  $\delta$  95.26,  $\delta$  105.3,  $\delta$  163.26,  $\delta$  165.6. El  $\delta$  6.20 en el flavonoide 2 correlaciona con los  $\delta$  94.6,  $\delta$  104.97,  $\delta$  162.23.



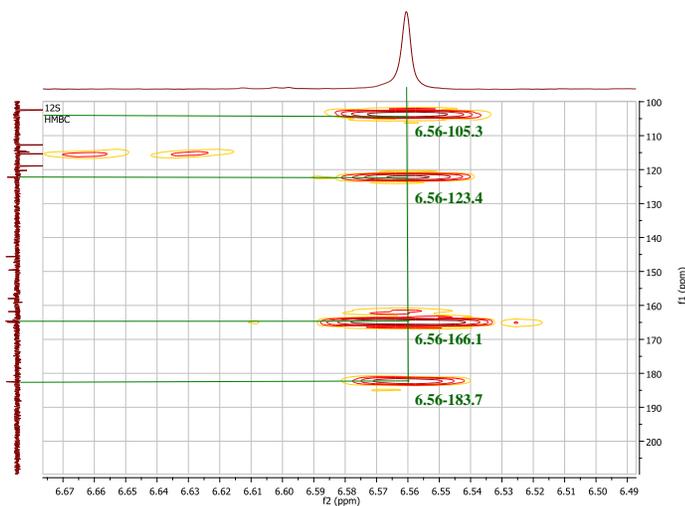
**Figura 24.** Análisis del espectro HMBC del MF12<sub>s</sub> región entre 6.0 ppm a 6.30 ppm.

El  $\delta$  6.41 del flavonoide 1 correlaciona con el  $\delta$  99.6,  $\delta$  104.97 y  $\delta$  158.3. En el flavonoide 2 el  $\delta$  6.46 correlaciona con los carbonos con desplazamientos  $\delta$  100.38,  $\delta$  105.3,  $\delta$  159.7 y  $\delta$  165.6 (Figura 25).



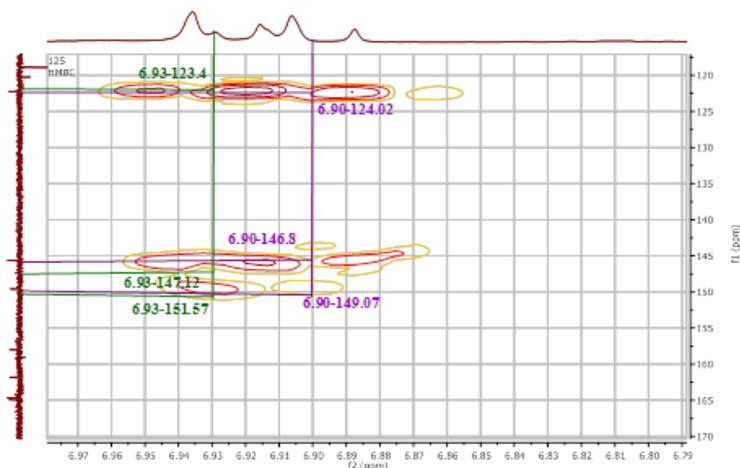
**Figura 25.** Análisis del espectro HMBC del MF12<sub>s</sub> desplazamiento  $\delta$  6.46 del flavonoide 1 y  $\delta$  6.41 del flavonoide 2.

En el caso del Flavonoide 1 en el espectro de  $^1\text{H}$  y en el espectro HSQC se observó un  $\delta$  6.56. Esta señal en HMBC (Figura 26) correlaciona con  $\delta$  105.3,  $\delta$  123.4,  $\delta$  166.1 y  $\delta$  183.7.



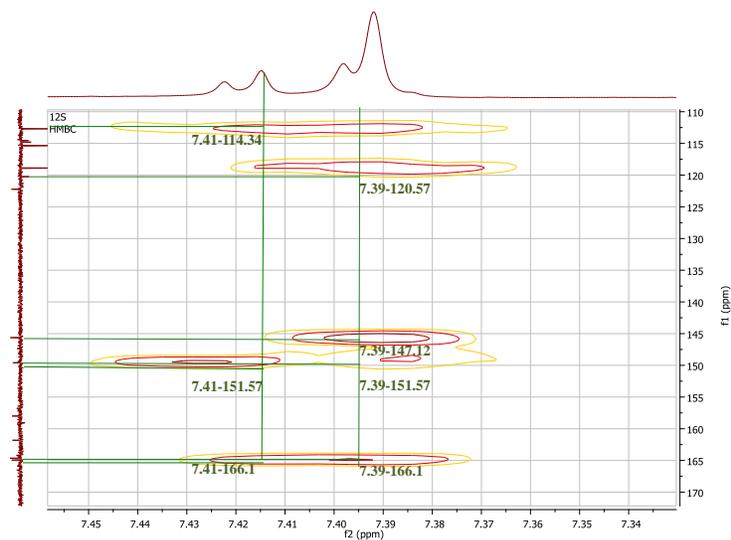
**Figura 26.** Análisis del espectro HMBC del MF12<sub>s</sub> desplazamiento  $\delta$  6.56 para el flavonoide 1.

En la región comprendida entre 6.79 y 6.97 ppm;  $\delta$  6.93 en el flavonoide 1 correlaciona con los  $\delta$  123.4,  $\delta$  147.12 y  $\delta$  151.57. En el flavonoide 2 el  $\delta$  6.90 correlaciona con los  $\delta$  124.02,  $\delta$  146.8 y  $\delta$  149.07 (Figura 27).



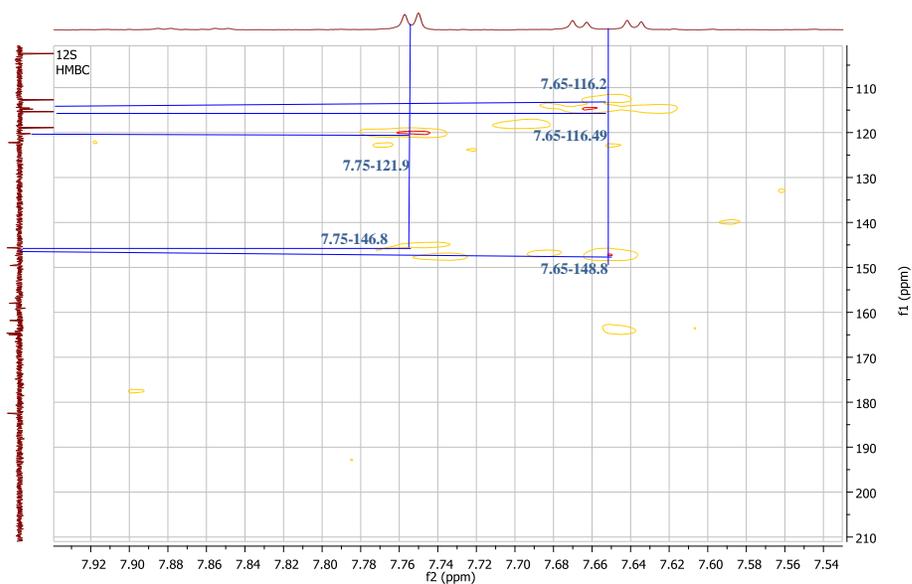
**Figura 27.** Análisis del espectro HMBC del MF12<sub>s</sub> desplazamiento  $\delta$  6.93 para el flavonoide 1 y  $\delta$  6.90 para el flavonoide 2.

Los desplazamientos  $\delta$  7.39 y  $\delta$  7.41 del flavonoide 1 correlacionan con los  $\delta$  120.57,  $\delta$  147.12,  $\delta$  151.57,  $\delta$  166.1 y  $\delta$  114.37,  $\delta$  151.57,  $\delta$  166.1 respectivamente (Figura 28).



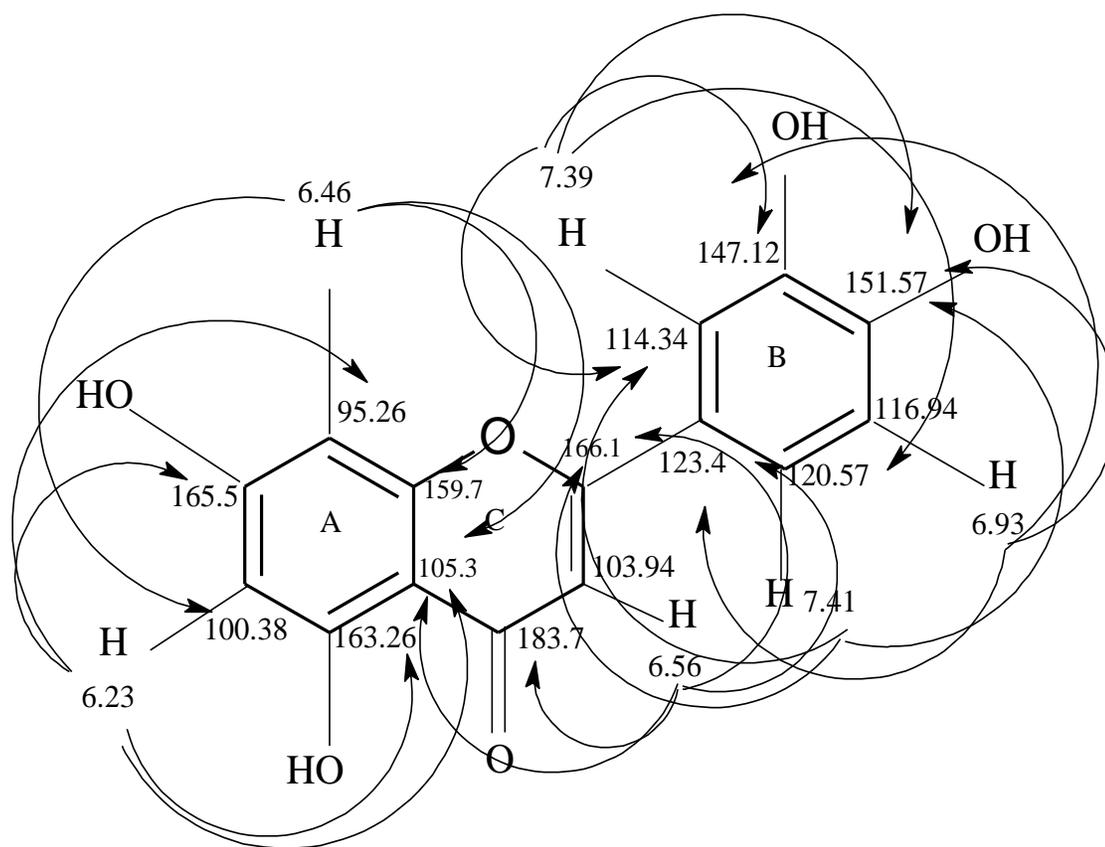
**Figura 28.** Análisis del espectro HMBC del MF12<sub>s</sub> desplazamientos  $\delta$  7.39 y  $\delta$  7.41 para el flavonoide 1.

Por otra parte el flavonoide 2 presenta un  $\delta$  7.65 este protón correlaciona con  $\delta$  116.2,  $\delta$  116.49,  $\delta$  148.8. A su vez el Hidrógeno  $\delta$  7.75 correlaciona con los carbonos  $\delta$  121.9,  $\delta$  146.8 (Figura 29).



**Figura 29.** Análisis del espectro HMBC del MF12<sub>s</sub> desplazamientos  $\delta$  7.65 y  $\delta$  7.75 para el flavonoide 2.

En el flavonoide 1 los  $\delta$  6.56 y  $\delta$  6.93 no fueron asignados por el experimento HMBC. Sin embargo, el  $\delta$  6.56 presenta multiplicidad singlete en el espectro de  $^1\text{H}$ , es decir no está acoplado con otro hidrógeno, esto también se corrobora en el experimento COSY, este protón se asignaría al  $\delta$  103.94 correspondiente al C-3 de la estructura y el  $\delta$  6.93 (multiplicidad doblete) al C-5'. De esta forma a partir de los datos obtenidos del análisis del espectro HMBC y los demás experimentos de RMN, el flavonoide 1 corresponde a la estructura de la flavona Luteolina (3',4',5, 7-tetrahidroxiflavona) como se muestra en la figura 30.



**Figura 30.** Estructura del flavonoide 1 identificada como Luteolina (3',4',5, 7-tetrahidroxiflavona) para la mezcla MF12s.

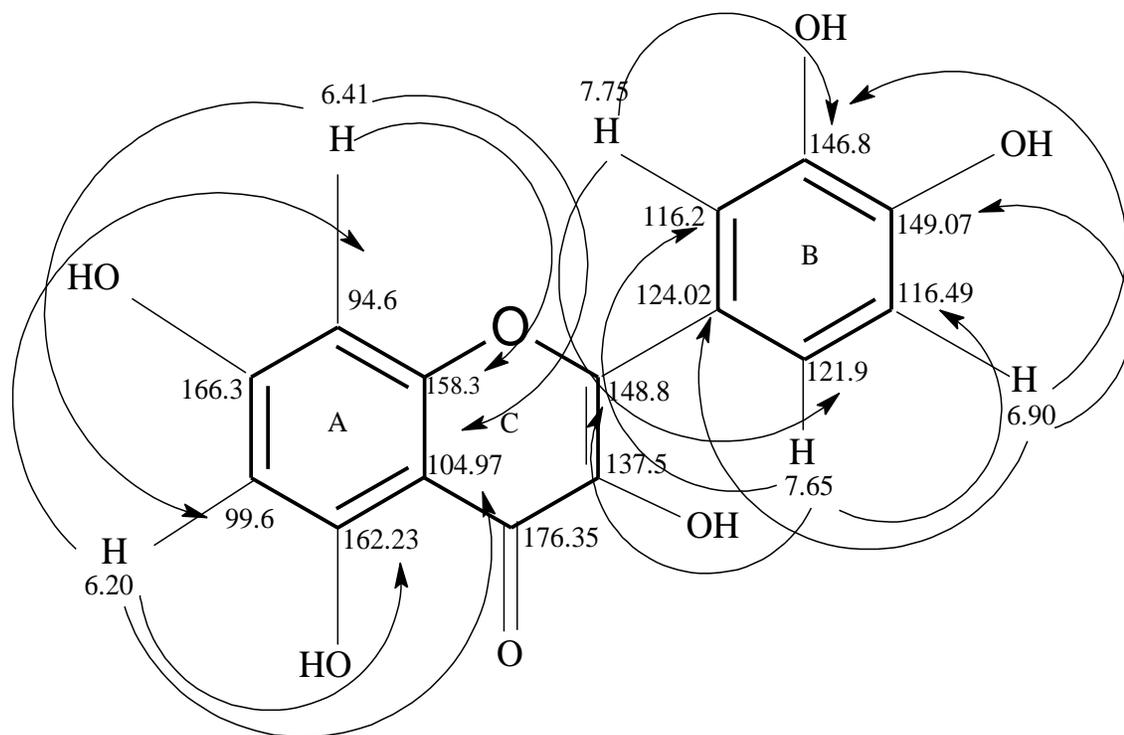
La comparación con la literatura para la Luteolina se explica en la tablas 8.

**Tabla 8.** Comparación de los desplazamientos en  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la Luteolina en el sólido MF12, con la Luteolina reportada en la literatura.

Luteolina en MF2 s (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )				Luteolina <sup>1</sup> (500MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )		Luteolina <sup>2</sup> (300MHz $\text{DMSO-d}_6$ )	
Posición H	RMN $^1\text{H}$	Posición C	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
-	-	2	166.1	-	166.0	-	164.5
3	6.56 (s)	3	103.94	6.52 (s)	103.9	6.59 (s)	103.3
-	-	4	183.7	-	183.9	-	182.2
-	-	5	163.26	-	163.2	-	162.1
6	6.23 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	6	100.38	6.19 (d, $J$ = 2.0 Hz, 1H)	100.1	6.22 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	99.2
-	-	7	165.6	-	166.4	-	164.7
8	6.46 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	8	95.26	6.42 (d, $J$ = 2.0 Hz, 1H)	95.0	6.47 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	94.2
-	-	9	159.7	-	159.4	-	157.9
-	-	10	105.3	-	105.3	-	104.2
-	-	1'	123.4	-	123.7	-	122.1
2'	7.39 (d)	2'	114.34	7.36 (m)	114.1	7.43 (d)	113.8
-	-	3'	147.12	-	147	-	146.2
-	-	4'	151.57	-	151.0	-	150.1
5'	$\delta$ 6.93 (d)	5'	116.94	$\delta$ 6.88 (d, $J$ =8.5)	116.8	$\delta$ 6.92 (d, $J$ =9.0, 1H)	116.4
6'	7.41 (d)	6'	120.57	7.36 (m)	120.3	7.44 (dd, $J$ = 9.0,2.1,1H)	119.3

1. Lin, L., et al., 2015.
2. Markham, K. R., et al., 1986.

En la elucidación final del flavonoide 2; el carbono cuaternario  $\delta$  177.5, observado en el espectro de  $^{13}\text{C}$ ; corresponde al carbonilo (C-4) en el anillo C. El desplazamiento químico del C-3, se asigna con base en datos espectrales reportados en la bibliografía y el análisis de un compuesto puro aislado en este trabajo (ver sección 4.3.2) se asigna entonces un  $\delta$  137.5. De esta manera el flavonoide 2 corresponde a un flavonol identificado como Quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi- flavona).



**Figura 31.** Estructura del flavonoide 2 identificada como Quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi- flavona) para la mezcla MF12s.

Los datos fueron corroborados en la literatura como se muestra en la tabla 9.

**Tabla 9.** Comparación de los desplazamientos en  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de la Quercetina en el sólido MF12<sub>s</sub> con la Quercetina reportada en la literatura.

Quercetina en MF2 <sub>s</sub> (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD)				Quercetina <sup>1</sup> (600MHz, CD <sub>3</sub> OD)		Quercetina <sup>2</sup> (500MHz CD <sub>3</sub> OD)	
Posición H	RMN $^1\text{H}$	Posición C	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$	RMN $^1\text{H}$	RMN $^{13}\text{C}$
-	-	2	148.8	-	146.19	-	148.2
-	-	3	137.5	-	137.21	-	137.2
-	-	4	176.35	-	177.29	-	177.5
-	-	5	162.23	-	162.47	-	162.6
6	6.20 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	6	99.6	6.20 (1H, d, $J$ = 2.4)	99.24	6.20 (1H, d, $J$ = 2.0)	99.4
-	-	7	166.3	-	165.55	-	165.7
8	6.40 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	8	94.6	6.40 (1H, d, $J$ = 2.4)	94.42	6.40 (1H, d, $J$ = 2.0 Hz,)	94.6
-	-	9	158.3	-	158.20	-	158.4
-	-	10	104.97	-	104.51	-	104.7
-	-	1'	124.02	-	121.68	-	124.3
2'	7.75 (d, $J$ = 2.1 Hz, 1H)	2'	116.2	7.75 (1H, d, $J$ = 1.9)	116.22	7.75 (1H, d, $J$ = 2.1 Hz,)	116.1
-	-	3'	146.8	-	147.96	-	146.3
-	-	4'	149.07	-	148.74	-	150.3
5'	$\delta$ 6.90 (d, $J$ = 8.5 Hz, 1H)	5'	116.49	6.89 (1H, d, $J$ = 8.5)	115.98	$\delta$ 6.90 (1H, d, $J$ = 8.5 Hz,)	116.2
6'	7.65 (dd, $J$ = 8.5, 2.2 Hz, 1H)	6'	121.9	7.65 (1H, dd, $J$ = 8.5, 2.4)	124.14	7.65 (1H, dd, $J$ = 8.5, 2.1 Hz)	121.8

1. Li, L., et al., 2010.

2. Allaoua, Z., et al., 2016.

### 4.3.2 Sólido proveniente del Residuo etanol-agua F2<sub>s</sub>

El sólido F2<sub>s</sub> presenta una coloración amarilla, es soluble en Me<sub>2</sub>CO, MeOH y parcialmente soluble en agua. El análisis realizado al sólido F2<sub>s</sub> (2,1 mg) por RMN <sup>1</sup>H muestra señales entre 6 y 8 ppm características de hidrógenos aromáticos (Figura 32).

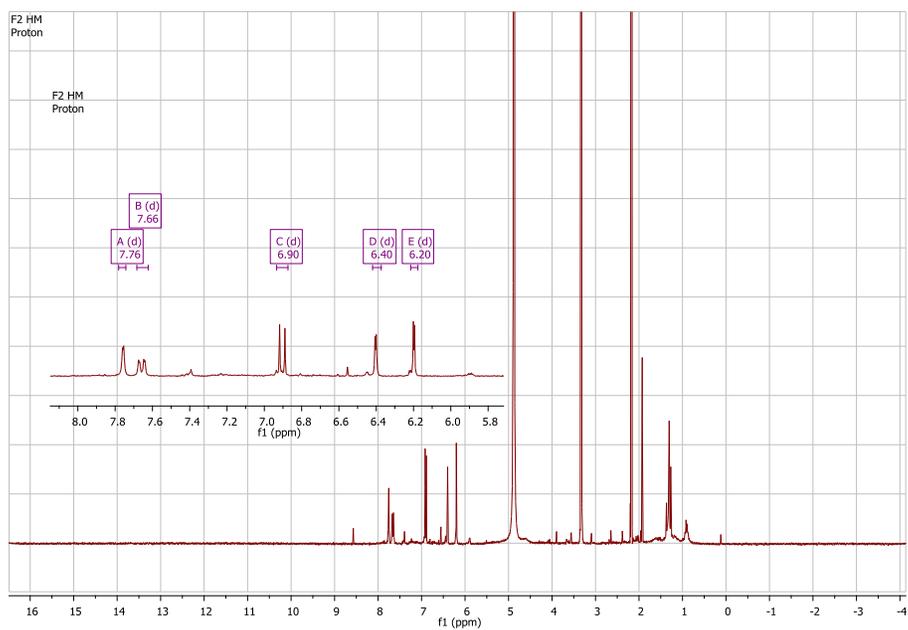
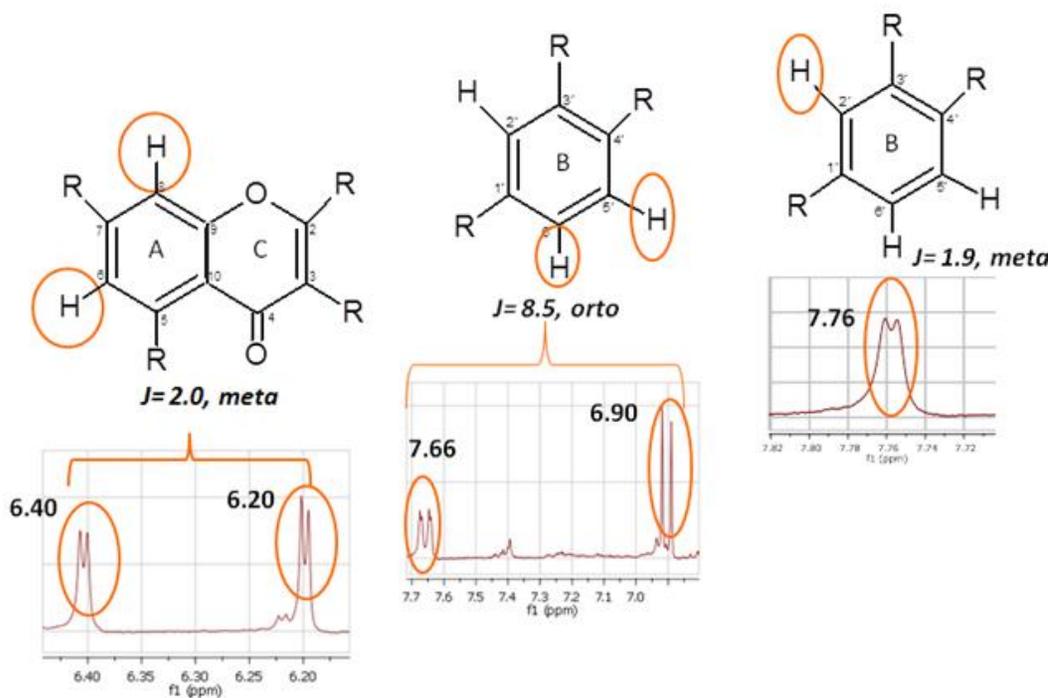


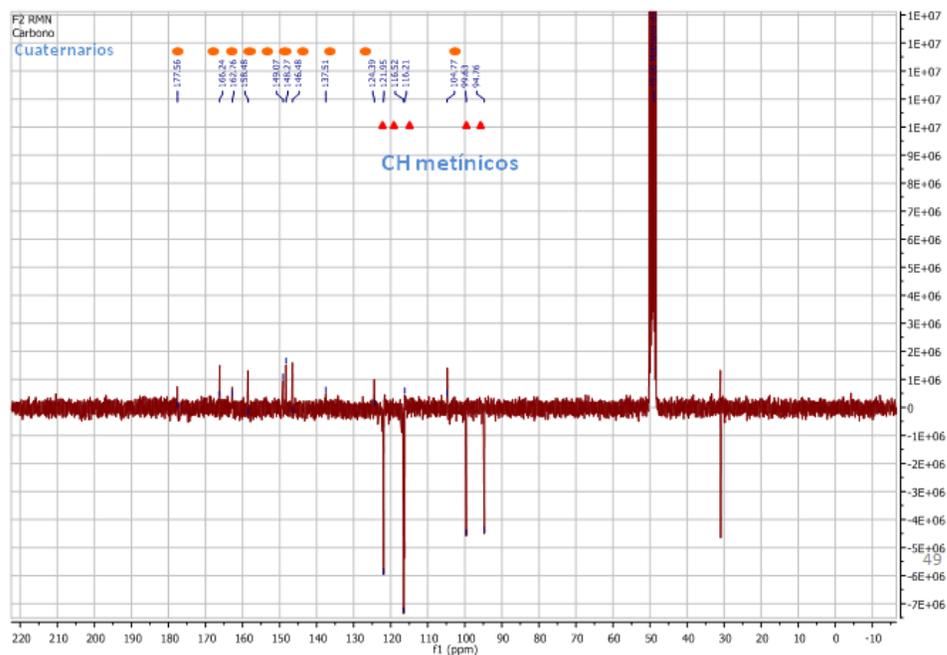
Figura 32. Espectro RMN <sup>1</sup>H (300 Hz, MeOD) del sólido F2<sub>s</sub>

En el espectro de <sup>1</sup>H-RMN, se observan señales características para dos protones acoplados meta a  $\delta$  6.20 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-6) y  $\delta$  6.40 (d,  $J = 2.0$  Hz, H-8), conjuntamente con un sistema de acoplamiento ABX a  $\delta$  6.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-5'),  $\delta$  7.66 (d,  $J = 8.5$  Hz, H-6') y  $\delta$  7.76 (d,  $J = 1.9$  Hz, H-2') sugiriendo una estructura tipo flavonoide (Figura 33).



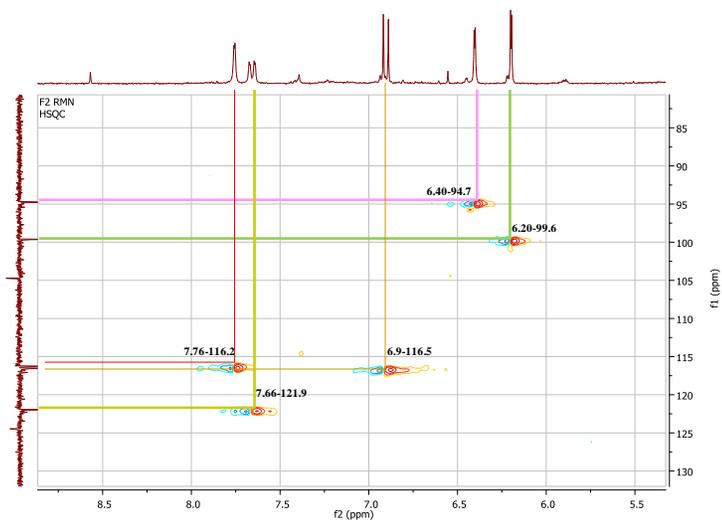
**Figura 33.** Asignación de protones y acoplamientos en el sólido  $F2_s$

En el espectro de carbono  $^{13}C$  experimento *J-MOD* (Figura 34) se observan 13 carbonos; 10 son cuaternarios y 5 metínicos (CH). Los desplazamientos químicos son característicos de carbonos aromáticos. Particularmente los  $\delta$  177.56,  $\delta$  166.24,  $\delta$  162.76,  $\delta$  158.48,  $\delta$  149.07,  $\delta$  148.27,  $\delta$  146.48,  $\delta$  137.51,  $\delta$  124.39,  $\delta$  104.77, pertenecen a los carbonos cuaternarios y los  $\delta$  121.95,  $\delta$  116.52,  $\delta$  116.21,  $\delta$  99.63,  $\delta$  94.76 a los carbonos metínicos (CH). En los desplazamientos de los carbonos cuaternarios cabe resaltar al  $\delta$  177.56 perteneciente al carbono del carbonilo (C-4) y el  $\delta$  137.51 sugiere un grupo hidroxilo sustituyente en C-3, como ocurre en los flavonoles (Marcano, D., et al., 2002).



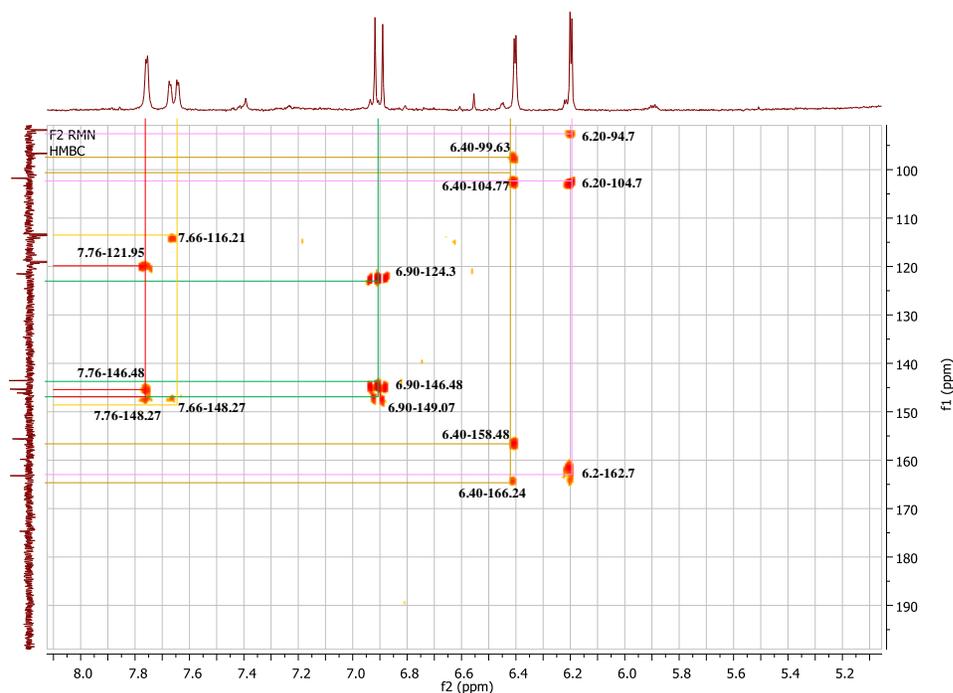
**Figura 34.** Espectro RMN<sup>13</sup>C NMR (75 MHz, MeOD)

En el espectro heteronuclear HSQC (Figura 35) se observó lo siguiente: (a)  $\delta$  6.20 muestra correlación con C-6 ( $\delta$  99.63) y  $\delta$  6.40 presenta conectividad con C-8 ( $\delta$  94.76). (b) el protón  $\delta$  6.90 correlaciona con C-5' ( $\delta$  116.52), el  $\delta$  7.66 con C-6' ( $\delta$  121.95); así mismo el  $\delta$  7.76 correlaciona con C-2' ( $\delta$  116.21).



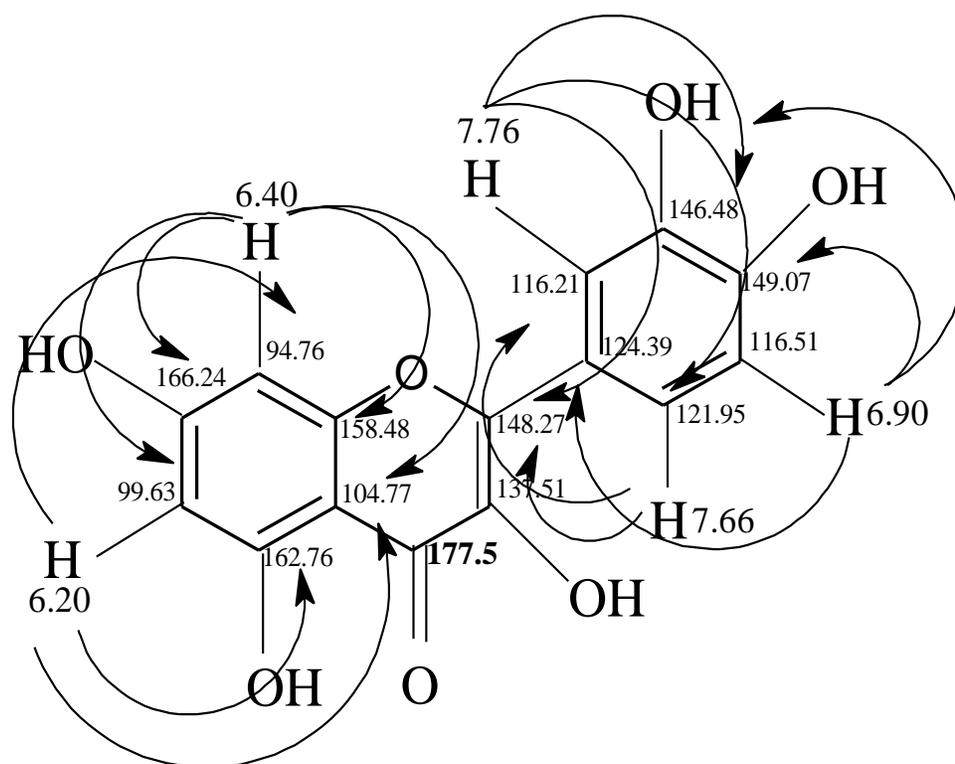
**Figura 35.** Espectro HSQC en RMN del sólido F2s

La elucidación de la estructura del flavonoide se completa con el análisis del espectro HMBC (Figura 36). En este experimento H-6 muestra conectividad  $^2J$  con C-5 ( $\delta$  162.76) y  $^3J$  con C-10 ( $\delta$  104.77). El protón H-8 muestra correlaciones a dos enlaces con C-7 ( $\delta$  166.24) y C-9 ( $\delta$  158.48). La asignación de C-2 ( $\delta$  148.27) se determina por su conectividad a tres enlaces con H-6' ( $\delta$  7.66) y H-2' ( $\delta$  7.76) este protón a su vez correlaciona a  $^2J$  con C-3' ( $\delta$  146.48). Por otra parte, H-5' muestra una conectividad  $^2J$  con C-4' ( $\delta$  149.07). Finalmente se asigna el  $\delta$  149.04 a C-4', este dato se corrobora con la literatura (ver tabla 9).



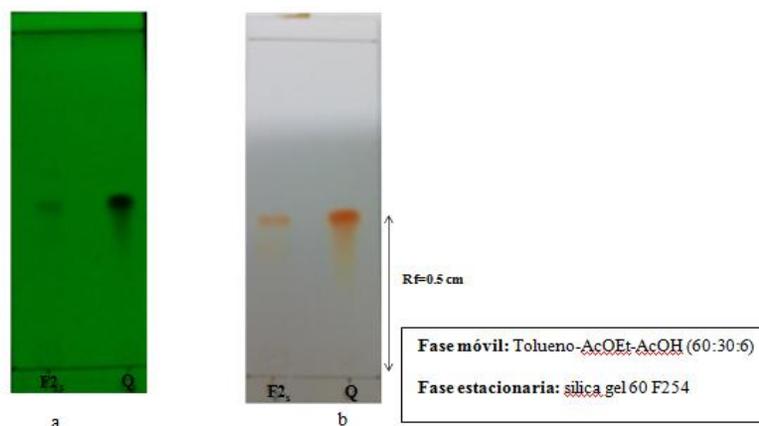
**Figura 36.** Espectro HMBC del sólido F2s

Una vez finalizada la elucidación estructural del sólido F2s; se confirmó que el compuesto es un flavonoide tipo flavonol cuya estructura corresponde a la de la quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiavona), tal como se observa en la figura 37.



**Figura 37.** Estructura de la quercetina de acuerdo a las correlaciones observadas en HMBC

Como análisis adicional se comparó por CCD el compuesto **F2s** con el patrón SIGMA de quercetina (3,3',4',5,7 Pentahidroxi flavona), se calculó un valor de  $R_f = 0.5$ , obteniendo en ambos sólidos el mismo resultado (Figura 38).



**Figura 38.** CCD del sólido F12<sub>s</sub> con el patrón SIGMA de Quercetina (Q) a. Cromatoplaqa vista a la luz UV de 254nm b. Cromatoplaqa vista a la luz visible

Los datos observados en los espectros  $^1\text{H}$  y  $\text{C}^{13}$  se corroboraron con la literatura.

**Tabla 9.** Comparación de los desplazamientos de F2, en  $^1\text{H}$  y  $\text{C}^{13}$  con Quercetina reportada en la literatura.

Quercetina en F2 s				Quercetina <sup>1</sup> (600MHz, CD <sub>3</sub> OD)		Quercetina <sup>2</sup> (500MHz CD <sub>3</sub> OD)	
Posición H	RMN <sup>1</sup> H	Posición C	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C	RMN <sup>1</sup> H	RMN <sup>13</sup> C
-	-	2	148.27	-	146.19	-	148.2
-	-	3	137.51	-	137.21	-	137.2,
-	-	4	177.56	-	177.29	-	177.5
-	-	5	162.76	-	162.47	-	162.6
6	6.20 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	6	99.63	6.20 (1H, d, <i>J</i> = 2.4)	99.24	6.20 (1H, d, <i>J</i> = 2.0)	99.4
-	-	7	166.24	-	165.55	-	165.7
8	6.40 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	8	94.76	6.40 (1H, d, <i>J</i> = 2.4)	94.42	6.40 (1H, d, <i>J</i> = 2.0 Hz,)	94.6
-	-	9	158.48	-	158.20	-	158.4
-	-	10	104.77	-	104.51	-	104.7
-	-	1'	124.39	-	121.68	-	124.3
2'	7.76 (d, <i>J</i> = 1.9 Hz, 1H)	2'	116.21	7.75 (1H, d, <i>J</i> = 1.9)	116.22	7.75 (1H, d, <i>J</i> = 2.1 Hz)	116.1
-	-	3'	146.48	-	147.96	-	146.3
-	-	4'	149.07	-	148.74	-	150.3
5'	δ 6.90 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H)	5'	116.52	6.89 (1H, d, <i>J</i> = 8.5)	115.98	δ 6.90 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	116.2
6'	7.66 (d, <i>J</i> = 8.5 Hz, 1H)	6'	121.95	7.65 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.4)	124.14	7.65 (1H, dd, <i>J</i> = 8.5, 2.1 Hz)	121.8

1. Li, L., et al., 2010.
2. Allaoua, Z., et al., 2016.

#### **4.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo por el método de difusión en pozo**

La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo para las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 70063 y *Candida albicans* ATCC 90028 no arrojó ningún resultado positivo, la inhibición se presentó únicamente por los controles positivos (anexo G y H).

Dentro de las hipótesis que se pueden manejar en la obtención de resultados negativos pueden atribuirse a diversos factores algunos relacionados con el material vegetal empleado y otras con las condiciones experimentales diseñadas en cada investigación (Frómata, *et al.*, 2013).

Los métodos de difusión se suelen utilizar por su simplicidad y bajo costo, pero no siempre son confiables para la detección de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas. La ausencia de la zona de inhibición no significa necesariamente que el compuesto es inactivo, especialmente para compuestos menos polares estos se difunden más lentamente en el medio de cultivo. En los ensayos de difusión, los compuestos antimicrobianos procedentes de fuentes naturales que son medianamente solubles e insolubles en agua, por su naturaleza hidrófoba, impide la difusión de estos de manera uniforme a través del agar (Klančnik, A., *et al.*, 2010).

Respecto al proceso de difusión depende de numerosos factores incluyendo el número, el tamaño y la forma de las partículas. El número de partículas es un factor importante: las moléculas se difunden más rápidamente a un mayor gradiente de concentración. El volumen de partículas también influye en la velocidad de difusión: las partículas pequeñas se difundirán más lentamente. Otro aspecto relevante en la determinación de la actividad antimicrobiana es el pH (este fue uno de los parámetros que no se determinó durante los ensayos de actividad antimicrobiana de los extractos provenientes de aquenios y vilanos); se debe comprobar el pH de los disolventes

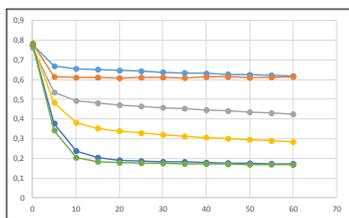
antes de la prueba, la actividad antibacteriana de sustancias activas puede ser alterada por pequeños interruptores de pH (Valgas, C., *et al.*,2007).

#### 4.5 Screening de capacidad antioxidante de los extractos y el residuo (tratamientos)

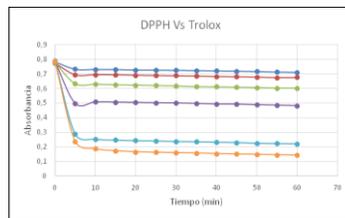
La capacidad antioxidante se evaluó en todos los tratamientos; tomando como criterio después de medir, el promedio de los porcentaje de captación de radicales libres % AOX de los extractos y el residuo a la máxima concentración (3200 ppm); se seleccionaron el E-EtOH y R-EtOH-H<sub>2</sub>O por presentar un % AOX  $\geq 50\%$  (anexo I). Este procedimiento se realizó en los dos métodos DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>+</sup>.

##### 4.5.1 Capacidad Antioxidante de extractos y residuo

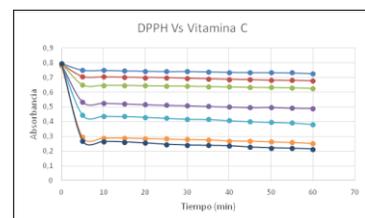
En la evaluación de la Capacidad Antioxidante en el E-EtOH y el R-EtOH-H<sub>2</sub>O; inicialmente se halló la fase estacionaria de la curva de cinética de cada tratamiento con cada uno de los métodos (ver ejemplo Figura 39). La absorbancia se seleccionó en el minuto donde no hubiera una variación del 10% a través del tiempo (anexo J).



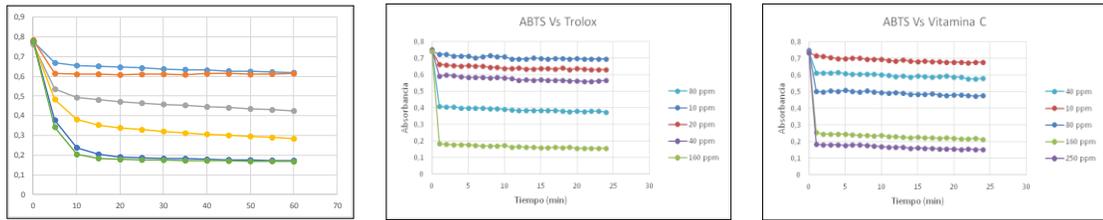
a. E-EtOH



Trolox



Vitamina C



b. E-EtOH

Trolox

Vitamina C

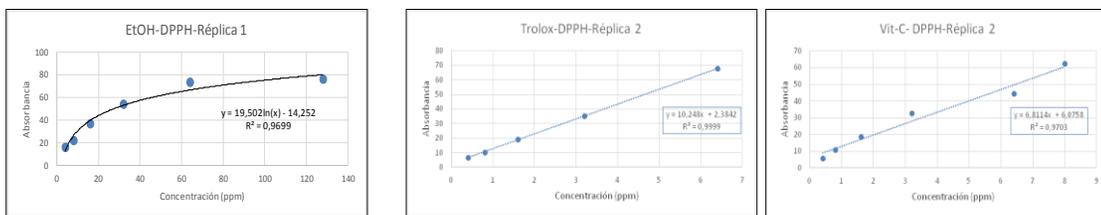
**Figura 39.** Determinación de la fase estacionaria en el E-EtOH y los controles: Método DPPH\* (a) Método ABTS \*\* (b)

De acuerdo a la cinética de los tratamientos en respuesta con el cromóforo se seleccionaron las absorbancias en el minuto 15; con estos datos se determinó el porcentaje de captación de radicales libres (Figura 40) para cada una de las concentraciones del E-EtOH y el R-EtOH-H<sub>2</sub>O. En total se realizaron dos replicas con sus respectivos triplicados.

$$AOX\% = \frac{[Abs. inicial - (Abs. muestra - Abs. blanco)]}{Abs inicial} \times 100$$

**Figura 40.** Ecuación para calcular el % AOX

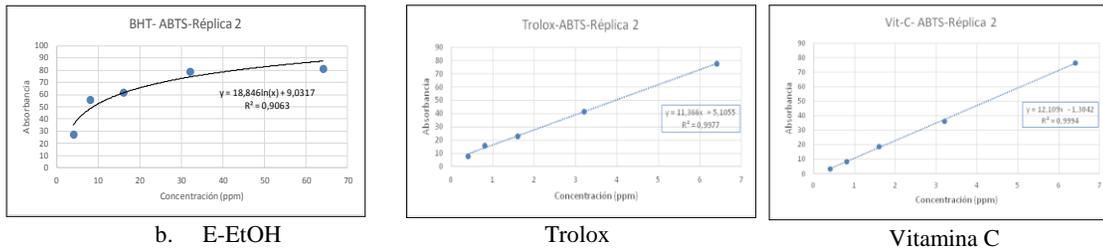
El promedio de los % AOX se graficaron versus las concentraciones, a partir de aquí se calculó la ecuación de la recta (ver ejemplo Figura 41). Mediante la interpolación de los datos al 50% de captación de radicales libres se calculó el CE<sub>50</sub> de cada tratamiento (anexo K). El CE<sub>50</sub> se define como la cantidad de muestra necesaria para disminuir en un 50 % la absorbancia.



a. E-EtOH

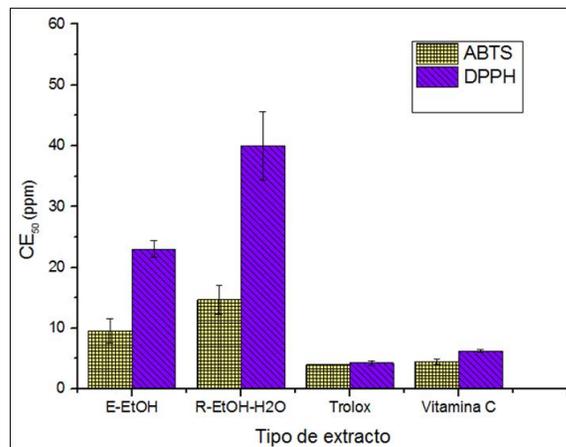
Trolox

Vitamina C



**Figura 41.** Determinación de la ecuación de la recta a partir del promedio de los % AOX versus las concentraciones en el E-EtOH y los controles: Método DPPH<sup>•</sup> (a) Método ABTS<sup>++</sup> (b).

Después de calcular los  $CE_{50}$  para cada tratamiento y cada replica, se calculó el promedio entre los datos (anexo L). Al comparar los resultados por el método DPPH<sup>•</sup> el menor valor lo presentó el E-EtOH ( $23 \pm 1,41$ ) en comparación con el valor del R-EtOH-H<sub>2</sub>O ( $40 \pm 5,66$ ); esto se corroboró por el método ABTS<sup>++</sup> donde el menor  $CE_{50}$  lo presentó el EtOH ( $9,55 \pm 2,05$ ) con respecto al R-EtOH-H<sub>2</sub>O ( $14,7 \pm 2,40$ ) descartando los controles positivos (Figura 42). El hecho de que el E-EtOH presente un menor valor de  $CE_{50}$  indica una cantidad de muestra menor para disminuir en un 50 % la absorbancia; esto se traduce en una mayor capacidad antioxidante del E-EtOH en relación al R-EtOH-H<sub>2</sub>O.



**Figura 42.** Comparación de los valores de  $CE_{50}$  entre los tratamientos E-EtOH y R-EtOH-H<sub>2</sub>O

De acuerdo al análisis preliminar fitoquímico del extracto etanólico total, de aquenios y vilanos, se detectó de manera cualitativa la presencia de fenoles, como por ejemplo, los taninos (anexo A). Los fenoles y flavonoides son considerados como los compuestos más importantes en capacidad antioxidante (Thabit, R. A. S., *et al*, 2015). Los taninos son polifenoles naturales distribuidos en diferentes partes de las plantas como por ejemplo frutos y semillas (Elías., *et al*, 2009). Los taninos ejercen un efecto beneficioso sobre la salud tienen actividad antioxidante. Previenen y mejoran enfermedades cardiovasculares y también parecen ejercer actividad anticancerígena (Camean, A., Repetto M., 2012).

Así como los taninos, los flavonoides presentan una alta capacidad antioxidante. En especies del género *Conyza* como la *Conyza bonariensis* se ha reportado un alto contenido de flavonoides (Thabit, R. A. S., *et al*, 2015). Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición lo que les confiere una gran capacidad antioxidante (Martínez-Flórez, S., *et al*, 2002). La presencia y posición de grupos hidroxilo en distintas partes de la molécula va influir notablemente en los mecanismos de actividad antioxidante. La capacidad de neutralización de radicales libres va a depender fundamentalmente de la reactividad de los sustituyentes hidroxilo. Por ejemplo, los grupos hidroxilo en el anillo B pueden donar fácilmente hidrógenos y electrones a distintos ROS (especies reactivas del oxígeno) ó RNS (especies reactivas del Nitrógeno) ya que el radical flavonoide formado está muy estabilizado. Entre los homólogos estructurales flavonas y flavanonas, la capacidad neutralizadora de radicales libres se incrementa de manera líneal y curvilínea respectivamente con el aumento de grupos hidroxilo en su estructura (Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L., 1997).

En ese sentido, el estudio químico realizado al E-EtOH y R-EtOH-H<sub>2</sub>O reportó la presencia de los flavonoides: quercetina (**F2<sub>s</sub>**), quercetina y luteolina (**MF12<sub>s</sub>**). Muchos resultados coinciden en que los flavonoides con sustituyentes dihidroxílicos

en posiciones 3´y 4´ en el anillo B se muestran más activos como antioxidantes y que este efecto es potenciado por la presencia de un doble enlace entre los carbonos 2 y 3, un grupo OH en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4; como sucede con la Quercetina (Pérez Trueba, G., 2003).

Numerosas evidencias apuntan hacia la protección del ADN ejercida por los flavonoides al inhibir los efectos oxidativos que provocan las ROS<sup>1</sup> sobre esta biomolécula. Dentro de estos compuestos se encuentran flavonas como la Luteolina (Trueba, G. P., *et al*, 2001).

Vale la pena aclarar, que en esta investigación, por la cantidad de muestra no se realizaron estudios de capacidad antioxidante con fracciones ni compuesto puro. Sin embargo, el extracto y el residuo fueron los que presentaron una alta capacidad antioxidante y es de donde se separaron los flavonoides.

#### **4.5.2 Análisis estadístico de la Capacidad Antioxidante**

El análisis estadístico de la capacidad antioxidante se realizó utilizando el programa SPSS. La prueba de Normalidad Shapiro – Wilk indico que se cumple el supuesto de normalidad. Al igual que los supuesto de equivalencia de grupos e independencia de observaciones. Al observar la robustez de la prueba, el análisis estadístico usado fue ANOVA a un factor (anexo I). El ANOVA unifactorial demostró que hay diferencias significativas de disminución después, de acuerdo con los tratamiento usados (F:64, 994; p=0,01;  $\alpha=0,05$ ). De acuerdo a la prueba Post-Hoc de Tukey se observa que existen diferencias significativas entre los tratamientos; donde el E-EtOH presentó el menor valor de CE<sub>50</sub> comparado con el R-EtOH-H<sub>2</sub>O (excluyendo los controles positivos).

---

<sup>1</sup> Especies reactivas del oxígeno incluyen iones de oxígeno, radicales libres y peróxidos.

Adicionalmente se llevó a cabo una correlación (Pearson) de los métodos DPPH• y ABTS+• de cada tratamiento (Anexo). La correlación mostro un  $p \leq 0.05$  y un  $R^2 = 0.928$ , siendo ambas correlaciones significativas (si hay correlación) y de geometría positiva o linealidad positiva de los datos.

## CONCLUSIONES

1. En el estudio químico realizado a aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*, a partir del residuo etanol- agua, se aisló un sólido (F2<sub>s</sub>) amarillo tipo flavonoide; identificado mediante el análisis por RMN como quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona). Este se reporta por primera vez para los aquenios y vilanos en esta especie.
2. A partir del extracto etanólico, mediante diferentes experimentos de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HSQC y HMBC), se identificaron dos flavonoides en MF2<sub>s</sub>; Luteolina (flavona) y Quercetina (flavonol).
3. El análisis por HPLC-MS permitió identificar en el extracto éter de petróleo y el extracto en diclorometano compuestos tales como terpenos y flavonoides. La identificación es tentativa pues está basada en el tiempo de retención y un espectro de masas de baja resolución. Sin embargo, los compuestos han sido reportados en otras especies del género *Conyza*.
4. A partir de los métodos DPPH<sup>•</sup> y ABTS<sup>+•</sup> se determinó que el E-EtOH presenta una mayor capacidad antioxidante con respecto al R-EtOH-H<sub>2</sub>O; de hecho el menor valor de CE<sub>50</sub> lo presentó el E-EtOH (23±1,41 y 9,55±2,05 respectivamente) comparado con los resultados para el R-EtOH-H<sub>2</sub>O (40±5,66 y 14,7±2,40). Ambos métodos mostraron una alta correlación.
5. La evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella Pneumoniae* ATCC 70063 y *Candida albicans* ATCC 90028 no presentaron actividad.

## RECOMENDACIONES

1. Los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis* son órganos de tamaño pequeño. Para realizar otros estudios químicos y biológicos de estas estructuras primero se debe contemplar una etapa de acumulación de material antes de iniciar el trabajo.
2. La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó por el método de difusión en pozos se recomienda ensayar otros técnicas y otros microorganismos para encontrar si presentan actividad antimicrobiana y antifúngica los aquenios y vilanos de la especie vegetal *Conyza trihecatactis*.

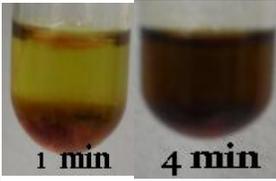
### Anexo A: Análisis Fitoquímico preliminar

El análisis preliminar fitoquímico se realizó basado en el Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y fitoquímica 2008 de la Universidad de Antioquia.

#### ALCALOIDES

ENSAYO	MUESTRA	PATRON	RESULTADO
Dragendorff			
		Mezcla de voacangina y clorhidato de papaverina	Positivo
Mayer			
			Positivo
Valsler			
		Negativo	
Warner		Atropina <sup>a</sup>	
			Positivo

## TERPENOS

ENSAYO	MUESTRA	PATRON	RESULTADO
Liebermann-Burchard			
Salkowsky		Stigmasterol	<div style="text-align: center;">  <p>1 min      4 min</p> </div>
			Positivo

## FLAVONOIDES

ENSAYO	MUESTRA	PATRON <sup>a</sup>	RESULTADO
Shinoda			
		Flavona	Positivo

## TANINOS

ENSAYO	MUESTRA	PATRON <sup>a</sup>	RESULTADO
Cloruro Férrico		 Acido gálico	 Positivo
		 Acido gálico	 Positivo

## CUMARINAS

ENSAYO	MUESTRA	PATRON <sup>a</sup>	RESULTADO
Hidroxamato férrico	Extracto MeOH 	 Cumarina	 Positivo
	Extracto clorofórmico 		 Positivo

## GLICOSIDOS CARDIOTONICOS

ENSAYO	MUESTRA	PATRON <sup>a</sup>	RESULTADO
Baljet		 Dedalera	 Positiva

## QUINONAS

ENSAYO	MUESTRA	PATRON <sup>a</sup>	RESULTADO
Hidrosulfito de sodio		 Emodina	 Dudosa

a. Algunos patrones fueron tomados de los realizados por trabajos de Borrego (2010).

**Anexo B: Identificación tentativa de compuestos mediante el análisis por HPLC-  
MS de E-EDP y E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>**

EXTRACTO	No.	tR	m/z [M+H]	m/z [M-H]	TIPO DE COMPUESTO	Nombre del compuesto
E-EDP	1	17.93	477	499	-	-
	2	19.73	345	343	Flavonoide	Herbacetina 3,8,4'-trimetileter
					Sesquiterpenlactona	Lactona Isochiliolide
					Diterpeno	3- $\alpha$ -4 $\alpha$ -Epoxy-6-oxo-15,16-epoxy-8- $\beta$ -1-0 $\beta$ -H-cis-clerodane-13(16),14-dien-20,12-olide
	3	21.52	463	485	-	-
	4	23.97	871	872	-	-
5	27.22	273	467	Terpeno	Acetato de betamirina	
E-CH <sub>2</sub>	6	32.34	871	869	-	-
	1	17.6	477	499	-	-
	2	18.33	577	787	-	-
	3	19.32	477	499	-	-
	4	19.64	345	343	Flavonoide	Herbacetina 3,8,4'-trimetileter
					Sesquiterpenlactona	lactona Isochiliolide
					Diterpeno	3- $\alpha$ -4 $\alpha$ -Epoxy-6-oxo-15,16-epoxy-8- $\beta$ -1-0 $\beta$ -H-cis-clerodane-13(16),14-dien-20,12-olide
5	21.55	463	485	-	-	
6	27.25	273	467	Terpeno	Acetato de betamirina	
7	32.38	871	883	-	-	

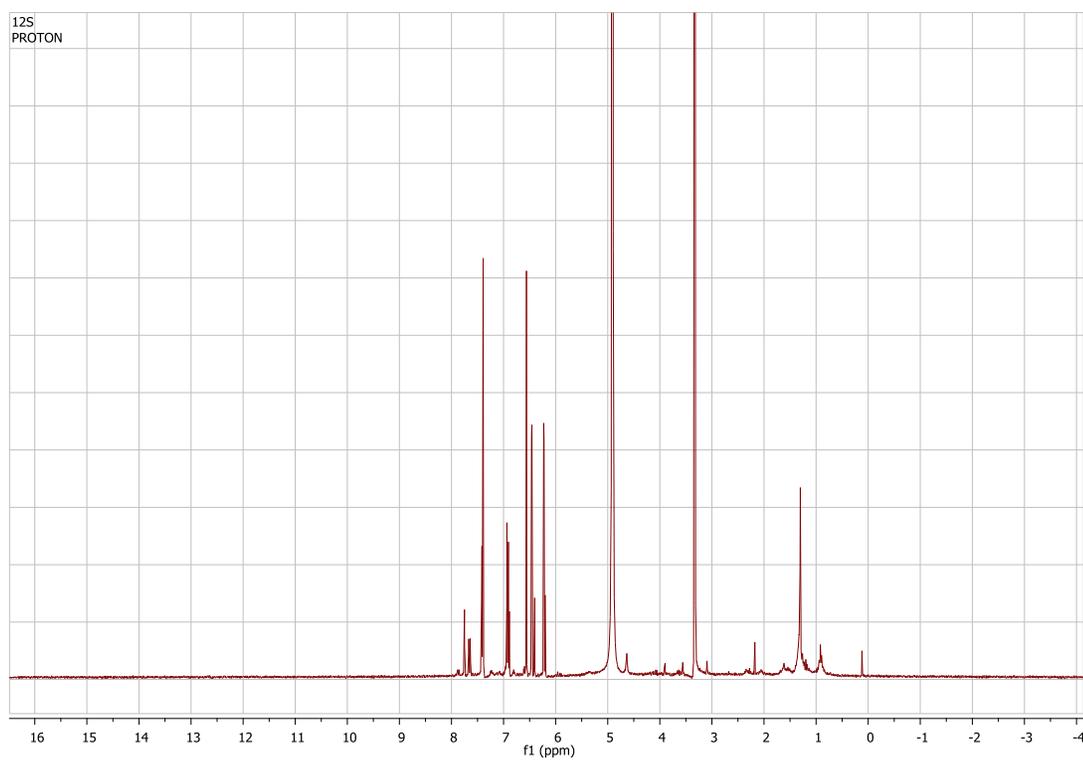
**t<sub>R</sub>**: tiempo de retención

### **Anexo C: Revelado con NP/PEG**

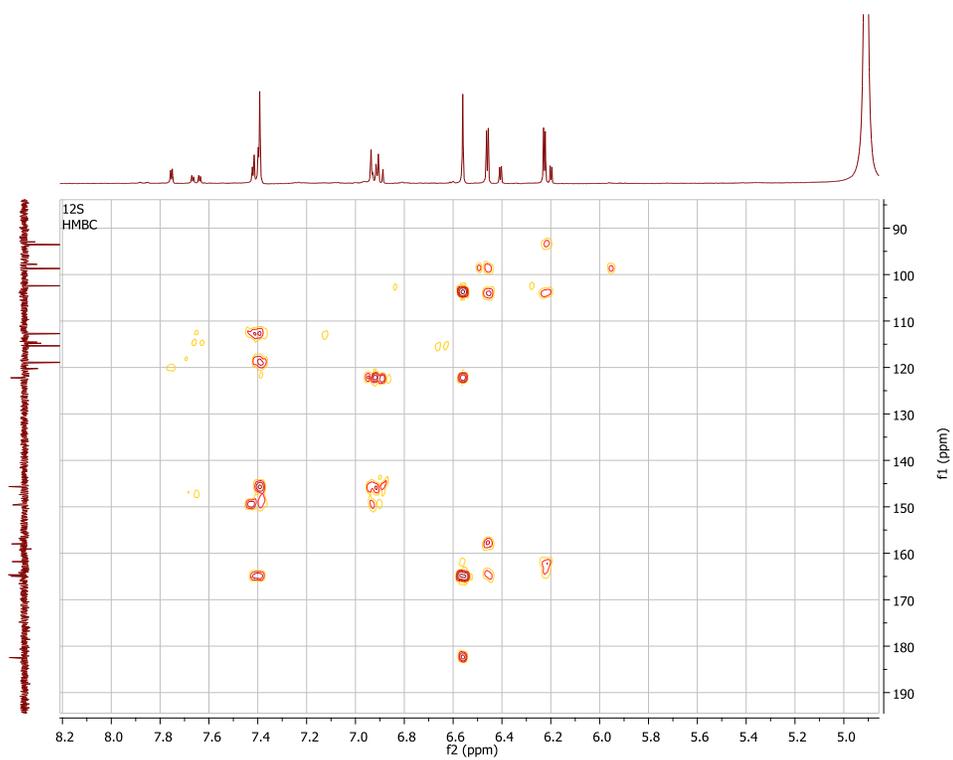
La placa es asperjada con una solución metanólica al 1% de ácido- $\beta$ -etilamino éster difenilbórico (difetilboriloxietilamina, NP), seguido por solución etanólica al 5% de polietilenglicol 400 (PEG) (10 mL a 8 mL respectivamente).

La detección de flavonoides se da por una intensa fluorescencia a 365nm. PEG incrementa la sensibilidad. La fluorescencia depende del comportamiento de la estructura (Wagner, H., Bladt, S., 1996).

### Anexo D: Espectro $^1\text{H}$ del MF<sub>2s</sub> (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



## Anexo E: Espectro HMBC del MF2<sub>S</sub>



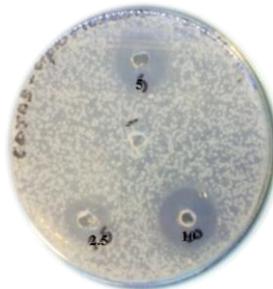
## Anexo F: Características de los microorganismos utilizados para la actividad antimicrobiana

Microorganismos (Forbes, B., Sahn D., Weissfeld, A., 2004)		
ESPECIE	CARACTERISTICAS	PATOGENIA
  <i>S. aureus</i>	Cocos gram-positivo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones cutáneas</li> <li>• Neumonía</li> </ul>
  <i>K. pneumoniae</i>	Bacilos-gramnegativos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infecciones del tracto urinario</li> <li>• Neumonía</li> </ul>
  <i>C. albicans</i>	Levadura	Causan diferentes tipos de infecciones en pacientes sanos e inmunodeprimidos como por ejemplo: queilitis comisural, infección pulmonar, meningitis

## Anexo G: Antibiogramas de los controles positivos utilizados en la actividad antimicrobiana

En el montaje de los antibiogramas, los ensayos se hicieron por triplicado y el control negativo fue el agua destilada, debido a que en este solvente se solubilizaron los antimicrobianos.

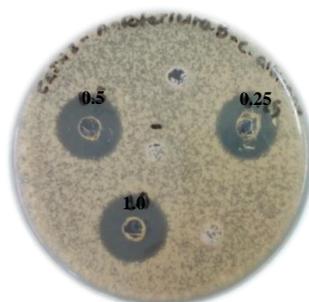
- *Staphylococcus aureus*: control (+) ciprofloxacina (2.5, 5, 10  $\mu\text{g/mL}$ ); la concentración seleccionada fue 5  $\mu\text{g/mL}$



- *Klebsiella pneumoniae*: control (+) ceftriaxona (15, 30, 60  $\mu\text{g/mL}$ ); la concentración seleccionada fue 30  $\mu\text{g/mL}$

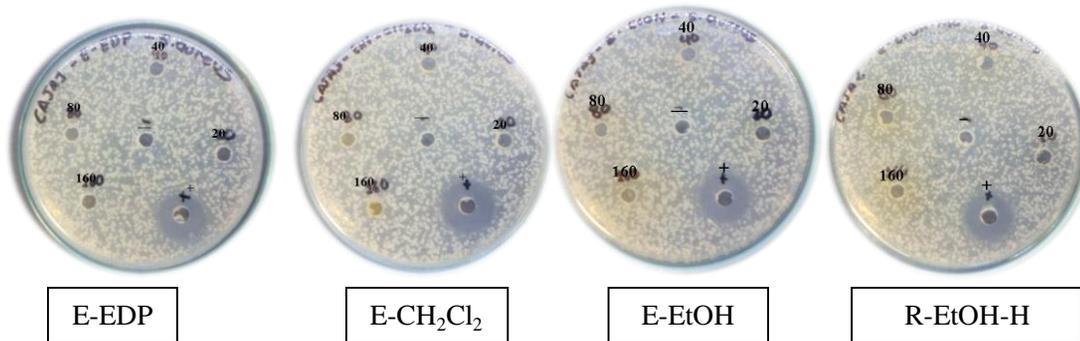


- *Candida albicans*: control (+) Anfotericina B (0,25;0,5;1,0  $\mu\text{g/mL}$ ); la concentración seleccionada fue 0,5  $\mu\text{g/mL}$

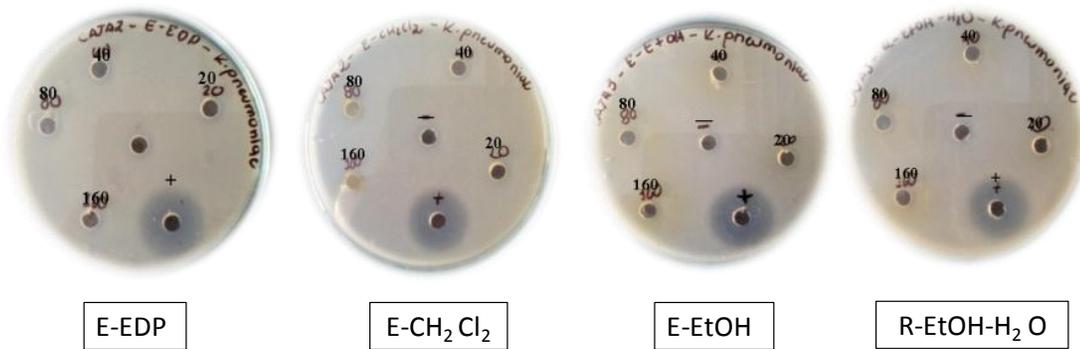


**Anexo H: Imágenes de la actividad antimicrobiana de la actividad antimicrobiana de los extractos y el residuo**

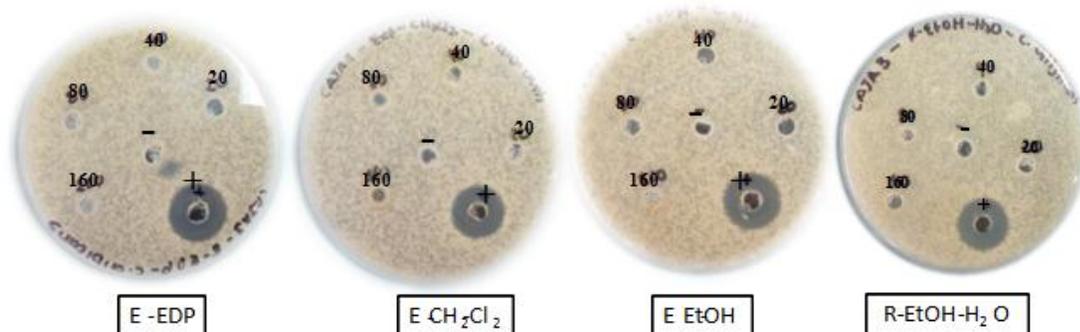
- *Staphylococcus aureus*:



- *Klebsiella pneumoniae*:



- *Candida albicans*:



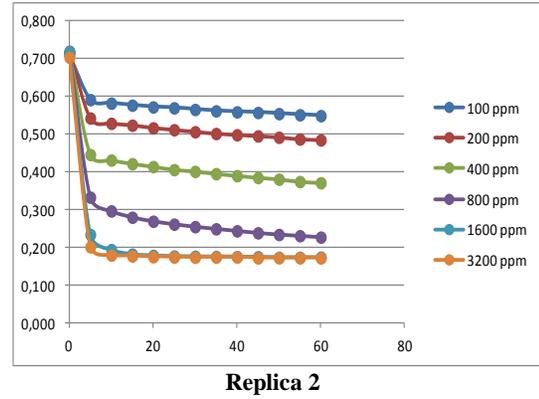
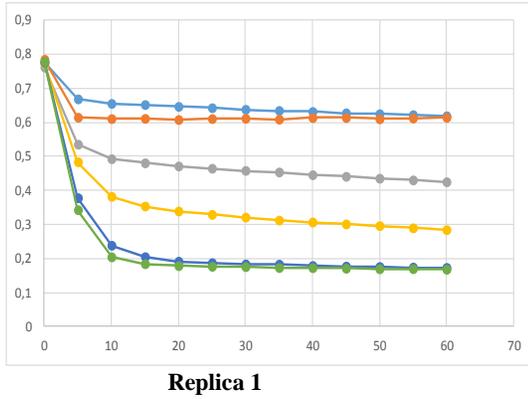
**Anexo I: Screening de la Capacidad Antioxidante a los extractos E-EDP, E-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, E-EtOH y el residuo R-EtOH-H<sub>2</sub>O**

TRATAMIENTOS	REPLICAS	Promedio% AOX a 3200 ppm			
		DPPH*		ABTS**	
		%AOX	s <sup>a</sup>	%AOX	s <sup>a</sup>
E-EDP	1	3,22	2,15	9,19	2,08
	2	3,71	0,6	9,19	2,08
E-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1	12,45	1,42	50,01	4,79
	2	15,46	0,75	47,10	4,63
E-EtOH	1	76,37	0,48	79,87	1,08
	2	74,73	1,59	80,98	0,78
R-EtOH-H <sub>2</sub> O	1	70,57	0,69	80,63	1,24
	2	70,61	0,33	81,70	1,03

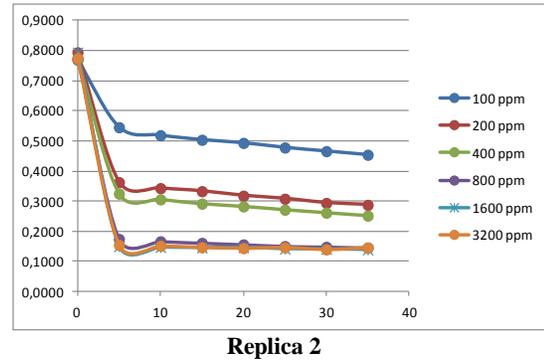
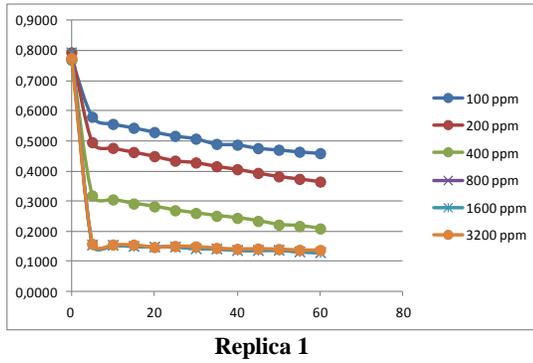
a. Desviación Estándar

## Anexo J: Determinación de la fase estacionaria en los extracto del E-EtOH y R-EtOH-H<sub>2</sub>O

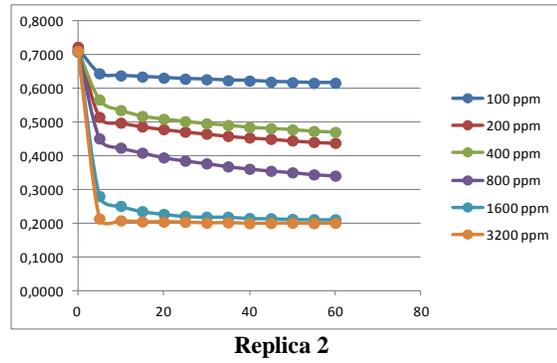
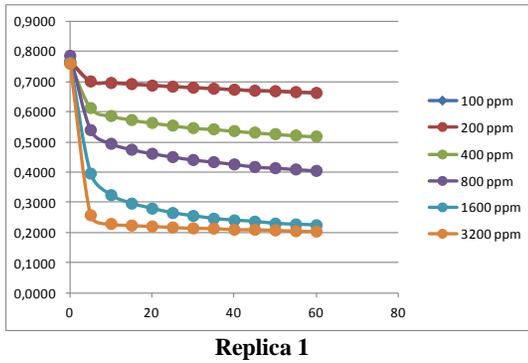
- E-EtOH-DPPH<sup>•</sup>**



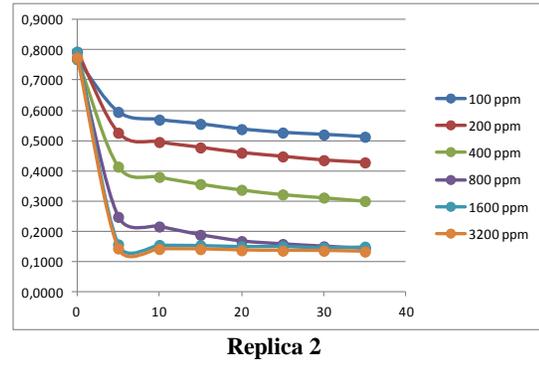
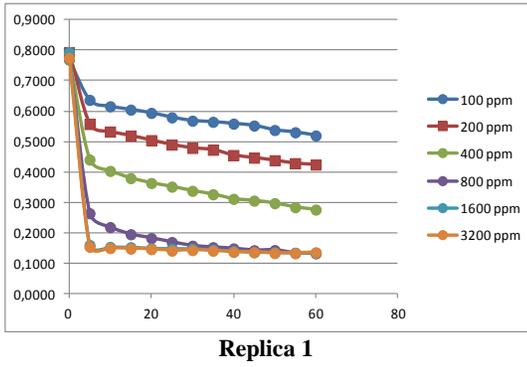
- E-EtOH- ABTS<sup>•+</sup>**



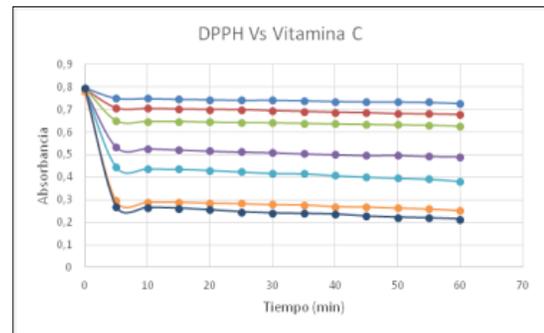
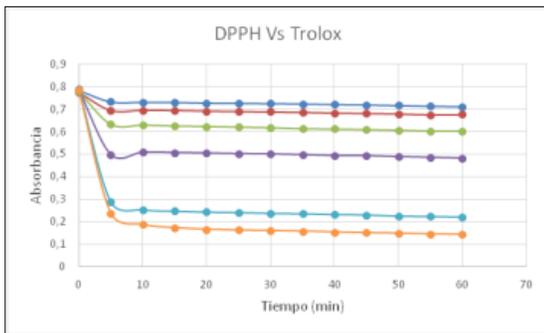
- R-EtOH-H<sub>2</sub>O- DPPH<sup>•</sup>**



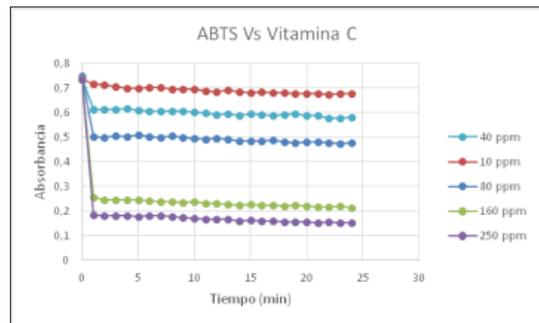
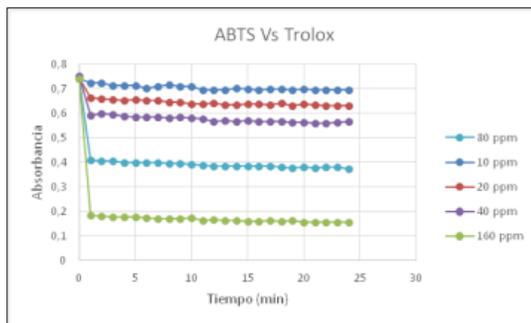
- **R-EtOH-H<sub>2</sub>O- ABTS<sup>+</sup>**



- **Controles TROLOX y VITAMINA C- DPPH<sup>•</sup>**



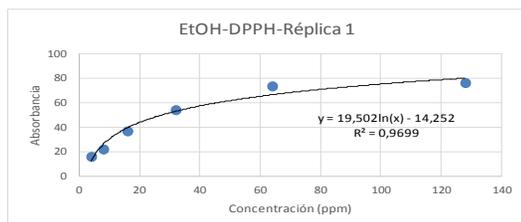
- **Controles TROLOX y VITAMINA C- ABTS<sup>+</sup>**



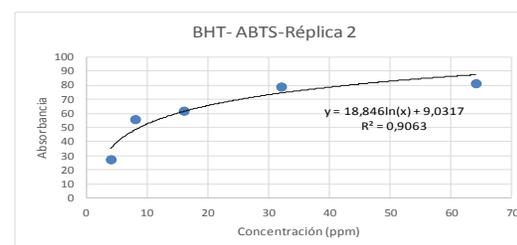
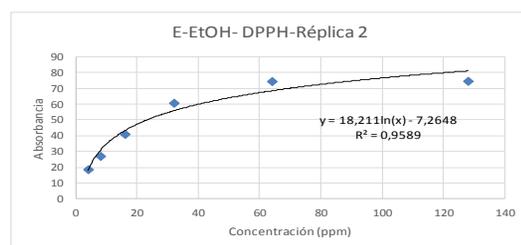
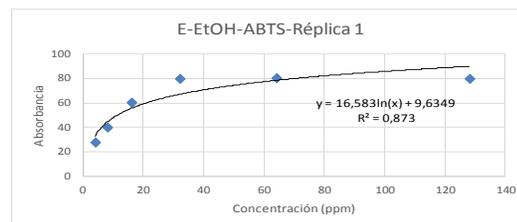
## Anexo K: Promedio de los %AOX Vs. Concentración para determinar CE<sub>50</sub>

- E-EtOH

**DPPH<sup>•</sup>**

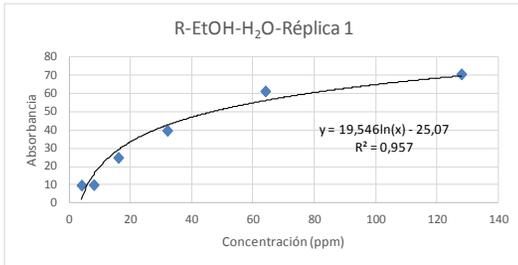


**ABTS<sup>+•</sup>**

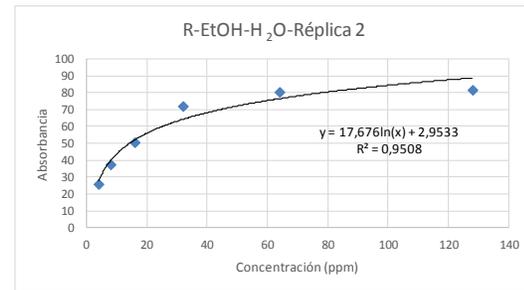
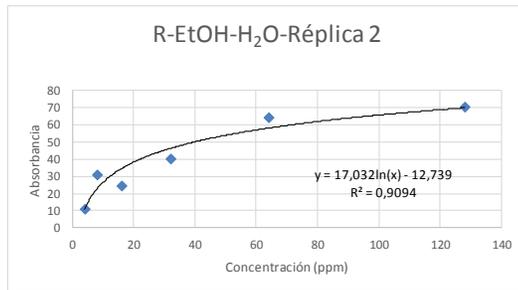
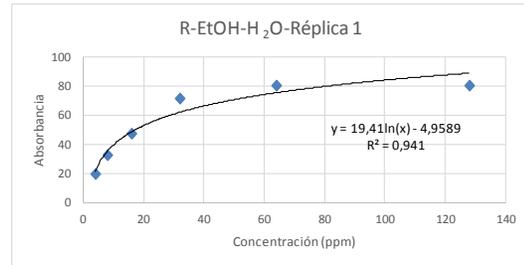


- **R-EtOH-H<sub>2</sub>O**

**DPPH<sup>•</sup>**

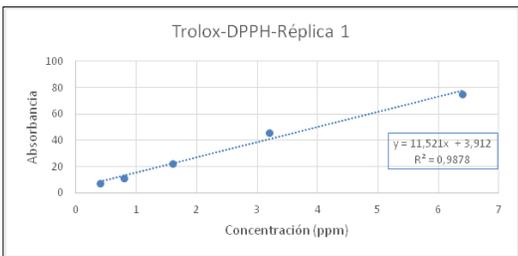


**ABTS<sup>+•</sup>**

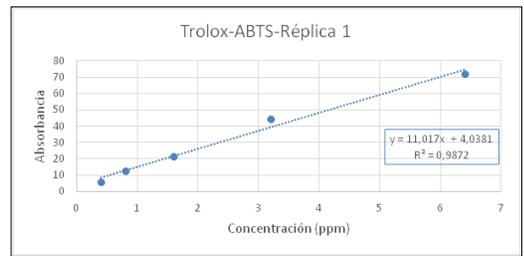


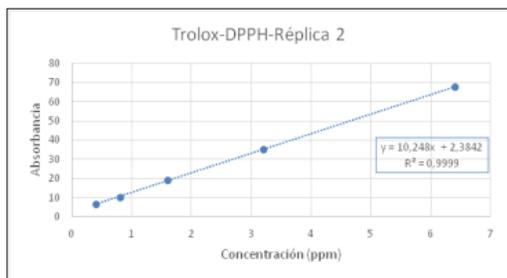
- **Control TROLOX**

**DPPH<sup>•</sup>**



**ABTS<sup>+•</sup>**

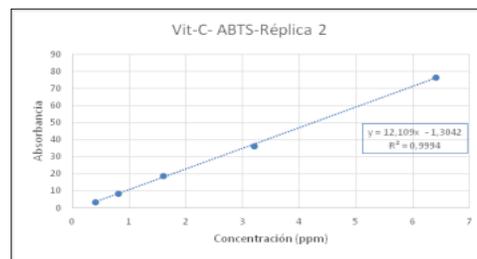
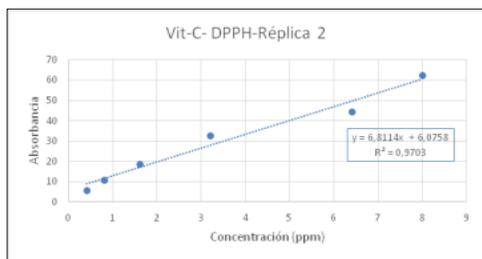
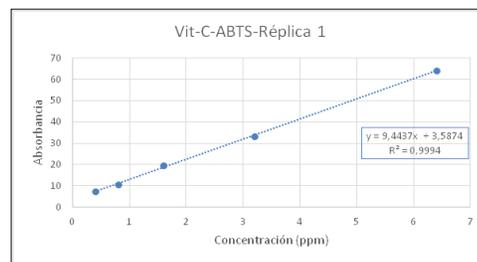
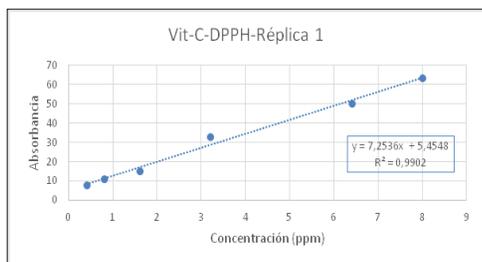




• Control VITAMINA C

**DPPH<sup>•</sup>**

**ABTS<sup>•+</sup>**



**Anexo L: Determinación de los CE<sub>50</sub> para el E-EtOH y el R-EtOH-H<sub>2</sub>O**

<b>DPPH-DETERMINACIÓN CE<sub>50</sub> R-EtOH-H<sub>2</sub>O</b>					
TRATAMIENTOS	Replica 1	Replica2	promedio	DS	CV
E-EtOH	24	22	23	1,41	6,15
R-EtOH-H <sub>2</sub> O	44	36	40	5,66	14,14
Trolox	4	4,6	4,3	0,42	9,87
Vitamina C	6,1	6,4	6,25	0,21	3,39
<b>ABTS-DETERMINACIÓN CE<sub>50</sub> R-EtOH-H<sub>2</sub>O</b>					
TRATAMIENTOS	Replica 1	Replica2	promedio	DS	CV
E-EtOH	11	8,1	9,55	2,05	21,47
R-EtOH-H <sub>2</sub> O	16,4	13	14,7	2,40	16,35
Trolox	4,1	3,9	4	0,14	3,54
Vitamina C	4,9	4,2	4,55	0,49	10,88

## Anexo I: Estadística descriptiva

- **Análisis Anova**

### Descriptives

CE50

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
E-EtOH	2	23,0000	1,41421	1,00000	10,2938	35,7062	22,00	24,00
R-EtOH-H2O	2	40,0000	5,65685	4,00000	-10,8248	90,8248	36,00	44,00
Trolox	2	4,3000	,42426	,30000	,4881	8,1119	4,00	4,60
Vitamina C	2	6,2500	,21213	,15000	4,3441	8,1559	6,10	6,40
Total	8	18,3875	15,59546	5,51383	5,3494	31,4256	4,00	44,00

### ANOVA

CE50

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1668,304	3	556,101	64,994	,001
Within Groups	34,225	4	8,556		
Total	1702,529	7			

## Post Hoc Tests

### Multiple Comparisons

CE50  
Tukey HSD

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
E-EtOH	R-EtOH-H2O	-17,0000 <sup>*</sup>	2,92511	,015	-28,9077	-5,0923
	Trolox	18,70000 <sup>*</sup>	2,92511	,011	6,7923	30,6077
	Vitamina C	16,75000 <sup>*</sup>	2,92511	,016	4,8423	28,6577
R-EtOH-H2O	E-EtOH	17,00000 <sup>*</sup>	2,92511	,015	5,0923	28,9077
	Trolox	35,70000 <sup>*</sup>	2,92511	,001	23,7923	47,6077
	Vitamina C	33,75000 <sup>*</sup>	2,92511	,001	21,8423	45,6577
Trolox	E-EtOH	-18,70000 <sup>*</sup>	2,92511	,011	-30,6077	-6,7923
	R-EtOH-H2O	-35,70000 <sup>*</sup>	2,92511	,001	-47,6077	-23,7923
	Vitamina C	-1,95000	2,92511	,905	-13,8577	9,9577
Vitamina C	E-EtOH	-16,75000 <sup>*</sup>	2,92511	,016	-28,6577	-4,8423
	R-EtOH-H2O	-33,75000 <sup>*</sup>	2,92511	,001	-45,6577	-21,8423
	Trolox	1,95000	2,92511	,905	-9,9577	13,8577

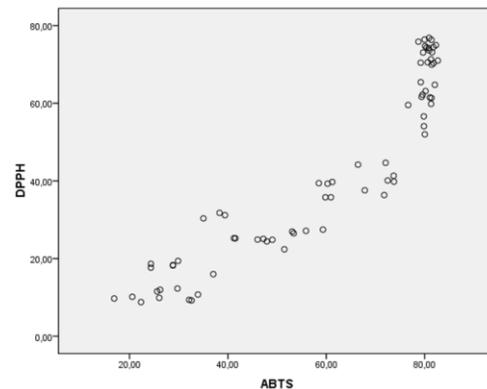
\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

- **Correlación de Pearson**

#### Correlations

		DPPH	ABTS
DPPH	Pearson Correlation	1	,928 <sup>**</sup>
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	72	72
ABTS	Pearson Correlation	,928 <sup>**</sup>	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	72	72

\*\* Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



**Diagrama de dispersión**

## BIBLIOGRAFIA

Allaoua, Z., Benkhaled, M., Dibi, A., Long, C., Aberkane, M. C., Bouzidi, S., ... & Haba, H. (2015). Chemical composition, antioxidant and antibacterial properties of *Pteranthus dichotomus* from Algerian Sahara. *Natural product research*, 1-5.

Angarita, A., Borrego, P. (2010). Fitoquímica de extractos y fracciones de la especie vegetal *Petiveria alliacea* L. y evaluación del efecto citotóxico sobre las líneas celulares tumorales K562, MCF-7, 4T.1 y A375. Bogotá, Colombia: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.

Bilbao, María del Rosario., (1997). Análisis Fitoquímico Preliminar química de los productos naturales. Quindío, Colombia: Universidad del Quindío.

Boniface, P., Verma, S., Shukla, A., Cheema, H., Srisvastava, S., Khan, F., Darokar, M., Pal, A. (2015). Bioactivity-guided isolation of antiplasmodial constituents from *Conyza sumatrensis* (Retz.) E.H Walker. *Parasitology International*, 64 (1), 118-123.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.

Burkart, A. 1969. Flora Ilustrada de Entre Ríos (Argentina). Colecc. Ci. Inst. Tecnol. Agropecu. 6 (2): 551 pp.

Camean, A., Repetto M., (2012). Toxicología alimentaría. Madrid, España: Díaz De Santos.

Chai, X., Su, Y. F., Guo, L. P., Wu, D., Zhang, J. F., Si, C. L., ... & Bae, Y. S. (2008). Phenolic constituents from *Conyza sumatrensis*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(3), 216-218

Chifa, C. R., Armando, I. A., Fernández, C., y Peña, S. (2004). Evaluación etnofarmacológica de plantas usadas popularmente por las comunidades del Chaco argentino. Presentación al VII Simposio Argentino y XI Simposio Latinoamericano de Farmacobotánica. Buenos Aires, Argentina.

Camacho Calero, D. 2004. Estudio del patrón espacial de dispersión de semillas de *Conyza bonariensis*, una mala hierba anemócora. Beca SEMh 2004. Universidad de Huelva.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(5), 749-760.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Third Informational Supplement (M-100 S23).

Csupor-Löffler, B. (2012). Activity-guided investigation of antiproliferative secondary metabolites of Asteraceae species. Universidad de Szeged, Hungría.

Cronquist, A. (1943). The separation of *Erigeron* from *Conyza*. Bull. Torrey Bot. Club 70: 629-632.

Cuatrecasas, J. (1969). Prima Flora Colombiana. Tomo 3o compositae Astereae. Bogotá, Colombia: Instituto Botánico de la Universidad.

Díaz, S., Correa A. Dos especies nuevas de *Conyza* (asteraceae, astereae) originarias de Colombia. Revista Academia Colombiana de Ciencias. 2001; 15(95): 179.

Domínguez, Xorge A. (1985). Métodos de Investigación Fitoquímica. México: Editorial Limusa.

Elías Obreque, S., Peña, A., López, R., Ramírez, C., Zamora, F. (2009). Phenolic Characterization of commercial enological tannins. *Eur. Food Res. Technol.*, 229: 859-866.

Fonnegra, R., Jiménez, S. (2007). Plantas Medicinales aprobadas en Colombia. Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.

Forbes, B., Sahm D., Weissfeld, A. (2004). Diagnóstico Microbiológico. Buenos Aires, Argentina: Editorial Medica Panamericana.

Frómata, S. S., Morán, J. E. M., Pacheco, A. O., & Tamayo, Y. V. (2013). *Petiveria alliacea* L.: distintas condiciones experimentales en la elaboración de extractos con actividad antimicrobiana. *Química Viva*, 12(3), 274-287.

Green, T. D. (2010). The ecology of fleabane (*Conyza* spp.) Doctoral dissertation, University of New England.

Hammouda F. M., Rizk A. M., Seif El-Nasr M. M., and El-Kady S. E. M. (1978), Phytochemical investigation of *Conyza dioscoridis* and *C. aegyptiaca*. *Fitoterapia* 49, 51 – 52.

Harborne, J., Baxter, H. (1999). The Handbook of Natural Flavonoids. Wiley

Hernández, M. (2014). Diterpenos *Ageratina vacciniaefolia*, *Conyza trihecatactis*, *Gnaphalium graveolens* y evaluación del efecto antiinflamatorio y citotóxico. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Hostettmann, K., Gupta, M., Marston, A., Ferreira, E. (2008). Manual de estrategias para aislamiento de productos naturales bioactivos. Bogotá, Colombia: CYTED-Convenio Andres Bello.

<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=315481>

Ismail, N., Akhtar, M. N., Ismail, M., Zareen, S., Shah, S. A. A., Lajis, N. H., & Tajuddin, S. N. (2015). Neuroprotective effect from stem bark extracts of *Knema laurina* against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-and A $\beta$ 1–42-induced cell death in human SH-SY5Y cells. *Natural product research*, 29(16), 1571-1574.

Instituto de Cooperación Iberoamericana- Instituto Colombiano de Cultura Hispanica. (1989). *Flora de la expedición Botánica del Nuevo Reino de Granada. Compuestas-Tribu Astereas tomo LXVII*. Madrid, España:Ediciones de cultura Hispanica.

Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., & Možina, S. S. (2010). Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods*, 81(2), 121-126.

Kpegba, K., Agbonon, A., Amouzou E., y Gbeassor., M. (2011). Effect of *Conyza aegyptiaca* on the frog semi isolated heart. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 01(07), 36-39.

Li, L., Tang, H., Wu, T., & Yu, C. Z. (2010). Chemical composition of *Sorbus tianschanica* leaves. *Chemistry of natural compounds*, 46(5), 811-812.

Lin, L. C., Pai, Y. F., & Tsai, T. H. (2015). Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(35), 7700-7706.

Mabrouk, S., Salah, K. B. H., Elaissi, A., Jlaiel, L., Jannet, H. B., Aouni, M., & Harzallah-Skhiri, F. (2013). Chemical composition and antimicrobial and allelopathic activity of Tunisian *Conyza sumatrensis* (Retz.) E. Walker essential oils. *Chemistry & biodiversity*, 10(2), 209-223.

Manzano Santana, P., Miranda, M., Gutiérrez, Y., García, G., Orellana, T., & Orellana-Manzano, A. (2011). Efecto antiinflamatorio y antimicótico del extracto alcohólico y composición química del aceite de hojas de *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (canilla de venado). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(1), 13-

Marcano, D., Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica Orgánica. Caracas, Venezuela: Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.

Markham, K. R.; Geiger, H. <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In *The Flavonoids – Advances in Research Since 1986*; Harborne, J. B., Ed.; Chapman and Hall: London, 1994; pp 441-499.

Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., & Culebras, J. M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17(n06).

Mata, R., Rojas, A., Acevedo, L., Estrada, S., Calzada, F., Rojas, I., ... & Linares, E. (1997). Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Conyza filaginoides*. *Planta medica*, 63(01), 31-35.

Mayulli, R. (1987). Contribución al estudio químico de *Conyza trihecatactis* (Blake) Cuatrecasas (Compositae-Asteraceae) y sus posibles efectos farmacológicos. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Nesom, G.L. (2000). Carolina del Norte, USA: Botanical Research Institute of Texas, 33.

Obón de Castro, C., Rivera, D. (1991). Las Plantas medicinales de nuestra Región. Madrid, España: Consejería de Cultura Educación y turismo.

Olivella, J., Panigo, E., Dellaferrera, I. M., Perreta, M. G., y UNL-CONICET, F. C. A (2015). Aspectos botânicos, ecofisiológicos e diferenciação de espécies do gênero *Conyza*. Recuperado de <http://www.hrac-br.com.br/wordpress/wp-content/uploads/2015/09/conyza-aspectos-botanicos.pdf>

Ozcan, M., Ayaz, F. A., Ozogul, Y., Glew, R., & Ozogul, F. (2016). Fatty acid composition of achenes of *Cirsium* taxa (Asteraceae, Carduoideae) from Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(3-4), 45-54.

Pérez Trueba, G. (2003). Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 22(1), 0-0.

Plitt, J. (2006). La flor y otros órganos derivados. Manizales, Colombia: Universidad de caldas

Ramírez, L. C., Castañeda, A. C., & Vargas, A. M. (2013). Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA*, 11(19).

Raven P., Evert, R., Eichhorn, S. (1992). Biología de las plantas volumen II. España : editorial Reverté.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Regehr, D.L. & Bazzaz, F.A. 1979. The population dynamics of *Erigeron canadensis*, a successional winter annual. *Journal of Ecology*, Oxford, v.67, n.3, p.923-933
- Rojas, A., Cruz, S., Rauch, V., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1995). Spasmolytic Potential of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine*, 2 (1), 51-55.
- San Feliciano, A., Perez, A., Del Olmo, E., Martínez, J., Pérez, C., Jiménez, C., Ravelo, A. (2008). Manual de determinación estructural de compuestos naturales. Bogotá, Colombia: CYTED-Convenio Andrés Bello.
- Shao, S., Yang, M. M., Bi, S. N., & Wan, Z. Q. (2012). Flavonoids of *Erigeron canadensis*. *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo zhongyao zazhi= China journal of Chinese materia medica*, 37(19), 2902-2905.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello. Bogotá, Colombia: Cooperación Iberoamericana CYTED.
- Soltana, H., Tekaya, M., Amri, Z., El-Gharbi, S., Nakbi, A., Harzallah, A., ... & Hammami, M. (2016). Characterization of fig achenes' oil of *Ficus carica* grown in Tunisia. *Food chemistry*, 196, 1125-1130.
- Takaishi, Y., Tokura, K., Noguchi, H., Nakano, K., Murakami, K., & Tomimatsu, T. (1991). Sesquiterpene esters from *Tripterygium wilfordii*. *Phytochemistry*, 30(5), 1561-1566.
- Thabit, R. A. S., Cheng, X. R., Tang, X., Sun, J., Shi, Y. H., & Le, G. W. (2015). Antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Conyza bonariensis* growing in Yemen. *Pak. J. Pharm. Sci*, 28(1), 129-134.
- Thebaud, C., Abbott, R.J. (1995). Characterization of invasive *Conyza* species (Asteraceae) in Europe: quantitative trait and isozyme analysis. *Amer. J. Bot.* 82:360-368.
- Torrenegra, R., Robles, J., Waibel, R., Löwel, M., & Achenbach, H. (1993). Diterpenes and diterpene xylosides from *Conyza trihecatactis*. *Phytochemistry*, 35(1), 195-199.
- Trueba, G. P., & Sanchez, G. M. (2001). Los flavonoides como antioxidantes naturales. *Acta Farm. Bonaerense*, 20(4), 297-306.
- Trujillo, S., Madrigal, B., (2005). Plantas Antimaláricas de Colombia Costa Pacífica colombiana. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

Universidad de Antioquia.(2008). Manual de prácticas de laboratorio de farmaconogía y fitoquímica 2008. Recuperado de [farmacia.udea.edu.co/~ff/manual2008.pdf](http://farmacia.udea.edu.co/~ff/manual2008.pdf)

Universidad de Antioquia. (2001). *Sesquiterpenlactonas*. Recuperado de: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>.

Valgas, C., Souza, S. M. D., Smânia, E. F., & Smânia Jr, A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.

Van der Horst, M. A., Hartog, A. F., El Morabet, R., Marais, A., Kircz, M., & Wever, R. (2015). Enzymatic Sulfation of Phenolic Hydroxy Groups of Various Plant Metabolites by an Arylsulfotransferase. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015(3), 534-541.

Vidal, R. A.; Kalsing, A.; Goulart, I. C. G. R.; Lamego, F. P. & Christoffoleti, P. J. 2007. Impacto da temperatura, irradiância e profundidade das sementes na emergência e germinação de *Conyza bonariensis* e *Conyza canadensis* resistentes ao glyphosate. *Planta daninha*, 25(2), 309-315.

Villagrán, C., Castro, V. (2003). *Ciencia indígena de los Andes del Norte de Chile*. Santiago de Chile, Chile: Editorial Universitaria.

Vrkoč, J., Ubik, K., & Sedmera, P. (1973). Phenolic extractives from the achenes of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry*, 12(8), 2062.

Wagner, H., Bladt, S. (1996). *Plant Drug analysis A Thin Layer Chromatography atlas*. München: Alemania: Springer.

Yan, M. M., Li, T. Y., Zhao, D. Q., Shao, S., & Bi, S. N. (2010). A new derivative of triterpene with anti-melanoma B16 activity from *Conyza canadensis*. *Chinese Chemical Letters*, 21(7), 834-837.

Zahoor, A., Siddiqui, I. N., Khan, A., Ahmad, V. U., Ahmed, A., Hassan, Z., ... & Iqbal, S. (2010). Two new glycosides from *Conyza bonariensis*. *Natural product communications*, 5(7), 1099-1102.

Zdero C., Ahmed A.A., Bohlmann F., Mungai, G.M. (1999). Diterpenes and sesquiterpenes xylosidos from East African *Conyzas* species. *Phytochemistry* 29:3167-3172.