

RÁPIDA PURIFICACIÓN POR HPLC DEL EXTRACTO ACUOSO FARMACOLÓGICAMENTE ACTIVO DE LAS PARTES AÉREAS DE *BACCHARIS TRIMERA* (LESS) DC

Mirtes Midori Tanae^a, Ingrid Elida Collantes Díaz^b, Antonio José Lapa^a

RESUMEN

La *Baccharis trimera* es una planta de uso tradicional muy diseminado por todo el continente Sudamericano y el modo de uso más común es por infusión, es por ello que se aplicó el mismo método para la obtención del extracto acuoso de las partes aéreas de la planta. El extracto acuoso fue liofilizado y sometido a análisis por HPLC analítico y semipreparativo, éste último con el objetivo de aislar e identificar la máxima cantidad de componentes químicos en 30 minutos. Fueron identificados un total de 13 compuestos en 9 fracciones (F2-F10) y la identificación fue realizada por análisis de sus espectros de RMN-¹H, RMN-¹³C y del espectro de masas por cromatografía líquida (CL) acoplado a espectrómetro de masas. Los metabolitos secundarios identificados en las fracciones fueron ácido 5-*O*-cafeoilquínico (F2), la mezcla de ácido 4-*O*-cafeoilquínico (F3-1) vicenina 2 (F3-2) e isocarlinosideo (F3-3), la mezcla de shaftosideo (F4-1) e isoshaftosideo (F4-2), ácido 3,5-*O*-dicafeoilshikímico (F5), ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico (F6), ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico (F7), la mezcla de guadichanolide B (F8-1) y el epímero de guadichanolide B (F8-2), 7 α -hidroxi-ent-cleroda-3-en-15,18-díacido-16,19-dilactona (F9) y eupatorina (F10).

Palabras clave: *Baccharis trimera*, ácido clorogénico, flavonoides, terpenos

RAPID HPLC PURIFICATION OF THE PHARMACOLOGICALLY ACTIVE AQUEOUS EXTRACT OF THE AERIAL PARTS OF *BACCHARIS TRIMERA* (LESS) DC

ABSTRACT

Baccharis trimera is a plant traditionally used throughout the South America. The most common use is by infusion, that is why the same method was applied to obtain the aqueous extract from the aerial parts of the plant. The aqueous extract thus obtained was freeze-dried and subjected to analytical and semi-preparative HPLC, the latter with the purpose of isolating and identifying the maximum number of chemical components in 30

^a Natural Products Section, Department of Pharmacology, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 04044-020 São Paulo, SP, Brazil

^b Facultad de Ingeniería Química y Textil, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú. icollantesd@uni.edu.pe

minutes. A total of 13 compounds were identified in 9 fractions (F2-F10) and the identification was performed by analysis of their NMR-¹H, NMR-¹³C spectra and the mass spectrum by liquid chromatography coupled to mass spectrometer. The secondary metabolites identified were: 5-*O*-caffeoylquinic acid (F2), the mixture of 4-*O*-caffeoylquinic acid (F3-1), vicenin 2 (F3-2) and isocarlinoside (F3-3), the mixture of shaftoside (F4-1) and isoshaftoside (F4-2), 3,5-*O*-dicafeoylshikimic acid (F5), 1,5-*O*-dicafeoylquinic acid (F6), 3,5-*O*-dicafeoylquinic acid (F7), the mixture of guadichanolide B (F8-1), epimer of guadichanolide B (F8-2), 7 α -hydroxy-ent-clerode-3-en-15,18-diacid-16,19-dilactone (F9) and eupatorin (F10).

Key words: *Baccharis trimer*a, chlorogenic acid, flavonoids, terpenes

INTRODUCCIÓN

*Baccharis trimer*a (Asteraceae) es una planta que ocurre en América del Sur, sus partes aéreas son muy usadas en medicina tradicional y es conocida por el nombre de carqueja¹. Una revisión amplia de la bibliografía como la de Rabelo et al 2018 muestra que las partes aéreas de *B. trimer*a son usadas popularmente para el tratamiento de malestares digestivos, infecciones genitourinarias, para adelgazar, para reducir el azúcar en sangre. Los estudios farmacológicos reportados, fueron sobre su actividad antioxidante, antiinflamatorio, protector gástrico, hepatoprotectivo, en la pérdida de peso, tripanosomicida, leishmanicida, antihelmíntica, antifúngica, antibacterial, antihemorrágica, antiviral, antiproliferativa y repelente. Debido a su amplio uso popular, los extractos acuosos, etanólico y tintura fueron sometidos a estudios sobre la toxicidad de *B. trimer*a, Rabelo et al 2018 reportaron que el uso a bajas concentraciones puede considerarse seguro, pero no por ello se puede usar indiscriminadamente ya que en algunos casos puede presentar toxicidad y mutagenicidad. La mayoría de los estudios fitoquímicos fueron realizados con las partes aéreas, los cuales reportan la presencia de flavonoides como agliconas y glicosilados (*O*-glicosilado y *C*-glicosilado), terpenos como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos, saponinas, ácidos fenólicos y ácidos clorogénicos².

En el presente trabajo, con la intención de identificar los metabolitos secundarios del extracto acuoso responsables de inducir hipotensión y el efecto gastrointestinal en animales no anestesiados^{3,4,5}, el extracto acuoso fue fraccionado por cromatógrafo líquido (HPLC) semipreparativo y fueron obtenidos 9 fracciones. Para la identificación, las fracciones fueron analizadas por resonancia magnética nuclear de hidrógeno y carbono 13, y el extracto acuoso fue analizado por cromatografía líquida acoplado a espectrómetro de masas. Fueron detectados ácido 5-*O*-cafeoilquínico (F2), la mezcla de ácido 4-*O*-cafeoilquínico (F3-1) vicenina 2 (F3-2) e isocarlinosideo (F3-3), la mezcla de shaftosideo (F4-1) e isoshaftosideo (F4-2), ácido 3,5-*O*-dicafeoilshikímico (F5), ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico (F6), ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico (F7), la mezcla de guadichanolide B (F8-1) epímero de guadichanolide B (F8-2), 7 α -hidroxi-ent-cleroda-3-en-15,18-diácido-16,19-dilactona (F9) y eupatorina (F10).

PARTE EXPERIMENTAL

Los solventes para el análisis por HPLC, ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo (ACN) fueron de grado HPLC, Merck; el agua ultrapura fue obtenido por desionizador Nanopure® y el liofilizador de la marca Edwards.

Preparación del extracto bruto

La *Baccharis trimera* fue cultivada en CPQBA-UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – Universidade Estadual de Campinas, Brasil). Tanto para los estudios farmacológicos como químicos fueron utilizadas las partes aéreas, secadas en una estufa a 40°C por 2 días y enseguida fue molida hasta obtener un tamaño de aproximadamente 1mm, el material seco y molido fue sometido a extracción con agua caliente (50 g/L, 72°C, 30 min), la infusión obtenida fue filtrada y el filtrado fue enfriado y congelado para ser sometido a liofilización y así obtener el extracto acuoso (EA). El EA fue sometido a análisis en HPLC analítico con la intención de tener la mayor cantidad de picos bien separados, para posteriormente ser fraccionado por HPLC semipreparativo.

Condición cromatográfica del HPLC Analítico

El EA fue diluido a la concentración de 1 mg/mL del cual fue inyectado 20 µL. Fueron usados como solventes A: agua ácida al 0,1% (TFA) y B: agua/acetonitrilo 75%, para la separación de los picos fue usado un gradiente de 5% B hasta 95% B en un periodo de tiempo de 30 minutos a un flujo de 0.8 mL/min (Figura 1).

El HPLC analítico (Shimadzu® - Japan) consistió en 2 bombas LC-20AT, con detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-10A), módulo de comunicación (CBM-20A) operando por el programa Lab solution, versión 1,24 SP1. La separación fue realizada en una columna Shimpack ODS (5 µm x 250 x 4,6 mm).

Condición cromatográfica del HPLC semipreparativo

Aproximadamente 3 g de EA fue fraccionado en el HPLC preparativo, cada inyección fue de 1 mL (100 mg/mL). Los solventes fueron A: agua ácida al 0,1% (TFA) y B: agua/acetonitrilo 75%, para la obtención de las fracciones fue usado un gradiente de 5% B hasta 95% B en un periodo de tiempo de 30 minutos a un flujo de 18 mL/min. Se obtuvo 10 fracciones y estas fueron sometidos a evaporación del ACN por rotaevaporador, la fase acuosa fue sometido a congelamiento para posteriormente ser sometidas a liofilización para la sublimación del agua.

El HPLC semipreparativo (Shimadzu® - Japan) consistió en 2 bombas (LC-8A), un detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-6A) operado a 220 nm, un controlador SCL-8A, un integrador CR-4A y un colector de fracciones FCV-100B. La separación fue realizada en una columna Shimpack-prep ODS (5 µm x 25 x 2 cm).

Los espectros de RMN-¹H y ¹³C fueron obtenidos en un espectrómetro Bruker DRX 500 operando a 500 MHz y 125 MHz respectivamente; los solventes fueron agua deuterada (D₂O), dimetilsulfóxido (*dms*-*d*₆) y cloroformo deuterado (CDCl₃) de la marca Merck. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (HPLC-MS/MS) del extracto acuoso: El sistema de HPLC consiste de 2 bombas (LC-10AVP), un detector espectrofotométrico UV-Vis (SPD-M10AVP) y controladora SCL-10AVP, las condiciones de análisis fueron A: agua ácida al 0,1% (ácido fórmico) y B:

agua/acetonitrilo 75%, fue usado un gradiente de 5% B hasta 95% B en un periodo de 30 minutos a un flujo de 1 mL/min, acoplado a espectrómetro de masas MAxis 3G - Bruker Daltonics, eluyendo con gradiente de solventes A: H₂O y B: H₂O/ACN 75%, de 5 a 95% de B en 30 min. Las condiciones del espectrómetro acoplado fueron: flujo 100 µL/min a 200°C, 8,0 L/min de gas y nebulizador a 2 bar y capilar a 4000 V.

Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas (CL-MS/MS) de la fracción 4 (F4): El sistema de HPLC (Shimadzu® - Japan) consiste de una controladora CBM-20A, 2 bombas (LC-20AD), un detector espectrofotométrico SPD-20A, horno CTO-20A a 25°C, a las condiciones cromatográfica de A: agua ácida al 0,1% (ácido fórmico) y B: agua/acetonitrilo 75%, fue usado un gradiente de 5% B hasta 60% B en 30 minutos a un flujo de 1 mL/min, columna Gemini C18 (5 µm x 250 x 4,6 mm) acoplado a espectrómetro de masas Bruker Daltonics Esquire 3000 plus, flujo 100 µL/min a 300°C, 9,0 L/min de gas y nebulizador a 27 psi y capilar a 4000 V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El extracto acuoso fue analizado en un HPLC analítico con la intención de determinar las condiciones cromatográficas para obtener la mejor separación entre los picos cromatográficos en poco tiempo (30 min) como se puede observar en la Figura 1.

Después de obtener las condiciones cromatográficas en el HPLC analítico, el método fue aplicado en un cromatógrafo HPLC semipreparativo y se procedió a la separación. Las 10 fracciones obtenidas por este cromatógrafo fueron sometidas a evaporación del acetonitrilo con rotaevaporador y el agua de la fracción fue removida por liofilización.

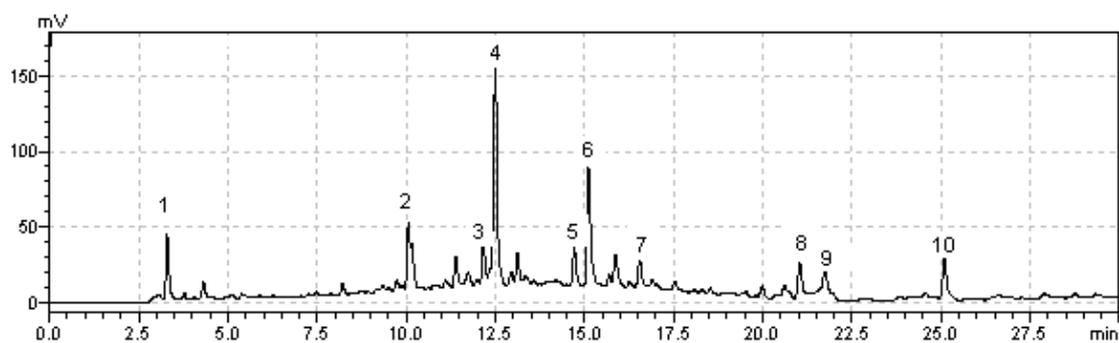


Figura 1.- Cromatograma del extracto acuoso de *Baccharis trimera* (AE) en HPLC (analítico).

A partir de la fracción 2 hasta la 10, cada fracción fueron sometidos a análisis por RMN-¹H y RMN-¹³C. El extracto acuoso fue analizado por cromatografía líquida acoplada a espectrómetro de masas de alta resolución. En la Figura 2 presentamos el cromatograma del pico base obtenido mediante HPLC-MS/MS. En el cromatograma se puede observar que las fracciones F2 y F3 están coeluyendo, así como también las fracciones F5 y F6 y eso se debe a que la columna utilizada para analizar el EA en el cromatógrafo analítico es diferente de la columna utilizada en el HPLC-MS/MS, ambas son de fase reversa, pero de diferentes marcas.

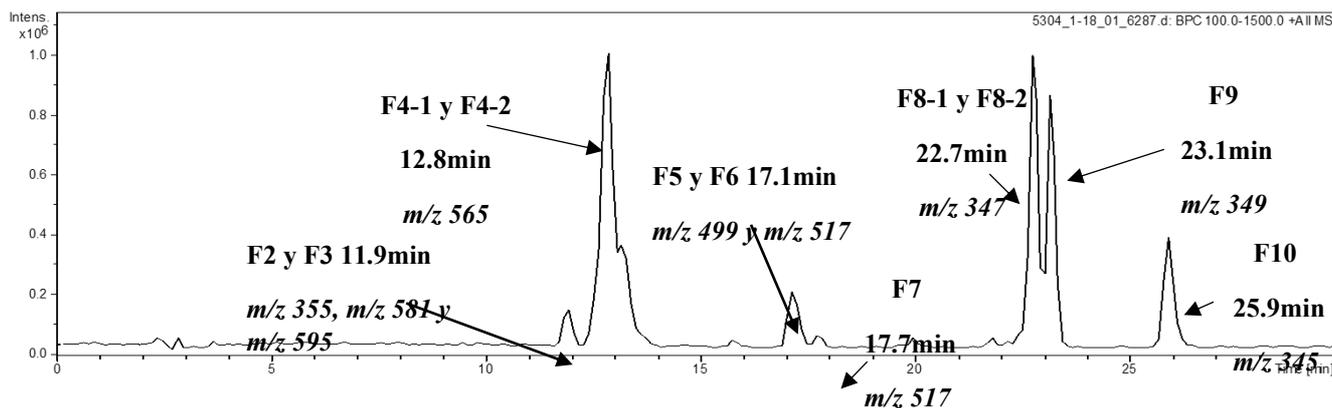


Figura 2.- Cromatograma de pico base obtenido por HPLC-MS/MS con la indicación de las fracciones obtenidas del fraccionamiento del extracto acuoso de *B. trimera*

Fracción 2 (F2) fue analizada por RMN-¹H y RMN-¹³C en D₂O, sus respectivos desplazamientos químicos están en las tablas 1 y 3, la comparación de estos con los reportados por la literatura^{6,7} confirmaron que se trataba del ácido 5-*O*-cafeoilquínico, también conocido con el nombre ácido clorogénico.

Fracción 3 (F3) fue analizada por RMN-¹H y RMN-¹³C en D₂O, sus desplazamientos químicos están en la tabla 1 y 3, la comparación de estos con los reportados por literatura confirmó que se trataba de una mezcla del ácido 4-*O*-cafeoilquínico también llamado de ácido criptoclorogénico (**F3-1**)⁸, también fueron identificados 6,8-Di-*C*-glucosilapigenina conocida como vicenina 2 (**F3-2**)⁹ y luteolina 6-*C*- α -arabinopiranosil-8-*C*- β -glucopiranosideo también llamada de isocarlinosideo (**F3-3**)¹⁰.

En la Figura 2 se aprecia el cromatograma de pico base obtenido del EA por HPLC-MS/MS en el que fue observado que las fracciones F2 y F3 coeluyen con tiempo de retención 11,9 min, a este tiempo se observó los iones moleculares con m/z 355, 1034, 581, 1528 y 595, 1678 [M+H]⁺ y sus fragmentos respectivos que son explicados como se generan cada uno de ellos en la tabla 5. Los espectros de masas de flavonoides *Di-C*-glucosilados presentan iones que son generados por las sucesivas pérdidas de agua y fragmentos producto de las quiebras intramoleculares de los azúcares, como las hexosas que presentan [M+H-120]⁺, [M+H-90]⁺, [M+H-134]⁺; las pentosas presentan [M+H-90]⁺, [M+H-60]⁺, [M+H-104]⁺, y otros fragmentos¹¹.

Fracción 4 (F4): El análisis del espectro de RMN-¹H y RMN-¹³C en *dms**o*-*d*₆, conllevan a que estamos tratando con una mezcla de flavonas *C*-glucosiladas y la comparación de sus desplazamientos químicos con los reportados por la referencia bibliográfica¹⁰, confirmaron que la mezcla era de schaftosideo (**F4-1**) e isoschaftosideo (**F4-2**) también llamados de apigenina 6-*C*- β -glucopiranosil-8-*C*- α -arabinopiranosideo y apigenina 6-*C*- α -arabinopiranosil-8-*C*- β -glucopiranosideo respectivamente. El espectro de masas (Tabla 5) presenta un ion molecular m/z 565, 429 [M+H]⁺ con tiempo de retención 12,8 min y el ion molecular m/z 565, 4391 [M+H]⁺ con tiempo de retención 13,4 min. La ausencia de los fragmentos [M+H-162]⁺, [M+H-146]⁺ y [M+H-(162+146)]⁺ en m/z 403, 419 y 257 sugiere que se trata de un flavonoide *C*-glucosilado como fue explicado en la **F3**.

Tabla 1.- Desplazamiento químico de los espectros de RMN-¹H (ppm, 500 MHz) de los compuestos F2, F3-1, F3-2, F3-3, F4-1 y F4-2

H	F2	F3-1	H	F3-2	F3-3	F4-1	H	F4-2
	D ₂ O			D ₂ O		DMSO- <i>d</i> ₆ sachafosideo		DMSO- <i>d</i> ₆ isosachafosid
2a	2,1 <i>m</i>	1,97-2,02 <i>m</i>	3	6,64 <i>s</i>	6,73 <i>s</i>	6,79 <i>s</i>	3	6,78 <i>s</i>
2e	2,1 <i>m</i>	1,97-2,02 <i>m</i>	2'	7,91 <i>d J</i> =8,5	7,45 <i>s</i>	8,02 <i>d J</i> =7,95	2'	7,97 <i>d J</i> =7,95
3	4,23 <i>d J</i> =4	4,24 <i>m</i>	3'	6,96 <i>d J</i> =8		6,91 <i>d J</i> =8,85	3'	6,91 <i>d J</i> =8,85
4	3,91 <i>m</i>	5,4 <i>m</i>	5'	6,96 <i>d J</i> =8	6,86 <i>d J</i> =8,5	6,91 <i>d J</i> =8,85	5'	6,91 <i>d J</i> =8,85
5	5,25 <i>ddd J</i> =9,8 8,5 4,5	4,24 <i>m</i>	6'	7,91 <i>d J</i> =8,5	7,46 <i>m</i>	8,02 <i>d J</i> =7,95	6'	7,97 <i>d J</i> =7,95
6a	2,1 <i>m</i>	1,97-2,02 <i>m</i>		6-C-β-glu	6-C-α-ara	6-C-β-glu		6-C-α-ara
6e	2,1 <i>m</i>	1,97-2,02 <i>m</i>	1''	5,52 <i>d J</i> =8	5,24 <i>d J</i> =4	4,69 <i>d J</i> =95	1''	4,58 <i>d J</i> =9,5
2''	7,07 <i>s</i>	7,17 <i>s</i>	2''	3,87 <i>m</i>	3,92 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	2''	3,23-3,90 <i>m</i>
5'	6,86 <i>d J</i> =8	6,82 <i>d J</i> =8	3''	3,31 <i>m</i>	3,47 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	3''	3,23-3,90 <i>m</i>
6'	6,99 <i>d J</i> =8	7,08 <i>d J</i> =8	4''	3,31 <i>m</i>	3,83 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	4''	3,23-3,90 <i>m</i>
7'	7,49 <i>d J</i> =15,5	7,58 <i>d J</i> =16	5''	3,3 <i>m</i>	3,63 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	5''a	3,23-3,90 <i>m</i>
8'	6,23 <i>d J</i> =16	6,38 <i>d J</i> =16	6''a	3,56 <i>m</i>	3,86 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	5''e	3,23-3,90 <i>m</i>
			6''e	3,7 <i>m</i>		3,23-3,90 <i>m</i>		8-C-β-glu
				8-C-β-glu	8-C-β-glu	8-C-α-ara	1'''	4,81 <i>d J</i> =9,5
			1'''	4,65 <i>d J</i> =9	4,45 <i>d J</i> =8	4,77 <i>d J</i> =9,5	2'''	3,23-3,90 <i>m</i>
			2'''	3,87 <i>m</i>	3,96 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	3'''	3,23-3,90 <i>m</i>
			3'''	3,38 <i>m</i>	3,64 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	4'''	3,23-3,90 <i>m</i>
			4'''	3,43 <i>m</i>	3,39 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	5'''	3,23-3,90 <i>m</i>
			5'''	3,32 <i>m</i>	3,32 <i>m</i>	3,23-3,90 <i>m</i>	6'''a	3,23-3,90 <i>m</i>
			6'''a	3,56 <i>m</i>	3,56 <i>m</i>		6'''e	3,23-3,90 <i>m</i>
			6'''e	3,76 <i>m</i>	3,8 <i>m</i>			
			OH5			13,82 <i>s</i>	OH5	13,66 <i>s</i>

multipléto (*m*), doblete (*d*), duploduplodoblete (*ddd*), singlete (*s*), constante de acoplamiento en Hz (*J*), glucosa (*glu*), arabinosa (*ara*)

Fración 5 (F5): Por análisis de sus desplazamientos químicos (tabla 2 y 4) de sus espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C en D₂O se propone que la muestra F5 es el ácido 3,5-*O*-dicafeoilshikimico auxiliados por las referencias^{12,13}, la confirmación de la estructura fue por análisis de su espectro de masas que presento un ion molecular en *m/z* 499,1254 [M+H]⁺ y sus fragmentos *m/z* 319,038 [M+H-180]⁺ que viene a ser la perdida de la molécula neutra del ácido cafeico, *m/z* 283,1679 [M+H-180-2H₂O]⁺ este fragmento se genera después de la perdida de la molécula neutra del ácido cafeico, molécula sufre una doble deshidratación; el fragmento *m/z* 163,0404 [M+H-ácido cafeoilshikímico]⁺ se generó por la pérdida de la molécula neutra del ácido cafeoilshikímico, después de la pérdida anterior el fragmento sufre una deshidratación generando *m/z* 145,0304 [M+H-ácido cafeoilshikímico-H₂O]⁺ y el fragmento en *m/z* 111,0455 [M+H-ácido cafeoilshikimico-H₂O-CO₂]⁺ es generado después de la perdida de la molécula neutra del ácido cafeoilshikímico, el fragmento sufre una descarboxilación^{14,15}.

Fración 6 (F6) fue analizada por RMN-¹H y RMN-¹³C en DMSO, sus desplazamientos químicos están en las tablas 2 y 4, la comparación de estos con los reportados por la referencia bibliográfica^{6,16} confirmaron que se trataba del ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico, también conocido con el nombre de cinarina. En el análisis del EA por HPLC-MS/MS fue observado que las fracciones F5 y F6 coeluyen con tiempo de retención 17,1 min, a este tiempo se observó los iones moleculares con *m/z* 499,1254 y 517,136 [M+H]⁺ y sus fragmentos respectivos que son explicados como se generan cada uno de ellos en la tabla 5. Se sugiere que el ion molecular *m/z* 499,1254 [M+H]⁺ le corresponde al ácido 3,5-*O*-

dicafeoilshikimico (F5)^{14,15} y el ion molecular m/z 517,136 $[M+H]^+$ le corresponde al ácido 1,5-*O*-dicafeoilquínico (F6)^{17,18}.

Fracción 7 (F7) fue analizada por RMN-¹H y RMN-¹³C en *dms*_o-*d*₆, sus desplazamientos químicos están en las tablas 2 y 4 respectivamente, la comparación de estos con los reportados por la literatura^{6,19} confirmaron que se trataba del ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico. Por el análisis del EA por HPLC-MS/MS fue observado que en el cromatogramas totales (Figura 2) la fracción 7 eluye a 17,7 min, a este tiempo de retención se observó el ion molecular m/z 517,136 $[M+H]^+$ y sus fragmentos respectivos que son explicados como se generan en la tabla 5. Se sugiere que el ion molecular que el ion molecular m/z 517,136 $[M+H]^+$ le corresponde al ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico (F7)^{17,18}.

Tabla 2.- Desplazamiento químico de los espectros de RMN-¹H (*ppm*, 500 MHz) de los compuestos F5, F6, F7, F9 y F10

H	F5 D ₂ O	H	F6 DMSO- <i>d</i> ₆	F7 DMSO- <i>d</i> ₆	H	F9 CDCl ₃	H	F10 CDCl ₃
2	3,73 <i>m</i>	2a	1,83-2,03 <i>m</i>	1,93-2,18 <i>m</i>	1	1,34 <i>m</i>	3	6,59 <i>s</i>
3	4,64 <i>m</i>	2e	1,83-2,03 <i>m</i>	1,93-2,18 <i>m</i>	2a	2,31 <i>m</i>	8	6,62 <i>s</i>
4	5,23 <i>m</i>	3	4,1 <i>m</i>	5,35 <i>m</i>	2e	2,15 <i>m</i>	2'	7,40 <i>d J</i> =2,4
5	4,15 <i>m</i>	4	3,72 <i>m</i>	3,84 <i>m</i>	3	6,72 <i>d J</i> =6,72	5'	6,97 <i>d J</i> =9
6a	1,97 <i>m</i>	5	5,4 <i>m</i>	5,19 <i>m</i>	6a	2,31 <i>m</i>	6'	7,46 <i>d J</i> =8,4
6e	2,1 <i>m</i>	6a	1,83-2,03 <i>m</i>	1,93-2,18 <i>m</i>	6e	1,65 <i>m</i>	6-OCH ₃	3,91 <i>s</i>
2'	6,91 <i>s</i>	6e	1,83-2,03 <i>m</i>	1,93-2,18 <i>m</i>	7	4,10 <i>m</i>	7-OCH ₃	3,99 <i>s</i>
5'	6,69 <i>m</i>	2'	7,01 <i>s</i>	7,05 <i>d J</i> =1,5	8	1,65 <i>m</i>	4'-OCH ₃	3,97 <i>s</i>
6'	6,80 <i>d J</i> =7,5	5'	6,76 <i>d J</i> =8	6,77 <i>d J</i> =8	10	1,65 <i>m</i>		
7'	7,5 <i>d J</i> =16	6'	6,92 <i>m</i>	6,98 <i>m</i>	11	1,34 <i>m</i>		
8'	6,21 <i>m</i>	7'	7,44 <i>d J</i> =16	7,47 <i>d J</i> =16	12	1,34 <i>m</i>		
2''	6,87 <i>s</i>	8'	6,22 <i>d J</i> =16	6,25 <i>d J</i> =16	13	2,49 <i>m</i>		
5''	6,62 <i>m</i>	2''	7,02	7,04 <i>d J</i> =2	14a	2,67 <i>m</i>		
6''	6,80 <i>d J</i> =7,5	5''	6,13 <i>d J</i> =8	6,76 <i>d J</i> =8	14e	2,15 <i>m</i>		
7''	7,39 <i>m</i>	6''	6,92 <i>m</i>	6,94 <i>m</i>	16	4,47 <i>dd J</i> =8,78 7,46		
8''	6,21 <i>m</i>	7''	7,43 <i>d J</i> =16	7,43 <i>d J</i> =16	17	1,04 <i>s</i>		
		8''	6,19 <i>d J</i> =16	6,16 <i>d J</i> =16	18	0,86 <i>s</i>		
					19a	5,3 <i>d J</i> =7,46		
					19e	3,93 <i>m</i>		
					20	-		

multiplete (*m*), doblete (*d*), duplodoblete (*dd*), singlete (*s*), constante de acoplamiento en Hz (*J*)

Fracción 8 (F8) fue analizada por RMN-¹³C en CDCl₃, sus desplazamientos químicos están en la tabla 4, la comparación de estos con los reportados por literatura confirmó que se trataba de una mezcla de diterpenos *ent*-clerodanos, gaudichanolida B (**F8-1**)²⁰ y su epímero en C8 (**F8-2**)²¹.

En el análisis del EA por HPLC-MS/MS (Tabla 5) fue observado que la fracción 8 eluye a 22,7 min, a este tiempo de retención se observó los iones moleculares m/z 693,3665 $[2M+H]^+$ y 347,1867 $[M+H]^+$ y sus fragmentos respectivos que son explicados como se originan en la tabla 5.

Tabla 3.- Desplazamiento químico de los espectros de RMN -¹³C (ppm, 125 MHz) de los compuestos F2, F3-1, F3-2, F3-3, F4-1, F4-2 y F10

C	F2	F3-1	C	F3-2	F3-3	F4-1	F4-2	F10
	D ₂ O			D ₂ O		DMSO-d ₆		CDCl ₃
1	74,76	75,89	2	164,5	163,8	163,71	163,79	164,38
2	36,37	39,75	3	101,18	102,23	102,27	102,49	103,25
3	71,34	66,40	4	182,31	182,31	182,08	182,15	182,52
4	70,53	74,51	5	159,52	159,55	160,39	160,39	153,08
5	69,11	69,63	6	109,8	109	108,48	108,21	131,9
6	36,48	34,97	7	162,5	164	161,8	161,19	158,59
7	176,85	177,79	8	104,6	104,6	103,98	104,6	90,63
1'	126,71	128,66	9	156	155,4	153,98	154,59	150,77
2'	114,99	115,36	10	102,23	101,18	103,24	103,19	110,89
3'	146,13	146,23	1'	121,5	119,8	121,25	121,35	123,22
4'	147,04	147,6	2'	128,69	114,84	128,99	128,95	105,44
5'	116,01	117,44	3'	115,7	144,04	115,94	115,94	146,25
6'	122,65	123,18	4'	160,6	146,97	159,35	158,6	151,2
7'	144,14	147,39	5'	115,7	115,12	115,94	115,94	112,48
8'	114,11	114,49	6'	128,69	121,2	128,99	128,95	118,64
9'	168,49	168,84		6-C-β-glu	6-C-α-ara	6-C-β-glu	6-C-α-ara	
			1''	74,09	73,64	73,29	74,18	
			2''	70,56	69,18	80,59	73,88	
			3''	78,63	73,19	78,78	70,96	
			4''	69,74	69,74	70,02	69,53	
			5''	80,66	70,9	81,2	68,46	
			6''	60,56		60,73		
				6-C-β-glu	8-C-β-glu	8-C-α-ara	8-C-β-glu	
			1'''	74,69	73,09	74,6	73,24	
			2'''	70,56	70,8	74,18	70,59	
			3'''	79	78,8	70,96	78,9	
			4'''	71,44	71,44	68,85	70,56	
			5'''	81	81	68,46	81,86	
			6'''	60,74	6,74		61,22	
			6-OCH ₃					60,35
			7-OCH ₃					55,88
			4'-OCH ₃					55,45

glucosa (glu), arabinosa (ara).

Fracción 9 (F9) fue analizada por RMN-¹H y RMN-¹³C en CDCl₃, sus desplazamientos químicos están en las tablas 2 y 4 respectivamente, la comparación de estos con los reportados por literatura confirmó que se trata de un diterpeno del tipo *ent*-clerodano²². En el análisis del EA por HPLC-MS/MS fue observado que por este análisis la fracción 9 eluye a 22,7 min, a este tiempo de retención se observó los iones moleculares *m/z* 697,3981 [2M+H]⁺ y 349,2027 [M+H]⁺ y sus fragmentos²³ respectivos que son explicados como se generan en la tabla 5.

Fracción 10 (F10) fue analizada por RMN-¹³C en CDCl₃, sus desplazamientos químicos están en la tabla 2, la comparación de estos con los reportados por literatura confirmó que se trataba del flavonoide eupatorina²⁴.

En el análisis del EA por HPLC-MS/MS fue observado que por este análisis la fracción 10 eluye a 25,9 min, a este tiempo de retención se observó el ion molecular *m/z* 345,0986 [M+H]⁺ y sus fragmentos²⁵.

Tabla 4. - Desplazamiento químico de los espectros de RMN -¹³C (ppm, 125 MHz) de los compuestos F5, F6, F7, F8-1, F8-2 y F9

C	F5	C	F6	F7	C	F8-2	F8-1	F9
	D ₂ O		DMSO			CDCl ₃		
1	77,73	1	76,86	73,36	1	20,9	20,39	19,59
2	65,02	2	35,61	35,68	2	27,62	27,36	27,31
3	72,73	3	68,43	70,61	3	135,12	137,1	135,09
4	77,11	4	72,78	69,81	4	134,97	136,14	137,92
5	70,53	5	70,8	71	5	44,98	48,01	44,76
6	36,67	6	39,5	34,7	6	48,94	50,54	40,26
7	182,22	7	175,76	175,35	7	210,88	209,06	72
1'	126,58	1'	125,49	125,77	8	52,39	51,39	40,26
2'	114,75	2'	114,78	114,89	9	40,53	43,6	38,18
3'	145,98	3'	145,63	145,69	10	45,79	47,75	48,9
4'	146,45	4'	148,48	148,51	11	35,48	35,73	36,61
5'	115,86	5'	115,81	115,94	12	26,53	26,86	26,33
6'	123,18	6'	121,54	121,59	13	36,18	35,88	35,95
7'	144,02	7'	145,37	145,31	14	34,16	34,55	34,41
8'	115,65	8'	114,01	115,68	15	176,89	176,54	176,98
9'	169,04	9'	166,06	166,24	16	72,64	73,1	73,23
1''	126,45	1''	125,58	125,69	17	9,18	7,8	11,87
2''	113,9	2''	114,71	114,79	18	169,83	167,94	169,34
3''	145,98	3''	145,63	145,69	19	72,7	71,09	72,67
4''	146,15	4''	148,39	148,39	20	24,46	19,01	19,13
5''	115,28	5''	115,81	115,88				
6''	123,1	6''	121,44	121,37				
7''	144,02	7''	145,19	144,94				
8''	115,65	8''	114,32	114,21				
9''	168,61	9''	165,91	165,69				

Tabla 5.- Compuestos identificados por HPLC-MS/MS del extracto acuoso de las partes aéreas de *Baccharis trimera*

Frac.	T. R. min	Sustancia Química	Fórmula	[M+H] ⁺ m/z	MS ² m/z	Referencias
F2	11,9	ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	355,1034	163,0401 [M+H-ácido químico] ⁺ , 135,045 [M+H-ácido químico-CO] ⁺	Clifford et al 2003
F3-1		ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico				
F3-2		Vicenina 2	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	595,1678	577,1787 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 559,1472 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 541,1391 [M+H-3H ₂ O] ⁺ , 523,1228 [M+H-4H ₂ O] ⁺ , 499,1232 [M+H-60-2H ₂ O] ⁺ , 457,1104 [M+H-120-H ₂ O] ⁺ , 439,1039 [M+H-120-2H ₂ O] ⁺ , 409,0929 [M+H-150-2H ₂ O] ⁺ , 391,0824 [M+H-150-3H ₂ O] ⁺ , 379,0823 [M+H-120-60-2H ₂ O] ⁺ , 355,0824 [M+H-120-120] ⁺ , 337,0717 [M+H-120-120-H ₂ O] ⁺ , 325,0727 [M+H-120-150] ⁺ , 307,0810 [M+H-120-150-H ₂ O] ⁺	
F3-3	Isocarlinosideo	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₅	581,1525	563,1322 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 545,1285 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 509,1171 [M+H-4H ₂ O] ⁺ , 461,0947 [M+H-120] ⁺ , 425,0877 [M+H-120-2H ₂ O] ⁺ , 395,0777 [M+H-150-2H ₂ O] ⁺ , 329,0633 [M+H-90-162] ⁺ , 311,0577 [M+H-120-162-H ₂ O] ⁺ , 285,2776 [M+H-90-162-CO ₂] ⁺	Li et al 1994	
F4-1	12,8	Schaftosideo	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₄	565,4290	529,1359 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 511,1254 [M+H-3H ₂ O] ⁺ , 493,1147 [M+H-4H ₂ O] ⁺ , 445 [M+H-120] ⁺ , 427,1024 [M+H-120-H ₂ O] ⁺ , 409,0932 [M+H-120-2H ₂ O] ⁺ , 391,0826 [M+H-120-3H ₂ O] ⁺ , 379,0833 [M+H-120-30-2H ₂ O] ⁺ , 355 [M+H-90-120] ⁺ , 325,0721 [M+H-120-120] ⁺	
F4-2	13,4	Isoschaftosideo		565,4391	547,1423 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 529,1347 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 511,1238 [M+H-3H ₂ O] ⁺ , 493,1156 [M+H-4H ₂ O] ⁺ , 475 [M+H-90] ⁺ , 445,0985 [M+H-120] ⁺ , 427,1026 [M+H-120-H ₂ O] ⁺ , 409,0933 [M+H-120-2H ₂ O] ⁺ , 391,0828 [M+H-120-3H ₂ O] ⁺ , 379,0831 [M+H-120-30-2H ₂ O] ⁺ , 325,0723 [M+H-120-120] ⁺	
F5	17,1	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilshikímico	C ₂₅ H ₂₂ O ₁₁	499,1254	319,038 [M+H-180] ⁺ , 283,1679 [M+H-180-2H ₂ O] ⁺ , 163,0404 [M+H-ácido cafeoilshikímico] ⁺ , 145,0304 [M+H-ácido cafeoilshikímico-H ₂ O] ⁺ , 111,0455 [M+H-ácido cafeoilshikímico-H ₂ O-CO ₂] ⁺	Jaiswal et al 2010, 2011
F6		Ácido 1,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517,136	163,0403 [M+H-ácido cafeoilquínico] ⁺ , 145,0303 [M+H-ácido cafeoilquínico-H ₂ O] ⁺	Clifford et al 2003, 2005
F7	17,7	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	517,136	163,0403 [M+H-ácido cafeoilquínico] ⁺ , 145,0303 [M+H-ácido cafeoilquínico-H ₂ O] ⁺	
F8	22,7	Gaudichanolida B; epímero de Gaudichanolida B	C ₂₀ H ₂₆ O ₅	347,1867	301,1809 [M+H-H ₂ O-CO] ⁺ , 283,1703 [M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺ , 255,1611 [M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O-CO] ⁺ , 199,134 [M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O-3CO] ⁺ , 183,1192 [M+H-H ₂ O-CO-H ₂ O-3CO-CH ₄] ⁺	Herz et al 1977
F9	23,1	7 α -hidroxi-ent-cleroda-3-en-15,18-díácido-16,19-dilactona	C ₂₀ H ₂₈ O ₅	349,2027	331,1927 [M+H-H ₂ O] ⁺ , 313,1807 [M+H-2H ₂ O] ⁺ , 295,1715 [M+H-3H ₂ O] ⁺ , 285,1843 [M+H-2H ₂ O-CO] ⁺ , 267,1683 [M+H-2H ₂ O-CO-H ₂ O] ⁺ ,	
F10	25,9	Eupatorina	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	345,0986	330,0748 [M+H-CH ₃] ⁺ , 312,0641 [M+H-CH ₃ -H ₂ O] ⁺ , 297,0412 [M+H-CH ₃ -H ₂ O-CH ₃] ⁺ , 284,0691 [M+H-CH ₃ -2H ₂ O] ⁺ , 269,0456 [M+H-CH ₃ -2H ₂ O-CH ₃] ⁺ , 241,0515 [M+H-CH ₃ -2H ₂ O-CH ₃ -H ₂ O] ⁺	Abu-Reidah et al 2019

CONCLUSIONES

El método presentado en este artículo es recomendable porque siguiendo este método fue posible la identificación de 13 compuestos, de los cuales 6 fueron aislados (F2, F5, F6, F7, F9 y F10), 7 fueron identificados en mezclas (F3-1, F3-2 y F3-3, F4-1 y F4-2, F8-1 y F8-2). La manera de obtener el extracto acuoso es el mismo método que se hace para el uso tradicional, ahora se sabe cuáles son los componentes químicos que se están injiriendo en una tasa de infusión de *Baccharis trimera*. En el presente trabajo se reporta por primera vez la incidencia de ácido 3,5-*O*-dicafeoilshikímico en *B. trimera*.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Dr. Pedro M. Magalhães del CPQBA – UNICAMP por la provisión de *Baccharis trimera*; también agradecen por el soporte financiero de FAPESP, CNPq y CAPES del Brasil.

REFERENCIAS

1. Paul EL, Lunardelli A, Caberlon E, de Oliveira CB, Santos RCV, Biolchi V, et al.. Anti-inflammatory and Immunomodulatory effects of *Baccharis trimera* Aqueous extract on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation in vitro. *Inflammation*. 2009; 32(6): 419 – 425.
2. Rabelo SAC, Costa CD. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. *Chem Biol Interact*. 2018; 296: 65 – 75.
3. Gamberini MT. Caracterização e mecanismos envolvidos na atividade cardiovascular do extrato aquoso e frações purificadas de *Baccharis trimera*, Less. [Tese de doutorado em Farmacologia]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 1996
4. Biondo TM, Tanae MM, Coletta ED, Lima-Landman MT, Lapa AJ, Souccar C. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extract and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. *J Ethnopharmacol*. 2011; 136(2): 368-73.
5. Garcia FA, Tanae MM, Torres LM, Lapa AJ, Lima-Landman MT, Souccar C. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less) DC. On the influx and mobilization of intracellular calcium in rato cardiomyocytes. *Phytomed*. 2014; 21(8-9):1021-5.
6. Tolonen A, Joutsamo T, Mattlla S, Kamarainen T, Jalonen J. Identification of isomeric dicaffeoylquinic acids from *Eleutherococcus senticosus* using HPLC-ESI/TOF/MS and ¹H-NMR methods. *Phytochem Anal*. 2002;13: 316-328.
7. Naidu MM, Sulochanamma G, Sampathu SR, Srinivas P. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffe. *Food Chem*. 2008; 107: 377-384.
8. Liu H, Zhang X, Wu C, Wu H, Guo P, Xu X. Anti-hyperlipidemic caffeoylquinic acids from the fruits of *Pandanus tectorius* Soland. *JAppl Pharm Sci*. 2013; 3(8): 16 – 19.
9. Lu Y, Foo Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*. *Phytochem*. 2000; 55: 263 – 267.

10. Xie C, Veitch NC, Houghton PJ, Simmonds MSJ. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* Makino. *Chem Pharm Bull.* 2003; 51(10): 1204 – 1207.
11. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J Mass Spectrom.* 2004; 39: 1 – 15.
12. Thongphichai W, Pongkittiphon V, Laorpaksa A, Wiwatcharakornkul W, Sukrong S. Antimicrobial activity against foodborne pathogens and antioxidant activity of plant leaves traditionally used as food packaging. *Foods.* 2023; 12: 2409. doi: 10.3390/foods12122409.
13. Fukuota M. Chemical and toxicological studies on Bracken Fern, *Pteridium aquilinum* var. *latiusculum* VI. Isolation of 5-*O*-caffeoylshikimic acid as an antithiamine factor. *Chem Pharm Bull.* 1982; 30(9): 3219 – 3224.
14. Jaiswal R, Sovdat T, Vivian F, Kuhner N. Profiling and characterization by LC-MSⁿ of the chlorogenic acids and hydroxycinnamoylshikimate ester in maté (*Ilex paraguariensis*). *J Agric Food Chem.* 2010; 58: 5471 – 5484.
15. Jaiswal R, Deshpande S, Kuhner N. Profiling the chlorogenic acids of *Rudbeckia hirta*, *Helianthus tuberosus*, *Carlina acaulis* and *Symphyotrichum novae-angliae* leaves by LC-MSⁿ. *Phytochem Anal.* 2011; 22: 432 – 441.
16. Etemadi-Tajbakhsh N, Faramarzi M-A, Delnavazi M-R. 1,5-dicaffeoylquinic acid, an α -glucosidase inhibitor from the root of *Dorema ammoniacum* D. Don. *Res Pharm Sci.* 2020; 15(5): 429 – 436.
17. Clifford MN, Johnston KL, Knight S, Kuhnert N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *J Agric Food Chem.* 2003; 51: 2900 – 2911.
18. Clifford MN, Knight S, Kuhnert N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 3821 – 3832.
19. Lee HJ, Lee JY, Kim SM, Nho CW, Jung SH, Song D-G, Kim CY, Pan C-H. Inhibitory effects of dicaffeoylquinic acids from *Artemisia dubia* on aldo-keto reductase Family 1B10. *J Korean Soc Appl Biol Chem.* 2010; 53(6): 826 – 830.
20. Hayashi KI, Kanamori T, Yamazoe A, Yamada M, Nozaki H. Gaudichanolides A and B, clerodane diterpenes from *Baccharis gaudichaudiana*. *J Nat Prod.* 2005; 68, 1121 – 1124.
21. Dai J, Suttisri R, Bordas E, Soejarto DD, Kinghorn AD. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochem.* 1993; 34(4): 1087 – 1090.
22. Kuroyanagi M, Fujita K, Kazaoka M, Matsumoto S, Ueno A, Fukushima S, Katsuoka M. Studies on the constituents of *Baccharis genistelloides*. *Chem Pharm Bull.* 1985; 33(11): 5975 – 5978.
23. Herz W, Pilotti A-M, Söderholm A-C, Shuhama IK, Vichnewski W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *J Org Chem.* 1977; 42(24): 3913 – 3917.
24. Gurer F, Demir S, Ozturk SB, Karaalp C. Secondary metabolites of endemic *Centaurea aphrodisea* Boiss. *J Fac Pharm Ankara.* 2024; 48(1): 1 – 7.
25. Abu-Reidah IM, Arráez-Roman D, Al-Nuri M, Warad I, Segura-Carretero A. Untargeted metabolite profiling and phytochemical analysis of *Micromeria fruticosa* L. (Lamiaceae) leaves. *Food Chem.* 2019; 279: 128 – 143.
26. Li QM, Claeys M. Characterization and differentiation of diglycosyl flavonoids by positive ion fast atom bombardment and tandem mass spectrometry. *Biol Mass Spectrom.* 1994; 23: 406 – 416.