



# Fitoquímica de *Baccharis* spp. L. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

Tesis presentada como requisito para aspirar al título de  
Doctor en Química

**Qco. Manuel Minteguiaga**



**Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales  
Laboratorio de Biotecnología de Aromas  
Facultad de Química. Universidad de la República (UdelaR)  
Montevideo, Uruguay**

**Laboratório de Operações Unitárias. Faculdade de Engenharia  
Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)  
Porto Alegre, Brasil**

Director de Tesis: Prof. Dr. Eduardo Dellacassa (FQ-UdelaR)  
Co-Director de Tesis: Prof. Dr. Eduardo Cassel (FENG-PUCRS)  
Directora Académica: Profa. Dra. Laura Fariña (FQ-UdelaR)

**Montevideo, 2019**



À Lê

Todos caminhos se encontram para a gente se ver

Todos caminhos se encontram para a gente se achar...



- *“Descubrimos que aprender las cosas equivale a verlas interiormente tal cual son...”*  
**Confesiones. San Agustín de Hipona (354-430 D.C.).**
  
- *“La teoría de la evolución en la vida de las plantas es mejor ilustrada por los constituyentes químicos que los vegetales sintetizan”.*  
**Helen Abbott Michael**



## the Analytical Scientist

### • (Top) Forna Fingerprints

In *Baccharis trimera*, a medicinal plant native to South America, irregular monoterpenes, such as carquejol and carquejol acetate, are considered chemical markers. Studying the species in Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza-Pro Mata in Brazil showed us that metabolism differences between the male and female specimens should be also considered.

Photo: Manuel Minteguiaga and Eduardo Dellacassa, Laboratorio de Biotecnología de Aromas. Facultad de Química, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.



### **Agradecimientos:**

Llegar a ésta instancia final no ha sido nada fácil. Como se suele decir “ha pasado mucha agua por debajo del puente”, o en una versión que tiene más que ver con ésta tesis “ha pasado mucha planta por el destilador”. En éste largo proceso he recibido el apoyo de muchas personas e instituciones para llevar a cabo éste estudio, y que me gustaría reconocer y agradecer en éste documento.

A mi director de tesis Prof. Eduardo Dellacassa. Gracias por ésta “terapia” que resultó en una gran aventura de descubrimiento y superación personal. Gracias también por la amistad y por el apoyo permanente a nivel académico, pero principalmente a nivel humano.

A mi co-director Prof. Eduardo Cassel. Gracias por recibirme en su laboratorio y hacerme sentir “como en casa” en Brasil.

A mi directora académica Profa. Laura Fariña. Gracias por la complicidad y el apoyo constante.

Al Prof. César Catalán. Gracias por recibirme en su laboratorio, y por las largas horas compartidas de aprendizaje analizando espectros.

A las Profas. Ana María Torres y Gabriela Ricciardi. Gracias por recibirme en su laboratorio y por la amistad en el desarrollo del trabajo.

A los organismos que me apoyaron económicamente (o a nivel de gestión) durante la realización de todas las fases de éste estudio: ANII, PEDECIBA, CAP-UdelaR, CSIC, IIBCE, INIA, CAPES, AUGM, PUCRS y UNT.

A todos los compañeros de las diferentes instituciones (pasadas y presente) que de alguna forma u otra me apoyaron en éste proceso.

A mis grandes amigos de todas las horas: Majo, Fátima, Marcos, Franco, Víctor, Mario, Andrés G. (“el botánico”), Andrés B., Andrés M., Matías y Quique. Gracias por prestarme su “oreja” y darme consejos tan valiosos.

A mi madre Marita y a mi hermano Mauro. Gracias por estar siempre y por el aliento para seguir.

A la memoria de mi padre Manuel. Gracias por confiar en mí inspirándome con tu ejemplo a ser mejor cada día.

A Felipe, Dorita y Cecilia. Gracias por tanto.

À minha esposa Aline. Obrigado por ser a minha companheira de viagem e minha fonte de inspiração. Por tantas horas de paciência e compreensão “quando tinha que escrever a tese”.

Por último y más importante, a Dios por darme la vida y permitirme llegar a concluir ésta etapa tan desafiante.

A todos, ¡¡¡ muchas gracias!!!

**Manuel Minteguiaga**

**Tacuarembó, Junio de 2019**



## Indice

	Página
Resumen .....	14
Abstract .....	15
<b>Capítulo 1. Introducción General</b>	
Resumen .....	17
Sección 1. Definiciones y antecedentes históricos en el empleo de plantas medicinales y aromáticas .....	18
1. Definición de plantas medicinales y aromáticas .....	18
2. Histórico del empleo de plantas medicinales y aromáticas .....	18
3. Empleo actual de las plantas medicinales y aromáticas .....	21
4. Empleo actual de productos naturales y aceites esenciales .....	22
5. Plantas medicinales y aromáticas en el Cono Sur Latinoamericano .....	25
Sección 2. Metabolismo secundario vegetal .....	28
1. Las plantas y su potencialidad química: metabolismo primario y secundario .....	28
2. El enfoque “ómico”: Metabolómica y Metabonomía .....	30
3. Metabolitos secundarios volátiles (MSVs): “moléculas mensajeras” .....	33
4. Biosíntesis de terpenos volátiles .....	35
5. Biosíntesis de compuestos volátiles no terpénicos .....	42
Sección 3. Antecedentes de <i>Baccharis</i> spp. L. ....	48
1. Botánica y taxonomía .....	48
2. Uso etnofarmacológico .....	50
3. Aspectos económicos y ambientales .....	51
4. Fitoquímica y actividad biológica .....	52
Bibliografía .....	60
<b>Capítulo 2. Objetivos</b>	
Objetivo general y objetivos específicos .....	66
<b>Capítulo 3. Métodos de extracción y análisis del volátiloma en plantas. El caso de <i>Baccharis uncinella</i> DC.</b>	
Resumen .....	68
<b>1. Introducción</b> .....	<b>68</b>
<b>1.1 Métodos de extracción de productos naturales volátiles</b> .....	<b>68</b>
<b>1.1.1 Destilación (SD)</b> .....	<b>70</b>
<b>1.1.2 Extracción-destilación simultánea (SDE)</b> .....	<b>74</b>
<b>1.1.3 Extracción con fluidos supercríticos (SFE)</b> .....	<b>76</b>
<b>1.2 Métodos de análisis químico del volátiloma</b> .....	<b>78</b>
<b>1.2.1 Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (GC-FID)</b> .....	<b>79</b>
<b>1.2.2 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)</b> .....	<b>81</b>
<b>1.2.3 Empleo de los índices de retención lineales (LRIs)</b> .....	<b>82</b>
<b>1.3 Análisis químico de la fracción no volátil</b> .....	<b>84</b>
<b>2. Materiales y Métodos</b> .....	<b>86</b>
<b>2.1 Colecta del material vegetal</b> .....	<b>86</b>
<b>2.2 Extracción del volátiloma</b> .....	<b>86</b>
<b>2.3 Análisis de compuestos volátiles</b> .....	<b>89</b>
<b>2.4 Análisis de compuestos no volátiles</b> .....	<b>90</b>



2.5 Tratamiento estadístico .....	91
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>91</b>
3.1 Rendimiento y curvas de extracción .....	91
3.2 Composición química volátil .....	94
3.3 Interpretación estadística .....	105
3.4 Composición química no volátil .....	108
<b>4. Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>110</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>111</b>

#### Capítulo 4. Quimiodiversidad volátil de *Baccharis* spp. L.

Resumen .....	114
---------------	-----

<b>1. Introducción .....</b>	<b>114</b>
Descripción botánica, etnofarmacológica y fitoquímica de las especies de <i>Baccharis</i> L. empleadas en éste estudio	
1.1 <i>Baccharis microdonta</i> DC. ....	115
1.2 <i>Baccharis linearifolia</i> subsp. <i>linearifolia</i> (Lam.) Pers. ....	116
1.3 <i>Baccharis cultrata</i> Baker .....	118
1.4 <i>Baccharis dentata</i> (Vell.) G.M. Barroso .....	119
1.5 <i>Baccharis dracunculifolia</i> subsp. <i>dracunculifolia</i> DC. ....	120
1.6 <i>Baccharis uncinella</i> DC. ....	122
1.7 <i>Baccharis spicata</i> (Lam.) Baill. ....	124
1.8 <i>Baccharis tridentata</i> Vahl. ....	126
1.9 <i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC. ....	128
1.10 <i>Baccharis crispa</i> Spreng. ....	131
1.11 <i>Baccharis milleflora</i> (Less.) DC. ....	133
1.12 <i>Baccharis phytumoides</i> (Less.) DC. ....	134
1.13 <i>Baccharis articulata</i> (Lam.) Pers. ....	136
1.14 <i>Baccharis palustris</i> Heering .....	138
1.15 <i>Baccharis genistifolia</i> DC. ....	139
1.16 <i>Baccharis punctulata</i> DC. ....	141
1.17 <i>Baccharis gibertii</i> Baker .....	142
1.18 <i>Baccharis gnaphalioides</i> Spreng. ....	143
1.19 <i>Baccharis ochracea</i> Spreng. ....	145
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>147</b>
2.1 Colecta del material vegetal .....	147
2.2 Extracción y análisis de los compuestos volátiles .....	152
2.3 Tratamiento estadístico .....	152
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>153</b>
3.1 Composición química del volátiloma de <i>Baccharis</i> spp. (Colecta No. 1) .....	153
3.2 Tratamiento quimiotaxonómico .....	166
3.3 Composición química del volátiloma de <i>Baccharis</i> spp. (Colecta No. 2) .....	173
3.4 Composición química del volátiloma de <i>Baccharis</i> spp. (Colecta No. 3) .....	196
<b>4. Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>212</b>
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>212</b>

#### Capítulo 5. Efecto del dioicismo sobre el metabolismo volátil de *Baccharis* spp. L.

Resumen .....	226
---------------	-----

<b>2. Introducción .....</b>	<b>226</b>
2.1 El fenómeno del dioicismo .....	226
2.2 Dioicismo desde el punto de vista químico .....	228
2.3 Estudios en <i>Baccharis</i> spp. L. ....	230
2.4 Odorantes y el sentido del olfato .....	232
2.5 Cromatografía gaseosa-olfatometría (GC-O) .....	235
2.6 Enantiómeros y cromatografía gaseosa enantioselectiva (eGC) .....	236
<b>3. Materiales y Métodos .....</b>	<b>239</b>
3.1 Colecta del material vegetal .....	239
3.2 Extracción de componentes del volátiloma .....	240
3.3 Análisis por GC-MS ( <i>B. articulata</i> y <i>B. tridentata</i> ) .....	240



3.4	Análisis por GC-O ( <i>B. articulata</i> ) .....	241
3.5	Análisis por GC-FID ( <i>B. tridentata</i> ) .....	242
3.6	Análisis por eGC-MS ( <i>B. tridentata</i> ) .....	243
3.7	Aislamiento de acetato de bornilo del aceite esencial de <i>B. tridentata</i> .....	244
3.8	Preparación de acetato de bornilo por acetilación de borneol patrón .....	244
3.9	Preparación de borneol por saponificación de acetato de bornilo natural .....	245
4.	<b>Resultados y Discusión</b> .....	<b>245</b>
4.1	Composición de los extractos volátiles de ambos sexos de <i>B. articulata</i> .....	245
4.2	Evaluación olfatométrica de los extractos volátiles de ambos sexos de <i>B. articulata</i> .....	255
4.3	Composición de los aceites esenciales de ambos sexos de <i>B. tridentata</i> .....	258
4.4	Distribución enantiomérica de monoterpenos en ambos sexos de <i>B. tridentata</i> .....	262
4.5	Análisis directo de acetato de bornilo natural por eGC-MS .....	265
4.6	Estrategia de análisis por semi-síntesis .....	268
4.7	Aislamiento de acetato de bornilo desde el aceite esencial de <i>B. tridentata</i> .....	268
4.8	Análisis por eGC-MS de los productos semi-sintéticos .....	269
5.	<b>Conclusiones y Perspectivas</b> .....	<b>272</b>
6.	<b>Bibliografía</b> .....	<b>273</b>

## Capítulo 6. Influencia de factores ambientales y fenológicos sobre el metabolismo volátil de *Baccharis* spp. L.

Resumen .....	278
1. Introducción .....	278
1.1 Factores ambientales, estrés y metabolismo secundario .....	278
1.1.1 Estacionalidad .....	281
1.1.2 Ritmo circadiano .....	281
1.1.3 Temperatura .....	282
1.1.4 Disponibilidad hídrica .....	283
1.1.5 Radiación ultravioleta .....	284
1.1.6 Nutrientes del suelo .....	284
1.1.7 Altitud .....	285
1.1.8 Contaminación atmosférica .....	286
1.1.9 Daño mecánico biótico y abiótico .....	286
1.2 Antecedentes en <i>Baccharis</i> spp. L. ....	287
2. Materiales y Métodos .....	288
2.1 Colecta del material vegetal .....	288
2.2 Datos pedoclimáticos .....	290
2.3 Preparación de las muestras .....	290
2.4 Análisis por GC-MS, GC-FID y eGC-MS .....	291
3. Resultados y Discusión .....	292
3.1 Apariencia general de las especies en el sitio de colecta .....	292
3.2 Monitoreo de variables pedoclimáticas a lo largo del período de estudio .....	294
3.3 Variación de la composición volátil de <i>B. dracunculifolia</i> .....	297
3.4 Diferencias sexuales en la emisión de <i>B. dracunculifolia</i> en floración .....	308
3.5 Variación de la composición volátil de <i>B. microdonta</i> .....	311
3.6 Análisis enantiomérico de los principales monoterpenos quirales de <i>B. dracunculifolia</i> y <i>B. microdonta</i> a lo largo del período de estudio .....	319
4. Conclusiones y Perspectivas .....	326
5. Bibliografía .....	327

## Capítulo 7. Evaluación biotípica y quimiotípica de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

Resumen .....	331
1. Introducción .....	331
1.1 Variación intraespecífica en plantas .....	331
1.2 Microscopía analítica e histoquímica .....	334
2. Materiales y Métodos .....	339
2.1 Material vegetal .....	339
2.2 Estudios morfo-anatómicos e histoquímicos .....	340





2.3	Extracción de aceites esenciales .....	341
2.4	Fraccionamiento del aceite esencial de la población de referencia .....	341
2.5	Análisis por GC-MS .....	342
2.6	Extracción y análisis de los componentes no volátiles .....	343
2.7	Tratamiento estadístico .....	344
3.	<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>345</b>
3.1	Observaciones a campo y apariencia general de la planta .....	345
3.2	Caracterización microscópica de la población de referencia .....	347
3.3	Composición volátil de las diferentes poblaciones de <i>B. trimera</i> estudiadas .....	355
3.4	Variación inter-poblacional en la composición volátil de <i>B. trimera</i> . Tratamiento estadístico .....	371
3.5	Composición química no volátil de la población de referencia .....	381
4.	<b>Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>384</b>
5.	<b>Bibliografía .....</b>	<b>385</b>

## Capítulo 8. Terpenos irregulares en *Baccharis* spp. L. y su importancia para propuestas semi-sintéticas originales. Estudio espectroscópico y computacional

Resumen .....	390	
1. <b>Introducción .....</b>	<b>390</b>	
1.1	Terpenos irregulares .....	390
1.2	Carquejol y sus derivados naturales .....	393
1.3	Semi-síntesis y obtención de derivados de carquejol .....	397
1.4	Propiedades biológicas del carquejol y sus derivados .....	403
1.5	Métodos espectroscópicos de análisis de productos orgánicos .....	404
1.6	Métodos computacionales para estudios de estructura molecular .....	405
2. <b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>406</b>	
2.1	Esquema general de semi-síntesis .....	406
2.2	Procedimientos instrumentales generales .....	406
2.3	Detalles computacionales .....	408
2.4	Obtención de acetato de carquejilo .....	409
2.5	Saponificación de acetato de carquejilo .....	410
2.6	Oxidación de carquejol a carquejona .....	412
2.7	Isomerización de carquejona a carquejifenol .....	415
2.8	Isomerización de carquejona a <i>iso</i> -carquejona y carquejifenol .....	416
2.9	Epoxidación de carquejol .....	418
3. <b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>420</b>	
3.1	Nomenclatura y numeración .....	420
3.2	Mecanismos involucrados en el esquema semi-sintético propuesto .....	422
3.3	Análisis computacional .....	431
3.4	Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN y $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY .....	447
3.5	Espectroscopía de $^{13}\text{C}$ -RMN, $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC y $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC .....	456
3.6	Espectrometría de MS .....	459
3.7	Espectroscopía de IR y Raman .....	471
3.8	Espectroscopía de UV .....	475
3.9	Espectroscopía de DC .....	478
4. <b>Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>479</b>	
5. <b>Bibliografía .....</b>	<b>479</b>	

## Capítulo 9. Relevancia de los compuestos poliacetilénicos en *Baccharis* spp. L.

Resumen .....	482	
1. <b>Introducción .....</b>	<b>482</b>	
1.1	Poliacetilenos naturales y su ocurrencia en <i>Baccharis</i> spp. ....	482
1.2	Biosíntesis de poliacetilenos en plantas .....	485
1.3	Bioactividad de poliacetilenos naturales .....	489
2. <b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>490</b>	
2.1	Esquema general de trabajo .....	490
2.2	Material vegetal .....	492
2.3	Extracción y análisis de la composición volátil de <i>Baccharis palustris</i> .....	492



2.4	Elucidación estructural .....	493
2.5	Aislamiento de (Z)-éster de lachnophyllum .....	493
<b>3.</b>	<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>495</b>
3.1	Espectroscopía de IR .....	495
3.2	Espectroscopía de UV .....	496
3.3	Espectroscopía de <sup>1</sup> H-RMN y <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY .....	499
3.4	Espectroscopía de <sup>13</sup> C-RMN .....	505
3.5	Espectrometría de MS .....	506
3.6	Espectrometría de MS-MS .....	513
3.7	Composición volátil de <i>B. palustris</i> por GC-MS .....	513
3.8	Aspectos biosintéticos .....	518
<b>4.</b>	<b>Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>519</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliografía .....</b>	<b>519</b>

**Capítulo 10. Actividad antiradicalaria y alexitérica de extractos de *Baccharis* spp. L. y compuestos de semi-síntesis.**

Resumen .....	521	
<b>1. Introducción .....</b>	<b>521</b>	
1.1	Actividad antioxidante y antiradicalaria .....	521
1.2	Método del DPPH para determinación de la actividad antiradicalaria .....	523
1.3	Ofidismo .....	526
1.4	<i>Bothrops</i> spp. (Serpentes:Viperidae) .....	527
1.5	Actividad alexitérica de productos naturales .....	528
1.6	Métodos <i>in-vitro</i> para la evaluación de la actividad alexitérica .....	529
<b>2. Materiales y Métodos .....</b>	<b>531</b>	
2.1	Material vegetal .....	531
2.2	Muestras adicionales .....	531
2.3	Extracción de los componentes volátiles .....	532
2.4	Extracción de los componentes fijos .....	533
2.5	Análisis por GC-MS .....	533
2.6	Actividad antiradicalaria .....	534
2.7	Actividad alexitérica .....	534
2.7.1	Veneno de <i>Bothrops</i> spp. ....	534
2.7.2	SDS-PAGE .....	535
2.7.3	Inhibición de la actividad proteolítica .....	538
2.7.4	Inhibición de la actividad hemolítica .....	539
2.7.5	Inhibición de la actividad coagulante .....	540
<b>3. Resultados y Discusión .....</b>	<b>541</b>	
3.1	Composición volátil de <i>Baccharis</i> spp. del nordeste argentino .....	541
3.2	Actividad antiradicalaria .....	544
3.2.1	Actividad de extractos de <i>Baccharis</i> spp. ....	544
3.2.2	Actividad de compuestos puros .....	552
3.3	Actividad alexitérica .....	554
3.3.1	Actividad de extractos de <i>Baccharis</i> spp. contra el veneno de <i>B. diporus</i> .....	554
3.3.2	Actividad de compuestos puros contra el veneno de <i>B. diporus</i> .....	565
3.3.3	Actividad contra el veneno de <i>B. alternatus</i> .....	570
<b>4. Conclusiones y Perspectivas .....</b>	<b>570</b>	
<b>5. Bibliografía .....</b>	<b>571</b>	

**Capítulo 11. Conclusiones finales.**

Conclusiones finales .....	574
----------------------------	-----

**Anexo**

Producción bibliográfica del presente Trabajo de Tesis .....	post-577
--	----------



Publicaciones (ver detalles bibliográficos en el anexo):

1. *FT-IR, FT-Raman, UV-Vis, NMR and structural studies of Carquejyl Acetate, a distinctive component of the essential oil from Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae).*
2. *Synthesis, spectroscopic characterization and structural study of 2-isopropenyl-3-methylphenol, carquejiphenol, a carquejol derivative with potential medicinal use.*
3. *Volatile constituents from Baccharis spp. L. (Asteraceae): Chemical support for the conservation of threatened species in Uruguay*
4. *Morphoanatomy and essential oil analysis of Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae) from Uruguay.*
5. *A structural and spectroscopic study on carquejol, an important constituent of the medicinal plant Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae).*
6. *Olfactometry evaluation and antimicrobial analysis of essential oils from Baccharis dentata (Vell.) G.M. Barroso and Baccharis uncinella DC.*
7. *Impact of gas chromatography-mass spectrometry combined with gas chromatography-olfactometry for the sex differentiation of Baccharis articulata by the analysis of volatile compounds.*
8. *Recent findings in the odorants chemistry from four Baccharis species and their impact as chemical markers.*
9. *¿Es el Acetato de Carquejilo un quimioindicador válido para las carquejas (Baccharis sect. Caulpoterae)?*

## Justificación

El presente Trabajo de Tesis, que se expone como requisito para aspirar al título de “Doctor en Química” de la Facultad de Química de la Universidad de la República (FQ-UdelaR, Montevideo, Uruguay) se ejecutó en el período Agosto 2011-Diciembre de 2016 (fase experimental), correspondiendo luego al período de redacción del presente documento y sus respectivos artículos científicos.

El trabajo experimental fue mayormente realizado en la Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales, y en el Laboratorio de Biotecnología de Aromas de FQ-UdelaR (bajo la dirección del Prof. Dr. Eduardo Dellacassa y la Profa. Dra. Laura Fariña), pero asimismo se realizaron diversas pasantías:

1. Laboratório de Operações Unitárias, Faculdade de Engenharia (LOPE-FENG). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS. Porto Alegre, Brasil). Períodos: Agosto 2011-Noviembre 2011 y Mayo 2014-Julio 2014. Dirección: Prof. Dr. Eduardo Cassel.
2. Instituto de Química Orgánica del Noroeste Argentino, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia (INQUINOA-FBQF). Universidad Nacional de Tucumán (UNT.



San Miguel de Tucumán, Argentina). Período: Abril 2016-Octubre 2016. Dirección: Prof. Dr. César A.N. Catalán.

3. Laboratorio de Productos Naturales “A.I.A. Ricciardi”, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (FaCENA). Universidad Nacional del Nordeste (UNNE. Corrientes, Argentina). Período: Noviembre 2016-Diciembre 2016. Dirección: Profa. Dra. Ana M. Torres y Profa. Dra. Gabriela A.L. Ricciardi.

El Plan de Trabajo de Posgrado fue aprobado por Resolución del Consejo de FQ-UdelaR con fecha 11/08/2011 (Exp. No. 101400-003130-11), y el mismo órgano universitario aprobó el día 06/03/2014 (Exp. No. 101400-006582-13) la continuación de los estudios en carácter de Doctorado. Dicha resolución fue tomada en base al informe del Tribunal evaluador que entendió en la Defensa Intermedia de ésta Tesis (18/12/2013), compuesto por el Prof. Dr. Eduardo Boido, Prof. Dr. David González y Profa. Dra. Graciela Mahler (todos pertenecientes a FQ-UdelaR).

Luego de entregado el presente documento, el Consejo de FQ-UdelaR con fecha 25/07/2019 (Exp. No. 101400-004351-19) resolvió designar al Prof. Dr. Eduardo Boido, Prof. Dr. Danilo Davyt (ambos de FQ-UdelaR) y Profa. Dra. Catalina van Baren (Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina) como integrantes del Tribunal para la Defensa de Tesis de Doctorado del candidato, la que finalmente se realizó el 29/10/2019. El dictamen del jurado se presenta a continuación.



PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS  
Ministerio de Educación y Cultura - Universidad de la República

Área Química

ACTA. En Montevideo a los veintinueve días del mes de octubre de 2019, se reúne en la Facultad de Química el Tribunal que entendió en la defensa de tesis de Doctorado en Química que postula el Qco. Manuel Minteguiaga, cuyo título es "Fitoquímica de *Baccharis* sp. L. (Asteraceae): metabolitos secundarios, semi-síntesis y bioactividad". Asisten todos sus integrantes: Dres. Catalina van Baren (Presidente del Tribunal), Danilo Davyt, Eduardo Boido así como Eduardo Cassel, Laura Fariña y Eduardo Dellacassa (Directores de tesis).

El Tribunal habiendo analizado la tesis en profundidad considera:

El trabajo presenta una exhaustiva recopilación de antecedentes bibliográficos.

El trabajo contempla aspectos del estudio quimitaxonómico del género *Baccharis* abordando distintas técnicas extractivas del volátiloma en forma comparativa, identificación de componentes, semisíntesis orgánica, bioactividad de los componentes y extractos, así como la utilización de una amplia gama de técnicas analíticas.

La tesis presentada demuestra una producción de alta calidad tanto en volumen como en resultados novedosos, con una exhaustiva discusión de los resultados y fundamentación de las metodologías utilizadas.

El trabajo desarrollado ha dado lugar a un número importante de publicaciones en revistas internacionales y congresos.

La presentación fue clara y logró resumir el extenso trabajo realizado, destacando los mas aspectos relevantes. Posteriormente respondió con amplia solidez las preguntas del Tribunal lo que indica la excelente formación alcanzada.

Por lo anterior, el tribunal le otorga la calificación de EXCELENTE.

Dra. Catalina van Baren

Dr. Danilo Davyt

Dr. Eduardo Boido

Dr. Eduardo Cassel

Dra. Laura Fariña

Dr. Eduardo Dellacassa

ÁREA QUÍMICA

Facultad de Química. Av. General Flores 2124, Montevideo 11800, URUGUAY

Teléfonos: (+598) 29242338 Fax: (+598) 29241906

copla fiel del  
original

PEDECIBA  
QUÍMICA



## Resumen

Las plantas medicinales y aromáticas (PAMs) han sido empleadas por las sociedades humanas desde sus inicios, y son el punto de partida para la investigación en productos naturales.

En ésta tesis se trabajó sobre la fitoquímica del género *Baccharis* L. (Asteraceae) como modelo de PAMs, colectando *in natura* 19 especies nativas de Uruguay, del sur de Brasil y del nordeste de Argentina: *B. articulata*, *B. crispa*, *B. cultrata*, *B. dentata*, *B. dracunculifolia*, *B. genistifolia*, *B. gibertii*, *B. gnaphalioides*, *B. linearifolia*, *B. microdonta*, *B. milleflora*, *B. ochracea*, *B. palustris*, *B. phyteumoides*, *B. punctulata*, *B. spicata*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella*. Para todas ellas se describió su composición química volátil (volatiloma) y se identificaron los principales metabolitos producidos por cromatografía gaseosa convencional y acoplada a espectrometría de masa (*GC-FID* y *GC-MS*). Para el estudio, se tomaron en cuenta diferentes variables que inciden directamente sobre la composición como: metodología de extracción (*B. uncinella*), origen geográfico de las poblaciones vegetales (*B. trimera*), estacionalidad (*B. dracunculifolia* y *B. microdonta*) y género de las plantas (masculino/femenino; *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia*, *B. linearifolia*, *B. spicata* y *B. tridentata*). En particular, sobre éste último aspecto se trabajó en caracterizar el perfil de emisión volátil de ambos sexos empleando para ello cromatografía gaseosa/olfatometría (*GC-O*) y cromatografía gaseosa enantioselectiva (*eGC*).

Para la especie *B. trimera* (“carqueja”) se realizó un detallado estudio de la composición del aceite esencial, fraccionando el mismo por cromatografía en columna (CC) y estudiando la composición de cada una de las fracciones por *GC-MS*. Adicionalmente, se realizó un estudio de las características morfoanatómicas e histoquímicas de una población de referencia de *B. trimera*, lo que permitió su caracterización biotípica. Desde el aceite esencial de ésta especie fue aislado por CC su compuesto mayoritario acetato de carquejilo, y mediante reacciones químicas específicas fueron obtenidos sus derivados semi-sintéticos: carquejol, carquejifenol, carquejona, *iso*-carquejona y óxido de carquejol (los últimos tres no reportados anteriormente en la bibliografía). En todos los casos los productos fueron caracterizados por medio de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN), infrarrojo (IR), ultravioleta (UV), dicroísmo circular (DC), Raman y espectrometría de masa (MS). También fue realizado un estudio de química computacional para predecir las propiedades moleculares del acetato de carquejilo, carquejol y carquejifenol, empleando la teoría del funcional de densidad (DFT).



Para la especie *B. palustris* fue determinado por diferentes técnicas espectroscópicas la presencia de poliacetilenos en su volatilo. Consecuentemente, fueron identificados los siguientes compuestos 1-nonen-3,5-diino, 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino, 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino y 3,5-nonadiino; así como los (*E*)/(*Z*) ésteres de lachnophyllum. Para los tres primeros compuestos es su primer reporte en la literatura como productos naturales.

Finalmente, se estudió la bioactividad de extractos y compuestos semi-sintéticos mediante técnicas *in-vitro*: antiradicalaria (metodología del *DPPH*) y neutralizante del veneno de serpientes del género *Bothrops* sp. (“yaras”) (actividad alexitérica). Los extractos de *B. dracunculifolia*, *B. punctulata* y *B. trimera* demostraron la mejor actividad de captura del *DPPH*, en tanto la carquejona y el (*Z*)-éster de lachnophyllum exhibieron los mejores resultados de neutralización de los venenos.

Los resultados de ésta tesis y sus correspondientes publicaciones demuestran la importancia del enfoque desarrollado en la búsqueda de metabolitos bioactivos provenientes de PAMs.

## Abstract

Medicinal and aromatic plants (MAPs) have been employed by human societies since the beginnings, and they are the starting point for the research on natural products.

In this thesis there was done a extensive study about the phytochemistry of the genus *Baccharis* L. (Asteraceae) as a model of MAPs, collecting *in natura* 19 species natives from Uruguay, Southern Brazil and Northeastern Argentina: *B. articulata*, *B. crispa*, *B. cultrata*, *B. dentata*, *B. dracunculifolia*, *B. genistifolia*, *B. gibertii*, *B. gnaphalioides*, *B. linearifolia*, *B. microdonta*, *B. milleflora*, *B. ochracea*, *B. palustris*, *B. phyteumoides*, *B. punctulata*, *B. spicata*, *B. tridentata*, *B. trimera* and *B. uncinella*. For all of them there were described their volatile chemical compositions (volatilomes) and were identified the main synthesized metabolites by means of conventional gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry (GC-FID and GC-MS). For this study there were took into account different variables which directly influence on the composition such as: methologies of extraction (*B. uncinella*), geographical origin of the vegetal populations (*B. trimera*), seasonality (*B. dracunculifolia* and *B. microdonta*) and gender of the plants (male/female; *B. articulata*, *B. crispa*, *B. dracunculifolia*, *B. linearifolia*, *B. spicata* y *B. tridentata*). In particular, on the



latter issue there was worked on the characterization of the emission volatile profile of both genders employing gas chromatography /olfatometry (GC-O) and enantioselective gas chromatography (eGC).

For the species *B. trimera* (“*carqueja*”) there was performed a detailed study on the composition of its essential oil, fractionating it through column chromatography (CC) and studying the composition of each fraction by GC-MS. In addition, there was conducted a study on the morphoanatomic and histochemical properties of a selected (reference) population of *B. trimera*, that allow to the biotype characterization. From the essential oil of this species it was isolated by CC its main compound carquejyl acetate, and through specific chemical reactions there were obtained its semi-synthetic derivatives: carquejol, carquejiphenol, carquejone, *iso*-carquejone and carquejol oxide (this last three not informed in the literature previously). In all cases, the products were chemically characterized by spectroscopic techniques: nuclear magnetic resonance (NMR), infrared (IR), ultraviolet (UV), circular dichroism (CD), Raman and mass spectrometry (MS). Furthermore there was applied the computational chemistry approach to predict the molecular properties of carquejyl acetate, carquejol and carquejiphenol through the density functional theory (DFT).

For the species *B. palustris* there was determined by different spectroscopic techniques the presence of polyacetylenic compounds in its volatilome. By thus, there were identified the following compounds: 1-nonen-3,5-diyne, 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diyne, 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diyne and 3,5-nonadiyne; as well as the (*E*)/(*Z*)-lachnophyllum esters. For the three first ones, this is the first report in the literature as natural products.

Finally, it was studied the bioactivity of extracts and semi-synthetic compounds through *in-vitro* methodologies: radical scavenger capacity (DPPH assay) and neutralizing activity of the *Bothrops* sp. (“*yaras*”) snake venom (alexiteric activity). The extracts obtained from *B. dracunculifolia*, *B. punctulata* and *B. trimera* demonstrated the best DPPH radical scavenger capacity, while carquejone and (*Z*)-lachnophyllum ester exhibited the best results regarding to the neutralization of snake venoms.

The results of this thesis and its corresponding publications show the importance of the followed approach in the search of bioactives metabolites from MAPs.





# Capítulo 1

## Introducción General

**Resumen:** Las plantas medicinales y aromáticas son el punto de partida en la investigación en productos naturales como disciplina científica, pero además, las mismas cuentan con variadas aplicaciones tecnológicas. Este capítulo introductorio al trabajo de Tesis se divide en tres grandes secciones:

- 1) definiciones y aspectos históricos del empleo de las plantas aromáticas y medicinales, y productos derivados;
- 2) metabolismo vegetal;
- 3) antecedentes del género *Baccharis* L. (Asteraceae) como modelo de investigación en productos naturales.

En la primera sección se ilustrará el papel histórico de la utilización de plantas medicinales y aromáticas, destacando el empleo de la etnobotánica como herramienta de compilación del saber tradicional. También se presentará información que confiere importancia específica a las plantas más comúnmente empleadas en el Cono Sur Latinoamericano.

En la segunda sección se definirán conceptos relacionados con la fisiología vegetal, como el metabolismo primario y secundario, y se ilustrarán las principales rutas de biosíntesis de metabolitos volátiles: terpénicos (vías del mevalonato y de la desoxi-xilulosa fosfato), y no terpénicos (vía del ácido shiquímico y rutas degradativas de compuestos de alto peso molecular).

Finalmente, en la tercera sección se establecerán antecedentes botánicos, fitoquímicos y etnomedicinales de *Baccharis* spp. L., que le confieren un rol destacado en la investigación en productos naturales.



## Sección 1. Definiciones y antecedentes históricos en el empleo de plantas medicinales y aromáticas.

### 1. Definición de plantas medicinales y aromáticas

Una planta medicinal se puede definir como aquella que contiene principios activos en alguno de sus órganos, los que pueden ser empleados con finalidad terapéutica, o que son precursores para la semi-síntesis con finalidad farmacológica (Cañigüeral *et al.*, 2003). Por su parte, una planta aromática es aquella que produce compuestos que exhiben olor de intensidad variable, que puede resultar más o menos agradable dependiendo del gusto personal de quién lo percibe (Bandoni, 2000; Dellacassa, 2010). Es importante resaltar que el hecho de que una determinada especie sea medicinal no implica que sea aromática, y lo mismo ocurre al contrario; aunque varios casos de las plantas más conocidas del Cono Sur comparten ambas características (Marchesi y Davies, 2004; Retta *et al.*, 2012). El uso de ambos tipos de plantas tiene lugar desde tiempos remotos pero fue recién en el siglo XIX que se comenzó con el abordaje científico para conocer los fundamentos de su utilización farmacológica y olfativa (Evans y Trease, 1991; Hórak, 2015).

### 2. Histórico del empleo de plantas medicinales y aromáticas

Desde los inicios mismos de la humanidad el hombre ha empleado las plantas que lo rodean para suplir sus necesidades básicas de alimentación y abrigo, para la cura de enfermedades y para el contacto espiritual con el “más allá”; contribuyendo al desarrollo cultural de las sociedades (Petrovska, 2012; Hórak, 2015). La elección de las mismas fue producto de ensayo y error, empleándolas instintivamente a lo largo de generaciones, lo que les confirió a cada especie diferentes indicaciones de uso tanto en el sentido positivo (*plantas útiles*) como en el sentido negativo (*plantas tóxicas*) (Petrovska, 2012; Hórak, 2015).

Se han encontrado fósiles humanos junto con restos de plantas medicinales desde el Paleolítico Medio, hace unos 60.000 años, lo cual demuestra la temprana importancia de las mismas en el desarrollo de nuestra especie (Fabricant y Farnsworth, 2001). El inicio de la escritura marcó un punto de inflexión en la eficacia de la transmisión del conocimiento de las plantas, sustituyendo a la comunicación oral y posibilitando una mayor y mejor diseminación de dicho conocimiento (Petrovska, 2012). El primer escrito referente a las plantas medicinales se encuentra en soporte arcilla con caracteres cuneiformes de la cultura Sumeria (aprox. 3000-2600 A.C.), en el que se detalla el uso de 250 plantas y extractos que se emplean



aún en la actualidad, como el aceite de cedro (*Cedrus sp.*, Pinaceae) y el jugo del opio (*Papaver somniferum*, Papaveraceae) (Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012). Casi simultáneamente, en el Lejano Oriente se produjo un uso extendido de las plantas: en China por medio del compendio *Pen-tsao Ching* atribuido al herbalista Sheng-Nun (aprox. 2800-2500 A.C.; figura mítica para algunos autores), y en India con los registros líricos sagrados de la tradición Ayurveda (*Rig-veda* y *Atharva-veda*, aprox. 2000-1700 A.C.), todos ellos con indicaciones de uso de más de 300 medicamentos herbales provenientes de la tradición oral (Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012).

Por otra parte, los egipcios fueron maestros en el empleo de plantas para diferentes usos, lo cual plasmaron en el llamado “papiro de Ebers” (aprox. 1600 A.C.), en el que se encuentran indicaciones de uso de unas 700 especies vegetales (Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012). Es interesante el hecho de que en Egipto el uso de las plantas se introdujo por su aroma, particularmente como perfumes que empleaban las damas de alta sociedad como elemento de belleza y distinción personal (Guentert, 2007). También se empleaban bálsamos, ungüentos e inciensos aromáticos como la mirra (resina exhudada de *Commiphora myrrha*, Burseraceae) y la resina de olíbano o franquinciense (obtenida de las especies arbóreas *Boswellia thurifera* o *Boswellia sacra*, Burseraceae) como parte de rituales y ceremonias religiosas, incluyendo la momificación (Guentert, 2007). Justamente fue en Egipto y en Persia donde se realizaron las primeras destilaciones para obtener aceites esenciales, aunque el legado de ese primigenio conocimiento es muy escaso y difuso (Forbes, 1970; Guenther, 1948; Pino, 2015). En tanto, en Fenicia (1500-300 A.C.), era muy común el empleo de colorantes de origen vegetal y animal (como el caso del famoso “Púrpura de Tiro” proveniente del caracol marino *Murex brandaris*), así como la existencia de herbarios de plantas medicinales (Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993).

En la época clásica, los filósofos y naturalistas griegos, Hipócrates (ca. 460-377 A.C.) y Teofrasto (ca. 371-287 A.C.), hicieron grandes aportes al conocimiento de las plantas medicinales y aromáticas; pero fue Dioscórides (40-90 D.C.) el que publicó la obra maestra “*De Materia Medica*” (con más de 600 especies vegetales registradas) que se convertiría en el manual de consulta farmacopeica durante el Imperio Romano, Edad Media y Renacimiento (Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012). Dioscórides reseñó el uso de varios aceites esenciales, particularmente el de trementina (esencia de varias especies de coníferas) que era muy valorizado en la época, aunque el mismo no se obtenía por destilación sino que se hacían maceraciones con aceites vegetales y grasas animales (técnica de “*enfleurage*”) (Guenther, 1948; Pino, 2015).



En la Edad Media, si bien no hubo grandes avances en el registro y uso de nuevas plantas medicinales y aromáticas, fue el tiempo dorado para la destilación de aceites esenciales (Guenther, 1948; Pino, 2015). Con la búsqueda de la “pureza”, de la “*quinta essentia*” (quinto elemento) y del “elíxir de la vida” se perfeccionaron los procesos de destilación, en un ambiente de Alquimia practicada por europeos y especialmente por árabes (Forbes, 1970; Guenther, 1948; Pino 2015). En dicho contexto, Avicena (980-1037) y Paracelso (1493-1541) fueron los autores más influyentes, siendo éste último el que acuñó el término “aceite esencial”, destacando la importancia de suministrar dosis correctas en los tratamientos terapéuticos con los mismos (Gurib-Fakim, 2006; Petrovska, 2012; Guenther, 1948; Pino, 2015). Es importante resaltar que en esa época las interpretaciones de la efectividad de las plantas y de sus aceites esenciales en la cura de enfermedades, era mayormente atribuida a razones mágicas y religiosas, donde los aromas en general ahuyentaban a los “malos espíritus” (Petrovska, 2012; Guenther, 1948; Ferreira *et al.*, 2014).

Los viajes de descubrimientos iniciaron una nueva etapa en el estudio de las plantas, ampliando notablemente la cantidad de especies conocidas en Europa. Es así que Marco Polo (1254-1324) en sus viajes por Persia y el Lejano Oriente, y Cristóbal Colón y sus sucesores en el descubrimiento de América (1492); llevaron consigo a Europa una cantidad considerable de plantas medicinales y aromáticas novedosas, que posibilitaron el surgimiento de los jardines botánicos para cultivar y estudiar las mismas (Petrovska, 2012). América aportó gran cantidad de especies y drogas vegetales (particularmente de las tradiciones culturales Azteca, Maya e Inca, entre ellas: cinchona, ipecacuana, cacao, maíz, papa, vainilla y tabaco) que proporcionaron un renovado auge a la ciencia alimentaria, la farmacia y la perfumería en Europa (Evans y Trease, 1991; Petrovska 2012). Carl Linneaus (1707-1788), padre de la Botánica moderna, en su obra “*Species Plantarum*” (1753) describió todas las especies conocidas hasta entonces, adjudicándoles como carácter identificativo un nombre binomial en Latín para género y especie, que se utiliza como nomenclatura científica hasta la actualidad (Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Gurib-Fakim, 2006; Kar, 2007; Petrovska 2012). En el siglo XIX comienza una nueva etapa en el conocimiento de las plantas medicinales y aromáticas, con el estudio de las sustancias activas que las componen. En tal sentido, se inició el aislamiento de productos naturales, como el de la morfina (1806), estricnina (1817) y quinina (1820), surgiendo el empleo farmacológico de los productos puros en lugar de las tradicionales infusiones, maceraciones o decocciones (Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Kar, 2007; Petrovska, 2012). En el terreno de la perfumería, el siglo XIX fue el inicio de una pujante industria, debido a que las esencias se comenzaron a preparar masivamente



para cuidado personal, siendo la pequeña ciudad de Grasse (Francia) la que se convirtió en el centro de las plantaciones de flores e hierbas para la incipiente industria (Guentert, 2007). El desarrollo de la Química Orgánica a lo largo de los siglos XIX y XX, particularmente de los métodos sintéticos (que permitieron obtener nuevos productos y/o sustituir aquellos cuya materia prima era escasa) y de las técnicas analíticas, instaló definitivamente el estudio químico de las plantas como una disciplina científica independiente de la Botánica (Kar, 2007; Petrovska, 2012). En dicho sentido, se consolidó el estudio de nuevas disciplinas surgidas de la Química Orgánica como la Farmacognosia, la Fitoquímica, la Química de Productos Naturales y la Bioquímica (Evans y Trease, 1991; Bruneton 1993).

### 3. Empleo actual de las plantas medicinales y aromáticas

En la actualidad, y luego de muchos años en los que la medicina/farmacia convencional y la perfumería se han valido de productos sintéticos para sus fines, se evidencia en todo el mundo un renovado interés por los productos naturales (Danishefsky, 2010; Pino, 2015). De ésta forma, medicamentos herbales han sustituido parcialmente, o complementado el uso de fármacos de síntesis, lo que ha relevado la importancia de tres nuevas disciplinas a nivel científico: la Fitoterapia, la Etnobotánica y la Etnofarmacología (Cañigual *et al.*, 2003; Hórak, 2015). La perfumería contemporánea ha adoptado el empleo de materiales botánicos (puros o en mezclas con materiales sintéticos) como sinónimo de distinción y de calidad, en la búsqueda de aromas innovadores (Corley, 2004; Pino, 2015).

La *Etnobotánica*, definida como el estudio científico de las relaciones entre los grupos humanos, su cultura y el entorno vegetal (Fabricant y Farnsworth, 2001; Hórak, 2015), permite identificar plantas medicinales presentes en la cultura de pueblos originarios que no son conocidas en los medios académicos (lo que se denomina propiamente *Etnofarmacología*). Constituyendo el paso inicial para el descubrimiento de nuevos principios farmacológicamente activos (Fabricant y Farnsworth, 2001; Hórak, 2015). Esto implica una mayor eficacia y eficiencia que el empleo de los enfoques de *screening* de plantas al azar y el uso de bibliotecas sintéticas obtenidas por Química Orgánica Combinatoria (Fabricant y Farnsworth, 2001). La valoración de tales conocimientos ancestrales es de suma importancia, en un contexto actual en el que de cada 10.000 moléculas (principalmente sintéticas) evaluadas por su bioactividad *in vitro*, 20 llegan a ser probadas en modelos animales, 10 son sometidas a ensayos clínicos y solamente 1 logra la aprobación para su venta



en el mercado farmacéutico; todo lo que insume un costo de más de 230 millones de dólares (Fabricant y Farnsworth, 2001).

La *Fitoterapia* es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica en la prevención, atenuación o cura de un estado patológico (Cañigueral *et al.*, 2003). La Fitoterapia desempeña un importante papel en la terapéutica moderna, ya que los medicamentos herbarios son generalmente empleados en la atención primaria a la salud, la gran mayoría de las veces sin supervisión médica (Fabricant y Farnsworth, 2001; Cañigueral *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2014). Uno de los factores claves para su uso es el bajo costo que implica la compra o colecta de una planta medicinal comparado con el precio relativamente elevado de los medicamentos de síntesis (Ferreira *et al.*, 2014). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en los países en vías de desarrollo de África, Asia y América Latina entre el 65% y el 80% de la población depende de la Fitoterapia para el cuidado y preservación de la salud (Fabricant y Farnsworth, 2001; Hórak, 2015).

También a nivel académico en los últimos veinte años ha surgido un interés por entender el rol que juegan los productos naturales de las plantas en las relaciones inter e intra-individuales de las especies que los producen, siendo por ello destacadas la Ecología Química y la Metabolómica, las que paulatinamente se han integrado con la Biología Molecular y la Biotecnología Vegetal (Schoonhoven *et al.*, 2005; Bergström, 2007; Kar, 2007; Hartmann, 2007).

#### 4. Empleo actual de productos naturales y aceites esenciales

Las plantas no sólo se pueden emplear *per se* para el tratamiento fitoterápico, sino que dan origen a variados productos naturales con un gran espectro de aplicaciones como fármacos, nutracéuticos y sustancias aromáticas medicinales, entre otras (Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Braz-Filho, 1994). De hecho, en la actualidad aproximadamente la mitad de los fármacos utilizados en el mundo contienen productos naturales o alguno de sus derivados como principios activos (Fabricant y Farnsworth, 2001; Simões Pires, 2004; Danishefsky, 2010). Además de las aplicaciones en la industria farmacéutica, los productos naturales también se emplean ampliamente en la industria de aromas y fragancias, textil, alimentaria y en la agricultura (Braz-Filho, 1994; Lubbe y Verpoorte, 2011; Ringuelet y Viña, 2013). Una de las aplicaciones más interesantes es la de constituir una fuente de sustancias para la *Química Fina* (por ejemplo, reactivos para síntesis orgánica), las que se caracterizan por tener



una pequeña demanda pero con un alto valor agregado, con precios de venta que pueden llegar a ser considerablemente elevados (**Franz, 1997; Danishefsky, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011**).

Para satisfacer las necesidades actuales de aplicación e industrialización de los productos naturales se deben implantar cultivos agrícolas, como aquellos que producen: aceites esenciales; drogas farmacéuticas; productos herbales para el cuidado de la salud; tintas y colorantes; y sustancias empleadas en protección vegetal de cultivos alimenticios (**Franz, 1997; Lubbe y Verpoorte, 2011**). La implantación de cultivos industriales tiene por objetivo independizar la extracción de los productos naturales de la fuente vegetal encontrada en la naturaleza, de manera de evitar su depredación (**Lubbe y Verpoorte, 2011**).

Los aceites esenciales, esencias o aceites volátiles (en cuanto productos derivados de plantas aromáticas) han sido desde siempre considerados productos “no tradicionales” por el volumen muchas veces escaso de la producción y demanda (**Bandoni, 2000; INIA, 2004; Dellacassa, 2010; Can Başer y Buchbauer, 2010**). En general dichos productos son líquidos volátiles, límpidos y poco coloreados (con tonos amarillos-pardos), solubles en lípidos y solventes orgánicos, con una densidad que puede ser mayor o menor que la del agua dependiendo de su composición (**Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Kar, 2007; Guenther, 1948**). En las plantas, los componentes de los aceites esenciales pueden ser sintetizados en prácticamente todos los órganos vegetativos y reproductivos (brotes, flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces, madera y corteza), lo que varía en función de cada una de las especies (**Guenther, 1948**). La biosíntesis y almacenamiento de tales mezclas se suele dar físicamente en estructuras secretoras llamados tricomas glandulares (ubicados sobre la epidermis del órgano productor) y en canales lisígenos y/o esquizógenos (estructuras modificadas del parénquima foliar) (ver capítulo 7) (**Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Franz, 1997; Lange y Turner, 2013a**).

La composición de un aceite esencial puede variar ampliamente debido a las técnicas de extracción, factores medioambientales bajo los cuales las plantas se desarrollan (régimen de precipitaciones y de vientos, heliofanía, estacionalidad, humedad, tipo de suelo y de relieve, interacciones bióticas, etc.); y a factores genéticos y fisiológicos intrínsecos (ciclo de vida, estado de desarrollo, existencia de variedades, división de sexos, etc.) (éstos temas se tratarán en detalle en los capítulos 3, 5, 6 y 7) (**Evans y Trease, 1991, Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). Incluso la variación en la composición se puede dar dentro de un mismo individuo, entre los diferentes órganos o hasta en el mismo órgano vegetal, por ejemplo en el caso de los aceites



de *Mentha* sp. cuya composición depende del grado de exposición a la radiación solar (**Lange y Turner, 2013a; Kapp, 2015**).

Químicamente, los aceites esenciales son mezclas complejas, constituidas por un número muy elevado (cientos) de componentes que en su conjunto generan el aroma que presenta dicha especie en la naturaleza, por lo que desde siempre han sido asociados a su aplicación en perfumería, como aromatizantes en la industria alimenticia y en tratamientos aromaterápicos (**Evans y Trease, 1991; Dewick, 2009; Can Başer y Buchbauer, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011**). Estas mezclas en general presentan múltiples efectos biológicos (bioactivos como antisépticos, antimicrobianos, analgésicos, antioxidantes, sedativos, anti-inflamatorios y espasmolíticos, pero también como mutágenos, fototóxicos y citotóxicos) (se tratará en el capítulo 4) (**Bakkali et al., 2008; Lubbe y Verpoorte, 2011; Saad et al., 2013**). También se les ha utilizado como solventes y componentes de detergentes para la industria química, como repelente de insectos molestos (principalmente mosquitos y moscas) y para aplicación contra plagas en cultivos agrícolas (**Guillij et al., 2008; Brud, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011; Lombardo et al., 2016**). Dichas propiedades dependen de la composición del aceite, por lo que conocerla detalladamente y establecer sus características fisicoquímicas y organolépticas son requisitos imprescindibles para establecer los criterios de aplicación (**Franz, 1997; Can Başer y Buchbauer, 2010, Dellacassa, 2010**).

A pesar de ser productos multifuncionales, el 90% de la producción mundial de aceites esenciales es destinado para la industria de aromas y fragancias, lo que representa un mercado de varios billones de euros (**Guentert, 2007; Brud, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011**). Los principales consumidores mundiales de aceites son: Estados Unidos, Francia, Alemania, Reino Unido y Japón, mientras que la participación de Sudamérica implica un pequeño porcentaje de dicho mercado (**Dellacassa et al., 2004; Guentert, 2007; Bovil, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011**). Actualmente se emplean unas 3000 plantas aromáticas para la extracción de sus aceites esenciales con fines comerciales alrededor del mundo, sin embargo sólo el 10% tienen significación económica, con un estimado de producción anual total de unas 110.000 toneladas de producto (**Dellacassa et al., 2004; Lubbe y Verpoorte, 2011**).

En dicho contexto, las esencias con mayor volumen de producción (mayor a 100 toneladas anuales) son: naranja (*Citrus sinensis*, *C. aurantium*), limón (*C. limon*), mandarina (*C. reticulata*), lima (*C. lima*), menta (*Mentha* sp.), eucalipto (*Eucalyptus globulus*, *E. citriodora*), citronela (*Cymbopogon winterianus*), clavo (*Syzygium aromaticum*), sazafrán (*Cinnamomum micranthum*), lavanda (*Lavandula* sp.), patchulí (*Pogostemon cablin*), anís estrellado (*Illicium verum*) y vetiver (*Vetiveria zizanioides*), entre otros (**Dellacassa et al.,**





2004; Brud, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011). El precio de los aceites en el mercado es altamente variable, siendo los cítricos y el eucalipto en general los más baratos (alrededor de 5 euros por kilo), mientras que el aceite de Rosa de Bulgaria (*Rosa damascena*) bajo cultivo orgánico se comercializa a aproximadamente 5.000 euros el kilo (Dellacassa *et al.*, 2004; Brud, 2010; Lubbe y Verpoorte, 2011).

## 5. Plantas medicinales y aromáticas en el Cono Sur Latinoamericano

En todo el Cono Sur Latinoamericano (Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay) existe un fuerte legado etnobotánico en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diferentes tipos de dolencias leves a moderadas, así como para uso ceremonial y decorativo. Tal conocimiento es proveniente de la cultura guaraní, principalmente transmitido por los indígenas en las reducciones jesuíticas y documentado tempranamente por los conquistadores europeos (de Montenegro, 1711; Martín y Valverde, 1995; Ricciardi y Chifa, 2015; Schripsema *et al.*, 2019). La nomenclatura nativa de las plantas en general tiene relación con sus propiedades medicinales, con las características morfológicas propias, o con observaciones que las comunidades originarias hicieron sobre el uso de las plantas por animales (*Zoofarmacognosia*) (Retta *et al.*, 2012; Hórak, 2015). Por ejemplo, en la etnobotánica guaraní la especie *Asclepias mellodora* (Asclepiadaceae) es llamada “*mboy-caá*” (“yerba dela víbora”) y se ha comprobado su actividad neutralizante del veneno de serpientes (Ricciardi y Chifa, 2015; Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2016).

Es importante destacar que al sustrato guaraní se le sumó el conocimiento herbario de los primeros habitantes europeos en América, los que encontraron en algunos casos plantas nativas parecidas a las que conocían del Viejo Continente y las adoptaron como medicinales (González *et al.*, 1993; Retta *et al.*, 2012; Schripsema *et al.*, 2019). Tal es el caso de la “marcela” (*Achyroclines satureioides*), que se asimiló con la “manzanilla alemana” o “camomila” (*Matricaria chamomilla*) de la tradición medicinal europea, teniendo ambas propiedades digestivas (Retta *et al.*, 2012). Otro ejemplo es la “carqueja” sudamericana (*Baccharis trimera*) a la que se dió el mismo nombre vulgar que a una especie medicinal europea (*Genista tridentata*) por la similitud anatómica de los tallos de ambas especies (Schripsema *et al.*, 2019).

Los recursos vegetales medicinales y aromáticos presentes en el Cono Sur (a los efectos de ésta tesis concretamente en Uruguay, el nordeste de Argentina y el sur de Brasil) son vastos debido al gran número de especies que crecen en dicha región y debido a la larga tradición de



uso mencionada anteriormente (Davyt *et al.*, 1991; González *et al.*, 1993; Alonso-Paz *et al.*, 2007; Mitra *et al.*, 2007; Barboza *et al.*, 2009; Bandoni y Dellacassa, 2010; Retta *et al.*, 2012).

Sin embargo, tanto en Argentina como en Uruguay, de los más de 5000 medicamentos que se dispensan como tratamiento médico, sólo el 3% se elaboran con drogas vegetales, y de ellos menos del 0,5% corresponden a especies nativas (Cañigüeral *et al.*, 2003; Dellacassa *et al.*, 2004). En contraste, es en los ambientes rurales donde se da un empleo casi exclusivo del recurso vegetal, mientras que en las grandes ciudades el empleo etnofarmacológico de plantas medicinales (muchas veces sin consulta médica) alcanza entre el 50% y el 70% de la población (Cañigüeral *et al.*, 2003). La medicina tradicional argentina emplea más de 750 plantas autóctonas y espontáneas, provenientes principalmente de colectas *in natura* y de importación, ya que el cultivo es casi inexistente (Cañigüeral *et al.*, 2003; Barboza *et al.*, 2009). Asimismo, en Argentina existe una farmacopea que recoge el uso de varias especies medicinales de importancia popular (Farmacopea Argentina, 1978).

En tanto, en el caso de Brasil, la situación actual indica un empleo extensivo de las plantas medicinales, con más de 700 productos fitoterápicos registrados y una farmacopea nacional que tiene en cuenta 45 monografías de drogas vegetales y sus extractos (Cañigüeral *et al.*, 2003; Farmacopea Brasileña, 2010). Seguramente lo anterior sea reflejo de la gran biodiversidad del Brasil, el que por sí sólo cuenta con más del 20% de la diversidad mundial de plantas superiores (angiospermas y gimnospermas), con un número estimado en 60.000 especies, de las cuales más de 1.500 son consideradas medicinales (Braz-Filho, 1994; Mors *et al.*, 2000; Cañigüeral *et al.*, 2003; Giulietti *et al.*, 2005; Mitra *et al.*, 2007). La biodiversidad es un elemento clave a la hora de considerar la potencialidad de un país para la producción de productos naturales medicinales y realizar una prospección sistemática, debido a que de todas las plantas existentes en el planeta, sólo el 6% han sido estudiadas en cuanto a su bioactividad y sólo un 15% han sido relevadas por su composición fitoquímica (Mors *et al.*, 2000; Fabricant y Farnsworth, 2001; Mitra *et al.*, 2007).

Las plantas aromáticas, al igual que las medicinales, son escasamente cultivadas en América Latina, pero sin embargo tienen una gran potencialidad dada la tradición agrícola existente en la región, la posibilidad concreta de domesticación y el interés de la industria esenciera para su explotación (Bandoni, 2000; INIA, 2004; Dellacassa, 2010). Si bien el empleo de plantas aromáticas en América no está tan bien documentado como en el caso de las plantas medicinales, en algunos grupos humanos sirven para propósitos mítico-religiosos, por



ejemplo para los llamados “chamanes” (curanderos) que las emplean para entrar en trance (Hórak, 2015).

La situación de uso de plantas medicinales y aromáticas en Uruguay es menos importante que en el caso de los países vecinos, lo que es reflejo final de la menor superficie (con su consecuente menor posibilidad de ocurrencia de especies) y menor población de nuestro país. Actualmente se emplean en Uruguay unas 300 especies medicinales nativas e introducidas, de acuerdo a un relevamientos de uso popular, existiendo una fuerte tendencia por parte de la población a emplear dicho recurso (Cañigueral *et al.*, 2003; Dellacassa *et al.*, 2004; Marchesi y Davies, 2004; Castiñeira Latorre *et al.*, 2018). Sin embargo, el cultivo industrial de plantas medicinales es extremadamente reducido, existiendo alrededor de 50 familias que se dedican al mismo de manera informal, y por ello se encuentran limitantes en cuanto a la calidad y cantidad del recurso vegetal (Cañigueral *et al.*, 2003; Dellacassa *et al.*, 2004). Por su parte, se estima que sólo en los alrededores de Montevideo, más de 100 familias tienen su sustento en la recolección *in natura* de plantas medicinales, en una actividad totalmente informal y casi sin ningún nivel de capacitación (Glass, 2004). Esta situación de colecta genera una presión importante sobre las poblaciones silvestres, lo que conlleva efectos ecológicos y pérdida de biodiversidad, cuyos impactos aún no han sido siquiera evaluados (Glass, 2004). Las principales especies medicinales que se colectan en el Uruguay son algunas autóctonas como la “marcela” (*Achyroclines satureioides*), “carqueja” (*Baccharis trimera*), “mburucuyá” o “pasiflora” (*Passifloraerulea*), “anacahuita” o “aguaribay” (*Schinus molle*), “yerba carnícer” (*Conyza bonariensis*), “cola de caballo” (*Equisetum giganteum*) y las naturalizadas “malva” (*Malva sp.*), “diente de león” (*Taraxacum officinale*) y “llantén” (*Plantago lanceolata*), entre otras (Glass, 2004; Alonso-Paz *et al.*, 2007; Castiñeira Latorre *et al.*, 2018).

La Flora aromática nativa del Uruguay está constituida por al menos 100 especies, pertenecientes a las familias Anarcadiaceae (“anacahuita”; “molle ceniciento”: *Schinus lentiscifolius*) Asteraceae (“carqueja”; “marcela”; “yerba carnícer”; “chirca blanca”: *Baccharis dracunculifolia*; “senecios”: *Senecio* spp.; “chirca negra”: *Acanthostyles buniifolius*; “vara de oro”: *Solidago chilensis*, “yerba lucera”: *Pluchea sagittalis*), Apiaceae (“viznagas”: *Ammi* spp.), Chenopodiaceae (“paico”: *Chenopodium ambrosoides*), Cyperaceae (“cípero”: *Cyperus rotundus*), Euphorbiaceae (“sangre de drago”: *Croton urucurana*), Fabaceae (“espinillo”: *Acacia caven*), Hypericaceae (“hipéricos”: *Hypericum* spp.), Lamiaceae (“albahaca de campo”: *Ocimum selloi*; “salvia”: *Salvia guaranitica*), Myrtaceae (“pitanga”: *Eugenia uniflora*; “arrayán”: *Blepharocalyx salicifolia*; “guayabo del país”: *Acca*



*sellowiana*), Poaceae (“espartillo”: *Elionurus muticus*) y Verbenaceae (“cedrón del monte”: *Aloysia gratissima*; “salvia trepadora”: *Lippia alba*; “lantana”: *Lantana camara*), etc. (Marchesi y Davies, 2004). Sin embargo, existe poca información en cuanto a la composición química de dichas especies y sus posibilidades de uso.

## Sección 2. Metabolismo secundario vegetal.

### 1. Las plantas y su potencialidad química: metabolismo primario y secundario

Las plantas son organismos que tienen un gran potencial de adaptación a las condiciones ambientales en que se desarrollan, de manera que se defienden y responden de manera precisa al estrés biótico o abiótico a que se encuentran expuestas, consecuencia en gran medida de su restricción de movimiento (Kaufmann *et al.*, 1999; Dewick, 2009). Dicha capacidad se relaciona con su potencialidad de sintetizar un rango muy amplio de metabolitos, cuyas funciones básicas son la supervivencia, preservación y continuidad de la especie (Kaufmann *et al.*, 1999; Torsell, 1997; Dewick, 2009).

En fisiología vegetal es común distinguir entre dos tipos de metabolismo: primario y secundario. El primero refiere a los procesos presentes en todos los vegetales (fotosíntesis, ciclo de Krebs y fosforilación oxidativa, procesos de replicación, transcripción y traducción del material genético, etc.), que se vale de componentes metabólicos como ácidos grasos, ácidos nucleicos, proteínas y azúcares (Torsell, 1997; Evans y Trease, 1991; Dewick, 2009). Por su parte, el metabolismo secundario involucra procesos biosintéticos restringidos y diferenciales para cada taxón considerado, e incluso para miembros de una misma especie (Torsell, 1997; Evans y Trease, 1991; Dewick, 2009). Sin embargo, la frontera entre metabolismo primario y secundario no es del todo precisa, por lo que hay compuestos que pueden considerarse parte de uno u otro dependiendo del contexto en el que se está trabajando, como por ejemplo, determinados azúcares (Dewick, 2009). Asimismo, las rutas biosintéticas del metabolismo secundario toman como elementos de partida compuestos del metabolismo primario, por lo que hay una continuidad intrínseca e indisoluble entre ambos (Torsell, 1997; Evans y Trease, 1991; Dewick, 2009).

Los productos del metabolismo secundario (productos naturales) inicialmente fueron considerados no esenciales para la vida vegetal y como productos de desecho; pero a través del avance en la investigación se fue dilucidando que los mismos son necesarios para la inter-



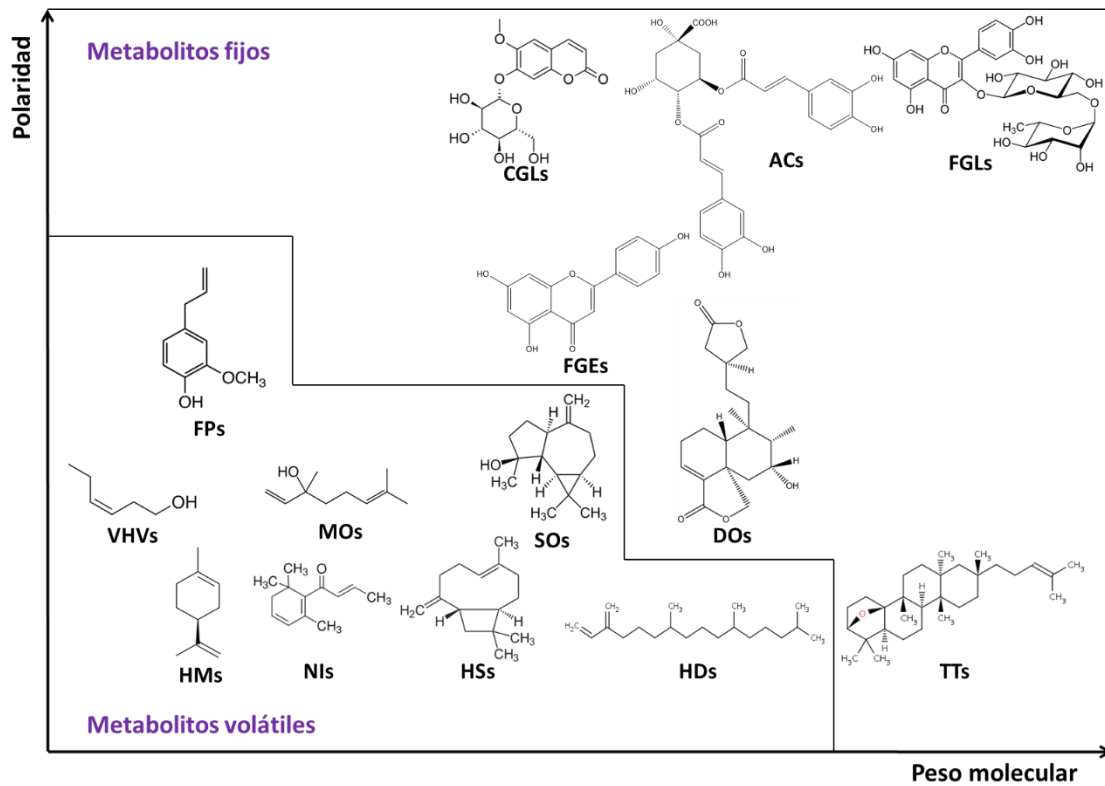
comunicación entre los seres vivos y sus ecosistemas (**Schoonhoven *et al.*, 2005; Hartmann, 2007; Dewick, 2009**). A la fecha, ha sido posible aislar e identificar un enorme número de metabolitos secundarios (alrededor de 200.000), y se ha constatado que su producción se modifica rápidamente de acuerdo a las condiciones ambientales en las que se desarrollan y prosperan las plantas que les dan origen (**Torsell, 1997; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Dewick 2009**). Por ejemplo, como respuesta de adaptación a factores bióticos (presencia de herbívoros, plantas competidoras, patógenos, polinizadores) y abióticos (sequía, regímenes de temperatura y viento, nivel de radiación, humedad, salinidad, altitud sobre el nivel del mar, etc.) (**Torsell, 1997; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Dewick 2009**). Las rutas metabólicas en las plantas representan un pool de diversidad química que da lugar a una gran biodiversidad de biomoléculas (**Evans y Trease, 1991; Bruneton 1993; Kar, 2007; Dewick, 2009**).

Los productos naturales se pueden clasificar no sólo en cuanto a su origen biosintético o funcionalidad química, sino en base a sus propiedades fisicoquímicas. Como ejemplo se puede distinguir entre compuestos volátiles o fijos de acuerdo a su presión de vapor (**Evans y Trease, 1991; Bruneton 1993**). Así, los metabolitos volátiles en general se caracterizan por tener una mediana a alta presión de vapor, bajo peso molecular (menor a 500 Daltons) y baja polaridad, los que los convierte en fácilmente extraíbles por técnicas de destilación y analizables por cromatografía gaseosa (lo que se tratará en el capítulo 3) (**Parliment, 2002; Kubezka, 2010; Bicchi y Maffei, 2012**). Los metabolitos fijos (no volátiles) en tanto, presentan menor presión de vapor, mayor peso molecular, y en general son de naturaleza medianamente polar a polar, debiéndose emplear otras metodologías de extracción (por solventes, en fase sólida, con fluidos supercríticos) y análisis por cromatografía líquida, espectrometría de masa y resonancia magnética nuclear (“*fingerprinting*”) (**Pourmortazavi, 2007; Hosstetmann, 2014; Varela-Ubillos, 2016**). Si bien la clasificación de los productos naturales en volátiles o fijos es de utilidad práctica para definir las técnicas de extracción y análisis que se aplicarán en cada caso, la frontera entre ambas clasificaciones no siempre es clara (Figura 1). Esto último puede evidenciarse por ejemplo en el caso de los diterpenos, en que algunos tipos pueden ser extraídos por destilación prolongada [como por ejemplo para compuestos apolares como los (*Z*) y (*E*)-fitoles, constituyentes de muchas esencias], mientras que otros sólo pueden ser extraídos con técnicas típicas de productos naturales fijos (**Can Başer y Demirci, 2007**).

En la Figura 1, se representa una imagen que ilustra diferentes clases frecuentes de productos naturales en función de dos propiedades fundamentales: la polaridad y el peso molecular (las



que se encuentra fuertemente relacionadas a la volatilidad (Evans y Trease, 1991; Bruneton 1993).



**Figura 1:** Diferentes clases de metabolitos secundarios en función del peso molecular y de la polaridad de los mismos. En la parte inferior izquierda se encuentran los metabolitos volátiles: VHV (volátiles de hoja verde), HMs (hidrocarburos monoterpenos), MOs (monoterpenos oxigenados), FPs (fenilpropanoides), NIs (norisoprenoides), HSs (hidrocarburos sesquiterpenos), SOs (sesquiterpenos oxigenados) y HDs (hidrocarburos diterpenos). En la parte superior derecha se encuentran algunos metabolitos fijos: FGEs (flavonoides geninas), CGLs (cumarinas glicosidos), DOs (diterpenos oxigenados), ACs (ácidos clorogénicos), TTs (triterpenos) y FGLs (flavonoides glicosidos).

Tradicionalmente, la investigación en *Química de Productos Naturales* y en *Fitoquímica* buscaba determinar qué compuestos biosintetizaba cada planta, así como su posible aplicación. Sin embargo, en la actualidad la investigación se ha redirigido a entender cuál es la función de los metabolitos secundarios en la naturaleza (*Ecología Química*), así como saber cuál es la relación entre los metabolitos sintetizados con las enzimas y proteínas expresadas, y con el material genético codificante y transcrito, lo que se conoce como *Metabolómica* (Sumner *et al.*, 2003; Schoonhoven *et al.*, 2005; Bergström, 2007).

## 2. El enfoque “ómico”: Metabolómica y Metabonomía

Los avances de las tecnologías analíticas en las ciencias de la vida han posibilitado una nueva forma de ver y entender a los sistemas biológicos desde un punto de vista integral (Sumner *et*

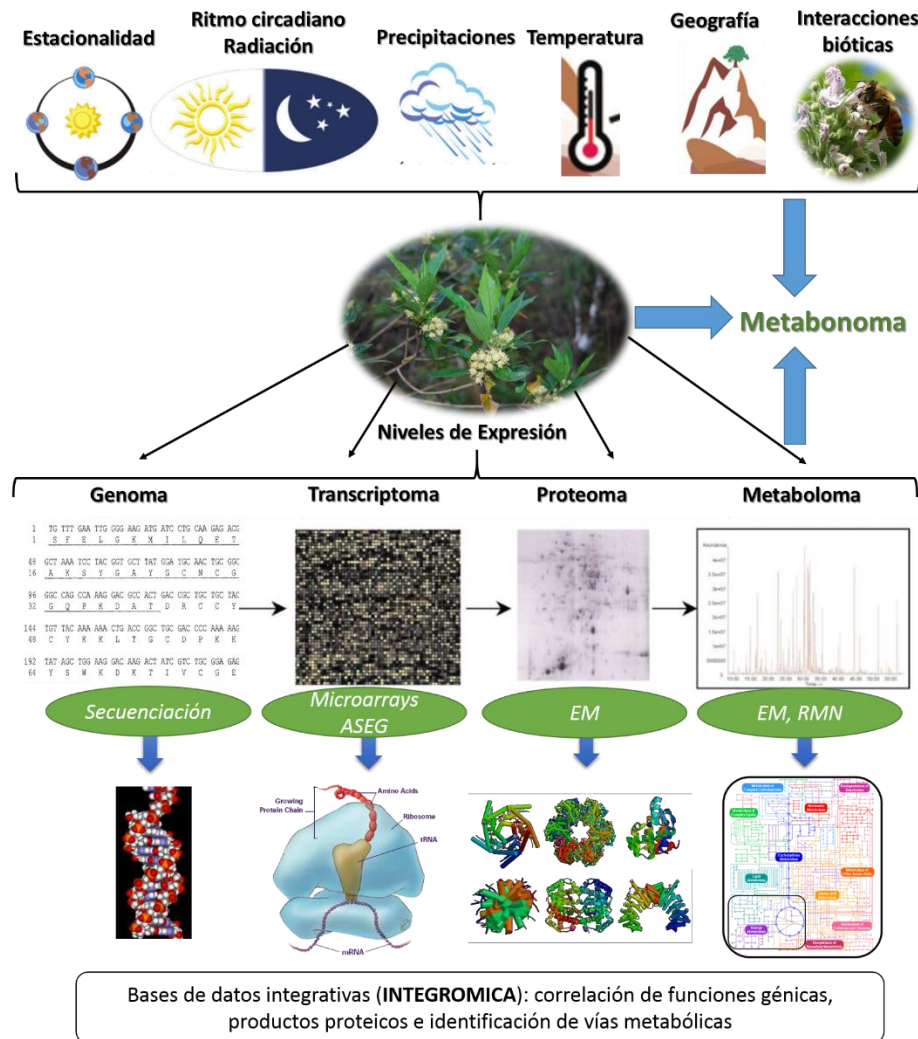


*al.*, 2003). En los últimos 15-20 años ha prosperado en la literatura científica el empleo de las llamadas técnicas “ómicas”, las que hacen referencia al estudio de la integralidad de un organismo vivo (o de una matriz biológica extraída a partir de un ser vivo) en sus diferentes niveles de complejidad (Sumner *et al.*, 2003). Ello implica el estudio de todos los genes que se encuentran codificados en su genoma (*Genómica*), los genes que en un momento dado están siendo expresados (*Transcriptómica*, estudio de todos los transcritos de ARNm), la totalidad de proteínas contenidas en la matriz en particular de enzimas (*Proteómica*), así como el universo de metabolitos presentes en la dicha matriz (*Metabolómica*) (Sumner *et al.*, 2003; Schripsema y Dagnino, 2014). Cada una de las técnicas “ómicas” tiene sus propias herramientas analíticas de estudio complementarias, ya que no existe ninguna tan poderosa para determinar en su verdadera magnitud la “integralidad ómica” debido a la complejidad inherente de los sistemas vivos (Fukushima *et al.*, 2009). Cuando se estudian todos los niveles de expresión mencionados, y se correlacionan dichos datos, se denomina un estudio de “*integrómica*”, y los mismos sólo pueden llevarse a cabo con potentes herramientas de computación que permitan procesar el gran volumen de información vinculante (Fukushima *et al.*, 2009).

La *Metabolómica* tiene por objetivo la identificación y cuantificación de todos los metabolitos primarios y secundarios que produce un organismo bajo determinadas circunstancias (millares de compuestos en varios niveles de concentración) (Sumner *et al.*, 2003; Schripsema y Dagnino, 2014). Para alcanzar tal objetivo deben emplearse una combinación de técnicas analíticas separativas (cromatografía, electroforesis, etc.) y de elucidación estructural: espectrometría de masa (*MS*), resonancia magnética nuclear (*RMN*), espectroscopía infrarroja (*IR*) (Sumner *et al.*, 2003; Schripsema y Dagnino, 2014). Actualmente, la cantidad de analitos que se pueden determinar por *MS* es mayor a la que se puede obtener por *RMN*, pero una gran ventaja de ambas técnicas es la posibilidad de hacer perfiles de expresión metabólica (*profiling*), con los que se puede comparar diferentes estados fisiológicos y de expresión del organismo bajo estudio (Sumner *et al.*, 2003; Schripsema y Dagnino, 2014; Varela-Ubillos, 2016). Por ejemplo, se puede contrastar el perfil de una planta sana contra el de la misma planta que padece una enfermedad, o el perfil de la misma en diferentes lugares de ocurrencia o en diferentes épocas del año (con las variables ambientales e intrínsecas del organismo ejerciendo su efecto) (Sumner *et al.*, 2003; Lindon y Nicholson, 2008). Para este tipo de estudios en que se trata de determinar la influencia de un efecto dado (o una combinación de varios de ellos) sobre la expresión metabólica de un organismo, se ha acuñado el término *Metabonómica* (Lindon y Nicholson, 2008).



En la Figura 2 se representa los diferentes niveles de complejidad existente en estudios de *Metabolómica* y *Metabonomía*, y su asociación con las restantes técnicas “ómicas”.



**Figura 2:** Las técnicas “ómicas” y sus herramientas para el estudio de los diferentes niveles de expresión de las plantas. Referencias: ASEG: análisis en serie de expresión génica, EM: espectrometría de masa, RMN: resonancia magnética nuclear. Fuente: Sumner et al. (2003); Gobbo-Neto y Lopes (2007).

Si se considera que la calidad tanto de las plantas cultivadas como de sus productos derivados, es una función directa de su contenido de metabolitos, y que se verifica un desarrollo continuo de los enfoques analíticos y bioinformáticos, la gama de aplicaciones útiles de la *Metabolómica* crece constantemente. En particular, los enfoques metabólicos no dirigidos (*untargeted*) tienen un gran potencial para ampliar el conocimiento a pesar de nuestra falta inicial de información sobre la bioquímica relacionada (Schripsema y Dagnino, 2014).

Un gran desafío, aún pendiente para estudios tanto metabolómicos como metabonómicos es la determinación de los analitos o perfiles de expresión *in vivo* con técnicas no invasivas, ya que lo que se hace actualmente es una rápida desactivación del metabolismo con nitrógeno líquido





o secado rápido y la medición *ex-vivo* (Sumner *et al.*, 2003; Lindon y Nicholson, 2008; Schripsema y Dagnino, 2014). En la misma línea, éste tipo de estudios requieren una menor cantidad de pasos de preparación de muestra (idealmente sin preparación alguna y con la matriz *in natura*), ya que los mismos pueden generar artefactos que afecten la validez de los estudios realizados (Sumner *et al.*, 2003; Lindon y Nicholson, 2008; Schripsema y Dagnino, 2014).

En el capítulo 4 de ésta Tesis se presentará una descripción del estudio de varias especies de *Baccharis* L. en cuanto a su perfil metabolómico volátil (volatiloma) determinado por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS). En el capítulo 6 se presentarán resultados de la variación de la composición volátil de *Baccharis* spp. en función de la estacionalidad, y en el capítulo 7 se mostrará la variación en función de la localidad geográfica, por lo que se pueden considerar en ambos casos estudios metabonómicos.

### 3. Metabolitos secundarios volátiles (MSVs): “moléculas mensajeras”

Los metabolitos secundarios volátiles (MSVs, productos naturales) biosintéticamente pertenecen a las familias de los terpenos, fenilpropanoides, norisoprenoides y de los compuestos derivados de ácidos grasos (“volátiles de hoja verde” o VHV), los que en su conjunto componen el volatiloma de las especies vegetales (Kesselmeier y Staudt, 1999; Dewick, 2009; Bicchi y Maffei, 2012). Los MSVs forman parte de un grupo más amplio conocidos como BVOCs (compuestos orgánicos volátiles biogénicos), aunque tal nomenclatura incluye también a compuestos que pertenecen exclusivamente al metabolismo primario (como es el caso de la hormona vegetal etileno) (Kesselmeier y Staudt, 1999; Can Başer y Demirci, 2007; Schoonhoven *et al.*, 2005). En general, todas las plantas pueden emitir algún tipo de BVOC a la atmósfera, aunque sólo sea bajo la forma de VHV o etileno (Kesselmeier y Staudt, 1999).

Los MSVs son considerados como semioquímicos, término que significa que los mismos son portadores de información codificada químicamente en canales de comunicación entre diferentes especies dentro de un ecosistema (Schoonhoven *et al.*, 2005; Bergström, 2007; Mithöfer y Boland, 2012). El “mensaje” que cada compuesto porta depende del tipo de interacción estudiada, debido a que un mismo MSV puede cumplir más de un rol en diferentes interacciones o canales de comunicación (Mithöfer y Boland, 2012). Como fue mencionado anteriormente, la emisión de MSVs depende de factores intrínsecos a la especie vegetal y de



factores bióticos y abióticos externos (Kesselmeier y Staudt, 1999; Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

Los terpenos volátiles son la clase de MSVs más estudiada, debido al gran número de componentes identificados por la investigación fitoquímica, así como a la amplia variedad de roles ecológicos y biológicos que se les ha atribuido (feromonas, atrayentes, defensas químicas, antimicrobianos, antioxidantes, alelopáticos, etc.) (Baldwin *et al.*, 2006; Bakkali *et al.*, 2008; Danishefsky, 2010; Loreto *et al.*, 2014; Pino, 2015). Incluso el más sencillo de los terpenos, el isopreno, es emitido por las plantas superiores e inferiores en grandes cantidades: 600 millones de toneladas anuales (casi la misma cantidad que las emisiones de metano de todas las fuentes); afectando el balance de gases en la química atmosférica y la formación de aerosoles (Kesselmeier y Staudt, 1999; Sharkey *et al.*, 2008; Zurbriggen, *et al.*, 2012). La razón de tal emisión es que el isopreno confiere tolerancia a las plantas, protegiendo de los daños provocados por el estrés calórico y por las especies reactivas radicalarias de oxígeno (ROS), siendo su síntesis inducida por la luz solar (Kesselmeier y Staudt, 1999; Sharkey *et al.*, 2008).

Algunos terpenos son responsables de la atracción de polinizadores y de la defensa frente a herbívoros y patógenos de forma directa [linalol, (*E*)- $\beta$ -farneseno] o por la atracción de enemigos naturales de los herbívoros (interacciones tritróficas) (Schoonhoven *et al.*, 2005; Mithöfer y Boland, 2012). Asimismo, los terpenos pueden ser constitutivos en una planta (como en el caso de los aceites esenciales) o en su defecto pueden ser inducidos como respuesta a la herbivoría, a la deposición de huevos de insectos o a la formación de agallas sobre las plantas (Damasceno *et al.*, 2010; Mithöfer y Boland, 2012). También es conocido el papel de éste tipo de compuestos en las interacciones planta-planta, como en el caso del timol, carvacrol y carvona que son inhibidores del crecimiento y de la germinación de plantas vecinas, actuando como alelopáticos (Azirak y Karaman, 2008; Mithöfer y Boland, 2012). La emisión de terpenos volátiles puede darse tanto en las partes aéreas de las plantas, como en las subterráneas, por ejemplo, en el caso de la emisión de (*E*)- $\beta$ -cariofileno por parte de las raíces de maíz (*Zea mays*, Poaceae) infestadas por larvas de escarabajos, atrayendo a nemátodos entomopatógenos para repeler la plaga en un esquema tritrófico (Rasmann y Turlings, 2008).

Si bien la gran mayoría de los terpenos son sintetizados por plantas, también pueden ser producidos por insectos, por bacterias y por levaduras (Carrau *et al.*, 2005; Zurbriggen, *et al.*, 2012; Martín *et al.*, 2016; Camesasca *et al.*, 2018). A modo de ejemplo, el (*S*)-(+)-linalol es producido en la glándula de machos y hembras de las abejas del género *Colletes* sp.



y su función es la agregación de los individuos para volar en grupo, actuando como feromona (Bergström, 2007). Por su parte, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* produce alcoholes monoterpénicos (linalol, geraniol,  $\alpha$ -terpineol y citronelol, entre otros) en condiciones de fermentación y ausencia de precursores vegetales, lo que le imprime a los vinos un aroma floral característico (Carrau *et al.*, 2005; Camesasca *et al.*, 2018). La función de éste tipo de componentes para las levaduras es la de ser moléculas de señalización del tipo “quorum sensing” (mecanismo de regulación ante el aumento poblacional), por ejemplo en el caso de los sesquiterpenos farnesol y nerolidol en *Candida* spp. (Martins *et al.*, 2010).

Es debido a la amplia distribución y sus variadas funciones en la naturaleza que la química de terpenos de bajo peso molecular (así como la de MSVs en general) se ha transformado en un tema importante de investigación en los últimos años (Loreto *et al.*, 2014; Pino, 2015). Adicionalmente, es amplia la utilización de éste tipo de componentes para la clasificación quimiotaxonómica de las especies, con el objetivo de encontrar quimiotipos (razas químicas vegetales y microbianas) estables, que generen productos normalizados para el procesamiento industrial (lo que se tratará en el capítulo 7) (Ložiene y Venskutonis, 2005; Dellacassa, 2010). Generalmente, para una adecuada evaluación de los quimiotipos, es necesario el análisis enantiomérico de los terpenos, lo que se puede emplear como criterio de genuinidad de los mismos (se tratará en los capítulos 5 y 6) (Köning *et al.*, 1992; Köning, 1998; Bicchi *et al.*, 1999).

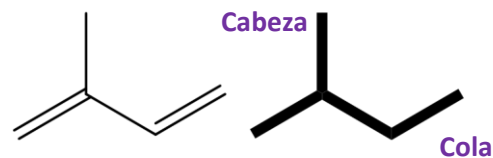
Así como los terpenos, los fenilpropanoides, norisoprenoides y VHV's también tienen importantes funciones en la comunicación y adaptación de los organismos a sus nichos ecológicos, pero la investigación en éstas familias es menos profunda que en el caso de los terpenos (Kesselmeier y Staudt, 1999; Dewick, 2009; Martin *et al.*, 2016).

#### 4. Biosíntesis de terpenos volátiles

Los terpenos (isoprenoides) constituyen el mayor grupo de metabolitos secundarios conocido, de acuerdo al número de compuestos reportados (estimados en más de 35.000), de los cuales alrededor de 1000 son volátiles (Dudareva *et al.*, 2004; Hartmann, 2007; Kar, 2007; Dewick, 2009). Todos los terpenos y sus derivados (como los esteroides) tienen en común que son formados estructuralmente por el ensamblaje de unidades de isopreno (2-metilbutadieno, Figura 3), hecho que fue conjeturado en 1887 por Wallach (Dewick, 2009). En 1953, Ruzicka formuló una regla general (“regla biosintética del isopreno”), cuyas predicciones fueron ampliamente confirmadas en la práctica: “cada grupo de terpenos



proviene de la condensación cabeza-cola de un número variable de unidades de isopreno” (Ruzicka, 1953; Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993). A los compuestos que cumplen dicha regla, se les llama terpenos “normales” es contraposición a los que se unen en otras disposiciones que se los conoce como “irregulares” (se tratará en el capítulo 8) (Dewick, 2009).



**Figura 3:** Isopreno (2-metil butadieno) y su unidad biosintética, estructura base de los terpenos. También se incluye una ilustración de lo que se conoce como “cabeza” y “cola” en la unidad isoprénica.

Los terpenos en general se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que forman su estructura en: hemiterpenos (5 carbonos, 1 unidad), monoterpenos (10 carbonos, 2 unidades), sesquiterpenos (15 carbonos, 3 unidades), diterpenos (20 carbonos, 4 unidades), sesterpenos (25 carbonos, 5 unidades), triterpenos (30 carbonos, 6 unidades) y tetraterpenos (40 carbonos, 8 unidades) (Bohlmann y Keeling, 2008; Dewick, 2009). A partir de 10 unidades isoprénicas, los derivados se denominan politerpenos o terpenos superiores, y es el caso de la goma “gutta percha” (*Palaquium gutta*, Sapotaceae) y de la “goma de caucho” (*Hevea brasiliensis*, Euphorbiaceae), cuyas moléculas poseen 102-104 y 103-105 unidades isoprénicas, respectivamente (Schoonhoven *et al.*, 2005; Dewick, 2009). En general, los terpenos superiores a 20 átomos de carbono se encuentran asociados a funciones de crecimiento y desarrollo, mientras que los terpenos de bajo peso molecular en general son mediadores en comunicación química (Bohlmann y Keeling, 2008).

Luego de que se sintetiza el esqueleto terpénico, la ocurrencia de modificaciones sucesivas puede conducir a la pérdida de carbonos en el esqueleto original, dando como resultado terpenos modificados (norterpenos), como por ejemplo los limonoides de 25-27 átomos de carbonos, típicos de las Meliáceas y Rutáceas (Dewick, 2009).

Los terpenos provienen biogénicamente de la condensación de dos unidades precursoras universales (*building blocks*): el isopentenil pirofosfato (IPP) y el dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Dewick, 2009; Zurbriggen, *et al.*, 2012). Existen dos vías metabólicas para la síntesis de éstos precursores: la ruta del ácido mevalónico (*MVA*); y la ruta “no mevalónica”, conocida por los nombres de: 1-deoxi-D-



xilulosa-5-fosfato (*DXP*) y 2-*C*-metil-D-eritriol-4-fostato (*MEP*) (Figura 4) (Dewick, 2009; Zurbriggen, et al., 2012). La ruta *MVA* se encuentra presente en los procariotas (árqueas y algunas eubacterias), eucariotas (insectos, hongos y levaduras), y especialmente en el citoplasma de las células vegetales (Dewick, 2009; Zurbriggen, et al., 2012). Por su parte, la ruta *MEP* se localiza en la mayoría de las eubacterias y cianobacterias, y en los plástidos de las células vegetales (Dewick, 2009; Zurbriggen, et al., 2012). Resultados de investigación indican que en las plantas, la síntesis de hemiterpenos, monoterpenos y diterpenos sucede en los plástidos por medio de la vía *MEP*, mientras que la síntesis de sesquiterpenos y triterpenos ocurre en el citosol por la ruta *MVA* (Dewick, 2009) (Figura 4).

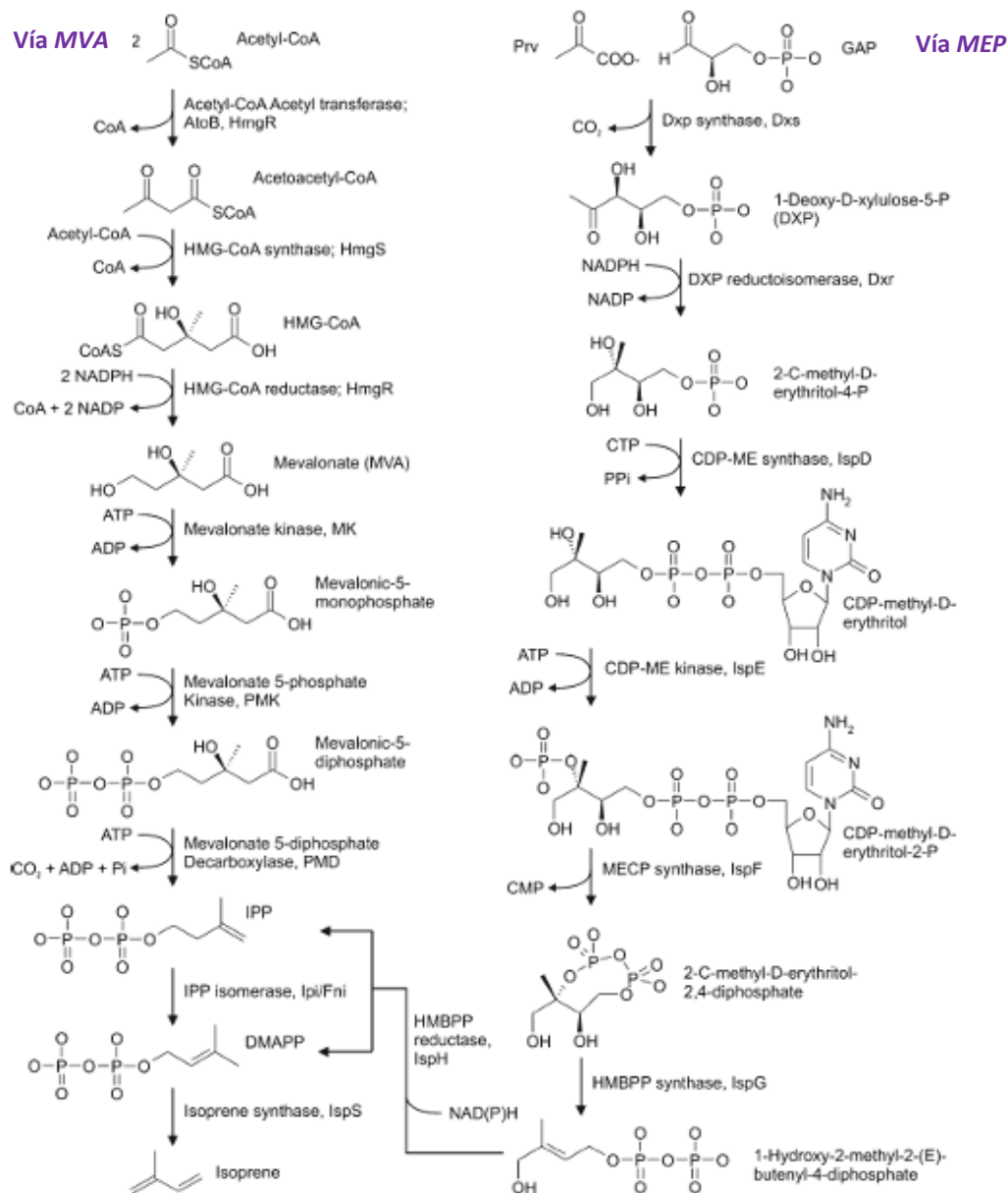


Figura 4: Rutas biosintéticas del del ácido mevalónico (MVA) y del 2-metileritriol-4-fosfato (MEP) para la síntesis de IPP y DMAPP en el paso inicial de la síntesis de los terpenos. Fuente: Zurbriggen et. al. (2012).



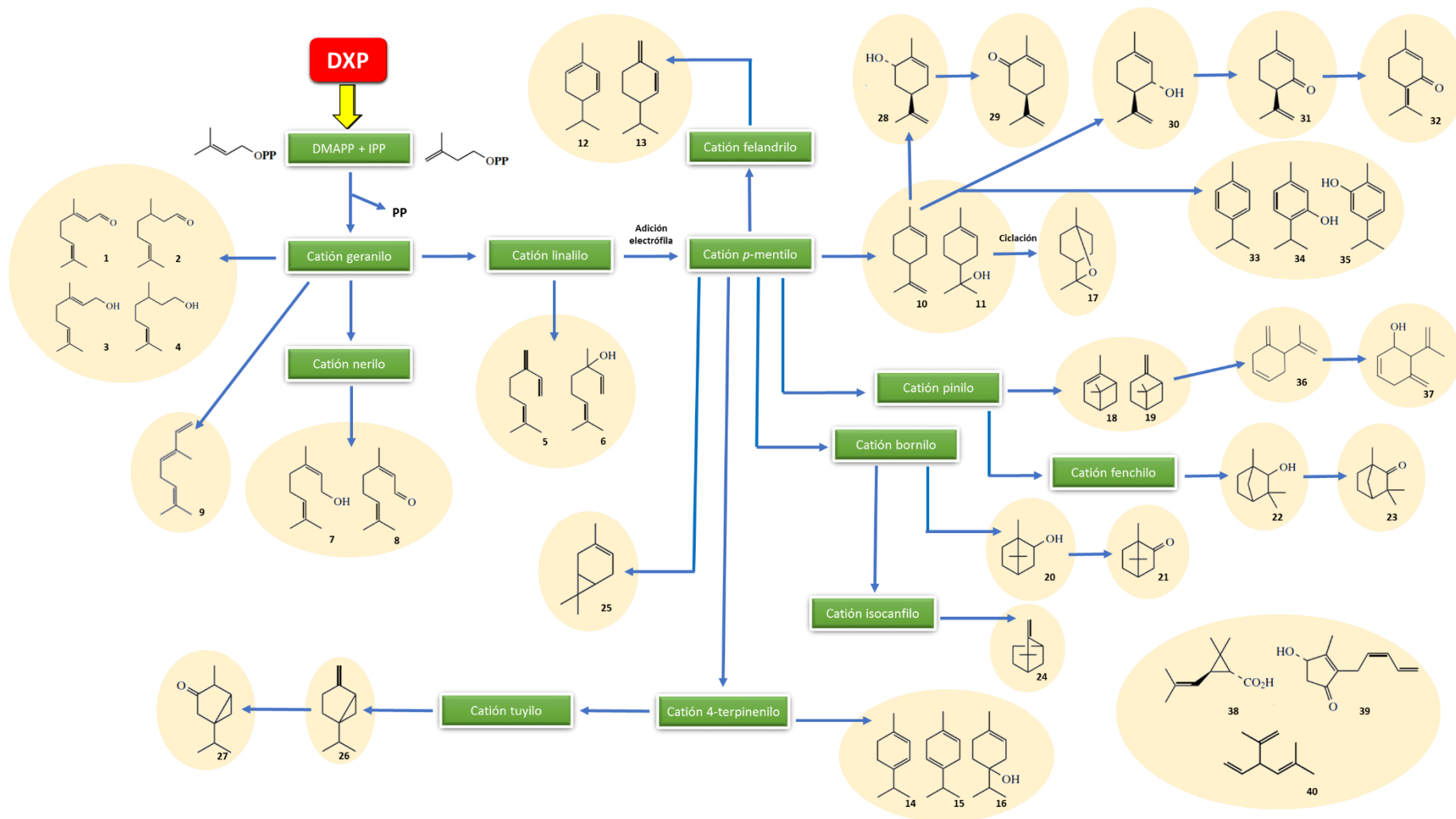
Luego de la formación del IPP y el DMAPP, ambas unidades se condensan para formar el geranil pirofosfato (GPP), precursor de los monoterpenos por acción de las enzimas monoterpeno-sintasas (Torsell, 1997; Dewick, 2009; Degenhardt *et al.*, 2009).

En la Figura 5 se presentan las rutas biosintéticas de formación de varios compuestos C<sub>10</sub> iniciado en el GPP, y que involucra intermediarios carbocatiónicos y diversos rearrreglos estructurales (Torsell, 1997; Dewick, 2009; Degenhardt *et al.*, 2009).

Como notación, para todo los componentes terpénicos se asigna como esqueleto precursor el correspondiente hidrocarburo insaturado con el mismo motivo estructural, por ejemplo, para los compuestos alicíclicos es el mircano (2,6-dimetiloctano) que se considera como el esqueleto de origen (Dewick, 2009; Sayuri *et al.*, 2010). Algunos de los compuestos que se biosintetizan con dicho esqueleto son: geranial (1), citronelal (2), geraniol (3), citronelol (4), mirceno (5), linalol (6), nerol (7), neral (8) y (*E*)- $\beta$ -ocimeno (9) (Figura 5).

En la Figura 5 se pueden visulizar las diferentes posibilidades de biosíntesis de los monoterpenos regulares, compuestos que en general se encuentran presentes en la mayoría de los aceites esenciales de plantas aromáticas (Evans y Trease, 1991; Bruneton, 1993; Torsell, 1997; Dewick, 2009).

Una gran familia de motivos estructurales diferentes se presenta en las plantas cuando no existe un patrón regular de unión cabeza-cola en la condensación de las unidades isoprenicas, lo que da lugar a la familia de los monoterpenos irregulares (se tratará en detalle en el capítulo 8). En éste caso las posibilidades sintéticas son variadas, y en general existe en ellas un indudable interés quimiotaxonómico por el restringido número de especies que expresan dichas rutas (Torsell, 1997; Dewick, 2009). Tal es el caso de la obtención del carquejeno (36) y su derivado carquejol (37; Figura 5) en la “carqueja” (*B. trimera*), los que presentan el esqueleto del *o*-mentano que se cree que se origina a partir del  $\beta$ -pineno (se tratará en el capítulo 8) (Bohlmann y Zdero, 1969). Otros compuestos monoterpenos irregulares son las piretrinas como el ácido crisantémico (38), piretrolona (39) y santolina trieno (40) (Figura 5) (Dewick, 2009).



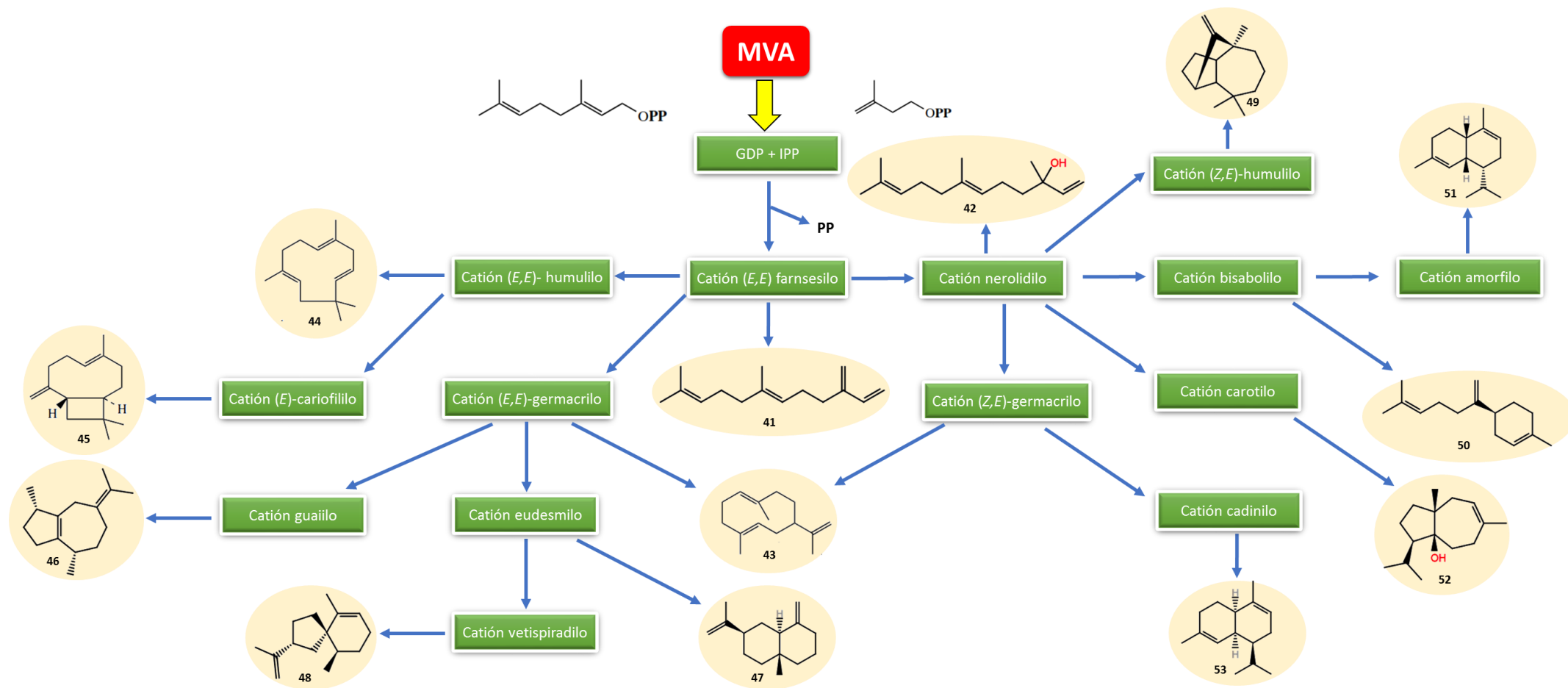
**Figura 5:** Biosíntesis de monoterpenos en plantas. Fuentes: Dewick (2009); Degenhart et al. (2009); Lange y Ahkami, (2013b). Referencias: (1) geraniol, (2) citronelol, (3) geraniol, (4) citronelol, (5) mircenol, (6) linalol, (7) nerol, (8) neral, (9) (E)- $\beta$ -ocimeno, (10) limoneno, (11)  $\alpha$ -terpineol, (12)  $\alpha$ -felandreno, (13)  $\beta$ -felandreno, (14)  $\alpha$ -terpineno, (15)  $\gamma$ -terpineno, (16) terpinen-4-ol, (17) 1,8-cineol (eucaliptol), (18)  $\alpha$ -pineno, (19)  $\beta$ -pineno, (20) borneol, (21) alcanfor, (22) fenchol, (23) fenchona, (24) canfeno, (25)  $\delta$ -3-careno, (26) sabineno, (27) tuyona, (28) (E)-carveol, (29) carvona, (30) (E)-isopiperitenol, (31) isopiperitenona, (32) piperitenona, (33) p-cimeno, (34) timol, (35) carvacrol, (36) carquejono, (37) carquejol, (38) ácido crisantémico, (39) piretrolona y (40) santolina trieno.



Por su parte, la ruta de formación de los sesquiterpenos se inicia en la condensación del GPP con una nueva unidad de IPP, para formar el farnesil pirofosfato (FPP), sobre el cual se producen una serie de reacciones de carbocationes y de rearrreglos catalizados por las enzimas sesquiterpeno-sintasas, semejante al caso de los monoterpenos (**Torsell, 1997; Dewick, 2009; Degenhardt *et al.*, 2009**). Debido al mayor tamaño del esqueleto carbonado (15 átomos), y a la presencia en el FPP de tres dobles enlaces capaces de realizar ataques nucleofílicos intramoleculares sobre los centros catiónicos; las posibilidades biosintéticas son mayores que en el caso de los monoterpenos (Figura 6) (**Torsell, 1997; Dewick, 2009; Degenhardt *et al.*, 2009**). Debido a que en la biosíntesis de los sesquiterpenos ocurren una variedad de tipos diferentes de ciclaciones, no es fácil determinar el orden en que se dieron las mismas para una estructura determinada, lo que requiere para su estudio de la complementariedad de las técnicas “ómicas” (**Degenhardt *et al.*, 2009**).

Las posibilidades biosintéticas en los sesquiterpenos no se remiten solamente a lo mostrado en la Figura 6, debido a que subsiguientes ciclaciones y modificaciones (oxidaciones, reducciones, etc.) son posibles, generando otros tipos de esqueletos de ocurrencia restringida en el reino vegetal (**Torsell, 1997; Dewick, 2009; Degenhardt *et al.*, 2009**).





**Figura 6:** Biosíntesis de sesquiterpenos en plantas. Fuentes: Dewick (2009); Degenhart et al.(2009); Lange y Ahkami (2013b). Referencias: (41) (E)- $\beta$ -farneseno, (42) (E)-nerolidol, (43) germacreno A, (44)  $\alpha$ -humuleno, (45) (E)- $\beta$ -cariofileno, (46) (Z)- $\beta$ -guaieno, (47)  $\beta$ -eudesmeno, (48) vetispiradieno, (49) longifoleno, (50)  $\beta$ -bisaboleno, (51)  $\beta$ -amorfenno, (52) carotol, (53)  $\alpha$ -cadineno.



### 5. Biosíntesis de compuestos volátiles no terpénicos

Como se mencionó anteriormente, el volatiloma de plantas no se encuentra exclusivamente compuesto por terpenos, y el mismo puede contener otros componentes como fenilpropanoides (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), bencenoides (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub> y C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>), norisoprenoides (C<sub>9</sub>, C<sub>10</sub>, C<sub>11</sub>, C<sub>13</sub>), derivados de ácidos grasos (“volátiles de hoja verde”, VHV, C<sub>6</sub> y C<sub>9</sub>), así como derivados azufrados y nitrogenados de los anteriores grupos (Dudareva et al., 2004; Dewick, 2009; Heining et al., 2013). En la Figura 7 se presenta un resumen de las principales rutas metabólicas que se expresan en las plantas, las que en última instancia generan todo el conjunto de MSVs.

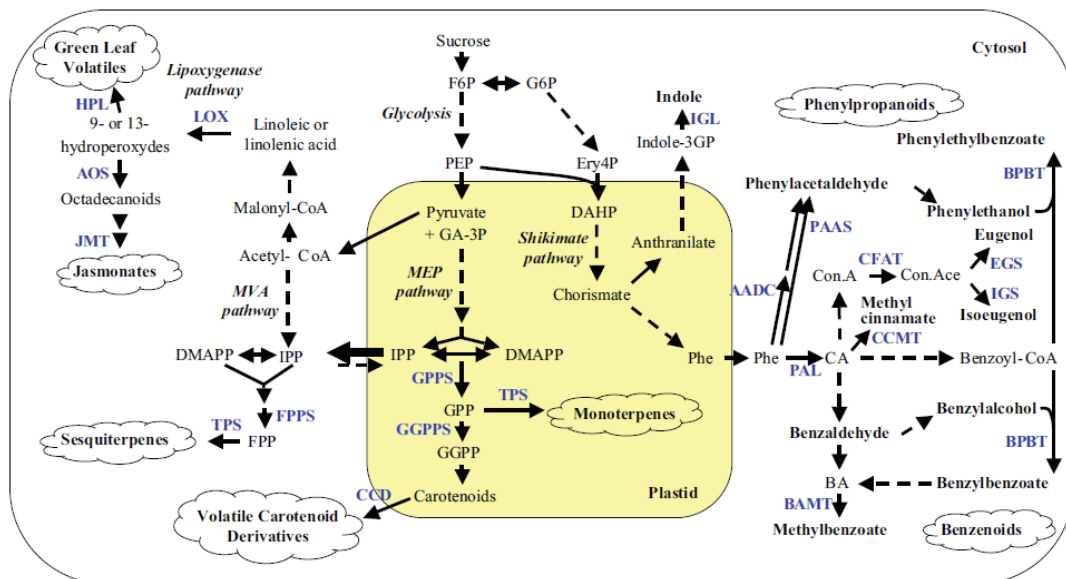
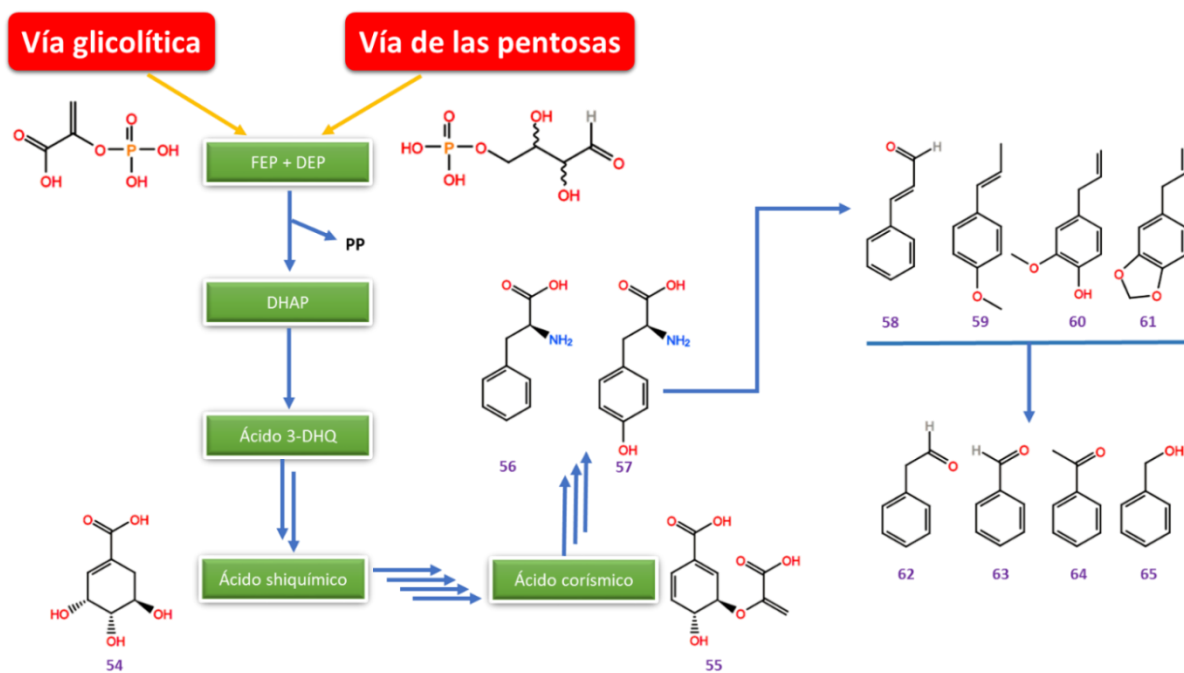


Figura 7: Rutas metabólicas relacionadas con la formación de los componentes volátiles más importantes en plantas (flores y frutas). Los compuestos volátiles se muestran en negrita, las enzimas en azul y las rutas metabólicas involucradas en itálica. Fuente: Heining et al. (2013).

En éste apartado se discutirá brevemente la biosíntesis de algunos de los grupos que son más representativos del metabolismo volátil de *Baccharis* spp. L. y que se discutirán en los capítulos posteriores.

Los fenilpropanoides y bencenoides se producen a través de la llamada vía del ácido shiquímico, la que se origina en dos rutas claves del metabolismo primario de degradación de azúcares: la vía glicolítica y la vía de las pentosas fostato (Dewick, 2009). Una resumen de la vía del ácido shiquímico se presenta en la Figura 8.



**Figura 8:** Biosíntesis de fenilpropanoides y bencenoides en plantas. Intermediarios de la vía biosintéticas: (54) ácido shiquímico, (55) ácido corísmico, (56) fenilalanina, (57) tirosina. Fenilpropanoides: (58) cinamaldehído, (59) anetol, (60) eugenol, (61) safrol. Bencenoides: (62) fenilacetaldéhído, (63) benzaldehído, (64) acetofenona y (65) alcohol bencílico. Los compuestos 58-65 son frecuentes en aceites esenciales. Fuente: Dewick (2009).

La biosíntesis de fenilpropanoides y bencenoides es de importancia para la planta porque son clave en la conformación del aroma de las flores (“bouquet”) de una diversidad de especies (Dudareva *et al.*, 2004; Dewick, 2009; Heining *et al.*, 2013; Martín *et al.*, 2016). Incluso, es posible la biosíntesis de derivados bencénicos volátiles de mayor peso molecular, lo que será presentado en el capítulo 4 de éste trabajo (ver el caso de la especie *B. linearifolia*).

Otros caso de origen de compuestos volátiles en la ruptura y degradación de compuestos de mayor peso molecular son las biosíntesis de los norisoprenoides (derivados de los carotenoides) y de los VHV's (derivados de ácidos grasos).

En el caso de los norisoprenoides (Figuras 9 y 10), el origen de los mismos es la ruptura de los carotenos, tetraterpenos (C<sub>40</sub>) comúnmente encontrados en las plantas debido a su rol como pigmentos fotosintéticos y fotoprotectores (Winterhalter y Rouseff, 2001; Baumes *et al.*, 2002; Mendes-Pinto, 2009). Dicha ruptura genera además de los componentes con propiedades aromáticas (norisoprenoides), los retinoides apocarotenoides y hormonas vegetales como el ácido absícico (Figura 9). Si bien no se encuentran completamente dilucidados muchos aspectos de la biosíntesis de éstos



componentes (principalmente en los pasos iniciales), se sabe que existe más de un sistema enzimático (dioxigenasas) que produce la ruptura del esqueleto C<sub>40</sub> en diferentes posiciones (Winterhalter y Rouseff, 2001; Baumes *et al.*, 2002; Winterhalter y Ebeler, 2013). También pueden producirse en algunos casos rupturas espontáneas no enzimáticas causadas por foto-oxidación, auto-oxidación y degradación térmica (Winterhalter y Rouseff, 2001; Baumes *et al.*, 2002; Mendes-Pinto, 2009).

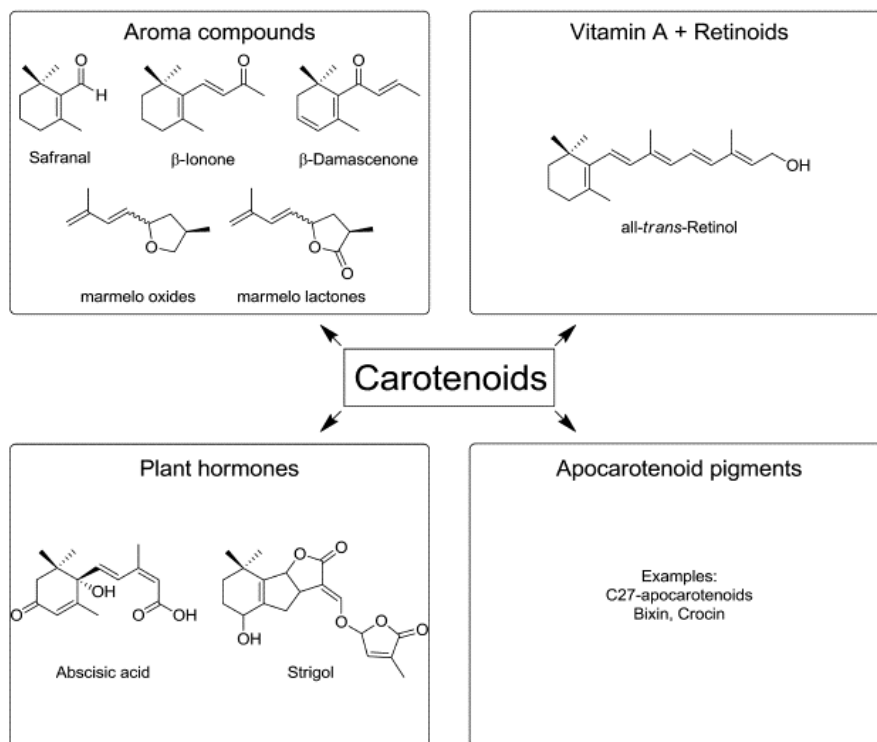


Figura 9: Ejemplos de metabolitos derivados de los carotenoides. Fuente: Winterhalter y Ebeler (2013).

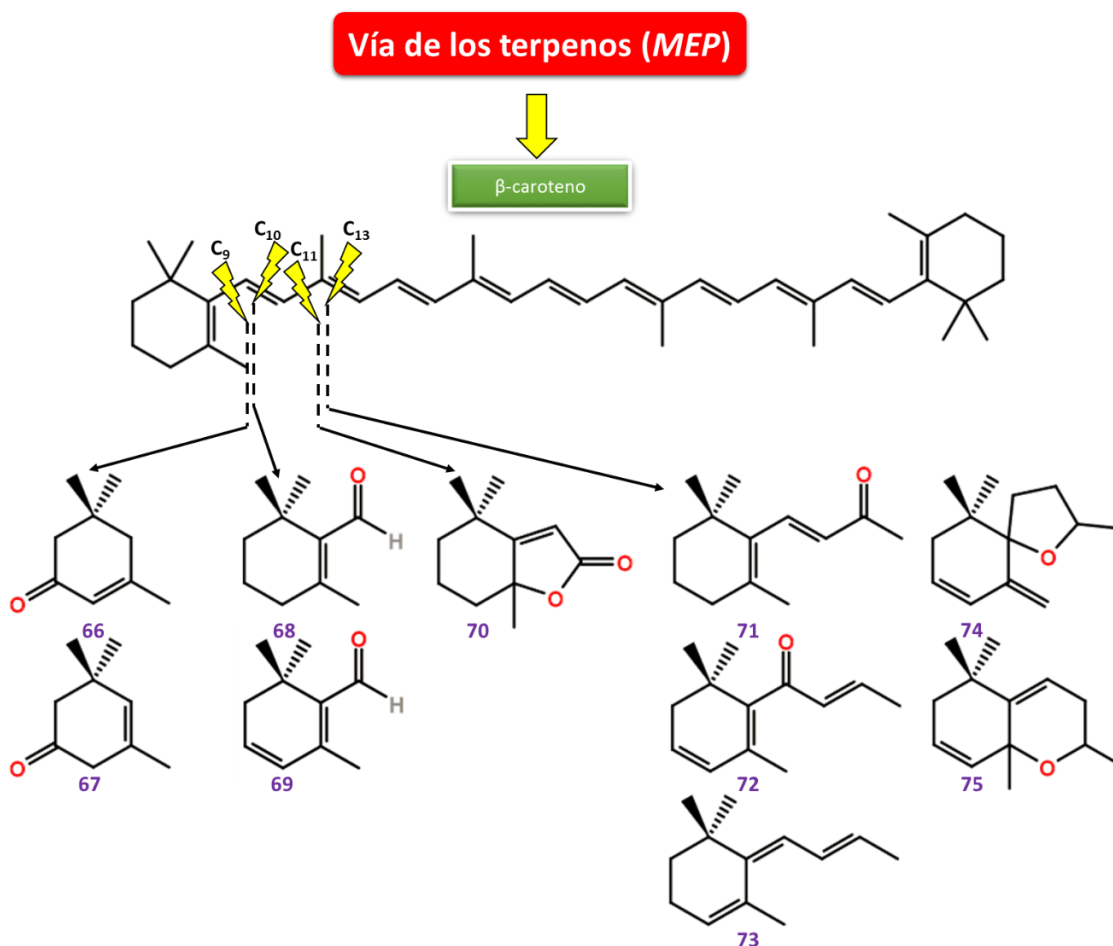
Los norisoprenoides como compuestos aromáticos se caracterizan por poseer un gran potencial odorante, con un umbral de percepción extremadamente bajo, por ejemplo: 0,007 ppb para el caso de la  $\beta$ -ionona y 0,002 ppb para la (*E*)- $\beta$ -damascenona, respectivamente (Winterhalter y Rouseff, 2001). Este tipo de compuestos son muy comunes en el aroma floral, por ejemplo en el caso de (*E*)- $\beta$ -damascenona y  $\beta$ -damascona que se biosintetizan significativamente en la “rosa de Bulgaria” (*Rosa damascena*, Rosaceae), confiriendo su aroma característico (Winterhalter y Rouseff, 2001).

Es usual el almacenamiento de los norisoprenoides como glicósidos (particularmente en los estigmas de las flores), por ejemplo, la picrocrocina ( $\beta$ -D-glicósido del hidroxisafranal) en *Crocus sativus* (Iridaceae), especie que da origen al azafrán



(Winterhalter y Rouseff, 2001). La ruptura de los glicósidos y la liberación de la aglicona norisoprenoide se puede dar tanto en condiciones enzimáticas como no enzimáticas, incluyendo degradación térmica (Winterhalter y Rouseff, 2001). Debido a ello, una variedad de aceites esenciales (obtenidos por destilación en condiciones térmicas) provenientes de estadios florales presentan norisoprenoides en su composición, como es el caso del “olivo dulce” (*Osmanthus fragans*, Oleaceae) y la “boronia parda” (*Boronia megastigma*, Rutaceae), entre otros (Winterhalter y Rouseff, 2001).

En la Figura 10 se presenta la ruptura del  $\beta$ -caroteno para dar una serie de derivados norisoprenoides que usualmente se encuentran en los aceites esenciales (Winterhalter y Rouseff, 2001).



**Figura 10:** Biosíntesis de norisoprenoides a partir del  $\beta$ -caroteno en plantas. Ver los nombres de los compuestos en el texto con su respectiva numeración. Fuentes: Winterhalter y Rouseff (2001); Mendes-Pinto (2009).

Los compuestos de la Figura 10 presentan diferente número de carbonos: 9 ( $\alpha$  y  $\beta$ -isoforonas **66** y **67**), 10 ( $\beta$ -ciclocitral **68** y safranal **69**), 11 (dihidroactinidiólido **70**) y 13



[ $\beta$ -ionona **71**, (*E*)- $\beta$ -damascenona **72**, (*E,E*)-megastigma-4,6,8-trieno **73**, vitispirano **74** y edulan-I **75**]. Otros compuestos norisoprenoides que también se encuentran usualmente en los aceites esenciales son la 6-metil-5-hepten-2-ona y la *pseudo*-ionona, aunque los mismos se originan en la degradación del licopeno (Winterhalter y Rouseff, 2001).

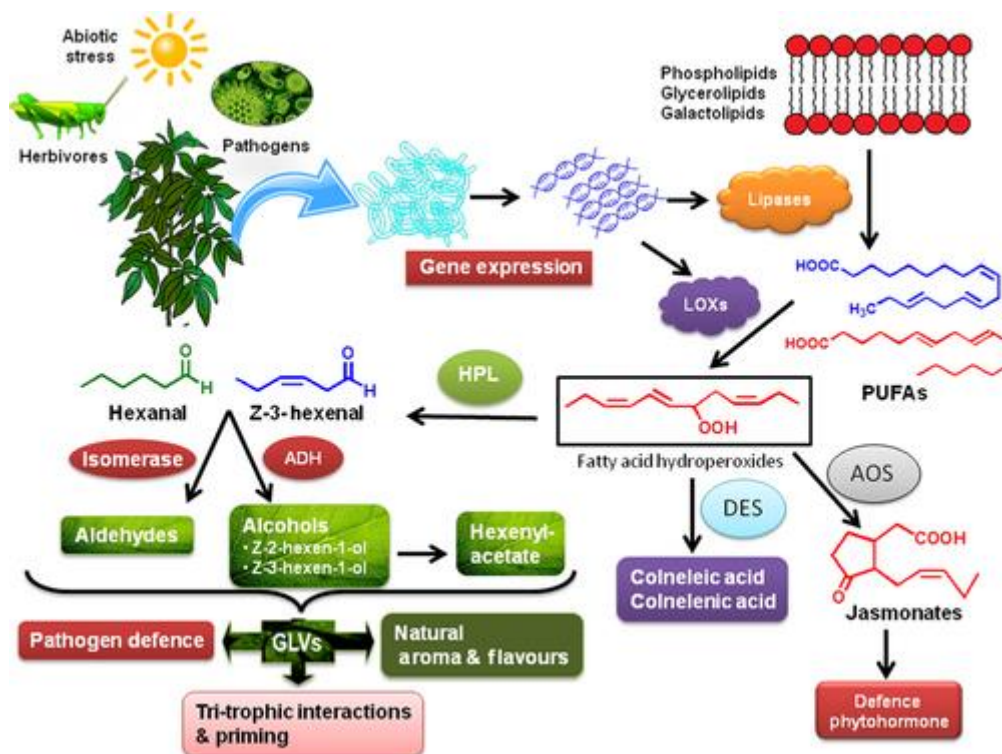
Otra familia de compuestos que usualmente se encuentran en los aceites esenciales son los “volátiles de hoja verde” (VHVs), los que se originan a partir de la ruptura de los ácidos grasos obtenidos primariamente a través de la vía acetogénica (Kesselmeier y Staudt, 1999; Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006). En general, los VHVs son aldehídos, alcoholes y ésteres monoinsaturados de 6 y 9 átomos de carbono, los que son los responsables del típico aroma a “pasto o hierba cortada” (Kesselmeier y Staudt, 1999; Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006). Son producidos por la oxidación de los ácidos grasos en una ruta mediada por la enzima lipoxigenasa (LOX) y la hidroxiperoxiliasa (HPL), principalmente a partir de los ácidos linoleico y linolénico (Figura 11), que se encuentran ubicuamente en las plantas constituyendo más del 1% del peso seco de las mismas (Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006; Hassan *et al.*, 2015).



**Figura 11:** Biosíntesis de volátiles de hoja verde (VHVs) en plantas. Referencias: Lpx: lipoxigenasa; Hpl: hidroxiperoxiliasas; ADH: alcohol deshidrogenasa. Fuente: Schoonhoven *et al.* (2005).



Un aspecto importante es que la biosíntesis de los VHVs es inducida por el deterioro o daño físico de las estructuras celulares por estrés biótico (por ejemplo, herbivoría o fitopatógenos) o abiótico (como por ejemplo, acción del viento y de las temperaturas) (Kesselmeier y Staudt, 1999; Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006). Sin embargo, la cantidad y el tipo de VHVs emitidos es una característica propia de cada especie vegetal (lo que refleja las diferentes isoformas y niveles de expresión de las enzimas involucradas) (Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006). Los VHVs pueden resultar tóxicos para algunos insectos herbívoros (o pueden inducir la síntesis de compuestos deterrentes o la atracción de depredadores), mientras que otros insectos utilizan éste tipo de compuestos como señal para encontrar su fuente alimenticia (Figura 12) (Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006). Los VHVs también tienen funciones como antimicrobianos, por lo cual protegen a las estructuras dañadas ante la posible infección por parte de fitopatógenos (Figura 12) (Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006).



**Figura 12:** Biosíntesis y función biológica de los VHVs. Ruta de la oxilipina: biosíntesis de jasmonatos, GLVs-volátiles de hoja verde, PUFAs (ácidos grasos insaturados), LOXs (lipoxigenasas), AOS (óxido de aleno sintasa), DES (divinil éter sintasa), HPL (hidroperóxido liasa), ADH (alcohol deshidrogenasa). Fuente: Schoonhoven *et al.* (2005).

Otro importante grupo de metabolitos vegetales derivado de los ácidos grasos son los jasmonatos, los que constituyen fitohormonas de defensa ante las agresiones causadas



por herbivoría (Figura 12) (Schoonhoven *et al.*, 2005; Matsui, 2006). Debido a dicha función, los jasmonatos se encuentran en la frontera entre metabolismo primario y secundario.

## Sección 3. Antecedentes de *Baccharis* spp. L.

### 1. Botánica y taxonomía

La familia Asteraceae (ex-Compositae Giseke) BERTCH & J. PRESL posee el mayor número de especies en la división Angiospermas (y en todo el Reino Plantae), con unas 23.600 de ellas descritas, las que se desarrollan en todos los continentes con la excepción de la Antártida (Verdi *et al.*, 2005; Budel *et al.*, 2008; Heiden *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2016). Estas especies se clasifican en 12 subfamilias y 28 tribus, siendo una de ellas la tribu Astereae CASS., de amplia ocurrencia en climas templados y cálidos alrededor del mundo (205 géneros, 3080 especies) (Verdi *et al.*, 2005; Budel *et al.*, 2008; Heiden *et al.*, 2009; Campos *et al.*, 2016). La subtribu Baccharidinae LESS. es exclusivamente americana, y comprende tres géneros: *Heterothalamus* Less. (2 especies), *Archibaccharis* Heering (32 especies) y *Baccharis* L. (360 especies) (Giuliano, 2001; Schneider, 2009; Campos *et al.*, 2016). En la literatura también pueden encontrarse otros géneros componentes de Baccharidinae como *Baccharidastrum* Cabrera y *Baccharidiopsis* Barroso, aunque los mismos no tienen completa aceptación por parte de los especialistas (Barroso, 1976; Giuliano, 2005; Müller, 2006; Giuliano y Freire, 2011; Heiden y Pirani, 2016a). Sin embargo, nuevas descripciones de *Baccharis* L. se suman año a año, por lo que se estima que el número real de especies de éste género sea mayor a 500 (Nesom, 1990; Verdi *et al.*, 2005; Schneider *et al.*, 2011; Heiden y Pirani, 2014; Müller, 2014). Por dicha razón, *Baccharis* L. es uno de los géneros más numerosos y más diversos dentro de la familia Asteraceae (Nesom, 1990; Campos *et al.*, 2016).

Las especies de *Baccharis* L. se distribuyen desde Canadá hasta el extremo austral de Argentina y Chile, ocupando una gran variedad de ecosistemas (Müller, 2006; Schneider, 2009; Heiden *et al.*, 2009; Giuliano y Freire, 2011). Por su parte, *Archibaccharis* Heering es casi exclusiva de México y América Central (apenas 2 especies ocurren en Sudamérica), mientras que *Heterothalamus* Less. se encuentra





presente solamente en el sur de Brasil y Uruguay (**Schneider, 2009**). Debido a la gran cantidad de especies de *Baccharis* L. presentes en Sudamérica (más del 90%), principalmente en las cadenas montañosas del centro-sur de Brasil y en los Andes, se ha planteado que ambas regiones son probables centros de origen del género (**Nesom, 1990; Verdi et al., 2005; Müller, 2006; Heiden et al., 2007; Heiden et al., 2009**). A modo de ejemplo, en Brasil se encuentran descritas más de 170 especies endémicas (**Barroso, 1976; Schneider, 2009; Heiden y Pirani, 2016b; Campos et al., 2016**). Se considera además que existe un tercer centro de origen (con menor diversidad que los anteriores) sobre América Central, México y Estados Unidos, donde crecen naturalmente 43 especies, la mayoría de las cuales no se encuentran presentes en Sudamérica (**Nesom, 1990**). Sin embargo, otros autores postulan que todas las especies tienen su origen en la misma región geográfica, pero que en la actualidad se encuentran separadas por regiones xerofíticas (regiones con bajo régimen de precipitaciones y humedad) en que la diversidad es menor (**Jarvis et al., 1991; Schneider 2009**).

*Baccharis* L. incluye plantas herbáceas perennes, arbustos y subarbustos leñosos, arbustos trepadores y hasta pequeños árboles (**Barroso, 1976; Nesom, 1990; Verdi et al., 2005; Müller, 2006 y 2014; Budel et al., 2008; Giuliano y Plos, 2014**). La característica más notable del género es que está compuesto en su mayoría por especies dioicas, es decir, con individuos masculinos y femeninos separados físicamente (ausencia de hermafroditismo), aspecto diferencial del resto de integrantes de la familia Astereaceae y poco común en el Reino Plantae (ver capítulos 4 y 5) (**Nesom, 1988; Müller, 2006; Budel et al., 2008; Schneider 2009; Campos et al., 2016**). De todas las especies del género, sólo 3 son monoicas: *B. monoica* nativa de Norte América, y *B. vulneraria* y *B. breviseta* endémicas de Sudamérica (**Nesom, 1988; Müller, 2006 y 2014**). El dioicismo le confiere a los especímenes macho y hembra diferencias fisiológicas en la floración así como en la tolerancia a las condiciones de estrés (ver capítulos 4 y 5) (**Nesom, 1988; Müller, 2006 y 2014**).

Si bien fue Linneo quien describió al género *Baccharis* en 1753 (en honor a Baco, dios romano de las vendimias) con la especie típica *B. halimifolia* L.; fue De Candolle (1836) el primero que estableció una clasificación infragenérica del mismo basándose principalmente en la morfología de las hojas (**Heiden, 2005; Schneider, 2009**). Posteriormente, otros autores como Baker (1882), Hoffmann (1894), Heering (1904), Cuatrecasas (1969), Espinar (1973), Barroso (1976), Nesom (1990) y Helwing (1993) establecieron correcciones en los sistemas de clasificación infragenérica de *Baccharis*



L., dándole mayor relevancia a los caracteres florales (**Giuliano, 2001; Heiden, 2005**). Si bien en los últimos 20 años se han seguido realizando tratamientos taxonómicos, la clasificación actual no está completamente definida y se encuentra bajo continua revisión y debate académico (**Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Müller, 2006 y 2014; Giuliano y Freire, 2011; Heiden y Pirani, 2016b**).

El esquema de clasificación más empleado en la actualidad (y que se empleará en éste trabajo de Tesis) es el de Giuliano, que postula la existencia de 25 secciones dentro del género *Baccharis* (**Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011; Giuliano y Plos, 2014**). Para ello se consideran como caracteres de clasificación la pubescencia de las plantas, el patrón de nerviación de las hojas y varios caracteres florales como disposición de los capítulos y forma de los verticilos, entre otros (aunque no se tienen en cuenta caracteres genéticos) (**Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011; Giuliano y Plos, 2014**). Algunas de las secciones propuestas en ésta clasificación son: *Angustifoliae* BAKER, *Aristidentes* G.L. NESOM, *Baccharis*, *Canescentes* GIULIANO, *Caulopterae* DC. (ex-*Alatae*), *Discolores* DC., *Molinae* (RUIZ & PAV.) PERS., *Nitidae* CUATREC., *Paniculatae* HEERING, *Tridentatae* GIULIANO y *Trinervatae* DC; las que se presentarán en el capítulo 4 junto a las especies pertenecientes estudiadas en éste trabajo (**Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011; Giuliano y Plos, 2014**).

## 2. Uso etnofarmacológico

Al menos 40 especies de *Baccharis* L. tienen uso etnomedicinal en Latinoamérica bajo la forma de decocciones e infusiones del material vegetal para el tratamiento malestares estomacales y hepáticos, anemias, heridas superficiales, úlceras, fiebre, diabetes y desórdenes intestinales, entre otras dolencias leves a moderadas (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016; Budel et al., 2018; Schripsema et al., 2019**). También se reporta en bibliografía el uso como espamolítico, diurético, analgésico, anti-inflamatorio, antimicrobiano (anti-infeccioso) y con propósitos de pérdida de peso (**Jarvis et al., 1991; Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016; Budel et al., 2018**).

Particularmente, la “carquejas” (*B. articulata*, *B. crispa*, *B. trimera*, entre otras) son especies cuyas infusiones poseen amplias propiedades etnomedicinales demostradas científicamente (por ejemplo: digestiva, analgésica, anti-inflamatoria, hemostática,



protectora hepática y renal, entre otras como se discutirá en el capítulo 4), y debido a ello han sido incluidas como oficinales en las Farmacopeas de la región: *B. articulata* y *B. crispa* en la argentina, y *B. trimera* en la brasileña (Farmacopea Argentina, 1978; Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008; Freire *et al.*, 2007; Farmacopea Brasileña, 2010; Silveira Rabelo y Caldeira Costa, 2018; Schripsema *et al.*, 2019). Sin embargo, la identificación de la droga vegetal es dificultosa, debido a que existen al menos 30 especies de apariencia morfológica parecida (tallos trialados) (se discutirá en detalle en el capítulo 4), lo que hace dificultoso el control de calidad (Schneider, 2009; Campos *et al.*, 2016; Schripsema *et al.*, 2019).

### 3. Aspectos económicos y ambientales

Dada la diversidad de ambientes en que las especies de *Baccharis* L. prosperan y su vigor de crecimiento, es natural que se vinculen con actividades agrícolas productivas bajo dos puntos de vista:

- 1) como especies de cultivo dada su potencialidad medicinal, aromática y ornamental;
- 2) como malezas de otros cultivos de interés (Verdi *et al.*, 2005).

Claramente, ambos fines se contraponen, ya que el objetivo del primero es la conservación y producción, mientras que en el caso del segundo es la eliminación del recurso vegetal (Verdi *et al.*, 2005; Scheffer-Basso *et al.*, 2008).

Como medicinales son importantes las especies con uso etnofarmacológico (particularmente las reconocidas como oficinales), mientras que en la industria de los aromas y fragancias son empleados los aceites esenciales de *B. dracunculifolia* y *B. trimera* (Queiroga *et al.*, 1990; Ferracini *et al.*, 1995; Verdi *et al.*, 2005). Por otra parte, *B. angustifolia*, *B. glomeruliflora*, *B. milleflora*, *B. neglecta* y *B. tridentata* han sido identificadas como especies de potencial uso ornamental (Verdi *et al.*, 2005; Tognon y Cuquel, 2016). Asimismo, algunas especies son empleadas en la formación de cercos y en la protección contra la erosión de los suelos, como es el caso de *B. pilularis* y *B. macrantha* en Colombia (Verdi *et al.*, 2005; Budel *et al.*, 2008). Otro aspecto económico de importancia es que varias especies (entre ellas *B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. salicifolia*, *B. spicata*) son melíferas y permiten la producción de



miel de excelente calidad organoléptica (Ferracini *et al.*, 1995; Verdi *et al.*, 2005; Giuliano y Plos, 2014).

En contraposición a sus aspectos útiles, algunas de las especies de *Baccharis* L. son consideradas malezas en sistemas agropecuarios, como: *B. halimifolia*, *B. neglecta*, *B. salicifolia* (en Estados Unidos), *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia* y *B. trimera* (en Argentina, Brasil y Uruguay), entre otras (Verdi *et al.*, 2005; Scheffer-Basso *et al.*, 2008; Negreiros *et al.*, 2014). Se ha constatado asimismo que algunas especies son tóxicas para el ganado cuando son ingeridas, como por ejemplo *B. artemisioides*, *B. coridifolia*, *B. megapotamica* y *B. halimifolia* ya que acumulan tricotecnos hepatotóxicos (derivados sesquiterpénicos macrocíclicos) que pueden causar la muerte de los animales en 14-40 horas después de la ingestión de 0,25-0,50 g de planta por kg de peso vivo (Jarvis *et al.*, 1991; Verdi *et al.*, 2005).

Todas las anteriores son especies de difícil eliminación de los sistemas productivos debido a su porte arbustivo perenne (con más de un año de vida y alta capacidad de rebrote), a que crecen de manera agresiva en una variedad de suelos (incluso aquellos con bajo nivel de nutrientes), y a que son muy tolerantes a las condiciones agroclimáticas (sequías, heladas, etc.) (Verdi *et al.*, 2005; Scheffer-Basso *et al.*, 2008; Negreiros *et al.*, 2014).

#### 4. Fitoquímica y actividad biológica

Debido a la diversidad genética y morfológica propia de las especies de *Baccharis* L., es razonable que las especies del mismo desarrollen un metabolismo secundario igualmente diverso (Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2018). Debido a que los esquemas de clasificación taxonómicos infragenéricos nombrados anteriormente sólo toman en cuenta aspectos morfológicos (que no necesariamente reflejan relaciones evolutivas), se han implementado otros tipos de abordaje para la clasificación, entre ellos la quimiotaxonomía (cuyos resultados se discutirán en los capítulos 4 y 7) (Zdero *et al.*, 1986; Lonni *et al.*, 2003 y 2005; Simões-Pires *et al.*, 2005; Budel *et al.*, 2018).

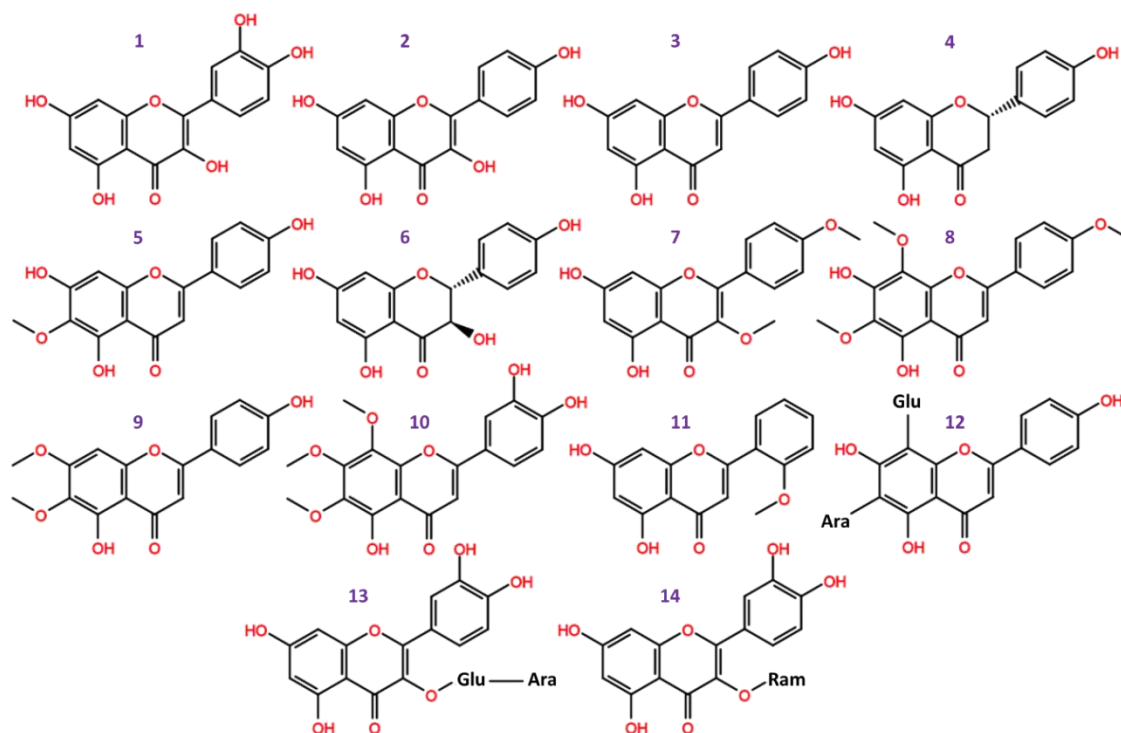
A nivel fitoquímico, *Baccharis* L. se caracteriza por la presencia en tallos, raíces, hojas y flores de flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas, diterpenos, triterpenos, tricotecnos, poliacetilenos y aceites esenciales; siendo mayor a 500 el número de



componentes aislados e identificados (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016; Bogo et al., 2016; Schripsema et al., 2019**).

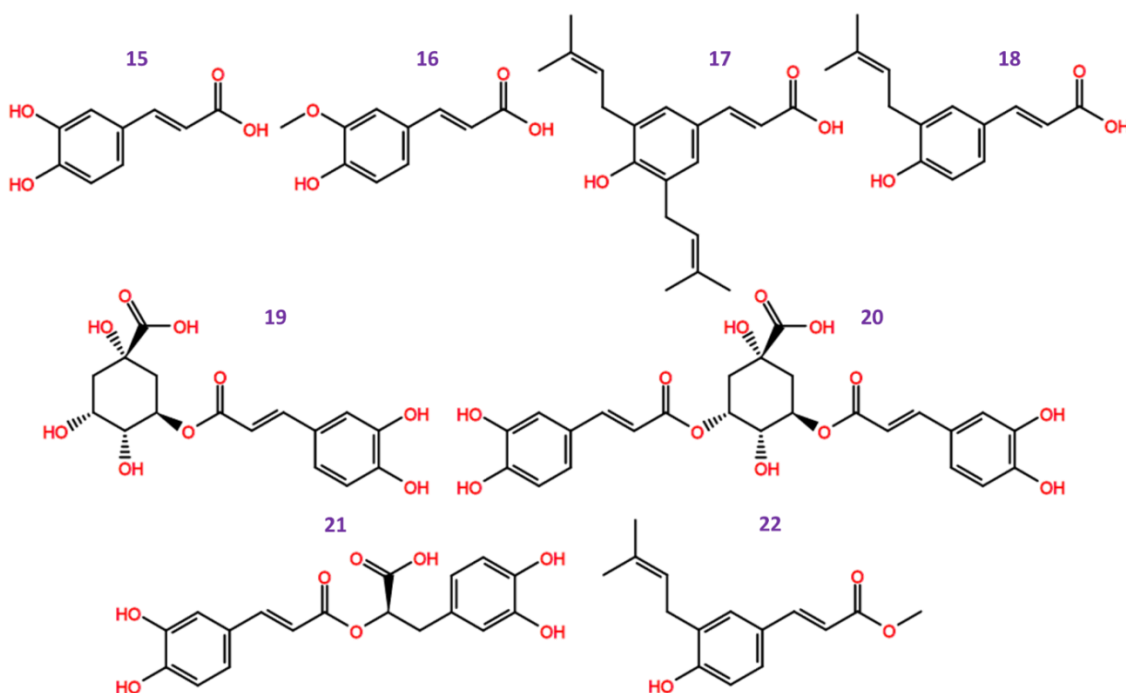
Más de 110 flavonoides han sido reportados en *Baccharis* L., y, junto con los diterpenos son los metabolitos secundarios más ampliamente distribuidos en el género (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016; Schripsema et al., 2019**). En la Figura 13 se representan las estructuras de la quercetina (1), kaempferol (2), apigenina (3), naringenina (4), hispidulina (5) y aromadendrina (6), que han sido reportados para varias especies del género (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016**). Otros flavonoides como ermanina (7), nevadensina (8), circimaritina (9) y sideritiflavona (10), entre otros, son de distribución restringida (Figura 13) (**Verdi et al., 2005; Campos et al., 2016**). Algunos flavonoides de *Baccharis* spp. presentan estructuras novedosas, como es el caso de la 2'-metoxicrisina (11) aislada de *B. illinita* y el isoschaftósido (12) (con unión a azúcares a través de enlace C-C) aislado de *B. gaudichaudiana* (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016**).

Es de destacar que más del 90% de los flavonoides reportados hasta la fecha se encuentran en su forma libre (aglicona; principalmente flavona) y el restante porcentaje como glicósidos, aspecto bastante característico de *Baccharis* L. y de la familia Asteraceae (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016**). Algunos de los glicósidos más comunes en el género son la rutina (13) y la quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido (14), que ha sido reportadas para varias especies (Figura 13) (**Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016**). Se ha comprobado que los flavonoides de *Baccharis* spp. presentan una variedad de bioactividades, como por ejemplo: antimicrobiana (contra hongos y bacterias), antiviral, antiparasitaria, antioxidante, citotóxica, antimutagénica, anti-hepatotóxica, espasmolítica y alelopática (**Verdi et al., 2005; Campos et al., 2016**).



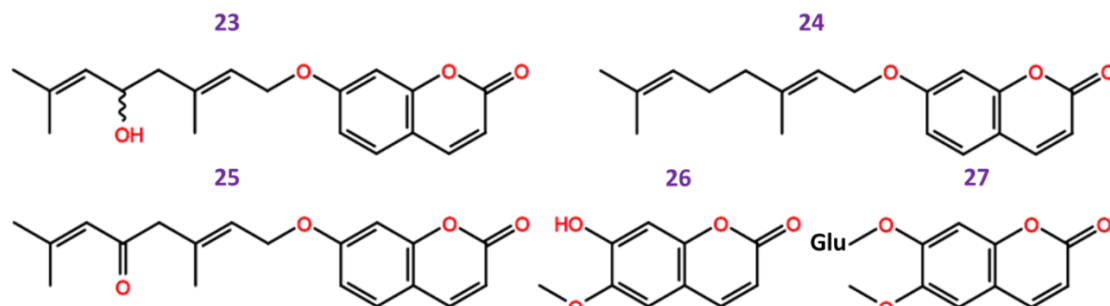
**Figura 13:** Flavonoides de *Baccharis* spp. Referencias: (1): quercetina, (2): kaempferol, (3): apigenina, (4): naringenina, (5): hispidulina, (6): aromadendrina, (7): ermanina, (8): nevandesina, (9): cirsimaritina, (10): sideritiflavona, (11): 2'-metoxicrisina, (12): isoschaftósido, (13): rutina y (14): quercetina-3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosido. Glu: glucosa, Ara: arabinosa, Ram: ramnosa. Fuente: Campos et al. (2016).

Los ácidos fenólicos son componentes muy importantes y en general ubicuos en *Baccharis* spp., especialmente los ácidos cafeico (15) y ferúlico (16) (Figura 14) (Campos et al., 2016). Como ejemplo de ello se encuentran los derivados prenilados del ácido cinámico artepillina C (17) y drupanina (18) que son comunes a varias especies del género y característicos del “propóleo verde” proveniente de *B. dracunculifolia* (Figura 14) (Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016). Se ha demostrado que dichos compuestos tienen actividad en la inhibición del ciclo celular de células de cáncer de colon, por lo cual son potenciales anticancerígenos (Shimizu et al., 2005). Otros compuestos de éste tipo aislados de *Baccharis* spp. se muestran en la Figura 14.



**Figura 14:** Ácidos fenólicos de *Baccharis* spp. Referencias: (15): ácido cafeico, (16): ácido ferúlico, (17): artemillina C, (18): drupanina, (19): ácido clorogénico, (20): ácido 3,5-dicafeoilquínico, (21): ácido rosmarínico y (22): plicatina B. Fuente: Campos et al. (2016).

Las cumarinas son otra de las clases de metabolitos secundarios que se han reportado en *Baccharis* spp., pero su presencia se restringe a unas pocas especies, lo que las convierte en componentes de interés quimiotaxonómico (Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016). Sólo se han reportado cuatro especies del género con presencia de cumarinas: *B. darwini* (que biosintetiza las cumarinas preniladas anisocumarina H 23, aurapteno 24 y diversinina 25), *B. grisebachii* (en que fueron reportados 8 derivados del ácido *p*-cumárico), *B. salicifolia* (con presencia de escopoletina 26) y *B. tricuneata* (sintetizando escopolina 27) (Figura 15) (Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016).

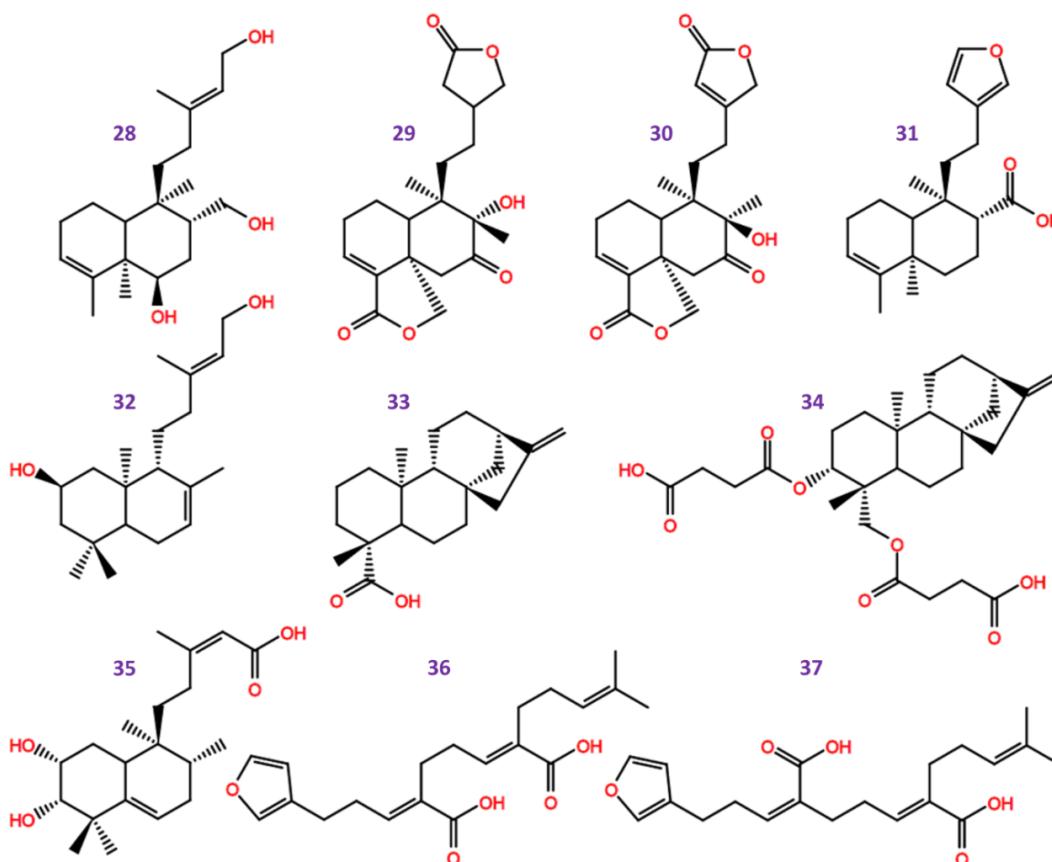


**Figura 15:** Cumarinas de *Baccharis* spp. Referencias: (23): anisocumarina H, (24): aurapteno, (25): diversinina, (26): escopoletina y (27): escopolina. Glu: glucosa. Fuente: Campos et al., (2016).



Los diterpenos son los componentes fitoquímicos más comunes del género *Baccharis* L. junto con los flavonoides, principalmente los del tipo *neo* y *ent*-clerodanos, *ent*-labdanos y *ent*-kauranos (Zdero *et al.*, 1989; Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008; Campos *et al.*, 2016). Es interesante que en los reportes de ocurrencia de diterpenos en *Baccharis* spp., en general no se observa un mismo compuesto para más de una especie, por lo que son productos naturales de gran importancia quimiotaxonómica (Campos *et al.*, 2016).

En la Figura 16 se muestran las estructuras de diterpenos del tipo *neo*-clerodanos, como por ejemplo el platypodiol (28 en *B. platypoda*), y el gaudichanólido A (29) y bacchariol (30) característicos de *B. gaudichaudiana* (Abad y Bermejo, 2007; Campos *et al.*, 2016). Otras estructuras de diterpenos de *Baccharis* spp. se muestran en al Figura 16. Estos compuestos presentan un amplio rango de actividades biológicas, como citotóxica (gaudichanólidos), actividad anti-alimentaria de insectos plaga (*neo*-clerodanos), antiofídica y efecto vasorelajante del músculo liso, entre otras (Verdi *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007).



**Figura 16:** Diterpenos de *Baccharis* spp. Referencias: (28): platypodiol, (29): gaudichanólido A, (30): bacchariol, (31): ácido bacchabolívico, (32): 13-(E)-15,2β-dihidroxi-ent-labda-7,13-dieno, (33): ácido

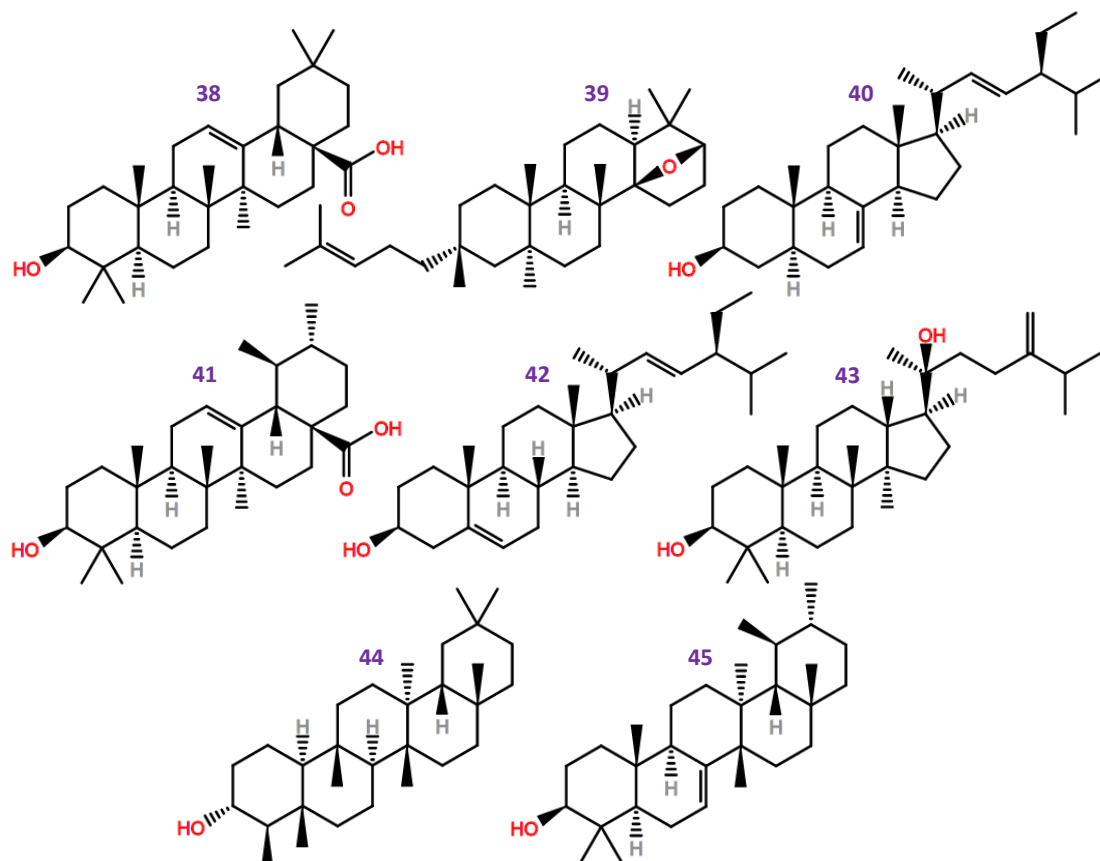




kaurenoico, (34): ent-3 $\alpha$ ,19-(disuccinoiloxi)-kaur-16-eno, (35): ácido salicifólico, (36): ácido (6E,10E)-timifodioico y (37): ácido (6E,10Z)-timifodioico. Fuente: Campos et al., (2016).

En cuanto a los triterpenos y esteroides de *Baccharis* spp., la cantidad y diversidad de componentes reportados es elevada (mayor a 100), tanto en la forma de agliconas libres como saponinas (glicósidos) (Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Budel et al., 2008; Campos et al., 2016).

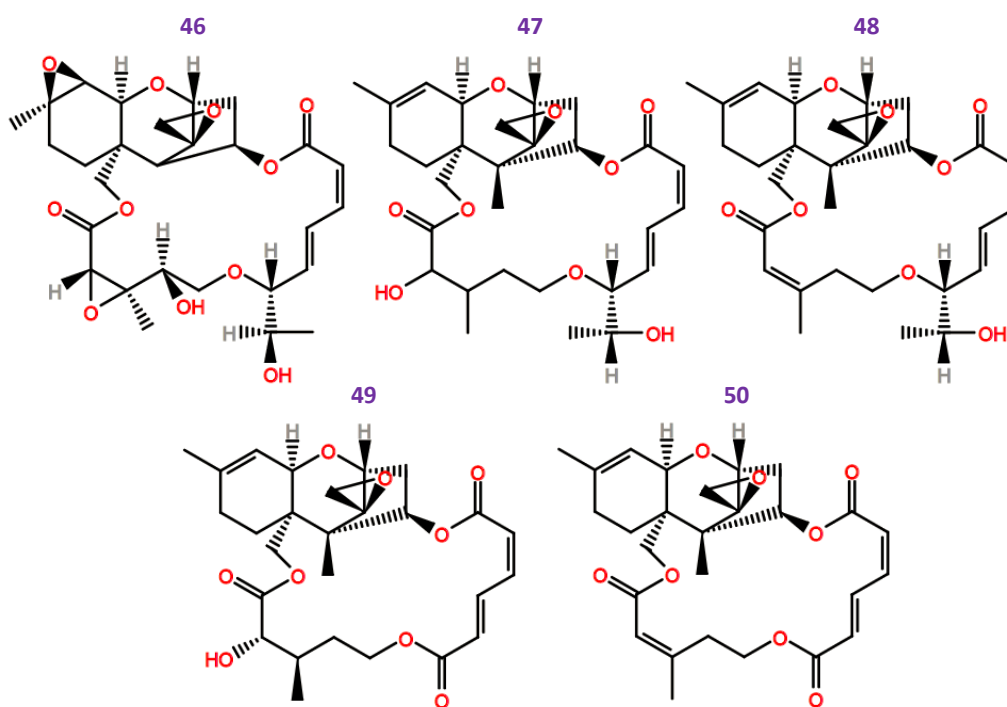
En la Figura 17 se representa la estructura del ácido oleanólico (38; bioactivo como deterrente de insectos fitófagos) que ha sido reportado en al menos 24 especies del género; el óxido de *Baccharis* (39) registrado en 17 especies; el  $\alpha$ -espinasterol (40; C<sub>29</sub>) que ha sido informado para *B. illinita*, *B. pseudotenuifolia* y *B. tenuifolia*; y el ácido ursólico (41) reportado en *B. uncinella* y *B. ligustrina*, entre otras (Verdi et al., 2005; Abad y Bermejo, 2007; Campos et al., 2016). Los demás triterpenos y esteroides de la Figura 17 han sido aislados y caracterizados para una única especie de *Baccharis* L.



**Figura 17:** Triterpenos de *Baccharis* spp. Referencias: (38): ácido oleanólico, (39): óxido de *Baccharis*, (40):  $\alpha$ -espinasterol, (41): ácido ursólico, (42): estigmasterol, (43): foliasalacina A4, (44): friedelanol y (45): baurenol. Fuente: Campos et al., (2016).



Con respecto a los tricotecenos, originalmente se planteó la hipótesis de que los mismos fueran producidos por hongos mutualistas, aunque posteriormente se confirmó que se trata de agentes defensivos (anti-alimentarios) sintetizados por las plantas para combatir a los animales herbívoros, encontrándose en todos los órganos y especialmente en las flores y frutos (Jarvis *et al.*, 1991; Verdi *et al.*, 2005). Algunos de los tricotecenos más comunes hallados en *Baccharis* spp. son la baccharina (46), roridina A (47), roridina E (48), verrucarina A (49) y verrucarina J (50) (Figura 18) (Jarvis *et al.*, 1991; Verdi *et al.*, 2005). Además de su papel tóxico para mamíferos e insectos, se ha demostrado que los tricotecenos poseen actividad antiviral, así como se han catalogado como moléculas anticancerígenas promisorias debido a su actividad citotóxica contra variadas líneas celulares tumorales (Verdi *et al.*, 2005; Budel *et al.*, 2008).

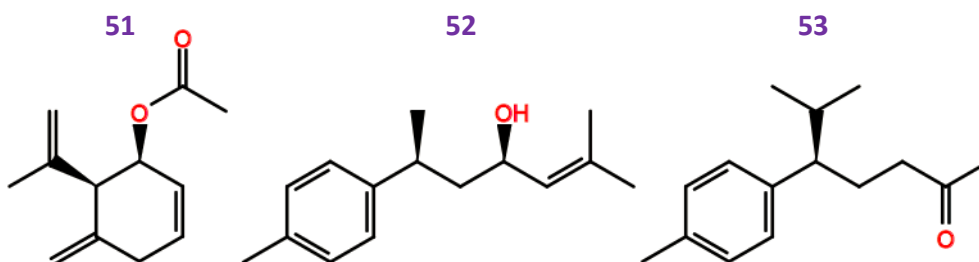


**Figura 18:** Tricotecenos de *Baccharis* spp. Referencias: (46): baccharina, (47): roridina A, (48): roridina E, (49): verrucarina A y (50): verrucarina J. Fuente: Verdi *et al.* (2005).

En el caso de los monoterpenos y los sesquiterpenos de *Baccharis* spp., los mismos se biosintetizan en plantas como fuera detallado anteriormente (Parte 4 de la Sección 1 de éste capítulo) para formar parte de los aceites esenciales, ampliamente distribuidos en el género (Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008; Bogo *et al.*, 2016). Los compuestos de ésta clase más comúnmente reportados en *Baccharis* L. son igualmente comunes a la mayor parte de las plantas aromáticas, por ejemplo:  $\alpha$  y  $\beta$ -pinenos,

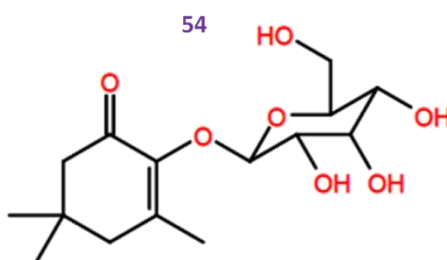


limoneno, mirceno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, (*E*)- $\beta$ -cariofileno, germacreno D, (*E*)-nerolidol, espatulenol, óxido de cariofileno, etc. (ver sus estructuras en el capítulo 4) (Adams, 2007; Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008; Bogo *et al.*, 2016). Por otra parte, algunas estructuras informadas en la literatura resultan novedosas y de ocurrencia restringida, como es el caso del monoterpene irregular acetato de carquejilo (51) de *B. trimera* (se discutirá en los capítulos 4, 7 y 8) y los sesquiterpenos bisacumol (52) y bacchariscetona (53), aislados de *B. dracunculifolia* (Figura 19) (Abad y Bermejo, 2007; Budel *et al.*, 2008; Bogo *et al.*, 2016; Campos *et al.*, 2016).



**Figura 19:** Algunos mono y sesquiterpenos novedosos de *Baccharis* spp. Referencias: (51) acetato de carquejilo, (52): bisacumol, (53): bacchariscetona. Fuente: Campos *et al.*, (2016).

Recientemente se ha reportado la ocurrencia en las partes aéreas de *Baccharis trimera* de un C<sub>9</sub> norisoprenoide glicosidado no volátil: [2( $\beta$ -D-glucopiranosil)-3,5,5-trimetil-2-ciclohexen-1-one] (trimerósido, 54), el que es el primero de su tipo informado en la literatura del género (Figura 20) (dos Santos *et al.*, 2018).

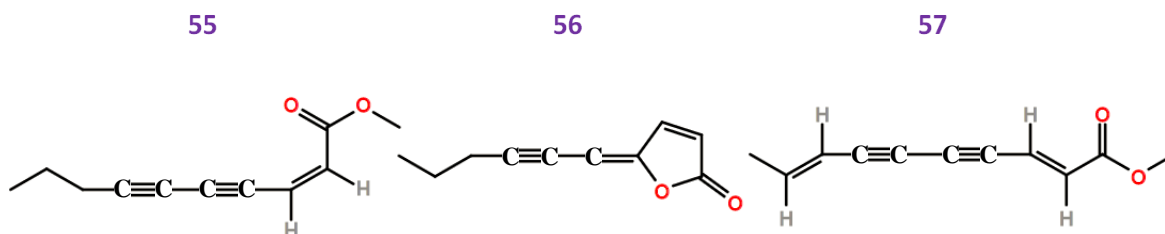


**Figura 20:** Trimerósido, C<sub>9</sub> norisoprenoide glicosilado aislado de partes aéreas de *B. trimera*. Fuente: dos Santos *et al.* (2018).

Finalmente, los poliacetilenos son otra de las clases de metabolitos secundarios presentes en miembros del género *Baccharis* L., aunque su ocurrencia no es ubicua sino que se restringe a algunas pocas especies (Christensen y Lam, 1991). Ejemplos de ellos son: el éster de (*Z*)-lachnophyllum (55) y su respectiva lactona (56), y el éster de matricaria (57) que han sido aislados de varias *Baccharis* spp. (Figura 21) (Christensen



y Lam, 1991). Los aspectos de la particular y distintiva biosíntesis (formación de triple enlace carbono-carbono) de éste grupo de productos naturales, así como otras estructuras presentes en *Baccharis* spp. y el detalle de su bioactividad se presentarán en el capítulo 9 de ésta tesis.



**Figura 21:** Poliacetilenos de *Baccharis* spp. Referencias, (54): éster de (*Z*)-lachnophyllum, (55): lactona de lachnophyllum, (56): éster de matricaria. Fuente: Christensen y Lam (1991).

## BIBLIOGRAFÍA

1. M.J. Abad, P. Bermejo. **2007**. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7: 76-96.
2. A.L. Aboy, M.A. Apel, S. Debenedetti, L. Francescato, M.A. Rosella, A.T. Henriques. **2012**. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1219: 147-153.
3. R.P. Adams. **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 804 pp.
4. E. Alonso-Paz, M.J. Bassagoda, F. Ferreira. **2007**. Yuyos. Uso racional de las plantas medicinales, 2ª edición. Editorial Fin de Siglo, Montevideo, Uruguay. 224 pp.
5. S. Azirak, S. Karaman. **2008**. Allelopathic effect of some essential oils and components on germination of weed species. *Acta Agric. Scand. B*, 58: 88-92.
6. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. **2008**. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446-475.
7. I.T. Baldwin, R. Halitschke, A. Paschold, C.C. von Dahl, C.A. Preston. **2006**. Volatile signaling in plant-plant interactions: “talking trees” in the genomics era. *Science*, 311: 812-815.
8. A. Bandoni (ed.). **2000**. Los Recursos Vegetales Aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 410 pp.
9. A. Bandoni, E. Dellacassa. **2010**. Importancia de las plantas aromáticas en el contexto internacional. En E. Dellacassa (ed.): Normalización de productos naturales obtenidos de especies de la Flora Aromática Latinoamericana: proyecto CYTED IV.20. ediPUCRS, Porto Alegre, Brasil; pp. 11-14.
10. G.E. Barboza, J.J. Cantero, C. Núñez, A. Pacciaroni, L. Ariza Espinar. **2009**. Medicinal Plants: A general review and a phytochemical and ethnopharmacological screening of the native Argentine Flora. *Kurtziana*, 34: 7-365.
11. G.M. Barroso. **1976**. Compositae. Subtribu Baccharidinae Hoffmann. Estudio das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguesia*, 40: 3-273.
12. R. Baumes, J. Wirth, S. Bureau, Y. Gunata, A. Razungles. **2002**. Biogenesis of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines. *Anal. Chim. Acta*, 458: 3-14.
13. G. Bergström. **2007**. Chemical ecology = chemistry + ecology! *Pure Appl. Chem.*, 79: 2305-2323.
14. C. Bicchi, A. D’Amato, P. Rubiolo. **1999**. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavor fields. *J. Chromatogr. A*, 843: 99-121.
15. C. Bicchi, M. Maffei. **2012**. The Plant Volatilome: Methods of Analysis. In J. Normanly (ed.): High-Throughput Phenotyping in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 918. Springer Science + Business Media LLC, New York, NY, USA; pp. 289-310.



16. A. Bogo, M.H. de Andrade, J.P. de Paula, P.V. Farago, P.M. Döll-Boscardin, J.M. Budel. **2016**. Comparative analysis of essential oils of *Baccharis* L.: a review. *Revista Stricto Sensu*, 1: 1-11.
17. F. Bohlmann, C. Zdero. **1969**. Über neue terpenoide aus *Baccharis trimera*. *Tetrahedron Lett.*, 28: 2419-2421.
18. J. Bohlmann, C.I. Keeling. **2008**. Terpenoids biomaterials. *Plant J.*, 54: 656-669.
19. R. Braz-Filho. **1994**. Química de Produtos Naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. *Quim. Nova*, 17: 405-445.
20. W.S. Brud. **2010**. Industrial Uses of Essential Oils. In H. Can Başer, G. Buchbauer (eds.): Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, Boca Raton, FL, USA; pp. 843-854.
21. J. Bruneton. **1993**. Farmacognosia, Fitoquímica y Plantas Medicinales. 2ª edición. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. 1099 pp.
22. J.M. Budel, N.I. Matzenbacher, M.R. Duarte. **2008**. Genus *Baccharis* (Asteraceae): a review of chemical and pharmacological studies. In: V.K. Singh, J.N. Govil (eds.). Phytopharmacology and therapeutic values III. Recent Progress in Medicinal Plants, Volume 21. Studium Press LLC, Houston, TX, USA; pp.1-18.
23. J.M. Budel, M. Wang, V. Raman, J. Zhao, S.I. Khan, J.U. Rehman, N. Techen, B. Tekwani, L.M. Monteiro, G. Heiden, I.J.M. Takeda, P.V. Farago, I.A. Khan. **2018**. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. *Molecules*, 23: 2620-2679.
24. L.Camesasca, M.Minteguiaga, L.Fariña, V.Salzman, P.S.Aguilar, C.Gaggero, F.Carrau. **2018**. Overproduction of isoprenoids by *Saccharomyces cerevisiae* in a synthetic grape juice medium in the absence of plant genes. *Int. J. Food Microbiol.*, 282: 42-48.
25. F.R. Campos, J. Bressan, V.C.G. Jasinski, T. Zuccolotto, L.E. da Silva, L.B. Cerqueira. **2016**. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. *Chem. Biodiversity*, 13: 1-17.
26. H. Can Başer, G. Buchbauer (eds.). **2010**. Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 975 pp.
27. S. Cañigual, E. Dellacassa, A. Bandoni. **2003**. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? *Acta Farm. Bonaerense*, 22: 265-278.
28. F.M. Carrau, K. Medina, E. Boido, L. Fariña, C. Gaggero, E. Dellacassa, G. Versini, P.A. Henschke. **2005**. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.*, 243: 107-115.
29. E. Castiñeira Latorre, A. Canavero, M.L. Pochettino. **2018**. Comparison of medicinal plant knowledge between rural and urban people living in the Biosphere Reserve "Bioma Pampa-Quebradas del Norte", Uruguay: an opportunity for biocultural conservation. *Ethnobiol. Conserv.*, 7: 4, 34 pp.
30. J. Corley. **2004**. Natural Fragrance Ingredients. Trends and challenges. *Perfumer & Flavorist*, 29: 26-32.
31. P. de Montenegro. **1711** (reedición **2007**). Materia Médica Misionera. Editorial Universitaria, Universidad Nacional de Misiones, Posadas, Argentina. 313 pp.
32. J. Dai, R. Suttisri, E. Bordas, D.D. Soejarto, D. Kinghorn. **1993**. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry*, 34: 1087-1090.
33. F.C. Damasceno, K.P. Nicolli, E.B. Caramão, G.L.G. Soares, C.A. Zini. **2010**. Change in the Volatile Organic Profile of *Schinus polygamus* (Anarcadiaceae) and *Baccharis spicata* (Asteraceae) Induced by Galling Psyllids. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21: 556-563.
34. S. Danishefsky. **2010**. On the potential of Natural Products in the discovery of Pharma leads: A case for reassessment. *Nat. Prod. Rep.*, 27: 1114-1116.
35. D. Davyt, E. Dellacassa, F. Ferreira, P. Menéndez, P. Moyna, A. Vázquez. **1991**. Phytochemical screening of Uruguayan medicinal plants. *Fitoterapia*, 62: 519-521.
36. J. Degenhardt, T.G. Kollner, J. Gershenzon. **2009**. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70: 1621-1637.
37. E. Dellacassa, P. Moyna, A. Nieto. **2004**. Antecedentes generales sobre el Sector de las Plantas Medicinales y Aromáticas y su Potencial en el marco de una integración productiva en el MERCOSUR. En FUNDAQUIM-PROPYMES-URUTEC-FUNDASOL-GTZ: Aportes para el Desarrollo del Sector de Plantas Medicinales y Aromáticas en el Uruguay. Artes Gráficas S.A., Montevideo, Uruguay; pp. 7-27.
38. E. Dellacassa (ed.). **2010**. Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana, ediPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 334 pp.
39. P.M. Dewick. **2009**. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach. 3<sup>rd</sup> edition. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK. 539 pp.



40. N. Dudareva, E. Pichersky, J. Gershenzon. 2004. Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiol.*, 135: 1893-1902.
41. W.C. Evans, G.E. Trease. 1991. Farmacognosia, 13ª edición, McGraw-Hill Interamericana, México D.F., México. 901 pp.
42. D.S. Fabricant, N.R. Farnsworth. 2001. The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drug Discovery. *Environ. Health Perspect.*, 109: 69-75.
43. Farmacopea Nacional Argentina VI ed. 1978. Codex Medecamentarius Argentino, BuenosAires; pp. 213-215.
44. [Farmacopea Brasileira], Vol. 2. Monografias, 5ª edição, 2010. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz. Brasília, Brasil; pp. 744-747.
45. V.L. Ferracini, L.C. Paraíba, H.L. Leitão Filho, A.G. da Silva, L.R. Nascimento, A.J. Marsaioli. 1995. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *J. Essent. Oil Res.*, 7: 355-367.
46. T.S. Ferreira, C.Z. Moreira, N.Z. Cária, G. Victoriano, W.F. Silva Jr., J.C. Magalhães. 2014. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 16: 290-298.
47. R.J. Forbes. 1970. A Short History of the Art of Distillation: From the Beginnings Up to the Death of Cellier Blumenthal. Brill Publishers, Leiden, The Netherlands. 405 pp.
48. C. Franz (ed.). 1997. Essential Oils Basic and Applied Research. Proceedings of the 27<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils. Allured Publishing Corporation, Vienna, Austria. 171 pp.
49. S.E. Freire, E. Urtubey, D.A. Giuliano. 2007. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*, 29: 23-38.
50. A Fukushima, M. Kusano, H. Redesting, M. Arita, K. Saito. 2009. Integrated omics approaches in plant systems biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13: 532-538.
51. D.A. Giuliano. 2001. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 39: 131-154.
52. D.A. Giuliano. 2005. New infragenera in *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Novon*, 15: 534-541.
53. D.A. Giuliano, S.E. Freire. 2011. Nuevas Secciones en *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) de América del Sur. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 98: 331-347.
54. D.A. Giuliano, A. Plos. 2014. *Baccharis* L. En: F. Zuloaga, M. Belgrano, A.M. Antón (eds.): Flora vascular de la República Argentina 7(1): Dicotyledoneae-Asteraceae (Anthemideae a Gnaphalieae), 1<sup>era</sup> edición. Instituto de Botánica Darwinion, Buenos Aires; pp. 43-123.
55. A.M. Giulietti, R.M. Harley, L.P. De Queiroz, M.dG. Wanderley, C. Van den Berg. 2005. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiversidade*, 1: 52-61.
56. R. Glass. 2004. Producción y Comercialización de Plantas Medicinales y Fitoterápicos. En FUNDAQUIM-PROPYMES-URUTEC-FUNDASOL-GTZ: Aportes para el Desarrollo del Sector de Plantas Medicinales y Aromáticas en el Uruguay. Artes Gráficas S.A., Montevideo, Uruguay; pp. 28-38.
57. L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes. 2007. Plantas Medicináis: Fatores de Influência no conteúdo de Metabólitos Secundários. *Quim. Nova*, 30: 374-381.
58. A. González, F. Ferreira, A. Vázquez, P. Moyna, E. Alonso Paz. 1993. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, 39: 217-220.
59. M. Guentert. 2007. The Flavor and Fragrance Industry-Past, Present and Future. In R.G. Berger (ed.). Flavor and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability, Springer Verlag, Berlin, Germany; pp. 1-14.
60. E. Guenther. 1948 (reprint 2008). The Essential Oils. Vol. 1: History-Origin in Plants-Production, Analysis.. Read Books Ltd., Worcestershire, UK. 456 pp.
61. Y.G. Guillij, R.M. Gleiser, J.A. Zygadlo. 2008. Mosquito repellent activity of essential oils of aromatic plants growing in Argentina. *Biores. Techn.*, 99: 2507-2515.
62. A. Gurib-Fakim. 2006. Medicinal Plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molec. Aspects Med.*, 27: 1-93.
63. T. Hartmann. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 68: 2831-2846.
64. M.N. Hassan, Z. Zainal, I. Ismail. 2015. Green leaf volatiles: biosynthesis, biological functions and their applications in biotechnology. *Plant Biotechnol J.*, 13: 727-739.
65. G. Heiden. 2005. O gênero *Baccharis* L. seção Caulopterae DC. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul. Tese Graduação. Universidade Federal de Pelotas, Brasil. 238 pp.
66. G. Heiden, J.R. Vieira Iganci, V.L. Bobrowski, L. Macias. 2007. Biogeografia de *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 58: 787-796.
67. G. Heiden, J.R. Vieira Iganci, L. Macias. 2009. *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 60: 943-983.



68. G. Heiden, J.R. Pirani. 2014. Two new species of *Baccharis* subgen. *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) with single flowered female capitula from the Serra do Cipó, Minas Gerais, Brazil. *Phytotaxa*, 164: 141-148.
69. G. Heiden, J.R. Pirani. 2016a. Taxonomy of *Baccharis* subgen. *Tarchonanthoides* (Asteraceae: Astereae: Baccharidinae), a group from the southeastern South American grasslands and savannas. *Phytotaxa*, 241: 1-70.
70. G. Heiden, J.R. Pirani. 2016b. Novelities towards a phylogenetic infrageneric classification of *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Phytotaxa*, 289: 285-290.
71. U. Heinig, M. Gutensohn, N. Dudareva, A. Aharon. 2013. The challenges of cellular compartmentalization in plant metabolic engineering. *Curr. Opin. Biotech.*, 24: 239-246.
72. M. Hórák. 2015. Metodología de la Investigación en la Etnobotánica. En: M. Hórák (ed.): Etnobotánica y Fitoterapia en América. 1<sup>era</sup> edición. Editora Universidad de Mendel en Brno, Brno, República Checa; pp. 25-30.
73. K. Hosstetmann (ed.). 2014. Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK. 1103 pp.
74. INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria). 2004. Estudios en Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas, Serie FPTA-INIA 11, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay. 261 pp.
75. B.B. Jarvis, N. Mokthari-Rejali, E.P. Schenkel, C.S. Barrios, N.I. Matzenbacher. 1991. Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 30: 789-797
76. K. Kapp. 2015. Polyphenolic and Essential Oil Composition of *Mentha* and Their Antimicrobial Effect. PhD Thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland. 90 pp.
77. A. Kar. 2007. Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology. 2<sup>nd</sup> edition. New Age International Publishers Ltd., New Dehli, India. 879 pp.
78. P.B. Kaufman, L.J. Cseke, S. Warber, J.A. Duke, H.L. Brielmann. 1999. Natural Products from Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 309 pp.
79. J. Kesselmeier, M. Staudt. 1999. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOCs): An Overview on Emission, Physiology and Ecology, *J. Atmosph. Chem.*, 33: 23-88.
80. W.A. Köning, A. Krüger, D. Icheln, T. Runge. 1992. Enantiomeric composition of the Chiral Constituents in Essential Oils. *J. High Resol. Chromatogr.*, 15: 184-189.
81. W.A. Köning. 1998. Enantioselective Capillary Gas Chromatography in the Investigation of Stereochemical Correlations of Terpenoids. *Chirality*, 10: 499-504.
82. K.H. Kubeczka. 2010. History and Source of Essential Oil Research. In: H. Can Başer, G. Buchbauer (eds.): Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, Boca Raton, USA; pp 3-38.
83. B.M. Lange, G.W. Turner. 2013a. Terpenoid biosynthesis in trichomes-current status and future opportunities. *Plant Biotech. J.*, 11: 2-22.
84. B.M. Lange, A.Ahkami. 2013b. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes-current status and future opportunities. *Plant Biotechnol. J.*, 11: 169-196.
85. J.C. Lindon, J.K. Nicholson. 2008. Analytical technologies for Metabonomics and Metabolomics, and multi-omic information recovery. *Trends Anal. Chem.*, 27: 194-204.
86. P. Lombardo, A. Guimaraens, J. Franco, E. Dellacassa, E. Pérez Faggiani. 2016. Effectiveness of essential oils for postharvest control of *Phyllosticta citricarpa* (citrus black spot) on citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.*, 121: 1-8.
87. A.A.S.G. Lonni, I.S. Scarminio, L.M.C. Silva, D.T. Ferreira. 2003. Differentiation of species of the *Baccharis* genus by HPLC and chemometric methods. *Anal. Sci.*, 19: 1013-1017.
88. A.A.S.G. Lonni, I.S. Scarminio, L.M.C. Silva, D.T. Ferreira. 2005. Numerical taxonomy characterization of *Baccharis* genus species by Ultraviolet-Visible spectrophotometry. *Anal. Sci.*, 21: 235-239.
89. F. Loreto, M. Dicke, J.P. Schnitzler, T.C.J. Turlings. 2014. Plant volatiles and the environment. *Plant Cell Environ.*, 37: 1905-1908.
90. K. Ložiene, P.R. Venskutonis. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33: 517-525.
91. A. Lubbe, R. Verpoorte. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for speciality industrial materials. *Ind. Crops Prod.*, 34: 785-801.
92. E. Marchesi, P. Davies. 2004. Especies vegetales autóctonas e introducidas presentes en el territorio de Uruguay consideradas como aromáticas y/o medicinales en relación con los datos de uso popular. En INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria), Estudios en Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas, Serie FPTA-INIA 11, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay; pp. 179-192.



93. V. Martín, F. Giorello, L. Fariña, M. Minteguiaga, V. Salzman, E. Boido, P.S. Aguilar, C. Gaggero, E. Dellacassa, A. Mas, F. Carrau. **2016.** *De novo* synthesis of benzenoid compounds by the yeast *Hanseniaspora vineae* increases the flavor diversity of wines. *J. Agric. Food. Chem.*, 64: 4574-4583.
94. C.M. Martín, J.L. Valverde. **1995.** La farmacia en la América Colonial. El arte de preparar medicamentos. Editorial Universidad de Granada y Hermandad Farmacéutica Granadina, Granada, España. 626 pp.
95. M. Martins, M. Henriques, J. Azeredo, S.M. Rocha, M.A. Coimbra, R. Olivera. **2010.** *Candida* species extracellular alcohols: production and effect in sessile cells. *J. Basic. Microbiol.*, 50: S89-97.
96. K. Matsui. **2006.** Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 9: 274-280.
97. M. M. Mendes-Pinto. **2009.** Carotenoid breakdown products-the norisoprenoids- in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.*, 483: 236-245.
98. R. Mitra, B. Mitchel, C. Gray, J. Orbell, T. Coulepis, M.S. Muralitharan. **2007.** Medicinal Plants of Brazil. *APBN*, 11: 689-706.
99. A. Mithöfer, W. Boland. **2012.** Plant Defense Against Herbivores: Chemical Aspects. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, 63: 431-450.
100. W.B. Mors, C.T. Rizzini, N. Alvares Pereira, R.A. De Filipps. **2000.** Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications Inc, Algonac, MI, USA. 501 pp.
101. J. Müller. **2006.** Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia including an overview of the Genus. *System. Bot. Monogr.*, 76: 1-341.
102. J. Müller. **2014.** The alate species of *Baccharis* (Compositae-Astereae) of the North Andes. *System. Bot.*, 39: 980-987.
103. D. Negreiros, D. Esteves, G.W. Fernandes, R.L.L. Berbara, Y. Oki, M. Vichiato, C. Chalub. **2014.** Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) in response to a nutrient gradient. *Trop. Ecol.*, 55: 167-176.
104. G.L. Nesom. **1988.** *Baccharis* sect. *Baccharidastrum* (Compositae:Asteraceae), including two monoecious and one dioecious species. *Phytologia*, 65: 169-173.
105. G.L. Nesom. **1990.** Infrageneric taxonomy of North and Central American *Baccharis* (Asteraceae:Astereae). *Phytologia*, 68: 40-46.
106. T. Parliment. **2002.** Solvent Extraction and Distillation Techniques. In R. Marsili (ed.). Flavor, Fragrances and Odor Analysis. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA; pp. 1-23.
107. B.B. Petrovska. **2012.** Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn. Rev.*, 6: 1-5.
108. J.A. Pino. **2015.** Aceites Esenciales. Química, Bioquímica, Producción y Usos. Editorial Universitaria, La Habana, Cuba. 209 pp.
109. S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi. **2007.** Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*, 1163: 2-24.
110. C.L. Queiroga, A. Fukai, A.J. Marsaioli. **1990.** Composition of the essential oil of Vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.*, 1: 105-109.
111. A.C.S. Rabelo, D.C. Costa. **2018.** A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. *Chem. Biol. Interact.*, 296: 65-75.
112. S. Rasmann, T.C.J. Turlings. **2008.** First insights into specificity of belowground tritrophic interactions. *Oikos*, 117: 362-369.
113. D. Retta, E. Dellacassa, J. Villamil, S.A. Suárez, A.L. Bandoni. **2012.** Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: a review. *Ind. Crops Prod.*, 38: 27-38.
114. A.I.A. Ricciardi, C. Chifa. **2015.** Las plantas medicinales del nordeste argentino en las crónicas de la época de la Colonia. Ediciones Elemento, Buenos Aires, Argentina. 80 pp.
115. B.V. Ricciardi-Verrastro, A.M. Torres, F.J. Camargo, E. Dellacassa. **2016.** Validación del uso tradicional de especies de *Asclepias* contra el veneno de *Bothrops diporus* (yarára chica) en el Nordeste de Argentina. *Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. Arom.*, 15: 112-121.
116. J.A. Ringuet, S. Viña (eds.). **2013.** Productos Naturales Vegetales. Editorial de la Universidad de la Plata, La Plata, Argentina. 258 pp.
117. L. Ruzicka. **1953.** The Isoprene Rule and the Biogenesis of Terpenic Compounds. *Experientia*, 9: 357-396.
118. N.Y. Saad, C.D. Muller, A. Lobstein. **2013.** Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their component. *Flavour Fragr. J.*, 28: 269-279.
119. V.A. Sayuri, P. Romoff, O. A. Fávero, M.J.P. Ferreira, J.H.G. Lago, F.O.S. Buturi. **2010.** Chemical Composition, Seasonal Variation and Biosynthetic Considerations of Essential Oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chem. Biodiversity*, 7: 2771-2782.





120. S.M. Scheffer-Basso, R. Lubenow, C.M. Carneiro, S.O. Chini. 2008. Morfofisiologia da rebrota de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae: subsídios para seu controle em pastagens naturais. *Biotemas*, 21: 31-37.
121. A.A. Schneider. 2009. Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 197 pp.
122. A.A. Schneider, G. Heiden, I.I. Boldrini. 2011. *Baccharis scopolorum*, a new species of section Caulopterae (Asteraceae: Astereae) from rocky cliffs of southern Brazil. *Phytotaxa*, 15: 9-14.
123. L.M. Schoonhoven, J.J.A. Van Loon, M. Dicke. 2005. Insect-Plant Biology. 2<sup>nd</sup> edition, Oxford University Press, Oxford, UK. 421 pp.
124. J. Schripsema, D. Dagnino. 2014. Metabolomics. In K. Hosstetmann (ed.): Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods. John Wiley and Sons Ltd., Chichester, UK; pp 885-902.
125. J. Schripsema, M.A. Lemos, D. Dagnino, F.J. Luna. 2019. Carqueja (*Baccharis* sect. Caulopterae), a critical review of its history, phytochemistry and medicinal use: problems of ethnopharmacology in Latin America. *Phytochem. Rev.*, in press, DOI: 10.1007/s11101-019-09616-0.
126. T.D. Sharkey, A.E. Wiberley, A.R. Donohue. 2008. Isoprene Emission from Plants: Why and How. *Ann. Bot.*, 101: 5-18.
127. K. Shimizu, S.K. Das, T. Hashimoto, Y. Sowa, T. Yoshida, T. Sakai, Y. Matsuura, K. Kanazawa. 2005. Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1 arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. *Molec. Carcinog.*, 44: 293-299.
128. M.S. dos Santos, J. da Silva, A.P.S. Menezes, F.M.C. de Barros, M.L.B. Lemes, R.R. Rossatto, C. Feistel, I.D. de Almeida, I. Grivicich, L. Prado, J.N. Picada, A.d.B.F. Ferraz. 2018. Biotoxicological Analyses of Trimeroside from *Baccharis trimera* Using a Battery of *In Vitro* Test Systems. *Oxid. Med. Cell. Long.*, Article ID 7804135.
129. C.A. Simões-Pires. 2004. Avaliação química e biológica de extratos de *Baccharis* pertencentes à seção Caulopterae. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 174 pp.
130. C.A. Simões-Pires, S. Debenedetti, E. Spegazzini, L.A. Mentz, N.I. Matzenbacher, R.P. Limberger, A.T. Henriques. 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.*, 253: 23-32.
131. L.W. Sumner, P. Mendes, R.A. Dixon. 2003. Plant Metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry*, 62: 817-836.
132. R. Suttisri, A.D. Kinghorn, A. Wright, O. Sticher. 1994. Neo-Clerodane diterpenoids and other constituents from *Baccharis genistelloides*. *Phytochemistry*, 35: 443-446.
133. G.B. Tognon, F.L. Cuquel. 2016. Ornamental potential use of *Baccharis milleflora* and *Baccharis tridentata* as ornamental cut foliage. *Ciência Rural*, 46: 70-75.
134. K.B.G. Torsell. 1997. Natural Product Chemistry. A mechanistic, biosynthetic and ecological approach. Apotekarsocieteten and Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, Sweden. 480 pp.
135. J. Varela-Ubillos. 2016. Búsqueda de actividad anti-*Trypanosoma cruzi* en plantas del Uruguay. Tesis de Doctorado, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 95 pp.
136. L.G. Verdi, I.M.C. Brighente, M.G. Pizzolatti. 2005. Gênero *Baccharis*: aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Quim. Nova*, 28: 85-94.
137. P. Winterhalter, R. Rouseff. 2001. Carotenoid-Derived Aroma Compounds: An Introduction. In: P. Winterhalter, R. Rouseff. (eds.) Carotenoid-Derived Aroma Compounds. ACS Symposium Series, Vol. 802. ACS, Washington DC., USA; pp 1-17.
138. P. Winterhalter, S.E. Ebeler. 2013. In: P. Winterhalter, S.E. Ebeler (eds.) Carotenoid Cleavage Products. ACS Symposium Series Vol. 1134. ACS, Washington DC., USA; pp 1-9.
139. C. Zdero, F. Bohlmann, R.M. King, H. Robinson. 1986. Diterpene glycosides and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 25: 2841-2855.
140. C. Zdero, F. Bolhmann, J. Solomon, R. King, H. Robinson. 1989. Ent-Clerodanes and other constituents from Bolivian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 28: 531-542.
141. A. Zurbriggen, H. Kirst, A. Melis. 2012. Isoprene production Via the Mevalonic Acid Pathway in *Escherichia coli* (Bacteria). *Bioenerg. Res.*, 5: 814-828.



## Capítulo 2

### Objetivos

#### Objetivo general:

Realizar un estudio químico sistemático del volatilo de poblaciones silvestres de *Baccharis* spp. L. (Asteraceae) en situaciones ambientales definidas, y evaluar la bioactividad de sus extractos, productos puros y derivados semisintéticos.

#### Objetivos específicos:

1. Estudiar y comparar la influencia de diferentes procesos extractivos sobre la composición volátil de *Baccharis* spp. empleando tratamientos estadísticos multivariados. (**CAPITULO 3**).
2. Relevar la composición volátil de *Baccharis* spp. en diferentes condiciones ambientales mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS) como insumo para la clasificación quimiotaxonómica. (**CAPITULO 4**).
3. Evaluar la influencia del dioicismo sobre la composición volátil de *Baccharis* spp. empleando técnicas cromatográficas no convencionales (cromatografía gaseosa-olfatometría GC-O y cromatografía gaseosa enantioselectiva eGC) para la identificación de notas aromáticas diferenciales y resolución quiral de componentes mayoritarios. (**CAPITULO 5**).
4. Indagar la influencia de la estacionalidad y las variables ambientales sobre el metabolismo volátil de poblaciones seleccionadas de *Baccharis* spp., realizando cuantificación de los componentes mayoritarios mediante cromatografía gaseosa convencional (GC-FID) a lo largo de una temporada de crecimiento. (**CAPITULO 6**).
5. Reconocer la importancia de la localidad geográfica de las poblaciones sobre la composición volátil de *Baccharis* spp., realizando una caracterización biotípica de una población de referencia a través del estudio de la morfo-anatomía, histoquímica y composición fitoquímica detallada; y comparación interpoblacional. (**CAPITULO 7**).



6. Aislar compuestos monoterpénicos irregulares de *Baccharis* spp. y realizar modificaciones semi-sintéticas originales para la obtención de estructuras novedosas factibles de estudios espectroscópicos y de química computacional. **(CAPITULO 8).**
7. Caracterizar e identificar compuestos poliacetilénicos en *Baccharis* spp. **(CAPITULO 9).**
8. Obtener un perfil de bioactividad (alexitérica y antiradicalaria) de extractos, compuestos puros y derivados semisintéticos de *Baccharis* spp. **(CAPITULO 10).**



## Capítulo 3

# Métodos de extracción y análisis del volatilo en plantas. El caso de *Baccharis uncinella* DC.

**Resumen:** Diferentes técnicas son empleadas para la extracción del volatilo de las especies vegetales y, en función de las características propias de cada una de ellas es posible obtener distintos niveles de información sobre la composición química de dichas especies. En este capítulo se describirán los fundamentos teóricos de tres técnicas extractivas que serán aplicadas a la especie *Baccharis uncinella* DC: arrastre con vapor de agua (*SD*), extracción-destilación simultánea (*SDE*) y extracción con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico (*SFE*). También se presentarán los métodos analíticos que fueron empleados: cromatografía gaseosa convencional (*GC-FID*), cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (*GC-MS*) y cromatografía líquida de alta eficiencia convencional (*HPLC-UV*). Adicionalmente, se presentará una discusión basada en las curvas extractivas y en la composición química obtenidas para cada una de las técnicas, empleando tratamientos estadísticos multivariados con el objetivo de diferenciar cada una de las muestras. Finalmente, se presentará un análisis primario de la composición no volátil del extracto de *SFE* realizado por *HPLC-UV*.

### 1. INTRODUCCION

#### 1.1 Métodos de extracción de productos naturales volátiles

Como se expuso en el capítulo 1, el volatilo de una especie vegetal puede definirse como el conjunto de componentes volátiles (en general de bajo peso molecular y alta presión de vapor) que la misma sintetiza a través de diferentes vías biosintéticas de manera constitutiva o inducida, como una estrategia defensiva contra el estrés biótico o abiótico (**Bicchi y Maffei, 2012**).

Previo a la implementación de una técnica de extracción de los componentes del volatilo vegetal, se debe tener presente que los mismos se encuentran en un amplio rango de concentración: desde partes por millón (ppm) o partes por trillón (ppt) hasta los mg/L o g/L (**Parliment, 2002; Reineccius, 2007; Bakkali et al., 2008**). Debido a ello, no es sólo necesario extraer dichos componentes, sino también concentrarlos para



su posterior detección (**Parliment, 2002**). Por otra parte, los componentes del volatilo presentan en general un amplio rango de volatilidades (**Parliment, 2002**). También es pertinente establecer que dichos componentes se encuentran originariamente compartimentalizados dentro de una matriz biológica (como en los tricomas glandulares o en los canales esquizógenos), la que debe ser alterada para poder extraerlos (**Parliment, 2002; Dellacassa et al., 2004; Reineccius, 2007; Stashenko, 2009; Pino, 2015**).

Los componentes volátiles vegetales suelen encontrarse en forma libre y/o conjugada con carbohidratos u otras moléculas orgánicas, lo que implica que para su liberación se deben romper enlaces químicos (**Dellacassa et al., 2004**). Otro aspecto importante de la matriz biológica que influye en la composición final obtenida es la presencia de la fracción no volátil, compuesta en su mayoría por lípidos, proteínas y carbohidratos. Esta puede generar espuma y emulsiones que dificultan el proceso de extracción, así como artefactos (compuestos originalmente no presentes en la matriz biológica) originados por la influencia del calor, la presión y cambios de pH sobre dichos componentes (**Parliment, 2002**). En cuanto a la generación de artefactos, se debe tener en cuenta también que algunos componentes volátiles son lábiles *per se* y también pueden sufrir procesos de degradación por calor o por el oxígeno del aire (**Parliment, 2002; Pino, 2015**).

Todas las técnicas que se emplean para la extracción del volatilo tienen sus limitantes y sesgos, por lo que la elección de una u otra depende generalmente de los objetivos de investigación y del destino final que se le dará al extracto, principalmente si el mismo será empleado por sus caracteres organolépticos o por su bioactividad (**Parliment, 2002; Reineccius, 2007; Bakkali et al., 2008; Zhang y Li, 2010**). De acuerdo a ello, el perfil de composición del volatilo varía no sólo debido a factores genéticos, ambientales y estacionales propios de la planta y su entorno (ver capítulos 6 y 7), sino también debido al método de extracción empleado para obtener los componentes (**Parliment, 2002; Reineccius, 2007; Bakkali et al., 2008; Stashenko, 2009; Pino, 2015**). Dicha variación no se produce sólo a nivel cuantitativo y cualitativo, sino que también puede incluir alteración de la composición enantiomérica de los compuestos quirales ópticamente activos (**Bakkali et al., 2008**). Es por dicha razón que es virtualmente imposible obtener dos volatilos o dos aceites esenciales con la misma



composición, lo que es un factor que atenta contra su estandarización como productos comerciales (**Dellacassa et al., 2010**).

Las técnicas empleadas para la extracción del volátiloma vegetal en condiciones de laboratorio son variadas y se pueden clasificar a grandes rasgos como sigue a continuación (**Parliment, 2002; Reineccius, 2007; Bakkali et al., 2008; Zhang y Li, 2010**):

- 1) extracción con solventes y destilación;
- 2) muestreo de “espacio de cabeza” (*headspace techniques*);
- 3) extracción en fase sólida (absorción en polímeros);
- 4) extracción por fluidos supercríticos.

Todas las técnicas citadas pueden emplear materia prima vegetal en estado fresco y/o seco, sin embargo debe tenerse en cuenta que el mismo se encuentre en buenas condiciones sanitarias (por ejemplo, sin necrosis) para una correcta interpretación de los resultados (**Bicchi y Maffei, 2012; Rubiolo et al., 2010**). En éste trabajo de tesis fueron usadas técnicas que pertenecen a las categorías 1 y 4 de las detalladas anteriormente, por lo que a continuación se explicarán los fundamentos de las mismas.

Mientras que a nivel industrial la destilación es la técnica empleada tradicionalmente para la obtención de aceites esenciales de plantas aromáticas (**Dellacassa et al., 2004; Cerpa Chávez, 2007; Stashenko, 2009; Pino, 2015**), otras técnicas se emplean en menor extensión como: enflorado (extracción mediante grasas), y prensado y expresión (por medios mecánicos se extrae el contenido de las glándulas oleosas, siendo el método de referencia para los aceites cítricos) (**Dellacassa et al., 2004; Bakkali et al., 2008; Stashenko, 2009; Pino, 2015**).

### **1.1.1 Destilación (SD)**

Existen varios procedimientos aplicables a la destilación de materiales vegetales aromáticos (**Dellacassa et al., 2004; Cerpa Chávez, 2007; Stashenko, 2009; Pino 2015**):

- 1) arrastre con vapor (*SD: steam-distillation*),

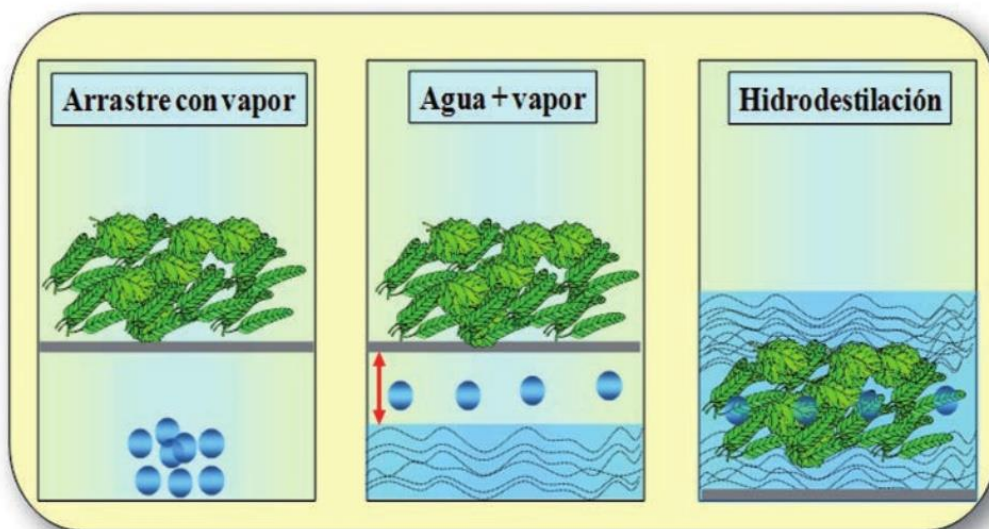


- 2) arrastre con agua-vapor,
- 3) hidrodestilación (*HD: hydro-distillation*) (Figura 1).

En el primer caso, se utiliza vapor de agua seco y sobrecalentado producido desde una fuente externa (caldera) que ingresa a un lecho empacado de material vegetal a una presión mayor a la atmosférica (Cerpa Chávez, 2007; Stashenko, 2009). Cuando el vapor de agua se pone en contacto con los tricomas o canales oleíferos del material, los daña y “arrastra” (suma de presiones de vapor parciales, según la ley de Raoult) los componentes volátiles, estableciéndose un equilibrio termodinámico entre el vapor y el material vegetal (Cerpa Chávez, 2007; Stashenko, 2009). Con ésta metodología en general se extraen aceites esenciales de materiales vegetales en que el contenido oleoso se encuentra en estructuras internas y se precisa mayor presión para su extracción, como es el caso de rizomas, raíces (vetiver, jengibre), semillas y de hojas secas o fermentadas (como por ejemplo el patchouli) (Dellacassa *et al.*, 2004; Reineccius, 2007; Stashenko, 2009).

Para la destilación por arrastre con agua-vapor se emplea vapor húmedo originado de agua en ebullición en el mismo recipiente en que se encuentra el material vegetal (suspendido por una malla metálica o falso fondo apenas por encima del agua, Figura 1) (Dellacassa *et al.*, 2004; Stashenko, 2009). Esta metodología es la que generalmente se aplica para destilar la mayoría de las plantas herbáceas (Stashenko, 2009).

Finalmente, en el caso de la hidrodestilación (*HD*), el material vegetal se sumerge directamente dentro del agua a ebullición (Cerpa Chávez, 2007; Stashenko, 2009; Pino 2015). Sin embargo, es importante destacar que los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación presentan notas aromáticas más fuertes y colores más oscuros que los obtenidos a través de otras metodologías, por lo que se consideran de calidad inferior (Dellacassa *et al.*, 2004). De acuerdo a ello, en éste último caso se pueden producir hidrólisis de los ésteres, y polimerización de los hidrocarburos monoterpénicos acíclicos, generando artefactos (Parliment, 2002; Dellacassa *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Extracción por destilación de aceites esenciales: los diferentes métodos de destilación y su relación espacial con el material vegetal a ser extraído. Fuente: Stashenko (2009).

En todos los casos anteriores el objetivo es alcanzar la presión de vapor requerida para hacer posible la extracción, por destilación, de componentes que se encuentran en bajas concentraciones en la mayor parte de las matrices vegetales a partir de las cuales se desean extraer (Dellacassa *et al.*, 2004; Pino 2015). Con ese objetivo, el arrastre de los compuestos volátiles se produce a una temperatura menor que las de sus puntos de ebullición y que la del agua misma (dado que las presiones de vapor de cada componente se adicionan para dar la presión total del sistema, una consecuencia de la ley de Raoult) (Dellacassa *et al.*, 2004; Stashenko, 2009; Pino, 2015). El proceso se puede visualizar considerando que existe un proceso difusivo de transferencia de masa desde una fase sólida (material vegetal) hacia una fase gaseosa (vapor) durante el pasaje de la segunda a través de la primera (Dellacassa *et al.*, 2004).

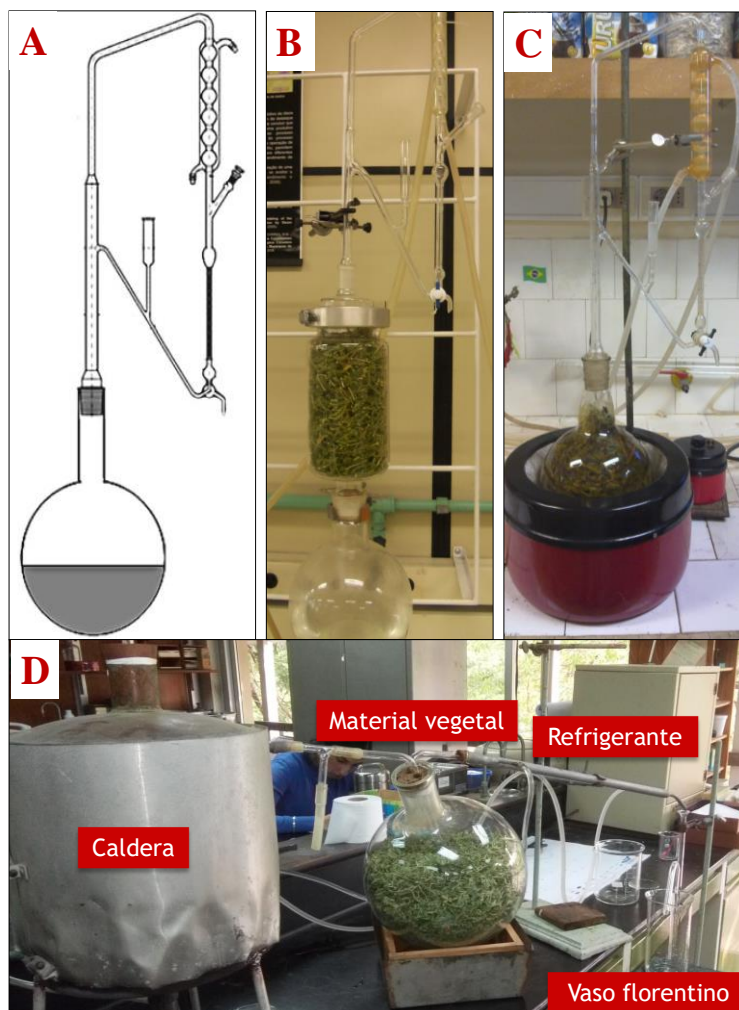
Posterior al arrastre, se produce una etapa de condensación a través de un refrigerante, y, dado que el aceite esencial no es soluble en agua (y en general es más liviano que ésta, aunque existen excepciones), el mismo se separa simplemente por decantación (en un vaso florentino), obteniéndose en simultáneo una suspensión acuosa impregnada en los compuestos aromáticos (hidrolato) (Dellacassa *et al.*, 2004; Reineccius, 2007; Stashenko, 2009; Pino, 2015).

Para la obtención de los aceites esenciales por cualquiera de los procesos descritos de destilación a escala de laboratorio, es usual utilizar el llamado sistema de Clevenger modificado (Figura 2), el que es el método oficial que figura en la Farmacopea Europea





(Clevenger, 1928; Dellacassa *et al.*, 2004; *European Pharmacopoeia*, 2008; Bicchi y Maffei, 2012). Este sistema permite obtener información primaria de rendimiento extractivo de aceites, lo que posibilita a su vez modelar a escala de laboratorio los parámetros fisicoquímicos del proceso de destilación (Cerpa Chávez, 2007; Cassel *et al.*, 2009). Por su parte, desde el punto de vista operacional posibilita la recirculación de agua (cohobación), por lo que es una ventaja en términos de aprovechamiento de recursos (Dellacassa *et al.*, 2004; Bicchi y Maffei, 2012; Pino, 2015). Sin embargo, se debe considerar que el agua de cohobación que retorna al sistema (en un principio fría, pero que luego se calienta en el seno del material vegetal) también ejerce su efecto extractivo y puede disolver componentes hidrosolubles, por lo que algunos autores sostienen que en éste proceso ocurre una “hidrodifusión” o “hidroextracción” (Cerpa Chávez, 2007).



**Figura 2:** Sistemas de destilación empleados en éste trabajo para la obtención de aceites esenciales: A) esquema del dispositivo con trampa de Clevenger, B) destilación por arrastre con agua-vapor (Laboratorio de Operaciones Unitarias, PUCRS), C) hidrodestilación (Cátedra de Farmacognosia y

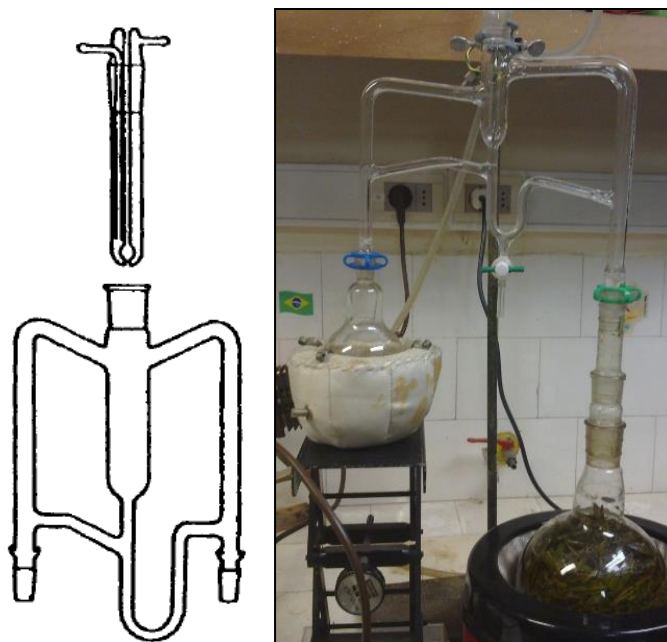


*Productos Naturales, UdelaR* y *D*) arrastre con vapor (*Laboratorio de Productos Naturales, UNNE*).  
Fuente: *Bicchi y Maffei (2012)*.

### 1.1.2 Extracción-destilación simultánea (SDE)

Los componentes volátiles pueden ser eventualmente extraídos desde el material vegetal por disolución en solventes orgánicos (pentano, hexano, diclorometano, éter dietílico, freones, etc.) (**Parliment, 2002**). La extracción con solventes puede ser realizada en *batch* (maceración) o de forma continua a través de extractores del tipo Soxhlet (**Parliment, 2002; Reineccius, 2007**). La desventaja de éste tipo de extracción es que el extracto puede contener compuestos no volátiles como pigmentos (clorofila, xantinas), lípidos, alcaloides, etc.; los que pueden contaminar los sistemas analíticos de cromatografía gaseosa (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002; Reineccius, 2007**). Para evitar dicho problema se ha desarrollado una metodología que combina la destilación con la extracción por solventes, la que se denomina extracción-destilación simultánea (SDE) (**Nickerson y Likens, 1966; Chaintreau, 2001; Parliment, 2002, Rubiolo et al., 2010**).

La metodología de SDE tiene por ventaja que en una etapa primaria de destilación separa la fracción volátil de la no volátil (**Nickerson y Likens, 1966; Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**). El dispositivo empleado (denominado de Likens-Nickerson; Figura 3) permite en su parte central la condensación simultánea del destilado de vapor de agua (generado en un proceso de hidrodestilación o destilación por arrastre con vapor del material vegetal disperso en agua) junto con un solvente orgánico volátil e inmisible, de manera que los compuestos arrastrados por el primero son solubilizados en el segundo, produciéndose un equilibrio de partición bifásico (**Nickerson y Likens, 1966; Chaintreau, 2001; Parliment, 2002; Reineccius, 2007**). A través de un sistema de retorno, ambos líquidos son continuamente reciclados, por lo que se trata de un sistema de extracción continua (Figura 3) (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**).



**Figura 3:** Sistema de extracción-destilación simultáneas (SDE) empleado en éste trabajo de tesis para la obtención de extractos volátiles de origen vegetal. Fuente: Parliment (2002).

Algunas ventajas adicionales de éste sistema incluyen (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**):

- 1) extracción y concentración de los volátiles en una única etapa;
- 2) requerimiento de un pequeño volumen de solvente para operación;
- 3) sistema fácilmente operable a presión reducida para minimizar la descomposición térmica;
- 4) permite un alto porcentaje de recuperación de compuestos volátiles desde la fuente vegetal.

Comparado con el sistema de Clevenger modificado, éste dispositivo de *SDE* presenta una menor pérdida de componentes medianamente solubles en agua (los que generan el hidrolato) o muy volátiles (los que se difunden en la atmósfera) por la disolución de los mismos en el solvente de extracción (**Reineccius, 2007**). Se trata adicionalmente de una técnica fácil de operar, que no necesita de equipamientos sofisticados, es reproducible, rápida y tiene un amplio rango de aplicabilidad (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**). Sin embargo, una desventaja es la posibilidad de generación de artefactos a través de: contaminación de los materiales (grasa de las juntas, impurezas de los solventes) y



oxidación y descomposición térmica (en caso de no trabajar a presión reducida); aspecto éste último que se comparte con las técnicas de destilación (**Chaintreau, 2001; Reineccius, 2007**). De allí la importancia de realizar blancos previo o en paralelo a la extracción de la muestra (**Chaintreau, 2001**).

En cuanto a los solventes de extracción, el hexano y el diclorometano han demostrado ser eficaces para la obtención de los volátiles de hierbas y alimentos, aunque también se han postulado el uso de éter etílico, pentano, cloroformo, acetato de etilo, y sus mezclas (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**). Una vez que el solvente es extraído del dispositivo, el mismo es desecado con un agente deshidratante (como  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro), y posteriormente se concentra cuidadosamente el extracto por medio de vacío a baja temperatura (para no perder componentes volátiles), volatilización por nitrógeno gaseoso o por columnas del tipo Vigreux (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**).

Si bien no existe una técnica de laboratorio que reproduzca y extraiga absolutamente todos los componentes volátiles presentes en una matriz biológica, de las diferentes metodologías disponibles es la *SDE* la que más se aproxima a la extracción exhaustiva del material a evaluar (**Chaintreau, 2001; Parliment, 2002**).

### 1.1.3 Extracción con fluidos supercríticos (*SFE*)

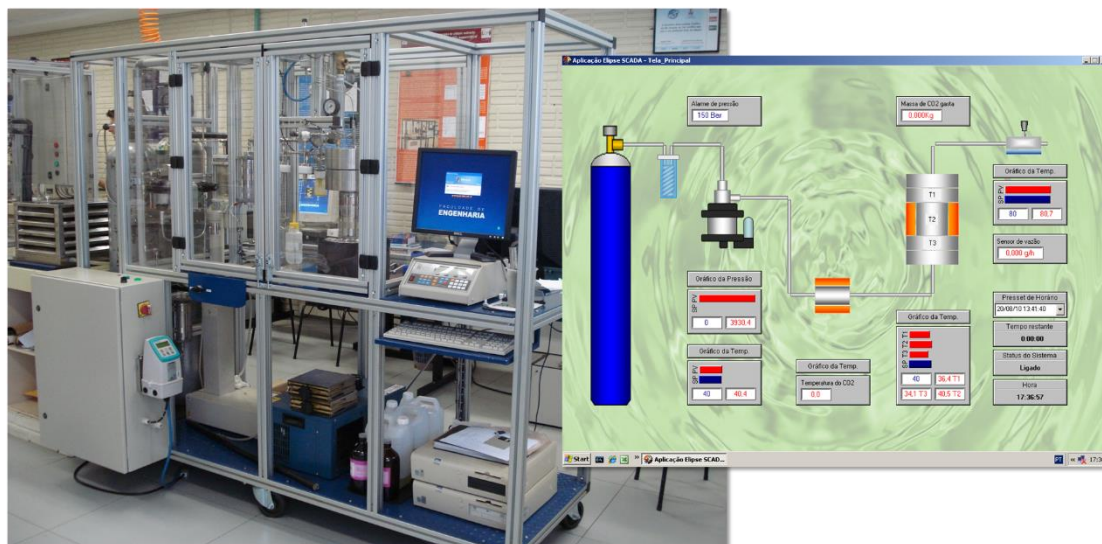
Los fluidos supercríticos son compuestos sometidos a temperaturas y presiones superiores a las del punto crítico, siendo éste el estado que determina la igualdad de propiedades entre la fase líquida y la fase gaseosa (**Velasco *et al.*, 2007**). En estas condiciones los solventes adquieren propiedades mixtas entre gases y líquidos, lo cual es empleado como fundamento para la extracción con fluidos supercríticos (*SFE*) (**Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007**).

La *SFE* brinda una alta capacidad de extracción, ya que los fluidos supercríticos se comportan con la alta difusividad y baja viscosidad de los gases, y la densidad de los líquidos, por lo que sus propiedades disolventes son mejores que las de los otros dos estados por separado (**Reverchon, 1997; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Velasco *et al.*, 2007**). La baja viscosidad y tensión superficial del fluido permite una rápida transferencia de masa, y la posibilidad de ingresar fácilmente en las partículas sólidas del material vegetal trozado, penetrando en las estructuras celulares y



disolviendo compuestos que se encuentran compartimentalizados (**Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Velasco et al., 2007**). Sin embargo, las características físicas de la matriz (tamaño y forma de partícula, el área superficial, la porosidad, el contenido de humedad del material a extraer y las características morfológicas) son de gran importancia para una adecuada extracción (**Reverchon, 1997; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007**). En general, disminuyendo el tamaño de partícula, y consecuentemente aumentando el área superficial expuesta, aumenta el rendimiento de extracción de la *SFE* (**Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007**). El extracto de compuestos volátiles obtenidos por ésta técnica se conoce como concreto (**Reverchon, 1997**).

A pesar de que existen varios compuestos que pueden ser considerados como solventes para *SFE*, en la práctica el CO<sub>2</sub> es el más conveniente no sólo por su baja temperatura y presión crítica (32°C; 74 bar) sino también por su carencia de toxicidad, su disponibilidad en alta pureza, su bajo costo y su neutralidad química (**Reverchon, 1997; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Velasco et al., 2007**). Además, dado que en condiciones de temperatura y presión ambiente el CO<sub>2</sub> es un gas, es muy fácil la separación del mismo del extracto bruto, simplemente despresurizando el sistema para que éste se disperse en la atmósfera y deje tras de sí un residuo resinoso (**Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Velasco et al., 2007**). Sin embargo, la utilización de CO<sub>2</sub> en estado supercrítico requiere una instrumentación sofisticada que permita el total control de parámetros como temperatura, presión y velocidad de flujo, entre otros (Figura 4) (**Reverchon, 1997; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007; Velasco et al., 2007; Bedinot et al., 2011**). La baja polaridad del CO<sub>2</sub> supercrítico (comparable a la polaridad del pentano) permite la extracción de compuestos lipofílicos (particularmente volátiles), aunque el poder disolvente puede ser modificado por ajustes de presión y temperatura para extraer compuestos más polares (**Reverchon, 1997; Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007**). La selectividad de extracción también se puede lograr por la adición de modificadores al fluido (generalmente solventes como ciclohexano, metanol), los que se conocen como co-solventes (**Pourmortazavi y Hajimirsadeghi, 2007**).



**Figura 4:** Equipamiento piloto de SFE diseñado e instalado en el Laboratorio de Operaciones Unitarias-PUCRS que se empleó en éste trabajo. Se presenta también una captura de pantalla del software de control de temperatura, presión y flujo. Fuente: Bedinot et al. (2011).

La SFE con CO<sub>2</sub> supercrítico ha sido adaptada para utilización industrial en procesos como extracción y fraccionamiento de aceites vegetales de materiales oleaginosos, extracción de antioxidantes naturales de fuente vegetal, descafeinado de café y té, eliminación de nicotina del tabaco y extracción de aromas y fragancias (Velasco *et al.*, 2007).

## 1.2 Métodos de análisis químico del volátiloma

La composición del volátiloma de una planta aromática es muy compleja, existiendo frecuentemente más de un centenar de componentes en muy diferentes niveles de concentración (Bakkali *et al.*, 2008; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010). Asimismo se encuentran diferentes tipo de funcionalidades químicas como: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos, fenoles, compuestos nitrogenados y azufrados, entre otros (Bakkali *et al.*, 2008; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010). Es por dicho motivo que los métodos de análisis del volátiloma deben ser capaces de identificar y cuantificar un gran número de entidades químicas (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Bicchi y Maffei, 2012). La caracterización analítica de los componentes volátiles es importante no sólo para la exploración sistemática de los recursos vegetales, sino para sus posibles aplicaciones a escala industrial, así como para la prevención de



adulteraciones de aquellas esencias de importancia económica (**D'Acampora Zellner et al., 2010; Havlíček y Spížek, 2014**).

Si bien aún se aplican técnicas analíticas fisicoquímicas clásicas para el control de calidad de aceites esenciales (densidad relativa aceite/agua, rotación óptica, índice de refracción, solubilidad en agua y en etanol, determinación del punto de fusión y congelación y residuo de evaporación) (**D'Acampora Zellner et al., 2010**), también se pueden aplicar reacciones químicas para conocer el contenido de adulterantes halógenos, metales pesados, ésteres del ácido ftálico, etc. Finalmente, a través de volumetrías se puede conocer el porcentaje de ésteres saponificables, alcoholes, aldehídos, cetonas, peróxidos y fenoles, entre otros grupos funcionales (**D'Acampora Zellner et al., 2010**). Sin embargo, son los métodos cromatográficos los que posibilitan obtener un mayor nivel de información en cuanto a la composición, particularmente la cromatografía en capa fina (*TLC*) con sus diferentes reveladores y la cromatografía gaseosa (*GC*) con sus múltiples tipos de detectores (**Wagner et al., 1984; D'Acampora Zellner et al., 2010; Havlíček y Spížek, 2014**).

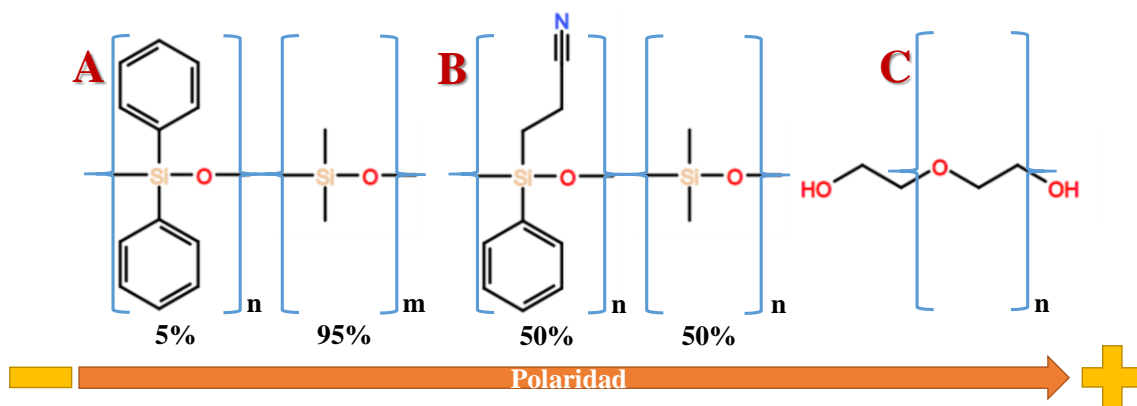
En el presente capítulo se describirán los métodos usualmente más empleados de *GC* para la identificación de los componentes del volatilo de plantas, mientras que en el capítulo 5 se describirán algunas metodologías no convencionales de *GC*, y en los capítulos 6 y 7 se hará una somera descripción del empleo de *TLC* aplicada a productos naturales de *Baccharis* spp. L.

### **1.2.1 Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (*GC-FID*)**

En un cromatógrafo gaseoso se produce la separación de una mezcla volátil por medio de equilibrios termodinámicos continuos de sus componentes entre una fase gaseosa neutra (llamada fase móvil) y una fase estacionaria líquida de polímeros entrecruzados e inmobilizados (cromatografía gas-líquido), proceso que ocurre cuando la primera fluye a través de la segunda dispuesta en un fino film dentro de una columna capilar (**Skoog et al., 2001; D'Acampora Zellner et al., 2010; Stashenko y Martínez, 2010a**). Los componentes de la mezcla volátil se separan en función de sus presiones de vapor relativas y de su interacción (adsorción) con la fase estacionaria (**D'Acampora Zellner et al., 2010; Stashenko y Martínez, 2010a**). Sin embargo, el orden de elución de los analitos está relacionado con la polaridad de cada analito (**D'Acampora Zellner et al.,**



2010). En la Figura 5 se presentan las estructuras de los polímeros líquidos empleados como fases estacionarias en éste trabajo de tesis, ordenados de acuerdo a su orden de polaridad creciente.



**Figura 5:** Estructuras de los polímeros líquidos empleados como fase estacionaria en GC y GC-MS en éste trabajo de tesis para el análisis de la composición volátil de *Baccharis* spp.: A) 5%-fenil-95%-metilsiloxano, B) 50% cianopropilfenil-50%-polidimetilsiloxano y C) polietilenglicol. Fuente: Agilent Technologies (2015).

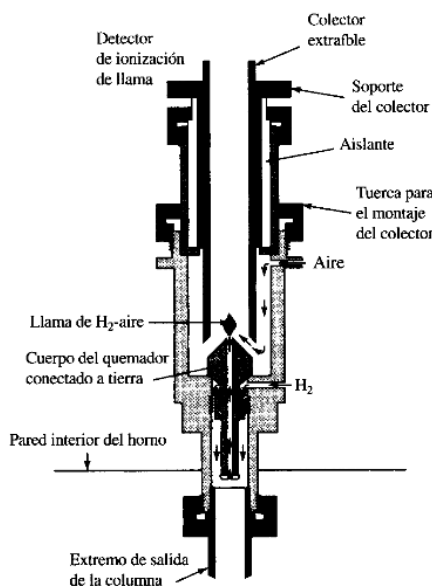
Luego de la elución de cada analito de la columna capilar, se produce la detección de los mismos, generando un registro de señal en función del tiempo, lo que se conoce como cromatograma, en el que idealmente los picos tienen forma de distribución Gaussiana (Skoog *et al.*, 2001; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a). Tanto el área de pico, como la altura de los mismos, tienen relación directa con la cantidad de analito presente en la muestra, mientras que el ancho de pico es función del ensanchamiento de banda en el interior de la columna (relacionado al tipo e intensidad de interacción y al tiempo de permanencia en la misma) (Skoog *et al.*, 2001; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a).

El detector más convencional, más versátil y más económico empleado en el análisis de aceites esenciales, fragancias, y en general del volatilo de plantas, es el detector de ionización de llama (*FID*, por sus siglas en inglés) (Figura 6) (Holm, 1999; Skoog *et al.*, 2001). Este tipo de detector responde al número de átomos de carbono que ingresan en su interior por unidad de tiempo, por lo que es un detector sensible a la masa eluída (llamado a veces “contador de carbono”) y no tanto a la concentración de analito (Holm, 1999; Skoog *et al.*, 2001). El detector *FID* es sumamente sensible (con un límite de alrededor de  $10^{-13}$  g/s), tiene un amplio rango de linealidad (aproximadamente





10<sup>7</sup>) y produce un bajo ruido instrumental cuando se opera en condiciones óptimas (Holm, 1999; Skoog *et al.*, 2001).



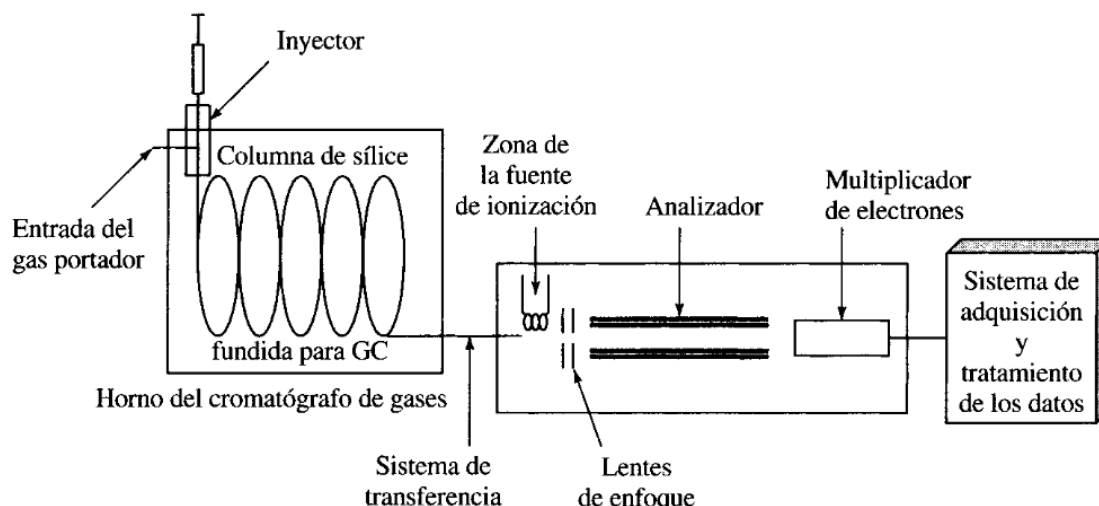
**Figura 6:** Diseño de un detector de ionización de llama (FID) para cromatografía gaseosa. Fuente: Skoog *et al.* (2001).

### 1.2.2 Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS)

El principio de separación cromatográfica en cromatografía gaseosa-espectrometría de masa (GC-MS) es idéntico a lo que sucede en un GC-FID, pero lo que varía es el empleo de un espectrómetro de masa al final de la columna cromatográfica que actúa como detector (Figura 7) (Skoog *et al.*, 2001; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a). En éste caso, a medida que los analitos son eluidos de la columna, son ionizados por una corriente de electrones (en la modalidad de ionización electrónica) de alta energía (70 eV), que es suficiente para ionizar y romper los enlaces covalentes en las moléculas orgánicas, produciéndose fragmentos iónicos (Skoog *et al.*, 2001; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a). Luego de la formación y fragmentación de los iones, los mismos son separados en función de su relación masa carga ( $m/z$ ) en un analizador de masas (en general un cuadrupolo en la configuración convencional), detectados y amplificados en un multiplicador de electrones, y, finalmente los datos de corrientes iónicas procesados por un sistema informático (Skoog *et al.*, 2001; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a). Como resultado de todo ese proceso, se obtiene un patrón de fragmentación característico (espectro de masa) que se puede comparar contra



estándares almacenados en bibliotecas comerciales automatizadas, obteniéndose una identificación primaria del compuesto de interés en unos pocos minutos (NIST, 1999; Adams, 2007; D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a; Mondello, 2015).



**Figura 7:** Diseño de un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masa (GC-MS) en su configuración más usual para el análisis de volátiles en plantas. Fuente: Skoog *et al.* (2001).

Los sistemas de *GC-MS* son muy sensibles, y pueden ser tanto empleados en la modalidad de corriente iónica total (*TIC*) para la identificación de compuestos desconocidos y/o semi-cuantificación; o en la modalidad de monitoreo de iones (*SIM*) con el objetivo de obtener una cuantificación precisa (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010a).

### 1.2.3 Empleo de los índices de retención lineales (*LRI*s)

En el caso de análisis por *GC-MS* del volatilo de plantas, es frecuente depararse con que los isómeros terpénicos cuentan con espectros de masa muy similares, por lo que pueden ser incorrectamente identificados si sólo se emplea la comparación directa de éstos (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010b).

El cálculo de índices de retención se basa en la comparación de los tiempos de retención de un analito de interés con los respectivos tiempos de elución de una serie homóloga de estándares (hidrocarburos alcanos normales o metil ésteres de ácidos grasos) (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010b). El índice más difundido en la literatura es el basado en la ecuación logarítmica de Kováts que emplea



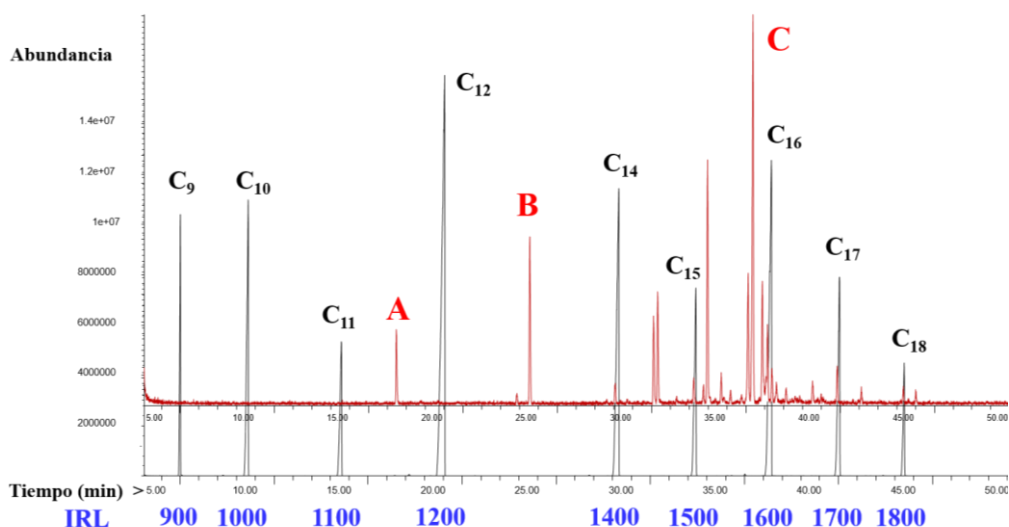
alcanos como patrones de elución en condiciones isotérmicas (Kováts, 1958; Ecuación 1). Sin embargo, la modificación introducida por van Den Dool y Krantz (van Den Dool y Krantz, 1963) es la usualmente más empleada en el análisis de metabolitos volátiles en plantas porque permite el análisis en condiciones de temperatura programada de GC y GC-MS (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010b). Los valores calculados utilizando programas de temperatura son los que se denominan propiamente como índices de retención (I), índices de retención lineales (LRI) o índices de retención a temperatura programada (PTRI); mientras que los índices isotérmicos se conocen como índices de Kováts (KI) (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010b).

De acuerdo a lo anterior, las fórmulas de cálculo son las siguientes:

$$IK = 100 * C_n + 100 * [(\log tr A_n - \log tr C_n) \div (\log tr C_N - \log tr C_n)] \text{ (Ecuación 1)}$$

$$LRI = 100 * C_n + 100 * [(tr A_n - tr C_n) \div (tr C_N - tr C_n)] \text{ (Ecuación 2)}$$

En la misma  $C_n$  representa el número de carbonos del alcano normal que eluye antes del analito de interés y  $tr C_n$  es su tiempo de retención;  $tr A_n$  es el tiempo de retención del analito, y  $tr C_N$  es el tiempo de retención correspondiente al hidrocarburo que eluye posteriormente al compuesto de interés (D'Acampora Zellner *et al.*, 2010; Stashenko y Martínez, 2010b). En la Figura 8, se presenta la explicación gráfica del cálculo.



**Figura 8:** Explicación gráfica del cálculo de índices de retención lineales (LRI). Se presenta un cromatograma con los tiempos de retención de una serie homóloga de alcanos normales ( $C_9$ - $C_{18}$ ) y



*un aceite esencial analizados en las mismas condiciones cromatográficas. El pico A tendrá un valor de LRI entre 1100 y 1200, el B entre 1200 y 1400, y el C entre 1500 y 1600; los que se calculan exactamente con la ecuación 2.*

Cuando se comparan los valores obtenidos experimentalmente de *LRI* para los analitos de interés con aquellos disponibles en las bases de datos y en la bibliografía, se constata que los índices calculados en columnas de fase estacionaria poco polar tienen una mayor reproducibilidad ( $\pm 1-10$  unidades) que los determinados en columnas polares, los que presentan dispersiones de  $\pm 10-50$  unidades (**Babushok y Zenkevich, 2009; D'Acampora Zellner et al., 2010; Stashenko y Martínez, 2010b**). Mayores variaciones se observan cuando el compuesto a determinar es de polaridad opuesta (ortogonal) a la fase, por ejemplo para el caso del análisis de alcoholes en fase poco polar y de hidrocarburos en fase polar (**Babushok y Zenkevich, 2009; Stashenko y Martínez, 2010b**).

La ventaja del empleo de éste tipo de sistema es que permite calcular un parámetro (*LRI*) que es independiente de las condiciones operativas para una fase estacionaria dada, por lo cual es posible el empleo de bases de datos de comparación inter-laboratoriales (**D'Acampora Zellner et al., 2010; Stashenko y Martínez, 2010b**).

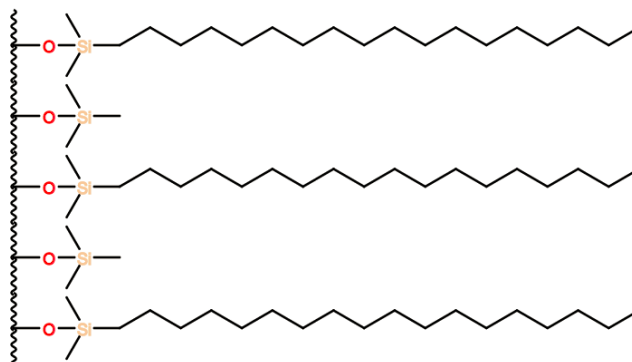
### **1.3 Análisis químico de la fracción no volátil**

Al igual que en el caso del volátiloma, la fracción no volátil de las plantas medicinales y aromáticas suele ser extremadamente compleja debido al gran número de metabolitos presentes en los extractos, pertenecientes a la expresión de una diversidad de vías metabólicas (**Schwab, 2003; Steinman y Ganzera, 2011**).

El método preferido para analizar y cuantificar ésta fracción es la cromatografía líquida de alta eficacia (*HPLC*), la que se basa en la separación de mezclas debido a equilibrios de afinidad química diferencial entre la fase móvil (líquida) y la fase estacionaria (sólida o líquida) (**Skoog et al., 2001; Meyer, 2014; Steinman y Ganzera, 2011**). Los analitos que resultan más solubles en la fase móvil eluyen primero del sistema cromatográfico, mientras que los más retenidos son los que tienen mayor interacción con la fase estacionaria (absorción y/o adsorción) (**Skoog et al., 2001; Meyer, 2014**). Como en el caso de la cromatografía gaseosa, se cuenta con una amplia gama de fases estacionarias comerciales para *HPLC*, siendo una de las de mayor empleo en el análisis de productos

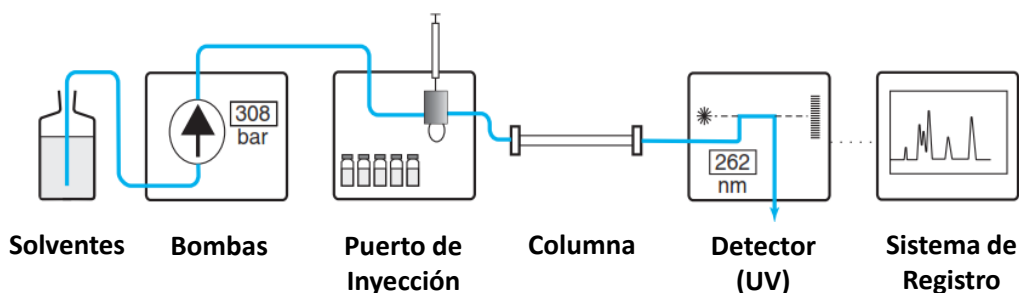


naturales las llamadas “fases reversas”, en que la matriz sólida de sílica se encuentra enlazada a líquidos alifáticos de 8 a 18 átomos de carbono (Figura 9) (Skoog *et al.*, 2001; Meyer, 2014). En éste tipo de columnas los componentes más hidrofóbicos son mayormente retenidos por adsorción en la fase estacionaria, mientras que los compuestos menos hidrofóbicos eluyen tempranamente arrastrados por una fase móvil en general acuosa (Skoog *et al.*, 2001; Meyer, 2014).



**Figura 9:** Estructura de la fase estacionaria  $C_{18}$  empleada para los análisis en HPLC-UV en éste trabajo de tesis. Obsérvese que existen porciones de la matriz en que el átomo de silicio se encuentra unido a tres grupos metilo, lo que se conoce como “end-capping”. Fuente: Agilent Technologies (2015).

El diseño convencional de un sistema modular de *HPLC* con sus diferentes componentes se presenta en la Figura 10 (Skoog *et al.*, 2001; Meyer, 2014). El detector empleado usualmente es el de ultravioleta de onda fija, en el que la detección se basa en la absorción de luz UV por grupos cromofóricos de los analitos (Skoog *et al.*, 2001; Meyer, 2014). Si bien con éste tipo de detector no es posible realizar una identificación de los analitos, sí es posible mediante el empleo de estándares obtener una identificación primaria de los mismos, además de poder cuantificarlos en el extracto (Skoog *et al.*, 2001; Meyer, 2014).



**Figura 10:** Diseño de bloques de un cromatógrafo líquido con detector UV (HPLC-UV), empleado convencionalmente para el análisis de la fracción no volátil de especies vegetales. El flujo de fase móvil se presenta en azul. Fuente: Meyer (2014).

Para el caso de *HPLC*, es posible emplear detectores más sofisticados como los de espectrometría de masa, con los que es posible obtener mayor información estructural de moléculas desconocidas (Steinman y Ganzera, 2011; Meyer, 2014).

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Colecta del material vegetal

El material vegetal que se empleó en éste capítulo consistió en partes aéreas en floración de la especie *Baccharis uncinella* DC. colectadas en la Reserva Pró-Mata (São Francisco de Paula, RS, Brasil), lugar que presenta una alta disponibilidad de la especie (Lucas, 2015). Las características de la colecta, así como los antecedentes botánicos de *B. uncinella* se detallarán en el capítulo 4.

### 2.2 Extracción del volátiloma

#### Destilación:

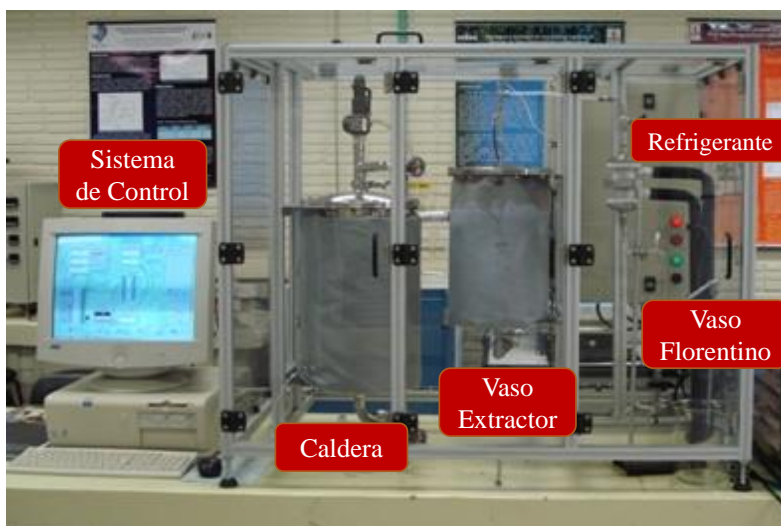
La extracción del volátiloma de *B. uncinella* se realizó tanto en condiciones de laboratorio (arrastre con agua + vapor) como en un dispositivo a escala piloto (arrastre con vapor), con el objetivo de realizar una comparación entre ambos procesos (Figuras 1 y 2).

En condiciones de laboratorio se empleó un dispositivo tipo Clevenger adosado a un recipiente de muestra de 3,0 L de capacidad en el que se



colocaron 200,0 g de material vegetal finamente trozado en un lecho uniformemente empacado (Figura 2B). El vapor se generó externamente por calentamiento de agua líquida mediante una resistencia térmica en una caldera de vidrio de 4,0 L de capacidad, colocada inmediatamente debajo del recipiente contenedor de la muestra (Figura 2B).

Para las condiciones de extracción a escala piloto fue empleado un dispositivo diseñado *in-house* e instalado en el *Laboratório de Operações Unitárias*-PUCRS (Figura 11). En el vaso extractor de dicho aparato (con capacidad de 5,0 L) se dispusieron uniformemente 570,0 g de material vegetal trozado. Como en el caso anterior, el vapor (100-105°C) se generó externamente por medio de una caldera de capacidad de 20,0 L, el que fue insuflado sobre el material vegetal a una presión de 2,0 bar con el objetivo de arrastrar el aceite (Figura 11).



**Figura 11:** Sistema piloto de extracción por arrastre con vapor presurizado empleado en éste trabajo de tesis. Fuente: LOPE-PUCRS (<http://www.feng.pucrs.br/laboratorios/lope/>).

El volumen de aceite esencial obtenido en ambos casos fue medido cada 5 minutos, hasta constancia de 3 medidas, calculándose el rendimiento como volumen de aceite por masa (Kg) de material vegetal (Xavier *et al.*, 2011). Con dicho parámetro fueron elaboradas curvas de extracción. El tiempo total de operación fue menor (en ambos casos) a 90 minutos.

Luego de obtenidos los aceites esenciales, se les adicionó Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EEUU) para eliminar la humedad residual, y a continuación fueron almacenados bajo refrigeración (-4°C) para posteriores análisis. La densidad del



aceite de *B. uncinella* (0,92 g/mL) se determinó por pesado, obteniéndose un valor similar al reportado por Fabiane *et al.* (2008).

La notación que se dará en éste trabajo a la muestra de aceite obtenido en equipo de laboratorio será *LSD* (*laboratory steam-distillation*) mientras que el obtenido a través del sistema a escala piloto se notará como *PSD* (*pilot steam-distillation*).

#### Extracción-destilación simultánea (SDE):

Se colocaron 120,0 g de material vegetal finamente trozado en un balón de 2,0 L, dispersándolo en agua (balón de muestra; Figura 3). Por otra parte, en el balón de solvente se colocaron 90,0 mL de ciclohexano (*Sigma-Aldrich*). El tiempo de extracción efectivo (desde que ambos solventes se encontraron en ebullición) fue de 120 minutos. Al finalizar la extracción, al balón conteniendo el extracto volátil se le adicionó  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro) para eliminar agua residual, y posteriormente el contenido se filtró por papel hacia un balón limpio. El extracto resultante fue a continuación evaporado a vacío en rotavapor (40°C), obteniéndose un concentrado (aproximadamente 2,0 mL) que se almacenó a -4°C para posteriores análisis. El extracto obtenido por ésta técnica será nombrado *SDE* en las secciones subsiguientes.

#### Extracción con $\text{CO}_2$ en estado supercrítico (SFE):

El equipo con el que se trabajó fue uno diseñado *in-house* e instalado en el LOPE-PUCRS (Figura 4; **Bedinot *et al.*, 2011**). El material vegetal de *B. uncinella* a extraer fue pulverizado y secado en estufa, hasta contenido de humedad de 6,5% (por balanza termogravimétrica). En el vaso de extracción del equipo fueron colocados 130,0 g de material vegetal desecado, sobre el que se hizo pasar  $\text{CO}_2$  (99,9%; *AirProducts and Chemicals Inc., Allentown, PE, EEUU*) en estado supercrítico a 40°C y 80 bar, con un flujo a través del sistema de 1,0 mL/min. Posterior a la etapa de extracción, el  $\text{CO}_2$  fue conducido hacia una cámara de despresurización a presión atmosférica, donde se obtuvo un concreto muy aromático y resinoso (oleorresina).

Para ésta técnica extractiva también fue realizada una curva de extracción, pesando la masa del recipiente con concreto cada 10 minutos hasta 3 medidas constantes, lo que insumió 160 minutos totales. Se obtuvieron 0,107 g de material, los que fueron disueltos en 5,0 mL de ciclohexano (*Sigma-Aldrich*) para análisis por *GC-MS*. El procedimiento extractivo se repitió en las mismas condiciones descriptas previamente y la oleorresina





obtenida en éste caso fue disuelta en metanol (*MerckKGaA, Darmstadt, Alemania*) a una concentración de 2,0 mg/mL para análisis por *HPLC-UV*. Para ambos análisis químicos, al concreto se le dará la denominación de *SFEC*.

Debido a la pérdida de volátiles que en general insume el paso de despresurización (*Stashenko et al., 1996*), antes de liberar el CO<sub>2</sub> a la atmósfera se lo hizo barbotar en un recipiente con ciclohexano (10,0 mL). De esa manera los compuestos más volátiles fueron retenidos en dicho solvente, y pudieron ser analizados *a posteriori* por *GC-MS* (extracto *SFEV*). Finalmente, se aumentó la presión del sistema a 90 bar (manteniendo la temperatura constante a 40°C), y se obtuvo el llamado residuo de extracción, el que fue disuelto en otros 5,0 mL de ciclohexano para análisis por *GC-MS* (extracto *SFER*). Todas las muestras fueron almacenadas a -4°C.

### 2.3 Análisis de compuestos volátiles

El análisis químico de los extractos volátiles y aceites esenciales se realizó por *GC-FID* (análisis preliminar) y *GC-MS* (análisis comparativo de todas las muestras) en columnas capilares de la misma polaridad [(5%-fenil)-metilpolisiloxano] (Figura 5). La identificación de los componentes fue realizada por comparación de espectros de masas con bibliotecas comerciales (*McLafferty y Stauffer, 1994; NIST, 1999; Adams, 2007; Mondello, 2015*) y por cálculo de índice de retención lineal (*LRI*) mediante la inyección de una solución de una serie homóloga de hidrocarburos lineales (C<sub>9</sub>-C<sub>20</sub>; *Sigma-Aldrich*). La cuantificación en ambos casos fue realizada por cálculo de porcentajes de área relativas, sin corrección por factores de respuesta.

El análisis por *GC-FID* fue realizado en un *GC PerkinElmer Autosystem XL* (*PerkinElmer Inc., Waltham, MA, EEUU*), con nitrógeno como fase móvil (1,0 mL/min). El volumen de inyección fue de 0,2 µL de aceite esencial diluído 1:3 en ciclohexano en modalidad *Split* (55:1). La columna empleada fue una *HP-5MS* (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm) (*Agilent Technologies, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, EEUU*). El programa de temperaturas empleado fue: 60°C (3 min), 60-180°C a 5°C/min, 180°C (2 min). Las temperaturas del inyector y del detector fueron ambas 180°C.



Los análisis por *GC-MS* fueron realizados en un instrumento *GC Agilent 7890A* acoplado a un espectrómetro *MS Agilent 5975C VL* (*Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU*). La fase móvil empleada fue He (0,8 mL/min). La columna analítica, el volumen de inyección y la relación de *Split* fueron los mismos que en el caso del análisis por *GC-FID*. El programa de análisis empleado fue adaptado de Lorenzo *et al.* (2005), y la secuencia de temperaturas fue la siguiente: 60°C (8 min), 60-180°C a 3°C/min, 180°C (1 min), 180-250°C a 20°C/min, 250°C (10 min). La temperatura del inyector y fuente de ionización fue de 250°C, mientras que la temperatura de la interfase fue de 280°C. El espectrómetro de masas se operó a 70 eV y el rango de barrido de masas fue 40-450 u.m.a.

#### **2.4 Análisis de compuestos no volátiles**

El extracto obtenido como concreto de *B. uncinella* (*SFEC*) se analizó también por cromatografía líquida con detector de UV de longitud de onda fija (*HPLC-UV*). El equipamiento empleado fue un *HPLC 1200 Standard* (*Agilent Technologies*) al que se le acopló una columna de fase reversa *Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub>* (250 mm × 4.6 mm d.i. × 5 μm) (*Agilent Technologies*).

El volumen de inyección fue de 5 μL de una solución 2,0 mg/mL de la oleoresina sólida de *SFEC* en metanol (*Merck*). La muestra fue filtrada por un filtro Whatman (*PTFE*, 0,22μm, *Sigma-Aldrich*) antes de ser inyectada. La longitud de onda de detección fue 345 nm para la detección de polifenoles. El programa de corrida fue adaptado de Kumazawa *et al.* (2003) y de Lucas(2015), para lo que se empleó un gradiente de fase móvil con los solventes acetonitrilo (A) y agua Milli-Q (B) (*Merck Millipore, Burlington, MA, EEUU*), ambos con 2% de ácido acético (*Merck*). La fase móvil de inicio fue compuesta por: 20% A - 80% B, y la misma fue variando hasta terminar en 80 minutos con 80% A - 20% B, a un flujo de 1,0 mL/min. La columna se mantuvo en condiciones isotérmicas a 40°C.

Como estándares para identificación se prepararon soluciones en metanol (*Merck*) de los siguientes metabolitos secundarios: ácido (*E*)-*p*-cumárico (2,1 mg/mL) (*Fluka Chemika, Buchs, Suiza*), ácido cafeico (2,7 mg/mL) (*Fluka*), kaempferol (1,8 mg/mL)



(Fluka), quercetina (2,6 mg/mL) (HWI Analytik, Rülzheim, Alemania) y ácido ursólico (2,0 mg/mL) (HWI Analytik).

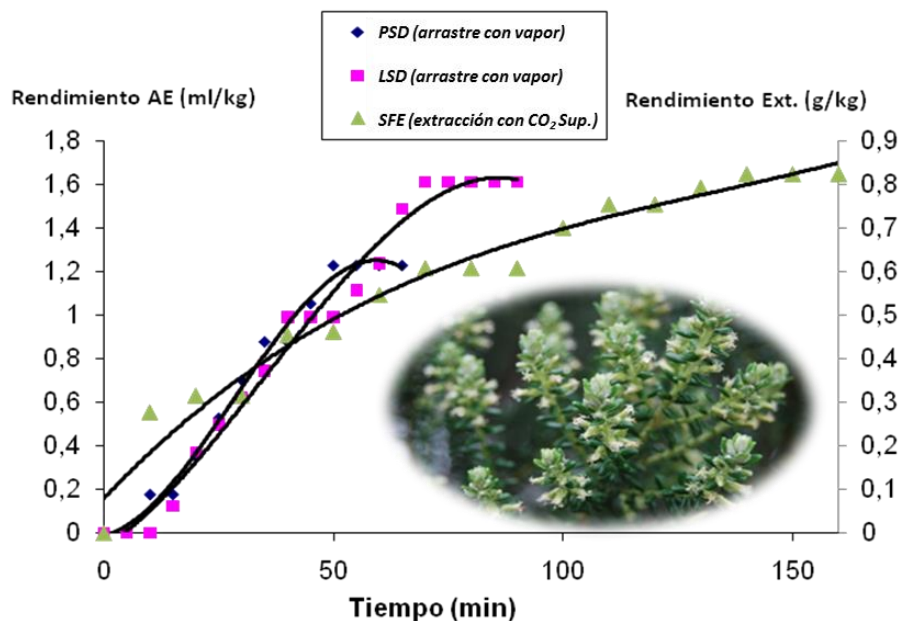
## 2.5 Tratamiento estadístico

Los datos de composición de la fracción volátil de *B. uncinella* obtenidos mediante GC-MS (Tabla 1) fueron empleados como insumo para tratamiento estadístico multivariado. Los estudios realizados fueron: análisis de componentes principales (PCA) y análisis de grupos jerárquicos (HCA) empleando el software NCSS 11 (2016; trial version) (NCSS LLC, Kaysville, UT, EEUU). El objetivo de los mismos fue comparar las diferentes técnicas de extracción y visualizar su comportamiento en el espacio multivariado.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Rendimiento y curvas de extracción

En la Figura 12 se presentan las curvas de extracción de las diferentes técnicas aplicadas para obtener el volatiloma de *B. uncinella* (no se incluye el proceso de extracción-distilación simultánea).



**Figura 12:** Curvas de extracción y rendimiento de las diferentes metodologías extractivas aplicadas a la obtención del volatiloma de *B. uncinella*: PSD, LSD (referencia en el eje izquierdo) y SFE (referencia en el eje derecho). En éste último caso se considera únicamente la obtención del extracto SFEC.



El rendimiento de obtención de *LSD* resultó mayor que el de *PSD* (1,6 mL/Kg vs. 1,2 mL/Kg, respectivamente), lo que es común en los procesos de escalado (**Cassel y Vargas, 2006; Cerpa Chávez, 2007**). Teniendo en cuenta la densidad del aceite esencial (0,92 g/mL), el rendimiento de *LSD* fue de 1,5 g/Kg y de *PSD* de 1,1 g/Kg (0,15 y 0,11 % p/p, respectivamente). El valor diferencial se debe a que en condiciones de laboratorio se consigue un mayor valor del coeficiente cantidad de vapor/cantidad de material vegetal que en condiciones piloto, con una consecuente mejor distribución del vapor en el lecho de muestra (facilitado por un mejor empaque), lo que finalmente resulta en una mayor recuperación de aceite (**Cerpa Chávez, 2007**). El rendimiento obtenido en condiciones de laboratorio se encuentra en el mismo orden de magnitud (0,16-0,18% p/p) que el obtenido previamente para la misma especie en el estudio de **Xavier et al. (2011)**.

La forma de las curvas de extracción por arrastre con vapor fueron las esperadas según el modelo matemático de transferencia de masa de Sovová, aplicado previamente para aceites esenciales de *Baccharis* spp. (Figura 12) (**Sovová, 1994; Sovová y Aleksovski, 2006; Xavier et al., 2011**). Según éste modelo, en un primer momento se produciría la extracción de los compuestos desde los compartimentos superficiales (tricomas glandulares) más o menos destruidos de la matriz vegetal, lo que sería regido por un proceso de equilibrio termodinámico de fases entre el aceite y el vapor (**Sovová, 1994; Sovová y Aleksovski, 2006; Cerpa Chávez, 2007; Xavier et al., 2011**). En una segunda instancia, se extraerían los compuestos desde los tricomas intactos y desde estructuras internas (por ejemplo, canales esquizógenos), por lo que el paso determinante que controlaría el proceso sería la difusión del aceite desde los compartimentos hacia el vapor (**Cassel y Vargas, 2006; Cerpa Chávez, 2007; Cassel et al., 2009; Xavier et al., 2011**). En este comportamiento se evidenciarían dos etapas bien diferenciadas en la curva de extracción: un comportamiento lineal para la primera etapa de extracción de aceite libre, y uno exponencial para la segunda etapa en que se extraería el aceite compartimentalizado (**Xavier et al., 2011**), lo que se ajusta perfectamente a lo observado en la Figura 12. Hay que resaltar que éste modelo considera, como simplificación, que el aceite esencial se comporta como un único componente, y que el proceso de transferencia de masa en términos de composición es el mismo durante todo el transcurso de la extracción (**Xavier et al., 2011**).



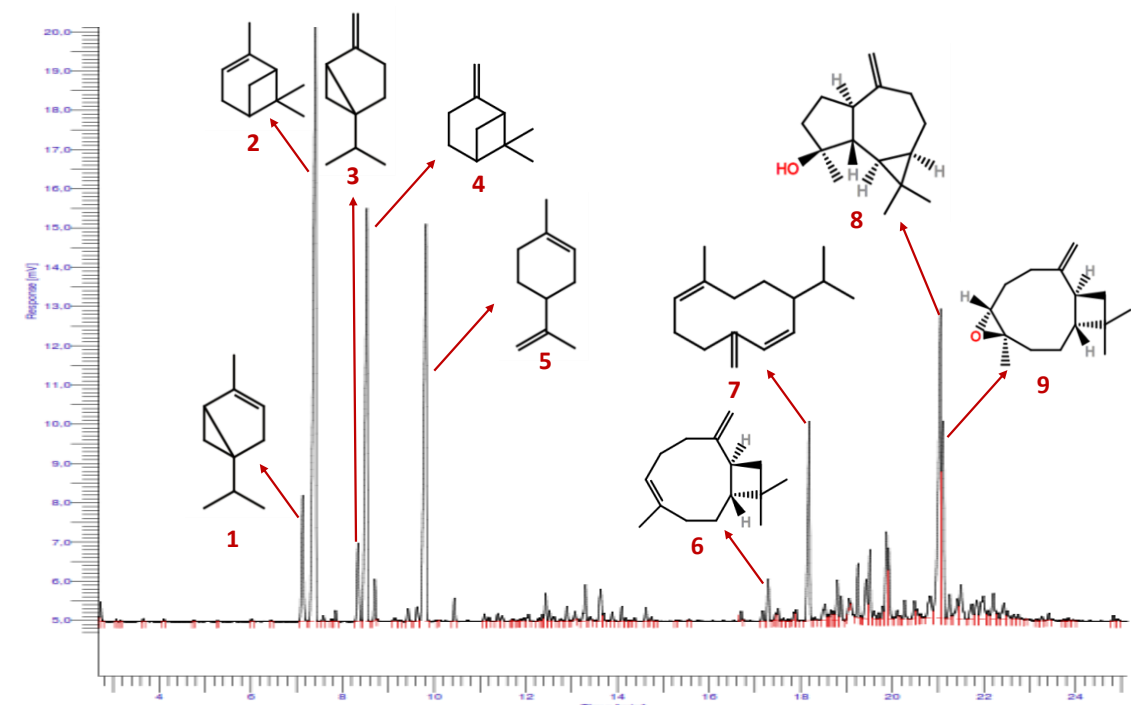
En lo que respecta a la extracción con CO<sub>2</sub> en estado supercrítico, se obtuvo un rendimiento de 0,85 g/Kg (0,085% p/p), es decir, menor que los correspondientes a los procesos de extracción por arrastre con vapor. Sin embargo, es pertinente subrayar que al considerar sólo el extracto *SFEC* el rendimiento real fue subestimado, ya que no se consideró la masa obtenida de las muestras *SFEV* ni de *SFER*. Trabajando a 40°C y 90 bar, Vargas *et al.* (2006) obtuvieron un rendimiento de 2,0% p/p luego de 60 minutos de extracción para la obtención del concreto de *B. trimera* por *SFE*. Sin embargo, Silva *et al.* (2009) obtuvieron un rendimiento de tan sólo 0,34% p/p para la misma especie trabajando a 40°C y 100 bar durante un período de 6 horas, lo que demuestra la influencia del tipo y origen del material vegetal empleado para realizar la extracción.

La forma de la curva de rendimiento en función del tiempo para la técnica de *SFE* obtenida en éste trabajo fue semejante a la reportada previamente para *B. trimera* (Figura 12) (Vargas *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2009). Como en el caso de la extracción mediada por vapor, la extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico se puede modelar matemáticamente, lo que es de importancia para el diseño de plantas industriales, permitiendo obtener buenos rendimientos en condiciones operacionales pre-establecidas (Cassel y Vargas, 2006; Vargas *et al.*, 2006; Cerpa Chávez, 2007; Cassel *et al.*, 2009; Xavier *et al.*, 2011). Sin embargo, el modelado de éste proceso es más complejo que el correspondiente al de destilación por arrastre con vapor, porque en éste caso no sólo se requiere de parámetros de transferencia de masa, sino también de solubilidad (Vargas *et al.*, 2006). En éste caso también se puede plantear una extensión del modelo de Sovová, considerando que algunos compartimentos de la matriz se encuentran intactos y otros destruidos por el efecto de molienda, lo que origina una curva con el mismo formato que la que se muestra en la Figura 12 (Sovová, 1994; Vargas *et al.*, 2006). Con éste modelo se demuestra la importancia de una adecuada molienda para disminuir el tamaño de partícula y aumentar el número de compartimentos destruidos, haciendo paralelamente más accesible el contenido de aceite esencial y más eficiente la transferencia de masa hacia el fluido supercrítico (Vargas *et al.*, 2006).



### 3.2 Composición química volátil

En la Figura 13 se presenta el perfil de composición determinado por *GC-FID* del aceite esencial de *B. uncinella* extraído por destilación por arrastre con vapor (muestra *LSD*), presentando asimismo las estructuras químicas de los principales constituyentes.



**Figura 13:** Perfil de composición por *GC-FID* del aceite esencial obtenido por *LSD* de *B. uncinella*. Principales componentes: (1)  $\alpha$ -tujeno; (2)  $\alpha$ -pineno; (3) sabineno; (4)  $\beta$ -pineno; (5) limoneno; (6) (*E*)- $\beta$ -cariofileno; (7) germacreno D; (8) espatulenol; (9) óxido de cariofileno.

El análisis detallado por *GC-MS* de los extractos obtenidos por las diferentes metodologías de extracción permitió la identificación de 189 compuestos, principalmente mono y sesquiterpenos (Tabla 1).

#	Compuesto <sup>a)</sup>	Tipo <sup>b)</sup>	<i>LRI</i> <sub>e</sub>	<i>LRI</i> <sub>t</sub>	<i>SDE</i> <sup>c)</sup>	<i>LSD</i>	<i>PSD</i>	<i>SFEC</i>	<i>SFEV</i>	<i>SFER</i>
1	1-hexen-3-ona <sup>d)</sup>	Ot.	780	776	tr	-	-	-	-	-
2	octano	Ot.	800	800	-	-	-	0,06	2,5	12,0
3	hexanal	Ot.	801	801	0,02	-	-	-	-	-
4	3-( <i>E</i> )-hexenol	Ot.	844	844	tr	-	-	-	-	-
5	2-( <i>E</i> )-hexenal	Ot.	846	846	tr	-	-	-	-	-
6	nonano	Ot.	900	900	-	tr	0,01	-	-	0,01
7	heptanal	Ot.	903	901	0,02	0,01	0,01	-	-	-
8	tricicleno	HM	916	921	0,01	-	-	-	-	-



Tabla 1, continuación

9	$\alpha$ -tuyeno	HM	923	924	3,4	2,6	4,2	0,05	1,4	1,5
10	$\alpha$ -pineno	HM	930	932	11,7	10,2	13,3	0,3	7,4	7,2
11	$\alpha$ -fencheno	HM	943	945	0,05	0,01	0,03	-	-	-
12	canfeno	HM	944	946	0,08	0,04	0,1	tr	0,06	0,05
13	tuya-2,4(10)-dieno	HM	947	953	-	0,04	0,1	-	-	-
14	ácido hexanoico (caproico)	Ot.	955	967	tr	-	-	-	-	-
15	2-( <i>E</i> )-heptenal	Ot.	957	947	tr	-	-	-	-	-
16	1-etil-4-metilbenceno	Ot.	959	969	-	-	-	-	-	0,04
17	sabineno	HM	971	969	2,5	1,9	3,3	0,07	1,8	1,5
18	$\beta$ -pineno	HM	974	974	7,6	7,1	9,6	0,2	5,4	4,0
19	$\beta$ -mirceno	HM	991	988	1,0	1,0	1,4	0,04	0,8	0,6
20	2-pentilfurano	Ot.	996	984	tr	0,08	0,02	-	-	-
21	$\alpha$ -felandreno	HM	1003	1002	0,09	-	0,1	-	-	-
22	$\delta$ -2-careno	HM	1009	1001	-	0,09	0,2	-	-	-
23	$\delta$ -3-careno	HM	1010	1008	0,1	0,4	0,5	tr	0,07	0,03
24	$\alpha$ -terpineno	HM	1015	1014	0,3	-	-	-	0,02	-
25	<i>o</i> -cimeno	HM	1021	1022	0,06	0,06	0,06	-	0,03	0,03
26	<i>p</i> -cimeno	HM	1024	1020	0,4	0,5	0,7	0,03	0,4	0,2
27	limoneno	HM	1028	1024	8,6	11,3	11,6	0,6	8,8	5,9
28	1,8-cineol	MO	1032	1026	0,03	0,02	tr	0,01	0,09	0,06
29	alcohol bencílico	Ot.	1036	1026	0,05	-	-	-	-	-
30	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	HM	1039	1032	0,05	0,02	0,02	-	-	-
31	fenilacetaldehído	Ot.	1043	1036	0,04	-	-	-	-	-
32	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	HM	1049	1044	0,3	0,5	0,4	0,02	0,2	0,2
33	$\gamma$ -terpineno	HM	1058	1054	0,5	0,7	0,7	tr	0,1	0,4
34	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	MO	1066	1065	0,1	0,02	0,02	0,01	-	-
35	( <i>Z</i> )-óxido de linalol (furanoide)	MO	1074	1067	tr	-	-	-	-	-
36	<i>m</i> -cimeneno	HM	1081	1082	-	-	0,01	-	-	-
37	terpinoleno + <i>p</i> -cimeneno	HM	1086	1086,1089	0,2	0,3	0,3	tr	-	-
38	óxido de $\alpha$ -pineno	MO	1097	1099	-	-	-	0,01	0,03	0,05
39	linalol	MO	1100	1095	0,1	0,06	0,04	0,01	0,05	0,05
40	undecano	Ot.	1102	1100	-	-	-	-	0,07	0,3
41	( <i>E</i> )-hidrato de sabineno	MO	1104	1098	0,1	-	-	-	-	-
42	nonanal	Ot.	1105	1100	tr	0,09	0,08	-	-	-
43	hotrienol	MO	1105	1103*	0,1	-	-	-	-	-
44	( <i>Z</i> )-tuyona	MO	1106	1101	-	-	-	-	0,3	0,08
45	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	HM	1110	1108	0,03	0,02	0,04	-	-	-
46	<i>endo</i> -fenchol	MO	1112	1114	0,1	0,06	0,04	0,01	0,04	0,03
47	( <i>E</i> )-tuyona	MO	1117	1112	-	0,01	0,01	0,02	0,2	0,1
48	( <i>E</i> )-4,8-dimetil-1,3,7-nonatrieno	Ot.	1117	1116*	-	0,03	0,04	-	-	-
49	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	MO	1120	1118	0,2	-	-	-	-	-
50	( <i>E</i> )- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	MO	1121	1119	-	0,07	0,02	0,01	0,03	-
51	$\alpha$ -canfolenal	MO	1125	1122	0,03	0,01	0,02	0,03	0,1	-
52	( <i>E,E</i> )-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	Ot.	1130	1130*	-	-	0,01	-	-	-



Tabla 1, continuación

53	Dureno	Ot.	1133	1131*	-	0,01	0,02	-	-	-
54	(Z)-óxido de limoneno	MO	1134	1132	-	-	-	0,01	0,03	-
55	(E)-pinocarveol	MO	1137	1135	0,1	0,04	0,03	0,06	0,2	0,1
56	(E)-p-ment-2-en-1-ol	MO	1138	1136	0,1	0,08	0,07	-	-	-
57	alcanfor	MO	1144	1141	-	-	-	0,02	0,2	0,08
58	(E)-verbenol	MO	1145	1140	0,1	0,05	0,01	0,04	0,07	0,06
59	exo-hidrato de canfeno	MO	1145	1148*	0,07	0,02	-	-	-	-
60	2,6-(E,Z)-nonadienal	Ot.	1148	1150	0,08	-	-	-	-	-
61	1-(1,4-dimetil-3-ciclohexen-1-il)-etanona	Ot.	1148	1152*	-	0,06	0,05	-	-	-
62	citronelal	MO	1154	1148	-	0,02	0,02	-	-	-
63	pinocarvona	MO	1162	1160	0,1	0,06	0,06	0,02	0,07	0,04
64	endo-borneol	MO	1165	1165	0,2	0,09	0,04	0,01	0,04	0,02
65	p-menta-1,5-dien-8-ol	MO	1167	1166	0,08	0,03	0,01	-	-	-
66	(Z)-pinocanfona	MO	1171	1172	-	-	0,01	-	-	-
67	terpinen-4-ol	MO	1177	1174	1,3	0,9	0,4	0,06	0,1	0,08
68	mirtanal	MO	1179	1180*	-	-	0,01	-	-	-
69	(E,E)-1,3,5-undecatrieno	Ot.	1182	1181*	0,09	-	-	-	-	-
70	p-cimen-8-ol	MO	1185	1179	0,2	0,04	0,01	0,01	-	-
71	α-terpineol	MO	1190	1186	0,6	0,3	0,08	0,03	0,06	0,04
72	mirtenal	MO	1195	1195	0,2	0,06	0,06	0,06	0,1	0,07
73	safranal	MO	1197	1196	tr	-	0,04	-	-	-
74	dodecano	Ot.	1200	1200	-	-	-	-	0,07	0,1
75	(E)-piperitol	MO	1202	1207	0,04	-	-	-	-	-
76	decanal	Ot.	1206	1201	0,1	0,07	0,07	-	-	-
77	verbenona	MO	1213	1204	tr	-	-	0,02	0,04	-
78	β-ciclocitral	Ot.	1218	1217	-	0,03	0,03	-	-	-
79	(E)-carveol	MO	1219	1215	0,08	-	-	0,02	0,02	-
80	(Z)-carveol	MO	1232	1226	-	-	-	0,01	-	-
81	isovalerato de 3-(Z)-hexenilo	Ot.	1234	1238*	0,04	0,05	0,06	0,02	0,04	-
82	2-metilbutanoato de hexilo	Ot.	1239	1233	-	0,03	0,03	0,02	0,03	-
83	carvona	MO	1244	1239	0,03	0,02	0,01	0,03	0,05	0,02
84	geraniol	MO	1253	1249	0,06	-	-	-	-	-
85	pipertitona	MO	1256	1249	-	-	-	0,01	-	-
86	citronelato de metilo	MO	1263	1257	-	-	-	0,01	-	-
87	(E)-cinamaldehído + perilla aldehído	MO	1273	1267,1269	0,04	-	-	-	-	-
88	geranial	MO	1274	1264	-	-	-	0,02	0,06	0,06
89	vitispirano	Ot.	1276	1271*	-	-	0,01	-	-	-
90	safrol	Ot.	1287	1285	-	-	tr	0,03	0,1	0,1
91	perilla alcohol	MO	1296	1294	0,03	0,02	0,02	-	-	-
92	tridecano	Ot.	1299	1300	-	-	tr	-	-	0,1
93	acetato de carquejilo	MO	1300	1298	-	-	-	-	0,3	14,2
94	undecanal	Ot.	1307	1305	-	0,02	0,02	-	-	-
95	p-vinilguaiacol	Ot.	1313	1309	0,03	-	-	-	-	-
96	2,4-(E,E)-decadienal	Ot.	1316	1315	0,03	0,02	0,01	-	-	-





Tabla 1, continuación

97	geranato de metilo	MO	1324	1322	0,02	0,02	0,02	-	-	-
98	silfiperfol-5-eno	HS	1325	1326	-	-	-	0,2	0,3	0,1
99	presilfiperfol-7-eno	HS	1336	1334	-	0,04	0,02	0,02	0,1	0,2
100	$\delta$ -elemeno	HS	1335	1335	-	0,03	0,04	-	-	-
101	silfineno	HS	1343	1345	-	-	-	1,3	1,9	0,8
102	$\alpha$ -cubebeno	HS	1349	1345	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,08
103	silfiperfol-4,7(14)-dieno	HS	1354	1358	-	-	0,03	-	-	-
104	eugenol	Ot.	1357	1356	0,1	0,05	0,07	-	-	-
105	ciclosativeno	HS	1366	1369	-	0,03	0,05	0,4	0,4	0,2
106	iso-ledeno	HS	1371	1374	-	0,1	0,1	-	-	-
107	$\alpha$ -ylangeno	HS	1372	1373	0,3	0,2	0,4	0,4	0,1	0,2
108	$\alpha$ -copaeno	HS	1376	1374	0,3	0,4	0,8	3,0	3,1	1,3
109	modafen-2-eno	HS	1378	1382	-	0,1	0,06	4,9	5,7	2,7
110	( <i>E</i> )- $\beta$ -damascenona	Ot.	1384	1383	-	0,04	0,04	-	-	-
111	$\beta$ -bourboneno	HS	1385	1387	0,1	0,1	0,1	0,4	-	0,2
112	$\alpha$ -isocomeno	HS	1387	1387	-	-	-	1,0	1,5	0,5
113	$\beta$ -cubebeno	HS	1390	1387	0,3	0,2	0,2	2,2	1,9	0,5
114	$\beta$ -elemeno	HS	1392	1389	0,2	0,2	0,2	-	-	0,3
115	$\beta$ -longipineno	HS	1396	1400	0,04	-	-	-	-	-
116	tetradecano	Ot.	1400	1400	0,07	-	-	-	0,2	0,5
117	longifoleno	HS	1401	1407	tr	-	0,07	-	-	-
118	$\beta$ -isocomeno	HS	1406	1407	-	-	-	0,6	0,6	0,3
119	$\alpha$ -gurjuneno	HS	1409	1409	0,3	0,4	0,4	1,1	1,1	0,5
120	( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno	HS	1421	1417	3,3	4,0	4,7	17,4	17,6	8,5
121	$\beta$ -copaeno	HS	1429	1430	0,1	0,08	0,06	0,2	0,1	0,07
122	$\alpha$ -guaieno	HS	1437	1437	0,7	-	-	-	-	-
123	( <i>E</i> )- $\alpha$ -bergamoteno	HS	1437	1432	0,7	-	-	0,07	-	-
124	aromadendreno	HS	1439	1439	tr	0,7	1,0	0,4	0,3	0,1
125	( <i>Z</i> )- $\beta$ -farneseno	HS	1442	1440	0,3	0,4	0,5	-	-	-
126	$\alpha$ -himachaleno	HS	1447	1449	0,3	0,2	0,3	0,1	-	-
127	( <i>E</i> )-murola-3,5-dieno	HS	1449	1451	0,2	0,1	0,2	-	-	-
128	$\alpha$ -humuleno	HS	1454	1452	1,0	1,0	1,1	3,1	2,6	1,1
129	( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	HS	1456	1454	tr	-	-	-	-	-
130	9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-cariofileno	HS	1462	1464	0,1	0,5	0,7	-	-	-
131	allo-aromadendreno	HS	1462	1458	0,5	-	-	1,3	0,8	0,5
132	$\gamma$ -gurjuneno	HS	1471	1475	0,2	-	-	-	-	-
133	( <i>E</i> )-cadina-1(6),4-dieno	HS	1474	1475	0,3	0,2	0,3	-	-	-
134	$\gamma$ -muroloeno	HS	1477	1478	0,7	0,6	0,8	-	-	0,1
135	amorfa-4,7(11)-dieno	HS	1478	1479	-	-	-	-	0,2	-
136	germacreno D	HS	1483	1484	4,3	4,1	3,3	16,4	9,3	6,5
137	<i>ar</i> -curcumeno	HS	1485	1479	1,5	1,8	2,0	-	-	-
138	$\beta$ -selineno	HS	1489	1489	-	-	-	0,5	-	0,09
139	$\delta$ -selineno	HS	1491	1492	0,6	0,6	0,6	-	-	-
140	ledeno	HS	1497	1496	-	-	-	-	-	1,8



Tabla 1, continuación

141	biciclo-germacreno	HS	1498	1500	4,6	5,1	5,1	12,0	6,8	3,4
142	$\alpha$ -muroleno	HS	1502	1500	0,8	0,8	0,9	0,6	0,3	0,2
143	germacreno A	HS	1505	1508	0,2	0,09	0,2	-	-	0,4
144	( <i>E,E</i> )- $\alpha$ -farneseno	HS	1505	1505	0,2	-	-	-	-	-
145	valenceno	HS	1509	1496	-	-	-	0,4	-	-
146	$\beta$ -bisaboleno	HS	1510	1505	0,5	-	-	-	-	-
147	$\delta$ -amorfenol	HS	1511	1511	0,4	0,3	0,4	-	-	-
148	$\gamma$ -cadineno	HS	1514	1513	0,8	0,7	0,8	-	-	-
149	modafen-8- $\beta$ -ol	SO	1517	1513	-	-	-	8,4	-	-
150	$\delta$ -cadineno	HS	1525	1522	2,7	3,0	3,1	1,2	0,5	0,6
151	( <i>E</i> )-cadina-1,4-dieno	HS	1532	1533	0,1	0,1	0,2	-	-	-
152	( <i>Z</i> )-nerolidol	SO	1532	1531	tr	-	-	-	-	-
153	$\alpha$ -cadineno	HS	1538	1537	0,2	0,2	0,2	-	-	-
154	$\alpha$ -calacoreno	HS	1544	1544	0,7	0,6	0,7	0,1	-	0,08
155	( <i>E</i> )-nerolidol	SO	1555	1561	0,2	0,1	0,1	-	-	-
156	$\beta$ -calacoreno	HS	1563	1564	0,1	0,07	0,1	-	-	-
157	palustrol	SO	1569	1567	1,5	0,3	0,3	-	-	1,1
158	espatulenol	SO	1581	1577	10,2	11,0	6,3	5,1	1,5	2,5
159	óxido de cariofileno	SO	1586	1582	4,3	4,3	3,1	4,8	1,8	1,6
160	viridiflorol	SO	1594	1592	0,4	0,9	0,3	-	1,2	0,3
161	hexadecano	Ot.	1600	1600	-	-	-	-	0,8	1,4
162	ledol	SO	1607	1602	1,2	-	-	-	-	0,4
163	tetradecanal	Ot.	1609	1611	0,6	-	-	-	-	-
164	aristol-9-en-3-ol	SO	1612	sd	0,3	0,1	0,09	-	-	-
165	óxido de humuleno II	SO	1613	1608	-	-	-	-	0,2	0,2
166	junenol	SO	1618	1618	0,3	-	-	-	-	-
167	$\alpha$ -corocaleno	HS	1623	sd	0,3	0,2	0,2	-	-	-
168	1- <i>epi</i> -cubenol	SO	1629	1627	0,3	0,2	0,3	-	-	-
169	cubenol	SO	1636	1645	-	-	-	0,1	-	-
170	<i>epi</i> - $\alpha$ -murolol	SO	1646	1640	-	-	-	0,2	-	-
171	$\alpha$ -murolol	SO	1648	1644	0,7	-	-	-	-	-
172	$\beta$ -eudesmol	SO	1654	1649	-	-	-	0,2	-	0,3
173	$\zeta$ -cadinol	SO	1655	1650*	1,2	0,7	0,5	-	-	-
174	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-cariofileno	SO	1663	1668	0,3	-	-	-	-	-
175	cadaleno	HS	1676	1675	0,5	0,4	0,3	0,1	-	-
176	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	SO	1690	1685	1,3	-	-	-	-	0,1
177	heptadecano	Ot.	1699	1700	-	-	0,03	-	-	-
178	14-hidroxi- $\alpha$ -humuleno	SO	1715	1713	0,3	-	-	-	-	-
179	pentadecanal	Ot.	1714	1715*	-	0,2	0,2	-	-	-
180	<i>iso</i> -bicclogermacrenal	SO	1736	1733	0,2	0,3	0,1	0,2	-	-
181	acetato de ( <i>E</i> )-sesquilandulilo	SO	1740	1739	-	-	-	-	-	0,3
182	oplopanona	SO	1742	1739	0,07	-	-	-	-	-
183	bisabolona	SO	1745	1740	-	0,1	0,05	-	-	-
184	escumulosona	SO	1766	1770	0,2	0,09	0,05	0,07	-	-



Tabla 1, continuación

185	epi-ciclocolorenona	so	1783	1774	-	0,07	0,04	-	-	-
186	octadecano	Ot.	1800	1800	-	-	-	-	0,5	1,0
187	neofitadieno	Ot.	1850	1844*	-	1,0	0,5	3,0	0,1	0,2
188	hexahidro-farnesilacetona	Ot.	1854	1848*	0,2	0,2	0,1	0,1	-	-
189	(E,E)-5,9-farnesil acetona	Ot.	1925	1913	0,2	-	-	-	-	-
<b>Total identificado (%)</b>					<b>94,4</b>	<b>86,8</b>	<b>90,9</b>	<b>93,8</b>	<b>93,2</b>	<b>90,6</b>
<b>Hidrocarburos monoterpenos (%)</b>					37,0	36,8	46,7	1,3	26,5	21,6
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>					4,2	2,0	1,1	0,6	2,2	15,1
<b>Hidrocarburos sesquiterpenos (%)</b>					28,6	27,8	30,5	69,6	55,4	31,3
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>					23,0	18,2	11,2	19,1	4,7	6,8
<b>Otros (%)</b>					1,6	2,0	1,4	3,2	4,4	15,8
<b>No identificados (%)</b>					5,6	13,2	9,1	6,2	6,8	9,4

**Tabla 1:** Composición cualitativa y cuantitativa del volatilo de *Baccharis uncinella* según la técnica de extracción empleada. Referencias: extracción-destilación simultáneas (SDE); extracción por arrastre con vapor en equipo de laboratorio (LSD); extracción por arrastre con vapor en unidad piloto (PSD); concreto de extracción con fluido supercrítico a 40°C y 80 bar (SFEC); volátiles de la extracción con fluido supercrítico a 40°C y 80 bar (SFEV); y residuo de extracción con fluido supercrítico a 40°C y 90 bar (SFER).

<sup>a)</sup> Los componentes son listados de acuerdo a su índice de retención en *HP-5MS*; <sup>b)</sup> Tipo de compuestos por familias: HM (hidrocarburo monoterpeno); MO (monoterpeno oxigenado); HS (hidrocarburo sesquiterpeno); SO (sesquiterpeno oxigenado); Ot. (otros). <sup>c)</sup> Proporciones relativas de los compuestos volátiles expresadas como porcentaje de áreas relativas en *GC-MS* con columna *HP-5MS*. Los factores de respuesta para cada compuesto se consideraron como iguales. <sup>d)</sup> La identificación de los picos se realizó por comparación de los valores experimentales de índices de retención lineal en columna *HP5-MS (LRIt)* con los valores reportados en la literatura para compuestos puros (*LRIt*) (Davies, 1990; Adams, 2007); y por comparación de espectros de masa experimentales con los respectivos patrones almacenados en bases de datos (McLafferty y Stauffer, 1994; NIST, 1999; Adams, 2007); (-) no detectado; (tr): trazas (menor a 0,01%).

Respecto al número de metabolitos volátiles de *B. uncinella* determinados por las diferentes técnicas: 129 fueron identificados por *SDE*, 107 por *LSD* y 118 por *PSD*. Por otra parte, con la metodología de extracción con  $\text{CO}_2$  en estado supercrítico, para la muestra *SFEC* fueron identificados 80 componentes, mientras que para la *SFEV* y *SFER* lo fueron 71 y 77, respectivamente. De acuerdo a la Tabla 1, los porcentajes de identificación de las muestras fueron los siguientes: *SDE* (94,4%), *LSD* (86,8%), *PSD* (90,9%), *SFEC* (93,8%), *SFEV* (93,2%) y *SFER* (90,6%). Los resultados anteriores demuestran que, en las condiciones experimentales reportadas, la *SDE* fue la metodología más adecuada para el estudio del volatilo ya que permitió obtener el mayor número de metabolitos secundarios desde la matriz vegetal. Por dicha razón, tal técnica fue la que se tomó como modelo para los ulteriores experimentos de extracción del volatilo en *Baccharis* spp. (capítulo 4).



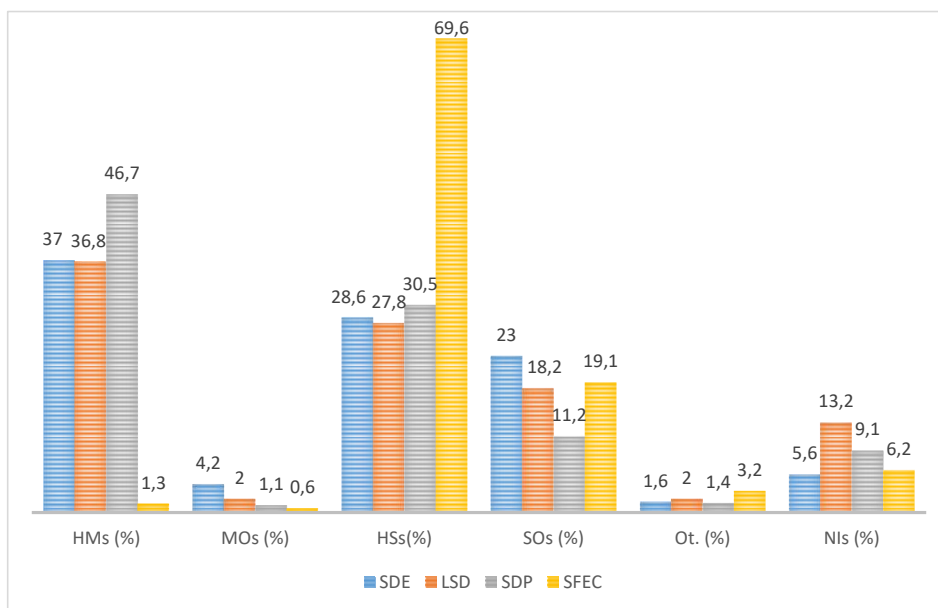
Coincidentemente con los resultados de éste trabajo, en un estudio comparando diferentes metodologías de extracción sobre las flores de “ylang-ylang” (*Cananga odorata* Hook Fil. *et.* Thomson, Annonaceae), Stashenko *et al.* (1996) obtuvieron 73 metabolitos volátiles trabajando con *SDE* y *SFE*, mientras que solamente fue posible extraer 51 por *SD*, por lo que los autores afirman que las dos primeras técnicas son las más adecuadas para la extracción de dicho material vegetal. En otro reporte comparando los extractos de *SDE* y *SD* de hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*, Solanaceae), Peng *et al.* (2004) se obtuvieron 377 componentes por medio de la primera técnica, y 322 por la segunda. Adicionalmente, los autores destacaron que no solamente es posible obtener mayor número de componentes volátiles empleando *SDE*, sino que se obtiene una mayor cantidad de extracto en masa (Peng *et al.*, 2004).

Los hidrocarburos monoterpénicos (HMs) y sesquiterpénicos (HSs) fueron los principales grupos de compuestos identificados en todos los extractos salvo en *SFEC* donde lo fueron los HSs junto con los sesquiterpenos oxigenados (SOs). Sin embargo, la composición química de las diferentes muestras varía tanto cuantitativa como cualitativamente según el método de extracción empleado (Tabla 1, Figuras 14 y 15). Por ejemplo, compuestos muy volátiles como: 1-hexen-3-ona, hexanal, 3-(*E*)-hexenol y 2-(*E*)-hexenal (compuestos de “hoja verde”, capítulo 1) solo fueron determinados en el extracto obtenido por *SDE*, en consonancia con lo publicado por Peng *et al.* (2004) para tabaco. Es frecuente que en las metodologías de arrastre con vapor, éste tipo de componentes muy volátiles no sean detectados debido a que los mismos son perdidos hacia la atmósfera (Charles y Simon, 1990; Peng *et al.*, 2004). En la misma línea, Stashenko *et al.* (2004) constataron un aumento en la proporción de los compuestos más volátiles (hidrocarburos monoterpénicos) en el volatilo de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae) obtenido por *SDE* comparado con el obtenido por hidrodestilación convencional y asistida por microondas.

Por otra parte, una serie homóloga de alcanos normales (octano a octadecano) fue detectada en los extractos obtenidos por CO<sub>2</sub> supercrítico, lo que se debe a la solubilización de los mismos desde las ceras epicuticulares de las hojas, aspecto que ha sido previamente reportado (Stashenko *et al.*, 1996; Stashenko *et al.*, 2004; Athukorala y Mazza, 2010).



En nuestro caso, comparando ambas metodologías de extracción por arrastre con vapor, se constataron diferencias tanto a nivel cuantitativo como cualitativo (Tabla 1 y Figura 14), pero en éste caso las diferencias se pueden explicar por las características propias de cada una de las escalas de trabajo, entre ellas la cantidad de vapor disponible para la extracción y la diferente accesibilidad de éste al material vegetal (vinculado a la porosidad del lecho) (Cerpa Chávez, 2007). Como puede verse en la Tabla 1 y Figura 14, se observó una tendencia general de aumento de la proporción de hidrocarburos y disminución de los compuestos oxigenados para la escala piloto. Dado que la calidad de un aceite esencial en general depende de la composición oxigenada (relacionado a notas aromáticas agradables; Stashenko *et al.*, 1996), la calidad del aceite destilado obtenido a escala piloto sería menor que la del obtenido en condiciones de laboratorio. Es importante señalar que los aceites producidos a ésta última escala, en general son más parecidos en cuanto a su composición a los productos obtenidos industrialmente que a los obtenidos a escala de laboratorio (Cerpa Chávez, 2007).



**Figura 14:** Composición resumida de los extractos de *B. uncinella* obtenidos por diferentes técnicas. Referencias: **SDE:** extracción-destilación simultánea; **LSD:** arrastre con vapor en condiciones de laboratorio; **PSD:** arrastre con vapor en sistema piloto; **SFEC:** concreto de extracción por CO<sub>2</sub> supercrítico; **HMs:** hidrocarburos monoterpénicos; **MOs:** monoterpénos oxigenados; **HSs:** hidrocarburos sesquiterpénicos; **SOs:** sesquiterpénos oxigenados; **Ot.:** otros; **NIs:** no identificados.

De acuerdo a los resultados obtenidos, existen importantes diferencias cuantitativas y cualitativas entre la composición de los extractos obtenidos por las técnicas de arrastre con vapor (*LSD* y *PSD*) y el obtenido por *SDE* (Tabla 1 y Figura 14). Con ésta última,

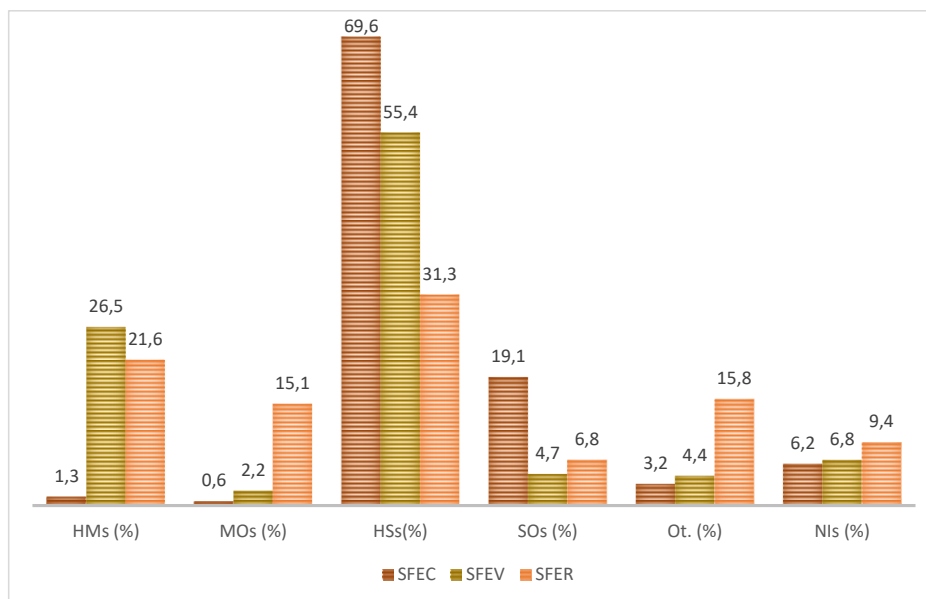


se constató un aumento del 120% (4,2% vs. 2,0%; *SDE* vs. *LSD*, respectivamente) en la composición de monoterpenos oxigenados (MOs) y del 26% (23,0% vs. 18,2%) en sesquiterpenos oxigenados (SOs), comparando ambas a escala de laboratorio (Figura 14). La composición en hidrocarburos monoterpénicos (HMs) tuvo muy poca variación entre las técnicas de *SDE* y de *LSD* (37,0 vs. 36,8%), mientras que se observó una mayor proporción de éstos en el extracto obtenido por *PSD* (46,7%). Por otra parte, la proporción de hidrocarburos sesquiterpénicos (HSs) fue similar en la comparación entre las tres metodologías (Figura 14).

Cuando se compararon las técnicas de *LSD*, *PSD* y *SDE* con *SFEC*, también existieron diferencias apreciables a nivel cualitativo y cuantitativo (Tabla 1 y Figura 14). Se evidenció un aumento en la proporción de los HSs (69,6% para *SFEC* vs. 28,6%, 27,8% y 30,5% para *SDE*, *LSD* y *PSD*; respectivamente) y una marcada disminución en los monoterpenos (HMs y MOs) respecto de las técnicas de destilación (Figura 14). Los resultados concuerdan con lo publicado por Stashenko *et al.* (1996, 2004) quienes determinaron que la *SFE* es la técnica más apropiada para una completa extracción de los hidrocarburos sesquiterpénicos.

En lo que respecta a los distintos extractos obtenidos por *SFE*, el extracto *SFEV* presentó una mayor composición de monoterpenos que *SFEC* (Figura 15), lo que es razonable debido a que los mismos son los terpenos más volátiles y son fácilmente arrastrados por el CO<sub>2</sub> cuando se produce el proceso de despresurización. Este comportamiento ha sido previamente reportado incluso para la especie *B. dracunculifolia* (Stashenko *et al.*, 1996; Cassel *et al.*, 2000; Da Porto *et al.*, 2009).

Por último, en el análisis del residuo *SFER*, se constató un aumento en la proporción de MOs (15,1%), principalmente debido a la presencia de acetato de carquejilo (14,2%); así como se incrementó la proporción de hidrocarburos alcanos y otros tipos de componentes catalogados en conjunto como “otros” (15,8%) (Tabla 1 y Figura 15).



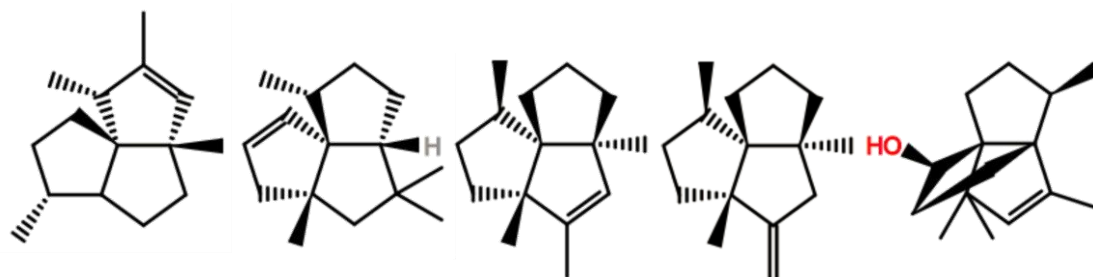
**Figura 15:** Composición resumida de los extractos de *B. uncinella* obtenidos por CO<sub>2</sub> en estado supercrítico. Referencias: **SFEC:** concreto (40°C, 80 bar); **SFEV:** fracción volátil (40°C, 80 bar); **SFER:** residuo (40°C, 90 bar); **HMs:** hidrocarburos monoterpénicos; **MOs:** monoterpenos oxigenados; **HSs:** hidrocarburos sesquiterpénicos; **SOs:** sesquiterpenos oxigenados; **Ot.:** otros; **NIs:** no identificados.

El acetato de carquejilo es un compuesto que se ha postulado como quimiomarcador de *B. trimera* (Simões-Pires, 2004; capítulo 7) y su presencia en *B. uncinella* no ha sido previamente reportada. Debido a que solamente fue determinado al aumentar la presión del CO<sub>2</sub> en el sistema extractivo de *SFE*, se formula la hipótesis de que dicho compuesto debe ser almacenado internamente en la planta, y no a nivel superficial. En otras palabras, en las condiciones usuales de extracción de los componentes del volatilo por *SFE* (40°C, 80 bar), el mismo no fue obtenido, pero al aumentar la presión (y por tanto, la difusividad y viscosidad del CO<sub>2</sub>) fue posible obtenerlo en una buena proporción del extracto (14,2%). En la misma línea que la hipótesis planteada, Budel y Duarte (2008) describieron la presencia de dos tipos de estructuras secretoras en *B. uncinella*: tricomas glandulares que almacenarían el aceite esencial a nivel de la superficie de la hoja, y ductos internos (canales esquizógenos) próximos al floema cuyo contenido no fue identificado. De acuerdo a la hipótesis aquí planteada, el acetato de carquejilo podría ser almacenado en dichos ductos secretores, o incluso en idioblastos (células aisladas en el parénquima vegetal; parte del esclerénquima) con actividad ergástica (Platt y Thomson, 1992; Budel y Duarte, 2007). Para confirmar la misma, se debería tomar directamente el contenido oleoso de los canales, idioblastos y/o de los tricomas glandulares, y analizar por *GC-MS* (McCaskill *et al.*, 1992). Debido a



limitaciones experimentales, éste procedimiento no fue abordado en la presente tesis doctoral, por lo cual dicho postulado permanece como hipótesis.

Es importante remarcar que tanto en las muestras de *SFEC* como en *SFEV* y *SFER* se identificaron componentes cuya ocurrencia no fue constatada en *LSD*, *PSD* y *SDE*, como por ejemplo, los MOs: óxidos de  $\alpha$ -pineno y de limoneno, (*Z*)-tuyona, alcanfor, verbenona, piperitona, (*E*) y (*Z*)-carveol, geranial, citronelato de metilo y acetato de carquejilo (Tabla 1). También se detectaron únicamente en los extractos obtenidos con  $\text{CO}_2$  en estado supercrítico algunos sesquiterpenos poco comunes en los aceites esenciales, como: silfiperfol-5-eno, silfineno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -isocomenos y modafen-8- $\beta$ -ol, entre otros (Figura 16). Estos compuestos denominados poliquinenos presentan estructuras complejas en las que un carbono cuaternario es compartido por tres anillos de cinco átomos de carbono, presentando 4 o 5 centros estereogénicos (Gupta *et al.*, 1991). Este tipo de componentes se han reportado como fuerte anti-alimentarios en ensayos con insectos plagas de cultivos agrícolas (González-Coloma *et al.*, 2002).



**Figura 16:** Estructuras de sesquiterpenos poco comunes (poliquinenos) identificados por GC-MS en los extractos de *B. uncinella* obtenidos por  $\text{CO}_2$  en estado supercrítico. De derecha a izquierda: silfiperfol-5-eno, silfineno,  $\alpha$ -isocomeno,  $\beta$ -isocomeno y modafen-8- $\beta$ -ol.

Es posible que estos compuestos se degraden (por hidrólisis, oxidación y/o isomerización) por la acción de las condiciones fisicoquímicamente exigentes de los procesos a ebullición (temperatura, medio acuoso), y que por ello no sean detectados en *LSD*, *PSD* y *SDE*, generándose artefactos (Stashenko *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2006; Da Porto *et al.*, 2009).

En vista de los resultados anteriores, se evidencia la necesidad de aplicar y combinar más de una técnica extractiva para caracterizar completamente el complejo volatiloma de una especie aromática como *B. uncinella* (Stashenko *et al.*, 1996).





### 3.3 Interpretación estadística

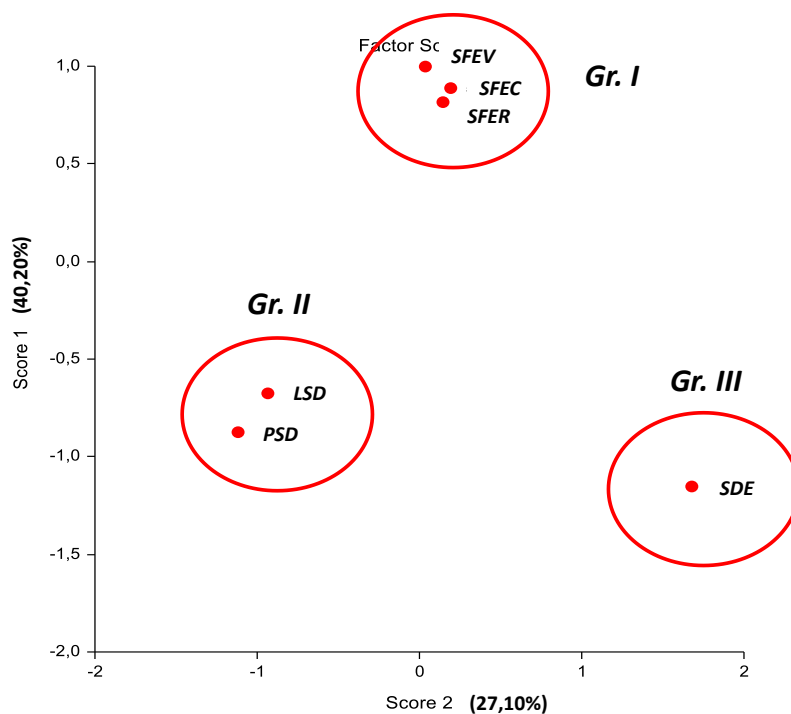
A partir de la composición volátil de cada una de las muestras presentada en la Tabla 1, se estudió la posible correlación entre las diferentes técnicas extractivas empleando herramientas de estadística multivariable (*PCA*, *HCA*).

El método de *PCA* se basa en descomponer la matriz original de datos (proporción de cada uno de los compuestos en cada una de las muestras) empleando algoritmos matemáticos para obtener nuevas coordenadas (combinaciones lineales de los datos originales) que describan mejor la variancia observada, reduciendo la dimensionalidad sin perder información (Vogt, 1987; Alvarenga *et al.*, 2001). Frecuentemente, una matriz original compleja puede ser representada sólo por unas pocas “variables latentes” (usualmente dos), que son capaces de describir gran parte de la varianza, permitiendo su inspección e interpretación visual (Vogt, 1987). Así, pueden ser obtenidos agrupamientos en un gráfico realizado con las dos primeras variables latentes (*PC1* y *PC2*), siempre teniendo en cuenta que la definición de tales agrupamientos debe ser realizada mediante consideraciones objetivas (Vogt, 1987).

En el análisis por *PCA* de los datos presentados en la Tabla 1, se pudo observar tres grupos bien definidos de técnicas extractivas (Figura 17):

- 1) un grupo formado por las muestras obtenidas mediante extracción con  $\text{CO}_2$  supercrítico (*SFEC*, *SFEV* y *SFER*);
- 2) otro por las muestras originadas por las dos técnicas de arrastre por vapor (*LSD* y *PSD*);
- 3) el último compuesto por la muestra resultante de *SDE*.

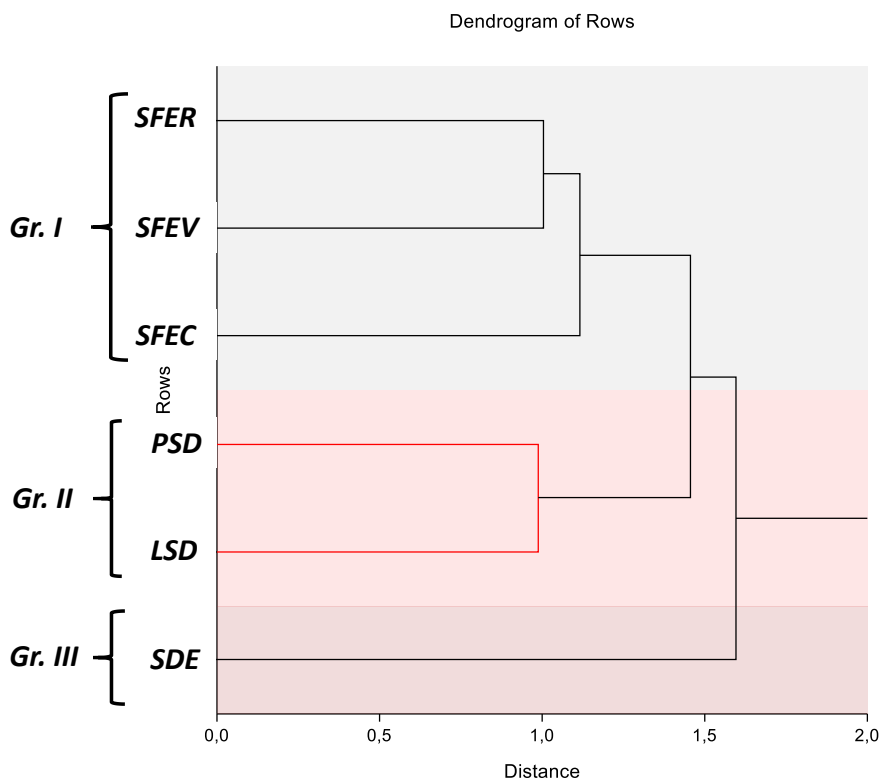
Con las dos primeras variables latentes del análisis por *PCA* fue posible explicar 67,3% de la varianza observada para las distintas muestras (Figura 17).



**Figura 17:** Análisis de componentes principales (PCA) para las diferentes muestras del volatilo de *B. uncinella* generadas por las distintas técnicas extractivas Referencias: **SDE:** extracción-destilación simultánea; **LSD:** arrastre con vapor en condiciones de laboratorio; **PSD:** arrastre con vapor en sistema piloto; **SFEC:** concreto de extracción supercrítica (40°C, 80 bar); **SFEV:** fracción volátil de extracción supercrítica (40°C, 80 bar); **SFER:** residuo de extracción supercrítica (40°C, 90 bar).

El método de *HCA* es una herramienta para dividir o formar grupos (*clusters*) a partir de los datos originales (llamados en ésta metodología *OTUs*, *operational taxonomic units*) en base a algoritmos de búsqueda de similitud (Vogt, 1987). Cada algoritmo empleado tiene sus propios criterios de similitud, por lo que para comparaciones entre diferentes análisis de *HCA*, se debe emplear el mismo algoritmo (Vogt, 1987). Generalmente, los resultados de éste análisis se presentan bajo la forma de dendrogramas, en los que es más fácil visualizar las correlaciones de similitud.

En la Figura 18 se muestra el análisis de *HCA*, el que, en concordancia con el *PCA* se obtuvieron los mismos tres grupos: 1) *SFEC*, *SFEV* y *SFER*; 2) *LSD* y *PSD*; y 3 *SDE*.



**Figura 18:** Análisis jerárquico de grupos (HCA) para las diferentes muestras de *B. uncinella* generadas por las diferentes técnicas extractivas. Referencias: **SDE:** extracción-destilación simultánea; **LSD:** arrastre con vapor en condiciones de laboratorio; **PSD:** arrastre con vapor en sistema piloto; **SFEC:** concreto de extracción supercrítica (40°C, 80 bar); **SFEV:** fracción volátil de extracción supercrítica (40°C, 80 bar); **SFER:** residuo de extracción supercrítica (40°C, 90 bar).

A través del cálculo de distancias euclidianas, es posible visualizar que la muestra *SFEV* se asemejó más a *SFER* que a *SFEC*, a pesar de que la primera y la tercera fueron obtenidas bajo las mismas condiciones de temperatura y presión (40°C y 80 bar) (Figura 18). Un aspecto muy interesante del análisis de *HCA* es que demostró que la composición brindada por *SDE* tuvo la mayor de las diferencias comparada con el resto de las técnicas, ya que se separó a mayor distancia euclidiana de las técnicas de *SD* y *SFE* (Figura 18). Lo mismo implica que los resultados obtenidos por *SDE* no son directamente comparables a los obtenidos por medio de las otras técnicas extractivas empleadas en éste trabajo.

Que los resultados obtenidos por la aplicación de *SDE* a *B. uncinella* tengan dicho comportamiento diferente al resto significa, en éste contexto, que dicha técnica extractiva brinda un mayor nivel de información (mayor cantidad de componentes extraídos). Lo anterior implica que, para este modelo de trabajo (*B. uncinella*), la *SDE* resultó ser la técnica más útil para estudiar su volatiloma. Por otra parte, dicha técnica

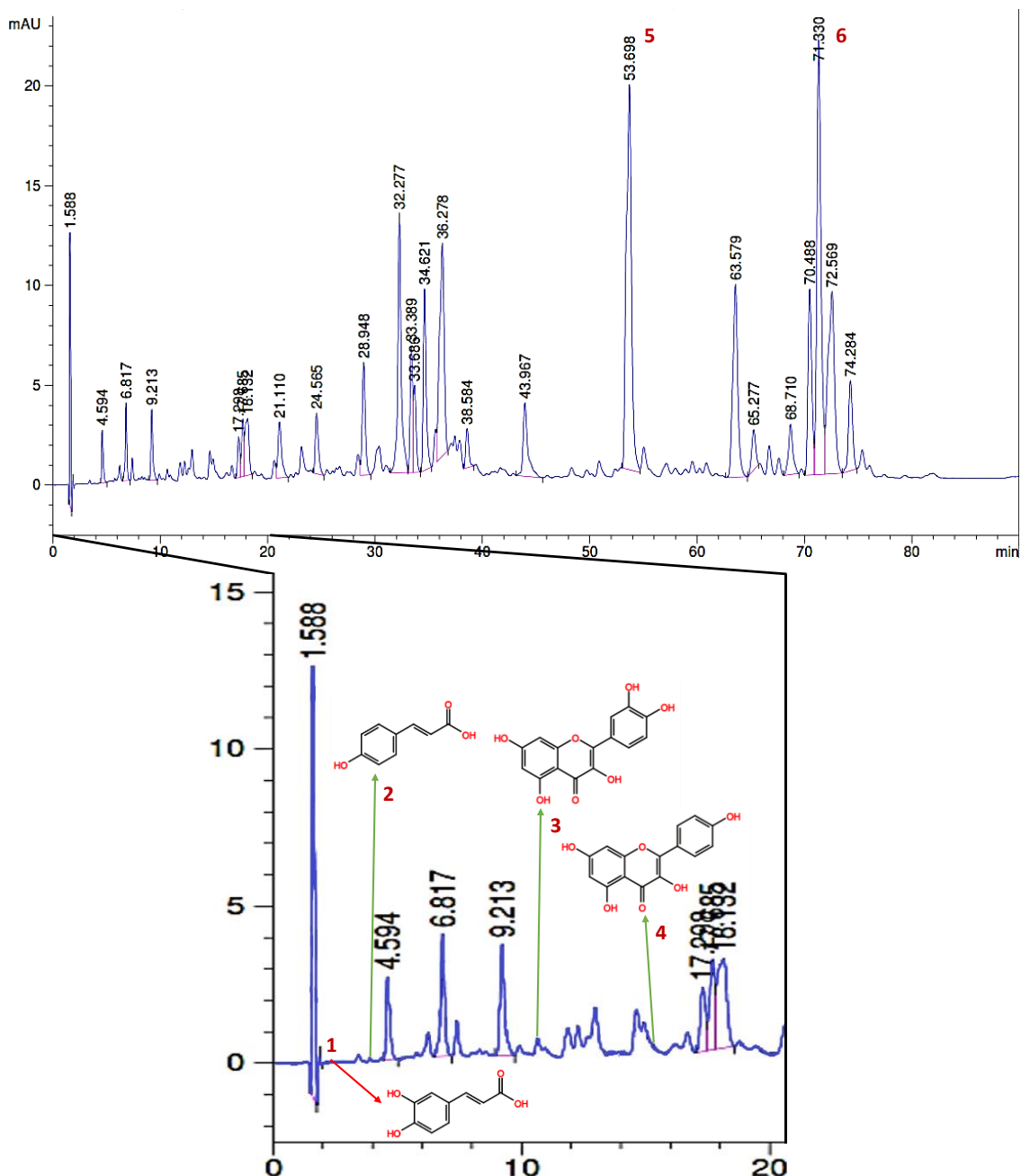


presenta la ventaja adicional de emplear poca cantidad de material vegetal y poco volumen de solvente (Parliment, 2002). Asimismo, según reportes de bibliografía, de las diferentes técnicas extractivas, la *SDE* es la que origina una composición más parecida con las metodologías de “espacio de cabeza” (por ejemplo, *SPME*), lo que es relevante porque éstas últimas son las más representativas de la emisión real de metabolitos volátiles a la atmósfera (Parliment, 2002; Stashenko *et al.*, 2004). De ésta manera, la elección de *SDE* como técnica de referencia para obtener el volatiloma de *Baccharis* spp. (capítulo 4) tuvo por objetivo obtener un mayor nivel de información sobre la expresión metabólica de dichas especies.

### 3.4 Composición química no volátil

El análisis de composición no volátil se realizó con el objetivo de evaluar la posible extracción de polifenoles en las condiciones experimentales empleadas en la *SFE*. En la Figura 19 se presenta el cromatograma del análisis del extracto *SFEC* por medio de *HPLC-UV* ( $\lambda = 345$  nm) en fase reversa. De acuerdo a la comparación de tiempos de retención con estándares en las mismas condiciones analíticas, se pudo establecer tentativamente la presencia en el extracto de ácido (*E*)-*p*-cumárico, quercetina y kaempferol a nivel de trazas (Figura 19).

De acuerdo a lo anterior, se pudo confirmar una baja presencia de polifenoles en las condiciones extractivas aplicadas (40°C, 80 bar) para *B. uncinella*, obteniéndose un mayor número de componentes y mayor cantidad extraída a medida que se aumenta la presión del fluido extractivo (por ejemplo, a 150 bar) de acuerdo al trabajo de Lucas (2015).



**Figura 19:** Cromatograma obtenido por HPLC-UV (en fase reversa  $C_{18}$ ;  $\lambda = 345$  nm) del extracto SFEC (40°C, 80 bar) de *B. uncinella*. Con este sistema y con la inyección de estándares descrita en el texto, sólo fue posible la identificación tentativa a bajos niveles de concentración de ácido (E)-p-cumárico (2), quercetina (3) y kaempferol (4; hombro). Picos cromatográficos como (5) y (6) no pudieron ser identificados. Para el caso del ácido caféico (1), no se evidenció ningún tipo de respuesta cromatográfica en el extracto en su tiempo de retención.

Los componentes que presentaron mayor señal en el UV (picos 5 y 6 del cromatograma de la Figura 19) y que eluyeron a mayores tiempos de retención, no pudieron ser identificados. Debido a que se trabajó con una fase reversa  $C_{18}$ , dichos compuestos tendrían mayor carácter hidrofóbico. No es factible que los mismos fueran los



componentes de los aceites esenciales debido a que aquellos presentan absorciones menores a la longitud de onda de trabajo. Sin embargo, es probable que dichos picos mayoritarios se deban a la presencia de pigmentos vegetales (como clorofila a y b,  $\beta$ -caroteno, luteína), ya que los mismos exhiben una alta absorbancia en ésta región del espectro UV y tienen una alta hidrofobicidad que los hacen extraíbles por el CO<sub>2</sub> en estado supercrítico sin el empleo de modificadores (Sovová *et al.*, 2004).

Adicionalmente, es posible que en el extracto supercrítico *SFEC* se encuentren presentes triterpenos, como el sitosterol, estigmasterol, ácidos ursólico y oleanólico, los que han sido aislados y caracterizados para ésta especie (Grecco *et al.*, 2010; Passero *et al.*, 2011). Sin embargo para determinar éste tipo de componentes se debe trabajar a otra longitud de onda (por ejemplo,  $\lambda = 210$  nm), ya que los mismos presentan absorbancia despreciable en las condiciones experimentales descriptas. Dicha determinación excede el objetivo de ésta tesis, y por tal no será tratada.

#### 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El trabajo realizado en el marco de éste capítulo posibilitó entender la complejidad del volatiloma de *Baccharis* spp. (a través del modelo de *B. uncinella*). Se obtuvieron perfiles de composición volátil diferenciales para la especie aplicando diferentes metodologías extractivas sobre sus partes aéreas: destilación con arrastre por vapor en escala de laboratorio y piloto (*LSD* y *PSD*), extracción-destilación simultáneas (*SDE*) y extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (*SFE*).

La técnica de *SDE* permitió obtener la mayor cantidad de metabolitos volátiles de la matriz vegetal (129; en su mayoría componentes terpénicos) y presentó mayor nivel de información, por lo que se la seleccionó como metodología modelo para estudios ulteriores del volatiloma de *Baccharis* spp.

Mediante la metodología de *SFE* fue posible la identificación de metabolitos que no fueron detectados mediante las otras metodologías extractivas: óxidos de  $\alpha$ -pineno y limoneno, acetato de carquejilo, (*Z*)-tuyona, alcanfor, verbenona, e hidrocarburos sesquiterpénicos del tipo poliquineno, entre otros; los que podrían degradarse en las condiciones hidrotérmicas dominantes de *LSD*, *PSD* y *SDE*.



## 5. BIBLIOGRAFIA

1. R.P. Adams. **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA; 804 pp.
2. Agilent Technologies. **2015**. GC and GC/MS. Your Essential Resource for Columns & Supplies. Technical Report. ([https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5991-5213EN\\_GC\\_Catalog\\_Columns.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/catalogs/public/5991-5213EN_GC_Catalog_Columns.pdf)). Recuperado 29/09/2017.
3. S.A.V. Alvarenga, M.J.P. Ferreira, V.P. Emerenciano, D. Cabrol-Bass. **2001**. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 56: 27-37.
4. Y. Athukorala, G. Mazza. **2010**. Supercritical carbon dioxide and hexane extraction of wax from triticale straw: Content, composition and thermal properties. *Ind. Crops Prod.*, 31: 550-556.
5. V.I. Babushok, I.G. Zenkevich. **2009**. Retention Indices for Most Frequently Reported Essential Oil Compounds in GC. *Chromatographia*, 69: 257-269.
6. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. **2008**. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446-475.
7. C. Bedinot, R.M.F. Vargas, E. Cassel. **2011**. Multi-Purpose Pilot Unit for Supercritical Fluid Extraction. Proceedings of the 13<sup>th</sup> European Meeting on Supercritical Fluids, The Hague, Netherlands. International Society for Advancement of Supercritical Fluids (ISASF). Paper 52.
8. C. Bicchì, M. Maffei. **2012**. The Plant Volatilome: Methods of Analysis. In J. Normanly (ed.): High-Throughput Phenotyping in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 918. Springer Science + Business Media LLC, New York, NY, USA; pp. 289-310.
9. J.M. Budel, M.R. Duarte. **2007**. Caracteres Morfoantômicos de Partes Vegetativas Aéreas de *Baccharis coridifolia* DC. (Asteraceae-Astereae). *Lat. Am. J. Pharm.*, 26: 723-731.
10. J.M. Budel, M.R. Duarte. **2008**. Estudio Farmacobotánico de Folha e Caule de *Baccharis uncinella* DC., Asteraceae. *Lat. Am. J. Pharm.*, 27: 740-746.
11. E. Cassel, C.D Frizzo, R. Vanderlinde, L. Atti-Serafini, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2000**. Extraction of *Baccharis* Oil by Supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39: 4803-4805.
12. E. Cassel, R.M.F. Vargas. **2006**. Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation. *J. Mex. Chem. Soc.*, 50: 126-129.
13. E. Cassel, R.M.F. Vargas, N. Martinez, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2009**. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Ind. Crops Prod.*, 29: 171-176.
14. M.G. Cerpa Chávez. **2007**. Hidrodestilación de aceites esenciales: modelado y caracterización. Tesis de Doctorado, Universidad de Valladolid, Valladolid, España. 304 pp.
15. A. Chaintreau. **2001**. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review. *Flavour Fragr. J.*, 16: 136-148.
16. D.J. Charles, J.E. Simon. **1990**. Comparison of Extraction Methods for the Rapid Determination of Essential Oil Content and Composition of Basil. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 115: 458-462.
17. J.F. Clevenger. **1928**. Apparatus for the determination of volatile oil. *J. Pharm. Sci.*, 17: 345-349.
18. B. D'Acampora Zellner, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. **2010**. Analysis of Essential Oils. In: H. Can Başer, G. Buchbauer (eds.): Handbook of Essential Oils. Science, Technology and Applications. CRC Press, Boca Raton, FL, USA; pp. 151-184.
19. C. Da Porto, D. Decorti, I. Kikic. **2009**. Flavour compounds of *Lavandula angustifolia* L. to use in food manufacturing: Comparison of three different extraction methods. *Food Chem.*, 112: 1072-1078.
20. E. Dellacassa, D. Lorenzo, D. Paz. **2004**. Procesos de Extracción aplicados a la obtención de Productos Aromáticos de origen vegetal. En: INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria): Estudios en Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas, Serie FPTA-INIA 11, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay; pp. 153-158.
21. E. Dellacassa (ed.). **2010**. Normalización de Productos Naturales Obtenidos de Especies de la Flora Aromática Latinoamericana, ediPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 334 pp.
22. K.C. Fabiane, R. Ferronato, S.B. Onofre, A.C. dos Santos. **2008**. Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). *Braz. J. Pharmacogn.*, 18: 197-203.
23. European Pharmacopoeia, 6th edn. **2008**. EDQM (Council of Europe), Strasbourg, France.
24. A. González-Coloma, F. Valencia, N. Martín, J.J. Hoffmann, L. Hutter, J.A. Marco, M. Reina. **2002**. Silphinene Sesquiterpenes as Model Insect Antifeedants. *J. Chem. Ecol.*, 28: 117-129.
25. S.d.S. Grecco, L. Gimenes, M.J.P. Ferreira, P. Romoff, O.A. Favero, C.A. Zalewski, J.H.G. Lago. **2010**. Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 38: 1234-1237.
26. A.K. Gupta, X. Fu, J.P. Snyder, J.M. Cook. **1991**. General approach for the synthesis of polyquinenes via the Weiss reaction. *Tetrahedron*, 47: 3665-3710.



27. V. Havlíček, J. Spížek (Eds.). **2014**. Natural Products Analysis. Instrumentation, Methods, and Applications. John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. 608 pp.
28. T. Holm. **1999**. Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. *J. Chromatogr. A*, 842: 221-227.
29. E. Kováts. **1958**. Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta*, 41: 1915-1932.
30. S. Kumazawa, M. Yoneda, I. Shibata, J. Kanaeda, T. Hamasaka, T. Nakayama T. **2003**. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem. Pharm. Bull.*, 51: 740-742.
31. D. Lorenzo, D. Paz, P. Davies, J. Villamil, R. Vila, S. Cañigüeral, E. Dellacassa. **2005**. Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochem. Anal.*, 16: 39-44.
32. A.M. Lucas. **2015**. Estudos sistemáticos de obtenção e impregnação supercrítica de extratos de *Baccharis*. Tese de Doutorado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 90 pp.
33. D. McCaskill, J. Gershenzon, R. Croteau. **1992**. Morphology and monoterpene biosynthetic capabilities of secretory cell clusters isolated from glandular trichomes of peppermint (*Mentha piperita* L.). *Planta*, 187: 445-454.
34. F.W. McLafferty, D.B. Stauffer. **1994**. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 6<sup>th</sup> edition. Wiley-Interscience, New York, USA. 7872 pp.
35. V.R. Meyer. **2014**. HPLC and Ultra HPLC: Basic Concepts. In: K. Hostettmann (ed.). Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods, Volume III. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK; pp. 207-226.
36. L. Mondello. **2015**. Mass Spectra of Flavors and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds, 3rd ed., Wiley, New York.
37. G.B. Nickerson, S.T. Likens. **1966**. Gas Chromatography evidence for the occurrence of hop oil components in beer. *J. Chromatogr. A*, 21: 1-5.
38. NIST (National Institute of Standards and Technology). **1999**. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA; PC Version 1.7.
39. T. Parliment. **2002**. Solvent Extraction and Distillation Techniques. In: R. Marsili (ed.): Flavor, Fragrances and Odor Analysis. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA; pp. 1-23.
40. L.F.D. Passero, A. Bonfim-Melo, C.E.P. Corbett, M.D. Laurenti, M.H. Toyama, D.O. de Toyama, P. Romoff, O.A. Fávero, S.S. dos Grecco, C.A. Zalewsky, J.H.G. Lago. **2011**. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). *Parasitol. Res.*, 108: 529-536.
41. F. Peng, L. Sheng, B. Liu, H. Tong, S. Liu. **2004**. Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves. *J. Chromatogr. A*, 1040: 1-17.
42. J.A. Pino. **2015**. Aceites Esenciales. Química, Bioquímica, Producción y Usos. Editorial Universitaria, La Habana, Cuba. 209 pp.
43. K.A. Platt, W.W. Thomson. **1992**. Idioblast oil cells of Avocado: distribution, isolation, ultrastructure, histochemistry, and biochemistry. *Int. J. Plant Sci.*, 153: 301-310.
44. S.M. Pourmortazavi, S.S. Hajimirsadeghi. **2007**. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *J. Chromatogr. A*, 1163: 2-24.
45. G.A. Reineccius. **2007**. Flavour Isolation Techniques. In: R.G. Berger (ed.): Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer-Verlag, Berlin, Germany; pp. 409-426.
46. E. Reverchon. **1997**. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. *J. Supercrit. Fluids*, 10: 1-37.
47. P. Rubiolo, B. Sgorbini, E. Liberto, C. Cordero and C. Bicchi. **2010**. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. *Flavour Fragr. J.*, 25: 282-290.
48. W. Schwab. **2003**. Metabolome diversity: too few genes, too many metabolites? *Phytochemistry*, 62: 837-849.
49. D.C.M.N Silva, L.F.V. Bresciani, R.L. Dalagnol, L. Danielski, R.A. Yunes, S.R.S. Ferreira. **2009**. Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: process parameters and composition profiles. *Food Bioprod. Process.*, 87: 317-326.
50. C.A. Simões-Pires. **2004**. Avaliação química e biológica de extratos de *Baccharis* pertencentes à seção Caulopterae. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 174 pp.





51. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. **2001**. Análisis Instrumental. 5ª edición. Editorial McGraw-Hill, Madrid, España. 1028 pp.
52. H.Sovová. **1994**. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical CO<sub>2</sub>-I. Modelling of extraction curves. *Chem. Eng. Sci.*, 49: 409-414.
53. H. Sovová, M. Sajfrtová, M. Bártlová, L. Opletal. **2004**. Near-critical extraction of pigments and oleoresin from stinging nettle leaves. *J. Supercrit. Fluids*, 30: 213-224.
54. H. Sovová, A. Aleksovski. **2006**. Mathematical model for hydrodistillation of essential oils. *Flavour Frag. J.*, 21: 881-889.
55. E.E. Stashenko, N.Q. Prada, J.R. Martinez. **1996**. HRGC/FID/NPD and HRGC/MSD Study of Colombian Ylang-Ylang (*Cananga odorata*) Oils Obtained by Different Extraction Techniques. *J. High Resol. Chromatogr.*, 19: 353-358.
56. E.E. Stashenko, B.E. Jaramillo, J.R. Martínez. **2004**. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. *J. Chromatogr. A*, 1025: 93-103.
57. E.E. Stashenko. **2009**. Aceites Esenciales. Editorial de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 180 pp.
58. E.E. Stashenko, J.R. Martínez. **2010a**. GC y GC-MS: Configuración del Equipo Versus Aplicaciones. *Scient. Chromatogr.*, 2: 33-59.
59. E.E. Stashenko, J.R. Martínez. **2010b**. Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scient. Chromatogr.*, 2: 29-47.
60. D. Steinmann, M. Ganzera. **2011**. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 55: 744-757.
61. H. van Den Dool, P.D. Kratz. **1963**. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chromatogr. A*, 11: 463-471.
62. R.M.F. Vargas, E. Cassel, G.M.F. Gomes, L.G.S. Longhi, L. Atti-Serafini, A.C. Atti-Santos. **2006**. Supercritical Extraction of Carqueja Essential Oil: experiments and modelling. *Braz. J. Chem. Eng.*, 23: 375-382.
63. R.J. Velasco, H.S. Villada, J.E. Carrera. **2007**. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18: 53-66.
64. N.B. Vogt. **1987**. Soft modelling and chemosystematics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1: 213-231.
65. H. Wagner, S. Bladt, E.M. Zgainski. **1984**. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. 320 pp.
66. V.B. Xavier, R.M.F. Vargas, E. Cassel, A.M. Lucas, M.A. Santos, C.A. Mondin, E.R. Santarem, L.V. Astarita, T. Sartor. **2011**. Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crops Prod.*, 33: 599-604.
67. Z. Zhang, G. Li. **2010**. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.*, 95: 127-139.



## Capítulo 4

### Quimiodiversidad volátil de *Baccharis* spp. L.

**Resumen:** Las especies del género *Baccharis* spp. L. (Asteraceae) son reconocidas por su carácter medicinal y aromático, produciendo una enorme variedad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles. En éste capítulo se presentarán los antecedentes botánicos, etnofarmacológicos y fitoquímicos, y los resultados del análisis del volatilo de 19 especies del género colectadas en diferentes condiciones ambientales de Uruguay y del sur de Brasil. La extracción de los componentes volátiles fue realizada por el procedimiento de extracción-destilación simultánea (SDE), y el análisis fue realizado por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masa (GC-MS). Para el caso de las especies colectadas en el mismo nicho ecológico, en el mismo período y de las cuales se obtuvo un alto porcentaje de identificación de su composición volátil (*B. milleflora*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella*), se presentará un tratamiento quimiotaxonómico mediante estadística multivariada. Los resultados obtenidos se discutirán contrastándolos con otros similares disponibles en la literatura. Finalmente, se expondrá la influencia de las diferencias sexuales sobre la composición volátil empleando como modelo a 4 especies del género (*B. crispera*, *B. linearifolia*, *B. dracunculifolia* y *B. spicata*).

#### 1. INTRODUCCION

##### Descripción botánica, etnofarmacológica y fitoquímica de las especies de *Baccharis* L. empleadas en éste estudio

A continuación se describirán cada una de las especies que fueron empleadas en éste trabajo de tesis y sus antecedentes. Las mismas se presentarán con sus respectivas secciones infragenéricas de acuerdo a la clasificación propuesta por Giuliano (Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011) y corregida por Heiden y Pirani (Heiden y Pirani, 2016 a y b).



## Subgénero *Baccharis*. Sección *Cylindricae*. Serie *Cylindricae*

### 1.1 *Baccharis microdonta* DC. Sinónimos: *B. refracta*, *B. meridionalis*, *B. sebastianopolitana*, *B. wilsoniana*.

*B. microdonta* es una de las especies que se conocen como “chilcas blancas”, y que frecuentemente es confundida en Uruguay con *B. dracunculifolia* (A. González, com. pers.; ver capítulo 6). En Brasil se conoce popularmente como “*trapichava*”, “*vassoura branca*” y “*vassoura alecrim*” (Barroso, 1976). Se trata de un arbusto de hasta 2,5 m de altitud, revestido de nido piloso. Sus hojas son brevemente pecioladas, trinervadas, de forma obovada o elíptica hasta casi linear, con un largo de 4-5 cm y ápice agudo a levemente obtuso, margen liso en la base y aserrado en los 2/3 superiores (Figura 1) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). El epíteto específico “*microdonta*” se encuentra relacionado a dicho tipo de dentición en el margen foliar (Barroso, 1976). Los capítulos son sésiles o brevísimamente pedunculados provisto de brácteas y organizados en glomérulos foliosos, con inflorescencia en forma de espiga de 10 a 15 flores (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014).

Su hábitat natural son los bosques abiertos y pastizales, creciendo en campos de altitud hasta 2800 m.s.n.m. Su distribución es el sur y sudeste de Brasil, Bolivia, y Paraguay, norte de Argentina y Uruguay (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014).

El estudio farmacobotánico y morfoanatómico de la especie fue realizado por Bobek *et al.* (2016) y Budel *et al.* (2018a), quienes establecieron caracteres morfológicos para diferenciar a *B. microdonta* de otras especies de apariencia semejante en el sur de Brasil. Los componentes fitoquímicos descritos hasta el momento incluyen aceites esenciales (Lago *et al.* 2008b, Sayuri *et al.*, 2010; Budel *et al.*, 2018b) y diterpenos del tipo *ent*-kaurano (de Oliveira *et al.*, 2010). Se ha reportado que el extracto acuoso obtenido de hojas de ésta especie posee actividad antimicrobiana (Anesini y Pérez, 1993; Pérez y Anesini, 1994), mientras que extractos orgánicos poseen actividad anti-inflamatoria y alexitérica contra el veneno de serpientes del género *Bothrops* sp. (Soares *et al.*, 2012). En tanto, el aceite esencial se ha caracterizado por su actividad anti-tripanosómica y por su citotoxicidad (Budel *et al.*, 2018b).



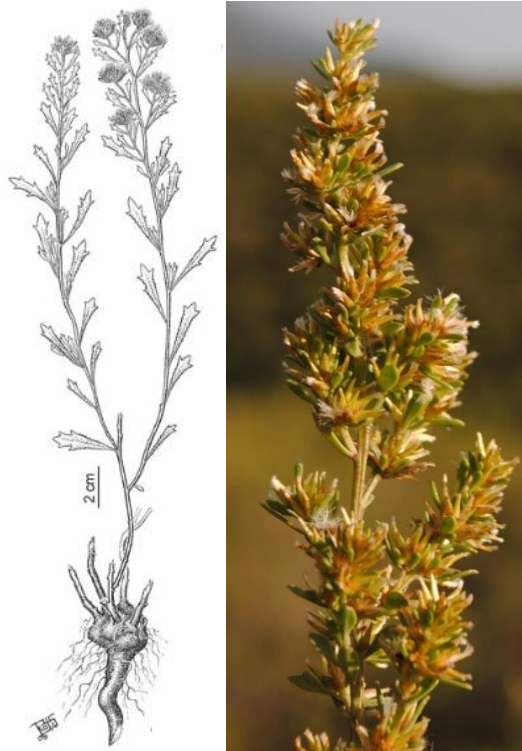
**Figura 1:** Espécimen en floración de *Baccharis microdonta* DC . Fuentes: 1) ilustración: D.A. Giuliano y A. Plos, (2014); 2) imagen: Luíz A. Funes (Flora de Santa Catarina; <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/>).

**1.2 *Baccharis linearifolia* subsp. *linearifolia* (Lam.) Pers.** Sinónimos: *B. rufescens*, *B. leptcephala*, *B. paucidentata*, *B. leptophylla*, *B. tenuifolia*, *B. pseudotenuifolia*, *B. denticulata*, *B. baldwinii*, *B. guianensis*, *B. subspathulata*, *B. maritima*, *B. santiaguensis*, *B. subrufescens*, *B. pseudotridentata*, *B. rufescens* var. *ventanicola*, *B. neaei*, *B. vernicosa*, *B. fluminensis*.

Se trata de una especie que se presenta como un arbusto ramificado y vellosa de hasta 1,5 m de altura, provisto de un grueso xilopodio (especie de tronco basal, Figura 2) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Las hojas son frecuentemente opuestas, obovadas o linear-filiformes, atenuadas en la base y agudas en el ápice, de 1-3 cm de longitud y 3-4 mm de ancho, enteras o con 1 a 5 dientes pequeños a cada lado del margen (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Sin embargo, la morfología foliar es muy variable, no existiendo correlación entre la misma y la distribución geográfica (Giuliano y Plos, 2014). Los capítulos son sésiles o brevemente pedunculados, conteniendo 5-8 flores los femeninos y alrededor de 20 los masculinos, ordenados en espigas cortas que en su conjunto forman una inflorescencia de tipo panícula multiflora (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014).



*B. linearifolia* es una especie polimorfa (de allí la gran cantidad de sinónimos con que cuenta la misma), de la que en la actualidad se distinguen dos subespecies: *B. linearifolia* subsp. *linearifolia* y *B. linearifolia* subsp. *polycephala*, las que se diferencian por sus caracteres florales (Giuliano y Plos, 2014). Sin embargo, el número de subespecies probablemente sea mucho mayor. Se desarrolla usualmente en el sur de Brasil y Paraguay, norte y centro de Argentina y Uruguay (subespecie *linearifolia*); y sur de Perú, Bolivia y norte de Argentina (subespecie *polycephala*) (Giuliano y Plos, 2014). Si bien se trata de una especie tóxica para el ganado (Giuliano y Plos, 2014), se ha reportado su empleo etnomedicinal como agente hepatoprotectivo para malestares gástricos (Montanher *et al.*, 2002).



**Figura 2:** Espécimen en floración de *Baccharis linearifolia* subsp. *linearifolia* (Lam.) Pers. En la ilustración se puede ver el característico xilopodio que presenta la especie. Fuentes: 1) ilustración: Giuliano y Plos (2014); 2) imagen: Andrés González (Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay; <http://floranativadeuruguay.blogspot.com/>).

El estudio farmacobotánico de la especie fue realizado por Souza *et al.* (Souza *et al.*, 2013). Con respecto a su fitoquímica, se han aislado de las partes aéreas diterpenos del tipo *ent*-kaurano y *ent*-labdano, triterpenos (ácido oleanólico,  $\alpha$ -espinasterol) y flavonoides (hispidulina, naringenina, quercetina, cirsimaritina, cirsilinol; entre otros), y se han identificado peróxidos y aceites esenciales (Faini *et al.*, 1992; Zunino *et al.*,



1998; Schenkel *et al.*, 2002; Simirgotis *et al.*, 2003; Moreira *et al.*, 2003; Ortiz *et al.*, 2013). Particularmente, los diterpenos han demostrado buena capacidad en ensayos anti-alimentarios con gorgojos (Simirgotis *et al.*, 2003). En cuanto a las propiedades bioactivas reportadas, se ha comprobado que los extractos orgánicos de las partes aéreas de la especie presentan actividad anti-inflamatoria *in vitro* (Cifuentes *et al.*, 2001), y han demostrado actividad tóxica contra el crustáceo *Artemia salina* (Montanher *et al.*, 2002; Moreira *et al.*, 2003). En tanto, el aceite esencial de la especie presenta una baja actividad insecticida contra piojos humanos (Tolosa *et al.*, 2010).

### Subgénero *Baccharis*. Sección *Cylindrica*. Serie *Axillares*

#### 1.3 *Baccharis cultrata* Baker. Sinónimo: *Baccharis delicata*

Se trata de arbustos muy ramificados con una altura entre 1,20-1,50 m. Las hojas de la especie (5-7 mm de longitud y 3-4 mm de ancho) son obovadas y poseen un ápice truncado y tridentado, con un estrechamiento pronunciado del ancho hacia la base; se encuentran provistas de muchas glándulas visibles (Barroso, 1976; Bobek *et al.*, 2015). Los capítulos son pilosos, provistos de brácteas y se agrupan en pequeños corimbos o glomérulos terminales: el femenino por lo general con 6 flores y el masculino con 10-15 de ellas. El nombre *cultrata* proviene del latín *culter* o *cultri* que significa diente de arado, lo que hace referencia a la forma particular de sus hojas (Figura 3) (Barroso, 1976). La especie se distribuye típicamente por el sur de Brasil (estados de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul) y Uruguay, aunque de manera muy dispersa (Bobek *et al.*, 2015). Su hábitat natural en el territorio nacional son los bosques serranos (Gautreau y Lezama, 2009). Es una especie que se considera vulnerable e incluso en riesgo de extinción, aunque existe poca información relativa a su estado de conservación (Bobek *et al.*, 2015).

En el único reporte existente en la literatura relacionado a la fitoquímica de la especie, se ha demostrado la ausencia de tricotecnos en las inflorescencias (Jarvis *et al.*, 1991). Por otra parte, no existen antecedentes de empleo etnofarmacológico ni de bioactividad para *B. cultrata*. A su vez, su estudio farmacobotánico fue realizado por Bobek *et al.* (2015) para material vegetal nativo del estado brasileño de Paraná.



**Figura 3:** Especimen en floración de *Baccharis culttrara* Baker y detalle de las hojas tridentadas en el ápice y profusamente glandulosas. Fuente de las imágenes: A. González (Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay; <http://floranativadeuruguay.blogspot.com/>).

### Subgénero *Baccharis*. Sección *Nitidae*.

#### 1.4 *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. Sinónimos: *B. macrodonta*, *B. orgyalis*, *B. fuchsiifolia*, *Chrysocoma maritima*.

Esta especie se caracteriza por desarrollarse bajo la forma de arbusto de 1 a 3 metros de altura, con hojas pecioladas ovado-elípticas irregularmente dentadas en los dos tercios superiores del margen, pinnatinervadas (un único nervio principal del que nacen los secundarios a lo largo de todo el limbo) (Figura 4) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Su zona de distribución se restringe al centro y sur de Brasil, Paraguay y el nordeste de Argentina (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Es de ocurrencia típica en bosques pluviales subtropicales, siendo pionera en dichos ecosistemas (de Gasper *et al.*, 2014).

En cuanto a reportes fitoquímicos, el aceite esencial de ésta especie se encuentra evaluado en la literatura, habiéndose observado una gran variabilidad estacional en la composición del mismo (Xavier *et al.*, 2011). También se ha reportado la presencia en las partes aéreas de polifenoles, particularmente flavonoides (quercetina, rutina,



kaempferol y apigenina, entre otros) y ácido cafeico (Sartor *et al.*, 2013). El aceite esencial, los polifenoles y los ácidos fenólicos (en extractos de solventes orgánicos como en agua) han sido reportados por su potencial antimicrobiano (Xavier, 2011; Sartor *et al.*, 2013). También se ha destacado el potencial alelopático de los extractos etanólicos y acuosos de partes aéreas de ésta especie (Dias *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Espécimen en floración de *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. Fuente de las imágenes: 1) gentileza Prof. Claudio Mondin (PUCRS) y 2) S. Bordignon; Flora Digital do Rio Grande do Sul (<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>).

### Subgénero *Baccharis*. Sección *Racemosae*.

#### 1.5 *Baccharis dracunculifolia* subsp. *dracunculifolia* DC. Sinónimo: *B. leptospermoides*, *B. doniana*, *B. bracteata*, *B. pulverulenta*.

*B. dracunculifolia* se conoce popularmente como “chilca blanca”, “chilca”, “chilca mata-ojo”, “suncho”, “tola”, y “vassoura” y “alecrim do campo” en portugués (Barroso, 1976; Loayza *et al.*, 1995; da Silva Filho, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Es una especie polimorfa arbustiva que puede alcanzar gran porte (hasta 5 metros de altura), considerándose en muchos casos como pequeños árboles cuya madera es empleada como combustible (Giuliano y Plos, 2014). Tradicionalmente se la ha considerado una maleza en campos de producción agrícola (Negreiros *et al.*, 2014). Es una especie frondosa (Figura 5), más o menos pubescente en las ramas jóvenes y carente de pilosidad en las ramas viejas (Giuliano y Plos, 2014). Las hojas son sésiles, anchas elípticas u obovadas, atenuadas en la base y agudas o subagudas en el ápice. Presentan 1 a 4 dientes a cada lado del margen y son de apariencia lanuginosa cuando jóvenes y glabras cuando viejas (Giuliano y Plos, 2014). La distribución de la especie abarca el sur de Brasil, Bolivia y Paraguay, norte y centro de Argentina y Uruguay





(Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Es una especie muy frecuente en campos abiertos y en bosques, desarrollándose incluso en el altiplano hasta una altitud de 3300 m.s.n.m (Loayza *et al.*, 1995). En la etnomedicina se la emplea como anti-inflamatorio y para el tratamiento de malestares gastrointestinales (da Silva Filho, 2009). Según Giuliano y Plos (2014), existen al menos dos subespecies: *B. dracunculifolia* subsp. *dracunculifolia* (de amplia distribución) y *B. dracunculifolia* subsp. *tandilensis* (endémica de la provincia de Buenos Aires).



**Figura 5:** Espécimen en floración de *Baccharis dracunculifolia* DC; imagen tomada en el marco de éste estudio en base a material vegetal colectado en Paso de la Patria (Corrientes, Argentina). Fuente de la ilustración: Giuliano y Plos (2014).

Desde las partes aéreas de ésta especie se obtiene un aceite esencial muy apreciado en perfumería (“*vassoura oil*”) por sus notas aromáticas “verdes” que se deben a la presencia de su componente mayoritario (*E*)-nerolidol (Queiroga *et al.*, 1990; Ferracini *et al.*, 1995). De las partes aéreas también se han aislado e identificado una gran variedad de metabolitos secundarios: flavonoides (aromadendrina-4-*O*-metiléter, isosakuranetina, kaempferol, kaempférido, pinobanksina, crisina, acacetina, baccharina; entre otros), ácidos fenólicos (*p*-cumárico, cumárico, dihidrocinámico, ferúlico y cafeico), fenoles prenilados (drupanina, artemillina C y viscidona), diterpenos clerodanos, triterpenos (ácidos ursólico y 2- $\alpha$ -hidroxiursólico, friedelanol,



baccharóxido), la lactona del ácido hautriwaico y peróxidos, entre otros (Schenkel *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Da Silva Filho *et al.*, 2004; Lemos *et al.*, 2007; Da Silva Filho *et al.*, 2008; Da Silva Filho *et al.*, 2009; Cestari *et al.*, 2011; Bachiega *et al.*, 2013; Figueiredo-Rinhel *et al.*, 2013; Munari *et al.*, 2014; Veiga *et al.*, 2017; Paula *et al.*, 2017; Casagrande *et al.*, 2018; Costa *et al.*, 2019).

Desde el punto de vista de su actividad biológica, para sus extractos acuosos y orgánicos se ha reportado actividad: anti-*Leishmania*, anti-*Plasmodium* (Da Silva Filho *et al.*, 2009), anti-*Trypanosoma* (Da Silva Filho *et al.*, 2004), anti-inflamatoria (Cestari *et al.*, 2011; Bachiega *et al.*, 2013), inmunomoduladora (Bachiega *et al.*, 2013; Figueiredo-Rinhel *et al.*, 2017), efecto protector contra el cáncer de colon (Munari *et al.*, 2014), anti-ulcerogénica (Lemos *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2019), antioxidante (Guimarães *et al.*, 2012; Figueiredo-Rinhel *et al.*, 2013; Veiga *et al.*, 2017; Casagrande *et al.*, 2018), antimicrobiana (Leitão *et al.*, 2004; Da Silva Filho *et al.*, 2008; Veiga *et al.*, 2017; Casagrande *et al.*, 2018), antiviral (Ferreira *et al.*, 2018; Simoni *et al.*, 2018) y citotóxica (Da Silva Filho *et al.*, 2009), entre otras. Por su parte, para el aceite esencial también se han reportados diferentes propiedades bioactivas como: anti-inflamatorias (Florão *et al.*, 2012), anti-ulcerogénicas (debido a su contenido en (*E*)-nerolidol) (Klopell *et al.* 2007; Massignani *et al.*, 2009), garrapaticida (Lage *et al.*, 2015), insecticidas (Chaaban *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2018), antiparasitarias, antimicrobianas (Pereira *et al.*, 2011; Parreira *et al.*, 2010; Salazar *et al.*, 2018; Cazella *et al.*, 2019) y alelopáticas (Ibáñez y Zoppolo, 2011).

Es destacable el hecho de que *B. dracunculifolia* es el origen botánico del llamado “propóleo verde” (exudado resinoso colectado por abejas melíferas de las yemas foliares de la especie) que, por su contenido en fenoles prenilados (por ejemplo artepilina C), presenta amplias propiedades medicinales como antioxidante, antibacteriano y antitumoral (Park *et al.*, 2004; Shimizu *et al.*, 2005; Abad y Bermejo, 2007; Veiga *et al.*, 2017).

### 1.6 *Baccharis uncinella* DC. Sinónimos: *B. discolor*.

Se trata de una especie que se desarrolla como arbusto (0,5 a 3 m de altura), que se conoce popularmente en Brasil como “vassoura”, “vassourinha” o “vassoura lageana”



(Barroso, 1976; Budel y Duarte, 2008; Ascari *et al.*, 2012). Presenta ramas tomentosas (con mucha pilosidad) provistas de hojas sésiles de forma obovadas a elípticas u oblongas, de 6-15 mm de largo y 4-6 mm de ancho, ápice obtuso y margen revoluto (Figura 6); capítulos florales provistos de 20-40 flores ordenados en ramos espiciformes (Barroso, 1976). Es característica la presencia de abundante pilosidad en el envés de las hojas, lo que les confiere un tono blanquecino. El nombre *uncinella* proviene del latín *uncis* (anzuelo), debido a la curvatura del margen de las hojas hacia el envés de las mismas (Barroso, 1976). Por su arquitectura, se ha considerado una planta promisoriosa como ornamental (Tognon *et al.*, 2015). Su distribución se restringe estrictamente al territorio brasileño, habiendo descripciones de la misma para los estados de Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul (Barroso, 1976; Budel y Duarte, 2008). Por lo general crece en ambientes serranos con suelos escasos y en ellos es una especie fundamental para la sucesión y regeneración ecológica, ya que bajo su porte crecen protegidas las semillas de *Araucaria angustifolia*, una especie clave para el fuertemente amenazado ecosistema de Floresta Atlántica (Duarte *et al.* 2006; Budel y Duarte, 2008). Infusiones de ésta especie se utilizan por los indios Laklaño (Santa Catarina) como sedativas y para regular la presión sanguínea (Ascari *et al.*, 2012).



**Figura 6:** *Espécimen en floración de Baccharis uncinella DC. Obsérvese en el detalle la pilosidad del tallo y las hojas curvadas hacia el envés (“forma de anzuelo”). La imagen de la izquierda fue tomada de material vegetal colectado en São Francisco de Paula (Rio Grande do Sul, Brasil) (Colecta correspondiente a los capítulos 3 y 4). Fuente: L.A. Funez (Flora de Santa Catarina; <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/>).*



Existen diversos estudios fitoquímicos relacionados con ésta especie, los que han demostrado la presencia de aceites esenciales (**Frizzo et al., 2001; Agostini et al., 2005; Frizzo et al., 2008; Fabiane et al., 2008; Xavier et al., 2011 y 2017**), ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico y ferúlico) (**Grecco et al., 2010; Passero et al., 2011; Grecco et al., 2014; Bocco et al., 2016**), flavonoides (pectolinaringenina, hispidulina, dihidro-oroxilina, entre otros) y triterpenoides (ácidos oleanólico y ursólico) (**Grecco et al., 2010; Passero et al., 2011**). Por otra parte, Budel y Duarte (2008) publicaron un completo estudio farmacobotánico de *B. uncinella*.

Algunas de las bioactividades que han sido evaluadas, y confirmadas, para extractos orgánicos y acuosos de ésta especie incluyen: efectos alelopáticos (**Dias et al., 2017**) antiparasitarios (contra *Leishmania sp.* y *Tripanosoma cruzi*) (**Passero et al., 2011; Yamamoto et al., 2014; Grecco et al., 2014**), anti-inflamatorios (**Zalewski et al., 2011**), antivirales (**Montanha et al., 2004; Simoni et al., 2018**) y paliativos del síndrome metabólico (**Bocco et al., 2016**); las que se deben principalmente al contenido de triterpenoides y derivados fenólicos. Para el aceite esencial se han reportado propiedades sedativas (**Ascari et al., 2012**), antimicrobianas (**Ferronato et al., 2007; Vannini et al., 2012; Xavier et al., 2017**), antioxidantes (**Ferronato et al., 2006**), y anti-inflamatorias (**Marchesan et al., 2006**).

## Subgénero *Baccharis*. Sección *Spicatae*

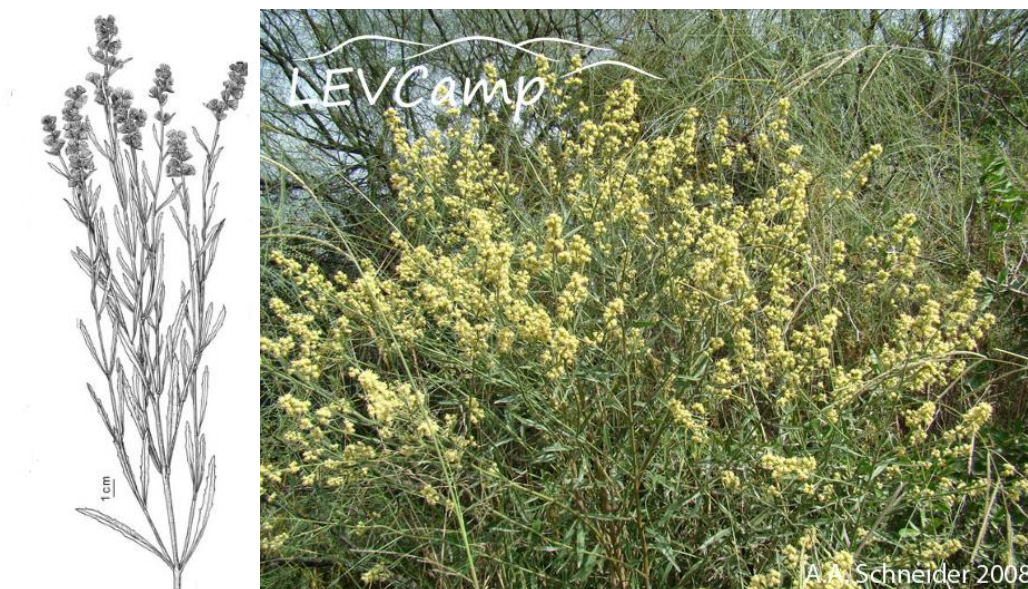
### 1.7 *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. Sinónimos: *B. platensis*, *B. attenuata*.

*B. spicata* se conoce popularmente como “carqueja”, “chilca melosa”, “chilca blanca”, “vassoura” (portugués) y “pi is í mop” (guaraní) (**Retta et al., 2009; Oliveira et al., 2011; Giuliano y Plos, 2014**). Es una especie que crece como arbustos o sufrútices de hasta 1,8 m de altura, profundamente ramosos y resinosos, glabros a densamente tomentosos, provistos de tallo estriado (**Agudelo et al., 2016; Giuliano y Plos, 2014**). Las hojas inferiores son opuestas, mientras que las superiores son subopuestas o alternas, brevemente pecioladas, elípticas o lineares de hasta 8 cm de longitud, agudas en el ápice y con algunos dientes distantes en el margen (Figura 7) (**Giuliano y Plos, 2014**). Los capítulos son sésiles, solitarios o en glomérulos, reunidos en forma de espiga



foliosa en ramas laterales. Durante el período de floración atrae a muchas especies de abejas, por lo que es considerada una especie melífera (Steiner *et al.*, 2010).

Se la encuentra frecuentemente en pajonales, estepas y terreno húmedos sin mucha alteración antropogénica y sin incidencia de pastoreo; su distribución es el sur de Brasil y Paraguay, nordeste y centro de Argentina, y Uruguay (Altesor *et al.*, 2005; Giuliano y Plos, 2014; Agudelo *et al.*, 2016). Sin embargo, en los últimos años se ha transformado en invasora en Europa (Verloove *et al.*, 2018). En Argentina, partes aéreas de ésta especie suelen emplearse como adulterantes de la planta medicinal *B. trimera* debido a la intensa explotación que existe para ésta última (Retta *et al.*, 2009). En Brasil, suele ser confundida con una especie relacionada, *B. curitybensis* (Oliveira *et al.*, 2011).



**Figura 7:** Espécimen en floración de *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. Fuentes: 1) ilustración: Giuliano y Plos (2014); 2) imagen: A.A. Schneider, Flora Digital do Rio Grande do Sul (<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>).

En la literatura se encuentra estudios fitoquímicos de ésta especie que informan sobre la presencia de aceites esenciales (Retta *et al.*, 2009), ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico y sus isómeros) y flavonoides (rutina, quercetina e isoquercitrina); no habiendo diferencias cuantitativas apreciables entre los sexos, al menos para los metabolitos no volátiles (Agudelo *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2018). También se han aislado de sus partes aéreas diterpenos del tipo *neo*-clerodano: bacchotricuneatina A y su 6- $\alpha$ -hidroxi-derivado con actividad anti-alimentaria de insectos plaga (Gallardo *et*



*al.*, 1996); y se ha identificado la presencia de peróxidos (Schenkel *et al.*, 2002). Por otra parte, existen varios reportes de química ecológica, en donde se demostró que tanto el metabolismo volátil como no volátil de *B. spicata* se puede modificar como consecuencia de la formación de agallas foliares por parte de insectos psílidos del género *Baccharopelma* (Damasceno *et al.*, 2008 y 2010; Agudelo *et al.*, 2018). En la literatura también existen estudios farmacobotánicos de ésta especie (Oliveira *et al.*, 2011).

Las actividades biológicas evaluadas para esta especie son muy numerosas, particularmente sobre actividad antioxidante y antiradicalaria de extractos ricos en compuestos polifenólicos (Quintana de Oliveira *et al.*, 2004; Vieira *et al.*, 2011; Agudelo *et al.*, 2016). Otras actividades de extractos de *B. spicata* incluyen acción antibacteriana (Quintana de Oliveira *et al.*, 2005), antiparasitaria (*Trypanosoma cruzii*) (Sülsen *et al.*, 2006), antiviral (contra una serie de virus prevalentes como los responsables de la diarrea bovina, herpes, y estomatitis vesicular, HSV-1, entre otros) (Montanha *et al.*, 2004; Visintini-Jaime *et al.*, 2013) y anti-alimentaria contra insectos plaga de granos almacenados (Gallardo *et al.*, 1996; Rodríguez *et al.*, 2018).

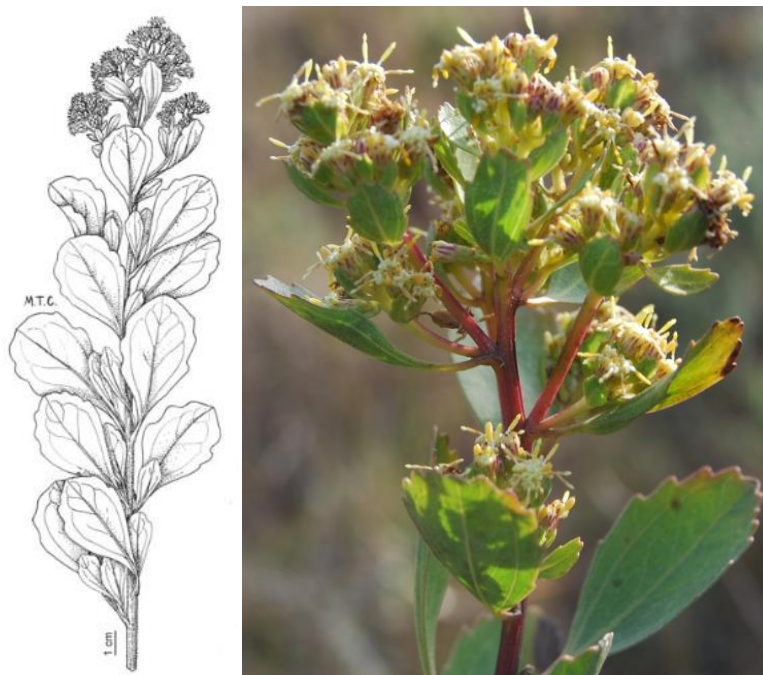
### Subgénero *Baccharis*. Sección *Tridentatae*

**1.8 *Baccharis tridentata* Vahl.** Sinónimos: *B. affinis*, *B. subopposita*, *B. tweediei*, *B. saltensis*, *B. pauciflosculosa* var. *puncticulosa*.

Esta es una especie que se presenta en la forma de arbustos ramosos y resinosos de hasta 1,2 m de altura, provistos de xilopodio y revestidos por nidos pilosos (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Las hojas son opuestas o subopuestas, escasamente pecioladas, obovadas u obovado-elípticas de 1,5-6 cm de longitud y 0,5-3 cm de ancho, truncadas o redondeadas en el ápice (Figura 8) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Presentan de 1 a 6 pares de dientes en el margen superior (generalmente tres en el ápice, razón por la cual se le confirió el epíteto específico *tridentata*), un trinervado característico sobre la lámina y apariencia coriácea al tacto (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Los capítulos son cortamente pedunculados, ordenados en corimbos foliosos simples o compuestos (3-5 capítulos), que a su vez se agrupan en una inflorescencia en forma de racimo (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014).



Durante la floración, *B. tridentata* emite un aroma fragante (y por ello es visitada por numerosos insectos; **Hermes y Köhler, 2006**), y se la ha sugerido como ornamental (**Tognon y Cuquel, 2016**). Se distribuye por el sur y sudeste de Brasil y Paraguay, norte y centro de Argentina y Uruguay (**Giuliano y Plos, 2014**). Barroso (**1976**) cita la existencia de dos variedades: *B. tridentata* var. *subopposita* de ocurrencia exclusiva en Brasil y *B. tridentata* var. *deltoidea* presente en Rio Grande do Sul, Argentina, Paraguay y Uruguay. En la bibliografía se reporta que el ganado vacuno consume ésta especie y que la misma tiene efecto antihelmíntico, presumiblemente por su contenido de taninos (**Morais-Costa et al., 2014**).



**Figura 8:** Espécimen en floración de *Baccharis tridentata* Vahl. Fuentes: 1) ilustración: **Giuliano y Plos (2014)**; 2) imagen: cortesía del Prof. **Claudio Mondin (PUCRS)**.

Respecto al perfil fitoquímico de *B. tridentata*, existen estudios sobre la composición de su aceite esencial (**Ferracini et al., 1995; Souza et al., 2011**) y un trabajo de semi-síntesis que reporta la preparación y posterior búsqueda en los aceites de alcoholes sesquiterpénicos novedosos derivados del cadinanol (**Queiroga et al., 1996**). Las estructuras secretoras (tricomas glandulares) fueron descritas por **Souza et al. (2011)** por microscopía electrónica. Asimismo, dichos autores reportaron la inhibición por parte del aceite del crecimiento micelial de hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Collectotrichum* y *Rhizoctonia* (**Souza et al., 2011**).



## Subgénero Molina. Sección Caulopterae

### 1.9 *Baccharis trimera* (Less.) DC. Sinónimos: *B. genistelloides* var. *trimera*, *B. triptera*, *Molina trimera*.

*B. trimera* se conoce popularmente como “carqueja” o “carqueja amarga”, y es una planta medicinal que se emplea tradicionalmente bajo la forma de infusiones o decocciones por sus propiedades digestivas, estomáquicas, antiespasmódicas, colagogas, diuréticas, antisépticas, anti-diabéticas, protectoras hepáticas, antiulcerogénicas, febrífugas, antireumáticas y vulnerarias (Martínez-Crovetto, 1981; Cortadi *et al.*, 1999; Karam *et al.*, 2013; Rabelo y Costa, 2018; García *et al.*, 2018; Schripsema *et al.*, 2019). También se emplea en la medicina popular contra la impotencia masculina y para favorecer la fertilidad femenina (Cortadi *et al.*, 1999). Debido a sus propiedades medicinales esta especie se encuentra registrada con su respectiva monografía en la Farmacopea Brasileña (2010).

*B. trimera* posee porte herbáceo (sufrútice) con una altura de hasta 1,20 metros de altura, glabro, con tallos trialados longitudinalmente llamados cladodios (que le confieren el epíteto *trimera*), y hojas atrofiadas (brácteas inconspicuas) (Figura 9) (Barroso, 1976; Cortadi *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2008; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014; García *et al.*, 2018). Se encuentra provista de capítulos sésiles en glomérulos unifloros o multifloros, en forma de espigas; su floración se produce de enero a julio (Barroso, 1976; Scheffer-Baso *et al.*, 2008; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014).

Su identificación taxonómica inequívoca es dificultosa ya que son reconocidas varias especies como “carquejas” y existe una amplia variación morfológica en *B. trimera*, lo que ha justificado el empleo del término “complejo *Baccharis trimera*” (Müller, 2006; Schneider, 2009). Las restantes especie que componen el complejo son: *B. crispa*, *B. lorentzii*, *B. cylindrica*, *B. jocheniana* y *B. myriocephala*; pero aún no se ha llegado a un consenso de establecer si las mismas constituyen entidades individuales o si por el contrario son ecotipos de la misma especie (Müller, 2006; Schneider, 2009).

*B. trimera* se desarrolla en estepas, campos bajos y de altitud, y ambientes alterados del sur de Brasil, Bolivia, Perú y Paraguay, norte y centro de Argentina y todo el Uruguay (Barroso, 1976; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Es de amplia distribución





(alta plasticidad) debido a que crece en gran una diversidad de suelos, incluyendo aquellos con deficiencia en nitrógeno, fósforo y potasio (Rabelo y Costa, 2018; Schripsema *et al.*, 2019). Asimismo, es considerada maleza de pastoreo y agricultura (Scheffer-Baso *et al.*, 2008; García *et al.* 2018). Existe un único cultivar comercial de la especie desarrollado y registrado en Brasil (*B. trimera* var. CPQBA-1) (García *et al.*, 2017, 2018).



**Figura 9:** Espécimen en floración de *Baccharis trimera* (Less.) DC. La imagen corresponde a la colecta realizada en el marco de éste trabajo en Estación Porvenir (Paysandú, Uruguay). Fuente de la ilustración: Giuliano y Plos (2014).

Existen muchos estudios anatómicos y morfológicos de ésta especie, principalmente referentes a la diferenciación de la misma con respecto a otras especies muy relacionadas de la sección Caulopterae. Como ejemplo, se pueden citar los trabajos de Cortadi *et al.* (1999), Budel *et al.* (2003), Rodríguez *et al.* (2008) y Martínez *et al.* (2018). Este aspecto será considerado en detalle en el capítulo 7 de ésta tesis.

El aceite esencial de *B. trimera* (“carqueja oil”) es obtenido industrialmente, y aplicado en perfumería por su contenido en acetato de carquejilo (un monoterpenoide irregular; capítulo 7) y su alcohol (carquejol), los que le confieren notas aromáticas a madera (similares a la especie *Dalbergia nigra*, rosewood) (Chialva y Doglia, 1990; Simões Pires *et al.*, 2005a; Silva *et al.*, 2007). Las propiedades bioactivas que se han



confirmado en la literatura para éste aceite incluyen: antihelmínticas (Nunes de Oliveira *et al.*, 2012), antibacterianas y antifúngicas (Caneschi *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2016; Tomazoni *et al.*, 2018), e insecticidas (Silveira, 2018). Adicionalmente, en las partes aéreas de *B. trimera*, se ha informado la siguiente composición fitoquímica no volátil: ácidos cafeoil-quinicos (Simões Pires *et al.*, 2005b; Biondo *et al.*, 2011; Aboy *et al.*, 2012), saponinas (Borella *et al.*, 2006; Gené *et al.*, 1996), flavonoides (Soicke y Leng-Peschlow, 1987; Gené *et al.*, 1996; Simões Pires *et al.*, 2005b; Biondo *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*, 2018), diterpenos (Torres *et al.*, 2000; Januario *et al.*, 2004; Biondo *et al.*, 2011; García *et al.*, 2014), y un glicósido *nor*-monoterpénico bioactivo (trimerósido) aislado recientemente (dos Santos *et al.*, 2018).

*B. trimera* es la especie, dentro del género *Baccharis* L., que cuenta con mayor cantidad de estudios farmacológicos en la literatura (Karam *et al.*, 2013; Rabelo y Costa, 2018; Schripsema *et al.*, 2019). Los extractos acuosos (especialmente infusiones) y orgánicos de partes aéreas de ésta especie han sido reportados como antioxidantes y antiradicalarios, principalmente debido a su alto contenido polifenólico (Simões Pires *et al.*, 2005b; de Oliveira *et al.*, 2012, Moreira *et al.*, 2012; Sabir *et al.*, 2017; Thomaz *et al.*, 2018; Irazusta *et al.*, 2018). Dado que varias de las dolencias que son tratadas con infusiones de ésta planta (artritis reumatoide, fibrosis quística y desórdenes gastrointestinales, entre otras) son inducidas por estrés oxidativo, se especula que dichas propiedades se deban en parte a la acción de dichos componentes (de Oliveira *et al.*, 2012, Moreira *et al.*, 2012).

Otras propiedades reportadas para sus extractos acuosos y orgánicos son: vasorelajantes y antihipertensivos (Torres *et al.*, 2000; Hnatyszyn *et al.*, 2003; García *et al.*, 2014; Gómez *et al.*, 2016), antimicrobianas (Quintana de Oliveira *et al.*, 2005; Nunes *et al.*, 2016; da Silva *et al.*, 2018), analgésicas (Gené *et al.*, 1996), antiofídicas (Januario *et al.*, 2004), anti-helmínticas (Nunes de Oliveira *et al.*, 2014), anti-inflamatorias (Gené *et al.*, 1992; Gené *et al.*, 1996; Nogueira *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2012), garrapaticidas (Lázaro *et al.*, 2013), gastroprotectoras (Biondo *et al.*, 2011; Rabelo y Costa, 2018), antidiabéticas (Kaut *et al.*, 2018), anti-hepatotóxicas (Soicke y Leng-Peschlow, 1987) y anticancerígenas (de Oliveira *et al.*, 2013).

Sin embargo, también se han reportado actividades nocivas de los extractos acuosos de *B. trimera* como genotóxico (Rodrigues *et al.*, 2009), antiproliferativo y mutagénico



(Facchinetto y Tedesco, 2009; Rabelo y Costa, 2018). La actividad genotóxica puede aumentar como consecuencia de la contaminación de la planta con metales pesados producto de actividades antropogénicas (Menezes *et al.*, 2016).

**1.10 *Baccharis crisper* Spreng.** Sinónimos: *B. genistelloides* var. *crispa*, Molina *crispa*, *Pingraea crispa*, Molina *cylindrica*, *B. cylindrica*, *B. genistelloides* var. *cylindrica*, *B. genistelloides* subsp. *lorentzii*, *B. lorentzii*.

Esta especie, como la anterior (con la que es frecuentemente confundida), también es conocida como “carqueja” o “carqueja crespa” o “carquejilla”, y es reconocida por la Farmacopea Nacional Argentina 6<sup>ta</sup> ed. (1978) por sus infusiones o decocciones con propiedades digestivas, colagogas, hepato-protectoras, estimulantes, febrífugas y antisépticas (Bandoni *et al.*, 1978; Cortadi *et al.*, 1999; Giuliano y Plos, 2014).

La planta es un sufrutice erecto trialado revestido por nido piloso, rizomatoso, de menor altitud (máximo 50 cm) que *B. trimera* (Barroso, 1976; Rodríguez *et al.*, 2008; Giuliano y Plos, 2014; Chaves *et al.*, 2014). Las hojas se encuentran atrofiadas (reducidas a brácteas inconspicuas) y las alas de los cladodios son “crespas” (lo que le confieren el epíteto específico) (Figura 10) (Barroso, 1976; Cortadi, 1999; Giuliano y Plos, 2014). Como todas las especies de la sección Caulopterae, presenta una amplia variación morfológica entre poblaciones, principalmente en cuanto a sus alas, las que poseen longitud variable y diferentes grados de ondulación (Chaves *et al.*, 2010; Chaves *et al.*, 2014). *B. crispa* posee capítulos sésiles en glomérulos unifloros o multifloros, dispuestos en capitulencias en forma de espigas cortas en ramos laterales o terminales (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). La floración se produce de enero a julio, fructificando inmediatamente después (Schneider, 2009). La diferenciación macroscópica de *B. crispa* con la especie *B. trimera* se basa en la forma y el tamaño del involucre de los capítulos (conjuntos de brácteas que se encuentran en la base de los mismos) y el color del papus (conjunto de pelos que rodean a las flores) (Rodríguez *et al.*, 2008).

La distribución geográfica de *B. crispa* abarca el sur de Paraguay, centro-este y sur de Brasil, norte y centro de Argentina y Uruguay, teniendo prácticamente la misma distribución que *B. trimera* (Barroso, 1976; Rodríguez *et al.*, 2008; Giuliano y Plos,



2014). Habita en campos secos, campos de altitud, bordes de bosques y ambientes alterados por la actividad antrópica (Giuliano y Plos, 2014). Asimismo, se ha comprobado que es una especie con alta capacidad de adaptación al estrés hídrico (Moreno-Pizani *et al.*, 2018). Giuliano y Plos (2014) han sugerido que *B. crispera* es una especie de ocurrencia exclusiva de Uruguay y del sur de Brasil, y que el resto de las poblaciones (examinadas por material de herbario) corresponderían a otras especies del “complejo *Baccharis trimera*” (Giuliano y Plos, 2014).



**Figura 10:** *Espécimen en floración de Baccharis crispera* Spreng. Fuentes: 1) ilustración: Giuliano y Plos (2014); 2) imagen: G. Heiden, *Flora da Serra do Cipó-Minas Gerais* (<http://www.ib.usp.br/botanica/serradocipo/>).

Los estudios fitoquímicos conducidos en ésta especie han confirmado la presencia de aceites esenciales (Tonn *et al.*, 1987; Zunino *et al.*, 1997; Simões Pires *et al.*, 2005a; Chaves *et al.*, 2014), flavonoides (Bandoni *et al.*, 1978; Palacios *et al.*, 1983; Simões Pires *et al.*, 2005b; Rodríguez *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2019), ácidos cafeoilquínicos (Debenedetti *et al.*, 1993; Simões Pires *et al.*, 2005b), diterpenos *neoclerodanos* (bacrispina y compuestos derivados) (Tonn *et al.*, 1979; Tonn y Giordano, 1980; Ceñal *et al.*, 1997; Rodríguez *et al.*, 2013) y saponinas (Velázquez *et al.*, 2019). En tanto, el estudio farmacobotánico de *B. crispera* se ha enfocado básicamente en la



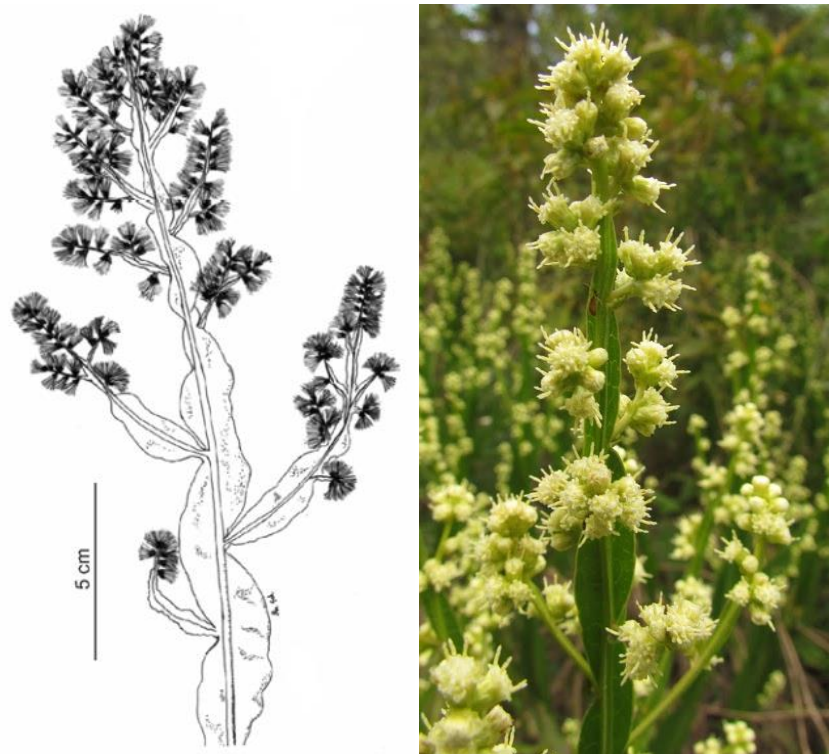
diferenciación morfológica macroscópica y microscópica con *B. trimera* y especies relacionadas (Cortadi *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2018).

Dentro de las propiedades biológicas relevantes de los extractos orgánicos y acuosos de ésta especie reportadas en literatura, se incluyen: antioxidantes y antiradicalarias (Simões Pires *et al.*, 2005b; de Oliveira *et al.*, 2014), anti-inflamatorias (Gené *et al.*, 1992), antimicrobianas (Palacios *et al.*, 1983; Alcáraz *et al.*, 2012) y promotoras de la contracción intestinal (Velázquez *et al.*, 2019). Se ha establecido la existencia de sinergia entre los extractos metanólicos de partes aéreas de ésta especie y el fármaco antifúngico Terbinafina<sup>®</sup> contra el hongo dermatofítico *Trichophyton rubrum* (agente causante de la infección conocida como “pie de atleta”) (Rodríguez *et al.*, 2013).

### 1.11 *Baccharis milleflora* (Less.) DC. Sinónimo: *B. genistelloides* var. *milleflora*, *Molina milleflora*.

Esta especie también es conocida como “carqueja” o “*carqueja do lajeado*” en portugués, y se utiliza en la etnomedicina como infusión por sus propiedades diuréticas, estomacales y anti-inflamatorias (Pereira *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2017). La planta consiste en un subarbusto erecto, ramoso, de hasta 1,80 m de altura provista de los característicos cladodios, con hojas atrofiadas o bractiformes (Figura 11) (Barroso, 1976; Schneider, 2009). Los capítulos de ésta especie son sésiles, solitarios, dispuestos en gran número (de allí el epíteto específico “*milleflora*”) en espigas con inflorescencia del tipo panícula en el ápice de las ramas (Barroso, 1976; Schneider, 2009). La floración se produce desde setiembre a febrero (Schneider, 2009). El mayor ancho de las alas, su ondulación, la presencia de nervaduras salientes y especialmente el mayor número de inflorescencias en el ápice de las ramas, diferencia fácilmente a *B. milleflora* de *B. trimera* y *B. crispa* (Schneider, 2009).

*B. milleflora* es una especie de distribución exclusiva del sudeste y sur de Brasil (estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul) (Schneider, 2009). Su hábitat son campos secos y húmedos, bañados, campos de altitud, bordes de bosques y lugares sombreados (Heiden *et al.*, 2007; Schneider, 2009). Esta especie se ha identificado como potencial ornamental para la confección de arreglos florales (Tognon y Cuquel, 2016).



**Figura 11:** Espécimen en floración de *Baccharis milleflora* (Less.) DC. Fuentes: 1) ilustración: A.A. Schneider (2009); 2) imagen: L.A. Funez (Flora de Santa Catarina; <https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/>).

Los estudios fitoquímicos de ésta especie se han centrado en la composición del aceite esencial de sus partes aéreas (Agostini *et al.*, 2005; Simões Pires *et al.*, 2005a; Besten *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2017; Trombin-Souza *et al.*, 2017). Particularmente, dicho aceite exhibe actividad citotóxica, antioxidante moderada, antimicrobiana, pediculicida e inmuno-moduladora (Pereira *et al.*, 2016; Pereira *et al.*, 2017; Pereira, 2017). En la literatura también se encuentra un estudio en el que por medio de tratamientos quimiométricos de los espectros UV-Vis de extractos etanólicos, se diferencia a ésta especie de *B. trimera* y *B. articulata* (Lonni *et al.*, 2005). Por otra parte, el estudio farmacobotánico de ésta especie fue realizado por Pereira *et al.* (2014).

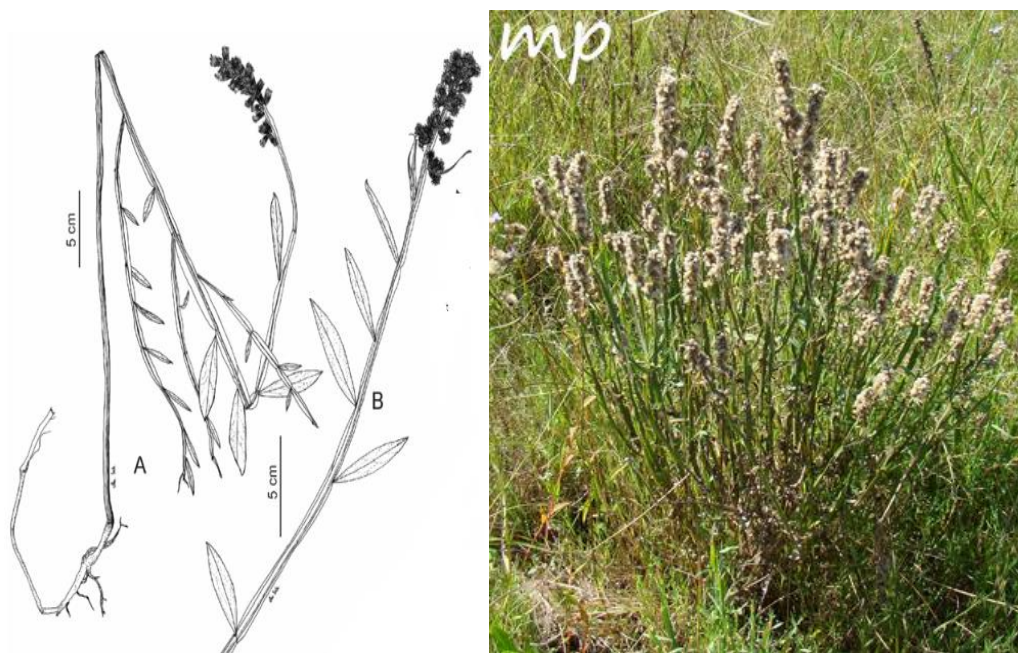
### 1.12 *Baccharis phyteumoides* (Less.) DC. Sinónimo: *Molina phyteumoides*.

*B. phyteumoides* se presenta como sufrútices erectos de hasta 1,5 m de altitud (ramificados en la base), con cladodios provistos de 3 a 4 alas glabras y artículos planos (Barroso, 1976; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). A diferencia de las especies anteriores *B. phyteumoides* posee hojas que son sésiles, angostamente elípticas,



lanceoladas a lineares con ápice agudo; dimensiones: hasta 8 cm de largo y 2 cm de ancho, con de apariencia papirácea al tacto (Figura 12) (Barroso, 1976; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Los capítulos son sésiles, solitarios o en glomérulos, en conjunto reunidos en una espiga foliosa en el extremo de las ramas terminales (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). La floración de ésta especie se produce entre diciembre y febrero (Schneider, 2009).

Ocurre espontáneamente en el sur de Brasil (Rio Grande do Sul), Paraguay, nordeste de Argentina y Uruguay (Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Es una especie hidrófila que habita generalmente en pajonales, bañados y campo húmedos (suelos hidromórficos) (Barroso, 1976; Heiden *et al.*, 2007; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). No existe información en cuanto al empleo etnobotánico de ésta especie (Retta *et al.*, 2009). Actualmente, debido a la antropización de los ambiente naturales en que se desarrolla, se encuentra en estado vulnerable de conservación (Alonso *et al.*, 2009; Heiden *et al.*, 2009).



**Figura 12:** *Espécimen en floración de Baccharis phyteumoides (Less.) DC.* Fuentes: 1) ilustración: A.A. Schneider (2009); 2) imagen: A.A. Schneider (Flora Digital do Rio Grande do Sul; (<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>)).

La literatura fitoquímica disponible para la especie es escasa, habiéndose reportado la composición del aceite esencial (Retta *et al.*, 2009), y la existencia de sinergia de extractos alcohólicos con antifúngicos (Rodríguez *et al.*, 2013). También se ha



propuesto la diferenciación de *B. phyteumoides* de las demás especies de la sección Caulopterae por medio de análisis multivariado a partir de datos obtenidos por espectrofotometría (Rodríguez *et al.*, 2012) y por análisis morfológico (Martínez *et al.*, 2018).

**1.13 *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.** Sinónimos: *B. gaudichaudinana*, Molina *articulata*, *Pingraea articulata*, *Conyza articulata*.

Esta especie se conoce popularmente con varios nombres: “carqueja”, “carquejilla”, “carqueja blanca”, “carqueja dulce”, “carqueja crespá” y “chilca melosa”, “*carqueja do morro*”, “*vassoura*” (portugués) entre otras (Barroso, 1976; Cortadi *et al.*, 1999; Retta *et al.*, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Se trata de arbustos erectos de 0,5-2,0 m de altura, resinosos y revestidos por nidos pilosos (Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Los tallos basales son trialados y los apicales bialados, de coloración verde cenicienta (con puntos blanquecinos característicos) que permiten la formación de artículos definidos (de allí su epíteto específico) (Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Las hojas son sésiles, reducidas e inconspicuas, presentes solamente en las ramas apicales (Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). La floración (julio-diciembre) es visualmente muy expresiva, con capítulos sésiles solitarios pero dispuestos en glomérulos, e inflorescencia del tipo panícula (Figura 13) (Barroso, 1976; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). La floración es muy aromática, y atrae a numerosos insectos polinizadores (Barroso, 1976; Schneider, 2009).

Al igual que *B. crispa*, es una especie que ha sido reconocida por la Farmacopea Nacional Argentina (6ª edición) (1978) como medicinal por sus infusiones con propiedades digestivas, colagogas, hepato-protectoras, diuréticas, anti-inflamatorias, antidiabéticas, antisépticas y anti-reumáticas, así como indicadas para disfunciones reproductivas en hombres y mujeres (Cortadi *et al.*, 1999; Freire *et al.*, 2007; Retta *et al.*, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Las infusiones de ésta planta medicinal suelen ser menos amargas que las correspondientes a otras especies de Caulopterae, de allí que se la conozca como “carqueja dulce”, lo que se asocia a su contenido de diterpenos (Fullas *et al.*, 1994; Schneider, 2009).





*B. articulata* posee una distribución semejante a la de *B. trimera* y *B. crispa*: sur de Bolivia y Paraguay, sur y centro-este de Brasil, norte y centro de Argentina y Uruguay (Barroso, 1976; Schneider, 2009; Giuliano y Plos, 2014). Usualmente crece en estepas y pastizales, campos secos y húmedos, campos de altitud (hasta 2500 m.s.n.m.) así como en ambientes alterados donde suele formar densas poblaciones (Schneider, 2009). Es pertinente aclarar que no todos los autores están de acuerdo en que *B. articulata* y *B. gaudichaudiana* sean considerados como el mismo taxón (Rodríguez et al., 2010; Schripsema et al., 2019).



**Figura 13:** *Espécimen en floración de Baccharis articulata (Lam.) Pers. Fuentes:1) ilustración: Giuliano y Plos (2014); 2) imagen: Autor Anónimo. Florais Aura Luz (<http://www.floraisauraluz.com.br/>).*

El estudio morfoanatómico de *B. articulata* ha sido principalmente desarrollado para diferenciar a ésta especie de otras relacionadas (Cortadi et al., 1999; Freire et al., 2007; Martínez et al., 2018).

El aceite esencial de ésta especie ha sido profusamente analizado en diversas localidades geográficas (Tonn et al., 1987; Zunino et al., 1998; Zunino et al., 2004; Agostini et al., 2005; Simões-Pires et al., 2005a; Simionatto et al., 2008; Retta et al., 2009; Florão et al., 2012; Trombin-Souza et al., 2017; Tomazoni et al., 2018). Dicho aceite ha sido destacado por sus propiedades antimicrobianas (Simionatto et al., 2008; Cezarotto, 2009), anti-inflamatorias (Florão et al., 2012), repelentes de insectos plagas



de granos (Campos *et al.*, 2013) y antifúngicas en tomate (Tomazoni *et al.*, 2018). Otros componentes químicos descritos para partes aéreas de *B. articulata* incluyen ácidos cafeoil-quínicos como agliconas y glicósidos (Debenedetti *et al.*, 1993; Cariddi *et al.*, 2012; Quintana de Oliveira *et al.*, 2003; Quintana de Oliveira *et al.*, 2014), flavonoides (Fullas *et al.*, 1994; Cariddi *et al.*, 2012; Quintana de Oliveira *et al.*, 2014), diterpenos del tipo clerodano, *neo*-clerodano y labdano (Stapel *et al.*, 1980; Dai *et al.*, 1993; Fullas *et al.*, 1994) y triterpenos (Fullas *et al.*, 1994).

Los extractos acuosos y etanólicos de esta especie han sido reportados como potentes agentes antioxidantes y antiradicalarios debido a su contenido polifenólico (Quintana de Oliveira *et al.*, 2003; Borgo *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2011; Quintana de Oliveira *et al.*, 2014; Gelatti *et al.*, 2018). Otras propiedades farmacológicas de los extractos orgánicos y acuosos de *B. articulata* incluyen: acción anti-inflamatoria (Gené *et al.*, 1992), antiglicémica (Kappel *et al.*, 2012), antimicrobiana (Quintana de Oliveira *et al.*, 2005; Vivot *et al.*, 2006; Toribio *et al.*, 2007), antiespasmódica (Toso y Boeris, 2010), antiviral (Torres *et al.*, 2011; Visintini-Jaime *et al.*, 2013), citotóxica contra células cancerígenas (Fullas *et al.*, 1994) y antimutagénica (Rodríguez *et al.*, 2011). Sin embargo, éste último punto se encuentra en debate en la literatura, ya que Cariddi *et al.* (2010, 2012) alertaron sobre la citotoxicidad y mutagenicidad de los extractos acuosos de *B. articulata* sobre líneas celulares humanas normales. El mismo efecto antiproliferativo y mutagénico ha sido observado en células de cebolla (Facchinetto y Tedesco, 2009).

#### 1.14 *Baccharis palustris* Heering

*B. palustris* es un arbusto erecto, de 0,8-2 m de altura, con ramos estriados y no alados (hecho destacable dentro de la sección Caulopterae) y abundante indumento vellosos (Schneider, 2009; Heiden *et al.*, 2009). Sus hojas son sésiles o cortamente pecioladas, de forma oblongo-lanceoladas (dimensiones: 2-4 cm de largo y 1-2,5 cm de ancho), con base atenuada, margen liso y ápice obtuso (Figura 14) (Schneider, 2009; Heiden *et al.*, 2009). Los capítulos de ésta especie son sésiles dispuestos en espigas, en gran número en el ápice de las ramas; la floración se produce entre los meses de diciembre y febrero (Schneider, 2009).



La distribución de *B. palustris* incluye el sur de Brasil (estados de Rio Grande do Sul y Santa Catarina) y Uruguay, en donde se encuentra exclusivamente en bañados y zonas húmedas (ambientes palustres, de allí su epíteto específico) (Schneider, 2009; Heiden *et al.*, 2009). A pesar de ser una especie poco frecuente, se la encuentra en la región metropolitana de Montevideo en la zona de bañados de Paso Carrasco (A. González, *com. pers.*). Es una especie de la que no hay disponible ninguna indicación acerca de su posible uso terapéutico, así como hasta el momento no se ha realizado ningún estudio fitoquímico ni morfoanatómico.



**Figura 14:** Espécimen en floración de *Baccharis palustris* Heer. Fuentes: 1) ilustración: A.A. Schneider (2009); 2) imagen: A. González (Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay; (<http://floranativadeuruguay.blogspot.com.br/>)).

## Subgénero Molina. Sección Aphyllae

### 1.15 *Baccharis genistifolia* DC. Sinónimo: *B. polygona*.

Esta especie es considerada como medicinal ya que sus decocciones se emplean a nivel popular como antiespasmódicas (Rondina *et al.*, 2008; Giuliano y Plos, 2014). Se caracteriza por presentarse como sufrútices de 20-50 cm de altura, revestidos por nidos pilosos y con gruesas raíces gemíferas (es decir, raíces que tienen la capacidad de botar y generar nuevos individuos) (Figura 15) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014).



Presenta dimorfismo foliar, con las hojas inferiores lineares o angostamente obovadas y las superiores pequeñas y bracteiformes (**Giuliano y Plos, 2014**). Los capítulos son sésiles, solitarios, en glómérulos de 2-6, formando una inflorescencia de forma paniculoide (**Giuliano y Plos, 2014**).

Es una especie que crece en suelos secos y arenosos, en el sur de Brasil, Uruguay y el centro y nordeste de Argentina (**Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014**). Es frecuente encontrarla sobre las dunas costeras, en las playas de los departamentos de Canelones y Montevideo (**Castiñeira Latorre et al., 2013**).



**Figura 15:** *Espécimen en floración de Baccharis genistifolia DC. Fuentes: 1) ilustración: Giuliano y Plos (2014); 2) imagen: A. González-Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay; (<http://floranativadeuruguay.blogspot.com/>).*

Existe un único trabajo fitoquímico publicado sobre ésta especie, y el mismo da cuenta del contenido de flavonoides (eupatorina) en sus partes aéreas, lo que le confiere efectos anti-inflamatorios moderados en ensayos *in vitro* de formación de edema inducido por carragenano (**Pelzer et al., 1998**).



### Subgénero Molina. Sección Molina

**1.16 *Baccharis punctulata* DC.** Sinónimos: *B. amygdalina*, *B. oxyodonta* var. *punctulata*, *B. melastomifolia*, *Pinagrea punctulata*.

Esta especie se conoce popularmente como “chilca” en español, “*Ch'illka saru saru*” en quechua y “*mata-pasto*”, “*rebetão*” y “*cambará cheiroso*” en portugués (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Se trata de arbustos ramosos de 1,5-2 m de altitud, provisto de hojas oblongo-lanceoladas (4-10 cm de largo y 0,5-2,5 cm de ancho), brevemente pecioladas con un fino aserrado en el margen, atenuadas en la base y agudas en el ápice; con un trinervado característico en el envés (Figura 16) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Los capítulos de ésta especie son pedunculados, dispuestos en corimbos agrupados en una panícula foliosa en el extremo de las ramas (Giuliano y Plos, 2014).

Se distribuye por el norte y centro de Argentina, sur y centro-este de Brasil, sur de Bolivia, Paraguay y Uruguay (Barroso, 1976; Fernández *et al.*, 2003; Giuliano y Plos, 2014). Es una especie arbustiva típica del monte nativo serrano del Uruguay (Gautreau y Lezama, 2009). En la región de Potosí (Bolivia) se emplea la infusión de las partes aéreas para el tratamiento del asma y como cataplasma contra luxaciones y contusiones (Fernández *et al.* 2003; Ascari *et al.*, 2019).



**Figura 16:** Especimen en floración de *Baccharis punctulata* DC. Fuentes: 1) ilustración: Giuliano y Plos (2014); 2) imagen: P. Schwirkowski (Flora Digital do Rio Grande do Sul; (<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>)).



En cuanto a la composición fitoquímica de ésta especie, Jakupovic *et al.* (1987) describieron (en partes aéreas de material vegetal colectado en Paraná, Entre Ríos, Argentina) la presencia de dímeros prenilados derivados del ácido *p*-cumárico junto a los sesquiterpenos germacreno D, biciclogermacreno,  $\alpha$ -humuleno y *epi*-cubenol. Por su parte, en la raíz se encontraron los ésteres poliacetilénicos de (*E*) y (*Z*)-dehidromatricaria, así como las cetonas bisabolona y tremetona, y algunos sesquiterpenos derivados del curcumeno (Jakupovic *et al.*, 1987). Recientemente González y Luis (2018) aislaron de partes aéreas de un flavonoide (guaijaverina) e identificaron varios isómeros del ácido cafeoilquínico. También existen reportes sobre la composición del aceite esencial de *B. punctulata*, incluyendo: su diferenciación en individuos masculinos y femeninos, y la comparación de diferentes técnicas extractivas (Schossler *et al.*, 2009; Budel *et al.*, 2018b; Ascari *et al.*, 2019; González, 2019). En particular, González (2019) aisló desde el aceite y caracterizó espectroscópicamente los compuestos mayoritarios verboccidentafurano y germacra-1(10),5-dien-4 $\alpha$ -ol.

En cuanto a su bioactividad, se han obtenido buenos resultados para los extractos orgánicos como antivirales (Montanha *et al.*, 2004) e inmunomoduladores (Alvarenga *et al.*, 2018). Por su parte, el aceite esencial ha demostrado actividad antioxidante y anti-inflamatoria (Ascari *et al.*, 2019).

### **Subgénero Tarchonanthoides. Sección Canescentes**

#### **1.17 *Baccharis gibertii* Baker.** Sinónimo: *Lanugothamus gibertii*.

Esta especie se desarrolla como subarbustos erectos de 0,5-1,7 m de altura, con tallos amarronados y brotes profusamente villosos (Heiden y Pirani, 2016). Las hojas son de forma cordadas, ovadas u oblongas de ápice agudo y de margen entero o ligeramente revoluto, con una longitud de 0,7-3,8 cm de largo y 0,3-1,2 cm de ancho; sésiles y distribuidas uniformemente a lo largo del tallo (Figura 17) (Heiden y Pirani, 2016). Los capítulos se agrupan en racimos terminales con una floración característica de octubre a febrero (Heiden y Pirani, 2016).

Su distribución se restringe al estado de Rio Grande do Sul (Brasil) y Uruguay (departamentos de Canelones, Cerro Largo, Maldonado, Montevideo, Rocha y San José) (Heiden y Pirani, 2016). En Uruguay, es una especie endémica del litoral



platense y atlántico, creciendo sobre superficies arenosas e inundadas en donde se desarrolla en poblaciones densas pero dispersas (Fagúndez y Lezama, 2005; Heiden y Pirani, 2016). Su estado de conservación es altamente vulnerable (con alto riesgo de extinción) debido al proceso acelerado de antropización en su área de ocurrencia debido a la urbanización e invasión de especies exóticas (Fagúndez y Lezama, 2005; Heiden y Pirani, 2016).

La especie lleva el nombre en homenaje al botánico y químico uruguayo/francés José Ernesto Gibert (1818-1886), quien colectó el espécimen tipo de la especie (Heiden y Pirani, 2016). No presenta nombre vernáculo ni se encuentran en bibliografía reportes respecto a la fitoquímica u etnofarmacología. Lo anterior, sumado a la vulnerabilidad reportada, hace que *B. gibertii* deba ser urgentemente incluida en planes de conservación de la Biodiversidad (Fagúndez y Lezama, 2005).



**Figura 17:** Especimen en floración de *Baccharis gibertii* Baker. Fuentes: 1) ilustración: Heiden y Pirani (2016); 2) imagen: A. González-Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay; (<http://floranativadeuruguay.blogspot.com/>).

**1.18 *Baccharis gnaphalioides* Spreng.** Sinónimos: *B. radicans*, *B. psammophila*, *Lanugothamus gnaphalioides*.

Se trata de una especie que ocurre como sufrútices rastreros o ascendentes, de 10 a 70 cm de altura, decumbentes y raramente erectos; densamente tomentosos (Giuliano y

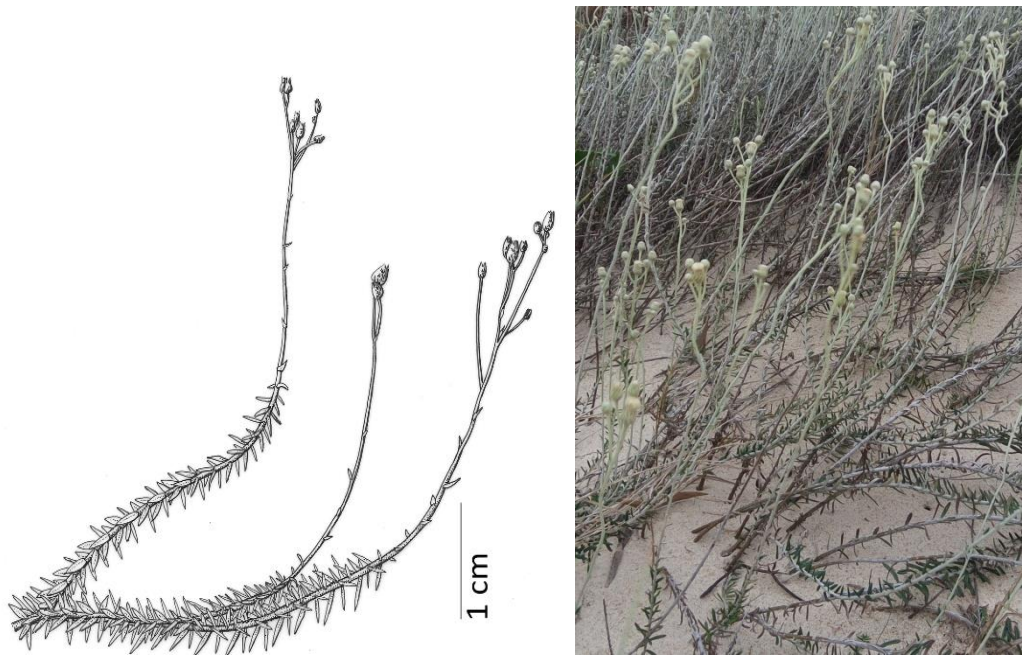


**Plos, 2014; Heiden y Pirani, 2016**). En Brasil se la conoce popularmente como “*vassourinha das dunas*” en virtud del ambiente en que principalmente se desarrolla (**Heiden y Pirani, 2016**). El epíteto *gnaphalioides* refiere a la semejanza morfológica de ésta especie con miembros del género *Gnaphalium* L. (Asteraceae) (**Heiden y Pirani, 2016**).

Las hojas de *B. gnaphalioides* son sésiles, lineares, oblongas o lanceoladas, de margen entero o revoluto y se encuentran dispuestas de manera apretada; dimensiones: hasta 2,5 cm de longitud y 5 mm de ancho (Figura 18); sin embargo se ha evidenciado una amplia variación en la morfología foliar (**Giuliano y Plos, 2014; Heiden y Pirani, 2016**). La base de las mismas es apenas atenuada y el ápice es agudo u obtuso; son discoloras, glabras o pubérulas en el haz y densamente tomentosas en el envés (**Giuliano y Plos, 2014; Heiden y Pirani, 2016**). Los capítulos son pedunculados y dispuestos en corimbos simples o compuestos terminales, raramente en capítulos apareados o solitarios (**Giuliano y Plos, 2014; Heiden y Pirani, 2016**). El período fértil de esta especie es todo el año, sin embargo el pico de floración se produce en los meses de marzo a mayo (**Heiden y Pirani, 2016**).

Crece frecuentemente en las planicies costeras y terrenos arenosos (especialmente dunas) del sur de Brasil (estados de Santa Catarina y Rio Grande do Sul), Uruguay (departamentos de Canelones, Maldonado, Montevideo, Rocha, Rivera y San José) y el este de Argentina (provincia de Buenos Aires) (**Giuliano y Plos, 2014; Heiden y Pirani, 2016**). Sin embargo, también se ha reportado la ocurrencia en ambientes serranos en los tres países, en elevaciones de hasta 400 m.s.n.m. (**Heiden y Pirani, 2016**).





**Figura 18:** Espécimen en floración de *Baccharis gnaphalioides* Spreng. La imagen fue tomada en el sitio de colecta del presente trabajo (El Pinar, Canelones, Uruguay). Fuente de la ilustración: Heiden y Pirani (2016).

En el único reporte fitoquímico de *B. gnaphalioides* en la literatura, Montanha *et al.* (2004) reportaron actividad antiviral moderada contra el virus HSV-1 para los extractos hidro-alcohólicos y acuosos de partes aéreas.

### Subgénero *Tarchonanthoides*. Sección *Coridifoliae*

#### 1.19 *Baccharis ochracea* Spreng. Sinónimo: *B. velutina*, *Lanugothamus ochraceous*.

Es una especie que se desarrolla como sufrutices de hasta 80 cm de alto, densamente tomentosos con color ferruginoso en su indumento (ocráceo, de allí su epíteto específico) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). En Brasil se la reconoce como planta medicinal y su denominación popular es “*vassoura do campo*”, “*carquejinha*” y/o “*erva santa*” (yerba santa) por las propiedades antiespasmódicas, tónicas, digestivas, antihelmínticas, antidiabéticas, antireumáticas, anti-hepatotóxicas, antidiarreicas, febrífugas, antitusígenas y desinfectantes de las infusiones de sus partes aéreas (Schenkel *et al.*, 1997; Simões *et al.*, 1999; Budel *et al.*, 2012; Barreto *et al.*, 2015).

Las hojas son lineares de hasta 1,5 cm de longitud y 2 mm de ancho, obtusas o subobtusas en el ápice y enteras y revolutas en el margen; densamente tomentosas en



ambas caras y glabras en el haz (Figura 19) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). Los capítulos son brevemente pedunculados y ordenados en racimos simples o compuestos que a su vez se agrupan en un racimo folioso amplio (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014).

La distribución geográfica de *B. ochracea* es exclusivamente en el sur de Brasil y Uruguay, sin embargo se la ha citado ocasionalmente en las provincias de Entre Ríos (Argentina) (Barroso, 1976; Giuliano y Plos, 2014). En Uruguay en general se desarrolla a los costados o formando parte del monte nativo, o en los campos abiertos (Sayagués Laso *et al.*, 2000).



**Figura 19:** Especimen en floración de *Baccharis ochracea* Spreng. Fuentes: 1) imagen de la izquierda: S. Bordignon (Flora Digital do Rio Grande do Sul; (<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/lorars/>); 2) imagen de la derecha: A. González (Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay; <http://floranativadeuruguay.blogspot.com.br/>).

De las partes aéreas de *B. ochracea* se aisló un diterpeno novedoso con la estructura del geranil-geraniol y un anillo butenólido, junto con el  $\alpha$ -espinasterol (triterpeno), ácido clorogénico e isoclorogénico, y la isoquercitrina (flavonoide) (Schenkel *et al.*, 1997). Asimismo, los extractos orgánicos de partes aéreas de esta especie han dado positivo a la presencia de peróxidos (Schenkel *et al.*, 2002). También se ha reportado en partes aéreas la presencia de aceites esenciales (Budel *et al.*, 2012; Tomazoni *et al.*, 2018).

Dentro de las propiedades farmacológicas evaluadas para extractos orgánicos y acuosos de *B. ochracea* se incluyen las citotóxicas y antitumorales (contra líneas celulares HT29



de adenocarcinoma de colon y línea NCI-H460 de cáncer de pulmón) (Monks *et al.*, 2002a y 2002b), antivirales (Simões *et al.*, 1999) y abortivas (Sobottka *et al.*, 1996). Por su parte, el aceite esencial ha sido reportado por su capacidad antifúngica contra la patógeno de tomate *Stemphylium solani*, y por la ausencia de fitotoxicidad contra dicho cultivo (Tomazoni *et al.*, 2018).

Finalmente, el estudio morfo-anatómico de ésta especie fue realizado por Budel *et al.* (2012) y Barreto *et al.* (2015).

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS:

### 2.1 Colecta del material vegetal

El material vegetal estudiado fue colectado en diversos lugares y diferentes estados vegetativos, de manera de poder abarcar una buena distribución geográfica y diferentes estadios de desarrollo fenológico. A los efectos de éste capítulo, las especies estudiadas se dividirán en tres secciones:

**Colecta No. 1 (6)**, muestras provenientes de Brasil sin discriminación de sexo: *B. dentata* (Bdt), *B. microdonta* (Bmd), *B. milleflora* (Bmf), *B. tridentata* (Btd), *B. trimera* (Btm1) y *B. uncinella* (Bun).

**Colecta No. 2 (10)**, muestras provenientes de Uruguay sin discriminación de sexo: *B. articulata* (Bar), *B. cultrata* (Bcu), *B. genistifolia* (Bge), *B. gibertii* (Bgi), *B. gnaphalioides* (Bgn), *B. ochracea* (Boc), *B. palustris* (Bpa), *B. phyteumoides* (Bph), *B. punctulata* (Bpu) y *B. trimera* (Btm2).

**Colecta No. 3 (4)**, material vegetal originario de Uruguay sexado en partes aéreas masculinas y femeninas: *B. crispa* (Bcr), *B. dracunculifolia* (Bdr), *B. linearifolia* (Bli) y *B. spicata* (Bsp).

Las especies que fueron parte de éste trabajo fueron reconocidas taxonómicamente por los siguientes especialistas: Ing. Agr. A. González (Departamento de Botánica, Museo Nacional de Historia Natural, MEC, Uruguay); Prof. E. Alonso-Paz (Cátedra de Botánica, Facultad de Química, UdelaR, Uruguay; *in memoriam*); y Profs. C. Mondin y P.M. Abreu (Departamento de Biodiversidad y Ecología, PUCRS, Brasil). Soporte taxonómico adicional fue provisto por los Dres. D. Giuliano (Facultad de Ciencias



Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata, Argentina) y G. Heiden (EMBRAPA Clima Temperado, Pelotas, Brasil).

El material vegetal fue secado en condiciones de sombra y aireación controladas por un período de 20-25 días hasta su extracción. Muestras representativas fueron herborizadas en los herbarios de la Facultad de Química (MVFQ) y en el herbario de la PUCRS (Porto Alegre, RS, Brasil). Del material que no pudo ser herborizado por diferentes circunstancias, se tomaron registros fotográficos. Fotos detalladas de las especies indicadas pueden ser obtenidas del Blog del Ing. González: Fotos de Flora Nativa y Adventicias de Uruguay (<http://floranativadeuruguay.blogspot.com/>).



**Colecta No. 1**

Especie	Bdt	Bmd	Bmf	Btd	Btm1	Bun
<b>Fecha de colecta</b>	02/2011 (verano)	05/2012 (otoño)	09/2011 (primavera)	09/2011 (primavera)	09/2011 (primavera)	09/2011 (primavera)
<b>Fenología y arquitectura de plantas</b>	Plantas en estado vegetativo, erectas de 50-70 cm de altura	Plantas con frutos, erectas de más de 1 m de altura	Plantas en estado vegetativo, erectas de más de 1 m de altura	Plantas con botones florales, erectas de más de 1 m de altura	Floración; plantas erectas de 50-80 cm de altura	Plantas con botones florales, erectas de 1.5-2.0 m de altura
<b>Localidad</b>	Estación Pro-Mata (PUCRS). São Francisco de Paula-RS	Estación Pro-Mata (PUCRS). São Francisco de Paula-RS	Estación Pro-Mata (PUCRS). São Francisco de Paula-RS	Estación Pro-Mata (PUCRS). São Francisco de Paula-RS	Estación Pro-Mata (PUCRS). São Francisco de Paula-RS	Estación Pro-Mata (PUCRS). São Francisco de Paula-RS
<b>Hábitat y condiciones de crecimiento</b>	Individuos aislados al margen de bosque nativo	Población al margen de bosque nativo creciendo en "parches"	Individuos aislados creciendo dentro de bosque nativo	Población al margen de bosque nativo creciendo en "parches"	Individuos aislados al margen de bosque nativo	Población al margen de bosque nativo creciendo en "parches"
<b>Relieve</b>	Abrupto	Abrupto	Abrupto	Abrupto	Abrupto	Abrupto

**Tabla 1:** Condiciones de colecta de las especies de la Colecta No. 1. Referencias: (Bdt): *B. dentata*; (Bmd): *B. microdonta*; (Bmf): *B. milleflora*; (Btd): *B. tridentata*; (Btm1): *B. trimera*; y (Bun): *B. uncinella*.



**Colecta No. 2**

Especie	Bar	Bcu	Bge	Bgi	Bgn	Boc	Bpa	Bph	Bpu	Btm2
<b>Fecha de colecta</b>	11/2012 (primavera)	04/2013 (otoño)	01/2013 (verano)	01/2013 (verano)	01/2013 (verano)	04/2013 (otoño)	01/2013 (verano)	06/2015 (invierno)	02/2016 (verano)	07/2011 (invierno)
<b>Fenología y arquitectura de plantas</b>	Floración temprana. Plantas erectas de 20-40 cm de altura	Estado vegetativo, plantas erectas de más de 80 cm de altura	Plantas secas con restos de frutos; erectas de 30-40 cm de altura	Estado vegetativo, plantas erectas de 40-50 cm de altura	Estado vegetativo. Plantas rastreras en “rosetas” de más de 30 cm de diámetro	Estado vegetativo con restos de frutos; plantas erectas de 20-40 cm de altura	Floración intensa. Plantas erectas de 40-50 cm de altura	Estado vegetativo, plantas erectas de más de 1 m de altura	Estado vegetativo, plantas erectas de más de 1 m de altura	Estado vegetativo, plantas erectas de 20-60 cm de altura
<b>Localidad</b>	Los Cerrillos, Canelones	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres	Balneario San Luis, Canelones	El Pinar, Canelones	El Pinar, Canelones	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres	Bañados de Carrasco, Canelones	31 de Marzo, Florida	Estación Porvenir, Paysandú	Estación Porvenir. Paysandú
<b>Hábitat y condiciones de crecimiento</b>	Campo de cultivo abandonado, asociado a malezas nativas	Suelo pedregoso, borde de camino	Suelo arenoso al margen del Río de la Plata. Vegetación en “parches” sobre dunas	Margen del arroyo Pando, asociada a especies acuáticas	Suelo arenoso al margen del Río de la Plata. Vegetación en “parches” sobre dunas	Suelo pedregoso, borde de camino	Bañados al margen de la ruta IB asociada a especies acuáticas	Margen de cañada, asociada a especies acuáticas	Margen de vía férrea, asociada a malezas nativas	Margen de vía férrea, asociada a malezas nativas
<b>Relieve</b>	Suavemente ondulado	Abrupto	Plano	Plano	Plano	Abrupto	Plano	Plano	Suavemente ondulado	Suavemente ondulado

**Tabla 2:** Condiciones de colecta de las especies de la Colecta No. 2. Referencias: (Bar): *B. articulata*; (Bcu): *B. cultrata*; (Bge): *B. genistifolia*; (Bgi): *B. gibertii*; (Bgn): *B. gnaphalioides*; (Boc): *B. ochracea*; (Bpa): *B. palustris*; (Bph): *B. phyteumoides*; (Bpu): *B. punctulata*; (Btm2): *B. trimera*.



**Colecta No. 3**

Especie	Bcr	Bdr	Bli	Bsp
<b>Fecha de colecta</b>	04/2013 (otoño)	01/2013 (verano)	04/2013 (otoño)	04/2013 (otoño)
<b>Fenología y arquitectura de plantas</b>	Floración. Plantas erectas de 20-30 cm de altura	Floración. Plantas erectas de 1,5-2,5 m de altura	Floración. Plantas erectas de 50-60 cm de altura	Floración. Plantas erectas de 50-60 cm de altura
<b>Localidad</b>	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres	Estación Porvenir, Paysandú	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres	Quebrada de los Cuervos, Treinta y Tres
<b>Hábitat y condiciones de crecimiento</b>	Plantas aisladas creciendo en suelo pedregoso, asociada a césped nativo	Población al margen de vía férrea, asociada a malezas nativas	Población creciendo en “parches” sobre suelo pedregoso en borde de camino asociada a especies nativas	Población creciendo en “parches” sobre suelo pedregoso en borde de camino asociada a especies nativas
<b>Relieve</b>	Abrupto	Suavemente ondulado	Abrupto	Abrupto

**Tabla 3:** Condiciones de colecta de las especies de la Colecta No. 3. Referencias: (Bcr): *B. crispa*; (Bdr): *B. dracunculifolia*; (Bli): *B. linearifolia*; (Bsp): *B. spicata*.



## 2.2 Extracción y análisis de los compuestos volátiles

La extracción de los componentes volátiles fue realizada por extracción-destilación simultánea (*SDE*) según el protocolo detallado en el capítulo 3. En algunos casos que se especifica, la extracción fue efectuada mediante destilación por hidrodestilación empleando un dispositivo de tipo Clevenger, también de acuerdo a lo indicado en el capítulo 3.

El análisis químico de los extractos volátiles fue realizado por *GC-MS* mediante dos columnas capilares de diferente polaridad: poco polar (5%-fenil-95%-metilpolisiloxano) y polar (polietilenglicol). Para el caso de la primera fase estacionaria, las condiciones experimentales fueron las mencionadas en el capítulo 3. El análisis en fase polar fue realizado en un *GC-MS Shimadzu GC-17* acoplado a un espectrómetro de masa *Shimadzu QP 5050 MSD* (*Shimadzu Co., Tokio, Japón*). El volumen de inyección fue de 0.2  $\mu$ L del extracto volátil concentrado en hexano en modalidad *Split* (25:1). Se empleó He (1,0 mL/min) como fase móvil. La columna utilizada fue una *DB-Wax* (30 m largo x 0,25 mm diámetro interno x 0,25  $\mu$ m de espesor de fase) (*Agilent Technologies- J & W Scientific, Santa Clara, CA, EEUU*). Programa de temperatura: 40°C (8 min); 40-180°C a 3°C/min; 180°C (1 min); 180-230°C a 20°C/min; 230°C (15 min); 230-240°C a 25°C/min; 240°C (5 min). La temperatura del inyector, fuente de ionización e interfase fue 250°C. La energía de ionización electrónica fue de 70 eV, y el rango de masas de detección fue de 40-400 u.m.a.

Como en el capítulo anterior, la identificación de los compuestos volátiles se realizó por comparación de espectros de masas con bibliotecas comerciales y por cálculo de índices de retención lineales (*LRI*). La cuantificación empleada en éste caso fue por cálculo de porcentajes de áreas relativas, tomando el área total bajo el cromatograma como 100% y el factor de respuesta igual a 1 para todos los componentes.

## 2.3 Tratamiento estadístico

Se aplicó un tratamiento estadístico multivariado a los datos de composición del volatilo de algunas especies pertenecientes a la Colecta No. 1 (*B. milleflora*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella*), empleadas como caso de estudio. Las variables consideradas fueron los componentes del volatilo y sus porcentajes de composición





(mayor al 1% en al menos una de las especies) obtenidos mediante el análisis por *GC-MS* en fase estacionaria poco polar.

Los análisis multivariados que se llevaron a cabo fueron *PCA* y *HCA* empleando el software Statistica 7.0 (2002) (*StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EEUU*).

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

Para la bioprospección del volatilo de *Baccharis* spp. L. se eligió la técnica de extracción-destilación simultánea (*SDE*) debido a que la misma permite extraer una mayor cantidad de componentes volátiles que otras técnicas, siendo asimismo fácil de implementar en condiciones de laboratorio (capítulo 3). Por ello, en las secciones subsiguientes serán presentados los datos de composición del volatilo de cada una de las especies colectadas extraídas mediante *SDE*, a menos que se especifique lo contrario.

#### **3.1 Composición química del volatilo de *Baccharis* spp. (Colecta No. 1)**

Mediante el análisis detallado (por *GC-MS* utilizando fases estacionarias de diferente polaridad) de la fracción volátil de las 6 especies pertenecientes a la Colecta No. 1, fue posible identificar 189 picos cromatográficos, varios de los cuales presentaron co-eluciones entre dos o tres componentes diferentes (Tabla 4). Dicho número de compuestos identificados es muy superior al número que en general aparece en los trabajos publicados en la literatura de *Baccharis* spp., seguramente debido al hecho que en dichas investigaciones suele emplearse una única fase estacionaria para el análisis químico. Sin embargo, un gran número de compuestos identificados (268) fue reportado por Chaverri y Ciccio (2017) para el aceite esencial de *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. de Costa Rica.

La mayor parte de los compuestos listados en la Tabla 4 pertenecen al grupo de los terpenos: mono y sesquiterpenos, lo que es un hecho bastante general para los aceites esenciales de muchas especies aromáticas y particularmente en el caso de *Baccharis* spp. (Adams, 2007; Bogo *et al.*, 2016).



#	Compuesto <sup>a)</sup>	LRI 1	LRI 2	Bdt <sup>b)</sup> d)	Bmd d)	Bmf	Btd	Btm	Bun
1	1-hexen-3-ona <sup>c)</sup>	780	1084	-	-	0,01	-	-	tr
2	hexanal	801	1067	-	-	0,1	-	0,08	0,02
3	ácido isovalérico	827	1641	-	-	0,04	-	tr	-
4	3-( <i>E</i> )-hexenol	844	1328	-	-	-	-	-	tr
5	2-( <i>E</i> )-hexenal	846	1198	-	-	0,06	-	0,03	tr
6	3-( <i>Z</i> )-hexenol	849	-	-	-	0,02	0,05	-	-
7	<i>n</i> -hexanol	871	1343	-	-	0,02	-	0,04	-
8	heptanal	903	1171	-	-	0,02	-	-	0,02
9	triciclono	916	1013	-	-	0,01	0,04	-	0,01
10	$\alpha$ -tuyeno*	922	1020	tr	-	-	1,3	0,07	3,4
11	$\alpha$ -pineno*	928	1012	1,2	3,4	0,09	46,7	0,9	11,7
12	canfeno*	941	1050	-	-	-	1,4	-	0,08
13	$\alpha$ -fencheno	947	1042	-	-	-	-	-	0,05
14	ácido hexanoico (caproico)	955	1809	-	-	0,07	-	tr	tr
15	2-( <i>E</i> )-heptenal	957	1302	-	-	-	-	-	tr
16	benzaldehído	958	-	-	-	0,02	-	-	-
17	sabineno*	969	1108	tr	0,1	0,02	3,0	0,2	2,4
18	$\beta$ -pineno*	972	1093	2,3	7,6	0,3	11,4	3,4	7,6
19	mirceneno + $\beta$ -felandreno*	990	1155, 1193	0,5	0,4	0,1	1,8	0,6	1,0
20	2-pentenilfurano	991	1220	-	-	0,2	-	tr	tr
21	$\alpha$ -felandreno	1003	1151	tr	-	-	-	0,07	0,09
22	octanal	1004	1274	-	-	0,03	-	tr	-
23	$\delta$ -3-careno + acetato de 2-( <i>E</i> )-hexenilo	1009	1135, 1311	-	-	-	-	-	0,1
24	$\alpha$ -terpineno	1014	1163	-	-	0,03	0,1	0,05	0,3
25	2,4-( <i>E,E</i> )-heptadienal	1012	-	-	-	0,04	-	0,07	-
26	<i>m</i> -cimeno	1021	1251	-	-	-	-	-	0,06
27	<i>p</i> -cimeno	1024	1252	0,2	-	0,06	0,06	0,3	0,4
28	limoneno*	1028	1185	7,0	10,1	3,2	14,1	1,2	8,6
29	1,8-cineol	1030	1193	-	-	0,03	-	0,1	0,03
30	alcohol bencílico	1036	-	-	-	0,03	-	-	0,05
31	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1039	1207	-	-	-	0,1	0,03	0,05
32	fenilacetaldehído	1043	-	-	-	0,09	-	0,04	0,04
33	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno*	1049	1240	tr	0,4	0,07	3,6	0,2	0,3
34	$\gamma$ -terpineno + 2-( <i>E</i> )-octenal	1058	1230, 1407	tr	-	0,03	0,2	0,2	0,5
35	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1066	1450	-	-	-	0,05	-	0,1
36	( <i>Z</i> )-óxido de linalol (furanoide)	1074	1424	-	-	0,08	-	0,1	tr
37	terpinoleno	1086	1267	tr	-	-	0,2	0,1	0,2
38	<i>p</i> -cimeneno	1088	1264	tr	-	0,02	-	0,1	-
39	( <i>E</i> )-óxido de linalol (furanoide)	1091	1452	-	-	0,03	-	tr	-
40	linalol	1101	1530	0,2	-	0,08	0,1	1,0	0,1
41	( <i>E</i> )-hidrato de sabineno + nonanal	1104	1377	0,1	-	-	0,07	0,2	0,1
42	hotrienol	1105	1585	-	-	0,2	-	-	0,1
43	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	1109	1374	-	-	-	-	-	0,03



Tabla 4, continuación

44	endo-fenchol	1111	1565	-	-	-	-	-	0,1
45	(Z)-p-ment-2-en-1-ol	1120	-	-	-	-	0,05	0,03	0,2
46	(E)-p-menta-2,8-dien-1-ol	1121	-	0,2	-	0,1	-	-	-
47	$\alpha$ -canfolenal	1125	-	tr	-	-	-	-	0,03
48	nopinona	1134	-	0,3	-	-	-	-	-
49	(Z)-óxido de limoneno	1134	-	-	-	0,02	-	-	-
50	(E)-pinocarveol	1136	1630	-	-	0,07	0,04	0,3	0,1
51	(E)-sabinol	1137	-	1,1	-	-	-	-	-
52	(E)-p-ment-2-en-1-ol	1138	-	-	-	-	-	-	0,1
53	alcanfor	1142	-	0,1	-	-	-	-	-
54	acetato de (E)-crisantemilo	1143	-	-	-	-	0,1	-	-
55	(E)-verbenol	1143	1656	-	-	-	-	-	0,1
56	exo-metilcanfenilol	1145	-	-	-	-	-	-	0,07
57	2,6-(E,Z)-nonadienal	1148	1560	-	-	-	-	-	0,08
58	citronelal	1154	-	tr	-	-	-	0,06	-
59	pinocarvona	1160	1539	0,7	-	-	-	0,2	0,1
60	borneol	1164	-	-	-	-	0,04	-	0,2
61	p-menta-1,5-dien-8-ol + (E)-óxido de linalol (piranoide)	1166	(-), 1756	tr	-	-	0,03	-	0,08
62	isopinocanfona + isopinocanfeol + terpinen-4-ol	1176	1516, 1544, 1581	0,3	0,1	-	0,5	0,2	1,0
63	(E,E)-1,3,5-undecatrieno	1182	1379	-	-	-	-	-	0,09
64	criptona	1184	-	0,1	-	-	-	-	-
65	p-cimen-8-ol	1185	1821	-	-	-	-	0,2	0,2
66	$\alpha$ -terpineol	1189	1674	0,4	0,2	0,09	0,2	0,5	0,6
67	mirtenal + safranal + mirtenol	1194	1597, 1615, 1770	2,6	-	0,2	-	0,4	0,2
68	(Z)-piperitol	1196	-	tr	-	-	-	-	-
69	(E)-piperitol	1202	1724	-	-	-	-	-	0,04
70	verbenona + decanal	1206	-, 1481	-	-	-	-	-	0,1
71	$\beta$ -ciclocitral	1218	-	-	-	-	-	0,09	-
72	(E)-carveol	1219	1810	0,9	-	0,3	-	-	0,08
73	citronelol	1223	1780	-	-	-	-	tr	-
74	nerol	1229	1825	-	-	-	-	0,1	-
75	(Z)-carveol	1231	-	0,3	-	0,1	-	-	-
76	isovalerato de 3-(Z)-hexenilo + neral + acetato de (E)-crisantemilo	1234	1458, 1663, 1781	-	-	-	-	-	0,04
77	timol metiléter	1235	-	-	-	-	-	0,05	-
78	carvona	1243	-	1,2	-	0,3	-	-	0,03
79	canfenoato de metilo	1250	1545	-	-	0,3	-	-	0,06
80	geraniol	1253	1825	tr	-	-	-	0,3	0,06
81	2-(E)-decanal	1263	-	-	-	0,08	-	0,03	-
82	geranial	1271	-	0,2	-	-	-	0,06	-
83	(E)-cinamaldehído + perilla aldehído	1273	-, -	-	-	0,2	-	-	0,04
84	acetato de bornilo*	1284	-	-	-	-	6,0	0,03	-
85	safrol	1288	1836	-	0,5	0,2	-	-	-



Tabla 4, continuación

86	perilla alcohol	1297	-	0,1	-	-	-	0,04	0,03
87	acetato de carquejilo	1300	1685	-	-	0,2	-	-	-
88	<i>p</i> -vinilguaiaicol	1313	-	-	-	0,3	-	0,1	0,03
89	2,4-( <i>E,E</i> )-decadienal	1316	1467	-	-	0,06	-	0,1	0,03
90	geraniato de metilo	1324	-	-	-	-	-	-	0,02
91	$\alpha$ -longipineno	1347	-	-	-	-	-	0,3	-
92	$\alpha$ -cubebeno	1349	-	0,2	-	0,2	-	-	0,2
93	eugenol	1357	-	-	-	-	-	-	0,1
94	ciclosativeno	1366	-	-	-	0,1	-	0,09	-
95	$\alpha$ -ylangeno	1370	1468	-	-	0,1	-	0,2	0,3
96	$\alpha$ -copaeno	1375	1476	1,2	0,4	0,6	0,02	0,9	0,3
97	( <i>E</i> )- $\beta$ -damascenona	1385	1790	-	-	0,6	-	0,6	-
98	$\beta$ -bourboneno	1386	1499	-	-	0,3	-	-	0,1
99	$\beta$ -cubebeno	1389	1519	0,3	0,2	0,4	-	0,4	0,3
100	$\beta$ -elemeno	1392	1572	3,3	1,0	0,9	0,04	0,8	0,2
101	$\beta$ -longipineno	1396	1609	0,5	-	-	-	0,04	0,04
102	longifoleno	1401	1584	-	-	-	-	0,1	0,07
103	$\alpha$ -cedreno	1406	-	-	-	0,2	-	-	-
104	$\alpha$ -gurjuneno + ( <i>Z</i> )-cariofileno	1407	1513, 1587	0,2	-	-	-	0,6	0,3
105	metileugenol	1407	-	-	-	-	0,07	-	-
106	cipereno	1410	-	-	-	0,07	-	-	-
107	( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno*	1418	1575	6,2	4,4	2,1	0,8	4,1	3,3
108	$\beta$ -cedreno	1417	1690	-	-	0,6	-	tr	-
109	$\beta$ -gurjuneno	1428	-	tr	-	-	-	-	-
110	$\beta$ -copaeno	1428	-	0,3	-	0,5	-	0,2	0,1
111	$\alpha$ -guaieno	1437	-	-	0,4	-	-	0,7	0,7
112	[ $\alpha$ -( <i>E</i> )-bergamoteno + aromadendreno]*	1437	1566, 1615	0,6	-	1,6	0,04	-	0,7
113	( <i>Z</i> )- $\beta$ -farneseno	1442	1619	-	-	-	-	-	0,3
114	( <i>Z</i> )-murola-3,5-dieno	1445	-	0,3	0,1	-	-	0,06	-
115	$\alpha$ -himachaleno	1446	-	-	-	-	-	-	0,3
116	( <i>E</i> )-murola-3,5-dieno	1449	-	-	0,3	-	-	0,2	0,2
117	$\alpha$ -humuleno ( $\alpha$ -cariofileno)*	1453	1645	1,6	-	3,1	0,03	1,1	1,0
118	( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno + geranilacetona	1456	1669, 1829	0,3	1,8	0,3	-	tr	tr
119	allo-aromadendreno	1459	1774	-	-	0,7	-	1,0	0,5
120	( <i>Z</i> )-murola-4(14),5-dieno	1461	-	-	0,3	-	-	0,1	-
121	( <i>Z</i> )-cadina-1(6),4-dieno	1461	-	-	0,4	-	-	-	-
122	9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-cariofileno	1464	1625	-	-	-	-	-	0,1
123	$\gamma$ -gurjuneno	1471	-	-	-	-	-	0,7	0,2
124	( <i>E</i> )-cadina-1(6),4-dieno + propionato de geranilo	1474	1761, 1841	0,3	0,4	0,2	-	0,4	0,3
125	$\gamma$ -muroleno*	1477	1671	1,2	0,7	0,5	0,02	1,2	0,7
126	( $\alpha$ -amorfenol + germacreno D)*	1481	1671, 1685	6,8	5,6	4,2	1,5	3,0	4,3
127	ar-curcumenol*	1485	1749	-	-	8,0	-	-	1,5
128	$\beta$ -selineno*	1486	-	1,1	0,2	-	0,06	1,3	-



Tabla 4, continuación

129	(E)- $\beta$ -ionona	1486	-	0,4	-	-	-	-	-
130	(Z)- $\beta$ -guaieno	1491	-	1,8	-	-	-	-	-
131	$\delta$ -selineno	1491	-	-	-	-	-	-	0,6
132	(E)-murolo-4(14),5-dieno	1494	-	-	0,6	0,3	-	0,3	-
133	ledeno (viridifloreño)	1495	-	1,1	-	-	-	-	-
134	biciclo-germacreno*	1497	1709	2,6	6,4	4,4	3,4	2,9	4,6
135	$\alpha$ -selineno	1498	1690	-	-	-	-	tr	-
136	$\alpha$ -murolo	1501	1704	0,5	1,4	0,9	0,06	0,9	0,8
137	germacreno A	1504	-	-	-	-	-	0,7	0,2
138	(E,E)- $\alpha$ -farneseno*	1505	1700	-	-	1,9	0,03	-	0,2
139	$\alpha$ -bulneseno	1506	-	-	1,2	-	-	-	-
140	$\beta$ -bisaboleno	1510	-	-	-	0,4	-	0,2	0,5
141	$\gamma$ -cadineno	1514	-	0,2	2,0	0,5	0,08	0,9	0,8
142	$\delta$ -amorfen*	1516	1736	0,4	0,6	1,5	-	-	0,4
143	$\beta$ -curcumeno	1518	1759	-	-	-	-	0,2	-
144	$\delta$ -cadineno*	1527	1735	1,6	5,9	0,4	0,3	3,5	2,7
145	(E)-cadin-1,4-dieno	1532	-	-	0,3	-	-	0,2	0,1
146	(Z)-nerolidol	1532	1949	-	-	-	-	tr	tr
147	$\alpha$ -cadineno	1539	-	-	1,0	0,2	-	0,2	0,2
148	$\alpha$ -calacoreno	1543	1888	2,5	0,4	0,4	-	0,5	0,7
149	elemol	1551	-	-	0,2	-	-	-	-
150	(E)-nerolidol	1555	2010	-	-	0,7	-	0,5	0,2
151	germacreno B	1557	1802	0,4	2,3	0,3	-	0,4	-
152	$\beta$ -calacoreno	1563	1929	-	0,3	-	-	-	0,1
153	palustrol*	1570	1903	-	0,3	0,5	-	20,0	1,5
154	espatulenol*	1582	2095	15,0	8,0	19,2	0,9	8,5	10,2
155	(óxido de cariofileno + globulol)*	1585	1952, 2050	16,8	4,0	4,1	0,2	7,1	4,3
156	viridiflorol	1592	2059	0,7	-	-	-	0,5	0,4
157	ledol*	1606	2001	-	1,1	0,6	-	2,3	1,2
158	tetradecanal*	1609	1913	-	-	-	-	1,3	0,6
159	aristol-9-en-3-ol	1612	-	-	-	-	-	-	0,3
160	óxido de humuleno II*	1614	2007	3,0	1,1	4,4	-	-	-
161	junenol	1618	-	-	-	-	-	0,4	0,3
162	murolo-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	1622	-	-	-	0,4	-	-	-
163	$\alpha$ -corocaleno	1623	-	-	-	-	-	0,4	0,3
164	1,10-diepi-cubenol	1629	2040	-	1,2	-	-	0,6	0,3
165	1-epi-cubenol	1633	2116	-	-	0,9	-	-	0,7
166	iso-espatulenol*	1641	-	-	-	1,9	-	0,8	-
167	$\zeta$ -murolo*	1645	-	tr	3,6	1,1	-	1,4	-
168	$\alpha$ -murolo	1648	-	-	1,3	-	0,3	0,6	0,7
169	$\zeta$ -cadinol*	1655	2143	-	-	1,3	0,1	1,7	1,2
170	óxido de allo-aromadendreno	1658	-	-	-	-	-	0,6	-
171	$\alpha$ -cadinol*	1659	-	-	4,6	2,0	-	-	-
172	14-hidroxi-9-epi-(E)-cariofileno	1663	-	-	-	0,7	-	-	0,3



Tabla 4, continuación

173	eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol*	1667	-	-	1,0	1,1	-	-	0,4
174	óxido de aromadendreno*	1674	-	-	-	1,4	-	1,2	-
175	cadaleno	1676	2188	-	-	0,9	-	0,4	0,5
176	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol*	1690	1771	-	-	1,3	-	0,6	1,3
177	14-hidroxi-α-humuleno	1715	-	-	-	0,8	-	-	0,3
178	longifolol	1718	-	-	-	0,3	-	-	-
179	isobiciclo-germacrenal	1735	-	-	-	-	-	0,4	0,2
180	sulfuro de menta	1737	-	-	0,6	-	-	-	-
181	oplopanona	1742	-	-	-	0,5	-	-	0,07
182	xantorrizol	1753	-	-	-	0,3	-	-	-
183	escumulosona	1766	-	-	-	-	-	-	0,2
184	14-hidroxi-α-muroleno	1780	-	-	-	0,2	-	-	-
185	14-hidroxi-δ-cadineno	1808	-	-	-	0,2	-	-	-
186	neofitadieno*	1849	-	-	-	1,0	-	2,6	-
187	hexahidro-farnesilacetona	1853	-	-	-	0,3	-	0,2	0,2
188	5,9-(E,E)-farnesilacetona	1925	-	-	-	0,2	-	-	0,2
189	ácido hexadecanoico (palmítico)	1969	2829	-	-	0,6	-	0,5	-
<b>Total identificado (%)</b>				<b>91,4</b>	<b>88,4</b>	<b>90,7</b>	<b>99,3</b>	<b>92,9</b>	<b>95,4</b>
<b>Hidrocarburos monoterpénicos (%)</b>				11,2	22,0	4,0	84,0	7,3	36,8
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>				8,8	0,3	2,3	7,2	3,9	4,4
<b>Hidrocarburos sesquiterpenos (%)</b>				35,5	38,6	36,7	6,5	28,9	28,4
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>				35,5	26,4	43,9	1,5	47,2	24,4
<b>Otros (%)</b>				0,4	1,1	3,9	0,1	5,6	1,4
<b>No identificado (%)</b>				8,6	11,6	9,3	0,7	7,1	4,6

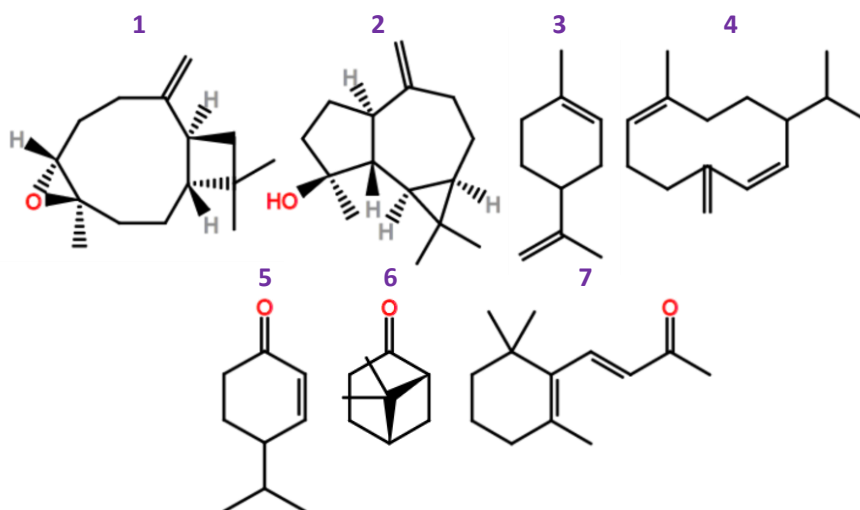
**Tabla 4:** Composición cualitativa y cuantitativa de las 6 especies de *Baccharis* spp. nativas de Brasil (Río Grande do Sul, São Francisco de Paula) estudiadas (Colecta No. 1). Referencias:(Bdt): *B. dentata*;(Bmd): *B. microdonta*; (Bmf): *B. milleflora*;(Btd): *B. tridentata*; (Btm1): *B. trimera*; (Bun): *B. uncinella*.

<sup>a)</sup> Los componentes son listados de acuerdo a su índice de retención en *HP-5MS*; <sup>b)</sup> Proporciones relativas de los compuestos volátiles expresadas como porcentaje de áreas relativas en *HP-5MS*. Los factores de respuesta para cada compuesto se consideraron como iguales. Promedio de dos réplicas analíticas; <sup>c)</sup> La identificación de los picos se realizó por comparación de los valores experimentales de índices de retención lineales en dos columnas: *HP5-MS (LRI 1)* y *DB-Wax (LRI 2)*, con los valores reportados en la literatura para compuestos puros (Davies, 1990; Adams, 2007); y por comparación de espectros de masa con los respectivos almacenados en bases de datos (McLafferty y Stauffer, 1994; NIST, 1999; Adams, 2007). (d): perfil obtenido por destilación por arrastre con vapor (hidrodestilación); (-) no detectado; (tr): trazas (menor a 0,01%). Se destacan en verde los compuestos mayoritarios de cada uno de los extractos volátiles y en azul la fracción mayoritaria. Los compuestos marcados con (\*) fueron empleados para el análisis estadístico multivariable que se describe en la siguiente sección.

***B. dentata*.** La composición volátil de *B. dentata* (colecta de verano) demostró abundancia en sesquiterpenos oxigenados, principalmente óxido de cariofileno (**1**; 16,8%) y espatulenol (**2**, 15,0%) junto con los hidrocarburos limoneno (**3**, 7,0%) y germacreno D (**4**, 6,8%) (Tabla 4 y Figura 20).



La riqueza de óxido de cariofileno en el volatilo de ésta especie podría ser de interés para posibles aplicaciones farmacológicas, dado que el mismo se ha reportado como analgésico y anti-inflamatorio (Chavan *et al.*, 2010). Por otra parte, el espatulenol ha demostrado ser promisorio como agente quimioterapéutico (Martins *et al.*, 2010; Ziaei *et al.*, 2011). Como compuestos minoritarios, determinados únicamente en ésta especie para ésta colecta, fueron identificadas la criptona (5, 0,1%) y la nopinona (6, 0,3%), dos cetonas derivadas de monoterpenos pero con 9 carbonos, las que son abundantes en aceites esenciales de *Eucalyptus calmadulensis* (Myrtaceae) (Pappas y Sheppard-Hanger, 2000), pero poco comunes en *Baccharis* spp. Otra cetona particular de ésta especie fue el C13-norisoprenoide (*E*)- $\beta$ -ionona (7, 0,4%) (Tabla 4 y Figura 20).



**Figura 20:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis dentata*. (1) óxido de cariofileno, (2) espatulenol, (3) limoneno, (4) germacreno D, (5) criptona, (6) nopinona, (7) y (*E*)- $\beta$ -ionona.

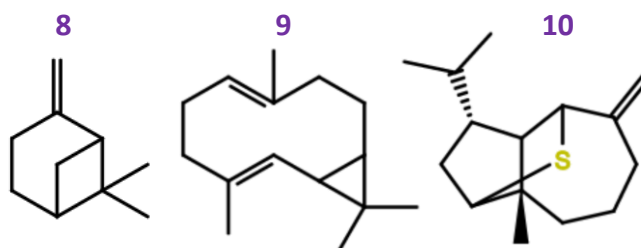
Anteriormente, un reporte de Xavier *et al.* (2011) demostró una variación importante en la composición del aceite esencial de ésta especie dependiendo de la temporada de colecta del material vegetal. Por ejemplo, en otoño la composición mayoritaria determinada por éstos autores fue: mirtenol (9,8%), (*E*)-pinocarveol (9,5%), óxido de cariofileno (7,7%) y espatulenol (6,8%); mientras que en invierno se determinaron como componentes mayoritarios al (*E*)- $\beta$ -cariofileno (15,3%), germacreno D (14,9%), espatulenol (10,7%) y óxido de cariofileno (10,5%) (Xavier *et al.*, 2011). Es de destacar que en dicho trabajo se realizó la colecta de material vegetal en el mismo lugar que el presente estudio, por lo que los resultados son directamente comparables al tratarse de la misma población de *B. dentata* (aunque a un nivel limitado, ya que no se trata del mismo año de colecta).



Los resultados anteriores demuestran la importancia de evaluar la composición en diferentes épocas del año debido a las variaciones estacionales propias de las especies, por ejemplo, debido a la alternancia intrínseca del ciclo reproductivo (floración) (Figueiredo *et al.*, 2008).

***B. microdonta***. En la composición volátil de *B. microdonta* (colecta de otoño), se constató un perfil dominado por la presencia de limoneno (**3**, 10,1%), espatulenol (**2**, 8,0%),  $\beta$ -pineno (**8**; 7,6%) y biciclogermacreno (**9**, 6,4%) (Tabla 4 y Figura 21).

El contenido de limoneno en ésta especie podría constituir un potencial para aplicaciones farmacológicas, ya que dicho compuesto ha sido reportado como responsable de la regresión de los carcinomas mamarios (Haag *et al.*, 1992). Si bien se encontró en un bajo porcentaje (0,6%), el compuesto azufrado sesquiterpénico sulfuro de menta (**10**) (Takahashi *et al.*, 1981; Figura 21) se determinó únicamente en el volatilo de ésta especie. Existen reportes que detallan que dicho compuesto se forma a partir del germacreno D en las hojas de menta (*Mentha* spp., Lamiaceae) cuando las mismas son fertilizadas con azufre elemental (Brown *et al.*, 2003). De acuerdo a ello, la presencia de tal compuesto podría indicar una abundancia de azufre en el terreno en que se realizó la colecta.



**Figura 21:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis microdonta*. (**8**)  $\beta$ -pineno, (**9**) biciclogermacreno y (**10**) sulfuro de menta.

Existen tres estudios en la literatura que reportan sobre la composición volátil de poblaciones silvestres de *B. microdonta*, todos provenientes de Brasil (Lago *et al.*, 2008b; Sayuri *et al.*, 2010; Budel *et al.*, 2018b).

Lago *et al.*, (2008b) determinaron una composición del aceite esencial de partes aéreas de *B. microdonta* con los siguientes componentes mayoritarios: óxido de cariofileno (24,1%),  $\alpha$ -cadinol (8,4%),  $\alpha$ -pineno (8,1%), viridiflorol (7,7%) y *epi*- $\alpha$ -murolol (5,8%).



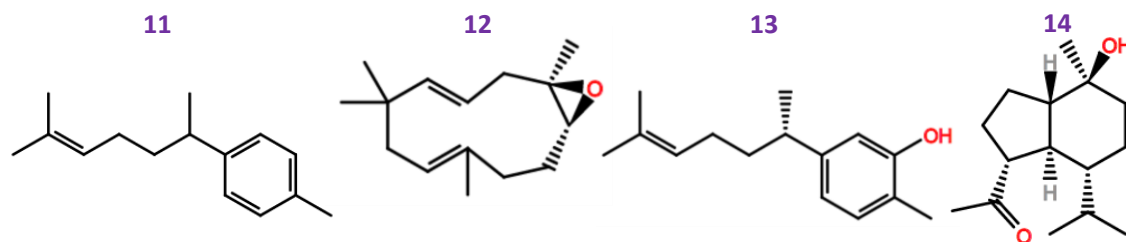


Por su parte, Sayuri *et al.* (2010) en el mismo sitio de colecta del trabajo anterior (campos de altura del estado de São Paulo, Brasil) evidenciaron una clara variación estacional de la composición volátil de ésta especie, con importante concentración de los sesquiterpenos elemol (11,7 a 30,6%), germacreno D (2,9% a 12,2%),  $\alpha$ -cadinol (trazas a 12,1%) y espatulenol (4,7% a 9,1%). En tanto, en un estudio reciente Budel *et al.* (2018b) informaron que el aceite esencial de especímenes colectados en el estado de Paraná (Brasil) se encuentra compuesto por una alta concentración de los sesquiterpenos oxigenados espatulenol (22,7 a 24,2%), kongol (20,1 a 22,2%) y óxido de cariofileno (6,8 a 7,5%).

Dichos resultados de literatura demuestran una expresión metabólica diferencial a la que se obtuvo en éste trabajo para la misma especie, lo que puede estar relacionado a las diferentes condiciones ambientales de los sitios de colecta, así como a la posible existencia de quimiotipos o “razas químicas” (Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

***B. milleflora.*** Para el caso de *B. milleflora* (colecta de primavera), los principales compuestos determinados en éste trabajo fueron los sesquiterpenos espatulenol (**2**; 19,2%), *ar*-curcumeno (**11**; 8,0%), biciclogermacreno (**9**; 4,4%) y epóxido de humuleno II (**12**; 4,4%) (Tabla 4 y Figura 22).

El elevado porcentaje de espatulenol es fundamental para proponer estrategias de aprovechamiento de éste recurso vegetal, ya que dicho compuesto se ha sugerido como un candidato para ser usado (en combinación con quimioterapia) para el tratamiento de enfermedades resistentes a múltiples drogas (Martins *et al.*, 2010), así como es importante su actividad inmunomoduladora (Ziaei *et al.*, 2011). Solamente en ésta especie se detectó la presencia del alcohol sesquiterpénico xantorrizol (**13**, 0,3%; Figura 22), el que deriva de la oxidación del *ar*-curcumeno (Hwang *et al.*, 2000). Se ha determinado que dicho compuesto tiene importante actividad antibacteriana y se encuentra presente normalmente en las raíces de *Curcuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae) (Hwang *et al.*, 2000). Otro componente poco común identificado en el volatilo de *B. milleflora* fue la cetona oplopanona (**14**, 0,5%; Figura 22).



**Figura 22:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis milleflora*. (11) ar-curcumemo, (12) epóxido de humuleno II, (13) xantorizol y (14) oplopanona.

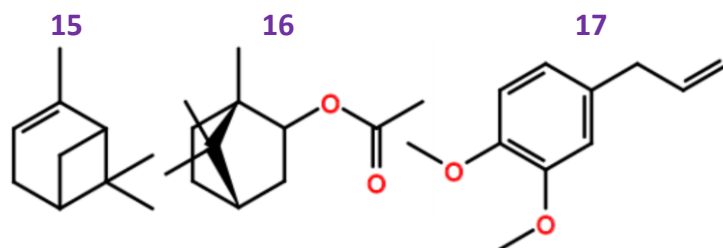
Existen varios reportes en la literatura referidos a la composición volátil de *B. milleflora*, principalmente porque se trata de una planta considerada medicinal en el sur de Brasil (Pereira *et al.*, 2017). Los resultados determinados en el presente trabajo son muy diferentes a los resultados previamente publicados (Agostini *et al.*, 2005; Simões Pires *et al.*, 2005a; Besten *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2017; Trombin-Souza *et al.*, 2017). Por ejemplo, en el estudio de Agostini *et al.* (2005) (realizado con material vegetal colectado en el mismo lugar y en la misma estación que el presente trabajo) se encuentra desde ausencia de  $\beta$ -pineno hasta presencia del mismo en un 34,2%; mientras que en éste trabajo el mismo fue determinado en un 0,3% (Tabla 4). Los autores atribuyeron dicha variación a la posible existencia de varios quimiotipos en el mismo sitio de colecta (Agostini *et al.*, 2005). Sin embargo, Besten *et al.* (2014) demostraron que dichas variaciones extremas se deben a las diferencias sexuales y a la diferente expresión metabólica de los órganos vegetales. A modo de ejemplo, los compuestos mayoritarios en el aceite de cladodios (tallos) de los especímenes hembras fueron: espatulenol (11,7%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (11,4%) y germacreno D (7,7%); mientras que en los especímenes masculinos lo fueron el viridiflorol (33,2%), germacreno D (10,8%) y  $\alpha$ -selineno (8,0%) (Besten *et al.*, 2014). Adicionalmente, los autores demostraron que colectando el material vegetal en floración en diferentes estadios de desarrollo, también se obtiene una composición diferencial en el volatilo (Besten *et al.*, 2014).

Todo lo anterior realza la importancia en un adecuado muestreo del material vegetal a evaluar, teniendo en cuenta el dioicismo propio del género *Baccharis* L., lo que será abordado más adelante en éste capítulo y en el capítulo 5.

***B. tridentata*.** En el volatilo de *B. tridentata* (colecta de primavera) los componentes principales determinados fueron los monoterpenos  $\alpha$ -pineno (15; 46,7%), limoneno (3; 14,1%),  $\beta$ -pineno (8; 11,4%) y acetato de bornilo (16, 6,0%) (Tabla 4 y Figura 23).



Debido a la importante contribución del  $\alpha$ -pineno en el perfil volátil de ésta especie, el extracto podría tener potencial anti-inflamatorio como se ha constatado para el compuesto puro (Zhou *et al.*, 2004), por lo que requeriría estudios adicionales para confirmar ésta hipótesis. En ésta colecta, el metileugenol (17, 0,07%) se determinó únicamente para ésta especie, aunque el mismo es un componente bastante común en los aceites esenciales (Adams, 2007).



**Figura 23:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis tridentata*. (15)  $\alpha$ -pineno, (16) acetato de bornilo y (17) metileugenol.

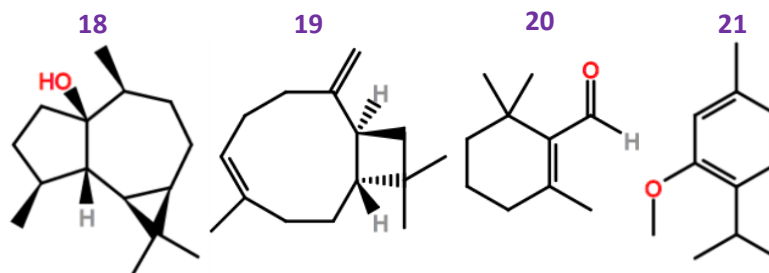
Los resultados de composición presentados en éste trabajo difieren apreciablemente de los datos que se encuentran disponibles en la literatura, sugiriendo que *B. tridentata* pueda tener una amplia plasticidad e influencia de las condiciones ambientales sobre el volatilo, posiblemente con la existencia de quimiotipos (Ferracini *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2011). Ferracini *et al.* (1995), trabajando con material vegetal nativo de Minas Gerais (Brasil), describieron un aceite esencial con alta proporción de sesquiterpenos: espatulenol (21,2%),  $\delta$ -cadineno (7,7%) y globulol (5,9%); y prácticamente ausencia de hidrocarburos monoterpénicos. Por su parte, Souza *et al.* (2011), en un estudio conducido en la misma región que el anterior, publicaron una composición de *B. tridentata* con un alto contenido en hidrocarburos monoterpénicos como el  $\alpha$ -tuyeno (22,9%),  $\beta$ -pineno (20,3%) y  $\beta$ -felandreno (16,2%).

Como en el caso de *B. milleflora*, no se puede descartar la influencia del sexo en la composición volátil. Dicho aspecto será abordado en el capítulo 5 de ésta tesis.

***B. trimera.*** Para el caso de *B. trimera*, los principales compuestos determinados en ésta colecta (primavera) fueron los sesquiterpenos palustrol (18; 20,0%), espatulenol (2; 8,5%), óxido de cariofileno (1; 7,1%) y (*E*)- $\beta$ -cariofileno (19; 4,1%) (Tabla 4 y Figura 24).



El palustrol es un alcohol sesquiterpénico que no ha sido objeto de estudios farmacológicos, por lo que la población de *B. trimera* analizada podría constituir una fuente de dicho compuesto para su investigación. Únicamente en el volatilo de ésta especie fue determinado el C<sub>9</sub> norisoprenoide β-ciclocitral (**20**, 0,07%) y el éter fenólico timol metil éter (**21**, 0,05%) (Figura 24).



**Figura 24:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis trimera* (Colecta No. 1). (**18**) palustrol, (**19**) (E)-β-cariofileno, (**20**) β-ciclocitral y (**21**) timol metil éter.

Debido a la importancia económica del aceite esencial de ésta especie, existen varios reportes de composición de la misma en sus diferentes lugares de ocurrencia. Respecto de los mismos, existen básicamente dos grupos:

1) aquellos que citan la presencia del monoterpeno irregular acetato de carquejilo en su composición (Naves 1959a y 1959b; Bauer *et al.*, 1978; Chialva y Doglia, 1990; Simões-Pires *et al.*, 2005a; Vargas *et al.*, 2006; Alves, 2010; Besten *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2016; Trombin-Souza *et al.*, 2017; Tomazoni *et al.*, 2018)

y 2) los que no (Silva *et al.*, 2006 y 2007; Lago *et al.*, 2008a y 2008b; Nunes de Oliveira *et al.*, 2012; García *et al.*, 2017; Silveira, 2018).

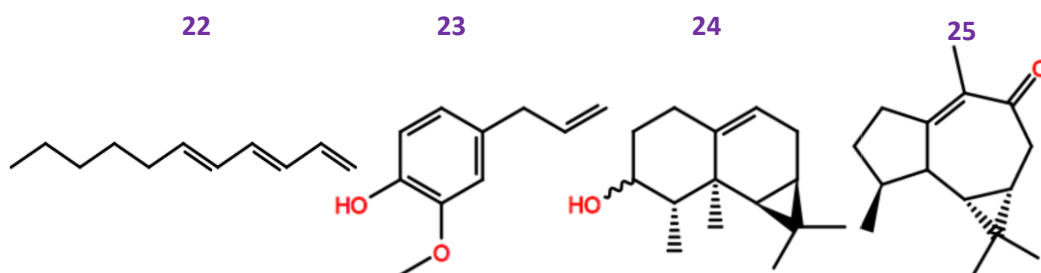
De acuerdo a los resultados presentados sobre ésta colecta, la población brasileña de *B. trimera* analizada pertenecería al segundo grupo (Tabla 4). En el trabajo de Simões-Pires *et al.* (2005a), se menciona que el acetato de carquejilo podría ser considerado un quimiomarcador para *B. trimera*, pero los resultados encontrados invalidan dicha hipótesis, ya que fue determinada la presencia de dicho componente en el extracto volátil de *B. milleflora* pero no en el de *B. trimera* (Tabla 4). Asimismo, como fuera expuesto con anterioridad en el capítulo 3, dicho componente también fue determinado en el extracto obtenido por SFE de *B. uncinella* (SFER, capítulo 3). Otros autores también han invalidado la hipótesis de Simões-Pires *et al.* analizando material vegetal



de *B. trimera* de diferentes localidades (Silva *et al.*, 2007; Lago *et al.*, 2008a y b; García *et al.*, 2017).

Adicionalmente, el acetato de carquejilo ha sido identificado previanteriormente en el aceite esencial de *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae) (Lorenzo *et al.*, 2005) y de *Phoebe porosa* (Lauraceae) (Weyerstahl *et al.*, 1994); por lo que de ninguna manera puede ser considerado quimiomarcador exclusivo de *B. trimera*. Más adelante en ésta tesis se realizarán otras consideraciones sobre ésta temática (capítulo 7).

***B. uncinella***. Finalmente, como resultado del análisis del extracto volátil de *B. uncinella*, se determinaron los siguientes compuestos principales:  $\alpha$ -pineno (**15**; 11,7%), espatulenol (**2**, 10,2%), limoneno (**3**; 8,6%) y  $\beta$ -pineno (**8**; 7,6%) (Tabla 4). Como compuestos minoritarios característicos de ésta especie se detectaron el C<sub>11</sub> derivado monoterpénico (*E,E*)-1,3,5-undecatrieno (**22**, 0,09%), eugenol (**23**, 0,1%), aristol-9-en-3-ol (**24**, 0,3%) y las cetonas oplopanona (**14**, 0,07%) y escuamulosa (**25**, 0,2%) (Tabla 4 y Figura 25).



**Figura 25:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis uncinella*. (**22**) (*E,E*)-1,3,5-undecatrieno, (**23**) eugenol, (**24**) aristol-9-en-3-ol y (**25**) escuamulosa.

Se ha reportado una importante regularidad en la composición volátil de *B. uncinella* obtenida de material vegetal nativo de diferentes estados de Brasil: Rio Grande do Sul (Frizzo *et al.*, 2001; Agostini *et al.*, 2005; Frizzo *et al.*, 2008; Xavier, 2011; Xavier *et al.*, 2011), Santa Catarina (Vannini *et al.*, 2012; Ascari *et al.*, 2012) y Paraná (Fabiane *et al.*, 2008; Ascari *et al.*, 2012; Trombin-Souza *et al.*, 2017). Por ejemplo, semejante a éste trabajo, en la descripción original de la composición del aceite, se determinó la presencia de  $\alpha$ -pineno (16,1%),  $\beta$ -pineno (15,5%), limoneno (13,1%) y espatulenol (9,8%) (Frizzo *et al.*, 2001). Variaciones de poca importancia podrían deberse a



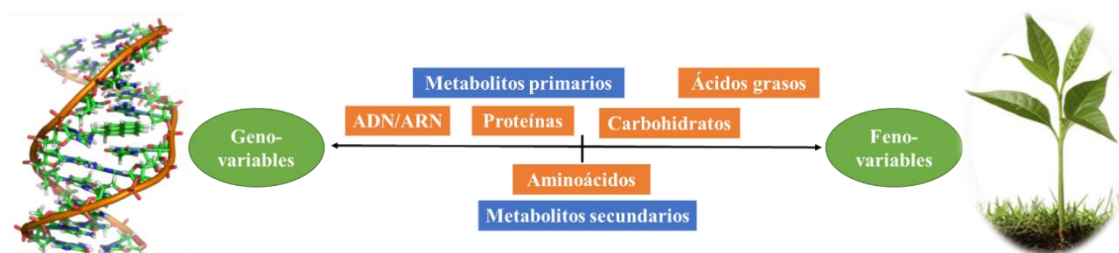
variaciones propias de la estacionalidad, como lo corroboraron Xavier *et al.* (2011) colectando material vegetal en otoño e invierno.

Sin embargo, muestras del estado brasileño de São Paulo han demostrado una composición diferente a las anteriores, con los compuestos mayoritarios  $\alpha$ -pineno (13,6%),  $\delta$ -cadineno (13,2%), guaiol (11,4%) y cubenol (8,3%) (Lago *et al.*, 2008b); siendo éstos últimos tres componentes muy minoritarios en las restantes muestras reportadas en la literatura. Dicha diferencia podría deberse a la incidencia directa de las variables ambientales sobre el metabolismo secundario, o bien, debido a la existencia de quimiotipos (Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

### 3.2 Tratamiento quimiotaxonómico

Los tratamientos quimiotaxonómicos a través de estadística multivariable son frecuentes en la literatura especializada para diferenciar tribus (Alvarenga *et al.*, 2001), familias, (Wolff *et al.*, 1997), géneros (Wolff *et al.*, 1997), especies (Kapetanos *et al.*, 2008), quimiotipos (Elechosa *et al.*, 2017) y cultivares (Biolley *et al.*, 1992) de una misma especie. Según la definición de Vogt (1987), los métodos multivariados son herramientas para reconocer patrones y establecer la conexión entre geno-variables (genética y metabolismo primario) y feno-variables (metabolismo secundario, ecología y ambiente) (Figura 26).

En la clasificación quimiotaxonómica, se suele diferenciar entre biomoléculas episemánticas y semánticas, siendo las primeras aquellas que brindan poca información sobre el organismo que la generó (ejemplo de los ácidos grasos cuya presencia en los seres vivos es ubicua), y las segundas las que brindan un gran volumen de datos (como las proteínas y metabolitos secundarios) (Vogt, 1987).



**Figura 26:** Relación entre expresión química y geno y feno-variables. Según éste modelo, estudiando la expresión metabólica secundaria a través de métodos multivariados, se puede establecer la conexión



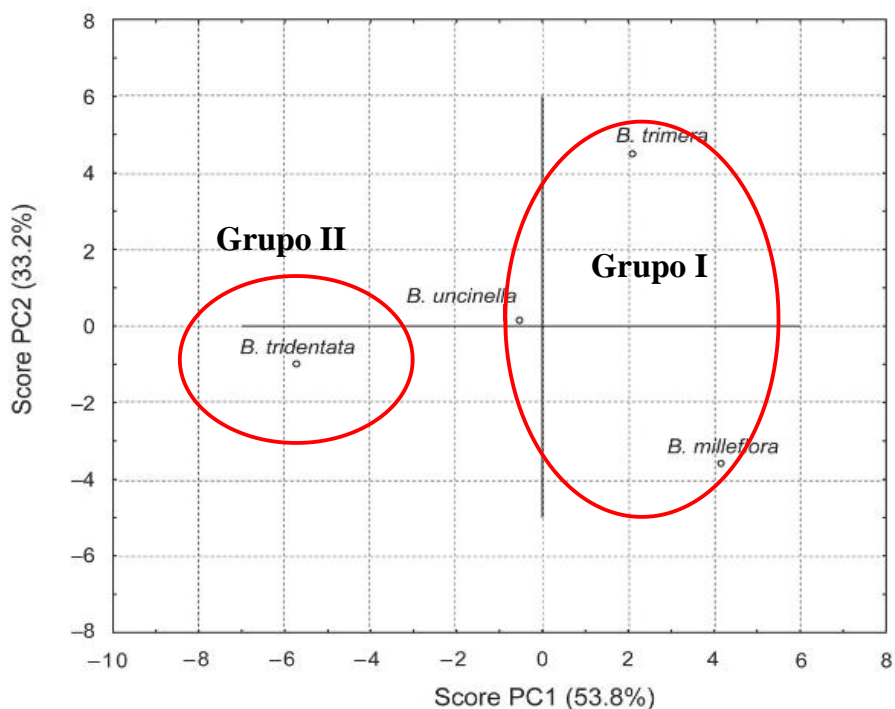
entre genotipo y fenotipo mejor que con cualquier otro tipo de metabolitos (salvo aminoácidos). Fuente: Vogt (1987).

El mayor desafío que se enfrenta al emplear un enfoque quimiotaconómico es obtener una adecuada base de datos de metabolitos secundarios (con el apropiado tamaño y calidad de los datos) para una correcta clasificación (Alvarenga *et al.*, 2001). Con anterioridad, ya se han empleado para el género *Baccharis* L. éste tipo de herramientas en el estudio del metabolismo volátil (Frizzo *et al.*, 2008; Besten *et al.*, 2012; Besten *et al.*, 2013; Chaves *et al.*, 2014; Trombin-Souza *et al.*, 2017) y no volátil (Lonni *et al.*, 2003; Lonni *et al.*, 2005).

Con el objetivo doble de evaluar en qué forma los componentes del volatilo de *Baccharis* spp. podrían aportar a la discriminación taxonómica de las especies (quimiotaconomía), y de identificar compuestos marcadores para tal agrupamiento; se realizó un análisis estadístico multivariable tomando las especies de la Colecta No. 1 colectadas, extraídas y analizadas en igualdad de condiciones. Asimismo, otro criterio empleado fue que el porcentaje de identificación del volatilo fuese mayor al 90%. De ésta manera, 4 especies fueron seleccionadas como caso de estudio: *B. milleflora*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella*.

En la Figura 27 se representa el análisis por PCA para las 4 especies analizadas, en donde puede verse que el plano que conforman las variables latentes *PC1* y *PC2* explican el 87% de la varianza original (suma de *PC1* y *PC2*). De acuerdo a ello, se discriminaron dos grupos:

- el primero, comprendió a las especies *B. trimera*, *B. milleflora* y *B. uncinella*, y se caracterizó por un alto contenido en sesquiterpenos, principalmente espatulenol;
- el segundo sólo incluyó a *B. tridentata*, caracterizándose por una alta proporción de  $\alpha$ - y  $\beta$ -pinenos, (*E*)- $\beta$ -ocimeno y limoneno.



**Figura 27:** Análisis por PCA aplicado al volatiloma de *B. milleflora*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella*.

Sobreponiendo la información obtenida de agrupamientos por PCA con los vectores correspondientes a cada uno de los analitos empleados (información original), se pudo evaluar cuáles componentes fueron responsables de tal patrón de distribución (Figura 28).

Es así que la posición en el plano *PC1/PC2* de *B. trimera* (cuadrante superior derecho) se debe a la influencia de compuestos sesquiterpénicos como el palustrol, ledol, (*E*)- $\beta$ -cariofileno, óxido de cariofileno,  $\zeta$ -cadinol,  $\delta$ -cadineno, entre otros.

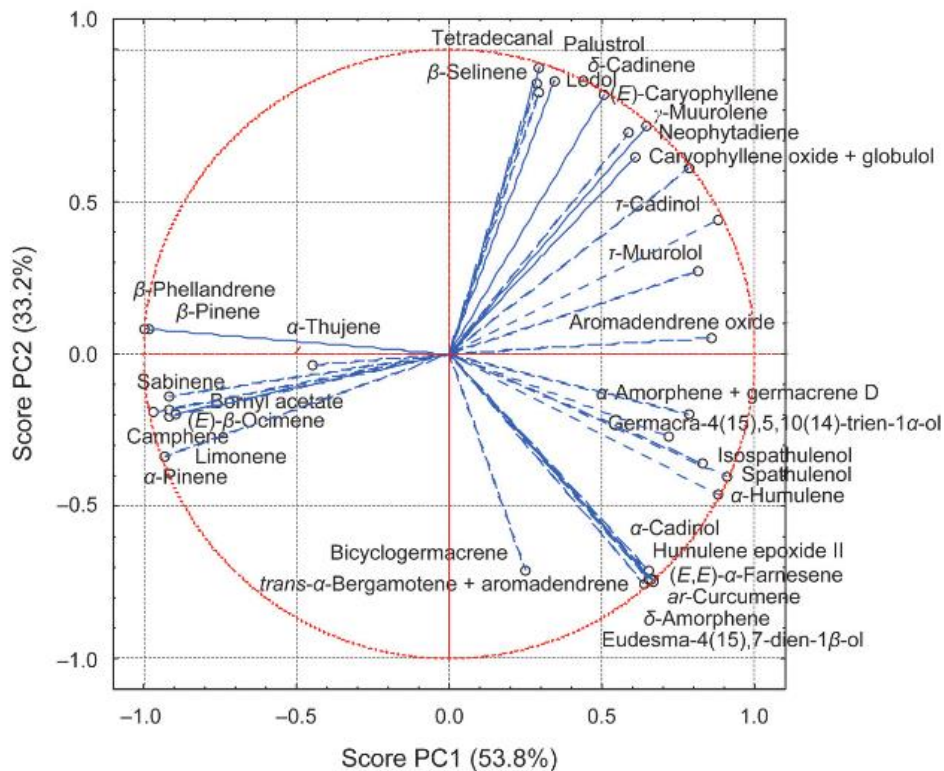
Por otra parte, *B. milleflora* se posiciona en el cuadrante inferior derecho del plano *PC1/PC2* por la influencia de otro tipo de sesquiterpenos como espatulenol e *iso*-espatulenol,  $\alpha$ -humuleno, epóxido de humuleno,  $\alpha$ -cadinol, (*E,E*)- $\alpha$ -farneseno, *ar*-curcumeno,  $\delta$ -amorfenol, entre otros.

Los monoterpenos influyeron decisivamente en la clasificación de *B. tridentata* (cuadrante inferior izquierdo), principalmente sabineno,  $\alpha$ - y  $\beta$ -pinenos,  $\beta$ -felandreno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, limoneno, canfeno y acetato de bornilo.



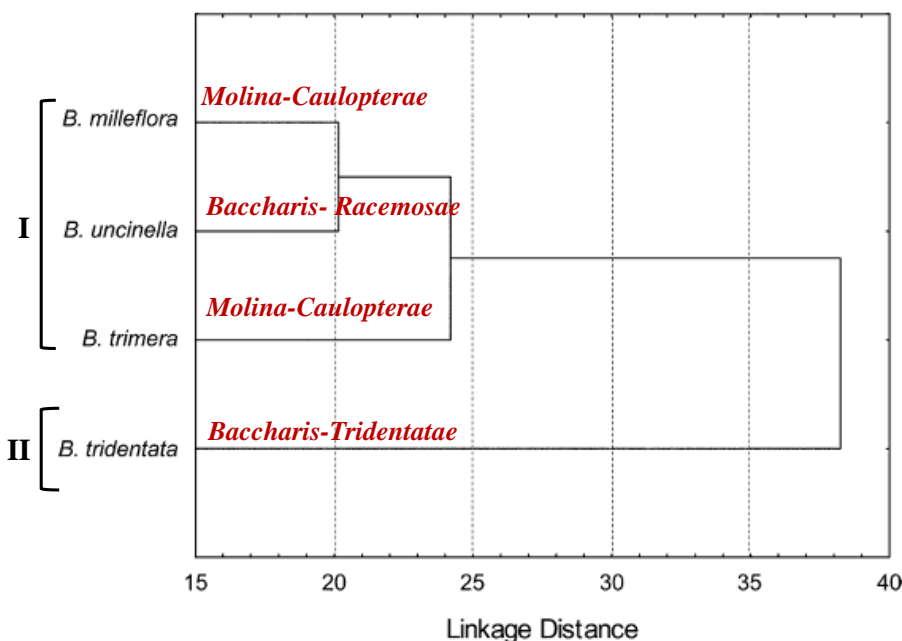


Por último, la posición de *B. uncinella* (cuadrante superior izquierdo) parece ser influenciada mayormente por la composición en  $\alpha$ -tuyeno (Figura 28).



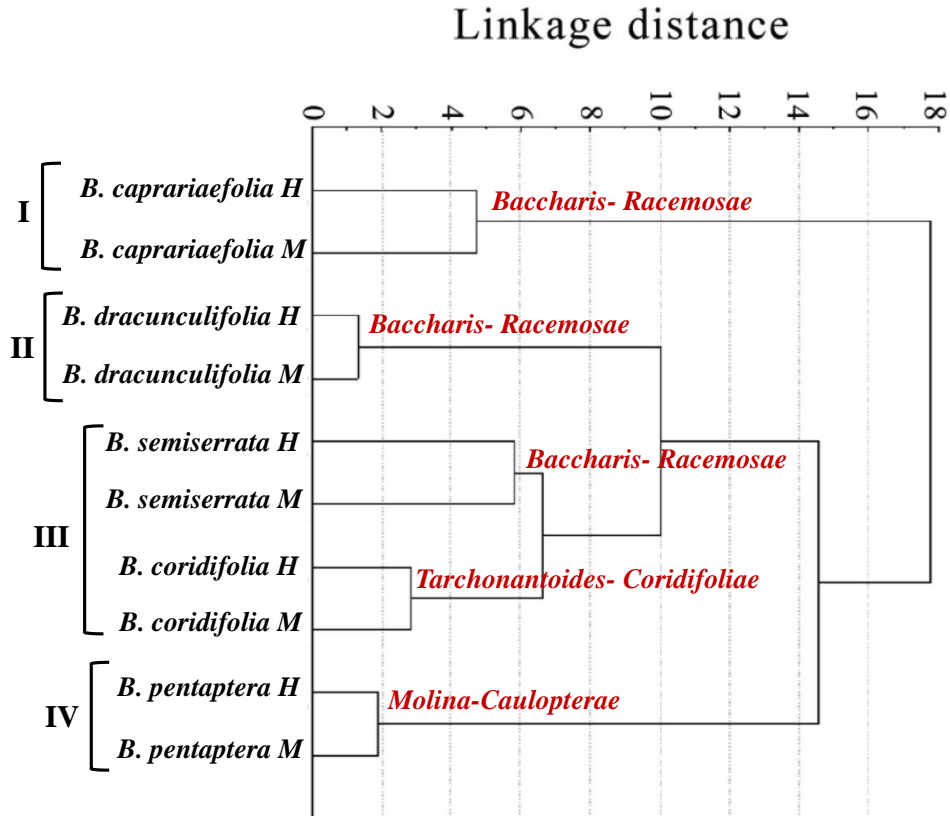
**Figura 28:** Análisis por PCA para *B. milleflora*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella* junto a la influencia de los vectores de cada uno de los componentes empleados para el análisis.

Finalmente, se obtuvo el dendrograma de las especies por análisis de *HCA* (Figura 29). De ésta forma, se pudieron observar los mismos dos agrupamientos obtenidos en el análisis por *PCA*: uno compuesto solamente por *B. tridentata* (debido a su mayor contenido en monoterpenos), y otro conteniendo las restantes especies (con volatíomas rico en sesquiterpenos) (Figura 29). Dentro de éste último agrupamiento, se encontró mayor grado de similitud entre las “ramas” (unidades taxonómicas operacionales, *OTUs*) de *B. milleflora* y *B. uncinella*, que entre las de *B. milleflora* y *B. trimera* (donde ambas pertenecen a la misma sección infragenérica, *Caulopterae*).



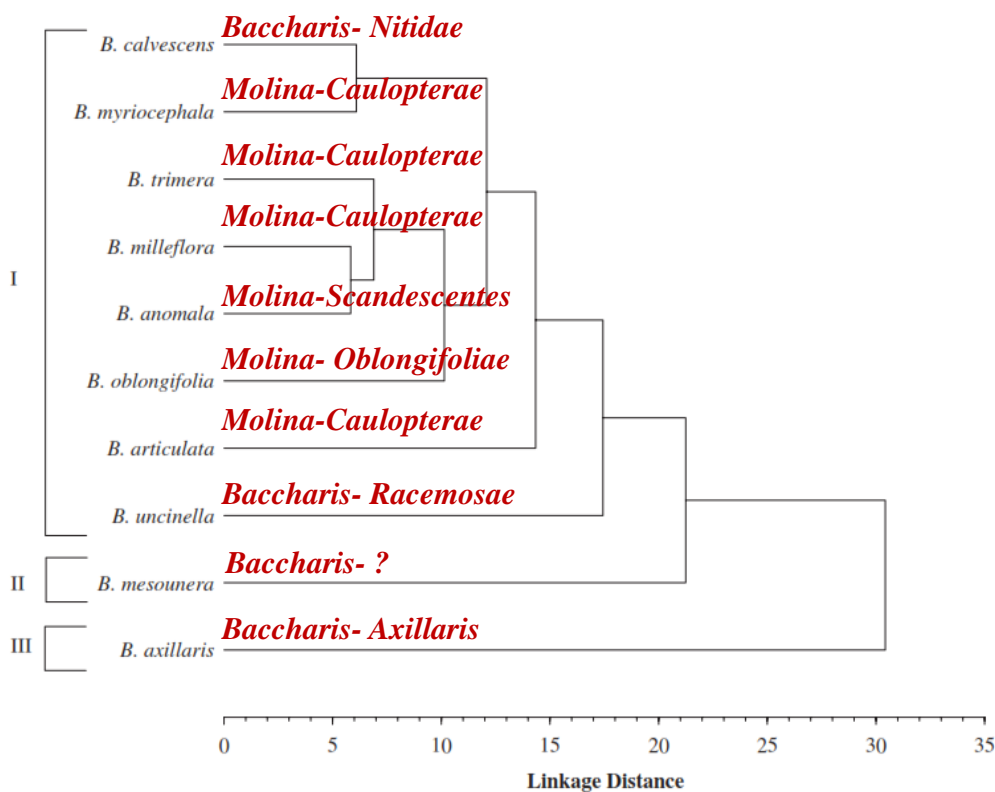
**Figura 29:** Dendrograma obtenido por análisis mediante HCA para las especies indicadas y clasificación infragenérica (formato: Subgénero-Sección) planteada por Giuliano (Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011), y corregida por Heiden y Pirani (2016 a y b).

Es preciso establecer que cuando se realizan éste tipo de análisis quimiotaconómicos no siempre el resultado del mismo se corresponde fielmente con la agrupación taxonómica morfológica, como se desprende del trabajo de Besten *et al.* (2012). Semejante al presente estudio, dichos autores trabajaron sobre los aceites esenciales de 5 especies de *Baccharis* L. (individuos masculinos y femeninos), realizando la identificación de los compuestos por *GC-MS* y el tratamiento quimiotaconómico por *HCA* (Besten *et al.*, 2012). De ésta forma, obtuvieron 4 agrupamientos que no correspondieron a la clasificación taxonómica en subgéneros y secciones, pero es importante destacar que la colecta del material vegetal no fue realizada en igualdad de condiciones ambientales y temporales (Figura 30) (Besten *et al.*, 2012). Debido a ello, su valor como elemento de evaluación de las geno-variables es limitado.



**Figura 30:** Dendrograma obtenido por análisis mediante HCA para las especies indicadas realizado por Besten et al. (2012). La clasificación infragenérica (formato: Subgénero-Sección) es la establecida por Giuliano (Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011), y corregida por Heiden y Pirani (2016 a y b). M hace referencia a individuos masculinos y H a femeninos.

Un muestreo más cuidadoso que el anterior fue realizado por Trombin-Souza *et al.* (2017) en un estudio en el que se analizaron los aceites esenciales de 10 especies de *Baccharis* L. colectadas bajo las mismas condiciones ambientales y temporales. Como en el presente estudio, se realizó una clasificación quimiotaconómica por PCA y HCA que resultó en el dendrograma que se muestra en la Figura 31 (Trombin-Souza *et al.*, 2017). De acuerdo a ello, se puede visualizar una mayor proximidad entre las “ramas” (OTUs) de *B. milleflora* con *B. anomala* (que pertenece a la Sección Scandentes dentro del subgénero Molina) que con *B. trimera*, aspecto muy similar a lo presentado para el presente estudio (Figuras 29 y 31).



**Figura 31:** Dendrograma obtenido mediante análisis por HCA para las especies indicadas realizado por Trombin-Souza et al. (2017). La clasificación infragenérica (formato: Subgénero-Sección) es la establecida por Giuliano (Giuliano, 2001; Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011), y corregida por Heiden y Pirani (2016 a y b).

Es pertinente destacar que en ambos reportes (Besten et al., 2012; Trombin-Souza et al., 2017) con los que se comparó el tratamiento quimiotaxonómico con el presente trabajo, se utilizaron como casos de estudio todas las especies informadas (independientemente de su porcentaje de identificación, habiendo varias con porcentajes menores a 80%), y además se utilizaron todos los compuestos identificados como variables originales independientemente de su proporción. En comparación, en el presente estudio, al exigir restricciones (especies > 90,0% de identificación y variables > 1,0%), se obtuvieron resultados de clasificación más precisos, lo que influyó en que la varianza explicada con las dos primeras variables latentes en el análisis por PCA fuera mayor que en los reportes publicados con anterioridad (Besten et al., 2012; Trombin-Souza et al., 2017).

Como puede verse en las Figuras 29 a 31, en general la formación de agrupamientos por HCA es bastante consistente con la división taxonómica morfológica del género *Baccharis* L. en subgéneros, aunque en todos los casos se presentan clasificaciones



quimiotaxonómicas dudosas. Sin embargo, el tratamiento quimiotaxonómico con metabolitos volátiles no es lo suficientemente consistente con la división en secciones y series infragenéricas, cuyas diferencias morfológicas parecen ser dependientes de la variabilidad ambiental (feno-variables) y no de caracteres genéticos (geno-variables).

En este sentido, para poder obtener conclusiones más generales es necesario una base de datos más amplia, con mayor número de especies de todas las secciones infragenéricas de *Baccharis*. También se deberían tener en cuenta en un análisis más general: las variaciones estacionales, las variaciones sexuales, la hibridación natural y la posible existencia de quimiotipos, aspectos ignorados en el presente tratamiento quimiotaxonómico.

Una dificultad en el uso de éste tipo de herramientas es el hecho de que no sea posible emplear un único lugar y un único momento de muestreo para todas las especies (estricta igualdad de condiciones ambientales), lo que invariablemente determina la influencia del ambiente sobre la clasificación quimiotaxonómica (Vogt, 1987; Alvarenga *et al.*, 2001).

### **3.3 Composición química del volatilo de *Baccharis* spp. (Colecta No. 2)**

En el caso de la Colecta No. 2, el análisis por *GC-MS* sólo se realizó en fase estacionaria poco polar, permitiendo la identificación de 260 compuestos (la gran mayoría terpenos) pertenecientes a 10 *Baccharis* spp. nativas de Uruguay (Tabla 5).



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

#	Compuesto <sup>a)</sup>	LRIe	LRI <sub>t</sub>	Bar <sup>b)</sup>	Bcu	Bge	Bgi	Bgn	Boc	Bpa	Bph	Bpu <sup>d)</sup>	Btm2
1	3-hexanona <sup>c)</sup>	791	784	0,03	-	0,1	-	0,06	-	0,01	-	-	-
2	2-( <i>E</i> )-pentenal	791	787	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-	-
3	2-hexanona	793	788	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-
4	1-metilciclopentanol	794	796	0,2	-	1,5	-	0,7	-	0,1	-	-	-
5	3-hexanol	795	797	0,05	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-
6	2-hexanol	800	796	0,05	-	-	-	0,1	0,09	0,03	-	-	-
7	hexanal	801	801	0,1	0,2	0,6	-	0,4	0,6	-	-	-	tr
8	3-metilciclopentanol	825	836	0,06	0,01	-	-	0,2	0,1	-	-	-	-
9	3-hexen-2-ona	834	834	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
10	2-( <i>E</i> )-hexenal	846	846	0,05	-	-	-	-	-	0,03	0,3	0,02	tr
11	3-( <i>Z</i> )-hexen-1-ol	852	850	0,1	0,06	-	-	-	0,07	-	0,1	-	-
12	2-( <i>E</i> )-hexen-1-ol	863	854	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
13	1-hexanol	879	863	0,04	0,02	-	-	0,06	0,08	-	0,1	-	-
14	2-heptanona	898	889	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-
15	heptanal	903	901	-	0,01	tr	-	0,1	0,03	-	-	-	-
16	2,2-dimetil-tetrahidrofurano	914	908	0,3	0,02	0,3	0,07	0,3	0,5	-	-	-	-
17	triciclono	920	921	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
18	α-tuyeno	924	924	0,07	0,2	-	1,7	-	-	0,01	-	0,3	0,07
19	α-pineno	932	932	4,0	1,1	0,07	4,2	0,05	0,1	0,05	0,4	0,2	0,2
20	α-fencheno	944	945	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	canfeno	946	946	0,08	0,01	-	0,2	-	-	-	0,01	0,3	0,03
22	2-( <i>E</i> )-heptenal	948	947	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
23	benzaldehído	956	952	0,02	-	0,2	-	0,07	-	-	0,01	-	tr
24	sabineno	972	969	-	5,1	tr	2,0	-	-	0,02	1,0	2,2	0,7
25	β-pineno	973	974	25,6	7,3	0,5	2,4	0,3	0,7	0,04	0,2	2,3	2,6



Tabla 5, continuación

26	1-octen-3-ona	977	972	-	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
27	$\alpha$ -metilestireno	982	974	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03
28	( <i>E</i> )- <i>p</i> -mentano	983	973	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	6-metil-5-hepten-2-ona	986	981	0,03	0,01	tr	0,04	-	0,1	-	0,03	-	0,02
30	dehidro-1,8-cineol	988	988	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
31	$\beta$ -mirceno	990	988	0,8	2,6	0,4	3,9	-	0,2	0,2	4,9	0,5	0,3
32	$\alpha$ -felandreno	992	1002	-	0,6	-	0,02	-	-	-	3,4	0,05	0,03
33	octanal	993	998	-	-	-	-	0,3	0,3	-	-	-	0,01
34	2,4-( <i>E,E</i> )-heptadienal	1001	1005	0,05	0,03	-	-	-	0,04	-	0,1	-	-
35	<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno	1002	1003	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	$\alpha$ -terpineno	1006	1014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
37	$\delta$ -3-careno	1009	1008	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
38	$\delta$ -2-careno	1011	1009	-	-	-	0,05	-	-	-	0,04	-	-
39	<i>o</i> -cimeno	1013	1011	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03
40	<i>p</i> -cimeno	1016	1020	0,4	1,8	-	0,1	0,05	0,2	-	0,3	-	0,1
41	4-careno	1017	1011	0,1	0,7	-	-	-	-	-	-	0,2	-
42	$\beta$ -felandreno	1020	1025	-	-	-	-	-	-	-	-	5,2	0,3
43	limoneno	1026	1024	3,3	-	1,3	1,6	0,8	1,8	0,2	20,1	-	1,6
44	silvestreno	1026	1025	-	10,6	-	-	-	-	-	-	-	-
45	1,8-cineol	1032	1026	0,09	-	-	-	0,2	0,2	-	-	-	0,05
46	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1034	1032	-	0,1	-	0,1	0,04	0,02	0,2	-	0,06	0,02
47	$\beta$ -isoforona	1035	1044	-	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
48	fenilacetaldehído	1038	1036	0,05	0,01	0,3	0,03	1,0	0,2	-	0,2	-	-
49	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	1046	1044	0,9	0,8	0,2	3,3	0,04	0,6	8,3	0,7	1,9	0,6
50	2-metil-6-metilen-2-octeno	1051	sd	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-



Tabla 5, continuación

51	$\gamma$ -terpineno	1055	1054	0,3	1,9	-	0,09	0,09	-	-	0,5	0,3	0,07
52	2-( <i>E</i> )-octenal	1056	1049	-	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
53	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1063	1065	0,03	1,1	-	0,07	0,07	0,1	-	-	0,06	0,04
54	( <i>Z</i> )-óxido de linalol (furanóide)	1069	1067	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
55	( <i>E</i> )-óxido de linalol (furanóide)	1091	1084	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
56	terpinoleno	1086	1086	0,3	0,7	-	0,09	-	0,06	-	-	0,2	0,08
57	2-nonanona	1089	1087	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
58	nonanal	1093	1100	0,07	-	0,3	-	1,1	0,7	-	0,1	-	0,05
59	( <i>E</i> )-hidrato de sabineno	1095	1098	-	1,0	-	0,07	0,07	0,1	-	-	0,04	0,03
60	linalol	1100	1095	0,7	0,7	0,2	1,2	0,8	0,3	0,3	2,0	0,05	0,4
61	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	1108	1108	-	-	-	-	-	-	-	tr	-	0,2
62	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	1109	1118	0,1	1,0	-	-	-	-	-	-	0,07	0,09
63	( <i>E</i> )- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1118	1119	-	-	-	-	0,2	0,1	-	0,8	-	-
64	( <i>E</i> )-tuyona	1120	1112	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
65	$\alpha$ -isoforona	1121	1118	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
66	$\alpha$ -canfolenal	1123	1122	0,02	0,2	-	-	0,02	0,1	-	-	-	-
67	<i>allo</i> -ocimeno	1128	1128	-	-	-	0,01	-	-	0,02	-	-	0,03
68	( <i>E</i> )- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	1128	1136	-	0,5	-	-	-	-	-	-	0,06	-
69	( <i>Z</i> )- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1133	1133	-	-	-	-	0,07	-	-	0,6	-	-
70	nopinona	1133	1135	0,2	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
71	( <i>Z</i> )-óxido de limoneno	1134	1132	-	0,03	-	0,04	-	-	-	0,2	-	-
72	( <i>E</i> )-pinocarveol	1134	1135	1,2	0,4	-	-	0,06	0,4	-	-	-	0,3
73	limoneno cetona	1135	1137	-	-	-	-	-	0,02	-	0,06	-	-
74	( <i>E</i> )-óxido de limoneno	1136	1137	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
75	3-( <i>E</i> )-nonen-2-ona	1138	1137	-	-	-	-	-	-	-	0,03	-	-





Tabla 5, continuación

76	(Z)-verbenol	1139	1137	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	(E)-verbenol	1142	1140	0,2	-	-	-	0,02	0,07	-	-	-	-
78	alcanfor	1142	1141	-	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-
79	(E)-óxido de ocimeno	1143	1137	-	-	-	-	-	0,03	0,04	-	-	-
80	4-cetoisoforona	1146	1140	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,5
81	2,6-(E,Z)-nonadienal	1148	1150	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-
82	sabineno cetona	1152	1154	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
83	citronelal	1154	1148	-	-	-	-	-	0,09	-	-	-	-
84	2-(E)-nonenal	1154	1157	-	-	-	-	0,04	-	-	0,1	-	-
85	iso-mentona	1155	1158	-	-	-	-	0,06	-	-	-	-	-
86	amilbenceno	1156	1158	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
87	pinocarvona	1158	1160	0,9	0,2	-	-	0,03	0,2	-	-	-	0,8
88	carquejol	1161	sd	-	-	-	-	0,02	-	-	-	0,03	3,5
89	endo-borneol	1164	1165	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
90	p-menta-1,5-dien-8-ol	1164	1166	0,08	-	-	-	0,05	0,03	-	-	-	-
91	2-(E)-nonenol	1167	1163	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-
92	terpinen-4-ol	1173	1174	0,8	10,1	-	0,4	0,7	1,1	-	-	1,0	0,2
93	p-metilacetofenona	1180	1183	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-	-
94	p-cimen-8-ol	1183	1179	-	-	-	0,03	0,1	0,1	-	-	-	0,8
95	mirtanal	1183	1180	0,02	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-
96	criptona	1184	1183	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
97	α-terpineol	1188	1186	1,2	1,3	-	0,2	0,6	0,5	0,05	0,5	0,1	1,4
98	(E)-p-menta-1(7),8-dien-2-ol	1189	1187	0,03	-	-	-	-	-	-	0,06	-	-
99	safranal	1193	1196	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	0,2
100	mirtenol	1194	1194	0,5	0,3	-	-	-	0,05	-	-	-	-



Tabla 5, continuación

<b>101</b>	mirtenal	1196	1195	1,1	0,5	-	-	0,07	0,3	-	-	-	0,3
<b>102</b>	(Z)-piperitol	1196	1195	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-	-
<b>103</b>	(E)-piperitol	1202	1208	-	0,3	-	-	-	-	-	-	0,03	-
<b>104</b>	2,6-dimetil-3,5-(E,E)-7-octatriene-2-ol	1205	1209	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
<b>105</b>	decanal	1206	1201	0,03	-	0,3	-	2,9	0,1	-	0,06	-	-
<b>106</b>	verbenona	1206	1204	0,09	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>107</b>	2,4-(E,E)-nonadienal	1208	1210	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-
<b>108</b>	(E)-carveol	1217	1215	0,1	0,07	-	-	-	-	-	1,1	-	-
<b>109</b>	β-ciclocitral	1218	1217	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-
<b>110</b>	4-metilen-isoforona	1220	1216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8
<b>111</b>	nerol	1229	1227	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
<b>112</b>	(Z)-carveol	1231	1226	-	-	-	-	-	-	-	0,4	-	-
<b>113</b>	isovalerato de 3-(Z)-hexenilo	1234	1238	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>114</b>	timol metiléter	1235	1232	-	-	-	-	0,08	-	-	-	-	-
<b>115</b>	pulegona	1237	1233	-	-	-	-	0,04	0,02	-	-	-	-
<b>116</b>	ascaridol	1238	1234	-	0,07	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>117</b>	carvona	1241	1239	0,08	0,08	-	-	0,09	0,1	-	1,2	-	tr
<b>118</b>	neral	1243	1235	-	-	-	0,2	0,04	0,02	-	-	-	2,9
<b>119</b>	cuminaldehído	1245	1238	0,06	0,05	-	-	-	-	-	-	-	4,2
<b>120</b>	geraniol	1253	1249	-	-	-	4,1	-	-	-	0,2	-	-
<b>121</b>	p-anisaldehído	1258	1247	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09
<b>122</b>	acetato de linalilo	1258	1254	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
<b>123</b>	canfenoato de metilo	1258	1257	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>124</b>	acetato de (Z)-crisantemilo	1260	1261	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	0,08
<b>125</b>	2-(E)-decanal	1265	1260	0,04	0,02	0,2	-	0,2	-	-	0,06	-	-



Tabla 5, continuación

126	solanona	1268	sd	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	-
127	geranial	1271	1264	-	-	-	0,4	0,03	-	-	-	-	3,9
128	perilla aldehído	1273	1269	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
129	iso-piperitenona	1275	1271	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-	-
130	felandral	1287	1281	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
131	acetato de bornilo	1287	1284	-	-	-	1,3	0,3	-	-	-	5,2	-
132	safrol	1288	1285	-	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-
133	<i>p</i> -cimen-7-ol	1291	1287	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
134	acetato de ( <i>E</i> )-sabinilo	1294	1289	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-
135	dihidro-edulan I	1294	1290	0,06	-	-	-	-	-	-	1,6	-	-
136	acetato de carquejilo	1298	1298	0,5	-	-	-	0,2	0,1	-	-	0,7	23,5
137	teaspirano A	1300	1298	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-
138	acetato de ( <i>E</i> )-pinocarvilo	1305	1298	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-
139	undecanal	1314	1305	-	-	0,3	-	0,7	0,2	-	-	-	-
140	2,4-( <i>E,E</i> )-decadienal	1316	1315	0,06	0,06	-	-	0,3	0,2	-	-	-	-
141	acetato de ( <i>Z</i> )-pinocarvilo	1322	1311	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
142	tiglato de 3-( <i>Z</i> )-hexenilo	1326	1319	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
143	acetato de mirtenilo	1327	1324	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06
144	δ-elemento	1337	1335	0,2	0,7	-	0,2	-	0,02	0,5	-	3,7	-
145	acetato de ( <i>E</i> )-carvilo	1346	1339	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
146	α-cubebeno	1352	1345	0,03	0,07	-	-	0,05	0,04	0,01	-	-	0,06
147	α-longipineno	1352	1350	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
148	eugenol	1356	1356	0,1	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
149	acetato de α-terpinilo	1357	1346	-	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
150	acetato de nerilo	1366	1359	-	-	-	0,09	-	-	-	-	-	0,05



Tabla 5, continuación

151	acetato de (Z)-carvilo	1367	1365	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04	0,08
152	$\alpha$ -ylangeno	1367	1373	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	0,1
153	2-(E)-undecenal	1368	1357	-	-	-	-	0,1	-	-	0,01	-	-
154	iso-ledeno	1370	1374	-	-	-	-	-	-	-	0,06	-	0,08
155	ciclosativeno	1371	1369	-	0,05	-	0,07	-	0,08	-	-	-	0,3
156	$\alpha$ -copaeno	1371	1374	0,2	0,9	-	0,2	0,2	0,3	0,3	0,04	-	0,3
157	acetato de geranilo	1380	1379	-	-	-	55,5	0,1	-	-	-	-	-
158	$\beta$ -patchuleno	1384	1379	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
159	2- <i>epi</i> -funebreno	1385	1380	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
160	acetato de (E)-mirtanilo	1386	1385	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	0,1
161	acetato de (Z)-mirtanilo	1388	sd	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
162	$\beta$ -cubebeno	1393	1387	0,04	0,2	-	-	0,2	0,2	-	-	-	0,2
163	$\beta$ -elemeno	1396	1389	0,2	1,2	0,1	-	1,4	1,7	0,02	4,9	1,1	0,6
164	(Z)-jasmona	1401	1392	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-	-
165	metileugenol	1405	1403	0,1	0,1	-	-	0,2	-	-	-	-	0,06
166	dodecanal	1409	1408	-	-	-	-	0,3	0,09	-	-	-	-
167	(Z)- $\beta$ -cariofileno	1409	1408	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
168	$\alpha$ -gurjuneno	1410	1409	-	0,5	-	-	0,1	-	-	-	-	0,3
169	$\beta$ -cedreno	1416	1419	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
170	$\beta$ -ylangeno	1417	1419	-	-	-	-	-	0,02	-	-	-	-
171	(E)- $\beta$ -cariofileno	1419	1417	3,3	6,7	0,8	0,5	2,6	2,5	1,1	0,9	1,2	0,4
172	(E)- $\beta$ -damascona	1420	1413	-	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
173	<i>epi</i> -biciclo-sesquifelandreno	1430	1430	0,1	0,09	-	-	0,1	-	0,07	-	-	0,4
174	$\gamma$ -elemeno	1430	1434	-	0,5	-	0,06	-	0,2	0,01	0,2	0,4	0,06
175	aromadendreno	1433	1439	0,1	0,1	-	-	-	0,06	-	-	-	0,2



Tabla 5, continuación

176	$\beta$ -gurjuneno	1437	1431	-	-	-	0,04	-	-	0,05	-	-	-
177	$\alpha$ -guaiano	1445	1437	-	0,02	-	-	0,05	-	-	-	-	0,06
178	$\alpha$ -himachaleno	1448	1449	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
179	$\alpha$ -patchuleno	1448	1454	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
180	geranilacetona	1449	1453	0,06	-	-	-	0,4	-	-	-	-	-
181	$\alpha$ -humuleno	1453	1452	0,2	0,7	0,3	0,09	0,6	0,5	0,1	0,9	0,2	0,1
182	dehidropseudo-ionona	1453	1455	-	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-
183	allo-aromadendreno	1454	1458	0,1	0,4	-	0,09	1,0	-	-	-	-	0,2
184	( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1457	1454	-	-	-	-	0,04	-	-	-	-	0,3
185	9- <i>epi</i> -( <i>E</i> )-cariofileno	1458	1464	-	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
186	$\alpha$ -elemeno	1463	1469	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	-
187	sesquisabineno	1468	1457	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-
188	$\beta$ -acoradieno	1470	1469	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
189	$\gamma$ -gurjuneno	1474	1475	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
190	10- <i>epi</i> - $\beta$ -acoradieno	1477	1474	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
191	massoialactona	1478	1471	-	-	-	-	-	0,6	-	2,6	-	-
192	$\beta$ -cadineno	1481	1473	0,03	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
193	$\gamma$ -muroleno	1481	1478	0,09	0,6	5,9	0,08	0,5	2,3	0,02	-	0,1	0,2
194	<i>ar</i> -curcumeno	1482	1479	-	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
195	germacreno D	1482	1484	1,3	-	-	1,7	3,2	-	1,6	1,2	0,1	0,8
196	( <i>E</i> )- $\beta$ -ionona	1485	1487	0,1	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
197	1,11-óxido de calameneno	1485	1492	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
198	$\beta$ -selineno	1486	1489	-	-	-	0,01	0,1	-	-	2,6	-	0,3
199	$\gamma$ -himachaleno	1487	1481	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8
200	$\alpha$ -amorfenno	1490	1483	-	-	0,2	-	-	-	0,02	-	2,1	-



Tabla 5, continuación

201	ledeno	1491	1496	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	0,3
202	<i>epi</i> -cubebol	1495	1493	-	-	-	-	2,1	0,5	-	-	-	-
203	biciclo-germacreno	1496	1500	-	2,8	-	-	-	1,4	2,2	-	1,0	0,4
204	$\alpha$ -muroleno	1496	1500	0,3	0,6	0,5	0,3	1,2	0,5	0,1	0,2	0,4	0,2
205	shyobunona	1498	1487	-	-	-	-	-	-	-	-	3,5	-
206	valenceno	1502	1496	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-	-
207	$\beta$ -bisaboleno	1502	1505	-	-	1,8	-	0,2	-	-	-	-	-
208	$\gamma$ -cadineno	1509	1513	0,2	1,1	1,2	0,1	1,0	0,09	-	-	-	-
209	$\alpha$ -bulneseno	1510	1509	-	-	-	-	-	-	0,01	-	-	0,4
210	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -selineno	1511	1520	-	-	-	-	1,1	-	-	-	-	-
211	cubebol	1513	1514	-	-	-	-	0,7	0,2	-	-	-	-
212	$\delta$ -cadineno	1520	1522	1,2	3,3	4,1	1,0	5,7	1,0	-	-	2,5	0,5
213	$\alpha$ -cadineno	1531	1537	-	0,1	-	0,04	0,3	-	-	-	-	0,1
214	$\gamma$ -vetiveneno	1538	1531	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	-
215	$\alpha$ -calacoreno	1538	1544	0,3	0,2	-	-	0,5	0,2	-	-	-	0,3
216	elemol	1542	1548	-	0,6	-	0,04	-	0,2	0,04	-	2,4	0,3
217	germacreno B	1551	1559	-	0,3	-	0,04	-	-	0,02	-	-	-
218	palustrol	1562	1567	-	0,2	-	0,03	0,6	-	0,1	-	0,1	7,8
219	$\beta$ -calacoreno	1563	1564	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-
220	( <i>E</i> )-nerolidol	1567	1561	0,3	-	-	0,2	-	-	0,1	0,07	0,3	0,1
221	germacreno D-4-ol	1573	1574	-	-	-	1,5	-	-	-	-	2,9	tr
222	espatulenol	1578	1577	12,9	10,0	3,4	-	11,6	30,8	3,6	7,8	-	3,8
223	óxido de cariofileno	1581	1582	10,1	1,8	1,2	0,2	3,1	14,1	0,7	4,9	-	1,3
224	<i>epi</i> -globulol	1583	1582	3,3	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-
225	globulol	1591	1590	-	-	0,2	-	-	-	-	-	0,2	tr



Tabla 5, continuación

226	viridiflorol	1593	1592	-	0,2	-	0,05	-	-	0,1	-	-	3,9
227	ledol	1599	1602	0,6	0,3	-	0,2	0,7	-	0,04	-	0,3	2,7
228	widrol	1602	1599	-	-	-	0,2	-	-	-	-	-	-
229	óxido de humuleno II	1605	1608	-	0,3	-	-	0,7	-	-	1,3	-	0,7
230	guaiol	1614	1600	-	-	1,8	-	-	-	-	-	-	-
231	germacra-1 (10),5-dien-4 $\alpha$ -ol**	1617	1623	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0	-
232	1,10- <i>diepi</i> -cubenol	1625	1618	-	0,5	-	-	0,3	0,6	-	-	-	-
233	$\alpha$ -corocaleno	1628	1622	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,1
234	1- <i>epi</i> -cubenol	1628	1627	1,0	-	-	0,2	0,7	0,6	0,04	-	-	-
235	himachalol	1631	1652	-	-	8,0	-	-	-	-	-	-	-
236	$\gamma$ -eudesmol	1633	1630	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
237	<i>iso</i> -espatulenol	1636	1640	1,5	-	-	-	0,9	2,0	0,4	2,0	-	-
238	$\zeta$ -cadinol	1639	1640	0,7	3,0	-	-	-	-	-	-	-	0,2
239	$\delta$ -cadinol (= $\alpha$ -murolol)	1644	1644	0,1	0,3	13,4	1,8	1,3	0,6	0,2	-	2,6	0,7
240	$\beta$ -eudesmol	1646	1649	-	0,2	-	-	-	-	-	-	-	4,8
241	$\zeta$ -murolol	1647	1649	-	-	-	0,1	10,6	2,0	-	-	1,7	-
242	$\alpha$ -cadinol	1652	1652	0,9	1,6	6,6	1,9	13,8	1,9	0,2	-	4,2	-
243	mustacona	1674	1676	-	-	-	-	-	0,4	-	-	-	-
244	cadaleno	1677	1675	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
245	$\alpha$ -bisabolol	1681	1685	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
246	<i>epi</i> - $\alpha$ -bisabolol	1683	1683	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-
247	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1692	1685	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	0,3
248	eudesma-4,11-dien-2-ol	1701	1691	-	-	-	-	-	-	-	-	0,09	-
249	2,6-di-isopropilnaftaleno (DIPN)	1718	1716	-	-	1,9	-	-	-	-	-	-	-
250	oplopanona	1742	1739	-	-	-	-	2,8	-	-	-	-	-



Tabla 5, continuación

251	benzoato de bencilo	1760	1759	-	-	2,9	-	1,1	-	-	-	-	-
252	ciclo-colorenona	1764	1759	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08
253	β-costol	1764	1766	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08
254	14-hidroxi-δ-cadineno	1809	1803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
255	acetato de 2,6-(Z,E)-farnesilo	1812	1821	-	-	-	0,04	-	-	-	-	-	-
256	neofitadieno	1837	1838	-	0,1	-	-	-	-	-	1,9	-	0,05
257	benzoato de feniletilo	1849	1854	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-
258	hexahidro-farnesilacetona	1853	1868	0,02	0,1	-	-	0,1	0,3	-	0,08	-	-
259	fenilacetato de 2-feniletilo	1895	1898	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
260	fitol	1941	1942	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-
<b>Total identificado (%)</b>				<b>86,0</b>	<b>94,0</b>	<b>63,3</b>	<b>95,6</b>	<b>88,0</b>	<b>77,4</b>	<b>21,2</b>	<b>74,9</b>	<b>60,6</b>	<b>90,1</b>
<b>Hidrocarburos monoterpénicos (%)</b>				36,0	33,7	2,5	19,8	1,4	3,7	9,0	31,6	13,7	7,0
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>				8,4	19,2	0,4	63,6	4,4	4,2	0,4	8,3	8,3	43,4
<b>Hidrocarburos sesquiterpenos (%)</b>				8,0	21,3	16,8	5,4	20,4	11,1	6,1	11,0	12,8	10,5
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>				31,4	19,0	34,6	6,5	50,5	53,5	5,5	16,1	18,6	27,4
<b>Otros (%)</b>				2,2	0,8	9,0	0,3	11,3	4,9	0,2	7,9	0,2	1,8
<b>No identificado (%)</b>				14,0	6,0	36,7	4,4	12,0	22,6	78,8	25,1	46,4	9,9

**Tabla 5:** Composición cualitativa y cuantitativa de las especies de *Baccharis* spp. nativas de Uruguay estudiadas (Colecta No. 2). Referencias: (*Bar*): *B. articulata*; (*Bcu*): *B. cultrata*; (*Bge*): *B. genistifolia*; (*Bgi*): *B. gibertii*; (*Bgn*): *B. gnaphalioides*; (*Boc*): *B. ochracea*; (*Bpa*): *B. palustris*; (*Bph*): *B. phyteumoides*; (*Bpu*): *B. punctulata*; (*Btm2*): *B. trimera*.

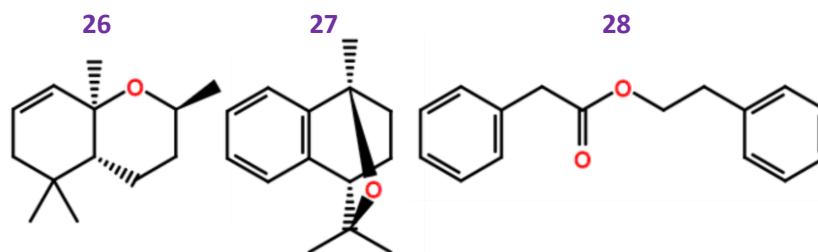
<sup>a)</sup> Los componentes son listados de acuerdo a su índice de retención en *HP-5MS*; <sup>b)</sup> Proporciones relativas de los compuestos volátiles expresadas como porcentaje de áreas relativas en *HP-5MS*. Los factores de respuesta para cada compuesto se consideraron como iguales. <sup>c)</sup> La identificación de los picos se realizó por comparación de los valores experimentales de índices de retención lineal en columna *HP5-MS (LRIe)* con los valores reportados en la literatura para compuestos puros (*LRI*) (Adams, 2007); y por comparación de espectros de masa con los respectivos almacenados en bases de datos (McLafferty y Stauffer, 1994; NIST, 1999; Adams, 2007). <sup>d)</sup> perfil obtenido por destilación por arrastre con vapor; (-) no detectado; (tr): trazas (menor a 0,01%). Se destacan en verde los compuestos mayoritarios de cada uno de los extractos volátiles y en azul la fracción mayoritaria. (\*\*\*) Identificado tentativamente en base a González (2019).





***B. articulata***. En la especie *B. articulata* (colecta de primavera) se constató como compuestos volátiles principales al  $\beta$ -pineno (**8**; 25,6%), espatulenol (**2**; 12,9%), óxido de cariofileno (**1**; 10,1%) y  $\alpha$ -pineno (**15**; 4,0%) (Tabla 5 y Figura 32).

La alta composición en  $\beta$ -pineno podría ser determinante para la aplicación de extractos volátiles de ésta especie como antimicrobianos, particularmente para su empleo contra levaduras nocivas (por ejemplo, *Candida albicans*) debido al efecto de dicho metabolito sobre las membranas de aquellas, inhibiendo su respiración normal (Uribe *et al.*, 1995). Como compuestos distintivos minoritarios de *B. articulata*, se determinaron el C<sub>13</sub> norisoprenoide dihidro-edulan I (**26**, 0,06%), el C<sub>14</sub> derivado sesquiterpénico 1,11-óxido de calameneno (**27**, 0,2%) y el bencenoide fenilacetato de 2-feniletilo (**28**, 0,2%) (Tabla 5 y Figura 32).



**Figura 32:** Algunos componentes del volatiloma de *Baccharis articulata*. (**26**) dihidro-edulan I, (**27**) 1,11-óxido de calameneno y (**28**) fenilacetato de 2-feniletilo.

Debido a la importancia de *B. articulata* como planta medicinal, y a su reconocimiento oficial en Brasil, existen variados reportes en cuanto a la composición volátil de ésta especie. Los resultados de composición aquí presentados son semejantes a los obtenidos para el sur de Brasil (Simões Pires *et al.*, 2005a; Agostini *et al.*, 2005 y Simionatto *et al.*, 2008; Trombin-Souza *et al.*, 2017; Tomazoni *et al.*, 2018), y para la provincia de Misiones (Argentina) (Retta *et al.*, 2009), aunque existe una variación intrínseca debido a las diferentes localidades y fechas de colecta (influencia de factores ambientales).

Sin embargo, los resultados aquí presentados (Tabla 5) son altamente contrastantes con los trabajos de Florão *et al.* (2012) y Zunino *et al.* (1998). En el primer caso, los autores trabajando sobre material vegetal colectado del estado de Paraná (Brasil), reportaron una alta composición en espatulenol (30,6%), 2-*epi*-funebreno (5,5%) y  $\zeta$ -gurjuneno (4,9%) (Florão *et al.*, 2012). Por su parte, Zunino *et al.* (1998) reportaron para la

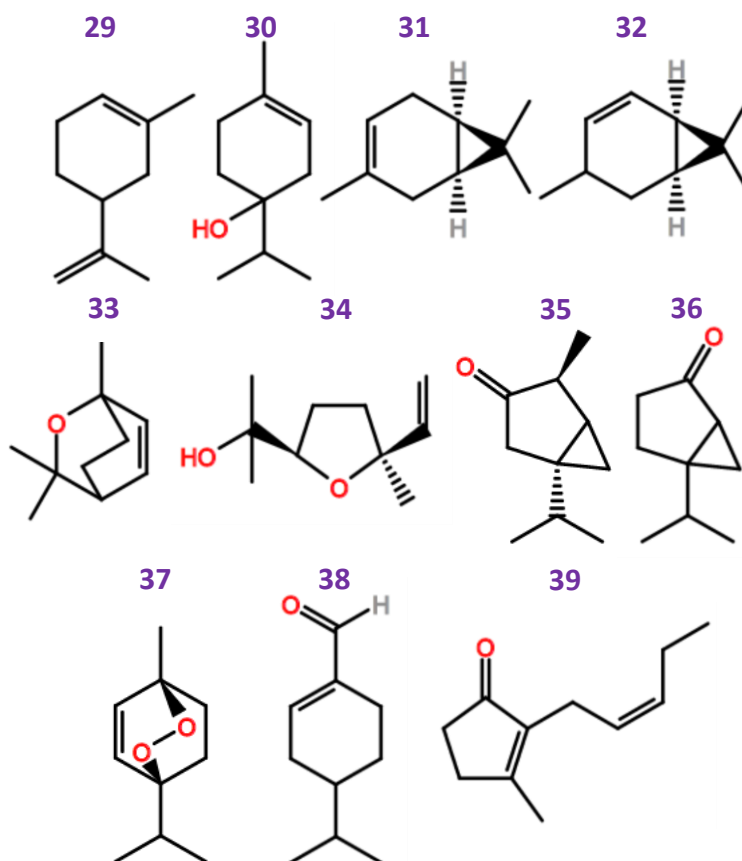


provincia de Córdoba (Argentina) una composición muy diferente, con los siguientes componentes mayoritarios: (*E*)- $\beta$ -cariofileno (16,8%), (*E*)-nerolidol (15,6%), germacreno D (9,3%) y  $\zeta$ -cadinol (9,3%). Todos estos datos en su conjunto sugieren la posible existencia de quimiotipos bien definidos para la *B. articulata*.

Por otra parte, Zunino *et al.* (2004) constataron una gran diferencia en la expresión metabólica de ambos sexos: por ejemplo, el  $\beta$ -pineno se estableció como compuesto discriminante con una abundancia de 14,7% en el aceite esencial femenino y un 0,1% en el masculino. Dichos autores atribuyeron éstas diferencias al diferente rol de ambos sexos en la atracción de insectos polinizadores (Zunino *et al.*, 2004). En el capítulo 5 se volverá sobre éste punto.

***B. cultrata***. Respecto de la especie *B. cultrata*, se evidenciaron (colecta de otoño) como componentes volátiles mayoritarios silvestreno (**29**, 10,6%), terpinen-4-ol (**30**, 10,1%), espatulenol (**2**, 10,0%) y  $\beta$ -pineno (**8**; 7,3%) (Tabla 5 y Figura 33).

Un hecho interesante de *B. cultrata* es que fue la única de las 19 especies estudiadas que presentó silvestreno y total ausencia de limoneno. Cuando este resultado se considera desde el punto de vista biosintético, el primero tiene el esqueleto del *meta*-mentano, mientras que el segundo posee el patrón normal del *para*-mentano. Según Rao y Simonsen (1925), el silvestreno es un artefacto que se forma por la descomposición térmica del  $\delta$ -3-careno, como en el caso del aceite esencial de *Pinus sylvestris* (Pinaceae). En el volatiloma de *B. cultrata*, el  $\delta$ -3-careno (**31**) se encontró en un 0,2% y el 4-careno (**32**) en un 0,7% del extracto (Tabla 5 y Figura 33). Algunos compuestos minoritarios hallados exclusivamente en éste perfil fueron: dehidro-1,8-cineol (**33**, 0,01%), (*Z*)-óxido de linalol (furanóide) (**34**, 0,05%), (*E*)-tuyona (**35**, 0,1%), sabineno cetona (**36**, 0,1%), ascaridol (**37**, 0,07%), felandral (**38**, 0,2%) y (*Z*)-jasmona (**39**, 0,02%); entre otros componentes comunes a los aceites esenciales (Tabla 5 y Figura 33).

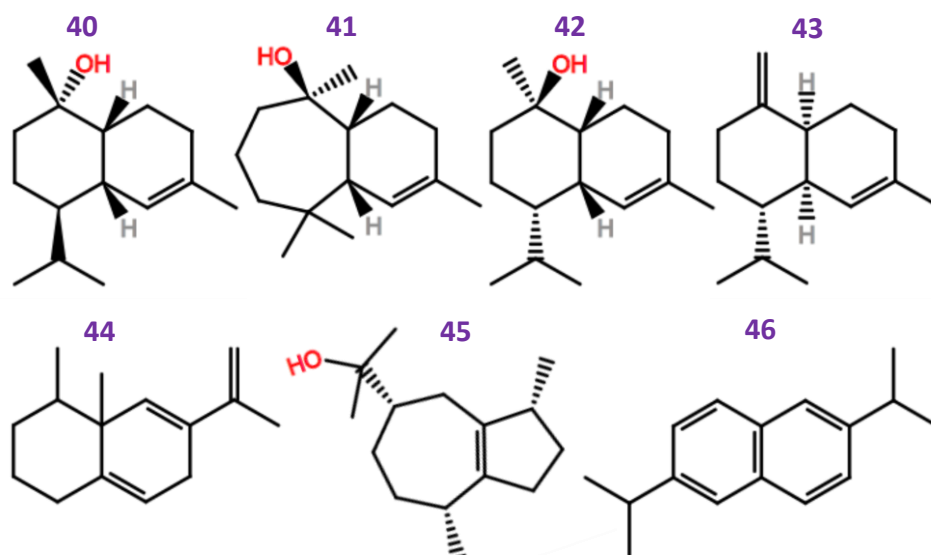


**Figura 33:** Algunos componentes del volatiloma de *Baccharis cultrata*. (29) silvestreno, (30) terpinen-4-ol, (31)  $\delta$ -3-careno, (32) 4-careno, (33) dehidro-1,8-cineol, (34) (Z)-óxido de linalol, (35) (E)-tuyona, (36) sabineno cetona, (37) ascaridol, (38) felandral y (39) (Z)-jasmona.

No existen reportes en la bibliografía respecto a la composición volátil de ésta especie, por lo cual los resultados presentados en éste trabajo son originales.

***B. genistifolia*.** Esta especie presentó un perfil volátil (colecta de verano) con abundancia de alcoholes sesquiterpénicos como el  $\delta$ -cadinol (40, 13,4%), himachalol (41, 8,0%),  $\alpha$ -cadinol (42; 6,6%), junto con el hidrocarburo sesquiterpeno  $\gamma$ -muroleno (43, 5,9%) (Tabla 5 y Figura 34).

De acuerdo a ello, el extracto de ésta especie podría ser interesante para evaluar en cuanto a su potencial antimicrobiano, ya que es conocido el rol bactericida de los cadinolos, particularmente el  $\zeta$ -cadinol que interactúa induciendo la lisis celular (Claeson *et al.*, 1992). Como compuestos minoritario de ésta especie fueron determinados: *ar*-curcumeno (11, 0,4%),  $\gamma$ -vetiveneno (44, 0,5%), guaiol (45, 1,8%), benzoato de bencilo (2,9%) y 2,6-di-isopropilnaftaleno (DIPN) (46, 1,9%).

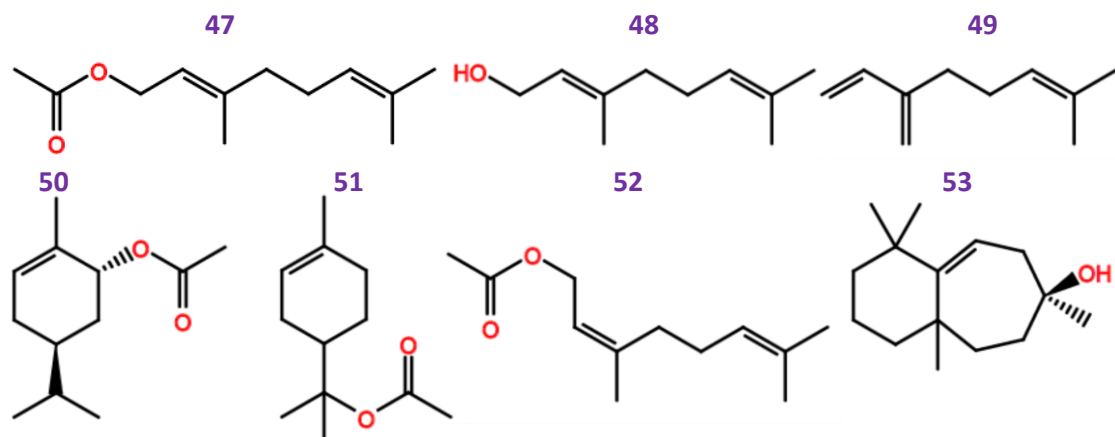


**Figura 34:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis genistifolia*. (40)  $\delta$ -cadinol, (41) himachalol, (42)  $\alpha$ -cadinol, (43)  $\gamma$ -muroleno, (44)  $\gamma$ -vetiveneno, (45) guaicol y (46) 2,6-diisopropilnaftaleno (DIPN).

Al igual que en el caso anterior, no se han encontrado reportes bibliográficos previos respecto de la fitoquímica volátil de *B. genistifolia*.

***B. gibertii*.** El volatilo de *B. gibertii* (colecta de verano) demostró ser inusual, con la presencia de acetato de geranilo en alta proporción (47, 55,5%) como componente ampliamente mayoritario, lo que le confirió a su extracto volátil un aroma agradable. Este componente, además de ser frecuente ingrediente de formulaciones aromáticas, posee acción antimicrobiana (Dorman y Deans, 2000). Otros componentes mayoritarios de *B. gibertii* fueron:  $\alpha$ -pineno (15; 4,2%), geraniol (48, 4,1%) y  $\beta$ -mirceno (49; 3,9%) (Tabla 5 y Figura 35). Dentro de los componentes minoritarios se destacaron varios acetatos: de bornilo (16, 1,3%), de (*E*)-carvilo (50, 0,03%), de  $\alpha$ -terpinilo (51, 0,01%) y de nerilo (52, 0,09%) (Figura 35). Asimismo, fue destacada la presencia exclusiva en *B. gibertii* del alcohol sesquiterpénico widrol (53, 0,2%), un compuesto presente usualmente en las partes aéreas de *Juniperus* sp. (Cupressaceae) y que ha sido destacado por producir apoptosis en las células de cáncer de colon (Kang et al., 2012).

Como fue anteriormente expuesto, no se encontró información previamente publicada sobre la fitoquímica de *B. gibertii*.

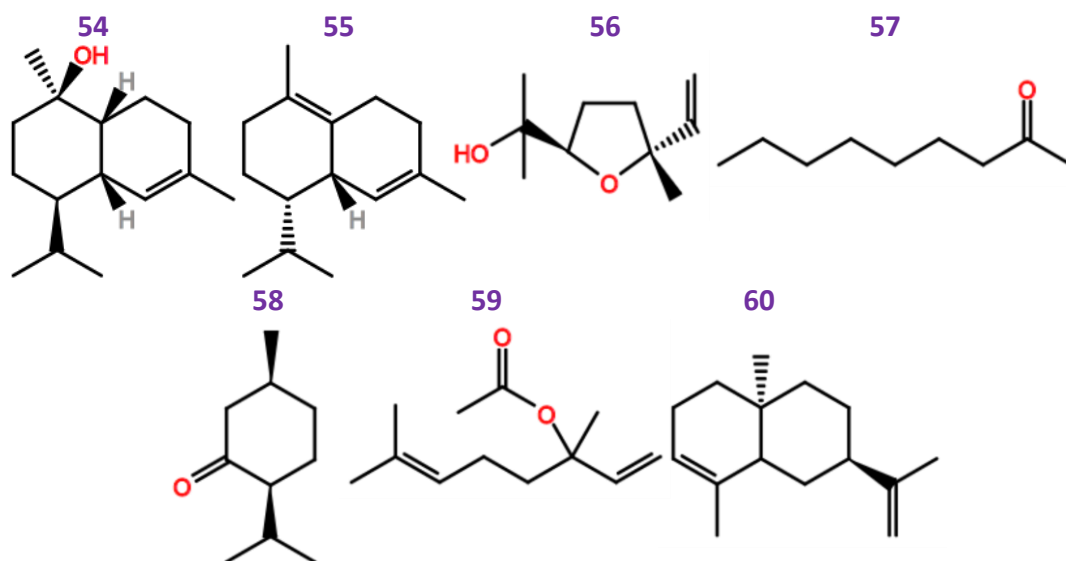


**Figura 35:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis gibertii*. (47) acetato de geranilo, (48) geraniol, (49)  $\beta$ -mirceno, (50) acetato de (E)-carvilo, (51) acetato de  $\alpha$ -terpinilo, (52) acetato de nerilo y (53) widrol.

***B. gnaphalioides*.** Esta especie presentó un volatilo (colecta de verano) integrada por los componentes mayoritarios  $\alpha$ -cadinol (42; 13,8%), espatulenol (2, 11,6%),  $\zeta$ -murolol (54; 10,6%) y  $\delta$ -cadineno (55, 5,7%) (Tabla 5 y Figura 36).

Debido a dicho contenido en  $\alpha$ -cadinol éste extracto podría ser de interés para evaluar como antimicrobiano, como ya fue establecido para *B. genistifolia* (Claeson *et al.*, 1992). Además, como componentes minoritarios exclusivos de ésta especie se determinaron: (E)-óxido de linalol (furanoide) (56, 0,03%), 2-nonanona (57, 0,03%), *iso*-mentona (58, 0,06%), acetato de linalilo (59, 0,2%) y 7-*epi*- $\alpha$ -selineno (60, 1,1%), entre otros (Tabla 5 y Figura 36).

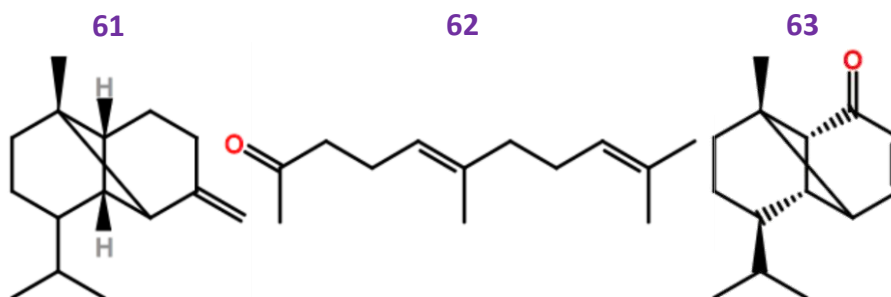
Al igual que en los casos anteriores, no se encontró en la literatura reportes fitoquímicos previo de ésta especie.



**Figura 36:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis gnaphalioides*. (54)  $\zeta$ -murolool, (55)  $\delta$ -cadineno, (56) (E)-óxido de linalol, (57) 2-nonanona, (58) iso-mentona, (59) acetato de linalilo y (60) 7-epi- $\alpha$ -selineno.

**B. ochracea.** La composición volátil de *B. ochracea* (colecta de otoño) presentó predominancia de espatulenol (2; 30,8%) y óxido de cariofileno (1; 14,1%), y es de destacar la presencia de (E)- $\beta$ -cariofileno (12; 2,5%) y  $\gamma$ -muroleno (18; 2,3%) (Tabla 5). El alto contenido en espatulenol de ésta especie podría ser de interés para posibles aplicaciones quimioterapéuticas, como ya fue mencionado para el caso de *B. dentata* y *B. milleflora* (Martins *et al.*, 2010; Ziaei *et al.*, 2011).

Los compuestos minoritarios diferenciales de éste volatilo fueron: el sesquiterpeno  $\beta$ -ylangeno (61; 0,02%), el C<sub>13</sub> norisoprenoide dihidropseudo-ionona (62; 0,1%) y la C<sub>14</sub> cetona mustacona (63; 0,4%) (Tabla 5 y Figura 37).



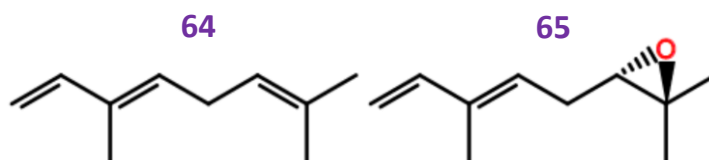
**Figura 37:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis ochracea*. (61)  $\beta$ -ylangeno, (62) dihidropseudo-ionona y (63) mustacona.



En la literatura se encuentran dos reportes sobre de la composición volátil de *B. ochracea*, en ambos casos con material vegetal colectado en el estado brasileño de Rio Grande do Sul, limítrofe con Uruguay (Budel *et al.*, 2012; Tomazoni *et al.*, 2018). En el primero de ellos, Budel *et al.* (2012) destacaron la presencia de un alto contenido de espatulenol (37,1%), óxido de cariofileno (30,8%),  $\alpha$ -acorenol (5,0%) y selin-11-en-4- $\alpha$ -ol (4,4%). En contraste, Tomazoni *et al.* (2018) obtuvieron una composición de aceite esencial de *B. ochracea* dominada por el  $\beta$ -pineno (31,2%), 1,8-cineol (eucaliptol; 28,3%), borneol (6,7%) y geraniol (4,1%); así como determinaron ausencia total de sesquiterpenos.

De acuerdo a lo anterior, se puede observar una muy buena correlación entre los compuestos mayoritarios del presente estudio y lo reportado por Budel *et al.* (2012), sugiriendo que ambos especímenes analizados puedan pertenecer al mismo quimiotipo. Por otra parte, las grandes diferencias entre la composición obtenida por el presente trabajo y el de Tomazoni *et al.* (2018) indican la existencia de diferentes quimiotipos, una alta influencia de las condiciones ambientales, o incluso la posibilidad de una incorrecta identificación botánica.

***B. palustris.*** El perfil volátil de *B. palustris* (colecta de verano) se caracterizó por presentar un gran porcentaje de picos cromatográficos no identificados a través de la metodología empleada (GC-MS con dos columnas de diferente polaridad). Dentro de los compuestos que sí pudieron ser identificados, se encuentran: (*E*)- $\beta$ -ocimeno (64; 8,3%), espatulenol (2; 3,6%), biciclogermacreno (9; 2,2%) y germacreno D (4; 1,6%) (Tabla 5 y Figura 38). Como compuesto minoritario se destaca la presencia del (*E*)-óxido de ocimeno (65; 0,04%), generado de la oxidación del (*E*)- $\beta$ -ocimeno (Figura 38).



**Figura 38:** Algunos componentes del volatiloma de *Baccharis palustris*. (64) (*E*)- $\beta$ -ocimeno y (65) (*E*)-óxido de ocimeno.

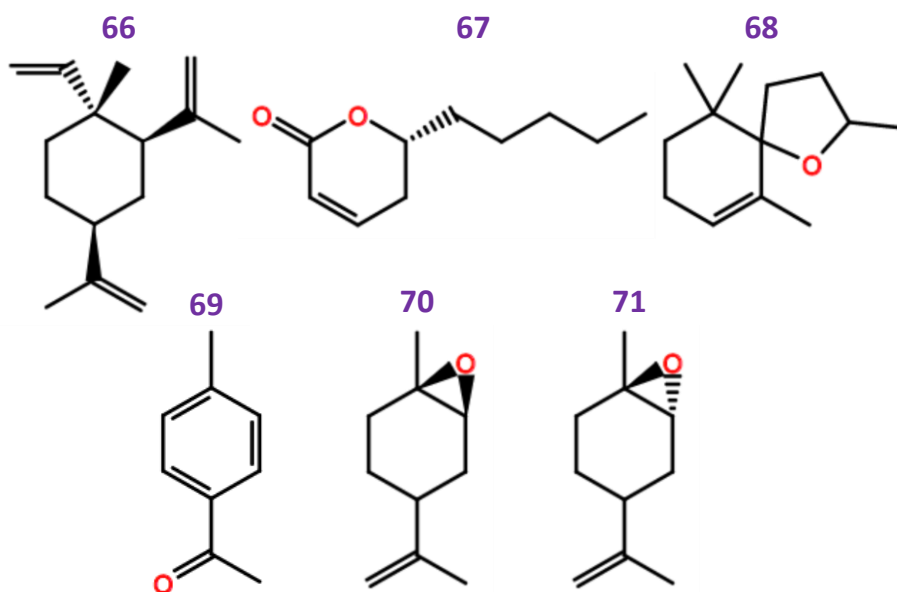
No existen reportes fitoquímicos previos de ésta especie.



Dado que el porcentaje de identificación del volatiloama fue el menor de todas las especies trabajadas (21,2%), el mismo fue seleccionado para un estudio más detallado de la composición con otras metodologías espectroscópicas. Dichos resultados serán presentados en el capítulo 9.

**B. phyteumoides.** La misma presentó un volatiloama (colecta de invierno) con los siguientes componentes mayoritarios: limoneno (**3**; 20,1%), espatulenol (**2**; 7,8%),  $\beta$ -mirceno (**49**; 4,9%), óxido de cariofileno (**1**; 4,9%) y  $\beta$ -elemeno (**66**; 4,9%) (Tabla 5 y Figura 39). Como en el caso de *B. microdonta*, ésta especie podría presentar potenciales propiedades anticancerígenas por su contenido en limoneno (**Haag et al., 1992**).

Dentro de los componentes minoritarios del perfil volátil de *B. phyteumoides* merece destacarse la presencia de la massoiolactona (**67**; 2,6%), teaspirano A (**68**; 0,3%) y *p*-metilacetofenona (**69**; 0,02%) (Tabla 5 y Figura 38). Es interesante destacar que ésta especie no sólo presentó limoneno en su composición volátil, sino varios compuestos derivados de éste como los óxidos de limoneno (*cis* y *trans*: **70** y **71**; 0,2% y 0,4%) (Figura 39), entre otros.



**Figura 39:** Algunos componentes del volatiloama de *Baccharis phyteumoides*. (**66**)  $\beta$ -elemeno, (**67**) massoiolactona, (**68**) teaspirano A, (**69**) *p*-metilacetofenona, (**70**) (*Z*)-óxido de limoneno y (**71**) (*E*)-óxido de limoneno.

En la literatura se encuentra publicado un trabajo de Retta *et al.* (2009), que da cuenta de la composición volátil de *B. phyteumoides* colectada durante el verano en la

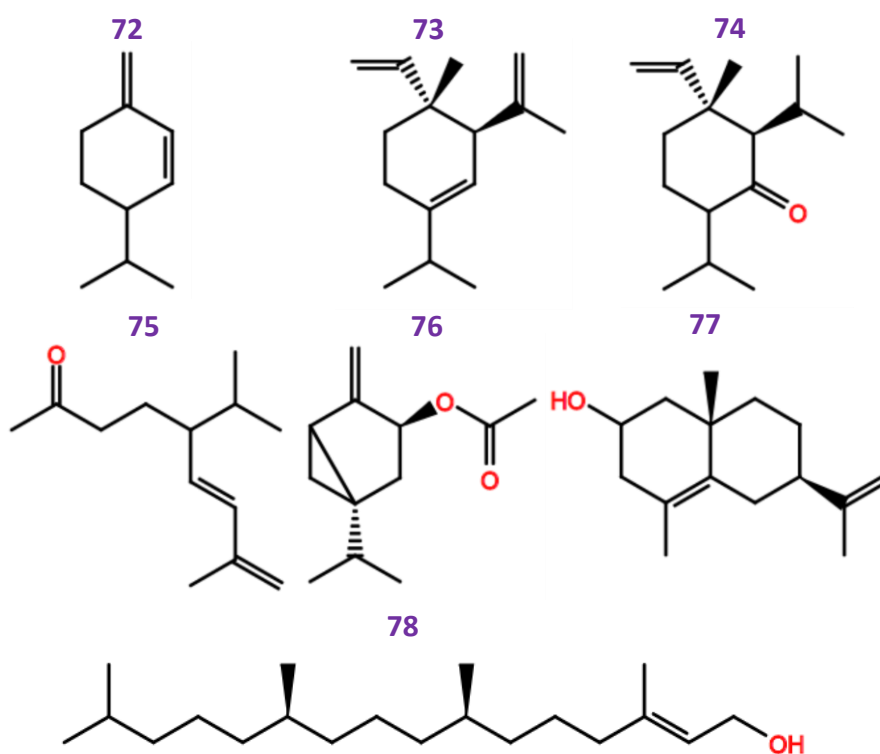




provincia de Santa Fe (Argentina). De acuerdo con el resultado de dichos autores, el perfil volátil de la muestra se caracterizó por la presencia de los siguientes compuestos mayoritarios: acetato de (*E*)-fitol (16,2%),  $\beta$ -selineno (12,9%), limoneno (8,7%),  $\beta$ -elemeno (8,5%) y espatulenol (8,2%) (Retta *et al.*, 2009).

Como consecuencia, existen diferencias entre los resultados del presente trabajo y el de Retta *et al.* (2009), pero las mismas pueden deberse no sólo a las diferentes condiciones de crecimiento del material vegetal, diferentes estaciones de colecta y a su diferencia genética, sino también a las diferentes condiciones extractivas y analíticas que se siguieron en ambas investigaciones (Retta *et al.*, 2009).

***B. punctulata.*** En el caso de *B. punctulata* (colecta de verano) los compuestos mayoritarios identificados fueron:  $\beta$ -felandreno (72; 5,2%), acetato de bornilo (16, 5,2%),  $\alpha$ -cadinol (42; 4,2%),  $\delta$ -elemeno (73; 3,7%) y shyobunona (74; 3,5%) (Tabla 5 y Figura 40). Además fueron determinados, como compuestos minoritarios: solanona (75; 0,09%), (*E*)-acetato de sabinilo (76; 0,04%), eudesma-4,11-dien-2-ol (77; 0,09%) y fitol (78; 0,05%) (Tabla 5 y Figura 40).



**Figura 40:** Algunos componentes del volatiloma de *Baccharis punctulata*. (72)  $\beta$ -felandreno, (73)  $\delta$ -elemeno, (74) shyobunona, (75) solanona, (76) (*E*)-acetato de sabinilo, (77) eudesma-4,11-dien-2-ol y (78) fitol.



Los reportes bibliográficos indican composiciones diferentes para el aceite esencial (obtenido por hidrodestilación) de *B. punctulata* en diferentes sitios de colecta en Brasil. En el estudio de Schossler *et al.* (2009) con material vegetal del estado de Rio Grande do Sul se obtuvieron los siguientes componentes principales: biciclogermacreno (9,7-22,9%), germacreno D (2,7-16,0%), (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (6,3-7,3%), (*Z*)-cadin-4-en-7-ol (2,7-6,8%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (0,6-6,8%), limoneno (4,3-6,0%) y (*E*)- $\beta$ -ocimeno (2,1-5,0%).

Por otra parte, Budel *et al.* (2018b) trabajando con material vegetal del estado de Paraná identificaron como componentes mayoritarios del perfil volátil a:  $\alpha$ -bisabolol (20,7-23,6%), espatulenol (10,0-11,7%), limoneno (9,8-11,4%), óxido de cariofileno (5,3-6,0%) y  $\beta$ -pineno (4,4-5,0%). Sin embargo, en un estudio reciente Ascari *et al.* (2019) demostraron una composición distintiva para aceites de individuos masculinos y femeninos de *B. punctulata* (también del estado de Paraná): mientras que para los primeros los compuestos principales fueron  $\delta$ -elemeno (14,3%), germacreno D (11,3%) y biciclogermacreno (10,9%); para los segundos lo fueron biciclogermacreno (42,4%), germacreno D (21,3%) y (*E*)- $\beta$ -cariofileno (14,1%). Asimismo, González (2019) aisló el sesquiterpeno verboccidentafurano del aceite esencial de las hojas de ejemplares masculinos en estado vegetativo, estableciendo una apreciable diferencia con el estado de floración (43,9% vs. 22,4%, respectivamente). Con respecto a los monoterpenos, éstos se incrementan notablemente en el período de floración comparado al período vegetativo (González, 2019).

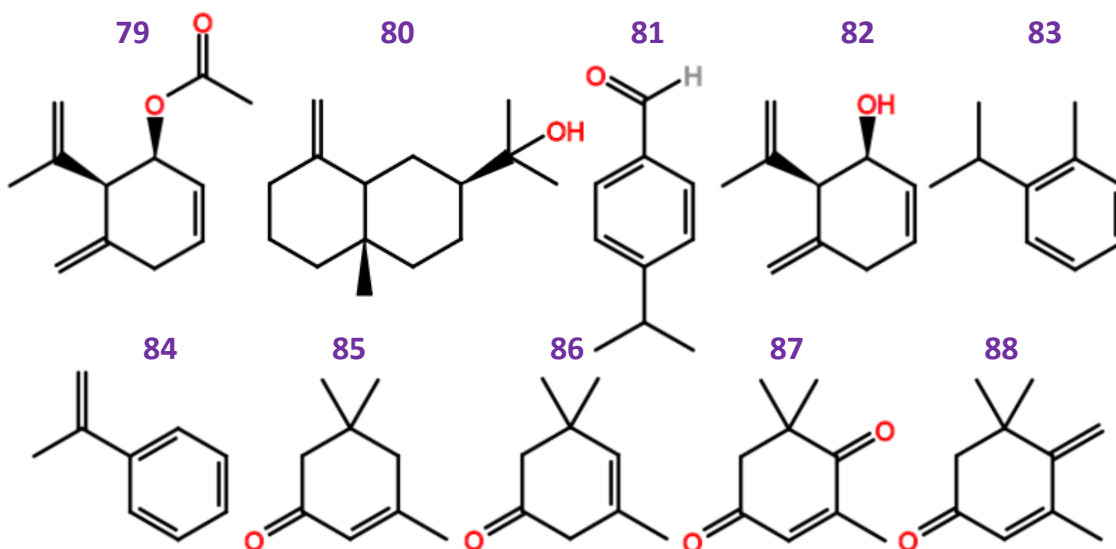
Lo anterior demuestra que las diferencias en los resultados de composición entre los reportes de literatura y el presente trabajo se pueden deber no sólo a condiciones ambientales diferentes y al estado fenológico de la planta, sino también a diferente proporción de material vegetal masculino/femenino empleado en la obtención de la muestra de extracción. Por otra parte, es importante recordar que las técnicas extractivas utilizadas no son intercambiables porque se basan en fundamentos completamente diferentes.

***B. trimera.*** En el volatilo de *B. trimera* (colecta de invierno) de Uruguay se destacaron como compuestos mayoritarios acetato de carquejilo (79; 23,5%), palustrol (18; 7,8%),  $\beta$ -eudesmol (80; 4,8%) y cuminaldehído (81; 4,2%) (Tabla 5 y Figura 41).



El acetato de carquejilo no ha sido evaluado por sus propiedades bioactivas hasta el momento.

Componentes minoritarios de relevancia en ésta especie fueron: carquejol (**82**; 3,5%), *o*-cimeno (**83**; 0,03%), ambos con el esqueleto del *o*-mentano, y  $\alpha$ -metilestireno (**84**; 0,03%) (Tabla 5 y Figura 41). En éste caso también fueron detectados el norisoprenoide isoforona y compuestos relacionados:  $\alpha$ -isoforona (**85**; 0,2%),  $\beta$ -isoforona (**86**; trazas), 4-cetoisoforona (**87**; 0,5%) y 4-metilenisoforona (**88**; 0,8%) (Figura 41).



**Figura 41:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis trimera* (Colecta No. 2). (**79**) acetato de carquejilo, (**80**)  $\beta$ -eudesmol, (**81**) cuminaldehído, (**82**) carquejol, (**83**) *o*-cimeno, (**84**)  $\alpha$ -metilestireno, (**85**)  $\alpha$ -isoforona, (**86**)  $\beta$ -isoforona, (**87**) 4-cetoisoforona y (**88**) 4-metilenisoforona.

En el análisis del extracto volátil de *B. trimera* colectada en Uruguay, se constató una composición muy diferente a la obtenida de la misma especie en la colecta realizada en Brasil (Tablas 4 y 5), posiblemente debido a la existencia de quimiotipos. En base a ello, los especímenes uruguayos pertenecerían al quimiotipo que sintetiza acetato de carquejilo, en consonancia con los resultados presentados por Simões-Pires *et al.* (2005a) y Besten *et al.* (2013). Esta problemática será tratada con más detalle en el capítulo 7 de ésta tesis.



### **3.4 Composición química del volátiloma de *Baccharis* spp. (Colecta No. 3)**

En el caso de la Colecta No. 3, fue posible la identificación de 185 componentes (principalmente terpenos) del volátiloma masculino/femenino de las 4 especies estudiadas de *Baccharis* L. nativas de Uruguay (Tabla 6).



**Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad**

#	Compuesto <sup>a)</sup>	LRIe	LRI <sub>t</sub>	Bcr F <sup>b)</sup>	Bcr M	Bdr F <sup>d)</sup>	Bdr M <sup>d)</sup>	Bli F	Bil M	Bsp F	Bsp M
1	1-pentanol <sup>c)</sup>	766	762	-	-	tr	tr	-	-	-	-
2	1-hexen-3-ona	780	776	-	-	0,07	0,04	-	-	-	-
3	3-metil-2-butenal	786	782	-	-	0,02	0,02	-	-	-	-
4	2-( <i>E</i> )-pentenal	791	787	-	-	tr	tr	-	-	-	-
5	2-hexanol	800	796	-	-	-	-	-	-	0,08	0,06
6	hexanal	801	801	-	-	0,04	0,03	-	-	0,3	0,5
7	3-metilciclopentanol	825	836	-	-	-	-	-	-	0,09	0,1
8	2-( <i>E</i> )-hexenal	846	846	-	-	0,03	0,03	-	-	0,02	tr
9	3-( <i>Z</i> )-hexen-1-ol	852	850	0,1	0,1	0,01	0,02	-	-	0,1	0,1
10	1-hexanol	879	863	-	0,07	0,02	0,02	-	-	0,08	0,08
11	2-heptanona	898	889	-	-	-	-	-	-	0,02	0,02
12	heptanal	903	901	-	-	0,03	0,04	-	-	0,01	0,02
13	2,4-( <i>E,E</i> )-hexadienal	911	907	-	-	tr	tr	-	-	-	-
14	2,2-dimetiltetrahidrofurano	914	908	-	-	-	-	-	-	0,6	0,5
15	triciclono	920	921	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-
16	$\alpha$ -tuyeno	924	924	-	-	0,1	0,2	0,1	0,05	-	-
17	$\alpha$ -pineno	932	932	0,8	0,9	3,9	4,5	18,0	25,0	1,3	0,4
18	4-metil-2-heptanona	942	943	-	-	-	-	-	-	0,01	0,01
19	$\alpha$ -fencheno	944	945	-	-	-	-	0,01	0,01	-	-
20	canfeno	946	946	-	-	0,1	0,1	0,04	0,07	-	-
21	2-( <i>E</i> )-heptenal	948	947	-	-	tr	tr	-	-	-	-
22	benzaldehído	956	952	-	-	0,04	0,05	0,1	0,3	0,01	0,03
23	tuya-2,4(10)-dieno	957	953	-	-	0,04	0,06	-	-	-	-
24	sabineno	972	969	-	-	-	-	2,5	0,4	-	-
25	$\beta$ -pineno	973	974	4,0	4,9	10,9	10,5	16,7	21,6	20,1	5,9



Tabla 6, continuación

26	1-octen-3-ona	977	972	-	-	-	-	-	-	0,01	tr
27	1-octen-3-ol	979	974	-	-	-	-	-	-	0,01	0,02
28	6-metil-5-hepten-2-ona	986	981	-	-	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,03
29	dehidro-1,8-cineol	988	988	-	-	0,01	tr	-	-	-	-
30	$\beta$ -mirceno	990	988	0,5	0,5	1,6	1,9	5,9	3,7	0,6	0,3
31	$\alpha$ -felandreno	992	1002	-	-	-	-	0,07	tr	-	-
32	2-[(2E)-2-pentenil]-furano	1001	1001	-	-	0,01	tr	-	-	-	-
33	2,4-(E,E)-heptadienal	1001	1005	-	-	0,01	0,01	Tr	tr	0,05	0,04
34	<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno	1002	1003	-	-	0,06	0,07	-	-	-	-
35	$\alpha$ -terpineno	1006	1014	-	-	-	-	0,2	0,1	0,05	0,03
36	$\delta$ -3-careno	1009	1008	-	-	0,1	0,1	0,03	tr	-	-
37	$\delta$ -2-careno	1011	1009	-	-	tr	0,01	-	-	-	-
38	<i>o</i> -cimeno	1013	1011	-	-	0,02	0,02	-	-	0,01	0,02
39	<i>p</i> -cimeno	1016	1020	-	-	0,07	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
40	4-careno	1017	1011	-	-	0,09	0,1	-	-	-	-
41	limoneno	1026	1024	3,1	4,1	8,9	9,1	2,8	1,7	8,5	5,1
42	1,8-cineol	1032	1026	-	-	-	-	0,01	-	0,08	0,1
43	alcohol bencílico	1032	1026	-	-	-	-	0,03	0,03	-	-
44	(Z)- $\beta$ -ocimeno	1034	1032	-	-	0,03	0,03	0,1	0,06	-	-
45	$\beta$ -isoforona	1035	1044	-	-	-	-	-	-	-	0,03
46	fenilacetaldehído	1038	1036	-	0,03	tr	0,03	0,05	0,02	0,2	0,3
47	(E)- $\beta$ -ocimeno	1046	1044	-	0,04	0,4	0,4	0,4	0,1	0,3	0,2
48	$\gamma$ -terpineno	1055	1054	-	-	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
49	acetofenona	1058	1059	-	-	0,4	0,4	-	-	-	-
50	1-octanol	1062	1063	-	-	0,02	0,02	-	-	-	-



Tabla 6, continuación

51	(Z)-hidrato de sabineno	1063	1065	-	-	-	-	0,02	tr	0,01	-
52	<i>m</i> -tolualdehído	1064	1059	0,03	0,03	-	-	-	-	-	-
53	(Z)-óxido de linalol (furanóide)	1069	1067	-	-	0,01	0,01	0,02	tr	-	-
54	terpinoleno	1086	1086	0,3	0,2	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2
55	6,7-epoximirceno	1089	1092	-	-	0,01	tr	-	-	-	-
56	nonanal	1093	1100	-	-	0,08	0,1	-	-	-	-
57	( <i>E</i> )-hidrato de sabineno	1095	1098	-	-	-	-	0,03	-	-	-
58	linalol	1100	1095	1,3	0,8	0,2	0,4	0,5	0,6	0,1	0,2
59	1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	1108	1108	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-
60	<i>endo</i> -fenchol	1111	1114	-	-	0,04	0,08	-	-	-	-
61	<i>exo</i> -fenchol	1116	1118	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
62	( <i>E</i> )- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1118	1119	0,2	0,2	0,2	0,2	0,08	-	0,1	0,1
63	$\alpha$ -canfolenal	1123	1122	-	0,05	0,03	0,03	0,2	0,2	0,01	-
64	(Z)- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1133	1133	-	-	0,07	0,08	-	-	-	-
65	nopinona	1133	1135	0,4	0,4	-	-	0,1	0,09	0,1	0,08
66	(Z)-óxido de limoneno	1134	1132	-	-	0,01	tr	-	-	-	-
67	( <i>E</i> )-pinocarveol	1134	1135	1,2	1,1	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,3
68	(Z)-verbenol	1139	1137	-	-	0,04	0,04	0,04	0,05	-	-
69	( <i>E</i> )-verbenol	1142	1140	-	-	0,2	0,2	0,3	0,4	-	-
70	hidrato de canfeno	1149	1145	-	-	-	-	-	-	0,08	0,08
71	citronelal	1154	1148	-	-	-	0,02	-	-	-	-
72	2-( <i>E</i> )-nonenal	1154	1157	-	-	0,03	0,02	-	-	-	-
73	<i>iso</i> -mentona	1155	1158	-	-	-	-	-	-	Tr	0,02
74	amilbenceno	1156	1158	-	-	-	-	-	-	0,01	0,02
75	pinocarvona	1158	1160	1,0	0,9	0,4	0,3	0,5	0,5	0,4	0,2



Tabla 6, continuación

76	1-(1,4-dimetil-3-ciclohexen-1-il)-etanona	1163	1152	-	-	0,02	0,03	-	-	-	-
77	endo-borneol	1164	1165	-	-	0,1	0,1	-	-	0,06	0,06
78	<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1164	1166	-	-	-	0,04	0,3	0,3	-	-
79	( <i>Z</i> )-pinocanfona	1171	1172	-	-	0,02	0,02	-	-	-	-
80	terpinen-4-ol	1173	1174	-	-	0,4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,5
81	<i>m</i> -cimen-8-ol	1177	1176	-	-	-	-	-	-	-	0,04
82	<i>p</i> -metil-acetofenona	1180	1183	-	-	-	-	0,02	-	-	-
83	<i>p</i> -cimen-8-ol	1183	1179	0,3	0,3	-	-	-	-	0,1	0,1
84	$\alpha$ -terpineol	1188	1186	0,9	0,6	0,6	0,9	0,8	0,6	2,1	2,3
85	( <i>E</i> )- <i>p</i> -menta-1(7),8-dien-2-ol	1189	1187	-	-	0,02	tr	-	-	-	-
86	mirtenol	1194	1194	0,3	0,2	0,8	0,7	0,2	0,2	0,3	0,1
87	mirtenal	1196	1195	1,5	1,2	-	-	0,5	0,6	0,4	0,3
88	( <i>E</i> )-piperitol	1202	1208	-	-	0,02	0,02	-	-	-	-
89	decanal	1206	1201	-	-	-	-	-	-	0,06	-
90	verbenona	1206	1204	0,1	0,1	0,02	0,02	0,2	0,2	-	-
91	( <i>E</i> )-carveol	1217	1215	0,5	0,3	0,2	0,2	0,06	0,1	-	-
92	$\beta$ -ciclocitral	1218	1217	-	-	0,03	0,01	-	-	-	-
93	nerol	1229	1227	-	-	0,06	0,1	-	-	-	-
94	( <i>Z</i> )-carveol	1231	1226	-	-	0,08	0,08	-	-	-	-
95	isovalerato de 3-( <i>Z</i> )-hexenilo	1234	1238	-	-	-	-	-	-	0,03	0,03
96	carvona	1241	1239	0,8	0,5	0,2	0,2	0,03	-	0,07	0,07
97	neral	1243	1235	-	-	0,04	0,04	-	-	-	-
98	geraniol	1253	1249	-	-	0,06	0,08	-	-	-	-
99	citronelato de metilo	1263	1257	-	-	0,07	0,1	-	-	-	-
100	geranial	1271	1264	-	-	0,05	0,05	-	-	-	-





Tabla 6, continuación

<b>101</b>	hexilbenceno	1272	1267	-	-	-	-	-	-	0,01	0,05
<b>102</b>	4,8-dimetilnona-3,8-dien-2-ona	1280	1276	-	-	0,09	0,07	-	-	-	-
<b>103</b>	$\alpha$ -terpinen-7-al	1287	1283	-	-	0,01	0,01	-	-	-	-
<b>104</b>	safrol	1288	1285	-	-	0,1	0,2	-	-	0,02	0,04
<b>105</b>	dihidro-edulan I	1294	1290	-	-	0,01	-	-	-	-	-
<b>106</b>	perilla alcohol	1297	1294	-	-	0,04	0,03	-	-	-	-
<b>107</b>	acetato de carquejilo	1298	1298	-	1,2	-	-	0,07	0,1	0,02	0,03
<b>108</b>	undecanal	1314	1305	-	-	-	-	-	-	0,09	-
<b>109</b>	2,4-( <i>E,E</i> )-decadienal	1316	1315	-	-	0,04	0,05	-	-	0,07	0,06
<b>110</b>	$\delta$ -elemeno	1337	1335	-	-	0,05	0,05	-	-	-	0,03
<b>111</b>	$\alpha$ -cubebeno	1352	1345	-	-	0,1	0,1	-	-	0,02	0,04
<b>112</b>	eugenol	1356	1356	-	0,1	0,08	0,04	-	-	0,02	0,04
<b>113</b>	acetato de nerilo	1366	1359	-	-	0,05	0,07	-	-	-	-
<b>114</b>	$\alpha$ -ylangeno	1367	1373	0,5	0,2	0,1	0,1	-	-	Tr	0,03
<b>115</b>	ciclo-sativeno	1371	1369	-	-	0,03	0,02	-	-	-	-
<b>116</b>	$\alpha$ -copaeno	1371	1374	0,7	0,5	0,2	0,2	-	-	0,09	0,3
<b>117</b>	$\beta$ -malieno	1373	1380	-	-	-	-	0,1	-	-	-
<b>118</b>	farnesano	1376	1379	-	-	-	-	0,3	0,4	-	-
<b>119</b>	( <i>E</i> )- $\beta$ -damascenona	1382	1383	0,3	0,4	-	0,03	-	-	-	-
<b>120</b>	$\beta$ -bourboneno	1382	1387	-	-	0,1	0,08	-	-	0,05	0,1
<b>121</b>	$\beta$ -cubebeno	1393	1387	-	-	0,1	0,09	-	-	0,03	0,06
<b>122</b>	$\beta$ -elemeno	1396	1389	-	-	0,3	0,4	0,8	0,7	0,2	0,6
<b>123</b>	valerato de bencilo	1397	1396	-	-	-	-	-	-	0,01	tr
<b>124</b>	<i>iso</i> -italiceno	1397	1401	-	-	-	-	0,1	0,08	-	-
<b>125</b>	metileugenol	1405	1403	-	-	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2	0,4



Tabla 6, continuación

126	$\alpha$ -gurjuneno	1410	1409	-	-	0,1	0,1	-	-	0,01	0,04
127	( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno	1419	1417	1,4	1,5	2,2	2,5	0,8	0,6	2,7	3,3
128	epibiciclo-sesquifelandreno	1430	1430	-	-	0,1	0,2	-	-	-	-
129	$\gamma$ -elemeno	1430	1434	-	-	-	-	1,0	0,9	-	-
130	( <i>E</i> )- $\alpha$ -bergamoteno	1433	1432	-	-	-	-	0,1	-	-	-
131	aromadendreno	1433	1439	1,1	0,7	0,7	0,5	-	-	0,02	0,1
132	benzoato de isoamilo	1435	1433	-	-	-	-	0,06	-	-	-
133	$\beta$ -gurjuneno	1437	1431	-	-	0,06	0,03	-	-	-	-
134	geranilacetona	1449	1453	-	-	-	-	0,04	0,09	-	-
135	$\alpha$ -humuleno	1453	1452	-	-	0,8	0,6	0,3	0,3	0,8	1,4
136	<i>allo</i> -aromadendreno	1454	1458	-	-	-	-	0,04	-	0,2	0,3
137	( <i>E</i> )- $\beta$ -farneseno	1457	1454	-	-	-	-	0,1	-	-	-
138	$\gamma$ -curcumeno	1478	1481	-	-	-	-	0,8	0,2	-	-
139	$\gamma$ -muroleno	1481	1478	0,3	0,5	0,6	0,6	-	-	0,6	2,0
140	<i>ar</i> -curcumeno	1482	1479	-	-	-	-	3,8	1,5	-	-
141	germacreno D	1482	1484	-	-	1,4	1,1	-	-	-	-
142	( <i>Z</i> )- $\beta$ -guaieno	1491	1492	-	-	0,09	0,2	-	-	-	-
143	ledeno	1491	1496	1,0	0,8	-	-	1,0	0,1	0,2	tr
144	biciclo-germacreno	1496	1500	-	-	2,8	2,9	-	-	0,3	2,0
145	$\alpha$ -muroleno	1496	1500	0,2	0,2	-	-	-	-	0,3	0,6
146	$\gamma$ -cadineno	1509	1513	0,4	0,4	0,3	0,3	-	-	0,2	0,3
147	$\delta$ -cadineno	1520	1522	1,1	1,0	-	-	0,2	0,1	0,9	1,6
148	$\alpha$ -cadineno	1531	1537	-	-	-	-	-	-	0,1	0,1
149	$\alpha$ -copaen-11-ol	1535	1539	-	-	-	-	-	-	-	0,07
150	$\alpha$ -calacoreno	1538	1544	0,8	1,0	0,2	0,3	-	-	0,2	0,3



Tabla 6, continuación

151	elemol	1542	1548	-	-	-	-	-	-	0,03	0,1
152	germacreno B	1551	1559	-	-	-	-	0,7	0,5	-	-
153	palustrol	1562	1567	1,3	1,8	-	-	Tr	0,2	-	-
154	( <i>E</i> )-nerolidol	1567	1561	0,2	0,2	17,3	16,7	0,5	0,2	0,1	0,3
155	espatulenol	1578	1577	16,1	16,4	5,2	5,5	1,8	0,8	18,9	24,0
156	óxido de cariofileno	1581	1582	12,7	10,8	-	-	2,5	2,4	9,9	9,6
157	<i>epi</i> -globulol	1583	1582	0,4	0,3	-	-	-	-	0,3	0,7
158	globulol	1591	1590	15,0	17,8	1,7	1,7	0,09	0,07	-	-
159	ledol	1599	1602	1,4	1,8	-	-	0,07	-	-	-
160	óxido de humuleno II	1605	1608	0,9	1,2	-	-	0,3	0,5	1,5	1,7
161	1,10- <i>diepi</i> -cubenol	1625	1618	0,8	0,9	1,4	1,5	-	-	0,4	0,8
162	1- <i>epi</i> -cubenol	1628	1627	0,4	0,2	0,5	0,5	-	-	0,1	0,1
163	cariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol	1629	1632	-	-	-	1,1	-	-	-	-
164	<i>iso</i> -espatulenol	1636	1640	0,1	0,2	-	-	-	-	1,4	1,7
165	$\zeta$ -cadinol	1639	1640	1,7	3,5	3,0	0,4	1,7	1,9	-	-
166	$\delta$ -cadinol (= $\alpha$ -murolol)	1644	1644	-	0,2	0,5	0,8	-	-	0,2	0,6
167	$\beta$ -eudesmol	1646	1649	1,6	0,8	-	-	-	0,3	-	-
168	$\zeta$ -murolol	1647	1649	-	-	tr	0,3	-	-	1,9	2,9
169	$\alpha$ -cadinol	1652	1652	0,5	0,8	1,3	1,4	0,7	0,8	1,7	3,1
170	cadaleno	1677	1675	-	-	tr	0,1	-	-	-	-
171	$\alpha$ -bisabolol	1681	1685	-	-	-	-	0,3	0,07	-	-
172	<i>epi</i> - $\alpha$ -bisabolol	1683	1683	-	-	-	-	0,1	-	-	-
173	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1692	1685	-	-	3,1	2,9	-	-	-	-
174	2,6-( <i>Z,E</i> )-farnesol	1726	1722	-	-	2,8	2,1	-	-	-	-
175	isobiciclo-germacrenal	1735	1733	-	-	1,7	1,6	-	-	-	-



**Tabla 6, continuación**

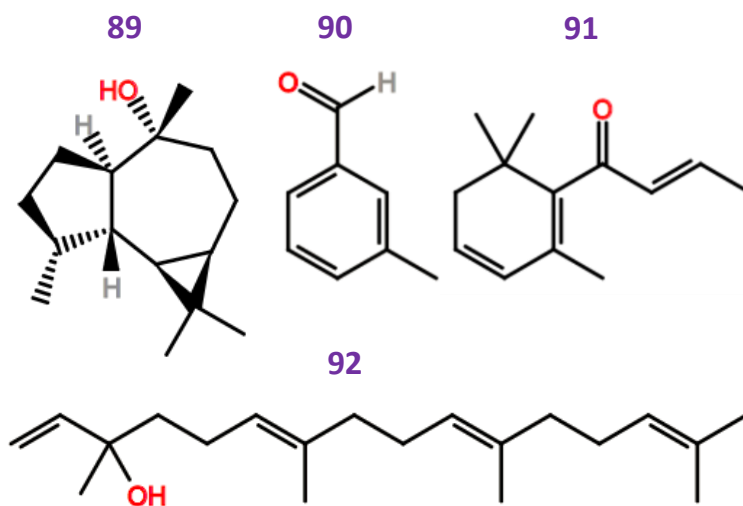
<b>176</b>	benzoato de bencilo	1760	1759	0,3	0,4	-	-	1,5	6,9	-	-
<b>177</b>	14-hidroxi- $\alpha$ -muroleno	1780	1779	-	-	0,06	0,06	-	-	-	-
<b>178</b>	14-hidroxi- $\delta$ -cadineno	1809	1803	-	-	0,02	0,01	-	-	-	-
<b>179</b>	neofitadieno	1837	1838	-	-	0,2	0,3	-	-	0,1	0,2
<b>180</b>	hexahidro-farnesilacetona	1845	1868	0,06	0,04	-	-	-	-	0,2	0,1
<b>181</b>	benzoato de feniletilo	1849	1854	-	0,03	-	-	0,3	0,3	-	-
<b>182</b>	salicilato de bencilo	1863	1864	0,02	0,04	-	-	14,3	9,3	-	-
<b>183</b>	fitol	1941	1942	-	-	0,04	0,04	-	-	-	-
<b>184</b>	( <i>E,E</i> )-geranillinalol	2034	2034	0,06	0,09	-	-	-	-	-	-
<b>185</b>	bencilvainillina	2049	sd	-	-	-	-	0,2	0,07	-	-
<b>Total identificado (%)</b>				<b>78,7</b>	<b>83,5</b>	<b>81,8</b>	<b>81,7</b>	<b>88,1</b>	<b>88,3</b>	<b>82,7</b>	<b>79,0</b>
<b>Hidrocarburos monoterpénicos (%)</b>				8,7	10,6	26,5	27,7	47,6	53,4	31,5	12,6
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>				8,5	7,9	4,8	5,1	5,3	5,0	5,5	4,7
<b>Hidrocarburos sesquiterpenos (%)</b>				7,5	6,8	10,3	10,5	10,1	5,4	6,9	13,2
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>				53,1	56,9	38,6	36,6	8,1	7,2	36,4	45,7
<b>Otros (%)</b>				0,9	1,3	1,6	1,8	17,0	17,3	2,4	2,8
<b>No identificado (%)</b>				21,3	16,5	18,2	18,3	11,9	11,7	17,3	21,0

**Tabla 6:** Composición cualitativa y cuantitativa de las especies de *Baccharis* spp. nativas de Uruguay y sus diferencias sexuales entre los perfiles femeninos (F) y masculinos (M) (Colecta No. 3). Referencias: (Bcr): *B. crispa*; (Bdr): *B. dracunculifolia*, (Bli): *B. linearifolia*; (Bsp): *B. spicata*. <sup>a)</sup> Los componentes son listados de acuerdo a su índice de retención en HP-5MS; <sup>b)</sup> Proporciones relativas de los compuestos volátiles expresadas como porcentajes de áreas relativas en HP-5MS. Los factores de respuesta para cada compuesto se consideraron como iguales. <sup>c)</sup> La identificación de los picos se realizó por comparación de los valores experimentales de índices de retención lineal en columna HP5-MS (LRIe) con los valores reportados en la literatura para compuestos puros (LRI) (Davies, 1990; Adams, 2007); y por comparación de espectros de masa con los respectivos almacenados en bases de datos (McLafferty y Stauffer, 1994; NIST, 1999; Adams, 2007). <sup>d)</sup> perfil obtenido por destilación por arrastre con vapor; (-) no detectado; (tr): trazas (menor a 0,01%). Se destacan en verde los compuestos mayoritarios de cada uno de los extractos volátiles y en azul la fracción mayoritaria.



***B. crispata***. El volatiloma de ésta especie (colecta de otoño) se caracterizó por una abundante presencia de sesquiterpenos oxigenados como espatulenol (**2**; 16,1% en la muestra femenina y 16,4% en la masculina, respectivamente), globulol (**89**; 15,0% y 17,8%), óxido de cariofileno (**1**; 12,7% y 10,8%); acompañados del hidrocarburo monoterpénico  $\beta$ -pineno (**8**; 4,0% y 4,9%, respectivamente) (Tabla 6 y Figura 42).

Al igual que para para casos anteriores (*B. dentata*, *B. milleflora*, *B. ochracea*), por su contenido en espatulenol y óxido de cariofileno, el extracto de ésta especie podría tener aplicaciones farmacológicas (Chavan *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010; Ziaei *et al.*, 2011). Por otra parte, el globulol ha sido descrito como antimicrobiano (Tan *et al.*, 2008). Como componentes minoritarios distintivos de éste perfil, se pueden citar al *m*-tolualdehído (**90**; 0,03% en ambos individuos), (*E*)- $\beta$ -damascenona (**91**; 0,3% y 0,4% en individuos femeninos y masculinos, respectivamente) y (*E,E*)-geranil linalol (**92**; 0,06% y 0,09%) (Tabla 6 y Figura 42).



**Figura 42:** Algunos componentes del volatiloma de *Baccharis crispata*. (**89**) globulol, (**90**) *m*-tolualdehído, (**91**) (*E*)- $\beta$ -damascenona y (**92**) (*E,E*)-geranil linalol.

En el caso de *B. crispata*, se encontraron diferencias cualitativas y cuantitativas entre las expresiones metabólicas de los especímenes masculinos y femeninos (Tabla 6). En los individuos masculinos fueron identificados un mayor número de componentes, por ejemplo, el acetato de carquejilo (**79**; 1,2%) fue identificado solamente en aquellos. Otros componentes minoritarios identificados solamente en el perfil masculino fueron:



*n*-hexanol, fenilacetaldehído, (*E*)- $\beta$ -ocimeno,  $\alpha$ -canfolenal, eugenol,  $\delta$ -cadinol y benzoato de feniletilo (Tabla 6).

Zunino *et al.* (1997) encontraron en el análisis de material vegetal de la provincia de Córdoba (Argentina), un aceite esencial caracterizado por la presencia de (*E*)-nerolidol (27,0%), germacreno D (18,7%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (10,0%),  $\gamma$ -muroleno (6,3%) y  $\zeta$ -cadinol (5,0%).

El estudio de variación de la composición volátil entre diferentes poblaciones de *B. crispa* separadas geográficamente fue realizado por Chaves *et al.* (2014) también en la provincia de Córdoba. El aceite esencial de las diferentes poblaciones se compuso básicamente por germacreno D (13,0% a 29,0%),  $\beta$ -cubebeno (2,6% a 5,6%), (*E*)-nerolidol (1,6% a 4,6%), espatulenol (1,5% a 4,5%), óxido de cariofileno (0,3% a 2,4%) y (*E*)- $\beta$ -cariofileno (1,2% a 2,1%); todo lo cual demuestra la variabilidad existente (Chaves *et al.*, 2014).

Por otra parte, Simões Pires *et al.* (2005a) trabajando sobre material vegetal del sur de Brasil, determinaron una muy importante variación estacional en la composición volátil. Por ejemplo, la presencia de monoterpenos sólo se observó en julio, el espatulenol osciló entre 2,9% y 54,2% del aceite en octubre y agosto, respectivamente; mientras que el  $\alpha$ -selineno no fue detectado en agosto, pero se cuantificó en 24,7% del extracto en octubre.

Todos los trabajos anteriores dan cuenta de una amplia variabilidad en la composición del volatilo de *B. crispa*, que no permite hacer comparaciones fehacientes entre los resultados anteriormente publicados y los presentados en ésta tesis. Lo que plantea la necesidad de evaluar a ésta especie aplicando otro tipo de estrategia de muestreos.

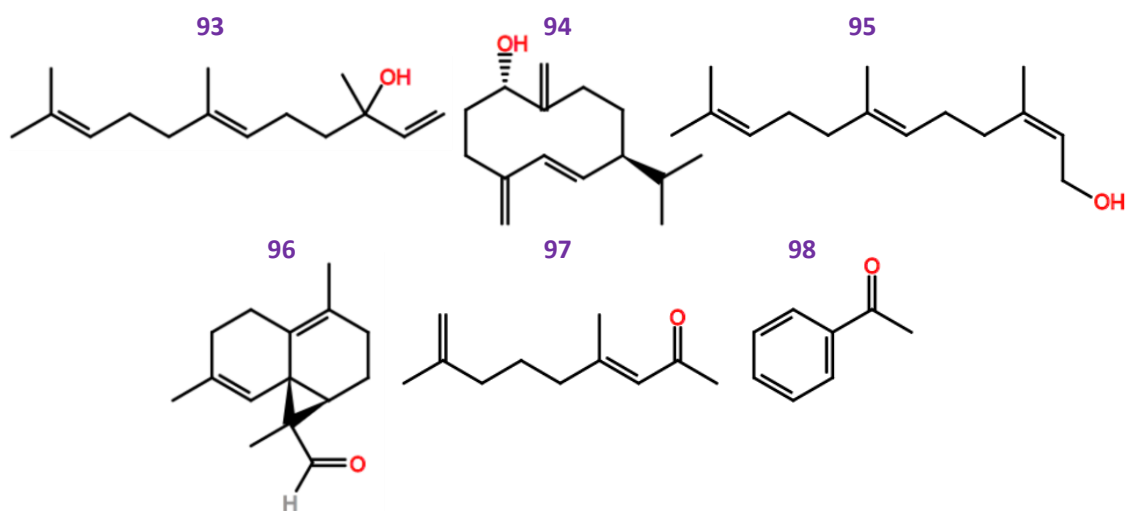
***B. dracunculifolia.*** En lo que respecta a los componentes mayoritarios determinados en ésta especie (colecta de verano), los mismos fueron: (*E*)-nerolidol (**93**, 17,3% en los individuos femeninos y 16,7% en los masculinos, respectivamente),  $\beta$ -pineno (**8**; 10,9% y 10,5%), limoneno (**3**; 8,9% y 9,1%) y espatulenol (**2**, 5,2% y 5,5%, respectivamente) (Tabla 6 y Figura 43).

Se ha demostrado que el contenido de (*E*)-nerolidol de ésta especie es responsable de las propiedades antiulcerogénicas del aceite esencial (Kloppel *et al.*, 2007; Massignani *et al.*, 2009) y de su efecto garrapaticida (Lage *et al.*, 2015). Otras actividades biológicas



importantes de dicho compuesto son como coadyuvante antimicrobiano por desestabilización de la membrana plasmática (Brehm-Stecher y Johnson, 2003), anti-leishmaniasis (Arruda *et al.*, 2005) y anticancerígeno (Wattenberg, 1991), entre otros efectos.

Entre los compuestos minoritarios diferenciales del volatilo de *B. dracunculifolia*, se encuentran: los sesquiterpenos germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol (**94**; 3,1% en la muestra femenina y 2,9% en la masculina, respectivamente), 2,6-(*Z,E*)-farnesol (**95**; 2,8% y 2,1) e *iso*-biciclogermacrenal (**96**; 1,7% y 1,6%); el C<sub>11</sub> derivado terpénico 4,8-dimetilnona-3,8-dien-2-ona (**97**; 0,09 y 0,07) y la acetofenona (**98**; 0,04% en ambos casos) (Tabla 6 y Figura 43).



**Figura 43:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis dracunculifolia*. (**93**) (*E*)-nerolidol, (**94**) germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol, (**95**) 2,6-(*Z,E*)-farnesol, (**96**) *iso*-biciclogermacrenal, (**97**) 4,8-dimetilnona-3,8-dien-2-ona y (**98**) acetofenona.

Como en el caso de la especie anterior, se encontraron para *B. dracunculifolia* diferencias en el perfil volátil de individuos masculinos y femeninos. En el volatilo de los primeros se determinó diferencialmente la presencia de citronelal, *p*-menta-1,5-dien-8-ol, (*E*)- $\beta$ -damascenona y cariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol; mientras que el perfil de las hembras se identificó el compuesto *dihidro*-edulan I (Tabla 6).

El aceite esencial industrial de ésta especie se caracteriza por una importante presencia de (*E*)-nerolidol (12,0%), (5,1%),  $\delta$ -cadineno (4,9%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (4,8%) y  $\beta$ -terpineol (4,0%) (Queiroga *et al.*, 1990). Sin embargo, también puede contener sesquiterpenos oxigenados (por ejemplo, óxidos de cabreuva, óxido de cariofileno e *iso*-



humbertioles) que se forman durante el almacenamiento y destilación (artefactos) (Queiroga *et al.*, 1990).

El estudio comparativo de la composición volátil de poblaciones silvestres de *B. dracunculifolia* de Uruguay, Brasil y Bolivia, muestra que el (*E*)-nerolidol puede desde no ser detectado (en muestras uruguayas trabajadas por Frizzo y colaboradores) hasta encontrarse en un 33,0% de la esencia (Loayza *et al.*, 1995; Kloppel *et al.*, 2007; Frizzo *et al.*, 2008; Schossler *et al.*, 2009; Massignani *et al.*, 2009; Parreira *et al.*, 2010; Lage *et al.*, 2015; Chaaban *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2018; Salazar *et al.*, 2018; Cazella *et al.*, 2019). Asimismo, se han constatado variaciones en el contenido en  $\beta$ -pineno (0,6 a 27,7%), espatulenol (5,3 a 27,4%), germacreno D (0,2 a 21,5%), biciclogermacreno (trazas a 19,2%), limoneno (5,4 a 13,2%),  $\delta$ -cadineno (trazas a 13,0%),  $\alpha$ -pineno (0,5 a 8,0%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (0,4 a 7,7%), viridiflorol (trazas a 5,0%) y  $\alpha$ -muurolol (trazas a 4,7%) (Loayza *et al.*, 1995; Frizzo *et al.*, 2008; Schossler *et al.*, 2009; Massignani *et al.*, 2009; Parreira *et al.*, 2010; Lage *et al.*, 2015; Chaaban *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2018; Salazar *et al.*, 2018; Cazella *et al.*, 2019).

Gran parte de esa variación puede ser atribuida a la incidencia en el metabolismo secundario del sexo de las plantas, del ritmo circadiano, de las condiciones de estrés y de las interacciones planta-insecto, como lo demostraron Ferracini *et al.* (1995). En dicho estudio se encontraron diferencias cuantitativas apreciables en la composición de los aceites esenciales de plantas masculinas y femeninas, por ejemplo, para el  $\alpha$ -pineno (0,1 vs. 1,2%, respectivamente),  $\beta$ -pineno (1,9 vs. 3,8%), limoneno (0,9 vs. 4,7%),  $\beta$ -cadineno (0,1 vs. 1,2%) y (*E*)-nerolidol (12 vs. 20,8%) (Ferracini *et al.*, 1995).

De acuerdo a los trabajos anteriormente referenciados, se puede establecer una coherencia entre la composición del aceite esencial de *B. dracunculifolia* obtenido en éste trabajo con los reportes bibliográficos: importancia de los monoterpenos  $\beta$ -pineno y limoneno, y presencia de porcentaje apreciable de (*E*)-nerolidol. Sin embargo, en la comparación con el volatilo de las muestras anteriormente reportadas de Uruguay (Frizzo *et al.*, 2008), se encuentra una diferencia apreciable, lo que será tratado con más detalle en el capítulo 6 de ésta tesis.

***B. linearifolia.*** La composición volátil de ésta especie (colecta de otoño) demostró ser esencialmente diferente del resto de las estudiadas, ya que junto con los componentes principales  $\alpha$ -pineno (15; 18,0% en la muestra femenina y 25,0% en la masculina,

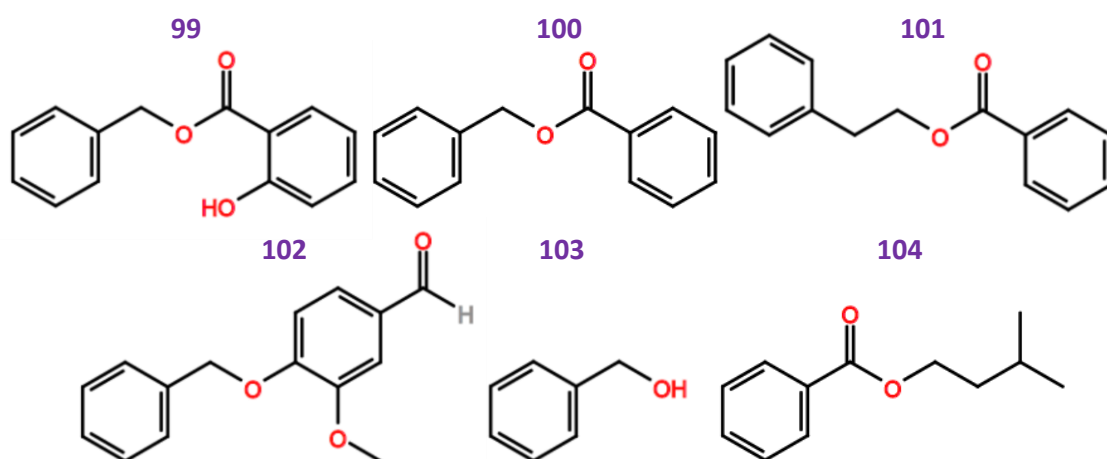




respectivamente) y  $\beta$ -pineno (**8**; 16,7% y 21,6%), se determinó importante presencia de derivados bencenoides como salicilato de bencilo (**99**; 14,3% y 9,3%, respectivamente) y benzoato de bencilo (**100**; 1,5% y 6,9%) (Tabla 6 y Figura 44).

Los mencionados bencenoides son compuestos ampliamente empleados en productos de cuidado personal por su fragancia agradable, por su capacidad de absorción de la radiación UV nociva, y por sus propiedades fijadoras (Charles y Darbre, 2009). Sin embargo, tienen el efecto nocivo de generar actividad estrogénica promotora del cáncer de mama, y se consideran alérgenos para la piel; por lo cual su concentración en los productos dermocosméticos se encuentra reglamentada (Charles y Darbre, 2009).

En menores proporciones se determinaron en *B. linearifolia* otros bencenoides como el benzoato de 2-feniletilo (**101**; 0,03% ambos), la bencil vainillina (**102**; 0,2% y 0,07%) y el alcohol bencílico (**103**; 0,03% en ambos) (Figura 44), demostrando el potencial de la especie para la síntesis de éste tipo de bencenoides poco comunes en plantas.



**Figura 44:** Algunos componentes del volatilo de *Baccharis linearifolia*. (**99**) salicilato de bencilo, (**100**) benzoato de bencilo, (**101**) benzoato de 2-feniletilo, (**102**) bencil vainillina, (**103**) alcohol bencílico y (**104**) benzoato de isoamilo.

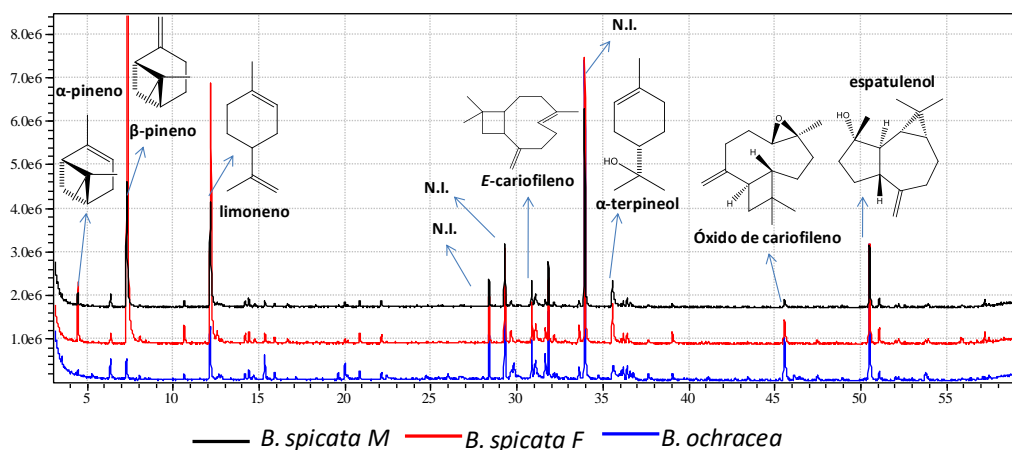
En el perfil volátil de la muestra femenina de *B. linearifolia* fueron identificados más compuestos que en la muestra masculina, entre ellos: 1,8-cineol, (*E*)-hidrato de sabineno, (*E*)-*p*-menta-2,8-dien-1-ol, *p*-metil-acetofenona, carvona,  $\beta$ -malieno, (*E*)- $\alpha$ -bergamoteno, benzoato de isoamilo (**104**; 0,06%), allo-aromadendreno, (*E*)- $\beta$ -farneseno, ledol y epi- $\alpha$ -bisabolol. En el volatilo de los individuos masculinos, sólo fue detectado diferencialmente el  $\beta$ -eudesmol (Tabla 6).



Existe un único reporte de composición del aceite esencial de ésta especie (bajo el sinónimo de *B. rufescens*), realizado con material vegetal de la provincia de Córdoba (Argentina) (Zunino *et al.*, 1998). En el mismo, se reportan los siguientes componentes principales: (*E*)-nerolidol (14,5%), limoneno (14,4%),  $\gamma$ -muroleno (9,9%), germacreno D (8,3%),  $\zeta$ -cadinol (8,1%) y cubenol (5,5%).

De acuerdo a dichos resultados, se evidencia una composición muy diferente a la reportada en éste estudio, lo que podría ser debido a variaciones ambientales, o incluso a que en realidad se traten de especies diferentes dada la amplia variabilidad morfológica de *B. linearifolia* (Giuliano y Plos, 2014).

***B. spicata***. Por último, la composición de *B. spicata* (colecta de otoño) fue muy semejante a la determinada para *B. ochracea* (incluso a nivel de los compuestos no identificados por GC-MS), presentando un perfil con la predominancia de: espatulenol (**2**; 18,9% en los individuos femeninos y 24,0% en los masculinos, respectivamente),  $\beta$ -pineno (**8**; 20,1% y 5,9%), óxido de cariofileno (**1**; 9,9% y 9,6%) y limoneno (**3**; 8,5% y 5,1%, respectivamente) (Tabla 6). La similitud entre dichos perfiles cromatográficos puede evidenciarse en la Figura 45. A pesar de lo anterior, dichas especies pertenecen a clasificaciones infragenéricas diferentes: subgénero *Baccharis*, sección *Spicatae* (*B. spicata*); y subgénero *Tarchonanthoides*, sección *Coridifoliae* (*B. ochracea*) (Giuliano, 2005; Giuliano y Freire, 2011).

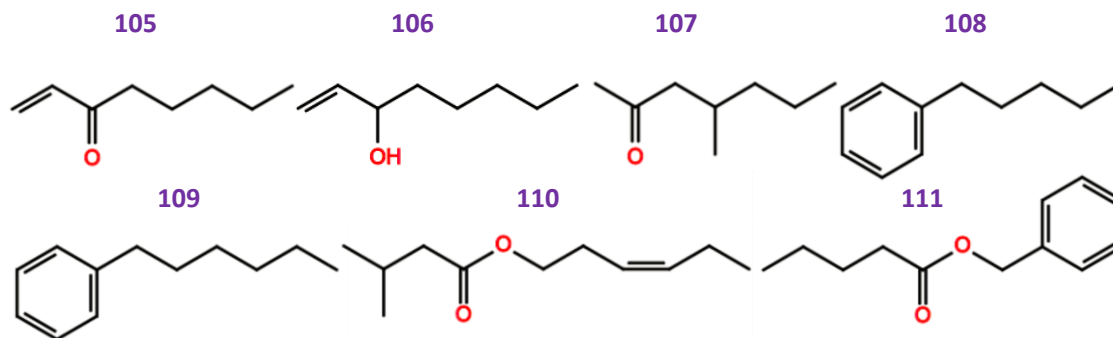


**Figura 45:** Perfiles volátiles en GC-MS de *B. spicata* masculino (negro) y femenino (rojo), y de *B. ochracea* (azul). Obsérvese que el pico mayoritario no fue identificado (NI). Perfil realizado en columna de fase estacionaria polar (polietilenglicol).

Respecto de la composición minoritaria diferencial de ésta especie, se encontraron: 1-octen-3-ona (**105**; 0,01% y trazas, en los individuos femeninos y masculinos,



respectivamente), 1-octen-3-ol (**106**; 0,01% y 0,02%), 4-metil-2-heptanona (**107**; 0,01% en ambos sexos), amilbenceno (**108**; 0,01% y 0,02%), hexilbenceno (**109**; 0,01% y 0,05%), isovalerato de 3-(Z)-hexenilo (**110**; 0,03 en ambos) y valerato de bencilo (**111**; 0,01% y trazas) (Tabla 6 y Figura 46).



**Figura 46:** Algunos componentes del volatiloma de *Baccharis spicata*. (**105**) 1-octen-3-ona, (**106**), 1-octen-3-ol, (**107**) 4-metil-2-heptanona, (**108**) amilbenceno, (**109**) hexilbenceno, (**110**) isovalerato de 3-(Z)-hexenilo y (**111**) valerato de bencilo.

Como en los casos anteriores, hubo diferencias entre el volatiloma masculino y el femenino de *B. spicata*: por ejemplo, en el primero se determinaron exclusivamente  $\beta$ -isoforona, *m*-cimen-8-ol,  $\delta$ -elemeno y  $\alpha$ -copaen-11-ol; mientras que en del segundo perfil fueron exclusivos: (Z)-hidrato de sabineno,  $\alpha$ -canfolenal, decanal y undecanal (Tabla 6).

En cuanto a estudios anteriores sobre la composición volátil de ésta especie, Retta *et al.* (2009) trabajaron con material vegetal colectado en Santa Fe y Corrientes (Argentina), obteniendo resultados semejantes a éste trabajo, con los siguientes compuestos mayoritarios:  $\beta$ -pineno (7,1-26,0%), espatulenol (13,1-18,7%), óxido de cariofileno (3,6-15,1%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (7,7-8,3%) y limoneno (4,4-8,1%).

Además, existe en bibliografía un estudio de química ecológica, en donde se demostró que el perfil volátil (captado mediante *SPME*) cambia como consecuencia de la formación de agallas foliares por parte de insectos psílidos (Damasceno *et al.*, 2008; Damasceno *et al.*, 2010), lo que indicaría la existencia de una inducción por daño.

Este último trabajo representa un aporte relevante a la discusión sobre el estudio del volatiloma en plantas creciendo en condiciones no controladas, ya que las mismas se encuentran interactuando continuamente con el medio ambiente circundante, por lo que



su composición no es estática sino altamente dinámica. Es por ello que en los trabajos con éste tipo de material vegetal se debe de prestar mucha atención en el muestreo, y si se ven signos claros de deterioro de las estructuras vegetales (como agallas, necrosis, manchas, signos de alimentación de animales, etc.) se debe descartar la muestra debido a que la misma puede generar una composición que no sea representativa de la población, con sus consiguientes sesgos (Bicchi y Maffei, 2012).

#### 4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

A lo largo de éste capítulo se presentó el estudio del volatilo de 19 especies del género *Baccharis* L., y se estableció el empleo de herramientas de estadística multivariada para comparar dichos perfiles en un caso concreto de estudio.

A partir de los resultados obtenidos, se pudo comprobar una gran riqueza y variedad de compuestos volátiles biosintetizados por éstas especies, con gran potencial de aplicación en múltiples áreas (farmacología, cosmética, agricultura).

La prospección fitoquímica realizada en éste trabajo es de importancia como información de base para posteriores investigaciones sobre el género *Baccharis* L en el Uruguay, ya que el mismo se encuentra representado por más de 50 especies nativas en el país.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

1. M.J. Abad, P. Bermejo. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7: 76-96.
2. A.L. Aboy, M.A. Apel, S. Debenedetti, L. Francescato, M.A. Rosella, A.T. Henriques. 2012. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1219: 147-153.
3. R.P. Adams. 2007. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 804 pp.
4. F. Agostini, A.C.A. Santos, M. Rossato, M.R. Pansera, F. Zattera, R. Wasum, L. Atti-Serafini. 2005. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Braz. J. Pharmacogn.*, 15: 215-220.
5. I.J. Agudelo, S.A. Isolabella, R. Filip, M.L. Wagner, R.A. Ricco. 2016. *Baccharis spicata* (Lam.) Baill: Polyphenol screening, determination of their antioxidant activity and their main polyphenolic metabolites. *J. Pharmacogn. Phytochem.*, 5: 278-285.
6. I. Agudelo, L. Cogoi, R. Filip, N. Kuzmanich, M.L. Wagner, R.A. Ricco. 2018. Anatomy, histochemistry, and comparative analysis of hydroxycinnamic derivatives in healthy leaves and galls induced by *Baccharopelma* spp. (Hemiptera: Psyllidae) in *Baccharis spicata* (Lam) Baill (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 77: 22-30.
7. L.E. Alcaráz, L.S. Favier, V. Cianchino, C. Tonn, A. Laciari. 2012. Investigation of Argentinean plant extracts for their antibacterial activity. *J. Life Sci.*, 6: 892-897.



8. E. Alonso, R. Beyhaut, L. Delfino, F. Haretche, C. Fagúndez, E. Marchesi. **2009**. Especies de plantas vasculares prioritarias para la conservación. Proyecto Fortalecimiento del Proceso de Implementación del Sistema Nacional de Áreas Protegidas (URU/05/001). DINAMA, Montevideo, Uruguay. 93 pp.
9. A. Altesor, M. Oesterheld, E. Leoni, F. Lezama, C. Rodríguez. **2005**. Effect of grazing on community structure and productivity of a Uruguayan grassland. *Plant Ecol.*, 179: 83-91.
10. N. Alvarenga, C. Burgos, I. Villalba, V. Giménez, M.M. Carpinelli, P.H. Sotelo, A. Cáceres, P. Langjahr. **2018**. Extractos vegetales de tres especies del género *Baccharis* inducen la proliferación de células mononucleares humanas. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud*, 16: 12-20.
11. S.A.V. Alvarenga, M.J.P. Ferreira, V.P. Emerenciano, D. Cabrol-Bass. **2001**. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 56: 27-37.
12. M.M. Alves. **2010**. Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata* e da *B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. 69 pp.
13. K.F. Alves, F.H. Caetano, I.J.P. Garcia, H.L. Santos, D.B. Silva, J.M. Siqueira, A.S. Tanaka, S.N. Alves. **2018**. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). *Environ Sci Pollut Res.*, 25: 31718-31726.
14. C.A. Anesini, C. Pérez. **1993**. Screening of plants used in Argentine folk medicine for antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.*, 39: 119-128.
15. D.C. Arruda, F.L. D'Alexandri, A.M. Katzin, S.R.B. Uliana. **2005**. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49: 1679-1687.
16. J. Ascari, S.L. Sens, D.S. Nunes, A. Wisniewski Jr., M.D. Arbo, V.M. Linck, P. Lunardi, M.B. Leal, E. Elisabetsky. **2012**. Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella*. *Pharm. Biol.*, 50: 113-119.
17. J. Ascari, M.S. de Oliveira, D.S. Nunes, D. Granato, D.R. Scharf, E. Simionatto, M. Otuki, B. Soley, G. Heiden. **2019**. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, 234: 1-7.
18. T.F. Bachiega, J.P.B. de Sousa, J.K. Bastos, J.M. Sforcin. **2013**. Immunomodulatory/anti-inflammatory effects of *Baccharis dracunculifolia* leaves. *Nat. Prod. Res.*, 27: 1646-1650.
19. A.L. Bandoni, J.E. Medina, R.V.D. Rondina, J.D. Coussio. **1978**. Genus *Baccharis* L. I: Phytochemical Analysis of a non-Polar fraction from *B. crispa* Sprengel. *Planta Med.*, 34: 328-331.
20. I.F. Barreto, J. Padilha de Paula, P.V. Farago, M.R. Duarte, J.M. Budel. **2015**. Pharmacobotanical Study of the Leaves and Stems of *Baccharis ochracea* Spreng. for Quality Control. *Lat. Am. J. Pharm.*, 34: 1497-1502.
21. G.M. Barroso. **1976**. Compositae. Subtribo Baccharidinae Hoffmann. Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguesia*, 40: 3-273.
22. L. Bauer, G.A.A.B. Silva, N.C.S. de Siqueira, C.T.M. Bacha, B.M.S. Sant'Ana. **1978**. Os óleos essenciais de *Baccharis genistelloides* Pers. do Rio Grande do Sul. *Rev. Centr. Cienc. Saúde*, 6: 7-12.
23. M.A. Besten, V.C.G. Jasinski, A.G.L.C. Costa, D.S. Nunes, S.L. Sens, A. Wisniewski Jr., E.L. Simionatto, D. Riva, J.B. Dalmarco, D. Granato. **2012**. Chemical Composition Similarity between the Essential Oils Isolated from Male and Female Specimens of Each Five *Baccharis* Species. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23: 1041-1047.
24. M.A. Besten, D.S. Nunes, A. Wisniewski Jr., S.L. Sens, D. Granato, E.L. Simionatto, D.R. Scharf, J.B. Dalmarco, N.I. Matzenbacher. **2013**. Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of Southern Brazil: a comparative study using chemometrics. *Quím. Nova*, 36: 1096-1100.
25. M.A. Besten, D.S. Nunes, D. Granato, S.L. Sens, A. Wisniewski Jr., E.L. Simionatto, D.R. Scharf. **2014**. Chemical Composition of Essential Oils from Cladodes and Inflorescences from Male and Female Specimens of *Baccharis milleflora*. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 17: 899-905.
26. C. Bicchi, M. Maffei. **2012**. The Plant Volatilome: Methods of Analysis. In: J. Normanly (ed.): High-Throughput Phenotyping in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 918. Springer Science + Business Media LLC, New York, NY, USA; pp. 289-310.
27. J.P. Biolley, M. Jay, J.P. Barbe. **1992**. Chemometric approach (flavonoids) in an automatic recognition of modern rose cultivars. *Biochem. Syst. Ecol.*, 20: 697-705.
28. T.M.A. Biondo, M.M. Tanae. E.D. Coletta, M.T.R. Lima-Landman, A.J. Lapa, C. Souccar. **2011**. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extracts and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. *J. Ethnopharmacol.*, 136: 368-373.



29. V.B. Bobek, J.M. Budel, T. Nakashima. 2015. Contribuição para o estudo farmacobotânico de *Baccharis*: *B. cultrata* Baker. *Visão Acadêmica*, 16: 18-29.
30. V.B. Bobek, G. Heiden, C.F. de Oliveira, V. Paes de Almeida, J.P. de Paula, P.V. Farago, T. Nakashima, J.M. Budel. 2016. Comparative analytical micrographs of “vassouras” (*Baccharis*, Asteraceae). *Braz. J. Pharmacogn.*, 26: 665-672.
31. B.M. Bocco, G.W. Fernandes, F.B. Lorena, R.M. Cysneiros, M.A. Christoffolete, S.S. Grecco, C.L. Lancellotti, P. Romoff, J.H.G. Lago, A.C. Bianco, M.O. Ribeiro. 2016. Combined treatment with caffeic and ferulic acid from *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae) protects against metabolic syndrome in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 49: e5003: 1-7.
32. C.A. Bogo, M.H. de Andrade, J.P. de Paula, P.V. Farago, P.M. Döll-Boscardin, J.M. Budel. 2016. Comparative analysis of essential oils of *Baccharis* L.: a review. *Revista Stricto Sensu*, 1: 1-11.
33. J.C. Borella, D.P. Duarte, A.A.G. Novaretti, A. Menezes Jr., S.C. França, C.B. Rufato, P.A.S. Santos, R.C.S. Veneziani, N.P. Lopes. 2006. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Braz. J. Pharmacogn.*, 16: 557-561.
34. J. Borgo, C.A.G. Xavier, D.J. Moura, M.F. Richter, E.S. Suyenaga. 2010. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonoides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. *Braz. J. Pharmacogn.*, 20: 12-17.
35. B.F. Brehm-Stecher, E.A. Johnson. 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to Antibiotics by the Sesquiterpenoids Nerolidol, Farnesol, Bisabolol and Apitone. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47: 3357-3360.
36. B. Brown, J.M. Hart, M.P. Wescott, N.W. Christensen. 2003. The Critical Role of Nutrient Management in Mint Production. *Better Crops*, 87: 9-11.
37. J.M. Budel, M.R. Duarte, C.A.M. Santos, L.M. Cunha. 2003. Macro and microscopical identification of four species of *Baccharis* from Trimeria group. *Braz. J. Pharmacogn.*, 13: 42-43.
38. J.M. Budel, M.R. Duarte. 2008. Estudo farmacobotânico de folha e caule de *Baccharis uncinella* DC., Asteraceae. *Lat. Am. J. Pharm.*, 27: 740-46.
39. J.M. Budel, M.R. Duarte, P.M. Döll-Boscardin, P.V. Farago, N.I Matzenbacher, A. Sartoratto, B.H.L.N.S. Maia. 2012. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. *J. Essent. Oil Res.*, 24: 19-24.
40. J.M. Budel, V. Raman, L.M. Monteiro, V.P. Almeida, V.B. Bobek, G. Heiden, I.J.M. Takeda, I.A. Khan. 2018a. Foliar anatomy and microscopy of six Brazilian species of *Baccharis* (Asteraceae). *Microsc. Res. Tech.*, 81: 832-842.
41. J.M. Budel, M. Wang, V. Raman, J. Zhao, S.I. Khan, J.U. Rehman, N. Techen, B. Tekwani, L.M. Monteiro, G. Heiden, I.J.M. Takeda, P.V. Farago, I.A. Khan. 2018b. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. *Molecules*, 23, 2620: pp. 1-19.
42. A.C.T. Campos, L.L. Radunz, A.L. Radunz, M.A. Scariot, F.J. Reichert, S.L. Ecker, A.J. Mossi. 2013. Bioatividade do óleo essencial de *Baccharis articulata* sobre *Acanthoscelides obtectus* em grãos de feijão. *Cadernos de Agroecologia*, 8: 1-5.
43. C.A. Caneschi, F.J. Martins, D.G. Larrude, E.C. Romani, M.A.F. Brandão, N.R.B. Raposo. 2015. In vitro antifungal activity of *Baccharis trimera* Less (DC) essential oil against Dermatophytes. *Trop. J. Pharm. Res.*, 14: 2083-2089.
44. L.N. Cariddi, F.M. Escobar, M.C. Sabini, C.V. Torres, J.A. Zygadlo, L.I. Sabini. 2010. First approaches in the study of cytotoxic and mutagenic damage induced by cold aqueous extract of *Baccharis articulata* on normal cells. *Molec. Med. Chem.*, 21: 4-7.
45. L. Cariddi, F. Escobar, C. Sabini, C. Torres, A.C. Reinoso, A. Cristofolini, L. Comini, S. Núñez Montoya, L. Sabini. 2012. Apoptosis and mutagenicity induction by a characterized aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) on normal cells. *Food Chem. Toxicol.*, 50: 155-161.
46. M. Casagrande, J. Zanela, A. Wagner Júnior, C. Busso, J. Wouk, G. Iurkevicz, P.F. Montanher, F. Yamashita, C.R.M. Malfatti. 2018. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of *Baccharis dracunculifolia*: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. *Ind. Crops Prod.*, 125: 207-219.
47. E. Castiñeira Latorre, C. Fagúndez, E. da Costa, A. Canavero. 2013. Composition and vegetation structure in a system of coastal dunes of the “de la Plata” river, Uruguay: a comparison with Legrand’s descriptions (1959). *Braz. J. Bot.*, 36: 9-23.
48. L.N. Cazella, J. Glamoclija, M. Soković, J.E. Gonçalves, G.A. Linde, N.B. Colauto, Z.C. Gazim. 2019. Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) Aerial Parts at Flowering Period. *Front Plant Sci.*, 10: Article 27, pp. 1-9.



49. J.P. Ceñal, O.S. Giordano, P.C. Rossomando, C.E. Tonn. **1997**. Neoclerodane Diterpenes from *Baccharis crispa*. *J. Nat. Prod.*, 60: 490-492.
50. S.H. Cestari, J.K. Bastos, L.C. Di Stasi. **2011**. Intestinal anti-inflammatory activity of *Baccharis dracunculifolia* in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 524349.
51. V.S. Cezarotto. **2009**. Influência da sazonalidade nos constituintes químicos, atividade antimicrobiana e antioxidante das partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. e *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa María, Santa María, Brasil. 98 pp.
52. A. Chaaban, C.E.N. Martins, L.C. Bretanha, G.A. Micke, A.R. Carrer, N.F. Rosa, L. Ferreira, M.B. Molento. **2018**. Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Nat. Prod. Res.*, 32: 2954-2958.
53. A.K. Charles, P.D. Darbre. **2009**. Oestrogenic activity of benzyl salicylate, benzyl benzoate and butylphenylmethylpropional (Lilial) in MCF7 human breast cancer cells *in vitro*. *J. Appl. Toxicol.*, 29: 422-434.
54. M.J. Chavan, P.S. Wakte, D.B. Shinde. **2010**. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine*, 17: 149-151.
55. C. Chaverri, J.F. Cicció. **2017**. Essential oils of *Baccharis trinervis* (Asteraceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 65: 1307-1321.
56. A.G. Chaves, L.E. Torres, Y. Massuh, P. Brunetti, S.F. Ocaño, N.E. Castillo, J.A. Bustos, M.S. Ojeda. **2010**. Phenotypic variability of four wild populations of *Baccharis crispa* Spreng. mountains area of the Province of Córdoba, Argentina. *Molec. Med. Chem.*, 21: 8-10.
57. A.G. Chaves, P.C. Brunetti, Y. Massuh, S.F. Ocaño, L.E. Torres, M.S. Ojeda. **2014**. Variabilidad entre poblaciones silvestres de *Baccharis crispa* Spreng. de la Provincia de Córdoba, Argentina. *Phyton*, 83: 145-153.
58. F. Chialva, G. Doglia. **1990**. Essential oil from Carqueja (*Baccharis genistelloides* Pers.). *J. Essent. Oil Res.*, 2: 173-177.
59. D.A. Cifuentes, M.J. Simirgiotis, L.S. Favier, A.E. Rotelli, L.E. Pelzer. **2001**. Antiinflammatory activity from aerial parts of *Baccharis medullosa*, *Baccharis rufescens* and *Laennecia sophiifolia* in mice. *Phytoter. Res.*, 15: 529-531.
60. P. Claesson, P. Rådström, O. Sköld, A. Nilsson, Höglund. **1992**. Bactericidal effect of the sesquiterpene  $\tau$ -cadinol on *Staphylococcus aureus*. *Phytoter. Res.*, 6: 94-98.
61. A. Cortadi, O. Di-Sapio, J. Mccargo, A. Scandizzi, S. Gattuso, M. Gattuso, M. **1999**. Anatomical studies of *Baccharis articulata*, *Baccharis crispa* and *Baccharis trimera*, "Carquejas" used in folk medicine. *Pharm. Biol.*, 37: 357-365.
62. P. Costa, T. Boeing, L.B. Somensi, B.J. Cury, V.L. Espíndola, T.C.S. França, M.O. de Almeida, C. Arruda, J.K. Bastos, L.M. da Silva, S.F. de Andrade. **2019**. Hydroalcoholic extract from *Baccharis dracunculifolia* recovers the gastric ulcerated tissue, and *p*-coumaric acid is a pivotal bioactive compound to this action. *BioFactors*, 45: 479-489.
63. A.R.H. da Silva, L.Q.S. Lopes, G.B. Cassanego, P.R. de Jesus, K.C. Figueredo, R.C.V. Santos, G.H.H. Lopes, L.d.F. Bauermann. **2018**. Acute toxicity and antimicrobial activity of leaf tincture *Baccharis trimera* (Less). *Biomed. J.*, 41: 194-201.
64. A.A. da Silva Filho, P.C.P. Bueno, L.E. Gregório, M.L.A. Silva, S. Albuquerque, J.K. Bastos. **2004**. *In vitro* tripanocidal activity evaluation of crude extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *J. Pharm. Pharmacol.*, 56: 1195-1199.
65. A.A. da Silva Filho, J.P.B. Sousa, S. Soares, N.A.J.C. Furtado, M.L.A. Silva, W.R. Cunha, L.E. Gregório, N.P.D. Nanayakkara, J.K. Bastos. **2008**. Antimicrobial activity of the extract and isolated compounds from *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). *Z. Naturforsch.*, 63c: 40-46.
66. A.A. da Silva Filho, D.O. Resende, M.J. Fukui, F.F. Santos, P.M. Pauletti, W.R. Cunha, M.L.A. Silva, L.E. Gregório, J.K. Bastos, N.P.D. Nanayakkara. **2009**. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). *Fitoterapia*, 80: 478-482.
67. A.L. de Gasper, A. Uhlmann, L. Sevegnani, L. Meyer, D.V. Lingner, M. Verdi, A. Stival-Santos, M. Sobral, A.C. Vibrans. **2014**. Floristic and forest inventory of Santa Catarina: species of evergreen rainforest. *Rodriguesia*, 65: A1-A66.
68. C.B. de Oliveira, L.N. Comunello, A. Lunardelli, R.H. Amaral, M.G.S. Pires, G.L. da Silva, V. Manfredini, C.R. Vargas, S.C.B. Gnoatto, J.R. de Oliveira, G. Gosmann. **2012**. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules*, 17: 1113-1123.



69. C.B. de Oliveira, L.N. Comunello, E.S. Maciel, S.R. Giubel, A.N. Bruno, E.C.F. Chiela, G. Lenz, S.C.B. Gnoatto, A. Buffon, G. Gosmann. **2013**. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. *Molecules*, 18: 11022-11032.
70. M.J.A. de Oliveira, T. Forghieri, P. Romoff, M.J.P. Ferreira, O.A. Fávero, J.H.G. Lago, F.O.S. Buturi. **2010**. Diterpenos ent-caurânicos isolados das folhas de *Baccharis microdonta* DC. (Asteraceae). 33 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP.
71. S. de Oliveira, G.A. de Souza, C.R. Eckert, T.A. Silva, E.S. Sobral, O.A. Fávero, M.J.P. Ferreira, P. Romoff, W.J. Baader. **2014**. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. *Quím. Nova*, 37: 497-503.
72. J. Dai, R. Suttisri, E. Bordas, D.D. Soejarto, D. Kinghorn. **1993**. Clerodane diterpenoids from *Baccharis articulata*. *Phytochemistry*, 34: 1087-1090.
73. M.S. dos Santos, J. da Silva, A.P.S. Menezes, F.M.C. de Barros, M.L.B. Lemes, R.R. Rossatto, C. Feistel, I.D. de Almeida, I. Grivicich, L. Prado, J.N. Picada, A.d.B.F. Ferraz. **2018**. Biotoxicological analyses of trimeroside from *Baccharis trimera* using a battery of *in vitro* test systems. *Oxid. Med. Cell. Long.*, Article ID 7804135.
74. F.C. Damasceno, K.P. Nicolli, G.L.G. Soares, C.A. Zini CA. **2008**. Analysis of volatile compounds of leaves and galls of *Schinus polygamus* and *Baccharis spicata* by headspace solid-phase microextraction. *Anal. Lett.*, 41: 1658-1673.
75. F.C. Damasceno, K.P. Nicolli, E.B. Caramão, G.L.G. Soares, C.A. Zini. **2010**. Change in the volatile organic profile of *Schinus polygamus* (Anarcadiaceae) and *Baccharis spicata* (Asteraceae) induced by galling psyllids. *J. Braz. Chem. Soc.*, 21: 556-563.
76. N.W. Davies. **1990**. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A*, 503: 1-24.
77. S.L. Debenedetti, P.S. Palacios, E.G. Wilson, J.D. Coussio. **1993**. HPLC analysis of caffeoylquinic acids contents in Argentine medicinal plants. *Acta Hort.*, 333: 191-199.
78. M.P. Dias, R.M. Nozari, E.R. Santarém. **2017**. Herbicidal activity of natural compounds from *Baccharis* spp. on the germination and seedlings growth of *Lactuca sativa* and *Bidens pilosa*. *Allelopathy J.*, 42: 21-36.
79. H.J.D. Dorman, S.G. Deans. **2000**. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.*, 88: 308-316.
80. L.S. Duarte, M.M.G. Dos Santos, S.M. Hartz, V.D. Pillar. **2006**. Role of nurse plants in Araucaria Forest expansion over grassland in south Brazil. *Austral Ecol.*, 31: 520-528.
81. M.A. Elechosa, P.D.L. Lira, M.A. Juárez, C.I. Viturro, C.I. Heit, A.C. Molina, A.J. Martínez, S. López, A.M. Molina, C.M. van Baren, A.L. Bandoni. **2017**. Essential oil chemotypes of *Aloysia citrodora* (Verbenaceae) in Northwestern Argentina. *Biochem. Syst. Ecol.*, 74: 19-29.
82. K.C. Fabiane, R. Ferronato, A.C. dos Santos, S.B. Onofre. **2008**. Physicochemical characteristics of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Braz. J. Pharmacogn.*, 18: 197-203.
83. J.M. Facchinetto, S.B. Tedesco. **2009**. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos aquosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle e *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 11: 360-367.
84. C. Fagúndez, F. Lezama. **2005**. Distribución Espacial de la Vegetación Costera del Litoral Platense y Atlantico Uruguayo. Informe Freplata. 36 pp. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/242537095\\_Distribucion\\_Espacial\\_de\\_la\\_Vegetacion\\_Costera\\_del\\_Litoral\\_Platense\\_y\\_Atlantico\\_Uruguayo](https://www.researchgate.net/publication/242537095_Distribucion_Espacial_de_la_Vegetacion_Costera_del_Litoral_Platense_y_Atlantico_Uruguayo).
85. F. Faini, C. Labbe, M.I. Polanco. **1992**. Diterpenoids from *Baccharis neaei*. *Phytochemistry*, 31: 3274-3276.
86. Farmacopea Nacional Argentina VI ed. **1978**. Codex Medecamentarius Argentino, Buenos Aires, pp. 213-215.
87. [Farmacopea Brasileira], Vol. 2. Monografias, 5ª edição, **2010**. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz. Brasília, Brasil; pp. 744-747.
88. E.C. Fernández, Y.E. Sandi, L. Kokosha. **2003**. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Province of the Potosi Department, Bolivia. *Fitoterapia*, 74: 407-416.
89. V. L. Ferracini, L.C. Paraíba, H.L. Leitão Filho, A.G. da Silva, L.R. Nascimento, A.J. Marsaioli. **1995**. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *J. Essent. Oil Res.*, 7: 355-367.
90. C.G.T. Ferreira, M.G. Campos, D.M. Felix, M.R. Santos, O.V. de Carvalho, M.A.N. Diaz, J.L. R. Fietto, G.C. Bressan, A. Silva-Júnior, M.R. de Almeida. **2018**. Evaluation of the antiviral activities of *Baccharis dracunculifolia* and quercetin on Equid herpesvirus 1 in a murine model. *Res. Vet. Sci.*, 120: 70-77.





91. R. Ferronato, E.D. Marchesan, F. Bednarski, S.M. Alencar, S.B. Onofre. **2006**. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 10: 67-70.
92. R. Ferronato, E.D. Marchesan, E. Pezenti, F. Bednarski, S.B. Onofre. **2007**. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Braz. J. Pharmacogn.*, 17: 224-230.
93. A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, J.J.C. Scheffer. **2008**. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.*, 23: 213-226.
94. A.S.G. Figueiredo-Rinhel, L.M. Kabeya, P.C.P. Bueno, R.F. Jorge-Tiossi, A.E.C.S. Azzolini, J.K. Bastos, Y.M. Lucisano-Valim. **2013**. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.*, 150: 655-664.
95. A.S.G. Figueiredo-Rinhel, L.L. de Melo, L.O. Bortot, E.O.L. Santos, M.F. Andrade, A.E.C.S. Azzolini, L.M. Kabeya, A. Caliri, J.K. Bastos, Y.M. Lucisano-Valim. **2017**. *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) selectively modulates the effector functions of human neutrophils. *J. Pharm. Pharmacol.*, 69: 1829-1845.
96. A. Florão, J.M. Budel, M. Do Rocio Duarte, A. Marcondes, R.A.F. Rodrigues, M.V.N. Rodrigues, C.A.D.M. Santos, A.M. Weffort-Santos. **2012**. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. *J. Essent. Oil Res.*, 24: 561-570.
97. S.E. Freire, E. Urtubey, D.A. Giuliano. **2007**. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*, 29: 23-38.
98. C.D. Frizzo, L.A. Serafini, E. Dellacassa, D. Lorenzo, P. Moyna. **2001**. Essential oil of *Baccharis uncinella* DC. from Southern Brazil. *Flavour Fragr. J.*, 16: 286-288.
99. C.D. Frizzo, L. Atti-Serafini, S. Etcheverrigaray, E. Cassel, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2008**. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour Fragr. J.*, 23: 99-106.
100. F. Fullas, R.A. Hussain, H.B. Chai, J.M. Pezzuto, D.D. Soejarto, A.D. Kinghorn. **1994**. Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*. *J Nat. Prod.*, 57: 801-807.
101. O. Gallardo, C. Tonn, M. Nieto, G. Morales, O. Giordano. **1996**. Bioactives neo-clerodane diterpenoids toward *Tenebrio molitor* larvae from *Teucrium nudiculae* H. and *Baccharis spicata* (Lam.) Beill. *Nat. Prod. Lett.*, 8: 189-197.
102. D. Garcia, P.S.S Da Silva, M.R. Furlan, M.T.C. Isobe, M.O.M. Marques, L.C. Ming. **2017**. Effect of organic fertilizer doses on the plant growth, essential oil production and chemical substances of "carqueja" over two harvest moments. *J. Agri. Sci. Technol.*, 7: 114-124.
103. D. Garcia, M.R. Furlan, L.C. Ming. **2018**. *Baccharis trimera* (Less.) DC. In: U. Albuquerque, U. Patil, A. Máthé (eds.) Medicinal and Aromatic Plants of South America. Medicinal and Aromatic Plants of the World, Vol 5. Springer, Dordrecht. pp: 129-138.
104. F.A.dO. Garcia, M.M. Tanae, L.M.B. Torres, A.J. Lapa, M.T.R. de Lima-Landman, C. Souccar. **2014**. A comparative study of two clerodane diterpenes from *Baccharis trimera* (Less.) DC. on the influx and mobilization of intracellular calcium in rat cardiomyocytes. *Phytomedicine*, 21: 1021-1025.
105. P. Gautreau, F. Lezama. **2009**. Clasificación florística de los bosques y arbustales de las sierras del Uruguay. *Ecología Austral*, 19: 81-92.
106. G.T. Gelatti, A.C. Tissiani, M.S. Mayer, T. Felippin, D.M. Gewehr, J. Koefender, E.M. Berlezi, D.P. Golle, R.C. Horn. **2018**. *In vitro* antioxidant potential of *Baccharis trimera* and *Baccharis articulata* infusions in postmenopausal women. *Int. J. Inn. Educ. Res.*, 6: 99-112.
107. R.M. Gené, E. Marín, T. Adzet. **1992**. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of three species of the genus *Baccharis*. *Planta Med.*, 58: 565-566.
108. R.M. Gené, C. Cartañá, T. Adzet, E. Marín, T. Parella, S. Cañigüeral. **1996**. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: identification of its Active Constituents. *Planta Med.*, 62: 232-235.
109. D.A. Giuliano. **2001**. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 39: 131-154.
110. D.A. Giuliano. **2005**. New infragenera in *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Novon*, 15: 534-541.
111. D.A. Giuliano, S.E. Freire. **2011**. Nuevas secciones en *Baccharis* (Asteraceae, Astereae) de América del Sur. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 98: 331-347.
112. D.A. Giuliano, A. Plos. **2014**. *Baccharis* L. En: F. Zuloaga, M. Belgrano, A.M. Antón (eds.): Flora vascular de la República Argentina 7(1): Dicotyledoneae-Asteraceae (Anthemideae a Gnaphalieae), 1era edición. Instituto de Botánica Darwinion, Buenos Aires; pp. 43-123.



113. L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, 30: 374-381.
114. M.A. Gómez, I. Miguez, M. Caggiani, X. Arias, M. Laprovitera, F. Blanco, M.V. Cesio, E.R. Migliaro, H. Heinzen. 2016. Vasorelaxant Effect of a *Baccharis trimera* infusion on precontracted rat aortic rings. *Nat. Prod. Commun.*, 11: 283-286.
115. M.D. González, C.M. Luis. 2018. Estudio químico de *Baccharis punctulata* DC. *Dominguezia*, 34: 31-36.
116. M.D. González. 2019. Chemical composition of the leaf oil from *Baccharis punctulata* DC. at two phenological stages. *J. Essent. Oil Res.*, in press. DOI: 10.1080/10412905.2019.1612472.
117. S. Grecco, L. Gimenes, M.J.P. Ferreira, P. Romoff, O.A. Favero, C.A. Zalewski, J.H.G. Lago. 2010. Triterpenoids and phenolic derivatives from *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 38: 1234-1237.
118. S.d.S. Grecco, M.J. Félix, J.H. Lago, E.G. Pinto, A.G. Tempone, P. Romoff, M.J. Ferreira, P. Sartorelli. 2014. Anti-trypanosomal phenolic derivatives from *Baccharis uncinella*. *Nat. Prod. Commun.*, 9: 171-173.
119. N.S.S. Guimarães, J.C. Melo, J.S. Paiva, P.C.P. Bueno, A.A. Berretta, R.J. Torquato, I.L. Nantes, T. Todrigues. 2012. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food Chem. Toxicol.*, 50: 1091-1097.
120. J.D. Haag, M.J. Lindstrom, M.N. Gould. 1992. Limonene-induced regression of mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 52: 4021-4026.
121. G. Heiden, J.R.V. Iganci, V.L. Bobrowski, L. Macias. 2007. Biogeografia de *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 58: 787-796.
122. G. Heiden, J.R.V. Iganci, L. Macias. 2009. *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 60: 943-983.
123. G. Heiden, J.R. Pirani. 2016a. Novelties towards a phylogenetic infrageneric classification of *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Phytotaxa*, 289: 285-290.
124. G. Heiden, J.R. Pirani. 2016b. Taxonomy of *Baccharis* subgen. *Tarchonanthoides* (Asteraceae: Astereae: Baccharidinae), a group from the southeastern South American grasslands and savannas. *Phytotaxa*, 241: 1-70.
125. M.G. Hermes, A. Köhler. 2006. The flower-visiting social wasps (Hymenoptera, Vespidae, Polistinae) in two areas of Rio Grande do Sul State, southern Brazil. *Rev. Bras. Entomol.*, 50: 268-274.
126. O. Hnатыszyn, V. Moscatelli, J. Garcia, R. Rondina, M. Costa, C. Arranz, A. Balaszczuk, G. Ferraro, J.D. Coussio. 2003. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the corpus cavernosum of Guinea pig. *Phytomedicine*, 10: 669-674.
127. J.K. Hwang, J.S. Shim, Y.R. Pyun. 2000. Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens. *Fitoterapia*, 71: 321-323.
128. F. Ibáñez, R. Zoppolo. 2011. Assessment of allelopathic properties of *Baccharis dracunculifolia* DC in laboratory and field conditions. *Allelopathy J.*, 28: 77-86.
129. A. Irazusta, R. Caccavello, L. Panizzolo, A. Gugliucci, A. Medrano. 2018. The potential use of *Mentha x piperita* L., *Peumus boldus* Mol. and *Baccharis trimera* Less. extracts as functional food ingredients. *Int. J. Food Nutr. Res.*, 2: 14, pp. 1-13.
130. J. Jakupovic, U. Warning, F. Bohlmann, R.M. King. 1987. New coumaric acid derivatives and other constituents from Argentinian *Baccharis* species. *Rev. Latinoam. Quím.*, 18: 75-77.
131. B.B. Jarvis, N. Mokhtari-Rejali, E.P. Schenkel, C.S. Barros, N.I. Matzenbacher. 1991. Trichothecene mycotoxins from Brazilian *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 30: 789-797.
132. A.H. Januário, S.L. Santos, S. Marcussi, M.V. Mazzi, R.C.L.R. Pietro, D.N. Sato, J. Ellena, S.V. Sampaio, S.C. França, A.M. Soares. 2004. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chem. Biol. Interact.*, 150: 243-251.
133. M.R. Kang, S.K. Park, C.W. Lee, I.J. Cho, Y.N. Jo, J.W. Yang, J.A. Kim, J. Yun, K.H. Lee, H.J. Kwon, B.W. Kim, K. Lee, J.S. Kang, H.M. Kim. 2012. Widdrol induces apoptosis via activation of AMP-activated protein kinase in colon cancer cells. *Oncol. Rep.*, 27: 1407-1412.
134. C. Kapetanios, A. Karioti, S. Bojovic, P. Marin, M. Veljic, H. Skaltsa. 2008. Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioideae taxa (Apiaceae) from Central Balkan. *Chem. Biodivers.*, 5: 101-119.
135. V.D. Kappel, D.F. Pereira, L.H. Cazaroli, S.M. Guesser, C.H.B. da Silva, E.P. Schenkel, E.P. Reginatto, F.R.M.B. Silva. 2012. Short and long-term effects of *Baccharis articulata* on glucose homeostasis. *Molecules*, 17: 6754-6768.



136. T.K. Karam, L.M. Dalposso, D.M. Casa, G.B.L. de Freitas. **2013**. Carqueja (*Baccharis trimera*): utilização terapêutica e biossíntese. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 15: 280-286.
137. N.N.d.N. Kaut, A.C.S. Rabelo, G.R. Araujo, J.G. Taylor, M.E. Silva, M.L. Pedrosa, M.M. Chaves, J.V. Rossoni Junior, D.C. Costa. **2018**. *Baccharis trimera* (Carqueja) improves metabolic and redox status in an experimental model of type 1 diabetes. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 6532637.
138. F.C. Kloppel, M. Lemos, J.P.B. Sousa, E. Comunello, E.L. Maistro, J.K. Bastos, S.F. de Andrade. **2007**. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Z. Naturforsch.*, 62c: 537-542.
139. T.C.d.A. Lage, R.M. Montanari, S.A. Fernandes, C.M.d.O. Monteiro, T.d.O.S. Senra, V. Zeringota, R.d.S. Matos, E. Daemon. **2015**. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.*, 148: 24-29.
140. J.H.G. Lago, P. Romoff, O.A. Favero, F.O. Souza, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Correa. **2008a**. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.*, 36: 737-740.
141. J.H.G. Lago, P. Romoff, O.A. Favero, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Correa, F.O. Souza. **2008b**. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de "Campos de altitude" da Mata Atlântica Paulista. *Quim. Nova*, 31: 727-730.
142. S.F. Lázaro, L.D. Fonseca, E.R. Martins, N.J.F. de Oliveira, E.R. Duarte. **2013**. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. *Vet. Parasitol.*, 194: 79-82.
143. D.P.d.S. Leitão, A.A. da Silva Filho, A.C.M. Polizello, J.K. Bastos, A.C.C. Spadaro. **2004**. Comparative evaluation on *in-vitro* effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. *Biol. Pharm. Bull.*, 27: 1834-1839.
144. M. Lemos, M.P. de Barros, J.P.B. Sousa, A.A. da Silva Filho, J.K. Bastos, S.F. de Andrade. **2007**. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. *J. Pharm. Pharmacol.*, 59: 603-608.
145. I. Loayza, D. Abujder, R. Aranda, J. Jakupovic, G. Collin., H. Deslauriers, F.I. Jean. **1995**. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 38: 381-389.
146. G.A. Logarzo, L. William, D.L. Carpintero. **2005**. Plant Bugs (Heteroptera: Miridae) associated with roadside habitats in Argentina and Paraguay: host plant, temporal and geographic range effects. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 98: 694-702.
147. A.A.S.G. Lonni, I.S. Scarminio, L.M.C. Silva, D.T. Ferreira. **2003**. Differentiation of species of the *Baccharis* genus by HPLC and chemometric methods. *Anal. Sci.*, 19: 1013-1017.
148. A.A.S.G. Lonni, I.S. Scarminio, L.M.C. Silva, D.T. Ferreira. **2005**. Numerical taxonomy characterization of *Baccharis* genus species by ultraviolet-visible spectrophotometry. *Anal. Sci.*, 21: 235-239.
149. D. Lorenzo, D. Paz, P. Davies, J. Villamil, R. Vila, S. Cañigueral, E. Dellacassa. **2005**. Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochem. Anal.*, 16: 39-44.
150. E.D. Marchesan, R. Ferronato, F. Bednarski, S.M. Alencar, S.B. Onofre. **2006**. Ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, 10: 63-67.
151. M.L. Martínez, G.R. Bettucci, M.D. Ferretti, M.N. Campagna, N. Ansaldi, A.A. Cortadi, M.V. Rodríguez. **2018**. Multivariate statistical analysis of morpho-anatomical data of nine sect. Caulopterae species (*Baccharis* – Asteraceae) used in folk medicine. *Braz. J. Pharmacogn.*, 28: 402-413.
152. R. Martínez-Crovetto. **1981**. Plantas utilizadas en medicina en el Noroeste de Corrientes (República Argentina). Volumen 69 Miscelánea. Fundación Miguel Lillo, Tucumán, Argentina; 139 pp.
153. A. Martins, Z. Hajdú, A. Vasas, B. Csupor-Löffler, J. Molnár, J. Hohmann. **2010**. Spathulenol inhibit the human ABCB1 efflux pump. *Planta Med.*, 76: P608.
154. J.J. Massignani, M. Lemos, E.L. Maistro, H.P. Schaphauser, R.F. Jorge, J.P.B. Sousa, J.K. Bastos, S.F. de Andrade. **2009**. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytother. Res.*, 23: 1355-1360.
155. F.W. McLafferty, D.B. Stauffer. **1994**. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data, 6<sup>th</sup> edition. Wiley-Interscience, New York, USA; electronic edition.
156. A.P.S. Menezes, J. da Silva, C. Fisher, F.R. da Silva, J.M. Reyes, J.N. Picada, A.G. Ferraz, D.S. Corrêa, S.M. Premoli, J.F. Dias, C.T. de Souza, A.d.B.F. Ferraz. **2016**. Chemical and toxicological effects of medicinal *Baccharis trimera* extract from coal burning area. *Chemosphere*, 146: 396-404.



157. N.R. Monks, A. Ferraz, S. Bordignon, K.R. Machado, M.F.S. Lima, A.B. da Rocha, G. Schwartzmann. **2002a**. *In vitro* cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. *Pharm. Biol.*, 40: 494-500.
158. N.R. Monks, S.A.L. Bordignon, A. Ferraz, K.R. Machado, D.H. Faria, R.M. Lopes, C.A. Mondin, I.C.C. Souza, M.F.S. Lima, A.B. da Rocha, G. Schwartzmann. **2002b**. Anti-tumour screening of Brazilian plants. *Pharm. Biol.*, 40: 603-616.
159. J.A. Montanha, P. Moellerke, S.A.L. Bordignon, E.P. Schenkel, P.M. Roehe. **2004**. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. *Acta Farm. Bonaerense*, 23: 183-186.
160. A.B.P. Montanher, M.G. Pizzolatti, I.M.C. Brighente. **2002**. An Application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian medicinal plants. *Acta Farm. Bonaerense*, 21: 175-178.
161. F. Morais-Costa, V.d.O. Vasconcelos, E.R. Duarte, W.d.S. Lima. **2014**. Plants from Cerrado for the control of gastrointestinal nematodes of ruminants. In: W. Quick (ed.). *Anthelmintics: clinical pharmacology, uses in veterinary medicine and efficacy*. Nova Science Publishers. Hauppauge, N.Y., EEUU; pp. 90-108.
162. F.d.P.M. Moreira, V. Coutinho, A.B.P. Montanher, M.S.B. Caro, I.M.C. Brighente, M.G. Pizzolatti. **2003**. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre *Artemia salina*. *Quim. Nova*, 26: 309-311.
163. V.E. Moreira, C.M. Gasparetto, L.A. Chibli, G.D.V. Vieira, O.B. de Sousa. **2012**. Teores de fenóis totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante de *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *HU Revista*, 38: 45-51.
164. M.A. Moreno-Pizani, A.J. Farias-Ramirez, T.H.S. Barros, J. Zucolotto, P.A.A. Marques, R.D. Coelho. **2018**. Crop Water Stress Index for a medicinal plant (*Baccharis crispa* Spreng.) under variable irrigation levels. *Wat. Res. Irrig. Managem.*, 7: 9-15.
165. C.C. Munari, R.A. Furtado, M.L. Santiago, S.S. Manhas, J.K. Bastos, D.C. Tavares. **2014**. Inhibitory effects of *Baccharis dracunculifolia* on 1,2-dimethylhydrazine-induced genotoxicity and preneoplastic lesions in rat colon. *Eur. J. Cancer Prev.*, 23: 240-245.
166. J. Müller. **2006**. Systematics of *Baccharis* (Compositae-Astereae) in Bolivia including an overview of the Genus. *Systematic Botany Monographs*, 76: 1-341.
167. Y.R. Naves. **1959a**. Etudes sur les matières végétales volatiles. CLIX. Sur l'huile essentielle de carqueja de l'état de Santa Catarina (Brésil). *Bull. Soc. Chim. France*, S/N, 1871-1879.
168. Y.R. Naves. **1959b**. Etudes sur les matières végétales volatiles CLXI. Présence de lédol dans l'huile essentielle de carquéja. *Helv. Chim. Acta*, 42: 1996-1998.
169. D. Negreiros, D. Esteves, G.W. Fernandes, R.L.L. Berbara, Y. Oki, M. Vichiato, C. Chalub. **2014**. Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) in response to a nutrient gradient. *Trop. Ecol.*, 55: 167-176.
170. NIST (National Institute of Standards and Technology). **1999**. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library. Perkin Elmer Corporation, Norwalk, CT, USA; PC Version 1.7.
171. N.P.A. Nogueira, P.A. Reis, G.A.T. Laranja, A.C. Pinto, C.A.F. Aiub, I. Felzenswalb, M.C. Paes, F.F. Bastos, K.C.C. Sabino, M.G.P. Coelho. **2011**. In vitro and in vivo toxicological evaluation of extracts and fractions from *Baccharis trimera* with anti-inflammatory activity. *J. Ethnopharmacol.*, 138: 513-522.
172. R. Nunes de Oliveira, V.L.G. Rehder, A.S.S. Oliveira, I. Montanari Jr., J.E. de Carvalho, A.L.T.G de Ruiz, V.d.L.S. Jeraldo, A.X. Linhares, S.M. Allegretti. **2012**. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less) DC. *Exp. Parasitol.*, 132: 135-143.
173. R. Nunes de Oliveira, V.L.G. Rehder, A.S.S. Oliveira, V.d.L.S. Jeraldo, A.X. Linhares, S.M. Allegretti. **2014**. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.*, 139: 63-72.
174. O.C. Nunes, C.M. Jamal, R.R. Kitagawa, R.C.R. Gonçalves. **2016**. Anti-*Helicobacter pylori* effect of the antioxidant extract from *Baccharis trimera* (Less.) DC. *Int. J. Phytomed.*, 8: 472-481.
175. A.M.A. Oliveira, V.L.P. Santos, C.R.C. Franco, P.V. Farago, M.R. Duarte, J.M. Budel. **2011**. Comparative morpho-anatomical study of *Baccharis curitybensis* Heering ex Malme and *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. *Lat. Am. J. Pharm.*, 30: 1560-1566.
176. L.S. Ortíz, Y. Flores, O. Sterner, G.R.A. Vega. **2013**. Ent-Kaurane diterpenoids from *Baccharis leptophylla*. *Rev. Bol. Quim.*, 30: 60-65.
177. P.P. Palacios, R.V.D. Rondina, R. Torres, J.D. Coussio. **1983**. Genus *Baccharis*. Part II. Antimicrobial activity of *Baccharis crispa* and *Baccharis notoserigila*. *Planta Med.*, 49: 128-128.
178. R.S. Pappas, S. Sheppard-Hanger. **2000**. Essential Oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. from South Florida: a high cryptone/low cineole Eucalyptus. *J. Essent. Oil Res.*, 12: 383-384.



179. J.K. Park, J.F. Paredes-Guzmán, C.L. Aguiar, S.M. Alencar, F.Y. Fujiwara. 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of Southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1100-1103.
180. N.A. Parreira, L.G. Magalhães, D.R. Morais, S.C. Caixeta, J.P.B. de Sousa, J.K. Bastos, W.R. Cunha, M.L.A. Silva, N.P.D. Nanayakkara, V. Rodrigues, A.A. da Silva Filho. 2010. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem. Biodivers.*, 7: 993-1001.
181. L.F.D. Passero, A. Bonfim-Melo, C.E.P. Corbett, M.D. Laurenti, M.H. Toyama, D.O. de Toyama, P. Romoff, O.A. Fávero, S.S. dos Grecco, C.A. Zalewsky, J.H.G. Lago. 2011. Anti-leishmanial effects of purified compounds from aerial parts of *Baccharis uncinella* C. DC. (Asteraceae). *Parasitol. Res.*, 108: 529-536.
182. J.T. Paula, I.M.O. Sousa, M.A. Foglio, F.A. Cabral. 2017. Selective fractionation of supercritical extracts from leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *J. Supercrit. Fluids*, 127: 62-70.
183. L.E. Pelzer, T. Guardia, A.O. Juárez, E. Guerreiro. 1998. Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. *Farmacol.*, 53: 421-424.
184. C.A. Pereira, A.C.B.P. da Costa, A.K.S. Machado, M. Beltrame Jr., M.S.A.C. Zöllner, J.C. Junqueira, A.O.C. Jorge. 2011. Enzymatic activity, sensitivity to antifungal drugs and *Baccharis dracunculifolia* essential oil by *Candida* strains isolated from the oral cavities of breast feeding infants and in their mothers' mouths and nipples. *Mycopathologia*, 171: 103-109.
185. C.B. Pereira, P.V. Farago, J.M. Budel, J.P. Paula, D.G. Folquitto, O.G. Miguel, M.D. Miguel. 2014. A new contribution to the pharmacognostic study of carquejas: *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. *Lat. Am. J. Pharm.*, 33: 841-847.
186. C.B. Pereira, P.V. Farago, D.M. Borsato, D.G. Folquitto, B.H.LdN.S. Maia, L.A. Esmerino, R.A. Kovaliczn, M.D. Miguel, O.G. Miguel. 2016. Chemical composition and biological activities of *Baccharis milleflora* DC. essential oil. *Lat. Am. J. Pharm.*, 35: 2225-2233.
187. C.B. Pereira, C.C. Kanufre, P.V. Farago, D.M. Borsato, J.M. Budel, B.H.LdN.S. Maia, E.A. Campesatto, A. Sartoratto, M.D. Miguel, O.G. Miguel. 2017. Cytotoxic mechanism of *Baccharis milleflora* DC. essential oil. *Toxicol. In Vitro*, 42: 214-221.
188. C.B. Pereira. 2017. Morfoanatomia, composição química e avaliação biológica do óleo essencial de *Baccharis milleflora* DC., Asteraceae. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil. pp. 189.
189. C. Pérez, C. Anesini. 1994. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by Argentinean medicinal plants. *Fitoterapia*, 65: 169-172.
190. C.L. Queiroga, A. Fukai, A.J. Marsaioli. 1990. Composition of the essential oil of vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.*, 1: 105-109.
191. C.L. Queiroga, V.L. Ferracini, A.J. Marsaioli. 1996. Three new oxygenated cadinanes from *Baccharis* species. *Phytochemistry*, 42: 1097-1103.
192. S. Quintana de Oliveira, F. Dal-Pizzol, G. Gosmann, D. Guillaume, J.C.F. Moreira, E.P. Schenkel. 2003. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. *Free Radic. Res.*, 37: 555-559.
193. S. Quintana de Oliveira, F. Dal-Pizzol, J.C.F. Moreira, E.P. Schenkel, G. Gosmann. 2004. Antioxidant activity of *Baccharis spicata*, *Baccharis trimera* and *Baccharis usterii*. *Acta Farm. Bonaerense*, 23: 365-368.
194. S. Quintana de Oliveira, V.H. Trentin, V.D. Kappel, C. Barelli, G. Gosmann, F.H. Reginatto. 2005. Screening of antibacterial activity of South Brazilian *Baccharis* species. *Pharm. Biol.*, 43: 434-438.
195. S. Quintana de Oliveira, V.D. Kappel, V.S. Pires, C.L. Lencina, P. Sonnet, J.C. Moreira, G. Gosmann G. 2014. Antioxidant properties of phenolic compounds from *Baccharis articulata* and *B. usterii*. *Nat Prod Commun.*, 9: 941-942.
196. A.C.S. Rabelo, D.C. Costa. 2018. A review of biological and pharmacological activities of *Baccharis trimera*. *Chem. Biol. Interact.*, 296: 65-75.
197. B.S. Rao, J.L. Simonsen. 1925. The occurrence of sylvestrene. *J. Chem. Soc., Trans.*, 127: 2494-2499.
198. D. Retta, M. Gattuso, S. Gattuso, P.D.L. Lira, C. Van Baren, A. Bandoni. 2009. Volatile constituents of five *Baccharis* Species from Northeastern Argentina. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20: 1379-1384.
199. C.R.F. Rodrigues, J.H. Dias, R.N. de Mello, M.F. Richter, J.N. Picada, A.B.F. Ferraz. 2009. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 125: 97-101.
200. M.dl.N. Rodríguez, L. Gianuzzi, M. Reta, M. L. Larramendy. 2011. The antimutagenic capacity of the aqueous extract of *Baccharis articulata* (Lam.) Persoon. *Toxicol. Environ. Chem.*, 93: 251-260.



201. M.V. Rodríguez, S. Gattuso, M. Gattuso. 2008. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): revisión y nuevos aportes para su normalización micrográfica. *Lat. Am. J. Pharm.*, 27: 387-397.
202. M.V. Rodríguez, M.L. Martínez, A.A. Cortadi, A. Bandoni, D.A. Giuliano, S.J. Gattuso, M.A. Gattuso. 2010. Characterization of three sect. Caulopterae species (*Baccharis*-Asteraceae) inferred from morphoanatomy, polypeptide profiles and spectrophotometry data. *Plant Syst. Ecol.*, 286: 175-190.
203. M.V. Rodríguez, M.A. Sortino, J.J. Ivancovich, J.M. Pellegrino, L.S. Favier, M.P. Raimondi, M.A. Gattuso, S.A. Zacchino. 2013. Detection of synergistic combinations of *Baccharis* extracts with Terbinafine against *Trichophyton rubrum* with high throughput screening synergy assay (HTSS) followed by 3D graphs. Behavior of some of their components. *Phytomedicine*, 20: 1230-1239.
204. M.V. Rodríguez, M.L. Martínez, A. Cortadi, M.N. Campagna, O. Di Sapio, M. Derita, S. Zacchino M. Gattuso. 2012. Quality control of herbal medicines with spectrophotometry and chemometric techniques-application to *Baccharis* L. species belonging to Sect-Caulopterae DC. (Asteraceae). In: J. Uddin (Ed). Macro to nano spectroscopy. InTech. Rijeka, Croatia; pp. 399-420.
205. M.V. Rodriguez, M.N. Campagna, M.D. Ferretti, G.M.M. Ríos, M.L. Martínez. 2017. Isoquercitrin and *Baccharis spicata* (Lam.) Baillon (Asteraceae) inflorescence extract as potential biocontrol agents against coleopteran rice weevil. *J. Phytopath. Pest Manag.*, 4: 32-40.
206. R.V.D. Rondina, A.L. Bandoni, J.D. Coussio. 2008. Especies medicinales argentinas con potencial actividad analgésica. *Dominguezia*, 24: 47-69.
207. S.M. Sabir, M.L. Athayde, A.A. Boligon, J.B.T. Rocha. 2017. Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. *S. Afr. J. Bot.*, 113: 318-323.
208. G.J.T. Salazar, J.P. de Sousa, C.N.F. Lima, I.C.S. Lemos, A.R.P. da Silva, T.S. de Freitas, H.D.M. Coutinho, L.E. da Silva, W. do Amaral, C. Deschamps. 2018. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind. Crops. Prod.*, 122: 591-595.
209. T. Sartor, V.B. Xavier, M.A. Falcão, C.A. Mondin, M.A. dos Santos, E. Cassel, L.V. Astarita, E.R. Santarem. 2013. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. *Ind. Crops Prod.*, 51: 355-359.
210. L. Sayagués Laso, E. Graf, L. Delfino. 2000. Análisis de la información publicada sobre composición florística de montes naturales del Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 4: 96-110.
211. V.A. Sayuri, P. Romoff, O.A. Fávero, M.J.P. Ferreira, J.H.G. Lago, F.O.S. Buturi. 2010. Chemical composition, seasonal variation and biosynthetic considerations of essential oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chem. Biodiversity*, 7: 2771-2782.
212. S.M. Scheffer-Basso, R. Lubenow, C.M. Carneiro, S.O. Chini. 2008. Morfofisiologia da rebrota de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae: subsídios para seu controle em pastagens naturais. *Biotemas*, 21: 31-37.
213. E.P. Schenkel, A.M. Sobottka, P.P. Lankhorst, J. Schripsema. 1997. An unusual diterpene and other constituents from *Baccharis ochracea*. *Phytochemistry*, 44: 755-757.
214. E.P. Schenkel, G. Rücker, D. Manns, M.B. Falkenberg, N.I. Matzenbacher, M. Sobral, L.A. Mentz, S.A.L. Bordignon, B.M. Heinzmann. 2002. Screening of Brazilian plants for the presence of peroxides. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 38: 191-196.
215. A.A. Schneider. 2009. Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae: Astereae) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 197 pp.
216. P. Schossler, G.L. Schneider, D. Wunsch, G.L.G. Soares, C.A. Zini. 2009. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20: 277-287.
217. J. Schripsema, M.A. Lemos, D. Dagnino, F.J. Luna. 2019. Carqueja (*Baccharis* sect. Caulopterae), a critical review of its history, phytochemistry and medicinal use: problems of ethnopharmacology in Latin America. *Phytochem. Rev.*, in press, DOI: 10.1007/s11101-019-09616-0.
218. K. Shimizu, S.K. Das, T. Hashimoto, Y. Sowa, T. Yoshida, T. Sakai, Y. Matsuura, K. Kanazawa. 2005. Artepillin C in Brazilian propolis induces G0/G1arrest via stimulation of Cip1/p21 expression in human colon cancer cells. *Mol. Carcinog.*, 44: 293-299.
219. F.G. Silva, J.E.B.P. Pinto, M.d.G. Cardoso, E.A. Nascimento, D.L. Nelson, J.d.F. Sales, D.J.d.S. Mol. 2006. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in carqueja. *Ciênc. Agrotec.*, 30: 52-57.
220. F.G. Silva, C.B.A. Oliveira, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, S.C. Santos, J.C. Seraphin, P.H. Ferri. 2007. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18: 990-997.



221. D.P.B. Silveira. 2018. Atividade larvívica sobre *Aedes aegypti* L. (Culicidae) e composição química do óleo essencial de partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão, São Luis, Brasil. 64 pp.
222. E. Simionatto, V. Ilha, A.S. Mallmann, C. Porto, I.I. Dalcol, A.F. Morel. 2008. Chemical Composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. *J. Essent. Oil Res.*, 20: 366-368.
223. I.C. Simoni, B. Aguiar, A.M.d.A. Navarro, R.M. Parreira, M.J.B. Fernandes, A.C.H.F. Sawaya, O.A. Fávero. 2018. *In vitro* antiviral activity of propolis and *Baccharis* sp. extracts on animal herpes viruses. *Arq. Inst. Biol.*, 85: e0972016, pp. 1-7.
224. M.J. Simirgiotis, M. García, M.E. Sosa, O.S. Giordano, C.E. Tonn. 2003. An *ent*-kaurene derivative from aerial parts of *Baccharis rufescens*. *J. Arg. Chem. Soc.*, 91: 109-116.
225. C.M.O. Simões, M. Falkenberg, L.A. Mentz, E.P. Schenkel, M. Amoros, L. Girre. 1999. Antiviral activity of South Brazilian medicinal plant extracts. *Phytomedicine*, 6: 205-214.
226. C.A. Simões-Pires, S. Debenedetti, E. Spegazzini, L.A. Mentz, N.I. Matzenbacher, R.P. Limberger, A.T. Henriques. 2005a. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.*, 253: 23-32.
227. C.A. Simões-Pires, E.F. Queiroz, A.T. Henriques, K. Hosstetmann. 2005b. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatization. *Phytochem. Anal.*, 16: 307-314.
228. V.C.G. Soares, D. Bristot, C.L. Pires, M.H. Toyama, P. Romoff, M.J. Pena, O.A. Favero, D.d.O. Toyama. 2012. Evaluation of extracts and partitions from aerial Parts of *Baccharis microdonta* on enzymatic activity, pro-inflammatory and myotoxic activities induced by secretory phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. *Toxicon*, 60: 208-208.
229. A.M. Sobottka, A. Langeloh, E.P. Schenkel. 1996. Efeito dos extratos aquosos de *Baccharis ochracea* Spreng. e *Iodina rhombifolia* Hook. et Arn. sobre a reprodução de ratas. *Rev. Ciênc. Farm.*, 17: 147-153.
230. H. Soicke, E. Leng-Peschlow. 1987. Characterization of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their anti-hepatotoxic properties. *Planta Med.*, 53: 37-39.
231. J.P. Souza, V.L.P. Santos, C.R.C. Franco, E.A.F.Q. Bortolozzo, P.V. Farago, N.I. Matzenbacher, J.M. Budel. 2013. *Baccharis rufescens* Spreng. var. *tenuifolia* (DC.) Baker: contribuição ao estudo farmacognóstico. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 15: 566-574.
232. S.P. Souza, M.G. Cardoso, P.E. Souza, L.G.L. Guimarães, J. Andrade, A.C.T. Mallet, D.L. Nelson. 2011. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 13: 456-466.
233. G. Stapel, H.G. Menßen, G. Snatzke. 1980. Isolierung und Strukturaufklärung von zwei Diterpenen aus *Baccharis articulata*. *Planta Med.*, 39: 366-374
234. J. Steiner, A. Zillikens, R. Kamke, E.P. Feja, D.d.B. Falkenberg. 2010. Bees and Melittophilous plants of Secondary Atlantic Forest habitats at Santa Catarina Island, Southern Brazil. *Oecologia Australis*, 14: 16-39.
235. V. Sülsen, C. Güida, J. Coussio, C. Paveto, L. Muschiatti, V. Martino. 2006. *In vitro* evaluation of trypanocidal activity in plants used in Argentine traditional medicine. *Parasitol. Res.*, 98: 370-374.
236. E.Y. Suzuki, C.A. Caneschi, R.C. Fochat, M.A.F. Brandão, N.R.B. Raposo. 2016. Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja-amarga). *Rev. Cubana Plant. Med.*, 21: 346-358.
237. K. Takahashi, S. Muraki, T. Yoshida. 1981. Synthesis and distribution of (-)-mintsulfide, a novel sulfur-containing sesquiterpene. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 129-132.
238. M. Tan, L. Zhou, Y. Huang, Y. Wang, X. Hao, J. Wang. 2008. Antimicrobial activity of globulol isolated from the fruits of *Eucalyptus globulus* Labill. *Nat. Prod. Res.*, 22: 569-575.
239. D.V. Thomaz, F.B. Machado, E.S.B. Rodrigues, C.E.P. Cunha, M.F. de Carvalho, I.Y.L. de Macedo, R.L. Morais, J.S. Lemes, B.G. Isecke, E.K.G. Moreno, M.F. Alecrim, M.T. de Oliveira, K.C.d.S. Leite. 2018. Assessment of antioxidant quality in commercial carqueja (*Baccharis trimera*) samples by electrochemical tools. *Res. J. Life Sci. Bioinf. Pharm. Chem. Sci.*, 4: 239-246.
240. G.B. Tognon, W. do Amaral, R.P. Bolzan, F.L. Cuquel. 2015. Ornamental potential and postharvest of *Baccharis uncinella* D.C. *Acta Hort.*, 1060: 133-139.
241. G.B. Tognon, F.L. Cuquel. 2016. Ornamental potential use of *Baccharis milleflora* and *Baccharis tridentata* as ornamental cut foliage. *Ciência Rural*, 46: 70-75.
242. A.C. Toloza, J. Zygadlo, F. Biurrun, A. Rotman, M.I. Picollo. 2010. Bioactivity of Argentinean essential oils against permethrin-resistant head lice, *Pediculus humanus capitis*. *J. Insect Sci.*, 10: Article 185, pp. 1-8.



243. E.Z. Tomazoni, G.S. Griggio, E.P. Broilo, R.T.d.S. Ribeiro, G.L.G. Soares, J. Schwambach. 2018. Screening for inhibitory activity of essential oils on fungal tomato pathogen *Stemphylium solani* Weber. *Biocatal. Agr. Biotechnol.*, 16: 364-372.
244. C.E. Tonn, J.C. Gianello, O.S. Giordano. 1979. Bacrispina, a new diterpene, isolated from *Baccharis crispa* Sprengel. *An. Asoc. Quim. Argent.*, 67: 1-8.
245. C.E. Tonn, O.S. Giordano. 1980. A new furane diterpenoid from *Baccharis crispa* Sprengel. *An. Asoc. Quim. Argent.*, 68: 237-241.
246. C.E. Tonn, J.C. Gianello, F.H. Guidugli. 1987. Composition of the essential oil of *Baccharis crispa* and *Baccharis articulata*. *An. Asoc. Quim. Argent.*, 75: 5-6.
247. M.S. Toribio, D.S. Oriani, J.G. Fernández, E.R. Toso, C.A. Tortone. 2007. Estudio de la actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Baccharis*. *Ciencia Veterinaria*, 9: 44-48.
248. R.E. Toso, M.A. Boeris. 2010. Validación de la actividad antiespasmódica de *Sida rhombifolia*, *Baccharis articulata*, *Chenopodium ambrosioides* y *Conyza bonariensis*. *Ciencia Veterinaria*, 12: 20-24.
249. C.V. Torres, M.J. Domínguez, J.L. Carbonari, M.C. Sabini, L.I. Sabini, S.M. Zanon. 2011. Study of antiviral and virucidal activities of aqueous extract of *Baccharis articulata* against Herpes suis virus. *Nat. Prod. Commun.*, 6: 993-994.
250. L.M.B. Torres, M.T. Gamberini, N.F. Roque, M.T.L. Landman, C. Souccar, A.J. Lapa. 2000. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, 55: 617-619.
251. M. Trombin-Souza, M. Trombin-Souza, W. Amaral, J.A.L. Pascoalino, R.A. Oliveira, H.R. Bizzo, C. Deschamps. 2017. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 400-406.
252. S. Uribe, J. Ramírez, A. Pena. 1985. Effects of  $\beta$ -pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.*, 161: 1195-1200.
253. A.B. Vannini, T.G. Santos, A.C. Fleming, L.R.P. Purnhagen, L.A. Lourenço, E.T.B. Butzke, M. Kempt, I.M. Begnini, R.A. Rebelo, E.M. Dalmarco, A. Bella Cruz, A.P. Schmit, R.C.B. Cruz, C.N. Yamanaka, M. Steindel. 2012. Chemical characterization and antimicrobial evaluation of the essential oils from *Baccharis uncinella* D.C. and *Baccharis semiserrata* D.C. (Asteraceae). *J. Essent. Oil Res.*, 24: 547-554.
254. R.M.F. Vargas, E. Cassel, G.M.F. Gomes, L.G.S. Longhi, L. Atti-Serafini, A.C. Atti-Santos. 2006. Supercritical extraction of carqueja essential Oil: experiments and modelling. *Braz. J. Chem. Eng.*, 23: 375-382.
255. R.S. Veiga, S. De Mendonça, P.B. Mendes, N. Paulino, M.J. Mimica, A.A. Lagareiro Netto, I.S. Lira, B.G.C. López, V. Negrão, M.C. Marcucci. 2017. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *J. Appl. Microbiol.*, 122: 911-920.
256. A.M. Velázquez, Z.E. Mallorquín, Y. Montalbetti, M.A. Campuzano-Bublitz, M.C. Hellióon-Ibarrola, M.L. Kennedy, D.A. Ibarrola. 2019. Assessment of General effects and gastrointestinal prokinetic activity of *Baccharis crispa* in mice. *J. Appl. Biol. Biotechnol.*, 7: 30-34.
257. F. Verloove, E.D. Dana, P. Alves. 2018. *Baccharis spicata* (Asteraceae), a new potentially invasive species to Europe. *Plant Biosyst.*, 152: 416-426.
258. T.O. Vieira, I. Seifriz, C.C.T. Charão, S.Q. de Oliveira, T.B. Creczynski-Pasa. 2011. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Braz. J. Pharmacogn.*, 21: 601-607.
259. M.F. Visintini-Jaime, F. Redko, L.V. Muschiatti, R.H. Campos, V.S. Martino, L. Cavallaro. 2013. *In vitro* antiviral activity of plant extracts from Asteraceae medicinal plants. *J. Virol.*, 10: 1-10.
260. E. Vivot, J.dD. Muñoz, I. Herrero, A. Dragán, C. Sequin. 2006. Antimicrobial activity of dichloromethane extracts of eleven plants from the flora of Entre Rios (Argentina). *Pharmacologyonline*, 3: 845-849.
261. N.B. Vogt. 1987. Soft modelling and chemosystematics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1: 213-231.
262. L.W. Wattenberg. 1991. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). *Carcinogenesis*, 12: 151-152.
263. P. Weyerstahl, H.C. Wahlburg, U. Splittgerber, H. Marschall. 1994. Volatile constituents of Brazilian phoebe oil. *Flavour Fragr. J.*, 9: 179-186.
264. R.L. Wolff, L.G. Deluc, A.M. Marpeau, B. Comps. 1997. Chemotaxonomic differentiation of conifer families and genera based on the seed oil fatty acid compositions: multivariate analyses. *Trees*, 12: 57-65.





265. V.B. Xavier, R.M.F. Vargas, E. Cassel, A.M. Lucas, M.A. Santos, C.A. Mondin, E.R. Santarem, L.V. Astarita, T. Sartor. **2011**. Mathematical modelling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crops Prod.*, 33: 599-604.
266. V.B. Xavier. **2011**. Investigación sobre compuestos volátiles de especies de *Baccharis* nativas do Rio Grande do Sul. Tese de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Brasil, Porto Alegre, Brasil 104 pp.
267. V.B. Xavier, M. Minteguiaga, N. Umpiérrez, R.M.F. Vargas, E. Dellacassa, E. Cassel. **2017**. Olfactometry evaluation and antimicrobial analysis of essential oils from *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso and *Baccharis uncinella* DC. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 137-144.
268. E.S. Yamamoto, B.L.S. Campos, M.D. Laurenti, J.H.G. Lago, S.d.S. Grecco, C.E.P. Corbett, L.F.D. Passero. **2014**. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania amazonensis)* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. *Parasitol. Res.*, 113: 333-339.
269. C.A. Zalewski, L.F.D. Passero, A.S.R.B. Melo, C.E.P. Corbett, M.D. Laurenti, M.H. Toyama, D.O. Toyama, P. Romoff, O.A. Fávero, J.H.G. Lago. **2011**. Evaluation of anti-inflammatory activity of derivatives from aerial parts of *Baccharis uncinella*. *Pharm. Biol.*, 49: 602-607.
270. J. Zhou, F. Tang, G. Mao, R. Bian. **2004**. Effect of  $\alpha$ -pinene on nuclear translocation of NF- $\kappa$ B in THP-1 cells. *Acta Pharmacol. Sin.*, 25: 480-484.
271. A. Ziaei, M. Ramezani, L. Wright, C. Paetz, B. Schneider, Z. Amirghofran. **2011**. Identification of Spathulenol in *Salvia mirzayanii* and the Immunomodulatory Effects. *Phytother. Res.*, 25: 557-562.
272. M.P. Zunino, M. Novillo-Newton, D.M. Maestri, J.A. Zygadlo. **1997**. Composition of the essential oil of *Baccharis crispa* Spreng. and *Baccharis salicifolia* Pers. grown in Córdoba (Argentina). *Flavour Fragr. J.*, 12: 405-407.
273. M.P. Zunino, M. Novillo-Newton, D.M. Maestri, J.A. Zygadlo. **1998**. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Med.*, 64: 86-87.
274. M.P. Zunino, M.L. López, J.A. Zygadlo, A.G. López. **2004**. Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. *J. Essent. Oil Res.*, 16: 29-30.



## Capítulo 5

# Efecto del dioicismo sobre el metabolismo volátil de *Baccharis* spp. L.

**Resumen:** En el capítulo 4 de ésta tesis se presentaron los volatílicos de *Baccharis* spp. L. obtenidos por *GC-MS*, lo que incluyó el detalle de los perfiles masculinos y femeninos de algunas especies. En éste capítulo se presentará primeramente el concepto de dioicismo y sus implicancias biológicas y fisiológicas, y se revisarán algunos estudios previos en el género *Baccharis* L. Posteriormente, se expondrán los fundamentos de técnicas cromatográficas no convencionales para el análisis del perfil volátil de ambos sexos: cromatografía gaseosa acoplada a olfatometría (*GC-O*) y cromatografía gaseosa enantioselectiva (*eGC*). Con dichas herramientas, y las reportadas en los capítulos precedentes, se detallará el efecto del dioicismo sobre el volatílico de dos especies de *Baccharis* seleccionadas como modelo de trabajo: *B. articulata* y *B. tridentata*. Para el caso del aceite esencial de ésta última especie, se realizó el aislamiento de acetato de bornilo de manera de poder establecer correctamente su quiralidad mediante un enfoque semi-sintético.

### 1. INTRODUCCION

#### 1.1 El fenómeno del dioicismo

El dioicismo se caracteriza por la presencia de las estructuras reproductoras masculinas y femeninas en individuos separados, y es un carácter presente en al menos la mitad de las familias de las Angiospermas (con mayor frecuencia entre dicotiledóneas que entre monocotiledóneas) (Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995; Simpson, 2013). Se estima que existen alrededor de unas 15000 especies dioicas, lo que representa un 6-7% de la diversidad de las Angiospermas (la gran mayoría de éstas son sexualmente monoicas o hermafroditas, con ambos sexos en el mismo individuo) (Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995; Simpson, 2013; Shipunov, 2017). Sin embargo, dicho porcentaje varía considerablemente entre las diferentes regiones del mundo, observándose una mayor proporción en las floras que se desarrollan en las islas y en los climas tropicales; por



ejemplo, en Hawai el 28% de las especies nativas son dioicas, y en Nueva Zelanda el 13% (Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995; Simpson, 2013).

El dioicismo se manifiesta visualmente exhibiendo diferencias en la morfología floral (Figura 1) (Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995). Los individuos masculinos presentan flores en que es evidente el androceo (anteras y filamentos que dan origen al polen; destacándose como apéndices de coloración amarilla nítida), mientras que en el caso de los individuos femeninos se encuentra ausente, pero está presente el gineceo (pistilo y ovarios) (Figura 1) (Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995; Shipunov, 2017). Debido a ello, el reconocimiento de los sexos se puede realizar con relativa facilidad aún en condiciones de campo.



**Figura 1:** Diferencias en la morfología floral de una especie dioica (*Baccharis pilularis*): a la izquierda se presenta el individuo femenino y a la derecha el individuo masculino con su gineceo evidente. Fuente: M. Kummel (<https://www.flickr.com/photos/treebeard/29659110800>)

Se considera que la fuerza evolutiva que da origen y permite el mantenimiento y desarrollo del dioicismo es que el entrecruzamiento entre los progenitores genéticamente diferentes genera ventajas adaptativas para la progenie (Bawa, 1980; Cuevas-García y Abarca-García, 2006). Asimismo, otros factores ecológicos y fisiológicos también tienen su contribución (distribución diferencial de recursos, selección sexual, dispersión de semillas, polinización y herbivoría), lo que permite que el dioicismo se encuentre presente tanto en familias primitivas como en las más evolucionadas (Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995; Cuevas-García y Abarca-



**García, 2006**). Se ha constatado una fuerte asociación entre dioicismo y el carácter perenne y leñoso de las plantas (árboles y arbustos), siendo poco frecuente observarlo en plantas herbáceas anuales (**Bawa, 1980; Renner y Ricklefs, 1995; Simpson, 2013**). Una gran proporción de las especies dioicas (alrededor del 70%) son polinizadas por insectos (especialmente por abejas) y, debido a que en general sus flores no son conspicuas (pequeñas, con colores blanco, amarillo o verde pálido; Figura 1), se cree que la atracción depende fuertemente de la intermediación química de compuestos volátiles atrayentes (**Bawa, 1980; Ferracini et al., 1995; Renner y Ricklefs, 1995; Simpson, 2013**).

### **1.2 Dioicismo desde el punto de vista químico**

Dado que el dioicismo implica: una diferencia en las estructuras sexuales (dimorfismo) en cada género, una distribución diferencial de recursos de crecimiento (nutrientes, agua, etc.), y una función diferente en la naturaleza (en cuanto al papel de ambos sexos en la concepción y desarrollo de la progenie); es coherente que exista un metabolismo diferenciado masculino/femenino (**Simpson, 2013**). Desde una perspectiva ecológica, los individuos femeninos suelen tener un mayor nivel de metabolitos secundarios defensivos que los masculinos debido al alto costo metabólico asociado con el desarrollo de la progenie (priorización de recursos hacia la reproducción), lo que los hace menos susceptibles al ataque de organismos perjudiciales (**Espírito-Santo et al., 2003; Carneiro et al., 2006; Simpson, 2013**). En cambio los individuos masculinos usualmente alcanzan una mayor altura, crecen más rápidamente y con mayor vigor que las plantas femeninas, demostrando una priorización de recursos hacia el crecimiento (**Espírito-Santo et al., 2003; Carneiro et al., 2006; Simpson, 2013**). Además, la sobrecarga metabólica que soportan las plantas hembras por la producción de frutos y semillas, hace que la demanda por nutrientes y agua de éstas sea mayor que para el caso de las plantas machos y que, en consecuencia, las primeras tengan una mayor tasa de mortalidad asociada ante factores de estrés nutricional o hídrico (**Espírito-Santo et al., 2003; Carneiro et al., 2006**).

A pesar de la importancia que tiene desde el punto de vista biológico y ecológico, el dioicismo ha sido escasamente considerado en la literatura fitoquímica (**Lago et al., 2008; Simpson, 2013**). Lo que se vuelve fundamental cuando se trata de especies



vegetales que son empleadas como medicinales, debido a que ambos sexos podrían tener un perfil diferente de actividad farmacológica (Simpson, 2013; Bajpai *et al.*, 2016). Por ejemplo, en el caso de *Tinospora cordifolia* (Menispermaceae; especie dioica empleada en la medicina Ayurvédica por sus propiedades antipiréticas y antidiabéticas), los individuos masculinos presentan mayor concentración de ciertos alcaloides (magnoflorina, jatrorrizina y oblongina) y los femeninos de otros diferentes (tetrahidropalmatina, norcoclaurina y reticulina) (Bajpai *et al.*, 2016). Adicionalmente, el contenido de azúcares totales, almidón y taninos es mayor para los tejidos de plantas femeninas de *T. cordifolia* independientemente de la estacionalidad, mientras que el contenido de fenoles es mayor en uno u otro sexo dependiendo de la época del año (Choudhry *et al.*, 2014).

Otro ejemplo de la importancia de la delimitación del sexo de las plantas para el estudio fitoquímico es el que se presenta en la especie *Cannabis sativa* (“marihuana”; Cannabaceae), en la que las flores femeninas acumulan mayor concentración del compuesto psicoactivo  $\Delta^9$ -tetrahidrocanabinol (THC) que las masculinas, para la mayoría de las variedades (Ohlsson *et al.*, 1971; Simpson, 2013). Tales diferencias en la composición química entre los géneros también existen a nivel de otros compuestos volátiles. Por ejemplo, Flamini *et al.* (2002) demostraron usando dos técnicas extractivas que el perfil de composición volátil de las flores masculinas y femeninas del “laurel” (*Laurus nobilis*, Lauraceae) es cualitativa y cuantitativamente diferente. Este comportamiento podría deberse a mensajes químicamente codificados como aromas originados en las estructuras florales, cuyo objetivo sería la atracción y orientación diferencial de insectos polinizadores y la repelencia direccionada de florívoros (Ferracini *et al.*, 1995; Flamini *et al.*, 2002; Zunino *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2018). Sin embargo, la comercialización de aceites esenciales de especies dioicas en general no tiene en cuenta la diferencia entre los aromas generados por individuos de diferentes sexos (Flamini *et al.*, 2002; Zunino *et al.*, 2004; Minnot y Brown, 2006; Mwang'ingo *et al.*, 2010).

Evaluar esas posibles diferencias es de importancia no sólo para entender los roles metabólicos de ambos géneros, sino además para la valoración económica en especies comerciales como el propio laurel, la “pimienta tabasca” (*Pimenta dioica*; Myrtaceae) y el “sándalo africano” (*Osyris lanceolata*; Santalaceae) entre otras (Flamini *et al.*, 2002; Minnot y Brown, 2006; Mwang'ingo *et al.*, 2010).



### 1.3 Estudios en *Baccharis* spp. L.

Como fue indicado en el capítulo 1, la inmensa mayoría de las especies del género *Baccharis* L. son dioicas, lo que le ha permitido ser foco de estudios ecológicos y fitoquímicos.

Entre los estudios ecológicos existentes, se destaca el trabajo de Espírito-Santo *et al.* (2003), en el que se identificó que los individuos masculinos de *B. dracunculifolia* florecen antes y con mayor vigor que los femeninos, lo que es un padrón común a la mayoría de la especies dioicas. Lo anterior se explica debido a los mayores gastos metabólicos asociados a la reproducción por parte de las plantas hembras, las que al florecer deben encontrar a los machos en condiciones reproductivas adecuadas (madurez del polen) para la optimización de recursos (Espírito-Santo *et al.*, 2003). A su vez, éste sería un mecanismo para que los insectos polinizadores visitasen en primera instancia a las flores masculinas y luego a las femeninas, lo que contribuiría en gran medida a una polinización exitosa (Espírito-Santo *et al.*, 2003). Los autores también constataron una mayor tasa de mortalidad femenina durante la temporada reproductiva, lo que contribuiría a que en las poblaciones naturales haya una mayor proporción de plantas masculinas que femeninas (Espírito-Santo *et al.*, 2003).

En otro estudio, Carneiro *et al.* (2006) identificaron que los machos de *B. concinna* alcanzan mayor desarrollo que las hembras, pero sin embargo son éstas las que en proporción tienen un mayor número de flores por rama. Para la misma especie, se demostró una segregación espacial en la ocurrencia de plantas femeninas y masculinas, donde las primeras se desarrollan con mayor frecuencia en ambientes de baja altitud: con mayor fertilidad del suelo, alta humedad y baja exposición a la radiación solar; mientras que las segundas presentan la tendencia opuesta (Marques *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2017). Sin embargo, para la especie *B. platypoda* son los individuos masculinos los que se desarrollan en ambientes más húmedos, demostrando que los sexos de cada especie dioica tiene su propia adaptación a los factores ambientales (Fonseca *et al.*, 2017).

Recientemente, Moreira *et al.* (2018) han correlacionado los aspectos ecológicos con la química subyacente de metabolitos volátiles para la especie *B. salicifolia* desde el punto de vista de la comunicación intersexual planta-planta ante el ataque de herbívoros, siendo el único estudio de su tipo en *Baccharis* spp. L. Con éste objetivo, los autores



expusieron plantas de ambos sexos (“emisoras de volátiles”) dañadas por el áfido especialista *Uroleucon macolai* junto con plantas sanas (“receptoras”), obteniendo en paralelo el volatilo de unas y otras por filtros de adsorción del “espacio de cabeza” (Moreira *et al.*, 2018). De ésta manera, las plantas que fueron expuestas al áfido aumentaron la emisión de volátiles de una manera sexo-dependiente, mientras que sólo las plantas femeninas respondieron a dicha emisión de sus con-genéricos (Moreira *et al.*, 2018). Estos resultados demuestran que debido a su rol biológico, los individuos femeninos son más sensibles a la agresión (herbivoría) e inducen rápidamente resistencia en sus con-genéricos mediante un mecanismo altamente especializado de emisión y recepción de compuestos volátiles (Moreira *et al.*, 2018).

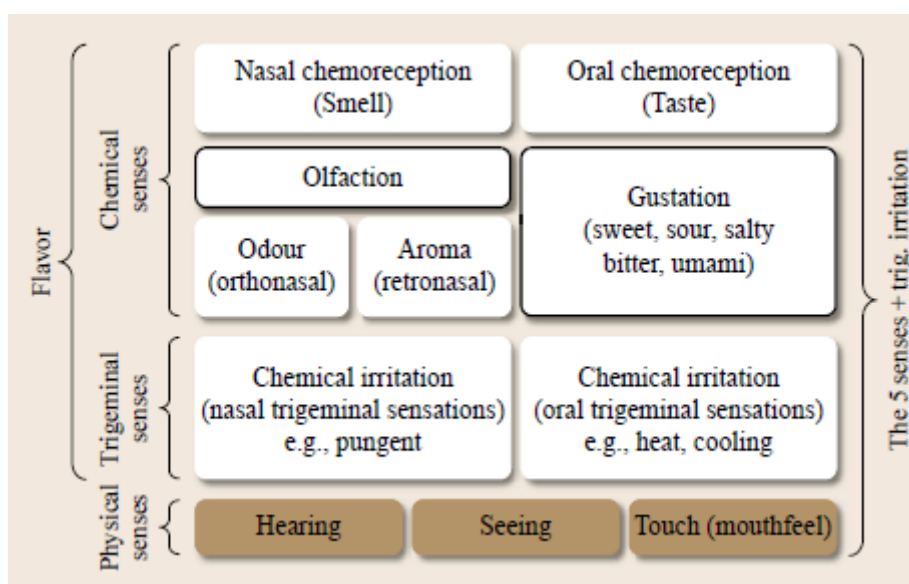
Por otra parte, es posible encontrar en la literatura reportes de composición (y en algunos casos de bioactividad) de aceites esenciales que diferencian entre individuos masculinos y femeninos para las siguientes especies: *B. erioclada* (Ferracini *et al.* 1995); *B. caprariaefolia*, *B. dracunculifolia* (Ferracini *et al.* 1995; Besten *et al.* 2012); *B. articulata* (Zunino *et al.*, 2004); *B. trimeria* (Lago *et al.*, 2008; Besten *et al.*, 2013); *B. coridifolia*, *B. semiserrata*, *B. pentaptera* (Besten *et al.*, 2012); *B. milleflora* (Besten *et al.*, 2014); *B. punctulata* (Ascari *et al.*, 2019); *B. aracatubaensis*, *B. organensis* y *B. burchellii* (Zuccolotto *et al.*, 2019). En algunos de éstos estudios se han encontrado diferencias apreciables en la composición de los aceites de ambos géneros, mientras que en otros se ha constatado un perfil volátil muy similar; lo que indicaría que las diferencias están relacionadas no sólo al material vegetal (genotipo) sino también al lugar de colecta y sus variables ambientales (capítulo 6) (Ferracini *et al.* 1995; Besten *et al.*, 2012; Besten *et al.*, 2013). A modo de ejemplo, en estudios sobre el aceite esencial de *B. dracunculifolia* de ambos géneros, se encontró que el valor del coeficiente monoterpenos/sesquiterpenos suele ser mayor para el caso de las plantas femeninas que para las masculinas, con excepción de las condiciones de sequía en donde la tendencia es la contraria (Ferracini *et al.* 1995; Besten *et al.*, 2012). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la composición volátil es altamente dinámica, y que se altera para ambos géneros a diferentes horas del día. Por ejemplo, en uno de los estudios anteriores se ha informado que las plantas hembras de *B. dracunculifolia* producen más monoterpenos a las 8AM y los machos lo hacen a las 11AM, correlacionando éste último con el horario de mayor actividad de los insectos polinizadores, lo que indicaría un posible rol atractivo (Ferracini *et al.* 1995).



En consecuencia, es posible que las contradicciones existentes en la literatura en cuanto al perfil volátil de los individuos masculinos y femeninos sean debidas a éste tipo de variaciones propias del ritmo circadiano de cada especie (Ferracini *et al.* 1995; Besten *et al.*, 2012).

### 1.4 Odorantes y el sentido del olfato

En la percepción sensorial, los dos sentidos químicos, sabor y olor, son provocados directamente por una entidad química que es percibida por un receptor, mientras que todos los demás sentidos (vista, oído, tacto) reconocen como señal disparadora a fuerzas físicas tales como la luz, el sonido, la temperatura o la presión, respectivamente (Figura 2) (Yeretizian, 2017). Luego de la percepción, una cascada de reacciones bioquímicas amplifica y transmite éstas señales al cerebro donde se pueden analizar y procesar.



**Figura 2:** Relación entre los diferentes sentidos químicos y físicos asociados a la percepción. Fuente: Yeretizian (2017).

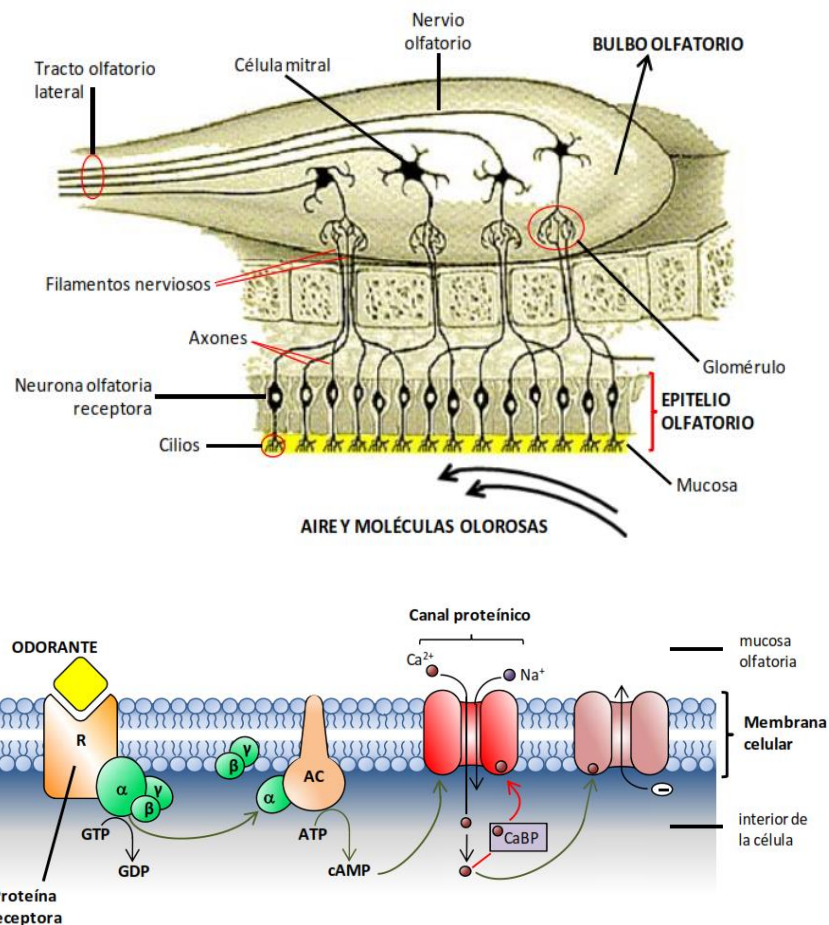
En éste contexto, se podría definir un olor como la impresión en el cerebro provocada por el reconocimiento de un producto químico volátil por parte de un receptor odorante localizado en el sistema olfativo. De ello se deduce que un compuesto químico puede considerarse como un odorante si cumple las siguientes condiciones (Pickenhagen, 2017):





- 1) capacidad de asociación y reconocimiento químico con un receptor odorante;
- 2) transmisión del reconocimiento al cerebro mediante un estímulo eléctrico;
- 3) interpretación del cerebro como una señal de olor.

En consecuencia, el proceso olfativo es una interacción bioquímica muy compleja entre los odorantes y las proteínas receptoras localizadas en la mucosa del epitelio olfatorio (Figura 3) (German *et al.*, 2007; Aceña Muñoz, 2011). Las células epiteliales contienen adosadas una gran cantidad de cilios en los que los odorantes interactúan enlazándose con proteínas receptoras generalistas y específicas (German *et al.*, 2007; Aceña Muñoz, 2011). Luego de la recepción se desencadena una cascada de transducción mediada por el monofosfato cíclico de adenosina (cAMP), que por último resulta en el reconocimiento del aroma en el córtex cerebral (Figura 3) (German *et al.*, 2007; Aceña Muñoz, 2011).



**Figura 3:** Anatomía del sistema olfativo humano y esquema del proceso de transducción de la información que ocurre en las células epiteliales, originado en la interacción odorante-proteína receptora y mediado por la producción del cAMP. Fuente: Aceña Muñoz (2011).



Es pertinente establecer que la transducción de información desde los odorantes al epitelio olfatorio se realiza por dos vías: percepción orthonasal (olfacción directa a través de la nariz), y percepción retronasal que se da por la conexión existente entre la cavidad bucal y dicho epitelio (**van Ruth, 2001; German *et al.*, 2007; Aceña Muñoz, 2011; Yeritzian, 2017**). Éste último mecanismo es el involucrado en la percepción aromática de los alimentos cuando los mismos se degluten en la cavidad bucal (**German *et al.*, 2007; Aceña Muñoz, 2011**).

Los odorantes y el sistema olfativo, ejercen un importante papel en la consolidación de la memoria a largo plazo: los recuerdos nuevos son inicialmente lábiles hasta que se asocian a pistas olfativas, lo que permite que los mismos sean más “recordables” por el cerebro con el paso del tiempo (**German *et al.*, 2007**).

En resumen, para que una sustancia sea considerada un odorante, la misma debe interactuar con el sistema biológico descrito y posibilitar el desencadenamiento de una respuesta nerviosa (**German *et al.*, 2007; Aceña Muñoz, 2011**). Sin embargo, no se han elucidado hasta el momento adecuadas relaciones entre las propiedades físicoquímicas de un compuesto y su aroma resultante (**Delahunty *et al.*, 2006**). De hecho, compuestos que son estructuralmente muy semejantes (como los enantiómeros del limoneno) suelen ser percibidos como aromas diferentes, y algunas sustancias que no tienen semejanza estructural pueden presentar notas aromáticas parecidas (**Delahunty *et al.*, 2006; d’Acampora Zellner *et al.*, 2008**).

En el caso de los aromas, se define una concentración mínima de odorante llamada umbral de percepción por encima de la cual dicha sustancia comienza a ser percibida como un estímulo sensorial, y por debajo de la cual es inodora (**Delahunty *et al.*, 2006; d’Acampora Zellner *et al.*, 2008**). Los valores de umbrales de percepción varían considerablemente de odorante a odorante, desde valores de partes por trillón (pirazinas) hasta g/L (**Delahunty *et al.*, 2006; d’Acampora Zellner *et al.*, 2008**). Es importante establecer que cada odorante tiene su propia función psicométrica (curvas sigmoideas que representan la relación concentración-respuesta sensorial), que posibilita que en general la intensidad percibida aumente a medida que aumenta la concentración del odorante (**Delahunty *et al.*, 2006**).

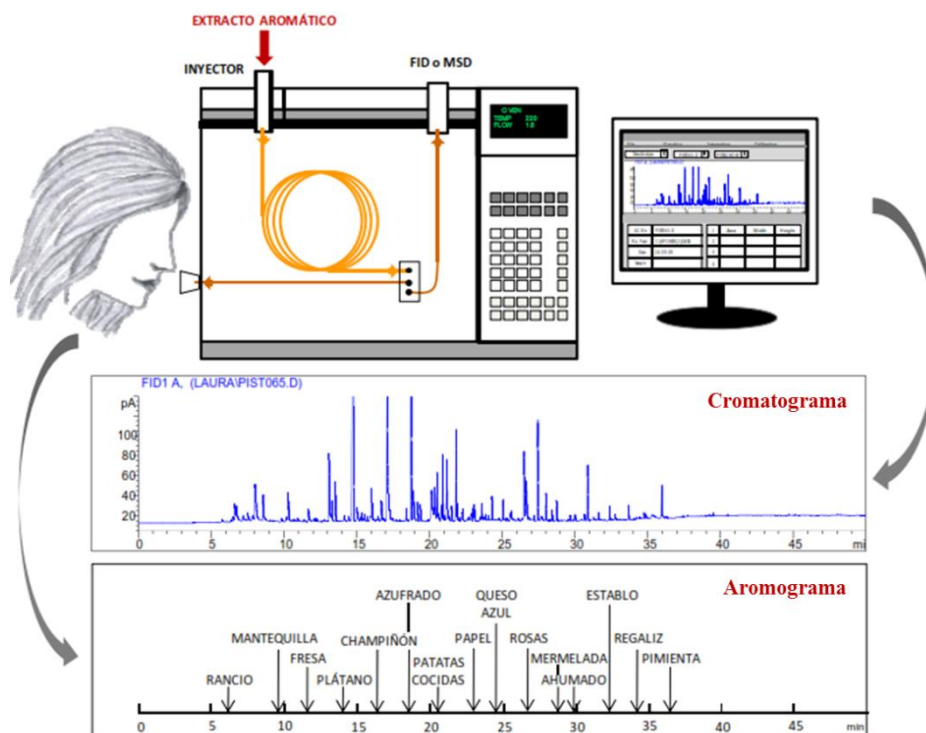


### 1.5 Cromatografía gaseosa-olfatometría (GC-O)

Esta es una técnica que permite la descripción sensorial de los aromas a medida que los odorantes eluyen del sistema de GC, empleándose la nariz humana como un detector (en el llamado puerto olfatómetrico) en paralelo a un detector instrumental convencional (Figura 4) (van Ruth, 2001; Delahunty *et al.*, 2006; d'Acampora Zellner *et al.*, 2008; Aceña Muñoz, 2011; Chin *et al.*, 2017). Como resultado de ésta técnica se obtiene simultáneamente un perfil de composición (cromatograma) y un perfil aromático (aromograma), lo que permite la identificación de odorantes de impacto de la muestra (Figura 4) (van Ruth, 2001; Delahunty *et al.*, 2006; d'Acampora Zellner *et al.*, 2008; Aceña Muñoz, 2011).

Para que ésta evaluación sensorial tenga validez, es fundamental que los evaluadores sean parte de un panel de jueces entrenados en la metodología, y que para la descripción de los aromas se considere un vocabulario estandarizado y unificado según las llamadas familias de aromas (van Ruth, 2001; Grosch, 2007; Chin y Marriott, 2015; Chin *et al.*, 2017). Por ejemplo, en el caso del vino, existe una “rueda de aromas” que clasifica los mismos en descriptores primarios, secundarios y terciarios (Noble *et al.*, 1987; Aceña Muñoz, 2011). En éste trabajo de tesis se empleó para GC-O dicha rueda aromática debido a que se contó con la evaluación de jueces integrantes del Panel Sensorial del Vino de Facultad de Química-UdelaR.

La metodología de GC-O es de amplia aplicación actual en una gran variedad de productos de consumo como: queso, vino, cerveza, frutas, café, té, miel, pan, aceites comestibles, carne, pescado, especias, yerba mate, arroz, leche, hongos comestibles, etc. (Grosch, 2007; Aceña Muñoz, 2011; Márquez *et al.*, 2013; Chin y Marriott, 2015; Zhu *et al.*, 2016; Xiao *et al.*, 2017; Aisala *et al.*, 2019). Sin embargo, aún son incipientes en la literatura los trabajos que emplean GC-O para evaluar los extractos volátiles y aceites esenciales de plantas aromáticas (Xavier *et al.*, 2013; Miyazawa *et al.*, 2016; Xavier *et al.*, 2017; Minteguiaga *et al.*, 2017).



**Figura 4:** Metodología de la cromatografía gaseosa-olfatometría (GC-O) que permite la obtención simultánea de un cromatograma y un aromograma de un extracto aromático. Fuente: Aceña Muñoz (2011).

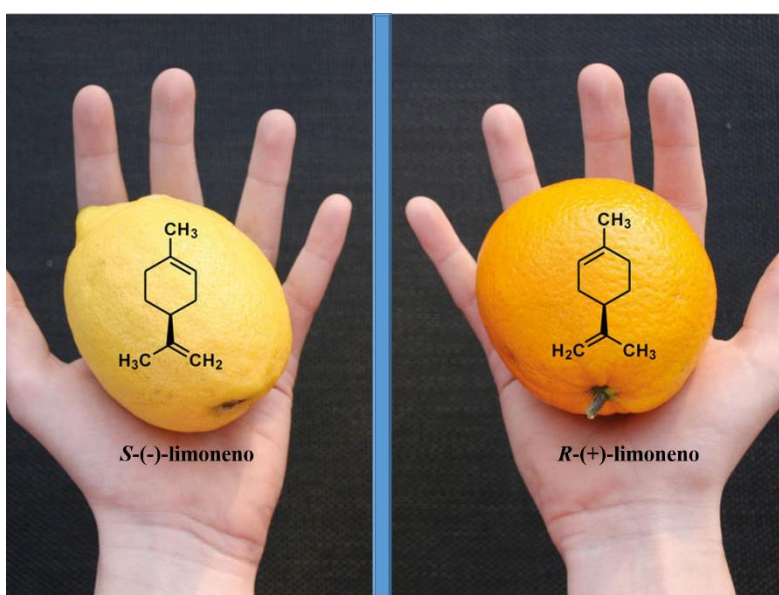
Es frecuente mediante *GC-O* detectar aromas que no tienen una señal correspondiente en el detector instrumental (evidenciado como un pico cromatográfico), lo que indica que la nariz humana es más sensible para algunos tipos de compuestos (Delahunty *et al.*, 2006; Aceña Muñoz, 2011). Asimismo, una de las grandes ventajas de la técnica es que permite hacer una evaluación de aromas de componentes de mezclas complejas por separado, aunque los mismos se encuentren en baja concentración en la matriz original (Aceña Muñoz, 2011; Chin y Marriott, 2015; Chin *et al.*, 2017).

### 1.6 Enantiómeros y cromatografía gaseosa enantioselectiva (*eGC*)

Muchos de los compuestos volátiles biosintetizados por las plantas son de naturaleza quiral, es decir, cuentan con un par de enantiómeros cuyas estructuras son imágenes especulares no superponibles en el espacio, a semejanza de las manos derecha e izquierda (Figura 5) (Carey, 2008; Scriba, 2011). Lo anterior es de extrema importancia en el caso de los compuestos odorantes, ya que uno de los enantiómeros puede presentar un aroma dado, y el otro puede ser inodoro o presentar un aroma



totalmente diferente (Carey, 2008; Scriba, 2011). Tal es el caso por ejemplo del limoneno (Figura 5), en donde el enantiómero 4-*R*-(+) posee un aroma suave, dulce semejante a la naranja; mientras que el 4-*S*-(-) tiene un aroma fuerte, agrio, con reminiscencia a limón (Scriba, 2011; Klika, 2013). Como consecuencia de lo anterior, la determinación de la pureza enantiomérica (análisis enantioselectivo) es de suma importancia en la industria de aromas y fragancias (en especial en lo que respecta a los aceites esenciales cítricos), incluso siendo un requisito importante para el control de calidad, autenticidad y origen geográfico de la materia prima y producto terminado (Tranchida *et al.*, 2012).



**Figura 5:** Enantiómeros del limoneno, su relación de imágenes especulares (al igual que las manos) y sus aromas característicos a limón (*levógiro*) y naranja (*dextrógiro*). Fuente: Scriba (2011).

Otro aspecto importante del análisis enantioselectivo es la posibilidad de brindar una aproximación más detallada de los aspectos biosintéticos, debido a que el exceso enantiomérico es el reflejo de los sistemas enzimáticos involucrados (Köning *et al.*, 1992; Köning, 1998; Degenhardt *et al.*, 2009). Las terpen-sintasas son enzimas que catalizan la biosíntesis de los compuestos terpénicos y en general son capaces de producir una diversidad de metabolitos con estereoquímica definida a partir de los mismos precursores (IPP, DMAPP y sus productos de condensación) (Degenhardt *et al.*, 2009). La capacidad de generar más de un compuesto se explica porque estos sistemas enzimáticos en general poseen más de un sitio activo, y porque existen una diversidad de opciones de estabilización de los carbocationes intermediarios (capítulo 1)



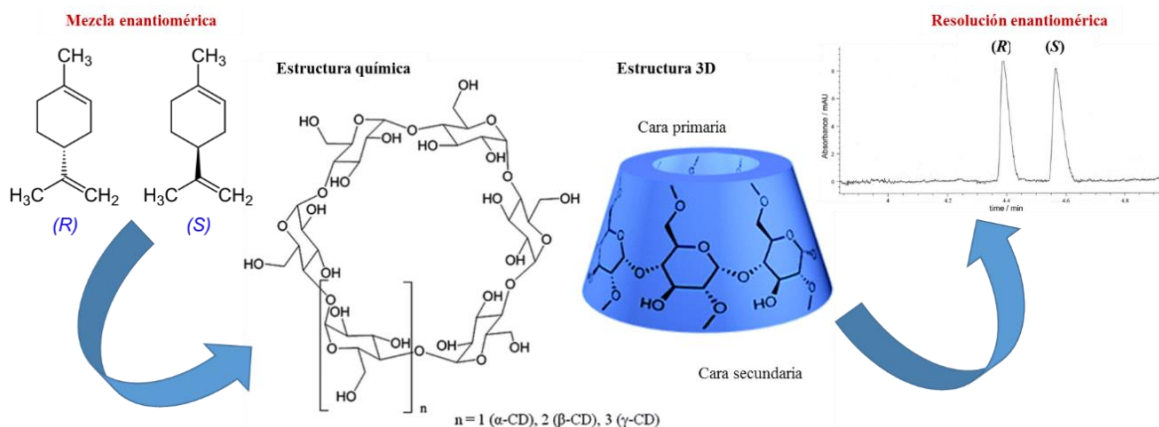
(**Degenhardt et al., 2009**). De hecho, más de la mitad de las terpen-sintasas forman su producto principal y cantidades significativas y constantes de productos secundarios, lo que es característico de cada enzima en particular (**Degenhardt et al., 2009**). Por ejemplo, dos limoneno sintasas han sido secuenciadas y caracterizadas en limón (*Citrus limon*; Rutaceae), siendo sus productos metabólicos 4-*R*-(+)-limoneno (99,2%), mirceno (0,8%) y trazas de  $\alpha$ -pineno (ambos enantiómeros) (**Lücker et al.; 2002**). Sin embargo, otras dos monoterpen sintasas caracterizadas en el mismo trabajo:  $\gamma$ -terpineno y  $\beta$ -pineno sintasas, producen (además de sus productos principales y otros secundarios) 9,1% y 3,5% de 4-*S*-(-)-limoneno, con un exceso enantiomérico de 60% y 78%, respectivamente (**Lücker et al.; 2002**). Lo anterior demuestra que cada tipo de enzima aporta una proporción enantiomérica definida, pero será el conjunto de la maquinaria biosintética presente en una planta el que dará los excesos observados a través del análisis enantioselectivo, lo que realza su importancia como herramienta metabolómica y quimiotaxonómica (**Köning, 1998; Tranchida et al., 2012**).

La información del análisis enantioselectivo de componentes volátiles quirales en general se obtiene por cromatografía gaseosa enantioselectiva (*eGC*), técnica caracterizada por una alta selectividad analítica (**Bicchi et al., 1999; Tranchida et al., 2012; Cagliero et al., 2017**). Si bien ésta metodología puede aplicarse a través de un único cromatógrafo gaseoso, es usual que para el caso de matrices complejas (como los aceites esenciales) se emplee cromatografía gaseosa multidimensional (*MDGC*) o cromatografía gaseosa exhaustiva (*GC $\times$ GC*) utilizando cromatógrafos acoplados (**Bicchi et al., 1999; Tranchida et al., 2012; Cagliero et al., 2017**).

El centro de la *eGC* es la fase estacionaria empleada, la que debe ser intrínsecamente quiral (llamada también selector quiral) para permitir una adecuada separación de los enantiómeros (**Bicchi et al., 1999; Scriba, 2011; Tranchida et al., 2012; Cagliero et al., 2017**). Las más usualmente empleadas son las fases líquidas del tipo ciclodextrina (CD) modificadas, en que varias moléculas de *D*-glucopiranososa se unen en conformación de silla formando un “cono quiral” (Figura 6), dentro del cual existe un “hueco” hidrofóbico en el que interactúan los enantiómeros a separar mediante fuerzas no covalentes (**Bicchi et al., 1999; Zhou y Ritter, 2010; Scriba, 2011; Tranchida et al., 2012**). Dado que cada uno de los enantiómeros tiene una disposición espacial diferente, se produce una interacción diferencial en el hueco, y una separación temporal en el sistema cromatográfico, lo que se aprecia como dos picos más o menos resueltos



(Figura 6) (Köning *et al.*, 1992; Köning, 1998; Bicchi *et al.*, 1999; Tranchida *et al.*, 2012; Cagliero *et al.*, 2017). Las ciclodextrinas pueden clasificarse en  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD o  $\gamma$ -CD dependiendo del número de residuos de carbohidratos contenidos en el “cono”: 6, 7 u 8, respectivamente (Figura 6) (Zhou y Ritter, 2010; Scriba, 2011).



**Figura 6:** Resolución enantiomérica del limoneno a través de eGC empleando una fase estacionaria de ciclodextrinas modificadas (CDs). Fuente: Zhou y Ritter (2010).

## 2. MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Colecta del material vegetal

Partes aéreas de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. y *Baccharis tridentata* Vahl en estado de floración fueron colectadas de poblaciones silvestres en el estado de Rio Grande do Sul (Brasil), según las siguientes condiciones:

Especie	<i>B. articulata</i> (Lam.) Pers.	<i>B. tridentata</i> Vahl
Fecha de colecta:	11/2011	07/2014
Partes colectadas	Partes aéreas en floración	Partes aéreas en floración
Arquitectura de plantas	Plantas verdes de 1,0-2,0 m de altura; florecidas	Plantas verdes de 1,0-1,5 m de altura; florecidas
Lugar	Sitio cercano a la Universidad de Caxias do Sul (UCS). Caxias do Sul-RS, Brasil	“CPCN Pró-Mata” (PUCRS). S.F. de Paula-RS-Brasil
Coordenadas geográficas	(29°10'S, 51°07'W)	(29°28'S, 50°10'W)
Hábitat y condiciones de crecimiento	Población lindera a bosque nativo	Población densa en pradera
Relieve	Abrupto	Plano con afloramientos rocosos
Reconocimiento botánico	C. Mondin (PUCRS)	P.M. Abreu (PUCRS)
Muestra de herbario	M. Minteguiaga MVFQ 4417	M. Minteguiaga MPUC 19926

**Tabla 1:** Condiciones de colecta de las especies empleadas para estudio químico del dioicismo.



Las muestras de individuos masculinos y femeninos fueron cuidadosamente separadas en el lugar de colecta y transportadas al laboratorio en bolsas de tela. Una porción del material vegetal fue herborizada y depositada en los herbarios de la Facultad de Química (UdelaR-Montevideo; *B. articulata* MVFQ 4417) y de la Pontificia Universidad Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS-Porto Alegre; *B. tridentata* MPUC 19926) (Tabla 1). El material sexado fue secado separadamente por dos días antes de la extracción de los componentes volátiles, de manera de minimizar la pérdida de los mismos.

## **2.2 Extracción de componentes del volátiloma**

En éste caso se emplearon dos metodologías diferentes para la extracción de los volátiles debido al destino posterior que se le daría a cada extracto: *GC-O* para *B. articulata*, y *eGC*, *GC-FID* y cromatografía en columna para *B. tridentata*.

Para ambas especies, el material vegetal masculino y femenino fue procesado de manera separada y en condiciones de minimizar la contaminación cruzada. En el caso de *B. articulata*, una porción de 120 g de material vegetal de cada sexo fue extraída por la metodología de extracción-destilación simultánea (*SDE*) por un período de 60 minutos, según las condiciones experimentales reportadas en el capítulo 3 (**Chaintreau, 2001; Zhu et al., 2008**). En tanto, para el caso de *B. tridentata*, 300 g de material vegetal de cada sexo fueron sometidos a destilación por arrastre con agua-vapor (*SD*) en una trampa tipo Clevenger durante 90 minutos, según las condiciones previamente detalladas también en el capítulo 3 (**Bicchi & Maffei, 2012**). En ambos casos se obtuvieron extractos de color amarillo claro y aroma dulce-meloso, los que fueron almacenados a refrigeración (-20°C) en frascos de color ámbar hasta su análisis.

## **2.3 Análisis por GC-MS (*B. articulata* y *B. tridentata*)**

Los análisis por *GC-MS* fueron realizados para ambas especies y ambos sexos en duplicado, según las condiciones experimentales detalladas previamente en los capítulos 3 y 4.





#### 2.4 Análisis por GC-O (*B. articulata*)

Los análisis fueron realizados en un cromatógrafo gaseoso *Shimadzu 14B* equipado con el *software* procesador *EZ-Chrom* (*Shimadzu Corporation, Tokyo, Japón*) acoplado a un puerto olfatométrico *ODO-1* (*SGE, Ringwood, Australia*). Para ello se empleó una columna capilar de fase polar *HP-InnoWax* (*Agilent Technologies, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, EEUU*) con las siguientes dimensiones: 30 m de largo  $\times$  0,32 mm de diámetro interno  $\times$  0,25  $\mu$ m de espesor de fase.

El programa de temperaturas empleado en el horno cromatográfico fue: 40°C (5 min), 40-100°C a 4°C/min, 100-136°C a 6°C/min, 136-220°C a 3°C/min, 220°C (10 min). Estas condiciones experimentales fueron previamente optimizadas para el análisis olfatométrico de aceites esenciales de *Baccharis* spp. y de cítricos en nuestro laboratorio (**Xavier et al., 2013; Xavier et al., 2017; Minteguiaga et al., 2017**). Las temperaturas del inyector, de la interfase de transferencia al *ODO-1* y del detector (*FID*) fueron mantenidas constantes a 250°C. Se inyectaron 0,5  $\mu$ L del extracto concentrado en modalidad *Splitless* (1 minuto de muestreo, y posteriormente se empleó una razón de *Split* 20:1). Se utilizó nitrógeno como fase móvil (1,0 mL/min) y como *make-up* (5,0 mL/min) en el puerto olfatométrico. Este último se equipó con un aparato humidificante de manera de reducir la deshidratación de la mucosa nasal en las condiciones de análisis (**Xavier et al., 2013; Xavier et al., 2017; Minteguiaga et al., 2017**).

Un panel de seis jueces sensoriales (panel del vino Facultad de Química-UdelaR) realizó las evaluaciones (por duplicado) de las cualidades aromáticas de los extractos de *SDE* para ambos sexos de *B. articulata*. Ninguno de los asesores presentó anosmias, y en todos los casos fueron jueces con amplia experiencia en evaluaciones mediante *GC-O*. Cada uno de ellos evaluó el aroma percibido durante 60 minutos, realizando una sesión por día de manera de evitar el agotamiento nasal. Se solicitó a los jueces que categorizaran la intensidad aromática percibida en todo momento empleando una escala aromática de 4 puntos (0 = no detectado; 1 = débil, aroma difícilmente reconocible; 2 = aroma claro pero no intenso, 3 = aroma intenso), permitiéndose además valores intermedios (**Escudero et al., 2007**). También se le pidió a cada uno de los asesores que suministrase una descripción del aroma percibido, empleando para ello como referencia la clasificación en familias aromáticas de la “rueda de aromas del vino” (**Noble et al., 1987**). Como una primera restricción, los odorantes considerados como significativos



fueron aquellos que al menos la mitad de los jueces pudieron identificar en el mismo tiempo de retención cromatográfico. Finalmente, los datos procesados fueron la intensidad aromática percibida y la frecuencia de detección, calculando el parámetro Frecuencia Modificada (FM) propuesto por Dravnieks (**Dravnieks, 1985**), cuya expresión matemática es:

$$FM (\%) = [F (\%) \times I (\%)]^{1/2}$$

donde, F es la frecuencia de detección de un atributo aromático por parte de los panelistas (expresada como porcentaje) e I es la intensidad promedio categorizada por los mismos (como porcentaje de la máxima intensidad percibida) (**Dravnieks, 1985**).

Como una segunda restricción, se tomaron en cuenta solamente los odorantes que suministraron un valor de FM mayor a 40 % (**Xavier et al., 2013; Xavier et al., 2017; Minteguiaga et al., 2017**). La identificación química de los odorantes fue realizada por comparación entre *LRI*s y orden de elución de los análisis de *GC-O* y *GC-MS* de la misma muestra en la misma fase estacionaria. Por su parte, las descripciones organolépticas de los aromas fueron comparadas con la información disponible en la base de datos Flavornet (**Acree y Arn, 1984-2019**), de manera de armonizar el vocabulario de las notas aromáticas percibidas y facilitar su reporte.

### 2.5 Análisis por *GC-FID* (*B. tridentata*)

Para cuantificar los principales componentes de los aceites esenciales de ambos sexos de *B. tridentata* se empleó un cromatógrafo gaseoso *Shimadzu 14B* con detector de *FID* en análisis por duplicado. La columna capilar fue una de fase poco polar compuesta por 95%-metil-5%-fenilpolisiloxano (25 m × 0,32 mm × 0,40 μm de espesor de fase) (*SE-52, Mega SNC, Legnano, Italia*). La fase móvil fue nitrógeno (1,0 mL/min). El programa de temperaturas fue idéntico al correspondiente del análisis por *GC-MS* en la misma fase estacionaria (capítulo 3). Temperatura del inyector, 250°C; temperatura del detector (*FID*), 280°C. Modo de inyección, *Split*, con una relación 1:30; volumen de inyección, 1 μL de aceite puro.

La identificación de los componentes fue realizada por comparación entre los perfiles cromatográficos de los análisis por *GC-FID* y los correspondientes por *GC-MS* en la



misma fase estacionaria, y por cálculo de los respectivos índices de retención lineal (*LRI*s; capítulo 3). El hidrocarburo saturado *n*-tetradecano (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, MI., EEUU) fue empleado como estándar interno; concentración, 20,0 µg/mL en el aceite puro. La elección de tal estándar fue realizada luego de un cuidadoso análisis para evitar posibles co-eluciones analíticas con componentes propios del aceite esencial. Las áreas de picos cromatográficos fueron normalizadas a la concentración del estándar, considerando el mismo factor de respuesta para cada analito (igual a uno).

## 2.6 Análisis por *eGC-MS* (*B. tridentata*)

La separación quiral de los principales monoterpenos del aceite esencial de *B. tridentata* ( $\alpha$ -tuyeno,  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno,  $\beta$ -pineno, limoneno y acetato de bornilo) fue realizada con un selector quiral (columna capilar) *CycloSil-B* compuesto por 30% heptakis 2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butil-dimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina sobre fase *DB-1701* (14% cianopropilfenil-86%-dimetilpolisiloxano) (*Agilent Technologies*, *Walt & Jennings Scientific*). Las dimensiones de dicha columna fueron: 30 m  $\times$  0,25 mm  $\times$  0,25 µm de espesor de fase y fue instalada en un cromatógrafo gaseoso *HP6890* acoplado a un espectrómetro de masa *HP5973* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, CA, EEUU).

El programa de temperaturas optimizado para la separación analítica de los monoterpenos quirales fue: 65°C (1 min), 65-100 °C a 1°C/min, 100°C (1 min), 100-150°C a 2°C/min, 150-220°C a 10°C/min, 220°C (3 min). Todas las demás condiciones experimentales fueron idénticas al análisis por *GC-MS* en columna poco polar descritas en el capítulo 3.

Para optimización del programa de separación quiral fueron empleados los siguientes estándares (*Dragoco*, *Holzminden*, *Alemania*):  $\beta$ -pineno (enantioméricamente impuro), acetato de isobornilo (enantioméricamente impuro) y acetato de bornilo (enantiómero levógiro; 100% de pureza). También se empleó un estándar de borneol enantioméricamente impuro (*Merck*, *Darmstadt*, *Alemania*).

Los aceites esenciales de individuos masculinos y femeninos de *B. tridentata* fueron analizados en duplicado. La identificación del orden de elución de los enantiómeros monoterpénicos fue por comparación con trabajos anteriormente publicados que empleasen el mismo tipo de selector quiral (**Köning *et al.*, 1992; Köning, 1998; Bicchi**



*et al.*, 1999) y con resultados previamente obtenidos en nuestro laboratorio (**Lorenzo *et al.*, 2004; 2005**). El orden de elución de los enantiómeros del borneol fue identificado de acuerdo al trabajo de Ravid *et al.* (1996).

### 2.7 Aislamiento de acetato de bornilo del aceite esencial de *B. tridentata*

Una porción del aceite esencial de *B. tridentata* (0,856 g; muestra compuesta por aceite de individuos masculinos y femeninos) fue fraccionada por cromatografía en columna (CC) sobre 30,09 g de sílica gel (230-400 mesh; *Merck*) como fase estacionaria. Todos los solventes empleados en ésta sección y en las próximas fueron de calidad analítica (*Cicarelli, San Lorenzo, SF, Argentina*), los que fueron destilados previamente a su uso. La elución de la CC fue realizada de manera isocrática con una fase móvil éter de petróleo-AcOEt (20:1) y un flujo prefijado de 2,4 mL/min. El monitoreo de la separación fue realizado por *TLC* sobre placas comerciales de sílica gel (Si-gel60 F<sub>254</sub>; *Merck*) empleando la misma fase móvil que en el caso de la CC. Para el revelado, las placas fueron asperjadas con *p*-anisaldehído (*Sigma-Aldrich*) diluido en una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (**Wagner *et al.*, 1984**). Posteriormente, las placas fueron sometidas a calor, y en dichas condiciones, tanto el acetato de bornilo como el borneol se visualizaron como manchas intensas de color amarillo. Como patrón de separación y visualización de ésteres, se empleó aceite esencial de *B. trimera* debido a su alto contenido en acetato de carquejilo (capítulo 7).

Luego de todo el proceso cromatográfico, se obtuvieron 30 mg de acetato de bornilo (84% de pureza por análisis en *GC-MS*).

### 2.8 Preparación de acetato de bornilo por acetilación de borneol patrón

Con propósitos comparativos para los análisis por *eGC-MS* se preparó acetato de bornilo por acetilación de borneol. Para ello se tomó una alícuota de 200,0 mg de borneol patrón enantioméricamente impuro (*Merck*), al que se sometió a acetilación por adición de 2,0 mL de anhídrido acético (calidad analítica; *Cicarelli*) en condiciones de calentamiento a 70°C durante 2 h en un vial de vidrio. El progreso de la reacción fue seguido por *TLC* en las condiciones previamente descriptas, y el rendimiento (93%) fue



confirmado por inyección en *GC-MS*. El exceso de anhídrido acético fue eliminado por adición gota a gota de una solución acuosa al 20% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Cicarelli). La extracción del acetato de bornilo resultante del medio de reacción fue realizada por agitación vigorosa del mismo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 2 mL) en bola de decantación. Finalmente, todas las capas orgánicas fueron reunidas y se agregó  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro (Cicarelli) para eliminar restos acuosos, con posterior filtración por papel.

### 2.9 Preparación de borneol por saponificación de acetato de bornilo natural

Una alícuota de acetato de bornilo obtenida del aislamiento desde el aceite esencial de *B. tridentata* (ver punto 2.7) fue sometida a saponificación para obtener borneol. El procedimiento fue realizado en condiciones suaves, de acuerdo a lo reportado previamente por Theodorou *et al.* (2007) con pequeñas modificaciones. Brevemente, una alícuota de acetato de bornilo (15,0 mg diluidos en 2,25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  destilado) se puso en contacto con 0,25 mL de una solución metanólica 2,2 N de NaOH (Anedra, Buenos Aires, BA, Argentina) en un vial de vidrio; relación final de volúmenes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (9:1). Se permitió reaccionar a la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h, realizando monitoreo de avance por *TLC* cada 30 min en las mismas condiciones descritas anteriormente.

El *make-up* de la reacción fue realizado por adición de 15,0 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  al medio. Posteriormente, la neutralización se realizó por lavado en una bola de decantación secuencialmente con 2 x 5 mL de agua destilada y 2 x 3 mL de una solución acuosa al 5% de HCl (Cicarelli). La capa orgánica obtenida fue secada por adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, filtrada y evaporada a vacío (rotavapor) previo al análisis por *eGC-MS*.

## 3 RESULTADOS Y DISCUSION

### 3.1 Composición de los extractos volátiles de ambos sexos de *B. articulata*

En la Tabla 2 se presentan los resultados de composición de los extractos volátiles de ambos sexos de *B. articulata* (identidad de los compuestos y sus respectivos porcentajes en *GC-MS*), así como también se exponen los resultados obtenidos de los experimentos de *GC-O*: FM de detección de los odorantes más importantes y sus descriptores



asociados. A efectos comparativos, también se presentan las notas aromáticas percibidas para otras *Baccharis* spp. estudiadas anteriormente en nuestro grupo de investigación (Xavier *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2017) y los descriptores que figuran en la base de datos Flavornet (Acree y Arn, 1984-2019).

El trabajo que aquí se reporta para la diferenciación de género en una especie dioica mediante el análisis de sus metabolitos volátiles empleando *GC-O* como herramienta analítica resultó novedoso en la literatura. En nuestro conocimiento, éste trabajo fue el primero de su tipo publicado (ver anexo), y, posteriormente Miyazawa *et al.* (2016) aplicaron el mismo procedimiento para la diferenciación de los extractos volátiles provenientes de los botones florales de la especie dioica *Eurya japonica* (Pentaphylacaceae).



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

Compuesto <sup>1</sup>	LRI1 <sup>2</sup>	LRI2	%A M <sup>3</sup>	%A F <sup>3</sup>	FM M <sup>4</sup>	FM F <sup>4</sup>	Desc.Arom. M. <sup>5</sup>	Desc. Arom. F. <sup>5</sup>	Desc.Arom. Bacch. <sup>6</sup>	Desc.Arom. Flav. <sup>7</sup>
hexanal	800	1063	0,7	0,1	-	-	-	-	-	pasto, grasa
3-(Z)-hexenol	850	1366	0,02	tr	-	-	-	-	-	pasto
4-(Z)-heptenal	893	1224	0,3	tr	-	-	-	-	-	crema
nonano	900	900	0,02	0,1	-	-	-	-	-	combustible
heptanal	902	1167	0,03	tr	-	-	-	-	-	grasa, rancio
triciclono	920	-	.	tr	-	-	-	-	-	N.R.
<b>α-tuyeno</b> <sup>b,g</sup>	925	1013	0,02	0,02	-	-	-	-	-	madera, pasto
<b>α-pineno</b> <sup>a,c,d,e,f,g</sup>	931	1009	3,2	2,6	-	-	-	-	menta <sup>u</sup> , miel <sup>u</sup>	pino, trementina
α-fencheno	944	-	-	0,01	-	-	-	-	-	N.R.
<b>canfeno</b> <sup>a,b</sup>	946	-	0,03	0,03	-	-	-	-	-	alcanfor
benzaldehído	959	1487	0,03	0,01	50	-	almendras, azúcar quemado	-	-	almendras
<b>sabineno</b> <sup>d,g</sup>	973	1107	0,3	0,2	58	-	madera	-	dulce <sup>a,d</sup> , ajo <sup>a</sup> , especiado <sup>u</sup> , quemado <sup>u</sup>	madera, pimienta
<b>β-pineno</b> <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>	979	1099	31,4	28,7	-	-	-	-	miel <sup>a</sup> , herbal <sup>d</sup> , especiado <sup>u</sup> , quemado <sup>u</sup>	pino, trementina
<b>mirreno</b> <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>	992	1152	1,0	1,1	50	-	balsámico, especiado	-	dulce <sup>a</sup> , cítrico <sup>a</sup>	moho, especiado
6-metil-5-hepten-2-ona	990	1146	-	tr	-	-	-	-	-	N.R.
decano	1000	1000	0,02	0,01	-	-	-	-	-	combustible
<b>δ-3-careno</b> <sup>a,b</sup>	1003	1107	-	tr	-	-	-	-	-	limón, resina
<i>p</i> -menta-1(7),8-dieno	1003	-	0,02	0,06	-	-	-	-	-	N.R.
octanal	1004	1270	0,06	tr	62	-	pasto	-	-	grasa, jabón
α-terpineno	1016	1162	0,05	0,04	-	-	-	-	metálico <sup>d</sup>	limón
<b><i>p</i>-cimeno</b> <sup>b,d,g</sup>	1024	1249	0,03	0,03	-	-	-	-	combustible <sup>a</sup> , naranja <sup>u</sup>	solvente, gasolina
<b>limoneno</b> <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>	1031	1186	12,9	13,1	-	-	-	-	refrescante <sup>a</sup> , pasta dental <sup>a</sup>	limón, naranja
<b>1,8-cineol</b> <sup>e</sup>	1032	-	0,03	0,05	-	-	-	-	-	eucalipto, menta



Tabla 2, continuación

alcohol bencílico	1036	-	0,02	tr	-	-	-	-	-	dulce, floral
(Z)- $\beta$ -ocimeno	1039	1190	0,04	0,05	-	-	-	-	-	herbal, floral
fenilacetaldehído	1044	-	0,05	0,04	-	-	-	-	-	N.R.
(E)- $\beta$ -ocimeno <sup>a,b,g</sup>	1050	1237	1,8	2,2	73	53	pasto, terpénico	pasto, terpénico	-	herbal, dulce
$\gamma$ -terpineno <sup>g</sup>	1058	1228	0,07	0,07	-	-	-	-	almendras <sup>a</sup> , terpénico <sup>u</sup> , floral <sup>u</sup>	gasolina, trementina
(Z)-hidrato de sabineno	1068	-	0,02	0,02	-	-	-	-	-	balsámico
(Z)-óxido de linalol (furanoide)	1075	1448	0,03	tr	-	-	-	-	-	floral
terpinoleno <sup>a,b</sup>	1087	1262	0,09	0,1	-	-	-	-	medicinal <sup>a</sup>	N.R.
(E)-óxido de linalol (furanoide)	1091	1446	0,04	0,01	50	41	floral, té	floral, té	-	floral
linalol <sup>a,b</sup> + hotrienol	1100	1527, 1585	0,2	0,2	58 + 53	62 + (-)	floral + pasto, refrescante	floral	dulce <sup>a,u</sup> , floral <sup>u</sup>	floral, lavanda + jacinto
nonanal	1105	1373	0,1	0,04	-	-	-	-	perfume <sup>u</sup> , dulce <sup>u</sup>	grasa, pasto
endo-fenchol	1112	-	0,02	0,03	-	-	-	-	-	alcanfor
(E)-4,8-dimetil-1,3,7-nonatriene	1117	-	0,3	0,1	-	-	-	-	-	N.R.
(E)- <i>p</i> -menta-2,8-dien-1-ol	1121	1643	0,1	0,09	41	-	menta	-	-	menta, refrescante
(Z)- <i>p</i> -mentha-2,8-dien-1-ol	1136	-	0,05	0,03	-	-	-	-	-	N.R.
(E)-pinocarveol	1137	1626	0,2	0,09	62	-	herbal	-	herbal <sup>a</sup> , miel <sup>u</sup> , floral <sup>u</sup>	floral
(E)- <i>p</i> -menth-8-en-1-ol	1141	1576	-	0,03	-	-	-	-	-	N.R.
hidrato de canfeno	1147	-	-	0,03	-	-	-	-	-	alcanfor
citronelal	1148	1455	tr	0,01	-	-	-	-	citronela <sup>u</sup>	grasa
pinocarvona <sup>b,f</sup>	1162	1535	0,1	0,06	75	58	dulce, herbal	dulce, herbal	bocadillos <sup>a</sup> , menta <sup>u</sup> , floral <sup>u</sup>	N.R.
endo-borneol	1165	-	-	0,03	-	-	-	-	alcanfor <sup>u</sup> , eucalipto <sup>u</sup>	alcanfor
(Z)-pinocanfona + isopinocanfona + isopinocanfeol	1174	1512, 1542, 1539	0,06	0,02	50	-	té, papel nuevo	-	-	N.R.
terpinen-4-ol <sup>a,b,g</sup>	1177	1576	0,2	0,2	-	-	-	-	madera <sup>a</sup> , tierra <sup>a</sup>	trementina, nuez moscada





Tabla 2, continuación

<i>p</i> -cimen-8-ol	1185	1816	tr	0,02	-	-	-	-	-	citrus, moho
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b> <sup>a,b,c,e,g</sup>	1190	1671	0,4	0,5	-	-	-	-	-	anís, menta
<b>mirtenol<sup>f</sup> + mirtenal<sup>b</sup></b>	1196	1764, 1596	0,2	0,1	58	nd	especiado	-	alcanfor <sup>a</sup> , menta <sup>a</sup> , quemado <sup>u</sup>	especiado
( <i>E</i> )-piperitol	1200	1718	0,04	0,02	-	-	-	-	-	herbal
decanal	1207	1477	0,3	0,06	-	-	-	-	-	jabón, cebo
( <i>E</i> )-carveol	1219	-	0,05	0,03	-	-	-	-	especiado <sup>a,u</sup> , tierra <sup>a</sup>	comino, solvente
nerol	1230	-	-	0,02	-	-	-	-	-	dulce
isovalerato de 3-( <i>Z</i> )-hexenilo	1238	1468	0,04	0,01	-	-	-	-	-	N.R.
<b>neral<sup>a</sup></b>	1243	1650	-	0,08	-	-	-	-	-	limón
carvona	1244	-	-	0,01	-	-	-	-	limón <sup>u</sup>	menta, hinojo
geraniol	1257	1818	tr	0,05	65	60	dulce, floral	dulce, floral	-	rosa, geranio
geranial	1272	-	-	0,1	-	-	-	-	citrus <sup>u</sup>	limón, menta
safrol	1275	1837	0,6	0,07	60	-	anís, floral	-	-	especiado, dulce
acetato de ( <i>E</i> )-pinocarvilo	1288	1620	0,04	0,03	-	-	-	-	-	N.R.
2-undecanona	1295	-	-	0,01	-	-	-	-	-	naranja, refrescante
acetato de carquejilo	1300	-	0,4	0,2	-	-	-	-	-	N.R.
undecanal	1308	-	0,1	0,06	-	-	-	-	-	aceite, pungente
<b>p</b> -vinilguayacol	1313	-	0,02	0,05	-	-	-	-	-	humo, medicinal
2,4-( <i>E</i> , <i>E</i> )-decadienal	1318	-	0,02	0,04	-	-	-	-	-	alga
tiglato de 3-( <i>Z</i> )-hexenilo	1326	-	0,04	tr	-	-	-	-	-	N.R.
<b><math>\delta</math>-elemeno<sup>b</sup></b>	1338	1460	0,05	0,06	-	-	-	-	-	madera
antranilato de metilo	1341	-	0,03	0,02	-	-	-	-	-	miel, floral
<b><math>\alpha</math>-cubebeno<sup>a,b,e</sup></b>	1350	-	0,04	0,04	-	-	-	-	herbal <sup>u</sup> , citrus <sup>u</sup> , lavanda <sup>u</sup>	herbal, cera
eugenol	1358	-	0,02	0,03	-	-	-	-	-	clavo, miel
<b><math>\alpha</math>-copaeno<sup>a,b,g</sup></b>	1376	1472	0,2	0,2	-	-	-	-	tierra <sup>u</sup>	madera, especiado



Tabla 2, continuación

<b><math>\beta</math>-cubebeno<sup>a,b,e</sup></b>	1391	1517	0,2	0,1	-	-	-	-	antigüedad <sup>a</sup> , citrus <sup>u</sup>	citrus, frutal
<b><math>\beta</math>-elemeno<sup>a,b,f,g</sup></b>	1393	1567	0,2	0,3	47	50	herbal	herbal	rosa <sup>a</sup> , coco <sup>u</sup>	herbal, cera
<b>metil eugenol<sup>d</sup></b>	1406	1976	0,5	1,2	62	-	especiado	-	-	clavo, especiado
<b><math>\alpha</math>-gurjuneno<sup>a,b,e</sup></b>	1410	-	-	0,03	-	-	-	-	madera <sup>u</sup>	madera, balsámico
$\beta$ -cedreno	1413	-	-	0,03	-	-	-	-	-	N.R.
<b>(E)-<math>\beta</math>-cariofileno<sup>a,b,c,d,f,g</sup></b>	1421	1572	2,2	2,2	71	41	dulce, herbal	dulce, herbal	chinche <sup>a</sup> , dulce <sup>a</sup> , <i>pop-corn</i> <sup>u</sup>	madera, especiado
$\beta$ -copaeno	1430	-	0,2	0,1	-	-	-	-	chinche <sup>u</sup>	N.R.
$\alpha$ -guaiano	1440	-	0,07	0,08	-	-	-	-	-	madera, balsámico
<b>(E)-<math>\beta</math>-farneseno<sup>a,b,e</sup></b>	1452	1643	0,07	0,07	-	-	-	-	medicinal <sup>d,u</sup> , madera <sup>u</sup> , quemado <sup>u</sup>	madera, dulce
<b><math>\alpha</math>-humuleno<sup>a,b,g</sup> (<math>\alpha</math>-cariofileno)</b>	1455	1641	0,2	0,2	-	-	-	-	queso <sup>a</sup> , bocadillos <sup>a</sup> , fresco <sup>u</sup> , herbal <sup>u</sup>	madera
(E)-cadina-1(6),4-dieno + <i>ar-curcumeno</i>	1476	-, 1758	-	0,2	-	-	-	-	-	(N.R.) + (N.R.)
<b><math>\gamma</math>-muroleno<sup>a,b,e,g</sup></b>	1476	-	0,1	0,3	-	-	-	-	-	herbal, madera
dauca-5,8-dieno	1479	-	0,2	tr	-	-	-	-	-	N.R.
$\alpha$ -amorfenol	1480	1664	tr	tr	55	-	pasto	-	-	N.R.
<b>germacreno D<sup>a,b,d,f,g</sup></b>	1485	1684	8,8	8,7	69	41	heno, madera	heno, madera	madera <sup>a</sup> , especiado <sup>a</sup>	madera, especiado
<b>valenceno<sup>a,b</sup></b>	1488	-	0,05	0,1	-	-	-	-	-	pasto, aceite
(E)-murola-4(14),5-dieno	1494	-	0,1	tr	-	-	-	-	-	N.R.
<b>biciclogermacreno<sup>a,b,d</sup></b>	1500	1707	4,9	5,8	44	-	especiado	-	limón <sup>a</sup> , pasto <sup>a</sup>	pasto, madera
<b><math>\alpha</math>-muroleno<sup>a,b,f</sup></b>	1502	1699	0,4	0,4	55	-	pasto	-	-	madera
germacreno A	1507	-	0,2	tr	-	-	-	-	-	N.R.
$\alpha$ -bulneseno	1508	-	0,3	0,2	-	-	-	-	-	N.R.
<b><math>\gamma</math>-cadineno<sup>a,b,c,f</sup></b>	1516	-	0,4	0,5	-	-	-	-	-	madera
cupareno	1520	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	N.R.
<b><math>\delta</math>-cadineno<sup>a,b,d,f</sup></b>	1526	1732	1,4	1,3	-	-	-	-	herbal <sup>d</sup>	tomillo, medicinal



Tabla 2, continuación

(Z)-calameneno <sup>b,g</sup> + (Z)-nerolidol	1528	1802, 1948	0,1	0,2	41	-	floral, madera	-	-	especias, herbal + cera
(E)-cadina-1,4-dieno	1534	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	N.R.
$\alpha$ -cadineno <sup>b</sup>	1540	-	0,06	0,07	-	-	-	-	-	N.R.
$\alpha$ -calacoreno <sup>a,b</sup>	1545	1882	0,3	0,1	44	-	madera	-	madera <sup>u</sup>	madera
elemol <sup>e</sup>	1552	2048	-	0,09	-	-	-	-	-	pasto, madera
(E)-nerolidol <sup>a,b</sup>	1557	2011	0,2	0,2	-	-	-	-	-	madera, floral
$\beta$ -calacoreno	1566	-	0,2	0,1	-	-	-	-	-	N.R.
germacreno D-4-ol <sup>f</sup> + palustrol <sup>g</sup>	1570	2017, 1897	0,2	0,1	50	-	frutal	-	-	N.R.
espatulenol <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>	1582	2093	3,3	5,1	60	67	frutal	frutal	herbal <sup>a</sup> , tierra <sup>a</sup>	herbal, frutal
óxido de cariofileno <sup>a,b,d,e,f</sup> + globulol <sup>e,f,g</sup>	1588	1944, 2044	3,7	4,5	67	-	especiado	-	madera <sup>a,d,u</sup> , especiado <sup>a</sup> + herbal <sup>u</sup> , citrus maduro <sup>u</sup>	herbal, especiado + (N.R.)
viridiflorol <sup>d,f,g</sup>	1596	2054	2,3	1,2	76	55	frutal, químico	frutal, químico	-	pasto, dulce
ledol	1601	1997	0,6	0,4	-	47	-	químico, quemado	-	N.R.
murola-4,10(14)-dien-1- $\beta$ -ol	1615	-	0,4	0,5	-	-	-	-	-	N.R.
junenol	1622	-	-	0,1	-	-	-	-	-	N.R.
cariofila-4-(12),8(13)-dien-5- $\alpha$ -ol	1632	2268	0,1	tr	-	53	-	madera	-	N.R.
cubenol <sup>a,b</sup>	1641	2025	0,2	0,2	-	-	-	-	maní tostado <sup>u</sup>	especiado, herbal
$\zeta$ -cadinol <sup>a,b,c,g</sup>	1646	2143	0,7	1,0	60	-	especiado	-	-	N.R.
$\delta$ -cadinol	1650	2174	0,3	0,3	-	53	-	especiado	-	herbal
$\alpha$ -cadinol <sup>a,b,c,e,f,g</sup>	1652	2200	0,7	tr	60	44	herbal	herbal	-	herbal, madera
$\zeta$ -murolol <sup>a,b</sup>	1658	2162	0,7	1,0	-	-	-	-	incienso <sup>u</sup> , madera <sup>u</sup>	herbal, especiado
cadaleno	1678	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	N.R.
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1692	2331	5,8	6,9	62	50	pasto	pasto, floral	-	N.R.
pentadecanal	1715	-	0,2	0,2	-	-	-	-	-	refrescante
iso-biciclogermacrenal	1740	-	-	0,2	-	-	-	-	-	N.R.



Tabla 2, continuación

neofitadieno	1849	-	0,2	0,2	-	-	-	-	-	N.R.
<b>Total identificado (%)</b>			<b>96,1</b>	<b>96,0</b>						
<b>Hidrocarburos monoterpénicos (%)</b>			51,0	48,2						
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>			2,0	2,0						
<b>Hidrocarburos sesquiterpénicos (%)</b>			21,3	21,7						
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>			19,1	21,9						
<b>Otros compuestos alifáticos (%)</b>			1,5	1,6						
<b>Otros compuestos aromáticos (%)</b>			1,2	0,6						

**Tabla 2:** Composición química de los extractos masculinos y femeninos de *Baccharis articulata* y sus resultados correspondientes de GC-O.

Referencias: (1): los compuestos en negrita fueron previamente reportados por otros autores para la misma especie: (a) Zunino *et al.* (1998), (b) Zunino *et al.* (2004), (c) Simões-Pires *et al.* (2005), (d) Agostini *et al.* (2005), (e) Simionatto *et al.* (2008), (f) Tischer *et al.* (2017), (g): Trombin-Souza *et al.* (2017). (2) Los compuestos se ordenan en orden creciente de valores de *LRI*s experimentales determinados en *HP-5MS (LRI1)*; *LRI2*: índices en *DB-Wax*. (3) Porcentajes de áreas relativas en extractos masculinos (% A. M.) y femeninos (% A. F.). (4): valores (en porcentaje) de frecuencia modificada de percepción en *GC-O* para los extractos masculinos (FM M) y femeninos (FM F). (5): descriptores aromáticos asociados obtenidos en los experimentos de *GC-O* de los extractos masculinos (Desc. Arom. M.) y femeninos (Desc. Arom. F). (6): descriptores aromáticos obtenidos en estudios previos de *Baccharis* spp. (Xavier *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2017). (a): *B. anomala*; (d): *B. dentata*; (u): *B. uncinella*. (7): descriptores aromáticos presentes en la base de datos Flavornet (Acree y Arn, 1984-2019). (-) no detectado; (tr): trazas (menor a 0,05%); N.R.: no reportado.



Como puede constatarse en la Tabla 2, ambos sexos de *B. articulata* (en estado de floración) presentaron un volatiloма complejo con pequeñas diferencias cuantitativas y cualitativas de composición en la comparación entre ellos. En contraposición, en un trabajo previo Zunino *et al.* (2004) reportaron importantes diferencias entre los aceites esenciales de individuos masculinos y femeninos de la misma especie de la provincia de Córdoba (Argentina). Los autores atribuyeron dicha diferencia en la composición macho/hembra al rol atractivo de polinizadores que tienen los compuestos volátiles. Por ejemplo, el  $\beta$ -pineno fue un componente distintivo entre ambos perfiles, encontrándose en un 14,7% en el aceite de individuos femeninos y solamente en un 0,1% en el aceite de individuos masculinos (Zunino *et al.*, 2004). Otros compuestos como espatulenol, (*E*)-nerolidol, (*E*)- $\beta$ -cariofileno y biciclogermacreno, fueron los principales componentes en ambos aceites y las diferencias relativas no fueron significativas (Zunino *et al.*, 2004).

En el presente trabajo, el perfil volátil constatado fue más complejo que los correspondientes reportes previamente publicados en la literatura (Tabla 2) (Zunino *et al.*, 1998; Zunino *et al.*, 2004; Simões-Pires *et al.*, 2005; Agostini *et al.*, 2005; Simionatto *et al.*, 2008; Tischer *et al.*, 2017; Trombin-Souza *et al.*, 2017).

Los terpenos fueron los principales componentes del volatiloма de ambos sexos de *B. articulata*, principalmente los hidrocarburos monoterpénicos que constituyeron casi la mitad de la composición del extracto (48,2% en individuos femeninos y 51,0% en individuos masculinos) (Tabla 2). Los principales componentes identificados fueron:  $\beta$ -pineno (31,4% y 28,7 % en el extracto masculino y femenino, respectivamente), limoneno (12,9% y 13,1%), germacreno D (8,8% y 8,7 %), germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol (5,8% y 6,9%), biciclogermacreno (4,9% y 5,8%) y espatulenol (3,3% y 5,1%) (Tabla 2). Por otra parte, la concentración de (*E*)-nerolidol fue significativamente menor (0,2% para ambos sexos) a la que determinaron Zunino *et al.* (2004) (superior al 8,0% para los dos géneros).

En tanto, los compuestos con estructuras aromáticas fueron componentes minoritarios de los perfiles volátiles de la especie, y entre ellos, se destacaron el metil eugenol (1,2 % y 0,5% en el extracto femenino y masculino, respectivamente), y el safrol (0,07% y 0,6%) (Tabla 2).



Como se indicó en el capítulo 1, las condiciones ambientales bióticas y abióticas tienen fuerte influencia sobre la expresión del metabolismo secundario, lo que puede explicar las diferencias encontradas entre los resultados de la Tabla 2 con el trabajo de Zunino *et al.* (2004). Por otra parte, los resultados de composición de aceite esencial de *B. articulata* presentados por otros autores para poblaciones de los estados de Rio Grande do Sul y Paraná (Brasil) son muy semejantes a los que se presentan en la Tabla 2 (Tischer *et al.*, 2017; Trombin-Souza *et al.*, 2017; Simionatto *et al.*, 2008; Simões-Pires *et al.*, 2005; Agostini *et al.*, 2005).

Por otra parte, cuando se compara la composición de la Tabla 2 con la colecta previa de *B. articulata* presentada en el capítulo 4 (colecta realizada en Uruguay), se constata que el compuesto mayoritario en ambos casos es el mismo ( $\beta$ -pineno), y que los principales componentes de los volatílicos también son idénticos, aunque en proporciones diferentes. Lo anterior podría ser evidencia de que las poblaciones analizadas en esta tesis (tanto en Uruguay como en Brasil) y las que aparecen en literatura para el sur de Brasil pertenecen al mismo quimiotipo.

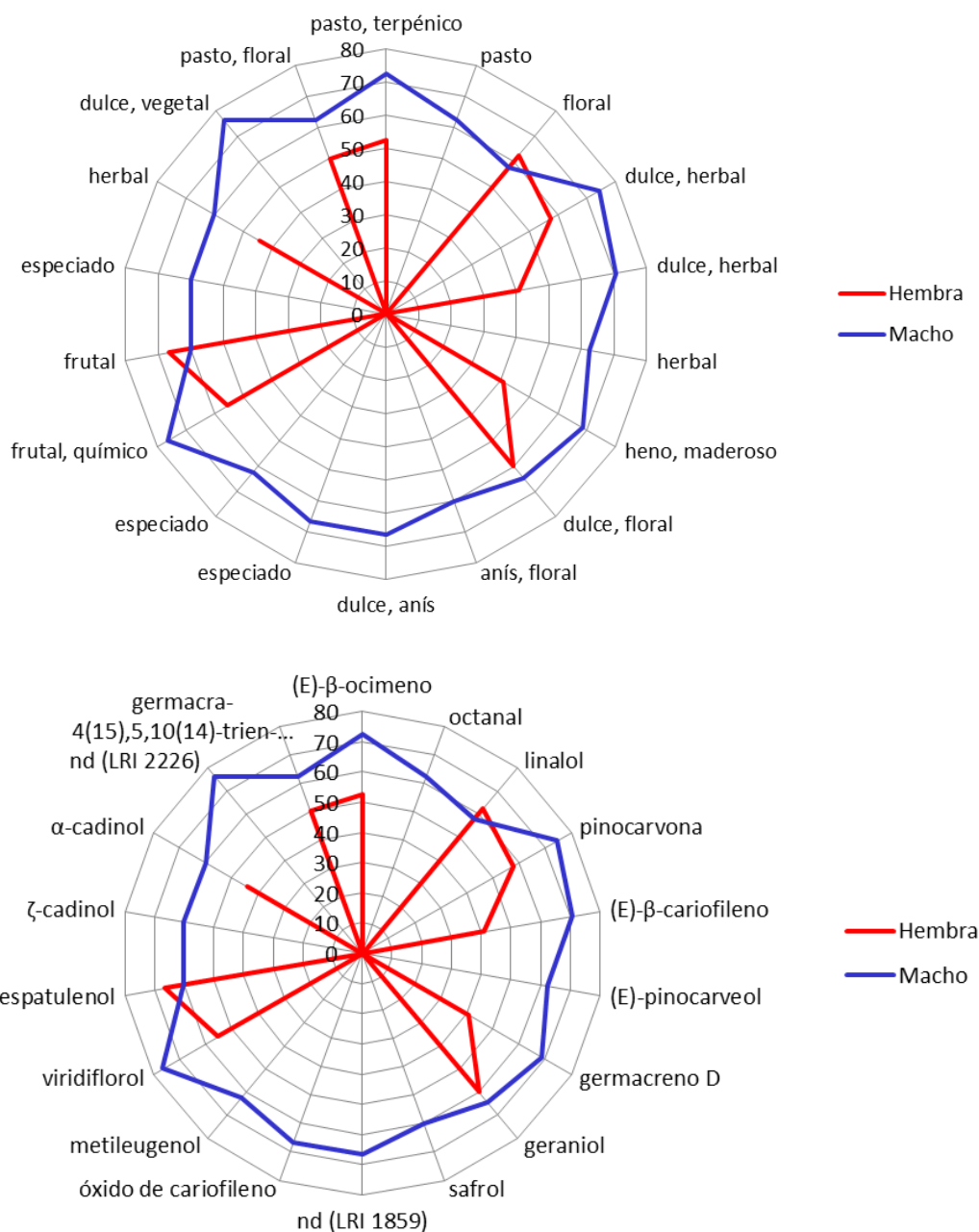
Un aspecto interesante desde el punto de vista biosintético y taxonómico, es que en la composición volátil de ambos sexos se determinó una importante presencia de compuestos con el esqueleto propio del germacrano (a diferencia de la colecta de *B. articulata* del capítulo 4), por ejemplo: germacreno D, germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 $\alpha$ -ol, biciclogermacreno, germacreno A, germacreno D-4-ol e *iso*-biciclogermacrenal (Tabla 2). Ello indicaría que dicha ruta metabólica se encontraba sobre-expresada en los individuos analizados, lo que podría ser una consecuencia del estado fenológico de floración.

Finalmente, en el volatílico de ambos sexos fue constatado el componente acetato de carquejilo (como en varias *Baccharis* spp. reportadas en el capítulo 4), lo que confirma que dicho compuesto no puede ser considerado un quimiomarcador exclusivo de *B. trimera* según el planteo de Simões-Pires *et al.* (2005) discutido previamente en el capítulo 4.



### 3.2 Evaluación olfatométrica de los extractos volátiles de ambos sexos de *B. articulata*

En la Tabla 2 y en la Figura 7 se presentan los resultados de los experimentos de GC-O para ambos sexos de *B. articulata*.



**Figura 7:** Resultados de GC-O (representados como aromogramas de red de notas aromáticas y sus correspondientes componentes responsables) para ambos sexos de *B. articulata* (valores de FM mayores a 60), donde se puede apreciar claramente las diferencias entre los perfiles aromáticos masculinos y femeninos, así como los odorantes de mayor impacto aromático. (nd): no determinado.



En total se determinaron 46 odorantes (FM > 40), de los cuales 34 pudieron ser identificados químicamente. A pesar de que el perfil volátil obtenido por *GC-MS* para ambos sexos fue esencialmente similar, el perfil aromático-sensorial fue claramente distintivo (Tabla 2 y Figura 7).

Particularmente, 39 odorantes fueron identificados para el extracto masculino, mientras que para el femenino solamente 20 (Tabla 2 y Figura 7). Además, en todos los casos los odorantes identificados en el perfil masculino presentaron un mayor valor de FM que los femeninos (Tabla 2 y Figura 7), lo cual fue consistente con observaciones realizadas a campo que demostraron un aroma más fuerte emitido por las flores de las plantas masculinas. Lo anterior podría ser una pista dirigida hacia los insectos polinizadores, de manera de encontrar primeramente las flores masculinas y posteriormente las femeninas para una polinización exitosa (**Ferracini et al., 1995; Zunino et al., 2004**).

Es importante notar que no existió correlación entre el porcentaje de composición en el extracto volátil (determinado por *GC-MS*) y los valores determinados de FM (percepción del aroma), lo que se explica por el umbral de percepción y la función psicométrica propios de cada compuesto (**Delahunty et al., 2006**). Es por dicha razón que los principales componentes del extracto ( $\beta$ -pineno y limoneno) no fueron determinados como odorantes por *GC-O* debido a que los mismos poseen altos umbrales de percepción: 37,2 mg/L y 13,7 mg/L, respectivamente (**Plotto et al., 2004**). Como comparación, algunos compuestos percibidos en éste trabajo poseen un bajo umbral: linalol (113  $\mu$ g/L), octanal (233  $\mu$ g/L) y mirceno (773  $\mu$ g/L), lo que les permitió ser catalogados como compuestos de impacto (Tabla 2) (**Plotto et al., 2004; Xavier et al., 2013**).

Los odorantes más potentes determinados para el extracto masculino fueron: viridiflorol (notas aromáticas: “frutal y “químico”), un componente no identificado de  $LRI_{Innowax} = 2226$  (“mentol”, “dulce”, “herbal”), pinocarvona (“herbal dulce”, “quemado”), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (“herbal”, “terpénico”), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (“dulce”, “herbal”), germacreno D (“heno”, “madera”), un componente no identificado  $LRI_{Innowax} = 1859$  (“dulce”, “anís”) y óxido de cariofileno (“especiado”, “herbal”) (Tabla 2 y Figura 7). Por otra parte, para el extracto femenino, los principales odorantes fueron: espatulenol (“frutal”), linalol (“floral”), geraniol (“dulce”, “floral”), pinocarvona (“floral”, “herbal dulce”) y viridiflorol (“frutal”, “químico”) (Tabla 2 y Figura 7).





Como puede verse en la Figura 7 (aromograma de red con los principales odorantes con FM mayor a 60, al menos para uno de los sexos) se aprecian claramente las diferencias entre los atributos aromáticos masculinos y femeninos de los extractos de *B. articulata*. El extracto de individuos masculinos mostró predominancia de notas herbales, frutales y dulces, mientras que el extracto femenino se caracterizó por las notas aromáticas herbales y florales (Figura 7). Como se expresó anteriormente en el capítulo 4, el aceite esencial de *B. dracunculifolia* se emplea en perfumería debido a sus características notas aromáticas herbales (Ferracini *et al.*, 1995), y de acuerdo a los resultados aquí presentados es posible que *B. articulata* pueda ser explotada en el mismo sentido.

En la Tabla 2 se puede observar que los odorantes caracterizados de *B. articulata* no sólo se diferencian en cuanto a los valores determinados de FM, sino también que los descriptores aromáticos para un mismo compuesto en uno u otro sexo pueden ser diferentes. Dicha disparidad se puede deber a la diferencia entre niveles de concentración de los componentes en el perfil masculino y femenino, lo que a su vez está relacionado a los umbrales de percepción y a las funciones psicométricas de cada uno de los odorantes (Delahunty *et al.*, 2006).

Cuando se comparan los presentes resultados con los obtenidos previamente por nuestro grupo de investigación para las especies *B. anomala*, *B. dentata* y *B. uncinella*, se puede constatar que existen algunas diferencias entre las descripciones aromáticas realizadas por los jueces aún para los mismos compuestos odorantes (Xavier *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2017). Sin embargo, para algunos componentes como (*E*)- $\beta$ -cariofileno,  $\beta$ -elemeno, germacreno D y espatulenol se encontraron descriptores aromáticos similares en todos los estudios (Tabla 2) (Xavier *et al.*, 2013; Xavier *et al.*, 2017). Dado que las evaluaciones sensoriales aquí presentadas y las de los trabajos previos de Xavier *et al.* (2013; 2017) fueron realizados mediante el mismo panel sensorial, las diferencias demuestran que en *GC-O* no solamente es relevante el aporte aromático de los odorantes individuales, sino que también deben considerarse aspectos propios de la matriz. Como ejemplo de lo anterior, en bibliografía se ha identificado el aporte sensorial adicional de componentes minoritarios que co-eluyen junto con los odorantes principales, cuya ocurrencia depende de cada matriz particular (Plotto *et al.*, 2004; Delahunty *et al.*, 2006).



Comparando los resultados de éste trabajo con los del trabajo de Miyazawa *et al.* (2016) que también examina el efecto del dioicismo sobre los aromas percibidos en GC-O (en la especie *Eurya japonica*), se constata que también existe una diferencia en la percepción aromática de los sexos basada en una diferencia de composición química. Los autores brindan la hipótesis de que dichas diferencias sexuales en la emisión volátil podrían estar asociadas con la incidencia de una polilla florívora (*Chloroclystis excisa*) que tiene una fuerte tendencia a oviponer sobre los botones florales masculinos, pudiendo ser los volátiles defensas químicas ante ésta agresión (Miyazawa *et al.*, 2016).

De acuerdo a los anteriores resultados, y los propios presentados, se puede constatar que cada sistema dioico tiene sus particularidades en la emisión de componentes volátiles, lo que sin dudas está correlacionado a factores genéticos de las especies, y a la influencia del medio abiótico y biótico que circunda a las plantas (capítulo 6).

### 3.3 Composición de los aceites esenciales de ambos sexos de *B. tridentata*

En la Tabla 3 se presenta la composición química (con identificación realizada mediante GC-MS y cuantificación por GC-FID con estándar interno) de los aceites esenciales de individuos masculinos y femeninos de *B. tridentata*.

Compuesto <sup>1</sup>	LRI Lit. <sup>2</sup>	LRI Exp. <sup>3</sup>	%Área I GC-MS <sup>4</sup>	%Área F GC-MS	%Area M GC-MS	Conc. F GC-FID <sup>5</sup>	Conc. M GC-FID <sup>5</sup>
hexanal	801	801	-	tr	tr	-	-
3-(Z)-hexen-1-ol	850	847	0,05	tr	0,1	-	-
n-hexanol	863	862	-	tr	tr	-	-
triciclono	921	917	Tr	0,08	0,09	-	-
<b>α-tuyeno</b> <sup>a</sup>	924	921	1,3	0,8	1,0	9,2 ± 0,5	15,8 ± 0,8
<b>α-pineno</b> <sup>a</sup>	932	928	46,7	29,5	30,8	794 ± 40	1173 ± 60
canfeno	946	941	1,4	2,7	2,6	27 ± 1	35 ± 2
tuya-2,4(10)-dieno	953	947	-	tr	tr	-	-
sabineno	969	968	3,1	1,7	1,6	*	*
<b>β-pineno</b> <sup>a</sup>	974	971	11,4	17,9	17,0	287 ± 14	362 ± 18
<b>mirceno</b> <sup>a</sup>	988	989	1,8	3,0	2,9	27 ± 1	37 ± 2
α-felandreno	1002	1000	-	0,09	0,1	1.9 ± 0,1	1.6 ± 0,1
acetato de 3-(Z)-hexen-1-ilo	1004	1009	-	0,05	0,06	-	-



Tabla 3, continuación

$\alpha$ -terpineno	1014	1015	0,1	tr	tr	3,7 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,1
<b><i>p</i>-cimeno</b> <sup>a</sup>	1020	1023	0,06	0,05	0,09	-	-
<b>limoneno</b> <sup>a</sup>	1024	1023	14,1	16,4	16,7	204 $\pm$ 10	273 $\pm$ 14
( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1032	1034	0,1	0,2	0,2	2,1 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1
fenil acetaldehído	1036	1040	-	tr	tr	-	-
( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno <sup>a</sup>	1044	1046	3,6	4,6	4,1	42 $\pm$ 2	47 $\pm$ 2
<b><math>\gamma</math>-terpineno</b> <sup>a</sup>	1054	1057	0,2	0,4	0,4	3,6 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,2
( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1065	1066	0,05	0,09	0,09	-	0,8 $\pm$ 0,1
<b>terpinoleno</b> <sup>a,b</sup>	1086	1086	0,2	0,4	0,4	-	3,2 $\pm$ 0,2
( <i>E</i> )-hidrato de sabineno	1098	1097	0,07	tr	0,06	-	-
linalol	1095	1099	0,1	0,2	0,3	2,8 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,2
nonanal	1100	1104	-	tr	0,07	-	-
1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	1108	1109	-	tr	tr	-	-
<b>endo-fenchol</b> <sup>a</sup>	1114	1112	-	tr	tr	-	-
( <i>Z</i> )- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	1118	1119	0,05	0,09	0,1	-	2,0 $\pm$ 0,1
$\alpha$ -canfolenal	1122	1124	-	tr	tr	-	-
allo-ocimeno	1128	1128	-	tr	tr	-	-
( <i>E</i> )-pinocarveol	1135	1138	Tr	tr	tr	-	-
( <i>E</i> )- <i>p</i> -ment-2-en-1-ol	1136	1138	-	tr	tr	-	-
( <i>Z</i> )-verbenol	1137	1136	-	tr	tr	-	-
( <i>E</i> )-verbenol	1140	1143	-	0,1	0,1	4,7 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1
pinocarvona	1160	1162	-	tr	tr	-	-
borneol	1165	1165	Tr	0,05	0,05	-	1,2 $\pm$ 0,1
<i>p</i> -menta-1,5-dien-8-ol	1166	1166	Tr	tr	0,05	-	-
<b>terpinen-4-ol</b> <sup>a</sup>	1174	1177	0,5	0,9	0,9	6,1 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,3
<i>p</i> -cimen-8-ol	1179	1183	-	tr	tr	-	-
<b><math>\alpha</math>-terpineol</b> <sup>a,b</sup>	1186	1191	0,2	0,3	0,3	2,2 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1
mirtenol	1194	1194	-	tr	tr	-	-
mirtenal	1195	1196	-	0,05	tr	-	-
( <i>Z</i> )-carveol	1226	1231	-	tr	tr	-	-
carvona	1239	1242	-	tr	tr	-	-
<b>acetato de bornilo</b> <sup>a</sup>	1284	1287	6,0	10,1	9,1	69 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3
$\delta$ -elemeno	1335	1338	-	0,6	0,5	-	-
<b><math>\alpha</math>-cubebeno</b> <sup>b</sup>	1345	1348	-	tr	0,06	-	-
<b><math>\alpha</math>-copaeno</b> <sup>b</sup>	1375	1374	Tr	-	-	-	-
<b><math>\beta</math>-bourboneno</b> <sup>a</sup>	1387	1389	-	tr	tr	-	-
<b><math>\beta</math>-elemeno</b> <sup>a,b</sup>	1389	1391	Tr	tr	tr	-	-
$\beta$ -cubebeno	1387	1391	-	tr	tr	-	-
metil eugenol	1403	1407	0,07	0,08	0,07	-	-
( <i>E</i> )- <b><math>\beta</math>-cariofileno</b> <sup>a,b</sup>	1417	1420	0,8	0,9	0,9	8,0 $\pm$ 0,4	24 $\pm$ 1
$\beta$ -gurjuneno	1431	1437	-	0,05	0,05	-	-
<b>aromadendreno</b> <sup>b</sup>	1437	1440	Tr	-	-	-	-
<b>allo-aromadendreno</b> <sup>b</sup>	1458	1462	-	0,05	0,05	-	-
<b><math>\alpha</math>-humuleno</b> <sup>a,b</sup>	1452	1452	Tr	0,07	0,08	-	-



Tabla 3, continuación							
9- <i>epi</i> -cariofileno	1464	1464	-	0,06	0,06	-	-
γ-muroleno	1478	1484	Tr	tr	0,05	-	-
<b>germacreno D</b> <sup>a</sup>	1484	1484	1,5	2,0	2,0	12,3 ± 0,6	9,2 ± 0,5
<b>β-selineno</b> <sup>b</sup>	1489	1490	0,06	0,05	0,1	-	-
( <i>E</i> )-murola-4(14),5-dieno	1493	1494	-	tr	tr	-	-
<b>biciclogermacreno</b> <sup>a</sup>	1500	1500	3,4	2,2	2,3	17,8 ± 0,9	13,1 ± 0,7
<b>α-muroleno</b> <sup>a,b</sup>	1500	1502	0,06	0,1	0,1	-	-
( <i>E, E</i> )-α-farneseno	1505	1506	Tr	-	-	-	-
γ-cadineno <sup>a</sup>	1513	1520	0,08	0,1	0,1	-	0,7 ± 0,1
δ-cadineno <sup>a,b</sup>	1522	1527	0,3	0,4	0,4	3,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1
elemol	1548	1552	-	0,07	0,05	-	-
espatulenol <sup>a,b</sup>	1577	1584	0,9	0,8	0,8	5,6 ± 0,3	3,5 ± 0,2
óxido de cariofileno <sup>a</sup>	1582	1584	0,2	0,2	0,2	*	*
<b>viridiflorol</b> <sup>b</sup>	1592	1598	-	0,3	0,4	4,7 ± 0,2	1,7 ± 0,1
1- <i>epi</i> -cubenol	1627	1629	-	tr	tr	-	-
ζ-cadinol	1640	1649	0,1	0,1	0,2	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,1
α-murolol	1648	1654	0,3	-	-	-	-
<b>α-cadinol</b> <sup>a,b</sup>	1652	1663	-	0,09	0,2	-	0,8 ± 0,1
<b>Total identificado (%)</b>			<b>99,3</b>	<b>98,0</b>	<b>98,0</b>		
<b>Hidrocarburos monoterpénicos (%)</b>			84,2	77,8	77,9		
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>			7,1	11,9	11,1		
<b>Hidrocarburos sesquiterpénicos (%)</b>			6,4	6,6	6,8		
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>			1,5	1,6	1,9		
<b>Otros (%)</b>			0,1	0,1	0,3		

**Tabla 3:** Composición química de los aceites esenciales de *B. tridentata* de individuos femeninos (*F*) y masculinos (*M*).

Referencias: (1): los compuestos en negrita fueron previamente reportados por otros autores para la misma especie: (a) Souza *et al.* (2011) y (b) Ferracini *et al.* (1995). (2) *LRI*s de literatura publicados por Adams (2007). (3) *LRI*s experimentales calculados en análisis por *GC-MS* y *GC-FID*. (4) Compuestos determinados en material vegetal sexualmente indiferenciado (I) en la colecta previa del capítulo 4. (5) Concentración (relativa al estándar interno *n*-tetradecano) en µg de compuesto/mL de aceite puro. (-) no detectado. (\*) en las corridas de *GC-FID*, el sabineno y el β-pineno, y, el espatulenol y el óxido de cariofileno co-eluyeron. (tr): trazas (menor a 0,05%).

Para los aceites de ambos sexos de *B. tridentata* se identificaron 75 componentes, de los cuales los hidrocarburos monoterpénicos (α-pineno, β-pineno, limoneno) y el éster acetato de bornilo fueron los principales en cuanto a su concentración en los mismos (Tabla 3).

Los perfiles de composición masculino/femenino fueron cualitativamente iguales, y no se observaron diferencias apreciables entre los géneros en el porcentaje relativo de áreas en *GC-MS*, de acuerdo a lo presentado en la Tabla 3. Adicionalmente, según los resultados de dicha tabla, varios de los componentes de los aceites se encontraron a



nivel de trazas (definido arbitrariamente como un porcentaje de área relativa menor al 0,05%) (Bicchi *et al.*, 2008).

Pocos componentes de los aceites fueron responsables por más del 90% de la composición:  $\alpha$ -tuyeno,  $\alpha$ -pineno, canfeno, sabineno,  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, acetato de bornilo, germacreno D y biciclogermacreno (Tabla 3).

La composición reportada en la Tabla 3 es prácticamente la misma que la informada en el capítulo 4 para la misma especie (con material vegetal sexualmente indiferenciado colectado en un período diferente), habiendo sólo pequeñas a medianas diferencias en los porcentajes de abundancia. Para propósitos comparativos, en la Tabla 3 se incluyen también los resultados de dicha colecta anterior, y los resultados de composición obtenidos previamente por otros autores para la misma especie (Ferracini *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2011). Los resultados del material vegetal sexualmente indiferenciado corresponden al estadio de floración temprana (Julio), mientras que la del material sexado corresponde a floración tardía (Setiembre-Noviembre) (Tabla 3). Las variaciones más extremas encontradas entre ambas colectas fueron para el  $\alpha$ -pineno, que en el caso de la presente se encontró en menor abundancia (29,5% en el aceite femenino y 30,8% en el masculino, comparado a 46,7% en el material vegetal sexualmente indiferenciado); y el acetato de bornilo, que incrementó su proporción en el volatilo (10,1% en la hembra y 9,1% en el macho, frente a 6,0% del material indiferenciado) (Tabla 3). Con lo anterior se concluye que existen importantes variaciones químicas en el volatilo de *B. tridentata* en diferentes fases de su período reproductivo, lo que debería tomarse en cuenta para su posible explotación a nivel industrial y agronómico.

Cuando se comparó la cuantificación realizada mediante *GC-FID* (relativa al estándar interno *n*-tetradecano) y la semi-cuantificación obtenida por *GC-MS* (mediante cálculo de porcentajes de áreas relativas) se encontraron diferencias apreciables (Tabla 3).

Lo anterior es un comportamiento descrito en la literatura, debido a que la estructura de los analitos tiene una gran influencia sobre la formación y la abundancia de los fragmentos iónicos en el detector de masas en modalidad de barrido (*Full Scan*, en inglés), no siendo por ese motivo una buena opción para cuantificar normalizando áreas (Bicchi y Maffei, 2012; Pino, 2015). Por otra parte, y como fue expuesto previamente en el capítulo 3, el *FID* es un detector sensible a la cantidad de masa y su respuesta en general no depende de la estructura del analito (Skoog *et al.*, 2001). A pesar de ello, un



gran número de trabajos en la literatura reportan la composición de los aceites esenciales y extractos volátiles como porcentaje de áreas relativas en *GC-MS* trabajando en *Full Scan* (Cicchetti *et al.*, 2008; Bicchi y Maffei, 2012; Pino, 2015).

En todos los estudios anteriormente publicados en la literatura referente al volatilo de ambos sexos de *Baccharis* spp. L., la comparación de composición entre los mismos se ha efectuado de una manera relativa reportando porcentajes de área en *GC-FID* y/o en *GC-MS* en modalidad *Full Scan* (Ferracini *et al.* 1995; Zunino *et al.*, 2004; Lago *et al.* 2008; Besten *et al.* 2012; Besten *et al.* 2013; Besten *et al.* 2014; Ascari *et al.*, 2019; Zuccolotto *et al.*, 2019). Sin embargo, lo anterior tiene un valor limitado ya que no permite realizar comparaciones cuantitativas realistas de las diferencias intersexuales, por lo que para tales casos en que el problema analítico tiene un significado biológico, es más adecuada una cuantificación empleando estándar interno (Zhang y Li, 2010; Bicchi y Maffei, 2012).

En la cuantificación por *GC-FID* se encontraron diferencias cuantitativas intersexuales en la concentración de los principales componentes de los aceites de *B. tridentata*: en general, la mayoría de los hidrocarburos monoterpénicos resultaron más concentrados en el aceite masculino (Tabla 3). Por ejemplo, el  $\alpha$ -pineno se determinó en una concentración de  $794 \pm 40$   $\mu\text{g/mL}$  en el aceite femenino y de  $1173 \pm 60$   $\mu\text{g/mL}$  en el aceite masculino (Tabla 3). A pesar de ello, los compuestos  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -terpineno, (*Z*)- $\beta$ -ocimeno, (*E*)-verbenol, acetato de bornilo, germacreno D, biciclogermacreno,  $\delta$ -cadineno, espatulenol, viridiflorol y  $\zeta$ -cadinol exhibieron una mayor concentración en el aceite de los individuos femeninos (Tabla 3). Como fue antedicho, las diferencias intersexuales podrían ser de importancia ecológica (Ferracini *et al.*, 1995; Miyazawa *et al.*, 2016).

### 3.4 Distribución enantiomérica de monoterpenos en ambos sexos de *B. tridentata*

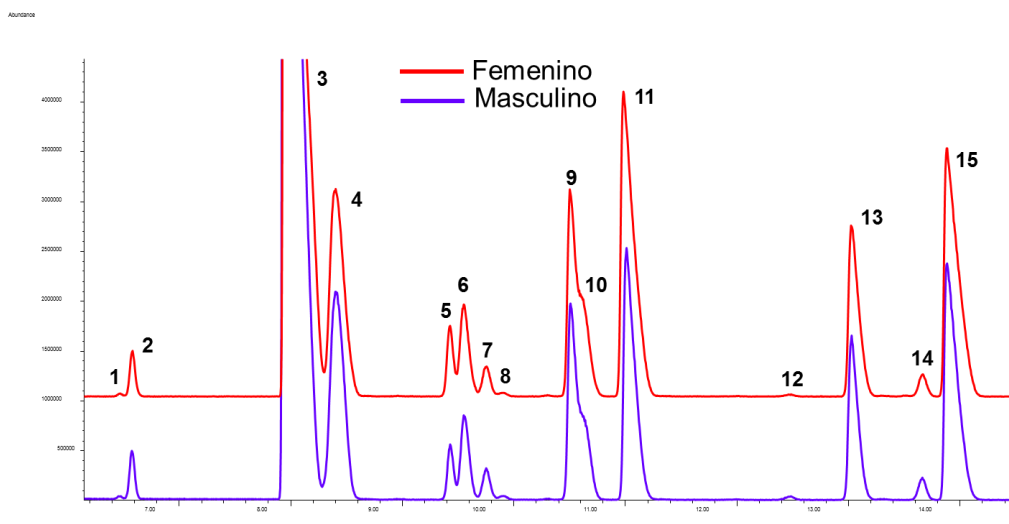
En la Tabla 4 y la Figura 8 se presentan las distribuciones enantioméricas de monoterpenos seleccionados en los aceites de *B. tridentata* (masculino y femenino), obtenidas por *eGC-MS* (con la excepción del acetato de bornilo, que será discutido posteriormente).



Compuesto	% Ba (+) <sup>1</sup>	% (+) F	% (+) M	% Ba (-) <sup>1</sup>	% (-) F	% (-) M
<b><math>\alpha</math>-tuyeno</b>	-	5 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	-	95 $\pm$ 2	97 $\pm$ 1
<b><math>\alpha</math>-pineno</b>	51,5	16 $\pm$ 4	15,3 $\pm$ 0,6	48,5	84 $\pm$ 4	84,7 $\pm$ 0,6
<b>canfeno</b>	-	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 3	-	97 $\pm$ 1	96 $\pm$ 3
<b>sabineno*</b>	-	24 $\pm$ 14	23 $\pm$ 17	-	76 $\pm$ 14	77 $\pm$ 17
<b><math>\beta</math>-pineno*</b>	38,4	73 $\pm$ 4	73 $\pm$ 2	61,6	27 $\pm$ 4	27 $\pm$ 2
<b>limoneno</b>	77,3	66,0 $\pm$ 0,3	66,3 $\pm$ 0,3	22,7	34,0 $\pm$ 0,3	33,7 $\pm$ 0,3

**Tabla 4:** Distribuciones enantioméricas de hidrocarburos monoterpénicos seleccionados de los aceites femeninos (F) y masculinos (M) de *B. tridentata* obtenidas por eGC-MS.

(+): enantiómero dextrógiro; (-): enantiómero levógiro. (1) Distribución enantiomérica para los componentes del aceite esencial de *B. articulata* (Ba) informada por Simmionatto *et al.* (2008). (\*) (-)-sabineno y (+)- $\beta$ -pineno co-eluyeron parcialmente (Figura 8) y debido a ello es que se presenta la mayor desviación estándar en la distribución enantiomérica del sabineno. Selector quirál empleado: 30% heptakis-2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butil-dimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina sobre fase estacionaria DB-1701 (14% cianopropilfenil-86%-dimetilpolisiloxano).



**Figura 8:** Cromatogramas de eGC-MS de los aceites masculino y femenino de *B. tridentata* en el que se evidencia la misma distribución enantiomérica para ambos sexos. Identificación de compuestos: **1:** (+)- $\alpha$ -tuyeno, **2:** (-)- $\alpha$ -tuyeno, **3:** (-)- $\alpha$ -pineno, **4:** (+)- $\alpha$ -pineno, **5:** mirceno (aquiral), **6:** (-)-canfeno, **7:** (+)-sabineno, **8:** (+)-canfeno, **9:** (-)- $\beta$ -pineno, **10:** (-)-sabineno (hombro), **11:** (+)- $\beta$ -pineno, **12:**  $\alpha$ -felandreno (quiralidad indefinida), **13:** (-)-limoneno, **14:** *p*-cimeno (aquiral), **15:** (+)-limoneno. Selector quirál empleado: 30% heptakis 2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butil-dimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina sobre fase estacionaria DB-1701 (14% cianopropilfenil-86%-dimetilpolisiloxano).

De acuerdo a los resultados presentados, no se encontraron diferencias apreciables en la distribución enantiomérica de los hidrocarburos monoterpénicos seleccionados provenientes de individuos masculinos y femeninos de *B. tridentata* (Tabla 4 y Figura 8). Por otra parte, tampoco se encontraron diferencias sexuales en la distribución de los alcoholes monoterpénicos linalol, terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol (resultados no mostrados).



A diferencia del presente trabajo, Herrera *et al.* (2018) encontraron diferencias importantes en la distribución enantiomérica de extractos de plantas masculinas y femeninas en floración de *Hedyosmum scabrum* (Chloranthaceae), especialmente para los componentes  $\beta$ -pineno y linalol.

La distribución enantiomérica durante la etapa reproductiva es de extrema importancia para la atracción de polinizadores en las especies dioicas. Por ejemplo, se ha comprobado que la avispa *Ceratosolomen solmsii marchali* responde diferencialmente a los enantiómeros del linalol, limoneno y  $\beta$ -pineno, centrandó en ello la diferenciación entre flores femeninas (receptivas) y masculinas (no receptivas) de *Ficus hispida* (Moraceae) (Chen y Song, 2008). Adicionalmente, se ha constatado que algunas especies en floración cambian en el tiempo la relación enantiomérica de sus constituyentes volátiles. Por ejemplo, en el caso de las flores hermafroditas de *Jasminum grandiflorum* (Oleaceae) en que en el período de 24 horas de floración alteran la distribución enantiomérica del linalol: el levógiro es el mayoritario en las primeras horas y luego el dextrógiro se convierte en dominante a medida que las flores maduran, lo que se relaciona con un cambio en el aroma percibido (Pragadeesh *et al.*, 2017).

La distribución enantiomérica ilustrada en la Tabla 4 y la Figura 8, puede ser de interés como huella dactilar quimiotaxonómica para diferenciar a la especie *B. tridentata* de otras especies relacionadas, ya que en última instancia dicha distribución refleja el genotipo, como fue expresado en la introducción de éste capítulo. De acuerdo a ello, se encontraron diferencias apreciables en la distribución enantiomérica obtenida en éste trabajo comparado con el de Simionatto *et al.* (2008), quienes trabajaron con material sexualmente indiferenciado de *B. articulata* (constituyendo hasta el momento la única publicación que reporta éste tipo de determinación en el género *Baccharis* L.). Dichos autores informaron sobre la predominancia del enantiómero dextrógiro para  $\alpha$ -pineno y del levógiro para  $\beta$ -pineno, mientras que en éste trabajo la tendencia constatada fue la opuesta (ver Tabla 4). Por otra parte, si bien en ambos estudios el limoneno presentó una mayor abundancia del enantiómero dextrógiro, el mismo se encuentra en diferentes proporciones en *B. articulata* y *B. tridentata* (Tabla 4) (Simionatto *et al.*, 2008).

Sin embargo, hay que considerar que Simionatto *et al.* (2008) emplearon un sistema de *eGC-FID* con dos selectores quirales de diferente composición al empleado en éste





trabajo. Ellos fueron: 1) heptakis-(6-*O*-metil-2,3-di-*O*-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina, y 2) heptakis-(2,6-di-*O*-metil-3-*O*-pentil)- $\beta$ -ciclodextrina (Simionatto *et al.*, 2008); mientras que en el presente trabajo se empleó *eGC-MS* con heptakis-(2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butil-dimetilsilil)- $\beta$ -ciclodextrina (en todos los casos la  $\beta$ -ciclodextrina modificada fue diluída en la misma fase estacionaria DB-1701). En base a tales consideraciones, las diferencias encontradas entre ambos estudios pueden ser parcialmente asignables a la diferente configuración analítica empleada de *eGC*, por lo que para propósitos comparativos realísticos se deberían inyectar los aceites esenciales de *B. tridentata* y *B. articulata* en el mismo sistema analítico.

Por otra parte, cuando se compara el presente trabajo con el de Lorenzo *et al.* (2005) y el de Lizarraga *et al.* (2017) en que se emplea el mismo tipo de selector quiral para determinar la distribución enantiomérica de los monoterpenos componentes del aceite esencial de la “chilca negra” (*Eupatorium buniifolium*, al igual que *Baccharis* spp. perteneciente a la familia Asteraceae), también se evidencian importantes diferencias, especialmente en la distribución de los pinenos. Esto último resalta la importancia del análisis enantioselectivo como una herramienta para evaluar la genuinidad y detectar adulteraciones en aceites esenciales (Köning, 1998; Tranchida *et al.*, 2012).

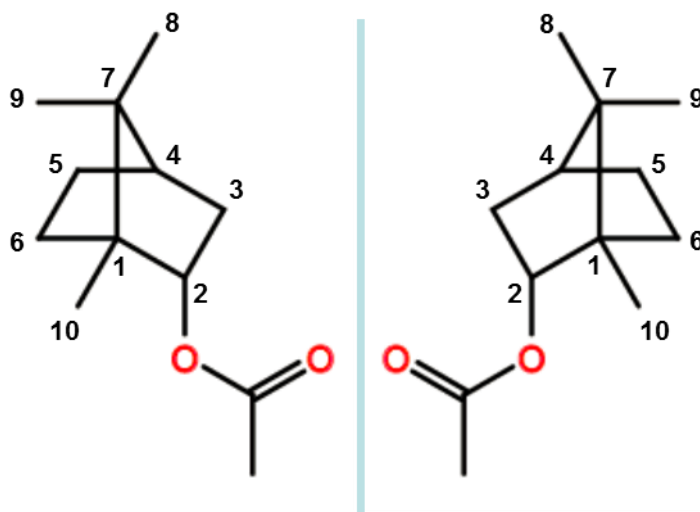
Finalmente, en el caso de los componentes sesquiterpénicos quirales del aceite, sólo se evidenció un pico cromatográfico de quiralidad indefinida (resultados no mostrados). Este comportamiento es el usual del complejo de terpen-sintasas presente en las plantas aromáticas: en general producen una mezcla enantiomérica de monoterpenos y sólo uno de ellos para sesquiterpenos y diterpenos (Köning, 1998). La biosíntesis de ambos enantiómeros de éstos últimos involucra un alto costo metabólico, por lo que mezclas de dichos componentes sólo han sido observadas en la naturaleza en materiales híbridos, con diferentes fuentes de información genética de sus especies parentales (Köning, 1998).

### 3.5 Análisis directo del acetato de bornilo natural por *eGC-MS*

El acetato de bornilo (Figura 9) genera en el sistema olfativo notas aromáticas frescas, dulces, canforáceas y con reminiscencia a pino, y, debido a que su umbral de percepción sensorial es bajo (75 ppb a 1,38 ppm; sin distinción de enantiómeros) (Burdock, 2010),



es razonable suponer que el mismo es un componente clave en el aroma agradable del aceite esencial de *B. tridentata*. Incluso el acetato de bornilo es apreciado como ingrediente en la fragancia de jabones de tocador y productos de baño (Matsubara *et al.*, 2011).



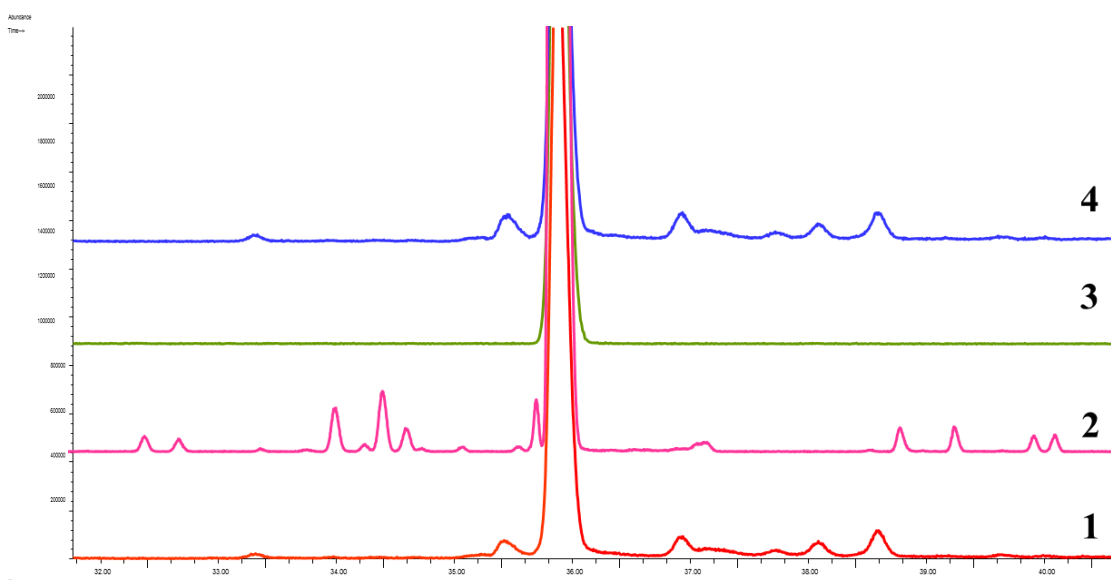
**Figura 9:** Estructura química de los enantiómeros del acetato de bornilo (acetato de endo-1,7,7-trimetilbicyclo[2.2.1]hept-2-ilo): dextrógiro a la izquierda (1R) y levógiro a la derecha (1S).

Se ha reportado que el enantiómero levógiro del acetato de bornilo (Figura 9) es un componente mayoritario de varios aceites esenciales de la familia Pinaceae (*Pinus densiflora*, *Abies balsamea* y *Abies sibirica*); mientras que el dextrógiro ocurre naturalmente en especies de Cupressaceae (Burdock, 2010; Matsubara *et al.*, 2011). Una propiedad muy interesante del enantiómero levógiro de éste compuesto es que es relajante del sistema nervioso autónomo (Matsubara *et al.*, 2011).

Al realizar el análisis directo de los aceites esenciales de *B. tridentata* masculinos y femeninos por *eGC-MS*, sólo se evidenció un pico cromatográfico para el acetato de bornilo (y también para el borneol), a diferencia del resto de los monoterpenos examinados anteriormente. Por otra parte, al realizar el correspondiente análisis de dos estándares comerciales (acetato de bornilo levógiro y acetato de isobornilo enantioméricamente impuro) en las mismas condiciones experimentales de *eGC-MS*, no se consiguió separación analítica bajo diferentes programas de temperaturas, y se obtuvo un único pico al mismo tiempo de retención que el acetato de bornilo natural (Figura 10).



Debido a éste comportamiento cromatográfico, se sospechó que el selector quiral empleado no fuese capaz de separar los enantiómeros del acetato de bornilo ni los del acetato de isobornilo. Por otra parte, impurezas quirales menores en el estándar de éste último compuesto (canfeno, acetato de fenchilo, *endo*-isofenchol e isoborneol) fueron eficientemente separadas en sus dos enantiómeros, indicando que la posible falta de resolución enantiomérica fuera sólo aplicable a los acetatos de bornilo e isobornilo (Figura 10).



**Figura 10:** Cromatogramas eGC-MS en los que se muestra la perfecta coincidencia en los tiempos de retención del acetato de bornilo natural proveniente de aceite esencial de individuos femeninos (1) y masculinos (4) de *B. tridentata*, comparado con el estándar enantioméricamente impuro de acetato de isobornilo (2) y el estándar de (-)-acetato de bornilo (3). En el caso del cromatograma 2, algunas impurezas quirales menores fueron efectivamente resueltas en sus enantiómeros (canfeno, acetato de fenchilo, *endo*-isofenchol e isoborneol). Selector quiral empleado: 30% heptakis 2,3-di-*O*-metil-6-*O*-*tert*-butil-dimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina sobre fase estacionaria DB-1701 (14% cianopropilfenil-86% dimetilpolisiloxano).

La co-elución enantiomérica en el selector quiral de  $\beta$ -ciclodextrina modificada fue confirmada por análisis de co-inyección en la misma muestra analítica de los estándares entre sí y con: aceites esenciales, acetato de bornilo natural aislado y derivados semi-sintéticos (ver más adelante; Figura 13).

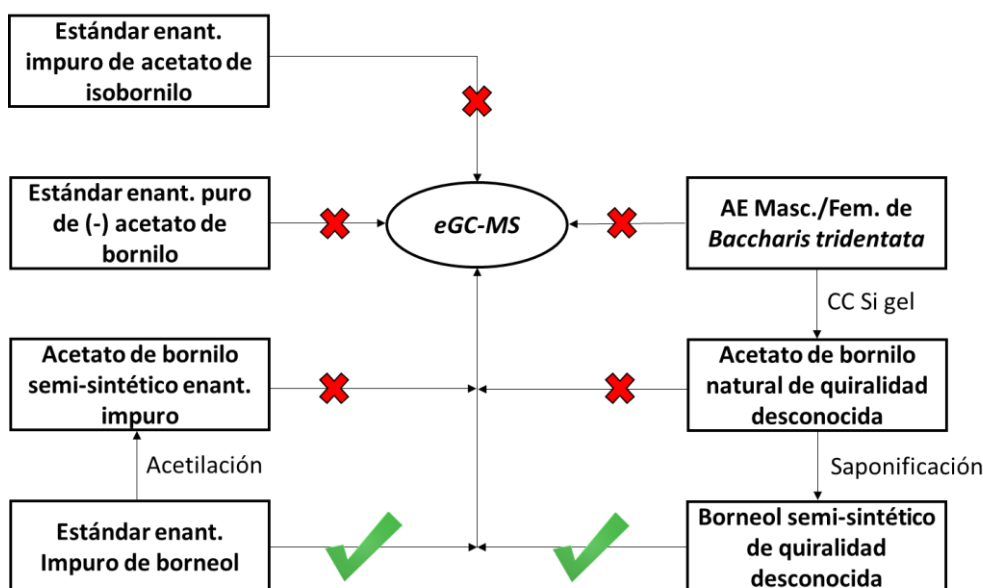
A pesar de que se ensayaron diferentes programas de temperatura en columna y diferentes flujos de gas portador, no fue posible separar enantiómeros para el acetato de bornilo ni para el acetato de isobornilo. Lo anterior significa que el selector quiral empleado no fue adecuado para la separación de dichos enantiómeros, aun cuando sí fue



capaz de resolver a los enantiómeros del acetato de fenchilo (estructuralmente semejante).

### 3.6 Estrategia de análisis por semi-síntesis

Debido a la falta de resolución quiral expuesta anteriormente para los enantiómeros del acetato de borneol, se diseñó una estrategia experimental basada en la separación quiral del borneol, siguiendo los pasos que se ilustran en la Figura 11. Para ello se obtuvo borneol semi-sintético por saponificación del acetato de borneol natural, y acetato de borneol semi-sintético (ambos enantiómeros, por acetilación de un estándar de borneol) para confirmación de la falta de resolución quiral del mismo (Figura 11).



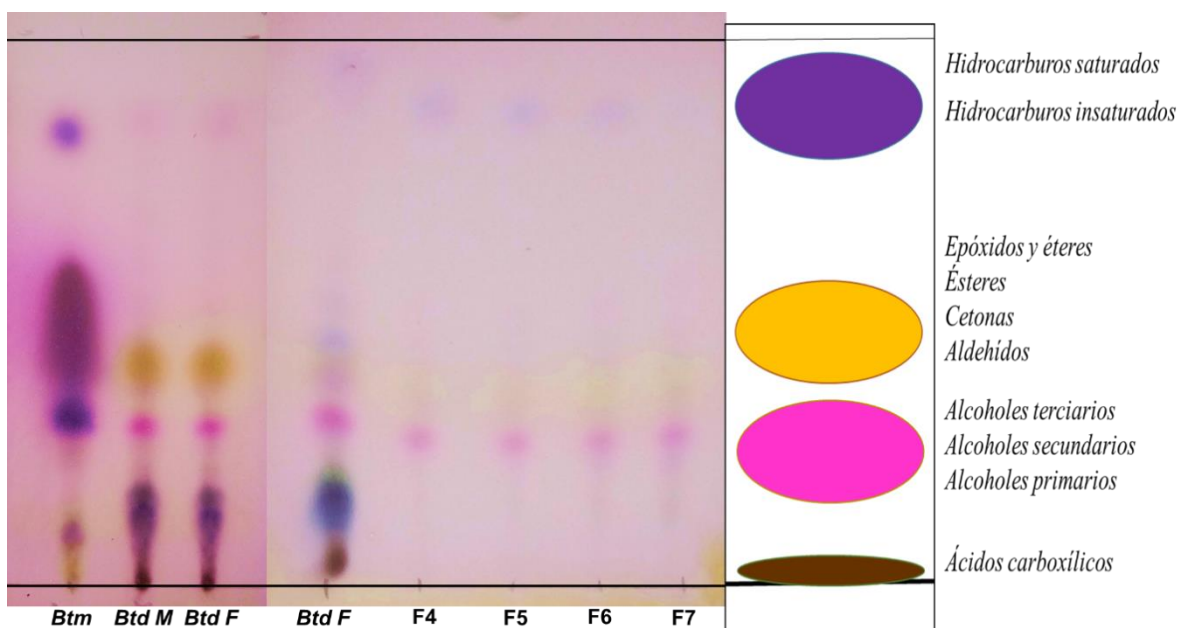
**Figura 11:** Esquema de la estrategia seguida para resolver la quiralidad del acetato de borneol proveniente de los aceites esenciales de *B. tridentata*. Una muestra de borneol semi-sintético fue obtenida para resolver el problema de falta de separación de los enantiómeros del acetato de borneol. Referencias: una cruz roja significa que no hubo resolución en eGC-MS, y un símbolo correcto verde significa que hubo resolución.

### 3.7 Aislamiento de acetato de borneol desde el aceite esencial de *B. tridentata*

En la Figura 12 se muestran los resultados de TLC obtenidos del aislamiento del acetato de borneol desde el aceite esencial de *B. tridentata* (muestra compuesta de ambos géneros). Se obtuvieron cuatro fracciones enriquecidas en el mismo (F<sub>4</sub>-F<sub>7</sub>) las que rindieron 30 mg de acetato de borneol con un 84% de pureza (de acuerdo a los análisis



por *GC-MS*). Cuando dicha porción fue sometida a análisis por *eGC-MS*, no hubo resolución enantiomérica y se obtuvo un único pico cromatográfico en el mismo tiempo de retención mostrado en la Figura 10.



**Figura 12:** Resultados de TLC de la separación por CC del acetato de bornilo del aceite de *B. tridentata*. Referencias: *Btm*: aceite esencial de *B. trimera* (patrón de elución de ésteres). *Btd M* y *Btd F*: aceite esencial masculino y femenino de *B. tridentata*. *F<sub>4</sub>-F<sub>7</sub>*: fracciones enriquecidas en acetato de bornilo. Como referencia, se presentan también el orden de elución en TLC de los diferentes compuestos que integran los aceites esenciales (Wagner et al., 1984).

El acetato de bornilo fue identificado primariamente en *TLC* de acuerdo al orden esperado de elución de los ésteres (Figura 12) (Wagner et al., 1984), y por comparación con las relaciones de frente (*R<sub>f</sub>*) del acetato de carquejilo del aceite esencial de *B. trimera* (capítulo 7); la confirmación fue realizada por inyección en *GC-MS*.

### 3.8 Análisis por *eGC-MS* de los productos semi-sintéticos

Primeramente, se analizó por *eGC-MS* un patrón enantioméricamente impuro de borneol, lo que demostró una buena resolución para ambos enantiómeros (adicionalmente a una buena resolución de impurezas como alcanfor e isorneol) (Figura 13). Los cromatogramas obtenidos fueron similares a los reportados previamente por Ravid et al. (1996) empleando el mismo selector quiral. En el análisis del patrón de borneol, el enantiómero levógiro correspondió al 4% y el dextrógiro a



86% (el resto fueron impurezas), medido como porcentaje de áreas relativas en *eGC-MS* (Figura 13).

A continuación, se inyectó la muestra de acetato de bornilo semi-sintético, obtenida por acetilación del patrón de borneol descrito en el párrafo anterior. Tal análisis produjo un único pico cromatográfico de acetato de bornilo (confirmado por su espectro de masa) al mismo tiempo de retención que las muestras expuestas en la Figura 10.

Debido a que el patrón de borneol de partida poseía ambos enantiómeros, era de esperar que la reacción de acetilación produjese ambos enantiómeros del acetato de bornilo. Sin embargo, se evidenció un único pico cromatográfico para éste último lo que confirmó que el selector no resolvió quiralmemente a dicho compuesto. Adicionalmente, dentro del mismo pico cromatográfico es altamente probable que se encontrasen ambos enantiómeros del acetato de isobornilo, ya que el patrón de partida tenía como impureza un 4,5% de isoborneol (ambos enantiómeros) y los mismos no fueron detectados en otros tiempos de retención. Incluso, al diluir la muestra 1/100 y modificar el programa de temperaturas en *eGC-MS*, no se pudieron resolver picos adicionales, lo que confirmó la co-elución de los enantiómeros del acetato de bornilo e isobornilo en el mismo tiempo de retención.

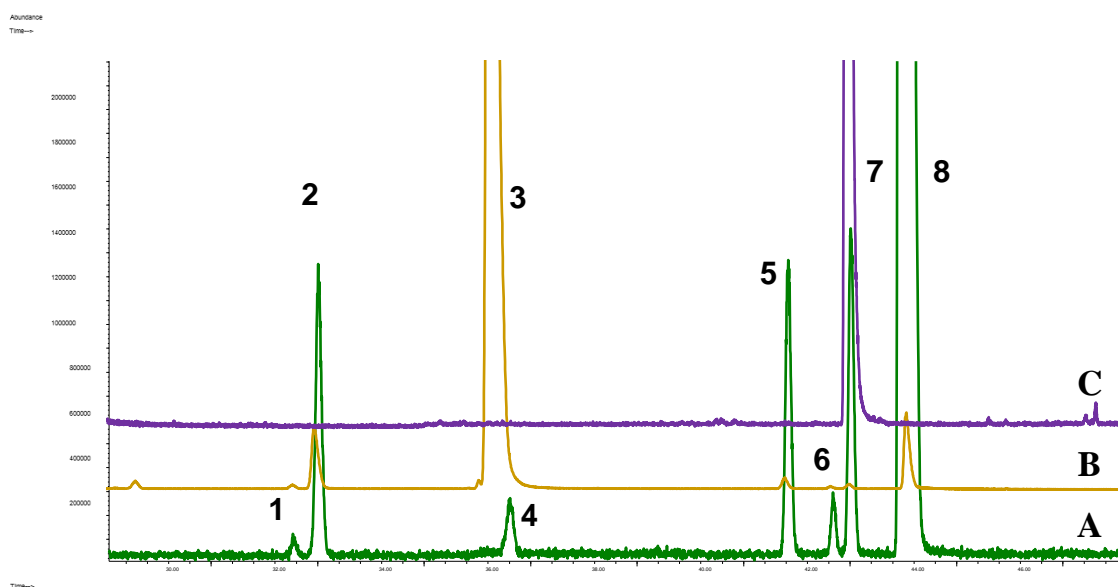
La capacidad del selector quiral empleado para separar los enantiómeros del borneol y de no hacerlo para los correspondientes del acetato de bornilo podría ser una consecuencia de la afinidad del borneol por formar complejos de inclusión (clatratos) con las  $\beta$ -ciclodextrinas, superior a todos los alcoholes e hidrocarburos monoterpénicos, según lo informado por Donze y Coleman (1993).

En contraposición, el acetato de bornilo fue una de los peores compuestos testados por dichos autores para formar complejos con las ciclodextrinas, similar al limoneno y otros hidrocarburos terpénicos (Donze y Coleman, 1993). Sin embargo, la selectividad de inclusión de los monoterpenos en el selector quiral es altamente dependiente de las condiciones experimentales, como por ejemplo, el estado físico en que se forma dicho complejo y la presencia de co-sustratos (Donze y Coleman, 1993). De hecho, cuando los citados autores prepararon una solución equimolecular de borneol y acetato de bornilo y dejaron que la misma entrara en contacto con la  $\beta$ -ciclodextrina, el complejo formado resultó en una proporción de 70% de borneol y 30% de acetato de bornilo, demostrando así la preferencia del oligómero quiral por el alcohol (Donze y Coleman,



1993). La razón por la que se produce tal comportamiento radica en la naturaleza de las interacciones intermoleculares entre el sustrato y el selector. Los compuestos polares (como los alcoholes) tienen mayor posibilidad de interacción con los grupos hidroxilo de las ciclodextrinas a través de puentes de hidrógeno (como donores o aceptores) o interacciones dipolo-dipolo; mientras que los compuestos poco polares (hidrocarburos y ésteres) sólo pueden interactuar a través de las fuerzas de dispersión de Van der Waals (Donze y Coleman, 1993; Köning, 1998). Por otra parte, en el caso de los acetatos de bornilo e isobornilo pueden existir además efectos estéricos adicionales generados entre el grupo acetilo y el puente *gem*-dimetilo (ver Figura 9), lo que podría impedir una adecuada interacción con la estructura molecular de la  $\beta$ -ciclodextrina modificada (Donze y Coleman, 1993).

Finalmente, para determinar la quiralidad del acetato de bornilo natural, el borneol semi-sintético obtenido por saponificación del anterior fue analizado por *eGC-MS*, resultando únicamente en un pico en el tiempo de retención del (-)-borneol (Figura 13). Análisis adicionales del aceite esencial puro de *B. tridentata* (individuos masculinos y femeninos) también demostraron la presencia de un único pico del enantiómero levógiro del borneol, confirmando lo obtenido a través del enfoque semi-sintético.



**Figura 13:** Cromatogramas de *eGC-MS* del estándar impuro de borneol (A), acetato de bornilo semi-sintético obtenido de la acetilación de A (B), y borneol semi-sintético obtenido de la saponificación del acetato de bornilo natural (C). Identificación de compuestos de acuerdo a Ravid et al. (1996). Referencias: 1 (-)-alcanfor, 2: (+)-alcanfor, 3: enantiómeros del acetato de bornilo (co-eluyendo con los acetatos de isobornilo), 4: enantiómero del fenchol (quiralidad indefinida), 5: (+)-isoborneol, 6: (-)-isoborneol, 7: (-)-borneol, 8: (+)-borneol. Selector quiral empleado: 30% heptakis 2,3-di-O-metil-6-O-



*tert*-butil-dimetilsilil- $\beta$ -ciclodextrina sobre fase estacionaria DB-1701 (14% cianopropilfenil-86%-dimetilpolisiloxano).

Los resultados indican que, independientemente del sexo, *B. tridentata* sintetiza enantioespecíficamente (-)-borneol y (-)-acetato de bornilo, un hecho compartido con varias especies aromáticas como por ejemplo el “orégano” (*Origanum vulgare*), la “albahaca” (*Ocimum canum*), *Coridothymus capitatus*, *Artemisia herba-alba* y *Tanacetum parthenium* (Ravid *et al.*, 1996).

Un comportamiento opuesto, es decir con altas purezas enantioméricas de (+)-borneol, ha sido reportado para los aceites comerciales de “lavanda” y “lavandín” (*Lavandula sp.*); mientras que especies aromáticas como el “romero” (*Rosmarinus officinalis*) presentan una amplia variación en la distribución enantiomérica del borneol y acetato de bornilo, de acuerdo a su origen (Ravid *et al.*, 1996).

#### 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En éste estudio se verificó que los extractos volátiles de partes aéreas florecidas de individuos masculinos y femeninos de *Baccharis articulata* poseen una composición química muy similar (por *GC-MS*), con variaciones semi-cuantitativas menores entre sus componentes.

Sin embargo, se encontraron diferencias apreciables respecto en el perfil aromático (por *GC-O*) de ambos sexos: los extractos de individuos masculinos exhibieron los odorantes más fuertes en número e intensidad aromática.

Este comportamiento podría tener un significado ecológico debido a que ésta especie es polinizada por insectos, y la ocurrencia de una diferencia aromática podría indicar a éstos un orden de visita a las flores.

En éste capítulo también se demostró la existencia de un perfil volátil diferencial para individuos masculinos y femeninos de *Baccharis tridentata* en período de floración tardía. El mismo fue evidenciado por diferencias individuales de concentración de compuestos obtenidas por análisis mediante *GC-FID* (estándar interno). De hecho se evidenciaron diferencias apreciables entre dicha cuantificación y los resultados de semi-cuantificación obtenidos por *GC-MS* (porcentajes de áreas relativas) en la modalidad





*Full Scan*. Esto demuestra la importancia del empleo de *GC-FID* para una cuantificación realista de los componentes de los aceites esenciales. A pesar de tales diferencias, fue constatada una distribución enantiomérica semejante para los hidrocarburos monoterpénicos de ambos géneros, junto con la biosíntesis enantioespecífica de (-)-borneol y de (-)-acetato de bornilo.

Las diferencias intersexuales en el volatilo de *B. tridentata* podrían ser “pistas” para insectos polinizadores (o para florívoros o hervíboros en general), como fue previamente hipotetizado para el aroma diferencial de ambos sexos en *B. articulata*.

Para aclarar el papel de los compuestos volátiles de ambos sexos de *B. articulata* y *B. tridentata* en la interacción con insectos, se necesitarían realizar estudios adicionales con un enfoque químico-ecológico que exploraran la percepción sensorial de éstos últimos.

## 5 BIBLIOGRAFÍA

1. L. Aceña Muñoz. **2011**. Aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría en la caracterización del aroma del vinagre de vino, de los pistachos y del aceite de oliva. Tesis de Doctorado, Universidad Rovira i Virgili, Tarragona, España. 308 pp.
2. T. Acree, H. Arn. **1984-2019**. Flavornet and human odor space. Recuperado de <http://www.flavornet.org/> (30/04/2019).
3. R.P. Adams. **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 804 pp.
4. H. Aisala, J. Sola, A. Hopia, K.M. Linderborg, M. Sandell. **2019**. Odor-contributing volatile compounds of wild edible Nordic mushrooms analyzed with HS-SPME-GC-MS and HS-SPME-GC-O/FID. *Food Chem.*, 283: 566-578.
5. F. Agostini, A.C.A. Santos, M. Rossato, M.R. Pansera, F. Zattera, R. Wasum, L. Atti-Serafini. **2005**. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Braz. J. Pharmacogn.*, 15: 215-220.
6. J. Ascari, M.S. de Oliveira, D.S. Nunes, D. Granato, D.R. Scharf, E. Simionatto, M. Otuki, B. Soley, G. Heiden. **2019**. Chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of the essential oils from male and female specimens of *Baccharis punctulata* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.*, 234: 1-7.
7. K.S. Bawa. **1980**. Evolution of dioecy in flowering plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 11: 15-39.
8. V. Bajpai, A. Singh, P. Chandra, M.P.S. Negi, N. Kumar, B. Kuma. **2016**. Analysis of phytochemical variations in dioecious *Tinospora cordifolia* stems using HPLC/QTOF MS/MS and UPLC/QqQLIT - MS/MS. *Phytochem. Anal.*, 27: 92-99.
9. M.A. Besten, V.C.G. Jasinski, A.G.L.C. Costa, D.S. Nunes, S.L. Sens, A. Wisniewski Jr., E.L. Simionatto, D. Riva, J.B. Dalmarco, D. Granato. **2012**. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23: 1041-1047.
10. M.A. Besten, D.S. Nunes, A. Wisniewski Jr., S.L. Sens, D. Granato, E.L. Simionatto, D.R. Scharf, J.B. Dalmarco, N.I. Matzenbacher. **2013**. Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of Southern Brazil: a comparative study using chemometrics. *Quim. Nova*, 36: 1096-1100.
11. M.A. Besten, D.S. Nunes, D. Granato, S.L. Sens, A. Wisniewski Jr., E.L. Simionatto, D.R. Scharf. **2014**. Chemical composition of essential oils from cladodes and inflorescences from male and female specimens of *Baccharis milleflora*. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 17: 899-905.



12. C. Bicchi, A. D'Amato, P. Rubiolo. **1999**. Cyclodextrin derivatives as chiral selectors for direct gas chromatographic separation of enantiomers in the essential oil, aroma and flavor fields. *J. Chromatogr. A*, 843: 99-121.
13. C. Bicchi, E. Liberto, M. Matteodo, B. Sgorbini, L. Mondello, B. d'Acampora Zellner, R. Costa, P. Rubiolo. **2008**. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. *Flavour Fragr. J.*, 23: 382-391.
14. C. Bicchi, M. Maffei. **2012**. The plant volatilome: methods of analysis. In: J. Normanly (ed.): High-Throughput Phenotyping in Plants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Volume 918. Springer Science + Business Media LLC, New York, NY, USA; pp. 289-310.
15. G.A. Burdock. **2010**. Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients, 6<sup>th</sup> edition. CRC Press, Boca Raton, FL, USA. 2135 pp.
16. C. Cagliero, B. Sgorbini, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, C. Bicchi. **2017**. Enantioselective gas chromatography with cyclodextrin in odorant analysis. In: A. Buettner (ed.). Springer Handbook of Odor. Springer, New York; pp. 409-433.
17. F. A. Carey. **2008**. Química Orgánica. Sexta Edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F., México. 1421 pp.
18. M.A.A. Carneiro, G.W. Fernandes, O.F.F. de Souza, W.V.M. Souza. **2006**. Sex-mediated herbivory by galling insects on *Baccharis concinna* (Asteraceae). *Rev. Bras. Entomol.*, 50: 394-398.
19. A. Chaintreau. **2001**. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review. *Flavour Fragr. J.*, 16: 136-148.
20. C. Chen, Q. Song. **2008**. Responses of the pollinating wasp *Ceratosolen solmsi marchali* to odor variation between two floral stages of *Ficus hispida*. *J. Chem. Ecol.*, 34: 1536-1544.
21. S.T. Chin, P.J. Marriott. **2015**. Review of the role and methodology of high-resolution approaches in aroma analysis. *Anal. Chim. Acta*, 854: 1-12.
22. S.T. Chin, G.T. Eyres, P.J. Marriott. **2017**. Gas chromatography-mass spectrometry in odorant analysis. In A. Buettner (ed.). Springer Springer Handbook of Odor. Springer, New York; pp. 344-350.
23. N. Choudhry, S. Singh, M.B. Siddiqui, S. Khatoon. **2014**. Impact of seasons and dioecy on therapeutic phytoconstituents of *Tinospora cordifolia*, a Rasayana drug. *BioMed Res. Int.*, Article ID 902138.
24. E. Cicchetti, P. Merle, A. Chaintreau. **2008**. Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. *Flavour Fragr. J.*, 23: 450-459.
25. E. Cuevas-García, C.A. Abarca-García. **2006**. Origen, mantenimiento y evolución del dioicismo. *Bol. Soc. Bot. Méx.*, 78: 33-42.
26. B. d'Acampora Zellner, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello. **2008**. Gas chromatography-olfactometry in food flavour analysis. *J. Chromatogr. A*, 1186: 123-143.
27. J. Degenhardt, T.G. Kollner, J. Gershenzon. **2009**. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70: 1621-1637.
28. C.M. Delahunty, G. Eyres, J.P. Dufour. **2006**. Gas chromatography-olfactometry. *J. Sep. Sci.*, 29: 2107-2125.
29. C. Donze, A.W. Coleman. **1993**.  $\beta$ -CD inclusion complex: relative selectivity of terpene and aromatic guest molecules studied by competitive inclusion experiments. *J. Incl. Phenom. Mol. Recognit. Chem.*, 16: 1-15.
30. A. Dravnieks. **1985**. Atlas of odor character profiles. ASTM Data Series 61. ASTM, Philadelphia, USA. 354 pp.
31. A. Escudero, E. Campo, L. Fariña, J. Cacho, V. Ferreira. **2007**. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 4501-4510.
32. M.M. Espírito-Santo, B.G. Madeira, F.S. Neves, M.L. Faria, M. Fagundes, G.W. Fernandes. **2003**. Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. *Ann. Bot.*, 91: 13-19.
33. G.W. Fernandes, H.M. Duarte, F.A.O. Silveira, F. Broetto, U. Lüttge, H. Rennenberg. **2017**. Effects of sex and altitude on nutrient, and carbon and nitrogen stable isotope composition of the endangered shrub *Baccharis concinna* G.M. Barroso (Asteraceae). *Acta Bot. Bras.*, 31: 229-240.
34. V.L. Ferracini, L.C. Paraíba, H.L. Leitão Filho, A.G. da Silva, L.R. Nascimento, A.J. Marsaioli. **1995**. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *J. Essent. Oil Res.*, 7: 355-367.
35. G. Flamini, P.L. Cioni, I. Morelli. **2002**. Differences in the fragrances of pollen and different floral parts of male and female flowers of *Laurus nobilis*. *J. Agric. Food Chem.*, 50: 4647-4652.



36. D.d.C. Fonseca, M.L.R. de Oliveira, I.M. Pereira, A.P.D. Gonzaga, C.C. de Moura, E.L.M. Machado. **2017**. Spatial pattern of *Baccharis platypoda* shrub as determined by sex and life stages. *Act. Oecol.*, 85: 33-43.
37. J.B. German, C. Yeritzian, V.B. Tolstoguzov. **2007**. Olfaction, where Nutrition, Memory and Immunity Intersect. In: R.G. Berger (ed.): Flavours and fragrances. Chemistry, bioprocessing and sustainability. Springer-Verlag, Berlín; pp. 25-42.
38. W. Grosch. **2007**. Gas chromatography-olfactometry of aroma compounds. In: R.G. Berger (ed.). Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability. Springer Verlag, Berlín; pp. 362-378.
39. C. Herrera, V. Morocho, G. Vidari, C. Bicchi, G. Gilardoni. **2018**. Phytochemical investigation of male and female *Hedyosmum scabrum* (Ruiz & Pav.) Solms leaves from Ecuador. *Chem. Biodiversity*, 15: e1700423: 1-9.
40. K.D. Klika. **2013**. The potential of <sup>13</sup>C isotopomers as a test for the vibrational theory of olfactory sense recognition. *ISRN Org. Chem.*, Article ID 515810.
41. W.A. Köning, A. Krüger, D. Icheln, T. Runge. **1992**. Enantiomeric composition of the chiral constituents in essential oils. *J. High Resol. Chromatogr.* 15: 184-189.
42. W.A. Köning. **1998**. Enantioselective capillary gas chromatography in the investigation of stereochemical correlations of terpenoids. *Chirality*, 10: 499-504.
43. J.H.G. Lago, P. Romoff, O.A. Favero, F.O. Souza, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Correa. **2008**. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.*, 36: 737-740.
44. E. Lizarraga, M. Minteguiaga, M.L. Guerra, J.M. Garrido, C.A.N. Catalán. **2016**. Aceite Esencial de *Acanthostyles buniifolius* (Asteraceae) de la provincia de Tucumán. Variación estacional, interindividual y composición enantiomérica de los monoterpenoides. *Dominguezia*, 32: 93-94.
45. D. Lorenzo, D. Paz, P. Davies, J. Villamil, R. Vila, S. Cañigueral, E. Dellacassa. **2004**. Characterization and enantiomeric distribution of some terpenes in the essential oil of a Uruguayan biotype of *Salvia sclarea* L. *Flavour Fragr. J.*, 19: 303-307.
46. D. Lorenzo, D. Paz, P. Davies, J. Villamil, R. Vila, S. Cañigueral, E. Dellacassa. **2005**. Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochem. Anal.*, 16: 39-44.
47. J. Lückner, M.K. El Tamer, W. Schwab, F.W.A. Verstappen, L.H.W. van der Plas, H.J. Bouwmeester, H.A. Verhoeven. **2002**. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *Eur. J. Biochem.*, 269: 3160-3171.
48. A.R. Marques, G.W. Fernandes, I.A. Reis, R.M. Assunção. **2002**. Distribution of adult male and female *Baccharis concinna* (Asteraceae) in the rupestrian fields of Serra do Cipó, Brazil. *Plant Biol.*, 4: 94-103.
49. V. Márquez, N. Martínez, M. Guerra, L. Fariña, E. Boido, E. Dellacassa. **2013**. Characterization of aroma impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC-olfactometry and GC-MS. *Food Res. Int.*, 53: 808-815
50. E. Matsubara, M. Fukagawa, T. Okamoto, K. Ohnuki, K. Shimizu, R. Kondo. **2011**. (-)-Bornyl acetate induces autonomic relaxation and reduces arousal level after visual display terminal work without any influence of task performance in low-dose condition. *Biomed. Res.*, 32: 151-157.
51. D.A. Minott, H.A. Brown. **2007**. Differentiation of fruiting and non-fruiting *Pimenta dioica* (L.) Merr. trees based on composition of leaf volatiles. *J. Essent. Oil Res.*, 19: 354-357.
52. M.A. Minteguiaga, C.D. Frizzo, E.S. Dellacassa. **2017**. Compuestos aromáticamente activos del aceite esencial de *Citrus deliciosa* Tenore var. Caí detectados por cromatografía gaseosa-espectrometría de masa y cromatografía gaseosa-olfatometría. *J. Pharm. Pharmacogn. Res.*, 5: 335-344.
53. M. Miyazawa, A. Usami, T. Tanaka, K. Tsuji, M. Takehara, Y. Hori. **2016**. Sexual differences in chemical composition and aroma-active compounds of essential oil from flower buds of *Eurya japonica*. *J. Oleo Sci.*, 65: 357-363.
54. X. Moreira, C.S. Nell, M.M. Meza-López, S. Rasmann, K.A. Mooney. **2018**. Specificity of plant-plant communication for *Baccharis salicifolia* sexes but not genotypes. *Ecology*, 99: 2731-2739.
55. P.L. Mwang'ingo, G. Kibodya, A.R. Mng'ong'o. **2010**. Oil yield and quality variation between sexes in *Osyris lanceolata* (African sandalwood) and its value as a fodder plant in Tanzania. *South. Forests*, 72: 69-74.
56. A.C. Noble, R.A. Arnold, J. Buechsenstein, E.J. Leach, J.O. Schmidt, P.M. Stern. **1987**. Modification of a standardized system of wine aroma terminology. *Am. J. Enol. Vitic.*, 38: 143-146.
57. A. Ohlsson, C.I. Abou-Chaar, S. Agurell, I.M. Nilsson, K. Olofsson, F. Sandberg. **1971**. Cannabinoid constituents of male and female *Cannabis sativa*. *UN Bulletin on Narcotics*, 23: 29-32.



58. J.A. Pino. 2015. Aceites esenciales. Química, bioquímica, producción y Usos. Editorial Universitaria, La Habana, Cuba. 209 pp.
59. W. Pickenhagen. 2017. History of odor and odorants. In: A. Buettner (ed.). Springer handbook of odor. Springer, New York; pp. 1-8.
60. A. Plotto, C.A. Margaría, K.L. Goodner, R. Goodrich, E.A. Baldwin. 2004. Odour and flavour thresholds for key aroma components in an orange juice matrix: terpenes and aldehydes. *Flavour Fragr. J.*, 19: 491-498.
61. V.S. Pragadheesh, C.S. Chanotiya, S. Rastogi, A.K. Shasany. 2017. Scent from *Jasminum grandiflorum* flowers: Investigation of the change in linalool enantiomers at various developmental stages using chemical and molecular methods. *Phytochemistry*, 140: 83-94.
62. U. Ravid, E. Putievsky, I. Katzir. 1996. Stereochemical Analysis of borneol in essential oils using permethylated  $\beta$ -cyclodextrin as a chiral stationary phase. *Flavour Fragr. J.*, 11: 191-195.
63. S.S. Renner, R.E. Ricklefs. 1995. Dioecy and it correlates in the flowering plants. *Am. J. Bot.*, 82: 596-606.
64. G.K.E. Scriba. 2011. Molecules in the mirror. Enantiomer separation using capillary electrophoresis. *Q&More*, 2: 8-13.
65. A. Shipunov. 2017. Introduction to Botany. Lectures notes. Version 175. Minot State University, North Dakota, USA. Recuperado de: [http://ashipunov.info/shipunov/school/biol\\_154/](http://ashipunov.info/shipunov/school/biol_154/) (02/05/2018)
66. E. Simionatto, V. Ilha, A.S. Mallmann, C. Porto, I. I. Dalcol, A.F. Morel. 2008. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. *J. Essent. Oil Res.*, 20: 366-368.
67. C.A. Simões-Pires, S. Debenedetti, E. Spegazzini, L.A. Mentz, N.I. Matzenbacher, R.P. Limberger, A.T. Henriques. 2005. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.*, 253: 23-32.
68. B.S. Simpson. 2013. Dioecy in plants – is it an important factor for phytochemists to Consider? *Planta Med.*, 79: 613-615.
69. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. 2001. Análisis Instrumental. 5ª edición. Editorial McGraw-Hill, Madrid, España. 1028 pp.
70. S.P. Souza, M.G. Cardoso, P.E. Souza, L.G.L. Guimarães, J. Andrade, A.C.T. Mallet, D.L. Nelson. 2011. Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 13: 456-466.
71. V. Theodorou, K. Skobridis, A.G. Tzakos, V. Ragoussis. 2007. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Lett.*, 48: 8230-8233.
72. B. Tischer, R.G. Vendruscolo, R. Wagner, C.R. Menezes, C.S. Barin, S.R. Giacomelli, J.M. Budel, J.S. Barin. 2017. Effect of grinding method on the analysis of essential oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. *Chem. Pap.*, 71: 753-761.
73. P.Q. Tranchida, L. Mondello, I. Bonaccorsi, G. Dugo. 2012. Analysis of Citrus essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour Fragr. J.*, 27: 98-123.
74. M. Trombin-Souza, M. Trombin-Souza, W. Amaral, J.A.L. Pascoalino, R.A. Oliveira, H.R. Bizzo, C. Deschamps. 2017. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 400-406.
75. S.M. van Ruth. 2001. Methods for gas chromatography-olfactometry: a review. *Biomol. Eng.*, 17: 121-128.
76. H. Wagner, S. Bladt, E.M. Zgainski. 1984. Plant Drug Analysis. A Thin layer chromatography atlas. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany. 320 pp.
77. V.B. Xavier, R.M.F. Vargas, M. Minteguiaga, N. Umpiérrez, E. Dellacassa, E. Cassel. 2013. Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: new applications for known products. *Ind. Crops Prod.*, 49: 492-496.
78. V.B. Xavier, M. Minteguiaga, N. Umpiérrez, R.M.F. Vargas, E. Dellacassa, E. Cassel. 2017. Olfactometry evaluation and antimicrobial analysis of essential oils from *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso and *Baccharis uncinella* DC. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 137-144.
79. Z. Xiao, H. Wang, Y. Niu, Q. Liu, J. Zhu, H. Chen, N. Ma. 2017. Characterization of aroma compositions in different Chinese congou black teas using GC-MS and GC-O combined with partial least squares regression. *Flavour Fragr. J.*, 32: 265-276.
80. C. Yeretzián. 2017. Coffee. History of odor and odorants. In: A. Buettner (ed.). Springer Handbook of Odor. Springer, New York; pp. 107-122.
81. Z. Zhang, G. Li. 2010. A review of advances and new developments in the analysis of biological volatile organic compounds. *Microchem. J.*, 95: 127-139.



82. J. Zhou, H. Ritter. **2010**. Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. *Polym. Chem.*, 1: 1552-1559.
83. M. Zhu, E. Li, H. He. **2008**. Determination of volatile chemical constituents in tea by simultaneous distillation extraction, vacuum hydrodistillation and thermal desorption. *Chromatographia*, 68: 603-610.
84. J.C. Zhu, F. Chen, L.Y. Wang, Y.W. Niu, H.X. Chen, H.L. Wang, Z.B. Xiao. **2016**. Characterization of the Key aroma volatile compounds in cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) using gas chromatography–olfactometry (GC-O) and odor activity value (OAV). *J. Agric. Food Chem.*, 64: 4990-4999.
85. T. Zuccolotto, J. Bressan, A.V.F. Lourenço, E. Bruginski, A. Veiga, J.V.N. Marinho, P.A. Raeski, G. Heiden, M.J. Salvador, F.S. Murakami, J.M. Budel, F.R. Campos. **2019**. Chemical, antioxidant, and antimicrobial evaluation of essential and an anatomical study of the aerial parts from *Baccharis* species (Asteraceae). *Chem. Biodiversity*, 16: e1800547: 1-12.
86. M.P. Zunino, M. Novillo-Newton, D.M. Maestri, J.A. Zygadlo. **1998**. Essential oils of three *Baccharis* species. *Planta Med.*, 64: 86-87.
87. M.P. Zunino, M.L. López, J.A. Zygadlo, A.G. López. **2004**. Essential oil composition of *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. *J. Essent. Oil Res.*, 16: 29-30.



## Capítulo 6

# Influencia de factores ambientales y fenológicos sobre el metabolismo volátil de *Baccharis* spp. L.

**Resumen:** En los capítulos precedentes de éste trabajo de tesis se presentó el análisis de la composición volátil de *Baccharis* spp. en colectas puntuales, sin tener en cuenta la variación de la misma como consecuencia de las condiciones ambientales en las que las plantas se desarrollaron. En éste capítulo inicialmente se introducirán conceptos y ejemplos de factores ambientales que pueden causar situaciones de estrés e incidir sobre el metabolismo secundario (temperatura, radiación UV, disponibilidad hídrica, entre otros), y se establecerá el rol de éste como interfase química para contrarrestar dicho estrés. Posteriormente se resumirán algunos antecedentes existentes de la literatura acerca de la variación del metabolismo secundario de *Baccharis* spp. relacionado a la variación de las condiciones ambientales, así como se presentarán antecedentes de las especies *B. microdonta* y *B. dracunculifolia*. A partir de esta información se describirá la estrategia diseñada en este trabajo para la colecta y análisis mensual de la composición volátil de estas dos últimas especies (usualmente confundidas en condiciones de campo) durante el período de un año en la estación INIA Las Brujas (Departamento de Canelones, Uruguay). Se registraron datos pedoclimáticos durante el período de colecta, de manera de poder caracterizar el ambiente en que las plantas se desarrollaron. Finalmente se presentará el análisis enantioselectivo de los principales monoterpenos de ambas especies durante el citado período, el que demostró que cada una de ellas tiene un patrón específico que podría permitir la diferenciación desde el punto de vista químico.

### 1. INTRODUCCION

#### 1.1 Factores ambientales, estrés y metabolismo secundario

Para cualquier organismo vivo, el efecto de los factores ambientales imperantes en el ecosistema es de primordial importancia para su actividad fisiológica, para el desarrollo de los ciclos biológicos, para la oposición al estrés y en última instancia para la expresión metabólica como un todo (Timmermann *et al.* 1984; Gobbo-Neto y Lopes,



2007). Las plantas superiores sobreviven en ambientes fluctuantes y han desarrollado metabolismos altamente flexibles y procesos de crecimiento y desarrollo necesarios para el estilo de vida sésil de las plantas (Dudareva *et al.*, 2013).

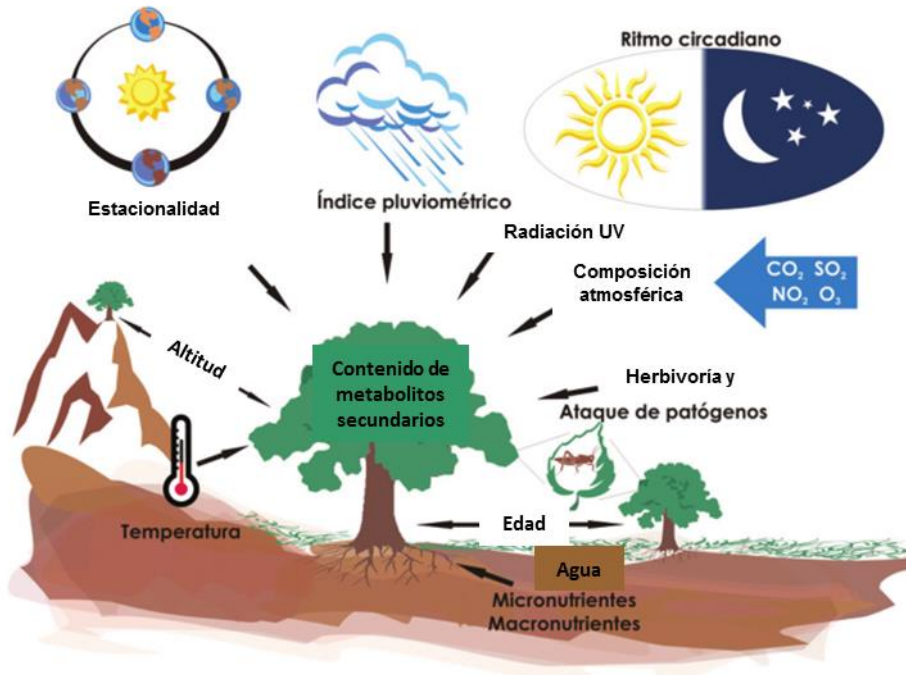
Particularmente, para el caso de las plantas aromáticas, culinarias, medicinales y tóxicas, lo anterior significa que la expresión genética, la cantidad de biomasa y el contenido de metabolitos primarios y secundarios (principios activos) pueden variar como consecuencia de alteraciones en las condiciones del ambiente en que las mismas fueron recolectadas (Timmermann *et al.* 1984; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

En sus ambientes naturales las plantas se encuentran sometidas a condiciones de estrés (extremos de temperaturas, disponibilidad hídrica, radiación y nutrientes; así como salinidad y alcalinidad del suelo, contaminación, y daño mecánico abiótico y biótico) que limitan su fisiología, afectando la producción normal de biomasa y sus productos metabólicos (Ramakrishna y Ravishankar, 2011). La adaptación a tales situaciones es posible gracias al metabolismo dinámico de las plantas, el que responde de manera precisa mediante la síntesis de compuestos químicos que contrarrestan los efectos negativos de las condiciones estresantes (Timmermann *et al.* 1984; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Dichos componentes en general se sintetizan, acumulan y transportan en las plantas, y se conocen como elicitores o moléculas señal, e incluyen a diversos metabolitos primarios como los ácidos absícico y salicílico, poliaminas, jasmonatos y óxido nítrico, entre otros (Timmermann *et al.* 1984; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Estos a su vez desencadenan la síntesis de metabolitos secundarios (terpenos, alcaloides, esteroides, flavonoides, etc.) que son los que ejercen la respuesta final a la situación estresante (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Dentro de los muchos factores ambientales (factores externos inter-relacionados) que influyen la expresión del metabolismo secundario vegetal y causan situaciones de estrés se encuentran: factores climáticos (estacionalidad, régimen pluviométrico, humedad, temperatura, presión atmosférica, nivel de radiación, ritmo circadiano, régimen de vientos), edáficos (tipo de suelo, estructura, humedad, salinidad y nivel el nutrientes del mismo), geográficos (altitud, contaminación atmosférica) y bióticos



(herbívoros, fitopatógenos, polinizadores, etc.) (Figura 1) (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Dudareva *et al.*, 2013).



**Figura 1:** Influencia de factores externos (condiciones ambientales) sobre el contenido de metabolitos secundarios de una especie vegetal. La edad de las plantas y el estado fenológico pueden considerarse factores internos que también inciden en la composición. Fuente: Gobbo-Neto y Lopes, (2007).

Se considera que el metabolismo secundario es una interfase química entre la planta y su ambiente, por lo que es evidente que variaciones en éste último tengan una marcada influencia en la producción de metabolitos (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). Es importante resaltar asimismo que la variación en el contenido de metabolitos secundarios vegetales también está asociado al genotipo de la planta y al estado fenológico de la misma (factores intrínsecos), lo que implica que su expresión metabólica en condiciones reproductivas o vegetativas es diferencial (capítulos 5 y 7) (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

En la misma línea, como consecuencia del crecimiento y desarrollo continuo de las plantas, el metabolismo presente en los diferentes órganos vegetales también es diferencial; por ejemplo, las partes más jóvenes en general tienen un mayor nivel de componentes químicos defensivos (aleloquímicos) que las partes más viejas (Gobbo-Neto y Lopes, 2007). Tal es el caso de la “arnica” *Arnica montana* (Asteraceae), que acumula las lactona sesquiterpénica helenalina en las partes jóvenes, pero la





concentración de la misma disminuye hasta casi desaparecer luego de 6 semanas de desarrollo; mientras que simultáneamente la dihidrohelenalina aumenta su concentración durante el desarrollo y se mantiene constante en la etapa adulta (**Schmidt et al., 1998**).

### **1.1.1 Estacionalidad**

Durante el régimen de estacionalidad (sucesión de las estaciones) se producen cambios en la duración del día y de la noche, en el nivel de radiación solar, en las temperaturas medias, en el régimen de precipitaciones e intensidad de vientos; aspectos todos adaptativos para las plantas en sus funciones de supervivencia y reproducción (**Timmermann et al. 1984; Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). La estacionalidad es uno de los factores ambientales clave que influyen el metabolismo secundario y en la literatura se encuentran muchos reportes de variación de distintas clases de metabolitos en diferentes especies en diferentes épocas del año (**He et al., 2000; Figueiredo et al., 2008**).

Evaluar el efecto de la estacionalidad es de gran importancia para especies de interés económico con el objetivo de establecer en qué época del año es más propicio realizar la colecta (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). Un ejemplo de lo anterior es el caso de la “hierba de San Juan” (*Hypericum perforatum*, Hypericaceae) que se emplea en el tratamiento de depresiones leves y moderadas debido a sus principios activos antraquinónicos hipericina y pseudohipericina (**Southwell y Burk, 2001**). En invierno el contenido de ambas sustancias en la planta llega a ser menos de 50 ppm, mientras que en el verano el mismo se incrementa hasta aproximadamente 5000 ppm (**Southwell y Burk, 2001**). Es por tal evidente, que la potencialidad terapéutica en uno y otro caso será diferente, lo que demuestra la necesidad de obtener productos fitoterápicos estandarizados para asegurar la efectividad del preparado (capítulo 1) (**Cañigüeral et al., 2003**).

### **1.1.2 Ritmo circadiano**

La variación del metabolismo secundario con el ciclo día-noche también ha sido profusamente estudiada en la literatura para una diversidad de especies vegetales



(**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). Dado que los metabolitos secundarios son mediadores en los procesos de comunicación química, es coherente que la síntesis de éstos se produzca en mayor extensión en el período de máxima actividad del organismo blanco (por ejemplo en el caso de las relaciones flores-polinizadores) (**Ferracini et al., 1995; Figueiredo et al., 2008; Howe y Jander, 2008**).

En general, las plantas que dependen de los insectos para transportar el polen entre diferentes individuos, emiten mezclas volátiles para atraerlos y guiarlos de manera precisa a las flores (**Figueiredo et al., 2008**). Debido a éste efecto del ritmo circadiano sobre el metabolismo secundario, para realizar estudios estacionales es conveniente coleccionar el material vegetal a la misma hora del día en las diferentes épocas del año, disminuyendo de ésta forma la influencia de dicho factor en la expresión metabólica de la planta (**Vasconcelos Silva et al., 1999; Gobbo-Neto y Lopes, 2007**).

### 1.1.3 Temperatura

Cada especie que se ha adaptado a su hábitat en un dado ecosistema está expuesta a un amplio rango de temperaturas producto de la estacionalidad, del ritmo circadiano, de la altitud y del nivel de radiación solar que recibe (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011; Dudareva et al., 2013**). Debido a ésta interdependencia entre los factores ambientales existen pocos estudios respecto de la incidencia de la temperatura como único factor sobre el metabolismo secundario (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). Una de las consecuencias más evidentes de la temperatura es que puede inducir la senescencia de las hojas, variando el nivel de carotenoides en las mismas (**Ramakrishna y Ravishankar, 2011**).

En el caso de la especie *Artemisia annua* (Asteraceae), la misma modifica su metabolismo secundario como consecuencia del régimen de heladas a la que se encuentra expuesta, produciendo un aumento del 60-75% en el contenido de la lactona sesquiterpénica artemisinina (sustancia con propiedades antimaláricas), concomitantemente con una reducción de la concentración de su precursor biosintético ácido dihidroartemisínico (**Wallaart et al., 2000**). El exceso de radicales libres que produce la abrupta disminución de temperaturas sería captado por éste último precursor,



formando un producto estable e inofensivo para la planta como la artemisinina (Wallaart *et al.*, 2000).

En el caso de las plantas aromáticas, en general cuanto mayor es la temperatura a la que se encuentran expuestas mayor es la producción de aceites esenciales debido a la constante volatilización de los mismos desde los tricomas glandulares y canales secretores (Gobbo-Neto y Lopes, 2007). Sin embargo, en la literatura hay citados casos en que existe una correlación negativa entre la temperatura y la producción de algunos monoterpenos, como por ejemplo para el limoneno,  $\beta$ -felandreno y 1,8-cineol en el aceite de *Santolina rosmarinifolia* (Asteraceae) de la península ibérica (Palá-Paúl *et al.*, 2001).

#### **1.1.4 Disponibilidad hídrica**

Existen una variedad de procesos fisiológicos que se encuentran afectados por la disponibilidad de agua, entre ellos la fotosíntesis, la apertura/cierre de los estomas, la movilización de nutrientes, la expansión y el crecimiento foliar, y el metabolismo secundario (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011). En éste caso, el régimen de precipitaciones, la humedad atmosférica y la humedad en el suelo son de trascendental importancia para la síntesis de determinados componentes de las plantas (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011).

Por ejemplo, se ha reportado un aumento en la concentración del compuesto poliacetilénico capileno en el aceite esencial de *Santolina rosmarinifolia* (Asteraceae) como consecuencia del aumento en el régimen de precipitaciones (Palá-Paúl *et al.*, 2001). Cuando ocurren condiciones de sequía (con baja disponibilidad hídrica, y altas temperaturas y niveles de radiación asociados) se produce un estrés oxidativo que modifica el contenido de pigmentos fotosintéticos, así como en general se eleva el contenido de polifenoles como medida para contrarrestar tales situaciones estresantes (Ramakrishna y Ravishankar, 2011).



### 1.1.5 Radiación ultravioleta

Una de las funciones clave de los metabolitos polifenólicos (fenilpropanoides, flavonoides, taninos y antocianinas) es la de ser protectores ante los efectos deletéreos de la radiación UV-B que pueden dañar el material genético (capítulo 10) (**Winkel-Shirley, 2002; Cassati y Walbot, 2005; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011**). En consecuencia, los polifenoles (principalmente flavonoides) son acumulados a nivel de tejidos superficiales (epidermis, sub-epidermis, tricomas, cutícula, etc.; ver capítulo 7) y utilizados por las plantas como “filtros” para captar la radiación dañina sin alterar la radiación fotosintéticamente activa (**Winkel-Shirley, 2002; Cassati y Walbot, 2005; Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011**). La biosíntesis de los metabolitos polifenólicos (realizada en gran parte mediante la ruta del ácido shikímico; capítulo 1) incluye enzimas como la fenil amonio-liasa (*PAL*) y la chalcona sintasa, cuya expresión génica es inducible por el nivel de radiación solar (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011**).

En otros casos, como en el aceite esencial de “menta” (*Mentha x piperita*, Lamiaceae), se presenta una mayor proporción de mentol y mentona cuando el fotoperíodo es mayor (es decir, cuando las plantas reciben mayor cantidad de luz), mientras que cuando el fotoperíodo es corto se encuentra una proporción elevada de mentofurano (**Voirin et al., 1990**).

### 1.1.6 Nutrientes del suelo

El nivel de micro y macronutrientes presentes en el suelo, así como su biodisponibilidad es clave para la producción de biomasa vegetal, pero también es de importancia para la biosíntesis de metabolitos secundarios (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011**). Sin embargo, dichos efectos no son genéricos y dependen de cada sistema suelo-planta en particular, lo que demuestra la complejidad intrínseca de los mismos (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**).

Se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la producción de metabolitos secundarios (con la excepción de los nitrogenados) y el balance carbono/nitrógeno (C/N) en el suelo (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). Por ejemplo, en suelos pobres en



nutrientes (coeficiente C/N alto), en general se produce un menor desarrollo vegetal y concomitantemente una mayor producción de metabolitos fenólicos primarios y secundarios, lo que involucra un mayor nivel de lignificación de los órganos vegetales (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011**). Una consecuencia es que las plantas que crecen en dichos ambientes se encuentran mejor protegidas físicamente (estructuras endurecidas por la lignina) y químicamente (fenoles tóxicos) ante el ataque de herbívoros (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**).

Se ha observado asimismo que las plantas que se desarrollan en suelos con una mayor biodisponibilidad de macronutrientes (nitrógeno, potasio y fósforo), en general presentan mayor contenido global de metabolitos nitrogenados (alcaloides, aminas, glucosinolatos y glicósidos cianogénicos); pero debido a que el nitrógeno tiene una gran influencia sobre la producción de biomasa, la concentración absoluta de los mismos puede disminuir (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ramakrishna y Ravishankar, 2011**). A modo de ejemplo, se ha reportado que para la especie *Tabernaemontana pachysipon* (Apocynaceae) se produce un aumento de la concentración del alcaloide aparicina y sus derivados cuando el nivel de fertilización con macronutrientes es mayor (**Höft et al., 1996**).

A diferencia de lo que sucede con los macronutrientes, la información referente a los efectos de los micronutrientes sobre el metabolismo secundario es escasa (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). Uno de los pocos estudios publicados demostró que el rociado de las hojas de la “digital” (*Digitalis grandifolia*; Plantaginaceae) con soluciones diluidas de manganeso y molibdeno incrementa a más del doble la producción de glicósidos cardioactivos (**Letchamo, 1986**).

### **1.1.7 Altitud**

Dado que la altitud a la que se desarrolla una planta está íntimamente relacionada a otros factores ambientales como temperatura, disponibilidad hídrica y nivel de radiación; es de esperar que variaciones en dicho factor en poblaciones de la misma especie puedan tener como consecuencia una expresión metabólica diferencial (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007**). En tal caso, la información existente en la literatura confirma la correlación positiva entre la altitud y el contenido de flavonoides, lo que sería



consecuencia de su función como “filtros” UV debido a que en ambientes montañosos el nivel de radiación es varias veces superior al correspondiente al nivel del mar (Zidorn y Stuppner, 2001; Winkel-Shirley, 2002; Cassati y Walbot, 2005; Gobbo-Neto y Lopes, 2007). Para el caso de los aceites esenciales, en general se evidencia una menor producción de los mismos a mayor altitud, con consiguientes alteraciones en la composición química (Frizzo *et al.*, 2008; Haider *et al.*, 2009).

### 1.1.8 Contaminación atmosférica

Existen muy pocas evaluaciones realizadas con respecto a la influencia de la contaminación atmosférica sobre el metabolismo secundario, y las mismas tratan principalmente sobre la incidencia de niveles elevados de dióxido de carbono y ozono (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; De Filippis, 2016). Uno de los trabajos publicados demostró que mudas de la especie *Pinus sylvestris* (Pinaceae) tratadas constantemente con ozono presentan una mayor inducción de la enzima estilbeno sintasa y una mayor producción de los metabolitos pinosilvina y pinosilvina-3-metiléter (Roseman *et al.*, 1991). Por otra parte, el cultivo de la “digital” *Digitalis lanata* (Plantaginaceae) en invernaderos con atmósfera enriquecida en CO<sub>2</sub>, demostró un aumento de 3,5 veces en la producción del cardenólido digoxina respecto de las plantas cultivadas bajo atmósfera normal (Stuhlfauth y Fock, 1990).

Al margen de los resultados publicados en la literatura, es práctica corriente en Fitoquímica no coleccionar material vegetal en lugares en donde haya signos visibles y evidentes de contaminación (bordes de carreteras, cercanía de fábricas, bordes de alambrados de cultivos que fueron tratados con pesticidas, etc.) para eliminar una variable adicional cuya incidencia es confusa.

### 1.1.9 Daño mecánico biótico y abiótico

Las plantas en general reaccionan bioquímicamente al daño mecánico causado por los herbívoros o microorganismos patógenos de manera de defender sus partes constitutivas (capítulo 1) (Gobbo-Neto y Lopes, 2007). Por ejemplo, la herbivoría dispara rápidamente la síntesis de péptidos inhibidores de las proteinasas que los insectos



emplean para digerir la biomasa vegetal, disminuyendo de ésta forma la palatabilidad de los tejidos (Hilder *et al.*, 1987). Otra forma de defensa ante el ataque de estos organismos detrimentales es la acumulación de metabolitos secundarios tóxicos, la que puede ser constitutiva o inducida por el ataque (mediante los elicitores jasmonatos y/o ácido salicílico), en un tipo de respuesta altamente específica ejercida a nivel local o sistémico (Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Howe y Jander, 2008).

Asimismo, el daño mecánico abiótico también desencadena respuestas concertadas ante la posibilidad de invasión a las estructuras afectadas por parte de microorganismos patógenos (Vázquez-Flota *et al.*, 2004; Gobbo-Neto y Lopes, 2007). Los factores que ocasionan éste tipo de daño en la naturaleza son por ejemplo lluvias, granizo, viento, fricción por arena, etc. (Jaffe *et al.*, 1984; Gobbo-Neto y Lopes, 2007).

## 1.2 Antecedentes en *Baccharis* spp. L.

En la literatura hay profusa información sobre la incidencia de los factores ambientales anteriormente mencionados sobre el metabolismo secundario de *Baccharis* spp. para varios tipos de metabolitos secundarios.

Por ejemplo, en relación a los flavonoides, para la especie *B. trimera* se ha constatado una mayor concentración de los mismos durante los meses estivales (diciembre-abril, en la época lluviosa y de crecimiento vegetativo intenso en la región sudeste de Brasil), siendo la misma independiente del contenido nutricional del suelo (Borella *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006).

En particular, existen diversos estudios sobre la variación estacional de la composición volátil (en general, aceites esenciales) de *Baccharis* spp., siendo algunos ejemplos: *B. trimera* (Silva *et al.*, 2008; Alves, 2010), *B. microdonta*, *B. elaeagnoides* (Sayuri *et al.*, 2010), *B. dentata*, *B. anomala* (Xavier *et al.*, 2011), *B. uncinella* (Frizzo *et al.*, 2008; Xavier *et al.*, 2011), *B. reticularia* (Dias de Santana, 2013), *B. articulata* (Alves, 2010) y *B. dracunculifolia* (Frizzo *et al.*, 2008; de Sousa *et al.*, 2009).

Específicamente, para *B. dracunculifolia* existen muchos estudios de composición volátil en la literatura (capítulo 4), los que reportan la extracción del volatilo mediante técnicas de: destilación por arrastre con vapor e hidrodestilación (Queiroga *et*



*al.*, 1990; Ferracini *et al.*, 1995; Loayza *et al.*, 1995; Weyerstahl *et al.*, 1996; Klopell *et al.*, 2007; Frizzo *et al.*, 2008; Lago *et al.*, 2008; Queiroga *et al.*, 2008; de Sousa *et al.*, 2009; Massignani *et al.*, 2009; Schossler *et al.*, 2009; Parreira *et al.*, 2010; Ibáñez y Zoppolo, 2011; Besten *et al.*, 2012; Florão *et al.*, 2012; Lage *et al.*, 2015; Chaaban *et al.*, 2017; Salazar *et al.*, 2018; Alves *et al.*, 2018; Cazella *et al.*, 2019), SPME (Schossler *et al.*, 2009), SDE (Boix *et al.*, 2010) y SFE (Cassel *et al.*, 2000; Martínez-Correa *et al.*, 2012). En éstos, las diferencias de composición encontradas provienen no solamente de las diferentes técnicas extractivas aplicadas, sino también de los factores ambientales mencionados que inciden sobre el metabolismo secundario, y de la ocurrencia de genotipos y/o quimiotipos diferentes para la especie (Frizzo *et al.*, 2008).

Es pertinente recordar (capítulos 1 y 4) que el aceite esencial de *B. dracunculifolia* es producido industrialmente, y a pesar de que la especie es de amplia distribución en el continente sudamericano (Argentina, Brasil, Bolivia, Paraguay y Uruguay), sólo Brasil posee una producción relevante de éste recursos aromático no tradicional (Queiroga *et al.*, 1990; Ferracini *et al.*, 1995, Frizzo *et al.*, 2008).

Para la especie *B. microdonta* existen trabajos publicados sobre la extracción y análisis de la composición del aceite esencial (Lago *et al.*, 2008; Sayuri *et al.*, 2010; Budel *et al.*, 2018). Sin embargo, los autores de dichos trabajos han encontrado una amplia variación en el perfil volátil de especímenes colectados en el mismo lugar en diferentes épocas del año, lo que indica una fuerte influencia de los factores ambientales sobre la composición volátil (Lago *et al.*, 2008; Sayuri *et al.*, 2010).

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Colecta del material vegetal

Partes aéreas de especímenes silvestres de *Baccharis dracunculifolia* DC. y *Baccharis microdonta* DC. fueron colectadas mensualmente a lo largo de un año (diciembre de 2012 a diciembre de 2013; ver Tabla 1 y Figura 2) en la Estación Experimental “Las Brujas” del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA; Departamento de Canelones, Uruguay; S34°40', W56°20'; 43 m.s.n.m.) donde se encuentran poblaciones homogéneas y estables de éstas especies. Al menos cinco individuos de cada una de





éstas fueron colectados en cada oportunidad, de manera de obtener una muestra compuesta y representativa de las poblaciones estudiadas.

# Colecta	Fecha	m. Bd (g)	est. des.	m. Bm (g)	est. des.
1	21/12/12	120,17	vegetativo	120,37	vegetativo con botones florales
2	29/01/13	120,01	vegetativo	120,08	Floración
3	28/02/13	120,02	vegetativo	120,39	Floración
4	02/04/13	120,01	vegetativo	120,02	Floración
5	07/05/13	120,02	vegetativo	120,00	fructificación
6	06/06/13	120,01	vegetativo con botones florales	120,00	vegetativo
7	05/07/13	120,42	vegetativo con botones florales	108,77	vegetativo
8	16/08/13	120,47	floración	120,06	vegetativo
9F	29/09/13	120,89	floración	100,82	vegetativo
9M	29/09/13	87,25	floración		
10	18/10/13	120,25	fructificación	105,89	vegetativo
11	29/11/13	120,01	vegetativo	110,50	vegetativo
12	30/12/13	120,04	vegetativo	118,79	vegetativo con botones florales

**Tabla 1:** Datos de colectas de material vegetal de las especies *B. dracunculifolia* (Bd) y *B. microdonta* (Bm) en la estación experimental “Las Brujas” de INIA, mostrando la cantidad de biomasa colectada (m.) y su estado de desarrollo fenológico correspondiente (est. des.).

La cantidad de material vegetal colectado dependió de la disponibilidad del mismo en el sitio de colecta, pero siempre fue del orden de 120 g (Tabla 1). Las colectas fueron realizadas a la misma hora (8:00-8:30 AM) para disminuir la influencia del ritmo circadiano sobre la composición química. La colecta 3 (28/02/2013) correspondió al período de máxima floración observado para *B. microdonta*, mientras que la colecta 9 (29/09/2013) fue lo propio para *B. dracunculifolia* (Tabla 1). En éste último caso, debido a la disponibilidad de material vegetal, las ramas masculinas y femeninas fueron



cuidadosamente separadas para poder tener evaluaciones diferenciales del metabolismo volátil (colectas llamadas 9F y 9M, respectivamente).

Los especímenes colectados fueron identificados por el Ing. Agr. H.A. González (Departamento de Botánica, Museo Nacional de Historia Natural; Montevideo), y muestras de herbario fueron depositadas en el Herbario “Arechavaleta” de Facultad de Química. Posterior a las colectas, el material vegetal fue secado (sin trozar) en condiciones controladas por un período de 15-20 días hasta la extracción de sus componentes volátiles. No se realizó análisis químico de la colecta 11 debido a que el secado de la misma no fue satisfactorio (presencia de hongos por excesiva humedad).

## **2.2 Datos pedoclimáticos**

Los parámetros agroclimáticos monitoreados en éste estudio a lo largo del año de colecta fueron: temperaturas (mínima, máxima y de colecta), unidades de frío (unidades de Richardson), precipitación, evaporación, humedad (media y de colecta), radiación, heliofanía y velocidad de vientos. Los datos fueron obtenidos diariamente y provistos por la Estación Agroclimática de INIA “Las Brujas” (GRAS-INIA, <http://www.inia.uy/gras>).

La acidez (pH) y la conductividad eléctrica fueron los dos parámetros físicoquímicos determinados del suelo en que se desarrollaron las poblaciones vegetales bajo estudio. Dichas determinaciones fueron realizadas por métodos potenciométricos validados en el Laboratorio de Análisis Físicos de Suelos de INIA (<http://www.inia.uy/productos-y-servicios/laboratorios/Laboratorio-de-Suelos-Plantas-y-Agua>).

## **2.3 Preparación de las muestras**

En todos los casos, para obtener los componentes volátiles de *B. dracunculifolia* y *B. microdonta*, se empleó el procedimiento de extracción-destilación simultáneas (SDE) que fuera descrito anteriormente en el capítulo 3. Se empleó una porción de aproximadamente 120 g de material vegetal finamente trozado (Tabla 1), y se extrajo por 90 minutos empleando *n*-hexano (*Pharmco Aaper, Brookfield, CT, EEUU*) como solvente de extracción. Las demás condiciones experimentales fueron las mismas



reportadas en el capítulo 3. Los extractos se concentraron por evaporación a vacío (40°C) hasta un volumen aproximado de 2,0 mL, tras lo cual se almacenaron en viales color ámbar bajo refrigeración (-4°C) hasta la siguiente etapa.

En el mismo día del análisis químico por *GC-FID* y *GC-MS*, a todos los extractos se les adicionaron 200 µL de una solución de geraniol (10,30 mg/mL en *n*-hexano) y de (*E*)-citronelol (10,12 mg/mL en *n*-hexano), ambos estándares de Sigma-Aldrich (*St. Louis, MI, EEUU*). A continuación, el contenido de los viales fue transvasado cuantitativamente a un matraz aforado de 5,00 mL, y enrasado con diclorometano (99,5% de pureza; *JT Baker, Phillisburg, NJ, EEUU*). La elección de ambos estándares internos fue basada en la similitud química de los mismos con los compuestos volátiles del material vegetal, y teniendo en cuenta su ausencia en el perfil volátil de ambas especies (confirmado por análisis mediante *GC-MS*).

#### **2.4 Análisis por *GC-MS*, *GC-FID* y *eGC-MS***

Los análisis mediante *GC-MS* fueron realizados en un cromatógrafo *Shimadzu GC2010* acoplado a un espectrómetro de masa *Shimadzu QP2010* (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón*) equipado con una columna capilar de fase poco polar *HP-5MS* (capítulo 3) y las siguientes condiciones de temperatura: 40°C (4 min), 40-180°C a 4°C/min, 180°C (2 min), 180-280°C a 10°C/min, 280°C (10 min). Las temperaturas del inyector, interfase y fuente de ionización se mantuvieron constantes a 280°C. Se empleó He como fase móvil (1,0 mL/min). Modo de inyección, *Split*; relación 1:25. Volumen de inyección, 0,2 µL. Rango de adquisición de masas: 35-400 u.m.a.; energía de ionización electrónica: 70eV. Para la identificación química de los componentes se aplicó el mismo procedimiento descrito anteriormente en el capítulo 3.

La cuantificación de los analitos se realizó por duplicado en un *GC-FID Shimadzu 14B* (*Shimadzu Corporation*) de acuerdo a las condiciones experimentales detalladas en el capítulo 5 para *B. tridentata*. El programa de temperaturas empleado fue igual al descrito previamente para *GC-MS*. Volumen de inyección, 1,0 µL. Los valores de áreas fueron medidos por medio del *software GCSolution* (*Shimadzu Corporation*) y normalizados al área de los estándares internos (geraniol y (*E*)-citronelol).



Los análisis por *eGC-MS* de los principales monoterpenos quirales de los extractos ( $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno, limoneno, linalol, terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol) fueron realizados por triplicado en las mismas condiciones experimentales descritas en el capítulo 5 para *B. tridentata*. La integración de las áreas de pico cromatográfico de cada enantiómero se realizó en la modalidad *RIC* (cromatograma de recuperación de iones) para eliminar las interferencias producidas por los otros componentes del extracto volátil. De ésta manera, los fragmentos seleccionados para la integración fueron los siguientes:  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, y limoneno ( $m/z$  93), linalol y terpinen-4-ol ( $m/z$  71), y  $\alpha$ -terpineol ( $m/z$  59).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

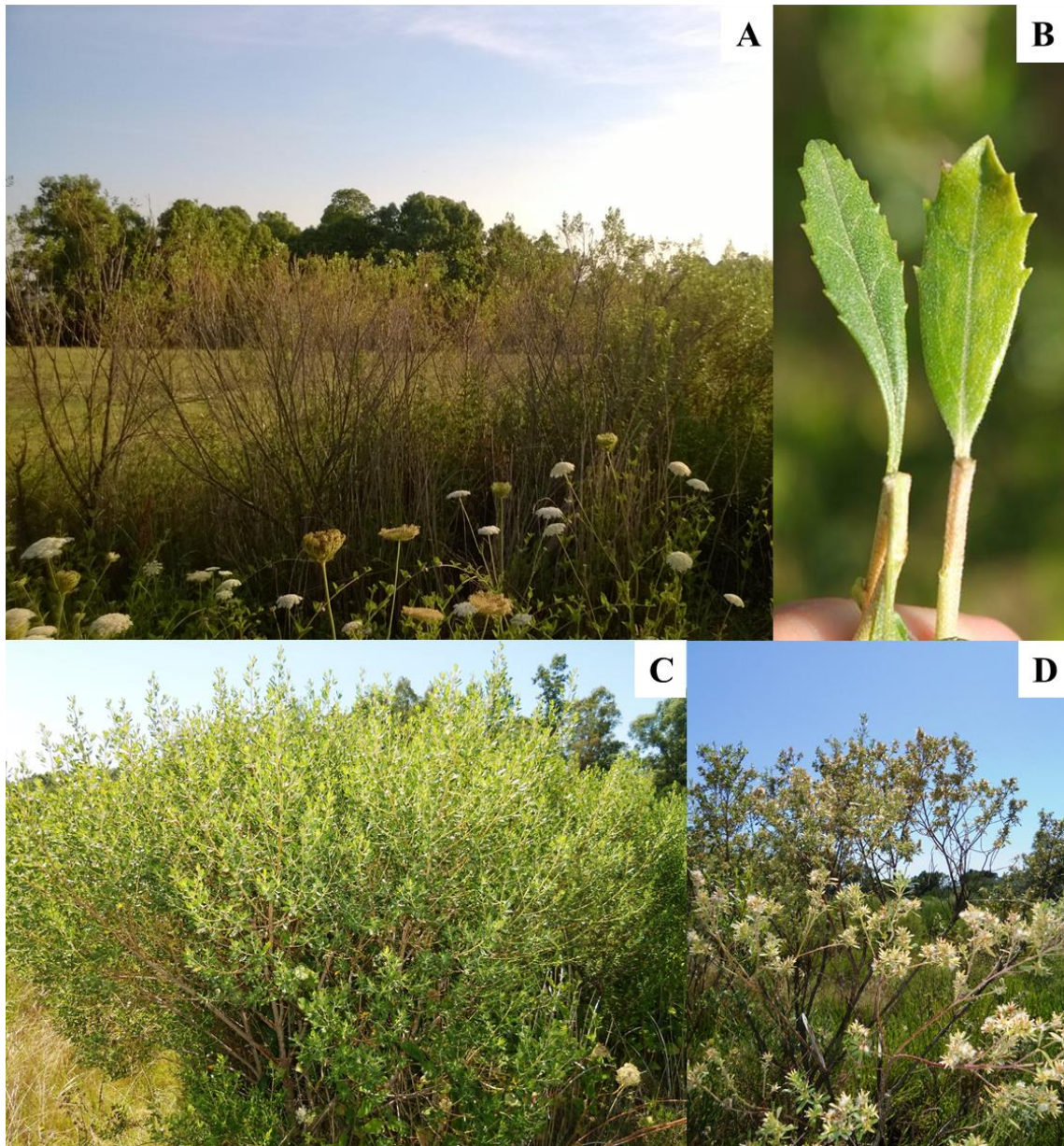
#### 3.1 Apariencia general de las especies en el sitio de colecta

*B. dracunculifolia* DC. y *B. microdonta* DC. (Figura 2) son dos especies arbustivas perennes, conocidas tradicionalmente en Uruguay como “chilca blanca” y ampliamente dispersas en campos naturales y ambientes serranos de todo el país (capítulo 4) (Gautreau y Lezama, 2009; Ibáñez y Zoppolo, 2011).

En el sitio de colecta tuvieron la apariencia mostrada en la Figura 2, con *B. microdonta* exhibiendo un ciclo reproductivo estival (diciembre-mayo) y *B. dracunculifolia* un ciclo primaveral (julio-octubre) (Tabla 1). En los ambientes naturales ambas especies coexisten y son en apariencia visual muy semejante, lo que hace que sean confundidas por no especialistas (Figura 2; H.A. González); sin embargo actualmente son clasificadas en secciones infragenéricas diferentes (capítulo 4) (Giuliano, 2001; Gautreau y Lezama, 2009). Si bien se constató a campo una arquitectura de plantas similar para ambas especies, las hojas demostraron ser suficientemente diferenciables para realizar colectas por separado: *B. microdonta* presentó un mayor nivel de dentición en el margen, mientras que *B. dracunculifolia* sólo presentó dentición en la porción superior (o incluso ausencia de dentición en hojas jóvenes) (Figura 2B). Otro aspecto diferencial constatado en el sitio de colecta fue que los especímenes de *B. dracunculifolia* presentaron mayor frondosidad que los correspondientes a *B. microdonta* (Figuras 2C y 2D).



Las plantas bajo estudio crecieron de manera dominante en un ambiente natural inalterado a lo largo del período de estudio, caracterizado por la presencia de otras especies arbustivas de *Baccharis* L. (*B. trimera* y *B. articulata*), “salvia trepadora” (*Lippia alba*, Verbenaceae), “viznaga” (*Ammi visnaga*, Apiaceae), “chilca negra” (*Acanthostyles buniifolius*, Asteraceae), entre otras (Figura 2A).



**Figura 2:** Material vegetal colectado de *B. dracunculifolia* y *B. microdonta*. Referencias: (A): ambiente de colecta en donde las dos especies arbustivas co-existían; (B): diferencia en la morfología foliar, a la izquierda *B. microdonta* y a la derecha *B. dracunculifolia*; (C): ejemplar de *B. dracunculifolia* en estado vegetativo; (D): ejemplar de *B. microdonta* en floración.



### 3.2 Monitoreo de variables pedoclimáticas a lo largo del período de estudio

En la Tabla 2 y en la Figura 3 se presenta el registro de variables agrometeorológicas obtenidas a lo largo del período de estudio (diciembre 2012 a diciembre 2013) en la Estación Experimental “Las Brujas” de INIA.

Uruguay se encuentra en una región de clima templado (entre 30° y 35° de latitud sur) y posee un relieve caracterizado por la baja altitud sobre el nivel del mar, lo que determina que las condiciones meteorológicas sean relativamente uniformes y no haya grandes variaciones espaciales (MVOTMA, 2014; Tiscornia *et al.*, 2016). En el período de estudio, se registraron las mayores temperaturas (medidas a las 8:00-8:30 AM) en las colectas estivales de diciembre de 2013 (27,4°C) y enero (22,8°C) y las menores en las colectas invernales de agosto (3,1°C) y junio (9,9°C); tendencia que fue acompañada por las temperaturas mínimas y máximas diarias, y por los valores de evaporación máxima en verano y mínima en invierno (Tabla 2 y Figura 3). Consecuentemente, en las colectas de agosto y junio se obtuvieron la mayor cantidad de unidades de frío de Richardson, y en diciembre-enero las mínimas (Tabla 2 y Figura 3).

Por otra parte, se verificó una importante precipitación en la colecta correspondiente al mes otoñal de abril (113 mm) y lluvias casi inexistente en las otras colectas mensuales, con un registro secundario en la colecta de setiembre (8,5 mm) (Tabla 2).

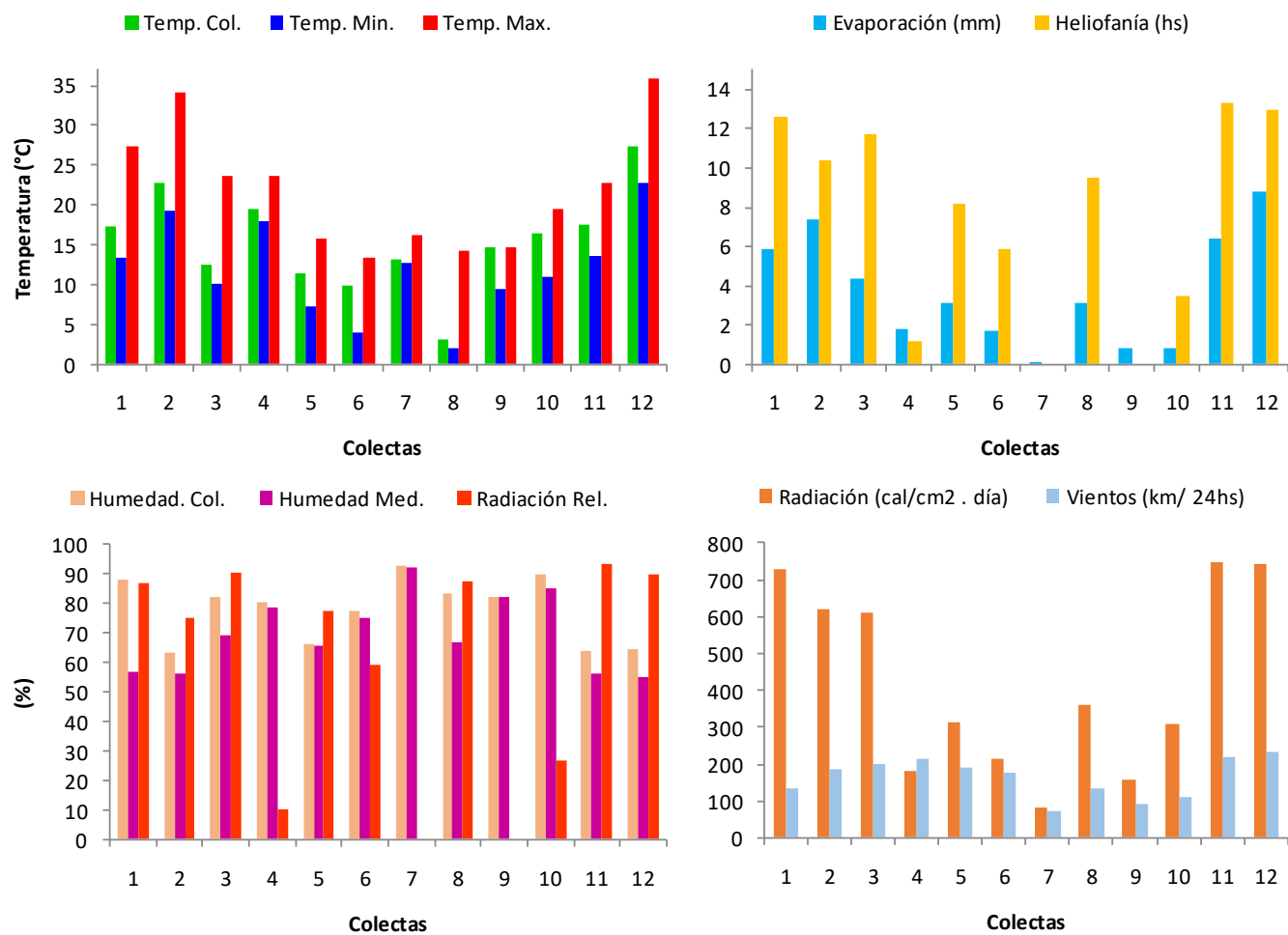
Las demás variables agrometeorológicas presentaron los valores detallados en la Tabla 2 y Figura 3.



**Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad**

# Colecta	Fecha	Temp. Col. (°C)*	Temp. Min. (°C)	Temp. Max. (°C)	Unid. frío (Rich.)	Precipitación (mm)	Evaporación (mm)	Humedad Col. (%)*	Humedad Media (%)	Radiación relativa (%)	Heliofanía (hs)	Radiación (cal/cm <sup>2</sup> .día)	Vientos (km/24hs)
1	21/12/12	17,3	13,3	27,4	-15,5	0	5,9	87,9	57,0	87,0	12,6	730,8	134,2
2	29/01/13	22,8	19,2	34,2	-24,0	0	7,4	63,3	56,0	75,0	10,4	618,2	187,4
3	28/02/13	12,6	10,2	23,6	-9,5	0	4,4	82,5	69,0	90,8	11,7	610,7	199,8
4	02/04/13	19,5	18,0	23,7	-24,0	113,0	1,8	80,7	79,0	10,3	1,2	179,2	215,7
5	07/05/13	11,5	7,4	15,7	9,5	0	3,1	66,6	66,0	77,6	8,2	311,3	193,0
6	06/06/13	9,9	4,1	13,4	14,5	0	1,7	77,6	75,0	59,4	5,9	213,5	177,4
7	05/07/13	13,1	12,7	16,3	-1	0,3	0,1	92,6	92,0	0	0	81,2	71,6
8	16/08/13	3,1	2,1	14,2	16,5	0	3,1	83,3	67,0	87,7	9,5	360,1	134,0
9	29/09/13	14,8	9,5	14,8	-2,5	8,5	0,8	82,0	82,0	0	0	159,0	91,6
10	18/10/13	16,5	10,9	19,5	-9,5	0	0,8	90,2	85,0	26,8	3,5	309,5	111,2
11	29/11/13	17,6	13,6	22,7	-16,0	0	6,4	63,8	56,0	93,2	13,3	746,7	216,9
12	30/12/13	27,4	22,7	35,8	-24,0	2,3	8,8	64,3	55,0	90,0	13,0	743,5	231,8

**Tabla 2:** Registro de variables agrometeorológicas (temperaturas, unidades de frío de Richardson, precipitación, evaporación, humedad, radiación, heliofanía y vientos) para cada uno de los días en que fueron realizadas las colectas a lo largo de un año de muestreo (diciembre 2012 a diciembre 2013) en la Estación Experimental INIA Las Brujas (Canelones, Uruguay). Datos de acuerdo a la Unidad Agroclimática de INIA (GRAS). (\*) Temperatura y humedad a la hora de colecta (8:00-8:30 AM).



**Figura 3:** valores de las variables agrometeorológicas a lo largo del período de estudio (diciembre 2012-diciembre 2013) en el sitio de colecta (INIA-Las Brujas).  
Fuente: GRAS-INIA ([www.inia.uy/gras](http://www.inia.uy/gras)).





Respecto de las características químicas del suelo en que las plantas bajo estudio se desarrollaron, aquí se presentan datos del estudio previo realizado por Ibáñez y Zoppolo (2011) en el mismo sitio de colecta, de manera de caracterizar el ambiente (Tabla 3). El tipo de suelo predominante en el sitio de colecta es clasificado como *Phaeozem* lúvico, y el mismo se caracteriza por una marcada acumulación de materia orgánica y saturación de bases en su parte superior (MVOTMA, 2014). Dado que el lugar de colecta se ha mantenido en las mismas condiciones de crecimiento natural de *B. dracunculifolia* desde el estudio de Ibáñez y Zoppolo (2011), se presentan en ésta tesis dichos datos como referencia; por detalles de las determinaciones analíticas en éste estudio, referirse al reporte original.

Parámetro	Suelo 0-5 cm	Suelo 5-25 cm
Carbono orgánico (%)	3,20 ± 0,36	2,66 ± 0,09
Nitrógeno total (%)	0,32 ± 0,02	0,25 ± 0,02
Nitrógeno como NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (µg N/g)	2,10 ± 0,45	1,77 ± 0,06
Nitrógeno como NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (µg N/g)	5,53 ± 1,17	7,67 ± 1,17
Fósforo (Bray I) (µg P/g)	13,24 ± 8,43	3,33 ± 1,28
Calcio (meq/100 g)	23,83 ± 3,33	28,30 ± 5,71
Magnesio (meq/100 g)	2,73 ± 0,61	2,42 ± 0,54
Potasio (meq/100 g)	1,39 ± 0,37	0,71 ± 0,14
Sodio (meq/100 g)	0,290 ± 0,038	0,280 ± 0,042

**Tabla 3:** Datos del análisis químico del suelo de INIA “Las Brujas” sobre el que se desarrollaron las plantas de *B. dracunculifolia* y *B. microdonta*; extraído del trabajo de Ibáñez y Zoppolo (2011).

En cuanto al análisis físico del suelo (5-25 cm), el mismo suministró un valor de pH de 7,08 (a 15,7°C) y una conductividad de 0,19 mS/cm, valores semejantes a lo determinado previamente en el mismo sitio de colecta (Ibáñez y Zoppolo, 2011).

### 3.3 Variación de la composición volátil de *B. dracunculifolia*

En las Tablas 4 y las Figuras 4 y 5 se presenta la variación de la composición volátil (identificación por *GC-MS* y cuantificación por *GC-FID*) para *B. dracunculifolia* a lo largo del período de estudio de un año en la estación INIA-Las Brujas.



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

Compuesto	LRI <sup>a</sup>	LRI <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9F	9M	10	12
1-metilciclopentanol	798	793	0,07												
hexanal	801	801	0,05												
2,2-dimetil-tetrahidrofurano	908	911	0,05												
<b>α-tuyeno</b> <sup>1-5,7,10,15-16</sup>	924	923	0,07												
<b>α-pineno</b> <sup>1,3-5,7-12,15-19</sup>	932	928	4,4	227 ± 24	142 ± 15	56 ± 6	197 ± 21	326 ± 34	432 ± 45	257 ± 27	247 ± 26	204 ± 21	233 ± 24	261 ± 27	252 ± 26
<b>canfeno</b> <sup>5,10,11,16</sup>	946	941	0,06												
<b>tuya-2,4(10)-dieno</b> <sup>11</sup>	957	948	0,02												
<b>β-pineno</b> <sup>2-13,15-19</sup>	974	971	11,8	612 ± 64	521 ± 55	244 ± 26	546 ± 57	788 ± 83	1062 ± 111	859 ± 90	795 ± 83	888 ± 93	797 ± 84	823 ± 86	712 ± 75
6-metil-5-hepten-2-ona	986	987	0,03												
<b>mirreno</b> <sup>3-5,7-8,10-12,15,18</sup>	988	991	1,8	93 ± 10	78 ± 8	39 ± 4	68 ± 7	128 ± 13	182 ± 19	73 ± 8	63 ± 7	43 ± 5	36 ± 4	48 ± 5	50 ± 5
<b>δ-3-careno</b> <sup>4,5,16</sup>	1008	1006	0,07												
4-careno	1018	1013	0,08												
<i>o</i> -cimeno	1022	1019	0,04												
<b><i>p</i>-cimeno</b> <sup>1,3,4,5,7,11,15</sup>	1020	1021	0,3												
<b>limoneno</b> <sup>1-5,7-13,15-19</sup>	1024	1025	8,2	422 ± 44	467 ± 49	304 ± 32	345 ± 36	538 ± 56	722 ± 76	379 ± 40	281 ± 29	273 ± 29	258 ± 27	274 ± 29	330 ± 35
<b>1,8-cineol</b> <sup>5,10,11</sup>	1026	1026	0,03												
<b>(Z)-β-ocimeno</b> <sup>10</sup>	1032	1038	0,03												
<b>(E)-β-ocimeno</b> <sup>3,5,7,15,16</sup>	1044	1047	0,1												
<b>γ-terpineno</b> <sup>3-5,10-11,15-16</sup>	1054	1055	0,4												
<b>(Z)-hidrato de sabineno</b> <sup>5</sup>	1065	1063	0,03												
<b>terpinoleno</b> <sup>2-5,10-11,15-16</sup>	1086	1084	0,2												
( <i>E</i> )-hidrato de sabineno	1098	1093	0,02												
<b>linalol</b> <sup>3-5,8,10-11,15-16,18</sup>	1095	1099	0,4	23 ± 2	16 ± 2	17 ± 2	19 ± 2	22 ± 2	24 ± 2	14 ± 1	12 ± 1	5.3 ± 0.6	5.9 ± 0.6	10 ± 1	19 ± 2
<i>endo</i> -fenchol	1118	1108	0,06												
( <i>E</i> )- <i>p</i> -ment-2,8-dien-1-ol	1119	1116	0,1												
α-canfolenal	1122	1121	0,03												
norinona	1142	1131	0,08												
<b>(E)-pinocarveol</b> <sup>16</sup>	1135	1132	0,8	41 ± 4	25 ± 3	13 ± 1	29 ± 3	23 ± 2	19 ± 2	17 ± 2	25 ± 3	35 ± 4	57 ± 6	49 ± 5	36 ± 4



Tabla 4, continuación

(E)-p-ment-2-en-1-ol	1136	1135	0,04												
(Z)-verbenol	1137	1136	0,04												
(E)-verbenol	1140	1140	0,2												
citronelal <sup>1,16</sup>	1148	1152	0,07												
pinocarvona <sup>16</sup>	1160	1156	0,4												
endo-borneol <sup>11,16</sup>	1165	1159	0,06												
p-ment-1,5-dien-8-ol	1166	1163	0,05												
terpinen-4-ol <sup>1,3-5,8,10-13,15-16</sup>	1174	1172	0,7	37 ± 4	29 ± 3	25 ± 3	35 ± 4	33 ± 3	37 ± 4	22 ± 2	16 ± 2	11 ± 1	13 ± 1	16 ± 2	21 ± 2
p-cimen-8-ol <sup>4</sup>	1179	1182	0,05												
α-terpineol <sup>2-6,8,10-12,15,18-19</sup>	1186	1186	1,0	52 ± 5	44 ± 5	38 ± 4	60 ± 6	42 ± 4	48 ± 5	36 ± 4	29 ± 3	17 ± 2	22 ± 2	27 ± 3	39 ± 4
mirtenal <sup>4,16</sup>	1195	1189	0,5	24 ± 3	14 ± 2	7.2 ± 0.8	16 ± 2	14 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	16 ± 2	23 ± 2	39 ± 4	38 ± 4	26 ± 3
mirtenol <sup>4,19</sup>	1194	1191	0,5												
safranal <sup>1,4,16</sup>	1196	1194	0,03												
verbenona <sup>11</sup>	1204	1203	0,05												
(E)-carveol <sup>4</sup>	1215	1215	0,1												
(Z)-carveol <sup>4</sup>	1229	1227	0,06												
carvona <sup>4</sup>	1239	1239	0,1												
citronelato de metilo <sup>4,16</sup>	1257	1262	0,4												
geranial <sup>1,4,16</sup>	1264	1269	0,03												
nerolato de metilo	1280	1280	0,01												
safrol <sup>4</sup>	1285	1283	0,02												
ácido citronélico	1312	1322	0,06												
δ-elemeno <sup>4,5,10,19</sup>	1335	1332	0,1												
α-cubebeno <sup>1,3,5,13,15,16,18</sup>	1345	1345	0,05												
α-copaeno <sup>1-5,13,15-16,18-19</sup>	1374	1370	0,04												
β-bourboneno <sup>3,5,10,16,19</sup>	1387	1378	0,03												
β-cubebeno <sup>1</sup>	1387	1385	0,03												
β-elemeno <sup>2-6,10,13,15-16,18-19</sup>	1389	1387	0,2												
α-gurjuneno <sup>1-3,5,13,15-16,18-19</sup>	1409	1402	0,1												
metileugenol <sup>4,8,10,15-16</sup>	1403	1404	0,7	35 ± 4	13 ± 1	13 ± 1	8.3 ± 0.9	15 ± 2	15 ± 2	9 ± 1	6.2 ± 0.6	4.2 ± 0.4	6.9 ± 0.7	6.6 ± 0.7	12 ± 1
(E)-β-cariofileno <sup>1-11,13,15-19</sup>	1417	1411	2,3	117 ± 12	73 ± 8	47 ± 5	34 ± 4	95 ± 10	173 ± 18	90 ± 9	94 ± 10	72 ± 8	125 ± 13	122 ± 13	103 ± 11



Tabla 4, continuación

<b>γ-elemeno</b> <sup>4</sup>	1434	1430	0,09												
<b>aromadendreno</b> <sup>1-10,13,15-16,18</sup>	1439	1432	0,04												
α-himachaleno	1449	1440	0,03												
(E)-murolo-3,5-dieno	1451	1443	0,07												
<b>α-humuleno</b> <sup>1-5,7-11,13,15-19</sup>	1452	1445	0,4	22 ± 2	15 ± 2	10 ± 1	8.2 ± 0.9	19 ± 2	36 ± 4	18 ± 2	16 ± 2	10 ± 1	18 ± 2	21 ± 2	21 ± 2
<b>allo-aromadendreno</b> <sup>1-5,16,19</sup>	1458	1452	0,2												
<b>γ-gurjuneno</b> <sup>3,5</sup>	1475	1465	0,3												
(E)-cadina-1(6),4-dieno	1475	1468	0,2												
<b>γ-murolo</b> <sup>3-5,7,11,13,16,18-19</sup>	1478	1471	0,08												
<b>germacreno D</b> <sup>3-10,13,15-19</sup>	1484	1474	0,6	30 ± 3	20 ± 2	12 ± 1	7.0 ± 0.7	35 ± 4	101 ± 11	48 ± 5	38 ± 4	23 ± 2	28 ± 3	45 ± 5	21 ± 2
γ-himachaleno	1481	1476	0,2												
<b>ar-curcumeno</b> <sup>5</sup>	1479	1480	0,3												
(E)-murolo-4(14),5-dieno	1493	1484	0,06												
<b>ledeno</b> <sup>4,5,18</sup>	1496	1489	1,5	77 ± 8	72 ± 8	46 ± 5	27 ± 3	91 ± 10	235 ± 25	147 ± 15	119 ± 13	68 ± 7	137 ± 14	133 ± 14	65 ± 7
β-himachaleno	1500	1493	0,03												
<b>α-murolo</b> <sup>1-5,10,15-16,18-19</sup>	1500	1495	0,1												
<b>γ-cadineno</b> <sup>1,3-5,10,13,18-19</sup>	1513	1507	0,2												
<b>δ-cadineno</b> <sup>1-5,7-11,13,15,17-19</sup>	1522	1519	0,8												
(E)-cadina-1,4-dieno <sup>6</sup>	1533	1526	0,1												
<b>α-cadineno</b> <sup>5,7</sup>	1537	1531	0,07												
<b>α-calacoreno</b> <sup>4</sup>	1544	1536	0,4												
<b>elemol</b> <sup>3,5</sup>	1548	1544	1,3	66 ± 7	56 ± 6	33 ± 3	36 ± 4	69 ± 7	123 ± 13	41 ± 4	82 ± 9	32 ± 3	84 ± 9	51 ± 5	47 ± 5
β-calacoreno	1564	1556	0,06												
<b>palustrol</b> <sup>1,4,14</sup>	1567	1559	0,5												
(E)-β-cariofilenol	1568	1562	0,1												
<b>espatulenol</b> <sup>1-5,7-10,12,16-19</sup>	1577	1572	13,8	709 ± 74	682 ± 72	526 ± 55	564 ± 59	744 ± 78	739 ± 77	442 ± 46	537 ± 56	310 ± 32	500 ± 52	431 ± 45	668 ± 70
<b>óxido de cariofileno</b> <sup>3,4,7,11,13,17</sup>	1582	1575	7,1	365 ± 38	280 ± 29	197 ± 21	218 ± 23	307 ± 32	269 ± 28	178 ± 19	208 ± 22	162 ± 17	422 ± 44	267 ± 28	303 ± 32
<b>viridiflorol</b> <sup>1-2,4-5,7,9-10,12-13,18-19</sup>	1592	1584	11,2	580 ± 61	581 ± 61	420 ± 44	430 ± 45	599 ± 63	744 ± 78	522 ± 55	624 ± 65	363 ± 38	617 ± 65	473 ± 50	477 ± 50
<b>ledol</b> <sup>4,5</sup>	1602	1595	1,5	75 ± 8	71 ± 7	55 ± 6	57 ± 6	83 ± 9	105 ± 11	59 ± 6	66 ± 7	38 ± 4	69 ± 7	54 ± 6	61 ± 6
<b>epóxido de humuleno II</b> <sup>4,14</sup>	1608	1600	0,6												
<b>1-epi-cubanol</b> <sup>3,5</sup>	1627	1621	0,7												



Tabla 4, continuación

$\gamma$ -eudesmol <sup>5</sup>	1630	1624	0,6											
cariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol	1633	1628	0,2											
iso-espatulenol	1636	1631	0,6											
$\zeta$ -cadinol <sup>3-5,7-8,16</sup>	1640	1635	0,7											
$\delta$ -cadinol	1645	1641	0,8											
$\alpha$ -cadinol <sup>1-5,13,17-18</sup>	1652	1648	0,5											
cadaleno	1675	1667	0,2											
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\beta$ -ol <sup>4,17</sup>	1685	1678	0,7											
eudesma-4,11-dien-2-ol	1714	1716	0,06											
iso-biclogermacrenal <sup>17</sup>	1733	1730	0,3											
esquamulosa	1770	1767	0,2											

**Tabla 4:** Composición química de los extractos volátiles de partes aéreas de *B. dracunculifolia* a lo largo de un año de muestreo (diciembre 2012 a diciembre 2013) en la Estación Experimental INIA Las Brujas (Canelones, Uruguay).

Referencias: (a) índice de retención lineal obtenido de la literatura; (b) índice de retención lineal obtenido en éste trabajo; (c) el porcentaje de composición obtenido en GC-MS (Modo *Full-Scan*) se reporta sólo para la colecta número 1 para propósitos comparativos; (d) cuantificación por estándar interno de los principales componentes volátiles ( $\mu\text{g}$  compuesto/g material vegetal desecado). Se denotan con la siguiente notación los componentes volátiles identificados previamente por: (1) **Queiroga et al., 1990**; (2): **Ferracini et al., 1995**; (3): **Loayza et al., 1995**; (4): **Weyerstahl et al., 1996**; (5): **Frizzo et al., 2008**; (6): **Lago et al., 2008**; (7): **Fabiane et al., 2008**; (8): **Queiroga et al., 2008**; (9): **de Sousa et al., 2009**, misma composición reportada en **Massignani et al., 2009** y en **Parreira et al., 2010**; (10): **Schossler et al., 2009**; (11): **Boix et al., 2010**; (12): **Ibáñez y Zoppolo, 2011**; (13): **Besten et al., 2012**; (14): **Florão et al., 2012**; (15): **Lage et al., 2015**; (16): **Chaaban et al., 2017**; (17): **Salazar et al., 2018**; (18): **Alves et al., 2018**; (19): **Cazella et al., 2019**.



Para el caso de *B. dracunculifolia* fueron identificados en éste conjunto de experimentos 101 componentes volátiles, de los cuales 31 no han sido informados previamente en la literatura para ésta especie (Tabla 4). Los componentes principales identificados fueron: espatulenol (13,8% para el caso de la Colecta No. 1 a la que se referirán los siguientes porcentajes),  $\beta$ -pineno (11,8%), viridiflorol (11,2%), limoneno (8,2%), óxido de cariofileno (7,1%),  $\alpha$ -pineno (4,4%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (2,3%), ledeno (1,5%), ledol (1,5%) y palustrol (0,5%) (Tabla 3).

En la comparación de los resultados del volatiloма de éste capítulo con los presentados previamente en el capítulo 4, se perciben notorias diferencias de composición. En tal sentido, el aceite esencial de ambos sexos en floración de *B. dracunculifolia* proveniente del norte del país (Departamento de Paysandú) presentó una composición rica en (*E*)-nerolidol (16,7 y 17,3% en los individuos masculinos y femeninos, respectivamente),  $\beta$ -pineno (10,5% y 10,9%), limoneno (9,1% y 8,9%) y espatulenol (5,5% y 5,2%) (capítulo 4). Sin embargo, en las colectas realizadas en el marco de éste capítulo no se determinó presencia de (*E*)-nerolidol en el perfil volátil de *B. dracunculifolia*.

Lo anterior concuerda con estudios previos de la especie realizados por Frizzo *et al.* (2008) e Ibáñez y Zoppolo (2011) en el mismo lugar de colecta que el presente estudio. De hecho, la composición reportada por éstos autores es muy semejante a la presentada en la Tabla 4 (Frizzo *et al.*, 2008; Ibáñez y Zoppolo, 2011), lo que indicaría una estabilidad en el perfil volátil de *B. dracunculifolia* en el sur de Uruguay, un requisito indispensable para la posible industrialización de éste recurso aromático.

Por otra parte, la composición encontrada en el norte de Uruguay (capítulo 4) se asemeja más a poblaciones de estados del sur-sudeste de Brasil y de la provincia argentina de Corrientes (capítulo 10), lo que demuestra una expresión metabólica diferencial (Frizzo *et al.*, 2008, de Sousa *et al.*, 2009). En ese sentido, Frizzo *et al.* (2008) demostraron por medio de análisis multivariado que existen dos quimiotipos diferentes para *B. dracunculifolia*: uno que se caracteriza por la alta presencia de derivados del esqueleto cadinano y otro que se asocia con la presencia de derivados del aromadendrano. Los especímenes del sur de Uruguay integran el segundo quimiotipo, y dentro de tal agrupamiento, las muestras de INIA Las Brujas fueron las más diferentes del resto, con ausencia de (*E*)-nerolidol y una alta concentración de viridiflorol (Frizzo *et al.*, 2008).

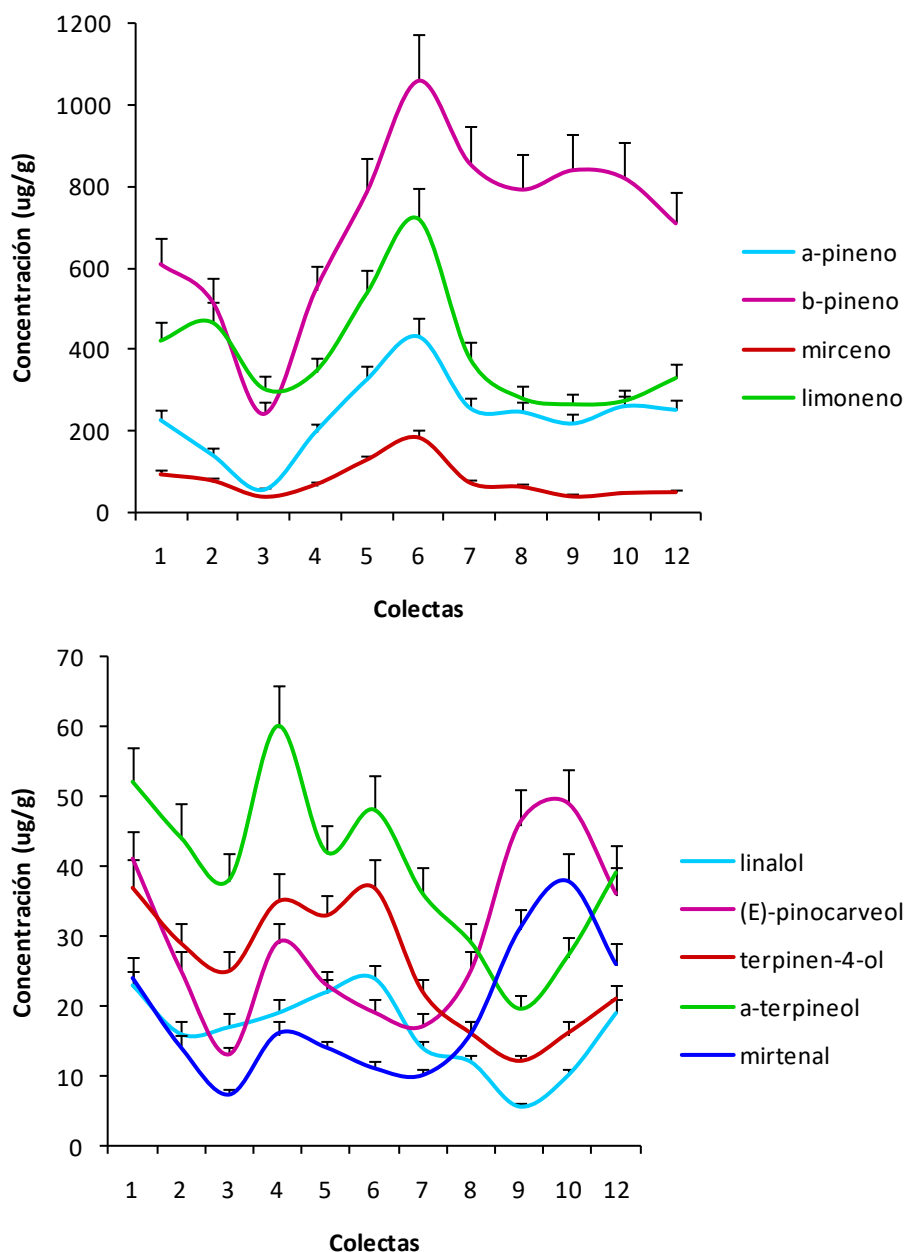


La ausencia de (*E*)-nerolidol en las poblaciones de ésta especie en el sur de Uruguay podría tener consecuencia directa sobre la calidad del recurso aromático, ya que el mismo imprime notas aromáticas herbales que son altamente apreciadas por la industria de la perfumería (**de Sousa *et al.*, 2009**).

En las Figuras 4 y 5 se presentan los gráficos de variación de concentración (expresada como  $\mu\text{g}$  de compuesto/ $\text{g}$  de material vegetal desecado) a lo largo del período de estudio.

Para el caso de los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos se evidenció un máximo claramente definido en la Colecta No. 6 (correspondiente a junio; estado vegetativo con botones florales) (Figuras 4 y 5). Los valores de concentración máximos alcanzados fueron los siguientes:  $\beta$ -pineno ( $1062 \mu\text{g/g}$ ), limoneno ( $722 \mu\text{g/g}$ ),  $\alpha$ -pineno ( $432 \mu\text{g/g}$ ), ledeno ( $235 \mu\text{g/g}$ ), mirceno ( $182 \mu\text{g/g}$ ), (*E*)- $\beta$ -cariofileno ( $173 \mu\text{g/g}$ ), germacreno D ( $101 \mu\text{g/g}$ ) y  $\alpha$ -humuleno ( $36 \mu\text{g/g}$ ) (Tabla 4 y Figuras 4 y 5). En contraposición, en la Colecta No. 6 no se registraron extremos en ninguna de las variables agroclimáticas (Tabla 2 y Figura 3), lo que indicaría que tales picos de producción podría deberse más a factores internos (ciclo de vida, estado de desarrollo y genotipo) que a factores ambientales externos.

Todos los hidrocarburos monoterpénicos presentaron un mínimo de concentración en la Colecta No. 3 (correspondiente a febrero; estado vegetativo) (Figura 4), mientras que los hidrocarburos sesquiterpénicos presentaron el mínimo en la Colecta No. 4 (correspondiente a abril; estado vegetativo) (Figura 5). En ésta última colecta se registró el máximo de precipitaciones ( $113 \text{ mm}$ , ver Tabla 2), por lo que se podría considerar que el mínimo en la concentración de los hidrocarburos sesquiterpenos se debería a la lixiviación (arrastre mecánico) de los componentes desde la superficie de las hojas (**Gobbo-Neto y Lopes, 2007; Ibáñez y Zoppolo, 2011**). Sin embargo, no sucede lo mismo con el resto de los componentes volátiles (Figuras 4 y 5), por lo cual dicha hipótesis debe descartarse en éste caso.



**Figura 4:** Variación en la concentración de los principales monoterpenos de *B. dracunculifolia* en el período de estudio de un año en INIA-Las Brujas. En la parte superior se representan los hidrocarburos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno y limoneno) y en la inferior los monoterpenos oxigenados [linalol, (E)-pinocarveol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol y mirtenal].

Por otra parte, el comportamiento para los componentes oxigenados no mostró un patrón igualmente definido como en el caso de los hidrocarburos. Así, parecen haber diferentes tipos de patrones de emisión entre los componentes volátiles analizados.

- **Grupo 1:** correspondiente al linalol, terpinen-4-ol y todos los sesquiterpenos oxigenados (elemol, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol y ledol). Se caracterizó por un máximo de concentración en las Colectas No. 1 y No. 12

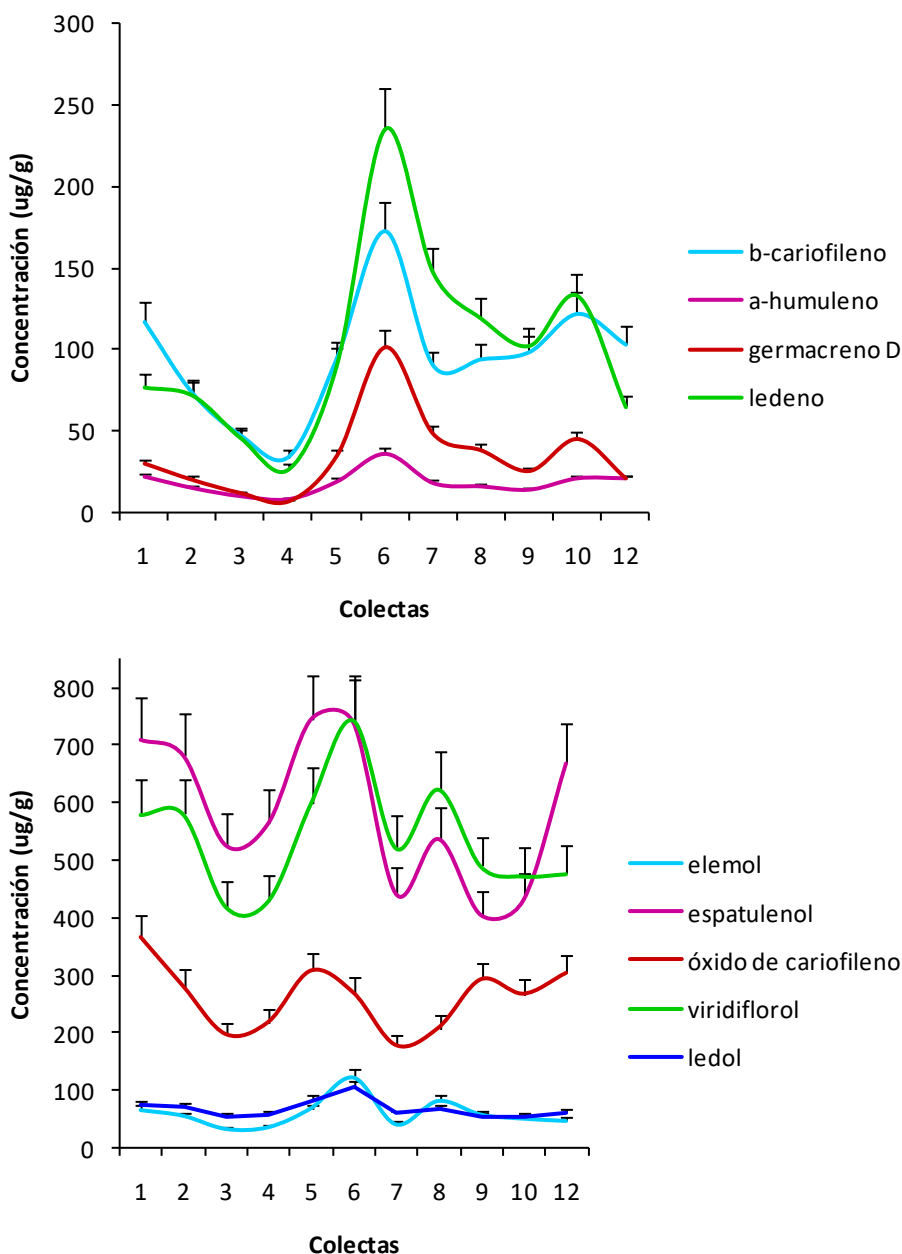




(diciembre), y No. 6 (junio) (todos estados vegetativos) (Figuras 4 y 5). Si bien biosintéticamente no es un terpeno, el metileugenol presentó un comportamiento parecido (Tabla 4). En el caso del Grupo 1, los mayores niveles de concentración obtenidos fueron los siguientes: viridiflorol (744  $\mu\text{g/g}$ ), espatulenol (744  $\mu\text{g/g}$ ), óxido de cariofileno (365  $\mu\text{g/g}$ ), elemol (123  $\mu\text{g/g}$ ), ledol (105  $\mu\text{g/g}$ ), terpinen-4-ol (37  $\mu\text{g/g}$ ), metileugenol (35  $\mu\text{g/g}$ ) y linalol (24  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabla 4 y Figuras 4 y 5).

- **Grupo 2:** correspondiente al patrón de emisión del (*E*)-pinocarveol y el mirtenal. Se caracterizó por un perfil de concentración con máximos en las Colectas No. 9 y No. 10 (período de floración y fructificación en setiembre y octubre, respectivamente); y con mínimos en la Colecta No. 3 (febrero, estado vegetativo). Los valores máximos de concentración determinados para el Grupo 2 fueron: (*E*)-pinocarveol (49  $\mu\text{g/g}$ ) y mirtenal (38  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabla 4 y Figura 4). El hecho de presentar un máximo de producción en floración podría estar correlacionado con el aroma típico percibido, y ser una señal para la atracción de polinizadores (capítulo 5).
- **Grupo 3:** integrado exclusivamente por el patrón de emisión del  $\alpha$ -terpineol, con un máximo en la Colecta No. 4 (abril; estado vegetativo) y un mínimo en la Colecta No. 9 (setiembre; estado de floración). En éste último grupo la concentración máxima alcanzada por el  $\alpha$ -terpineol fue de 60  $\mu\text{g/g}$  (Tabla 4 y Figura 4).

Al igual que en el caso de los hidrocarburos, no existieron correlaciones aparentes entre la composición de los metabolitos oxigenados y las variables agrometeorológicas registradas.



**Figura 5:** Variación en la concentración de los principales sesquiterpenos de *B. dracunculifolia* en el período de estudio de un año en INIA-Las Brujas. En la parte superior se representan los hidrocarburos [(*E*)- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D y ledeno] y en la inferior los sesquiterpenos oxigenados (elemol, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol y ledol).

Previamente Frizzo *et al.* (2008) realizaron un estudio sobre la variación estacional en la composición volátil de *B. dracunculifolia* en el sur de Brasil. Según estos autores, la composición varía durante el año de manera que pueden establecerse dos grandes grupos de similitud: composición en el período octubre-marzo (floración, fructificación y estado vegetativo post-floración) y en el período abril-setiembre (estado vegetativo pre-floración). Sin embargo, no se discute en qué período se producen los máximos y mínimos de concentración de los metabolitos (Frizzo *et al.*, 2008).



En una evaluación más detallada, de Sousa *et al.* (2009) reportaron para poblaciones cultivadas de *B. dracunculifolia* del sudeste de Brasil (estado de São Paulo), que el rendimiento de aceite esencial varía como consecuencia de la estacionalidad, obteniéndose el máximo de producción en los meses de marzo y abril (período vegetativo) y disminuyendo en mayo-julio (período reproductivo). El máximo de concentración de los principales componentes del aceite [(*E*)-nerolidol y espatulenol] se produjo durante el período vegetativo (febrero-marzo) mientras que el mínimo fue constatado durante el período reproductivo (julio) (de Sousa *et al.*, 2009), resultados semejantes al del presente estudio. En el caso de los hidrocarburos sesquiterpénicos, el máximo de producción se produjo en período vegetativo (febrero) (de Sousa *et al.*, 2009), también en coincidencia con los resultados del presente estudio. Sin embargo, los hidrocarburos monoterpénicos del estudio de Sousa *et al.* (2009) alcanzaron su mayor valor durante el inicio de floración, mientras que en fases reproductivas posteriores no fueron detectados; así como tampoco lo fueron los monoterpenos oxigenados durante todo el período de estudio, siendo un gran contraste con los resultados aquí presentados.

Respecto a los niveles de concentración obtenidos, de Sousa *et al.* (2009) informaron rendimientos máximos de 97,0 µg/g de hidrocarburos monoterpénicos, 512,7 µg/g de hidrocarburos sesquiterpénicos, 1365,3 µg/g de (*E*)-nerolidol, 512,1 µg/g de espatulenol y 270,3 µg/g del resto de los sesquiterpenos oxigenados. En la comparación de los datos de concentración del trabajo precedente con el presente, es evidente la existencia de un patrón diferencial de producción volátil de *B. dracunculifolia*. Los especímenes cultivados produjeron principalmente (*E*)-nerolidol y bajos niveles de monoterpenos (de Sousa *et al.*, 2009); mientras que los especímenes silvestres analizados en éste trabajo produjeron un importante nivel de hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpenos en el mismo orden de concentración (Tabla 4, Figuras 4 y 5). Dichas diferencias no sólo se deben al hecho de que el material genético de ambas poblaciones estudiadas sea distinto (considerando además que ambas son geográficamente distantes), sino a las prácticas agrícolas empleadas para la población cultivada y a la innegable influencia de los factores ambientales sobre el metabolismo volátil.

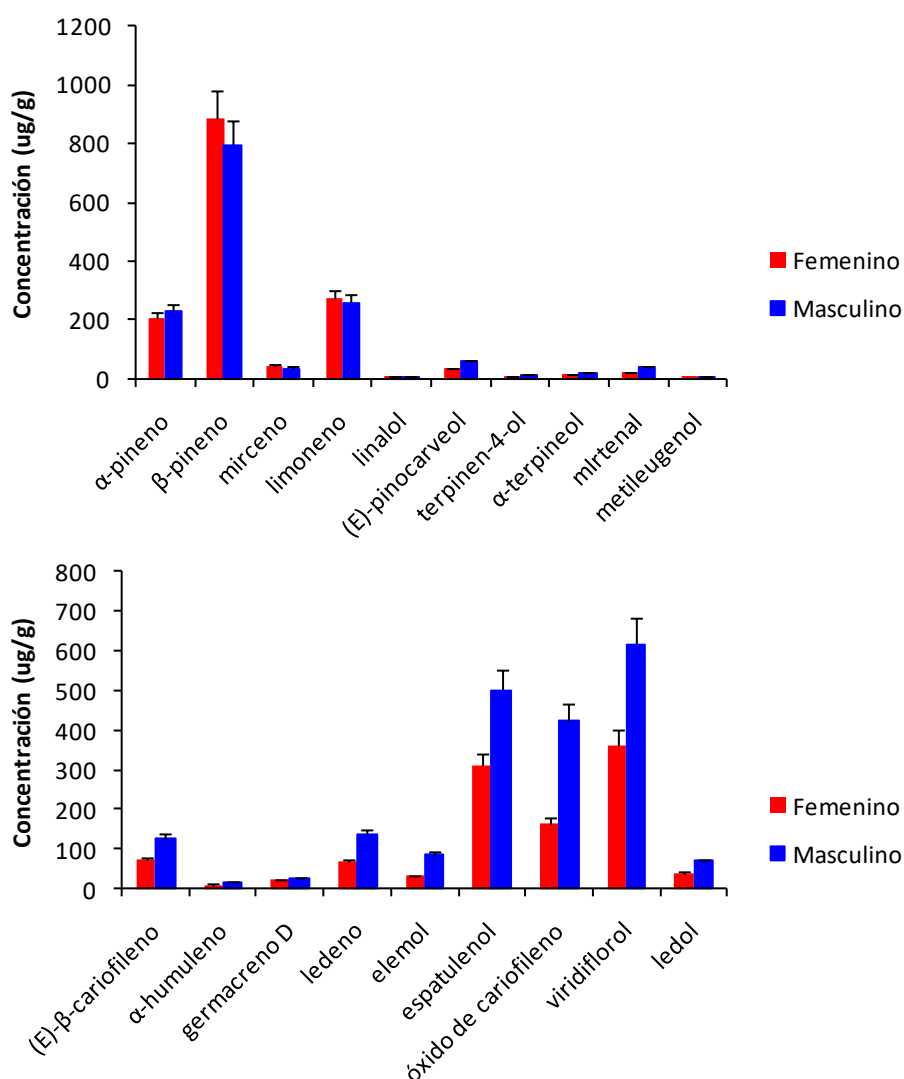
Un aspecto interesante es que los valores de concentración determinados para la mayoría de los compuestos volátiles en las Colectas No. 1 y No. 12 (con un año de diferencias entre ellas) fueron similares, lo que podría indicar un patrón de emisión



estable anual, y que el comportamiento registrado en éste experimento podría ser una característica propia de la especie en el ecosistema considerado (Figuras 4 y 5).

### 3.4 Diferencias sexuales en la emisión de *B. dracunculifolia* en floración.

Para la especie *B. dracunculifolia*, en la Colecta No. 9 (setiembre; floración plena) se pudieron realizar colectas diferenciadas de material vegetal masculino y femenino inequívocamente, lo que no fue posible en el resto de las colectas. En la Figura 6 se presentan los resultados cuantitativos obtenidos para los componentes estudiados.



**Figura 6:** Diferencias de la concentración de los principales componentes volátiles de *B. dracunculifolia* (monoterpenos y metileugenol arriba; sesquiterpenos abajo) entre los individuos masculinos y femeninos en el período de floración plena (setiembre; Colecta No. 9).



Como puede verse en la Figura 6, las diferencias más notorias en la composición de individuos masculinos y femeninos se evidenciaron para el caso de los sesquiterpenos. Los siguientes compuestos fueron notoriamente más concentrados en los individuos masculinos que en los femeninos: (*E*)- $\beta$ -cariofileno (125  $\mu\text{g/g}$  vs. 72  $\mu\text{g/g}$ ), ledeno (137  $\mu\text{g/g}$  vs. 68  $\mu\text{g/g}$ ), elemol (84  $\mu\text{g/g}$  vs. 32  $\mu\text{g/g}$ ), espatulenol (500  $\mu\text{g/g}$  vs. 310  $\mu\text{g/g}$ ), óxido de cariofileno (422  $\mu\text{g/g}$  vs. 162  $\mu\text{g/g}$ ), viridiflorol (617  $\mu\text{g/g}$  vs. 363  $\mu\text{g/g}$ ) y ledol (69  $\mu\text{g/g}$  vs. 38  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabla 4 y Figura 6).

Para el caso de los monoterpenos, sólo el (*E*)-pinocarveol (57  $\mu\text{g/g}$  vs. 35  $\mu\text{g/g}$ ) y el mirtenal (39  $\mu\text{g/g}$  vs. 23  $\mu\text{g/g}$ ) se determinaron en mayor concentración en los individuos masculinos que en los femeninos, mientras que para el resto no existieron diferencias cuantitativas apreciables (Tabla 4 y Figura 6).

Las diferencias intersexuales cuantitativas en la composición volátil ya han sido previamente presentadas en el capítulo 5 para las especies *B. articulata* y *B. tridentata*, y también han sido reportadas en la literatura; por lo que podría afirmarse que se trata de un comportamiento definido del género.

Como fue mencionado, la diferencia en las funciones biológicas de ambos sexos hace que las plantas femeninas y masculinas tengan un metabolismo diferencial (capítulo 5) (Espírito-Santo *et al.*, 2003; Simpson, 2013). Ferracini *et al.* (1995) caracterizaron previamente las diferencias intersexuales en el aceite esencial de *B. dracunculifolia* teniendo en cuenta además el ritmo circadiano, las condiciones de estrés de la planta y las interacciones planta-insecto. Los autores encontraron diferencias cuantitativas apreciables en la composición de los aceites de plantas masculinas y femeninas, por ejemplo, para compuestos tales como  $\alpha$ -pineno (0,1% vs. 1,2%, respectivamente),  $\beta$ -pineno (1,9% vs. 3,8%), limoneno (0,9% vs. 4,7%),  $\beta$ -cadineno (0,1% vs. 1,2%) y (*E*)-nerolidol (12% vs. 20,8%) (Ferracini *et al.*, 1995). Asimismo, se demostró diferencia intersexual en la relación monoterpenos/sesquiterpenos (M/S), obteniéndose un mayor valor de éste parámetro para el caso de los individuos femeninos (Ferracini *et al.*, 1995), en completa concordancia con los resultados de éste capítulo que demuestran mayor concentración de sesquiterpenos en individuos masculinos.

Sin embargo, resultados exactamente opuestos (M/S mayor para el aceite esencial de individuos masculinos) fueron obtenidos para la misma especie por Besten *et al.*, (2012), lo que no sólo se puede deber a diferencias de factores internos y externos a las



plantas sino también al carácter relativo del enfoque analítico empleado (cuantificación por cálculo de porcentajes de áreas relativas).

En experimentos que consideraron la influencia del ritmo circadiano (**Ferracini et al., 1995**), se encontró que las inflorescencias masculinas producen mayor cantidad de monoterpenos (y mayor M/S que las inflorescencias hembras) hacia las 11 AM (casi 4 veces más que a las 8AM y el doble que a las 5PM), mientras que no existe variación apreciable a lo largo del día de M/S tanto para el caso de las inflorescencias femeninas como para los órganos foliares de ambos sexos. El mismo estudio correlacionó dicha diferencia con la visita de insectos polinizadores, observándose una mayor actividad de visita de abejas, avispas y moscas en el entorno de las 10:30 AM-1:00 PM en que los individuos masculinos mostraban mayor porcentaje de monoterpenos y un aroma meloso (**Ferracini et al., 1995**). Ello podría indicar un papel de atracción de los insectos hacia las plantas masculinas causado por el aroma floral de *B. dracunculifolia*, lo que es lógico considerando que en ésta especie dioica los insectos deben transportar el polen entre las flores masculinas y femeninas.

Adicionalmente, se ha demostrado que la variación en M/S y en el rendimiento de aceites esenciales en *B. dracunculifolia* también depende de la estacionalidad, de la disponibilidad hídrica y del régimen de precipitaciones, obteniéndose mayor cantidad de aceite en los meses lluviosos con M/S variable según la estación (**Ferracini et al., 1995; Besten et al., 2012**). Sin embargo, Besten *et al.* (2012) destacan que las diferencias intersexuales de composición del aceite esencial sólo son de importancia en el período de floración.

Todos los resultados discutidos realzan la importancia de una cuidadosa selección de la hora de colecta del material vegetal y del seguimiento estacional, así como demuestran que los informes de colectas puntuales carecen de valor ecológico. En otras palabras, es esencial un adecuado seguimiento estacional y un procedimiento analítico riguroso para obtener datos de emisión volátil que permitan entender mecanismos presentes en la naturaleza.



### 3.5 Variación de la composición volátil de *B. microdonta*

En las Tabla 5 y las Figuras 7 y 8 se presenta la variación de la composición volátil (identificación por *GC-MS* y cuantificación por *GC-FID*) para *B. microdonta* a lo largo del período de estudio de un año en la estación INIA-Las Brujas.



**Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad**

Compuestos	LRI <sup>a</sup>	LRI <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12
1-metilciclopentanol	798	793	0,3											
3-hexanol	797	798	0,05											
Hexanal	801	801	0,2											
3-metilciclopentanol	836	837	0,06											
ácido isovalérico	848	844	0,3											
ácido 2-metilbutanoico	856	852	0,05											
ácido (Z)-tíglico	898	898	0,03											
2,2-dimetiltetrahydrofurano	908	911	0,2											
α-tuyeno	924	923	0,05											
<b>α-pineno</b> <sup>1-3</sup>	932	928	1,7	13 ± 2	10 ± 1	3.2 ± 0.4	27 ± 3	35 ± 4	46 ± 5	68 ± 8	43 ± 5	44 ± 5	52 ± 6	30 ± 3
ácido 4-metilvalérico	955	957	0,03											
<b>β-pineno</b> <sup>1-3</sup>	974	971	6,1	48 ± 6	46 ± 5	17 ± 2	116 ± 13	119 ± 14	157 ± 18	145 ± 17	77 ± 9	113 ± 13	92 ± 11	46 ± 5
<b>mirreno</b> <sup>2</sup>	988	991	0,6	4.8 ± 0.6	7.3 ± 0.8	3.9 ± 0.4	6.2 ± 0.7	7.8 ± 0.9	10 ± 1	12 ± 1	6.2 ± 0.7	11 ± 1	6.8 ± 0.8	2.6 ± 0.3
<b>p-cimeno</b> <sup>2</sup>	1020	1021	0,4											
<b>limoneno</b> <sup>2-3</sup>	1024	1025	9,6	76 ± 9	97 ± 11	52 ± 6	102 ± 12	132 ± 15	178 ± 21	193 ± 22	100 ± 12	134 ± 15	99 ± 12	58 ± 7
1,8-cineol	1026	1026	0,03											
<b>(E)-β-ocimeno</b> <sup>2</sup>	1044	1047	0,1											
<b>γ-terpineno</b> <sup>2</sup>	1054	1055	0,8											
<b>terpinoleno</b> <sup>2</sup>	1086	1084	0,1											
<b>linalol</b> <sup>2-3</sup>	1095	1099	1,1	9 ± 1	6.7 ± 0.8	6.3 ± 0.7	5.2 ± 0.6	6.9 ± 0.8	8.2 ± 0.9	5.8 ± 0.7	4.3 ± 0.5	5.0 ± 0.6	5.9 ± 0.7	6.6 ± 0.8
<b>(E)-p-ment-2,8-dien-1-ol</b>	1119	1116	0,2											
Norinona	1142	1131	0,2											
<b>(E)-pinocarveol</b> <sup>3</sup>	1135	1132	0,7	5.5 ± 0.6	8.0 ± 0.9	5.7 ± 0.7	9 ± 1	5.2 ± 0.6	3.4 ± 0.4	2.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	3.1 ± 0.4	2.7 ± 0.3	4.0 ± 0.5
<b>(E)-verbenaol</b>	1140	1140	0,06											
<b>pinocarvona</b> <sup>3</sup>	1160	1156	0,3											
<b>terpinen-4-ol</b> <sup>2</sup>	1174	1172	0,3	2.3 ± 0.3	4.7 ± 0.5	5.3 ± 0.6	3.4 ± 0.4	4.1 ± 0.5	3.6 ± 0.4	4.4 ± 0.5	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.2
<b>α-terpineol</b> <sup>2-3</sup>	1186	1186	0,7	5.2 ± 0.6	7.5 ± 0.9	5.7 ± 0.7	6.5 ± 0.8	6.0 ± 0.7	6.4 ± 0.7	6.3 ± 0.7	5.0 ± 0.6	3.9 ± 0.5	2.9 ± 0.3	3.5 ± 0.4
<b>mirtenal</b> <sup>3</sup>	1195	1189	0,5	3.8 ± 0.4	5.0 ± 0.6	3.6 ± 0.4	6.7 ± 0.8	3.4 ± 0.4	2.3 ± 0.3	1.2 ± 0.1	1.0 ± 0.1	2.2 ± 0.3	2.2 ± 0.3	3.4 ± 0.4





Tabla 5, continuación

<b>mirtenol</b> <sup>2</sup>	1194	1191	0,4											
( <i>E</i> )-carveol	1215	1215	0,2											
<b>carvona</b> <sup>3</sup>	1239	1239	0,3											
Safrol	1285	1283	0,09											
( <i>Z</i> )-teaspirano	1302	1291	0,2											
( <i>E</i> )-teaspirano	sd	1309	0,5											
δ-elemeno	1335	1332	0,08											
<b>α-cubebeno</b> <sup>2</sup>	1345	1345	0,1											
<b>α-copaeno</b> <sup>2-3</sup>	1374	1370	0,2											
<b>β-elemeno</b> <sup>2-3</sup>	1389	1387	0,4											
α-gurjuneno	1409	1402	0,1											
Metileugenol	1403	1404	0,3											
( <i>E</i> )-β-cariofileno <sup>1-3</sup>	1417	1411	4,0	32 ± 4	67 ± 8	25 ± 3	33 ± 4	59 ± 7	89 ± 10	61 ± 7	44 ± 5	90 ± 10	48 ± 6	18 ± 2
γ-elemeno <sup>1</sup>	1434	1430	0,04											
<b>aromadendreno</b> <sup>1</sup>	1439	1432	0,1											
( <i>E</i> )-murola-3,5-dieno	1451	1443	0,2											
<b>α-humuleno</b> <sup>1-3</sup>	1452	1445	0,9	7.3 ± 0.8	11 ± 1	4.0 ± 0.5	8.0 ± 0.9	11 ± 1	18 ± 2	13 ± 2	10 ± 1	16 ± 2	10 ± 1	4.0 ± 0.5
<b>allo-aromadendreno</b> <sup>2</sup>	1458	1452	0,4											
γ-gurjuneno	1475	1465	0,06											
( <i>E</i> )-cadina-1(6),4-dieno	1475	1468	0,2											
γ-muroloeno <sup>1-2</sup>	1478	1471	0,2											
<b>germacreno D</b> <sup>2-3</sup>	1484	1474	0,6	4.8 ± 0.6	19 ± 2	5.9 ± 0.7	8.1 ± 0.9	25 ± 3	66 ± 8	65 ± 7	42 ± 5	77 ± 9	39 ± 5	1.0 ± 0.1
γ-himachaleno	1481	1476	0,03											
<b>β-selineno</b> <sup>3</sup>	1489	1478	0,06											
<i>ar</i> -curcumeno	1479	1480	0,4											
( <i>E</i> )-murola-4(14),5-dieno	1493	1484	0,4											
<b>ledeno</b> <sup>2</sup>	1496	1489	1,0	7.6 ± 0.9	18 ± 2	4.4 ± 0.5	9 ± 1	22 ± 3	61 ± 7	69 ± 8	49 ± 6	102 ± 12	54 ± 6	8 ± 1
<b>α-muroloeno</b> <sup>1,3</sup>	1500	1495	0,3											
γ-cadineno <sup>2</sup>	1513	1507	0,3											
δ-cadineno <sup>1-3</sup>	1522	1519	1,5											
( <i>E</i> )-cadina-1,4-dieno	1533	1526	0,1											



Tabla 5, continuación

<b><math>\alpha</math>-calacoreno</b> <sup>3</sup>	1544	1536	0,9											
<b>elemol</b> <sup>2</sup>	1548	1544	0,9											
<b>palustrol</b> <sup>3</sup>	1567	1559	4,1	33 ± 4	23 ± 3	19 ± 2	95 ± 11	80 ± 9	112 ± 13	73 ± 8	95 ± 11	96 ± 11	81 ± 9	126 ± 15
<b>(E)-nerolidol</b> <sup>2</sup>	1561	1562	0,1											
<b>espatulenol</b> <sup>1,3</sup>	1577	1572	17,3	137 ± 16	185 ± 21	101 ± 12	203 ± 24	206 ± 24	203 ± 24	171 ± 20	178 ± 21	197 ± 23	123 ± 14	154 ± 18
<b>óxido de cariofileno</b> <sup>1,3</sup>	1582	1575	14,0	111 ± 13	129 ± 15	67 ± 8	128 ± 15	118 ± 14	116 ± 13	70 ± 8	74 ± 9	100 ± 12	59 ± 7	86 ± 10
<b>viridiflorol</b> <sup>1,3</sup>	1592	1584	2,0	16 ± 2	14 ± 2	10 ± 1	50 ± 6	41 ± 5	58 ± 7	42 ± 5	56 ± 6	57 ± 7	45 ± 5	57 ± 7
<b>ledol</b> <sup>3</sup>	1602	1595	3,9	31 ± 4	30 ± 3	19 ± 2	85 ± 10	73 ± 8	99 ± 11	71 ± 8	92 ± 11	94 ± 11	69 ± 8	87 ± 10
óxido de humuleno II	1608	1600	1,9											
<b>1-epi-cubenol</b> <sup>3</sup>	1627	1621	0,8											
<b><math>\gamma</math>-eudesmol</b> <sup>2</sup>	1630	1624	0,2											
cariofila-4(12),8(13)-dien-5- $\beta$ -ol	1633	1628	0,2											
<i>iso</i> -espatulenol	1636	1631	1,2											
$\zeta$ -cadinol	1640	1635	1,1											
<b><math>\delta</math>-cadinol</b> <sup>3</sup>	1645	1641	0,5											
<b><math>\alpha</math>-cadinol</b> <sup>1,2</sup>	1652	1648	0,6											
Cadaleño	1675	1667	1,3											
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1685	1678	0,4											
eudesma-4,11-dien-2-ol	1714	1716	0,05											
<i>iso</i> -biciclogermacrenal	1733	1730	0,3											
Neofitadieno	1840	1846	0,1											

**Tabla 5:** Composición química de los extractos volátiles de partes aéreas de *B. microdonta* a lo largo de un año de muestreo (diciembre 2012 a diciembre 2013) en la Estación Experimental INIA Las Brujas (Canelones, Uruguay).

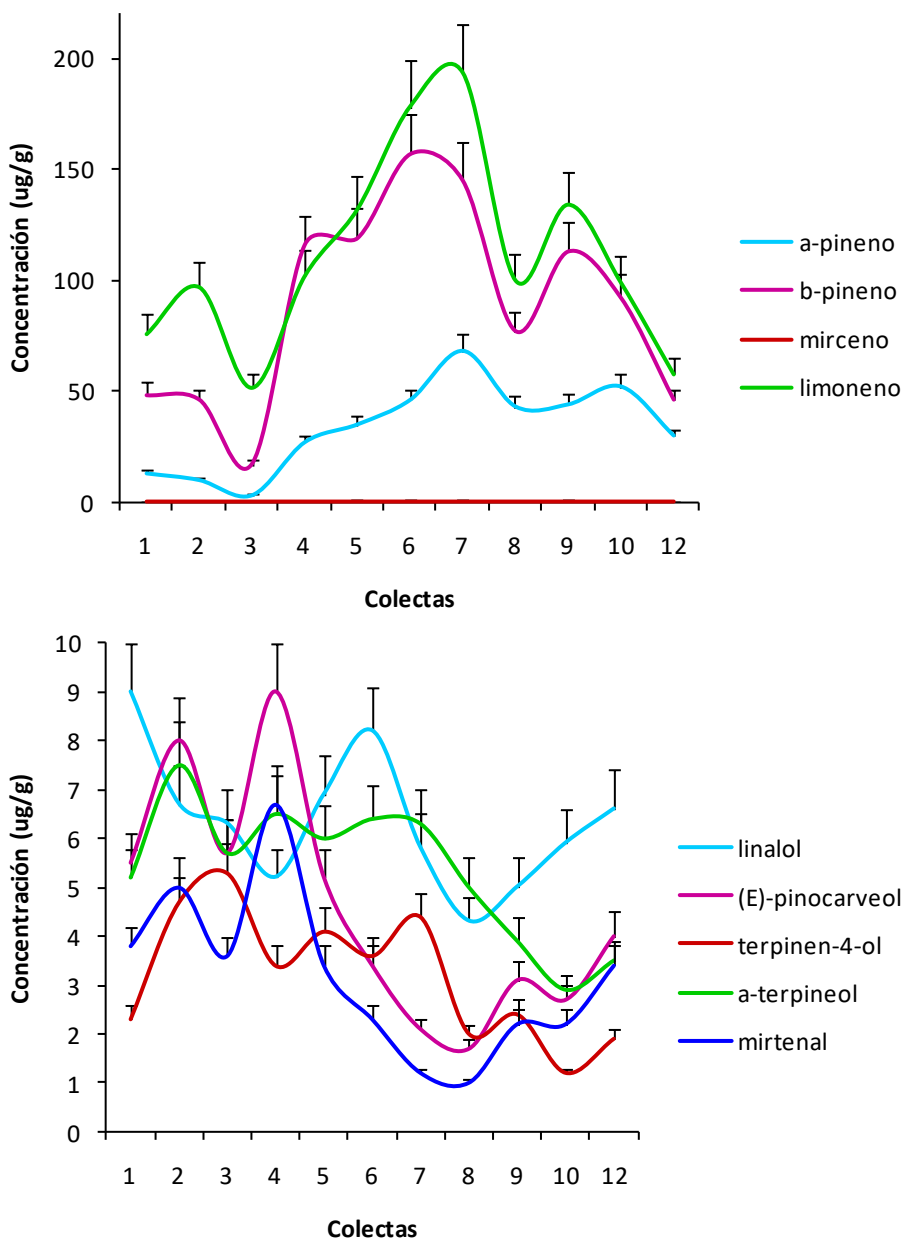
Referencias: (a) índice de retención lineal obtenido de la literatura; (b) índice de retención lineal obtenido en éste trabajo; (c) el porcentaje de composición obtenido en GC-MS (Modo Full-Scan) se reporta sólo para la colecta número 1 para propósitos comparativos; (d) cuantificación por estándar interno de los principales componentes volátiles ( $\mu\text{g}$  compuesto/g material vegetal desecado). Se denotan con la siguiente notación los componentes volátiles identificados previamente por: (1): **Lago et al., 2008**; (2): **Sayuri et al., 2010**; (3): **Budel et al., 2018**.



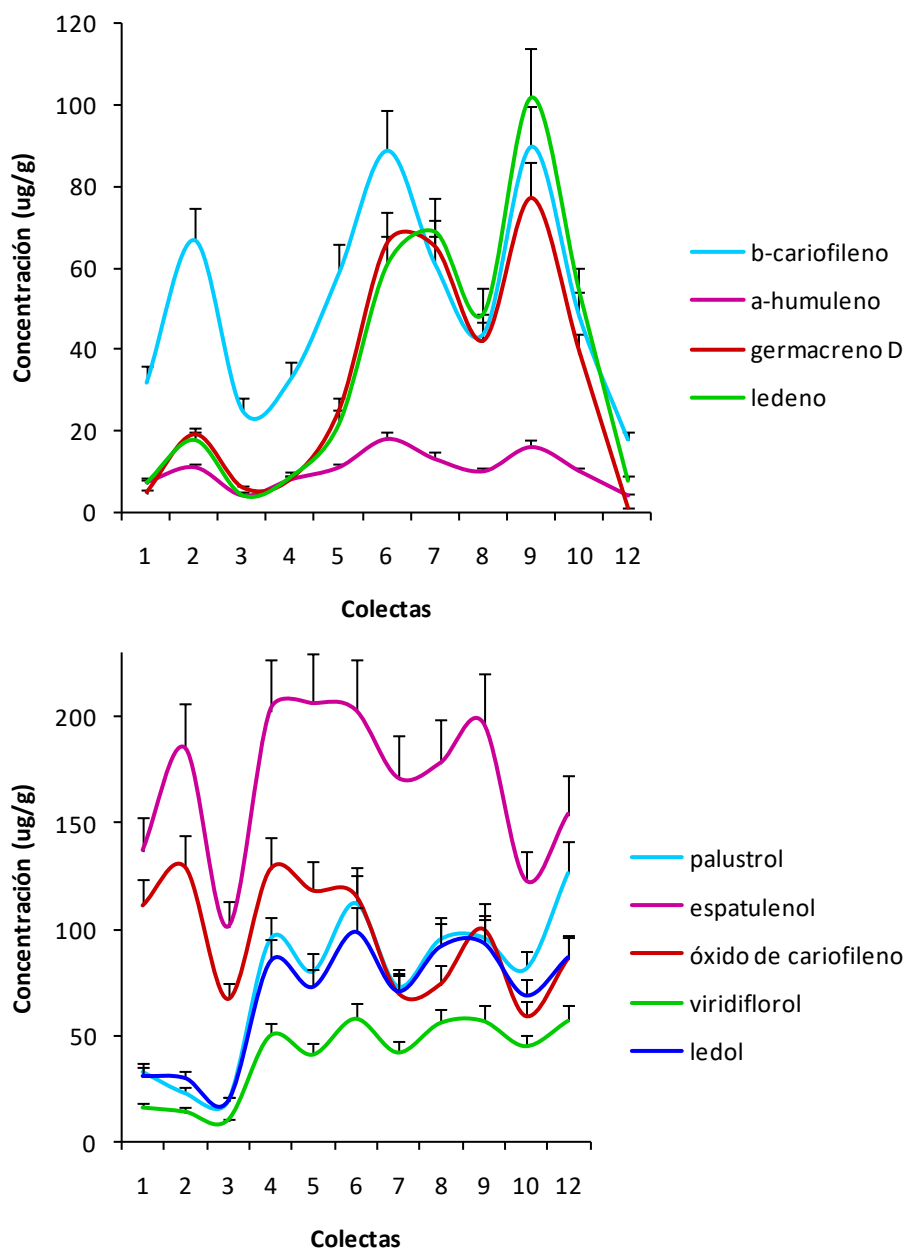
Para el caso de *B. microdonta* fueron identificados 80 componentes volátiles, de los cuales 37 no han sido previamente informados en la literatura para la especie (Tabla 5). Los principales compuestos identificados en el perfil volátil de ésta especie fueron: espatulenol (17,3% para el caso de la Colecta No. 1 a la que se referirán los siguientes porcentajes), óxido de cariofileno (14,0%), limoneno (9,6%),  $\beta$ -pineno (6,1%), palustrol (4,1%), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (4,0%), ledol (3,9%), viridiflorol (2,0%),  $\alpha$ -pineno (1,7%), ledeno (1,0%) y germacreno D (0,6%). Vale destacar que en éste caso, y a diferencia con lo constatado para *B. dracunculifolia*, en el volatilo de *B. microdonta* se determinó la presencia de (*E*)-nerolidol (0,1% en la Colecta No. 1) (Tabla 5). Algunos de los anteriores componentes principales fueron también comunes a los informados previamente en el capítulo 4 para una colecta puntual de *B. microdonta* del sur de Brasil, los que fueron: limoneno (10,1%), espatulenol (8,0%),  $\beta$ -pineno (7,6%), biciclogermacreno (6,4%),  $\delta$ -cadineno (5,9%) y germacreno D (5,6%) (ver capítulo 4).

Comparando los resultados obtenidos para *B. dracunculifolia* y *B. microdonta*, se aprecia que la composición cualitativa volátil de ambas especies en el ecosistema evaluado (ambiente plano) del sur de Uruguay es muy semejante, aunque existen marcadas diferencias cuantitativas (Tablas 4 y 5). Dicha similitud contrasta con el reporte de Lago *et al.* (2008), quienes informaron un perfil cualitativa y cuantitativamente diferente para las mismas dos especies colectadas en el mismo ambiente de campos de altitud en el estado brasileño de São Paulo.

En las Figuras 7 y 8 se presentan gráficos de la variación anual de la concentración (expresada como  $\mu\text{g}$  de compuesto/g de material vegetal desecado) de los principales componentes volátiles analizados en éste trabajo.



**Figura 7:** Variación en la concentración de los principales monoterpenos de *B. microdonta* en el período de estudio de un año en INIA-Las Brujas. En la parte superior se representan los hidrocarburos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno y limoneno) y en la inferior los monoterpenos oxigenados [linalol, (E)-pinocarveol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol y mirtenal].



**Figura 8:** Variación en la concentración de los principales sesquiterpenos de *B. microdonta* en el período de estudio de un año en INIA-Las Brujas. En la parte superior se representan los hidrocarburos [(E)- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D y ledeno] y en la inferior los sesquiterpenos oxigenados (palustrol, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol y ledol).

En éste experimento, se determinó una amplia variación (con patrones oscilantes) en la concentración de los componentes volátiles de *B. microdonta* como consecuencia de la estacionalidad (Figuras 7 y 8).

En el caso de los hidrocarburos monoterpénicos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mirceno y limoneno) el máximo de concentración determinado fue en el período de las Colectas No. 6 y 7 (junio-julio, estado vegetativo), un comportamiento similar a lo determinado



previamente para la especie *B. dracunculifolia* (Figuras 4 y 7). En el caso de *B. microdonta*, los valores máximos de concentración determinados fueron los siguientes: limoneno (193  $\mu\text{g/g}$ ),  $\beta$ -pineno (157  $\mu\text{g/g}$ ),  $\alpha$ -pineno (68  $\mu\text{g/g}$ ) y mirceno (12  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabla 5 y Figura 7).

Los hidrocarburos sesquiterpénicos [(*E*)- $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D y ledeno] por su parte mostraron un patrón oscilante definido, con máximos en las Colectas No. 2, 6 y 9 (enero, junio y setiembre, respectivamente), lo que no se correlaciona *a priori* con la variación de ninguna variable agrometeorológica (Tabla 2 y Figura 8). Los valores máximos de concentración obtenidos para éste grupo de componentes fueron: ledeno (102  $\mu\text{g/g}$ ), (*E*)- $\beta$ -cariofileno (90  $\mu\text{g/g}$ ), germacreno D (77  $\mu\text{g/g}$ ) y  $\alpha$ -humuleno (18  $\mu\text{g/g}$ ) (Tabla 5 y Figura 8).

Como en el caso de *B. dracunculifolia*, para el caso de los monoterpenos oxigenados de *B. microdonta* parecen existir diferentes patrones de emisión dependiendo del tipo de componente analizado (Figuras 7 y 8).

- **Grupo 1:** integrado por (*E*)-pinocarveol, mirtenal y  $\alpha$ -terpineol. Se caracteriza por presentar un patrón oscilante con máximos en las Colectas No. 2 y 4 (enero y abril respectivamente, ambas en período de floración) que correspondieron a concentraciones de 9,0  $\mu\text{g/g}$ , 6,7  $\mu\text{g/g}$  y 7,5  $\mu\text{g/g}$ ; respectivamente (Tabla 5 y Figura 7).
- **Grupo 2:** compuesto únicamente por el terpinen-4-ol, el que presenta un patrón oscilante con un máximo de concentración en la Colecta No. 3 (febrero, floración) con un valor de 5,3  $\mu\text{g/g}$  (Tabla 5 y Figura 7).
- **Grupo 3:** compuesto únicamente por el linalol, el que mostró su máxima concentración en las Colectas No. 1 y 6 (diciembre y junio; estados vegetativos), con un valor de 9,0  $\mu\text{g/g}$  (Tabla 5 y Figura 7).

Por último, respecto a los sesquiterpenos oxigenados también se encontraron patrones oscilantes, y en éste caso también se diferenciaron dos grupos bien definidos.

- **Grupo 4:** integrado por espatulenol y óxido de cariofileno, con máximos en las Colectas No. 2, 4 y 9. Los valores extremos de concentración obtenidos fueron: 206  $\mu\text{g/g}$  (espatulenol) y 129  $\mu\text{g/g}$  (óxido de cariofileno) (Tabla 5 y Figura 8).



- **Grupo 5:** integrado por palustrol, viridiflorol y ledol, los que presentaron máximos en las Colectas No. 4, 6, 9 y 12 (Tabla 5 y Figura 8). En éste caso los valores de concentración máximo obtenidos fueron: 112  $\mu\text{g/g}$  (palustrol), 94  $\mu\text{g/g}$  (ledol) y 58  $\mu\text{g/g}$  (viridiflorol).

Por otra parte, todos los sesquiterpenos y la mayoría de los monoterpenos (salvo el terpinen-4-ol) presentaron una concentración mínima en la Colecta No. 3 (febrero) correspondiente a floración, lo que podría ser un cierto tipo de “mensaje” hacia los insectos polinizadores según la hipótesis de Ferracini *et al.* (1995).

En un estudio sobre la especie *B. microdonta* (creciendo en un hábitat montañoso del sudeste brasileño, estado de São Paulo) en que se evaluó el efecto de la estacionalidad sobre el perfil volátil, se constataron grandes diferencias en el rendimiento y composición del aceite esencial (Sayuri *et al.*, 2010). Para racionalizar tales variaciones, los autores consideraron en su análisis los esqueletos precursores (análisis biosintético) más que los componentes individuales sintetizados en cada estación del año. Sin embargo, los resultados de éste enfoque demostraron que las variación anual también fue pronunciada y oscilante para cada uno de dichos esqueletos precursores, lo que indicaría que el metabolismo volátil de *B. microdonta* es altamente variable y dependiente de los factores ambientales (Sayuri *et al.*, 2010).

Para los principales componentes volátiles analizados en éste trabajo, la concentración determinada en *B. dracunculifolia* fue de dos a diez veces superior a la determinada para *B. microdonta*, lo que podría ser un importante elemento de diferenciación de las especies desde el punto de vista químico (Tablas 4 y 5 y Figuras 4, 5, 7 y 8). Al igual que en el caso de *B. dracunculifolia*, los valores de concentración determinados para la mayoría de los volátiles de *B. microdonta* en las Colectas No. 1 y 12 (un año de diferencia entre ellas) fueron similares, lo que también podría indicar un patrón de emisión estable año a año (Figuras 7 y 8).

### 3.6 Análisis enantiomérico de los principales monoterpenos quirales de *B. dracunculifolia* y *B. microdonta* a lo largo del período de estudio

En las Tablas 6 y 7 se presenta el análisis enantiomérico de los principales monoterpenos quirales de ambas especies bajo estudio (realizado por *eGC-MS*) en el período citado.



**Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad**

Compuesto	Fr. (m/z)	1 <sup>a</sup>	2	3	4	5	6	7	8	9F	9M	10	12	Promedio
<b>1S(-)-<math>\alpha</math>-pineno</b>	93	69.0 $\pm$ 0.1	63.1 $\pm$ 0.5	64.1 $\pm$ 0.8	63.4 $\pm$ 0.1	67.6 $\pm$ 0.2	67.5 $\pm$ 0.1	60.1 $\pm$ 0.4	63.9 $\pm$ 0.3	60.9 $\pm$ 0.1	60.4 $\pm$ 0.1	55.6 $\pm$ 0.5	59.5 $\pm$ 0.2	63 $\pm$ 8
<b>1R(+)-<math>\alpha</math>-pineno</b>	93	31.0 $\pm$ 0.1	36.9 $\pm$ 0.5	35.9 $\pm$ 0.8	36.6 $\pm$ 0.1	32.4 $\pm$ 0.2	32.5 $\pm$ 0.1	39.9 $\pm$ 0.4	36.1 $\pm$ 0.3	39.1 $\pm$ 0.1	39.6 $\pm$ 0.1	44.4 $\pm$ 0.5	40.5 $\pm$ 0.2	37 $\pm$ 8
<b>1S(-)-<math>\beta</math>-pineno</b>	93	66.6 $\pm$ 0.1	68.2 $\pm$ 0.1	71.2 $\pm$ 0.1	73.2 $\pm$ 0.1	74.6 $\pm$ 0.2	70.2 $\pm$ 0.4	59.7 $\pm$ 0.1	56.2 $\pm$ 0.1	43.5 $\pm$ 0.1	60.1 $\pm$ 0.1	67.9 $\pm$ 0.1	74.6 $\pm$ 0.2	67 $\pm$ 14
<b>1R(+)-<math>\beta</math>-pineno</b>	93	33.4 $\pm$ 0.1	31.8 $\pm$ 0.1	28.8 $\pm$ 0.1	26.8 $\pm$ 0.1	25.4 $\pm$ 0.2	29.8 $\pm$ 0.4	40.3 $\pm$ 0.1	43.8 $\pm$ 0.1	56.5 $\pm$ 0.1	39.9 $\pm$ 0.1	32.1 $\pm$ 0.1	25.4 $\pm$ 0.2	33 $\pm$ 14
<b>4S(-)-limoneno</b>	93	35.2 $\pm$ 0.1	21.8 $\pm$ 0.2	19.5 $\pm$ 0.2	28.2 $\pm$ 0.1	30.9 $\pm$ 0.1	28.2 $\pm$ 0.3	27.3 $\pm$ 0.7	37 $\pm$ 1	24.6 $\pm$ 0.1	28.0 $\pm$ 0.2	30.0 $\pm$ 0.8	25.9 $\pm$ 0.6	28 $\pm$ 10
<b>4R(+)-limoneno</b>	93	64.8 $\pm$ 0.1	78.2 $\pm$ 0.2	80.5 $\pm$ 0.2	71.8 $\pm$ 0.1	69.1 $\pm$ 0.1	71.8 $\pm$ 0.3	72.7 $\pm$ 0.7	63 $\pm$ 1	75.4 $\pm$ 0.1	72.0 $\pm$ 0.2	70.0 $\pm$ 0.8	74.1 $\pm$ 0.6	72 $\pm$ 10
<b>3R(-)-linalol</b>	71	67.0 $\pm$ 0.4	76 $\pm$ 2	73.6 $\pm$ 0.5	69.9 $\pm$ 0.3	71.0 $\pm$ 0.6	68.3 $\pm$ 0.4	63 $\pm$ 3	64 $\pm$ 5	62 $\pm$ 2	52.4 $\pm$ 0.3	70.2 $\pm$ 0.1	62.5 $\pm$ 0.2	68 $\pm$ 10
<b>3S(+)-linalol</b>	71	33.0 $\pm$ 0.4	24 $\pm$ 2	26.4 $\pm$ 0.5	30.1 $\pm$ 0.3	29.0 $\pm$ 0.6	31.7 $\pm$ 0.4	37 $\pm$ 3	36 $\pm$ 5	38 $\pm$ 2	47.6 $\pm$ 0.3	29.8 $\pm$ 0.1	37.5 $\pm$ 0.2	32 $\pm$ 10
<b>4S(+)-terpinen-4-ol</b>	71	38.2 $\pm$ 0.1	41 $\pm$ 2	40.5 $\pm$ 0.5	40.1 $\pm$ 0.1	37 $\pm$ 2	38.6 $\pm$ 0.1	38 $\pm$ 4	35 $\pm$ 7	39.2 $\pm$ 0.7	42 $\pm$ 1	37 $\pm$ 7	40 $\pm$ 4	39 $\pm$ 4
<b>4R(-)-terpinen-4-ol</b>	71	61.8 $\pm$ 0.1	59 $\pm$ 2	59.5 $\pm$ 0.5	59.9 $\pm$ 0.1	63 $\pm$ 2	61.4 $\pm$ 0.1	62 $\pm$ 4	65 $\pm$ 7	60.8 $\pm$ 0.7	58 $\pm$ 1	63 $\pm$ 7	60 $\pm$ 4	61 $\pm$ 4
<b>8S(-)-<math>\alpha</math>-terpineol</b>	59	40.3 $\pm$ 0.3	36 $\pm$ 3	32 $\pm$ 1	33.4 $\pm$ 0.2	35.4 $\pm$ 0.2	39.9 $\pm$ 0.7	47 $\pm$ 2	49 $\pm$ 4	57.1 $\pm$ 0.4	44.9 $\pm$ 0.2	43 $\pm$ 5	35 $\pm$ 4	40 $\pm$ 12
<b>8R(+)-<math>\alpha</math>-terpineol</b>	59	59.7 $\pm$ 0.3	64 $\pm$ 3	68 $\pm$ 1	66.6 $\pm$ 0.2	64.6 $\pm$ 0.2	60.1 $\pm$ 0.7	53 $\pm$ 2	51 $\pm$ 4	42.9 $\pm$ 0.4	55.1 $\pm$ 0.2	57 $\pm$ 5	65 $\pm$ 4	60 $\pm$ 12

**Tabla 6:** Variación en la distribución enantiomérica de monoterpenos quirales seleccionados en el perfil volátil de *B. dracunculifolia* a lo largo de un año de muestreo. Los resultados se presentan como porcentaje del enantiómero dextrógiro y del levógiro, y fueron determinados mediante RIC (cromatograma de recuperación de iones) según los fragmentos (Fr.) típicos listados con sus respectivos valores de m/z.



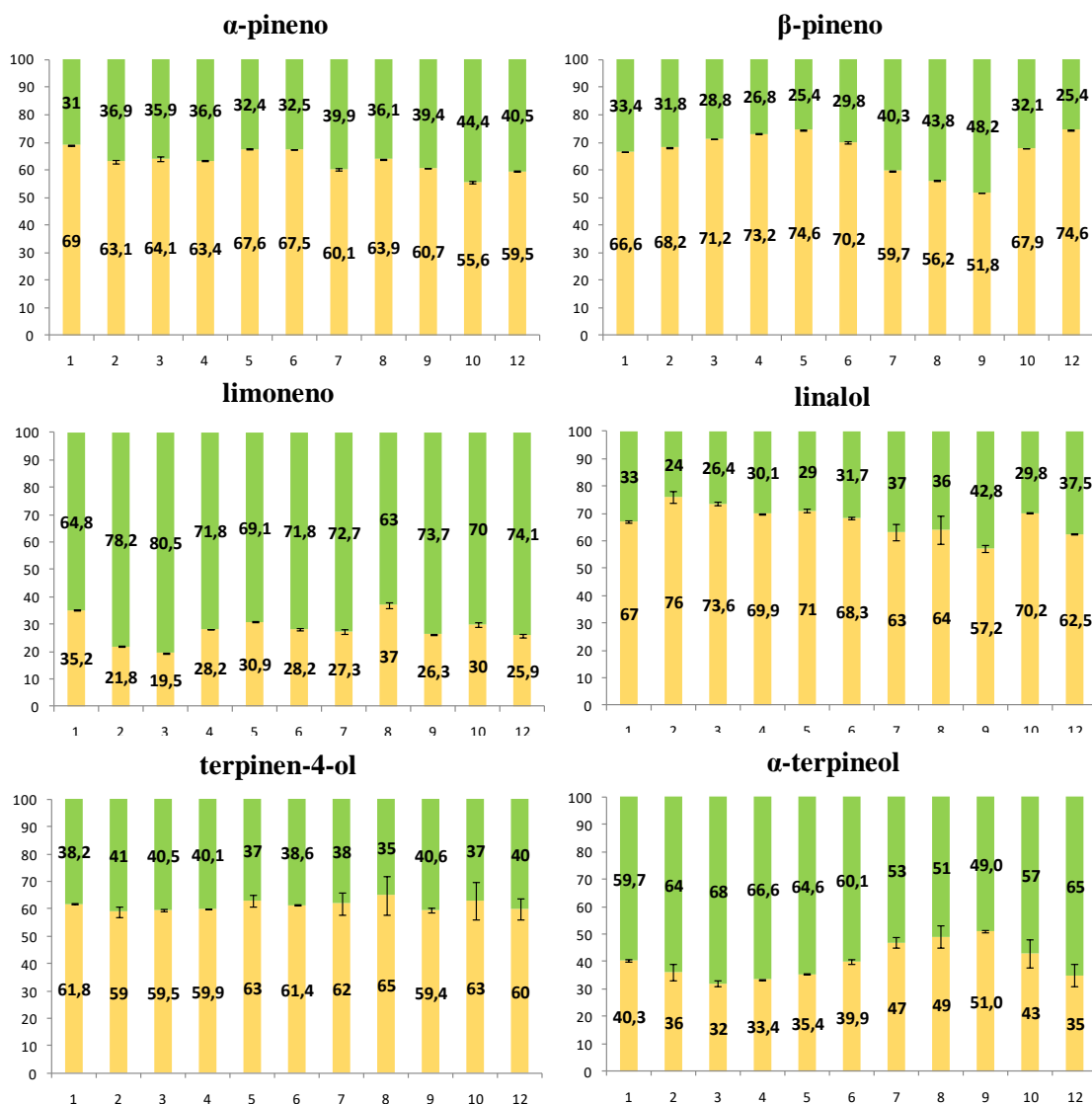


Compuesto	Fr. (m/z)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	Promedio
<b>1S(-)-<math>\alpha</math>-pineno</b>	93	64 $\pm$ 2	64 $\pm$ 1	63.8 $\pm$ 0.6	66.9 $\pm$ 0.3	64.8 $\pm$ 0.2	64.9 $\pm$ 0.6	63.4 $\pm$ 0.5	63.9 $\pm$ 0.7	64.1 $\pm$ 0.1	63.6 $\pm$ 0.6	63.9 $\pm$ 0.2	64 $\pm$ 2
<b>1R(+)-<math>\alpha</math>-pineno</b>	93	36 $\pm$ 2	36 $\pm$ 1	36.2 $\pm$ 0.6	33.1 $\pm$ 0.3	35.2 $\pm$ 0.2	35.1 $\pm$ 0.6	36.6 $\pm$ 0.5	36.1 $\pm$ 0.7	35.9 $\pm$ 0.1	36.4 $\pm$ 0.6	36.1 $\pm$ 0.2	36 $\pm$ 2
<b>1S(-)-<math>\beta</math>-pineno</b>	93	57.2 $\pm$ 0.2	58 $\pm$ 1	56.5 $\pm$ 0.3	43.1 $\pm$ 0.2	50.1 $\pm$ 0.3	52.2 $\pm$ 0.1	57.0 $\pm$ 0.1	57.3 $\pm$ 0.1	57.2 $\pm$ 0.4	57.2 $\pm$ 0.1	58.3 $\pm$ 0.1	55 $\pm$ 10
<b>1R(+)-<math>\beta</math>-pineno</b>	93	42.8 $\pm$ 0.2	42 $\pm$ 1	43.5 $\pm$ 0.3	56.9 $\pm$ 0.2	49.9 $\pm$ 0.3	47.8 $\pm$ 0.1	43.0 $\pm$ 0.1	42.7 $\pm$ 0.1	42.8 $\pm$ 0.4	42.8 $\pm$ 0.1	41.7 $\pm$ 0.1	45 $\pm$ 10
<b>4S(-)-limoneno</b>	93	24 $\pm$ 1	29.8 $\pm$ 0.3	24.1 $\pm$ 0.8	14.6 $\pm$ 0.4	14.9 $\pm$ 0.5	15.8 $\pm$ 0.7	15.2 $\pm$ 0.9	18.2 $\pm$ 0.7	24 $\pm$ 2	22.5 $\pm$ 0.9	22 $\pm$ 2	20 $\pm$ 10
<b>4R(+)-limoneno</b>	93	76 $\pm$ 1	70.2 $\pm$ 0.3	75.9 $\pm$ 0.8	85.4 $\pm$ 0.4	85.1 $\pm$ 0.5	84.2 $\pm$ 0.7	84.8 $\pm$ 0.9	81.8 $\pm$ 0.7	76 $\pm$ 2	77.5 $\pm$ 0.9	78 $\pm$ 2	80 $\pm$ 10
<b>3R(-)-linalol</b>	71	45.1 $\pm$ 0.2	31 $\pm$ 2	48.2 $\pm$ 0.7	48 $\pm$ 3	48.5 $\pm$ 0.8	49 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	54 $\pm$ 4	51 $\pm$ 3	50.7 $\pm$ 0.9	50.4 $\pm$ 0.9	48 $\pm$ 12
<b>3S(+)-linalol</b>	71	54.9 $\pm$ 0.2	69 $\pm$ 2	51.8 $\pm$ 0.7	52 $\pm$ 3	51.5 $\pm$ 0.8	51 $\pm$ 3	50 $\pm$ 3	46 $\pm$ 4	49 $\pm$ 3	49.3 $\pm$ 0.9	49.6 $\pm$ 0.9	52 $\pm$ 12
<b>4S(+)-terpinen-4-ol</b>	71	36.6 $\pm$ 0.1	36 $\pm$ 2	35 $\pm$ 1	35.2*	34.2*	36.2*	36.5*	36.6*	38.9*	35.2*	30 $\pm$ 3	35 $\pm$ 4
<b>4R(-)-terpinen-4-ol</b>	71	63.4 $\pm$ 0.1	64 $\pm$ 2	65 $\pm$ 1	64.8*	65.8*	66.8*	63.5*	63.4*	61.1*	64.8*	70 $\pm$ 3	65 $\pm$ 4
<b>8S(-)-<math>\alpha</math>-terpineol</b>	59	56.8 $\pm$ 0.5	81 $\pm$ 2	76.9 $\pm$ 0.7	77.0*	73.9*	66.5*	65.9*	67.4*	62.4*	58.7*	44 $\pm$ 4	66 $\pm$ 22
<b>8R(+)-<math>\alpha</math>-terpineol</b>	59	43.2 $\pm$ 0.5	19 $\pm$ 2	23.1 $\pm$ 0.7	23.0*	26.1*	33.5*	34.1*	32.6*	37.6*	41.3*	56 $\pm$ 4	34 $\pm$ 22

**Tabla 7:** Variación en la distribución enantiomérica de monoterpenos quirales seleccionados en el perfil volátil de *B. microdonta* a lo largo de un año de muestreo. Los resultados se presentan como porcentaje del enantiómero dextrógiro y del levógiro, y fueron determinados mediante RIC (cromatograma de recuperación de iones) según los fragmentos (Fr.) típicos listados con sus respectivos valores de m/z. Referencia: (\*) en los casos marcados, se realizó una única determinación para cada enantiómero.



En las Figuras 9 a 11 se presentan los gráficos con los resultados de distribución enantiomérica de cada uno de los enantiómeros analizados a lo largo del año de estudio para cada especie.



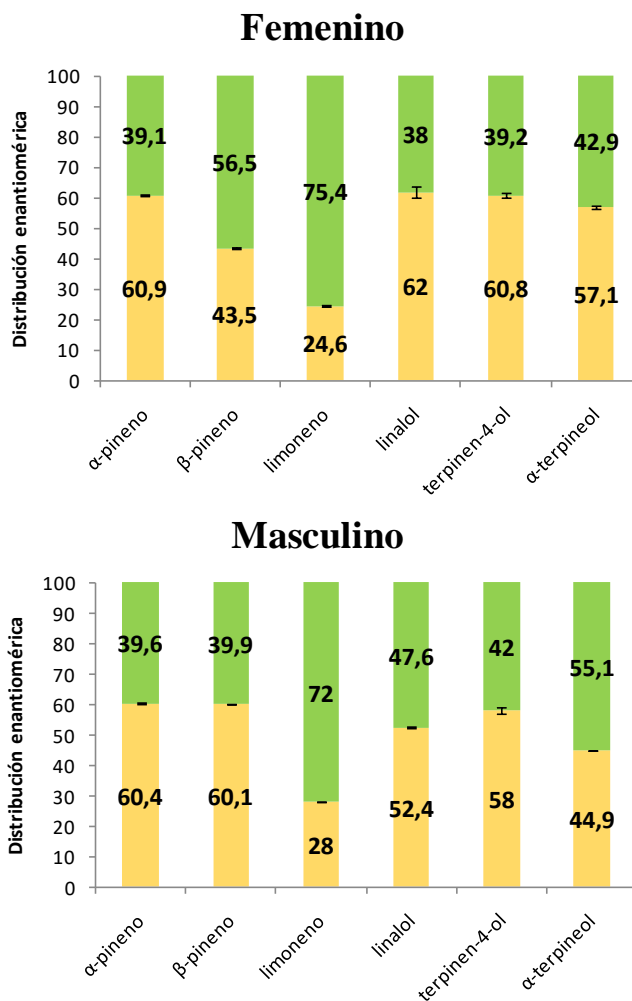
**Figura 9:** Variación de la distribución enantiomérica de los monoterpenos quirales de *B. dracunculifolia* en el período de estudio de un año en INIA-Las Brujas. Referencias: se indican las respectivas Colectas como 1-12; en amarillo se representa el enantiómero levógiro (-) y en verde el dextrógiro (+).

El estudio de la variación estacional de la distribución enantiomérica de los principales monoterpenos quirales de *B. dracunculifolia* demostró pequeñas variaciones a lo largo del período de estudio (Figura 9). Para  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, linalol y terpinen-4-ol predominó a lo largo de todo el año el enantiómero levógiro, mientras que el dextrógiro fue el mayoritario en el caso del limoneno y  $\alpha$ -terpineol (Tabla 6 y Figura 9). Es interesante, que en el caso de éste último se evidenció una variación tal que en las



Colectas No. 8 y 9 (agosto-setiembre; período de pre-floración y floración) se produjo una inversión en la distribución enantiomérica (levógiro a dextrógiro): 51/49 y 49/51, lo que puede estar relacionado con el inicio del período reproductivo (Figura 9).

Cuando se observó en detalle el análisis de la distribución enantiomérica en individuos masculinos y femeninos se encontraron diferencias relevantes (Figura 10).



**Figura 10:** Variación de la distribución enantiomérica de los monoterpenos quirales de *B. dracunculifolia* en individuos femeninos y masculinos en floración plena (Colecta No. 9). Referencia: en amarillo se representa el enantiómero levógiro (-) y en verde el dextrógiro (+).

La distribución enantiomérica del  $\beta$ -pineno y del  $\alpha$ -terpineol fue exactamente la contraria: el primero presentó una distribución (levógiro a dextrógiro) 43,5/56,5 en individuos femeninos y 60,1/39,9 en masculinos; mientras que el segundo exhibió 57,1/42,9 para las plantas hembras y 44,9/55,1 para las plantas macho (Figura 10). Este comportamiento es diferencial a lo anteriormente expuesto de igualdad en la distribución enantiomérica de los hidrocarburos monoterpénicos quirales para ambos



sexos de *B. tridentata* (capítulo 5). Para el resto de los monoterpenos quirales de *B. dracunculifolia*, si bien hubieron diferencias intersexuales, el exceso enantiomérico se presentó en el mismo sentido para ambos sexos y en concordancia con la distribución correspondiente a las plantas no sexadas de la Figura 9.

Las diferencias sexuales en la distribución enantiomérica de monoterpenos y su inversión en el tiempo han sido reportadas previamente en la literatura, y parece ser consecuencia de la necesidad de atracción diferencial de insectos polinizadores en la etapa de floración (ver capítulo 5) (Chen y Song, 2008; Pragadeesh *et al.*, 2017; Herrera *et al.*, 2018).

El análisis enantiomérico correspondiente a *B. microdonta* a lo largo del período de estudio se presenta en la Figura 11.

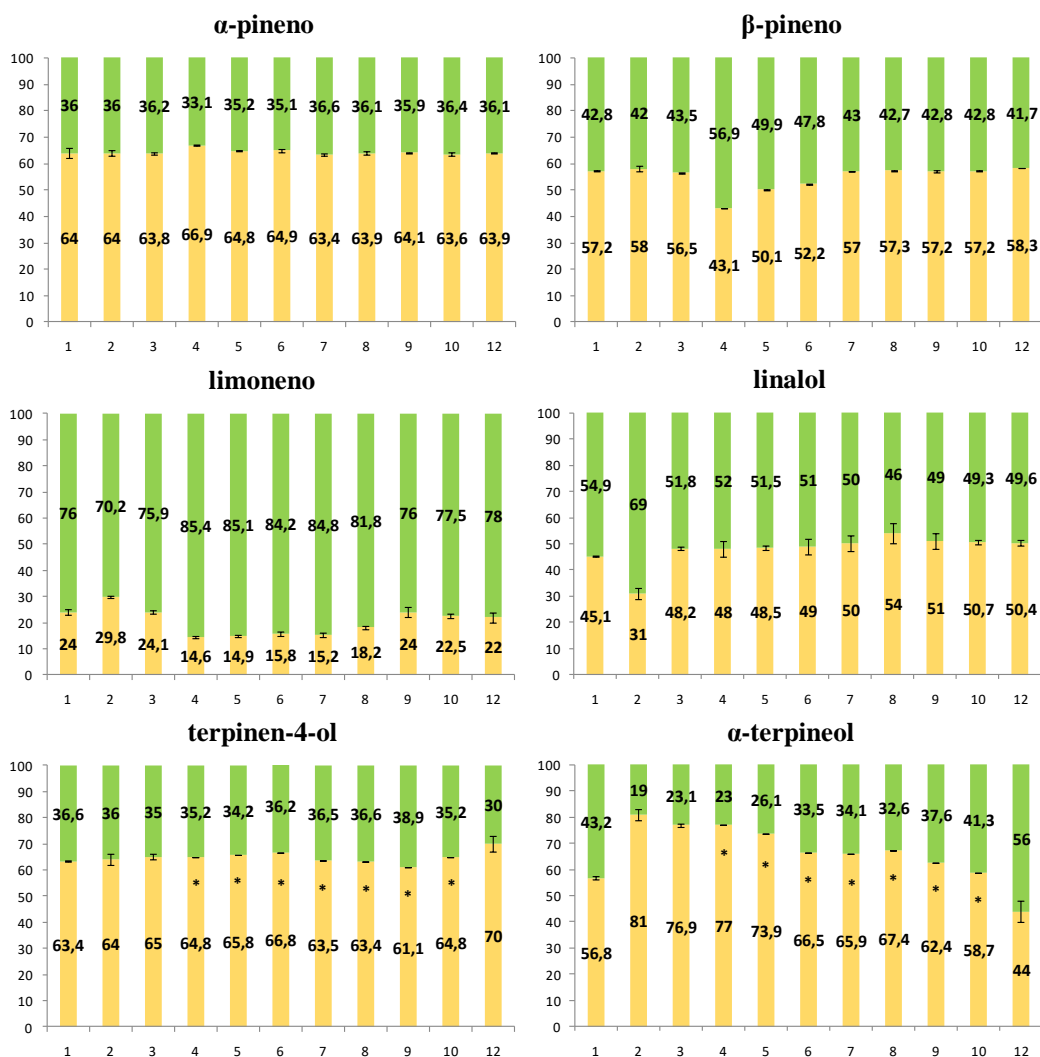


Figura 11: Variación de la distribución enantiomérica de los monoterpenos quirales de *B. microdonta* en el período de estudio de un año en INIA-Las Brujas. Referencias: se indican las respectivas Colectas



como 1-12; en amarillo se representa el enantiómero levógiro (-) y en verde el dextrógiro (+); (\*) indica que el resultado fue obtenido mediante una única evaluación.

En *B. microdonta* se observó predominancia del enantiómero levógiro para  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, terpinen-4-ol y  $\alpha$ -terpineol, mientras que el dextrógiro fue el principal enantiómero para el limoneno; en el caso del linalol se observó en la práctica la presencia de una mezcla racémica salvo para el período de máxima floración (Colecta No. 2; febrero) (Figura 11). Este último hecho podría deberse a un patrón de distribución propio para individuos masculinos y femeninos como fue detallado anteriormente para *B. dracunculifolia* (Figura 10), pero dado que el material vegetal de *B. microdonta* fue escaso no se pudo hacer una colecta sexualmente diferenciada para dilucidar apropiadamente éste punto. Inversiones de las distribuciones enantioméricas anteriormente mencionadas de *B. microdonta* fueron observadas para  $\beta$ -pineno (Colecta No. 4; abril) y  $\alpha$ -terpineol (Colecta No. 12; diciembre) (Figura 11).

Como consta en las Figuras 9 y 11, el patrón de variación en la distribución enantiomérica de ambas especies analizadas a lo largo del período de estudio fue diferente. Lo anterior no sólo se aprecia a través de diferentes cocientes levógiro/dextrógiro propios de cada especie, sino que, por ejemplo en el caso del linalol se evidenció una mezcla racémica para *B. microdonta* y un marcado exceso del enantiómero levógiro en el caso de *B. dracunculifolia* (Figuras 9 y 11). También es de interés el caso del  $\alpha$ -terpineol, que presentó exceso del enantiómero levógiro para *B. microdonta* y exceso del dextrógiro para *B. dracunculifolia* (Figuras 9 y 11). Todos éstos elementos son de importancia para una correcta diferenciación de ambas especies desde el punto de vista químico, lo que podría ser relevante para establecer la genuinidad de uno u otro aceite esencial (o extracto volátil) para su explotación económica (Tranchida *et al.*, 2011).

Comparando los resultados anteriormente mencionados con los presentados en el capítulo 5, se observó que para el  $\beta$ -pineno *B. tridentata* presentó en mayor medida el enantiómero dextrógiro, a diferencia de *B. dracunculifolia* y *B. microdonta* que fue el levógiro (Figuras 9 y 11). Por su parte, las tres especies presentaron predominancia del enantiómero levógiro del  $\alpha$ -pineno y dextrógiro del limoneno (capítulo 5 y Figuras 9 y 11). Estos resultados de distribución enantiomérica también son diferentes a los publicados para la especie *B. articulata* (capítulo 5) (Simionatto *et al.*, 2008), lo que



demuestra que cada una de ellas tiene su propio perfil de distribución como elemento característico y distinguible.

La variación de la distribución enantiomérica en las plantas y su influencia con los factores ambientales y fenológicos es aún un fenómeno escasamente reportado en la literatura. Por ejemplo, Lizarraga *et al.* (2016) encontraron variaciones en la distribución enantiomérica de monoterpenos entre individuos de una misma población de *Acanthostyles buniifolius* (Asteraceae). Sin embargo en general el exceso enantiomérico se mantiene estable (dentro de ciertos límites) a lo largo de la temporada de cultivo, como por ejemplo para algunas especies citadas en la literatura como *Alpinia zerumbet* (Zingiberaceae) (Murakami *et al.*, 2009), *Citrus deliciosa* (Rutaceae) (Frizzo *et al.*, 2004) y *Pittosporum undulatum* (Ferreira *et al.*, 2007), entre otras.

En el presente estudio no fueron percibidos variaciones de la distribución enantiomérica asociadas a la incidencia de las variables agroclimáticas, sino que las influencias fueron mayormente respecto del estado fenológico (ciclo vegetativo/reproductivo). Sin embargo, son necesarios más estudios (incluyendo nuevos análisis enantioméricos) en condiciones controladas (por ejemplo, en invernaderos) para determinar la real influencia de las variables pedoclimáticas sobre el metabolismo volátil de *B. dracunculifolia* y *B. microdonta*.

#### **4. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

A través de los resultados obtenidos se pudo constatar que la composición volátil de las especies morfológicamente similares *B. dracunculifolia* y *B. microdonta* en el sur de Uruguay (Departamento de Canelones) es cualitativamente muy similar, y que las diferencias en los perfiles volátiles se encuentran básicamente a nivel cuantitativo (donde la concentración de los compuestos individuales es de dos a diez veces mayor en el caso de la primera especie).

Cada una de las especies estudiadas presentó un patrón anual característico de concentración/emisión de compuestos volátiles, así como una distribución enantiomérica propia de los monoterpenos quirales, lo que puede ser de utilidad para la diferenciación química de las especies y para establecer estándares de genuinidad.



La aplicación de éste conocimiento podría ser de interés para el cultivo de ambas especies a nivel de pequeños productores rurales del sur de Uruguay, dada la potencialidad del aceite esencial de *B. dracunculifolia* como producto agrícola no tradicional.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. M.M. Alves. **2010**. Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata* e da *B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional. Tese de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. 69 pp.
2. K.F. Alves, F.H. Caetano, I.J.P. Garcia, H.L. Santos, D.B. Silva, J.M. Siqueira, A.S. Tanaka, S.N. Alves. **2018**. *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) essential oil toxicity to *Culex quinquefasciatus* (Culicidae). *Environ Sci Pollut Res.*, 25: 31718-31726.
3. B.Y.K. Binder, C.A.M. Peebles, J.V. Shanks, K.Y. San. **2009**. The effects of UV-B stress on the production of terpenoid indole alkaloids in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol. Prog.*, 25: 861-865.
4. M.A. Besten, V.C.G. Jasinski, A.G.L.C. Costa, D.S. Nunes, S.L. Sens, A. Wisniewski Jr., E.L. Simionatto, D. Riva, J.B. Dalmarco, D. Granato. **2012**. Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female specimens of each five *Baccharis* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, 23: 1041-1047.
5. Y.F. Boix, C.P. Victório, C.L.S. Lage, R.M. Kuster. **2010**. Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. growing in Southeast coast of Brazil. *Quim. Nova*, 33: 255-257.
6. J.C. Borella, A. Fontoura, A. Menezes Jr., S.C. França. **2001**. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) -Carqueja. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 4: 101-104.
7. J.C. Borella, D.P. Duarte, A.A.G. Novaretti, A. Menezes Jr., S.C. França, C.B. Rufato, P.A.S. Santos, R.C.S. Veneziani, N.P. Lopes. **2006**. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Braz. J. Pharmacogn.*, 16: 557-561.
8. J.M. Budel, M. Wang, V. Raman, J. Zhao, S.I. Khan, J.U. Rehman, N. Techen, B. Tekwani, L.M. Monteiro, G. Heiden, I.J.M. Takeda, P.V. Farago, I.A. Khan. **2018**. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. *Molecules*, 23: 2620: 1-19.
9. S. Cañigüeral, E. Dellacassa, A. Bandoni. **2003**. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farm. Bonaerense*, 22: 265-278.
10. P. Casati, V. Walbot. **2005**. Differential accumulation of maysin and rhamnosyl isoorientin in leaves of high-altitude landraces of maize after UV-B exposure. *Plant Cell Environ.*, 28: 788-799.
11. E. Cassel, C.D. Frizzo, R. Vanderlinde, L. Atti-Serafini, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2000**. Extraction of *Baccharis* oil by supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 39: 4803-4805.
12. H.G. Castro, V.W.D. Casali, L.C.A. Barboza, P.R. Cecon. **1999**. Rendimento de tanino em dois acessos de carqueja (*Baccharis myriocephala* DC.) em diferentes épocas de colheita em Viçosa-MG. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 1: 29-33.
13. L.N. Cazella, J. Glamoclija, M. Soković, J.E. Gonçalves, G.A. Linde, N.B. Colauto, Z.C. Gazim. **2019**. Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. *Front Plant Sci.*, 10: 1-9.
14. A. Chaaban, C.E.N. Martins, L.C. Bretanha, G.A. Micke, A.R. Carrer, N.F. Rosa, L. Ferreira, M.B. Molento. **2018**. Insecticide activity of *Baccharis dracunculifolia* essential oil against *Cochliomyia macellaria* (Diptera: Calliphoridae). *Nat. Prod. Res.*, 32: 2954-2958.
15. C. Chen, Q. Song. **2008**. Responses of the pollinating wasp *Ceratosolen solmsi marchali* to odor variation between two floral stages of *Ficus hispida*. *J. Chem. Ecol.*, 34: 1536-1544.
16. L.F. De Filippis. Plant secondary metabolites: from molecular biology to health products. **2016**. In: M.M. Azooz, P. Ahmad (eds.) Plant-environment interaction. Responses and approaches to mitigate stress. John Wiley & Sons; pp. 263-299.
17. J.P.B. de Sousa, R.F. Jorge, M.F. Leite, N.A.J.C. Furtado, J.K. Bastos, A.A. da Silva Filho, C.L. Queiroga, P.M. de Magalhães, A.E.E. Soares. **2009**. Seasonal variation of the (*E*)-nerolidol and other



- volatile compounds within ten different cultivated populations of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). *J. Essent. Oil Res.*, 21: 308-314.
18. J.P.B. de Sousa, M.F. Leite, R.F. Jorge, D.O. Resende, A.A. da Silva Filho, N.A.J.C. Furtado, A.E.E. Soares, A.C.C. Spadaro, P.M. de Magalhães, J.K. Bastos. **2011**. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, Article ID 464289.
  19. H.C. Dias de Santana. **2013**. Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal. Tese de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, Brasil. 73 pp.
  20. N. Dudareva, A. Klempien, J.K. Muhlemann, I. Kaplan. **2013**. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytol.*, 198: 16–32.
  21. M.M. Espírito-Santo, G.W. Fernandes, L.R. Allain, T.R.F. Reis. **1999**. Tannins in *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae): Effects of seasonality, water availability and plant sex. *Acta Bot. Bras.*, 13: 167-174.
  22. M.M. Espírito-Santo, B.G. Madeira, F.S. Neves, M.L. Faria, M. Fagundes, G.W. Fernandes. **2003**. Sexual differences in reproductive phenology and their consequences for the demography of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae), a dioecious tropical shrub. *Ann. Bot.*, 91: 13-19.
  23. K.C. Fabiane, R. Ferronato, A.C. dos Santos, S.B. Onofre. **2008**. Physicochemical characteristics of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Braz. J. Pharmacogn.*, 18: 197-203.
  24. F. Faini, C. Labbé, J. Coll. **1999**. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 27: 673-679.
  25. V.L. Ferracini, L.C. Paraiba, H.F. Leitão Filho, A.G. da Silva, L.R. Nascimento, A.J. Marsaioli. **1995**. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* Species. *J. Essent. Oil Res.*, 7: 355-367.
  26. N.J. Ferreira, I.G.M. de Sousa, T.C. Luís, A.J.M. Currais, A.C. Figueiredo, M.M. Costa, A.S.B. Lima, P.A.G. Santos, J. G. Barroso, L.G. Pedro, J.J.C. Scheffer. **2007**. *Pittosporum undulatum* Vent. grown in Portugal: secretory structures, seasonal variation and enantiomeric composition of its essential oil. *Flavour Fragr. J.*, 22: 1-9.
  27. A.C. Figueiredo, J.G. Barroso, L.G. Pedro, J.J.C. Scheffer. **2008**. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.*, 23: 213-226.
  28. A. Florão, J.M. Budel, M.d.R. Duarte, A. Marcondes, R.A.F. Rodrigues, M.V.N. Rodrigues, C.A.d.M. Santos, A.M. Weffort-Santos. **2012**. Essential oils from *Baccharis* species (Asteraceae) have anti-inflammatory effects for human cells. *J. Essent. Oil Res.*, 24: 561-570.
  29. C.D. Frizzo, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2004**. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 3036-3041.
  30. C.D. Frizzo, L. Atti-Serafini, S.E. Laguna, E. Cassel, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2008**. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour Fragr. J.*, 23: 99-106.
  31. P. Gautreau, F. Lezama. **2009**. Clasificación florística de los bosques y arbustales de las sierras del Uruguay. *Ecol. Aust.*, 19: 81-92.
  32. D.A. Giuliano. **2001**. Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae). *Darwiniana*, 39: 131-154.
  33. L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes. **2007**. Plantas Medicináis: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*, 30: 374-381.
  34. F. Haider, N. Kumar, S. Banerjee, A.A. Naqvi, G.D. Bagchi. **2009**. Effect of altitude on the essential oils constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser var. *purpurascens* (Jacq.) Hook. *J. Essent. Oil Res.*, 21: 303-304.
  35. C. He, F. Murray, T. Lyons. **2000**. Seasonal variations in monoterpene emissions from *Eucalyptus* species. *Chemosphere*, 2: 65-76.
  36. C. Herrera, V. Morocho, G. Vidari, C. Bicchi, G. Gilardoni. **2018**. Phytochemical investigation of male and female *Hedyosmum scabrum* (Ruiz & Pav.) Solms leaves from Ecuador. *Chem. Biodiversity*, 15: e1700423: 1-9.
  37. V.A. Hilder, A.M.R. Gatehouse, S.E. Sheerman, R.F. Barker, D. Boulter. **1987**. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature*, 330: 160-163.
  38. M. Höft, R. Verpoorte, E. Beck. **1996**. Growth and alkaloid contents in leaves of *Tabernaemontana pachysiphon* Stapf (Apocynaceae) as influenced by light intensity, water and nutrient supply. *Oecologia*, 107: 160-169.
  39. G.A Howe, G. Jander. **2008**. Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 41-66.





40. F. Ibáñez, R. Zoppolo. **2011**. Assessment of allelopathic properties of *Baccharis dracunculifolia* DC in laboratory and field conditions. *Allelopathy J.*, 28: 77-86.
41. M.J. Jaffe, F.W. Telewski, P.W. Cooke PW. **1984**. Thigmomorphogenesis: on the mechanical properties of mechanically perturbed bean plants. *Physiol Plant.*, 62: 73-78.
42. F.C. Klopell, M. Lemos, J.P.B. Sousa, E. Comunello, E.L. Maistro, J.K. Bastos, S.F. de Andrade. **2007**. Nerolidol, an antiulcer constituent from the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Z. Naturforsch.*, 62c: 537-542.
43. T.C.dA. Lage, R.M. Montanari, S.A. Fernandes, C.M.dO. Monteiro, T.dO.S. Senra, V. Zeringota, R. dS.Matos, E. Daemon. **2015**. Chemical composition and acaricidal activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* De Candolle (1836) and its constituents nerolidol and limonene on larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Parasitol.*, 148: 24-29.
44. J.H.G. Lago, P. Romoff, O.A. Favero, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Correa, F.O. Souza. **2008**. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “Campos de altitude” da Mata Atlântica Paulista. *Quim. Nova*, 31: 727-730.
45. W. Letchamo. **1986**. Effect of trace elements on cardiac glycosides accumulation in *Digitalis grandiflora*. *Planta Med.*, 52: 421-421.
46. E. Lizarraga, M. Minteguiaga, M.L. Guerra, J.M. Garrido, C.A.N. Catalán. **2016**. Aceite Esencial de *Acanthostyles buniifolius* (Asteraceae) de la provincia de Tucumán. Variación estacional, interindividual y composición enantiomérica de los monoterpenoides. *Dominguezia*, 32: 93-94.
47. I. Loayza, D. Abujder, R. Aranda, J. Jakupovic, G. Collin, H. Deslauriers, F.I. Jean. **1995**. Essential oils of *Baccharis salicifolia*, *B. latifolia* and *B. dracunculifolia*. *Phytochemistry*, 38: 381-389.
48. H.A. Martinez-Correa, F.A. Cabral, P.M. Magalhães, C.L. Queiroga, A.T. Godoy, A.P. Sánchez-Camargo, L.C. Paviani. **2012**. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. *J. Supercrit. Fluids*, 63: 31-39.
49. J.J. Massignani, M. Lemos, E.L. Maistro, H.P. Schaphauser, R.F. Jorge, J.P.B. Sousa, J.K. Bastos, S.F. de Andrade. **2009**. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. *Phytother. Res.*, 23: 1355-1360.
50. S. Murakami, W. Li, M. Matsuura, T. Satou, S. Hayashi, K. Koike. **2009**. Composition and seasonal variation of essential oil in *Alpinia zerumbet* from Okinawa Island. *J. Nat. Med.*, 63: 204-208.
51. MVOTMA (Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente de Uruguay). **2014**. Informe del estado del ambiente de Uruguay 2013. MVOTMA, Montevideo, Uruguay. 259 pp.
52. D. Negreiros, D. Esteves, G.W. Fernandes, R.L.L. Berbara, Y. Oki, M. Vichiato, C. Chalub. **2014**. Growth-survival tradeoff in the widespread tropical shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) in response to a nutrient gradient. *Trop. Ecol.*, 55: 167-176.
53. J. Palá-Paúl, M.J. Pérez-Alonso, A. Velasco-Negueruela, R. Palá-Paúl, J. Sanz, F. Conejero. **2001**. Seasonal variation in chemical constituents of *Santolina rosmarinifolia* L. ssp. *rosmarinifolia*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 29: 663-672.
54. N.A. Parreira, L.G. Magalhães, D.R. Morais, S.C. Caixeta, J.P.B. de Sousa, J.K. Bastos, W.R. Cunha, M.L.A. Silva, N.P.D. Nanayakkara, V. Rodrigues, A.A. da Silva Filho. **2010**. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem. Biodiversity*, 7: 993-1001.
55. V.S. Pragadheesh, C.S. Chanotiya, S. Rastogi, A.K. Shasany. **2017**. Scent from *Jasminum grandiflorum* flowers: Investigation of the change in linalool enantiomers at various developmental stages using chemical and molecular methods. *Phytochemistry*, 140: 83-94.
56. C.L. Queiroga, A. Fukai, A.J. Marsaioli. **1990**. Composition of the essential oil of Vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.*, 1: 105-109.
57. C.L. Queiroga, J.K. Bastos, J.P.B. de Sousa, P.M. de Magalhães. **2008**. Comparison of the chemical composition of the essential oil and the water soluble oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). *J. Essent. Oil Res.*, 20: 111-114.
58. A. Ramakrishna, G.A. Ravishankar. **2011**. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal. Behav.*, 6: 1720-1731.
59. D. Rosemann, W. Heller, H. Sandermann. **1991**. Biochemical plant responses to ozone II. Induction of stilbene biosynthesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Plant Physiol.*, 97: 1280-1286.
60. G.J.T. Salazar, J.P. de Sousa, C.N.F. Lima, I.C.S. Lemos, A.R.P. da Silva, T.S. de Freitas, H.D.M. Coutinho, L.E. da Silva, W. do Amaral, C. Deschamps. **2018**. Phytochemical characterization of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) essential oil and antibacterial activity evaluation. *Ind. Crops. Prod.*, 122: 591-595.



61. V.A. Sayuri, P. Romoff, O. A. Fávero, M.J.P. Ferreira, J.H.G. Lago, F.O.S. Buturi. **2010**. Chemical composition, seasonal variation and biosynthetic considerations of essential oils from *Baccharis microdonta* and *B. elaeagnoides* (Asteraceae). *Chem. Biodiversity*, 7: 2771-2782.
62. T.J. Schmidt, U. Bomme, A.W. Alfermann. **1998**. Sesquiterpene lactone content in leaves of *in vitro* and field cultivated *Arnica montana*. *Planta Med.*, 64: 268-270.
63. P. Schossler, G.L. Schneider, D. Wunsch, G.L.G. Soares, C.A. Zini. **2009**. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20: 277-287.
64. F.G. Silva, A.H. Januário, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, W.S. Barizan, J.F. Sales, S.C. França. **2006**. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8: 19-25.
65. F.G. Silva, C.B.A. Oliveira, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, S.C. Santos, J.C. Seraphin, P.H. Ferri. **2007a**. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18: 990-997.
66. F.G. Silva, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, J.F. Sales, E.L. Souchie, S.K.V. Bertolucci. **2007b**. Seasonal variation in the total phenol contents in cultivated and wild carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 9: 52-57.
67. E. Simionatto, V. Ilha, A.S. Mallmann, C. Porto, I. I. Dalcol, A.F. Morel. **2008**. Chemical composition and antimicrobial activity of the volatile oil from *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. *J. Essent. Oil Res.*, 20: 366-368.
68. B.S. Simpson. **2013**. Dioecy in plants – is it an important factor for phytochemists to consider?. *Planta Med.*, 79: 613-615.
69. I.A. Southwell, C.A. Bourke. **2001**. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort). *Phytochemistry*, 56: 437-441.
70. T. Stuhlfauth, H.P. Fock. **1990**. Effect of whole season CO<sub>2</sub> enrichment on the cultivation of a medicinal plant, *Digitalis lanata*. *J. Agron. Crop Sci.* 164: 168-173.
71. B.N. Timmermann, C. Steelink, F.A. Loewus. **1984**. Recent Advances in phytochemistry. phytochemical adaption to stress. Springer Science and Business Media, New York. 334 pp.
72. G. Tiscornia, A. Cal, A. Giménez. **2016**. Análisis y caracterización de la variabilidad climática en algunas regiones de Uruguay. *RIA. Rev. Investig. Agropecu.*, 42: 66-71.
73. P.Q. Tranchida, L. Mondello, I. Bonaccorsi, G. Dugo. **2012**. Analysis of *Citrus* essential oils: state of the art and future perspectives. A review. *Flavour Fragr. J.*, 27: 98-123.
74. M.G. de Vasconcelos Silva, A.A. Craveiro, F.J. Abreu Matos, M.I.L. Machado, J.W. Alencar. **1999**. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. *Fitoterapia*, 70: 32-34.
75. F. Vázquez-Flota, M. Carrillo-Pech, Y. Minero-García, M.d.L. Miranda-Ham. **2004**. Alkaloid metabolism in wounded *Catharanthus roseus* seedlings. *Plant Physiol. Biochem.*, 42: 623-628.
76. B. Voirin, N. Brun, C. Bayet. **1990**. Effects of daylength on the monoterpene composition of leaves of *Mentha x piperita*. *Phytochemistry*, 29: 749-755.
77. T.E. Wallaart, N. Pras, A.C. Beekman, W.J. Quax. **2000**. Seasonal variation of artemisinin and its biosynthetic precursors in plants of *Artemisia annua* of different geographical origin: proof for the existence of chemotypes. *Planta Med.*, 66: 57-62.
78. P. Weyerstahl, C. Christiansen, H. Marschall. **1996**. Constituents of Brazilian vassoura oil. *Flavour Fragr. J.*, 11: 15-23.
79. B. Winkel-Shirley. **2002**. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr. Op. Plant Biol.*, 5: 218-223.
80. V.B. Xavier, R.M.F. Vargas, E. Cassel, A.M. Lucas, M.A. Santos, C.A. Mondin, E.R. Santarem, L.V. Astarita, T. Sartor. **2011**. Mathematical modelling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crops Prod.*, 33: 599-604.
81. C. Zidorn, H. Stuppner. **2001**. Evaluation of chemosystematic characters in the genus *Leontodon* (Asteraceae). *Taxon*, 50: 115-133.



## Capítulo 7

### Evaluación biotípica y quimiotípica de *Baccharis trimera* (Less.) DC.

**Resumen:** En los capítulos anteriores de ésta tesis se trabajó sobre el volatilo de *Baccharis* spp. L. realizando colectas sobre una misma población en una única (capítulos 3-5) o diferentes épocas del año (capítulo 6). Sin embargo, para evaluar la existencia de variaciones intraespecíficas, se debe hacer un análisis sobre diferentes poblaciones dentro de la región geográfica de ocurrencia de la especie bajo estudio. En éste capítulo se discutirán primeramente algunos conceptos de variación intraespecífica de las especies vegetales, y a continuación se presentará a la Microscopía Analítica como una herramienta diagnóstica de utilidad para evaluar dicha variación. Empleando ésta técnica, se presentará posteriormente un análisis morfo-anatómico e histoquímico detallado del biotipo de una población de *Baccharis trimera* (Less.) DC. tomada como referencia (Estación Porvenir, Departamento de Paysandú, Uruguay). Para ésta, se presentarán además los resultados de un exhaustivo análisis de la composición del aceite esencial (por fraccionamiento mediante cromatografía en columna y análisis por GC-MS), y un análisis primario de la composición no volátil. Posteriormente, se describirá la composición volátil obtenida por GC-MS de varias poblaciones de *B. trimera* colectadas en diferentes localidades de Uruguay y del sur de Brasil. Con los datos anteriores (y otros resultados anteriormente publicados para la especie), se expondrá una clasificación quimiotaxonómica multivariada, con el objetivo de clasificar quimiotipos dentro de las poblaciones estudiadas. Finalmente, se concluyó que todas las poblaciones de Uruguay pertenecerían al mismo quimiotipo, el que se caracteriza por un alto contenido de acetato de carquejilo.

#### 1. INTRODUCCION

##### 1.1 Variación intraespecífica en plantas

Como consecuencia de la evolución orgánica de las plantas no existen dos individuos iguales, sin embargo, a lo largo del proceso evolutivo se han formado “tipos” que dieron origen a las divisiones, órdenes, familias, tribus, géneros y especies; las que se conocen



actualmente como categorías taxonómicas (Stebbins, 1950; Kenrick y Crane, 1997). Las mismas pueden ser reconocidas en la naturaleza porque miembros del mismo “tipo” se parecen más entre sí que a miembros de otra categoría, lo cual es la base de la Taxonomía y Sistemática (Stebbins, 1950; Kenrick y Crane, 1997; Pietra, 2002). Sin embargo, desde hace más de 100 años el empleo de “tipos” en categorías inferiores a especie ha sido confuso, usándose de manera más o menos indiscriminada los términos: variedades, razas, líneas puras, clones, biotipos, genotipos, ecotipos, epitipos, fenotipos y quimiotipos (Shull, 1912; Stebbins, 1950; Quinn 1978; Hufford y Mazer, 2003).

En los ambientes naturales, las especies vegetales suelen agruparse en poblaciones más o menos homogéneas, dentro de las cuales existe cierto patrón de variación, por ejemplo: en la altura de la planta, tamaño y color de las hojas y flores, disposición de las ramas, tipo de corteza, etc.; cada uno de los cuales caracteriza estrictamente una forma biotípica o fenotípica (Stebbins, 1950; Sultan, 2000). Por tanto, un biotipo o fenotipo se define como una morfología vegetal más o menos idéntica (dentro de ciertos límites arbitrarios) exhibida por un individuo o un grupo de individuos y sus con-específicos (Stebbins, 1950; Sultan, 2000).

La definición operacional de biotipo/fenotipo se encuentra indisolublemente asociada a la visualización, medición y evaluación de las características morfológicas, ya sea directamente o a través de microscopía (Sultan, 2000). La existencia de un biotipo/fenotipo se encuentra condicionado a dos fuentes de variación: una intrínseca (material genético) y otra extrínseca (condiciones ambientales) (Stebbins, 1950; Sultan, 2000). De acuerdo a ésta definición, una población puede estar formada por uno o más biotipos, y poblaciones diferentes en general tienen diferentes biotipos, lo que depende de la especie considerada (Stebbins, 1950; Sultan, 2000).

Cuando la información genética entre individuos es más o menos uniforme (nuevamente dentro de ciertos límites prefijados), se establece la existencia de un genotipo (Sultan, 2000; Desjardins, 2008). Como definición operacional, la existencia de genotipos debe ser comprobada a través de métodos de biología molecular (Desjardins, 2008).

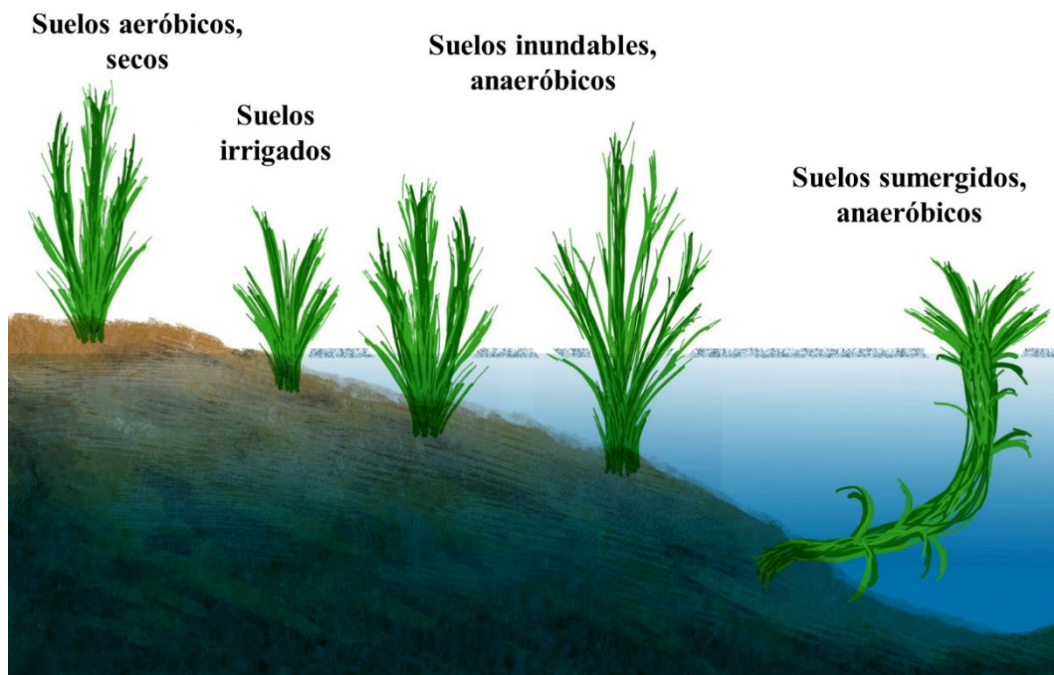
Dado que la existencia de biotipos tiene una dependencia en los factores ambientales, desde una perspectiva ecológica se considera que las especies que tienen una amplia área de distribución también poseen un alto número de aquellos y posiblemente también de genotipos (Hufford y Mazer, 2003; Stebbins, 2013). Consecuentemente, se denomina plasticidad a la capacidad de las especies de desarrollarse en una variedad de



nichos ecológicos, lo que determina la definición de ecotipo (Sultan, 2000; Hufford y Mazer, 2003; Stebbins, 2013).

La definición operacional de ecotipo involucra un biotipo o genotipo adaptado a ciertas condiciones ecológicas, por lo que no sólo hay que considerar la evaluación morfológica de las plantas sino también las variables ecosistémicas en que éstas se desarrollan (Hufford y Mazer, 2003; Stebbins, 2013). Debido a éstas características, el concepto de ecotipo es marginalmente empleado en ecología vegetal ya que no representa una unidad evolutiva (Quinn, 1978).

Para ilustrar la ocurrencia de ecotipos, se recurrirá al “arroz” (*Oryza sativa*, Poaceae) que es un cultivo que puede desarrollarse desde el nivel del mar hasta los 3000 m de altura en las montañas de Nepal y Bután (Mac Lean *et al.*, 2002). El arroz crece en una variedad de suelos, con diferentes texturas, regímenes hidrológicos y disponibilidad de oxígeno: desde los suelos aeróbicos en los casos de las tierras altas hasta los suelos completamente sumergidos y anaeróbicos (Figura 1) (Mac Lean *et al.*, 2002).



**Figura 1:** Ecotipos de arroz y su relación con el régimen hídrico y tipo de suelo en que las plantas se desarrollan. Fuente: A.M. Ismail, <http://pia-dev.mgmt.science.uq.edu.au/content/case-study-181-rice-ecotypes-and-systems>.

El caso del arroz demuestra la plasticidad de *Oryza* spp. y sus ecotipos, y refleja un metabolismo adaptable a las condiciones ambientales. Por ejemplo, en condiciones de suelos sumergidos, las plantas producen mayor cantidad de hormonas (etileno y



giberelinas) que provocan que la altura sea mayor, que tenga una mayor cantidad de tallos y que los mismos puedan flotar (Figura 1) (Mac Lean *et al.*, 2002; Mohapatra *et al.*, 2011).

Por último, el concepto de quimiotipo (a veces llamado “raza química”) involucra individuos dentro de una misma especie que contienen una composición química diferencial, siendo por tal necesarios métodos químicos para determinar tal definición (Wink y Waterman, 1999; Desjardins, 2008). Históricamente, los monoterpenos y sesquiterpenos presentaron las primeras evidencias de la existencia de éste “tipo”, pero la existencia de quimiotipos también puede ser consecuencia de una composición diferencial de metabolitos no volátiles (Wink y Waterman, 1999). Es interesante notar que en una población de una especie dada puede haber más de un quimiotipo, lo que indica que la influencia del ambiente sobre los mismos es parcial, y que también existe un componente genético (Wink y Waterman, 1999; Ložiene y Venskutonis, 2005). Sin embargo, algunas plantas (por ejemplo, *Thymus pulegioides*, Lamiaceae) pueden modificar la composición química si las mismas son recolectadas en la naturaleza y domesticadas, indicando que el quimiotipo no es un “tipo” estable sino que depende fuertemente de los factores ambientales a que la planta se encuentra expuesta *in natura* (Ložiene y Venskutonis, 2005).

Por éstas razones es imperioso basarse en las definiciones operacionales y considerar al concepto de quimiotipo como independiente del de biotipo/fenotipo, genotipo o ecotipo, ya que todos constituyen diferentes dimensiones de la variabilidad intraespecífica (Ložiene y Venskutonis, 2005; Desjardins, 2008).

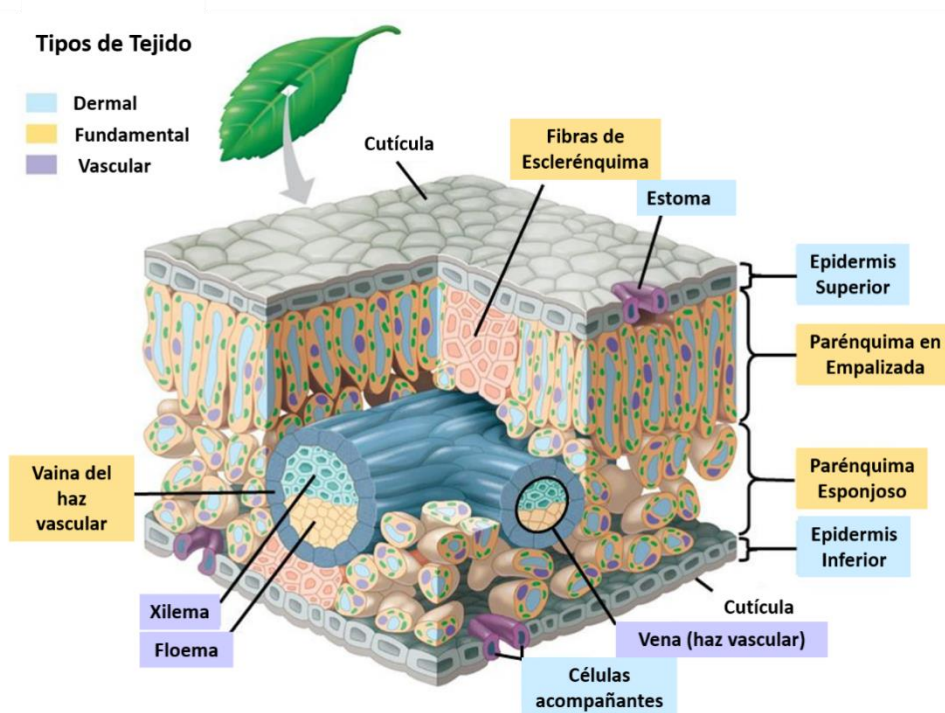
## 1.2 Microscopía analítica e histoquímica

En Farmacognosia, el análisis microscópico de los materiales de interés farmacéutico tiene una larga tradición para la caracterización e identificación del material botánico de acuerdo a su micro-anatomía (Kamboj, 2012; Saukel y Ginko, 2014). Debido a las características visuales de éste análisis, hasta el presente constituye la metodología más rápida y más económica para el control de calidad de los materiales herbarios en bruto (Kamboj, 2012; Saukel y Ginko, 2014). Para realizar éste tipo de análisis es imprescindible contar con un microscopio óptico, aunque actualmente es posible el análisis por medio de microscopios electrónicos sofisticados, que permiten una



identificación más precisa del material vegetal y sus micro-estructuras (Saukel y Ginko, 2014).

Bajo éste tipo de análisis se pueden visualizar los diferentes tejidos vegetales y sus células componentes, los que se diferencian en: tejidos dermales (la capa externa protectora de las plantas: epidermis y peridermis), tejidos vasculares (encargados del transporte y distribución de nutrientes y agua: floema y xilema) y tejidos fundamentales (tejidos de soporte y almacenamiento: colénquima, esclerénquima y parénquima) (Saukel y Ginko, 2014; Shipunov, 2017). En dicha clasificación, las estructuras secretoras (algunas de las cuales contienen los aceites esenciales) no son consideradas, debido a que las mismas se encuentran presentes en diversos órganos de la planta y no forman un tejido definido (Fahn, 1988; Lange y Turner, 2013; Saukel y Ginko, 2014). En la Figura 2 se muestran los diferentes tipos de tejidos vegetales ilustrados para el caso de la hoja.



**Figura 2:** Tejidos vegetales dermales, fundamentales y vasculares. Fuente: Pearson Education; <https://www.pearson.com/uk/>

Como puede verse en la Figura 2, el tejido de almacenamiento (parénquima) se puede subdividir en esponjoso y en empalizada, dependiendo de la organización de las células en el mesófilo de la hoja; en ambos tipos se encuentran los cloroplastos con función



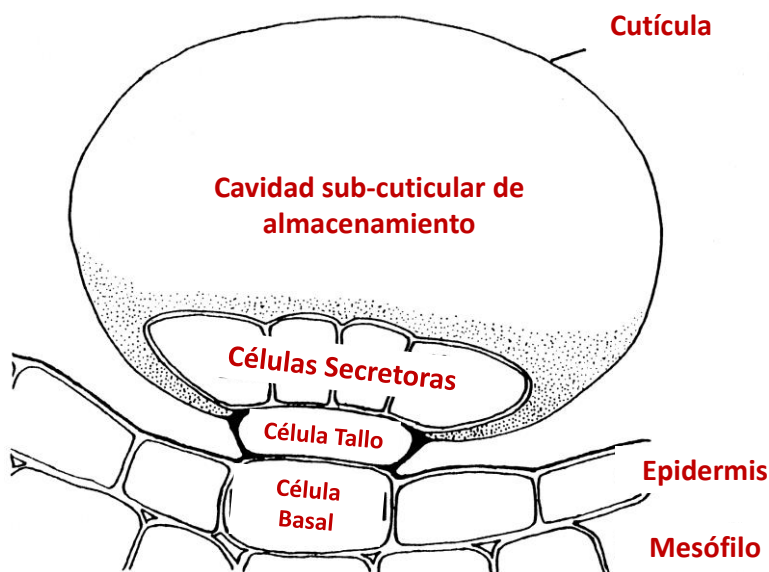
fotosintética (Saukel y Ginko, 2014; Shipunov, 2017). Las diferencias en la distribución de los tejidos vegetales entre los diferentes órganos derivan de la posición relativa del tejido fundamental y del vascular en los mismos (Saukel y Ginko, 2014; Shipunov, 2017).

El tipo de células (tamaño, forma y grosor de pared) que conforman la epidermis tienen carácter diagnóstico específico en Microscopía Analítica, así como es importante la disposición de la cutícula cerosa (Saukel y Ginko, 2014). Las células estomáticas (especializadas en el intercambio gaseoso en la hoja), sus células acompañantes, y especialmente los tricomas (pelos glandulares o no glandulares) también son de gran valía para la clasificación taxonómica, existiendo un vocablo especializado para describir la variedad de estructuras que se encuentran presentes en las plantas (Lange y Turner, 2013; Saukel y Ginko, 2014).

Los tricomas glandulares (estructura secretoras externas) son pelos epidérmicos con distribución más o menos uniforme sobre la superficie de las hojas (Turner *et al.*, 2000; Saukel y Ginko, 2014; Lange y Turner, 2013). Los mismos contienen células especializadas en funciones metabólicas, usualmente la biosíntesis y secreción de néctar, cristales, mucílagos, resinas, lípidos, enzimas digestivas y metabolitos secundarios defensivos como los aceites esenciales (Figura 3) (Fahn, 1988; Turner *et al.*, 2000; Saukel y Ginko, 2014; Lange y Turner, 2013). Estos apéndices especializados se encuentran ampliamente distribuidos en las dicotiledóneas, teniendo especial importancia taxonómica en las Asteraceae, en la clasificación a nivel de tribus y de especies (Metcalf y Chalk, 1972).

Anatómicamente, los tricomas glandulares consisten de un grupo de células secretoras en el ápice y una base (células tallo) de una o más células de ancho, en general suberizadas cuya función es estructural (Figura 3) (Turner *et al.*, 2000; Saukel y Ginko, 2014). Además, existe una fina cutícula que cubre las células secretoras, la que forma un reservorio sub-cuticular de almacenamiento en el que las secreciones se acumulan (Turner *et al.*, 2000; Lange y Turner, 2013; Saukel y Ginko, 2014).

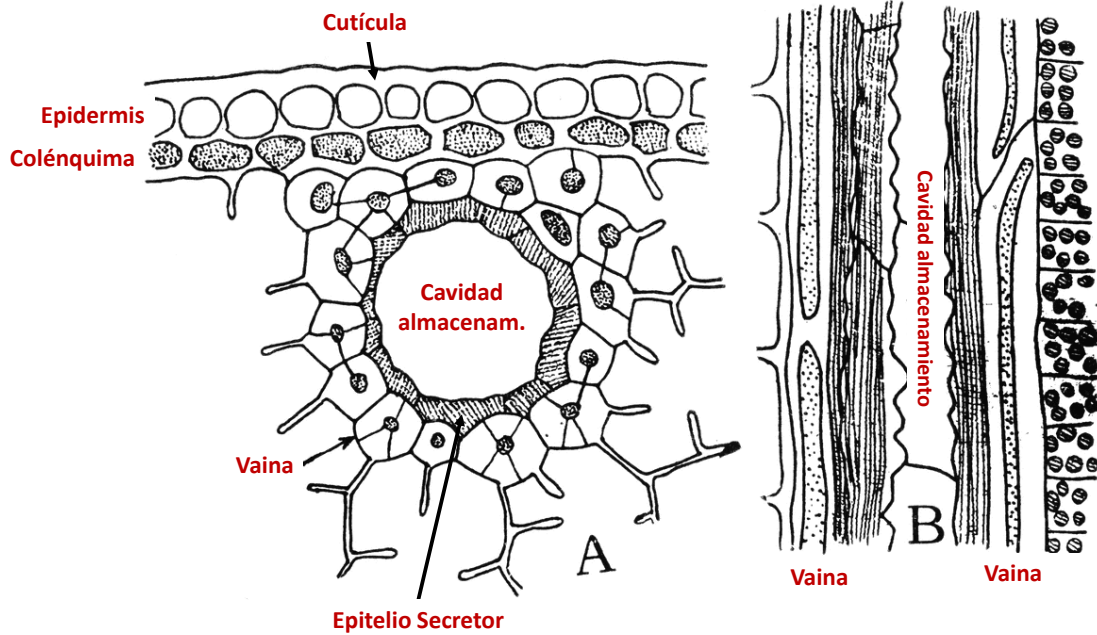




**Figura 3:** Estructura de un tricoma glandular del tipo peltado, productor y almacenador de aceites esenciales (*Mentha x piperita*). Obsérvese que las células del tallo en general tienen paredes más gruesas (suberizadas). Fuente: Turner et al. (2000).

Las células secretoras se caracterizan por poseer núcleos grandes y abundancia de retículo endoplásmico liso, plástidos (leucoplastos) y ribosomas, dando cuenta de una importante actividad metabólica (Lange y Turner, 2013). Por ejemplo, se ha constatado que la velocidad de síntesis de terpenos dentro de tricomas glandulares de *Mentha x piperita* (Lamiaceae) es de  $1,8 \text{ fmol}/\mu\text{m}^2/\text{h}$ , lo que implica que una célula secretora podría producir su propio volumen de aceite esencial en 25 horas de actividad metabólica (Lange y Turner, 2013).

Por otra parte, las estructuras secretoras internas pueden variar desde simples idioblastos (células aisladas que almacenan aceites, mucílagos, cristales taninos, etc.) a estructuras mayores como canales secretores, cavidades o laticíferos (Stevens, 1924; Saukel y Ginko, 2014; Shipunov, 2017). Estas estructuras son frecuentes en las Asteraceae, pudiendo tener uno o más estratos de células epiteliales (con función secretora) rodeando la cavidad central junto con una banda suberizada que impide la fuga del contenido secretado (Figura 4) (Stevens, 1924; Fahn, 1988). Los canales secretores a su vez pueden ser del tipo lisígeno (la cavidad se forma por lisis celular) o esquizógeno (la cavidad se forma por la dilatación de los espacios intercelulares), dependiendo del proceso que les dio origen (Stevens, 1924; Saukel y Ginko, 2014; Shipunov, 2017).



**Figura 4:** Estructura de un canal esquizógeno productor y almacenador de aceites esenciales (*Pinus sylvestris*, Pinaceae) en sección transversal (A) y longitudinal (B). Las células del epitelio secretor se disponen en un ciclo, y se encuentran rodeadas de una vaina de fibras suberizadas. Fuente: Stevens (1924).

En la identificación y caracterización de un material vegetal por Microscopía Analítica, es usual que se realicen tinciones con diferentes reactivos, de manera de poder tener una idea primaria de la composición del tejido, lo que se conoce como histoquímica (Pearse, 1953). Lo anterior es particularmente útil cuando se trabaja con sustancias que se encuentran compartimentalizadas (ejemplo de tricomas y canales secretores), como es el caso de los aceites esenciales, taninos, mucílagos, almidón, quinonas, oxalato de calcio, etc. (Pearse, 1953; Saukel y Ginko, 2014). En éste trabajo de tesis fue empleada en histoquímica la tinción con  $\text{FeCl}_3$  para la detección de polifenoles, Nadi (solución de naftol y diamina) para aceites esenciales, y Sudan IV para lípidos; aunque existe una gran diversidad de reactivos para diferentes tipos de compuestos (Pearse, 1953; Saukel y Ginko, 2014).

Debido a que existen controversias con respecto a la correcta clasificación de las especies de *Baccharis* L. de la sección Caulopterae (“carquejas”) (capítulos 1 y 4), la morfo-anatomía del género ha sido investigada con objetivos de identificación taxonómica, el control de calidad de la droga vegetal y la evaluación biotípica de las especies (Ariza-Espinar, 1973; Cortadi *et al.*, 1999; Budel y Duarte, 2009; Rodriguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018).



Los estudios previos existentes en la literatura diferencian los caracteres morfo-anatómicos de *B. trimera* y de otras especies relacionadas como: *B. articulata* (Lam.) Pers. (Cortadi *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2018), *B. gaudichaudiana* DC. (Budel *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018), *B. crispa* Spreng. (Cortadi *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2018), *B. microcephala* (Less.) DC. (Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018), *B. cylindrica* (Less.) DC. (Budel *et al.*, 2004), *B. usterii* Heering (Budel y Duarte, 2010), *B. glaziovii* Baker (Jasinski *et al.*, 2014), *B. pentaptera* (Less.) DC. (Budel *et al.*, 2015), así como *B. penningtonii* Heering, *B. sagittalis* (Less.) DC., *B. phyteumoides* (Less.) DC. y *B. triangularis* Hauman (Martínez *et al.*, 2018). Consecuentemente, la Microscopía Analítica puede resultar una herramienta de valor para evaluar la variación intraespecífica e intragenérica en *Baccharis* spp. L.

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Material vegetal

Para éste trabajo, se tomó como referencia una población de *B. trimera* colectada en “Estación Porvenir” (32°21’56,5”S; 57°54’02,1”O), Departamento de Paysandú, Uruguay. Fueron aleatoriamente seleccionados cladodios y raíz en estado vegetativo (VE-julio de 2011 y setiembre de 2016) y en floración (FL- marzo de 2016). Muestras de *exsicata* de la misma población fueron ingresadas al herbario “Arechavaleta” de la Facultad de Química, Universidad de la República (MVFQ) con el número de registro M. Minteguiaga 4420. La identificación taxonómica fue realizada por el Prof. Eduardo Alonso-Paz (†, *in memoriam*).

Para el estudio histológico se seleccionaron 10 individuos al azar de *B. trimera*, de los cuales se tomaron muestras de cladodio (partes aéreas) y raíz. El material fue secado a temperatura ambiente durante una semana y fijado en una solución de formaldehído-ácido acético-agua-etanol (FAA) para estudios de morfo-anatomía, o empleado fresco para caracterización histoquímica.

Para la comparación inter-poblacional de *B. trimera*, se colectó material vegetal en diferentes localidades y condiciones, según se detalla en la Tabla 1.



Código	Sitio de Colecta	Fecha	Estado fenológico
<b>VE</b>	Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay	07/2011 (Invierno)	vegetativo
<b>FL</b>	Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay	03/2016 (Verano)	floración
<b>MI</b>	Las Brujas, Canelones, Uruguay	08/2013 (Invierno)	vegetativo
<b>M2</b>	Valle del Lunarejo, Rivera, Uruguay	01/2015 (Verano)	floración
<b>M3</b>	Conchillas, Colonia, Uruguay	SD (muestra comercial)	SD (muestra comercial)
<b>M4</b>	Salto Grande, Salto, Uruguay	06/2013 (Invierno)	vegetativo
<b>M5</b>	Antoniópolis, Rocha, Uruguay	01/2013 (Verano)	floración
<b>M6</b>	Santa María, RS, Brasil	10/2011 (Primavera)	vegetativo
<b>M7</b>	São Francisco de Paula, RS, Brasil	09/2011 (Primavera)	vegetativo

**Tabla 1:** Datos de colecta de *B. trimera* en diferentes situaciones ambientales para el estudio inter-poblacional. SD: sin datos, muestra de aceite esencial comercial.

## 2.2 Estudios morfo-anatómicos e histoquímicos

Cinco ejemplares frescos y 5 ejemplares fijados en FAA (ácido acético, formol, agua y etanol 1: 2: 7: 10) fueron utilizados para estudios de microscopía óptica.

Para el análisis de epidermis se realizaron diafanizados según la técnica reportada por Dizeo de Strittmater (1973). Para la obtención de cortes transversales se trabajó con la porción correspondiente al tercer o cuarto entrenudo de los cladodios y la sección media de las raíces. Se cortaron segmentos de 2 cm del respectivo órgano y se montaron en soportes de cera odontológica, para posteriormente ser seccionados transversalmente con un micrótopo rotativo *Microm HM 315* (GMI Inc., Ramsey, MN, EEUU) para obtener cortes con 15 a 20  $\mu\text{m}$  de espesor. El material seccionado fue decolorado con hipoclorito de sodio al 50%, lavado y teñido. Las tinciones fueron realizadas por doble coloración sucesiva con Violeta de Cresilo o sucesivamente con Azul Astra y Safranina O (*Sigma Aldrich, St. Louis, MI, EEUU*). Para la clasificación de los estomas se utilizó la terminología propuesta por Dilcher (1974).

Los ensayos histoquímicos fueron realizados sobre secciones de material vegetal fresco de acuerdo a los procedimientos descritos por D'Ambrogio de Argüeso (1986) y Zarlavsky (2014). Para ello, fueron empleados los siguientes reactivos:  $\text{FeCl}_3$  para polifenoles (reacción positiva visualizada como manchas negras), Sudán IV para lípidos (resultado positivo: color rojo), y Nadi para aceites esenciales (resultado positivo para terpenos: azul oscuro) (D'Ambrogio de Argüeso, 1986; Zarlavsky, 2014). Los



gránulos de almidón fueron visualizados a través de tinción con lugol y posterior observación bajo luz polarizada (Zarlavsky, 2014).

Luego de las tinciones, los preparados fueron montados en agua destilada- glicerina (1:1) y llevados al microscopio. Las fotografías fueron tomadas mediante un microscopio óptico *Carl Zeiss Lab. A1 Axiolab* con una cámara *AxioCam ERc 5s Zeiss* adosada, y la medición de dimensiones fue realizada con un *software Axio Vision 4.8.2* (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

### 2.3 Extracción de aceites esenciales

Para el caso de la población de referencia (muestras VE y FL), se obtuvo el aceite esencial por hidrodestilación con trampa de Clevenger, empleando 200 g de material vegetal, y realizando extracción durante 90 minutos como fue previamente descrito en el capítulo 3. Con el objetivo de obtener un mayor volumen de aceite esencial para fraccionamiento, fueron extraídos 30 Kg de material vegetal de *B. trimera* en floración (FL) en una unidad de destilación piloto por arrastre con vapor (*Eysseric Company, Nyons, Francia*) localizada en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental “Las Brujas” (Rincón del Colorado, Canelones) (Davies, 2004). De ésta manera se obtuvieron 45 mL de aceite esencial, al que se le adicionó una punta de espátula de BHT (butilhidroxitolueno) (*Sigma-Aldrich*) para su preservación de la oxidación.

En el caso de las restantes poblaciones estudiadas de *B. trimera* (M1, M2, M4, M5, M6 y M7; Tabla 1), las muestras de análisis fueron obtenidas mediante *SDE*, en las mismas condiciones experimentales previamente reportadas en el capítulo 3. En tanto, la muestra M3 consistió en aceite esencial comercial obtenido por arrastre con vapor por el Establecimiento Alegría (Conchillas, Colonia, Uruguay), cedida gentilmente por la Dra. Pilar Larravide.

### 2.4 Fraccionamiento del aceite esencial de la población de referencia

Un total de 43,0 mL de aceite esencial puro de la población referencia de *B. trimera* en estado de floración (muestra FL) fue fraccionado en dos pasos a través de cromatografía en columna (CC; 50 cm × 5.5 cm d.i.) mediante 530 g de sílica gel activada (230-400 mesh; *Merck*). La elución fue realizada en condiciones isocráticas con la fase móvil



hexano-AcOEt (15:1) a un flujo controlado de 4,5 mL/min. Se colectaron fracciones de aproximadamente 40 mL.

El monitoreo de la separación fue realizado a través de *TLC* sobre placas comerciales de sílica gel (Si-gel 60F<sub>254</sub>; *Merck*) con la misma fase móvil que en el caso de la CC. Las manchas correspondientes a las fracciones 1 a 59 fueron reveladas en *TLC* por rociado de una solución de *p*-anisaldehído (*Sigma-Aldrich*) (preparación: 0,5 mL de *p*-anisaldehído se mezclaron con 10,0 mL de CH<sub>3</sub>COOH glacial, 85,0 mL de MeOH y 5,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98% m/m; en ese orden) y calentamiento (**Wagner et al., 1984**). De acuerdo a éstos resultados, las fracciones fueron agrupadas en 6 fracciones finales (1-6), cuya composición se presenta en la Tabla 2.

### **2.5 Análisis por GC-MS**

Con éste objetivo, se emplearon tres columnas capilares de iguales dimensiones (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de espesor de fase), acopladas secuencialmente a un cromatógrafo de gases-espectrómetro de masa *Shimadzu GC-MS QP2010 Ultra* (*Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón*). La columna No. 1 fue de fase poco polar *HP-5MS* (95%-metil-5%-fenilpolisiloxano; *Agilent Technologies, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, USA*); la columna No. 2 fue de polaridad media, *OV-225* (50%-metil-25%-cianopropil-25%-fenilsilicona; *Quadrex Corporation, Woodbridge, CT, EEUU*); y la columna No. 3 fue de fase polar, *Stabilwax* (100%-polietilenglicol; *Restek Corporation, Bellefonte, PA, EEUU*).

Para los aceites esenciales, el volumen de inyección fue de 1,0 µL diluído (1:10) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (*Dorwil, Buenos Aires, BA, Argentina*), relación de *Split* 25:1; en el caso de los extractos hexánicos de *SDE* se inyectó 1,0 µL en las condiciones reportadas en el capítulo 3.

El programa analítico de temperaturas empleado para la columna No. 1 fue: 40°C (4 min), 40-180°C a 4°C/min, 180°C (2 min), 180-280°C a 10°C/min, 280°C (10 min). Las temperaturas del inyector, de la interfase y de la fuente de iones fueron constantes y fijadas en 280°C.

Para la columna No. 2 el programa empleado fue: 60°C (4 min), 60-160°C a 2°C/min, 160-230°C a 20°C/min, 230°C (10 min). La temperatura del inyector, interfase y fuente de ionización fue de 230°C.



Finalmente, para la columna No. 3, el programa empleado fue: 40°C (4 min), 40-180°C a 5°C/min, 180-220°C a 10°C/min, 220°C (10 min), 220-240°C a 20°C/min, 240°C (10 min). Las temperaturas del inyector, interfase y fuente de iones fueron fijadas en 250°C. En todos los casos se empleó gas helio (99,9999%; *Linde, Munich, Alemania*) como fase móvil a 1,0 mL/min. La energía de ionización establecida en el espectrómetro de masa fue la convencional de 70 eV y el rango de masas de barrido fue de 35 a 400 u.m.a.

La identificación de los compuestos volátiles se realizó por comparación de los espectros de masa y cálculo de *LRI*s, como fuera previamente descrito en el capítulo 3. Los valores de éstos últimos fueron comparados con reportes bibliográficos (**Davies, 1990; Adams, 2007; A.M. El-Sayed, 2003-2019; Linstrom y Mallard, 2019**).

Para la columna No. 2, no se encontraron valores disponibles de *LRI*s en bases de datos, por lo que para tener una referencia comparativa, se analizó en las mismas condiciones analíticas un aceite esencial industrial de limón (*Citrus limon*, Rutaceae) químicamente bien caracterizado en nuestro grupo de investigación (**Dellacassa et al., 1997**).

En todos los casos se informará la proporción (porcentaje) de los componentes volátiles en áreas normalizadas obtenidas en *GC-MS* en columna *HP-5MS*, considerando el mismo factor de respuesta para cada compuesto.

## **2.6 Extracción y análisis de los componentes no volátiles**

La extracción de componentes no volátiles fue realizada de manera continua mediante un dispositivo de Soxhlet empleando 12 g de cladodios finamente trozados, los que se empacaron en un cartucho de papel de filtro en el reservorio del mismo (**Soicke y Leng-Peschlow, 1987**).

Se realizó una extracción secuencial con 200 mL de cada uno de los siguientes solventes: *n*-hexano (desgrasado), AcOEt y MeOH (solventes destilados; *Droguería Industrial Uruguaya, Montevideo, Uruguay*). Con cada uno de ellos, se realizaron 4 ciclos extractivos en el dispositivo de Soxhlet. Con el objetivo de reducir el volumen de los extractos, los mismos fueron evaporados a vacío (rotavapor) y retomados en 5 mL de su respectivo solvente. Posterior a la extracción con MeOH, se realizó una decocción del material vegetal en 300 mL de agua destilada a ebullición durante 30 minutos.

El análisis de cada una de las fracciones fue realizado por cromatografía en capa fina (*TLC*) mediante siembra de 5 µL de cada uno de los extractos y los patrones (ver más



adelante) en placas comerciales (Si-gel60F<sub>254</sub>; Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil seleccionada para una adecuada elución de los componentes fue CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1). El revelado de las placas fue realizado por una solución de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en medio ácido y calentamiento (10 g de Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en 100 mL de una solución acuosa al 10% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>); y por radiación UV a 254 y 366 nm (Wagner *et al.*, 1984). Otros reveladores como FeCl<sub>3</sub> y SbCl<sub>2</sub> fueron preparados según las instrucciones de Wagner *et al.* (1984), pero en las condiciones experimentales reportadas no se obtuvo una adecuada visualización de las manchas.

Como patrones de elución en TLC se prepararon soluciones metanólicas de concentración 2,0-5,4 mg/mL de los siguientes metabolitos secundarios: ácido ursólico, oleanólico y gálico (Mallinckrodt Pharmaceuticals, St. Louis, MI, EEUU) alcohol mirístico y cetílico (C<sub>14</sub> y C<sub>16</sub>; Dehydag Deutsche Hydrierwerke GMBH, Dusseldorf, Alemania), ácido ferúlico, quínico, rutina, quercetina y cumarina (Fluka AG, Buchs, Suiza), y ácido clorogénico (Sigma-Aldrich). Los R<sub>f</sub> de cada uno de los patrones fueron calculados, y se compararon con los obtenidos para las manchas correspondientes del extracto teniendo en cuenta además la coloración de revelado.

## 2.7 Tratamiento estadístico

Se realizó un análisis multivariado de HCA (dendrograma) empleando el software NCSS 11 (2016; trial version) (NCSS LLC, Kaysville, UT, EEUU) para clasificar posibles quimiotipos. Los datos que se emplearon fueron los porcentajes de áreas relativas obtenidas de las muestras procesadas en éste capítulo, así como datos bibliográficos. Para el caso de éstos últimos se tomaron como restricciones: 1) que la extracción de los compuestos volátiles fuera realizada por alguna metodología de destilación; 2) que se emplease GC-FID o GC-MS para cuantificar (porcentajes de áreas relativas); y 3) que la identificación de los compuestos fuera mediante cálculo de LRIs. En todos los casos, se tomaron como significativos los metabolitos con porcentaje de abundancia superior al 5%, de manera de evitar influencia de la metodología de integración de áreas. Para realizar la validación de los grupos formados, se comparó con la información obtenida por Umpiérrez (2017), de manera que muestras de una misma población pertenecieran a un mismo quimiotipo.





### 3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Observaciones a campo y apariencia general de la planta

De acuerdo a las observaciones de colectas a campo realizadas a lo largo de ésta tesis, la especie *B. trimera* ocurre frecuentemente en Uruguay en diferentes condiciones ambientales. Es habitual encontrarla en pasturas naturales y en sitios alterados, por ejemplo en el borde de caminos y de vías férreas o en rastrojos de cultivos; lo que concuerda con reportes previos (**Pereira Machín, 2008; Scheffer-Basso et al., 2008**). También fue observada su presencia en ambientes costeros (Antoniópolis, Rocha) y en el ambiente alterado de la Isla de Flores en el Río de la Plata, lo que podría ser un indicio de su carácter invasor.

Las poblaciones estudiadas fueron densas, con plantas de una altura aproximada de unos 50-60 cm. Se constató que se trata de una especie no apetecible para el ganado posiblemente por su dureza y amargor (**Pereira Machín, 2008**). Fue poco frecuente de observar bajo la sombra de otras especies de mayor porte, y puede o no desarrollarse en terrenos húmedos, lo que indica una alta plasticidad.

El período de floración (Figura 5) observado en las colectas en Uruguay fue desde mediados de verano (primeros días de enero) a inicios de otoño (marzo-abril) (ciclo estival); los botones florales se comenzaron a visualizar unos dos meses antes coincidiendo con reportes bibliográficos (**Pereira Machín, 2008**). El mismo patrón de fenología se ha reportado para el sur de Brasil (**Scheffer-Basso et al., 2008; Alves, 2010, Besten et al., 2013**).

Durante la floración, la especie presentó un aroma típico meloso que fue atractivo para varias especies de mariposas y abejas (Figura 5). Fuera de floración se constató un aroma característico con notas herbales y maderosas que correspondió al componente acetato de carquejilo (esto último se comprobó por el aislamiento y olfacción del mismo; capítulo 8).

La diferenciación morfológica de *B. trimera* a campo respecto de otras “carquejas” de la sección Caulopterae fue dificultosa (principalmente comparada con *B. crispa*), sin embargo todas las poblaciones uruguayas analizadas presentaron dicho aroma característico ausente en las demás especies. Se constató además una amplia variación en la morfología de la planta, principalmente en cuanto al tamaño, ondulación y color de los cladodios (tallos alados), así como a la densidad de floración (Figura 5). En algunas



colectas puntuales se pudo evidenciar la ocurrencia de agallas en los cladodios, lo cual no ha sido informado previamente en la literatura.



**Figura 5:** Algunos biotipos en floración de *Baccharis trimera* (“carqueja”) estudiados en éste trabajo de tesis. Referencias (A): población de referencia (Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay; FL); (B): Valle del Lunarejo (Rivera, Uruguay); (C): Antoniópolis (Rocha, Uruguay); (D): São Francisco de Paula (Rio Grande do Sul, Brasil).



### 3.2 Caracterización microscópica de la población de referencia

A continuación se presentan los principales resultados morfo-anatómicos e histoquímicos que se obtuvieron en éste trabajo para la población de referencia de *B. trimera* (muestra VE).

Para ésta especie, la Farmacopea Brasileña (2010) describe la presencia de hojas sésiles y escamosas, mientras que Barroso y Bueno (2002) reportaron la presencia de hojas ovales reducidas. En el presente trabajo, en concordancia con Budel y Duarte (2009), y con Cortadi *et al.* (1999); no se observó ninguna estructura foliar. El biotipo analizado (Figura 6) presentó los cladodios característicos de las especies del Grupo Trimeria de la sección Caulopterae (Ariza-Espinar, 1973; Barroso, 1976; Barroso y Bueno, 2002). En corte transversal del tallo se evidenció el contorno circular trialado característico, con alas equidistantes (Figura 6A). En el material analizado no fueron identificadas costillas conspicuas entre las alas, en concordancia con el reporte de Budel y Duarte (2009), pero en contraposición a lo informado por Cortadi *et al.* (1999) y por la Farmacopea Brasileña (2010).

#### Epidermis

En vista paradermal tanto el tallo como el ala presentaron células epidérmicas poligonales de paredes anticlinales rectas (Figura 6B y 6D). En transcorte, la epidermis se presentó uniestratificada, con células poliédricas rectangulares ( $14,90 \pm 2,87 \mu\text{m}$  de espesor), constatándose una cutícula delgada, de aspecto estriado ( $4,25 \pm 0,37 \mu\text{m}$  de espesor). Sobre la epidermis pudieron observarse estomas del tipo anisocítico y menos frecuentemente del tipo anomocítico con dimensiones de  $27,54 \pm 1,95 \mu\text{m}$  de longitud por  $26,34 \pm 1,41 \mu\text{m}$  de ancho (Figuras 6B y 6C). Se determinó en transcorte que los estomas se encuentran al mismo nivel que las células epidérmicas o ligeramente sobre-elevados.

La epidermis identificada (tipo de células y tipo de estomas) sigue el patrón general presentado anteriormente para la especie, así como para otras especies de la sección Caulopterae como *B. articulata*, *B. crispera* y *B. microcephala*, entre otras (Cortadi *et al.*, 1999; Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018). Algunas otras especies sólo han presentado estomas anomocíticos: *B. cylindrica* (Budel *et al.*, 2004), *B. usterii* (Budel y Duarte, 2010), *B. glaziovii* (Jasinski *et al.*, 2014), *B. grisebachii* (Ariza Espinar, 1973), *B. pentaptera* (Budel *et al.*, 2015), y *B. triangularis*



y *B. penningtonii* (Martínez *et al.*, 2018). En tanto que *B. gaudichaudiana*, *B. sagittalis* y *B. phyteumoides* presentan conjuntamente estomas anomocíticos y ciclocíticos (Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018).

### Tricomas

En relación a los tricomas de *B. trimera* la información bibliográfica es abundante y contradictoria, lo que podría ser consecuencia de la presencia de varios biotipos y ecotipos en las diferentes regiones de ocurrencia. Por ejemplo, Alquini y Takemori (2000) clasificaron los tricomas pluricelulares biseriados de *B. trimera* como tectores sin hacer referencia a la presencia de ningún tipo de tricoma glandular. Por su parte, Cortadi *et al.* (1999) describieron para la especie la presencia exclusiva de tricomas glandulares pluricelulares biseriados y no constataron la presencia de tricomas tectores. Por otro lado la Farmacopea Brasileña (2010) cita para *B. trimera* la presencia de cuatro tipos de tricomas sin especificar diferenciación entre glandulares y no glandulares.

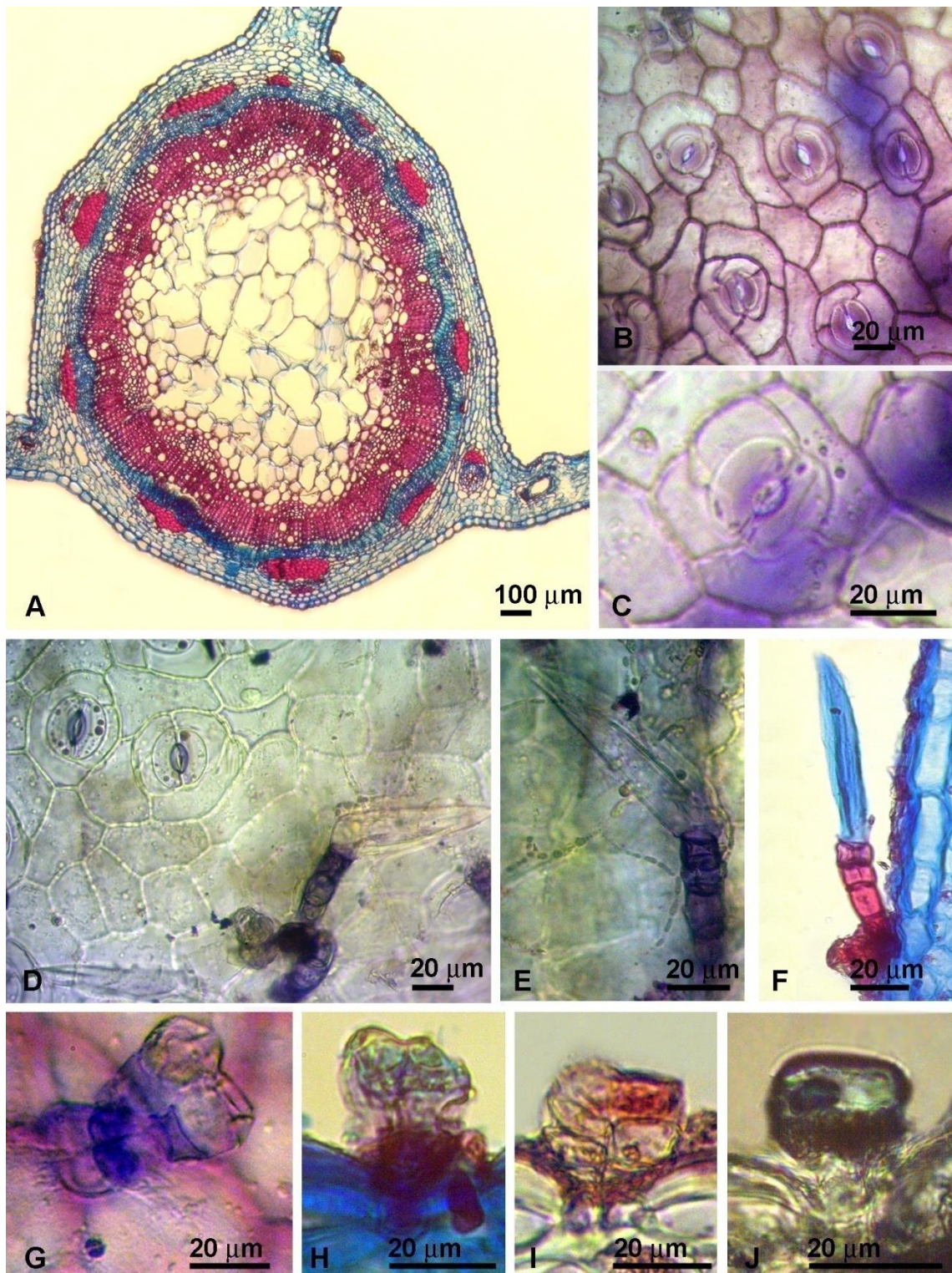
Los tricomas no glandulares (TECTORES) determinados en éste trabajo, fueron del tipo simple, pluricelulares, uniseriados con 3-4 células basales redondeadas lignificadas ( $53,57 \pm 10,52 \mu\text{m}$  de longitud) y una célula terminal larga de paredes celulósicas gruesas no lignificadas y ápice agudo ( $98,11 \pm 12,34 \mu\text{m}$  de longitud) (Figuras 6D a 6F).

Dicho tipo de tricoma se corresponden a los determinados anteriormente por Rodríguez *et al.* (2013) y Martínez *et al.* (2018), y con uno de los tipos reportados en la Farmacopea Brasileña (2010). Sin embargo, los mismos autores y otros han informado para la especie la presencia de un tipo de tricoma tector en forma de T, así como de tricomas del tipo clavado que no fueron encontrados en éste trabajo (Chicourel *et al.*, 1997; Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018). Tricomas tectores similares a los descritos en éste trabajo fueron previamente citados para *B. articulata* (Ariza Espinar, 1973; Cortadi *et al.*, 1999; Ortins y Akisue, 2000; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018), *B. crispa* (Cortadi *et al.*, 1999; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018), *B. cylindrica* (Budel *et al.*, 2004), *B. gaudichaudiana* (Budel *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018), *B. glaziovii* (Jasinski *et al.*, 2014), *B. grisebachii* (Ariza-Espinar, 1973), *B. microcephala* (Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018) y *B. pentaptera* (Budel *et al.*, 2015), entre otras.



Los tricomas glandulares visualizados en éste trabajo (Figuras 6G a 6J) fueron cortos, pluricelulares, biseriados, conformados por un par de células basales y 2-3 pares de células en el cuerpo ( $29,20 \pm 4,41 \mu\text{m}$  de longitud por  $21,89 \pm 6,44 \mu\text{m}$  de ancho en la región apical). La cutícula se dispone ligeramente expandida en torno al par de células terminales. Este tipo de tricomas presentó reacción positiva para lípidos (tinción con Sudan IV) y aceites esenciales (tinción con Nadi) (Figuras 6G a 6J). En ocasiones, los tricomas se encontraron en grupos (nidos pilosos) conformados por tricomas glandulares y no glandulares geminados, distribuidos por toda la superficie caulinar (Figura 6D), conforme a lo anteriormente reportado (**Ariza-Espinar, 1973; Freire et al., 2007; Rodríguez et al., 2008; Martínez et al., 2018**).

La morfología de éste tipo de tricomas fue muy similar a la descrita en trabajos anteriormente publicados para *B. trimera* (**Cortadi et al., 1999; Rodríguez et al., 2008; Budel y Duarte, 2009; Martínez et al., 2018**). Por su parte, Santos Filho et al. (1980) informaron sobre la presencia de tricomas glandulares pluricelulares, cuya célula apical es alargada, afilada y contiene aceite esencial; que en éste trabajo no fueron determinados.



**Figura 6:** Resultados del análisis morfo-anatómico e histoquímico de *B. trimera* de la población de referencia (Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay) (1). Referencias: **A:** transcurso de cladodio; **B:** epidermis en vista paradermal; **C:** estoma anomocítico; **D:** tricomas glandulares y no glandulares en grupos (nidos pilosos); **E-F:** tricoma no glandular; **E:** vista paradermal en tinción con violeta de cresilo; **F:** transcurso con tinción de azul astra-safranina; **G-J:** tricoma glandular; **G:** vista paradermal en tinción con violeta de cresilo; **H:** transcurso con tinción de azul astra-safranina; **I:** reacción positiva para lípidos con Sudan IV; **J:** reacción positiva para aceites esenciales con reactivo de Nadi.



### Córtex

El córtex de *B. trimera* presentó 1-2 estratos de colénquima laminar sub-epidérmico, en ocasiones esclerificado (entre 10,15 y 23,17  $\mu\text{m}$  de espesor) y 4-5 estratos de clorénquima (parénquima clorofiliano) conformado por células poliédricas rectangulares (40,78  $\pm$  10,34  $\mu\text{m}$  de espesor) (Figura 7A). Este último frecuentemente interrumpido por conductos secretores esquizógenos de diversas dimensiones, con epitelio secretor uni o biestratificado, formado por 5-10 células en el ciclo interno y 6-12 células en el ciclo externo (Figura 7A a 7C). Se observó también una endodermis continua delimitando el cilindro central, en donde parte del epitelio externo de los conductos esquizógenos conformó la endodermis (Figura 7B). Dichos conductos secretores ocasionalmente fueron visualizados inmersos en grupos de fibras perivasculares que conformaron la vaina, y se encontraron asociados al floema (Figuras 4 y 7A).

La presencia de conductos secretores esquizógenos con epitelio biestratificado ocasionalmente asociado a la endodermis es novedosa para la especie *B. trimera* y para el género, ya que otros autores anteriormente citaron la presencia de ductos con epitelio secretor uniestratificado (Castro *et al.*, 1997; Cortadi *et al.*, 1999; Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013). La asociación de los conductos secretores con la endodermis ha sido previamente informada en la literatura para *B. trimera* (Cortadi *et al.*, 1999; Alquini y Takemori, 2000; Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013). También se ha reportado para otras especies relacionadas: *B. articulata* (Ariza-Espinar, 1973; Cortadi *et al.*, 1999; Ortins y Akisue, 2000; Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013), *B. crispa* (Budel *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2013), *B. gaudichaudiana* (Budel *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2013) y *B. myriocephala* (Rodríguez *et al.*, 2013). El contenido color ámbar de los conductos secretores esquizógenos presentó reacción positiva para lípidos y aceites esenciales (Figuras 7B y 7E).

Se determinó que el sistema vascular del cilindro central está conformado por una euestela ectofloica, observándose a nivel de floema casquetes de fibras perivasculares (Figura 7A). El xilema presentó vasos solitarios o en hileras cortas (de 2 o 3), con abundantes fibras (Figura 7A). La médula resultó amplia, con células poliédricas de mayores dimensiones que las observadas en la corteza. En el parénquima perimedular se observaron cristales poliédricos piramidales, prismáticos y drusas de oxalato de calcio (Figura 7C; detalle bajo luz polarizada). Estos últimos han sido previamente descritos



para *B. trimera* (Santos Filho *et al.*, 1980; Cortadi *et al.*, 1999; Farmacopea Brasileña, 2010) y para otras especies de la sección Caulopterae (Budel *et al.*, 2004; Budel y Duarte 2009; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018).

### Ala

A nivel de transcorte del ala de *B. trimera*, al igual que para el caso de los tricomas; existen informaciones contradictorias en la literatura. Por ejemplo, se cita la ocurrencia de mesófilo homogéneo esponjoso lacunar (Chicourel *et al.*, 1997), dorsiventral (Farmacopea Brasileña, 2010) u homogéneo isobilateral (Cortadi *et al.*, 1999).

En tanto, en éste trabajo, el ala ( $184,06 \pm 72,88 \mu\text{m}$  de espesor) presentó mesófilo isolateral: 2-3 estratos de parénquima en empalizada adaxial ( $67,28 \pm 21,72 \mu\text{m}$ ) (con ensanchamiento en el área próxima al tallo), 2-3 estratos de parénquima esponjoso central de células cortas ( $43,72 \pm 22,00 \mu\text{m}$ ) y 2-3 estratos de parénquima en empalizada abaxial ( $61,85 \pm 22,49 \mu\text{m}$ ) (se determinó la posición adaxial por la presencia de xilema en los haces vasculares) (Figura 7D). El ala presentó epidermis adaxial y abaxial uniestratificadas ( $16,00 \pm 1,62 \mu\text{m}$ ) y carácter anfiestomático (estomas en ambas caras), con estomas y tricomas idénticos a los descritos para el caso del tallo. Lo anterior está de acuerdo a resultados previamente publicados para *B. trimera* (Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2018). Otras especies de la sección Caulopterae también han presentado éste tipo de mesófilo en el ala: *B. articulata* (Ariza-Espinar, 1973; Cortadi *et al.*, 1999; Ortins y Akisue, 2000; Rodríguez *et al.*, 2013), *B. cylindrica* (Budel *et al.*, 2004), *B. crispa* (Budel *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2013), *B. gaudichaudiana* (Budel *et al.*, 2003; Rodríguez *et al.*, 2013), *B. microcephala* (Budel y Duarte, 2009; Rodríguez *et al.*, 2013) y *B. usterii* (Budel y Duarte, 2010), entre otras.

En el margen del ala se ha informado la presencia de colénquima sub-epidérmico para *B. trimera* (Cortadi *et al.*, 1999) y varias especies de la sección Caulopterae (Ariza Espinar, 1973; Cortadi *et al.*, 1999; Ortins y Akisue, 2000). Sin embargo en el presente trabajo, en concordancia con lo citado por Rodríguez *et al.* (2013) no se observó colénquima a nivel del margen del ala.

Se determinó que los haces vasculares de *B. trimera* son colaterales, acompañados (los de mayor orden) por casquetes de fibras floemáticas y xilemáticas, estas últimas menos desarrolladas. Se observó asimismo una vaina parenquimática endodermoide

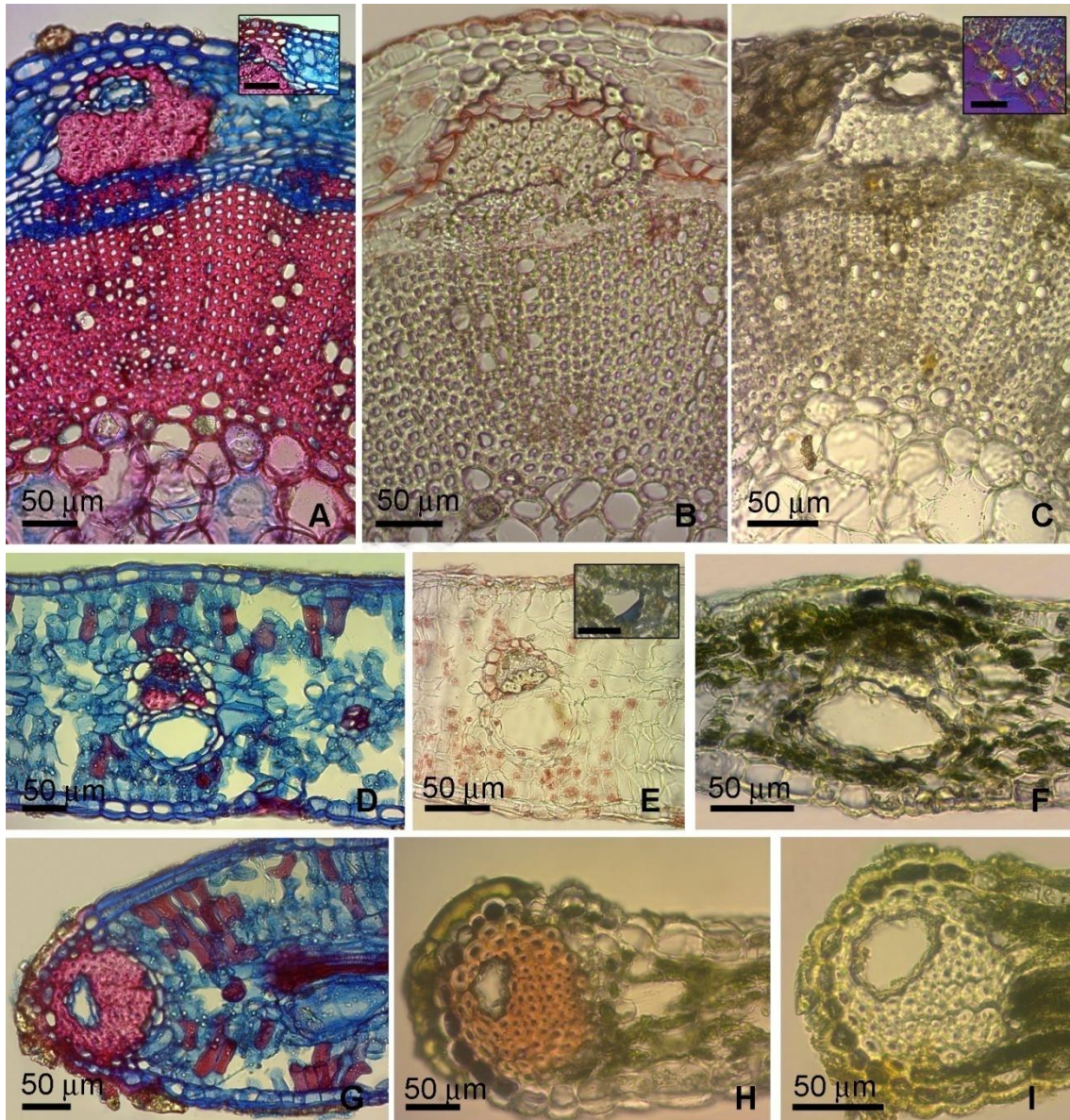




circundando toda la estructura del haz (Figuras 7D a 7E). Canales esquizógenos similares a los descritos para el córtex se encontraron junto a los haces de mayor desarrollo hacia la región floemática, interrumpiendo la empalizada. Adicionalmente, se constató que el epitelio externo del canal forma parte de la vaina parenquimática endodermoide que rodea a los haces vasculares (Figura 7E).

El margen del ala presentó un conspicuo refuerzo de fibras y 1-2 canales esquizógenos inmersos en las fibras, ocasionalmente acompañados de un haz menor y un estrato de colénquima sub-epidérmico con paredes lignificadas (Figuras 7G a 7I). Tanto el tallo como el ala, particularmente en la región del margen; presentaron reacción positiva con  $\text{FeCl}_3$  a nivel de epidermis, cutícula, colénquima laminar y epitelio secretor de los conductos esquizógenos; lo que indica la presencia de compuestos de naturaleza polifenólica (Figuras 7C, 7F, 7I). Del mismo modo, la epidermis del margen del ala y los conductos secretores esquizógenos presentaron reacción positiva para lípidos y aceites esenciales (por tinción con sudan IV y reactivo Nadi) (Figuras 7E y 7H).

La única referencia histoquímica previa en el género *Baccharis* L. es un estudio de Budel *et al.* (2012) en que se trabajó sobre especies no pertenecientes a la sección Caulopterae (*B. anomala*, *B. megapotamica*, *B. ochracea*), empleando una solución de Sudan III como indicador de sustancias lipofílicas en cavidades secretoras y tricomas glandulares. Sin embargo, en nuestro conocimiento, no existen en la literatura del género reportes sobre la reacción positiva de  $\text{FeCl}_3$  para compuestos de naturaleza fenólica a nivel del epitelio de los conductos secretores y algunas células epidérmicas, particularmente a nivel del margen del ala. En la sección 3.5 se discutirá la presencia de dichas sustancias en la población modelo de *B. trimera* estudiada.



**Figura 7:** Resultados del análisis morfo-anatómico e histoquímico de *B. trimera* de la población de referencia (Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay) (II). Referencias: **A-C:** transcorte de tallo; **A:** tinción con azul astra-safranina, detalle de colénquima sub-epidérmico lignificado; **B:** tinción con Sudan IV para lípidos; **C:** tinción con  $FeCl_3$  para polifenoles, detalle de cristales de oxalato de calcio a nivel de parénquima perimedular bajo luz polarizada; **D-F:** transcorte de ala; **D:** tinción con azul astra-safranina; **E:** tinción con Sudan IV, detalle de la tinción positiva para aceites esenciales con reactivo de Nadi; **F:** tinción con  $FeCl_3$ ; **G-I:** transcorte de ala a nivel del margen; **G:** tinción con azul astra-safranina; **H:** tinción con reactivo de Nadi; **I:** tinción con  $FeCl_3$ .

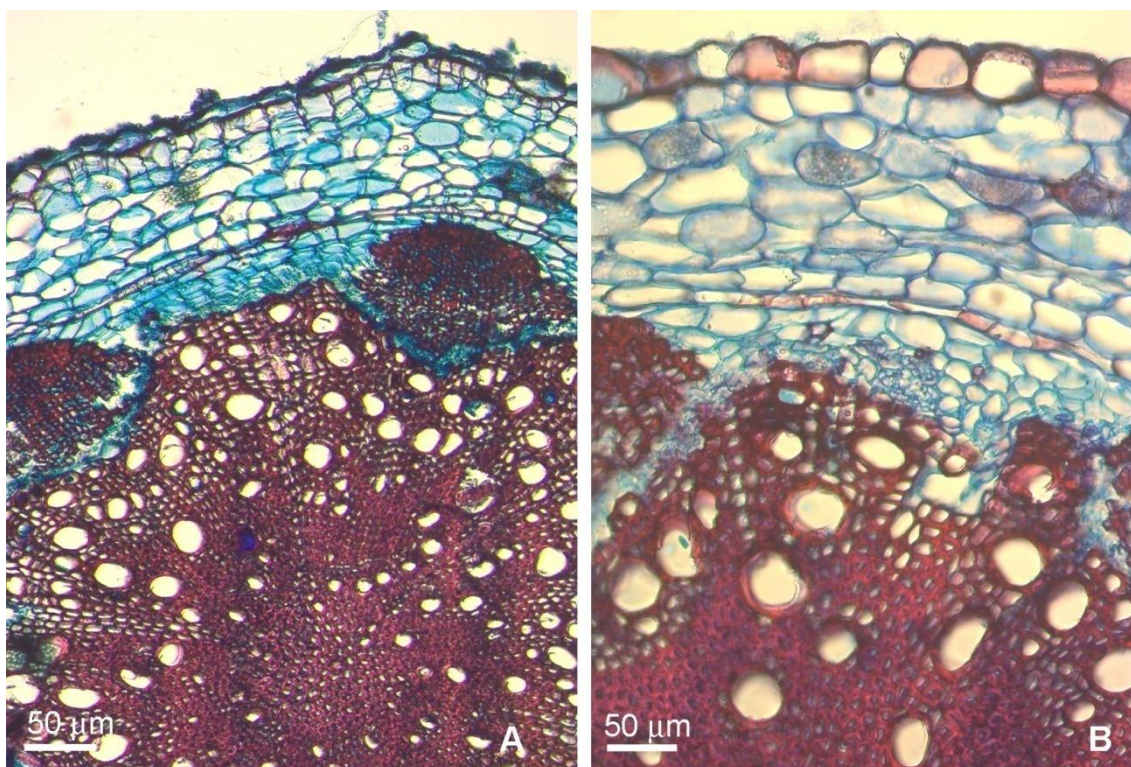
### Raíz

En transcorte, la raíz de *B. trimera* presentó crecimiento secundario temprano con rizodermis persistente y uniestratificada (Figuras 8A y 8B). El córtex incluye 6-8 estratos de parénquima cortical amilífero (conteniendo almidón; visible bajo la luz polarizada), endodermis (con banda de Caspary conspicua) y periciclo (Figura 8B). El sistema vascular presentó floema continuo, poco desarrollado, con prominentes



casquetes de fibras floemáticas. El xilema es de apariencia porosa, difusa, con vasos solitarios o más raramente en hileras cortas de 2 o 3, con abundantes fibras. La médula tuvo apariencia maciza y está constituida por abundantes fibras (Figuras 8A-B).

No existen reportes previos en que se detalle la anatomía de la raíz de *Baccharis* spp. Sect. Caulopterae, por lo que los anteriores resultados son novedosos.



**Figura 8:** Resultados del análisis morfo-anatómico e histoquímico de *B. trimera* de la población de referencia (Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay) (III). Referencias: A: transcorde de raíz; B: detalle de la banda de Caspary y parénquima cortical con gránulos de almidón.

### 3.3 Composición volátil de las diferentes poblaciones de *B. trimera* estudiadas

En la Tabla 2 se presenta la composición volátil de *B. trimera* (obtenida por *GC-MS*) de la población de referencia así como del resto del material vegetal estudiado de diferentes orígenes geográficos (Tabla 1). Para el caso de la población de referencia, también se presenta el análisis de la composición de cada una de las fracciones (1-6) que se obtuvieron por cromatografía en columna (CC) del fraccionamiento del aceite esencial.

El uso de la técnica de CC antes del análisis por *GC-MS* permite una identificación más exhaustiva de la composición, especialmente para determinar componentes que se encuentran a nivel de trazas que de otra manera no podrían ser detectados (Queiroga *et al.*, 1990). Debido a que éste análisis empleó un método separativo previo como lo es la



CC, se podría considerar que el mismo fue realizado en un sistema bidimensional *off-line*, en el que la primera dimensión no fue instrumental. De esa manera, en la jerga de los acoplamientos, se puede decir que la metodología empleada en éste caso fue un *CC-GC-MS*.



#	Compuesto <sup>a</sup>	LRI1 <sup>b</sup>	LRI2 <sup>b</sup>	LRI3 <sup>b</sup>	F. Det. <sup>c</sup>	% VE <sup>c</sup>	% FL <sup>d</sup>	% M1 <sup>d</sup>	% M2 <sup>d</sup>	% M3 <sup>d</sup>	% M4 <sup>d</sup>	% M5 <sup>d</sup>	% M6 <sup>d</sup>	% M7 <sup>d</sup>
1	hexanal <sup>15</sup>	801	1060	1071	AE	tr	-	0,03	0,1	-	0,02	-	-	-
2	2-(E)-hexenal	847	Nd	1205	AE	tr	-	0,01	-	-	0,01	-	0,01	-
3	triciclono	920	1032	1013	1, 5	0,01	tr	0,01	-	0,01	0,01	-	0,01	-
4	$\alpha$ -tuyeno <sup>13</sup>	925	1036	1015	AE, 1, 5	0,07	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	0,05	0,1	0,01
5	$\alpha$ -pineno <sup>1-2,6-8,11-15</sup>	930	1037	1010	AE,1,4-6	0,2	0,4	0,3	0,6	0,3	0,4	0,2	0,2	0,1
6	$\alpha$ -fenchono	944	Nd	1042	EV	-	-	0,01	-	-	-	-	-	-
7	canfeno <sup>1</sup>	945	1057	1048	AE, 1, 5	0,03	0,08	0,06	0,05	0,04	0,07	0,04	0,04	-
8	2-(E)-heptenal	951	Nd	1311	AE	tr	-	-	-	-	-	-	-	-
9	benzaldehído	958	Nd	1487	AE	tr	-	0,01	-	-	0,01	-	-	-
10	sabineno <sup>1,2,11,13-14</sup>	972	1088	1112	AE, 1-6	0,7	1,6	0,7	0,7	1,9	0,1	0,9	0,8	0,2
11	$\beta$ -pineno <sup>1-2,6-15</sup>	976	1081	1097	AE, 1-3, 5-6	2,6	8,8	7,1	4,8	6,8	8,1	3,5	5,0	0,2
12	$\alpha$ -metilestireno	982	1206	nd	5	0,03	tr	0,01	-	-	-	-	-	-
13	6-metil-5-hepten-2-ona (sulcatona)	987	1268	1329	2	0,02	tr	0,02	0,02	-	0,02	-	-	-
14	mirreno <sup>1-2,6,8-9,11-15</sup>	991	1101	1158	AE, 1, 3, 5-6	0,3	1,2	0,2	0,5	1,1	0,3	0,3	0,8	-
15	octanal	997	1246	1270	AE	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-
16	2-octanol	1002	Nd	nd	6	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
17	$\alpha$ -felandreno <sup>1,8</sup>	1003	Nd	1152	AE, 1, 4-5	0,03	0,03	-	-	0,04	-	-	0,05	-
18	<i>p</i> -menta-1,7(8)-dieno (pseudolimoneno)	1003	1114	nd	AE	0,03	-	0,02	-	-	0,02	-	-	-
19	acetato de 3-(Z)-hexenilo	1007	Nd	nd	2	-	tr	-	-	-	-	-	0,08	-
20	$\delta$ -(3)-careno	1008	Nd	1107	AE,1	-	0,09	-	-	-	-	-	-	-
21	2,4-(E,E)-heptadienal	1011	1359	1481	3	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
22	4-carene	1013	Nd	nd	AE	-	0,06	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>o</i> -cimeno <sup>1</sup>	1012	Nd	1251	AE	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
24	<i>o</i> -isopropiltolueno *	1012	Nd	nd	AE, 1, 5-6	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-



Tabla 2, continuación

25	$\alpha$ -terpineno <sup>1</sup>	1016	1125	1167	AE, 1, 5-6	0,05	0,06	0,06	0,1	0,03	0,03	0,04	0,03	0,01
26	3-isopropenil-4-metilenciclohexeno (carquejeno)*	1022	Nd	nd	AE, 1,5	-	0,1	-	-	-	-	-	-	-
27	<i>p</i> -cimeno <sup>1,13,15</sup>	1023	1193	1258	3-4, 6	0,1	tr	0,09	-	-	0,07	0,07	0,3	0,1
28	limoneno <sup>1-3,8,10-11,13-15</sup> + $\beta$ -felandreno <sup>1,14</sup>	1028 (coel)	1133	1188	AE, 1-6	1,9	6,0	2,5	2,6	5,7	2,6	2,0	4,5	0,8
29	1,8-cineol <sup>1,8</sup> (eucaliptol)	1030	1183	1197	AE, 2, 6	0,05	0,02	0,07	0,3	0,03	0,05	0,05	-	-
30	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno <sup>1</sup>	1038	Nd	1230	AE, 1, 3, 5	0,02	0,09	-	-	0,07	-	-	0,05	0,01
31	$\beta$ -isoforona	1039	Nd	1395	AE, 1, 3, 6	tr	0,3	0,5	1,0	0,5	0,3	0,5	0,8	-
32	fenilacetaldehído	1039	Nd	nd	EV	-	-	tr	-	-	-	0,02	0,06	-
33	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno <sup>1-3,10-13,15</sup>	1049	1158	1249	AE, 1-6	0,6	4,6	tr	0,7	3,7	0,01	0,1	2,8	0,03
34	2-( <i>E</i> )-octenal	1056	1371	1407	2	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
35	$\gamma$ -terpineno <sup>1,8,13</sup>	1057	1176	1230	AE, 1, 3, 5-6	0,07	0,08	0,1	0,3	0,09	0,07	0,07	0,04	0,09
36	( <i>Z</i> )-óxido de limoneno	1066	1388	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,03
37	( <i>Z</i> )-hidrato de sabineno	1067	1338	1446	AE, 1-5	0,04	0,01	0,02	-	0,02	0,03	0,03	-	-
38	terpinoleno <sup>1,15</sup>	1087	1209	1271	AE, 1, 3, 5	0,08	0,2	0,04	-	0,2	0,02	0,03	0,2	0,06
39	<i>p</i> -cimeneno	1087	Nd	nd	6	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
40	nonanal <sup>15</sup>	1093	1352	1384	AE	0,05	-	0,01	-	-	-	0,04	-	-
41	( <i>E</i> )-hidrato de sabineno	1098	1401	nd	3	0,03	tr	0,02	-	0,01	0,03	0,02	-	-
42	rosafurano	1098	Nd	nd	AE, 1, 5	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
43	linalol <sup>1,10,15</sup>	1101	1382	1530	3, 4	0,4	tr	-	0,05	0,06	0,05	0,2	0,3	1,8
44	6-metil-3,5-( <i>E</i> )-heptadien-2-ona	1106	Nd	nd	4	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
45	<i>p</i> -ment-1,3,8-trieno	1108	Nd	nd	AE, 1, 5	0,2	0,01	-	-	-	-	-	-	-
46	endo-fenchol	1112	Nd	1565	2, 3	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
47	4,8-dimetil-1,3,7( <i>E</i> )-nonatrieno (DMNT)	1117	Nd	nd	AE, 1, 5	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-



Tabla 2, continuación

48	(Z)-p-ment-2-en-1-ol	1118	1408	nd	AE	0,09	-	0,03	-	-	-	-	-	-
49	$\alpha$ -isoforona	1121	1335	1395	AE, 1-6	0,2	0,03	0,1	0,6	0,2	0,1	0,2	0,3	-
50	allo-ocimeno	1130	1392	1355	AE	0,03	-	-	-	0,02	-	-	-	-
51	p-ment-1,5,8-trieno	1130	Nd	nd	AE, 1, 5	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
52	(Z)-p-ment-2,8-dien-1-ol	1132	Nd	nd	EV	-	-	0,01	-	-	-	0,03	-	-
53	(E)-pinocarveol <sup>15</sup>	1138	1451	1627	4	0,3	tr	0,2	0,2	-	0,3	0,2	-	0,06
54	allo-neo-ocimeno	1142	Nd	nd	AE, 1	-	0,05	-	-	-	-	-	-	-
55	2-hidroxi-isoforona	1143	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	0,7	0,3	-
56	4-cetoisoforona	1146	Nd	nd	4	0,5	tr	-	-	-	-	0,04	-	-
57	citronelal	1154	1424	1461	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05
58	carquejol <sup>1-2,8,10-11</sup>	1160	1477	1664	AE, 1-5	3,5	0,7	0,5	7,5	0,7	1,0	2,2	1,0	-
59	pinocarvona <sup>15</sup>	1164	1485	1535	AE, 2	0,8	0,01	-	-	-	-	0,2	-	-
60	endo-borneol	1164	1509	-	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
61	o-mentha-1(7),8-dien-3-ol (dihidrocarquejol)*	1167	Nd	nd	3	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
62	terpinen-4-ol	1177	1458	1576	AE, 1-3	0,2	0,1	0,3	0,5	0,2	0,2	0,1	-	0,1
63	2-isopropenil-3-metilfenol (carquejifenol)**	1181	Nd	nd	AE, 2-3	tr	0,3	0,2	2,5	0,06	0,2	0,2	-	-
64	p-cimen-8-ol	1183	1609	1816	AE	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-
65	criptona <sup>8</sup>	1184	Nd	nd	4	-	tr	0,1	-	-	0,3	0,2	-	-
66	$\alpha$ -terpineol <sup>4,8,10,15</sup>	1189	1520	1670	AE, 1-4, 6	1,4	0,01	0,08	0,2	0,04	0,08	0,1	-	0,8
67	mirtenol <sup>12</sup>	1189	Nd	1764	6	-	tr	0,1	0,06	-	0,2	-	-	0,1
68	mirtenal <sup>8,15</sup>	1194	1547	1596	AE, 2	0,3	0,01	0,2	0,3	-	0,3	0,2	-	-
69	safranal	1199	1535	1615	AE, 2	0,2	0,01	0,08	-	0,05	-	-	0,1	-
70	decanal	1206	Nd	1477	AE	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04
71	verbenona	1206	Nd	nd	AE	-	0,04	0,04	0,1	0,03	0,2	0,09	-	-



Tabla 2, continuación

72	eucarvona <sup>1</sup>	1218	1622	nd	AE, 2, 3, 6	0,8	0,3	0,5	0,5	0,1	0,4	-	-	-
73	<i>p</i> -ment-1-en-9-al	1217	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,01
74	( <i>E</i> )-carveol	1219	1603	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04
75	4-metilen-isoforona	1220	Nd	nd	AE	0,8	-	-	-	-	-	-	0,5	-
76	nerol	1229	1577	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
77	$\beta$ -citronelol	1230	Nd	nd	6	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
78	cuminaldehído	1240	1634	nd	2	4,2	tr	0,03	-	-	0,04	0,03	-	-
79	neral <sup>11</sup> + carvona	1246 (coel)	1613, nd	1657, nd	2	2,9	tr	0,04	0,09	-	0,06	0,07	-	0,02
80	geraniol <sup>15</sup>	1253	1619	1821	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	1,1
81	<i>p</i> -anisaldehído	1258	Nd	nd	4	0,09	tr	-	-	-	-	-	-	-
82	acetato de ( <i>Z</i> )-crisantenilo	1265	1493	nd	AE, 1, 5	0,08	0,07	0,1	-	-	-	-	0,2	-
83	2-( <i>E</i> )-decenal	1263	Nd	1618	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,04
84	geranial <sup>11</sup>	1274	1657	nd	3, 4	3,9	tr	-	-	-	-	-	-	0,04
85	felandral	1276	Nd	nd	EV	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
86	<i>p</i> -cimen-7-ol	1291	Nd	nd	AE, 6	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-
87	acetato de carquejilo <sup>1-3,8,10-11,13-14</sup>	1300	1597	1685	AE, 1-6	23,5	53,0	42,7	27,4	57,6	23,8	28,7	44,7	-
88	undecanal	1308	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,02
89	2,4-( <i>E,E</i> )-decadienal	1321	Nd	1782	2, 3	-	tr	-	-	-	-	-	-	0,07
90	acetato de ( <i>Z</i> )-pinocarvilo	1322	Nd	nd	AE, 2, 5	0,3	0,1	0,3	0,2	-	0,2	-	-	-
91	acetato de mirtenilo <sup>8</sup>	1327	1565	nd	AE	0,06	0,2	0,03	-	0,2	-	0,2	-	-
92	$\delta$ -elemeno <sup>15</sup>	1335	Nd	nd	AE	-	0,4	-	0,05	0,3	-	-	-	0,4
93	acetato de $\alpha$ -terpinilo	1346	Nd	nd	AE	-	0,3	0,6	-	0,3	0,05	0,2	-	-
94	acetato de ( <i>E</i> )-carvilo	1346	Nd	nd	EV	-	-	0,02	-	0,02	0,01	-	0,05	-
95	$\alpha$ -cubebeno <sup>1,8,15</sup>	1352	1422	1440	AE, 1, 5-6	0,06	0,05	0,05	0,05	0,01	0,02	0,03	0,02	-





Tabla 2, continuación

96	$\alpha$ -longipineno <sup>8</sup>	1352	1428	nd	6	0,05	tr	-	0,03	-	0,02	-	-	0,3
97	eugenol <sup>15</sup>	1358	Nd	nd	EV	-	-	0,02	-	-	0,05	0,1	0,05	-
98	acetato de nerilo	1366	1629	nd	AE, 2, 5	0,05	0,02	0,03	-	-	-	-	0,2	-
99	acetato de (Z)-carvilo	1367	Nd	nd	AE	0,08	-	0,09	0,05	0,03	0,03	-	-	-
100	ciclo-sativeno	1370	1440	nd	AE, 5, 6	0,3	0,05	-	-	-	-	-	-	-
101	iso-ledeno <sup>6,7,15</sup>	1370	Nd	nd	AE,1	0,08	0,2	-	-	-	-	-	-	-
102	$\alpha$ -ylangeno <sup>1</sup>	1373	Nd	1468	1, 6	0,1	tr	-	-	-	-	-	-	0,2
103	$\alpha$ -copaeno <sup>1,5,8-10,12,14</sup>	1377	Nd	1472	AE, 1, 5-6	0,3	0,2	0,2	0,3	-	-	0,2	0,3	0,6
104	$\beta$ -bourboneno	1382	Nd	1501	AE, 5	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-
105	2- <i>epi</i> - $\alpha$ -funebreno	1385	Nd	nd	AE	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
106	( <i>E</i> )- $\beta$ -damascenona <sup>15</sup>	1385	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7
107	acetato de mirtanilo <sup>8</sup>	1388	1666	nd	AE	0,1	0,03	0,2	0,2	0,03	0,2	0,04	0,09	-
108	$\beta$ -cubebeno <sup>1,5,8,15</sup>	1391	1504	1516	AE, 1, 4-5	0,2	0,1	0,02	0,09	0,06	0,03	0,07	0,2	-
109	$\beta$ -elemeno <sup>1-3,5-9,11-13,15</sup>	1394	Nd	1569	AE, 1-2, 4-6	0,6	1,7	0,2	0,7	2,2	0,1	0,3	1,7	0,6
110	longifoleno	1400	Nd	1584	AE, 4-5	-	0,01	-	-	-	-	-	-	0,05
111	metileugenol	1408	Nd	1976	2, 3	0,06	tr	0,07	0,4	0,1	0,1	0,09	0,1	-
112	$\beta$ -funebreno	1409	Nd	nd	AE, 1, 5	-	0,04	-	-	-	-	-	-	-
113	$\alpha$ -gurjuneno <sup>5,8,11,15</sup>	1410	1491	nd	AE, 1, 4-6	0,3	1,4	0,05	0,3	0,1	0,05	0,2	0,3	0,2
114	$\beta$ -cedreno	1416	Nd	nd	AE	0,2	-	0,06	-	-	-	-	0,07	-
115	( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno <sup>1-2,5-6,8-12,15</sup>	1419	1558	1572	AE, 1, 5	0,4	0,8	0,03	0,4	0,4	0,04	0,5	0,7	3,2
116	$\beta$ -copaeno <sup>15</sup>	1430	Nd	nd	AE	-	0,08	0,01	0,03	0,05	0,02	0,02	-	0,09
117	$\gamma$ -elemeno <sup>10</sup> (elixeno)	1432	Nd	nd	AE, 5-6	0,06	0,02	-	-	-	-	-	-	-
118	aromadendreno <sup>6,7,8,12</sup>	1437	Nd	1619	6	0,2	0,02	0,02	-	-	-	-	-	0,7
119	acetato de perillilo	1439	Nd	nd	AE	-	0,2	0,2	-	0,2	0,3	-	0,4	-



Tabla 2, continuación

120	<b><math>\alpha</math>-guaiano</b> <sup>5,9,15</sup>	1440	Nd	nd	1, 5	0,06	tr	-	-	-	-	-	-	-
121	<b><math>\alpha</math>-patchuleno</b> <sup>7</sup>	1448	Nd	nd	AE	0,2	0,07	-	0,03	-	-	-	-	-
122	dehidro-aromadendreno	1448	Nd	1774	AE, 5-6	-	0,03	-	-	-	-	-	-	-
123	<b><math>\alpha</math>-himachaleno</b> <sup>8</sup>	1448	1574	nd	AE, 1, 5	0,2	0,1	0,05	0,1	0,1	0,1	0,1	-	-
124	( <i>E</i> )-murola-3,5-dieno	1449	Nd	nd	AE	-	0,02	-	-	-	-	-	-	-
125	<b><math>\alpha</math>-humuleno</b> <sup>5-7,9-12,15</sup> ( <b><math>\alpha</math>-cariofileno</b> )	1453	1683	1645	AE, 1, 5	0,1	0,2	-	0,1	-	-	0,07	0,3	0,6
126	geranilacetona	1454	Nd	1829	2	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
127	<b>9-epi-(<i>E</i>)-cariofileno</b> <sup>15</sup>	1456	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	0,02	0,1	-
128	( <i>E</i> )- <b><math>\beta</math>-farneseno</b> <sup>8</sup>	1459	1595	1643	AE, 2, 5	0,3	0,5	0,02	0,2	0,1	0,07	-	0,2	-
129	<b>allo-aromadendreno</b> <sup>8,12,15</sup>	1464	1660	nd	AE, 1, 4-6	0,2	0,1	0,05	0,2	0,1	0,07	0,1	-	1,3
130	$\beta$ -acoradieno	1470	Nd	nd	AE	0,1	-	0,08	0,1	-	0,06	-	-	-
131	<b><math>\gamma</math>-gurjuneno</b> <sup>2,5-6,8,10</sup>	1474	1601	nd	AE, 5-6	0,4	0,3	0,1	0,4	0,08	0,1	0,2	0,6	0,2
132	(10- <i>epi</i> )- $\beta$ -acoradieno	1477	Nd	nd	AE	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
133	<b><math>\gamma</math>-muroleno</b> <sup>5-6,8-10,12,15</sup>	1478	1614	1671	AE, 6	0,2	0,2	0,03	0,2	-	-	-	0,2	1,7
134	<b>germacreno D</b> <sup>1,3,5-12</sup>	1483	Nd	1684	AE, 1, 4-5	0,8	1,9	-	0,4	1,7	-	0,5	5,1	-
135	( <i>E</i> )- $\beta$ -ionona	1485	Nd	nd	2	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
136	$\gamma$ -himachaleno	1487	Nd	nd	AE	0,8	0,1	0,02	0,4	0,1	0,1	0,1	-	-
137	<b><math>\beta</math>-selineno</b> <sup>5,12-13,15</sup>	1487	1643	nd	AE, 1, 5-6	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	0,1	0,08	0,3	0,2
138	1- <i>epi</i> -cubebol	1489	Nd	nd	EV	-	-	0,2	-	-	0,07	0,5	-	-
139	( <i>E</i> )- <b>murola-4(14),5-dieno</b> <sup>15</sup> ( <b>epi-biciclo-sesquifelandreno</b> )	1492	Nd	nd	AE, 5	0,4	0,09	-	0,03	-	-	0,04	-	-
140	<b>ledeno</b> <sup>1</sup> ( <b>viridifloreño</b> )	1495	Nd	nd	6	0,3	tr	-	0,5	-	-	-	-	2,3
141	$\beta$ -himachaleno	1498	Nd	nd	4, 5	-	tr	-	0,1	-	0,2	0,06	-	-
142	<b>biciclo-germacreno</b> <sup>1,2,5-7,9,11-12,15</sup>	1498	1679	1707	AE, 1, 5	0,4	1,0	-	-	-	-	-	1,4	-



Tabla 2, continuación

143	$\alpha$ -muroloeno <sup>1,5-6,8-9,15</sup>	1502	Nd	1699	AE, 1, 5	0,2	0,1	0,1	0,1	-	-	0,08	0,3	1,0
144	germacreno A <sup>6,7</sup>	1503	Nd	nd	AE, 1, 5	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-
145	$\alpha$ -bulneseno <sup>5,10,15</sup>	1509	Nd	nd	AE	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-
146	$\beta$ -bisaboleno	1510	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2
147	$\delta$ -amorfenol	1511	Nd	nd	6	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
148	valenceno	1512	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-
149	$\gamma$ -cadineno <sup>15</sup>	1520	Nd	nd	EV	-	-	-	0,06	0,09	-	-	0,3	0,9
150	$\delta$ -cadineno <sup>1-3,5-10,12,15</sup>	1525	1671	1732	AE, 1-2, 4-6	0,5	0,6	0,2	0,4	0,5	0,1	0,3	0,9	3,6
151	( <i>E</i> )-cadin-1,4-dieno <sup>6-7,15</sup> (cubeneno)	1531	Nd	1761	AE, 1, 4-6	-	0,02	-	-	-	-	-	0,05	0,1
152	$\alpha$ -cadineno <sup>6,15</sup>	1536	Nd	1770	AE, 1, 5-6	0,1	0,01	-	-	-	-	-	-	-
153	( <i>Z</i> )-cadin-1(6),4-dieno	1541	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	0,02	-
154	( <i>E</i> )- $\alpha$ -bisaboleno	1543	1640	nd	AE, 5	-	0,01	-	-	-	-	-	-	-
155	$\alpha$ -calacoreno <sup>1,5-8,12,15</sup>	1544	1795	1882	AE, 1, 4-6	0,3	0,04	-	-	-	-	0,2	-	0,7
156	elemol <sup>1-2,8,10</sup>	1554	Nd	2048	AE, 1-6	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,3	0,4	1,0	-
157	germacreno B <sup>5-7,12,15</sup>	1555	Nd	nd	1, 5	-	tr	-	-	-	-	-	0,04	-
158	( <i>E</i> )-nerolidol <sup>6,8</sup>	1565	1877	2011	3	0,1	tr	0,2	-	-	-	-	-	-
159	palustrol <sup>1,3-4,8,13-14</sup>	1574	1851	1903	AE, 1, 5-6	7,8	4,9	11,2	14,6	5,4	19,6	22,2	7,3	9,2
160	espatulenol <sup>1-2,4-6,8-15</sup> + germacreno D-4-ol	1582 (coel)	1966, 1908	2093, 2017	AE, 2-4	3,8	0,4	3,0	5,0	0,2	8,0	3,5	0,9	14,8
161	amorfa-4,9-dieno-2-ol	1586	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
162	óxido de cariofileno <sup>6,8,10-15</sup>	1587	1945	1944	AE, 2	1,3	0,2	1,7	1,7	0,07	1,5	3,3	0,2	10,0
163	viridiflorol <sup>1,4-6,8-10,13-15</sup> + globulol <sup>2,4-7,9,11-12,14</sup>	1596 (coel)	1934, nd	2054, 2044	AE, 1, 3-4, 6	3,9	1,0	3,5	1,4	1,2	3,1	3,0	2,4	-
164	ledol <sup>1,2,5,8-11,13-14</sup>	1607	1928	2001	AE, 4-5	2,7	1,0	3,1	3,7	1,1	5,5	5,3	2,3	-
165	óxido de humuleno II <sup>15</sup>	1617	1984	2007	AE	0,7	-	0,5	0,6	-	-	0,9	0,03	-



Tabla 2, continuación

166	1- <i>epi</i> -cubenol <sup>12,15</sup>	1623	Nd	nd	EV	-	-	0,2	0,2	0,04	-	0,2	-	-
167	$\alpha$ -corocaleno	1628	Nd	nd	AE	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
168	$\alpha$ -acorenol	1632	Nd	nd	EV	-	-	0,05	-	-	-	-	-	-
169	1,10- <i>diepi</i> -cubenol	1629	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	-	0,6
170	$\gamma$ -eudesmol <sup>1,8,10</sup>	1633	Nd	nd	AE, 1, 4	0,4	0,02	-	-	0,02	-	-	0,1	-
171	cubenol	1633	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	0,08	-
172	<i>epi</i> - $\alpha$ -cadinol <sup>5-6</sup>	1638	Nd	nd	AE, 1, 5	0,2	0,02	-	-	-	-	-	-	-
173	$\alpha$ -murolol <sup>8,15</sup> ( $\delta$ -cadinol)	1645	Nd	2174	AE, 2	0,7	0,08	0,06	0,2	0,06	-	-	0,2	2,5
174	himachalol	1647	Nd	nd	EV	-	-	0,4	0,6	0,09	0,7	0,3	-	-
175	$\alpha$ -cadinol <sup>2,5-9,12-13,15</sup>	1653	Nd	2200	AE, 5-6	-	0,1	-	-	0,1	-	-	0,3	-
176	$\beta$ -eudesmol <sup>1-3,8,10,13-14</sup>	1656	2059	nd	AE, 1-2, 4-6	4,8	0,9	3,6	3,4	0,8	6,8	2,9	1,8	-
177	$\zeta$ -murolol <sup>13</sup> ( <i>epi</i> - $\alpha$ -murolol)	1661	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	0,6	-
178	cadaleno <sup>15</sup>	1677	2050	2188	1, 5	1,0	tr	-	-	-	-	-	-	-
179	óxido de aromadendreno	1676	Nd	nd	AE	-	-	-	-	-	-	-	0,1	-
180	$\alpha$ -bisabolol	1687	Nd	nd	3	0,2	tr	-	-	-	-	-	-	-
181	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol <sup>15</sup>	1692	Nd	2331	AE	0,3	0,06	0,1	-	-	-	0,3	0,1	-
182	eudesma-4,11-dien-2-ol	1726	Nd	nd	EV	-	-	-	-	-	-	-	0,04	-
183	ciclo-colorenona	1764	Nd	nd	AE	0,08	-	0,05	-	-	-	-	-	-
184	$\beta$ -costol <sup>15</sup>	1764	Nd	nd	2	-	tr	-	-	-	-	-	-	-
185	14-hidroxi- $\delta$ -cadineno	1809	Nd	nd	AE	0,05	-	-	-	-	-	-	-	0,09
186	neofitadieno <sup>15</sup>	1837	Nd	nd	AE, 1, 5-6	0,05	0,1	-	-	-	-	-	-	5,2
187	hexahidro-farnesilacetona	1853	Nd	nd	EV	-	-	0,01	0,04	-	-	-	-	0,5
188	ácido palmítico	1967	Nd	2829	AE	0,09	0,1	-	-	-	-	-	-	-
189	fitol	1942	Nd	nd	EV	-	-	0,01	-	-	-	-	0,02	1,8



Tabla 2, continuación

Total identificado (%)	91,0	99,9	88,4	90,2	96,2	87,3	88,1	96,3	92,9
Hidrocarburos monoterpénicos (%)	7,1	23,6	11,3	10,5	20,2	11,9	7,3	14,9	7,3
Monoterpenos oxigenados (%)	44,3	55,5	46,8	40,2	59,7	28,0	33,1	47,0	3,9
Hidrocarburos sesquiterpénicos (%)	10,5	11,1	1,4	5,6	6,0	1,2	3,2	14,5	28,9
Sesquiterpenos oxigenados (%)	27,3	9,1	28,1	31,7	9,5	45,6	42,8	17,7	47,2
Otros (%)	1,8	0,6	0,8	2,2	0,8	0,6	1,7	2,2	5,6
No identificado (%)	9,0	0,1	11,6	9,8	3,8	12,7	11,9	3,7	7,1

**Tabla 2:** Composición obtenida por GC-MS de los aceites esenciales y extractos volátiles de *Baccharis trimera* de diferentes orígenes geográficos.

Referencias: (a), los compuestos se ordenan según su *LRI* creciente en *HP-5MS*; los compuestos en negrita fueron identificados previamente en la especie por: (1) Chialva y Doglia, 1990; (2) Simões Pires *et al.*, 2005a; (3) Vargas *et al.*, 2006; (4) Silva *et al.*, 2006a; (5) Silva *et al.*, 2007; (6) Lago *et al.*, 2008a; (7) Lago *et al.*, 2008b; (8) Alves, 2010; (9) Nunes de Oliveira *et al.*, 2012; (10) Besten *et al.*, 2013; (11) Suzuki *et al.*, 2016; (12) García *et al.*, 2017; (13) Trombim-Souza *et al.*, 2017; (14) Tomazoni *et al.*, 2018; y (15) Silveira, 2018. (b) *LRI1*: índices de retención lineal en *HP-5MS*; *LRI2*: índices en *OV-225*; *LRI3*: índices en *Stabilwax*. (c): identificado en el aceite esencial de la población de referencia (AE) y/o en las fracciones correspondientes (1-6) de CC; o en el extracto volátil (EV) en el caso de que el compuesto no fuera encontrado en la población de referencia. (d): porcentaje de áreas relativas en modalidad *Full-Scan* en columna *HP-5MS*; origen de *B. trimera* según notación en Tabla 1. (tr) trazas (<0,01%); (coel): co-elución. nd: no detectado o no determinado. (\*): compuestos tentativamente identificados (sin confirmación de *LRI*).(\*\*): el carquejifenol fue identificado por comparación del espectro de masa y de su *LRI* con los respectivos del compuesto semi-sintético obtenido y caracterizado espectroscópicamente en éste trabajo de tesis (capítulo 8).



Luego de un detenido análisis de la composición del aceite esencial y de los extractos volátiles de las diferentes poblaciones de *B. trimera* estudiadas (con el empleo de *CC-GC-MS* para el caso del aceite de la población de referencia) fue posible la identificación de 193 componentes, 101 de los cuales no han sido previamente reportados en el volatiloma de la especie (Tabla 2). Por su parte, si se considera solamente el enfoque *CC-GC-MS*, el mismo permitió incrementar un 45% la capacidad de detección (análisis *GC-MS* directo: 106 compuestos; análisis *CC-GC-MS*: 150 compuestos), detectándose componentes a nivel de trazas que convencionalmente no serían detectados.

Ningún reporte previo en la literatura detalla el antedicho nivel de identificación para el volatiloma de *B. trimera*, seguramente debido a que los mismos en general emplean una única fase estacionaria en el análisis cromatográfico y no aplican fraccionamiento como fue realizado en éste trabajo. Existe un único reporte previo en que se ha empleado un sistema bidimensional cromatográfico instrumental (*GC×GC/TOF-MS*) para el análisis del aceite de *B. trimera*, aunque en éste sólo se informó la presencia de 61 componentes (Alves, 2010). Lo anterior significa que el enfoque de *CC-GC-MS* seguido en éste trabajo es una estrategia poderosa para detectar compuestos a nivel de trazas comparable (o en ciertos casos, mejor) a los sistemas bidimensionales instrumentales (*on-line*).

Como se expresó en el capítulo 4, el principal compuesto en el aceite esencial de *B. trimera* colectada en Uruguay fue el monoterpene irregular acetato de carquejilo, aunque el mismo presentó una importante variación en porcentaje en la población de referencia (VE invernal 23,5% y FL estival 53,0%), así como en el resto de las poblaciones estudiadas (Tabla 2). El acetato de carquejilo también fue el componente mayoritario en muestras colectadas en Minas (Departamento de Lavalleja) y la Quebrada de los Cuervos (Departamento de Treinta y Tres) (resultados no mostrados), lo que indicaría que las poblaciones uruguayas son uniformes en la producción de éste compuesto.

Como fue expuesto anteriormente en el capítulo 4, en la población de *B. trimera* colectada en São Francisco de Paula (Rio Grande do Sul, Brasil) no fue determinada la presencia del acetato de carquejilo (Tabla 2).



Por su parte, el carquejol demostró una tendencia estacional opuesta a la de su acetato en la población de referencia: 3,5% en VE y 0,5% en FL; en el resto de las poblaciones estudiadas demostró porcentaje variable, desde ausencia (S.F. de Paula) hasta presencia en 7,5% (Valle del Lunarejo, Rivera).

Algunos trabajos previos en los cuales se ha colectado y destilado *B. trimera* en diferentes estadios fenológicos en el mismo sitio de colecta, han demostrado una amplia variación mensual en el contenido de acetato de carquejilo y carquejol (Simões Pires *et al.*, 2005a; Carreira, 2007; Alves 2010). Por ejemplo, Simões Pires *et al.* (2005a) determinaron una variación del porcentaje del primero de ellos del orden de: 68,0% en julio, 42,3% en agosto, 60,0% en setiembre y 58,5% en octubre. Por su parte, la variación del carquejol fue de: 1,5% en julio, 0,6% en agosto, 2,6% en setiembre y 1,9% en octubre (Simões Pires *et al.*, 2005a). Diferentes patrones de variación han sido determinados por diferentes autores (Simões Pires *et al.*, 2005a; Carreira, 2007; Alves 2010) cuando se comparan diferentes sitios de colecta en diferentes ecosistemas; lo que demuestra que las condiciones ambientales ejercen en gran medida una influencia sobre la composición química y sobre la expresión de un quimiotipo.

Asimismo, una amplia variación en el contenido de acetato de carquejilo y carquejol ha sido constatada al comparar diferentes órganos del material vegetal; sin embargo, no se han apreciado variaciones importantes como consecuencia del dioicismo (Besten *et al.*, 2013).

Si bien se ha postulado que el acetato de carquejilo podría ser un quimiomarcador para *B. trimera*, este hecho se encuentra en discusión en la literatura (Simões Pires *et al.*, 2005a; Silva *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2007; Lago *et al.*, 2008a; Lago *et al.* 2008b; Besten *et al.*, 2013).

En éste trabajo de tesis se ha encontrado la presencia de dicho compuesto no sólo en *B. trimera*, sino en un extracto supercrítico de *B. uncinella* (capítulo 3); en los extractos volátiles obtenidos por SDE de *B. milleflora*, *B. articulata*, *B. gnaphalioides*, *B. ochracea*, *B. punctulata*, *B. crispa* (individuos masculinos), *B. linearifolia* y *B. spicata* (capítulo 4); y en el volatiloma de ambos sexos de *B. articulata* (capítulo 5). Por otra parte, tampoco el carquejol fue únicamente determinado en *B. trimera* sino también en *B. gnaphalioides* y en *B. punctulata* (capítulo 4).



Estas evidencias invalidan sin lugar a dudas la hipótesis que dichos componentes puedan ser considerados quimiomarcadores para *B. trimera*.

De la misma forma, tampoco se los puede considerar como compuestos exclusivos del género *Baccharis* L., ya que el acetato de carquejilo y/o carquejol han sido reportados en el aceite esencial de *Phoebe porosa* (Lauraceae) (Weyerstahl *et al.*, 1994), *Eupatorium buniifolium* (Asteraceae), (Lorenzo *et al.*, 2005) y *Piqueria trinervia* (Asteraceae) (Rufino-González *et al.*, 2017). El rol del acetato de carquejilo y del carquejol en la naturaleza es desconocido, y tampoco existe información respecto a su origen biosintético; aunque Bohlmann y Zdero (1969) postularon que los mismos surgen de un rearrreglo del esqueleto del  $\beta$ -pineno (ver capítulo 8).

Resulta interesante que en el análisis detallado del aceite esencial de la población de referencia no sólo fueron identificados el carquejol y el acetato de carquejilo, sino también el carquejifenol (elucidación estructural reportada en el capítulo 8) y tentativamente el carquejeno y el dehidro-carquejol (Tabla 2). Estos últimos no pudieron ser confirmados debido a que no existen índices de retención publicados para los mismos, así como tampoco pudieron ser aislados dado que se encontraron a nivel de trazas en el aceite esencial.

Como se muestra en la Tabla 2, otros componentes fueron de importancia en el volatiloма de las diferentes poblaciones de *B. trimera*:  $\beta$ -pineno, mirceno, limoneno (co-eluyendo junto al  $\beta$ -felandreno), (*E*)- $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -elemeno, germacreno D, palustrol, espatulenol (co-eluyendo junto al germacreno D-4-ol), óxido de cariofileno, viridiflorol (co-eluyendo junto al globulol), ledol y  $\beta$ -eudesmol. Todos éstos compuestos han sido previamente identificados en el aceite de *B. trimera* (Chialva y Doglia, 1990; Simões Pires *et al.*, 2005a; Vargas *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2007; Carreira, 2007; Lago *et al.*, 2008a; Lago *et al.*, 2008b; Alves, 2010; Nunes de Oliveira *et al.*, 2012; Besten *et al.*, 2013; Suzuki *et al.*, 2016; García *et al.*, 2017; Trombin-Souza *et al.*, 2017; Umpiérrez, 2017; Silveira, 2018; Tomazoni *et al.*, 2018).

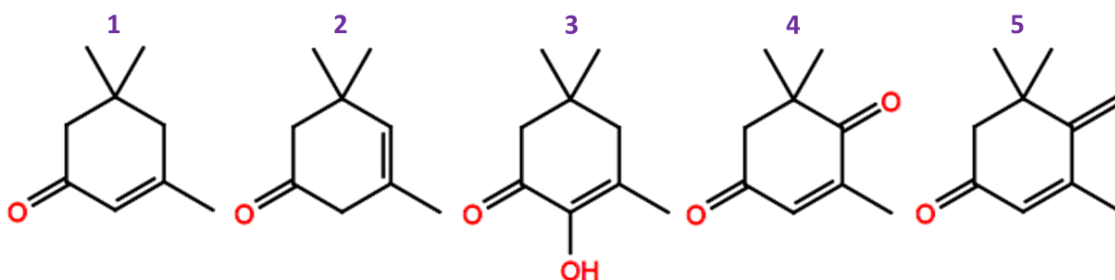
Es de destacar que en éste trabajo fueron identificados varios aldehídos, principalmente en la muestra vegetativa de la población de referencia (VE) que no fueron detectados (o detectados a nivel de trazas) en la muestra en floración (FL) (Tabla 2). Tal es el caso del hexanal, 2-(*E*)-hexenal, 2-(*E*)-heptenal, benzaldehído, octanal, nonanal, cuminaldehído,





neral, *p*-anisaldehído y geranial. Por el contrario, otros aldehídos sólo fueron determinados en FL: 2,4-(*E,E*)-heptadienal, 2-(*E*)-octenal y 2,4-(*E,E*)-decadienal (Tabla 2). Además, un par adicional de aldehídos (mirtenal y safranal) se encontraron presentes en ambas muestras (VE y FL). Dichas alteraciones metabólicas podrían ser consecuencia de cambios en las condiciones ambientales entre VE y FL (efecto de la estacionalidad; capítulo 6), o debido a la necesidad de *B. trimera* de atraer insectos polinizadores en el período FL (Lago *et al.*, 2008a; Besten *et al.*, 2013).

Mediante el análisis químico detallado de éste trabajo fue posible la identificación en el perfil volátil de *B. trimera* de C<sub>9</sub> norisoprenoides derivados de la isoforona (Figura 9; **1**: α-isoforona, **2**: β-isoforona, **3**: 2-hidroxi-isoforona, **4**: 4-cetoisoforona y **5**: 4-metilenisoforona), siendo la primera vez que éste tipo de compuestos son informados para ésta especie.



**Figura 9:** C<sub>9</sub> norisoprenoides derivados de la isoforona determinados en el perfil volátil de diferentes poblaciones de *B. trimera*. Referencias: **1**: α-isoforona, **2**: β-isoforona, **3**: 2-hidroxi-isoforona, **4**: 4-cetoisoforona y **5**: 4-metilenisoforona.

La importancia de éstos derivados (más allá de su relevancia metabólica *per se*) radica en que los mismos son responsables del aroma a azafrán (Concurso *et al.*, 2017), y por ello, podría influenciar las características organolépticas del aceite esencial de *B. trimera* de Uruguay para su posible aplicación en la industria de aromas y fragancias. Además, se identificaron en el perfil volátil de la especie un par de C<sub>13</sub> norisoprenoides: (*E*)-β-ionona y (*E*)-β-damascenona (Tabla 2).

Como fue expuesto en el capítulo 1, los norisoprenoides se originan en la ruptura química o enzimática de los carotenoides y se encuentran presentes en diferentes variedades de uvas, confiriendo apreciables notas aromáticas a los vinos (Mendes-Pinto, 2009). En el caso de *B. trimera*, la presencia de carotenos reportada por Simão *et al.* (2013) justifica el hecho de que se hayan detectado sus productos de degradación en las fracción volátil.



Otros compuestos identificados en éste trabajo y que también son originados en la ruptura o rearreglo de terpenos superiores fueron: 6-metil-5-hepten-2-ona ( $C_8$ , sulcatona), 6-metil-3,5-(*E*)-heptadien-2-ona ( $C_8$ ), rosafurano ( $C_{10}$ ) y 4,8-dimetil-1,3,7-(*E*)-nonatrieno (DMNT) ( $C_{11}$ ) (Tabla 2).

Las variables ambientales en general tienen una gran influencia en la fisiología vegetal, como fue visto en el capítulo 6. Por ejemplo, Silva *et al.* (2006a) demostraron que altos niveles de radiación afectan el desarrollo de *B. trimera*, produciendo plantas más bajas y más pesadas (provistas de más ramas) que las que se desarrollan bajo sombra. En el mismo sentido, los autores encontraron que el rendimiento de aceite esencial es mayor para especímenes que crecen bajo fuerte iluminación solar, y que el aceite esencial de éstas concentra mayor cantidad de globulol y epi-globulol y menor proporción de palustrol que las plantas desarrolladas bajo sombra (Silva *et al.*, 2006a).

Los resultados anteriores podrían justificar las variaciones observadas en la Tabla 2 entre los perfiles volátiles de VE y FL, debido a que el nivel de radiación solar al cual las plantas son expuestas cambia continuamente durante el año. Ello no sólo se debería al efecto de estacionalidad (como se detalló en el capítulo 6), sino también al crecimiento de otras especies dentro de la misma comunidad vegetal (por ejemplo, árboles y arbustos) que podrían disminuir la radiación efectiva que las plantas pueden captar para su desarrollo.

Otro factor importante que influencia la composición del aceite esencial de *B. trimera* es el balance químico del suelo. En este sentido, Silva *et al.* (2007) demostraron para especímenes cultivados de *B. trimera*, que el contenido de ledol y guaiol presenta una fuerte correlación con el contenido de P, K, S, Cu y Zn y con el nivel de saturación de bases en el suelo. Por otra parte, el contenido de (*E*)- $\beta$ -cariofileno en el aceite se correlacionó con la concentración de Mn y Al, la humedad del suelo y con la ocurrencia de precipitaciones (Silva *et al.*, 2007).

En otro estudio, García *et al.* (2017) demostraron que el abonado de un cultivar registrado de *B. trimera* (CPQBA-1) con fertilizante orgánico (consistente en biomasa vegetal y estiércol animal) incrementa el rendimiento de materia seca y de aceite esencial, alterando la composición del mismo. Como consecuencia de una mayor dosis de fertilizante orgánico, el contenido de espatulenol en el aceite disminuyó mientras que el de germacreno D aumentó, y otros componentes como biciclogermacreno, (*E*)- $\beta$ -



cariofileno y óxido de cariofileno también fueron sensibles a la dosis de abonado (García *et al.*, 2017).

Considerando los anteriores estudios, es evidente que las condiciones edafo-climáticas en cada sitio de ocurrencia de *B. trimera* junto a las diferencias genéticas pueden influenciar al metabolismo secundario de la especie, afectando la composición volátil y permitiendo la existencia de composiciones muy dispares entre las poblaciones silvestres de diferentes localidades, como se muestra en la Tabla 2.

### **3.4 Variación inter-poblacional en la composición volátil de *B. trimera*. Tratamiento estadístico.**

Para realizar un análisis multivariado inter-poblacional amplio sobre la composición volátil de *B. trimera*, se tomaron los datos de la Tabla 2 junto con datos anteriormente publicados en bibliografía, obteniéndose la Tabla 3.

El objetivo de éste análisis fue establecer la presencia de quimiotipos para la especie en toda el área de distribución de la misma. Para eliminar mayores fuentes de variación (como las provenientes de las diferentes metodologías de extracción empleadas y de los diferentes enfoques de análisis de la composición), sólo se considerarán los componentes que se determinaron en un porcentaje mayor al 5% en al menos una de las muestras [ $\beta$ -pineno, limoneno, carquejol, acetato de carquejilo, (*E*)- $\beta$ -cariofileno, aromadendreno,  $\alpha$ -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno,  $\alpha$ -cadineno, palustrol, espatulenol, óxido de cariofileno, viridiflorol + globulol, ledol y  $\beta$ -eudesmol] (Tabla 3).



Compuesto	Muestras (% de áreas relativas)																		
<i>β-pineno</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	2,6	8,8	7,1	4,8	6,8	8,1	3,5	5,0	0,2	8,2	2,4	5,7	1,4	5,6	12,6	11,3	12,3	-	
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,9	2,9	-	0,4	4,8	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
3,1	0,4	2,2	-	-	-	-	-	2,3	1,0	2,8	1,1	0,2	0,5	0,2	0,5	2,1	2,8	-	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	-	
23,4	4,8	0,7	4,4	1,3	8,8	2,6	5,1	1,7	8,0	3,1	9,0	1,6	6,8	2,7	6,0	5,1	8,7	-	
<i>limoneno*</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	1,9	6,0	2,5	2,6	5,7	2,6	2,0	4,5	0,8	4,7	0,8	1,8	1,0	3,4	4,2	4,7	4,0	-	
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-	-	-	-	0,1	-	-	-	-	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	-	
5,9	18,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>carquejol</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
	3,5	0,7	0,5	7,5	0,7	1,0	2,2	1,0	-	2,0	3,7	5,5	-	1,5	0,6	2,6	1,9	-	
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29,9	25,7	29,6	26,5	22,3	27,7
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	-	
31,2	28,3	-	-	-	0,6	0,8	3,7	-	16,9	0,7	0,6	1,2	0,2	8,5	7,3	6,3	6,2	-	



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	0,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>acetato de carquejilo</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	23,5	53,0	42,7	27,4	57,6	23,8	28,7	44,7	-	42,8	36,2	65,8	35,5	68,0	42,3	60,0	58,5	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17,8	15,8	18,6	21,3	18,7	19,0
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
20,7	19,9	-	-	41,6	68,9	70,9	59,6	-	42,7	73,5	73,3	45,6	51,1	38,1	40,7	66,7	65,1	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
19,0	52,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	39,5	40,3	57,5	57,9	
<i>β-cariofileno**</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	0,4	0,8	0,03	0,4	0,4	0,04	0,5	0,7	3,2	1,3	-	-	1,6	0,5	-	-	-	2,0
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	16,0	16,0	17,0	13,0	14,0	14,0	21,0	16,0	19,0	17,0	17,0	17,0	14,4	9,7	6,1	4,5	12,7	7,0
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
6,0	3,6	16,1	12,3	-	-	-	-	14,8	1,0	-	0,4	1,3	3,5	1,5	2,1	0,3	-	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
6,4	-	15,5	14,1	14,6	16,0	15,1	13,2	14,4	12,9	15,7	13,2	15,8	14,0	0,3	1,2	0,4	0,3	
<i>aromadendreno</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	0,2	0,02	0,02	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	0,4
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,9	7,8	12,5	8,5
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
6,6	3,4	1,2	0,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	-	-	1,1	1,6	1,0	1,0	1,0	1,3	1,1	1,2	0,8	1,3	0,9	1,5	-	-	-	-
<i>α-humuleno</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	0,1	0,2	-	0,1	-	-	0,07	0,3	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	19,4
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	1,4	1,8	1,6	1,4	1,4	1,2	1,9	2,0	1,9	1,6	1,6	1,8	3,4	5,1	2,3	5,9	-	8,1
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
-	4,8	-	20,3	-	-	-	-	2,1	0,1	-	0,3	1,1	0,7	0,9	-	0,4	-	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
3,1	-	1,8	1,5	1,5	1,1	1,6	1,2	1,7	1,0	1,8	1,3	1,8	3,6	0,09	0,2	0,1	0,05	
<i>germacreno D</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	0,8	1,9	-	0,4	1,7	-	0,5	5,1	-	4,3	-	-	-	-	-	-	-	8,9
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	25,0	7,7	6,3	22,0	25,0	23,0	24,0	8,9	13,0	27,0	28,0	26,0	-	5,6	4,0	-	10,8	11,7
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
2,0	1,9	-	12,9	0,8	1,0	1,1	0,6	15,3	4,2	3,9	4,9	6,9	9,7	6,2	4,4	3,1	3,1	
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
5,0	-	11,4	8,2	11,1	2,6	10,9	9,5	12,0	5,4	13,5	8,0	15,2	12,6	1,1	0,2	1,4	1,7	
<i>biciclogermacreno</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	0,4	1,0	-	-	-	-	-	1,4	-	1,6	-	-	-	-	1,2	0,4	0,5	2,7
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
23,0	14,0	12,0	17,0	16,0	15,0	20,0	15,0	13,0	23,0	21,0	20,0	-	6,1	3,7	-	10,9	-	
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
1,6	-	7,8	3,0	-	-	-	-	14,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	1,6	-	20,9	19,2	21,8	15,8	21,7	18,1	23,9	18,9	22,9	16,7	22,5	19,8	-	-	-	0,7
<i>α-cadineno</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	0,1	0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
-	-	11,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>palustrol</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	7,8	4,9	11,2	14,6	5,4	19,6	22,2	7,3	9,2	0,08	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
-	6,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,2	4,7	5,3	5,6
<i>espatulenol***</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	3,8	0,4	3,0	5,0	0,2	8,0	3,5	0,9	14,8	0,3	1,2	-	2,8	-	-	-	-	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	2,6	12,0	9,4	6,4	5,1	3,0	3,0	12,0	7,1	3,5	3,3	2,5	-	-	-	-	-	-
37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	
16,5	-	0,9	-	4,7	1,8	1,5	2,3	2,0	0,2	-	0,4	0,3	-	0,2	0,6	-	0,2	



Fitoquímica de *Baccharis* spp. (Asteraceae): Metabolitos Secundarios, Semi-Síntesis y Bioactividad

	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	4,4	0,4	10,6	6,2	11,0	17,7	8,9	20,2	9,4	19,1	9,4	6,7	8,8	5,3	0,6	0,2	0,6	0,5
<i>óxido de cariofileno</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	1,3	0,2	1,7	1,7	0,07	1,5	3,3	0,2	10,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	-	1,1	7,5	6,1	2,4	1,0	0,8	1,1	-	0,3	-	-	0,5	0,4	0,3	0,7	-	-
	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	-	0,3	5,4	4,6	5,3	6,1	5,3	7,0	5,2	3,5	4,6	5,1	4,5	3,0	0,1	0,1	-	-
<i>viridiflorol + globulol</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	3,9	1,0	3,5	1,4	1,2	3,1	3,0	2,4	-	0,8	0,6	-	-	-	2,3	0,9	1,2	1,7
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	5,2	11,8	14,6	7,3	6,9	3,7	6,2	11,7	9,5	5,3	5,8	5,0	-	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	-	-	3,7	1,7	4,9	2,0	2,5	1,2	2,0	0,6	0,6	0,3	1,2	0,7	3,6	3,5	1,6	1,0
	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	2,3	2,2	1,8	1,4	1,6	1,2	1,8	1,4	1,9	1,5	1,3	1,2	1,4	0,6	3,3	1,5	1,5	1,4
<i>ledol</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	2,7	1,0	3,1	3,7	1,1	5,5	5,3	2,3	-	1,0	19,6	10,9	24,2	5,9	7,2	7,1	7,5	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	7,5	12,0	9,7	12,0	11,0	9,6	2,9	9,6	9,3	5,9	4,8	4,4	-	-	1,1	6,9	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
-	1,1	-	-	23,0	8,8	9,0	14,5	1,3	12,6	6,0	7,7	17,0	15,1	14,9	17,5	7,0	7,7	





	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
	4,6	2,1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	1,0	1,5	1,4
<i>β-eudesmol</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	4,8	0,9	3,6	3,4	0,8	6,8	2,9	1,8	-	1,4	13,8	2,3	14,8	2,3	1,3	3,0	2,9	-
	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,8	-	-	-	-	-
	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
	-	0,6	-	-	5,0	3,9	3,0	1,6	-	2,7	5,0	2,9	4,5	1,5	4,4	5,5	4,0	5,1
55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	
-	1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,7	0,9	1,5	1,6	

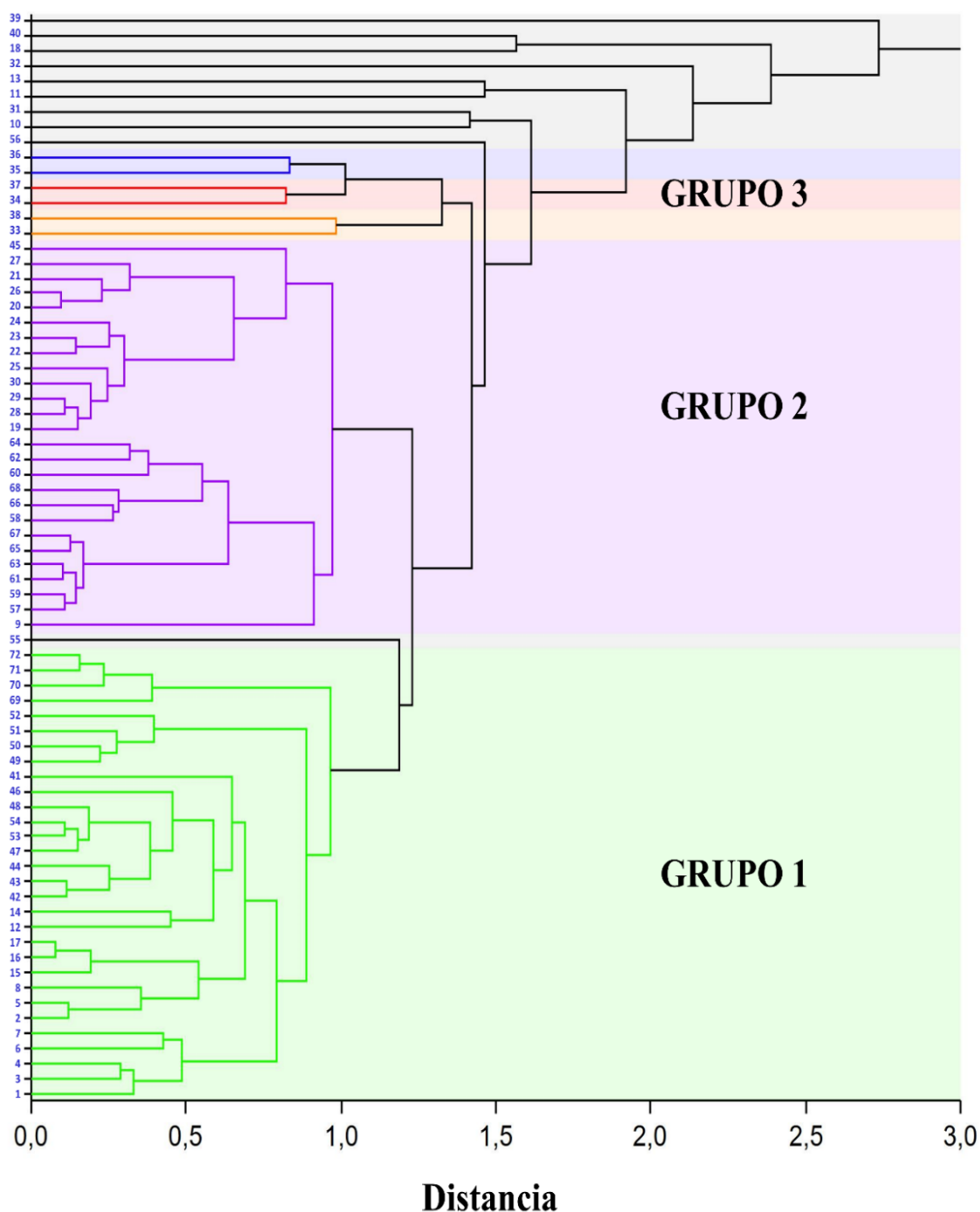
**Tabla 3:** Composición volátil (en porcentaje de componentes mayores al 5%) de *B. trimera* de las muestras obtenidas en el presente trabajo de tesis y reportada en la bibliografía.

Referencias: **1-9:** presente trabajo (en orden creciente: VE, FL, M1, M2, M3, M4, M5, M6 y M7); **10:** Chialva y Doglia, 1990; **11-17:** Simões Pires *et al.*, 2005 (según el código de los autores, en orden creciente: Bt1, Bt2, Bt3, Bt4j, Bt4a, Bt4s y Bt4o); **18:** Lago *et al.*, 2008b; **19-30:** Silva *et al.*, 2007 (19-24: en orden creciente, plantas cultivadas colectadas en enero, marzo, mayo, julio, setiembre, noviembre; 25-30 en orden creciente: plantas salvajes colectadas en enero, marzo, mayo, julio, setiembre, noviembre); **31-38:** Carreira, 2007 (en orden creciente: composición de plantas secas del Cerrado y Mata Atlántica, colectas de verano, otoño, invierno y primavera; de acuerdo a la Tabla 3 de la autora); **39-40:** Lago *et al.*, 2008a (en orden creciente: plantas femeninas y masculinas); **41-44:** Alves, 2010 (en orden creciente: colecta de verano, otoño, invierno y primavera; de acuerdo a la Tabla 6 del autor); **45:** Nunes *et al.*, 2012; **46-54:** Besten *et al.*, 2013 (en orden creciente: 1-9 en la notación de los autores que figura en la Tabla 2 del respectivo trabajo); **55:** Suzuki *et al.*, 2016; **56:** Trombim-Souza *et al.*, 2017; **57-68:** García *et al.*, 2017 (en el orden de la Tabla 3 de los autores); **69-72:** Umpiérrez, 2017 (según el código de la autora, en orden creciente: BTSF, BTSV, BTNF, BTNV). (\*) suma de limoneno y  $\beta$ -felandreno; (\*\*) suma de (*E*)- $\beta$ -cariofileno y (*Z*)- $\beta$ -cariofileno; (\*\*\*) suma de espatulenol + óxidos de humuleno. El color del sombreado corresponde al color de los grupos formados en el análisis de HCA (ver más adelante): verde (Grupo 1), violeta (Grupo 2), rojo (Grupo 3), gris (sin agrupamiento).



Como puede verse en la Tabla 3, la variación constatada en la literatura para el perfil volátil de *B. trimera* es extensa, lo que se debe a: la colecta de genotipos diferentes, las diferentes condiciones ambientales de desarrollo de las especies, las diferentes metodologías extractivas, y las diferentes metodologías analíticas seguidas en cada estudio en particular.

Con los datos de la Tabla 3 se realizó un análisis multivariado de grupos (HCA), el que se muestra en la Figura 10.



**Figura 10:** Clasificación quimiotaixonómica multivariada de la composición volátil de las diferentes poblaciones de *B. trimera*, mostrando los 3 grupos formados.



De acuerdo al dendrograma de *HCA* se identificaron tres grupos, cuyas características se describen a continuación:

**Grupo 1 (Verde). Quimiotipo acetato de carquejilo:** conformado por 30 muestras, dentro de las que se encuentran poblaciones uruguayas (1-8 y 69-72), y poblaciones de los estados brasileños de Rio Grande do Sul (12, 14-17 y 41-44), Paraná (46-50) y Santa Catarina (51-54) (Tabla 3). Incluye muestras de poblaciones silvestres colectadas en diferentes épocas del año, muestras en estado vegetativo y en floración, muestras masculinas y femeninas, y muestras de diferentes órganos (cladodios, inflorescencias y brotes) (Simões Pires *et al.*, 2005a; Alves, 2010; Besten *et al.*, 2013; Umpiérrez, 2017).

Químicamente el grupo se definió por la presencia de una importante proporción de acetato de carquejilo (51,0% en promedio), bajo contenido de carquejol (2,7% en promedio) y presencia de  $\beta$ -eudesmol (3,1% en promedio) (Tabla 4).

**Grupo 2 (Violeta). Quimiotipo bicilogermacreno-germacreno D-(E)- $\beta$ -cariofileno:** conformado por 26 muestras, dentro de las cuales se encuentran exclusivamente material de los estados brasileños de Rio Grande do Sul (9), Minas Gerais (19-30) y São Paulo (45 y 57-68). Incluye poblaciones naturales y cultivadas (especialmente de la variedad registrada como CPQBA-1), muestras colectadas en diferentes épocas del año en la misma o diferentes poblaciones, muestras en floración y muestras bajo diferentes regímenes de fertilización (Silva *et al.*, 2006a; Silva *et al.*, 2007; Nunes de Oliveira *et al.*, 2012; García *et al.*, 2017).

Químicamente se definió por la dominancia en el perfil volátil de bicilogermacreno (17,9% en promedio), (E)- $\beta$ -cariofileno (15,0% en promedio) y germacreno D (14,3% en promedio); y ausencia de carquejol, acetato de carquejilo y  $\beta$ -eudesmol (Tabla 4).

**Grupo 3 (Rojo). Quimiotipo carquejol-acetato de carquejilo:** conformado por 6 muestras y 3 sub-clústeres, correspondió a las poblaciones silvestres 33-38 pertenecientes al estado brasileño de São Paulo en biomas de Cerrado y Mata Atlántica, colectadas en diferentes épocas del año y en diferentes estados fenológicos (Carreira, 2007).

Químicamente el grupo se definió por la presencia predominante de carquejol (27,6% en promedio) y acetato de carquejilo (19,7% en promedio) (Tabla 4).

**Sin agrupamiento:** se trata de muestras que no agruparon en ninguno de los grupos anteriores del análisis de *HCA*, incluyendo material vegetal de los estados brasileños de Santa Catarina (10), Rio Grande do Sul (11, 13, 55), São Paulo (18, 31-32, 39,40) y Paraná (56).



En el caso de la muestra 10, la misma correspondió a un aceite comercial catalogado como *B. genistelloides* (sinónimo de *B. trimera*), y el mismo demostró una importante presencia de acetato de carquejilo (42,8%) y carquejol (2,0%) pero bajo contenido de sesquiterpenos oxigenados (palustrol, ledol, espatulenol, viridiflorol, óxido de cariofileno y  $\beta$ -eudesmol) (Chialva y Doglia, 1990), lo que la hizo quedar fuera del Grupo 1.

De manera semejante, las muestras 55 y 56 presentaron los componentes principales del Quimiotipo 1, pero su alta proporción de hidrocarburos monoterpénicos (especialmente de  $\beta$ -pineno y limoneno) (Suzuki *et al.*, 2016; Trombin-Souza *et al.*, 2017) determinaron su exclusión de dicho grupo (Figura 10).

Por último, las muestras 18, 39 y 40 pertenecen a una misma población nativa de campos de altura del estado de São Paulo, en las que se constató una variación de extrema importancia entre la composición de los individuos masculinos y femeninos (Lago *et al.*, 2008a; Lago *et al.*, 2008b). Debido a que justamente esas tres últimas muestras presentan la mayor distancia euclidiana de separación del resto de las poblaciones (Figura 10), es posible que las mismas pertenezcan a un quimiotipo diferente de *B. trimera* aún no suficientemente reportado en la literatura, o, que por el contrario se trate de otra especie botánica. Para confirmarlo, se requerirían estudios adicionales.

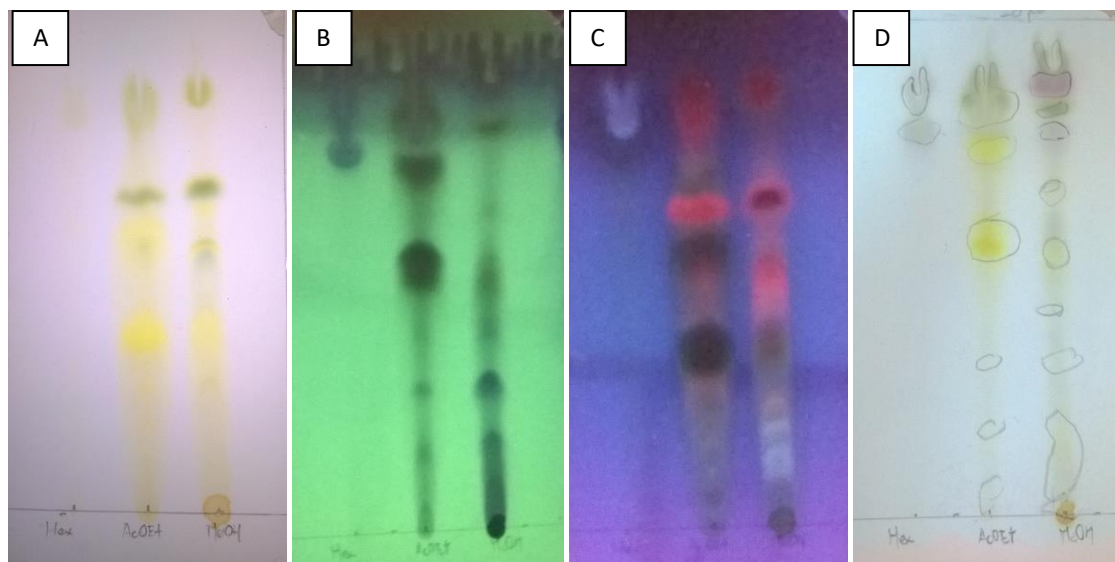
Compuesto	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Sin agrup.
$\beta$ -pineno	4,3 $\pm$ 7,6	2,1 $\pm$ 5,9	1,5 $\pm$ 3,7	5,2 $\pm$ 13,2
limoneno	1,5 $\pm$ 3,9	0,03 $\pm$ 0,31	0,2 $\pm$ 0,7	3,1 $\pm$ 11,1
carquejol	2,7 $\pm$ 7,3	-	27,6 $\pm$ 5,6	6,2 $\pm$ 21,8
acetato de carquejilo	51,0 $\pm$ 29,4	-	19,7 $\pm$ 2,0	22,0 $\pm$ 36,2
(E)- $\beta$ -cariofileno	0,6 $\pm$ 1,7	15,0 $\pm$ 6,0	6,7 $\pm$ 5,9	6,4 $\pm$ 11,9
aromadendreno	0,01 $\pm$ 0,07	0,6 $\pm$ 1,2	6,8 $\pm$ 6,9	0,2 $\pm$ 0,8
$\alpha$ -humuleno	0,2 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 1,0	3,5 $\pm$ 6,0	5,1 $\pm$ 15,1
germacreno D	2,2 $\pm$ 4,9	14,3 $\pm$ 15,9	5,0 $\pm$ 9,1	3,7 $\pm$ 8,6
biciclogermacreno	0,2 $\pm$ 0,8	17,9 $\pm$ 9,8	2,7 $\pm$ 7,8	2,3 $\pm$ 5,2
$\alpha$ -cadineno	0,00 $\pm$ 0,04	-	-	1,2 $\pm$ 7,0
palustrol	3,9 $\pm$ 11,9	0,4 $\pm$ 3,5	-	0,8 $\pm$ 3,8
espatulenol	1,3 $\pm$ 3,8	8,5 $\pm$ 10,2	2,8 $\pm$ 12,3	1,0 $\pm$ 2,8
óxido de cariofileno	0,6 $\pm$ 1,6	2,7 $\pm$ 5,8	0,2 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 5,4
viridiflorol + globulol	1,8 $\pm$ 2,5	4,3 $\pm$ 7,8	-	1,3 $\pm$ 2,3
ledol	7,7 $\pm$ 11,3	3,8 $\pm$ 9,1	1,5 $\pm$ 4,9	5,2 $\pm$ 17,1
$\beta$ -eudesmol	3,1 $\pm$ 3,1	-	0,1 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 11,1

Tabla 4: Composición química promedio de los diferentes grupos y quimiotipos mostrados en la Figura 9 de *B. trimera* (promedio  $\pm$  2 x desviación estándar).



### 3.5 Composición química no volátil de la población de referencia

El análisis de los extractos fijos obtenidos por dispositivo de Soxhlet de la población de referencia de *B. trimera* sólo fue de carácter primario, pero igualmente permitió obtener algunas conclusiones valiosas. En la Figura 11 se presentan los perfiles de *TLC* de las fracciones en AcOEt y en MeOH.



**Figura 11:** Resultados de *TLC* de los extractos obtenidos por dispositivo de Soxhlet de las partes aéreas de *B. trimera* (población de referencia). Referencias: en cada caso se muestra (de izquierda a derecha) el extracto hexánico (**Hex**), en acetato de etilo (**AcOEt**) y en metanol (**MeOH**). La fase móvil empleada fue  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$  (9:1) y el revelado fue: A) sin revelar, B) UV a 254 nm, C) UV a 366 nm y D) revelador de  $\text{CuSO}_4$ .

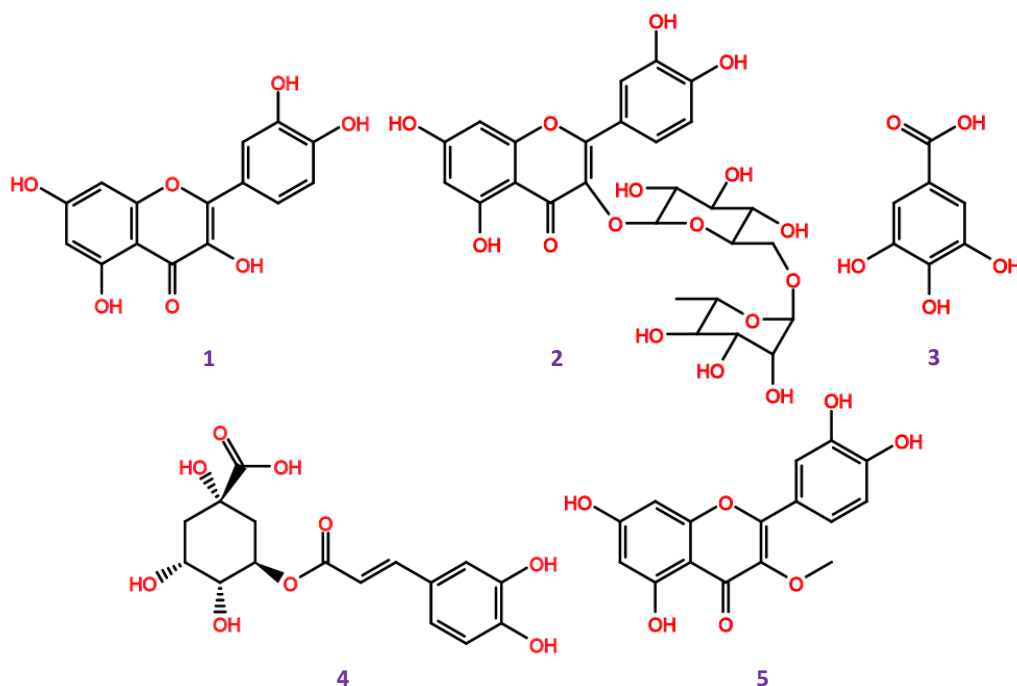
En el extracto hexánico se visualizaron por *TLC* pocas manchas a  $R_f$  altos (Figura 11), lo que significa la presencia de compuestos de baja polaridad, posiblemente ácidos grasos y ceras.

Por su parte, los extractos en AcOEt y MeOH demostraron ser de composición sumamente compleja con la presencia de varias manchas a diferentes  $R_f$ . Se pudieron observar algunas de ellas coincidentes en los perfiles de ambos extractos (a un mismo  $R_f$  y con el mismo color de revelado) (Figura 11). Lo anterior indicaría que la extracción en el primer solvente no fue completa, y que se podría extraer con mayor eficiencia con mezclas AcOEt-MeOH.

De acuerdo a la comparación de los valores de  $R_f$  y al color de revelado usando revelador de  $\text{CuSO}_4$  entre los extractos y los patrones empleados, se pudo asignar tentativamente la presencia de: quercetina (**1**;  $R_f$ : 0,43), rutina (**2**;  $R_f$ : 0,01), ácido gálico (**3**;  $R_f$ : 0,23) y ácido clorogénico (**4**;  $R_f$ : 0,05) en ambos extractos (Figuras 11 y 12). Además, se pudo visualizar en el extracto en AcOEt una mancha muy próxima a la quercetina con  $R_f$  mayor, y, que reveló del mismo color amarillo que ésta última. Dicha mancha podría corresponder a la 3-*O*-



metilquercetina (5), un flavonoide más apolar que la quercetina, reportado anteriormente en *B. trimera* nativa de Uruguay (Figura 12) (Gómez *et al.*, 2016).



**Figura 12:** Compuestos tentativamente identificados por TLC (con patrones) en las partes aéreas de *B. trimera* de la población de referencia. Referencias: (1) quercetina, (2) rutina, (3) ácido gálico, (4) ácido clorogénico, (5): 3-*O*-metilquercetina.

Todos los componentes anteriores han sido previamente identificados (con diferentes técnicas de elucidación estructural) en *B. trimera*, por ejemplo para la quercetina (Soicke y Leng-Peschlow, 1987; Simões Pires *et al.*, 2005b; Oliveira *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2016; Sabir *et al.*, 2017), rutina (Gené *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2005; Gómez *et al.*, 2016; Sabir *et al.*, 2017), ácido gálico (Sabir *et al.*, 2017) y ácido clorogénico (Simões Pires *et al.*, 2005b; Oliveira *et al.*, 2005; Aboy *et al.*, 2012; Gómez *et al.*, 2016).

Incluso la quercetina y la 3-*O*-metilquercetina se utilizan como patrones de identificación de la droga vegetal por medio de TLC, según la Farmacopea Brasileña (2010). Por otra parte, según ésta última, la dosificación de la droga se realiza a través de la determinación de ácidos cafeoilquínicos (cafeicos) por HPLC.

Otros componentes no volátiles que han sido identificados previamente en los extractos orgánicos y acuosos de *B. trimera* son: flavonoides (luteolina, nepetina, hispidulina, apigenina, eupatorina, isoquercetina, isoramnetina, 3-*O*-metilisorametina; 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, entre otros) (Herz *et al.*, 1977; Soicke y Leng-Peschlow, 1987; Simões Pires *et al.*, 2005b; Borella *et al.*, 2006; Gómez *et al.*, 2016; dos Santos *et al.*,



2018), ácidos cafeoilquínicos (Simões Pires *et al.*, 2005b; Aboy *et al.*, 2012), saponinas (ácido equinocístico) (Gené *et al.*, 1996; Borella *et al.*, 2006) y diterpenos (del tipo clerodano y neo-clerodano) (Herz *et al.*, 1977; Torres *et al.*, 2000; Januário *et al.*, 2004; Biondo *et al.*, 2011).

Se ha reportado actividad anti-hepatotóxica de los flavonoides de *B. trimera* (especialmente de la hispidulina) protegiendo contra los efectos de la toxina faloidina (extraída del hongo *Amanita phalloides*) en modelo *in-vivo* (Soicke y Leng-Peschlow, 1987). Asimismo, la rutina y fracciones concentradas en ella, han demostrado actividad analgésica y anti-inflamatoria, previniendo la formación de edema causado por varios agentes flogísticos (especialmente carragenano y dextrano) *in-vivo* (Gené *et al.*, 1996). Por otra parte, una infusión acuosa concentrada en polifenoles y ácidos cafeoilquínicos demostró efecto vasorelajante sobre el músculo liso arterial en condiciones *in-vitro* (Gómez *et al.*, 2016). Todos los estudios anteriores confirman la importancia farmacológica de la fracción polifenólica de *B. trimera*.

Los polifenoles son los responsables de la reacción histoquímica positiva con FeCl<sub>3</sub> constatada para las células epidérmicas y las del epitelio secretor presentada en el apartado 3.2 de éste capítulo.

Es bien conocido que los polifenoles tienen muy buena actividad en la captura de radicales libres y frente al estrés oxidativo (capítulo 10), y el hecho que se encuentren en las células más externas puede indicar una función de protección frente al exceso de radicales que genera la radicación UV y frente al exceso de oxígeno de la atmósfera (Agudelo *et al.*, 2018). Coincidentemente con dicha hipótesis, en estudios estacionales de ocurrencia de flavonoides en *B. trimera*, se constató que los mismos se concentran mayormente en los meses estivales (época de floración de la especie), es decir, cuando existe mayor nivel de radiación solar, siendo independiente del contenido nutricional del suelo (Borella *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2006b). Por otra parte, los ácidos cafeoilquínicos, tienen una dinámica inversa, concentrándose mayormente en los meses invernales (Aboy *et al.*, 2012).

En éste trabajo de tesis no se profundizó mayormente en el análisis químico y de actividad biológica de fracción no volátil de *B. trimera* debido a la gran diversidad de trabajos que existen en la literatura sobre la misma. Por tal, se decidió trabajar con mayor detalle sobre la fracción volátil (especialmente sobre la presencia del acetato de carquejilo/carquejol y su importancia como bloque de síntesis) (Sección 3.3 de éste capítulo y capítulo 8), de manera de poder realizar mayores contribuciones originales.



#### 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los estudios realizados en éste capítulo permitieron observar características morfo-anatómicas de un biotipo de *B. trimera* considerado como referencia, particularmente en cuanto a la distribución de los tejidos dermales, fundamentales y vasculares en cladodios y raíz.

Una serie de características anatómicas en el biotipo analizado no difirieron de los descriptos en anteriores reportes de la especie (distribución de los tejidos de sostén, presencia de vainas parenquimáticas, y el tipo de tricomas glandulares y no-glandulares), pero la presencia de canales esquizógenos con epitelio secretor biestratificado (ocasionalmente asociado a la endodermis) no había sido previamente informada. Asimismo, en éste trabajo se describió por primera vez la anatomía de la raíz de *B. trimera*.

Por otra parte, las partes aéreas analizadas demostraron completa ausencia de hojas y de costillas entre las alas de los cladodios, indicando que dicho biotipo referencia es diferente al que figura como oficial en la Farmacopea Brasileña.

En cuanto a los ensayos histoquímicos, las tinciones de Sudan IV y Nadi permitieron evidenciar el almacenamiento de aceites esenciales en los tricomas glandulares, canales esquizógenos y en las células epidérmicas del margen del ala. También se obtuvieron resultados positivos con  $\text{FeCl}_3$  para compuestos polifenólicos a nivel de canales secretores y de células epidérmicas.

El análisis de la composición volátil de la población de referencia y demás poblaciones de *B. trimera* permitió identificar 193 componentes, de los cuales 101 resultaron novedosos para la especie.

El principal componente volátil de todas las poblaciones (excepto la de S.F. de Paula, Brasil) fue el acetato de carquejilo (independientemente del estado fenológico), siendo particularmente uniforme su presencia en las muestras de Uruguay. Otros componentes de importancia fueron:  $\beta$ -pineno, carquejol, palustrol, espatulenol, viridiflorol, ledol y  $\beta$ -eudesmol.

Adicionalmente, se identificó por primera vez en la literatura de la especie la ocurrencia de varios norisoprenoides derivados de la isoforona, los que podrían tener un papel clave en la percepción aromática del volatilo.

Por medio de una clasificación quimiotaxonómica multivariada (empleando información existente en la literatura) se constató que todas las poblaciones analizadas en Uruguay pertenecerían al mismo quimiotipo, el que se caracteriza por la dominancia del acetato de





carquejilo en el perfil volátil. Esto es una información de importancia para futuros trabajos de normalización de aceites esenciales de la especie.

El análisis primario de composición no volátil de la población de referencia permitió la identificación tentativa de los flavonoides quercetina, 3-*O*-metilquercetina y rutina, y los ácidos orgánicos clorogénico y gálico; componentes previamente identificados para la especie y reportados por su bioactividad.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. A.L. Aboy, M.A. Apel, S. Debenedetti, L. Francescato, M.A. Rosella, A.T. Henriques. **2012**. Assay of caffeoylquinic acids in *Baccharis trimera* by reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1219: 147-153.
2. R.P. Adams. **2007**. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 804 pp.
3. I. Agudelo, L. Cogoi, R. Filip, N. Kuzmanich, M.L. Wagner. R.A. Ricco. **2018**. Anatomy, histochemistry, and comparative analysis of hydroxycinnamic derivatives in healthy leaves and galls induced by *Baccharopelma* spp. (Hemiptera: Psyllidae) in *Baccharis spicata* (Lam) Baill (Asteraceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, 77: 22-30.
4. Y. Alquini, N.K. Takemori. **2000**. Organização estrutural de espécies vegetais de interesse farmacológico. Herbarium de Curitiba, Curitiba, Brasil. 79 pp.
5. M.M. Alves. **2010**. Influência sazonal no óleo essencial da *Baccharis articulata* e da *B. trimera* via cromatografia gasosa mono e bidimensional. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil. 69 pp.
6. L. Ariza-Espinar. **1973**. Las especies de *Baccharis* (Compositae) de Argentina Central. *Bol. Acad. Nac. Cienc. Córdoba*, 50: 176-305.
7. L. Bauer, G.A.A.B. Silva, N.C.S. de Siqueira, C.T.M. Bacha, B.M.S. Sant'Ana. **1978**. Os óleos essenciais de *Baccharis genistelloides* Pers. do Rio Grande do Sul. *Rev. Centr. Cienc. Saúde*, 6: 7-12.
8. G.M. Barroso. **1976**. Compositae – Subtribo Baccharidinae Hoffmann – Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguésia*, 28: 1-273.
9. G.M. Barroso, O. Bueno. **2002**. Compostas: subtribo Baccharidinae. Ed. Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, Brasil. 1065 pp.
10. M.A. Besten, D.S. Nunes, A. Wisniewski Jr., S.L. Sens, D. Granato, E.L. Simionatto, D.R. Scharf, J.B. Dalmarco, N.I. Matzenbacher. **2013**. Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of Southern Brazil: a comparative study using chemometrics. *Quím. Nova*, 36: 1096-1100.
11. T.M.A. Biondo, M.M. Tanae. E.D. Coletta, M.T.R. Lima-Landman, A.J. Lapa, C. Souccar. **2011**. Antisecretory actions of *Baccharis trimera* (Less.) DC aqueous extracts and isolated compounds: analysis of underlying mechanisms. *J. Ethnopharmacol.*, 136: 368-373.
12. F. Bohlmann, C. Zdero. **1969**. Über neue terpenoderivate aus *Baccharis trimera*. *Tetrahedron Letters*, 28: 2419-2421.
13. J.C. Borella, A. Fontoura, A. Menezes Jr., S.C. França. **2001**. Influência da adubação mineral (N-P-K) e sazonalidade no rendimento e teor de flavonóides em indivíduos masculinos de *Baccharis trimera* (Asteraceae) -Carqueja. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 4: 101-104.
14. J.C. Borella, D.P. Duarte, A.A.G. Novaretti, A. Menezes Jr., S.C. França, C.B. Rufato, P.A.S. Santos, R.C.S. Veneziani, N.P. Lopes. **2006**. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Braz. J. Pharmacogn.*, 16: 557-561.
15. J.M. Budel, M.R. Duarte, C.A.M. Santos. **2003**. Caracteres morfo-anatômicos de *Baccharis gaudichaudiana* DC., Asteraceae. *Acta Farm. Bonaerense*, 22: 313-320.
16. J.M. Budel, M.R. Duarte, C.A.M. Santos. **2004**. Stem morpho-anatomy of *Baccharis cylindrica* (Less.) DC. Asteraceae. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, 40: 93-99.
17. J.M. Budel, M.R. Duarte. **2009**. Análise morfoanatômica comparativa de duas espécies de carqueja: *Baccharis microcephala* DC. e *B. trimera* (Less.) DC., Asteraceae. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 45: 75-85.
18. J.M. Budel, M.R. Duarte. **2010**. Macro and microscopic characters of the aerial vegetative organs of Carqueja: *Baccharis usterii* Heering. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53: 123-131.



19. J.M. Budel, M.R. Duarte, P.M. Döll-Boscardin, P.V. Farago, N.I. Matzenbacher, A. Sartoratto, B.H.L.N.S. Maia. **2012**. Composition of essential oils and secretory structures of *Baccharis anomala*, *B. megapotamica* and *B. ochracea*. *J. Essent. Oil Res.*, 24: 9-24.
20. J.M. Budel, J. Padilha de Paula, V.L. Pereira dos Santos, C.R. Cavichiolo Franco, P.V. Farago, M.R. Duarte. **2015**. Pharmacobotanical study of *Baccharis pentaptera*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 25: 314-319.
21. R.C. Carreira. **2007**. *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae): estudo comparativo dos óleos voláteis, atividade biológica e crescimento de estacas de populações ocorrentes em áreas de Cerrado e Mata. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica-Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo, São Paulo, Brasil. 191 pp.
22. M.M. Castro, H.F. Leitão-Filho, W.R. Monteiro. **1997**. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. *Rev. Bras. Bot.*, 20: 163-174.
23. F. Chialva, G. Doglia. **1990**. Essential oil from Carqueja (*Baccharis genistelloides* Pers.). *J. Essent. Oil Res.*, 2: 173-177.
24. E.L. Chicourel, D.S. Pimenta, L.I.F. Jorge, V.O. Ferro. **1997**. Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 7-8: 59-66.
25. C. Conduro, F. Cincotta, G. Tripodi, A. Verzera. **2017**. Bioactive volatiles in Sicilian (South Italy) saffron: safranal and its related compounds. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 221-227.
26. A. Cortadi, O. Di-Sapio, J. Mccargo, A. Scandizzi, S. Gattuso, M. Gattuso. **1999**. Anatomical studies of *Baccharis articulata*, *Baccharis crispa* and *Baccharis trimera*, “Carquejas” used in folk medicine. *Pharm. Biol.*, 37: 357-365.
27. M.S. dos Santos, J. da Silva, A.P.S. Menezes, F.M.C. de Barros, M.L.B. Lemes, R.R. Rossatto, C. Feistel, I.D. de Almeida, I. Grivicich, L. Prado, J.N. Picada, A.d.B.F. Ferraz. **2018**. Biotoxicological Analyses of Trimeroside from *Baccharis trimera* Using a Battery of *In Vitro* Test Systems. *Oxid. Med. Cell. Long.*, Article ID 7804135.
28. A. D'Ambrogio de Argüeso. **1986**. Manual de técnicas de histología vegetal. Editora Hemisferio Sur, Buenos Aires, Argentina. 83 pp.
29. N.W. Davies. **1990**. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A*, 503: 1-24.
30. P. Davies. **2004**. Equipo Destilador para la Obtención de Aceites Esenciales de Plantas Aromáticas. En: INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria): Estudios en Domesticación y Cultivo de Especies Medicinales y Aromáticas Nativas, Serie FPTA-INIA 11, Rincón del Colorado, Canelones, Uruguay; pp. 25-28.
31. E. Dellacassa, D. Lorenzo, P. Moyna, A. Verzera, L. Mondello, P. Dugo. **1997**. Uruguayan essential oils. Part VI. Composition of lemon oil. *Flavour Fragr. J.*, 12: 247-255.
32. A.E. Desjardins. **2008**. Natural Product Chemistry Meets Genetics: When Is a Genotype a Chemotype? *J. Agric. Food Chem.*, 56: 7587-7592.
33. D.L. Dilcher. **1974**. Approaches to the identification of angiosperm leaves. *Bot. Rev.*, 40: 1-157.
34. C.G. Dizeo de Strittmater. **1973**. Nueva técnica de diafanización. *Bol. Soc. Argent. Bot.*, 15: 126-129.
35. A.M. El-Sayed. **2003-2019**. The Pherobase: Database of Pheromones and Semiochemicals. Recuperado de <http://www.pherobase.com/>. [14 Mayo 2019].
36. D. García, P.S.S. da Silva, M.R. Furlan, M.T.C. Isobe, M.O.M. Marques, L.C. Ming. **2017**. Effect of Organic Fertilizer Doses on the Plant Growth, Essential Oil Production and Chemical Substances of “Carqueja” over Two Harvest Moments. *J. Agr. Sci. Technol. B*, 7: 114-124.
37. A. Fahn. **1988**. Secretory tissues in vascular plants. *New Phytol.*, 108: 229-257.
38. [Farmacopea Brasileira], Vol. 2. Monografias, 5ª edição, **2010**. ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), Fundação Oswaldo Cruz. Brasília, Brasil; pp. 744-747.
39. S.E. Freire, E. Urtubey, D.A. Giuliano. **2007**. Epidermal characters of *Baccharis* (Asteraceae) species used in traditional medicine. *Caldasia*, 29: 23-38.
40. R.M. Gené, C. Cartañá, T. Adzet, E. Marín, T. Parella, S. Cañigual. **1996**. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of *Baccharis trimera*: identification of its Active Constituents. *Planta Med.*, 62: 232-235.
41. M.A. Gómez, I. Míguas, M. Caggiani, X. Arias, M. Laprovitera, F. Blanco, M.V. Cesio, E.R. Migliaro, H. Heinzen. **2016**. Vasorelaxant Effect of a *Baccharis trimera* Infusion on Precontracted Rat Aortic Rings. *Nat. Prod. Commun.*, 11: 283-286.
42. W. Herz, A.M. Pilotti, A.C. Söderholm, I.K. Shuhama, W. Vichnewski. **1977**. New *ent*-Clerodane-Type Diterpenoids from *Baccharis trimera*. *J. Org. Chem.*, 42: 3913-3917.
43. K.M. Hufford, S.J. Mazer. **2003**. Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration. *Trends Ecol. Evol.*, 18: 147-155.



44. V.C.G. Jasinski, R.Z. Silva, R. Pontarolo, J.M. Budel, F.R. Campos. 2014. Morpho-anatomical characteristics of *Baccharis glaziovii* in support of its pharmacobotany. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 24: 506-515.
45. A.H. Januario, S.L. Santos, S. Marcussi, M.V. Mazzi, R.C.L.R. Pietro, D.N. Sato, J. Ellena, S.V. Sampaio, S.C. França, A.M Soares. 2004. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chem. Biol. Interact.*, 150: 243-251.
46. A. Kamboj. 2012. Analytical Evaluation of Herbal Drugs. In: O. Vallisuta, S.M. Olimat (Eds.), Drug Discovery Research in Pharmacognosy. InTech Open, Rijeka, Croatia; pp: 23-60.
47. P. Kenrick, P.R. Crane. 1997. The origin and early evolution of plants on land. *Nature*, 389: 33-39.
48. J.H.G. Lago, P. Romoff, O.A. Favero, F.O. Souza, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Correa. 2008a. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochem. Syst. Ecol.*, 36: 737-740.
49. J.H.G. Lago, P. Romoff, O.A. Favero, M.G. Soares, P.T. Baraldi, A.G. Correa, F.O. Souza. 2008b. Composição química dos óleos essenciais das folhas de seis espécies do gênero *Baccharis* de “Campos de altitude” da Mata Atlântica Paulista. *Quim. Nova*, 31: 727-730.
50. B.M. Lange, G.W. Turner. 2013. Terpenoid biosynthesis in trichomes-current status and future opportunities. *Plant Biotech. J.*, 11: 2-22.
51. P.J. Linstrom, W.G. Mallard (eds.). 2019. NIST Chemistry WebBook. NIST Standard Reference Database Number 69. Recuperado de <http://webbook.nist.gov/> [14 Mayo 2019].
52. D. Lorenzo, D. Paz, P. Davies, J. Villamil, R. Vila, S. Cañigüeral, E. Dellacassa. 2005. Application of multidimensional gas chromatography to the enantioselective characterisation of the essential oil of *Eupatorium buniifolium* Hooker et Arnott. *Phytochem. Anal.*, 16: 39-44.
53. K. Ložiene, P.R. Venskutonis. 2005. Influence of environmental and genetic factors on the stability of essential oil composition of *Thymus pulegioides*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 33: 517-525.
54. J.L. Maclean, D.C. Dawe, B. Hardy, G.P. Hettel. 2002. Rice Almanac. Source Book for the Most Important Economic Activity on Earth. Third Edition. CABI Publishing, Wallingford, UK. 253 pp.
55. M.L. Martínez, G.R. Bettucci, M.D. Ferretti, M.N. Campagna, N. Ansaldi, A.A. Cortadi, M.V. Rodríguez. 2018. Multivariate statistical analysis of morpho-anatomical data of nine sect. Caulopterae species (*Baccharis* – Asteraceae) used in folk medicine. *Braz. J. Pharmacogn.*, 28: 402-413.
56. M.M. Mendes-Pinto. 2009. Carotenoid breakdown products -the norisoprenoids- in wine aroma. *Arch. Biochem. Biophys.*, 483: 236-245.
57. C.R. Metcalfe, R. Chalk. 1972. Anatomy of the Dicotyledons. Clarendon Press, Oxford, London. 1500 pp.
58. P.K. Mohapatra, B.B. Panda, E. Kariali. 2011. Plasticity of tiller dynamics in wild rice *Oryza rufipogon* Griff.: a strategy for resilience in suboptimal environments. *Internat. J. Agron.*, Article ID 543237.
59. R. Nunes de Oliveira, V.L.G. Rehder, A.S.S. Oliveira, I. Montanari Jr., J.E. de Carvalho, A.L.T.G de Ruiz, V.d.L.S. Jeraldo, A.X. Linhares, S.M. Allegretti. 2012. *Schistosoma mansoni*: in vitro schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (Less) DC. *Exp. Parasitol.*, 132: 135-143.
60. A.C.P. Oliveira, D.C. Endringer, L.A.S. Amorim, M.d.G.L. Brandão, M.M Coelho. 2005. Effect of the extracts and fractions of *Baccharis trimera* and *Syzygium cumini* on glycaemia of diabetic and non-diabetic mice. *J. Ethnopharmacol.*, 102: 465-469.
61. G.M.M. Ortins, G. Akisue. 2000. Estudo morfo-histológico, screening fitoquímico, constantes físicas e análise cromatográfica da droga e extrato fluido visando controle de qualidade da espécie *Baccharis articulata* Pers. *Lecta*, 18: 9-32.
62. T. Parliment. 2002. Solvent Extraction and Distillation Techniques. In: R. Marsili (ed). Flavor, Fragrances and Odor Analysis. Marcel Dekker Inc., New York, NY, USA; pp. 1-23.
63. A.G.E. Pearse. 1953. Histochemistry. Theoretical and Applied. Little Brown and Company, London, UK. 530 pp.
64. M. Pereira Machín. 2008. “Carqueja”. *Revista Plan Agropecuario*, 126: 60-60.
65. F. Pietra. 2002. Biodiversity and Natural Product Diversity. Elsevier Science Ltd; Oxford, UK. 351 pp.
66. C.L. Queiroga, A. Fukai, A.J. Marsaioli. 1990. Composition of the Essential Oil of Vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.*, 1: 105-109.
67. J.A. Quinn. 1978. Plant ecotypes: ecological or evolutionary units? *Bull. Torrey Bot. Club*, 105: 58-64.
68. M.V. Rodríguez, S. Gattuso, M. Gattuso. 2008. *Baccharis crispa* y *Baccharis trimera* (Asteraceae): revisión y nuevos aportes para su normalización micrográfica. *Lat. Am. J. Pharm.*, 27: 387-397.
69. M.V. Rodríguez, S. Gattuso, M. Gattuso. 2013. Micrographic standardization of *Baccharis* L. species (Asteraceae). *Domínguezia*, 29: 39-54.
70. Y. Rufino-González, M. Ponce-Macotela, M. Jiménez-Estrada, C.N. Jiménez-Fragoso, Guadalupe Palencia, Gabriel Sansón-Romero, A. Anzo-Osorio, M.N. Martínez-Gordillo. 2017. *Piqueria trinervia* as a source of metabolites against *Giardia intestinalis*. *Pharm. Biol.*, 55: 1787-1791.



71. S.M. Sabir, M.L. Athayde, A.A. Boligon, J.B.T. Rocha. **2017**. Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. *S. Afr. J. Bot.*, 113: 318-323.
72. D. Santos-Filho, S.J. Sarti, W. Vichnewski, M.S. Bulhões, H.F. Leitão-Filho. **1980**. Atividade moluscicida em *Biomphalaria glabrata*, de uma lactona diterpênica e de uma flavona isoladas de *Baccharis trimera* (Less.) A.P. De Candolle. *Rev. Fac. Farm. Odontol. Ribeirão Preto*, 17: 43-47.
73. J. Saukel, E. Ginko. **2014**. Microscopic Analysis. In: K. Hostettmann (ed.). Handbook of Chemical and Biological Plant Analytical Methods, Volume III. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK; pp. 131-184.
74. S.M. Scheffer-Basso, R. Lubenow, C.M. Carneiro, S.O. Chini. **2008**. Morfofisiologia da rebrota de *Baccharis trimera* (Less) DC., Asteraceae: subsídios para seu controle em pastagens naturais. *Biotemas*, 21: 31-37.
75. A. Shipunov. **2017**. Introduction to Botany. Lectures notes. Version 175. Minot State University, North Dakota, USA. Disponible en: [http://ashipunov.info/shipunov/school/biol\\_154/](http://ashipunov.info/shipunov/school/biol_154/).
76. G.H. Shull. **1912**. "Genotypes", "Biotypes", "Pure Lines" and "Clones". *Science*, 35: 27-29.
77. F.G. Silva, J.E.B.P. Pinto, M.d.G. Cardoso, E.A. Nascimento, D.L. Nelson, J.d.F. Sales, D.J.d.S. Mol. **2006a**. Influence of radiation level on plant growth, yield and quality of essential oil in Carqueja. *Ciênc. Agrotec.*, 30: 52-57.
78. F.G. Silva, A.H. Januário, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, W.S. Barizan, J.F. Sales, S.C. França. **2006b**. Teor de flavonóides em populações silvestre e cultivada de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.] coletadas nas estações seca e úmida. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8: 19-25.
79. F.G. Silva, C.B.A. Oliveira, J.E.B.P. Pinto, V.E. Nascimento, S.C. Santos, J.C. Seraphin, P.H. Ferri. **2007**. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18: 990-997.
80. D.P.B. Silveira. **2018**. Atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* L. (Culicidae) e composição química do óleo essencial de partes aéreas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz, Brasil. 65 pp.
81. A.A. Simão, F.F. Lage, P.M.B. Chagas, R.M. Fraguas, J.M. Freire, T.R. Marques, A.D. Corrêa. **2013**. Antioxidants from medicinal plants used in the treatment of obesity. *Eur. J. Med. Plants*, 3: 429-443.
82. C.A. Simões-Pires, S. Debenedetti, E. Spagazzini, L.A. Mentz, N.I. Matzenbacher, R.P. Limberger, A.T. Henriques. **2005a**. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.*, 253: 23-32.
83. C.A. Simões-Pires, E.F. Queiroz, A.T. Henriques, K. Hosstettmann. **2005b**. Isolation and on-line identification of antioxidant compounds from three *Baccharis* species by HPLC-UV-MS/MS with post-column derivatisation. *Phytochem. Anal.*, 16: 307-314.
84. H. Soicke, E. Leng-Peschlow. **1987**. Characterization of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their anti-hepatotoxic properties. *Planta Med.*, 53: 37-39.
85. G.L. Stebbins Jr. **1950**. Variation and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York, NY, USA. 643 pp.
86. G.L. Stebbins Jr. **2013**. The genetic approach to problems of rare and endemic species. *Madroño*, 60: 302-319.
87. W.C. Stevens. **1924**. Plant Anatomy from the standpoint of the development and function of the tissues and Handbook of micro-technic. J & A Churchill Ed., London, UK. 452 pp.
88. S.E. Sultan. **2000**. Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends Plant Sci.*, 5: 537-542.
89. E.Y. Suzuki, C.A. Caneschi, R.C. Fochat, M.A.F. Brandão, N.R.B. Raposo. **2016**. Antimicrobial activity of essential oil from *Baccharis trimera* (Less.) DC. (carqueja-amarga). *Rev. Cubana Plant. Med.*, 21: 346-358.
90. E.Z. Tomazoni, G.S. Griggio, E.P. Broilo, R.T.d.S. Ribeiro, G.L.G. Soares, J. Schwambach. **2018**. Screening for inhibitory activity of essential oils on fungal tomato pathogen *Stemphylium solani* Weber. *Biocatal. Agr. Biotechnol.*, 16: 364-372.
91. L.M.B. Torres, M.T. Gamberini, N.F. Roque, M.T.L. Landman, C. Souccar, A.J. Lapa. **2000**. Diterpene from *Baccharis trimera* with a relaxant effect on rat vascular smooth muscle. *Phytochemistry*, 55: 617-619.
92. M. Trombin-Souza, M. Trombin-Souza, W. Amaral, J.A.L. Pascoalino, R.A. Oliveira, H.R. Bizzo, C. Deschamps. **2017**. Chemical composition of the essential oils of *Baccharis* species from southern Brazil: a comparative study using multivariate statistical analysis. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 400-406.
93. G.W. Turner, J. Gershenzon, R.B. Croteau. **2000**. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. *Plant Physiol.*, 124: 655-663.
94. N. Umpiérrez. **2017**. Evaluación de la actividad antifúngica de metabolitos presentes en plantas aromáticas nativas para el control de patógenos de cítricos. Tesis de Maestría, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 118 pp.



95. R.M.F. Vargas, E. Cassel, G.M.F. Gomes, L.G.S. Longhi, L. Atti-Serafini, A.C. Atti-Santos. **2006**. Supercritical extraction of carqueja essential oil: experiments and modelling. *Braz. J. Chem. Eng.*, 23: 375-382.
96. H. Wagner, S. Bladt, E.M. Zgainski. **1984**. Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer Verlag, Berlin Heildenberg, Germany. 320 pp.
97. P. Weyerstahl, H.C. Wahlburg, U. Splittgerber, H. Mars. **1994**. Volatile constituents of Brazilian phoebe oil. *Flavour Fragr. J.*, 9: 179-186.
98. M. Wink, P.G. Waterman. **1999**. Chemotaxonomy in relation to molecular phylogeny of plants. In: M. Wink (ed.). Biochemistry of Plant Secondary Metabolism. CRC Press, Boca Raton, USA; pp. 300-341.
99. G.E. Zarlavsky. **2014**. Histología vegetal: Técnicas simples y complejas. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, Argentina. 198 pp.



## Capítulo 8

# Terpenos irregulares en *Baccharis* spp. L. y su importancia para propuestas semi-sintéticas originales.

## Estudio espectroscópico y computacional.

**Resumen:** En el capítulo 7 se presentó que el acetato de carquejilo es un compuesto mayoritario que se encuentra presente en el aceite esencial de *B. trimera* de especímenes colectados en Uruguay y en Brasil, definiendo un quimiotipo de la especie. Dado que el mismo presenta una estructura con el esqueleto poco convencional del *o*-mentano (monoterpeno irregular), se planteó como objetivo de ésta tesis aislarlo y obtener productos semi-sintéticos novedosos derivados del carquejol que pudieran resultar en propuestas originales. En éste capítulo se presentará una introducción al tema de los terpenos irregulares, así como se describirá específicamente los antecedentes semi-sintéticos para compuestos relacionados al carquejol y sus propiedades bioactivas reportadas. También se describirá brevemente la base de los métodos espectroscópicos (UV, DC, IR, Raman, RMN y MS) y computacionales que se emplearon en éste trabajo para dilucidar la estructura y propiedades fisicoquímicas de dichos productos. A partir del aislamiento del acetato de carquejilo, se obtuvieron los siguientes derivados semi-sintéticos: carquejol, carquejifenol, carquejona, *iso*-carquejona y óxido de carquejol (8,9-epoxicarquejol); los últimos tres previamente no descritos en la literatura química. Se describirá cada uno de los protocolos de obtención de los compuestos nombrados, así como se interpretará la información espectroscópica que permitió dilucidar su estructura incluyendo la discusión sobre aspectos mecanísticos de la obtención de cada uno de los productos. El estudio computacional del acetato de carquejilo, carquejol y carquejifenol realizado permitió dilucidar los conformeros más estables y obtener los valores de varias propiedades moleculares de importancia para la actividad biológica y reactividad de éstos compuestos.

### 1 INTRODUCCION

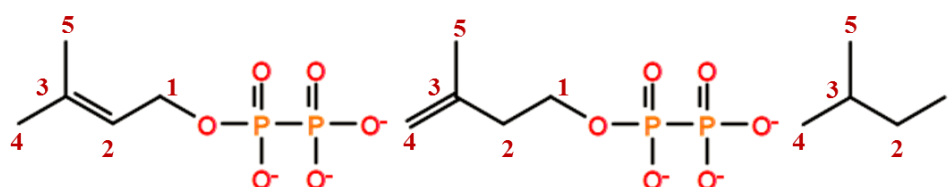
#### 1.1 Terpenos irregulares

En el capítulo 1 se mencionó la “Regla Biogenética del Isopreno”, propuesta por Ruzicka en 1922, que establece que los derivados terpenoides se forman por la unión “regular” o “cabeza-



cola” de las unidades isoprénicas (**Ruzicka y Stoll, 1922; Poulter, 1990**). Sin embargo, fue el mismo autor que reconoció que existían terpenos naturales en que la unión se producía de manera diferente, siendo por tal llamados irregulares (**Ruzicka y Stoll, 1922; Ruzicka, 1953; Poulter, 1990; Dewick, 2009**). Dentro de ellos, los monoterpenos son los más ampliamente conocidos y son especialmente abundantes en la familia de las Asteraceae (**Ruzicka, 1953; Poulter, 1990; Dewick, 2009**).

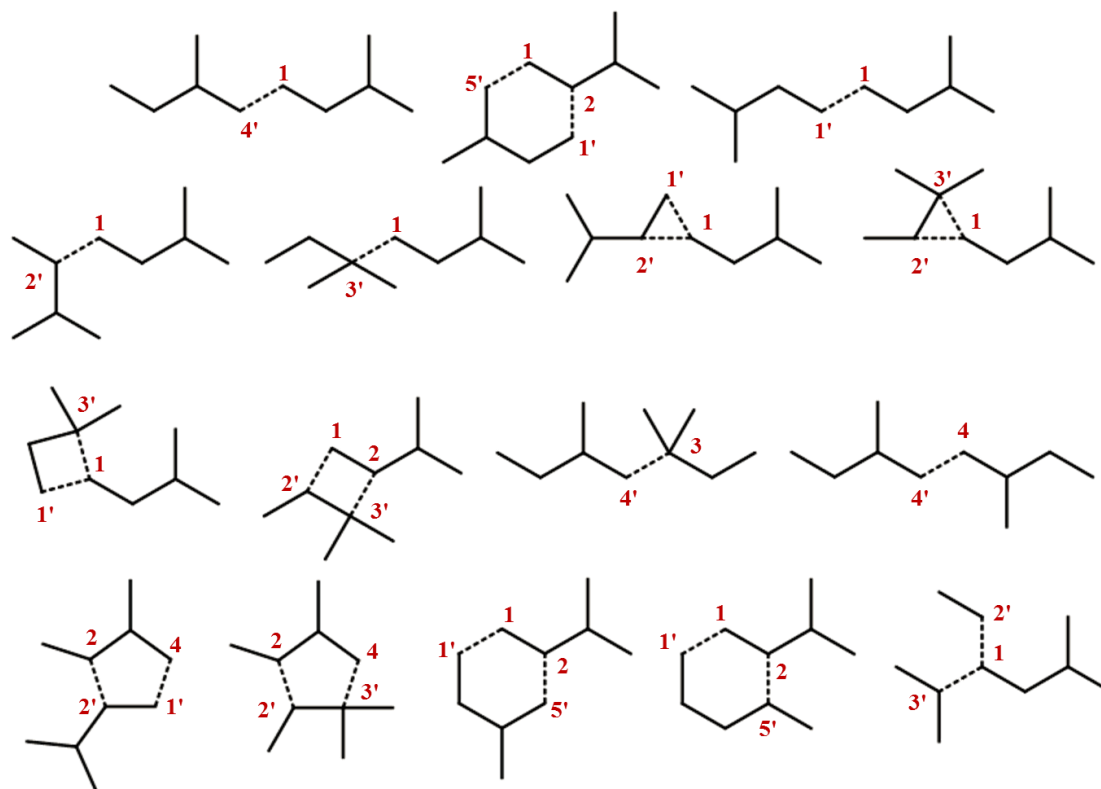
Para definir la posición y el tipo de unión de los terpenos irregulares, se enumerarán primeramente los carbonos en la unidad isoprénica de manera que refleje la unión original del grupo difosfato en el DMAPP (dimetilalil-pirofosfato) y en el IPP (isopentenil-pirofosfato) (capítulo 1) (Figura 1) (**Poulter, 1990**).



**Figura 1:** Numeración de las posiciones en la unidad isoprénica y en sus “bloques de construcción” biogénicos: el DMAPP (izquierda) y el IPP (derecha). Fuente: Poulter (1990).

Con dicha notación, la unión biogénica “regular” propuesta por Ruzicka es la 1-4’ o 1-5’ (la notación “prima” designa que se trata de la segunda unidad isoprénica, por lo que 1’-4 o 1’-5 son equivalentes) (Figura 2) (**Ruzicka y Stoll, 1922; Ruzicka, 1953; Poulter, 1990; Dewick, 2009**). También hay que tener en cuenta que cuando las unidades isoprénicas se unen para formar el esqueleto regular del *p*-mentano (4-metil-1-isopropilciclohexano), además del enlace 1-5’ se forma también un enlace 2-1’ (Figura 2).

En cambio, en los terpenos irregulares las unidades isoprénicas se pueden unir por enlace entre cualquier otra posición, de manera de formar compuestos acíclicos y cíclicos de tres, cuatro, cinco y seis miembros, lo que da lugar a una gran diversidad (Figura 2) (**Poulter, 1990; Epstein et al., 1991; Millar et al., 2005; Dewick, 2009; Henning et al., 2011**).



**Figura 2:** Tipos de unión de las unidades isoprenicas en la formación de los monoterpenos regulares (1-4' y 1-5') e irregulares (diversos casos). Fuente: Poulter (1990).

Es pertinente puntualizar que también se consideran terpenos irregulares a aquellas estructuras que provienen de la condensación de unidades isoprenicas, pero que por la acción de rearrreglos posteriores (principalmente por la migración de grupos alquilo) poseen un esqueleto en que no es posible reconocer al menos una de sus unidades biosintéticas (Ruzicka, 1953; Poulter, 1990). Tal es el caso de las dos últimas estructuras de la Figura 2, en la que se producen migraciones de un grupo metilo y un grupo etilo que impiden reconocer adecuadamente una de las unidades isoprenicas originarias.

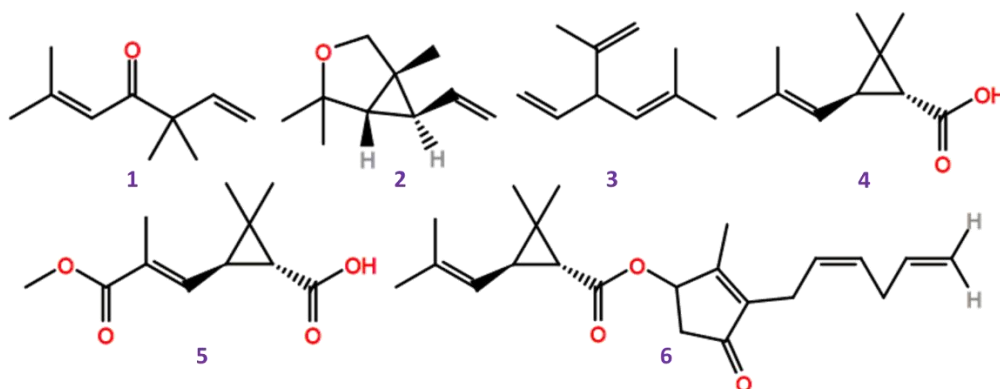
A diferencia de las uniones “cabeza-cola” que son ubicuas en la mayoría de los organismos (tanto en metabolitos primarios como secundarios), las estructuras irregulares son restrictas a unos pocos organismos relacionados entre sí (Poulter, 1990; Dewick, 2006). La excepción a la regla es la unión 1-1' (“cola-cola”) presente en los carotenos y esteroides, que es común en todos los organismos vivos (Poulter, 1990; Dewick, 2009).

En plantas, miembros de la familia Asteraceae son capaces de sintetizar diferentes tipos de monoterpenos irregulares, particularmente para el caso del género *Artemisia* sp. en cuyos aceites esenciales se encuentran terpenos con uniones 1-3', 1-1'-2', 1-1'-3', 1-2'-3' (cíclica) y





1-2'-3'(acíclica), como los compuestos de la Figura 3 (Epstein *et al.*, 1984; Poulter, 1990; Epstein *et al.*, 1991; Dewick, 2009). Otros miembros destacables de éste grupo de compuestos irregulares son los ácidos crisantémico y pirétrico y sus formas esterificadas conocidas como piretrinas (piretrinas, cinerinas y jasmolinas), que son componentes con acción insecticida presentes en el piretro (*Chrysanthemum cinerariaefolium*, Asteraceae) (Figura 3) (Kumar *et al.*, 2005; Dewick, 2009).

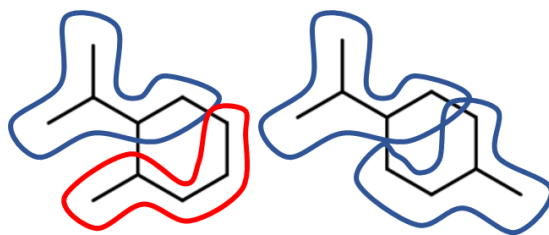


**Figura 3:** Monoterpenos irregulares comunes en las Asteraceae, principalmente en *Artemisia* sp. Referencias: (1): artemisia cetona con unión 1-3'; (2): artemiseol con rearrreglo posterior de la unión 1-2'-3' (cíclica); (3): santolinatrieno con unión 1-2'-3' (acíclica); (4)-(6): unión 1-2'-3' (cíclica); (4): ácido crisantémico; (5): ácido pirétrico; (6): piretrina I. Fuente: Epstein *et al.* (1991) y Dewick (2009).

## 1.2 Carquejol y sus derivados naturales

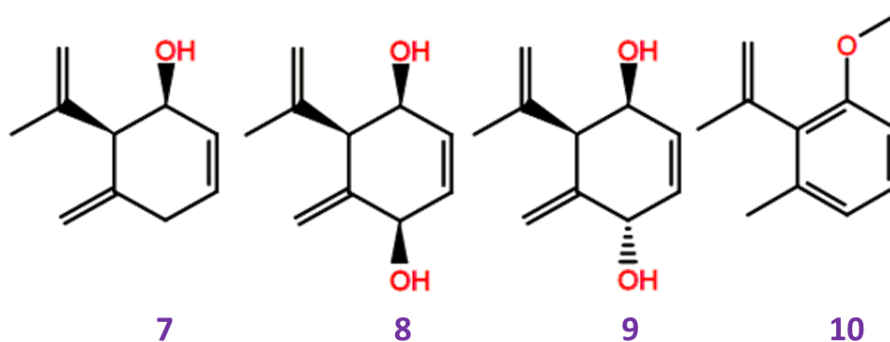
Dentro de los terpenos irregulares naturales, los monoterpenos que poseen el esqueleto del *orto*-mentano (2-metil-1-isopropilciclohexano) son muy poco frecuentes en la naturaleza (Henning *et al.*, 2011). En la estructura de los mismos se puede apreciar una unidad isoprénica unida a un subunidad pentánica normal con sus 5 átomos de carbono en línea, la que surge como consecuencia de la migración de un grupo metilo (Figuras 2 y 4) (Bohlmann y Zdero, 1969; Henning *et al.* 2011).

Lo anterior establece la diferencia con el esqueleto regular del *para*-mentano en donde las dos unidades isoprénicas se encuentran unidas cabeza-cola (Figura 4) (Ruzicka, 1953; Dewick, 2009).



**Figura 4:** esqueleto irregular del *o*-mentano (izquierda) y regular del *p*-mentano (derecha) con el detalle de las unidades isoprénicas (azul) y la unidad normal pentánica (rojo).

Los metabolitos secundarios más conocidos con éste tipo de esqueleto son el carquejol (7) y los piqueroles A y B (8 y 9) (Figura 5), los que junto a sus derivados han sido identificados principalmente en *Baccharis trimera* (sinónimo de *B. genistelloides*) y *Piqueria trinervia* (sinónimo de *P. trinervis*) (Sangaiah y Rao, 1981; González de la Parra *et al.* 1981; Henning *et al.*, 2011; Rufino-González *et al.*, 2017).

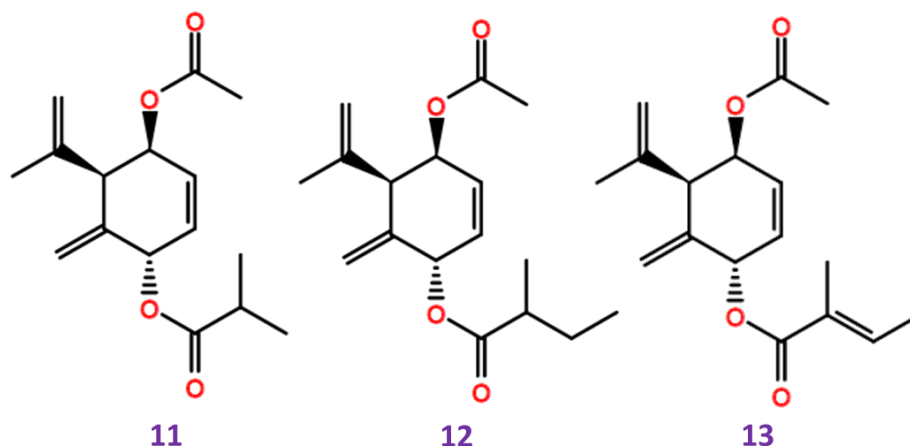


**Figura 5:** estructura del carquejol (7), piquerol A (8), piquerol B (9) y 2-isopropenil-3-metilanol (10); monoterpenos irregulares con el esqueleto del *o*-mentano aislados de *B. trimera* (7) y *P. trinervia* (7-10). Fuente: González Parra *et al.* (1981), y Sangaiah y Rao, (1981).

Tanto el acetato de carquejilo como el carquejol son componentes mayoritarios de los aceites esenciales de las partes aéreas de *B. trimera* (capítulos 4 y 7) (Naves, 1959; Simões Pires *et al.*, 2005). Además, en el aceite también pueden encontrarse a nivel de trazas otros isómeros *o*-mentanos derivados del carquejol, variando en la posición del doble enlace endocíclico y del grupo hidroxilo (Naves y Caujolle, 1963). Asimismo, es posible encontrar al 2-isopropenil-3-metilfenol (carquejifenol, ver más adelante) como artefacto de descomposición térmica y/o de oxidación por el oxígeno del aire (u otros agentes oxidantes) del carquejol (Naves y Caujolle, 1963). El acetato de carquejilo por su parte, es estable en las condiciones usuales de almacenamiento y de análisis en cromatografía gaseosa (Naves y Caujolle, 1963; Thomas, 1967).



De los extractos apolares de raíces y partes aéreas de *B. trimera*, se han aislado diésteres del piquerol B (**11-13**) (Figura 6), pero hasta la fecha no hay reportes de la presencia de piquerol A y B en su forma libre en dicha especie (Bohlmann y Zdero, 1969; Henning *et al.*, 2011).



**Figura 6:** estructuras de diésteres derivados del piquerol B, aislados y elucidados de partes aéreas y raíces de *B. trimera*. Fuente: Bohlmann y Zdero (1969) y Henning *et al.* (2011).

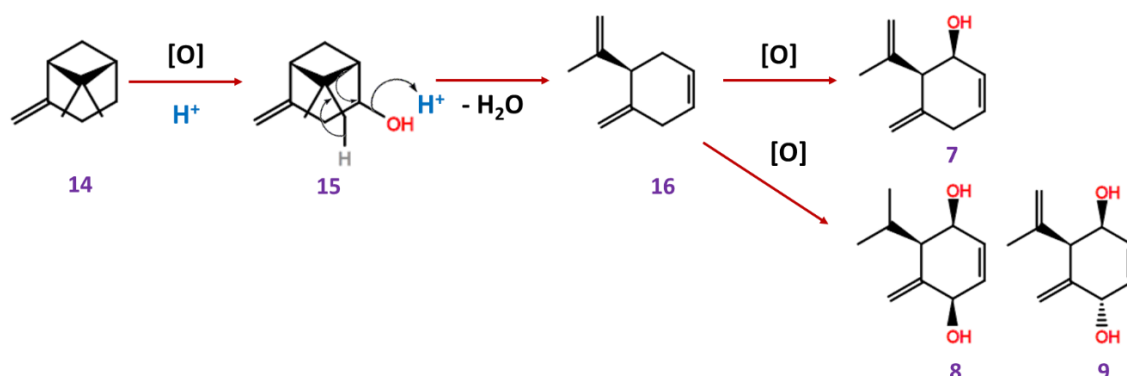
Como se puede ver en la Figura 6, ambos grupos ésteres se encuentran en posición *trans* uno respecto del otro (**11-13**). Normalmente el ácido que esterifica al piquerol B en posición  $\alpha$  al isopropenilo siempre es el acético, mientras que los ácidos que esterifican en el otro extremo hidroxilo son derivados del ácido con estructura isoprénica 2-metilbutírico, por ejemplo: isobutírico, 2-metilbutírico y 2-metil-2-buténico, respectivamente en **11**, **12** y **13** (Figura 6) (Bohlmann y Zdero, 1969; Henning *et al.* 2011). Ello se podría deber a razones biogénicas aún no abordadas por la investigación fitoquímica.

Todo lo anterior demuestra que éste tipo de componentes monoterpénicos irregulares son muy comunes y se encuentran en alta concentración en las partes aéreas y raíces de *B. trimera*; lo que indica indudablemente un metabolismo muy distintivo de ésta especie comparada al resto de las especies de *Baccharis* L. descritas en la literatura fitoquímica, muchas de las cuales fueron presentadas en el capítulo 4.

Si bien no está dilucidada la ruta biosintética que origina al carquejol y a los piqueroles, Bohlmann y Zdero (1969) propusieron que el origen de dichos componentes es el monoterpeneo regular  $\beta$ -pineno (**14**), el que por rearrreglo de su estructura generaría el esqueleto del *o*-mentano, según el esquema mostrado en la Figura 7. Dicha hipótesis, si bien no ha sido testada, es factible debido a que todos los aceites de *B. trimera* ricos en acetato de



carquejilo también presentan como compuesto mayoritario al  $\beta$ -pineno (capítulo 7) (Simões Pires *et al.*, 2005), lo que podría significar una abundancia del precursor biosintético.



**Figura 7:** esquema de biosíntesis propuesto por Bohlmann y Zdero (1969) para el origen del carquejol y los piqueroles a partir del  $\beta$ -pineno.

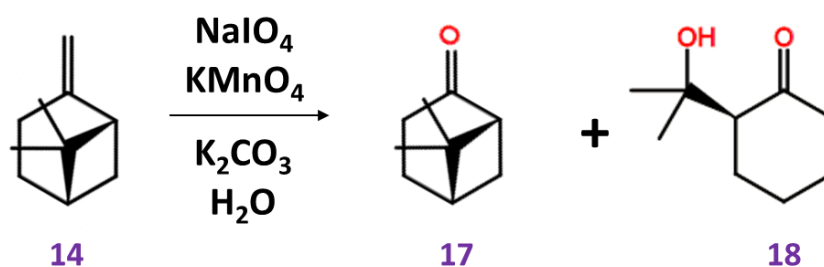
Un derivado clave de la conversión del  $\beta$ -pineno (**14**) a los compuestos con el esqueleto del *o*-mentano sería el alcohol derivado de la oxidación de éste, con el grupo hidroxilo en posición  $\beta$  al doble enlace exocíclico (compuesto **15** en la Figura 7). Para obtener tal alcohol debería darse una oxidación específica y poco frecuente en esa posición, ya que lo más factible es la oxidación en posición  $\alpha$  al doble enlace que originaría el compuesto (*E*)-pinocarveol (Dewick, 2009).

Además, el rearrreglo catalizado por ácido requeriría tres pasos concertados: 1) eliminación del hidroxilo de la posición  $\beta$ , 2) migración de un par electrónico desde el puente dimetilo del  $\beta$ -pineno para suplir la deficiencia electrónica generada por la eliminación, y 3) pérdida de un protón desde uno de los metilos del puente para restablecer el catalizador (con la participación de una base no especificada) (Figura 7) (Bohlmann y Zdero, 1969). De esa manera se generaría el compuesto **16** (“carquejeno”) que por oxidación específica daría el carquejol y los piqueroles (Bohlmann y Zdero, 1969). En el capítulo 7 cuando se reportó el análisis detallado del aceite esencial de *B. trimera* en floración (población de referencia) se identificó tentativamente la presencia de tal compuesto por *GC-MS*, lo que sería una evidencia primaria que el esquema de biosíntesis de Bohlmann y Zdero es el correcto.

Si bien Bohlmann y Zdero postularon la hipótesis de la ocurrencia de dicho tipo de rearrreglos en *B. trimera* y *P. trinerva*, en condiciones de laboratorio es posible observar oxidaciones anómalas del  $\beta$ -pineno (**14**) que producen rearrreglos del esqueleto, generando además de la



nopinona esperada (**17**) derivados del *o*-mentano como el cetol **18** (Figura 8) (Jefford *et al.*, 1975; Nurnberg, 1997).

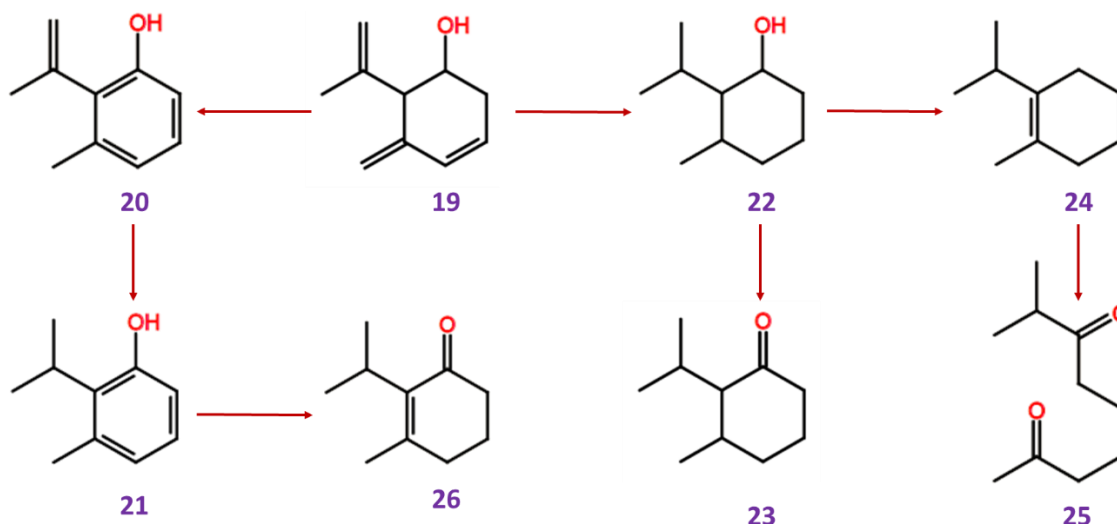


**Figura 8:** oxidación anómala del  $\beta$ -pineno (**7**) en condiciones de laboratorio para producir nopinona (**13**) y un derivado cetólico con el esqueleto del *o*-mentano (**14**). Fuente: Nurnberg (1997).

### 1.3 Semi-síntesis y obtención de derivados de carquejol

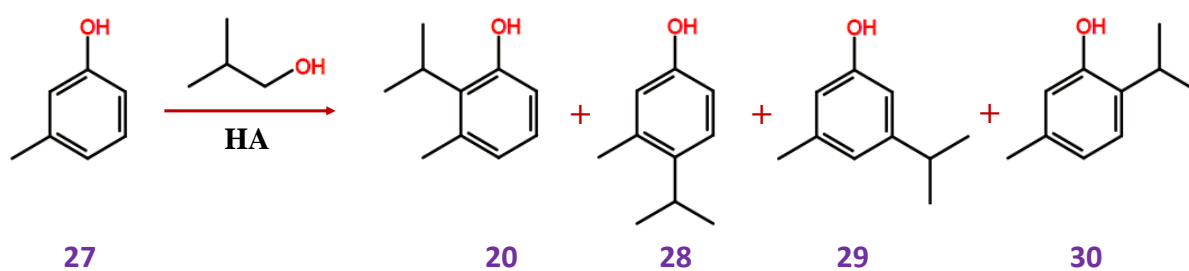
Los reportes sobre la semi-síntesis de los derivados del carquejol fueron iniciados por parte del químico francés Yves Naves en 1959, con el descubrimiento de la presencia del acetato de carquejilo como componente mayoritario del aceite esencial de *B. trimera* (Naves, 1959; Coffey, 1968). A partir de dicho acetato (obtenido por destilación fraccionada del aceite), Naves obtuvo por hidrólisis el carquejol, y para su caracterización obtuvo varios tipos de derivados sin determinación de las configuraciones absolutas de sus centros quirales, como se muestra en la Figura 9 (Naves, 1959; Thomas, 1967; Naves y Caujolle, 1963; Coffey, 1968). Sin embargo, éste trabajo semi-sintético llevó a postular a la estructura **19** como la propia del carquejol (Naves, 1959; Coffey, 1968), la que mostraría ser incorrecta.

Dentro de los derivados con el esqueleto del *o*-mentano, en éste primer trabajo se obtuvieron dos fenoles: el 2-isopropenil-3-metilfenol (que a los fines de ésta tesis se llamará carquejifenol) (**20**), y el 2-isopropil-3-metilfenol (**21**); así como el carquejanol (**22**), la *o*-mentona (**23**), el *o*-1-menteno (**24**) y finalmente la 2-metilnona-3,8-diona (**25**) (Naves, 1959a; Thomas, 1967; Ferretti-Alloise *et al.*, 1967; Coffey, 1968) (Figura 9). Además, partiendo del 2-isopropil-3-metilfenol (**21**) se obtuvo la *iso*-tetrahydrocarquejona (*o*-1-menten-3-ona) (**26**), obteniendo como intermediarios una mezcla de carquejanoles (Figura 9) (Naves, 1959; Ferretti-Alloise *et al.*, 1967).



**Figura 9:** esquema original de semi-síntesis seguido por Naves para la determinación de la estructura del carquejol (19). El autor no determinó las configuraciones absolutas de los centros quirales en los compuestos reportados. Fuente: Coffey (1968).

La obtención original del 2-isopropil-3-metilfenol (**21**) corresponde al estudio de Carpenter y Easter (1955). Dichos autores trabajando sobre el *m*-cresol (**27**) y aplicando una alquilación con alcohol isopropílico (o éter isopropílico) en medio ácido obtuvieron una mezcla isomérica de los derivados **21** (llamado *vic*-timol), **28** (*p*-timol), **29** (*sym*-timol) y **30** (timol) (Carpenter y Easter, 1955). La alquilación típica de Friedel y Crafts del *m*-cresol no permitió obtener al *vic*-timol, debido a la baja estabilidad térmica que presenta el mismo en medio ácido (Carpenter y Easter, 1955).

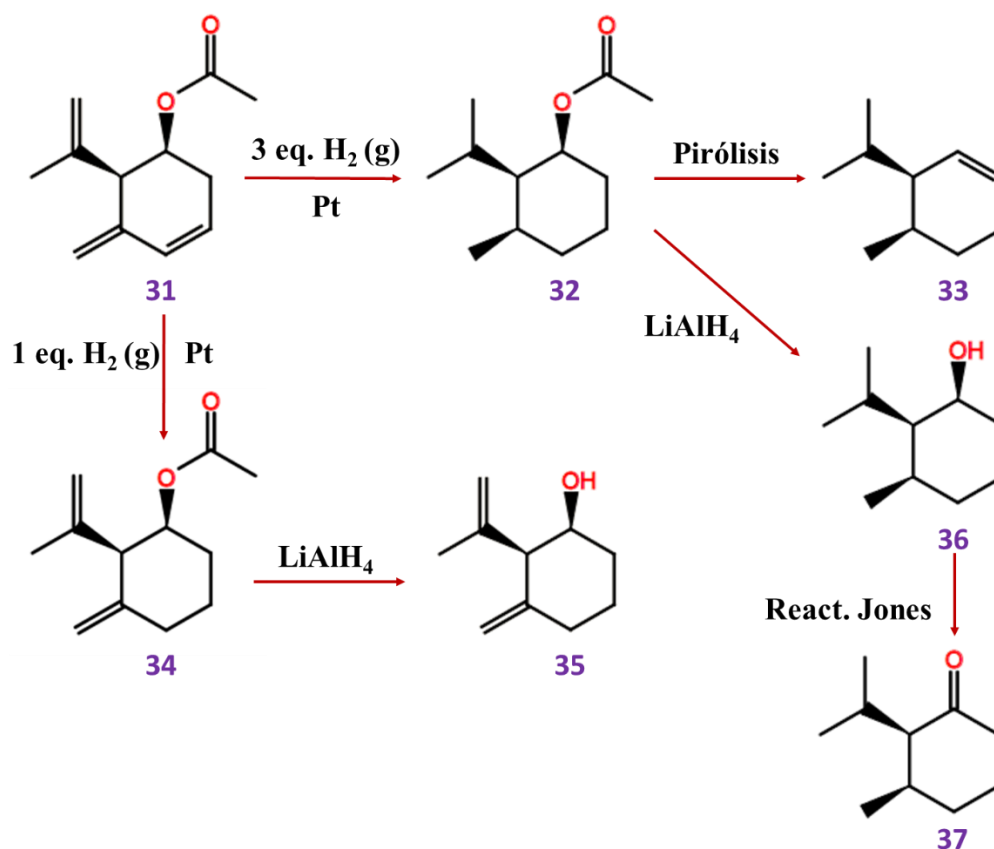


**Figura 10:** alquilación del *m*-cresol y obtención de la mezcla isomérica que incluye al *vic*-timol (**21**; 2-isopropil-3-metilfenol) con el esqueleto del *o*-mentano y relacionado estructuralmente al carquejol. Fuente: Carpenter y Earster (1955).

Posteriormente al trabajo pionero de Naves, Thomas redujo al acetato de carquejilo (**31**) por medio de H<sub>2</sub> (g) (con catálisis sobre Pt) para obtener el acetato de hexahidro-carquejilo (**32**),



el que por medio de pirólisis (400°C) produjo mayormente el isómero del *o*-3-menteno **33** (Figura 11) (Thomas, 1967).



**Figura 11:** esquema original de semi-síntesis seguido por Thomas (1967) para la determinación de la configuración absoluta del carquejol.

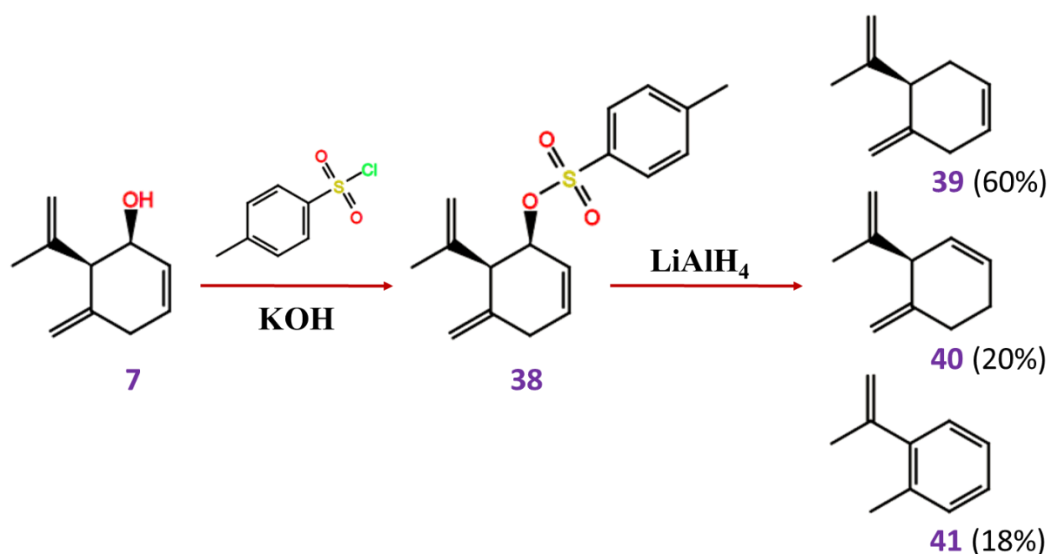
Con la hidrogenación parcial, Thomas demostró que el primer enlace que se reduce es el endocíclico, obteniendo el acetato de dihidro-carquejilo (**34**), el que por reducción con LiAlH<sub>4</sub> brindó el alcohol correspondiente (**35**). El acetato de hexahidrocarquejilo (**32**) suministró por reducción al (-)-*o*-neo-isomentol (**36**; un carquejanol) que tiene la estructura “all cis” (Thomas, 1967). Por medio de oxidación suave con reactivo de Jones (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O), el *o*-neo-isomentol (**36**) produjo la *o*-isomentona (**37**; *iso*-carquejanona), con propiedades espectroscópicas semejantes a la *o*-mentona de Naves (**23**), por lo cual se sospechó que fuese el mismo compuesto (Thomas, 1967).

Con éste trabajo, Thomas confirmó la posición *cis* de los sustituyentes hidroxilo e isopropenilo en el carquejol, pero continuó con la estructura errónea del carquejol propuesta por Naves (compuesto **19**, Figura 9) (Thomas, 1967). Además, por medio de medidas de dicroísmo circular (DC) sobre la *o*-isomentona (**37**), se determinó que la conformación



preferencial de éste compuesto es con el grupo isopropilo en posición axial y con el metilo en posición ecuatorial (en el sistema silla del anillo de ciclohexano) (Thomas, 1967). También, el mismo autor determinó la posición axial del hidroxilo en el (-)-*o-neo*-isomentol (36), por lo que todo lo anterior permitió establecer la configuración absoluta [2-(*R*)-isopropenil-3-(*S*)-hidroxi] para el carquejol (Thomas, 1967).

La investigación sobre la configuración absoluta del carquejol y sus derivados naturales continuó con el aporte de Snatzke *et al.* (1969), quienes por medio de estudios semi-sintéticos, de espectroscopía UV, RMN y DC asignaron al carquejol la estructura y la configuración absoluta con la que se lo conoce actualmente (compuesto 7 de la Figuras 5 y 12). Los procedimientos semi-sintéticos de estos autores tuvieron por objetivo obtener deoxi-derivados del carquejol, haciéndolo reaccionar con cloruro de *p*-toluensulfonilo generando el correspondiente éster tosilato (38) como intermedio, y posteriormente los *o*-mentatrienos 39 y 40, y el *o*-isopropiltolueno (41) (Figura 12) (Snatzke *et al.*, 1969). Asimismo, en éste trabajo los autores confirmaron la configuración absoluta de los carbonos quirales del carquejol (2*R* y 3*S*) reportada anteriormente por Thomas (Snatzke *et al.*, 1969).



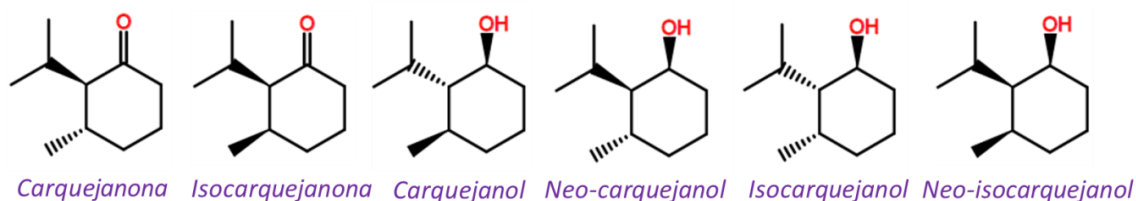
**Figura 12:** esquema original de semi-síntesis seguido por Snatzke *et al.* (1969) para la obtención de los *o*-mentatrienos deoxi-derivados del carquejol.

Posteriormente, Ferretti-Alloise *et al.* (1970 a, b y c) publicaron una serie de importantes contribuciones sobre la química de las *o*-metonas y *o*-mentoles, poniendo en evidencia la necesidad de una normalización de la nomenclatura para referirse a éste tipo de derivados, la



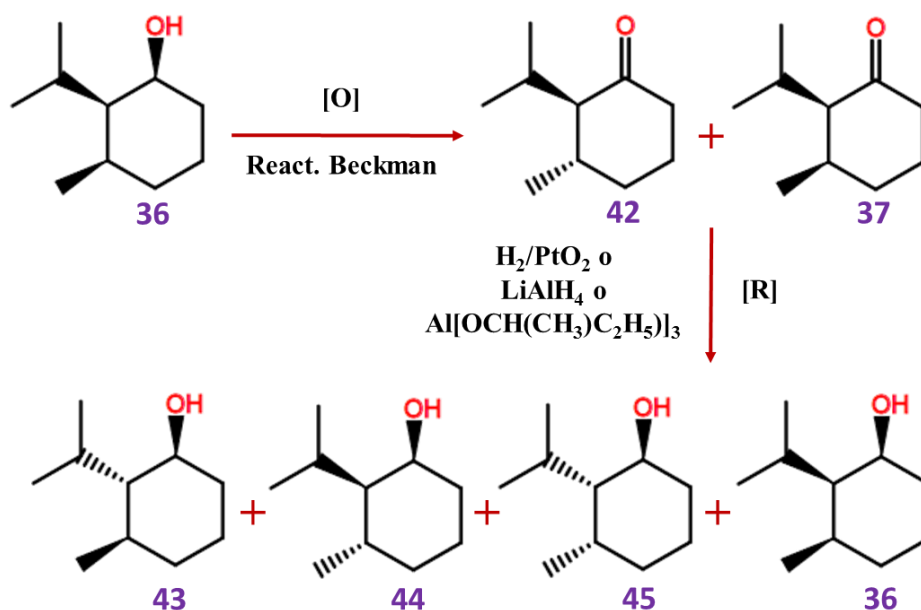


que se presenta en la Figura 13. Es pertinente destacar que para cada una de dichas estructuras deben considerarse los dos posibles enantiómeros.



**Figura 13:** nomenclatura de las o-mentonas y o-mentoles propuesta por Ferretti-Alloise et al. (1970a).

El esquema semi-sintético de éstos autores partió de una mezcla cruda de neo-isocarquejanol (36), obteniéndose una mezcla de la carquejanona (42) e isocarquejanona (37) mediante oxidación crómica de Beckman (Ferretti-Alloise *et al.*, 1970a) (Figura 14). Sobre ésta mezcla se realizó reducción para obtener todos los carquejanoles posibles, incluyendo el alcohol de partida (36, 43-45) (Figura 14) (Ferretti-Alloise *et al.*, 1970a).



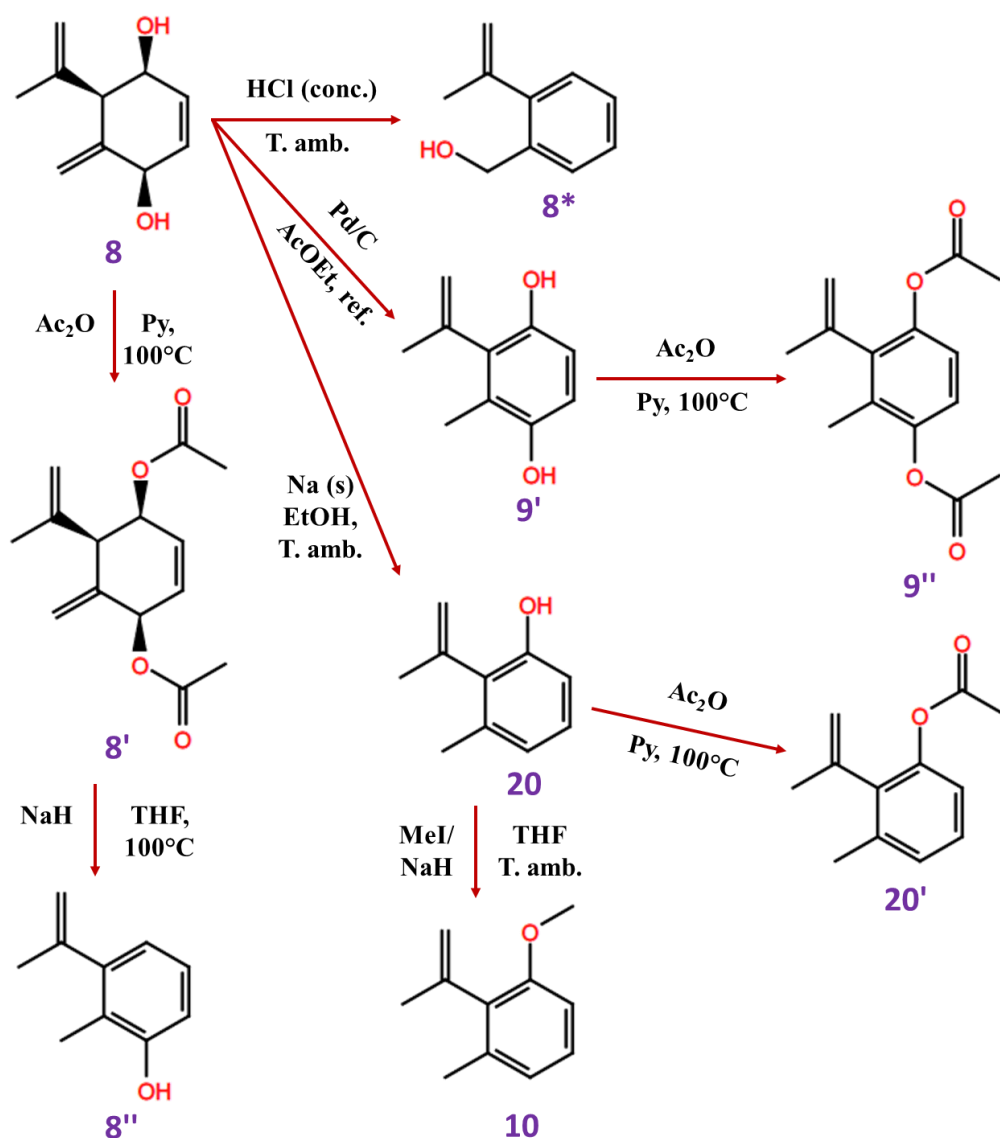
**Figura 14:** esquema original de semi-síntesis seguido por Ferretti-Alloise et al. (1970a) para la obtención de carquejanoles.

Como parte del mismo trabajo, los autores separaron cada uno de los carquejanoles y los volvieron a oxidar mediante la mezcla crómica de Beckman, siendo que el carquejanol (43) y el neocarquejanol (44) dieron como resultado la carquejanona (42), mientras que el



isocarquejanol (45) y el neo-isocarquejanol (36) suministraron la isocarquejanona (37) (Ferretti-Alloise *et al.*, 1970a).

Posteriormente, Jiménez-Estrada *et al.* (1996) por medio de reacciones simples obtuvieron una serie de derivados semi-sintéticos del piquerol A (incluyendo al carquejifenol; Figura 15), los que fueron empleados en evaluaciones de actividad alelopática con buenos resultados.



**Figura 15:** esquema original de semi-síntesis de Jiménez-Estrada *et al.* (1996) para la obtención de derivados del piquerol A.

Adicional a lo descrito, existe en literatura un artículo en el que se reportan espectros de RMN de mezclas epiméricas de cetonas naturales en el que se llama “carquejana” a lo que en



realidad es “carquejanona” (Enríquez *et al.*, 1973), según la nomenclatura de Ferretti-Alloise *et al.* (1970a).

### 1.4 Propiedades biológicas del carquejol y sus derivados

El aislamiento del carquejol (enantiómero dextrógiro) para fines terapéuticos se encuentra registrado en una patente de Estados Unidos (Naves y Caujolle, 1963), así como en un par de artículos científicos (Caujolle *et al.*, 1960a y 1960b).

Se ha reportado que el carquejol exhibe propiedades antipiréticas fuertes e inmediatas en modelos animales mediante inyección por vía intraperitoneal o de su ingestión oral (Caujolle *et al.*, 1960b; Naves y Caujolle, 1963). Asimismo, el carquejol actúa como narcótico, hipnótico y analgésico a nivel del sistema nervioso central (SNC) tanto en administraciones orales como parenterales (Caujolle *et al.*, 1960b; Naves y Caujolle, 1963).

En cuanto a la toxicidad del carquejol, los reportes indican que dosis agudas sub-letales inyectadas en ratones provocan inmediatamente inestabilidad de movimiento y narcosis, aunque el efecto es de corta duración tras lo cual los animales vuelven a sus condiciones normales de movilidad, crecimiento y fertilidad sin efectos adversos (Caujolle *et al.*, 1960a; Naves y Caujolle, 1963). En inyecciones con dosis letales (LD<sub>50</sub>: 0,46 g/Kg intraperitoneal y 1,80 g/Kg oral), los animales pierden su capacidad de movimiento y entran progresivamente en coma terminal hasta la muerte, sin aparentar padecimiento de dolor (Naves y Caujolle, 1963).

A pesar de todos los resultados pre-clínicos aparentemente promisorios, no existen más reportes en la literatura posteriores a 1970 sobre el estudio de los derivados del carquejol.

En nuestro conocimiento no existen en literatura evaluaciones publicadas sobre actividades biológicas del acetato de carquejilo (salvo en aquellas que se considera como parte del aceite esencial de *B. trimera*). Por otra parte, tanto el piquerol A como el carquejifenol (y otros derivados del piquerol) han ido reportados por ser potentes agentes alelopáticos (González de la Parra *et al.*, 1981; Jiménez-Estrada *et al.*, 1996).



## 1.5 Métodos espectroscópicos de análisis de productos orgánicos

En éste capítulo se sumará al trabajo previo realizado por espectrometría de masa, la aplicación de otras herramientas espectroscópicas. En el entendido de que ninguna técnica espectroscópica *per se* permite obtener todos los detalles estructurales, sino que la información aportada por cada una de ellas es de valor y complementaria entre sí (**Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008**).

Es el caso del dicroísmo circular (DC), que utiliza un fenómeno de interacción diferencial entre una molécula quiral y radiación electromagnética circularmente polarizada (**Ranjbar y Gill, 2009; Batista Jr., 2012**). El DC se encuentra intrínsecamente relacionado con la quiralidad, debido a que los haces de luz circularmente polarizada hacia la derecha o hacia la izquierda son imágenes especulares uno del otro, y por tal, la interacción con un compuesto quiral permite la discriminación de sus enantiómeros (**Ranjbar y Gill, 2009; Batista Jr., 2012**). En general los espectros de DC (elipticidad en función de la longitud de onda de la radiación) se registran en el mismo intervalo que la espectroscopía UV-Vis (200-800 nm; en lo que se llama DC electrónico), y la obtención de los mismos es de gran importancia para la determinación de la configuración absoluta de los compuestos quirales, naturales o sintéticos (**Ranjbar y Gill, 2009; Batista Jr., 2012**).

Por su parte, la absorción de energía infrarroja corresponde al intervalo del espectro electromagnético de 2,5-16  $\mu\text{m}$  o a su equivalente de 4000-625  $\text{cm}^{-1}$ , y la misma es la responsable de transiciones entre estados de energía vibratoria y rotatoria de la molécula.

Un espectro similar al IR es obtenido por la espectroscopía Raman, la que también permite estudiar modos de vibración y de rotación característicos de moléculas orgánicas (**Fleming y Williams, 1968; Faria et al., 2002**). Sin embargo, las espectroscopía IR y Raman se basan en diferentes fenómenos físicos. En éste último caso, cuando una muestra es irradiada con una luz monocromática (por ejemplo, de un laser en la región visible del espectro), los electrones de valencia de las moléculas la dispersan de manera elástica (esto es, a la misma longitud de onda de irradiación; dispersión Rayleigh) o de manera inelástica (a una longitud de onda diferente; dispersión Raman), siendo en éste último caso detectada y registrada como un espectro (**Faria et al., 2002**).

Por último, en la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) si bien los espectros de mayor utilidad en Química Orgánica son los de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , el empleo de espectros de



bidimensionales es de uso extendido en la actualidad permitiendo determinar mayor cantidad de detalles estructurales (Carey, 2008). Entre ellos, los más conocidos son  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  vecinal),  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  vecinal) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (acoplamiento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a larga distancia) (Carey, 2008).

### 1.6 Métodos computacionales para estudios de estructura molecular

Los métodos computacionales tienen enorme importancia actual en la Química Orgánica y en el diseño de nuevos fármacos, ya que permiten el estudio de la estructura molecular y la predicción de propiedades de los componentes sin necesidad de sintetizarlos en el laboratorio (Atkins *et al.*, 2009; Ortolan, 2014).

Uno de los métodos de cálculo más conocidos es la Teoría del Funcional de Densidad (*DFT*, por sus siglas en inglés), el que permite realizar cálculos de la estructura electrónica de moléculas poliatómicas con facilidad (Atkins *et al.*, 2009; Ortolan, 2014). Es uno de los métodos más empleados en la literatura, y es una aproximación que emplea la densidad electrónica del estado fundamental para describir los estados energéticos en un sistema molecular, y por tal, aproximarse a la solución de la ecuación de Schrödinger (Ortolan, 2014). El punto débil de la *DFT* es la correlación aproximada entre la energía y la densidad electrónica, y por ello se han creado diferentes funcionales teóricos (más de 50) que posibilitan aproximaciones más o menos precisas (Ortolan, 2014). Particularmente, el funcional más empleado actualmente es el B3LYP, el que se considera un híbrido porque tiene contribuciones de varios funcionales (Ortolan, 2014).

El funcional B3LYP emplea funciones de base, que son aproximaciones optimizadas de los orbitales atómicos para poder realizar los cálculos computacionales y obtener aproximaciones adecuadas a los datos experimentales (Becke, 1988; Lee *et al.*, 1988; Ortolan, 2014). Para una descripción precisa de los sistemas moleculares se emplean las funciones de bases llamadas difusas, que tienen en cuenta la distorsión (o polarización) de los orbitales atómicos que se produce como consecuencia de la formación de enlace (Atkins *et al.*, 2009). Existen varias funciones de base que se pueden escoger para los cálculos, y dos de las más empleadas (que también se eligieron para éste trabajo) son la 6-31G\* y la 6-311++G\*\* (ésta última difusa) (Becke, 1988; Lee *et al.*, 1988; Ortolan, 2014). A nivel de nomenclatura, se dice por ejemplo que un funcional con una función de base constituye un nivel de teoría; de manera que en éste trabajo se emplearon dos niveles teóricos: B3LYP/6-31G\* y B3LYP/6-311++G\*



(Ortolan, 2014). Debido al carácter difuso, es de esperar que éste último nivel sea el más preciso en la predicción de las propiedades moleculares.

Empleando los niveles de teoría mencionados, se pueden realizar una amplia gama de cálculos (de energías, de geometría molecular, de propiedades físicas, de superficies de energía potencial; así como la predicción de espectros IR y Raman, UV-Vis y RMN) (Ortolan, 2014).

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Esquema general de semi-síntesis

En la Figura 16 se presenta, de forma resumida, el esquema general semi-sintético que se diseñó en éste trabajo de tesis para la obtención de derivados del carquejol. En las siguientes secciones se detallarán las condiciones experimentales mediante las cuales se obtuvieron cada uno de los componentes detallados en dicho esquema.

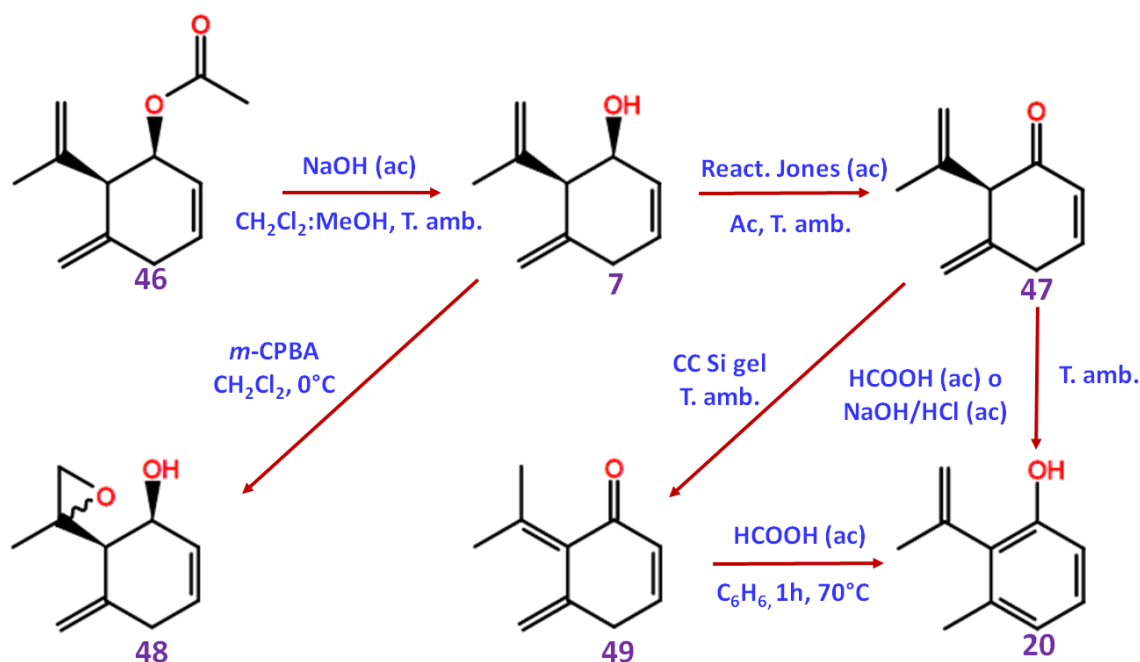


Figura 16: esquema original de semi-síntesis seguido en éste trabajo de tesis.

### 2.2 Procedimientos instrumentales generales

En todos los casos de los compuestos ilustrados en la Figura 16, se obtuvieron sus espectros de RMN en un instrumento *Bruker AC200* (*Bruker Corporation, Billerica, MA, EEUU*), empleando las frecuencias de 200 MHz para  $^1\text{H}$  y de 50 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Los espectros fueron



registrados en el solvente  $\text{CDCl}_3$  con una pequeña porción de TMS (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MI, EEUU*), empleando el mismo como referencia interna en la medición ( $\delta_{\text{H}}$  7,26;  $\delta_{\text{C}}$  77,3, 77,0 y 76,7). Espectros bidimensionales ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) fueron obtenidos empleando programas estándares de Bruker de excitación y medición.

Los espectros por *GC-MS* fueron obtenidos en un cromatógrafo *Hewlett Packard GC6890* acoplado a un detector selectivo de masas *Hewlett Packard MSD 5973* (*Hewlett Packard Company, Palo Alto, CA, EEUU*). La columna analítica empleada fue una *HP-5MS* (95%-metil-5%-fenilpolisiloxano; *Agilent Technologies, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, EEUU*) (30 m  $\times$  0,25 mm d.i.  $\times$  0,25 mm de espesor de fase). Las temperaturas de inyector, interfase, fuente de iones y cuadrupolo fueron 250°C, 275°C, 280°C y 150°C, respectivamente. La fase móvil fue He (1,0 mL/min). El programa de temperatura fue: 50°C (1 min), 50-100°C a 1,0°C/min, 100-150°C a 2°C/min, 150-270°C a 10°C/min, 270°C (5 min). Energía de ionización electrónica: 70 eV; volumen de inyección: 0,1  $\mu\text{L}$  (solución al 10% en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ); modo de inyección: *Split*, relación: 1/55. Para determinar la pureza enantiomérica de los productos se empleó análisis por *eGC-MS* según las condiciones reportadas previamente en el capítulo 5.

Los espectros de UV-Vis fueron obtenidos empleando cubeta de cuarzo de 1,0 cm en el rango 200-800 nm mediante un equipamiento *Beckman DU-610* (*Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EEUU*). En cada caso se realizaron las diluciones apropiadas (en *n*-hexano) para ajustar la absorbancia de medida a un valor menor a 1,0.

Para el acetato de carquejilo (**46**), carquejol (**7**) y carquejifenol (**20**) (Figura 16), se realizaron además caracterizaciones por *FT-IR* (infrarrojo con transformada de Fourier) y Raman; y DC para **7** y **46**.

Las medidas de *FT-IR* fueron realizadas en un espectrofotómetro *Perkin Elmer GXFTIR* provisto con un detector piroeléctrico de *DTGS* (sulfato de triglicerina deuterado) (*Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, EEUU*) purgado constantemente con aire seco. Los espectros fueron registrados en el rango 4000- 400  $\text{cm}^{-1}$ , con la muestra dispuesta en forma de película líquida sobre una celda desmontable, y empleando una ventana de ZnSe. Los espectros fueron registrados con un total de 256 barridos y una resolución de 1  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de Raman fueron obtenidos en el rango 3500-50  $\text{cm}^{-1}$  mediante un microscopio *Thermo DXR Raman* (*Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU*) equipado con un laser Nd:YAG con línea de excitación monocromática de 532 nm y 10 mW de potencia. Las



muestras de carquejol y carquejifenol fueron medidas a temperatura ambiente en estado sólido, y la de acetato de carquejilo lo fue en estado líquido. Los espectros de Raman fueron registrados con 300 barridos y una resolución de  $4\text{ cm}^{-1}$ .

Por último, los espectros de DC fueron obtenidos en el rango 200-400 nm en un espectropolarímetro *Jasco J-815* (*Jasco Inc., Easton, PA, EEUU*), empleando una celda de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Las soluciones de medida (acetato de carquejilo y carquejol) fueron preparadas a una concentración de 0,1 y 0,3 mg/mL en EtOH 96% (*Dorwil, Buenos Aires, BA, Argentina*).

Para el caso del carquejol y carquejifenol cristalinos, se determinaron sus puntos de fusión mediante un microscopio *Ernst Leitz* (*Ernst Leitz GmbH, Wetzlar, Alemania*). Para el calentamiento de la platina con la muestra (agujas cristalinas de ambos compuestos) se empleó una corriente de 1,1 A, correspondiente a puntos de fusión menores a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3 Detalles computacionales

Las estero-estructuras posibles para el acetato de carquejilo, carquejol y carquejifenol fueron dibujadas con el programa *GaussView* y posteriormente optimizadas usando el funcional de cálculo híbrido B3LYP y las funciones de bases 6-31G\* y 6-311++G\*\* con el programa Gaussian 09 (**Becke, 1988; Lee et al., 1988, Nielsen y Holder, 2008; Frisch et al., 2009**).

Para las estructuras optimizadas, fueron calculadas las curvas de energía potencial (*PEC*) los valores de energía total y relativa, el momento dipolar ( $\mu$ ) y los valores de las poblaciones de los conformeros más estables. Las magnitudes de potencial electrostático molecular (*MEP*) para todos los átomos fueron calculados por el método de las cargas atómicas de Merz-Kollman (MK) (**Besler et al., 1990**). Asimismo, se generó el mapa de las superficies potenciales moleculares para las estructuras de los conformeros por medio del programa *GaussView* (**Nielsen y Holder, 2008**).

Las estabildades de los conformeros del acetato de carquejilo, carquejol y carquejifenol fueron también estudiadas a través de sus propiedades topológicas con el programa AIM2000 (**Biegler-König et al., 2001**). En este trabajo, las posibles interacciones intra-moleculares fueron determinadas con la teoría de Bader (**1990**) calculando las siguientes propiedades topológicas: distribución de densidad electrónica  $\rho(r)$  en los puntos críticos de enlace (*Bcps*),





puntos críticos de anillo (RCPs), valores del Laplaciano,  $\nabla^2\rho(r)$ , los *eigenvalues* ( $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$ ,  $\lambda_3$ ) de la matriz Hessiana y la relación  $\lambda_1/\lambda_3$ . Estos parámetros son importantes también para identificar las características y tipo de interacciones intermoleculares. Para mayores detalles ver el anexo y las publicaciones allí presentadas.

## 2.4 Obtención de acetato de carquejilo

Para la obtención del acetato de carquejilo se partió de aceite esencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. de la población de referencia en estado de floración (capítulo 7), el que según análisis por *GC-MS* contenía 71,4% de dicho componente, 0,5% de carquejol y 0,1% de carquejifenol.

En una primera instancia, el aceite esencial fue fraccionado por cromatografía en columna (CC) en las condiciones experimentales descritas previamente en el capítulo 7. La colecta y monitoreo de las fracciones por *TLC* permitió reunir aquellas con mayor contenido de acetato de carquejilo. Estas fueron concentradas mediante destilación con columnas tipo Vigreux y finalmente evaporadas a vacío mediante rotavapor (50-60°C). De ésta manera se obtuvieron 28,40 g de un concentrado líquido rico en acetato de carquejilo (pureza 90,6% por *GC-MS*), el que presentó una consistencia viscosa, un color levemente pardo y el aroma típico percibido normalmente de *B. trimera* (notas amaderadas). La mayor impureza constatada (5,6%) fue el alcohol sesquiterpénico palustrol, cuya identidad fue determinada por *GC-MS* y RMN. Esta fracción impura de acetato de carquejilo se empleó para continuar con el esquema de semi-síntesis propuesto.

En una segunda instancia, y para obtener acetato de carquejilo de mayor pureza para estudios espectroscópicos, se fraccionó una nueva porción de 3,0 mL de aceite esencial por CC (30 cm  $\times$  2,5 cm) con 78,0 g de sílica gel (230-400 mesh; Merck, Darmstadt, Alemania). La fase móvil de corrida en éste caso fue hexano-AcOEt (20:1; Cicarelli, San Lorenzo, SF, Argentina) a un flujo isocrático de 2,5 mL/min, tras lo cual se obtuvieron 27 fracciones de aproximadamente 3,5 mL cada una. Las mismas fueron reunidas de acuerdo a su semejanza de perfil por *TLC* y *GC-MS*.

Se obtuvieron en ésta segunda instancia 1,64 g de una fracción enriquecida en acetato de carquejilo 88,2% y palustrol 4,3%, por *GC-MS*. Dicho concentrado fue posteriormente sometido a re-cromatografía empleando 80,2 g de sílica gel y fase móvil hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15:4; Cicarelli) eluída a un flujo de 2,5 mL/min; con el objetivo de eliminar los hidrocarburos remanentes. De ésta forma se obtuvieron 27 fracciones de aproximadamente 5



mL cada una, las que se reunieron de acuerdo a su similitud por análisis de *TLC* y *GC-MS*. Luego de evaporación del solvente, finalmente se obtuvieron 0,34 g de una fracción conteniendo 94,5% de acetato de carquejilo y 5,5% de palustrol.

El agregado de una punta de espátula de  $\text{CaCl}_2$  (*Anedra, Research AG, Tigre, BA, Argentina*) a dicha solución (para precipitar el palustrol como alcoholato) apenas modificó el porcentaje de pureza, obteniéndose finalmente acetato de carquejilo 95,0% de pureza. El que se filtró por algodón, lavando cuidadosamente el sólido con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y se eliminó el solvente remanente mediante cuidadosa evaporación a vacío. El acetato de carquejilo obtenido de ésta manera fue empleado para estudiar sus espectros. Los mismos ( $^1\text{H-RMN}$ , *MS*) coincidieron con los resultados anteriormente reportados por Thomas (1967).

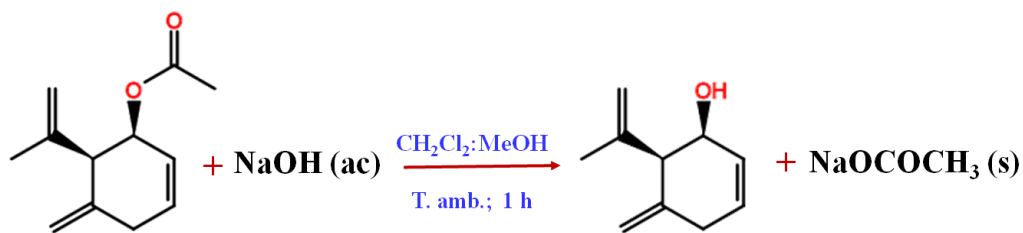
#### Acetato de carquejilo (95,0% pureza por *GC-MS*), $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_2$ . (46)

Líquido a temperatura ambiente (25°C). *EI-MS* (70 eV) (*m/z*; %):  $[\text{M}]^+$  192 (1,0), 150 (15,2), 135 (29,6), 132 (62,4), 131 (24,0), 117 (100), 115 (15,6), 107 (23,2), 105 (18,8), 94 (17,6), 91 (64,8), 81 (22,8), 79 (35,6), 77 (28,0), 65 (16,4), 53 (9,6), 43 (66,4).  $^1\text{H RMN}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm): 5,79 (C-CH=C; H-3; doble doblete;  $J_1$ : 12,0 Hz;  $J_2$ : 2,0 Hz); 5,71 (C-CH=C; H-2; doble doblete,  $J_1$ : 12,0 Hz;  $J_2$ : 2,0 Hz); 5,46 (2C-CH-O; H-1; multiplete con acoplamiento fino); 4,97 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; 2H-9; doblete,  $J$ : 0,8 Hz); 4,93 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; 2H-7; multiplete,  $J$ : 1,2 Hz); 3,42 (2C-CH-C; H-6; doblete,  $J$ : 5,6 Hz); 2,83 (C-CH<sub>2</sub>-C; 2H-4; doble doblete con acoplamiento fino;  $J_1$ : 20,8 Hz;  $J_2$ : 2,0 Hz); 2,04 (C-CH<sub>3</sub>; 3H-12; singulete); 1,74 (C-CH<sub>3</sub>; 3H-10; doblete,  $J$ : 0,8 Hz).  $^{13}\text{C-RMN}$  (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm): 170,6 (O-RC=O; C-11); 142,8 (2C-C=C; C-5); 141,3 (2C-C=C; C-8); 128,9 (C-CH=C; C-3); 126,5 (C-CH=C; C-2); 113,2 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; C-9); 112,5 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; C-7); 71,9 (2C-CH-O; C-1); 51,7 (2C-CH-C; C-6); 31,8 (C-CH<sub>2</sub>-C; C-4); 22,7 (CH<sub>3</sub>-C; C-10); 21,2 (CH<sub>3</sub>-C; C-12).

El acetato de carquejilo aislado fue enantioméricamente puro según análisis por *eGC-MS*.

### 2.5 Saponificación de acetato de carquejilo

El acetato de carquejilo impuro obtenido de la fase anterior fue saponificado en condiciones suaves de reacción, siguiendo el procedimiento descrito por Theodorou *et al.* (2007). La reacción fue la siguiente:



Para ello, una porción de 27,78 g de solución de acetato de carquejilo (90,6% de pureza; 25,17 g puros; 0,131 moles) se transvasó cuantitativamente a un matraz tipo Erlenmeyer de 2,0 L de capacidad. Al mismo también fueron adicionados 80,0 mL de una solución de NaOH (preparada a partir de lentejas; *Anedra*) al 10,0% en MeOH (bidestilado; *Cicarelli*); y un medio de reacción conteniendo CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH (9:1), 630,0 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (monodestilado) y 70,0 mL de MeOH (bidestilado).

La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 2 horas bajo agitación magnética constante, y su avance fue seguido por medio de *TLC* (desaparición de la mancha correspondiente al acetato de carquejilo y aparición de la del carquejol) en las condiciones descriptas en el capítulo 7. A lo largo de la reacción se observó un color amarillento en el sistema, así como turbidez correspondiente a la precipitación del acetato de sodio.

Luego de acabada la reacción, la mezcla (de aspecto gelatinoso) fue filtrada por papel, enjuagando cuidadosamente el NaOCOCH<sub>3</sub> (s) resultante con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 10,0 mL). Para eliminar el solvente, se evaporó parcialmente la solución anterior a vacío por rotavapor. Con el objetivo de eliminar restos de NaOH, al concentrado anterior se lo transvasó a una ampolla de decantación, se lo lavó con 200 mL de agua destilada y se lo extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 250 mL). A la fase orgánica resultante se la secó por adición de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (anhidro; *Anedra*) y se filtró por papel, enjuagando el sólido con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 2 mL). Se eliminó el solvente de la fase orgánica a vacío, obteniéndose de ésta etapa 23,49 g de un líquido de color naranja intenso, el que se destinó para posterior purificación.

La última etapa se realizó mediante CC en las mismas condiciones experimentales de separación del acetato de carquejilo (capítulo 7). En éste caso, se recogieron 69 fracciones de aproximadamente 25 mL, con una elución efectuada a una velocidad constante de 4,0 mL/min. Posteriormente, se reunieron las fracciones más puras según análisis por *TLC*, se evaporó el solvente a vacío y finalmente se obtuvieron 8,08 g de carquejol (99,8% de pureza por *GC-MS*) que fue empleado para estudios espectroscópicos. La masa total de carquejol



(95,0% de pureza) obtenida luego del procesamiento previamente descrito para todas las fracciones de CC fue de 19,05 g (18,10 g puros, 0,120 moles; 92% de rendimiento).

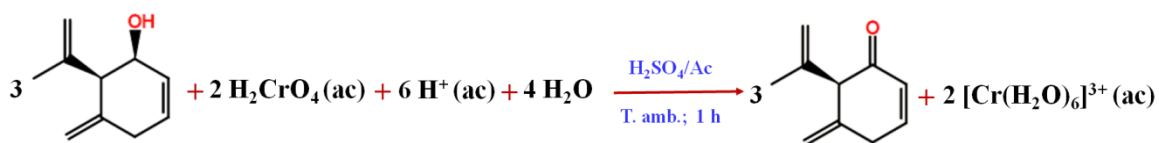
### Carquejol (99,8% de pureza por GC-MS), C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O. (7)

Sólido cristalino blanco (agujas) de punto de fusión 38-39 °C. **UV (n-hexano):** λ<sub>max</sub> (log ε) 208 nm (3,78). **EI-MS (70 eV) (m/z; %):** [M]<sup>+</sup> 150 (1,7), 149 (1,5), 135 (62,0), 133 (16,0), 117 (45,0), 115 (17,0), 107 (44,0), 95 (23,0), 94 (49,0), 93 (24,0), 92 (17,0), 91 (97,0), 81 (20,0), 79 (100), 77 (56,0), 70 (23,0), 65 (23,0), 55 (16,0), 53 (17,0), 51 (16,0), 41 (24,0). **<sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm):** 5,87 (C-CH=C; H-2; doble doble triple doblete, J<sub>1</sub>: 9,9 Hz, J<sub>2</sub>: 3,3 Hz, J<sub>3</sub>: 2,0 Hz, J<sub>4</sub>: 0,4 Hz); 5,74 (C-CH=C; H-3; doble triple doble doblete, J<sub>1</sub>: 9,9 Hz, J<sub>2</sub>: 3,3 Hz, J<sub>3</sub>: 1,5 Hz, J<sub>4</sub>: 0,4 Hz); 5,24 (CH<sub>2</sub>=C; H-9b, multiplete con acoplamiento fino); 5,04 (CH<sub>2</sub>=C; H-9a; quintuplete, J: 1,4 Hz); 4,97 (CH<sub>2</sub>=C; H-7b; cuarteto, J: 1,4 Hz); 4,92 (CH<sub>2</sub>=C; H-7a; singulete amplio); 4,41 (2C-CH-O; H-1; multiplete); 3,14 (2C-CH-C; H-6; doblete amplio, J: 4,7 Hz); 2,89 (C-CH<sub>2</sub>-C; H-4b; doblete con acoplamiento fino, J: 19,7 Hz); 2,77 (C-CH<sub>2</sub>-C; H-4a; doblete con acoplamiento fino, J: 19,7Hz); 1,87 (O-H; doblete, J: 10,3 Hz); 1,78 (CH<sub>3</sub>-C; 3H-10; doble doblete, J<sub>1</sub>: 1,4 Hz, J<sub>2</sub>: 0,7 Hz). **<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) (δ, ppm):** 143,2 (2C-C=C; C-5); 142,4 (2C-C=C; C-8); 130,8 (C-CH=C; C-2); 128,1 (C-CH=C; C-3); 112,6 (CH<sub>2</sub>=C; C-9); 111,6 (CH<sub>2</sub>=C; C-7); 68,8 (2C-CH-O; C-1); 54,3 (2C-CH-C; C-6); 33,1 (C-CH<sub>2</sub>-C; C-4); 23,8 (C-CH<sub>3</sub>; C-10).

El carquejol aislado fue enantioméricamente puro según análisis por *eGC-MS*.

## 2.6 Oxidación de carquejol a carquejona

Para oxidar el carquejol a la carquejona se empleó la técnica de oxidación de alcoholes con reactivo de Jones (CrO<sub>3</sub> en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), descrita en detalle por Pasto y Johnson (1974). La misma es adecuada para la oxidación selectiva del grupo hidroxilo, no produciéndose oxidación de los dobles enlaces. La técnica se basa en la reacción en condiciones suaves (a temperatura ambiente o menor) del grupo hidroxilo con el anión hidrógeno cromato generado *in situ* en medio acetónico (Pasto y Johnson, 1974). La reacción llevada a cabo fue:





El agente oxidante (reactivo de Jones) fue preparado por disolución de 3,59 g de trióxido de cromo ( $\text{CrO}_3$ ; *Anedra*) en 3,20 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (98,5%, ppa; *Cicarelli*), y posteriormente diluido a 25 mL por adición de agua destilada.

De ésta manera, una porción de 16 mL de reactivo de Jones fue adicionada gota a gota durante 1 hora (a temperatura ambiente y bajo agitación magnética continua) a un matraz Erlenmeyer conteniendo una solución de carquejol (4,26 g; 28 mmoles) disuelta en acetona destilada (70 mL; *Dorwil*). La reacción fue seguida hasta completa desaparición del carquejol, monitoreada por *TLC* como fuera detallado anteriormente (en éste caso, para tener una mejor resolución de las manchas, la fase móvil empleada fue hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  2:1).

Experimentalmente se evidenciaron dos fases en el medio de reacción: la superior orgánica (fase incolora de acetona con el alcohol reactivo y la cetona formada) y la inferior acuosa (de color verde conteniendo las sales cromosas). El reactivo de Jones fue agregado hasta ligero exceso del mismo, constatado por una coloración pardo-rojiza estable en la capa orgánica. El exceso del oxidante fue eliminado por adición de unas 20 gotas de  $\text{MeOH}$ .

Luego de completada la reacción, se adicionaron al matraz de reacción 400 mL de  $\text{Et}_2\text{O}$  (*Cicarelli*). Dicha mezcla fue transferida inmediatamente a una ampolla de decantación en la que se separaron las fases cromosas. El lavado de la fase orgánica se realizó en la misma ampolla con 50 mL de una solución de  $\text{NaCl}$  al 20%, y posteriormente se separaron las fases. A la fase orgánica se le adicionó  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro) y posteriormente se la filtró por papel. A continuación se eliminó el solvente por evaporación a vacío, obteniéndose finalmente 3,40 g de un líquido amarillo de aspecto aceitoso. El análisis por *GC-MS* del producto crudo de reacción estableció la presencia de carquejona (93,6%), carquejifenol (6,2%) y carquejol (0,2%). Esta solución de carquejona impura fue empleada para estudios espectroscópicos, debido a que la misma no se pudo purificar adicionalmente por *CC* debido a la existencia de procesos de interconversión (ver más adelante).

Finalmente, teniendo en cuenta la pureza de la mezcla, la masa obtenida de carquejona pura fue de 3,18 g (21 mmoles), que corresponde a un rendimiento de reacción de 77%.

El procedimiento anteriormente detallado fue optimizado en cuanto al *work-up* de la reacción, debido a que en una primera instancia el exceso de ácido se eliminó por tratamiento con  $\text{NaHCO}_3$  (ac), pero, en tales condiciones, el compuesto mayoritario obtenido fue el



carquejifenol. Asimismo, la purificación de la carquejona mediante cromatografía en columna con sílica gel condujo a la *iso*-carquejona y al carquejifenol (sección 2.8).

En un experimento paralelo se dejó en reposo a temperatura ambiente una muestra de carquejona durante un período de dos meses, al final del cual se constató la completa isomerización de la misma a carquejifenol. De estas observaciones experimentales se concluye que la carquejona no es estable, y que por tal su procesamiento y análisis deben ser realizados de manera rápida, preservándola en condiciones de refrigeración para ralentizar la isomerización.

En éste trabajo también se testeó la oxidación del carquejol mediante  $MnO_2$  activo, pero la misma no fue exitosa en las condiciones experimentales empleadas.

### **Carquejona (93,6% de pureza por GC-MS, 6,2% carquejifenol), $C_{10}H_{12}O$ . (47)**

Líquido a temperatura ambiente (25°C). UV (etanol 95%):  $\lambda_{max}$  (log  $\epsilon$ ) 220 nm (4,00). **EI-MS (70 eV) (m/z; %):**  $[M]^+$  148 (11), 133 (40), 120 (20), 105 (100), 92 (28), 91 (45), 79 (71), 77 (39), 68 (21), 65 (13), 53 (10), 51 (15), 41 (9), 40 (9).  **$^1H$  RMN (200 MHz,  $CDCl_3$ ) ( $\delta$ , ppm):** 6,97 (C-CH=C; H-3; doble doble doblete,  $J_1$ : 10,0 Hz,  $J_2$ : 4,8 Hz,  $J_3$ : 3,0 Hz); 6,11 (C-CH=C; H-2; doble doble doblete amplio,  $J_1$ : 10,0 Hz,  $J_2$ : 3,0 Hz,  $J_3$ : 1,7 Hz); 5,00 ( $CH_2=C$ ; H-7a; singlete amplio); 4,96 ( $CH_2=C$ ; H-7b + H-9a; acoplamiento fino); 4,73 ( $CH_2=C$ ; H-9b, multiplete con acoplamiento fino); 3,64 (2C-CH-C; H-6; singlete amplio); 3,18 (C- $CH_2$ -C; H-4a; doble quinteto,  $J_1$ : 20,4 Hz,  $J_2$ : 2,5 Hz); 3,00 (C- $CH_2$ -C; H-4b; doble doble doblete,  $J_1$ : 20,4 Hz,  $J_2$ : 4,8 Hz,  $J_3$ : 1,7 Hz,  $J_4$ : 0,8 Hz); 1,76 ( $CH_3$ -C; 3H-10; singlete amplio con acoplamiento fino,  $J$ : 0,7 Hz).  **$^{13}C$ -RMN (50 MHz,  $CDCl_3$ ) ( $\delta$ , ppm):** 199,0 (2C-C=O; C-1); 148,0 (C-CH=C; C-3); 141,6 (2C-C=C; C-5); 141,1 (2C-C=C; C-8); 129,0 (C-CH=C; C-2); 113,9 ( $CH_2=C$ ; C-7); 112,8 ( $CH_2=C$ ; C-9); 63,3 (2C-CH-C; C-6); 32,3 (C- $CH_2$ -C; C-4); 21,5 (C- $CH_3$ ; C-10).

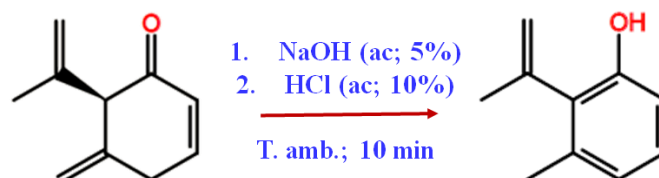
Con el fin de verificar la presencia/ausencia de carquejona en el aceite esencial de *B. trimera* se empleó GC-MS en la modalidad SIM (monitoreo de iones simples) en las condiciones cromatográficas reportadas anteriormente. Los iones empleados en la búsqueda fueron (m/z): 68, 120, 79, 91, 105 y 133. De ésta manera no se detectó presencia de carquejona en el aceite.

Según análisis por eGC-MS, ambos enantiómeros se encontraron presentes en el caso de la carquejona, el mayoritario en 99,9% y el minoritario en 0,01%. En la sección 3.2 se propondrá una explicación para éste hecho.



## 2.7 Isomerización de carquejona a carquejifenol

En la sección 2.6 se mencionó que el procedimiento de *work-up* de la reacción de carquejona en medio alcalino generó el carquejifenol, por lo cual se empleó dicha característica para obtener el citado compuesto por isomerización/catálisis alcalina/ácida. La reacción llevada a cabo en dos etapas fue la siguiente:



Primeramente, una alícuota de 7,5 mL de una solución al 5% de NaOH (ac.) se adicionó gota a gota (bajo agitación magnética continua) a un vial conteniendo 688 mg (4,6 mmoles) de carquejona a temperatura ambiente. Luego de 10 min, la mezcla de reacción fue neutralizada por adición de 10 mL de una solución al 10% de HCl (patrón de 36,5-38,0%; *Cicarelli*) (ac.), controlando el pH del medio mediante papel indicador (*Merck*). Posteriormente, la mezcla fue transvasada cuantitativamente a una ampolla de decantación y extraída con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL).

Las fases orgánicas fueron reunidas, secadas mediante adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro), filtradas por papel y trasvasadas a un balón limpio y seco. Posteriormente se eliminó el solvente por evaporación a vacío, obteniéndose un residuo oleoso incoloro que fue purificado mediante cromatografía en columna de sílica gel (como fuera detallado previamente para el carquejol), empleando una mezcla de hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4:1) como fase móvil. Finalmente se obtuvieron 391 mg de carquejifenol (99,7% de pureza; 57% de rendimiento de reacción), sobre los que se hicieron estudios espectroscópicos.

Para realizar la isomerización en medio ácido, se tomó una porción de carquejona (31 mg), la que disolvió en 0,8 mL de benceno (99,0% de pureza; *Aberkon Química, Buenos Aires, BA, Argentina*) en un vial de vidrio. En el mismo se adicionaron 0,2 mL de ácido fórmico (85% de pureza; *Carlo Erba, Milán, Italia*), y la mezcla de reacción fue sometida a calentamiento a 70 °C durante 60 min bajo agitación magnética constante. Posteriormente, la mezcla de reacción fue diluída en 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , transferida cuantitativamente a una ampolla de decantación y lavada secuencialmente con una solución de  $\text{NaHCO}_3$ (ac) (10,0%; 3 x 3 mL) (*Socram, Goiânia, GO, Brasil*) y agua destilada (1 x 4 mL).



La fase orgánica fue separada, secada por adición de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro) y filtrada por papel. A continuación, se eliminó el solvente por evaporación a vacío, de manera que se obtuvo finalmente un residuo (20 mg, 64,5% de rendimiento de reacción) compuesto por 98,0% de carquejifenol y 2,0% de carquejona de acuerdo a análisis mediante *GC-MS*.

### **Carquejifenol (99,7% de pureza por *GC-MS*), $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$ . (20).**

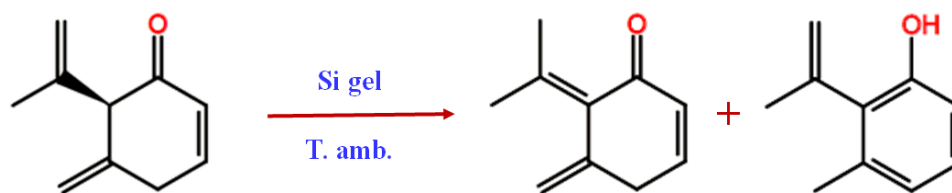
Sólido cristalino incoloro (agujas) de punto de fusión 41-43 °C. **UV (n-hexano):**  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 210 nm (3,04), 279 (1,30). ***EI-MS* (70 eV) (m/z; %):**  $[\text{M}]^+$  148 (75), 133 (61), 115 (19), 105 (100), 103 (17), 91 (20), 79 (14), 77 (27), 65 (7,5), 63 (9,5), 51 (10), 41 (2,0).  **$^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm)\*:** 7,07 [C(F)-H; H-3; triplete, J: 7,8 Hz]; 6,79 [C(F)-H; H-4; doblete amplio, J: 7,8 Hz]; 6,77 [C(F)-H; H-2; doblete amplio, J: 7,8 Hz]; 5,52 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; H-9a; doble cuarteto,  $J_1$ : 2,0 Hz,  $J_2$ : 1,5 Hz); 5,38 (O-H, singulete amplio; la señal desaparece por intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$ ); 5,06 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; H-9b; doble cuarteto,  $J_1$ : 2,0 Hz,  $J_1$ : 1,0 Hz); 2,25 ( $\text{CH}_3\text{-C}$ ; 3H-7; singulete amplio); 2,03 ( $\text{CH}_3\text{-C}$ ; 3H-10; doble doblete,  $J_1$ : 1,5 Hz,  $J_2$ : 1,0 Hz).  **$^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm):** 151,5 [C(F)-O; C-1]; 141,5 (2C-C=C; C-8); 135,8 [C(F)-C; C-5]; 129,4 [C(F)-C; C-6]; 127,8 [C(F)-H; C-3]; 121,8 [C(F)-H; C-2]; 118,2 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; C-9); 112,3 [C(F)-H; C-4]; 23,4 (C- $\text{CH}_3$ ; C-10); 19,3 (C- $\text{CH}_3$ ; C-7). \*Nota: Los carbonos del grupo fenilo se denotan como C(F).

Es de destacar que luego de realizar el aislamiento y los estudios espectroscópicos del carquejifenol, se buscó a dicho compuesto en el aceite esencial de *B. trimera*, encontrándose en una proporción de 0,1% (capítulo 7). Sin embargo, no se puede afirmar con total certeza que el mismo sea un producto natural, ya que se ha reportado que se forma como artefacto mediante la oxidación del carquejol por oxígeno del aire (Naves y Caujolle, 1963).

### **2.8 Isomerización de carquejona a *iso*-carquejona y carquejifenol**

En la sección 2.6 cuando se mencionó la obtención de carquejona no se mencionó el procedimiento de purificación de la misma. Ello es debido a que en las condiciones de cromatografía en columna aplicadas hubo una isomerización de la carquejona al compuesto que en éste caso se denominó *iso*-carquejona y carquejifenol, según el esquema siguiente:





La porción impura de carquejona obtenida en la sección 2.6 (3,40 g) se sembró en la misma columna en que se hizo la purificación del carquejifenol, empleando como fase móvil hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4:1) a un flujo de 2,4 mL/min. Como en los casos anteriores, el seguimiento de la separación fue realizado por *TLC* en las condiciones previamente detalladas, con excepción del revelado que fue efectuado mediante vapores de  $\text{I}_2$ . Finalmente se obtuvieron 29 fracciones de aproximadamente 5 mL cada una. Un concentrado de las fracciones más purificadas en *iso*-carquejona (13-15; 77,0% de pureza; 23,0% de carquejifenol) fue sometido a estudios por RMN.

Es de destacar que la *iso*-carquejona (al igual que la carquejona) se isomerizó en medio ácido (ácido fórmico en benceno) a carquejifenol, en un experimento realizado bajo las mismas condiciones experimentales reportadas anteriormente para la conversión de carquejona a carquejifenol.

#### ***Iso*-carquejona (77,0% de pureza por *GC-MS*; 23,0% carquejifenol), $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}$ . (49)**

Líquido a temperatura ambiente (25°C). **UV (etanol 95%):**  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 219 nm (3,89);  $\lambda_{\text{max}}$  (log  $\epsilon$ ) 280 nm (3,32). ***EI-MS* (70 eV) (m/z; %):**  $[\text{M}]^+$  148 (3,6%), 147 (25,7), 133 (100), 132 (14,3), 131 (53,6), 119 (9,6), 115 (14,3), 107 (21,8), 105 (58,6), 103 (18,2), 91 (41,8), 79 (31,1), 78 (11,4), 77 (37,5), 65 (13,6), 63 (12,5), 53 (8,9), 51 (15,4), 41 (6,4).  **$^1\text{H}$  RMN (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm):** 6,84 (C-CH=C; H-3; doble triplete,  $J_1$ : 9,9 Hz,  $J_2$ : 3,8 Hz); 6,05 (C-CH=C; H-2; doble triplete,  $J_1$ : 9,9 Hz,  $J_2$ : 2,1 Hz); 5,18 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; H-7a; cuarteto, J: 1,5 Hz); 4,81 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; H-7b; cuarteto, J: 1,3 Hz); 3,13 (C- $\text{CH}_2$ -C; 2H-4; multiplete); 2,16 ( $\text{CH}_3$ -C; 3H-9; singulete); 2,01 ( $\text{CH}_3$ -C; 3H-10; singulete).  **$^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ( $\delta$ , ppm):** 191,3 (2C-C=O; C-1); 146,2 (2C-C=C; C-8); 145,4 (C-CH=C; C-3); 141,8 (2C-C=C; C-5); 134,1 (2C-C=C; C-6); 131,2 (C-CH=C; C-2); 115,8 ( $\text{CH}_2=\text{C}$ ; C-7); 36,5 (C- $\text{CH}_2$ -C; C-4); 24,1 ( $\text{CH}_3$ -C; C-9); 22,5 (C- $\text{CH}_3$ ; C-10).

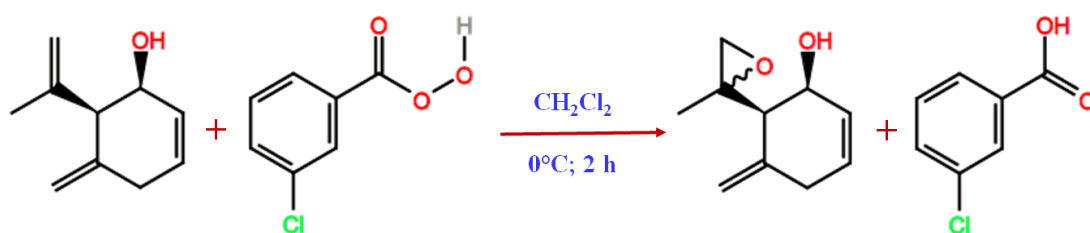
No se encontró *iso*-carquejona en el aceite esencial de *B. trimera*, para lo cual se empleó *GC-MS* en la modalidad *SIM* (monitoreo de iones simples) en las condiciones cromatográficas



reportadas previamente. Los iones empleados en la búsqueda fueron ( $m/z$ ): 77, 91, 105, 131, 133 y 147.

## 2.9 Epoxidación de carquejol

La epoxidación de carquejol se realizó adaptando la técnica detallada por Kočovský (1994). Para ello, se pusieron a reaccionar el alcohol secundario (carquejol) con ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA), de acuerdo a la siguiente reacción (representada para el producto mayoritario 8,9-epoxicarquejol):



Se partió de una porción de 75,7 mg de carquejol puro (0,5 mmoles) obtenido como fue descrito anteriormente, la que se disolvió en un vial mediante 5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Sobre el mismo vial mantenido bajo refrigeración constante de baño de hielo ( $0^\circ\text{C}$ ) fueron adicionadas subsecuentes porciones de *m*-CPBA ( $\leq 77,0\%$ ; *Sigma-Aldrich*): la primera de 103,8 mg (añadido cada 5 minutos durante 1 hora) y dos porciones adicionales de 15,5 mg y 21,2 mg para completar la reacción (masa total de *m*-CPBA agregada: 140,5 mg; 0,8 mmoles). La desaparición del carquejol fue seguida por *TLC* (revelado por medio de vapores de  $\text{I}_2$ ) y por *GC-MS*. El tiempo total de reacción fue de 2 horas.

Luego de completada la reacción, la mezcla resultante se disolvió en 65 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y posteriormente se filtró a un matraz Erlenmeyer limpio y seco. El filtrado fue lavado en ampolla de decantación con una solución 4,0% de  $\text{NaOH}$  (ac.) (2 x 5 mL) y a continuación con agua destilada (2 x 5 mL). La fase orgánica resultante se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro), y posteriormente se evaporó el solvente a vacío hasta sequedad. En las condiciones anteriormente mencionadas se obtuvieron 70,9 mg de una mezcla de epóxidos (88,5% de rendimiento).

Mediante análisis por *GC-MS* se constató la presencia de 7 productos principales de epoxidación, 6 de los cuales presentaron espectros de masa muy parecidos con idéntico pico



base ( $m/z$  91); el compuesto mayoritario se encontró en un 55,5%. Para purificación del mismo se utilizó cromatografía en columna (CC), empleando sílica gel como fase estacionaria (8,40 g) y una mezcla hexano- $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1:1) como fase móvil, con una velocidad de flujo de 0,3 mL/min. El seguimiento de la separación fue realizado mediante *TLC* (con la misma fase móvil que la CC) y revelado por *p*-anisaldehído; y mediante *GC-MS*. En éstas condiciones se recogieron 66 fracciones de 1 mL.

De acuerdo a los análisis por *GC-MS* se reunieron las fracciones más concentradas en el epóxido mayoritario (F<sub>14</sub>-F<sub>28</sub>) (masa: 13,6 mg; pureza 92,0%), la que se sometió a estudios de RMN. También se reunieron las fracciones F<sub>57</sub>-F<sub>66</sub> (masa: 15,0 mg; pureza > 70,0%) y también se estudió por RMN.

### **8,9-epoxicarquejol (92,0% de pureza por *GC-MS*), C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>. (48)**

***EI-MS* (70 eV) ( $m/z$ ; %):** [M-1]<sup>+</sup> 165 (0,3), 151 (3,5), 147 (4,2), 135 (13,2), 133 (20,1), 121 (8,3), 119 (27,4), 117 (14,6), 115 (11,8), 109 (15,3), 108 (12,5), 107 (31,3), 105 (44,1), 103 (11,8), 97 (10,8), 96 (19,1), 95 (33,7), 94 (14,9), 93 (24,3), 92 (31,3), 91 (100), 81 (27,4), 80 (13,5), 79 (76,5), 78 (19,8), 77 (55,9), 69 (16,3), 67 (26,0), 65 (27,8), 63 (7,3), 55 (19,1), 53 (19,4), 51 (17,0), 43 (27,0), 41 (27,0). **<sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ , ppm):** 5,81 (C-CH=C; H-2; multiplete, J<sub>1</sub>: 10,6 Hz, J<sub>2</sub>: 2,2 Hz); 5,70 (C-CH=C; H-3; multiplete, J<sub>1</sub>: 10,6 Hz, J<sub>2</sub>: 1,2 Hz); 5,02 (CH<sub>2</sub>=C; 2H-7; singulete amplio); 4,40 (2CH-O; H-1; singulete amplio); 3,56 (O-H; singulete amplio); 3,43 (C-CH<sub>2</sub>-O; H-9a; doblete; J: 4,5 Hz); 2,98 (2C-CH-C; H-6; doblete, J: 5,0 Hz); 2,78 (C-CH<sub>2</sub>-C; 2H-4; singulete amplio); 2,66 (C-CH<sub>2</sub>-O; H-9b; doblete, J: 4,5 Hz); 1,37 (CH<sub>3</sub>-C; 3H-10; singulete). **<sup>13</sup>C-RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ( $\delta$ , ppm):** 142,3 (2C-C-C; C-5); 131,6 (C-CH=C; C-2); 126,8 (C-CH=C; C-3); 112,8 (CH<sub>2</sub>=C; C-7); 69,4 (2C-CH-O; C-1); 58,8 (3C-C-O; C-8); 53,1 (C-CH<sub>2</sub>-O; C-9); 49,6 (2C-CH-C; C-6); 33,1 (C-CH<sub>2</sub>-C; C-4); 23,1 (C-CH<sub>3</sub>; C-10).

Es de destacar que no se encontraron indicios de la presencia de epóxidos de carquejol en el aceite esencial de *B. trimera*, para lo cual se empleó *GC-MS* en la modalidad *SIM* (monitoreo de iones simples; análisis realizado con energías de ionización de 70 eV y 20 eV) en las condiciones cromatográficas reportadas previamente. Los iones empleados en la búsqueda fueron ( $m/z$ ): 79, 91, 105, 119, 133 y 166.

En el caso de los epóxidos, no se realizó análisis por *eGC-MS*.



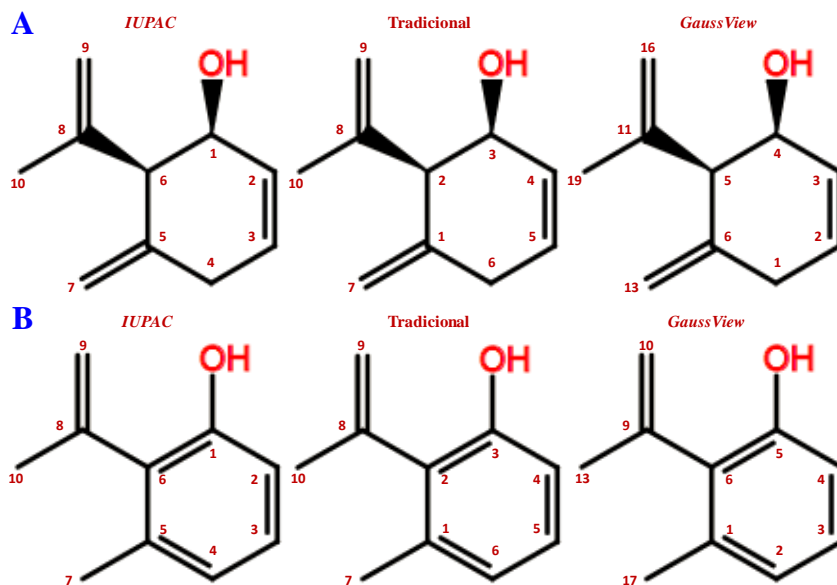
### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Nomenclatura y numeración

En la Química Orgánica es muy importante establecer un sistema de nomenclatura y de numeración para la identificación única e inequívoca de los átomos en las estructuras, y de cada una de las sustancias en el universo de compuestos orgánicos (Carey, 2008). En tal sentido, el sistema *IUPAC* es el más usado, pero existen casos (siendo la Química de Productos Naturales uno de ellos) en que en general se usan los nombres tradicionales y no la nomenclatura sistemática para identificar a los compuestos (Carey, 2008).

Por ello, si bien el nombre *IUPAC* del carquejol es 5-metiliden-6-(2'-prop-1'-enil)-ciclohex-2-en-1-ol, es más conocido por su nombre tradicional. También es nombrado en la literatura como derivado del monoterpeno irregular *orto*-mentano, en cuyo caso su nombre es *cis*-3-hidroxi-*orto*-menta-1(7),4,8-trieno (Snatzke *et al.*, 1969). El producto natural puede ser nombrado tanto (1*S*,6*R*)-5-metiliden-6-(2'-prop-1'-enil)-ciclohex-2-en-1-ol como (2*R*,3*S*)-*cis*-3-hidroxi-*orto*-menta-1(7),4,8-trieno dependiendo del sistema de nomenclatura empleado, y teniendo en cuenta la configuración absoluta de los carbonos quirales (Figura 17A) (Snatzke *et al.*, 1969). Por su parte, el nombre *IUPAC* de la estructura de la Figura 17B es 5-metil-6-(2'-prop-1'-enil)-fenol, aunque en los reportes de la literatura es conocido simplemente como 2-isopropenil-3-metil-fenol (Naves y Caujolle, 1963; Ferretti-Alloise *et al.*, 1970a).

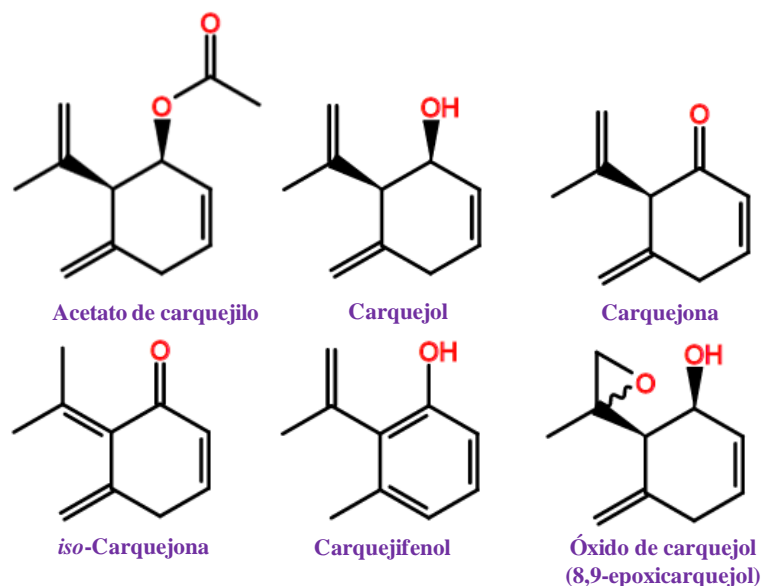
Las numeraciones de ambos sistemas (*IUPAC* y tradicional) se muestran en la Figura 17, en donde además se ilustra la numeración que adoptó el programa de modelado estructural *GaussView*, el que por comodidad será empleado en éste capítulo para discusión de los resultados de análisis computacional (sección 3.3).



**Figura 17:** Numeración para el carquejol en los diferentes sistemas de nomenclatura.

A menos que se especifique lo contrario, en otras secciones de éste capítulo se empleará para el carquejol y sus derivados el sistema *IUPAC* de numeración. A fines de conveniencia, en ésta tesis se seguirá el esquema de Ferretti-Alloise *et al.* (1970a), nombrando a los compuestos como derivados del carquejol según sea su grupo funcional como se representa en la Figura 18. De todos los compuestos que aparecen en dicha figura, el acetato de carquejilo, el carquejol y el carquejifenol fueron identificados en el aceite esencial de *B. trimera* de la población de referencia y de otras poblaciones nativas de Uruguay y del sur de Brasil (capítulo 7).

En la bibliografía se ha reportado que el carquejifenol es un artefacto que se forma mediante oxidación del carquejol por el oxígeno del aire (Naves y Caujolle, 1963). Sin embargo, éste trabajo se usó el antioxidante *BHT* para prevenir la oxidación del aceite esencial de *B. trimera* (capítulo 7), por lo que se considera que el carquejifenol podría también ser un producto natural. Sin embargo, dicha hipótesis no fue validada. Un compuesto fenol éter de estructura similar al carquejifenol (ver compuesto **10** de la Figura 5) se aisló de *P. trinervia*, una especie biosintéticamente muy relacionada a *B. trimera* como fuera anteriormente expresado (Sangaiah y Rao, 1981).



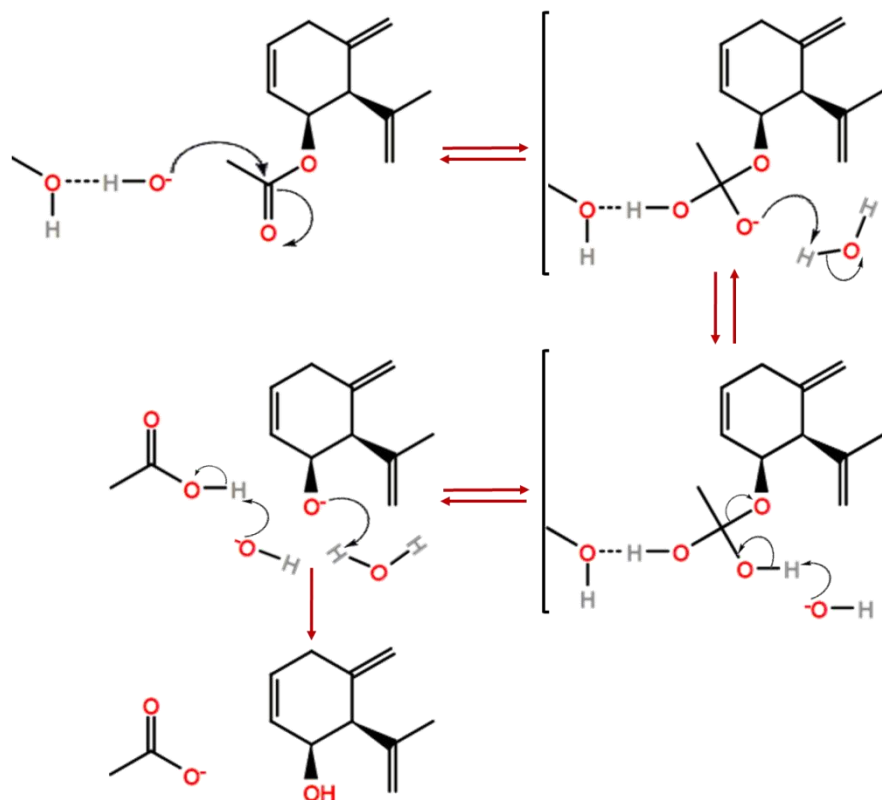
**Figura 18:** Nombres que se darán en ésta tesis a los compuestos obtenidos mediante el enfoque semi-sintético empleado.

### 3.2 Mecanismos involucrados en el esquema semi-sintético propuesto

En ésta sección se discutirán en forma breve los mecanismos que corresponden a cada paso semi-sintético seguido, considerando la reactividad típica de cada grupo funcional.

#### *Saponificación del acetato de carquejilo. Obtención del carquejol.*

El mecanismo de saponificación involucra al ion hidróxido produciendo sustitución nucleófila sobre el grupo acilo, lo cual procede a través de la formación y posterior disociación de un intermediario tetraédrico (Figura 19) (Carey, 2008). La saponificación se suele realizar en medio alcohólico, el cual funciona como un catalizador estabilizando al ion hidróxido mediante puente de hidrógeno previo al ataque nucleofílico y durante la presencia del intermediario tetraédrico (Figura 19) (Theodorou *et al.*, 2007).



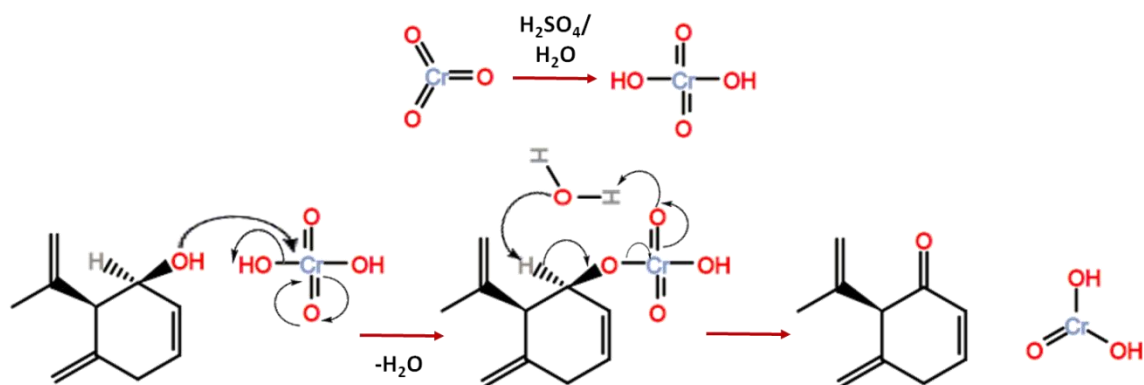
**Figura 19:** Mecanismo de saponificación del acetato de carquejilo con NaOH para dar carquejol en medio metanólico. Obsérvese que se forma un intermediario tetraédrico, y que el metanol actúa como catalizador (estabilizador del nucleófilo). Fuente: Theodorou et al. (2007) y Carey (2008).

Un aspecto relevante de lo anterior es que debido a que el mecanismo procede por sustitución nucleófila sobre el grupo acilo y no por sustitución nucleófila con el carboxilato como grupo saliente, la configuración absoluta de alcoholes ópticamente activos (como es el caso del carquejol) es retenida, garantizando que sea la misma para el acetato y para el alcohol (Thomas, 1967; Carey, 2008).

#### *Oxidación del carquejol. Obtención de la carquejona.*

Una de las técnicas más empleadas para oxidar alcoholes a cetonas es mediante ácido crómico ( $H_2CrO_4$ ), el que se forma *in situ* en el medio de reacción cuando se acidulan sales de Cr (VI) (como el  $CrO_3$  en medio sulfúrico, lo que se conoce como oxidación de Jones) (Pasto y Johnson, 1974; Carey, 2008). Los alcoholes secundarios (como el carquejol) cuando se tratan con el reactivo de Jones se oxidan únicamente a cetonas, generalmente con buenos rendimientos.

El mecanismo que transcurre en la oxidación con  $H_2CrO_4$  se muestra en la Figura 20.



**Figura 20:** Mecanismo de oxidación del carquejol para dar carquejona (reacción de Jones). Fuente: Carey (2008).

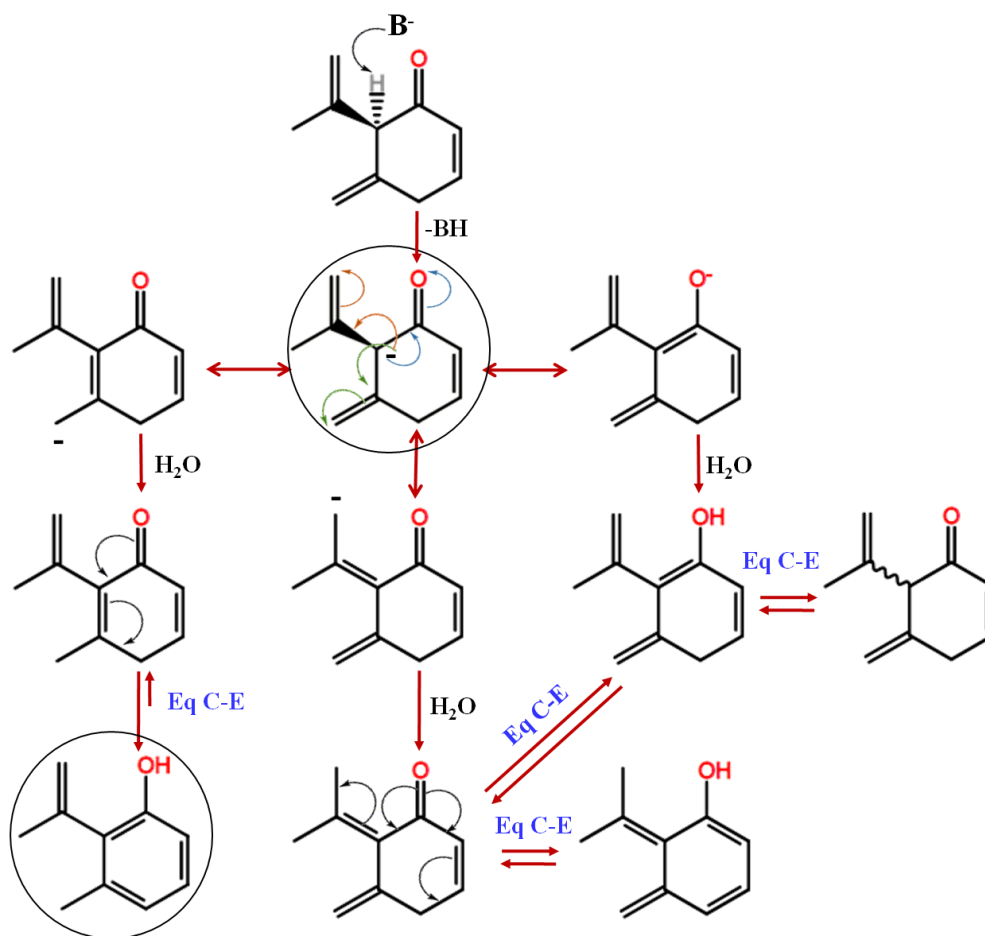
### Isomerización de la carquejona. Obtención del carquejifenol.

En el caso de la carquejona, el equilibrio ceto-enólico deja a la estructura muy próxima a la de un fenol (estabilizada por la formación de un sistema  $\pi$  con 4 enlaces conjugados), según se muestra en el siguiente esquema:



En base a ello, aún en medio básico débil, el protón en posición 6 ( $\alpha$  al grupo carbonilo y a dos dobles enlaces) sería lo suficientemente ácido como para ser abstraído, debido a que la base conjugada se encuentra muy estabilizada por la presencia de tres estructuras resonantes (Figura 21). Cuando las estructuras de los aniones correspondientes se estabilizan por transferencia de un protón desde el agua, la ruta de la izquierda de la Figura 21 conduciría a una estructura quinoide que se estabilizaría al correspondiente fenol (carquejifenol).



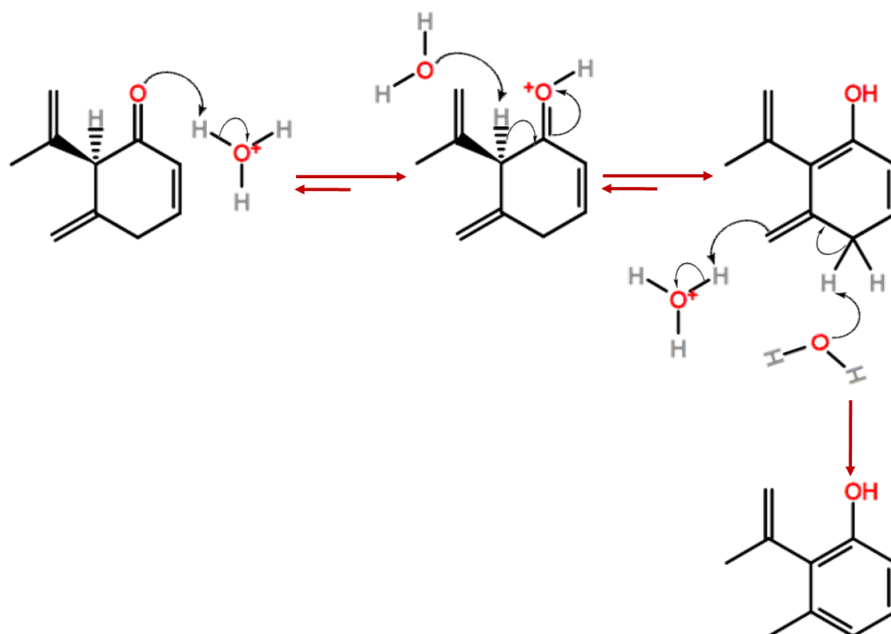


**Figura 21:** Mecanismo propuesto de isomerización de la carquejona a carquejifenol en medio básico. Referencias: B: base; Eq C-E: equilibrio ceto-enólico.

Debido a la gran estabilidad que se produciría como consecuencia de la aromatización, la ruta de la izquierda sería la preferencial, y el equilibrio ceto-enólico que conduce al carquejifenol se encontraría muy desplazado hacia la formación de éste último.

En la ruta de la derecha de la Figura 21 se observa que uno de los posibles productos finales de estabilización en medio básico es la carquejona, pero en éste caso se produciría una racemización en el carbono  $\alpha$  al carbonilo, lo que sería la razón por la cual en la mezcla de reacción se encontraron ambos enantiómeros (99,9% de uno y 0,01% del otro).

Como fue demostrado en condiciones experimentales, la isomerización de carquejona a carquejifenol también ocurre en medio ácido, aunque el mecanismo en éste caso sería diferente (Figura 22).

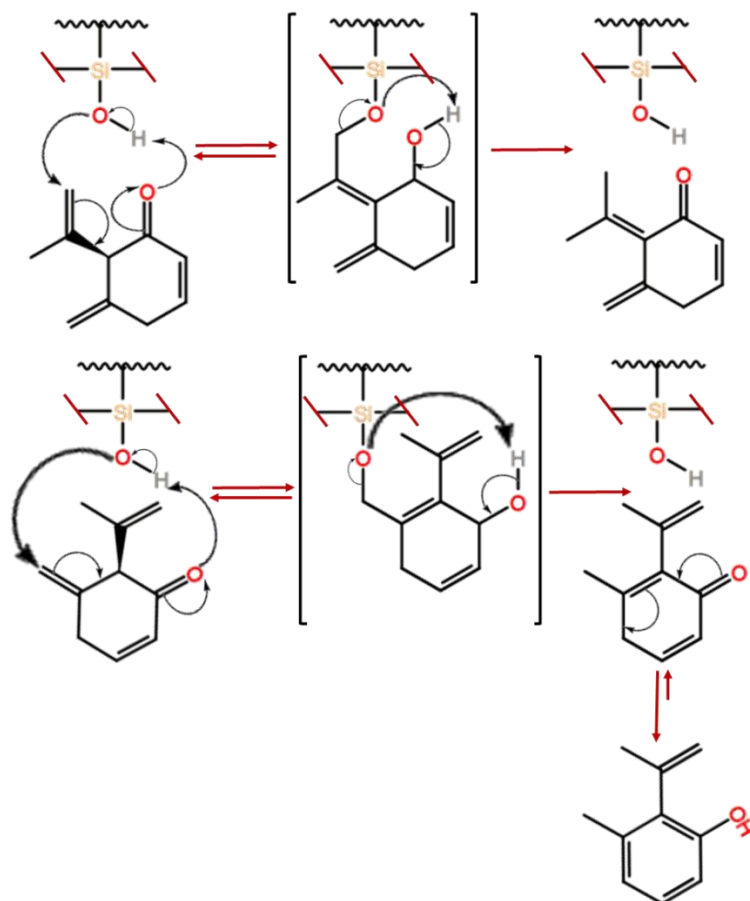


**Figura 22:** Mecanismo propuesto de isomerización de la carquejona a carquejifenol en medio ácido.

#### *Isomerización de la carquejona. Obtención de la iso-carquejona.*

Una importante observación experimental de éste trabajo fue que al intentar realizar la purificación de la carquejona en columna sobre sílica gel, se percibió un apreciable cambio de color en la misma, desde el blanco característico a pardo-amarronado. Finalmente, cuando se recogieron las fracciones se obtuvieron: un isómero de la carquejona (llamado *iso*-carquejona) y carquejifenol, por lo cual ocurrió una isomerización sobre la fase estacionaria.

En base a información disponible en la literatura (**Gallaway y Murray, 1948; Hunter y Brogden, 1963**), se postuló el mecanismo de la Figura 23 en que la sílica actuaría como catalizador para la isomerización, posibilitando un medio para una rápida transferencia de protones.



**Figura 23:** Mecanismo propuesto de isomerización de carquejona a *iso*-carquejona y carquejifenol en la fase estacionaria de sílica gel.

En este mecanismo, los pares electrónicos no compartidos del carbonilo abstraerían un protón de la sílica, tras lo cual el oxígeno deficiente de ésta atacaría al doble enlace del grupo isopropenilo por el lado menos impedido, generándose un intermediario sobre la superficie de la fase estacionaria (Figura 23). En un segundo paso, el oxígeno de la sílica retomarí su protón (regenerando el catalizador) y liberando *iso*-carquejona al medio (Figura 23, parte superior). La reacción opuesta, que consistiría en la substracción del protón por parte de carbonilo de la *iso*-carquejona y el ataque del oxígeno de la sílica al doble enlace  $RR'C=(CH_3)_2$  no sería cinéticamente posible por el impedimento estérico de éste doble enlace y porque el mismo se encuentra mayormente estabilizado por encontrarse tetrasustituído.

Es posible también que la isomerización se produzca sobre el doble enlace exocíclico, ya que el mismo también pertenece al tipo de olefina  $RR'C=CH_2$  (y no se encuentra impedido estéricamente). Sin embargo, dicha isomerización conduciría directamente a una forma quinoide, la que se estabilizaría rápidamente al carquejifenol, y por ello sería éste el producto

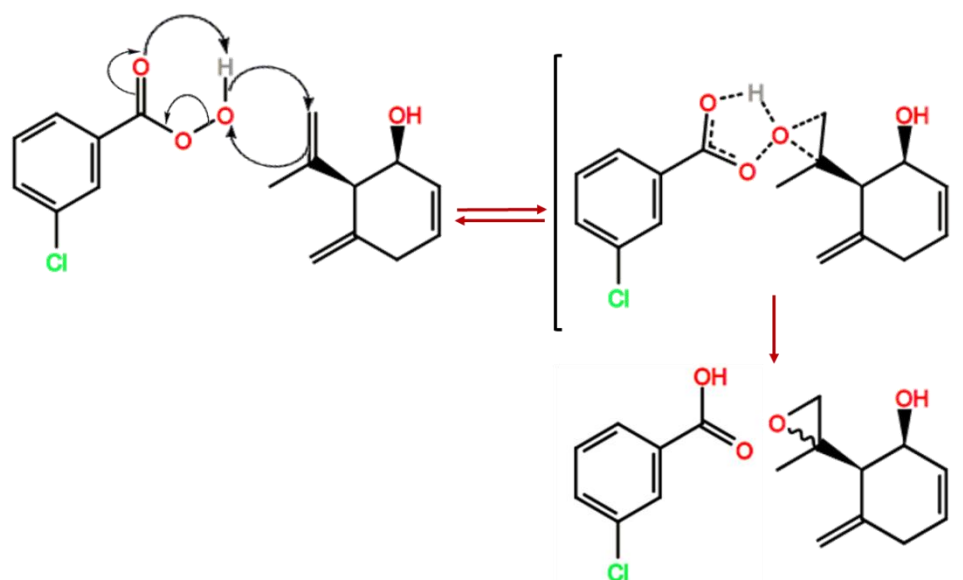


recuperado en condiciones experimentales (Figura 23, parte inferior). El hecho de que la *iso*-carquejona sea el producto mayoritario de isomerización en la sílica puede deberse al impedimento estérico que constituye el grupo isopropenilo para el ataque nucleofílico sobre el enlace exocíclico de la carquejona (Figura 23).

#### *Epoxidación del carquejol. Obtención del óxido de carquejol.*

En general los epóxidos son muy fáciles de preparar por medio de una reacción de un doble enlace con un peroxiácido o peroxisal (llamada epoxidación o reacción de Prilezhaev), por ejemplo con el ácido *m*-cloroperbenzoico (*m*-CPBA) (Fieser y Fieser, 1967; Kočovsky, 1994; Carey, 2008). Una de las características notables de ésta reacción es que es compatible con una amplia variedad de disolventes, aunque generalmente se realiza en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> o CHCl<sub>3</sub> (Fieser y Fieser, 1967; Kočovsky, 1994; Carey, 2008).

A nivel de mecanismo, la Figura 24 muestra las principales características del mismo.



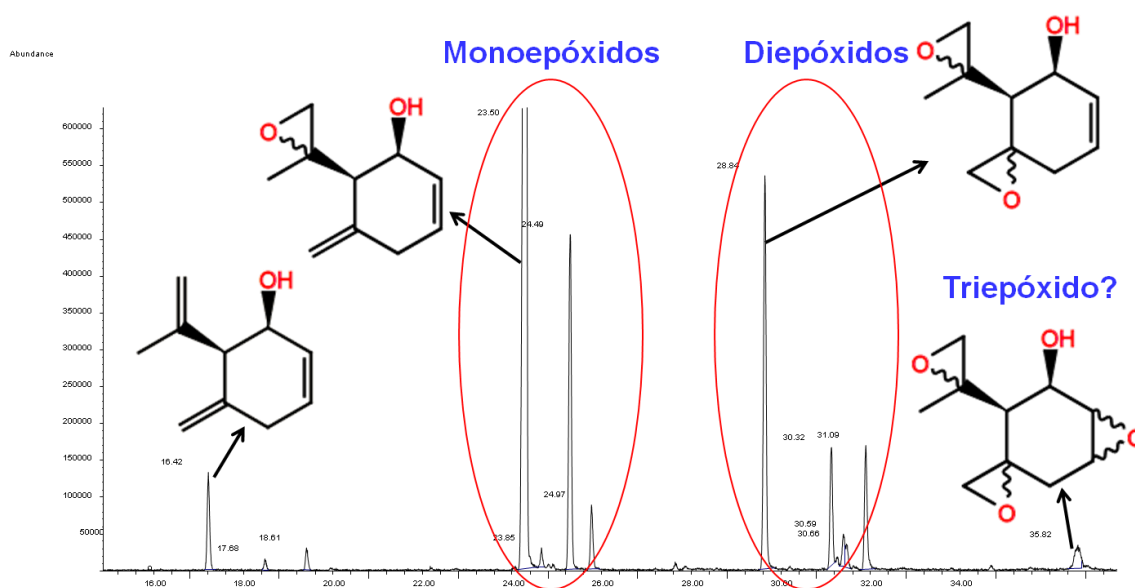
**Figura 24:** Mecanismo de epoxidación del carquejol con *m*-CPBA para dar óxido de carquejol (8,9-epoxycarquejol). Fuente: Carey (2008).

En la Figura 24 se presenta el mecanismo de reacción para el epóxido formado como producto mayoritario de reacción, sin embargo en el análisis mediante *GC-MS* se constató la posible presencia de tres monoepóxidos, tres diepóxidos y el triepóxido, de acuerdo a comparación de espectros de masa (Figuras 25 y 26). Únicamente la estructura del 8,9-epoxycarquejol y tentativamente la del 5,7-8,9-diepoxycarquejol pudieron ser confirmadas por estudios de RMN (ver sección 3.4). El primero se presentó en un 62,0% de la muestra,

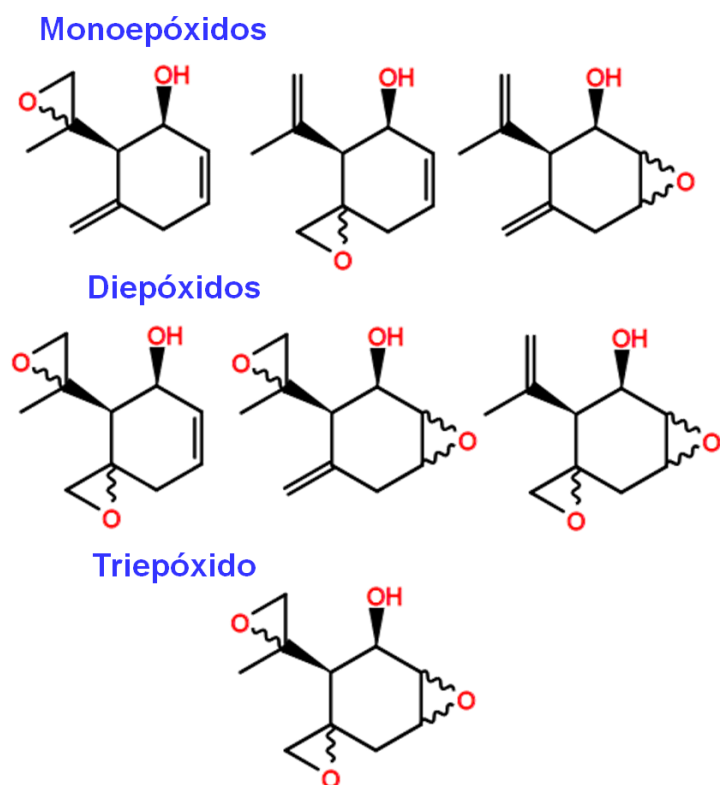


mientras que el segundo lo hizo en un 13,8%; los porcentajes de abundancia de los restantes epóxidos fueron menores al 12,0% (Figura 25).

Lo anterior indicaría que el doble enlace 8,9 resultó ser el más activado para la epoxidación por ataque al *m*-CPBA (coincidentalmente con los resultados del análisis computacional que determinaron un mayor potencial electrostático en dicho enlace; ver sección 3.3). De ésta forma, el carquejol representa un ejemplo interesante de estudio por la competencia para la epoxidación entre tres dobles enlaces disustituídos (dos homoalílicos y uno alílico al hidroxilo).

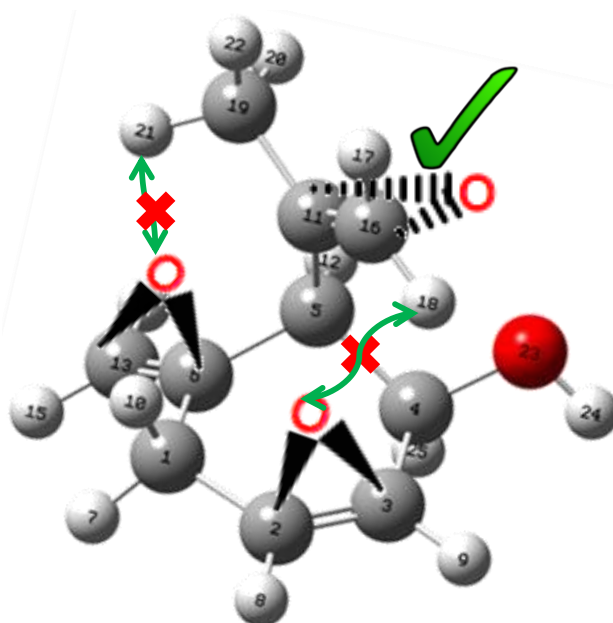


**Figura 25:** Análisis por GC-MS mostrando los productos principales de epoxidación del carquejol mediante ácido *m*-CPBA (mezcla final de reacción). Mediante estudios de RMN se confirmó la presencia del 8,9-epoxicarquejol (óxido de carquejol), mientras que la identificación del 5,7-8,9-diepoxicarquejol fue sólo de carácter tentativo. Se indica en la figura los grupos de monoepóxidos, diepóxidos y posiblemente del triepóxido.



**Figura 26:** Estructuras posibles de los monoepóxidos, diepóxidos y el triepóxido del carquejol, sin consideraciones estereoquímicas en los carbonos quirales del grupo epóxido.

En general las epoxidaciones de alcoholes alílicos y homoalílicos cíclicos son dirigidas por la orientación del grupo hidroxilo, debido a que éste último permite el “anclaje” del peroxiácido mediante enlace de hidrógeno; y de ésta manera el epóxido resultante es *cis* respecto del OH, a menos que haya impedimento estérico (Kočovský, 1994). Debido a ello, la obtención del producto mayoritario 8,9-epoxicarquejol se justifica debido a la posición *cis* del OH y del isopropenilo, a que el enlace C<sub>8</sub>=C<sub>9</sub> en posición homoalílica respecto del hidroxilo es el más expuesto (ver Figura 27), y, por otra parte debido a que dicho enlace es el que tiene la mayor densidad electrónica (ver sección 3.3). Asimismo, por la libre rotación del grupo isopropenilo, las dos posiciones de epoxidación en C<sub>8</sub>=C<sub>9</sub> (C<sub>11</sub>=C<sub>16</sub> en la notación del programa *GaussView* de la Figura 27) serían equivalentes.



**Figura 27:** Modelo molecular mostrando los impedimentos estéricos que se producirían en caso que se formasen los epóxidos en posición *cis* en los dos dobles  $C_2=C_3$  y  $C_6=C_{13}$ . Debido a ello, la posición de epoxidación más favorecida sería la homoalílica  $C_{11}=C_{16}$ . El enantiómero del carquejol representado es el correspondiente producto natural (4R,5S).

Por otra parte, en cuanto a los restantes dobles enlaces, el endocíclico alílico ( $C_2=C_3$ ) fue menos preferido para la epoxidación debido al impedimento estérico (interacciones 1,3-diaxiales en la conformación de silla distorsionada) que produciría el grupo isopropenilo en la cara *cis*, lo que no permitiría una buena aproximación del peroxiácido para la reacción (Figura 27) (Kočovský, 1994). Un argumento semejante se puede formular para el doble enlace homoalílico exocíclico ( $C_6=C_{13}$ ), ya que la posición del voluminoso grupo isopropenilo es cercano espacialmente al mismo (Figura 27) (Kočovský, 1994). Debido a éstos impedimentos estéricos, en el caso de epoxidación en  $C_2=C_3$  y/o en  $C_6=C_{13}$ , sería esperable que el producto tuviera la configuración preferencial *trans* (respecto al anillo) del hidroxilo y de la función epóxido (Kočovský, 1994).

### 3.3 Análisis computacional

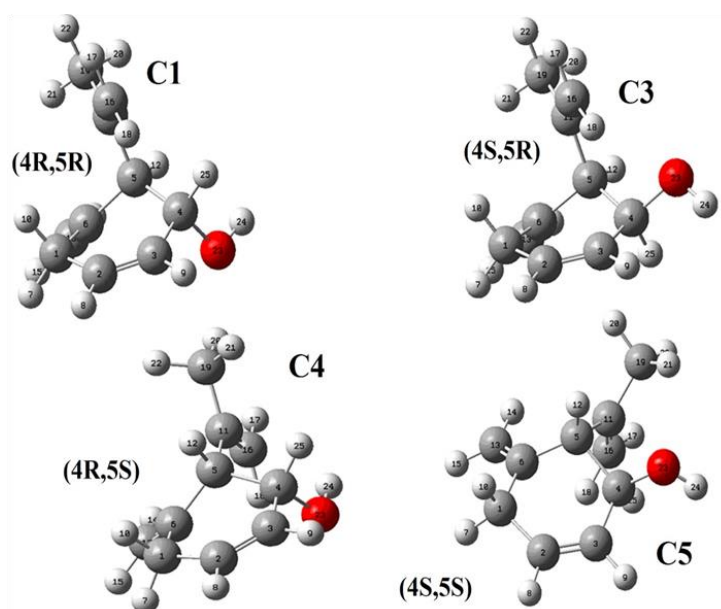
En ésta sección se resumirán los principales resultados obtenidos a través del análisis computacional de las estructuras del carquejol, acetato de carquejilo y carquejifenol. Este análisis permitió la predicción de espectros de RMN, IR, Raman, UV y DC que mostraron muy buena correlación con los resultados experimentales.



Por otra parte, no se presentan resultados para la carquejona, *iso*-carquejona y óxido de carquejol porque los mismos no pudieron ser obtenidos en cantidad, pureza y estabilidad adecuadas para realizar un estudio espectroscópico exhaustivo, lo que impidió la comparación teórico/práctica.

### Carquejol

Existen cuatro posibles diasterómeros para el carquejol dado sus dos centros quirales (numeración del programa *GaussView*): (4*R*,5*R*), (4*S*,5*R*), (4*R*,5*S*) y (4*S*,5*S*), las que serán nombradas respectivamente como C1, C3, C4 y C5 (Figura 28).



**Figura 28:** Numeración atómica y estructuras de los diasterómeros del carquejol.

Tanto C1/C5 como C3/C4 son pares enantioméricos, en tanto el producto natural enantioméricamente puro corresponde a la estructura C3 (2*R*,3*S* en el sistema de numeración tradicional; 1*S*,6*R* en el de la *IUPAC*; o 4*S*,5*R* en la numeración del programa *GaussView*; Figura 28), lo que fue establecido previamente por el trabajo de Thomas (1967) y Snatzke *et al.* (1969).

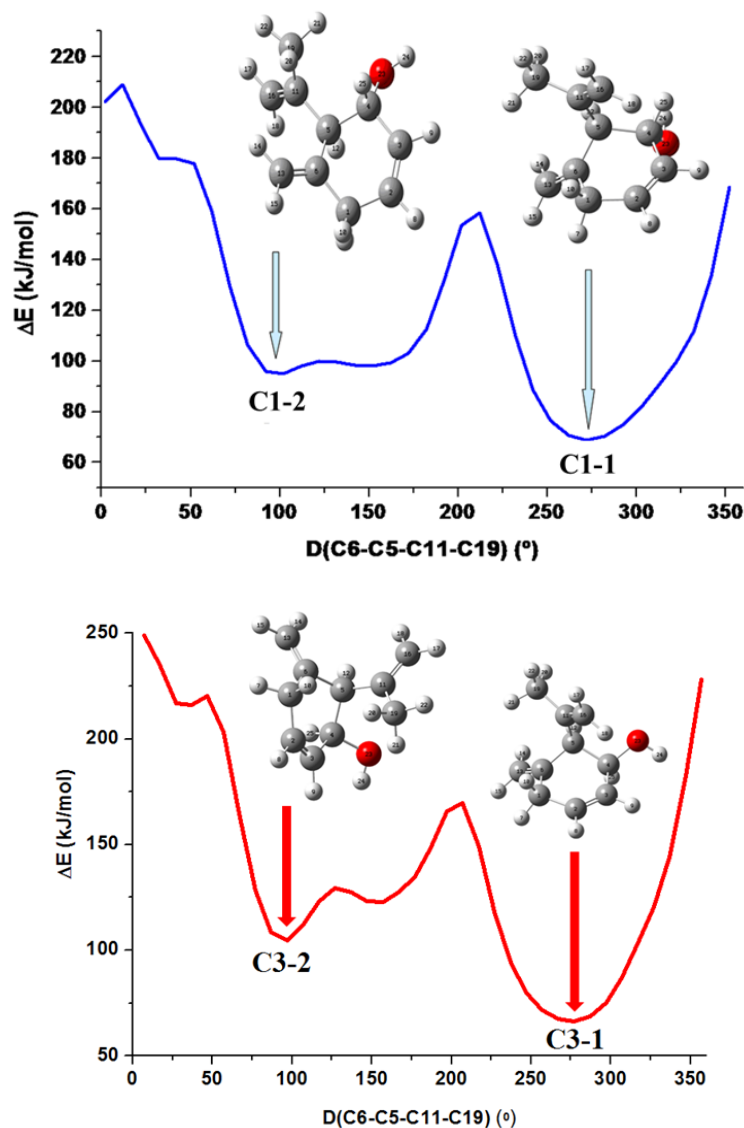
En un ambiente no quiral, los enantiómeros tienen idénticas propiedades fisicoquímicas y únicamente se diferencian por el hecho de que ambos desvían el plano de la luz polarizada con el mismo ángulo pero en sentidos opuestos, por lo que fue suficiente para el análisis





computacional sólo considerar a los diastereómeros C1 y C3, ya que son energéticamente iguales a C5 y C4, respectivamente.

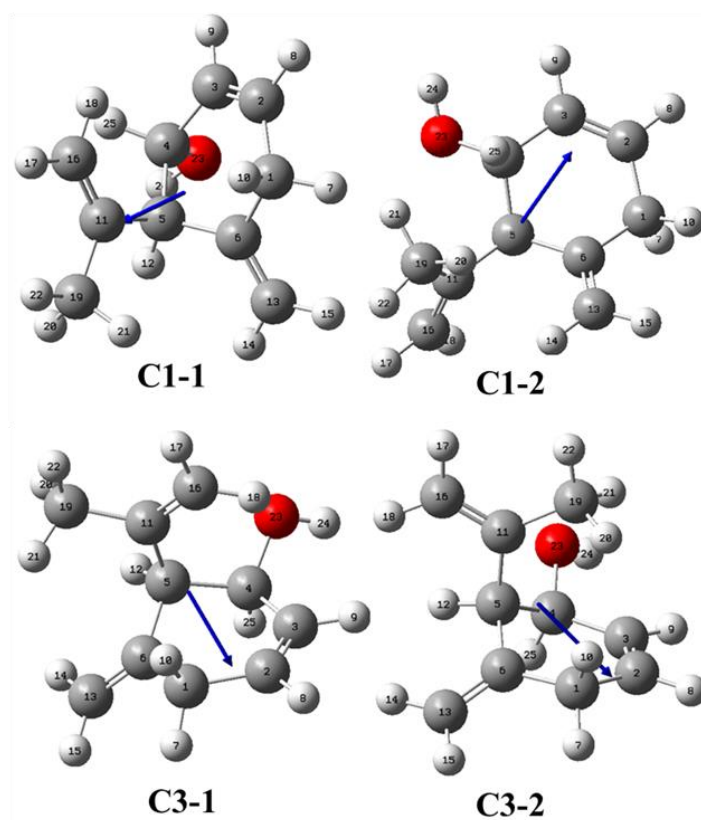
En la Figura 29 se muestran las curvas de energía potencial descritas por los ángulos diedros C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> obtenidas mediante cálculo computacional para los diastereómeros C1 y C3 del carquejol. Estas curvas son de utilidad para entender cuáles conformeros y geometrías son los más estables para una estructura molecular dada, lo que influye en cuáles se encontrarán en mayores poblaciones en un medio dado y serán los que participarán mayormente de una reacción química (Carey, 2008; Ortolan, 2014). Tanto para el diastereómero C1 como para el C3 (producto natural), los mínimos de energía potencial se establecen con un valor de ángulo diedro de 90° (conformeros C1-2 y C3-2) y de 275° (conformeros C1-1 y C3-1) (Figura 29).



**Figura 29:** Curvas de energía potencial descritas por el ángulo diedro C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>11</sub>-C<sub>19</sub> para las estructuras (4R,5R) y (4S,5R) del carquejol, nombradas respectivamente como C1 y C3. Para su cálculo se empleó el nivel de teoría B3LYP/6-31G\*.



En la Figura 30 se muestran con mayor detalle los conforméromos más estables del carquejol (determinados por los mínimos que se muestran en la Figura 29) con sus respectivos vectores de momento dipolar resultante ( $\mu$ ).



**Figura 30:** Conforméromos más estables del carquejol: (4R,5R: C1-1 y C1-2) y (4S,5R: C3-1 y C3-2) y momentos dipolares resultantes (flechas azules) calculados en fase gaseosa empleando el nivel teórico B3LYP/6-31G\*.

En la Tabla 1 se presentan los valores de energía total y relativa, el valor del momento dipolar y los valores de las poblaciones calculados para los cuatro conforméromos más estables del carquejol (Figura 30) en fase gaseosa, en solución acuosa y en *n*-hexano. Dicha tabla fue construida en base a los dos niveles de teoría empleados (B3LYP/6-31G\* y B3LYP/6-311++G\*\*).



Funcional B3LYP/6-31G*/fase gaseosa					
Configuración	Confórmero	<i>E</i> (Hartrees)	$\Delta E$ (kJ/mol)	$\mu$ (Debye)	Población%
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-1	-464,6431	0,00	1,39	49,30
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-2	-464,6430	-0,26	1,84	44,44
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-1	-464,6405	-6,82	1,59	3,13
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-2	-464,6395	-6,82	2,00	3,13
Funcional B3LYP/6-31G*/solución acuosa					
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-1	-464,6513	0,00	2,08	39,43
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-2	-464,6509	-1,05	2,70	25,63
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-1	-464,6483	-0,34	2,31	34,30
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-2	-464,6474	-10,23	2,87	0,64
Funcional B3LYP/6-31G*/n-hexano					
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-1	-464,6536	0,00	1,56	51,65
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-2	-464,6535	-0,26	2,09	46,49
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-1	-464,6485	-9,97	1,91	0,93
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-2	-464,6498	-9,97	2,26	0,93
Funcional B3LYP/6-311++G**/fase gaseosa					
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-1	-464,7836	0,00	1,61	49,72
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i> )	C1-2	-464,7834	-0,52	1,88	40,28
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-1	-464,7787	-4,18	1,70	9,20
(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )	C3-2	-464,7797	-10,23	1,97	0,80

**Tabla 1:** Energía total (*E*) y relativa ( $\Delta E$ ), momento dipolar ( $\mu$ ) y valores de poblaciones calculados para los confórmeros más estables del carquejol en fase gaseosa, solución acuosa y en n-hexano.

Los resultados teóricos muestran claramente que el confórmero C1-1 es el más estable (menor energía *E*) independientemente del medio, y por ello, presenta los mayores valores de población en todos los casos (Tabla 1).

En la determinación de la configuración absoluta del producto natural (4*S*,5*R*), los grupos hidroxilo e isopropenilo fueron reportados con una configuración *cis* entre ellos (Snatzke *et al.*, 1969). Dicha configuración corresponde al diasterómero C3, mientras que el confórmero más estable determinado por cálculos teóricos en éste trabajo fue el C1-1 (seguido por el C1-2) con una configuración (4*R*,5*R*) (con ambos grupos en posición *trans* respecto del anillo, y sometido a menor impedimento estérico). En todos los casos, los confórmeros de C3 presentaron las mayores energías relativas y absolutas, y como consecuencia, las menores poblaciones (Tabla 1). Las diferencias podrían deberse a que Snatzke *et al.* (1969)

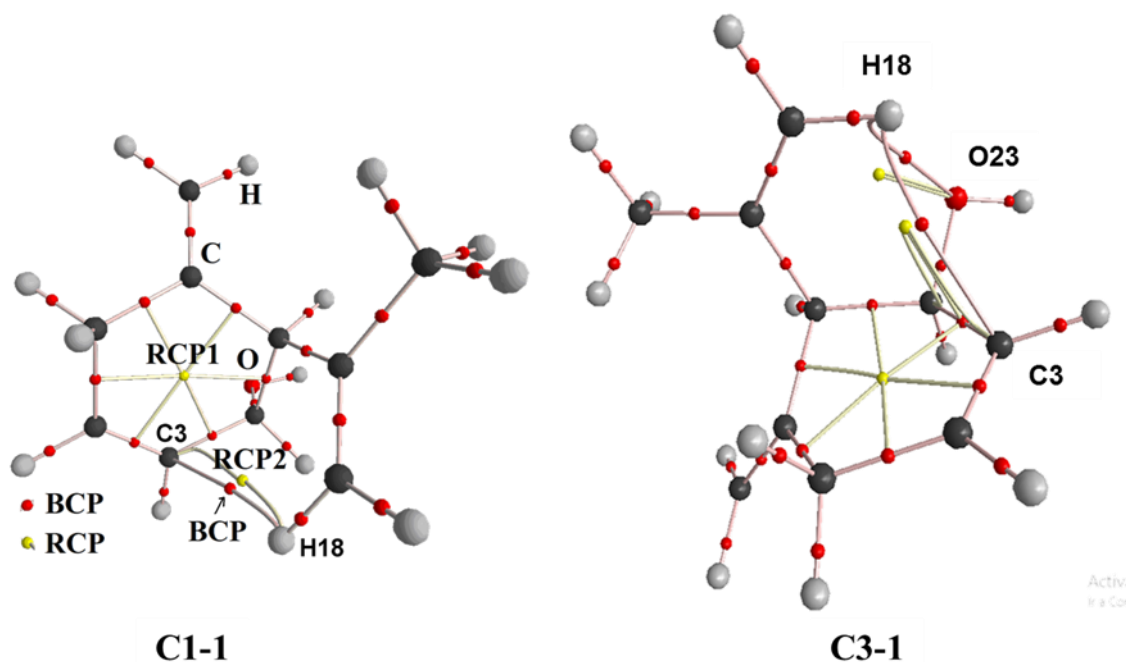


determinaron la configuración absoluta en fase sólida, aspecto no evaluado en éste trabajo por medio de análisis computacional.

Por otra parte, cuando se compararon los momentos dipolares de los conformeros C1-1, C1-2, C3-1 y C3-2 en fase gaseosa (empleando el nivel teórico B3LYP/6-31G\*), se observó que la magnitud, dirección y orientación de los vectores fueron diferentes para todos los conformeros (Figura 30 y Tabla 1). El valor y orientación del momento dipolar determinado para los dos conformeros C3, así como la posibilidad de interacciones intermoleculares e intramoleculares podría justificar por qué éste diastereómero es el observado en fase sólida, como ya ha sido reportado para otros tipos de compuestos (**Romano et al., 2011; Romano et al., 2013**). Asimismo, la diferencia en los momentos dipolares constatada (que es basada en una distribución diferencial de cargas atómicas en las estructuras) podría tener influencia sobre las propiedades electrónicas y las reactividades de los conformeros del carquejol en los diferentes medios.

En la Figura 31 se muestra el diagrama de puntos críticos de enlace (*BCP*) que representa todos los enlaces e interacciones intermoleculares presentes en una estructura, el que fue calculado por medio del programa AIM2000 (**Bader, 1990; Biegler-König et al., 2001**). Para el conformero C1-1 se constató una única interacción no covalente entre el C<sub>3</sub>---H<sub>18</sub>, mientras que para el C3-1, se obtuvieron dos interacciones: O<sub>23</sub>---H<sub>18</sub> (enlace de hidrógeno) y C<sub>3</sub>---H<sub>18</sub> (Figura 31).

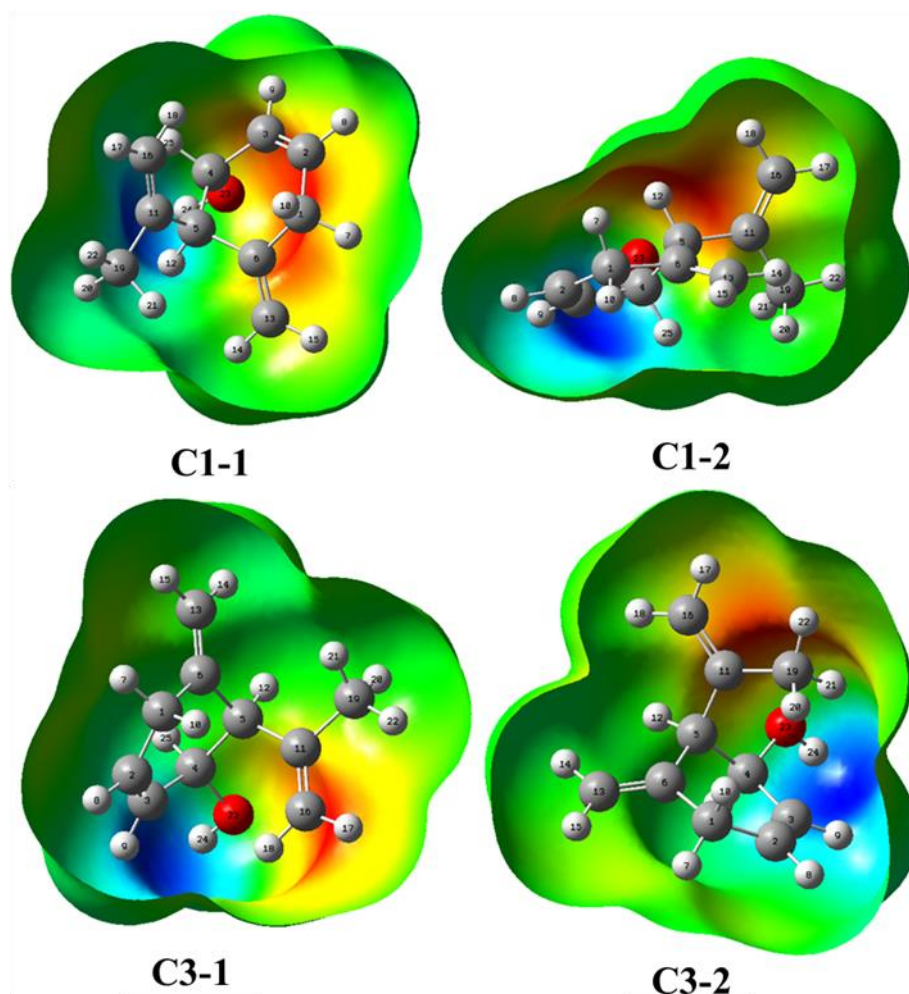
En la misma Figura 31, también se presenta el cálculo de los puntos críticos de anillo (*RCPs*; aquellas porciones del espacio molecular en donde es factible la formación de un anillo debido a los enlaces covalentes e interacciones intramoleculares no covalentes). Para el caso del conformero C1-1 se observaron sólo dos anillos (puntos amarillos; uno de ellos corresponde al ciclohexeno), mientras que en para el caso del C3-1 se constataron tres de ellos debido a que presenta una interacción molecular más que C1-1 (Figura 31).



**Figura 31:** Detalles de modelo molecular para los conformeros C1-1 y C3-1 del carquejol en fase gaseosa mostrando la geometría de todos los puntos críticos de enlace (BCPs; puntos rojos) y de los puntos críticos de anillo (RCPs; puntos amarillos) con el nivel de teoría B3LYP/6-31G\*. Se observan las interacciones intramoleculares no covalentes  $C_3\cdots H_{18}$  para C1-1, y  $O_{23}\cdots H_{18}$  y  $C_3\cdots H_{18}$  para C3-1.

Lo anterior está relacionado con la estabilidad de las estructuras, debido a que cuanto mayor es el número de interacciones y de anillos que se puedan formar, la geometría molecular es más estable (Bader, 1990; Biegler-König *et al.*, 2001). Esto explicaría la razón por la cual C3-1 es el conformero determinado experimentalmente en fase sólida previamente por Snatzke y colaboradores, y no el C1-1 como sería de esperar como resultado del análisis computacional en fase gaseosa y fase acuosa (Tabla 1) (Snatzke *et al.*, 1969).

La actividad biológica de las sustancias terpénicas está determinada en buena medida por los motivos estructurales asociados a la hidrofobicidad y a los sitios hidrofílicos de dichas especies (Urzúa *et al.*, 2008). Por ello, la identificación de los posibles sitios de reacción del carquejol es de interés debido a su potencial farmacológico y toxicológico reportado (ver sección 1.4) (Caujolle *et al.*, 1960a y 1960b; Naves y Caujolle 1963). Una forma de evaluar dichos sitios es a través de los mapas de superficie de potencial electrostático molecular (MEP). En la Figura 32 se presentan dichos mapas para los cuatro conformeros del carquejol.



**Figura 32:** Mapas de superficie de potencial electrostático molecular (MEP) calculados para los conformeros C1-1, C2-1, C3-1 y C3-2 del carquejol en fase gaseosa. Rango de colores: desde rojo  $-0.056$  a azul  $+0.056$ . Teoría: B3LYP/6-31G\*. Valor de iso-densidad: 0.005.

Se observa la coloración típica roja y azul de aquellos sitios nucleófilos y electrófilos, respectivamente. De ésta manera, los dos principales sitios de reacción fueron claramente definidos sobre el grupo hidroxilo (independientemente del conformero): oxígeno (nucleófilo) e hidrógeno (electrófilo). Esto determina que sea razonable que en la obtención de la carquejona por oxidación de Jones, sea el hidroxilo quien ataca nucleofílicamente al Cr (VI) para formar el éster de cromilo (sección 3.2).

Por otra parte, no hubo prácticamente diferencias entre los *MEPs* generados para cada uno de los conformeros (Figura 32). Coincidentemente, los valores atómicos de potenciales electrostáticos (calculados mediante las cargas de Merz-Kollman) demostraron que el átomo con mayor densidad electrónica fue el oxígeno (lo cual es razonable en base a su valor de electronegatividad), seguido por los carbonos C<sub>13</sub> y C<sub>16</sub> de los grupos metilidenos (=CH<sub>2</sub>). Debido a ésta mayor densidad electrónica sobre C<sub>13</sub> y C<sub>16</sub> (y consecuentemente sobre los



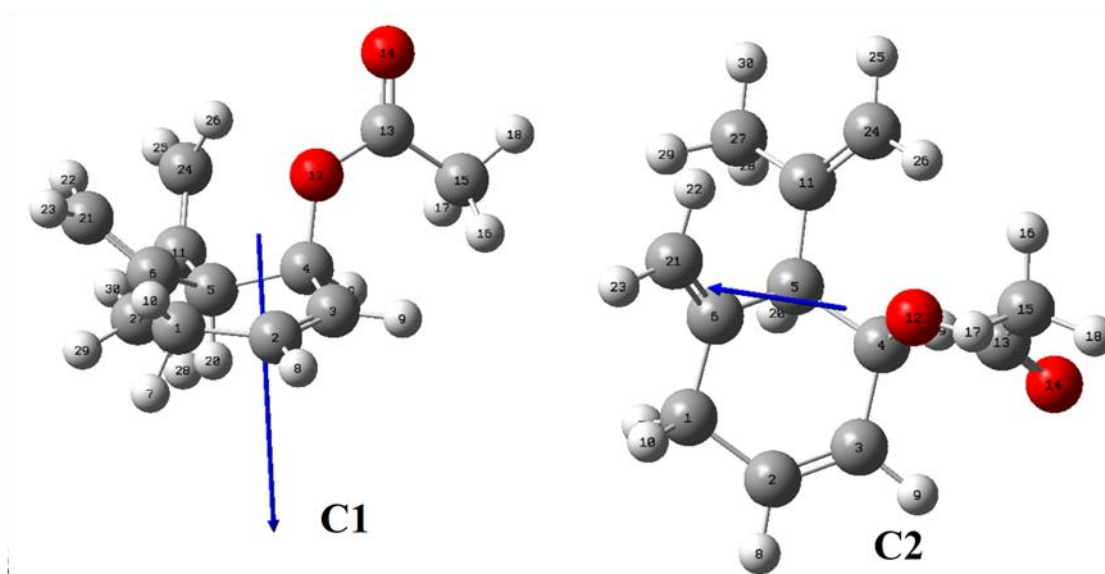
dobles enlaces  $C_{11}=C_{16}$  y  $C_6=C_{13}$ ) fue que la epoxidación se efectuó preferencialmente en dichas posiciones en detrimento del enlace  $C_2=C_3$  (sección 3.2).

A su vez, y como era de esperar, el carbono con menor densidad electrónica fue el  $C_4$  que se encuentra directamente unido al oxígeno. En el mismo orden, el protón del grupo hidroxilo presentó el menor potencial electrostático constatado (debido a la fuerte electronegatividad del oxígeno vecino), lo que significa que es el átomo más lábil, y más fácilmente removible. Todo lo mencionado anteriormente tiene directa consecuencia sobre los desplazamientos químicos de dichos núcleos en los experimentos de RMN, como se verá más adelante.

Mediante el cálculo de orbitales de frontera (ver anexo) se observó que el carquejol posee una baja reactividad comparado con otros compuestos con reconocida actividad biológica. Sin embargo, la nucleofilia del mismo es comparable a otros terpenos con actividad antimicrobiana y antiviral (lactonas sesquiterpénicas cnicina y onopordopicrina) (**Bach et al., 2011**), por lo que dicho parámetro podría estar relacionado con las propiedades biológicas descritas para el carquejol.

### *Acetato de carquejilo*

Debido a que la diferencia estructural entre el carquejol y el acetato de carquejilo es simplemente un grupo acetato, y, dado que la configuración absoluta no cambia como consecuencia de la reacción de saponificación (ver sección 3.2), se tomó en cuenta el diastereómero que constituye el producto natural ( $4S,5R$ ; configuración *cis* de los sustituyentes) para el modelado mediante el programa *GaussView* (ver Figura 28). La optimización de los mínimos de energía potencial en medio gaseoso y en solución permitió identificar dos conformeros más estables (nombrados C1 y C2; Figura 33), siendo C2 el que presentó los mínimos globales en ambos medios.



**Figura 33:** Conforméros más estables del (4S,5R)-acetato de carquejilo (C1 y C2) y sus vectores de momento dipolar resultante (flechas azules) en fase gaseosa empleando el nivel teórico B3LYP/6-31G\*. Obsérvese que los grupos acetato e isopropenilo se encuentran en posición cis uno respecto del otro, de acuerdo a la constitución del producto natural (Snatzke et al., 1969).

En la Tabla 2 se presentan los valores calculados de energías totales y relativas, momento dipolar ( $\mu$ ), y valores de poblaciones de los cofórmeros más estables del acetato de carquejilo (C1 y C2) en ambos medios con ambos niveles de teoría.

Funcional B3LYP/6-31G* /fase gaseosa				
Confórmero	$E$ (Hartrees)	$\Delta E$ (kJ/mol)	$\mu$ (Debye)	Población%
C1	-617,2998	34,88	4,6126	0,0
C2	-617,3131	0,0	2,0248	100
Funcional B3LYP/6-31G*/solución acuosa				
C1	-617,3110	23,87	6,3618	0,0
C2	-617,3201	0,0	2,6987	100
Funcional B3LYP/6-311++G**/fase gaseosa				
C1	-617,4757	33,57	2,3281	0,0
C2	-617,4885	0,0	2,3277	100
Funcional B3LYP/6-311++G**/solución acuosa				
C1	-617,4892	20,46	7,1750	0,0
C2	-617,4970	0,0	3,2665	100

**Tabla 2:** Energía total ( $E$ ) y relativa ( $\Delta E$ ), momento dipolar ( $\mu$ ) y valores de población calculados para los conforméros más estables C1 y C2 del acetato de carquejilo en fase gaseosa y solución acuosa.

Los resultados del cálculo con los dos funcionales mostraron que el conformero C2 es el más estable tanto en fase gaseosa como en solución acuosa, con valores de poblaciones de 100% (Tabla 2). Debido a esto, probablemente sólo C2 se encuentre realmente presente en ambos medios.

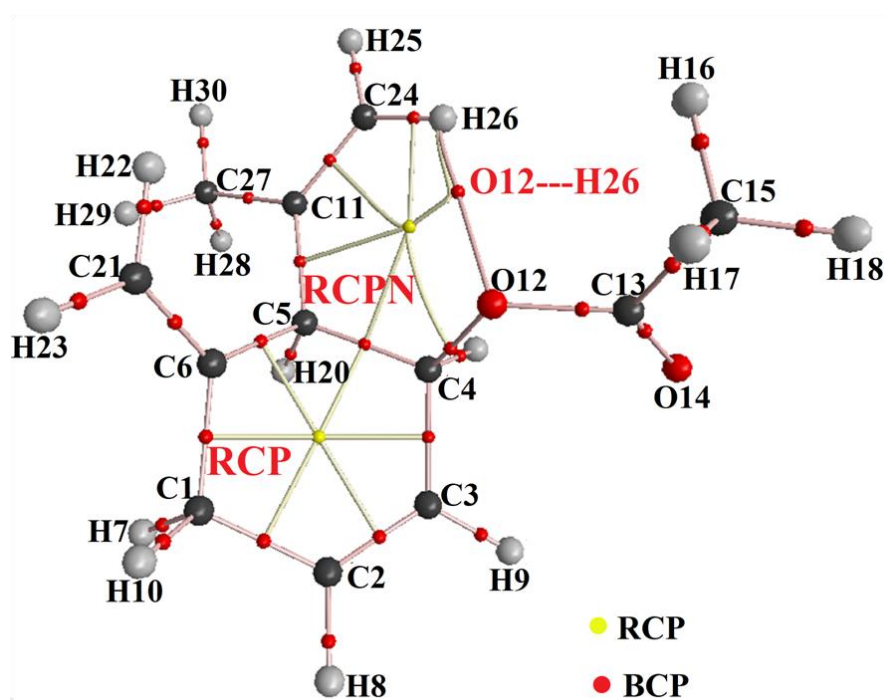




Un aspecto adicional es que los valores de energía total calculados para los conformeros del acetato de carquejilo fueron menores que los correspondientes al carquejol (-617,3131 hartrees para el acetato y -464,6431 hartrees para el carquejol; comparación de los conformeros más estables en fase gaseosa con el mismo nivel de teoría), lo que indica que el acetato es una molécula con mayor estabilidad que su alcohol (ver Tablas 1 y 2).

Como puede verse en la Figura 33, los vectores de  $\mu$  de ambos conformeros del acetato de carquejilo presentaron diferente magnitud, dirección y orientación. Posiblemente, la dirección del vector  $\mu$  de C1 perpendicular al anillo genere inestabilidad en la estructura del mismo comparado con C2, cuyo vector  $\mu$  es prácticamente paralelo al anillo (Figura 33).

En la Figura 34 se presenta el diagrama de puntos críticos de enlace (BCP) y puntos críticos de anillo (RCP) para el conformero C2. Se observa que es posible la formación de un enlace de hidrógeno  $O_{12}---H_{26}$ , el que permite la formación de un nuevo anillo en la estructura (nombrado como RCPN en la Figura 34). El mismo tipo de interacción fue anteriormente predicha para el conformero C3-1 del carquejol (Figura 31). La posibilidad de establecer dicho tipo de enlace intermolecular estaría relacionado con la alta estabilidad de la estructura del conformero C2 y su dominancia en las poblaciones (Tabla 2).



**Figura 34:** Detalles de modelo molecular para el conformero C2 del acetato de carquejilo en fase gaseosa, mostrando la geometría de todos los puntos críticos de enlace (BCPs; puntos rojos) y de los puntos críticos de anillo (RCPs; puntos amarillos) con el nivel de teoría B3LYP/6-31G\*. Se observa la interacción intramolecular no covalente  $O_{12}---H_{26}$  (enlace de hidrógeno) y el correspondiente anillo generado (RCPN).



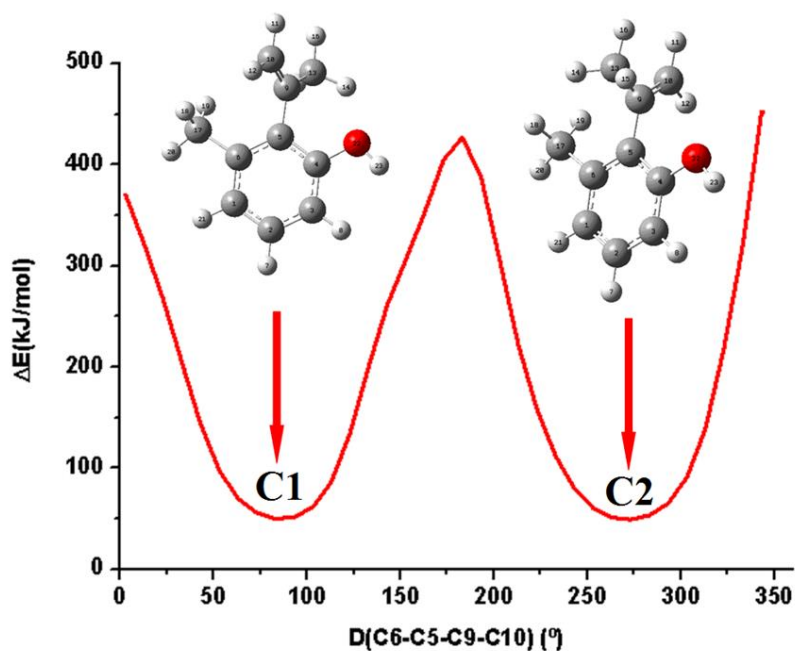
Por otra parte, el enlace O<sub>12</sub>--H<sub>26</sub> en el confórmero C2 del acetato de carquejilo presentó en el análisis computacional una densidad electrónica superior al del mismo enlace en el confórmero C3-1 del carquejol (resultados no mostrados). La contribución electrónica adicional en éste caso estaría dada por la presencia del grupo acetato, siendo una razón adicional para la mayor estabilidad del acetato de carquejilo respecto del carquejol.

Alineado a lo anterior, mediante el cálculo de orbitales de frontera (ver anexo) se constató que el acetato de carquejilo posee menor reactividad (mayor estabilidad) que el carquejol y que otros compuestos bioactivos con reconocida actividad biológica. Todo ello justificaría la presencia del primero como compuesto mayoritario en el aceite esencial de *B. trimera* (capítulo 7).

Detalles adicionales de cálculos computacionales para el acetato de carquejilo se suministran en la sección anexo con el correspondiente artículo científico.

### *Carquejifenol*

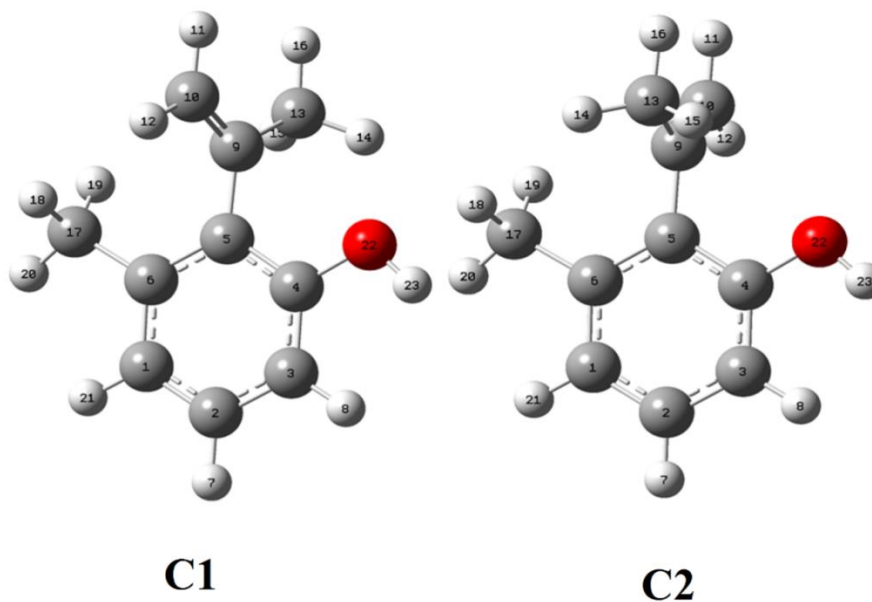
Una gran diferencia estructural entre el carquejifenol y el carquejol es que el primero no presenta centros quirales, por lo cual no presenta enantiómeros. Por otra parte, de acuerdo a la geometría de la molécula, el anillo bencénico y el grupo hidroxilo se encuentran en el mismo plano (Figura 35). En ésta Figura se presentan las curvas de energía potencial y los confórmeros más estables obtenidos mediante análisis computacional basado en el ángulo diedro C<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>-C<sub>9</sub>-C<sub>10</sub> del carquejifenol. Al igual que en el caso del carquejol, los mínimos fueron determinados a valores de 90° y 270°, pero en éste caso ambos presentan la misma magnitud en energía y la curva se caracteriza por un patrón regular (comparar las Figuras 29 y 35).



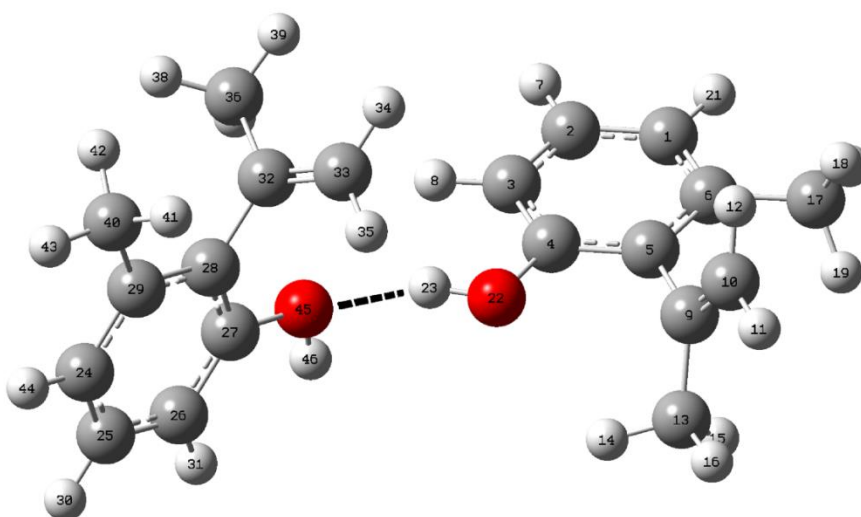
**Figura 35:** Curvas de energía potencial descriptas para el ángulo diedro  $C_6-C_5-C_9-C_{10}$  para el carquejifinol, y sus conformeros más estables C1 y C2. Para su cálculo se empleó el nivel de teoría B3LYP/6-31G\*.

En la Figura 36 se presenta en detalle la estructura de los conformeros más estables del carquejifinol. Como surge de la Figura 35, ambos conformeros tienen la misma energía potencial, y como consecuencia, las mismas propiedades químicas.

Debido a la falta de correlación entre las asignaciones de las frecuencias de vibración del carquejifinol correspondientes en los espectros Raman e IR (ver sección 3.6 y anexo), se propuso la existencia de una especie dimérica en fase sólida para explicar dichas frecuencias anómalas. Los fenoles en general son considerados fuertes dadores y aceptores de enlace de hidrógeno, por lo cual la existencia de la especie dimérica es razonable (Carey, 2008; Jelsch y Bisseyou, 2017). En la Figura 37 se presenta la estructura del dímero construida mediante el programa *GaussView*.



**Figura 36:** Detalle de los conformeros más estables C1 y C2 del carquejifenol.



**Figura 37:** Estructura del dímero de carquejifenol propuesto en éste trabajo, formado por enlace de hidrógeno intermolecular.

En la Tabla 3 se muestran las energías totales y relativas, y los momentos dipolares en fase gaseosa y solución acuosa para la estructura más estable del carquejifenol, empleando ambos funcionales de base de cálculo.



Funcional B3LYP/6-31G*			
Parámetro	Fase gaseosa	Solución acuosa	$\Delta E$ (kJ/mol)
E (Hartrees)	-463,4930	-463,4997	-15,57
$\mu$ (Debye)	1,27	1,77	

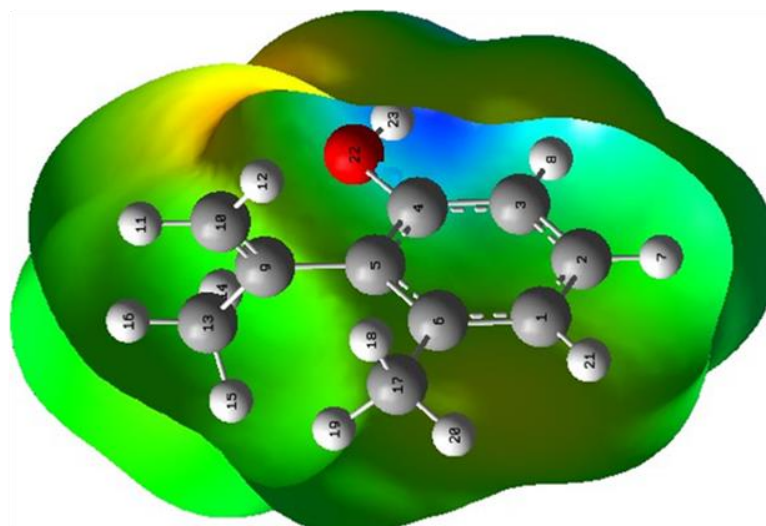
Funcional B3LYP/6-311++G*			
Parámetro	Fase gaseosa	Solución acuosa	$\Delta E$ (kJ/mol)
E (Hartrees)	-463,6263	-463,6340	-20,20
$\mu$ (Debye)	1,13	1,69	

**Tabla 3:** Energía total ( $E$ ) y relativa ( $\Delta E$ ) y momento dipolar ( $\mu$ ) calculados para el carquejifenol en fase gaseosa y solución acuosa usando dos niveles de teoría.

Las diferencias observadas en la Tabla 3 para el momento dipolar entre la fase gaseosa y la solución acuosa son debidas al aumento de volumen de la molécula del carquejol en éste último medio como consecuencia de la solvatación. Por otra parte, existen diferencias en el cálculo dependiendo de qué funcional de base se emplee: 6-31G\* o 6-311G++\*, lo que radica en la diferencia de “tamaño” y en el carácter difuso del último.

Es importante observar el valor de la energía total de la molécula del carquejifenol (-463,4930 hartrees) comparada a la de los conformeros más estables del carquejol (-464,6431 hartrees) y acetato de carquejilo (-617,3131 hartrees) en fase gaseosa con el nivel teórico B3LYP/6-31G\* (Tablas 1, 2 y 3). De acuerdo a ello, el orden de estabilidad sería: acetato de carquejilo > carquejol  $\approx$  carquejifenol.

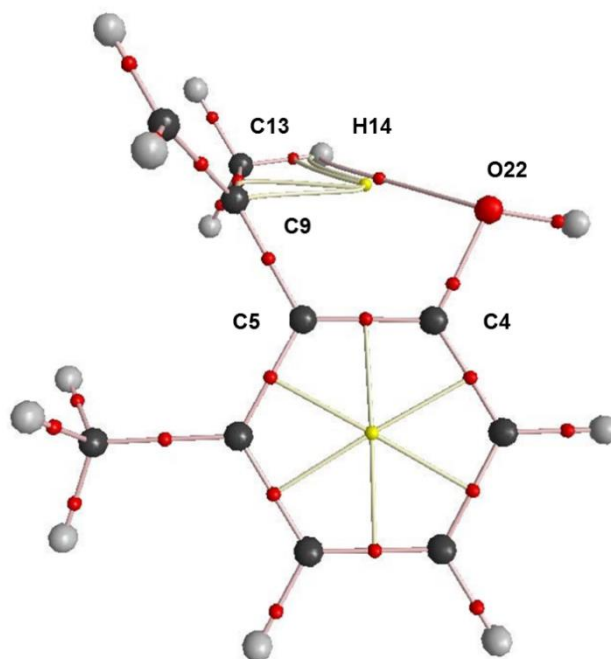
En la Figura 38 se muestra el mapa de *MEP* molecular para el carquejifenol. Se observa el mismo patrón de coloración que en el caso del carquejol, donde los principales sitios nucleófilos y electrófilos de la molécula se encuentran sobre el grupo hidroxilo. En concordancia con lo anterior, el mayor valor de potencial electrostático atómico fue evidenciado para el O<sub>22</sub>, mientras que el menor fue para el H<sub>23</sub> del grupo hidroxilo, que constituye el átomo más lábilmemente unido (teniendo también el menor orden de enlace; resultados no mostrados). Para los carbonos, el menor valor de *MEP* fue observado para el átomo C<sub>4</sub>, directamente unido al O<sub>22</sub>, debido al carácter altamente polarizado de dicho enlace.



**Figura 38:** Mapa de superficie de potencial electrostático molecular (MEP) calculado para el carquejifol en fase gaseosa. Rango de colores: desde rojo  $-0.063$  a azul  $+0.063$ . Teoría: B3LYP/ 6-31G\*. Valor de isodensidad: 0.005.

Debido a la similitud en los perfiles electrostáticos y en las energías tanto del carquejol como del carquejifol, es probable que ambos compuestos tengan propiedades biológicas semejantes. Sin embargo, hay que considerar que un factor adicional es la geometría molecular (de suma importancia en algunas actividades, como por ejemplo en la interacción con enzimas; capítulo 10), por lo que a pesar de tener una distribución de cargas semejante, puede variar el nivel de interacción con dianas biológicas (Urzúa *et al.*, 2008).

En la Figura 39 se presenta el diagrama de interacciones intermoleculares calculadas para el carquejifol con el programa AIM2000. Aparte de los enlaces covalentes, se observó un punto crítico de enlace (BCP) entre el  $O_{22}$ --- $H_{14}$ , coincidente con un enlace de hidrógeno intermolecular. Es interesante observar que en el carquejifol se da una interacción entre el oxígeno y uno de los protones del grupo metilo del  $C_{13}$ ; mientras que en el caso del acetato de carquejilo y el carquejol la interacción de éste tipo constatada fue entre el oxígeno y uno de los protones del grupo metilideno del  $C_{10}$  (Figuras 31, 34 y 39). Este tipo de enlace de hidrógeno no es muy común en moléculas orgánicas, ya que el metilo no es buen dador de éste tipo de enlace (sus hidrógenos no se encuentran lo suficientemente polarizados) (Carey, 2008). Sin embargo, la existencia de dicha interacción posibilita la formación de un punto crítico de anillo (RCP) de 6 miembros:  $O_{22}$ ,  $C_4$ ,  $C_5$ ,  $C_9$ ,  $C_{13}$  e  $H_{14}$ , lo que incrementaría la estabilidad de la molécula. A ello también contribuiría la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares que también estabilizaría la estructura dimérica (Figura 37).



**Figura 39:** Modelo molecular para el carquejifenol en fase gaseosa mostrando la geometría de todos los puntos críticos de enlace (BCPs; puntos rojos) y de los puntos críticos de anillo (RCPs; puntos amarillos) con el nivel de teoría B3LYP/6-31G\*. Se observa la interacción intramolecular no covalente  $O_{22} \cdots H_{14}$  (enlace de hidrógeno).

Mediante el cálculo de orbitales moleculares de frontera (ver anexo) se constató que el carquejifenol es más reactivo que el carquejol y que el acetato de carquejilo (a pesar de sus diferencias en energía absoluta), pero menos que otros compuestos terpénicos con reconocida actividad biológica (como la sesquiterpen-lactona cnicina).

Detalles adicionales de cálculos computacionales para el carquejifenol se encuentran en el anexo con la publicación correspondiente.

### 3.4 Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN y $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN del acetato de carquejilo y carquejol obtenidos en éste trabajo (Figuras 40 y 41) fueron idénticos a los reportados previamente por Thomas (1967) para los mismos compuestos, confirmando la estructura previamente descrita.

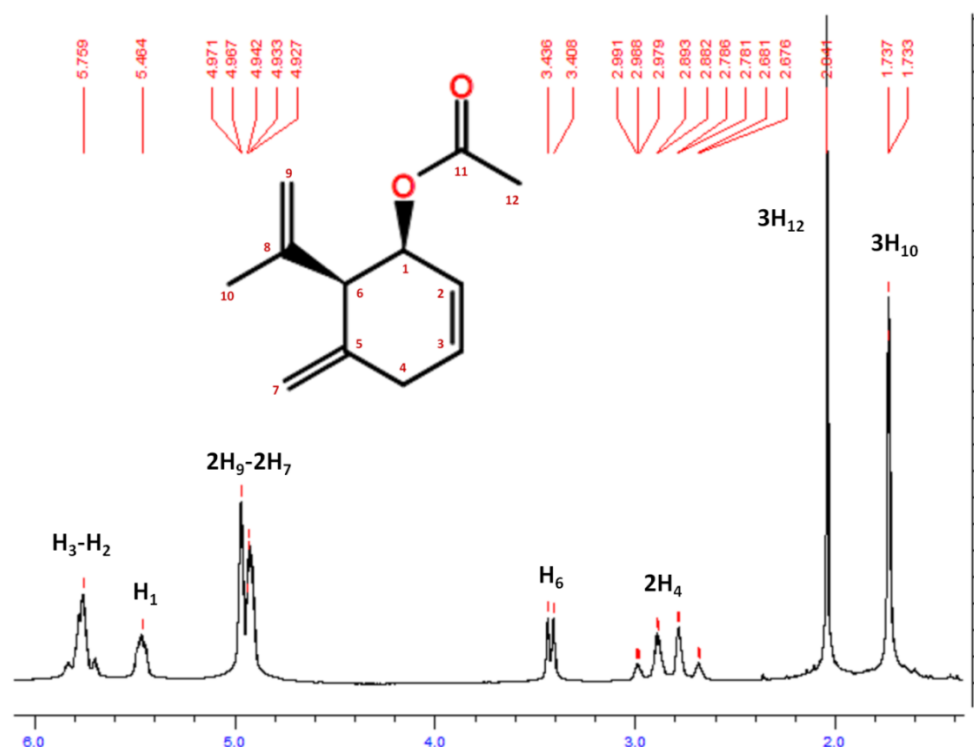


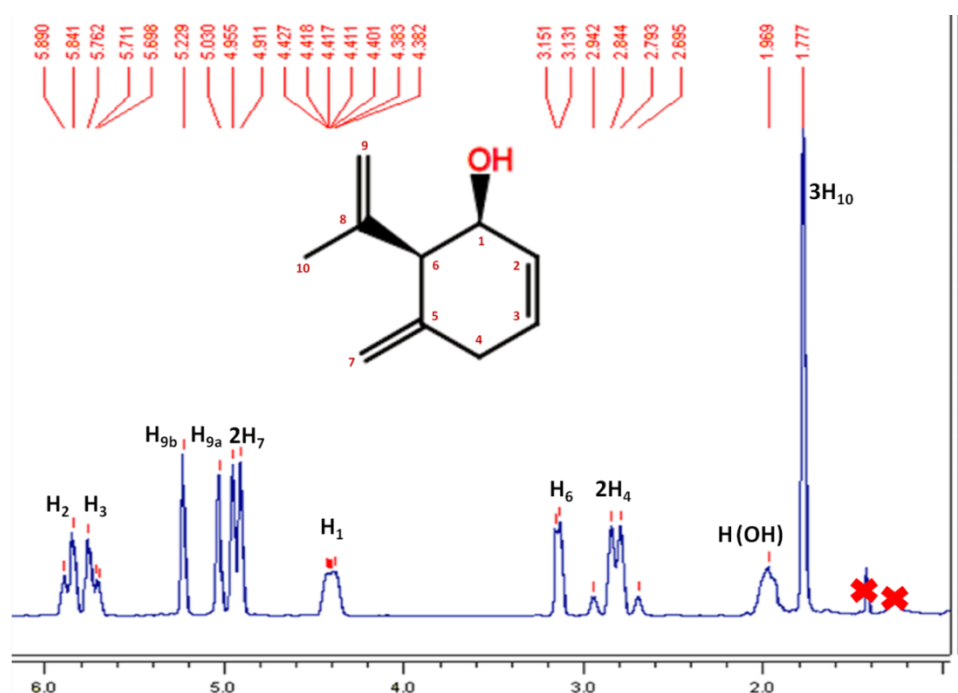
Figura 40: Espectro de <sup>1</sup>H-RMN (200 MHz) del acetato de carquejilo obtenido experimentalmente.

Como era de esperar, los protones olefínicos (vinílicos) (H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>7</sub> y H<sub>9</sub>) se presentaron con señales a campo bajo (altos desplazamientos químicos;  $\delta$ : 4,90-5,90 ppm) debido a la propiedad anisotrópica desapantallante de los dobles enlaces (Figuras 40 y 41) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008).

En el caso del acetato de carquejilo, las señales de los protones H<sub>7</sub> y H<sub>9</sub> no se resolvieron, mientras que en el caso del carquejol hubo una buena resolución de las mismas, seguramente debido al cambio del entorno magnético producido por la pérdida del voluminoso grupo acetato (Figuras 40 y 41).

Un aspecto muy interesante en éstos experimentos fue que el protón H<sub>1</sub> sufrió un abrupto cambio en el desplazamiento desde el acetato al alcohol (de  $\delta$ : 5,46 ppm a  $\delta$ : 4,41 ppm) (Figuras 40 y 41). Lo anterior se debe a que el acetato es un grupo aceptor de electrones por efecto inductivo que “arrastra” la carga electrónica del anillo hacia sí mismo, desapantallando el protón más próximo (en éste caso el H<sub>1</sub>) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Al efecto inductivo, se le adiciona el efecto anisotrópico tipo “cono” propio del grupo carbonilo del acetato, que contribuye aún más a desapantallar a H<sub>1</sub> (ver más adelante) (Fleming y Williams, 1968).

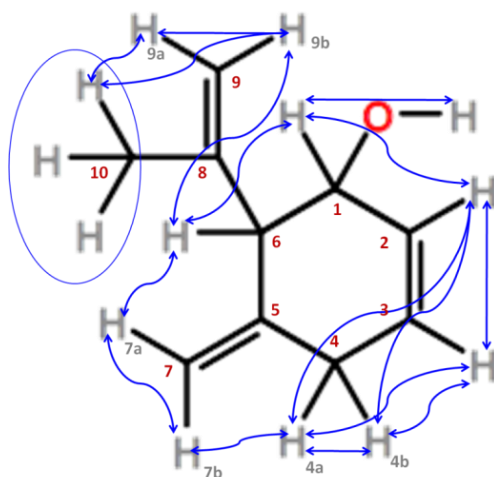




**Figura 41:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz) del carquejol obtenido experimentalmente.

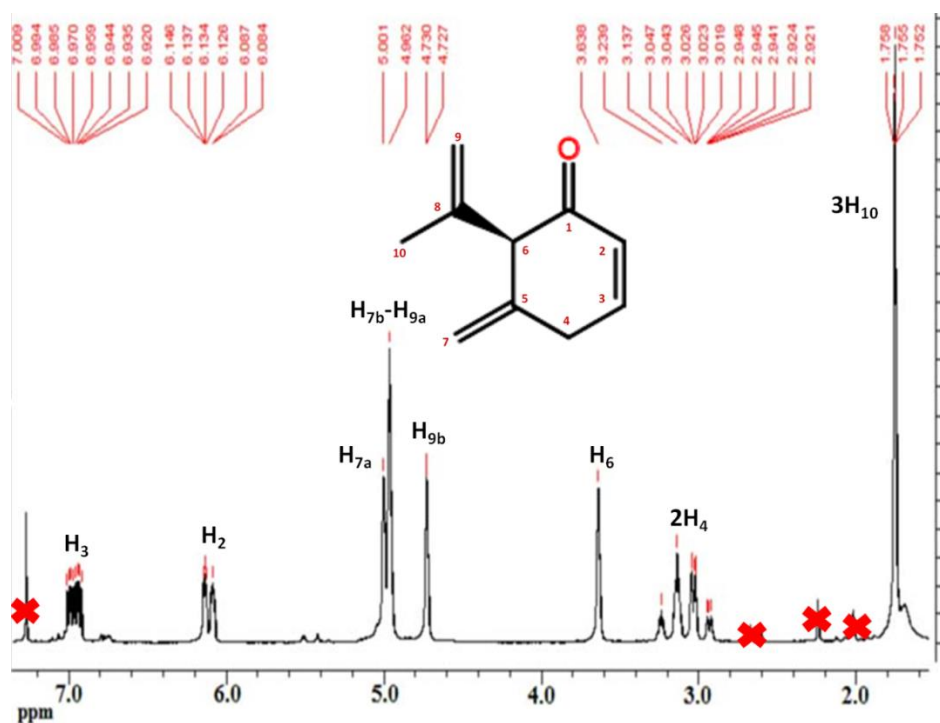
Los protones metino ( $\text{H}_6$ ), metilenos ( $\text{H}_4$ ) y metílicos ( $\text{H}_{10}$  y  $\text{H}_{12}$ ) fueron detectados a sus desplazamientos químicos normales en compuestos orgánicos: 3,42-3,14 ppm; 2,83-2,77 ppm; y 2,04-1,74 ppm respectivamente (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Debido al efecto aceptor electrónico del grupo acetato, los protones  $\text{H}_{12}$  del acetato de carquejilo se observaron un poco más desapantallados que los correspondientes protones  $\text{H}_{10}$  (Figura 40). En el caso del carquejol, también fue detectado el protón correspondiente al hidroxilo como una señal ancha a  $\delta$ : 1,87 ppm (Figura 41), lo que constituye un caso notable porque en general dicho protón se encuentra unido muy labilmente (véase sección 3.2), intercambiándose entre moléculas del alcohol y perdiéndose su señal en el ruido instrumental (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Para confirmar que tal señal perteneciera efectivamente al protón del hidroxilo, se realizó adición al tubo de RMN de agua pesada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), identificándose posteriormente una nueva señal a  $\delta$ : 4,70 ppm correspondiente al protón del agua semi-pesada ( $\text{DHO}$ ), y la desaparición de la señal antedicha a  $\delta$ : 1,87 ppm (resultados no mostrados) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008).

En lo que respecta a acoplamiento espín-espín protónico, en la Figura 42 se presentan los principales determinados por análisis de espectros  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para el carquejol.

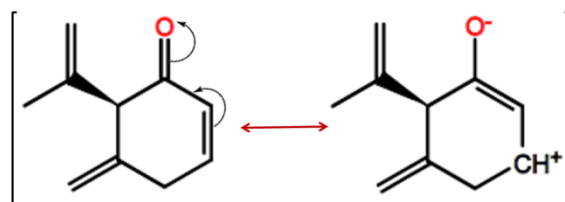


**Figura 42:** Acoplamiento espín-espín protónico en el carquejol (estructura sin consideraciones estereoquímicas) basados en el análisis de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (200 MHz). Los protones metílicos  $\text{H}_{10}$  son equivalentes, y con el objetivo de mostrar tal equivalencia se encerraron en un óvalo.

En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la carquejona (Figura 43) un efecto relevante fue la completa resolución de las señales para  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$ , que en los espectros del acetato de carquejilo y carquejol se superpusieron (comparar las Figuras 40, 41 y 43). Lo mismo se debe a un efecto típico de los sistemas carbonílicos  $\alpha$ - $\beta$  conjugados, por la disminución de densidad electrónica en el carbono  $\beta$  por efecto de resonancia, dando como resultado un desapantallamiento correspondiente en el protón  $\text{H}_3$  (Figura 44) (Fleming y Williams, 1968).



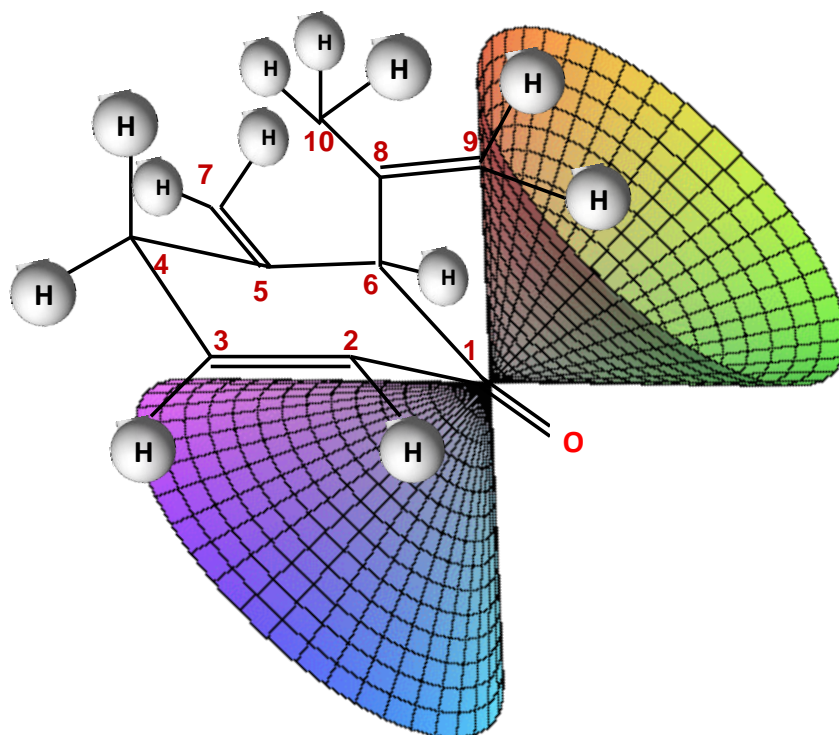
**Figura 43:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz) de la carquejona obtenido experimentalmente.



**Figura 44:** Formas resonantes de la carquejona que explican el desapantallamiento observado en el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  para  $\text{H}_3$ .

Cuando se comparan los desplazamientos químicos en la carquejona de los  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$  ( $\delta$ : 6,11 y 6,97 ppm, respectivamente), se encuentra que ambas señales se exhiben a campos menores que en el caso del acetato de carquejilo ( $\delta$ : 5,71 y 5,79 ppm, respectivamente) y en el carquejol ( $\delta$ : 5,87 y 5,74, respectivamente) (Figuras 40, 41 y 43).

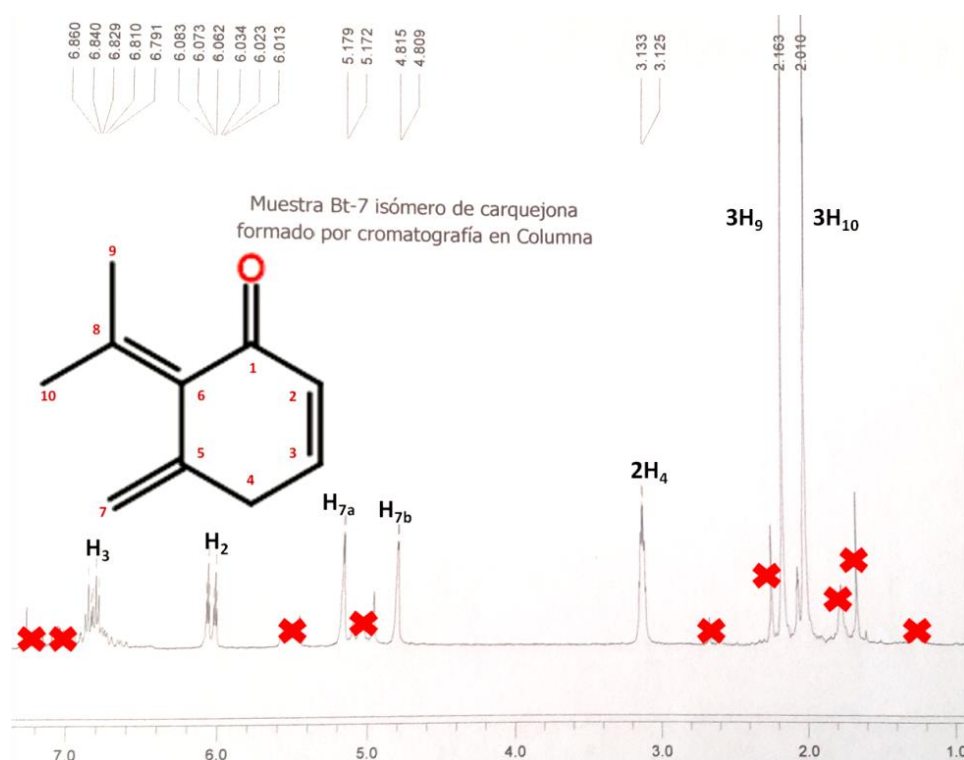
La diferencia se debe al efecto anisotrópico del grupo carbonilo, el que apantalla a los protones que se encuentran por encima o por debajo de un bicono cuyo vértice es el carbono carbonilo; y desapantalla a quienes quedan por fuera de aquél, como es el caso de los  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$  (Figura 45) (Fleming y Williams, 1968). Dicho efecto de desprotección se extendió para otros protones en la estructura, como el  $\text{H}_6$  ( $\delta$ : 3,14 ppm en el carquejol y  $\delta$ : 3,64 ppm en la carquejona) y los  $\text{H}_4$  ( $\delta$ : 2,77 y 2,89 ppm en el carquejol;  $\delta$ : 3,00 y 3,18 ppm en la carquejona); pero fue despreciable para el caso de los  $\text{H}_7$  y  $\text{H}_{10}$  (que se encuentran a mayor distancia del grupo carbonilo). En el caso de los dos  $\text{H}_9$  ( $\delta$ : 5,04 y 5,24 ppm en el carquejol;  $\delta$ : 4,73 y 4,96 ppm en la carquejona), hubo un apantallamiento porque debido a su posición espacial quedaron dentro de los límites del bicono mencionado anteriormente (Figura 45) (Fleming y Williams, 1968).



**Figura 45:** Estructura tipo silla distorsionada para el anillo de la carquejona en donde se muestra el efecto anisotrópico del grupo carbonilo representado por el bicono de apantallamiento. Los protones  $H_2$ ,  $H_3$  y  $H_6$  son desapantallados (posiciones externas al bicono), mientras que los  $H_9$  se encuentran dentro de la región del cono superior y son apantallados; los  $H_{10}$  se encuentran distantes y no son afectados. Es pertinente aclarar que los  $C_1$ ,  $C_2$  y  $C_3$  (así como sus respectivos protones) se encuentran en el mismo plano debido a la hibridación  $sp^2$  de los mismos.

Respecto a los acoplamientos espín-espín evidenciados para la carquejona, fueron prácticamente los mismos que en el caso del carquejol (considerando los protones que permanecieron iguales en ambos compuestos).

En la Figura 46 se presenta el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del isómero de la carquejona llamado *iso*-carquejona que presentó algunas diferencias espectroscópicas importantes que permitieron su identificación. Es pertinente aclarar que como se obtuvo una fracción de 77% de pureza de *iso*-carquejona y con 23% de carquejifenol (según *GC-MS*) no se consideraron las señales de éste último para su asignación.



**Figura 46:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz) de la iso-carquejona (77% de pureza) obtenida experimentalmente por isomerización de carquejona en sílica gel.

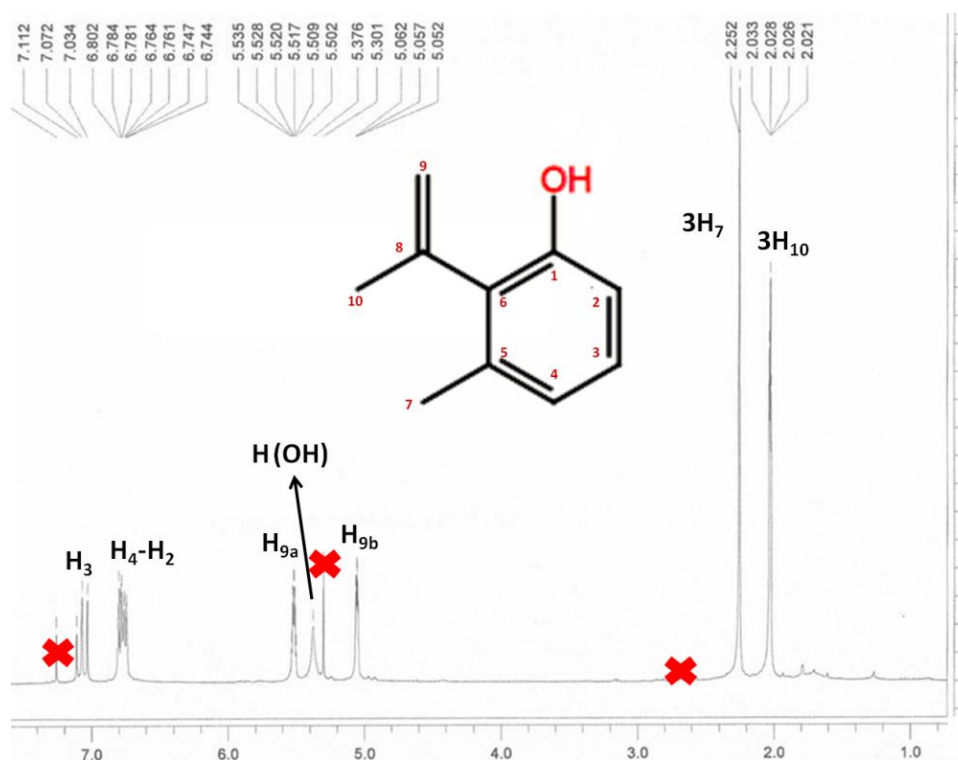
La señales más características del espectro de la *iso*-carquejona en comparación con la carquejona fue la desaparición de la señal correspondiente al protón  $\text{H}_6$ , y la transformación de la señal de los dos protones  $\text{H}_9$  vinílicos (dobletes con acoplamiento fino en la carquejona) a una señal singlete de 3 protones metílicos a campo alto (Figuras 43 y 46).

Como los carbonos  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_5$  y  $\text{C}_6$  poseen una hibridación  $\text{sp}^2$ , la estructura de la *iso*-carquejona es prácticamente plana, y la mayoría de los protones se encuentran en el plano del grupo carbonilo, lo que hace que los mismos sean desapantallados por el efecto anisotrópico comentado anteriormente para la carquejona (Figura 46). Debido a ello, el desplazamiento químico de las señales de  $\text{H}_9$  ( $\delta$ : 2,16 ppm) y  $\text{H}_{10}$  ( $\delta$ : 2,01 ppm) en la *iso*-carquejona son mayores que los de  $\text{H}_{10}$  en la carquejona ( $\delta$ : 1,76 ppm), lo que indica un claro desapantallamiento. Los desplazamientos del resto de los protones de la *iso*-carquejona se detectaron a valores similares respecto a sus equivalentes en la carquejona.

Los acoplos constatados por el análisis del espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de la *iso*-carquejona fueron los mismos que para el caso de la carquejona, exceptuando los de aquellos protones diferenciales en la estructura.



En la Figura 47 se presenta el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del carquejifenol obtenido por isomerización de la carquejona y de la *iso*-carquejona.



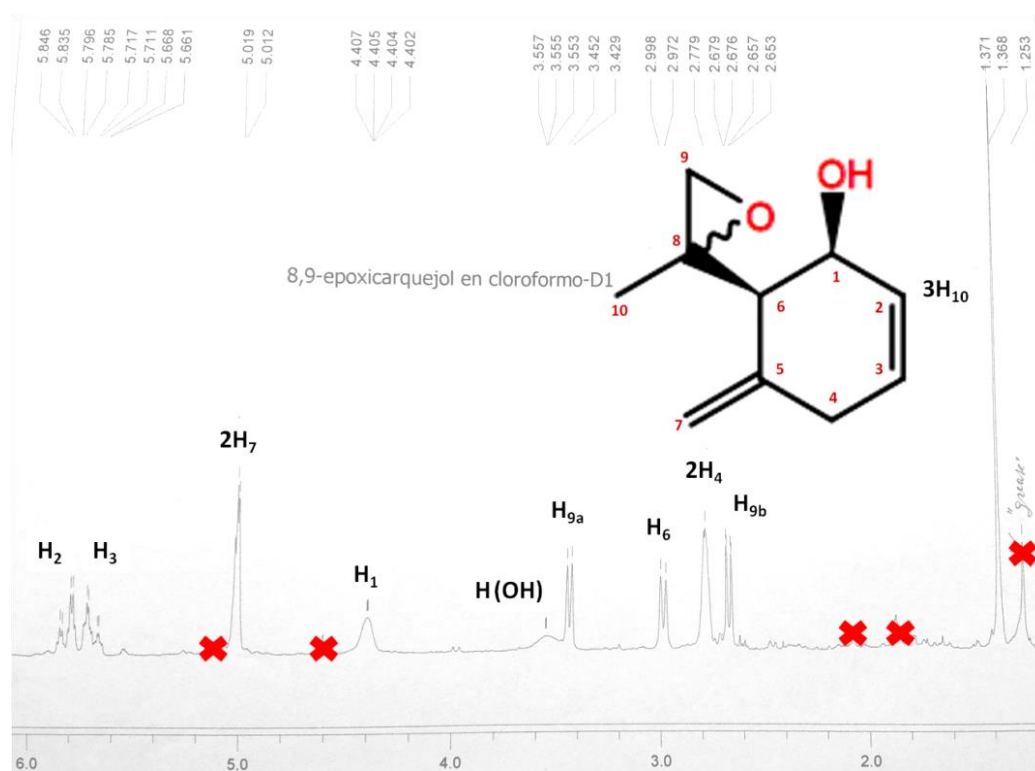
**Figura 47:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz) del carquejifenol obtenido experimentalmente.

La simple inspección visual del espectro permitió establecer la existencia en la estructura de protones aromáticos ( $\delta$ : 6,0-9,0 ppm) (Figura 47). Tal desapantallamiento es debido al campo magnético inducido creado por la corriente anular electrónica a través del anillo bencénico, cuyo efecto se suma en el mismo sentido al del campo externo en la periferia del anillo (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Dicho campo inducido también permite el desapantallamiento de protones que se encuentran próximos al anillo, por ejemplo: los H<sub>9</sub> presentaron en la carquejona un desplazamiento de  $\delta$ : 4,76 y 4,93 ppm, mientras que el carquejifenol los mismos tuvieron valores de  $\delta$ : 5,06 y 5,52 ppm (Figuras 43 y 47). En el mismo sentido, los protones H<sub>10</sub> se presentaron en la carquejona a  $\delta$ : 1,76 ppm, mientras que los mismos resonaron en el carquejifenol a  $\delta$ : 2,03 ppm (Figuras 43 y 47).

Debido a la transformación del C<sub>7</sub> en un grupo metilo, su señal también se identificó como un singlete muy desapantallado por efecto del campo aromático inducido ( $\delta$ : 2,25 ppm). Al igual que en el caso del carquejol, para el carquejifenol fue posible detectar la señal del protón del hidroxilo intercambiable, la que en éste caso se presentó como un singlete amplio a  $\delta$ : 5,38 ppm (Figura 47).



Por último, se presenta en la Figura 48 el espectro del óxido de carquejol (8,9-epoxicarquejol), compuesto mayoritario de la reacción de epoxidación del carquejol.



**Figura 48:** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (200 MHz) del 8,9-epoxicarquejol obtenido experimentalmente.

Para determinar fehacientemente la posición de epoxidación se comparó el espectro del producto obtenido de reacción con el del material de partida (carquejol). De ésta manera se constató que las señales correspondientes a los protones vinílicos  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_3$  y  $\text{H}_7$  no se modificaron, mientras que sí lo hizo la señal de los protones  $\text{H}_9$  debido a la alteración del entorno magnético por la introducción de un grupo epóxido.

En el carquejol, los protones  $\text{H}_9$  resonaron a  $\delta$ : 5,04 ppm y 5,24 ppm, mientras que en el óxido de carquejol lo hicieron a  $\delta$ : 2,66 ppm ( $\text{H}_{9b}$ , doblete) y 3,43 ppm ( $\text{H}_{9a}$ , doblete) (Figuras 41 y 48), los que son valores típicos (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Tales desplazamientos ubicados a campos altos son normales en epóxidos de 3 miembros, lo que se debe al blindaje que ofrece el anillo de tres miembros por las perturbaciones estéricas y la proximidad de los orbitales entre sí y a los protones (Pohlit y Ferraz, 1995; Carey, 2008).

El efecto de apantallamiento por introducción del epóxido también afectó a los protones más cercanos a dicho grupo, como los protones  $\text{H}_{10}$  ( $\delta$ : 1,78 ppm en el carquejol y  $\delta$ : 1,37 ppm en el óxido de carquejol, respectivamente) y en menor medida al  $\text{H}_6$  ( $\delta$ : 3,14 ppm y  $\delta$ : 2,98 ppm, respectivamente) (Figuras 41 y 48). Los desplazamientos del resto de los protones no se



vieron prácticamente modificados entre el espectro del carquejol y el del óxido de carquejol. Es de notar, que en el caso del óxido de carquejol también fue evidenciado el protón del grupo hidroxilo como una señal ancha centrada en  $\delta$ : 3,55 ppm a campos menores que en el carquejol ( $\delta$ : 1,87 ppm) (ver Figuras 41 y 48).

En cuanto a los acoplamientos espín-espín observados por el análisis de espectro COSY, éstos fueron los mismos que en el caso del carquejol (Figura 42).

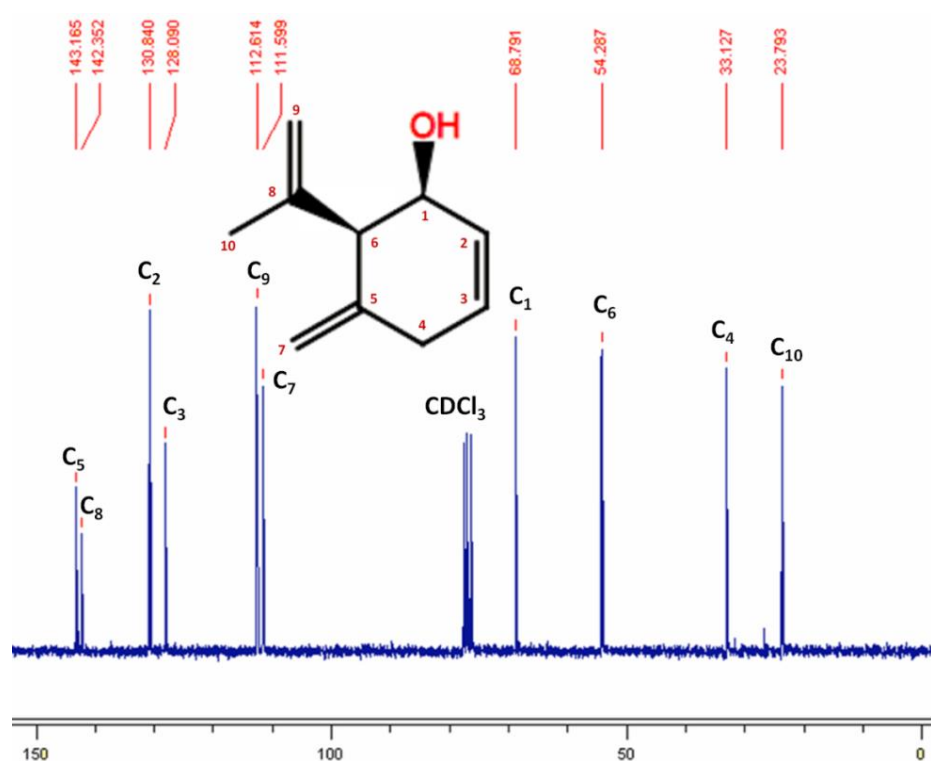
Como se comentó anteriormente en la sección 2.9, se obtuvo además de la fracción conteniendo el 8,9-epoxicarquejol, una segunda fracción enriquecida en un epóxido que se estudió únicamente por  $^1\text{H}$ -RMN y MS. Si bien el espectro de RMN presentó muchas señales de impurezas (no mostrado) se observó la desaparición de las señales de  $\text{H}_7$  del carquejol y presencia de las señales correspondientes de  $\text{H}_{9a}$  y  $\text{H}_{9b}$  a los mismos desplazamientos que en el caso del 8,9-epoxicarquejol; lo que indicaría tentativamente que se pudo tratar del 5,7;8,9-diepoxicarquejol.

### 3.5 Espectroscopía de $^{13}\text{C}$ -RMN, $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HSQC y $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC

En la sección anterior se discutió el análisis de la espectroscopía de RMN protónico para los compuestos obtenidos experimentalmente mediante el enfoque semi-sintético seguido en ésta tesis. En ésta sección se presentará el análisis de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN y las correlaciones obtenidas en experimentos de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC que permitieron confirmar la identidad de las estructuras propuestas (no se muestran resultados de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC; ver anexo). Al igual que en el caso de  $^1\text{H}$ -RMN, en  $^{13}\text{C}$ -RMN se comentará en detalle el espectro del carquejol y luego se especificarán las diferencias más apreciables de éste con los respectivos espectros del resto de los compuestos.

En la Figura 49 se muestra el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del carquejol (no reportado anteriormente en la literatura previo a éste trabajo de tesis).





**Figura 49:** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (50 MHz) del carquejol obtenido experimentalmente.

Como era esperable, los carbonos con hibridación  $\text{sp}^2$  ( $\text{C}_5$ ,  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_3$ ,  $\text{C}_9$  y  $\text{C}_7$ ) fueron los más desapantallados y los que presentaron resonancia a mayores desplazamientos químicos ( $\delta$ : 111 ppm a 143 ppm; Figura 49) (Carey, 2008).

De los carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$ , el que resonó a menor campo fue  $\text{C}_1$  debido a que se encuentra directamente unido al oxígeno de mayor electronegatividad, lo que contribuye a la desprotección por polarización del enlace  $\text{C}_1\text{-O}$  (Figura 48) (como fuera anticipado mediante análisis computacional; sección 3.2). Para el resto de los carbonos, el orden de aparición a campos mayores también fue el esperado:  $\delta\text{C}_6$  (terciario;  $\delta$ : 54,3 ppm) >  $\delta\text{C}_4$  (secundario;  $\delta$ : 33,1 ppm) >  $\delta\text{C}_{10}$  (primario;  $\delta$ : 23,8 ppm) (Figura 49) (Carey, 2008).

En el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN del acetato de carquejilo (ver anexo), las diferencias comparando con el del carquejol fueron:

1) la aparición de la señal del carbono del acetato muy desprotegida ( $\delta$ : 170,6 ppm) debido a la unión de éste a dos oxígenos (uno de ellos perteneciente al grupo carbonilo), y 2) la señal del carbono metílico del acetato a campos muy altos ( $\delta$ : 21,2 ppm).

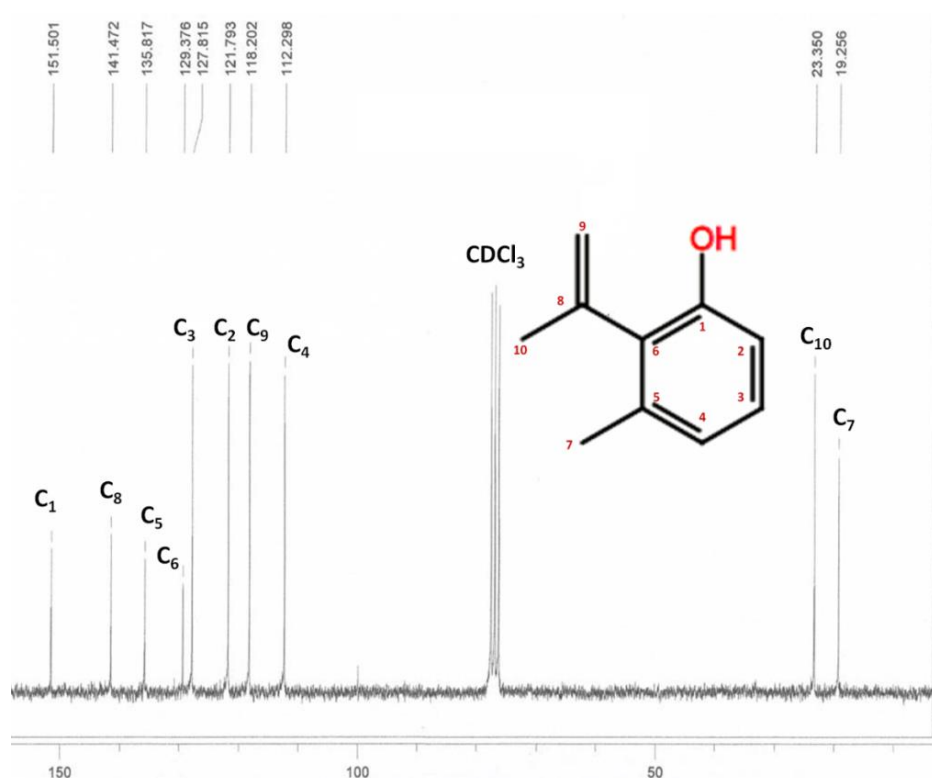
De igual forma, en la carquejona e *iso*-carquejona el  $\text{C}_1$  se encontró muy desprotegido por acción del grupo carbonilo ( $\delta$ : 199,0 ppm y 191,3 ppm; respectivamente), mientras que los desplazamientos de los restantes carbonos no tuvieron gran variación comparado al espectro del carquejol (a excepción de los que cambiaron su hibridación:  $\text{C}_9$ , que pasó a resonar de  $\delta$ :



112,8 ppm en la carquejona a  $\delta$ : 24,1 ppm en la *iso*-carquejona; y C<sub>6</sub> que pasó de  $\delta$ : 63,3 ppm a  $\delta$ : 134,1 ppm) (ver anexo).

En tanto, en el caso del óxido de carquejol los desplazamientos de los C<sub>9</sub> y C<sub>8</sub> disminuyeron al pasar de la hibridación sp<sup>2</sup> a la sp<sup>3</sup> por la introducción del grupo epóxido, por ejemplo: C<sub>8</sub> pasó de  $\delta$ : 142,4 ppm en el carquejol a  $\delta$ : 58,8 ppm en el óxido, mientras que el C<sub>9</sub> pasó de  $\delta$ : 112,6 ppm a  $\delta$ : 53,1 ppm. El resto de los carbonos prácticamente no se vieron afectados en sus desplazamientos químicos por la epoxidación (ver anexo).

En el caso del carquejifenol, el efecto de la corriente electrónica anular permitió el desapantallamiento de los seis carbonos del anillo, marcando un patrón diferente al del carquejol y el resto de sus derivados (Figura 50).

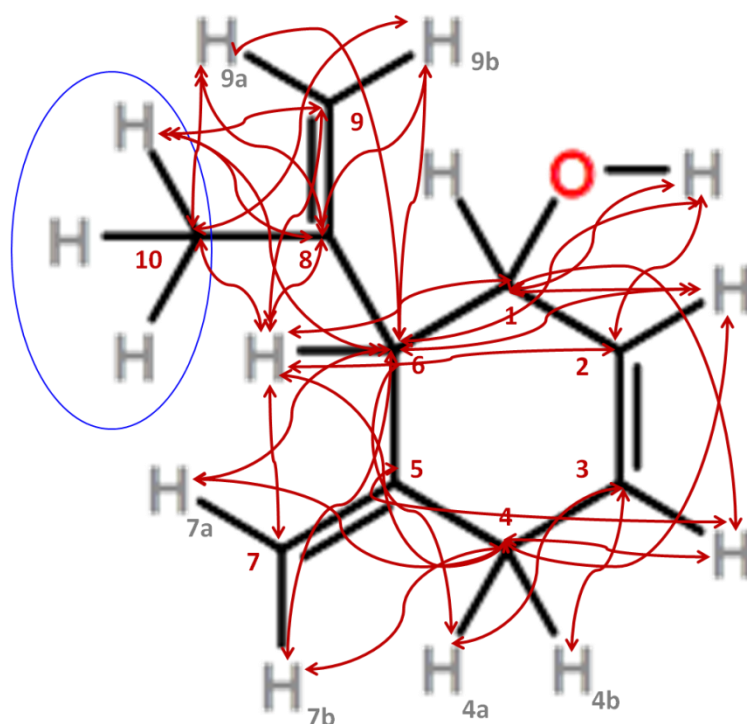


**Figura 50:** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN (50 MHz) del carquejifenol obtenido experimentalmente.

De ésta manera, los desplazamientos de todos los carbonos con hibridación sp<sup>2</sup> tuvieron valores mayores a 110 ppm, y los únicos carbonos que se encontraron a campo alto fueron los primarios C<sub>10</sub> y C<sub>7</sub> (Figura 50). En acuerdo a la teoría, el carbono más desapantallado del carquejifenol fue el C<sub>1</sub>, que junto al efecto del campo local de desprotección generado por la corriente anular del anillo se encuentra unido un átomo electronegativo (oxígeno), lo que desapantalla aún más su señal ( $\delta$ : 151,5 ppm) (Figura 50) (Carey, 2008).



El análisis de las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a un enlace (espectros *HSQC*) permitió la confirmación de la conectividad de los átomos propuesta para los compuestos obtenidos. Una confirmación adicional fue posible a través del análisis de correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a 2 y 3 enlaces (espectros *HMBC*). A modo de ejemplo, se presentan todas las correlaciones observadas para el caso del carquejol (Figura 51).

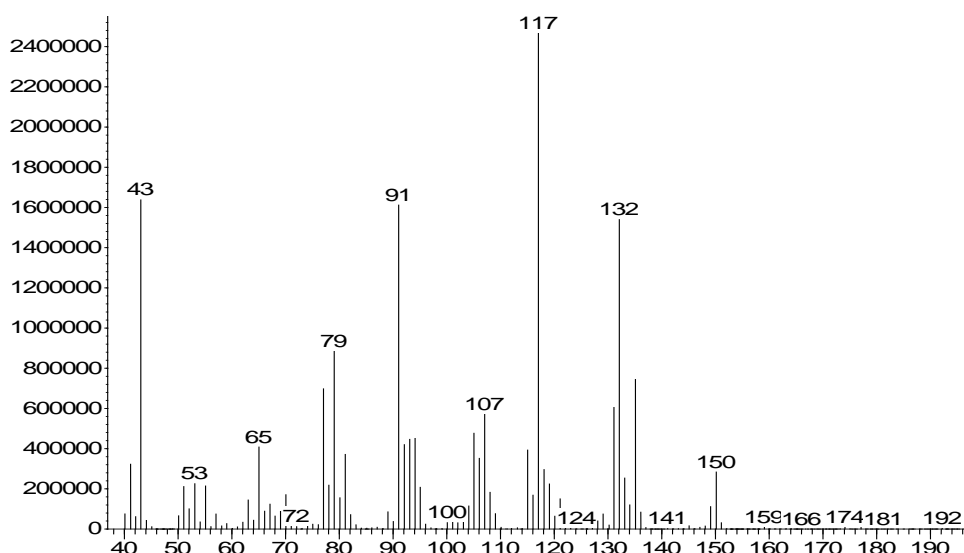


**Figura 51:** Correlaciones espín-espín  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  a larga distancia en el carquejol (estructura sin consideraciones estereoquímicas) obtenidas mediante análisis de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN,  $^{13}\text{C}$ -RMN y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Los protones metílicos  $\text{H}_{10}$  son equivalentes, y con el objetivo de mostrar tal equivalencia se encerraron en un óvalo.

En la sección anexo se presentan los espectros *HSQC* y *HMBC* que permitieron confirmar todas las estructuras propuestas.

### 3.6 Espectrometría de MS

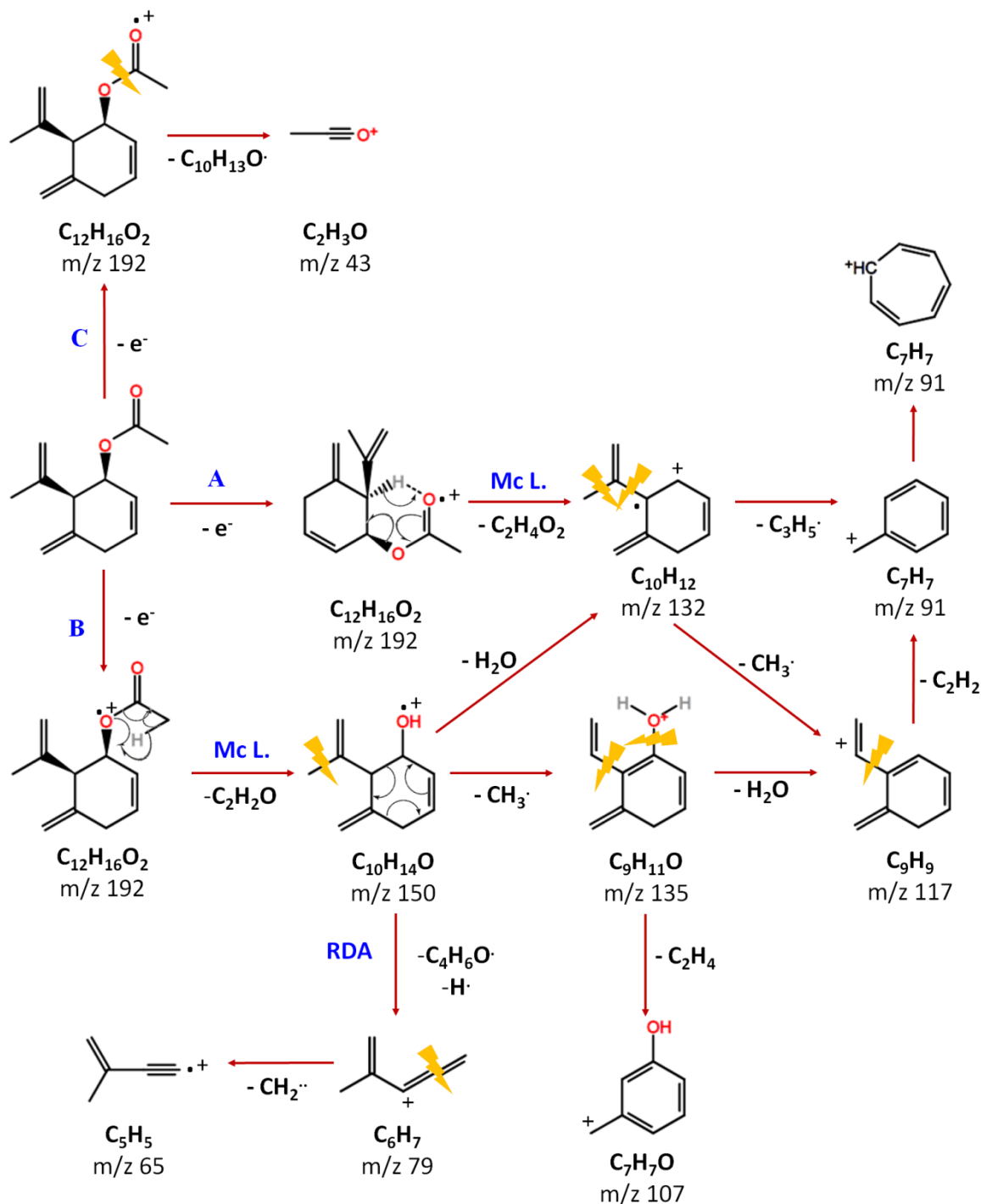
En ésta sección se mostrarán los espectros de masa (ionización electrónica a 70 eV) de los componentes terpénicos irregulares obtenidos mediante el enfoque semi-sintético desarrollado, así como se propondrán pasos de fragmentación que expliquen los diferentes picos observados en los espectros. En la Figura 52 se presenta el espectro del acetato de carquejilo.



**Figura 52:** Espectro de MS (ionización electrónica) del acetato de carquejilo obtenido experimentalmente.

El ion molecular ( $M^+$ ;  $m/z$  192) no fue evidente en el espectro de masa del acetato de carquejilo (abundancia menor al 1%), lo que es común en el caso de los ésteres alifáticos (Seibl, 1973) (Figura 52). A continuación se detallará el esquema de fragmentación propuesto.

Dos pérdidas de importancia constatadas en el espectro fueron debidas posiblemente a rearrreglos del tipo Mc. Lafferty, de los que resultaron dos compuestos neutros: ácido acético ( $m/z$  192  $\rightarrow$   $m/z$  132;  $M^+ - 60$ ) y cetena (etenona) ( $m/z$  192  $\rightarrow$   $m/z$  150;  $M^+ - 42$ ), lo cual es típico de ésteres (Seibl, 1973) (Figuras 52 y 53). En la ruta de fragmentación A (Figura 53) se produciría posteriormente la escisión de radicales: metilo ( $CH_3$ ), que daría por resultado el pico base ( $m/z$  132  $\rightarrow$   $m/z$  117;  $M^+ - 60 - 15$ ); o propenilo ( $C_3H_5$ ) que conduciría a un fragmento bencílico que luego de un rearrreglo generaría el ion tropilio ( $m/z$  132  $\rightarrow$   $m/z$  91;  $M^+ - 60 - 41$ ) (Figura 53) (Seibl, 1973; Carey, 2008). El fragmento del pico base podría transformarse en el ion tropilio simplemente por pérdida de acetileno ( $m/z$  117  $\rightarrow$   $m/z$  91;  $M^+ - 60 - 15 - 26$ ).



**Figura 53:** Fragmentación propuesta para explicar los principales picos observados en el espectro de MS (ionización electrónica) del acetato de carquejil. Referencias: Mc. L.: rearrreglo de Mc. Lafferty; RDA: ruptura retro Diels-Alder.

En la ruta de fragmentación B, luego de la pérdida de ceteno, se produciría el ion molecular del carquejol ( $C_{10}H_{14}O^+$ ;  $m/z$  150), el que podría perder un radical metilo ( $m/z$  150  $\rightarrow$   $m/z$  135;  $M^+-42-15$ ), una molécula de agua ( $m/z$  150  $\rightarrow$   $m/z$  132;  $M^+-42-18$ ), o sufrir la reacción de retro-Diels Alder con la consiguiente pérdida de un radical hidrógeno ( $m/z$  150  $\rightarrow$   $m/z$  79;

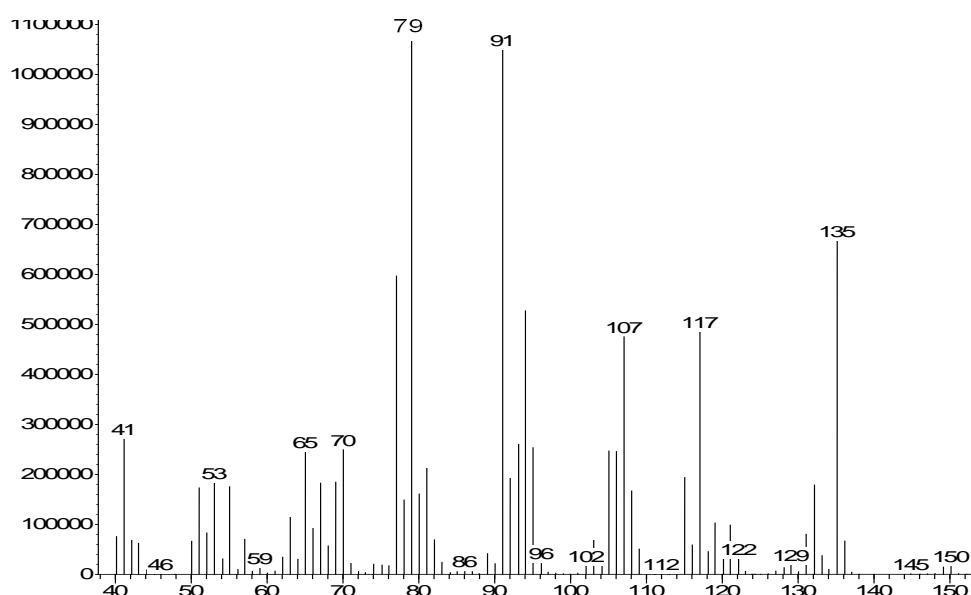


$M^+$ -42-70-1) (Figura 53). Eventualmente el fragmento  $m/z$  135 también podría perder una molécula de agua y generar el fragmento del pico base ( $m/z$  135  $\rightarrow$   $m/z$  117;  $M^+$ -42-15-18), uniéndose a la ruta de fragmentación A (Figura 53). Otra posibilidad es que el fragmento  $m/z$  135 pierda una molécula de etano, generando una estructura fenólica ( $m/z$  135  $\rightarrow$   $m/z$  107;  $M^+$ -42-15-28).

La fragmentación tipo retro Diels-Alder formaría un derivado alénico, el que por pérdida de un diradical metileno podría generar el fragmento  $m/z$  65 ( $m/z$  79  $\rightarrow$   $m/z$  65;  $M^+$ -42-71-14) (Figura 53).

Por último, la fragmentación  $\alpha$  típica de ésteres (ruta de fragmentación C) generaría el ion acilio ( $m/z$  192  $\rightarrow$   $m/z$  43;  $M^+$ -149) que tiene importante abundancia en el espectro de masa del acetato de caquejilo (Figuras 52 y 53) (Seibl, 1973).

En la Figura 54 se presenta el espectro de masa del carquejol.



**Figura 54:** Espectro de MS (ionización electrónica) del carquejol obtenido experimentalmente.

El ion molecular del carquejol ( $m/z$  150) presentó una muy baja abundancia (1,5%) en su espectro de masa, lo que significa que el mismo es poco estable en las condiciones de ionización.

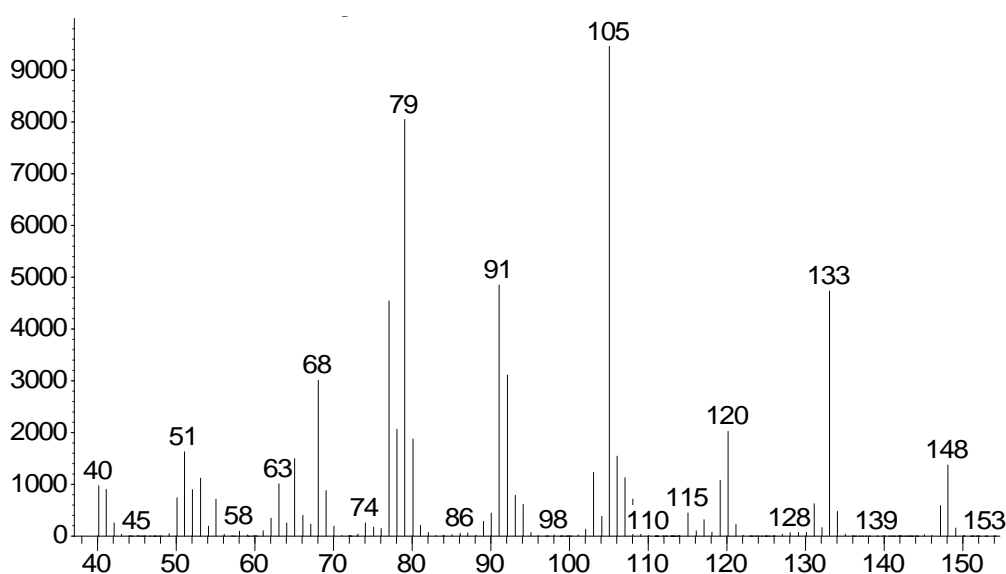
Como fue anteriormente mencionado, el carquejol sufriría fragmentación en un esquema paralelo al del acetato de carquejilo, aunque evidentemente las abundancias de los fragmentos cambiarían en uno y otro espectro, debido a que las mismas son propias de cada molécula (un tipo de “huella digital”) (Seibl, 1973; Carey, 2008). De ésta manera, el pico base en el



espectro del carquejol es el  $m/z$  79, uno de los fragmentos de la ruptura retro Diels-Alder (con la pérdida posterior de un radical hidrógeno) (Figuras 53 y 54). El otro producto de ésta fragmentación también es visible en el espectro a  $m/z$  70 (Figura 54).

También se destaca en el espectro del carquejol la abundancia del ion  $m/z$  77, el que es propio de la fragmentación bencílica para generar el catión benceno ( $m/z$  91  $\rightarrow$   $m/z$  77) (presente también en el acetato de carquejilo) (Figuras 52 y 54).

La introducción de un grupo carbonilo en la estructura repercutió en que el espectro de masa de la carquejona cambiara en aspectos claves de la fragmentación molecular comparado al carquejol y al acetato de carquejilo (Figuras 55 y 56).



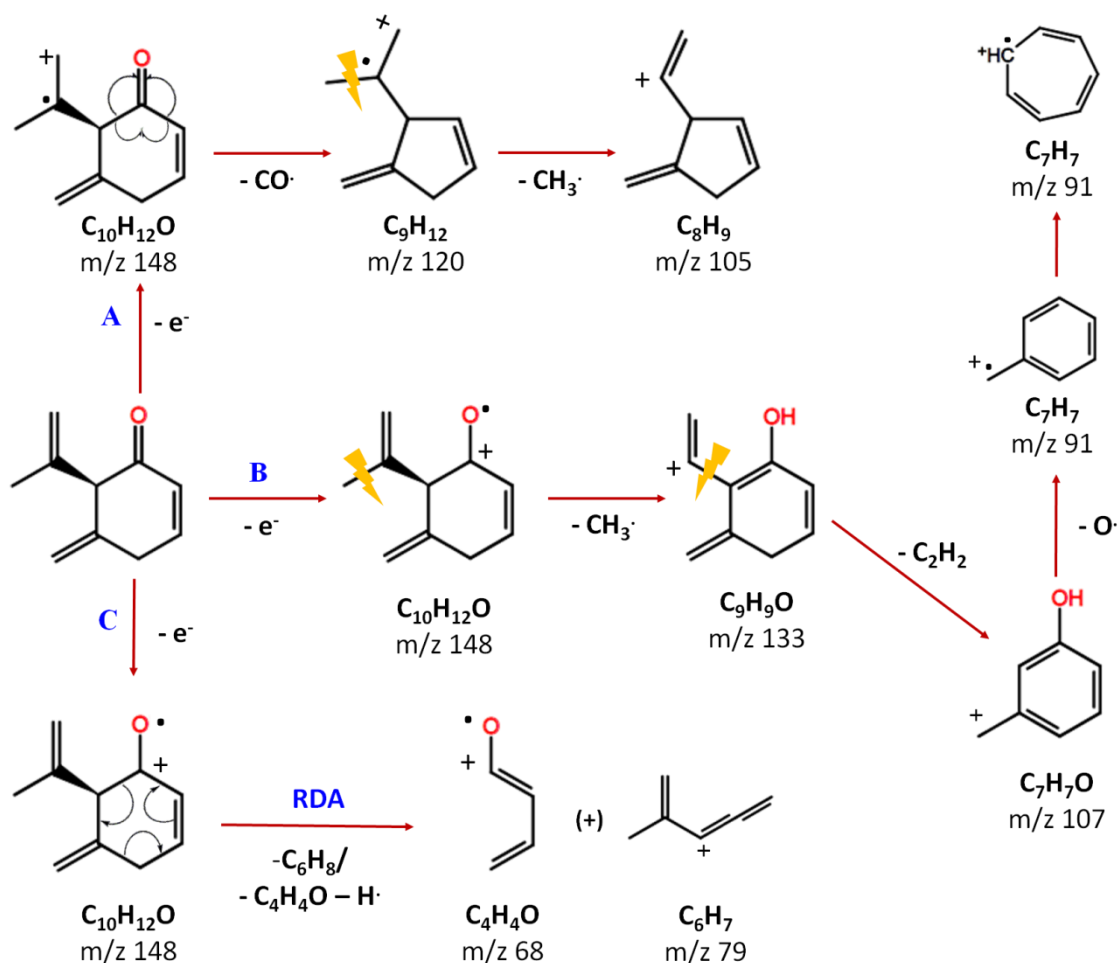
**Figura 55:** Espectro de MS (ionización electrónica) de la carquejona obtenido experimentalmente.

Primeramente, el ion molecular ( $m/z$  148) presentó mayor abundancia que en los casos anteriores (11%; Figura 55), lo que indicaría una mayor estabilidad del mismo. En el esquema de fragmentación propuesto, el primer paso de la ruta A implicaría la ruptura en el grupo carbonilo con escisión de un radical monóxido de carbono, el que produciría un fragmento de masa par ( $m/z$  148  $\rightarrow$   $m/z$  120;  $M^+ - 28$ ) (Figura 56). Posteriormente, se produciría la pérdida de un radical metilo, lo que resultaría directamente en el fragmento correspondiente al pico base ( $m/z$  120  $\rightarrow$   $m/z$  105;  $M^+ - 28 - 15$ ) (Figura 56).

Por su parte, en la ruta de fragmentación B el ion molecular de la carquejona perdería primeramente un radical metilo ( $m/z$  148  $\rightarrow$   $m/z$  133;  $M^+ - 15$ ) y a continuación una molécula de acetileno ( $m/z$  133  $\rightarrow$   $m/z$  107;  $M^+ - 15 - 26$ ) para producir un fragmento fenólico de  $m/z$  107, semejante a lo visto anteriormente para el acetato de carquejilo (Figuras 53 y 56). Este último



fragmento podría desprender un radical oxígeno para generar el fragmento bencílico, estabilizado posteriormente al catión tropilio ( $m/z$  107  $\rightarrow$   $m/z$  91;  $M^+$ -15-26-16) (Figura 56).



**Figura 56:** Fragmentación propuesta para explicar los principales picos observados en el espectro de MS (ionización electrónica) de la carquejona. Referencias: RDA: ruptura retro Diels-Alder.

Finalmente, la ruta de fragmentación C sería posible mediante una ruptura tipo retro Diels-Alder y generaría el fragmento par  $m/z$  68 ( $m/z$  148  $\rightarrow$   $m/z$  68;  $M^+$ -80) y el impar  $m/z$  79 (fragmentación seguida de una pérdida de radical hidrógeno) ( $m/z$  148  $\rightarrow$   $m/z$  79;  $M^+$ -68-1) (Figura 56). Como en el caso del acetato de carquejilo y del carquejol, el catión benceno ( $m/z$  77) también fue evidente en el espectro (Figura 56).

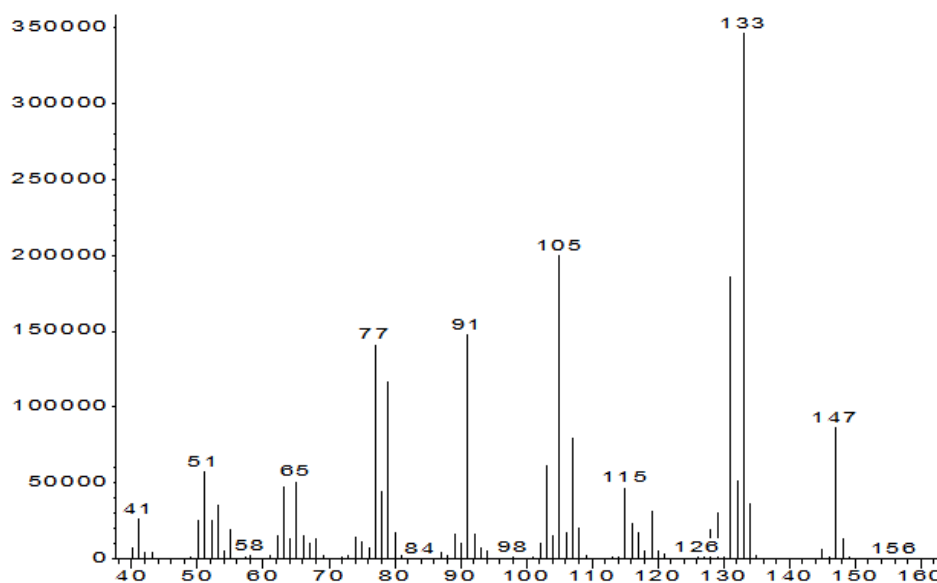
A pesar de ser estructuralmente isómeros posicionales, los espectros de masa de la carquejona y de la *iso*-carquejona resultaron muy diferentes en apariencia (Figuras 55 y 57). En primer lugar, el ion molecular ( $m/z$  148) en el caso de la *iso*-carquejona fue poco abundante (3,6%), y adicionalmente se evidenció una importante abundancia del fragmento  $m/z$  147 ( $M^+$ -1) por





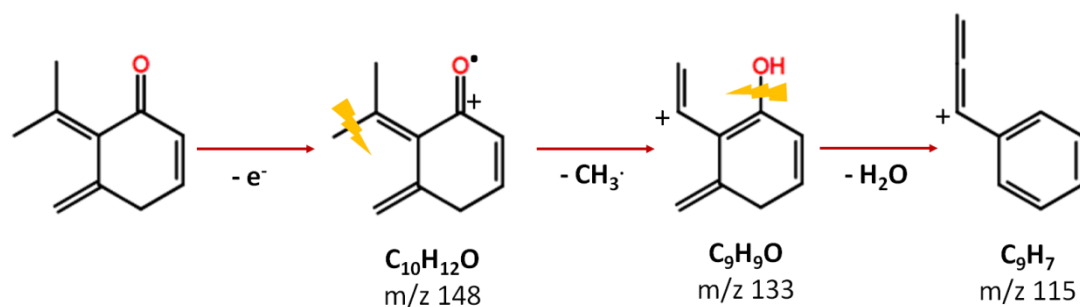
pérdida de radical hidrógeno, lo que fue de menor importancia en el espectro de la carquejona (Figuras 55 y 57).

El pico base de la *iso*-carquejona fue el fragmento  $m/z$  133, el que surgiría de la pérdida de un radical metilo ( $m/z$  148  $\rightarrow$   $m/z$  133;  $M^+ - 15$ ) (Figura 57 y 58). Esta fragmentación también ocurriría en la carquejona, pero su abundancia sería menor seguramente debido al hecho de que ésta posee únicamente un grupo metilo para perder, mientras que la *iso*-carquejona tiene dos de ellos (Figuras 56, 57 y 58).



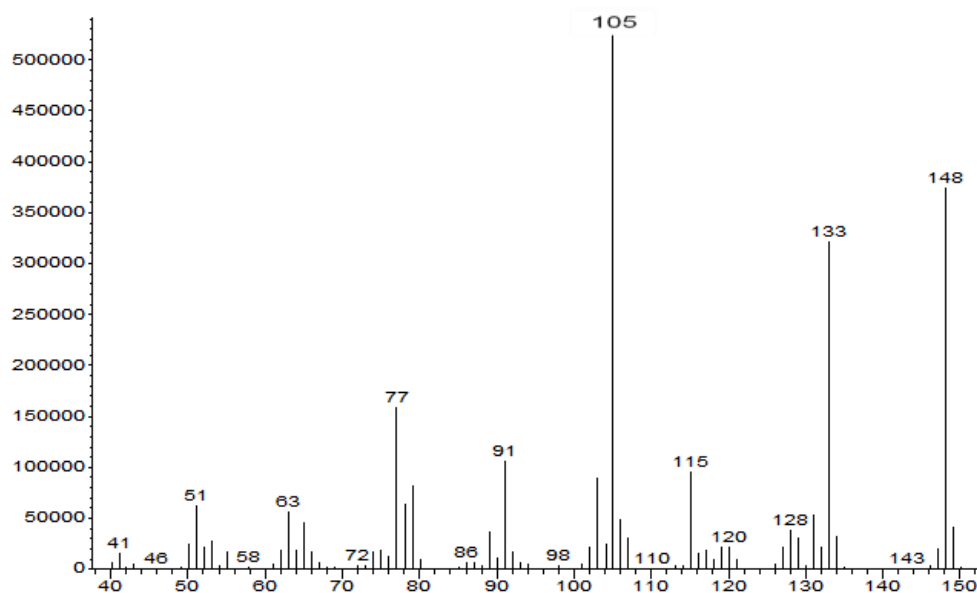
**Figura 57:** Espectro de MS (ionización electrónica) de la *iso*-carquejona obtenido experimentalmente.

Una fragmentación que ocurre tanto en la carquejona como en la *iso*-carquejona es la formación del ion  $m/z$  115, el que se produciría por la pérdida de agua desde el ion de  $m/z$  133 ( $m/z$  133  $\rightarrow$   $m/z$  115;  $M^+ - 15 - 18$ ). El mismo podría tener una estructura alénica (consideración hipotética, siendo posible además otras estructuras, que deberían ser evaluadas por experimentos de *MS-MS*) como consecuencia de rearrreglos (migración de grupo metileno) en las condiciones de fragmentación, semejante a lo que ocurre en el caso del ion tropilio (Seibl, 1973; Carey, 2008) (Figura 58).



**Figura 58:** Fragmentación propuesta para explicar la formación del ion  $m/z$ : 115 presente en el espectro de MS (ionización electrónica) de la carquejona e iso-carquejona.

Es relevante destacar que en el caso del espectro de masa del carquejifenol (Figura 59) la presencia del ion molecular ( $m/z$  148) es abundante (75%), lo que es coincidente con su estructura aromática y su consiguiente gran estabilidad, aún en las condiciones altamente energéticas de ionización a 70 eV (Figura 59) (Seibl, 1973; Carey, 2008). El resto de las rupturas principales fueron a las mismas unidades de masa que algunas de las correspondientes al acetato de carquejilo, carquejol, carquejona o *iso*-carquejona,  $m/z$  133, 120, 115, 105, 91 y 77 (Figura 59); por lo que se puede hipotetizar que se trate del mismo tipo de fragmentaciones propuestas e ilustradas en las Figuras 53, 56 y 58.



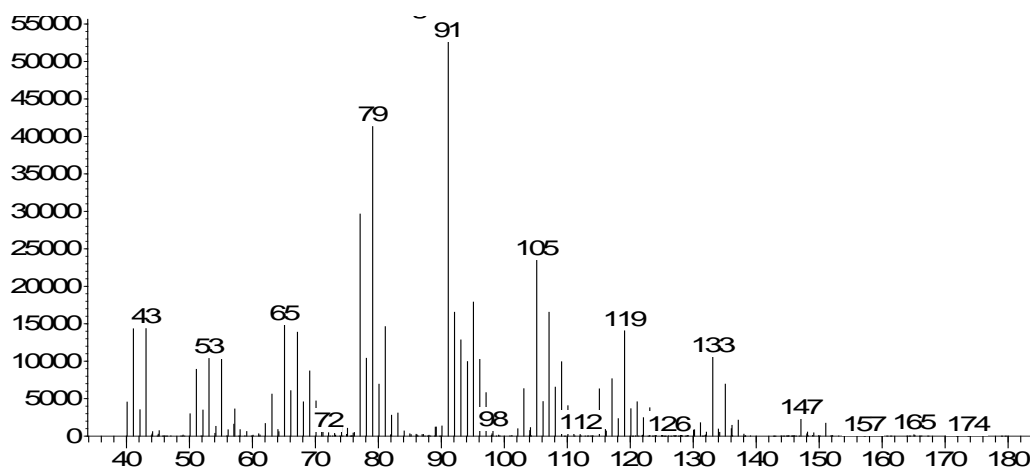
**Figura 59:** Espectro de MS (ionización electrónica) del carquejifenol obtenido experimentalmente.

A diferencia de los casos anteriores, también es pertinente subrayar que para el carquejifenol no se evidenciaron fragmentos productos de retro Diels Alder (al menos de intensidad destacable), lo que coherente con el hecho de la propia estabilidad aromática, y con que la

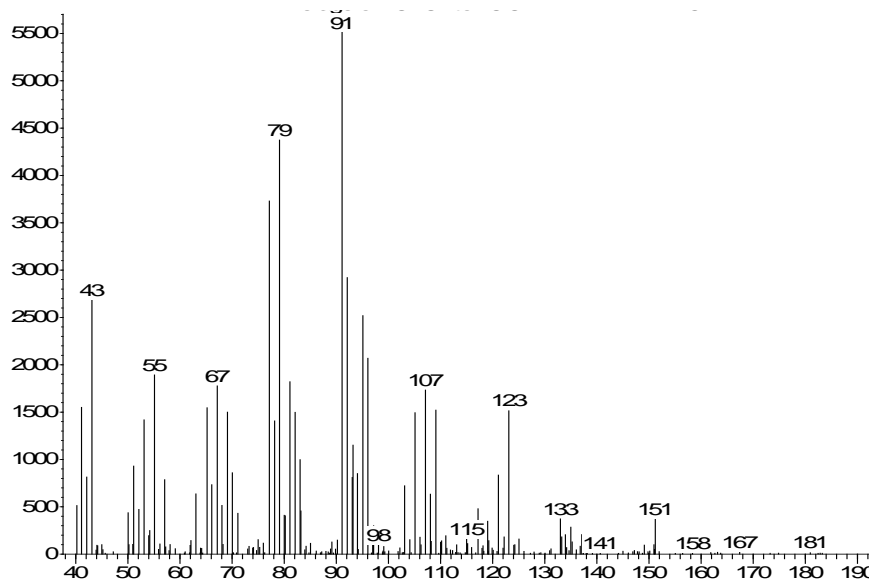


estructura del carquejifenol no corresponde a un anillo ciclohexénico sino a uno bencénico (Figura 59).

Por último, se analizará el espectro de masa del óxido de carquejol (8,9-epoxicarquejol) y del compuesto tentativamente identificado como 5,7-8,9-diepoxicarquejol, siendo que ambos tuvieron un aspecto semejante (Figuras 60 y 61).



**Figura 60:** Espectro de MS (ionización electrónica) del óxido de carquejol (8,9-epoxicarquejol) obtenido experimentalmente.



**Figura 61:** Espectro de MS (ionización electrónica) del 5,7-8,9-diepoxicarquejol (tentativo) obtenido experimentalmente.

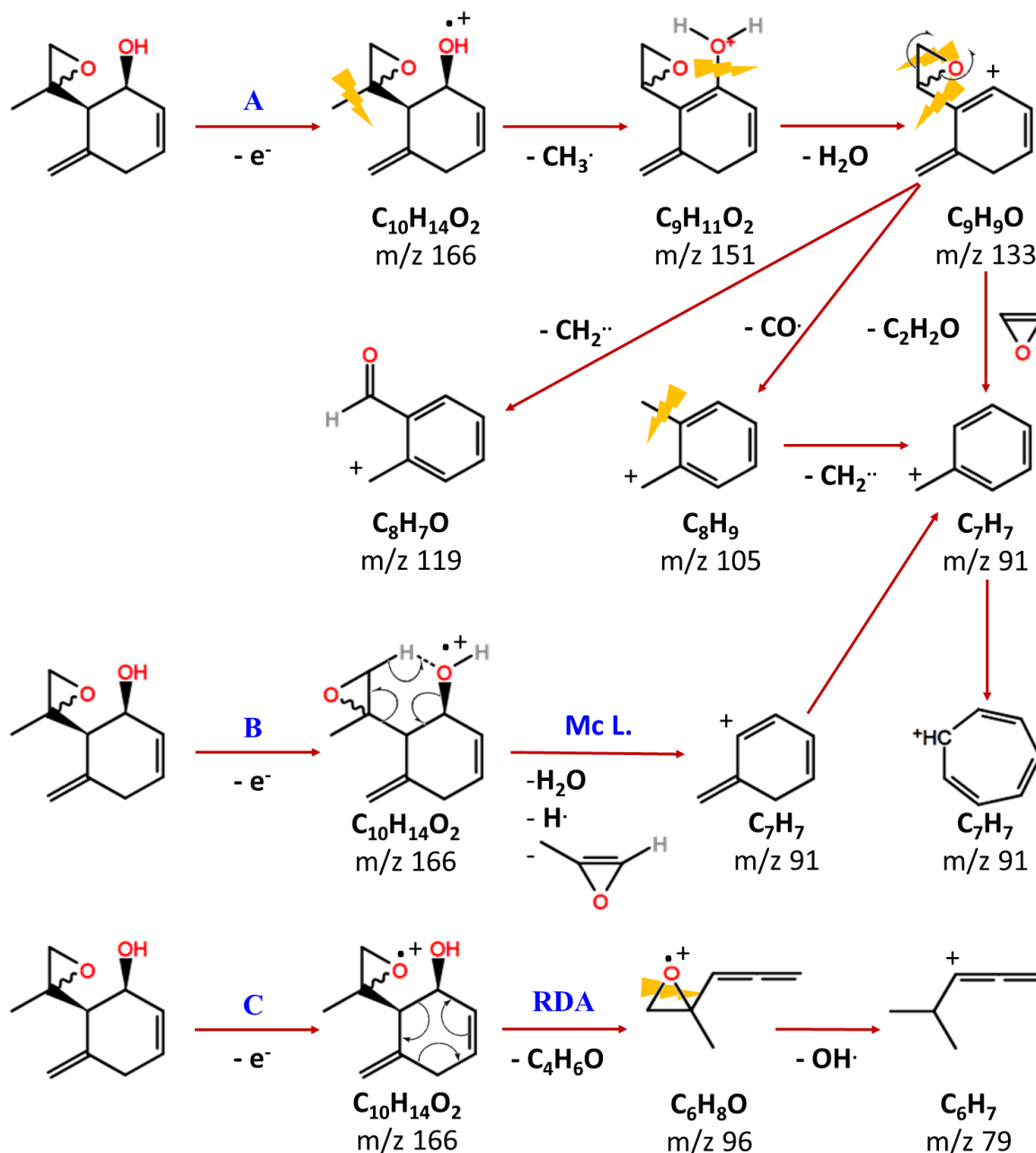
En ninguno de los dos casos fueron evidentes los iones moleculares ( $m/z$  166 para el 8,9-epoxicarquejol y  $m/z$  182 para el 5,7-8,9-epoxicarquejol), aún cuando adicionalmente a la ionización convencional a 70 eV se realizó una ionización en condiciones más suave (20 eV)



(resultados no mostrados) (Figura 59 y 60). Sin embargo, en ambos casos se detectaron a baja abundancia los picos correspondientes a los fragmentos ( $M^+-1$ ) ( $m/z$  165 para el 8,9-epoxicarquejol y  $m/z$  181 para el 5,7;8,9-epoxicarquejol; Figuras 60 y 61).

En la Figura 62 se plantean tres posibles rutas de fragmentación que explicarían los principales picos en el espectro de masa del óxido de carquejol. El primer pico claramente definido en éste espectro (señal superior al menos 3 veces al ruido instrumental) fue a  $m/z$  151, lo que correspondería a la eliminación de un radical metilo desde el ion molecular ( $m/z$  166  $\rightarrow$   $m/z$  151;  $M^+-15$ ), siendo el primer paso de la ruta de fragmentación A (Figuras 60 y 62). A partir del fragmento anterior, se produciría una pérdida neutra de agua, lo que generaría el fragmento observado a  $m/z$  133 ( $m/z$  151  $\rightarrow$   $m/z$  133;  $M^+-15-18$ ) (Figura 62).

El ion de  $m/z$  133 sería clave en la ruta de fragmentación A, debido a que sería el progenitor de varios otros fragmentos iónicos por pérdida de elementos del epóxido: un diradical metileno ( $m/z$  133  $\rightarrow$   $m/z$  119;  $M^+-15-18-14$ ), un radical monóxido de carbono ( $m/z$  133  $\rightarrow$   $m/z$  105;  $M^+-15-18-28$ ) o una molécula neutra de oxireno ( $m/z$  133  $\rightarrow$   $m/z$  91;  $M^+-15-18-42$ ) (Figura 62). Esta última pérdida conduciría al pico base  $m/z$  91 con estructura bencílica, que se estabilizaría al correspondiente catión tropilio (Figura 62) (Seibl, 1973; Carey, 2008). El fragmento de  $m/z$  119 se podría convertir al correspondiente fragmento del pico base por pérdida de un radical monóxido de carbono ( $m/z$  119  $\rightarrow$   $m/z$  91;  $M^+-15-18-14-28$ ) (Figura 62).



**Figura 62:** Fragmentación propuesta para explicar los principales picos observados en el espectro de MS (ionización electrónica) del óxido de carquejol (8,9-epoxycarquejol). Referencias Mc. L. rearrreglo de Mc. Lafferty; RDA ruptura retro Diels-Alder.

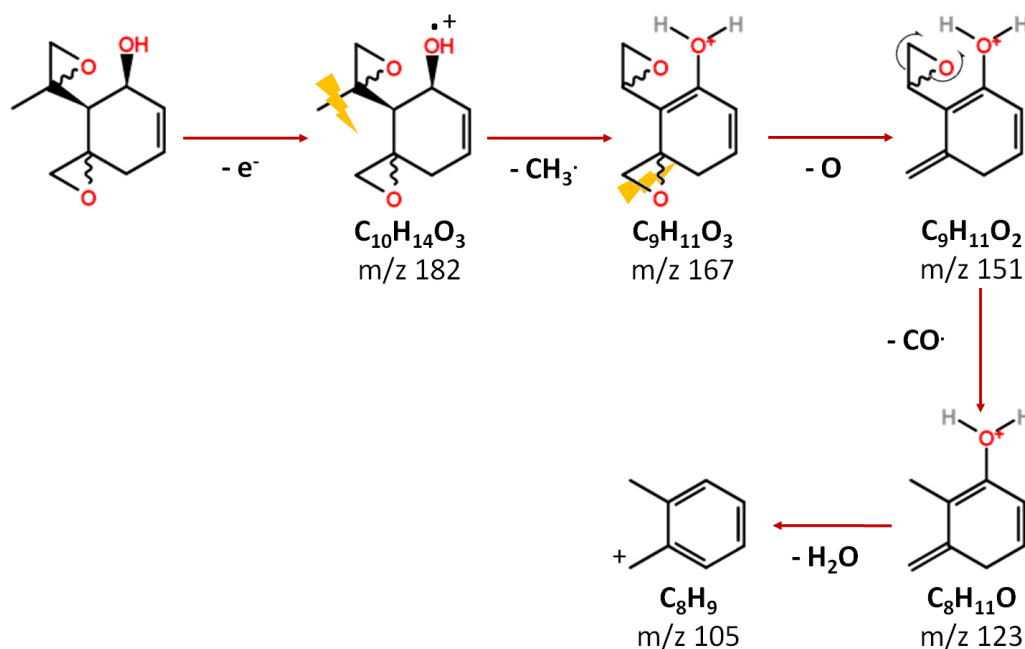
En la ruta de fragmentación B del óxido de carquejol tendría lugar un rearrreglo típico de Mc. Lafferty en un anillo de seis miembros, que produciría el desprendimiento de una molécula de agua y una de metil oxireno, dando por resultado el fragmeto del pico base (previo desprendimiento de un radical hidrógeno) ( $m/z$  166  $\rightarrow$   $m/z$  91;  $M^+ - 18 - 56 - 1$ ) (Figura 62).

Finalmente, en la ruta de fragmentación C propuesta, el ion molecular del óxido de carquejol sufriría una ruptura del tipo retro Diels-Alder, lo que generaría un fragmento  $m/z$  96 (de baja



intensidad en el espectro) ( $m/z$  166  $\rightarrow$   $m/z$  96;  $M^+ - 70$ ) (figura 62). Este último sin embargo sería el ion padre del fragmento  $m/z$  79 con importante abundancia en el espectro, por pérdida de un radical hidroxilo ( $m/z$  96  $\rightarrow$   $m/z$  79;  $M^+ - 70 - 17$ ) (Figura 62).

En el caso del 5,7-8,9-diepoxicarquejol, se produciría en primera instancia una liberación de un radical metilo ( $m/z$  182  $\rightarrow$   $m/z$  167;  $M^+ - 15$ ), produciendo el fragmento  $m/z$  167 cuya abundancia en el espectro fue baja (Figuras 61 y 63). Este fragmento podría perder un átomo de oxígeno del 5,7-epóxido para dar el fragmento de  $m/z$  151 ( $m/z$  167  $\rightarrow$   $m/z$  151;  $M^+ - 15 - 16$ ), por lo cual la fragmentación del diepóxido continuaría como la del monoepóxido mostrada en la Figura 62, y consecuentemente los espectros serían de apariencia similar de acuerdo a lo observado experimentalmente (Figura 63).



**Figura 63:** Fragmentación propuesta para explicar los principales picos observados en el espectro de MS (ionización electrónica) del 5,7-8,9-diepoxicarquejol.

Una fragmentación de escasa importancia en el espectro del óxido de carquejol pero destacada en el caso del 5,7-8,9-diepoxicarquejol sería la pérdida de un radical  $CO\cdot$  desde el fragmento  $m/z$  151 ( $m/z$  151  $\rightarrow$   $m/z$  123;  $M^+ - 15 - 16 - 28$ ) y su consiguiente fragmentación a  $m/z$  105 por pérdida de agua ( $m/z$  123  $\rightarrow$   $m/z$  105;  $M^+ - 15 - 16 - 28 - 18$ ) (Figura 63).

Debido a que no se pudo identificar plenamente el ion molecular, y que los datos de RMN no son definitivos para establecer la estructura del 5,7-8,9-diepoxicarquejol, la identificación fue catalogada como tentativa.



Un análisis detallado mediante espectrometría de masa tándem ( $MS/MS^n$ ) y de alta resolución ( $HRMS$ ) podría confirmar o descartar los esquemas de fragmentación propuestos en ésta sección, develando fiablemente cuales serían los correspondientes iones padres e hijos de éste tipo de compuestos. Lo anterior se encuentra por fuera de los objetivos de éste trabajo de tesis.

### 3.7 Espectroscopía de IR y Raman

En la Figura 64 se presenta el espectro de IR y Raman del carquejol, y la asignación de las principales bandas de absorción y de dispersión, respectivamente. Para una asignación más exacta basada en cálculos computacionales, ver la sección de anexo de ésta tesis con las correspondientes publicaciones.

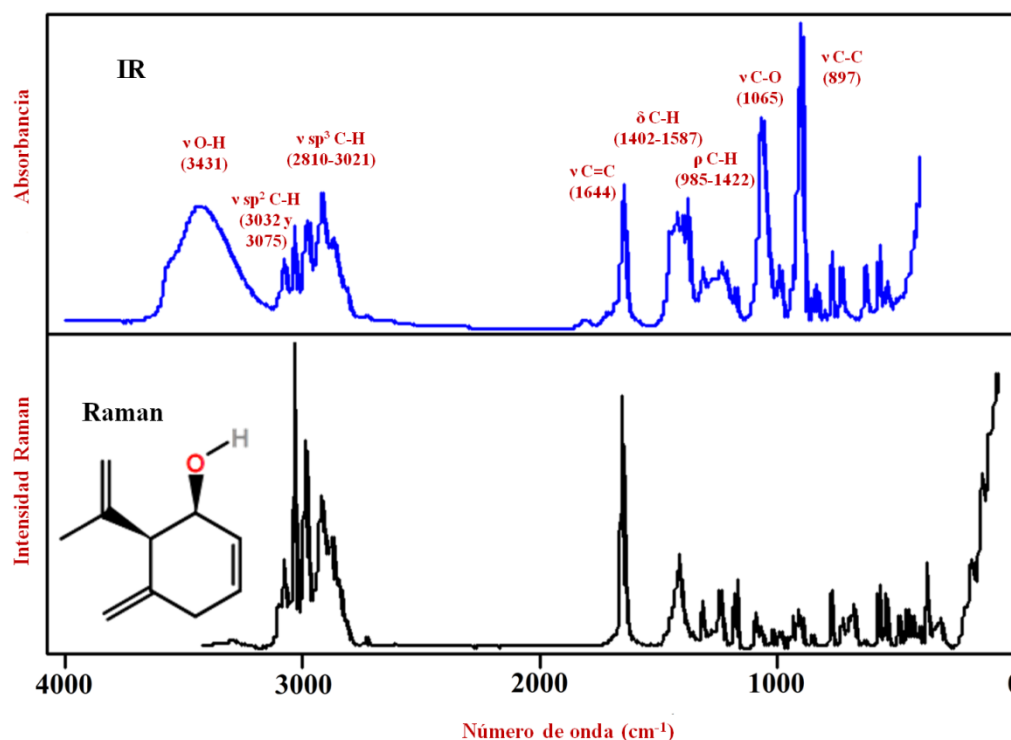
Las bandas asociadas a los modos de tensión o alargamiento (designadas como  $\nu$  en la Figura 64) generalmente son las más intensas en los espectros de IR y Raman de moléculas orgánicas (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). De ésta manera, los modos de tensión del grupo OH en el carquejol se presentaron como una banda ancha e intensa centrada en  $3431\text{ cm}^{-1}$ , lo cual es típico de alcoholes (Figura 64) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Dicha banda (usualmente llamada “polimérica”) se presentó ancha debido a interacciones intermoleculares de enlace de hidrógeno, lo cual es esperable que ocurra en una estructura como la del carquejol de acuerdo a lo presentado en la sección 3.3 (Fleming y Williams, 1968).

En el carquejol existen tres dobles enlaces con átomos de hidrógeno como sustituyentes ( $\text{H-C}_2=\text{C}_3\text{-H}$ ,  $\text{C}_5=\text{C}_7\text{-2H}$  y  $\text{C}_8=\text{C}_9\text{-2H}$ ), por lo que los modos de tensión  $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$  fueron asignados a dos bandas a las frecuencias de  $3032\text{ cm}^{-1}$  y  $3075\text{ cm}^{-1}$ . La primera presentó una intensidad media en IR y alta en Raman, mientras que la segunda exhibió una intensidad media en ambas espectroscopías (Figura 64). Otra banda intensa en ambos espectros asociada a hibridación  $\text{sp}^2$  correspondió a la vibración de tensión de los enlaces  $\text{C}=\text{C}$ , la que fue determinada a  $1644\text{ cm}^{-1}$ .

Las frecuencias de tensión para los enlaces  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  fueron asignadas en la región  $2810\text{-}3021\text{ cm}^{-1}$  (Figura 64). En tanto, el modo de alargamiento para el enlace  $\text{C-O}$  en el carquejol se evidenció en IR como una banda ancha e intensa centrada en  $1065\text{ cm}^{-1}$ , siendo de baja intensidad en el espectro Raman (Figura 64). Por otra parte, la región de frecuencias de tensión de los enlaces  $\text{C-C}$  se asignó en el intervalo de “huella digital” de  $768\text{-}985\text{ cm}^{-1}$ , con un máximo de absorbancia en el espectro localizado a  $897\text{ cm}^{-1}$  intenso en IR y de baja intensidad en Raman (Figura 64).



Por medio del análisis computacional, se determinó que los modos de balanceo (designados como  $\rho$ ) de los enlaces  $C(sp^2)$ -H correspondieron a la región  $1166$ - $1374\text{ cm}^{-1}$ , superponiéndose con las frecuencias de balanceo de los enlaces  $C(sp^3)$ -H ( $985$ - $1422\text{ cm}^{-1}$ ). En tanto, las bandas correspondientes a los modos de deformación (designados como  $\delta$ ) de los enlaces  $C(sp^3)$ -H y  $C(sp^2)$ -H fueron predichos en el intervalo  $1402$ - $1587\text{ cm}^{-1}$  (Figura 64).



**Figura 64:** Espectros de IR y Raman del carquejil obtenidos experimentalmente en estado sólido. Referencias (modos de vibración):  $\nu$ : tensión (alargamiento);  $\delta$ : deformación;  $\rho$ : balanceo.

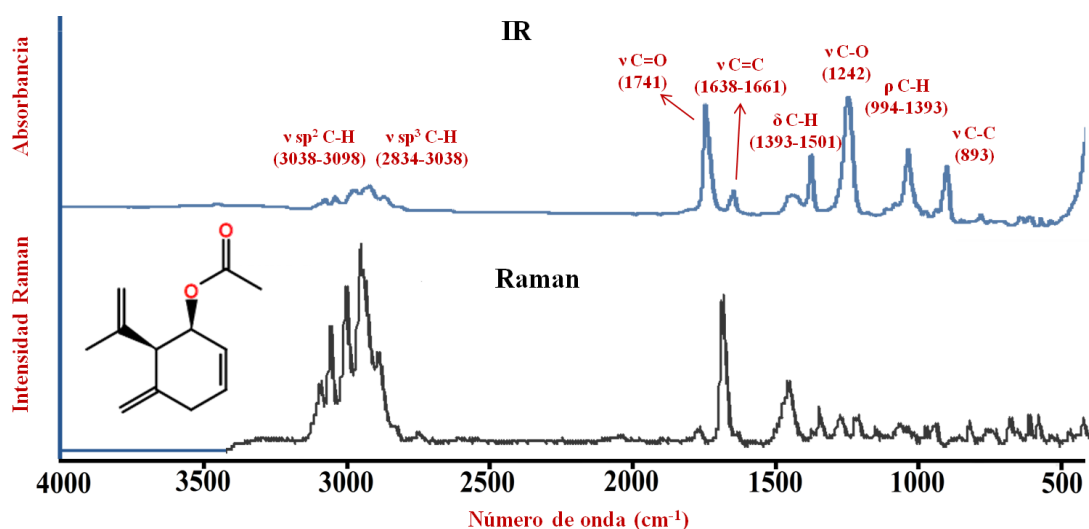
En la Figura 64 se presentan los espectros IR y Raman del acetato de carquejilo, obtenidos en estado líquido. En ambos se observaron frecuencias de alargamiento semejantes a las del carquejil para los enlaces  $C(sp^2)$ -H ( $3038$ - $3098\text{ cm}^{-1}$ ) y  $C(sp^3)$ -H ( $2834$ - $3038\text{ cm}^{-1}$ ), de baja intensidad en IR y alta en Raman (Figura 65).

La banda correspondiente al modo de tensión del enlace carbonilo se presentó en IR muy intensa a  $1741\text{ cm}^{-1}$  (claramente ausente en el caso del carquejil), lo cual es típico de ésteres saturados (Fleming y Williams, 1968) (Figura 65). Por otra parte, los modos de alargamiento de los enlaces  $C=C$  se presentaron como bandas deformadas en el intervalo de frecuencias  $1638$ - $1661\text{ cm}^{-1}$  con baja intensidad en IR y alta en Raman.





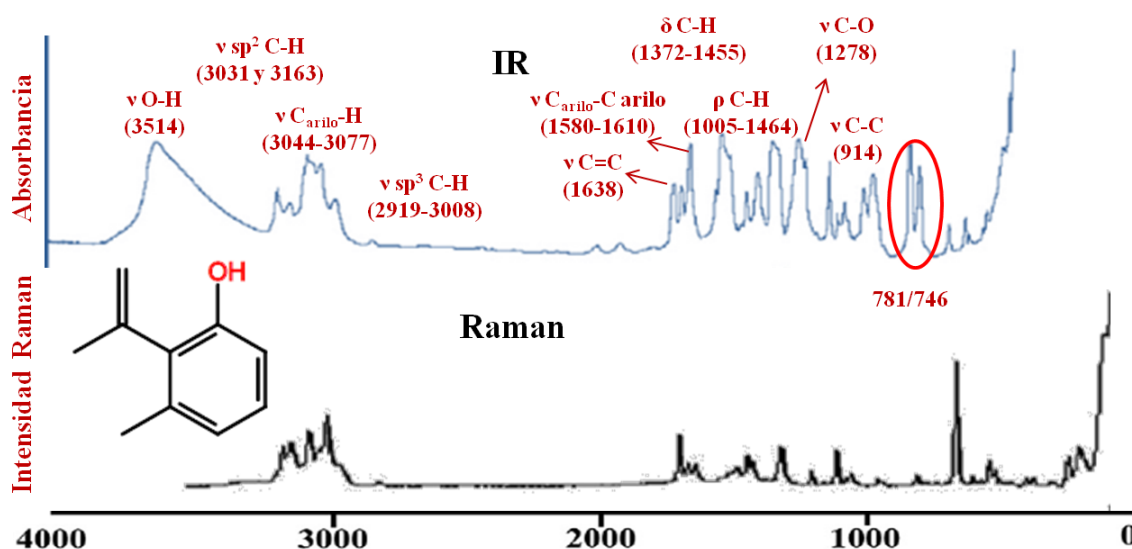
A su vez, la vibración de tensión correspondiente al enlace C-O se evidenció como una banda de intensidad fuerte en IR centrada en  $1242\text{ cm}^{-1}$  (en Raman la intensidad de la misma fue despreciable), un valor sustancialmente diferente al observado para el carquejol ( $1065\text{ cm}^{-1}$ ) seguramente debido a la influencia del grupo vecinal acetato (Fleming y Williams, 1968) (Figura 65). La banda principal correspondiente a la tensión del enlace C-C en el acetato de carquejilo se centró en  $893\text{ cm}^{-1}$ , valor muy semejante a los  $897\text{ cm}^{-1}$  obtenido para el carquejol, lo que está de acuerdo con que ambos poseen el mismo esqueleto carbonado.



**Figura 65:** Espectros de IR y Raman del acetato de carquejilo obtenido experimentalmente en estado líquido. Referencias (modos de vibración):  $\nu$ : tensión (alargamiento);  $\delta$ : deformación;  $\rho$ : balanceo.

Las siguientes predicciones fueron realizadas por análisis computacional para las frecuencias de balanceo de los enlaces:  $\text{C(sp}^2\text{)-H}$  ( $1172\text{-}1393\text{ cm}^{-1}$ ) y  $\text{C(sp}^3\text{)-H}$  ( $994\text{-}1374\text{ cm}^{-1}$ ). Por otra parte, las bandas correspondientes a los modos de deformación de ambos tipos de enlace fueron calculadas en el intervalo  $1393\text{-}1501\text{ cm}^{-1}$  (Figura 65).

Finalmente, en la figura 66 se presentan los espectros de IR y Raman del carquejifenol. Debido a que no hubo coincidencia entre varias de las bandas obtenidas experimentalmente y las correspondientes predichas por análisis computacional, se planteó la necesidad de la presencia de un dímero del carquejifenol (unido por enlace de hidrógeno de los monómeros) en estado sólido (sección 3.3), que explicaría tales diferencias. Más información al respecto se presenta en el anexo de ésta tesis.



**Figura 66:** Espectros de IR y Raman del carquejifenol obtenido experimentalmente en estado sólido. Referencias (modos de vibración): v: tensión (alargamiento);  $\delta$ : deformación;  $\rho$ : balanceo.

Al igual que en el caso del carquejol, fue evidente en el carquejifenol una banda ancha correspondiente a la tensión del enlace O-H del fenol centrada en  $3514\text{ cm}^{-1}$ , lo que es debido a la formación de enlaces de hidrógeno intermoleculares (Figura 66) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008).

En el carquejifenol existen tres enlaces del tipo  $C_{\text{arilo}}\text{-H}$  por lo que sus frecuencias de vibración de alargamiento fueron predichas por cálculo computacional en la región  $3044\text{-}3077\text{ cm}^{-1}$ , superponiéndose con las frecuencias de tensión de los enlaces  $C(\text{sp}^2)\text{-H}$  del sistema  $C_8=C_9\text{-}2\text{H}$  ( $3031\text{ y }3163\text{ cm}^{-1}$ ). Todas éstas bandas demostraron una intensidad media tanto en IR como en Raman, lo que es típico de compuestos aromáticos (Figura 66) (Fleming y Williams, 1968).

En tanto, la señal de vibración de alargamiento del enlace  $C_8=C_9$  fue evidenciada como de mediana intensidad en IR y Raman a una frecuencia de  $1638\text{ cm}^{-1}$  (Figura 66). Un poco por debajo de dicha frecuencia, fueron predichos los modos de vibración de alargamiento de los enlaces  $C_{\text{arilo}}\text{-}C_{\text{arilo}}$  ( $1580\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ ), en una región característica de los derivados del benceno (Fleming y Williams, 1968).

Por otra parte, las vibraciones de alargamiento de los enlaces  $C(\text{sp}^3)\text{-H}$  correspondientes a ambos grupos metilo del carquejifenol fueron determinadas en el rango  $2919\text{-}3008\text{ cm}^{-1}$ , valores similares a los propios del carquejol y acetato de carquejilo (Figura 66). A diferencia del caso de éstos últimos compuestos, el enlace  $C_{\text{arilo}}\text{-O}$  presentó una banda centrada en  $1278\text{ cm}^{-1}$ , a frecuencias mayores que el enlace C-O en el acetato de carquejilo ( $1242\text{ cm}^{-1}$ ) y



carquejol ( $1065\text{ cm}^{-1}$ ) (Figuras 64, 65 y 66). Asimismo, la banda de alargamiento de los enlaces C-C también se predijo por análisis computacional a mayores frecuencias ( $914\text{ cm}^{-1}$ ) que en los casos anteriores.

En la literatura es frecuente encontrar que las bandas fuertes a frecuencias menores de  $900\text{ cm}^{-1}$  y asociadas a la vibración fuera del plano de los enlaces  $\text{C}_{\text{arilo}}\text{-H}$  sean empleadas para dilucidar el patrón de sustitución de los anillos aromáticos (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). En el caso del carquejifenol, se presentaron dos bandas fuertes a  $781$  y  $746\text{ cm}^{-1}$  (Figura 66), las que descartan los patrones típicos de monosustitución ( $730\text{-}770\text{ cm}^{-1}$  y  $690\text{-}710\text{ cm}^{-1}$ ), *o*-disustitución (única banda a  $735\text{-}770\text{ cm}^{-1}$ ), *m*-disustitución ( $750\text{-}810\text{ cm}^{-1}$  y  $680\text{-}730\text{ cm}^{-1}$ ) y *p*-disustitución (única banda a  $790\text{-}840\text{ cm}^{-1}$ ) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). El hecho de que no se obtenga ajuste a ninguno de éstos patrones se debe a que la estructura del carquejifenol es trisustituída, siendo su patrón por tal una combinación de las vibraciones esperadas para los casos de *o*-disustitución y *m*-disustitución.

### 3.8 Espectroscopía de UV

En ésta sección se discutirán las principales resultados obtenidos mediante espectroscopía UV para los componentes derivados del acetato de carquejilo, cuyos espectros se presentan en la sección anexo. La interpretación de las correspondientes bandas se realizará en base a las reglas de Woodward, Fieser y Scott (abreviado como WFS), las que predicen la longitud de onda del máximo correspondiente a la absorción menos energética (Fleming y Williams, 1968).

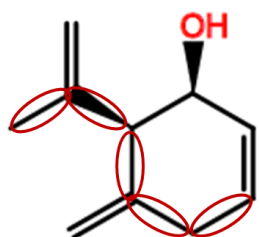
**Aceite esencial:** presentó dos bandas principales, una terminal a  $215\text{ nm}$  y un hombro a  $226\text{ nm}$ . Las mismas serían causadas debido la absorción de sistemas dieno-conjugados o componentes aromáticos presentes en el aceite (capítulo 7), ya que el compuesto mayoritario acetato de carquejilo no tiene en su estructura ningún cromóforo que sea activo (los dobles enlaces se encuentran aislados) en la región de medida del UV ( $200\text{-}800\text{ nm}$ ). Compuestos que podrían absorber en ésta longitudes de onda serían el mirceno,  $\alpha$ -felandreno, cimenos, ocimenos, metileugenol, germacreno D, etc; por lo que sus bandas se verían superpuestas en el espectro.

**Carquejol:** como en el caso del acetato de carquejilo, no presenta grupo cromofórico en su estructura, por lo cual se evidenció en el espectro UV únicamente una absorción terminal con



un máximo a 208 nm (ver anexo). Dicha banda corresponde a los dobles enlaces unidos a auxóchromos alquilo.

La transición  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los dobles enlaces aislados presenta un máximo en el entorno de 190 nm, mientras que según las reglas WFS cada grupo alquilo aporta un corrimiento batocrómico de unos 5 nm, por lo que el máximo esperado para el carquejol se encontraría a 215 nm. Debido a que los grupos alquilo no son completamente “independientes” como sustituyentes de los dobles enlaces, la aproximación del máximo en el espectro UV del carquejol es completamente válida.



**Reglas de Woodward-Fieser-Scott**

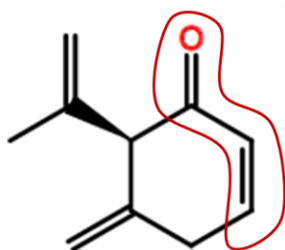
$$\lambda_{\text{max. esperada}} = [190 + (5 \times 5)] \text{ nm} = 215 \text{ nm}$$

190 nm. Base. Dobles enlaces aislados.

5 nm. Incremento por cada grupo alquilo (auxóchromo).

Una banda de absorción final a 205 nm ya había sido reportada previamente para el carquejol por Snatzke *et al.* (1969). Por su parte, Naves y Caujolle (1963) determinaron una banda a 220 nm y un hombro a 274 nm, pero aquellos obtuvieron los espectros en EtOH como solvente y no en *n*-hexano, lo que en general causa un desplazamiento batocrómico (Fleming y Williams, 1968).

**Carquejona:** a diferencia del caso anterior, en éste caso sí se presenta un cromóforo ya que la estructura de éste compuesto corresponde a una cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Según las reglas WFS se debería obtener una absorción a 227 nm. Sin embargo el máximo se observó a 220 nm, aunque con una banda muy ancha.



**Reglas de Woodward-Fieser-Scott**

$$\lambda_{\text{max. esperada}} = (215 + 12) \text{ nm} = 227 \text{ nm}$$

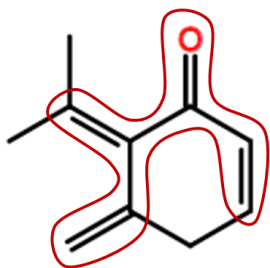
215 nm. Base. Cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en anillo hexagonal

12 nm. Incremento por resto anular alquilo en  $\beta$ .

**Iso-carquejona:** en éste caso, el sistema cromofórico es un poco diferente al anterior, ya que de acuerdo a la estructura de éste compuesto se tienen dos sistemas cetónicos  $\alpha,\beta$ -insaturados y conjugados a un doble enlace adicional. Además, se presentan en la estructura dos dobles



enlaces en posición exocíclica, lo que aumenta considerablemente la predicción del máximo de banda según las reglas WFS, con un valor de 301 nm.



#### Reglas de Woodward-Fieser-Scott

$$\lambda_{\text{max. esperada}} = [215 + 30 + 10 + (12 \times 3) + (5 \times 2)] \text{ nm} = 301 \text{ nm}$$

215 nm. Base. Cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada en anillo hexagonal

30 nm. Incremento por conjugación adicional con doble enlace

10 nm. Incremento por resto anular en  $\alpha$

12 nm. Incremento por resto anular en  $\beta$  o grupos alquilo

5 nm. Incremento por enlace exocíclico

Experimentalmente se obtuvieron dos bandas bien definidas: la primera a un máximo de 219 nm (coincidente con el máximo observado para la carquejona) y la segunda a 280 nm (ver anexo). Es normal que los sistemas tipo dieno exocíclico las predicciones de WFS sean superiores al valor experimental debido a que los orbitales  $\pi$  en éste tipo de sistemas no son coplanares, por lo que se pierde parte del efecto de la conjugación (**Fleming y Williams, 1968**).

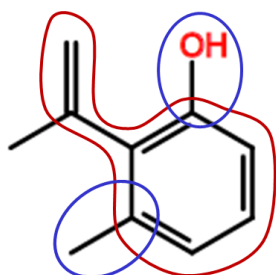
**Carquejifenol:** en éste caso la estructura presenta un cromóforo de anillo bencénico sustituido por un grupo hidroxilo, un isopropenilo y un metilo.

Como en todos los compuestos aromáticos, son esperables dos tipos de bandas en la región de 200-400 nm: una banda con máximo a 204 nm (banda I) y una banda “prohibida” a 254 nm (banda II) con estructura fina vibracional (en el caso de los compuestos aromáticos más simples) (**Fleming y Williams, 1968**). La existencia de ésta última banda se debe a la pérdida de simetría causada por las vibraciones moleculares, y en el caso de los compuestos aromáticos sustituidos involucra una transición electrónica  $0 \rightarrow 0$  (desde el estado fundamental vibracional correspondiente al estado fundamental electrónico, al estado fundamental vibracional del primer estado excitado electrónico) (**Fleming y Williams, 1968**).

En el caso de los compuestos aromáticos, las predicciones de las reglas de WFS no son tan aproximadas como para el caso de cetonas y dienos conjugados, además de que el efecto de los sustituyentes múltiples es poco predecible. Sin embargo, se ha observado que tanto la sustitución del anillo con grupos dadores de electrones como la presencia de una conjugación adicional produce un corrimiento batocrómico en las bandas del espectro UV (**Fleming y Williams, 1968**).



En el caso del carquejifenol, la presencia de un sustituyente isopropenilo aumenta la conjugación del anillo, lo que explicaría que las dos bandas del espectro UV fueran observadas a 210 nm (banda I) y 279 nm (banda II) por corrimiento batocrómico. Además, el efecto dador de electrones de los grupos hidroxilo y metilo (auxócromos) contribuiría aún más para el corrimiento hacia mayores longitudes de onda de ambas bandas.



#### Reglas de Woodward-Fieser-Scott

$\lambda_{\text{max}}$ . Ph-H: 204 nm y 254 nm

$\lambda_{\text{max}}$ . Ph-Me: 207 nm y 261 nm

$\lambda_{\text{max}}$ . Ph-OH: 211 nm y 270 nm

$\lambda_{\text{max}}$ . Ph-CH=CH<sub>2</sub>: 248 nm y 282 nm

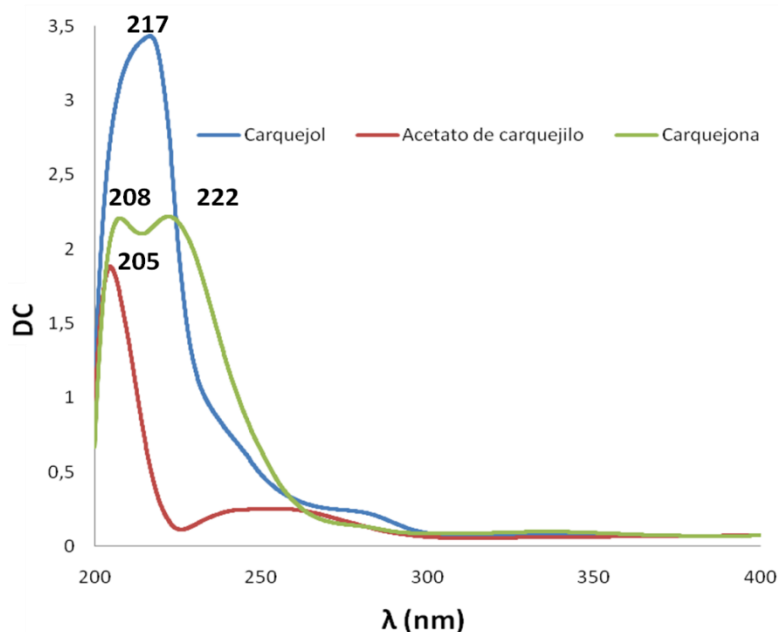
Sin embargo, el efecto del enlace conjugado adicional parece no afectar a la absorción de la banda I del carquejifenol, ya que la misma se presentó a 210 nm y no a los 248 nm esperados. Lo anterior puede deberse a que el doble enlace del grupo isopropenilo no se encuentra impedido en cuanto a su rotación, por lo cual no existe co-planaridad entre los orbitales  $\pi$  del fenilo y el orbital  $\pi$  del isopropenilo, y con ello, no es tan efectiva la conjugación.

### 3.9 Espectroscopía de DC

En la Figura 67 se presentan los espectros de DC para el acetato de carquejilo, carquejol y carquejona en el intervalo 200-400 nm.

Usualmente, la apariencia de los espectros de DC se encuentra relacionada con la presencia de grupos cromofóricos. Las bandas observadas en la Figura 67 pueden ser claramente asignadas a las transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  de los dobles enlaces aislados (sustituídos por grupos auxócromos) en el caso del carquejol y acetato de carquejilo, y conjugados a un grupo carbonilo en el caso de la carquejona (Snatzke *et al.*, 1969; Batista Jr., 2012).

Los espectros de DC calculados para los conformeros más estables del carquejol y del acetato de carquejilo (ver anexo) determinaron que la estructura que corresponde a los espectros reales es el de configuración absoluta (1*S*,6*R*); confirmando los resultados previamente obtenidos por Snatzke *et al.* (1969) respecto de la configuración absoluta de ambos compuestos.



**Figura 68:** Espectros de DC (intervalo: 200-400 nm) del acetato de carquejilo, carquejol y carquejona obtenidos experimentalmente.

#### 4. CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Como resultado del enfoque semi-sintético llevado a cabo, se obtuvieron en estado puro o semi-puro 6 monoterpenos irregulares con el esqueleto del *o*-mentano (acetato de carquejilo, carquejol, carquejifenol, carquejona, *iso*-carquejona y óxido de carquejol).

Las estructuras de la carquejona, *iso*-carquejona y el óxido de carquejol no habían sido reportadas previamente en la literatura.

La estructura de cada uno de los compuestos nombrados fue caracterizada por medio de estudios espectroscópicos (RMN, 1D y 2D), MS, IR, Raman, UV y DC; mientras que para los primeros acetato de carquejilo, carquejol y carquejifenol se realizaron estudios computacionales para predecir sus propiedades fisico-químicas en diferentes medios.

Los resultados obtenidos resaltan la importancia del enfoque semi-sintético para la obtención de estructuras novedosas a partir de productos naturales relativamente simples y de amplia disponibilidad, lo que puede ser de gran relevancia para la evaluación de actividades biológicas e identificación de moléculas potencialmente activas (capítulo 10).

#### 5. BIBLIOGRAFIA

1. P. Atkins, J. de Paula, R. Friedman. **2009**. Quanta, matter, and change: A molecular approach to physical chemistry. Oxford University Press, Oxford, UK. 782 pp.
2. S.M. Bach, M.A. Fortuna, R. Attariana, J.T. de Trimarco, C.A.N. Catalán, Y. Av-Gaya, H. Bach. **2011**. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin. *Nat. Prod. Comm.*, 6: 163-166.



3. R.F.W. Bader. **1990**. Atoms in molecules. A quantum theory. Oxford University Press, Oxford, UK. 458 pp.
4. J.M. Batista Jr. **2012**. Dicroísmo circular vibracional e eletrônico na determinação da configuração absoluta de benzopiranos de *Peperomia obtusifolia* e *Piper gaudichaudianum* (Piperaceae): implicações biológicas e biossintéticas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, SP, Brasil. 215 pp.
5. A.D. Becke. **1988**. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A*, 38: 3098-3100.
6. B.H. Besler, K.M. Merz Jr., P.A. Kollman. **1990**. Atomic charges derived from semiempirical methods. *J. Comp. Chem.*, 11: 431-439.
7. F. Biegler-Köning, J. Schönbohm, D. Bayle. **2001**. AIM2000; a program to analyze and visualize atoms in molecules. *J. Comput. Chem.*, 22: 545-559.
8. F. Bohlmann, C. Zdero. **1969**. Über neue terpenoide aus *Baccharis trimera*. *Tetrahedron Lett.*, 28: 2419-2421.
9. F. Caujolle, D. Meynier, Pham-Huu-Chanh. **1960a**. Toxicité du carquejöl. *Ann. Pharm. Fr.*, 18: 715-725.
10. F. Caujolle, D. Meynier, J. Cros. **1960b**. Pharmacological study of carquejöl and its derivatives. *Thérapie*, 15: 931-939.
11. F. A. Carey. **2008**. Química orgánica. Sexta Edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F., México. 1421 pp.
12. M.S. Carpenter, W.M. Easter. **1955**. The isopropyl cresols. *J. Org. Chem.*, 20: 401-411.
13. S. Coffey (ed.). **1968**. Rodd's chemistry of carbon compounds. Volume II: alicyclic compounds. Part B: Six and Higher-membered monocarbocyclic compounds. Second Edition. Elsevier Publishing Company; Amsterdam, The Netherlands; pp. 193.
14. P.M. Dewick. **2009**. Medicinal natural products. A biosynthetic approach. 3<sup>rd</sup> edition. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, UK. 539 pp.
15. W.W. Epstein, L.A. Gaudioso, G.B. Brewster. **1984**. Essential oil constituents of *Artemisia tridentata rothrockii*. The isolation and characterization of two new irregular monoterpenes. *J. Org. Chem.*, 49: 2748-2754.
16. W.W. Epstein, M.A. Klobus, A.S. Edinson. **1991**. Irregular monoterpene constituents of *Artemisia tridentata canna*. The isolation, characterization and synthesis of two new chrysanthemyl derivatives. *J. Org. Chem.*, 56: 4451-4456.
17. R. Enríquez, J. Taboada, I. Salazar, E. Díaz. **1973**. NMR Stereotopic induced shifts in epimeric mixtures. *Org. Magn. Reson.*, 5: 291-293.
18. D.L.A. Faria, M.C. Afonso, H.G.M. Edwards. **2002**. Espectroscopia Raman: uma nova luz no estudo de bens culturais. *Rev. do Museu de Arqueologia e Etnologia, São Paulo*, 72: 249-267.
19. M.G. Ferretti-Alloise, A. Jacot-Guillarmont, Y.R. Naves. **1970a**. Contribution à la connaissance des *o*-menthols et des *o*-menthones (carquéjanols et carquéjanones). 1<sup>ère</sup> communication. *Helv. Chim. Acta*, 53: 201-208.
20. M.G. Ferretti-Alloise, A. Jacot-Guillarmont, Y.R. Naves. **1970b**. Contribution à la connaissance des *o*-menthols et des *o*-menthones (carquéjanols et carquéjanones). 2<sup>º</sup> communication. *Helv. Chim. Acta*, 53: 551-555.
21. M.G. Ferretti-Alloise, A. Jacot-Guillarmont, Y.R. Naves. **1970c**. Contribution à la connaissance des *o*-menthols et des *o*-menthones (carquéjanols et carquéjanones). 3<sup>º</sup> communication. *Helv. Chim. Acta*, 53: 1339-1347.
22. L.F. Fieser, M. Fieser. **1967**. Reagents for organic synthesis. John Wiley & Sons, New York, NY, USA; pp. 135.
23. I. Fleming, D.H. Williams. **1968**. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Ediciones Umo, Bilbao, España. 223 pp.
24. M.J. Frisch et al. **2009**. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, USA.
25. W.S. Gallaway, M.J. Murray. **1948**. Isomerization of certain olefins by silica gel at room temperature. *J. Am. Chem. Soc.*, 70: 2584-2586.
26. M. González de la Parra, A.L. Anaya, F. Espinosa, M. Jiménez, R. Castillo. **1981**. Allelopathic potential of *Piqueria trinervia* (Compositae) and piquerols A and B. *J. Chem. Ecol.* 7: 509-515.
27. L. Henning, G.M. García, A. Giannis, R.W. Bussmann. **2011**. New constituents of *Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers. *Arkivoc*, 6: 74-81.
28. G.L.K. Hunter, W.B. Brogden Jr. **1963**. Isomerization and disproportionation of d-limonene on silica gel. *J. Org. Chem.*, 28: 1679-1682.
29. C.W. Jefford, A. Roussel, S.M. Evans. **1975**. An anomalous oxidation of  $\beta$ -pinene. *Helv. Chim. Acta*, 58: 2151-2160.





30. C. Jelsch, Y.B.M. Bisseyou. **2017**. Atom interaction propensities of oxygenated chemical functions in crystal packings. *IUCrJ*, 4: 158-174.
31. M. Jiménez-Estrada, A. Navarro, M.V. Flores, R.R. Chilpa, B. Hernández, A.L. Anaya, B. Lotina-Hennsen. **1996**. Transformation of Terpene Piquerol A to Hydroquinone and Phenolic Derivatives. Effect of These Compounds on Weeds. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 2839-2841.
32. P. Kočovský. **1994**. Stereochemistry of epoxidation of allylic and homoallylic cyclohexene alcohols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 1: 1759-1763.
33. A. Kumar, S.P. Singh, R.S. Bhakuni. **2005**. Secondary metabolites of *Chrysanthemum* genus and their biological activities. *Curr. Sci.*, 89: 1489-1501.
34. C. Lee, W. Yang, R.G. Parr. **1988**. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density. *Phys. Rev. B*, 37: 785-789.
35. J.G. Millar, S.L. Midland, J.S. McElfresh, K.M. Daane. **2005**. (2,3,4,4-tetramethylcyclopentyl)methyl acetate, a sex pheromone from the obscure mealybug: first example of a new structural class of monoterpenes. *J. Chem. Ecol.*, 31: 2999-3005.
36. Y.R. Naves. **1959**. Etudes sur les matières végétales volatiles. CLIX (1). Sur l'huile essentielle de Carqueja de l'Etat de Santa Catarina (Brésil). *Bull. Soc. Chim. France*, 1871-1879.
37. Y.R. Naves, F. Caujolle. **1963**. Therapeutic d-ortho-menthatriene-1(7),5,8-ol-3. *US Patent*, 3112245.
38. A.B. Nielsen, A.J. Holder. **2008**. Gauss View 5.0, User's Reference, GAUSSIAN Inc., Pittsburgh, PA, USA.
39. V. Nurnberg. **1997**. Estudo fitoquímico de *Baccharis myriocephala* e uso de  $\beta$ -pineno para a obtenção de orto-mentanos. Tese de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, Brasil. 132 pp.
40. A.O. Ortolan. **2014**. Apostila de práticas de química computacional. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, PR, Brasil. 88 pp.
41. D.J. Pasto, C.R. Johnson. **1974**. Determinación de estructuras orgánicas. Editorial Reverté S.A., Barcelona, España; pp 409-410.
42. A.M. Pohlit, H.M.C. Ferraz. **1995**. Estudos de RMN de epóxidos: uma visão geral. *Quim. Nova*, 18: 160-170.
43. C.D. Poulter. **1990**. Biosynthesis of non-head-to-tail terpenes. Formation of 1'-1 and 1'-3 linkages. *Acc. Chem. Res.*, 23: 70-77.
44. B. Ranjbar, P. Gill. **2009**. Circular dichroism techniques: biomolecular and nanostructural analyses- a review. *Chem. Biol. Drug Des.*, 74: 101-120.
45. E. Romano, A.B. Raschi, A.M. Benavente, S.A. Brandán. **2011**. Structural analysis, vibrational spectra and coordinated normal of 2*R*-(-)-6-hydroxytremetone. *Spectrochim. Acta A*, 84: 111-116.
46. E. Romano, M.V. Castillo, J. Pergomet, J. Zinczuk, S.A. Brandán. **2013**. Synthesis, structural study and spectroscopic characterization of a quinolin-8-yloxy derivative with potential biological properties. *Open J. Synth. Theory Appl.*, 2: 8-22.
47. Y. Rufino-González, M. Ponce-Macotela, M. Jiménez-Estrada, C.N. Jiménez-Fragoso, G. Palencia, G. Sansón-Romero, A. Anzo-Osorio, M.N. Martínez-Gordillo. **2017**. *Piqueria trinervia* as a source of metabolites against *Giardia intestinalis*. *Pharm. Biol.*, 55: 1787-1791.
48. L. Ruzicka, M. Stoll. **1922**. Höhere Terpenverbindungen VII. Konstitution des Eudalins, des Selinens und des dantalens. Das Kohlenstoffgerüst der Sesquiterpene. *Helv. Chim. Acta*, 5: 923-936.
49. L. Ruzicka. **1953**. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, 9: 357-396.
50. R. Sangaiah, G.S.K. Rao. **1981**. Revision of the structure assigned to a monoterpene isolated from *Piqueria trinervia*. *Tetrahed. Lett.*, 22: 1843-1844.
51. J. Seibl. **1973**. Espectrometría de masas. Editorial Alhambra, Madrid, España. 228 pp.
52. C.A. Simões-Pires, S. Debenedetti, E. Spegazzini, L.A. Mentz, N.I. Matzenbacher, R.P. Limberger, A.T. Henriques. **2005**. Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach. *Plant Syst. Evol.*, 253: 23-32.
53. G. Sntzke, A.F. Thomas, G. Ohloff. **1969**. Die absolute Konfiguration von Carquejol und verwandten *o*-Menthane-Derivaten. *Helv. Chim. Acta*, 52: 1253-1258.
54. V. Theodorou, K. Skobridis, A.G. Tzakos, V. Ragoussis. **2007**. A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Lett.*, 48: 8230-8233.
55. A.F. Thomas. **1967**. La configuration du "carquejol" (isopropényl-2-méthylène-3-cyclohexène-4-ol) et la conformation privilégiée de l'ortho-néo-isomentol. *Helv. Chim. Acta*, 50: 963-978.
56. A. Urzúa, M.C. Rezende, C. Mascayano, L. Vasquez. **2008**. A structure-activity study of antibacterial diterpenoids. *Molecules*, 13: 882-891.



## Capítulo 9

# Relevancia de los compuestos poliacetilénicos en *Baccharis* spp. L.

**Resumen:** En el capítulo 4 de éste trabajo de tesis se informó que el porcentaje de identificación alcanzado en el perfil volátil de la especie *Baccharis palustris* por medio del análisis por *GC-MS* convencional (analizador de cuadrupolo), fue bajo (21,1%). Las características de fragmentación de los espectros de masa de sus componentes principales fueron inusuales, descartando la posibilidad que se trate de terpenos y sugiriendo la presencia de poliacetilenos. Por este motivo se decidió seleccionar al aceite de *B. palustris* como modelo para el estudio de la incidencia de éste tipo de componentes en *Baccharis* spp. L. En primer lugar se expondrán conceptos introductorios sobre poliacetilenos naturales y su presencia en *Baccharis* spp., para posteriormente describir brevemente las características de su biosíntesis y la actividad biológica. A continuación se presentará la extracción y análisis (IR, UV, RMN, *GC-MS*) del aceite esencial de *B. palustris* rico en poliacetilenos. Como resultado de la interpretación de la información espectroscópica, se presentará la identificación del compuesto C<sub>9</sub> diacetilénico 1-nonen-3,5-diino (65,0% en el aceite esencial, compuesto mayoritario); así como la presencia de otros componentes C<sub>9</sub> análogos [1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino; 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino; y 3,5-nonadiino] en el aceite. Se describirá asimismo el aislamiento y elucidación estructural del éster de (*Z*)-lachnophyllum de la especie *Conyza bonariensis* (Asteraceae) como estándar poliacetilénico, y la posterior identificación de los ésteres isómeros (*Z*)- y (*E*)-lachnophyllum diasteroméricos en el aceite esencial de *B. palustris*. Finalmente, el estudio mediante *MS-MS/IT* (analizador de trampa de iones) del 1-nonen-3,5-diino permitió constatar la “polimerización” (formación de aductos de combinación) en las condiciones de análisis, lo cual es un comportamiento típico de ésta clase de compuestos poliacetilénicos.

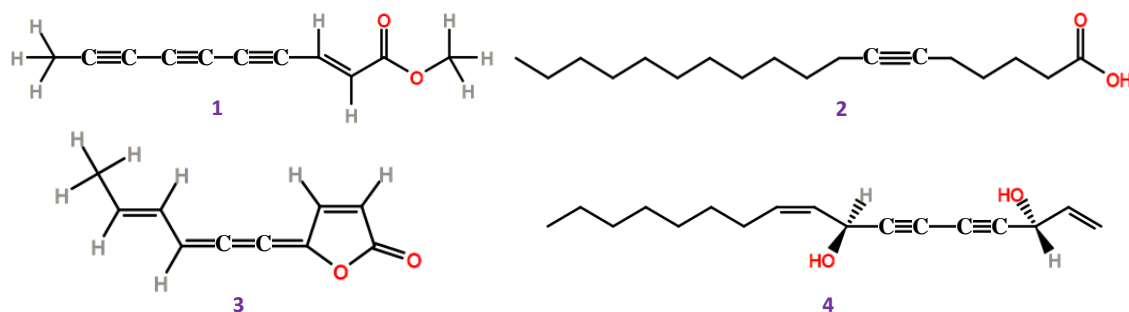
### 1 INTRODUCCION

#### 1.1 Poliacetilenos naturales y su ocurrencia en *Baccharis* spp.

A pesar de no ser técnicamente preciso, se emplea generalmente el término “poliacetilenos” para referirse a todos aquellos compuestos naturales altamente especializados que poseen al menos un enlace triple carbono-carbono (Minto y Blacklock, 2008). Los poliacetilenos se



encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, con ocurrencia en plantas, musgos, líquenes, hongos, algas marinas, esponjas, tunicados, insectos, anfibios, e incluso en concentraciones a nivel de traza en el metabolismo humano (Minto y Blacklock, 2008). Históricamente, el primero de los poliacetilenos naturales aislado de una fuente vegetal fue el éster metílico de (*E*)-dehidro-matricaria ( $C_{10}$ ) [metil (*2E*)-deca-2-en-4,6,8-triinoato] (1; Figura 1) en 1826, pero su identificación como derivado alquiníco se realizó más de 80 años después (Sørensen, 1977). Por ello, el primer producto natural vegetal fielmente caracterizado como poliacetileno (en realidad un monoacetileno) fue el ácido tarírico ( $C_{18}$ ) (2; Figura 1) en 1892 (Minto y Blacklock, 2008).



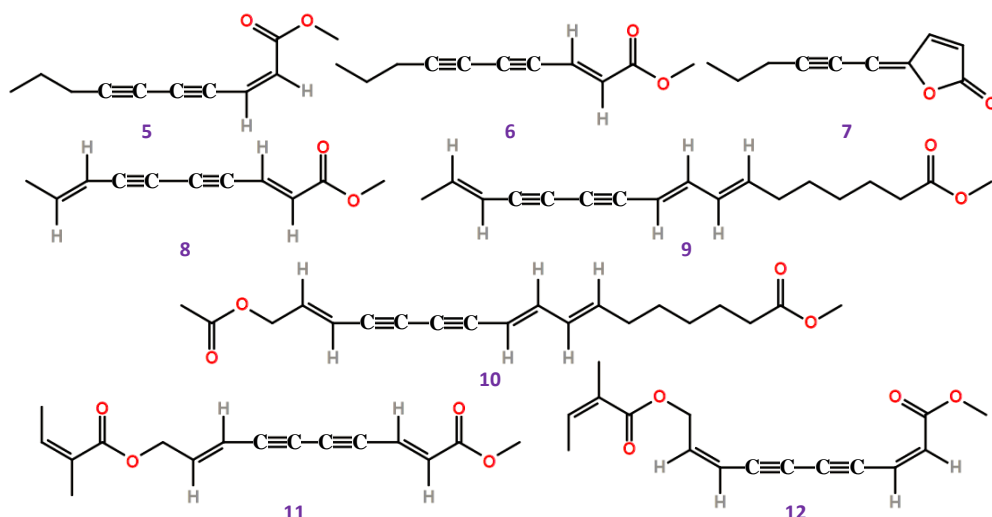
**Figura 1:** Poliacetilenos y cumulenos presentes en plantas. Referencias: (1): éster de (*E*)-dehidro-matricaria, (2): ácido tarírico; (3): lactona cumulena aislada de *C. bonariensis*; (4): falcarindiol. Fuentes: Christensen y Lam (1991), y, Minto y Blacklock (2008).

Otro tipo de productos naturales vegetales íntimamente relacionados a los poliacetilenos son los cumulenos y polienos. Los primeros presentan una estructura poli-alénica con dobles enlaces múltiples continuados (“acumulados”) y conjugaciones con dobles enlaces entre sí, como en el caso de la lactona **3** aislada de *Conyza bonariensis* (“yerba carnícer”) (Figura 1) (Bohlmann *et al.*, 1965; Christensen y Lam, 1991). Los polienos por su parte son compuestos que presentan una larga cadena hidrocarbonada con dobles enlaces conjugados, como es el caso del  $\beta$ -caroteno (capítulo 1) (Christensen y Lam, 1991). Tanto los poliacetilenos como cumulenos y polienos son compuestos que debido a sus funcionalidades altamente poli-insaturadas tienden a ser químicamente inestables, sufriendo descomposición oxidativa, fotolítica, reacciones ácido-base y polimerización (Bohlmann *et al.*, 1965; Christensen y Lam, 1991; Minto y Blacklock, 2008). Por lo tanto, el aislamiento y caracterización estructural de éste tipo de productos naturales vegetales ha sido dificultoso (Bohlmann *et al.*, 1965; Christensen y Lam, 1991; Minto y Blacklock, 2008).



Los poliacetilenos se encuentran presentes en plantas asociados principalmente a siete familias de angiospermas: Apiaceae, Araliaceae, Asteraceae, Campanulaceae, Pittosporaceae, Olaceae y Santalaceae (Hansen y Boll, 1986; Christensen y Lam, 1991; Christensen y Brandt, 2006). Un par de poliacetilenos de amplia distribución en éstas familias son el falcarindiol (4) y su precursor, el alcohol facarinol (Figura 1) (Hansen y Boll, 1986; Christensen y Brandt, 2006; Minto y Blacklock, 2008). Sin embargo, la familia Asteraceae es la más rica y diversa en éste tipo de componentes, con más de 1100 poliacetilenos reportados de los poco más de 2000 de éstos productos naturales conocidos (Minto y Blacklock, 2008). De acuerdo a los reportes disponibles en la literatura, la distribución de poliacetilenos en las tribus Asterinae y Baccharinae (Asteraceae) es bastante homogénea, mientras que para el caso de las otras tribus y sub-tribus la presencia es altamente heterogénea (Christensen y Lam, 1991). Debido a ello, la presencia de poliacetilenos en una determinada especie o grupo de especies tiene un interés quimiotaxonómico intrínseco, así como una significancia desde el punto de vista fisiológico, farmacológico, ecológico y ambiental.

Los poliacetilenos más comúnmente hallados en la subtribu Baccharinae, género *Baccharis* L. son los ésteres metílicos C<sub>10</sub> (5, 6) y lactonas (7) de lachnophyllum, y los ésteres metílicos de matricaria C<sub>10</sub> (8) (Figura 2). Alguna de las especies en que se han identificado incluyen a: *B. alaternoides*, *B. calvescens*, *B. cassinaefolia*, *B. concava*, *B. conferta*, *B. linearis*, *B. paniculata*, *B. pedunculata*, *B. pilularis*, *B. quitensis*, *B. sternbergiana*, *B. subdentata*, *B. tricuneata* y *B. trinervis* (Montenegro *et al.*, 1966; Christensen y Lam, 1991; Faini *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.* 2004; Sobrinho *et al.*, 2016). Sin embargo, algunos ésteres metílicos en C<sub>17</sub> (como el 9 y el 10 de la Figura 2) son de ocurrencia restricta y han sido aislados de *B. trinervis* y *B. trinervis* var. *rhexoides* (Christensen y Lam, 1991). Asimismo, en *B. quitensis* han sido identificados tres ésteres poliacetilénicos isoméricos del ácido angélico, mientras que otro isómero se ha reportado para *B. eleagnoides* (11, 12 y sus isómeros geométricos) (Rehder *et al.*, 1990; Christensen y Lam, 1991).

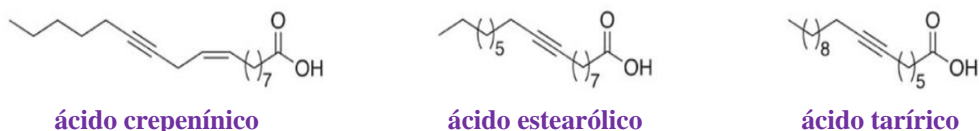


**Figura 2:** Algunos poliacetilenos identificados en *Baccharis* spp. L. Referencias: (5): éster de (Z)-lachnophyllum, (6): éster de (E)-lachnophyllum; (7): lactona de lachnophyllum; (8): éster de (E,E)-matricaria; (9 y 10): ésteres  $C_{17}$  aislados de *B. trinervis*; (11 y 12): ésteres aislados de *B. quitensis* y *B. eleagnoides*, respectivamente. Fuente: Christensen y Lam (1991).

De acuerdo a lo expuesto, se puede apreciar una uniformidad en la presencia de poliacetilenos en el género *Baccharis* L. que lo relaciona quimiotaxonómicamente a varios géneros de la subtribu Asterinae; aspecto que no es aparente si se analiza la quimiotaxonomía de otro tipo de metabolitos secundarios como diterpenos y triterpenos, flavonoides o derivados *p*-hidroxiacetofenónicos (Christensen y Lam, 1991). A pesar de ello, la presencia de compuestos poliacetilénicos en aceites esenciales de *Baccharis* spp. es muy inusual, habiéndose reportado hasta la fecha únicamente la presencia de los ésteres de lachnophyllum en el aceite obtenido de partes aéreas de *B. trinervis* (Montenegro *et al.*, 1966; Albuquerque *et al.* 2004; Sobrinho *et al.*, 2016).

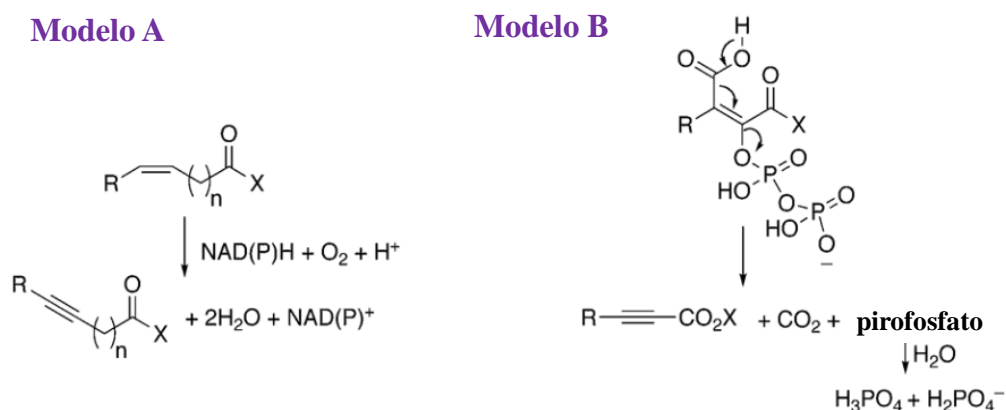
## 1.2 Biosíntesis de poliacetilenos en plantas

En la biosíntesis de los poliacetilenos en plantas, se han identificado tres ácidos grasos alquínicos que son intermediarios clave para generar la amplia variedad de compuestos poliacetilénicos conocidos: ácidos crepenínico, estearólico y tarírico (Figura 3) (Christensen y Lam, 1991; Minto y Blacklock, 2008).



**Figura 3:** Ácidos grasos alquínicos identificados como intermediarios claves para el origen de la diversidad de poliacetilenos en plantas. Fuente: Minto y Blacklock (2008).

Sin embargo, el aspecto crucial para la biosíntesis de poliacetilenos es la formación del enlace  $C\equiv C$  (actividad acetilénasa), para lo cual en la literatura se encuentran dos modelos explicativos propuestos: el de la deshidrogenación asistida por  $O_2$  gaseoso de un alqueno precursor (ruta de desaturación; modelo A), y el de descarboxilación de un enol activado (modelo B) (Figura 4) (Minto y Blacklock, 2008).



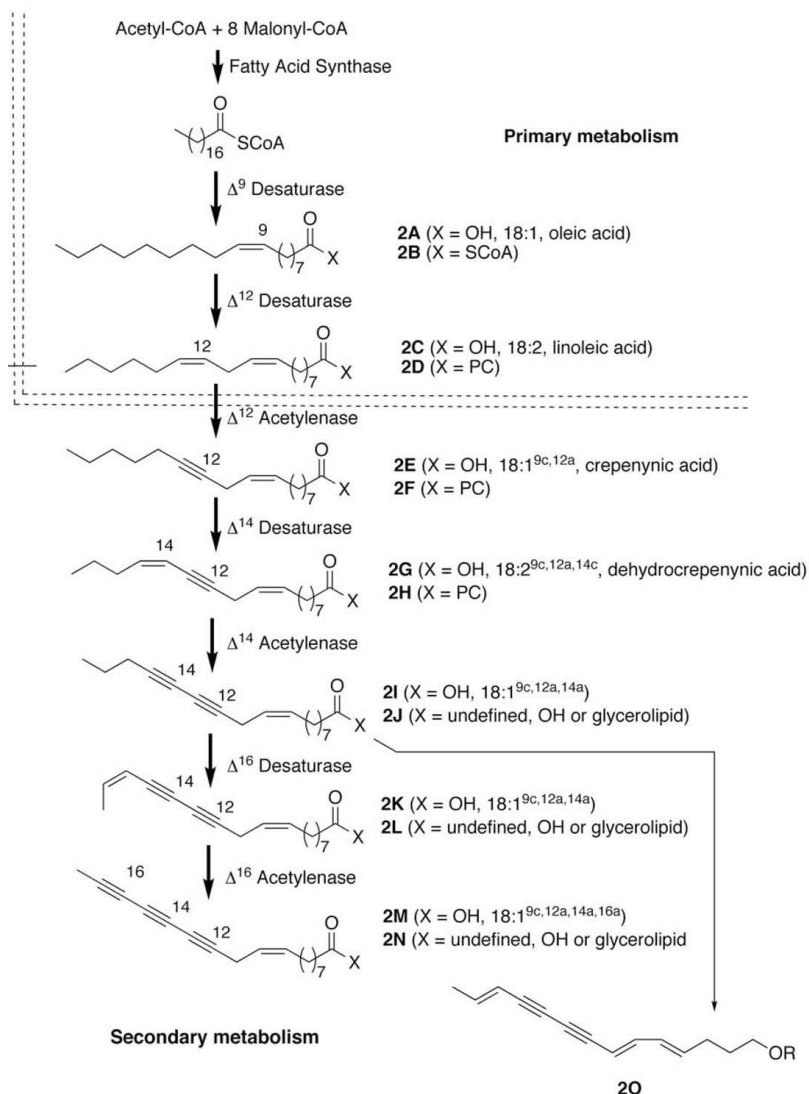
**Figura 4:** Modelos propuestos para el paso inicial de biosíntesis de poliacetilenos en plantas (formación del enlace  $C\equiv C$  a partir de un enlace  $C=C$ ). Modelo A: ruta de desaturación; Modelo B: ruta de descarboxilación de un enol activado. Fuente: Minto y Blacklock (2008).

El primer modelo operaría sobre los ácidos grasos instaurados de cadena completa (por ejemplo, el ácido oleico); mientras que el segundo modelo tendría lugar en la formación de ácidos grasos poliacetilénicos *de novo*, principalmente durante el proceso de elongación de cadena (Minto y Blacklock, 2008). Si bien la mayoría de los experimentos que se han llevado a cabo sobre la biosíntesis de ácidos grasos poliacetilénicos son consistentes con la ruta de desaturación (modelo A), la hipótesis de la descarboxilación (modelo B) sigue siendo válida para ácidos grasos poliacetilénicos derivados de policétidos (Minto y Blacklock, 2008).

La ruta biosintética del ácido crepenínico se encuentra frecuentemente presente en plantas y tiene su origen en el metabolismo primario de los ácidos grasos (Figura 5), divergiendo de éste (e iniciando el metabolismo secundario) por la conversión del ácido linoleico (18:2) a

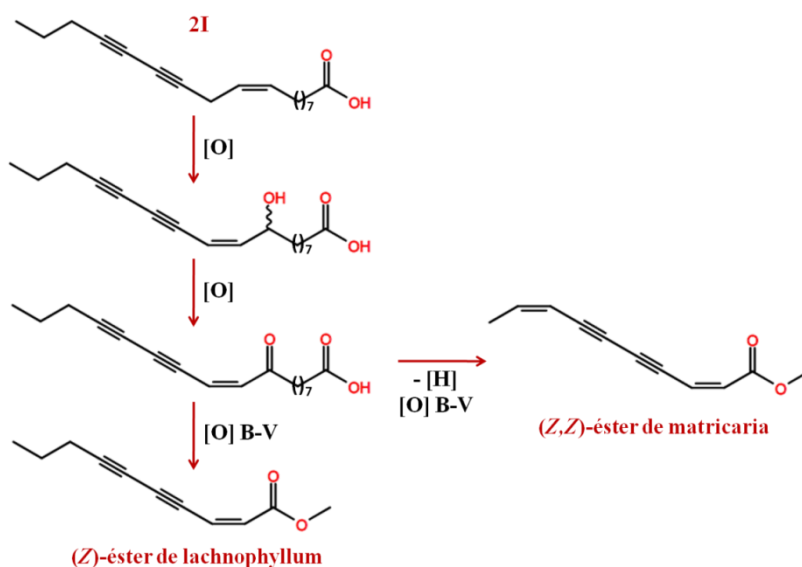


ácido crepenínico ( $C_{12}\equiv C_{13}$ ) (estructura **2E** de la Figura 5) por acción de una enzima  $\Delta$ -12 acetilnasa (**Minto y Blacklock, 2008**).



**Figura 5:** Ruta de biosíntesis del ácido crepenínico en plantas. Fuente: *Minto y Blacklock (2008)*.

Todos los poliacetilenos de las Asteraceae derivan de la ruta del ácido crepenínico, a través de pasos de acortamiento de cadena por  $\beta$ -oxidación y deshidrogenación para crear los enlaces  $C\equiv C$  (**Christensen y Lam, 1991; Minto y Blacklock, 2008**). En particular, los poliacetilenos  $C_{10}$  ampliamente distribuidos en las Asteraceae son biosintetizados de los precursores  $C_{18}$  a través de 4 pasos de  $\beta$ -oxidación, o por oxidación directa de Baeyer-Villinger (Figura 6) (**Christensen y Lam, 1991**). Por ejemplo, en la biosíntesis del (*Z*)-éster de lachnophyllum [metil (*Z*)-dec-2-en-4,6-diinoato] y del (*Z,Z*)-éster de matricaria se parte del ácido graso intermediario  $C_{18}$  poliacetilénico nombrado como **2I** en la Figura 5, el que tiene en su estructura dos triples enlaces ( $\Delta$ -12, 14) y uno doble ( $\Delta$ -9) (**Christensen y Lam, 1991**).



**Figura 6:** Ruta de biosíntesis del (Z)-éster de lachnophyllum y del (Z,Z)-éster de matricaria a partir de un intermediario de la vía del ácido crepenínico (2I; Figura 5). Referencias: [O]: oxidación; [H]: deshidrogenación (formación de C=C); [O] B-V: oxidación de Baeyer-Villinger. Fuente: Christensen y Lam (1991).

En general, el ácido crepenínico no se acumula en plantas pero puede ser encontrado en algunos aceites de semillas, como por ejemplo en *Crepis* spp. y otras especies de Asteraceae (Minto y Blacklock, 2008). Como en todas las rutas biosintéticas del metabolismo secundario, la del ácido crepenínico también depende de los factores exógenos (condiciones ambientales) y endógenos (genética y fisiología de la planta) (capítulo 6). Por ejemplo, en estudios realizados sobre la especie *Chrysanthemum flosculosum* (Asteraceae) se demostró que la síntesis del ácido crepenínico es activada apenas acabada la floración y alcanza un máximo entre los 14-28 días posteriores (fructificación), sugiriendo algún tipo de función de defensa química de las estructuras reproductivas (Minto y Blacklock, 2008).

Por otra parte, las rutas metabólicas que generan los ácidos estearóico y tártrico (y sus derivados) se encuentran íntimamente relacionadas a la del ácido crepenínico, aunque la actividad acetilasa se da en posiciones diferentes en la cadena de ácido graso (Minto y Blacklock, 2008). Una característica fundamental de los productos de la ruta del ácido estearóico es la estereoquímica *trans* de los dobles enlaces, lo que no se observa para el caso de la vía del ácido crepenínico (donde predomina la estereoquímica *cis*), por lo que los productos de una y otra ruta pueden ser fácilmente identificados (Minto y Blacklock, 2008). Por último, lo que diferencia a la ruta del ácido tártrico (Figura 4) de las anteriores es que la misma no parte del ácido oleico (C18:1,  $\Delta$ -9), sino que se origina a partir de su isómero





posicional ácido petroselénico (C18:1,  $\Delta$ -6), el que es abundante en las Apiaceae, Araliaceae y Simarubiaceae (Minto y Blacklock, 2008).

### 1.3 Bioactividad de los poliacetilenos naturales

Los poliacetilenos se caracterizan por ser biológicamente activos en la naturaleza ya sea en ecosistemas terrestres como acuáticos. Compuestos como el falcarinol y el falcarindiol ejercen una eficaz actividad inhibitoria del crecimiento de hongos fitopatógenos y de la germinación de sus esporas, alterando la integridad de la membrana plasmática de los mismos (Hansen y Boll, 1986; Christensen y Brandt, 2006; Minto y Blacklock, 2008).

Los resultados de investigación han concluido que los poliacetilenos se biosintetizan como respuesta a la infección fúngica (es decir, son elicitados; aunque existen algunos metabolitos constitutivos), por ejemplo en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*; Solanaceae) en donde los mismos no han sido detectados en plantas sanas pero sí en infectadas (Hansen y Boll, 1986; Christensen y Brandt, 2006; Minto y Blacklock, 2008). La acumulación de poliacetilenos en canales oleosos superficiales presentes en todos los órganos vegetales, parecen confirmar éste rol como defensas químicas (Minto y Blacklock, 2008). Tal función defensiva no se limita a los hongos, sino que éste tipo de metabolitos secundarios también son anti-alimentarios contra insectos herbívoros, así como en general tienen efectos insecticidas potentes cuando son activados mediante luz UV (Minto y Blacklock, 2008). Adicionalmente, los poliacetilenos tienen una función como alelopáticos, siendo liberados (exudados) por una especie vegetal a nivel de raíces directamente al suelo para inhibir el crecimiento de otra (Minto y Blacklock, 2008).

Como el resto de los metabolitos secundarios, los poliacetilenos presentan una dinámica de variación estacional y de variación en los diferentes órganos de la planta, encontrándose en mayor proporción particularmente en los brotes jóvenes como consecuencia de su papel como defensas químicas y como protectores contra el estrés abiótico (capítulo 6) (Hansen y Boll, 1986; Fainiet *al.*, 1999; Minto y Blacklock, 2008).

Algunos efectos farmacológicos benéficos para la salud humana de los poliacetilenos son como: anestésicos, anti-inflamatorios (por modulación de la producción de prostaglandinas), antibacterianos y principalmente citotóxicos, previniendo ciertas formas de cáncer o retardando el desarrollo de tumores por inhibición del ciclo celular (Hansen y Boll, 1986; Christensen y Brandt, 2006; Dembistky, 2006; Minto y Blacklock, 2008).



Desde el punto de vista toxicológico y debido a su carácter hidrófobo, el falcarindiol y el falcarinol producen hemólisis en los eritrocitos humanos ya que se intercalan en la bicapa lipídica desintegrándola y generando micelas (Hansen y Boll, 1986; Minto y Blacklock, 2008). Algunos poliacetilenos tienen una gran neurotoxicidad y han sido empleados con finalidades poco éticas como venenos; por ejemplo en el caso de la oenantotoxina y la cicutoxina aisladas de las especies *Oenanthe crocata* y *Cicuta* spp. (Apiaceae), las que causan convulsiones violentas que conducen a la muerte en pocos minutos (Christensen y Brandt, 2006; Minto y Blacklock, 2008).

Algunos poliacetilenos C<sub>17</sub> (incluido el falcarinol) han sido descritos por sus efectos alérgicos a nivel de piel, produciendo dermatitis de contacto y reacciones de irritación (Christensen y Brandt, 2006). Tal efecto es causado debido a que en las condiciones biológicas los poliacetilenos se transforman en carbocationes muy estabilizados, siendo por tal fuertes agentes alquilantes de proteínas y otras biomoléculas (Christensen y Brandt, 2006; Minto y Blacklock, 2008). Este mecanismo podría explicar el conjunto de bioactividades observado para los poliacetilenos.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Esquema general de trabajo

Como se presentó en el capítulo 4, los tres principales componentes del perfil volátil obtenido mediante *SDE* de *B. palustris* (con porcentajes de abundancia de 52,7%, 14,4% y 5,3%) no fueron identificados empleando *GC-MS* y comparación con bibliotecas de espectros de masa. Con éste enfoque primario sólo fue posible identificar 21,1% de dicho volatilo, siendo el menor porcentaje de identificación de todas las especies y muestras de *Baccharis* spp. analizadas en el marco de éste trabajo de tesis.

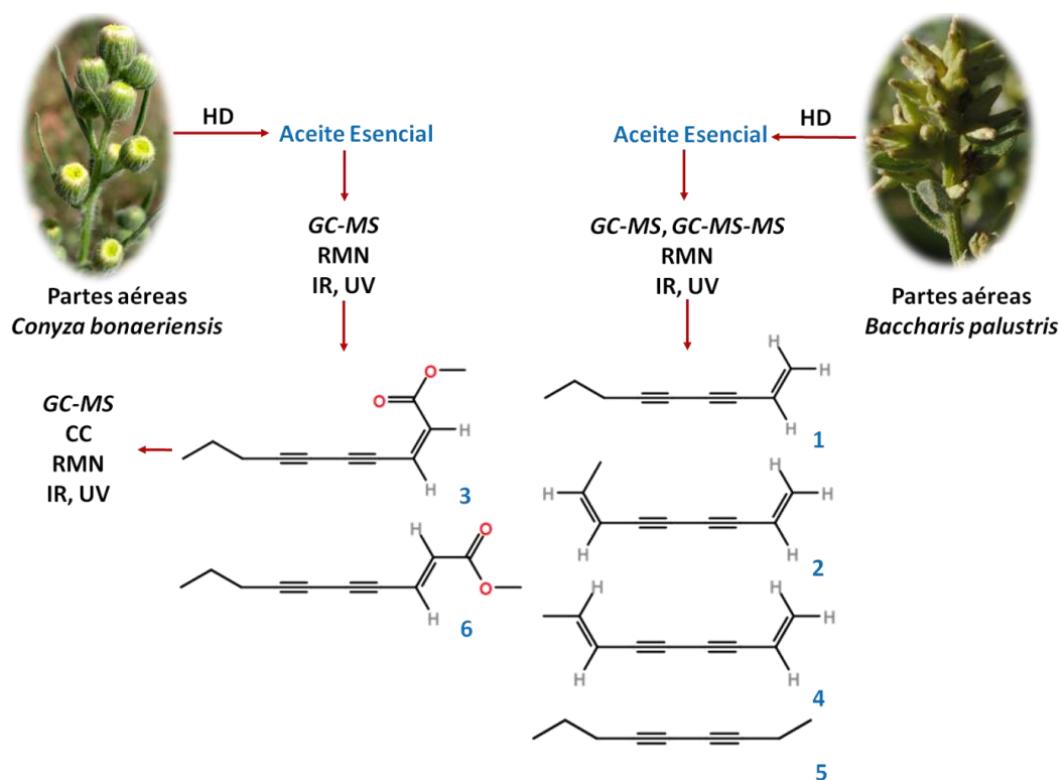
Para poder dilucidar la estructura de los componentes mayoritarios, se empleó un enfoque analítico con diferentes técnicas espectroscópicas de elucidación estructural, que se detalla en el esquema de la Figura 7.

El aceite esencial de partes aéreas de *B. palustris* se obtuvo por hidrodestilación en cantidad suficiente para ser estudiado en bruto mediante diferentes técnicas: IR, UV, RMN, *GC-MS* y *GC-MS-MS*; de manera de poder acumular la mayor cantidad de información posible sobre la composición de la muestra. El análisis primario por *GC-MS* del aceite esencial obtenido en éstas condiciones demostró la presencia de los mismos tres componentes desconocidos en porcentajes de abundancia de 65,0%, 17,8% y 4,3%; respectivamente.



Debido a un hecho fortuito, como parte de otro trabajo de investigación, el último de éstos componentes también se detectó en el aceite esencial de la especie *Conyza bonariensis* (Asteraceae), aunque en un porcentaje de abundancia significativamente mayor (32,0%). De ésta manera, a partir de éste último aceite se realizó el aislamiento de dicho componente desconocido mediante cromatografía en columna (CC). El producto obtenido tuvo una pureza del 94,0 % que permitió su elucidación estructural por métodos espectroscópicos (UV,  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -RMN y *MS*), confirmando posteriormente su presencia en el aceite esencial de *B. palustris*.

Finalmente, se identificaron los tres componentes desconocidos principales de *B. palustris* como los poliacetilenos: 1-nonen-3,5-diino (compuesto **1** en la Figura 7); 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino (**2**); y (*Z*)-éster de lachnophyllum (**3**). Con ésta información, y realizando un detallado análisis de espectros de masa, fue posible la identificación tentativa en el aceite de *B. palustris* de: 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino (compuesto **4** en la Figura 7), 3,5-nonadiino (**5**) y del (*E*)-éster de lachnophyllum (**6**), los que se encontraron presentes en el aceite en porcentajes de abundancia de 1,5%, 0,7% y 0,2%, respectivamente.



**Figura 7:** Esquema general de trabajo para dilucidar la estructura de los compuestos poliacetilénicos de *Baccharis palustris*. Se partió del aceite esencial de ésta última especie y de *C. bonariensis*, y se estudió los mismos en bruto mediante IR, UV, RMN, GC-MS y GC-MS-MS. En el caso del aceite de *C. bonaerensis*, el compuesto 3 se aisló por CC y también fue analizado espectroscópicamente. Referencias: HD: hidrodestilación.



1. 1-nonen-3,5-diino; 2. 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino; 3. (Z)-éster de *lachnophyllum*; 4. 1,7(E)-nonadien-3,5-diino; 5. 3,5-nonadiino; 6. (E)-éster de *lachnophyllum*.

Finalmente, como resultado del enfoque analítico aplicado fue posible identificar el 97,6% del perfil volátil de *B. palustris* presentado en el capítulo 4, y el 99,3% del aceite esencial obtenido en el marco de éste capítulo.

## 2.2 Material vegetal

Partes aéreas de *Baccharis palustris* Heering fueron colectadas en una zona de bañados de la localidad de Paso Carrasco (Departamento de Montevideo, Uruguay) en estado de floración (FL) en enero de 2013 (capítulo 4) y en estado vegetativo en junio de 2016 (VE). La identificación del material vegetal fue realizada por el Ing. Agr. A. González (Departamento de Botánica, Museo Nacional de Historia Natural, Uruguay).

## 2.3 Extracción y análisis de la composición volátil de *B. palustris*

Para el caso de la primera colecta (muestra en floración de partes aéreas) se realizó una extracción por *SDE* para obtener el perfil volátil (capítulo 4); por su parte en el segundo caso (muestra en estado vegetativo de partes aéreas; 500g) se realizó una extracción del aceite esencial por hidrodestilación con dispositivo de Clevenger durante 90 minutos, conforme a lo descripto previamente en el capítulo 3. Se obtuvo un aceite de color marrón oscuro y notas aromáticas dulces, el que fue preservado bajo refrigeración (-20°C) en recipientes color ámbar hasta la realización de los análisis químicos.

También se contó con una muestra de aceite esencial de la especie *Conyza bonariensis* (Asteraceae) provista por la MSc. N. Umpiérrez, y obtenida en las mismas condiciones de hidrodestilación en el marco de su maestría (Umpiérrez, 2017).

El análisis primario de composición de los aceites esenciales fue realizado mediante *TLC* utilizando sílica gel como fase estacionaria con una fase móvil *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2:1) (Laboratorios Cicarelli; San Lorenzo, SF, Argentina), y detección por UV a 254 nm (los poliacetilenos revelan pobremente con *p*-anisaldehído). Todas las demás condiciones experimentales fueron las mismas previamente descriptas en los capítulos 5 y 7. Un análisis más detallado de la composición fue realizado mediante *GC-MS* con columna analítica capilar



de fase poco polar (*HP-5MS*) y polar (*DB-Wax*) en las condiciones reportadas anteriormente en ésta tesis (capítulos 3 y 4).

## 2.4 Elucidación estructural

Los análisis instrumentales de IR, UV y RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  *COSY*,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *HSQC* y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  *HMBC*) fueron realizados en las mismas condiciones detalladas previamente en el capítulo 8. Para el caso de los aceites esenciales de *B. palustris* y *C. bonariensis*, el espectro de IR fue adquirido como film líquido. Los espectros de UV fueron registrados con los aceites disueltos en *n*-hexano (*Cicarelli*).

El aceite esencial de *B. palustris* se estudió en cuanto al perfil *MS-MS* del principal componente (1-nonen-3,5-diino) en un equipamiento *TraceGC Ultra* acoplado a un analizador de masa *Polaris Q* (trampa de iones) (*Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EEUU*). Para ello se empleó una columna analítica de fase poco polar *DB-5MS* compuesta por 95%-metil-5%-fenilpolisiloxano (30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 μm de espesor de fase) (*Agilent Technologies, Walt & Jennings Scientific, Wilmington, DE, EEUU*). El programa de temperatura fue: 60-180 °C a 3°C/min, 180-300°C a 10°C/min; temperaturas del inyector y de la interfase, 300°C. La fase móvil fue He (1,0 mL/min). Se inyectó 1,0 μL de una solución al 5% del aceite en *n*-hexano con una relación de *Split* 1:10. El rango de barrido de masas en la modalidad *full-scan* fue de 50-450 u.m.a; ionización electrónica a 70 eV.

Para el experimento de *MS-MS* se seleccionó el ion padre *m/z* 118 (rango de selección, 0,5-1,0 u.m.a) y se lo sometió a re-fragmentación con un voltaje de disociación por colisión inducida (*CID*) de 3,0 V. Durante el experimento en la trampa iónica hubo una presión constante de He como gas de amortiguamiento (10<sup>-5</sup> torr). El rango de adquisición de masas (modalidad *SRM*) fue de 39-250 u.m.a.

## 2.5 Aislamiento de (Z)-éster de lachnophyllum

Este compuesto se aisló a partir de la muestra de aceite esencial puro (1,00 g) de *C. bonariensis* [32,0% de (Z)-éster de lachnophyllum según análisis por *GC-MS*] mediante cromatografía en columna (CC). Se emplearon 38,1 g de sílica gel activada (230-400 mesh; *Merck KgaA, Darmstadt, Alemania*) en una columna de vidrio (25 cm × 2,2 cm de diámetro



interno). La elución de los componentes fue realizada utilizando *n*-hexano-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5:1) (*Cicarelli*) como fase móvil de a un flujo de 1,8 mL/min, recogiendo fracciones de 2 mL.

Como producto de la CC se recogieron 32 fracciones, y el monitoreo de la composición de cada una de ellas fue realizado por *TLC* en las condiciones descriptas para el análisis de los aceites esenciales. El éster de (*Z*)-lachnophyllum cristalizó en la punta de la columna durante la elución de las fracciones F<sub>11</sub>-F<sub>18</sub>, presentando un color amarillo bien definido. De ésta manera se reunieron las fracciones más puras en el compuesto (F<sub>11</sub>-F<sub>14</sub>), obteniéndose 134,4 mg del éster luego de la remoción del solvente en rotavapor. Dicha porción fue sometida a estudios de RMN y *GC-MS* (los espectros se presentan en la Sección 3.3, 3.4 y 3.5).

**(Z)-éster de lachnophyllum** (pureza > 94,0 % mediante *GC-MS*). <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 6,21 y 6,18 (sistema AB, de los protones H-2 + H-3; J<sub>2,3</sub> = 11,4 Hz; la señal a 6,18 ppm correspondiente a H-3 se presentó ensanchada esbozando un triplete por acoplamiento de largo alcance con el metileno de C-8); 3,78 (singulete, 3H éster); 2,35 (triplete ligeramente ensanchado, J: 7,1 Hz, 2H-8); 1,59 (sexteto, J = 7,1 Hz, 2H-9); 1,00 (triplete, J = 7,1 Hz, 3H-10). El valor de la constante de acoplamiento J<sub>2,3</sub> = 11,4 Hz confirma que se trata del isómero *cis*. <sup>13</sup>C RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm) : 164,7 (C-1), 130,6 (C-3); 122,4 (C-2); 90,0 (C-7); 86,5 (C-5); 70,8 (C-4); 65,1 (C-6); 51,1 (metilo del éster); 22,7 (C-9); 21,5 (C-8); 13,4 (C-10). *EI-MS* (70 eV), m/z: 176 (100), 161 (22), 147 (97), 145 (45), 133 (36), 124 (53), 115 (59), 105 (42), 91 (43), 89 (43), 77 (42), 61 (30), 62 (30). (Figura 19).

**1-nonen-3,5-diino** (en el aceite esencial de *B. palustris*; de acuerdo al análisis por *GC-MS* representa el 65,0 % en la muestra analizada). <sup>1</sup>H RMN (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 5,77 (multiplete, H-1a y H-2); 5,60 (multiplete, H-1b); 2,30 (triplete, J = 6,9 Hz; 2H-7); 1,58 (sexteto, J<sub>1</sub> = 7,3 Hz, J<sub>2</sub> = 6,9 Hz; 2H-8); 1,00 (triplete, J = 7,3 Hz; 3H-9). <sup>13</sup>C RMN (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ (ppm): 129,5 (C-1); 116,3 (C-2); 84,6 (C-4 and C-6); 73,5 (C-3); 65,0 (C-5); 21,7 (C-8); 21,5 (C-7); 13,4 (C-9). *EI-MS* (70 eV), m/z: 118 (100), 117 (28), 116 (13), 115 (63), 103 (19), 91 (55), 89 (49), 86 (14), 85 (14), 77 (27), 76 (32), 63 (54). (Figura 16).

**1,7(Z)-nonadien-3,5-diino** (en el aceite esencial de *B. palustris*; de acuerdo al análisis por *GC-MS* representa el 17,8 % en la muestra analizada). Señales asignadas por experimentos 1D (<sup>1</sup>H- y <sup>13</sup>C-NMR) y 2D (HSQC, COSY y HMBC) (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 6,18 (doble cuarteto, J<sub>1</sub> = 10,9 Hz, J<sub>2</sub> = 7,0 Hz; H-8); 5,79 (multiplete H-1a y H-2); 5,57 (m, H-1b) (estas dos señales se encuentran superpuestas y oscurecidas por las señales correspondientes mucho más intensas del alquino mayoritario, el 1-nonen-3,5-diino); 5,56 (doblete ensanchado

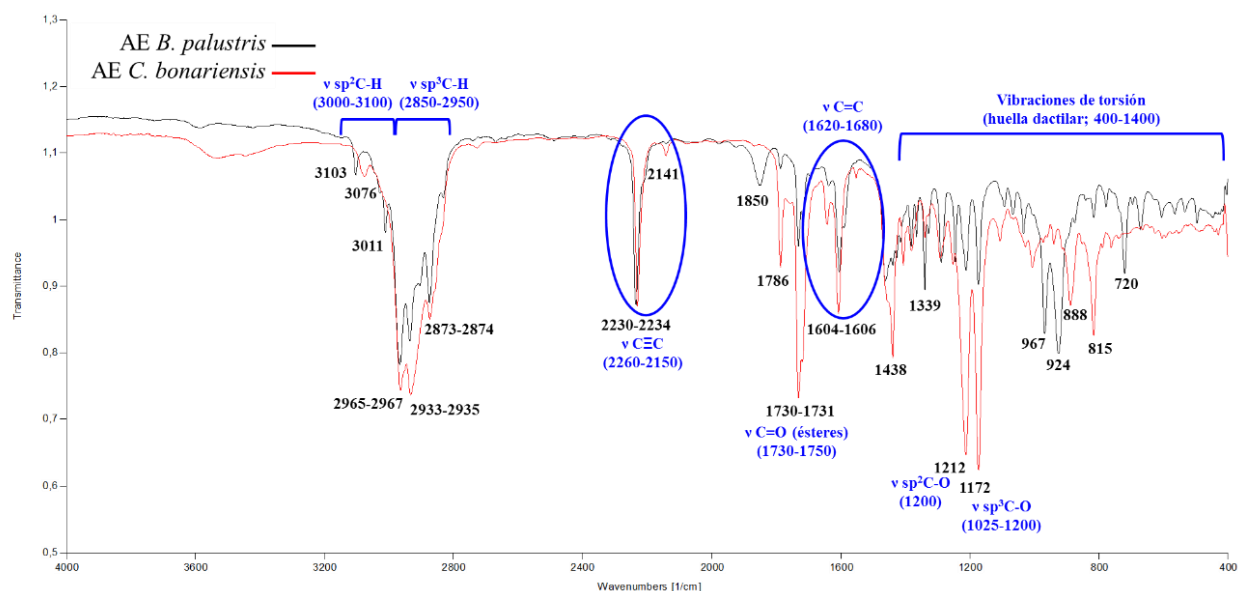


por partición alílica con el metilo de C-9,  $J = 10,9$  Hz; H-7); 1,93 (doble doblete,  $J_1 = 7,0$  Hz,  $J_2 = 1,6$  Hz; 3H-9). Señales principales de  $^{13}\text{C}$  RMN (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (no superpuestas a las del 1-nonen-3,5-diino)  $\delta$  (ppm): 143,0 (C-8); 129,8 (C-1); 116,2 (C-2); 109,0 (C-7); 75,0 (C-3); 65,4 (C-5); 70,8 (C-6); 16,4 (C-9). *EI-MS* (70 eV),  $m/z$ : 116 (73), 115 (100), 89 (17), 74 (10), 63 (15), 62 (13). (Figura 18).

### 3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Espectroscopía de IR

En la Figura 8 se presentan los espectros de infrarrojo de los aceites esenciales (en film líquido) de *B. palustris* y *C. bonariensis*.



**Figura 8:** Espectros de infrarrojo ( $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ ) de los aceites esenciales de *B. palustris* y *C. bonariensis* mostrando las bandas características del alargamiento  $\text{C}\equiv\text{C}$  para ambas muestras. Además se observa una amplia absorción de tensión de  $\text{C}=\text{O}$  para el caso de los ésteres poliacetilénicos (predominante en *C. bonariensis*). Valores de frecuencias en  $\text{cm}^{-1}$ . Fuente: Fleming y Williams (1968) y Carey (2008).

Como surge de la Figura 8, en el análisis de los aceites esenciales puros de *B. palustris* y *C. bonariensis* por medio de IR se observaron bandas intensas típicas de las vibraciones de alargamiento del enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  ( $2230\text{-}2234\text{ cm}^{-1}$  y  $2141\text{ cm}^{-1}$ ), lo que confirmó la presencia de poliacetilenos como compuestos mayoritarios en las muestras (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Sin embargo, se evidenció ausencia de la señal característica correspondiente a la tensión del enlace  $\text{C}(\text{sp})\text{-H}$  (esperable en un alquino) a  $3300\text{ cm}^{-1}$ , lo que indica que los  $\text{C}\equiv\text{C}$  en la muestra no se encontraban unidos a hidrógeno (Figura 8); este tipo de acetilenos



que no dan precipitado con sales de plata (acetiluros) se denominan “falsos acetilenos”. Por otra parte, se observó la presencia de una banda típica correspondiente a la vibración de tensión del grupo carbonilo de éster ( $1730\text{-}1731\text{ cm}^{-1}$ ) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008) (presentando mayor intensidad en el caso del aceite de *C. bonariensis*; Figura 8), lo que indicó que dicho tipo de compuestos también se encontraban en la muestra.

Además fueron tentativamente asignadas las vibraciones de alargamiento  $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-O}$  (éster o enol) y  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-O}$  (éter) a  $1212\text{ cm}^{-1}$  y  $1172\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente; así como las bandas correspondientes a la vibración de tensión del enlace  $\text{C}=\text{C}$  (alqueno) a  $1604\text{-}1606\text{ cm}^{-1}$  (Figura 8) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Asimismo, fueron asignadas las correspondientes vibraciones de tensión de los enlaces  $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$  y  $\text{C}(\text{sp}^2)\text{-H}$  en el entorno de  $3000\text{ cm}^{-1}$ , como una banda intensa y deformada, típica de hidrocarburos (Figura 8) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). No se detectaron en los espectros de IR otras bandas típicas de vibración de anillos bencénicos (compuestos aromáticos) o del grupo hidroxilo, por lo que se descartó la presencia de éstas funcionalidades como parte de compuestos mayoritarios en las muestras. Con base a las informaciones extraídas de los espectros de IR, se puede afirmar que los componentes dominantes de los aceites esenciales de *B. palustris* y *C. bonariensis* contienen funcionalidades correspondientes a alquenos, ésteres y alquinos falsos ( $\text{R-C}\equiv\text{C-R}'$ ), ésto es, que no poseen la función  $\text{R-C}\equiv\text{C-H}$  de los llamados “acetilenos verdaderos”.

En un trabajo previo sobre poliacetilenos en el aceite esencial de *Selinum tenuifolium*, Chauhan *et al.* (2012) asignaron las bandas de tensión del enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  a valores algo mayores ( $2280$  y  $2180\text{ cm}^{-1}$ ) que en éste caso. Esto se debe a la conjugación particular de cada sistema alquínicico con otros grupos acetilénicos u olefínicos, debido a que la misma aumenta la frecuencia de vibración y la intensidad de absorción del enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  (Fleming y Williams, 1968).

### 3.2 Espectroscopía de UV

Los espectros UV-Visible de las muestras de aceite esencial y del éster poliacetilénico de *lachnophyllum* se caracterizaron por poseer varias bandas de absorción en la región del ultravioleta medio ( $200\text{-}310\text{ nm}$ ) (a modo de “dedos”) (Tabla 1), lo cual es característico de los cromóforos poliacetilénicos (Bruun *et al.*, 1950; Holme y Sørensen, 1954; Fleming y Williams, 1968). De ésta manera, se obtuvo una confirmación adicional de la presencia de éste tipo de compuestos como mayoritarios en los aceites esenciales de ambas especies.





En el caso del espectro del aceite esencial de *B. palustris*, se observaron 9 bandas (máximos de absorción y hombros), 5 de las cuales coincidieron en los valores con el (Z)-éster de lachnophyllum aislado. Esto sugirió fuertemente que alguno de los componentes mayoritarios de *B. palustris* tuviesen un sistema cromoforo similar o idéntico al éster de lachnophyllum, a saber, dos triples enlaces conjugados con dos dobles enlaces. Por su parte, el espectro UV del aceite de *C. bonariensis* resultó casi idéntico al del éster de lachnophyllum.

En la Tabla 1 se resumen los valores de los máximos de las bandas UV de cada una de las muestras, así como se presenta el cálculo de absortividad ( $\epsilon$ ) para los aceites y de absortividad molar ( $\epsilon_m$ ) para el (Z)-éster de lachnophyllum empleando la ley de Lambert-Beer ( $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ ) (Fleming y Williams, 1968). A modo de comparación, se presentan también en la Tabla 1 los valores de reportes bibliográficos (Bruun *et al.*, 1950; Sørensen y Stavholt, 1950; Holme y Sørensen, 1954).

$\lambda_{Bp}$	$\lambda_{Cb}$	$\lambda_{ELA}$	$\lambda_{EEL}$	$\lambda_{EZL}$	$\lambda_{LOL}$	$\epsilon_{Bp}$	$\epsilon_{Cb}$	$\epsilon_{mELA}$	$\epsilon_{mEEL}$	$\epsilon_{mEZL}$
212	217	215	NR	NR	-	201,8	58,3	$1,7 \times 10^4$	-	-
226	224	224	224	225	-	150,8	66,2	$2,0 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$	$3,5 \times 10^4$
237	-	-	-	-	240	146,7	-	-	-	-
250	-	-	-	-	252	133,4	-	-	-	-
-	-	-	257	-	-	-	-	-	$6,9 \times 10^3$	-
264	-	-	-	-	267	177,5	-	-	-	-
277(h)	274	275	271	276	-	90,3	27,5	$7,2 \times 10^3$	$1,7 \times 10^4$	$9,6 \times 10^3$
280	-	-	-	-	283	161,9	-	-	-	-
290	290	289	287	291	-	85,4	40,7	$1,2 \times 10^4$	$2,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
309	308	307	305	309	-	70,5	40,5	$1,1 \times 10^4$	$3,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$

**Tabla 1:** Bandas en el UV para las muestras evaluadas y cálculo de la absortividad. Referencias:  $\lambda$ : longitud de onda (nm) del máximo de las bandas absortivas;  $\epsilon$ : coeficiente de absortividad para los aceites (UA/cm.g/L) y  $\epsilon_m$ : coeficiente de absortividad molar para los ésteres (UA/cm.mol/L). Bp (aceite de *B. palustris*), Cb (aceite de *C. bonariensis*), ELA [(Z)-éster de lachnophyllum aislado], EEL [(E)-éster de lachnophyllum reportado en Bruun *et al.* (1950), y Holme y Sørensen (1954)], EZL [(Z)-éster de lachnophyllum reportado en Sørensen y Stavholt (1950), y Holme y Sørensen (1954)], LOL [lachnophyllol reportado en Bruun *et al.* (1950), y Holme y Sørensen, (1954)]. (h): hombro. (NR): no reportado.

De acuerdo a la Tabla 1, se confirmó que 5 de las bandas UV correspondientes al aceite de *B. palustris* coincidieron en valores de longitud de onda con las del aceite de *C. bonariensis* y con la del (Z)-éster de lachnophyllum aislado de ésta última especie.

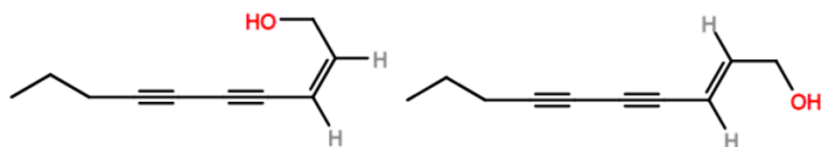
En la comparación con datos espectroscópicos reportados en bibliografía para los dos isómeros geométricos del éster de lachnophyllum ( $\lambda$  del máximo de absorción y valores de  $\epsilon_m$  de las bandas), se constató que el éster aislado se adecuó mayormente a los valores



respectivos del (*Z*)-éster de lachnophyllum, debido principalmente a la ausencia de la banda diagnóstica a 257 nm del isómero *trans* (Tabla 1) (Sörensen y Stavholt, 1950; Holme y Sörensen, 1954). La configuración *cis* del éster de lachnophyllum fue confirmada por el espectro de  $^1\text{H-RMN}$  (ver más adelante). Sörensen y Stavholt (1950) demostraron que el espectro del isómero *cis* presenta un corrimiento batocrómico (hacia longitudes de onda mayores) de 4 nm de diferencia respecto del isómero *trans*. El (*Z*)-éster de lachnophyllum es el isómero que normalmente se encuentra en mayor concentración en los aceites esenciales de las Asteraceae, aunque es usual la presencia de ambos isómeros geométricos (Sörensen y Stavholt, 1950; Holme y Sörensen, 1954).

Es interesante notar que la longitud de onda del máximo de las 4 bandas del aceite de *B. palustris* que pueden ser asignadas al (*Z*)-éster de lachnophyllum, tienen una intensidad muy superior a lo que podría predecirse ya que representa apenas un 4,3% del aceite esencial. Esto sugirió fuertemente que en éste debería estar presente una cantidad considerable de otro componente con un sistema cromóforo similar al del éster de lachnophyllum, que resultó ser el 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino (ver más adelante), segundo componente mayoritario del aceite esencial (17,8% de abundancia). Este compuesto posee el sistema cromóforo  $\text{C}=\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}=\text{C}$ , y el éster de lachnophyllum el sistema  $\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}\equiv\text{C}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{O}$ , de allí que ambos compuestos deben presentar espectros UV casi idénticos y superponibles.

Por otra parte, las restantes absorciones del espectro UV de *B. palustris* no asignables al 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino ni al (*Z*)-éster de lachnophyllum, a saber,  $\lambda_{\text{max}}$ : 280 nm, 264 nm, 250, nm y 237 nm; demostraron muy buena correlación y paralelismo con los valores informados para el (*Z*) y (*E*)-lachnophyllol (Figura 9) (Tabla 1) (Bruun *et al.*, 1950; Holme y Sörensen, 1954). Lo anterior dió sustento a la presencia de un compuesto con el mismo sistema cromóforo: dos triples enlaces conjugados con un enlace doble, el que se encuentra presente en el 1-nonen-3,5-diino, componente principal del aceite esencial (65,0 %) (ver más adelante). Adicionalmente, el orden constatado de intensidad de las bandas fue el mismo en ambos espectros:  $I_{264\text{nm}} > I_{280\text{nm}} > I_{250\text{nm}}$  para el caso del aceite de *B. palustris* y  $I_{267\text{nm}} > I_{283\text{nm}} > I_{252\text{nm}}$  para el lachnophyllol (Tabla 1) (Bruun *et al.*, 1950). Tomando en cuenta que el contenido de 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino (*ca.* 15 %) + (*Z*)-éster de lachnophyllum (*ca.* 5 %) en el aceite esencial representa aproximadamente un 20% y que el componente principal, 1-nonen-3,5-diino *ca.* 60 %; la relación entre ambos sistemas cromofóricos es *ca.* 1:3 que concuerda con la relación de intensidades para las bandas a 309 nm/290 nm frente a las bandas a 280 nm/264 nm.



**Figura 9:** Estructuras de cis (izquierda) y trans (derecha) lachnophyllol obtenidos mediante síntesis por Bruun et al., (1950).

Por último, los máximos a 212 y 217 nm que se observaron en el espectro UV de los ambos aceites y del éster aislado corresponden a la absorción terminal de dienos conjugados presentes en el aceite esencial (componentes minoritarios en el caso del éster), como el caso del germacreno D y los ocimenos (capítulo 8) (Fleming y Williams, 1968). Es importante destacar que de acuerdo a los espectros UV obtenidos, se descarta la presencia en las muestras de cantidades relevantes de los ésteres de matricaria, ya que no se observó una banda intensa característica a 335 nm (observada, por ejemplo, en el caso del aceite esencial de raíces de *Bellis perennis*) correspondiente a un doble enlace adicional (Holme y Sørensen, 1954).

Es importante destacar que las diferencias en los valores de longitud de onda de los máximos entre las muestras y los reportes bibliográficos ( $\pm 2$  nm) se encuentran dentro del error experimental del equipo de medición. Por su parte, las diferencias en los valores de absorptividad se deben a errores sistemáticos en la preparación de las soluciones (concentración), a impurezas de la muestra (por ejemplo, la fracción aislada del éster presentó un 94% de pureza mediante análisis de GC-MS), y a la pureza del solvente.

### 3.3 Espectroscopía de $^1\text{H}$ -RMN y $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY

Debido a que los hidrocarburos poliacetilénicos no identificados del aceite esencial de *B. palustris* poseen baja polaridad y aparecían como una mancha no resuelta en TLC en varias fases móviles diferentes, se decidió emplear los principios del análisis de mezclas en RMN (analizando en detalle las señales más intensas) para dilucidar la estructura de los dos componentes principales (65,0% y 17,8% en la mezcla, según GC-MS) (Nathan y Díaz, 1970).

De ésta manera, se obtuvo el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del aceite esencial que se muestra en la Figura 10.

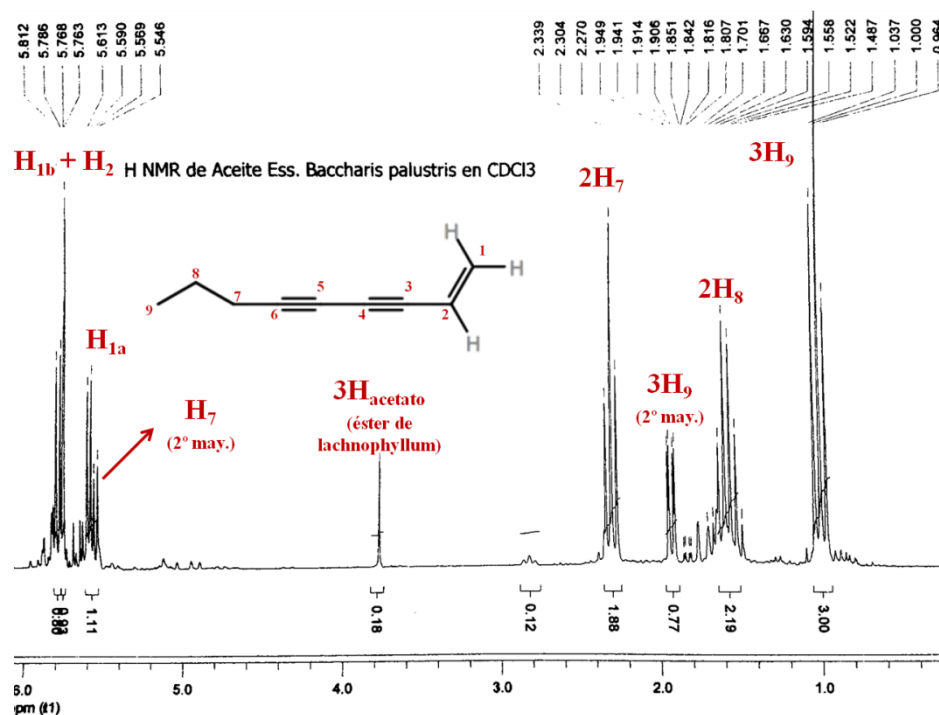


Figura 10: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del aceite esencial de *B. palustris*.

Primeramente se evidenció un triplete bien definido e intenso centrado en 1,0 ppm (desplazamiento químico de los protones  $\text{CH}_3\text{-C}$ ) lo que indicó la presencia de protones metílicos en una cadena terminal, cuya señal se escindió por la influencia del campo magnético generado por la presencia de dos protones vecinales (Figura 10). A continuación se constató la presencia de protones metilenos ( $\text{CH}_2$ ) (señales características a 1,59 ppm y 2,30 ppm), presentándose la primera como un sexteto bien definido y la segunda como un triplete (Figura 10). De lo anterior se dedujo que en la estructura poliacetilénica desconocida podría haber una cadena propílica  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2$ , lo cual resultó coherente con el patrón de partición de las señales observada (triplete, sexteto, triplete) (Figura 10) (Fleming y Williams, 1968). La señal de los protones metilenos a 2,30 ppm se presentó la suficientemente desapantallada para sospechar que se encontraba vecinal a un sistema  $\pi$  o a un fuerte atractor de electrones, por lo que se planteó que los mismos fuesen vecinales un enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$ .

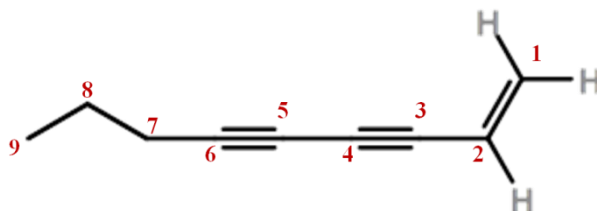
Por otra parte, como se constató previamente en los estudios de IR, no fue evidente la presencia de enlace  $\text{C}(\text{sp})\text{-H}$  de un grupo alquino (ausencia de su banda característica de tensión), lo que indicó que los enlaces  $\text{C}\equiv\text{C}$  no se encontraban unidos a protones (“falsos acetilenos”). Asimismo, para satisfacer la necesidad de generar un grupo cromóforo como el del lachnophyllol (sección 3.2; Figura 9) y obtener un espectro de UV semejante entre éste alcohol y el compuesto desconocido, se planteó la estructura conjugada  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{C-}$



$C\equiv C-CH=CH_2$  para el compuesto mayoritario del aceite esencial de *B. palustris*. En concordancia, la estructura anterior con una fórmula molecular  $C_9H_{10}$  presenta una masa molecular de 118 u.m.a., por lo que se esperaría que a esa unidad de masa fuera detectada una señal correspondiente al ion molecular en los estudios de *MS*, lo que efectivamente fue constatado (ver sección 3.5).

Finalmente, coincidiendo con la estructura planteada, en el espectro de  $^1H$ -RMN fueron detectadas las señales correspondientes a tres protones vinílicos a valores de  $\delta$  (ppm): 5,60; 5,77; y 5,78 (Figura 10); lo que constituyen valores típicos de desplazamiento químico de ésta clase de protones (Fleming y Williams, 1968). Es de destacar que la multiplicidad de las señales de los protones vinílicos no fue clara en un análisis primario, debido a que en esa región del espectro se presentaron otras señales de protones vinílicos de componentes minoritarios del aceite esencial que obliteraron los patrones de desdoblamiento (Figura 10).

Como resultado del análisis previo, se presenta en la Figura 11 la estructura planteada del compuesto mayoritario del aceite esencial de *B. palustris*, con su respectiva numeración. Su nomenclatura *IUPAC* es: 1-nonen-3,5-diino; pudiéndose constatar su semejanza estructural con los ésteres de lachnophyllum y con los isómeros del lachnophylol (Figuras 2 y 9).



**Figura 11:** Estructura del 1-nonen-3,5-diino, componente mayoritario (65,0%) del aceite esencial de *B. palustris* confirmado por estudios de RMN y de *MS* (ver más adelante).

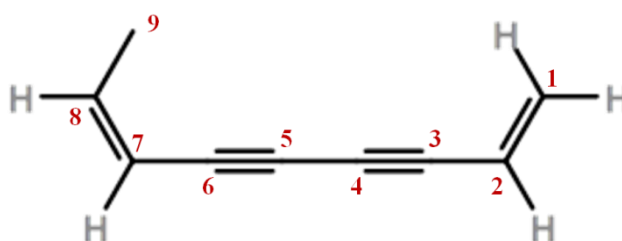
En cuanto a los desdoblamientos de las señales como consecuencia de acoplamiento espín-espín evidenciados mediante el análisis del espectro  $^1H$ - $^1H$  *COSY*, fue claro el acople vecinal entre los protones metílicos  $H_9$  y los metilénicos  $H_8$  ( $J_{8,9\text{vecinal}} = 7,3$  Hz), y entre éstos últimos y los protones  $H_7$  ( $J_{7,8\text{ vecinal}} = 6,9$  Hz). Los anteriores valores de la constante son valores típicos para acoplamiento vecinales en cadenas alquílicas (Fleming y Williams, 1968). Por otra parte, fue evidente en el espectro  $^1H$ - $^1H$  *COSY* el acople vecinal de los protones  $H_1$  con  $H_2$ , y geminal entre los dos  $H_1$ , confirmando la estructura propuesta en la Figura 11.

En el espectro de  $^1H$ -RMN de la Figura 10 además de las señales más intensas correspondientes al compuesto mayoritario 1-nonen-3,5-diino, también se observó una señal



bien definida como doble doblete a  $\delta$ : 1,93 ppm que se acopló con otra señal de protones vinílicos a  $\delta$ : 5,56 ppm (de acuerdo al análisis del espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY). Debido a la intensidad de las señales, se hipotetizó que ambas pertenecieran al segundo compuesto mayoritario del aceite esencial de *B. palustris* (17,8 % en el aceite; fórmula molecular  $\text{C}_9\text{H}_8$  según MS, ver más adelante), debido a que el resto de los componentes del aceite presentaron una abundancia inferior al 5,0 % (ver sección 3.5). De ésta forma, dicho componente tendría una estructura con el mismo tipo de esqueleto poliacetilénico que el 1-nonen-3,5-diino (dado que no se detectaron señales de intensidad e integración semejantes a las nombradas en otras regiones del espectro de  $^1\text{H}$ -RMN), con la diferencia de contar con un  $\text{C}=\text{C}$  adicional que desapantallaría la señal de los protones metílicos  $\text{H}_9$  (de  $\delta$ : 1,00 ppm a  $\delta$ : 1,93 ppm) y desdoblaría la misma como un doble doblete bien definido (por un acoplamiento vecinal y uno alílico).

Con base en ésta hipótesis de trabajo, se pudo proponer la estructura de la Figura 12 para el segundo componente mayoritario del aceite esencial de *B. palustris*. El nombre de dicho compuesto en el sistema IUPAC es 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino, y su estructura es coherente con los principios biosintéticos de esta clase de compuestos poliacetilénicos (ver secciones 1.2 y 3.6).



**Figura 12:** Estructura del 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino, segundo componente mayoritario (17,8%) del aceite esencial de *B. palustris* tentativamente confirmado por estudios de RMN y de MS (ver más adelante).

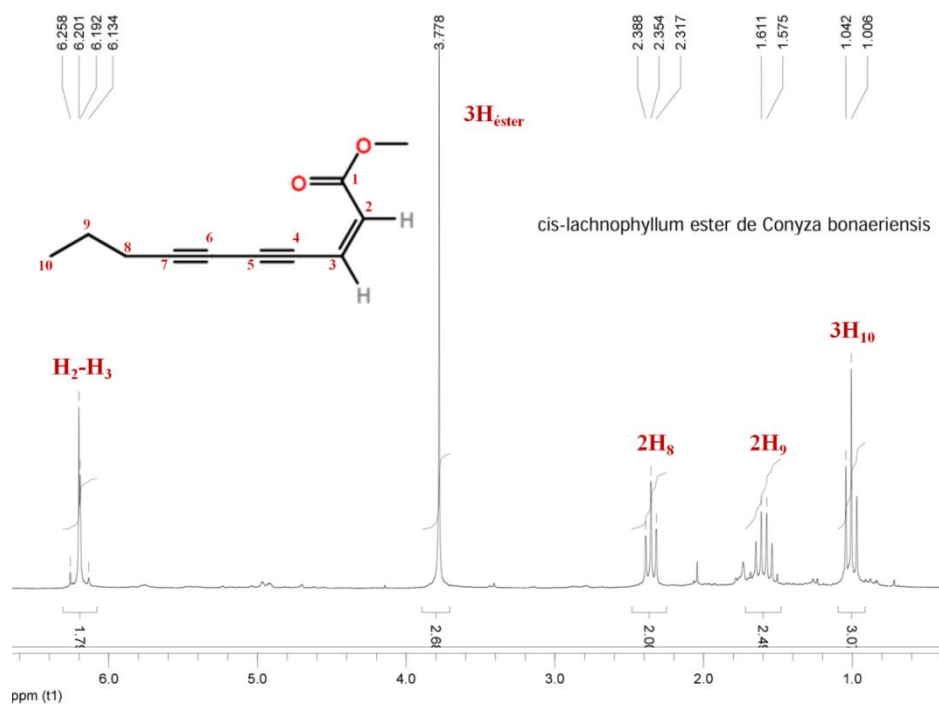
Según la información obtenida del espectro de de  $^1\text{H}$ -RMN del aceite esencial de *B. palustris*, la señal de de los protones metílicos  $\text{H}_9$  del 1,7-nonadien-3,5-diino se desdobló como doble doblete por dos tipos de acoplamientos: vecinal con  $\text{H}_8$  ( $J_{8,9}$  vecinal = 7,0 Hz) y alílico con  $\text{H}_7$  ( $J_{7,9}$  alílico = 1,6 Hz) (Figura 10), lo que constituyen valores típicos (Fleming y Williams, 1968). Por su parte, el acople vecinal entre  $\text{H}_8$  y  $\text{H}_7$ , y alílico entre  $\text{H}_9$  y  $\text{H}_7$ , haría que la señal de  $\text{H}_7$  se escindiera como un doble doblete. Sin embargo, debido a que el protón metínico  $\text{H}_7$  se encontraría más próximo al enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  (Figura 10), la señal del mismo aparecería a desplazamientos menores (campos mayores) que la correspondiente a  $\text{H}_8$  (Figura 10); lo cual



se debería al efecto apantallante del triple enlace respecto a los dobles enlaces (**Fleming y Williams, 1968**).

De acuerdo al anterior razonamiento, la señal de aparente doblete a  $\delta$ : 5,56 ppm pertenecería al protón H<sub>7</sub> del 1,7-nonadien-3,5-diino. Calculando la constante de acoplamiento vecinal para H<sub>8</sub> y H<sub>7</sub> se obtuvo que la estereoquímica del enlace C<sub>7</sub>=C<sub>8</sub> era *cis* ( $J_{7,8\text{vecinal}} = 4,6$  Hz; si fuera *trans* dicho valor sería superior a los 12,0 Hz) (**Fleming y Williams, 1968**). Así, se postuló que el segundo compuesto mayoritario del aceite esencial de *B. palustris* es el 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino (Figura 12). Adicionalmente, la estereoquímica *cis* está de acuerdo con los datos de espectroscopía UV obtenidos (sección 3.2), y con el origen biosintético de éste tipo de compuestos poliacetilénicos derivados de la vía del ácido crepenínico, en contraposición a los productos de la vía del ácido estearólico (secciones 1.2 y 3.6).

En la Figura 13 se presenta el espectro de <sup>1</sup>H-RMN del éster de lachnophyllum aislado del aceite esencial de *C. bonaerensis* (pureza: 94,0% de acuerdo al análisis de GC-MS).



**Figura 13:** Espectro de <sup>1</sup>H-RMN del (*Z*)-éster de lachnophyllum aislado del aceite esencial de *C. bonaerensis*.

La apariencia del espectro de <sup>1</sup>H-RMN del éster de lachnophyllum aislado de *C. bonaerensis* fue semejante a la del aceite esencial puro de *B. palustris* (Figuras 10 y 13). Por otra parte, dicho espectro también presentó la misma apariencia al reportado por Albuquerque *et al.*



(2004) para los dos ésteres de *lachnophyllum* puros aislados del aceite esencial de la especie *B. trinervis*.

Como en el caso del espectro de *B. palustris* (y más precisamente de su componente mayoritario 1-nonen-3,5-diino) fue claro el patrón de la cadena alquílica de propilo con un desdoblamiento de señal característico triplete-sexteto-triplete (Figura 13). En el caso del éster las señales se presentaron a  $\delta$ : 1,00 ppm ( $H_{10}$ ),  $\delta$ : 1,59 ppm ( $H_9$ ) y  $\delta$ : 2,35 ppm ( $H_8$ ), valores muy semejantes a  $\delta$ : 1,00 ppm ( $H_9$ ),  $\delta$ : 1,59 ppm ( $H_8$ ) y  $\delta$ : 2,30 ppm ( $H_7$ ) en el espectro de *B. palustris* para los protones equivalentes (Figuras 10 y 13). Por otra parte, los acoplamientos constatados (por análisis del espectro  $^1H$ -RMN y  $^1H$ - $^1H$  COSY) entre éstos protones fueron solamente vecinales:  $H_{10}$ - $H_9$  ( $J_{9,10}$  vecinal = 7,2 Hz) y  $H_9$ - $H_8$  ( $J_{8,9}$  vecinal = 7,1 Hz); valores semejantes a los propios para el 1-nonen-3,5-diino de *B. palustris*.

Un aspecto claramente distintivo entre ambos espectros protónicos fue la intensa señal de singulete constatada a  $\delta$ : 3,78 ppm correspondiente a los protones metílicos del grupo éster (Figura 13), un desplazamiento típico debido al efecto desapantallante del grupo carbonilo (capítulo 8) (Fleming y Williams, 1968). Adicionalmente, observando en detalle el espectro de  $^1H$ -RMN del aceite de *B. palustris* (Figura 10) se identifica el mismo tipo de señal de los protones del éster al mismo  $\delta$  que el correspondiente al del éster de *lachnophyllum*, lo que es un indicio que dicho compuesto es un componente minoritario del aceite (como fue posteriormente confirmado por GC-MS; sección 3.6).

Por último, las señales de los protones  $H_2$  y  $H_3$  se presentaron como un sistema A-B extremo en donde las dos señales centrales se mostraron superpuestas a  $\delta$ : 6,20 ppm (Figura 13) (Fleming y Williams, 1968). El desapantallamiento respecto a los desplazamientos químicos observados para los protones equivalentes en el caso del 1-nonen-3,5-diino (5,6-5,8 ppm) se debe a la presencia vecinal del éster. Mediante el cálculo de la constante de acoplamiento de ambos protones ( $J_{2,3}$  vecinal = 11,5 Hz) se determinó que la estereoquímica del enlace  $C_2=C_3$  en dicho compuesto era *cis* (el valor de  $J_{2,3}$  fue menor al límite inferior de 12,0 Hz para la estereoquímica *trans*) (Figura 13). De ésta manera, se confirmó la identidad del compuesto aislado de *C. bonariensis* como (*Z*)-éster de *lachnophyllum*, lo que está de acuerdo con algunos resultados previos para la especie (Tzakou *et al.*, 2005) pero contrasta con otros en que el isómero *trans* fue el compuesto mayoritario informado en el aceite esencial (Barbosa *et al.*, 2005).

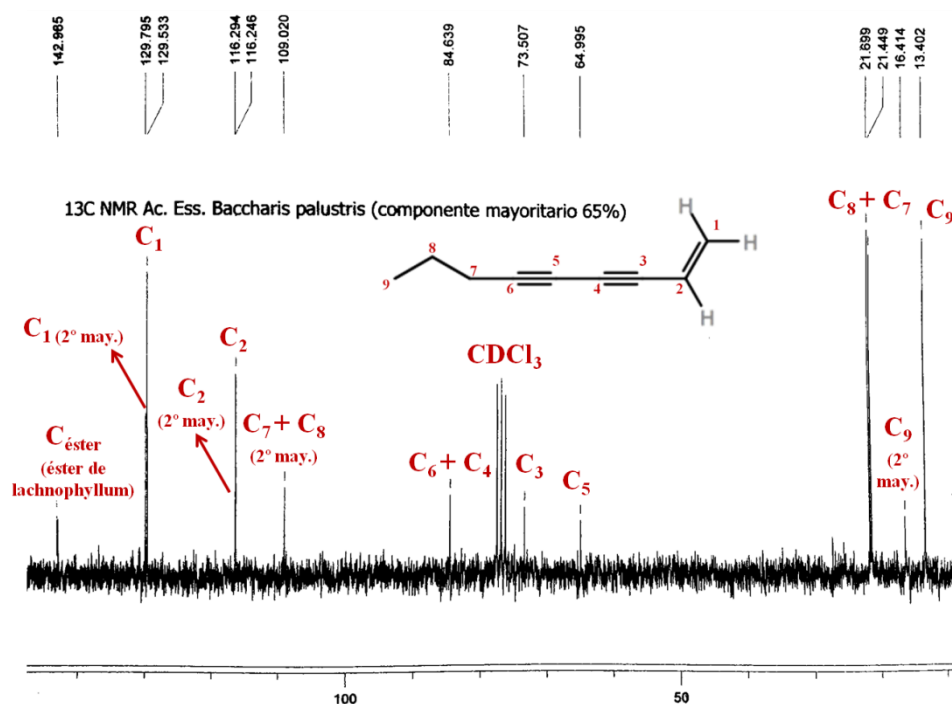




Un hecho particularmente interesante del análisis del espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del (*Z*)-éster de lachnophyllum es que se constató un débil acoplamiento a larga distancia entre el protón metínico  $\text{H}_3$  y los metilénicos  $\text{H}_8$ . Tal acoplamiento espín-espín a 7 enlaces sólo puede ser posible por la alta eficiencia de los orbitales  $\pi$  de los grupos acetilénicos conjugados para transmitir la información magnética (Fleming y Williams, 1968).

### 3.4 Espectroscopía de $^{13}\text{C}$ -RMN

En la Figura 14 se presenta el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el aceite esencial de *B. palustris*.



**Figura 14:** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del aceite esencial de *B. palustris* puro, conteniendo un 65,0% de 1-nonen-3,5-diino. Se destacan además las señales de algunos carbonos pertenecientes al segundo compuesto mayoritario (2° may.) 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino, y el carbono base de éster correspondiente al (*Z*)-éster de lachnophyllum.

En acuerdo con la teoría (Carey, 2008), los carbonos que resonaron a menores campos (mayores desplazamientos) fueron los que poseen hibridación  $\text{sp}^2$ :  $\text{C}_1$  ( $\delta$ : 129,5 ppm) y  $\text{C}_2$  ( $\delta$ : 116,2 ppm) en el caso del 1-nonen-3,5-diino de *B. palustris*, y sus correspondientes carbonos equivalentes en el caso del 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino ( $\delta$   $\text{C}_1$ : 129,8 ppm y  $\delta$   $\text{C}_2$ : 116,3 ppm) (Figura 14). Para éste último compuesto, dado que el mismo presenta un doble enlace adicional  $\text{C}_7=\text{C}_8$ , la señal de éstos carbonos vinílicos se apreció más apantallada como un



singulete a  $\delta$ : 109,0 ppm (se comprobó la ausencia de correlación de ésta señal con los protones del 1-nonen-3,5-diino en el espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) (Figura 14).

Debido al efecto de campo inducido generado a lo largo del enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  (hibridación sp) que se opone al campo magnético externo, los carbonos acetilénicos se presentaron más apantallados que los carbonos vinílicos en el aceite de *B. palustris*:  $\text{C}_4$  y  $\text{C}_6$  ( $\delta$ : 84,6 ppm),  $\text{C}_3$  ( $\delta$ : 73,5 ppm) y  $\text{C}_5$  ( $\delta$ : 65,0 ppm) (Figura 14) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Como el sistema acetilénico es el mismo para el 1-nonen-3,5-diino que para el 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino, el desplazamiento de sus carbonos fue el mismo, de manera que no se exhibieron otras señales correspondientes a carbonos con hibridación sp (Figura 14). Los carbonos con hibridación  $\text{sp}^3$  se presentaron a los mayores campos del espectro:  $\text{C}_8$  ( $\delta$ : 21,7 ppm),  $\text{C}_7$  ( $\delta$ : 21,5 ppm) y  $\text{C}_9$  ( $\delta$ : 13,4 ppm) (Figura 14). Debido al efecto desapantallante del doble enlace  $\text{C}_7=\text{C}_8$ , la señal del carbono metílico ( $\text{C}_9$ ) del 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino se presentó a  $\delta$ : 16,4 ppm (Figura 14). Es de destacar que a campo muy bajo ( $\delta$ : 142,9 ppm) se detectó una señal de baja intensidad, la cual es típica de carbonos carbonílicos y se asignó al carbono base de éster del (*Z*)-éster de lachnophyllum (Figura 14).

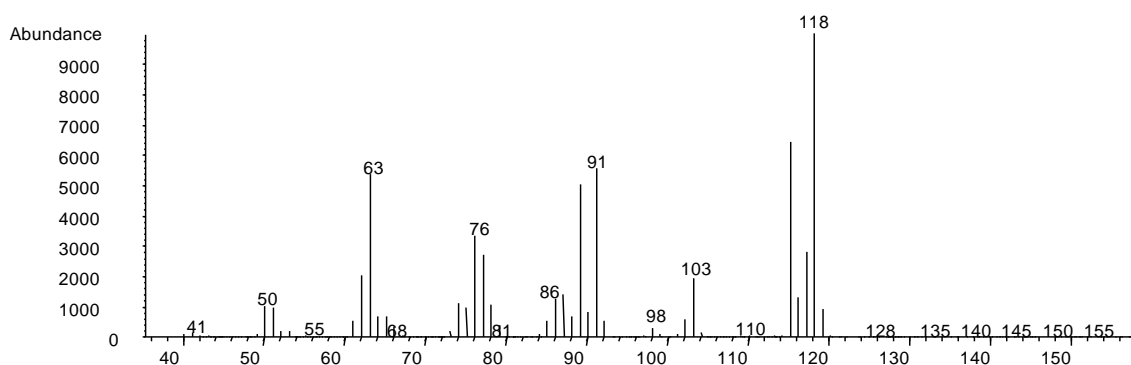
Por otra, el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN para el (*Z*)-éster de lachnophyllum aislado de *C. bonariensis* fue muy semejante al publicado por Albuquerque *et al.* (2004) del aceite esencial de la especie *B. trinervis*.

En resumen, mediante todos los estudios anteriormente detallados de espectroscopía de RMN se pudo confirmar la estructura de los tres componentes mayoritarios desconocidos del aceite esencial de *B. palustris*: 1-nonen-3,5-diino (65,0%), 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino (17,8%) y (*Z*)-éster de lachnophyllum [metil (*Z*)-dec-2-en-4,6-diinoato, 4,3%].

### 3.5 Espectrometría de MS

De los estudios realizados en MS por ionización electrónica, primeramente se discutirán los resultados obtenidos por medio del analizador de cuadrupolo y a continuación se detallarán algunos resultados preliminares obtenidos del análisis MS-MS con analizador de trampa de iones.

En la Figura 15 se presenta el espectro de masa obtenido para el 1-nonen-3,5-diino del aceite esencial de *B. palustris*. El hecho más relevante de dicho espectro es que el ion molecular ( $\text{C}_9\text{H}_{10}^+$ ,  $m/z$  118) es el pico base del mismo (Figura 15), lo que indica que éste tipo de compuestos poliacetilénicos tienen alta estabilidad en condiciones de fragmentación a 70 eV.

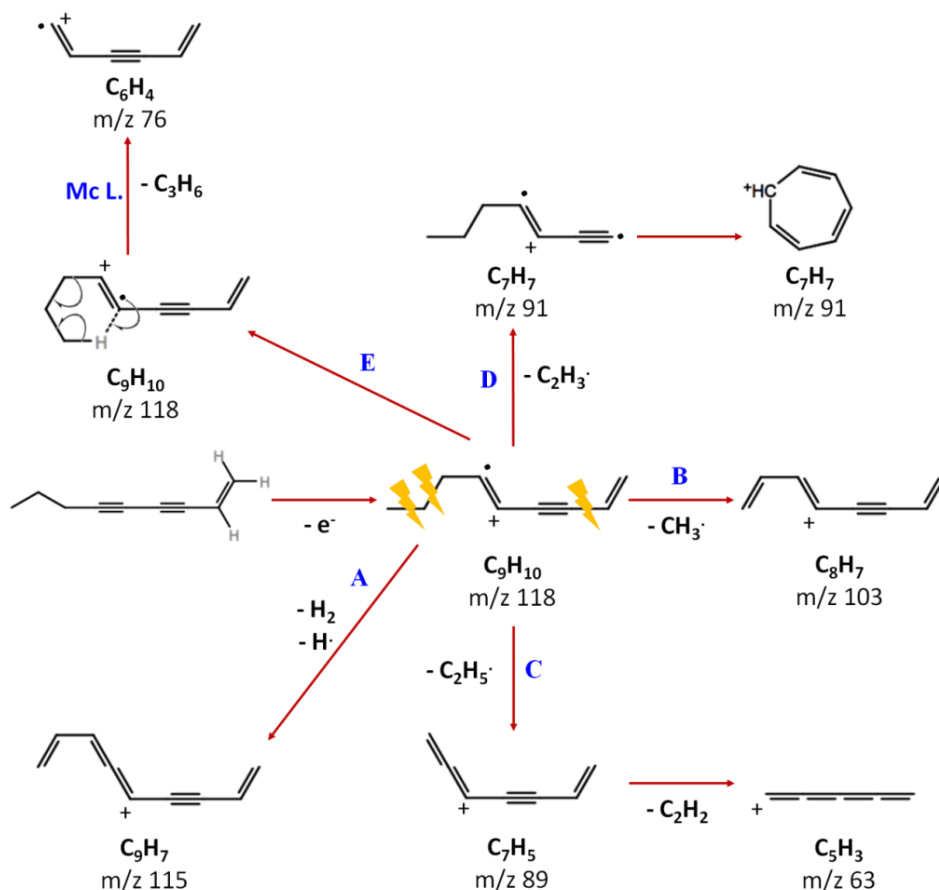


**Figura 15:** Espectro de MS (ionización electrónica) del 1-nonen-3,5-diino del aceite esencial de *B. palustris*.

En la Figura 16 se presentan las principales fragmentaciones postuladas para el 1-nonen-3,5-diino por ionización electrónica, las que brindarían el espectro de la Figura 15.

Un aspecto poco común del espectro de masa del 1-nonen-3,5-diino es la presencia del fragmento  $M^+-3$  ( $m/z$  115) con una importante abundancia (segundo pico en importancia del espectro; Figura 15); que implicaría la pérdida de una molécula y un radical de hidrógeno (ruta de fragmentación A de la Figura 16). Otras fragmentaciones importantes se darían por ruptura de la cadena propílica, lo que generaría los picos observados a  $m/z$  103 (pérdida de un radical metilo;  $M^+-15$ ; ruta de fragmentación B de la Figura 17) y  $m/z$  89 (pérdida de un radical etilo;  $M^+-29$ ; ruta C). Este último fragmento podría perder una molécula de acetileno neutra para dar el fragmento  $m/z$  63 ( $M^+-29-26$ ), que tendría la estructura estabilizada de cumuleno mostrada en la Figura 16.

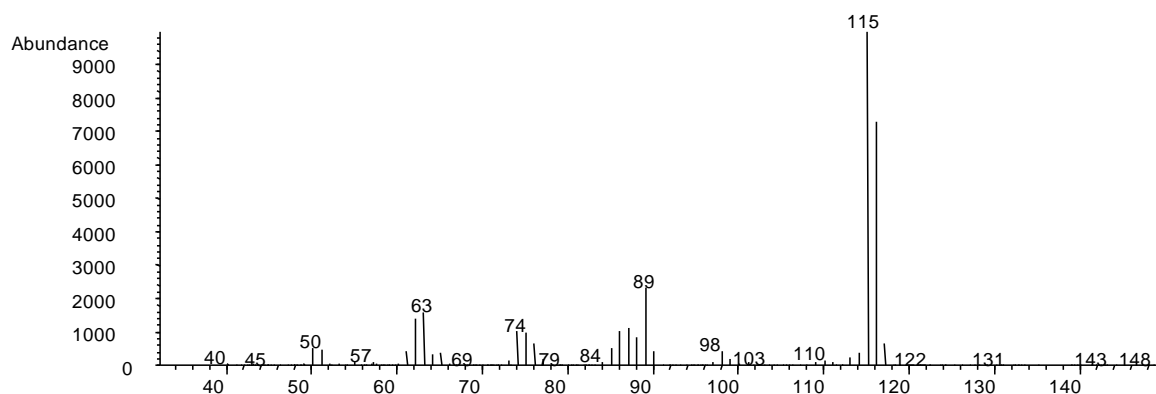
Si bien es algo poco frecuente en espectrometría de masa, se postuló que mediante la ruta de fragmentación D se podría producir una pérdida de un radical etenilo, que produciría el fragmento  $m/z$  91 ( $M^+-27$ ) (Figura 16). La posibilidad de que éste último fragmento finalmente se estabilice al catión aromático tropilio por rearreglo sería la fuerza impulsora de tal fragmentación, lo cual es frecuentemente encontrado en espectros de masa de compuestos orgánicos (capítulo 8) (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008). Sin embargo, es nuevamente útil destacar que éste planteamiento es hipotético, y deberían realizarse estudios detallados de *MS-MS* o *MS<sup>n</sup>* (con equipamientos de alta resolución) para validar o descartar la ocurrencia de dicho tipo de rearreglos.



**Figura 16:** Esquema de fragmentación propuesto para interpretar los principales picos observados en el espectro de MS (ionización electrónica) del 1-nonen-3,5-diino. Referencias: Mc L.: rearrreglo de Mc. Lafferty.

Por último, se propuso que la generación del fragmento por  $m/z$  76 ( $M^+ - 42$ ) sería debida a un rearrreglo del tipo Mc Lafferty en una estructura de anillo de 6 miembros (ruta de fragmentación E, Figura 16), lo que implicaría la pérdida de una molécula neutra de propeno. Otros picos pares que aparecen en el espectro de masa del 1-nonen-3,5-diino se originarían por rearrreglos semejantes, aunque los mismos serían menos probables que el nombrado anteriormente debido a la baja intensidad de sus fragmentos resultantes (Figura 15).

En la Figura 17 se presenta el espectro de masa del segundo compuesto en importancia del aceite esencial de *B. palustris* (17,8%), identificado según RMN como 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino).



**Figura 17:** Espectro de MS (ionización electrónica) del 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino del aceite esencial de *B. palustris*.

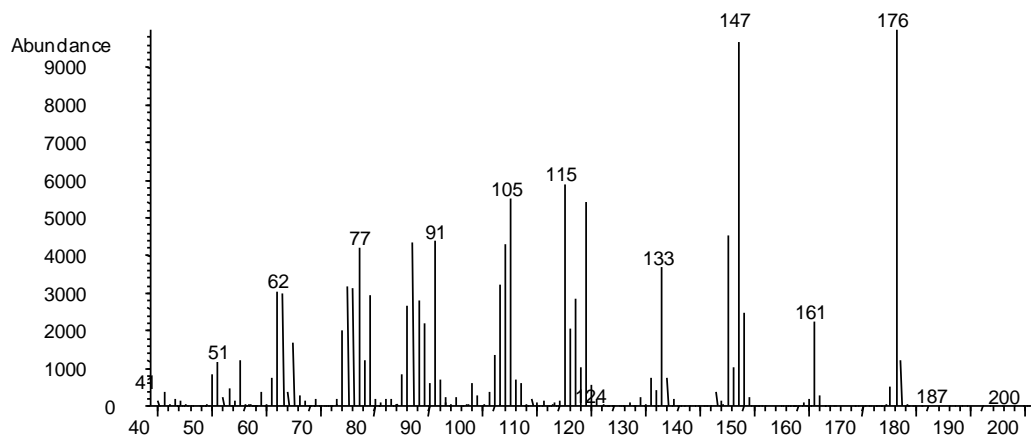
Cuando se realizó inicialmente el trabajo sobre el volatilo de *B. palustris* (capítulo 4), la obtención del espectro de masa de la Figura 17 fue el primer indicio de que los compuestos desconocidos del aceite esencial eran de naturaleza poliacetilénica. Ello fue debido a que la comparación computarizada de dicho espectro con bases de datos brindó el resultado de que tal pico correspondía al fenilmetilacetileno ( $C_9H_8$ ) con un 97% de probabilidad; sin embargo, el índice de retención lineal (*LRI*, capítulo 4) no coincidía con tal compuesto. Por ello fue que se decidió seguir investigando y no confiar en dicho resultado primario.

Los fragmentos observados en el espectro del 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino implican pérdidas semejantes a las encontradas para el caso del 1-nonen-3,5-diino (Figuras 15 y 17). En éste caso, el fragmento del ion molecular ( $m/z$  116;  $M^+$ ) fue el segundo con mayor intensidad en el espectro luego del  $m/z$  115 ( $M^+-1$ ), el que implicaría una pérdida de radical hidrógeno (su estructura sería la misma de la ruta de fragmentación A de la Figura 16). La intensidad de los demás fragmentos del espectro es menor al 30% del pico base, y los principales picos serían generados por el mismo tipo de fragmentaciones ilustradas anteriormente en la Figura 16. Esto es, pérdida de un radical etenilo ( $m/z$  89;  $M^+-27$ ) y posteriormente generación de la estructura cumulena por pérdida de una molécula neutra de acetileno ( $m/z$  63,  $M^+-27-26$ ) (Figura 16). Por su parte, la generación del fragmento par de  $m/z$  74 sería posible por medio a un rearrreglo tipo Mc. Lafferty, análogo al de la Figura 16.

En la Figura 18 se muestra el espectro de MS obtenido para el (Z)-éster de lachnophyllum de *C. bonariensis*, el que resultó idéntico al espectro del tercer componente mayoritario del aceite esencial de *B. palustris* (4,3%). De ésta manera, se confirmó definitivamente la presencia de dicho componente poliacetilénico en el aceite de ésta última especie, validando

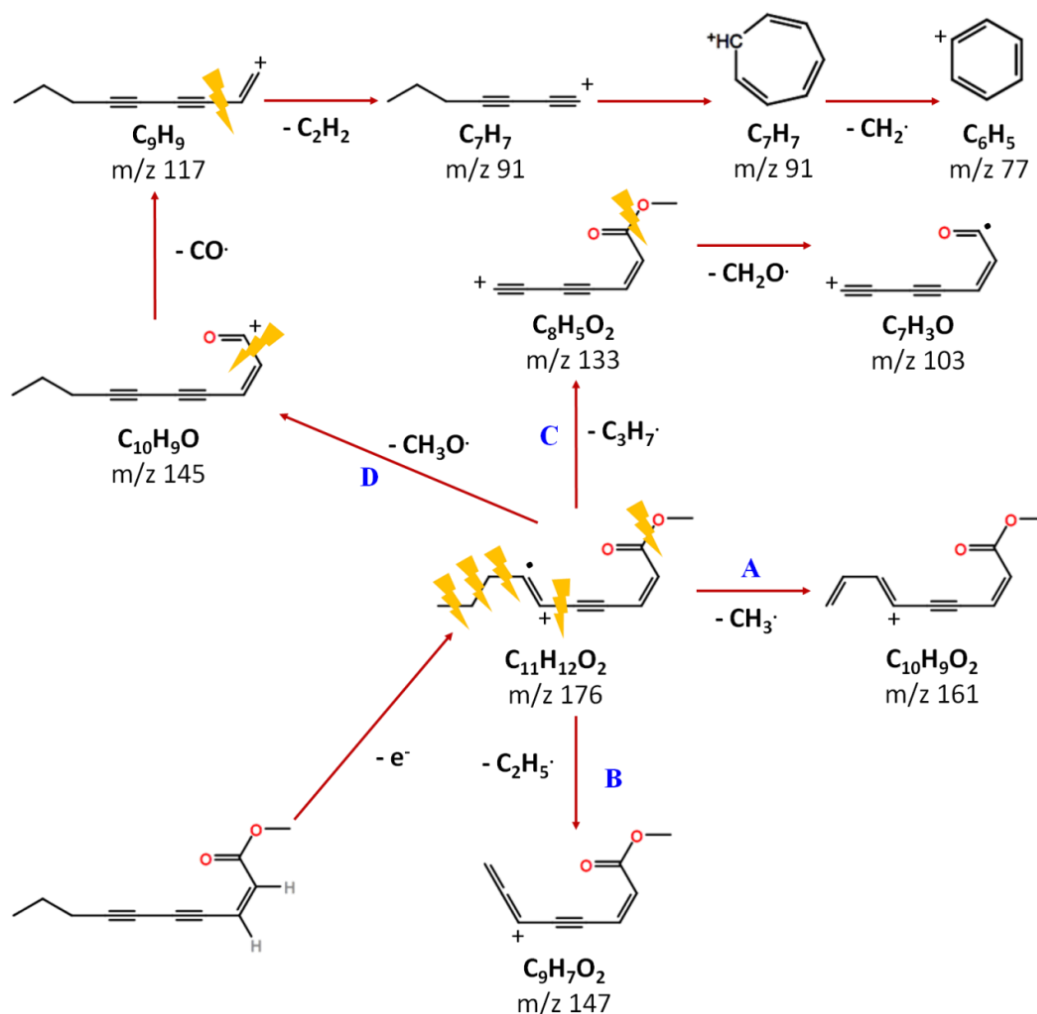


los resultados obtenidos mediante RMN (señal de los protones del acetato en el espectro del aceite puro, Figura 11).



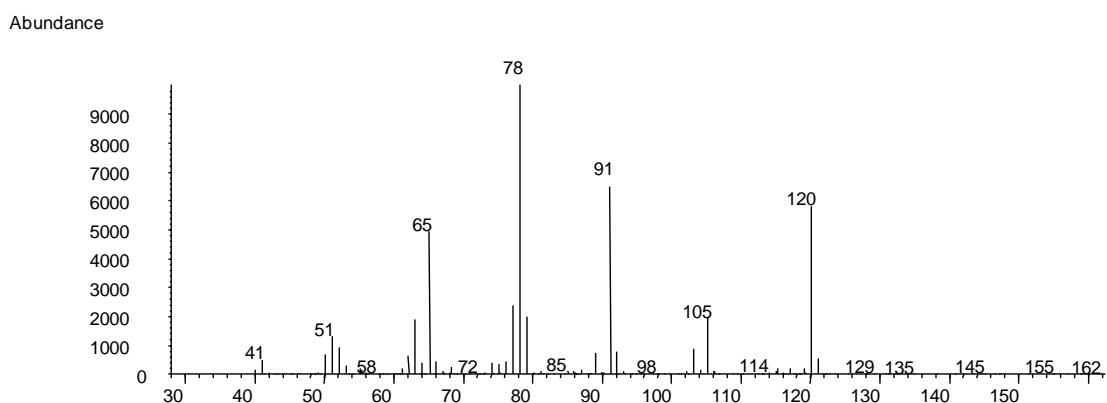
**Figura 18:** Espectro de MS (ionización electrónica) del (Z)-éster de *lachnophyllum* de los aceites esenciales de *C. bonariensis* y *B. palustris*.

En la Figura 19 se presenta el esquema de interpretación del origen de algunos de los principales fragmentos constatados en el espectro de masa del (Z)-éster de *lachnophyllum* (Figura 18), lo que implica el mismo tipo de rupturas que se expusieron anteriormente (Figura 16), considerando además la extensión de la cadena carbonada y la presencia del grupo éster.



**Figura 19:** Esquema de fragmentación propuesto para interpretar algunos de los principales fragmentos observados en el espectro de MS (ionización electrónica) del (Z)-éster de lachnophyllum.

Luego de identificar los principales componentes del aceite esencial de *B. palustris* [1-nonen-3,5-diino, 1,7(Z)-nonadien-3,5-diino y (Z)-éster de lachnophyllum] se prestó especial atención en algunos compuestos minoritarios con el objetivo de intentar identificarlos, al menos de manera tentativa. El primero de ellos con un índice de retención de 1004 y una abundancia del 0,7% (en columna poco polar *HP-5MS*) presentó el espectro de masa de la Figura 21.



**Figura 21:** Espectro de MS (ionización electrónica) del 3,5-nonadieno (tentativo) del aceite esencial de *B. palustris*.

Del espectro se observa que el ion molecular aparente del producto desconocido es el  $m/z$  120, por lo que se sospechó que se tratase de un compuesto con un grado de saturación mayor que el 1-nonen-3,5-diino (cuyo ion molecular es  $m/z$  118). Debido a ello, se planteó como posible que el compuesto desconocido fuera el 3,5-nonadieno. Comparando el espectro de masa obtenido experimentalmente con el reportado para dicho compuesto en bibliografía (aislado de los aceites esenciales de *Selinum tenuifolium* y *Cachrys ferulaceae*, Apiaceae) se obtuvo una confirmación tentativa de identidad (Đoković *et al.*, 2004; Chauhan *et al.*, 2012; Chauhan *et al.*, 2017).

Por otra parte, un pico cromatográfico no identificado con índice de retención en *HP-5MS* de 1121 y abundancia del 1,5% presentó un espectro de masa casi idéntico al de la Figura 18. Por tal razón, se asignó tentativamente dicho pico con el 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino, es decir, el isómero geométrico del 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino. En las condiciones altamente energéticas de la ionización electrónica, los espectros de los isómeros geométricos suelen ser idénticos, no pudiendo distinguirse claramente uno del otro (Fleming y Williams, 1968; Carey, 2008).

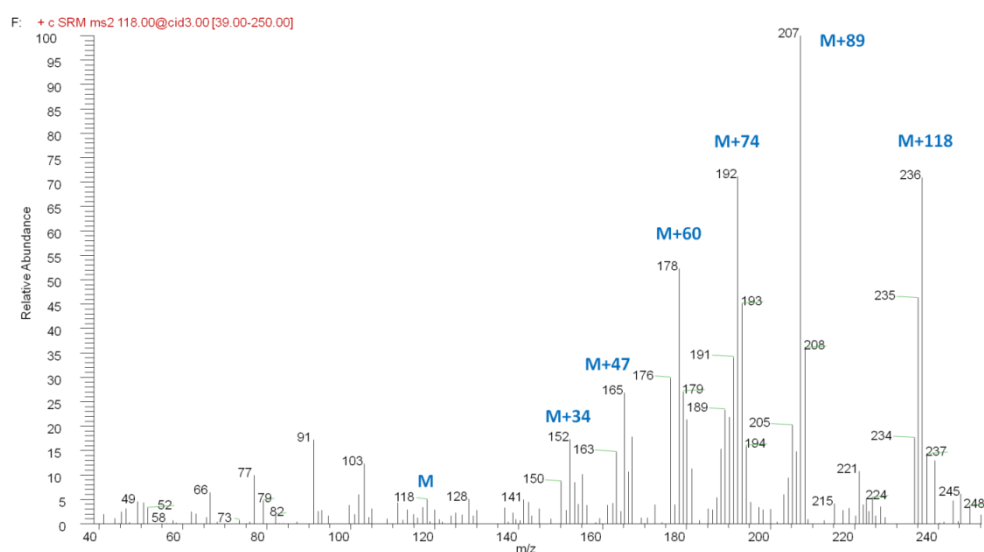
En la misma línea, realizando una minuciosa búsqueda pico a pico en el cromatograma del aceite esencial de *B. palustris* obtenido mediante *GC-MS*, se encontró un espectro de masa idéntico al de la Figura 18. Aplicando el mismo razonamiento, se concluyó que tal pico (con índice de retención en *HP-5MS* de 1519 y abundancia del 0,2%) correspondería al (*E*)-éster de lachnophyllum [metil (*E*)-dec-2-en-4,6-diinoato].





### 3.6 Espectrometría de MS-MS

En la Figura 22 se presenta el espectro CID obtenido del experimento de MS-MS para el ion padre  $m/z$  118 correspondiente al 1-nonen-3,5-diino. En el mismo se observó formación de aductos (por reacción ion-ion o ion-molécula) en las condiciones de fragmentación, lo que es un comportamiento típico de los acetilenos y poliacetilenos, siendo una herramienta adicional para su caracterización (Anicich *et al.*, 1986).



**Figura 22:** Espectro CID del experimento MS-MS correspondiente a la fragmentación del ion padre  $m/z$  118 del 1-nonen-3,5-diino. Se observa la gran abundancia de aductos en la trampa iónica.

### 3.7 Composición volátil de *B. palustris* por GC-MS

En la Tabla 2 se presenta la composición volátil final de *B. palustris* obtenida por GC-MS y confirmada en cuanto a sus componentes mayoritarios poliacetilénicos a través de IR, UV, RMN y MS, como fuera expuesto en las secciones anteriores. En tanto, en la Figura 23 se muestra el perfil volátil de la especie en estado vegetativo, y la estructura de los principales componentes poliacetilénicos determinados con éste trabajo en sus respectivos tiempos de retención.

#	Compuesto	LRI1e	LRI1b	LRI2e	LRI2b	%FL	%VE	Identif.
1	3-hexanona	791	788*	1037	1055*	0,01	-	LRI, MS
2	1-metilciclopentanol	795	798*	1345	ndis	0,1	-	LRI, MS
3	2-hexanol	800	796	1223	1239*	0,03	-	LRI, MS
4	3-hexen-2-ona	834	834*	ndet	1209*	0,05	-	LRI, MS



Tabla 2, continuación

5	2-( <i>E</i> )-hexenal	846	846	1201	1209*	0,03	0,08	LRI, MS
6	$\alpha$ -tuyeno	925	924	1022	1038	0,01	-	LRI, MS
7	$\alpha$ -pineno	930	932	1020	1036	0,05	-	LRI, MS
8	sabineno	967	969	1095	1130	0,02	-	LRI, MS
9	$\beta$ -pineno	970	974	1079	1124	0,04	0,04	LRI, MS
10	mirceneno	987	988	1149	1168	0,2	0,1	LRI, MS
11	3,5-nonadieno	1004	1091 <sup>†</sup>	1294	ndis	1,3	0,7	MS
12	limoneno	1024	1024	1180	1210	0,2	-	LRI, MS
13	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimeno	1036	1032	1265	1238	0,2	0,1	LRI, MS
14	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno	1049	1044	1258	1257	8,3	4,1	LRI, MS
15	1-nonen-3,5-diino	1089	ndis	1468	ndis	52,7	65,0	RMN, MS
16	1,7-( <i>Z</i> )-nonadien-3,5-diino	1097	ndis	1522	ndis	14,4	17,8	RMN, MS
17	linalol	1105	1095	1549	1555	0,3	0,07	LRI, MS
18	1,7-( <i>E</i> )-nonadien-3,5-diino	1121	ndis	1571	ndis	2,4	1,5	MS
19	<i>allo</i> -ocimeno	1131	1128	ndet	1392	0,02	-	LRI, MS
20	( <i>E</i> )-miróxido	1143	1140	ndet	1474*	0,04	-	LRI, MS
21	$\alpha$ -terpineol	1188	1186	ndet	1731	0,05	-	LRI, MS
22	$\delta$ -elemeno	1343	1335	ndet	1469	0,5	-	LRI, MS
23	$\alpha$ -cubebeno	1355	1345	ndet	1458	0,01	-	LRI, MS
24	$\alpha$ -copaeno	1382	1374	ndet	1519	0,3	-	LRI, MS
25	$\beta$ -cubebeno	1391	1387	1535	1560	-	0,05	LRI, MS
26	$\beta$ -elemeno	1392	1389	ndet	1591	0,02	0,04	LRI, MS
27	( <i>E</i> )- $\beta$ -cariofileno	1425	1417	1583	1617	1,1	0,3	LRI, MS
28	$\beta$ -gurjuneno	1435	1431	ndet	1593	0,05	-	LRI, MS
29	$\gamma$ -elemeno	1441	1434	ndet	1642	0,01	-	LRI, MS
30	$\alpha$ -humuleno	1458	1452	1637	1672	0,1	0,1	LRI, MS
31	$\alpha$ -amorfeneno	1474	1483	ndet	1691	0,02	-	LRI, MS
32	$\gamma$ -muroleno	1480	1478	ndet	1692	0,02	0,06	LRI, MS
33	germacreno D	1488	1484	1675	1712	1,6	1,6	LRI, MS
34	( <i>E</i> )-murolo-4(14),5-dieno	1497	1493	ndet	ndis	0,07	0,04	LRI, MS
35	biciclo-germacreno	1504	1500	1698	1738	2,2	1,4	LRI, MS
36	$\alpha$ -muroleno	1507	1500	ndet	1730	0,1	0,08	LRI, MS
37	$\alpha$ -bulneseno	1510	1509	ndet	1729	0,01	-	LRI, MS
38	( <i>E</i> )-éster delachnophyllum	1519	1493 <sup>#</sup>	ndet	ndis	0,2	0,2	LRI, MS
39	$\delta$ -cadineno	1525	1522	ndet	1785	-	0,2	LRI, MS
40	( <i>Z</i> )-éster de lachnophyllum	1534	1502 <sup>#</sup>	ndet	ndis	5,3	4,3	RMN, MS
41	elemol	1556	1548	ndet	2078	0,04	0,1	LRI, MS
42	germacreno B	1558	1559	ndet	1572	0,02	0,2	LRI, MS
43	palustrol	1569	1567	nd	1953*	0,1	0,09	LRI, MS
44	( <i>E</i> )-nerolidol	1573	1561	2010	2044	0,1	0,06	LRI, MS
45	espatulenol	1583	1577	2095	2153	3,6	0,7	LRI, MS
46	óxido de cariofileno	1586	1582	1955	2000	0,7	0,1	LRI, MS
47	viridiflorol	1593	1592	2054	2112	0,1	0,2	LRI, MS
48	ledol	1600	1602	1997	2025*	0,04	-	LRI, MS



49	1- <i>epi</i> -cubenol	1626	1627	2040	2037	0,04	-	LRI, MS
50	<i>iso</i> -espatulenol	1636	1638*	ndet	2225*	0,4	-	LRI, MS
51	$\delta$ -cadinol	1639	1636	2174	2150	0,2	-	LRI, MS
52	$\alpha$ -murolol	1643	1644	ndet	ndis	0,03	-	LRI, MS
53	$\alpha$ -cadinol	1650	1652	ndet	2229*	0,2	-	LRI, MS
<b>Total identificado (%)</b>						97,6	99,3	
<b>Hidrocarburos monoterpénicos (%)</b>						9,0	4,3	
<b>Monoterpenos oxigenados (%)</b>						0,4	0,07	
<b>Hidrocarburos sesquiterpénicos (%)</b>						6,1	4,1	
<b>Sesquiterpenos oxigenados (%)</b>						5,6	1,3	
<b>Poliacetilenos (%)</b>						76,3	89,5	
<b>Otros (%)</b>						0,2	0,08	

**Tabla 2:** Composición volátil de *Baccharis palustris* en estado de floración (enero de 2013; extracción por SDE; capítulo 4) y vegetativo (junio de 2016; extracción por hidrodestilación) expresada como porcentaje de áreas relativas de cada compuesto en GC-MS (columna analítica de fase poco polar).

Referencias: *LRI1e*: valores de índice de retención lineal en columna de fase poco polar (HP-5MS) en condiciones experimentales; *LRI1b*: valores de índice de retención lineal en columna de fase poco polar (HP-5MS) de reportes bibliográficos; *LRI2e*: valores de índice de retención lineal en columna de fase polar (DB-Wax) en condiciones experimentales; *LRI2b*: valores de índice de retención lineal en columna de fase polar (DB-Wax) de reportes bibliográficos. ndet: no detectado, ndis: no disponible en base de datos. La mayoría de los valores de LRI en columna poco polar pertenecen a Adams (2007); mientras que la mayoría de los valores en columna polar son de Davies (1990). (\*) reportado por Linstrom y Mallard (NIST Webbook, 2019); (#) reportado por Albuquerque *et al.* (2004); (¶) reportado por Chauhan *et al.* (2017). Identif: técnica analítica empleada para la identificación del compuesto dado: LRI (índice de retención lineal), MS (espectrometría de masa), RMN (resonancia magnética nuclear).

Es pertinente aclarar que los resultados presentados en la Tabla 2 no permiten comparar directamente los porcentajes de concentración de uno y otro experimento (estado FL y estado VE) debido a que ambos extractos se obtuvieron mediante metodologías diferentes (SDE en el primer caso e hidrodestilación con agua y vapor en el segundo).

Como puede verse en la misma Tabla 2, como resultado del estudio espectroscópico detallado del aceite esencial de *B. palustris* se consiguió un porcentaje final de identificación del 97,6 % del perfil volátil en floración y del 99,3 % en el caso del estado vegetativo, los que representan valores muy superiores al obtenido en el capítulo 4 (21,1 %).

Asimismo, éste estudio permitió identificar un gran porcentaje de componentes poliacetilénicos en el aceite esencial de *B. palustris*: 76,3% en floración y 89,5% en estado vegetativo (Tabla 2 y Figura 23). Básicamente, los componentes terpénicos resultaron minoritarios en ésta especie, lo que fue un hecho diferencial a todas las especies y muestras analizadas a lo largo de ésta tesis (capítulo 4, Tabla 2 y Figura 23).



**Figura 23:** Perfil volátil de *B. palustris* (estado vegetativo) y la estructura de los principales componentes poliacetilenos del mismo.

En el aceite esencial de la especie *B. trinervis* (originaria del estado de Ceará, Brasil) se detectó previamente la presencia de los (*Z*) y (*E*) ésteres de lachnophyllum (porcentaje de abundancia 0,8 y 14,7%; respectivamente) junto a componentes terpénicos; siendo éste el único registro de presencia de poliacetilenos en aceites esenciales del género *Baccharis* L. como fuera indicado anteriormente (Albuquerque *et al.*, 2004; Sobrinho *et al.*, 2016). Sin embargo, en un reporte de la misma especie colectada en Costa Rica no se detectó la presencia de poliacetilenos, demostrando la amplia variabilidad química de *B. trinervis* y la existencia de quimiotipos (Chaverry y Ciccio, 2017).

Considerando estos antecedentes, y dado que la especie *B. palustris* no se ha estudiado químicamente con anterioridad en la literatura, se puede afirmar que ésta especie representa un caso único dentro del género *Baccharis* L. por su alto contenido en poliacetilenos (mayor al 75% del aceite esencial).

Especies vegetales con tan alto contenido de poliacetilenos en el aceite esencial son poco frecuentes, y dentro de ellas destacan miembros de la familia Apiaceae. Un caso particularmente destacable es el del aceite esencial de raíces de *Selinum tenuifolium* (especie que crece en la cadena montañosa del Himalaya), el que contiene varios poliacetilenos C<sub>9</sub> como compuestos mayoritarios: 3,5-nonadiino (85,6-94,3 %), 3,5-nonadiino-2-ona (3,0 %), 4,6-nonadiino-3-ona (2,5 %), 3,5-nonadiino-2-ol (2,2 %) y 4,6-nonadiino-3-ol (3,1 %) (Chauhan *et al.*, 2012; Chauhan *et al.*, 2017).



En la misma línea que la especie anterior, el aceite esencial del rizoma de *Cachrys ferulaceae* colectada en Montenegro contiene un 85,0% de 3,5-nonadiino, compuesto éste que posee actividad biológica *in vitro* inhibiendo la liberación de monóxido de nitrógeno (gas regulador del proceso de inflamación) (Đoković *et al.*, 2004). Un poliacetileno de cadena carbonada más larga como el falcarinol (C<sub>17</sub>), ha sido identificado en algunos aceites, particularmente en el caso de varios órganos de *Eryngium yuccifolium* (3,2-9,6%) (Ayoub *et al.*, 2006).

Dentro de las Asteraceae, de las partes aéreas florecidas de la especie *Bidens cernua* colectada en Serbia se obtuvo un aceite esencial rico en poliacetilenos, con los compuestos principales C<sub>13</sub>: 1-fenilhepta-1,3,5-triino (57,1 %) y 1,3(E),11(E)-tridecatrieno-5,7,9-triino (1,8 %) (Chalchat *et al.*, 2009). Por otra parte, una población cultivada en Egipto de *Grindelia humilis* demostró un contenido destacable de poliacetilenos (46,2 %) en el aceite esencial de partes aéreas, siendo los principales de ellos los compuestos C<sub>9</sub> (E) y (Z) acetatos de lachnophyllol (4,1 y 22,1%, respectivamente) y varios compuestos C<sub>13</sub> (El-Shamy *et al.*, 2000). En tanto, el aceite esencial de partes aéreas y raíces de *Conyza bonariensis* y *Conyza canadensis* es extremadamente rico en ésteres poliacetilénicos C<sub>10</sub>: de matricaria y de lachnophyllum; así como en la lactona de matricaria (Barbosa *et al.*, 2005; Tzakou *et al.*, 2005; Ayaz *et al.*, 2017). Dichos componentes también se han reportado como mayoritarios en el aceite esencial de raíces de *Erigeron acris* y *Erigeron annuus* (Nazaruk y Kalemba, 2009). Otros acetilenos C<sub>10</sub> como el deca-4,6-diionato de metilo (éster de dehidro-lachnophyllum) y su respectivo ácido han sido reportados también como componentes mayoritarios del aceite esencial de partes aéreas de *Bellis perennis* (Avato *et al.*, 1997). Finalmente, desde el aceite esencial de partes aéreas de *Santolina canescens* se aisló un nuevo hidrocarburo poliacetilénico C<sub>16</sub> (llamado santolindiacetileno; 28,5 % de abundancia en el aceite) con la estructura de un naftaleno unido a una cadena polialquínica (Utrilla *et al.*, 1995).

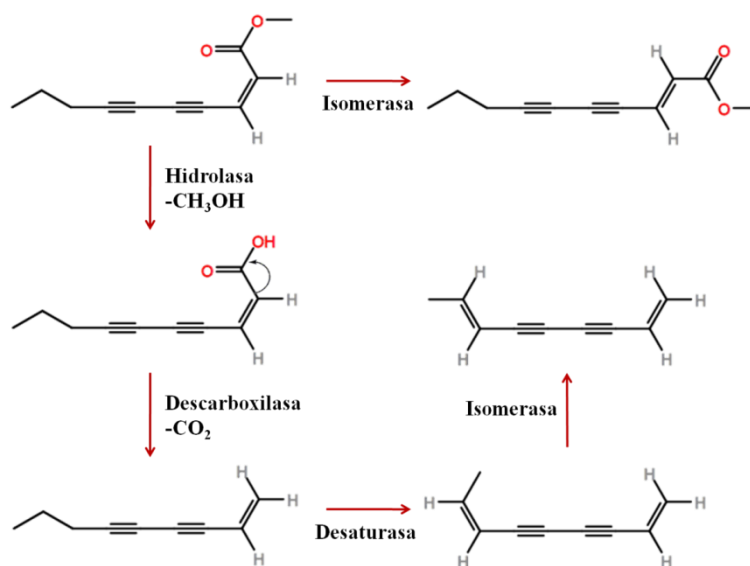
Todos los reportes anteriores demuestran que los poliacetilenos pueden estar presentes en aceites esenciales obtenidos de las Apiaceae y de las Asteraceae pero no son frecuentes en el género *Baccharis* L. Por otra parte, en general son escasos los reportes de composición de poliacetilenos C<sub>9</sub> en aceites esenciales. De acuerdo a nuestros relevamientos bibliográficos, los compuestos reportados en éste trabajo como componentes mayoritario del aceite de *B. palustris* (1-nonen-3,5-diino y ambos isómeros geométricos del 1,7-nonadien-3,5-diino), no han sido informados previamente en la literatura como productos naturales.



En consecuencia, los resultados aquí expuestos son novedosos, y podrían tener una posible aplicación dado que los compuestos poliacetilénicos volátiles tienen importancia como agentes aromatizantes (Chauhan *et al.*, 2012; Chauhan *et al.*, 2017).

### 3.8 Aspectos biosintéticos

En la introducción de éste capítulo se describió la vía biosintética del ácido crepenínico, mostrando los pasos necesarios para la síntesis del (*Z*)-éster de lachnophyllum. En ésta sección final se brindará una hipótesis de los pasos necesarios para la obtención de los compuestos mayoritarios identificados o tentativamente identificados en el aceite esencial de *B. palustris* a partir del precursor (*Z*)-éster de lachnophyllum (Figura 24).



**Figura 24:** Posibles modificaciones estructurales biosintéticas a partir del (*Z*)-éster de lachnophyllum que conducirían a los principales compuestos poliacetilénicos determinados en el aceite esencial de *B. palustris*.

A partir de (*Z*)-éster de lachnophyllum por medio de una isomerasa (o por isomerización química) se produciría el (*E*)-éster de lachnophyllum, encontrado como compuesto minoritario en el aceite esencial de *B. palustris*. No se considera que el éster *trans* provenga de la ruta del ácido estearóico (a pesar de tener la típica estereoquímica de dicha ruta) debido a que la síntesis de éstos compuestos en general se da por la vía del ácido crepenínico (Christensen y Lam, 1991; Minto y Blacklock, 2008).

También a partir del precursor se postuló una posible hidrólisis (enzimática o química) que generaría el ácido de lachnophyllum, el cual mediante descarboxilación generaría el 1-nonen-3,5-diino, compuesto mayoritario del aceite esencial de *B. palustris*. A partir de éste último se produciría una nueva desaturación (del tipo de las que se da en los pasos iniciales de la vía del



ácido crepenínico de la Figura 5), que produciría el 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino (Figura 25). Finalmente, una nueva isomerización de éste último compuesto brindaría su isómero geométrico 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino, completando el conjunto de compuestos poliacetilénicos principales del aceite esencial de *B. palustris*.

#### 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Mediante la aplicación de diferentes técnicas espectroscópicas (RMN, MS, IR, y UV) se identificó en el volatilo de *B. palustris* algunos componentes mayoritarios C<sub>9</sub> poliacetilénicos no descritos previamente en la literatura: 1-nonen-3,5-diino, 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino y 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino. Asimismo, se identificaron otros compuestos poliacetilénicos previamente descritos: 3,5-nonadiino, (*Z*)-éster de lachnophyllum y (*E*)-éster de lachnophyllum. La estructura de los componentes identificados permitió hipotetizar que el origen de todos ellos sería el (*Z*)-éster de lachnophyllum mediante reacciones de hidrólisis, descarboxilación, desaturación e isomerización; lo que en consecuencia incrementaría la complejidad química del volatilo de *B. palustris*.

Debido a que los componentes identificados presentan una estructura con alto nivel de insaturación, la evaluación de bioactividad en ensayos *in-vitro* podría ser interesante para dilucidar la potencialidad de estos compuestos.

#### 5 BIBLIOGRAFIA

1. R.P. Adams. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 804 pp.
2. M.R.J.R. Albuquerque, E.B. Souza, M.U.D.S. Lins, N.A.P. Nogueira, T.L.G. Lemos, E.R. Silveira, O.D.L. Pessoa. 2004. Composition and antimicrobial activity of the essential oil from aerial parts of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. *Arkivoc*, 6: 59-65.
3. V.G. Anicich, W.T. Huntress Jr., M.J. McEwan. 1986. Ion-molecule reactions of hydrocarbon ions in C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> and HCN. *J. Phys. Chem.*, 90: 2446-2450.
4. P. Avato, C. Vitali, P. Mongelli, A. Tava. 1997. Antimicrobial activity of polyacetylenes from *Bellis perennis* and their synthetic derivatives. *Planta Med.*, 63: 503-507.
5. F. Ayaz, N. Küçükboyacı, B. Demirci. 2017. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Conyza canadensis* (L.) Cronquist from Turkey. *J. Essent. Oil Res.*, 29: 336-343.
6. N. Ayoub, M. Al-Azizi, W.König, K.H. Kubeczka. 2006. Essential oils and a novel polyacetylene from *Eryngium yuccifolium* Michaux. (Apiaceae). *Flavour Fragr. J.*, 21: 864-868.
7. L.C.A. Barbosa, V.F. Paula, A.S. Azevedo, E.A.M. Silva, E.A. Nascimento. 2005. Essential oil composition from some plant parts of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist. *Flavour Fragr. J.*, 20: 39-41.
8. F. Bohlmann, H.Bornowski, C. Arndt. 1965. Über das erste natürlich vorkommende Kumulen. *Chem. Ber.*, 98: 2236-2242.
9. T. Bruun, C.M. Haug, N.A. Sörensen. 1950. The synthesis of *trans*-lachnophyllum ester. *Acta Chem. Scand.*, 4: 850-855.



10. F. A. Carey. 2008. Química orgánica. Sexta Edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F., México. 1421 pp.
11. J.C. Chalchat, S. Petrovic, Z. Maksimovic, M. Gorunovic. 2009. Composition of essential oil of *Bidens cernua* L., Asteraceae from Serbia. *J. Essent. Oil Res.*, 21: 41-42.
12. R.S. Chauhan, M.C. Nautiyal, A. Tava, M. Mella. 2012. Chemical composition of the volatile oil from the roots of *Selinum tenuifolium* Wall. *Helv. Chim. Acta*, 95: 780-787.
13. R.S. Chauhan, M.C. Nautiyal, Y.M. Bahuguna, G. Figueredo, P.Chalard. 2017. 3,5-Nonadiyne rich accession of *Selinum tenuifolium* Wall. from Dayara, Uttarakhand, Himalaya. *J. Essent. Oil Bear. Pl.*, 20: 878-882.
14. C. Chaverri, J.F. Ciccio. 2017. Essential oils of *Baccharis trinervis* (Asteraceae) from Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 65: 1307-1321.
15. L.P. Christensen, J. Lam. 1991. Acetylenes and related compounds in Astereae. *Phytochemistry*, 30: 2453-2476.
16. L.P. Christensen, K. Brandt. 2008. Bioactive polyacetylenes in food plants of the Apiaceae family: Occurrence, bioactivity and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41: 683-693.
17. N.W. Davies. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *J. Chromatogr. A*, 503: 1-24.
18. V.M. Dembitsky. 2006. Anticancer activity of natural and synthetic acetylenic lipids. *Lipids*, 41: 883-924.
19. D.D. Đoković, V.M. Bulatović, B.Đ. Božić, M.V. Kataranovski, T.M. Zrakić, N.N. Kovačević. 2004. 3,5-Nonadiyne isolated from the rhizome of *Cachrys ferulacea* inhibits endogenous nitric oxide release by rat peritoneal macrophages. *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 853-854.
20. A.M. El-Shamy, S.S. El-Hawary, A.O. El-Shabrawy, H.M. El-Hefnawy, H. Glasl. 2000. Essential oil composition of three *Grindelia* species. *J. Essent. Oil Res.*, 12: 631-634.
21. F. Faini, C. Labbé, J. Coll. 1999. Seasonal changes in chemical composition of epicuticular waxes from the leaves of *Baccharis linearis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 27: 673-679.
22. I. Fleming, D.H. Williams. 1968. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Ediciones Urmo, Bilbao, España. 223 pp.
23. L. Hansen, P.M. Boll. 1986. Polyacetylenes in Araliaceae: their chemistry, biosynthesis and biological significance. *Phytochemistry*, 25: 285-293.
24. D. Holme, N.A. Sørensen. 1954. Studies related to naturally occurring acetylene compounds. XV. The isolation of *trans*-lachnophyllum Ester from *Bellis perennis* L. *Acta Chem. Scand.*, 8: 280-283.
25. P.J. Linstrom, W.G. Mallard (eds.). 2019. NIST Chemistry WebBook. NIST Standard Reference Database Number 69. <http://webbook.nist.gov>. Accesado 03/06/2019.
26. R.E. Minto, B.J. Blacklock. 2008. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. *Prog. Lipid. Res.*, 47: 233-306.
27. K. He, G. Montenegro, J.J. Hoffmann, B.N. Timmermann. 1996. Diterpenoids from *Baccharis linearis*. *Phytochemistry*, 41: 1123-1127.
28. P.J. Nathan, E. Díaz T. 1970. Introducción a la resonancia magnética nuclear. Editorial Limusa-Wiley, Ciudad de México, México. 190 pp.
29. J. Nazaruk, D.Kalemba. 2009. Chemical composition of the essential oils from the roots of *Erigeron acris* L. and *Erigeron annuus* (L.) Pers. *Molecules*, 14: 2458-2465.
30. V.L.G. Redher, H.F. Leitão Filho, A.J. Marsaioli. 1990. Isolation and <sup>13</sup>C NMR of polyacetylenes from *Baccharis eleagnoides*. *J. Nat. Prod.*, 53: 692-695.
31. A.C.N. Sobrinho, E.B. de Souza, M.F.G. Rocha, M.R.J.R. Albuquerque, P.N. Bandeira, H.C. dos Santos, C.S. de Paula Calvacante, S.S. Oliveira, P.R. Aragão, S.M. de Moraes, R.O. dos Santos Fontenelle. 2016. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). *Ind. Crops Prod.*, 84: 108-115.
32. N.A. Sørensen, K. Stavholt. 1950. Studies related to naturally occurring acetylene compounds. VI. The essential oils of some species of *Erigeron*. *Acta Chem. Scand.*, 4: 1575-1583.
33. N.A. Sørensen. 1977. Some naturally occurring acetylenic compounds. *Proc. Chem Soc.*, 1961: 98-110.
34. O. Tzakou, C. Vagias, A. Gani, A. Yannitsaros. 2005. Volatile constituents of essential oils isolated at different growth stages from three *Conyza* species growing in Greece. *Flavour Fragr. J.*, 20: 425-428.
35. N. Umpiérrez. 2017. Evaluación de la actividad antifúngica de metabolitos presentes en plantas aromáticas nativas para el control de patógenos de cítricos. Tesis de Maestría. Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 117 pp.
36. M.P. Utrilla, M.C. Navarro, J. Jiménez, M.P. Montilla, A. Martín. 1995. Santolindiacetylene, a polyacetylene derivative isolated from the essential oil of *Santolina canescens*. *J. Nat. Prod.*, 58: 1749-1752.





## Capítulo 10

### Actividad antiradicalaria y alexitérica de extractos de *Baccharis* spp. L. y compuestos de semi-síntesis

**Resumen:** A lo largo de los capítulos precedentes de ésta tesis se describieron estudios de composición química de extractos volátiles y no volátiles de *Baccharis* spp. y la semi-síntesis y estudio estructural del derivados del carquejol. En éste último capítulo se abordará la temática de actividad biológica de los extractos y productos obtenidos en capítulos anteriores (a partir de material vegetal de Uruguay y Brasil), empleando dos tipos de evaluaciones: actividad antiradicalaria y alexitérica. Primeramente se describen conceptos fundamentales sobre actividad antiradicalaria y antioxidante (con particular énfasis en el método del *DPPH*); así como se desarrolla sobre el ofidismo y la actividad alexitérica de productos naturales. Luego se presenta el trabajo con diferentes extractos volátiles y no volátiles de *Baccharis* spp. obtenidos con anterioridad (capítulos 4, 5, 6 y 7), y sus respectivos ensayos de actividad, junto con un análisis en paralelo de compuestos de semi-síntesis obtenidos en el capítulo 8. A efectos comparativos también se colectó material vegetal de la provincia de Corrientes (Argentina) y se obtuvieron sus respectivos extractos, los que también fueron estudiados en cuanto a su bioactividad. Algunos extractos orgánicos fueron particularmente promisorios en cuanto a su actividad biológica, como en el caso de los pertenecientes a las especies *B. dracunculifolia*, *B. punctulata* y *B. trimera* (extractos alcohólicos) en cuanto a su actividad antiradicalaria; y los de *B. articulata* (individuos masculinos y femeninos) y *B. trimera* (extractos en acetato de etilo) por su actividad alexitérica. Sin embargo, los mejores resultados de éste último tipo de actividad fueron obtenidos para el compuesto semi-sintético carquejona y para el (*Z*)-éster de lachnophyllum, lo que demostró la importancia de los enfoques de investigación empleados en ésta tesis para la búsqueda de productos bioactivos.

#### 1 INTRODUCCION

##### 1.1 Actividad antioxidante y antiradicalaria

En los procesos fisiológicos normales se generan especies químicas altamente reactivas con una alta capacidad oxidativa: radicales libres (superóxido, peróxido, hidróxido; y radicales de nitrógeno y cloro) y moléculas capaces de producir radicales (peróxido de hidrógeno,



hidroperóxidos, etc.) (Kohen y Nyska, 2002; Puertollano *et al.*, 2011). Los sistemas biológicos contrarrestan la proliferación de dichas especies mediante un arsenal antioxidante endógeno mediado por enzimas y por la participación de antioxidantes exógenos obtenidos de la dieta. Estos pueden ser vitaminas o pro-vitaminas (ácido ascórbico,  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -tocoferol), carotenoides (licopeno, luteína, zeaxantina), esteroides ( $\beta$ -sitosterol), fenoles y polifenoles (timol, safrol, carvacrol, flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos, estilbenos), y minerales (selenio, cobre, hierro y zinc); entre otros (Kohen y Nyska, 2002; Paendey y Rizvi, 2009; Puertollano *et al.*, 2011). Además de la protección antioxidante y antiradicalaria, los fenoles y polifenoles suelen tener otras funciones más o menos relacionadas como antimutágenos, anti-inflamatorios y antimicrobianos, por lo que se trata de compuestos aconsejados para su ingesta alimentaria como nutrientes polifuncionales (nutraceuticos) (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Paendey y Rizvi, 2009; Ares *et al.*, 2010). Los polifenoles se encuentran naturalmente en las plantas, en donde ejercen actividad como protectores de la radiación UV, del daño oxidativo y de la actividad nociva de otros organismos (fitopatógenos, herbívoros, etc.) (capítulos 1 y 6) (Pandey y Rizvi, 2009; Ricco *et al.*, 2015).

Existen dos principales mecanismo de acción antioxidante para los compuestos polifenólicos: el mecanismo *SET* (*single electron transfer*) en que dichos agentes transfieren un electrón hacia los radicales libres estabilizándolos; y el mecanismo *HAT* (*hydrogen atom transfer*) donde un átomo de hidrógeno es transferido logrando la captura y estabilización del radical (Kohen y Nyska, 2002; Muschietti y Martino, 2009; Schaich *et al.*, 2015). A pesar de que el resultado final es el mismo, el mecanismo *SET* es mucho más rápido y no tiene influencia por la difusión de las especies; mientras que el mecanismo *HAT* es ralentizado por difusión e inhibido por solventes próticos (Schaich *et al.*, 2015). Otro posible mecanismo de acción antioxidante de los polifenoles es el de actuar como ligandos en reacciones de complejación con iones metálicos (por ejemplo  $\text{Fe}^{2+}$ ), inactivando su capacidad redox (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Kohen y Nyska, 2002).

Evaluar la actividad antioxidante y antiradicalaria de plantas medicinales y sus extractos es un objetivo relevante en la búsqueda de aquellos que provean de agentes antioxidantes exógenos como nutraceuticos (Ares *et al.*, 2010). Este tipo de actividad de un compuesto o un extracto puede ser evaluada por diferentes metodologías: mediante captura de un radical peróxido (métodos de *ORAC* y *TRAP*), hidroxilo (método de la desoxirribosa) o un radical orgánico no biogénico (métodos de *ABTS* y *DPPH*); midiendo el poder reductivo de un metal (métodos de

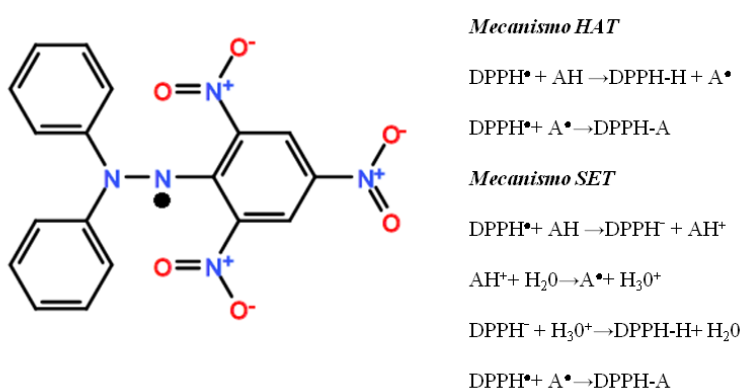


FRAP y CUPRAC); cuantificando los productos formados durante la peroxidación de lípidos (métodos de TBARS, oxidación de LDL, co-oxidación de  $\beta$ -caroteno); entre otras (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Kohen y Nyska, 2002; Muschietti y Martino, 2009, Schaich *et al.*, 2015).

Como se indicó en el capítulo 1 y 4 de ésta tesis, gran parte de las especies de *Baccharis* L. estudiadas hasta el momento han demostrado buenos niveles de actividad antiradicalaria y antioxidante, principalmente debido a su alto contenido polifenólico (flavonoides y ácidos fenólicos) (Tapia *et al.*, 2004; Abad y Bermejo, 2007; Ares *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2011; de Oliveira *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2012; Moreira *et al.*, 2012; Figueiredo-Rinhel *et al.*, 2013; Campos *et al.*, 2016; Nunes *et al.*, 2016). Por ello se estimó pertinente evaluar dicha actividad biológica de los extractos obtenidos en el marco de ésta tesis doctoral.

## 1.2 Método del DPPH para determinación de la actividad antiradicalaria

El método espectrofotométrico de captura del radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) (Figura 1) es uno de los más empleados para la evaluación primaria de la actividad antioxidante (antiradicalaria) dada su simplicidad de aplicación y su bajo costo (Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004; Muschietti y Martino, 2009; Xie y Schaich, 2014; Schaich *et al.*, 2015).



**Figura 1:** Estructura química y reacciones del radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) con un antioxidante (AH) mediante sus dos mecanismos principales de reacción: HAT y SET. Dado que la evaluación de la actividad antiradicalaria en general se hace en medio alcohólico, el mecanismo SET es el más indicado para representar la reactividad. Fuente: Brand-Williams *et al.* (1995) y Molyneux, (2004).

La metodología analítica se basa en la reacción del antioxidante a evaluar (AH en la Figura 1) con el DPPH en medio alcohólico (metanol o etanol), produciendo una disminución en la absorbancia en el rango 515-520 nm hasta una situación de equilibrio, acompañado de un



característico cambio de color del violeta al amarillo cuando se está frente a un buen agente antioxidante (**Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004**). La metodología del *DPPH* es de relevancia cuando se quiere evaluar antioxidantes de bajo peso molecular en muestras biológicas, ya que el *DPPH* no reacciona con azúcares y proteínas (produciendo precipitación de dichos compuestos), aunque el ion  $\text{Fe}^{2+}$  puede ser un interferente (**Molyneux, 2004**).

En la metodología, la concentración inicial de *DPPH* se calcula partiendo de una curva de calibración o mediante el empleo de la Ley de Lambert-Beer (Ecuación 2) (**Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004**). Se define la  $\text{EC}_{50}$  (concentración efectiva 50%) como los moles de antioxidante necesarios para disminuir la concentración inicial de *DPPH* en un 50%; por lo que su cálculo se realiza por interpolación en el gráfico % *DPPH* remanente vs. concentración del antioxidante en el estado estacionario (**Brand-Williams *et al.*, 1995; Molyneux, 2004; Rufino *et al.*, 2007**). Sin embargo, el cálculo de  $\text{EC}_{50}$  requiere el empleo de varias concentraciones de un mismo extracto, por lo cual no es un parámetro práctico cuando se deben evaluar muchas muestras diferentes y emplear la técnica como “*screening*” de actividad (**Mensor *et al.*, 2001**). Por ello, un parámetro más directo a la hora de expresar los resultados es el llamado “remanente de *DPPH*”, el que se define por la siguiente ecuación:

$$DPPH_r = [DPPH]_t / [DPPH]_{t=0} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde  $[DPPH]_t$  es la concentración de radical a un tiempo  $t$  luego de iniciar la reacción y  $[DPPH]_{t=0}$  es la concentración inicial de *DPPH* al momento de iniciar el experimento (**Sánchez-Moreno *et al.*, 1998**). Dado que la reacción cumple con la ley de Lambert-Beer, dichas concentraciones pueden ser directamente sustituidas por los valores de absorbancia (**Molyneux, 2004**).

$$A_{DPPH,t} = \epsilon \cdot b \cdot [DPPH]_t \quad (\text{Ec. 2; ley de Lambert-Beer})$$

$$DPPH_r = (A_{DPPH,t} / \epsilon \cdot b) / (A_{DPPH,t=0} / \epsilon \cdot b) = A_{DPPH,t} / A_{DPPH,t=0} \quad (\text{Ec. 3})$$

La limitación que presenta la ecuación 3 es que supone que el valor de  $\epsilon$  es el mismo para  $t=0$  que para cualquier tiempo de reacción, lo que no es completamente cierto, ya que a medida que la reacción transcurre, se encuentra contribución de la especie estabilizada que también presenta absorbancia a 517 nm (**Molyneux, 2004**). Por ello, la expresión  $A_{DPPH,t}$  es engañosa ya que implica que sólo el *DPPH* absorbe a un tiempo  $t$  a esa longitud de onda, lo que no es real pero en la mayoría de los casos es una aproximación aceptable cuando el objetivo es emplear la técnica como *screening* de actividad (**Brand-Williams *et al.*, 1995; Mensor *et al.*, 2001; Molyneux, 2004**). El remanente de *DPPH* en general se expresa como porcentaje



(**Brand-Williams et al., 1995; Molyneux, 2004**), y será ese el parámetro calculado en éste trabajo.

Cuando la cinética de la reacción antiradicalaria es lenta:  $A_{DPPH,t=0} \approx A_0$ , donde  $A_0$  es la absorbancia del *DPPH* sin el agregado de antioxidante (control; debe mantenerse estable a lo largo de toda la medición espectrofotométrica). Si la cinética de la reacción es rápida, para calcularse el remanente de *DPPH* se debe emplear el valor de  $A_0$  para tener una medida más fiable de la capacidad antiradicalaria. Por ello, otro índice más preciso que suele calcularse con la metodología del *DPPH* es el porcentaje de inhibición o *Q* (*quenching*, en inglés), el que se presenta en la siguiente fórmula:

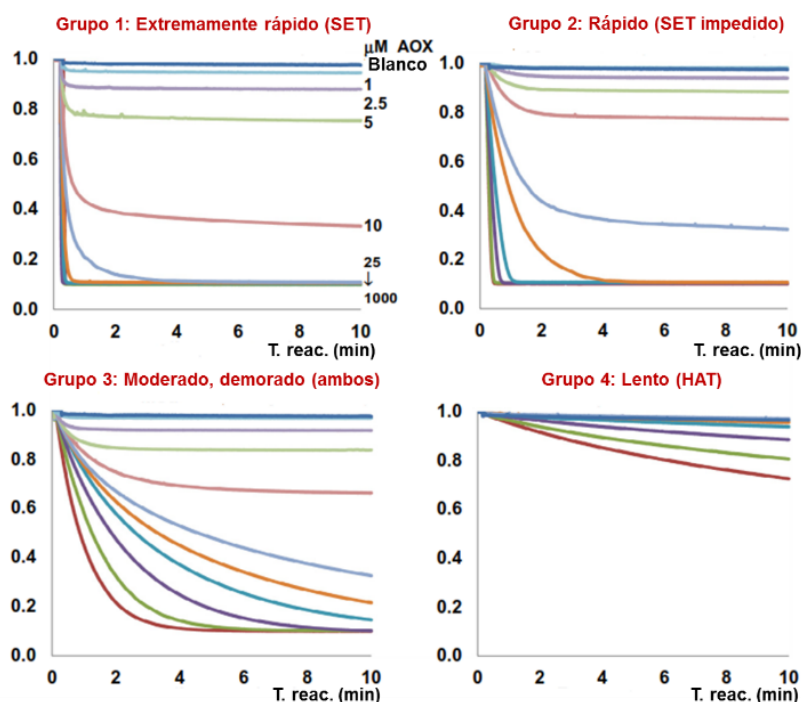
$$Q = 100 [(A_0 - A_{DPPH,t}) / A_0] \quad (\text{Ec. 4})$$

La ventaja es que *Q* no depende de la primera medida a tiempo 0 de reacción (que suele ser imprecisa por los tiempos diferentes de medición entre muestras sucesivas), lo que lo hace un parámetro más adecuado para hacer un *screening* de actividad antiradicalaria (**Koleva et al., 2002; Molyneux, 2004**). Cuando se realiza la aproximación  $A_{DPPH,t=0} = A_0$ , sustituyendo la ecuación 3 en la ecuación 4 se obtiene:

$$Q = 100 - DPPH_r \quad (\text{Ec. 5})$$

La ecuación 5 será la empleada en éste trabajo de tesis para tener el mismo nivel de comparación entre las diferentes muestras ensayadas.

Los compuestos que en general reaccionan con una cinética más rápida son los fenoles simples con un sólo anillo (Grupo 1, Figura 2), empleando el mecanismo *SET*, ya que la transferencia de un electrón se encuentra menos impedida que en el mecanismo *HAT* (**Xie y Schaich, 2014; Schaich et al., 2015**). Las moléculas voluminosas en general tienen dificultades de acceso al centro radicalario, por lo que presentan cinéticas mucho más lentas, pertenecientes a los grupos 3 y 4 de la Figura 2 (**Schaich et al., 2015**).



**Figura 2:** Patrones cinéticos de las reacciones entre DPPH y compuestos antioxidantes. Fuente: Schainch *et al.* (2015).

### 1.3 Ofidismo

El ofidismo es la intoxicación de personas por mordidas de serpientes venenosas en la que las mismas inyectan su veneno a la víctima por medio de los colmillos, causando severos daños a la víctima (Carreira *et al.*, 2005). En general, el ataque a seres humanos es una actividad defensiva que ejercen las serpientes sólo cuando se sienten agredidas, ya que el uso principal de la ponzoña es para la caza de presas (ratones, aves, otras serpientes) (Carreira *et al.*, 2005). El ofidismo es uno de los problemas de salud pública de mayor gravedad en el ámbito rural de los países subdesarrollados, particularmente en América Latina en donde se producen unos 150.000 casos anuales y 5000 muertes (Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015). Actualmente se considera que el ofidismo es una dolencia negligenciada, principalmente en América Latina, África, Asia y Oceanía (dos Santos Gomes *et al.*, 2016).

La composición del veneno de serpientes (ofidios) varía en función de la especie, la distribución geográfica, la edad del animal, la dieta y el estado fisiológico, el sexo y la época del año (dos Santos Gomes *et al.*, 2016). El mismo contiene proteínas y péptidos neurotóxicos, miotóxicos y cardiotoxicos, enzimas proteolíticas (metaloproteinasas), hidrolíticas (fosfolipasas, hialuronidasas) y de óxido-reducción (*L*-amino oxidasas), entre otras (Januário, *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2015; dos Santos Gomes *et al.*, 2016; Gay *et al.*,

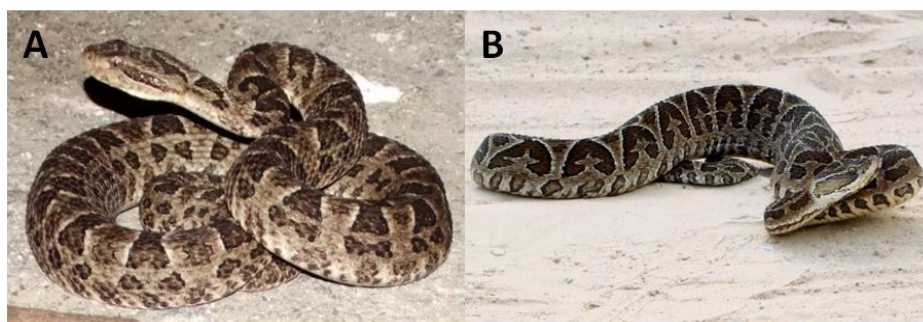


2016). Además, el veneno suele incluir otros metabolitos no proteicos como carbohidratos, ácidos orgánicos y sales inorgánicas (Torres *et al.*, 2015).

El tratamiento actual para el ofidismo es la seroterapia (con sueros que se obtienen de la inmunización de equinos), aunque la misma tiene algunos efectos indeseados como el “*shock*” anafiláctico, producido por la introducción de proteínas externas al organismo (alérgenos) en el torrente sanguíneo (Soares *et al.*, 2005; Carreira *et al.*, 2005; Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015; Gay *et al.*, 2016). Sin embargo, el suero no permite la protección o reconstitución del daño local a los tejidos blandos producido por la inyección del veneno, lo que muchas veces resulta en la decisión médica de amputar los miembros afectados (Camargo *et al.*, 2001; dos Santos Gomes *et al.*, 2016). Por ello es imperioso buscar alternativas al tratamiento serológico, y los productos naturales son una alternativa altamente promisoriosa como será detallado en el punto 1.5.

#### 1.4 *Bothrops* sp. (Serpentes:Viperidae)

Las serpientes del género *Bothrops* son las que causan mayor incidencia de casos de ofidismo en América Latina, sobrepasando el 90% de los mismos (da Silva y Rodrigues, 2008; Torres *et al.*, 2015, Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2016; dos Santos Gomes *et al.*, 2016). En Uruguay las especies que provocan más accidentes son las especies terrestres *B. pubescens* (“yara”) y *B. alternatus* (“yará grande”, “crucera”) (Carreira *et al.*, 2005), mientras que en Argentina (particularmente en la región nordeste) *B. diporus* (“yará chica”) es la especie con mayor número de accidentes seguida de *B. alternatus* (Bustillo *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2015; Gay *et al.*, 2016) (Figura 3).



**Figura 3:** (A): *Bothrops diporus* (“yará chica”) y (B): *Bothrops alternatus* (“yará grande”, “crucera”), especies cuyos venenos fueron empleados en éste trabajo.

Fuentes (A) W. Bustamante (<http://www.ecoregistros.org/site/imagen.php?id=91007>); (B): Wikiwand ([http://www.wikiwand.com/it/Bothrops\\_alternatus](http://www.wikiwand.com/it/Bothrops_alternatus)).



### 1.5 Actividad alexitérica de productos naturales

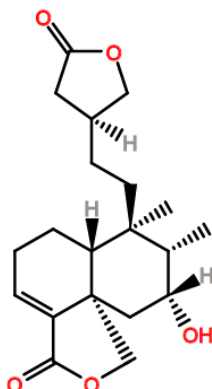
Debido a la gravedad inherente de la intoxicación aguda (mordida) con veneno de serpientes y a los efectos indeseados del suero antiofídico, es que existen bastantes investigaciones en la búsqueda de terapias alternativas para combatir este flagelo. Se ha propuesto la búsqueda de inhibición de la toxicidad o de los síntomas del veneno a través de metabolitos secundarios vegetales, lo que se conoce como actividad alexitérica (**Camargo et al., 2011; Dellacassa et al., 2014; Torres et al., 2015**). En todo el mundo existen unas 850 especies de plantas (pertenecientes a 138 familias botánicas) reportadas como antiveneno de serpientes (**Mors et al., 2000; Soares et al., 2005; Dellacassa et al., 2014**). Las plantas en general son maceradas y aplicadas sobre las mordeduras en forma de cataplasmas y como decocciones para ingerir o lavar el área afectada (**Torres et al., 2015**). Varios flavonoides (rutina, quercetina, hesperidina, luteolina, etc.) han demostrado actividad contra las enzimas fosfolipasa A<sub>2</sub> y las hialurodinastas, actuando como inhibidores directos de las enzimas o indirectamente como inmunomoduladores (**Mors et al., 2000; Soares et al. 2005; Dellacassa et al., 2014**). Otro tipo de componentes que han resultado alexitéricos son los cumestanos (la wedelolactona), pterocarpanos (cabenequinas), alcaloides (ácido aristolóquico), ácidos fenólicos (clorogénico, cafeico), esteroides ( $\beta$ -sitosterol, colesterol), diterpenos (del tipo clerodano, Figura 4), triterpenos (betulina, ácido betulínico), entre otros grupos de metabolitos secundarios (**Mors et al., 2000; Soares et al. 2005; Dellacassa et al., 2014**).

Particularmente, en el caso de *Baccharis trimera* se aisló desde un extracto orgánico de partes aéreas un compuesto diterpeno del tipo *neo*-clerodano (Figura 4) con actividad alexitérica. El mismo demostró su funcionalidad en la inhibición de más del 90% de la actividad proteolítica y de la actividad hemorrágica del veneno bruto de *B. neuwiedi*, *B. jararacussu*, *B. asper*, *B. pirajai*, *B. moojeni* y *B. alternatus* (**Januário et al., 2004**). Dicho compuesto demostró actividad no sólo contra el veneno bruto sino también contra las metaloproteasas aisladas del mismo en ensayos *in vitro* e *in vivo*. Además, la acción del diterpeno redujo parcialmente la formación de edema y la miotoxicidad de los venenos, aunque no tuvo incidencia sobre la actividad coagulante (**Januário et al., 2004**). La acción probablemente se deba a la interacción de dicho compuesto con las metaloproteasas, lo que reduciría su actividad, aunque el mecanismo no ha sido dilucidado hasta la fecha (**Januário et al., 2004**). Adicionalmente, existe en la literatura un estudio bioinformático en que se reporta que los extractos orgánicos de partes aéreas de *B. trimera* reducirían la actividad de la PLA<sub>2</sub> de venenos ofídicos en un





50%, en la misma línea que lo hallado por Januário *et al.* (Bernard *et al.*, 2001; Januário *et al.*, 2004).



**Figura 4:** 7- $\alpha$ -hidroxi-3,13-clerodadieno-16,15:18,19-diólido, compuesto diterpeno del tipo neo-clerodano con actividad alexitérica aislado de *B. trimera*. Fuente: Januário *et al.* (2004).

### 1.6 Métodos *in vitro* para la evaluación de la actividad alexitérica

Si bien existen diferentes tipos de ensayos para la evaluación *in vitro* de la actividad alexitérica contra veneno de serpientes, en el caso del presente trabajo de tesis se emplearon cuatro de ellos que han sido ampliamente validados (Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015):

- 1) electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes con dodecil sulfato sódico (*SDS-PAGE*);
- 2) inhibición de la actividad coagulante del plasma citratado;
- 3) inhibición de la actividad proteolítica de la caseína;
- 4) inhibición de la actividad hemolítica.

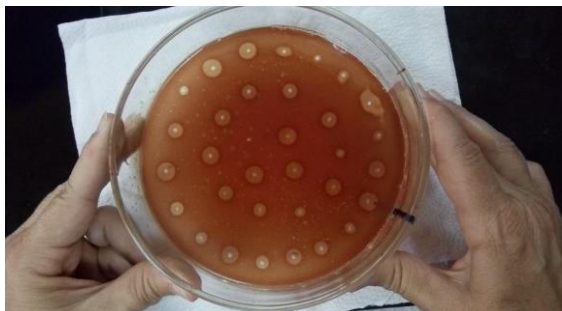
La técnica de *SDS-PAGE* cualitativa es el método de elección para realizar un *screening* rápido y confiable de la actividad alexitérica, ya que se ha encontrado una alta correlación entre los resultados obtenidos por *SDS-PAGE* y los ensayos *in vitro* de coagulación y hemólisis (Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011). La bioactividad se evidencia por la modificación del perfil de bandas proteicas del veneno puro respecto del veneno que se ha incubado con el extracto o producto a evaluar (Camargo *et al.*, 2011). En el caso de que haya una fuerte interacción veneno-extracto (o producto), se pueden formar complejos de muy alto peso molecular que no son evidenciados en las condiciones de la electroforesis, haciendo “desaparecer” las bandas proteicas (Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015).



En el ensayo de inhibición de la actividad coagulante, se mide la diferencia entre el tiempo de coagulación normal del plasma citratado y el tiempo de coagulación del plasma tratado con veneno (pre-incubado con el extracto) (Torres *et al.*, 2015; Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2016). Dichos tiempos se miden hasta la observación de la formación del primer coágulo, lo que se puede realizar a través de los coagulómetros. Cuanto más actividad inhibitoria tenga el extracto, ambos tiempos tienden a aproximarse y la diferencia será pequeña; mientras que para extractos muy inactivos, el tiempo de coagulación va a ser prácticamente el mismo que el del veneno + plasma (Torres *et al.*, 2015).

En lo que respecta al ensayo de inhibición de la actividad proteolítica, se emplea una proteína testigo (en general caseína) (Januário *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2015). Se pre-incuban los extractos vegetales con el veneno, y, posteriormente esta mezcla se incuba con una solución de caseína. Los extractos que son activos van a interferir sobre el veneno disminuyendo su capacidad proteolítica, y por tanto, preservando intacta a la caseína (Januário *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2015). Los resultados de las bandas proteicas se visualizan mediante SDS-PAGE, incluyendo un control del extracto sin incubar para asegurarse que el mismo no posea actividad proteolítica *per se* (Torres *et al.*, 2015).

La prueba de la inhibición de la actividad hemolítica se basa en la capacidad de las enzimas fosfolipasas del veneno de serpientes de hidrolizar la lecitina para producir liso-lecitina, la que a su vez produce la lisis de los glóbulos rojos de la sangre (Torres *et al.*, 2015). Para medir la actividad se siembra las mezclas de extracto + veneno (pre-incubados) en una placa de Petri con medio agar-sangre (adicionado con yema de huevo) y, como patrones de comparación, también se siembran los extractos y veneno de manera separada (Torres *et al.*, 2015). Posteriormente, dicha placa se incuba por 24 horas a 36°C, tiempo en el que ocurre la hemólisis que se observará como un halo transparente (sobre el medio agar-sangre; Figura 5) originado desde el punto de siembra (Torres *et al.*, 2015). Si el extracto a evaluar resulta activo (alexitérico), se producirá una disminución del tamaño del halo, lo que se cuantifica como porcentaje de inhibición (Torres *et al.*, 2015).



**Figura 5:** Apariencia de una placa de Petri en medio agar-sangre en la que se ensayó inhibición de la actividad hemolítica. Se puede ver, partiendo de cada pocillo de siembra, el característico halo de hemólisis producido por el veneno. A menor halo, mayor inhibición de la actividad (salvo para los extractos patrones que no producen halo).

## 2 MATERIALES Y METODOS

### 2.1 Material vegetal

Partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*, *B. punctulata* y *B. dentata* (Vell.) G.M. Barroso fueron colectadas en estado vegetativo en la localidad de Paso de la Patria (Corrientes, Argentina) en mayo de 2016. El material vegetal fue identificado por especialistas del IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste Argentino). También se contó con partes aéreas vegetativas de *Baccharis trimera* (Less.) DC. colectadas en octubre de 2016 en la localidad de Estación Porvenir (Paysandú, Uruguay; población de referencia del capítulo 7).

El material vegetal fue empleado en condiciones de semi-sequedad (2 días) para la extracción de componentes volátiles (arrastre con vapor) y llevado a deshidratación total a temperatura ambiente para la extracción de componentes fijos (maceración).

### 2.2 Muestras adicionales

Se contó adicionalmente con muestras vegetales obtenidas en otras instancias de éste trabajo de tesis:

**Aceites esenciales:** *B. trimera* (Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay; colecta en estado vegetativo y en floración; capítulo 7, población de referencia), *B. tridentata* (masculino y femenino, Estación Pró-Mata, S.F. de Paula, RS, Brasil; floración; capítulo 5), *B. dracunculifolia* (masculino y femenino; Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay; floración; capítulo 4), *B. dracunculifolia* (Las Brujas, Canelones, Uruguay; vegetativo; capítulo 6), *B. microdonta* (Las Brujas, Canelones, Uruguay; vegetativo; capítulo 6); *B. palustris* (Paso Carrasco, Montevideo, Uruguay; vegetativo; capítulo 9).



**Extractos fijos:** *B. trimera* (Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay; vegetativo; capítulo 7, población de referencia): extractos hexánico, en acetato de etilo y en metanol (extracción por dispositivo de Soxhlet) y acuoso (decocción). *B. articulata* (masculino y femenino; Estación Porvenir, Paysandú, Uruguay; floración): extractos hexánico, en acetato de etilo y en metanol (Soxhlet) y acuoso (decocción). Esta última extracción fue realizada en las mismas condiciones experimentales reportadas para *B. trimera* en el capítulo 7.

**Compuestos puros:** carquejol, carquejona y carquejifenol (obtenidos por medio de semi-síntesis; capítulo 8) y (*Z*)-éster de lachnophyllum (aislado del aceite esencial de *C. bonariensis*; capítulo 9).

### 2.3 Extracción de los componentes volátiles

Los aceites esenciales de *B. dracunculifolia* y *B. punctulata* fueron obtenidos por arrastre con vapor en un dispositivo de diseño propio (Figura 2, capítulo 3), según las condiciones reportadas por Torres *et al.* (Torres *et al.*, 2011 y Torres *et al.*, 2014).

El material vegetal finamente trozado (200 g) fue colocado en un balón de fondo redondo, a través del cual se permitió el pasaje de vapor generado externamente en una caldera. Por medio de un refrigerante con flujo de agua fría a contracorriente, se permitió la condensación de los aceites esenciales en un vaso florentino. El agua de condensación obtenida en el vaso florentino fue extraída tres veces con éter dietílico (Cicarelli, San Lorenzo, SF, Argentina), lo que permitió obtener el hidrolato (éste procedimiento sólo fue aplicado en el caso de *B. dracunculifolia*). Posteriormente se concentró el hidrolato por volatilización directa del éter dietílico y posterior concentración por evaporación a vacío en rotavapor en condiciones suaves (40°C) para evitar pérdida de componentes volátiles. Todas las muestras fueron almacenadas bajo refrigeración (-4°C) para posteriores análisis químicos mediante GC-MS.

Para el caso de *B. dentata*, debido a los reportes previos respecto de su bajo rendimiento de aceite esencial (Xavier *et al.*, 2011), se empleó la técnica de SDE (con dispositivo modificado de Likens-Nickerson) para obtener el extracto volátil (realizando pequeñas alteraciones al procedimiento descrito en el capítulo 3). El tiempo de extracción efectivo (desde que ambos solventes se encontraron en estado de ebullición) fue de 180 minutos. El extracto resultante fue posteriormente evaporado a vacío en condiciones suaves (40°C), obteniéndose un concentrado (aproximadamente 1,0 mL) que finalmente se almacenó bajo refrigeración.



## 2.4 Extracción de los componentes fijos

Por medio de maceración estática se obtuvieron los extractos fijos del material vegetal descrito en la sección 2.1. Se realizaron extractos en tres solventes: agua (ultrapura tipo 1; Laboratorio GT, Rosario, SF, Argentina), etanol (absoluto, 99,5%) y hexano (mezcla de isómeros) (Cicarelli). En la Tabla 1 se presenta la cantidad de material vegetal de partida (en gramos), así como entre paréntesis se presenta el rendimiento de extracción, calculado como: [m (g) extracto/m (g) material vegetal] \*100 (Torres *et al.*, 2015).

Mat veget./extracto (g)	<i>B. dentata</i>	<i>B. dracunc.</i>	<i>B. punctulata</i>	<i>B. trimera</i>
Extracto acuoso	22,9172 (20,4%)	7,0479 (18,9%)	9,8742 (13,6%)	18,4893 (16,7%)
Extracto alcohólico	26,2416 (7,1%)	7,7126 (24,0%)	8,1413 (9,0%)	15,0764 (11,4%)
Extracto hexánico	21,2510 (6,0%)	10,6650 (2,8%)	11,2980 (6,2%)	15,7046 (5,8%)

**Tabla 1:** Cantidad de material vegetal de partida (en gramos) y rendimiento de la extracción por maceración para los diferentes solventes empleados.

Para todos los extractos, se realizó maceración durante 24 horas (extracto acuoso) y 48 horas (extractos alcohólicos y hexánicos); tras lo cual fueron filtrados secuencialmente por algodón y por papel en condiciones de vacío (kitasato) hacia un balón limpio y previamente pesado (Torres *et al.*, 2015). Cada uno de los extractos fue evaporado a vacío por medio de un rotavapor (40°C) hasta sequedad. Luego de que los balones fueron pesados para calcular su rendimiento, las muestras fueron almacenadas a vacío en desecador para posteriores análisis.

## 2.5 Análisis por GC-MS

El análisis químico de composición de los aceites esenciales de *B. dracunculifolia*, *B. trimera*, *B. punctulata* y el hidrolato de *B. dracunculifolia* se realizó en un cromatógrafo gaseoso HP6890 acoplado a un espectrómetro de masa HP-5973 (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EEUU). La columna capilar empleada fue una Elite-5MS (5%-fenil-95%-metilpolisiloxano; PerkinElmer, Waltham, MA, EEUU), 30 m × 0,25 mm d.i. × 0,25 µm de espesor de fase. Se inyectaron 0,2 µL de los aceites diluidos 1:3 en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (destilado, Cicarelli) en modalidad Split (relación 1:55). Todas las demás condiciones experimentales fueron iguales a las descriptas en el capítulo 3.



## 2.6 Actividad antiradicalaria

Para las determinaciones de actividad antiradicalaria se siguió el procedimiento detallado por Mensor *et al.* (2001) con algunas modificaciones. Se prepararon soluciones de cada uno de los extractos de las secciones 2.2 y 2.4 en sus respectivos solventes (1,0 mg/mL); y para el caso de los aceites esenciales se tomaron alícuotas de 5,0  $\mu$ L de cada uno y se diluyeron en 1,0 mL de etanol (96% p.p.a.; Dorwil). Se preparó una solución del radical DPPH (0,30 mg/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI., EEUU) en etanol cubriendo el matraz aforado con papel aluminio para prevenir la degradación del radical por efecto de la luz ambiente (Molyneux, 2004). De cada solución fue tomada una alícuota de 1,0 mL y se la adicionó junto con 1,0 mL de solución de DPPH en una cubeta de cuarzo. Inmediatamente luego de mezclar las soluciones se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Metrolab VD-40 (Metrolab, Buenos Aires, BA, Argentina) considerando tiempo igual a 0 la primera medición de absorbancia, y continuando la evaluación cada 1 minuto por un total de 5 minutos. Para aquellos casos en que las medidas de absorbancia continuaron disminuyendo luego de ese período inicial, se continuó la evaluación durante 25-30 minutos o hasta estabilización por 3 lecturas consecutivas iguales.

Como controles positivos de actividad antiradicalaria se prepararon soluciones de quercetina (2,51 mg/mL; Fluka AG, Buchs, Suiza) y de ácido gálico (2,49 mg/mL; Merck, Darmstadt, Alemania) en un matraz aforado de 10,0 mL, el que se completó con etanol. Las soluciones de trabajo para evaluación de las curvas cinéticas se prepararon por diluciones seriadas a la mitad, partiendo de las soluciones patrón hasta una concentración de 0,04 mg/mL de ambos estándares. Como controles positivos adicionales se prepararon soluciones de eugenol y carvacrol (Sigma-Aldrich), siguiendo el mismo procedimiento que en el caso de los aceites esenciales (tomando 5,0  $\mu$ L del estándar y diluyendo en 1,0 mL de etanol). Como controles negativos se emplearon soluciones de estragol, *p*-cimeno y  $\alpha$ -pineno (Sigma-Aldrich) preparadas de la misma forma.

## 2.7 Actividad alexitérica

### 2.7.1 Veneno de *Bothrops* spp.

Los venenos de las especies *Bothrops diporus* Cope (“yarára chica”) y *Bothrops alternatus* Bibron & Duméril (“yarára grande”, “crucera”) fueron obtenidos por expresión manual de



varios individuos (“ordeñe”) por personal del Serpentario de la ciudad de Corrientes. Posteriormente, los venenos fueron disecados a presión reducida y almacenado bajo refrigeración. En todos los casos, se siguieron los protocolos publicados por Camargo *et al.* (2011) y Torres *et al.* (2015).

### 2.7.2 SDS-PAGE

**Preparación del *buffer* gel de concentración (*stacking*), pH 6,8.** Se pesaron en recipientes separados 3,00 g de *buffer* TRIS-HCl (pH 8,8; *Biorad, Hercules, CA, EEUU*) y 0,21 g de SDS (dodecilsulfato de sodio; *Sigma-Aldrich*); y se disolvieron en 40,0 mL de agua destilada. El pH de ésta solución fue ajustado a 6,8 por agregado de una solución de HCl 4N. La solución resultante fue disuelta en agua destilada y llevada a volumen en matraz aforado a 50,00 mL.

**Preparación del *buffer* electrodo, pH 8,3.** Para ello se pesaron en recipientes separados 3,00 g de *buffer* TRIS-HCl, 14,40 g de glicina (*Merck*), 1,00 g de SDS; y se disolvieron conjuntamente en 700,0 mL de agua destilada. El pH de ésta solución fue ajustado a 8,3 por agregado de la solución de HCl 4N y se la llevó a volumen con agua destilada en un matraz aforado de 1000,00 mL.

**Preparación del *buffer* gel de separación, pH 8,8.** Se pesaron en recipientes separados 18,20 g de *buffer* TRIS-HCl, 0,40 g de SDS; y se disolvieron en 40,0 mL de agua destilada. El pH de ésta solución fue ajustado a 8,8 por agregado de la solución de HCl 4N y la solución resultante fue llevada a volumen con agua destilada en matraz aforado de 100,00 mL.

**Preparación del *buffer* muestra, pH 6,8.** A una alícuota de 4,0 mL de *buffer* gel de concentración se le adicionaron 4,0 mL de glicerol (*Sigma-Aldrich*), 3,36 g de urea (*Anedra, Buenos Aires, BA, Argentina*) (éste reactivo mejora la visualización de las bandas de las proteínas en la electroforesis) y una punta de espátula de colorante azul de bromofenol (*Merck*) (para visualizar el frente de corrida).

**Preparación de soluciones de veneno y muestras a evaluar.** Se pesaron 3,5 mg de veneno desecado de *B. diporus* o *B. alternatus* (según el experimento) y se disolvieron en 140  $\mu$ L de *buffer* PBS (*buffer* fosfato salino fisiológico) (*Neolab, Buenos Aires, BA, Argentina*). Una alícuota de 10  $\mu$ L de dicha solución fue adicionada en tubos tipo Eppendorf conteniendo 1,8-2,0 mg de cada una de las muestras (extractos fijos, aceites esenciales, productos semi-



sintéticos o estándares a evaluar) disueltos en 15  $\mu\text{L}$  de su solvente de origen (o en etanol, según el caso). Para el extracto volátil obtenido por *SDE* de la especie *B. dentata*, se emplearon directamente 15  $\mu\text{L}$  del mismo (en *n*-hexano) sin adición de etanol. Las soluciones a ensayar obtenidas en éstas condiciones fueron incubadas en baño de agua por 30 minutos a 37°C. De ésta manera, la relación veneno-muestra para cada uno de los casos fue 1:7. Al término del tiempo de incubación se le agregó a cada uno de los tubos 25  $\mu\text{L}$  de una solución de *buffer* muestra (con el objetivo de detener la interacción veneno-muestra) junto con 15  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol (*Sigma-Aldrich*; distorsiona los enlaces disulfuro de las proteínas y facilita su desnaturalización). Posteriormente se realizó un calentamiento adicional en baño de agua a ebullición durante 5 minutos para completar la desnaturalización proteica.

Como control negativo se empleó una solución de “muestra patrón”, y como control positivo una solución de veneno. Para el caso de la preparación de las soluciones de “muestra patrón” (que no fueron incubadas con veneno), se pesaron 1,2 mg de cada una de las muestras (extractos fijos, aceites esenciales o productos de semi-síntesis) y dicha cantidad se disolvió en 50  $\mu\text{L}$  de *buffer* muestra y en 2,5  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol; posteriormente se llevaron a ebullición en las mismas condiciones que las muestras + veneno. Por su parte, al veneno patrón (1,0 mg) se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de *buffer* muestra y 15  $\mu\text{L}$  de  $\beta$ -mercaptoetanol y se lo sometió a ebullición como en los casos anteriores.

**Preparación del gel de separación (poliacrilamida al 12%).** En un vaso de Bohemia se agregaron: 8,00 mL de acrilamida (*Sigma-Aldrich*), 5,00 mL de *buffer* gel de separación, 7,00 mL de agua destilada, 20  $\mu\text{L}$  de *TEMED* (tetrametiletilendiamina; *Sigma-Aldrich*) y 72  $\mu\text{L}$  de persulfato de amonio (*Merck*). Luego del agregado del último componente, se agitó de forma rápida y vigorosa para homogeneizar la solución y evitar que el gel se formase dentro del vaso de Bohemia (la *TEMED* actúa como iniciador y el persulfato de amonio como catalizador de la reacción de polimerización). A continuación, se esparció uniformemente el contenido de la solución gelificante anterior entre 4 pares de vidrios contenedores de geles (“gelera”), lo que permitió la formación de los mismos; el espacio sobrante entre los vidrios se completó con agua destilada. Con la finalidad de lograr un tamaño de poro uniforme, los geles obtenidos se almacenaron por 12 horas bajo refrigeración antes del montaje del sistema electroforético.

**Preparación del gel de concentración (*stacking*; poliacrilamida al 4%).** Se agregaron secuencialmente en un vaso de Bohemia: 1,06 mL de acrilamida, 2,00 mL de *buffer* gel de concentración, 4,80 mL de agua destilada, 8  $\mu\text{L}$  de *TEMED* y 100  $\mu\text{L}$  de persulfato de





amonio. Se agitó vigorosamente y se colocó de inmediato la solución gelificante sobre los geles de separación obtenidos en el punto anterior (entre los vidrios contenedores en las “geleras” previo secado de los mismos con papel de filtro). A continuación, se colocaron rápidamente sobre los geles de concentración los “peines” (dispositivos que permiten la formación de los carriles de sembrado), y posteriormente se permitió la polimerización. Luego se agregó solución de *buffer* electrodo para completar los carriles antes de las correspondientes siembras, evitando su resecamiento.

**Montaje del sistema electroforético.** Los vidrios contenedores con los geles fueron montados dos a dos en portageles ubicados dentro de una cuba de un equipo de electroforesis *Miniprotean4* (Biorad). Posteriormente, se completó el volumen de ésta última con *buffer* electrodo.

**Siembra y Separación.** En cada uno de los carriles de los geles de concentración, se sembraron mediante pipeta automática las diferentes soluciones a ensayar: alícuotas de 3,5  $\mu$ L de la solución de muestra + veneno; 5  $\mu$ L de la solución veneno patrón; y 5  $\mu$ L de la solución de muestra patrón. Para propósitos comparativos, también se sembraron en cada gel 5  $\mu$ L de una solución de peso molecular patrón con los siguientes valores (en KDa): 94, 67, 43, 30, 20,1 y 14,4 (*Biorad*) preparada siguiendo instrucciones del fabricante).

La electroforesis se corrió en condiciones de corriente constante con 25 mA por gel durante 80 minutos, monitoreando visualmente el desplazamiento de las bandas proteicas por medio del colorante azul de bromofenol (incluido en el *buffer* muestra). Luego de la corrida, los geles fueron extraídos del dispositivo y dejados en recipientes cristalizadores tapados durante toda la noche para coloración mediante una solución de azul de *Coomassie G* (1,25 g del colorante, 277 mL de metanol y 46 mL de ácido acético glacial llevando a 500 mL con agua destilada).

**Revelado y lectura.** El revelado de los geles de electroforesis fue realizado retirándolos de la solución colorante y sumergiéndolos en una solución decolorante (70 mL de ácido acético glacial en 300 mL de etanol y llevando a 1000 mL con agua destilada) durante 3 horas. Tras la decoloración, los geles fueron lavados abundantemente con agua destilada, y posteriormente secados a temperatura ambiente mediante papel absorbente. La lectura fue realizada directamente de forma visual (resultados de aparición y desaparición de bandas proteicas), así como fueron registradas imágenes de los geles.



**Estándares.** Varias soluciones de estándares puros (2 mg/mL en etanol) se incubaron con el veneno de *B. diporus* en las mismas condiciones que las reportadas anteriormente para las muestras, y se analizó su interacción por medio de *SDS-PAGE*. Los estándares empleados fueron: **1) cetonas terpénicas:** fenchona, semicarbazona de piperitona; carvona,  $\alpha$ -ionona y alcanfor; **2) cetonas aromáticas y alifáticas no terpénicas:** acetofenona, benzalacetona, metilnonilcetona, 2-metilciclohexanona, 3-metilciclohexanona, 4-metilciclohexanona y benzofenona; **3) quinonas:** *p*-benzoquinona, 1,4 naftoquinona y antraquinona; **4) flavonoides:** quercetina y naringina; **5) azúcares:** ramnosa, glucosa y manosa; **6) ácidos fenólicos:** ácido gálico.

### 2.7.3 Inhibición de la actividad proteolítica

**Preparación de los buffers y geles.** Este procedimiento fue el mismo que el detallado en el punto 2.7.2 para *SDS-PAGE* en el caso de todos los buffers descriptos y el gel de concentración (*stacking*; poliacrilamida al 4%). Sin embargo, para realizar ésta técnica *in-vitro* se preparó adicionalmente el buffer *TRIS-HCl* pH 8,0, pesando 1,21 g de buffer base *TRIS-HCl* y adicionando 40,0 mL de agua destilada. La mezcla se ajustó al pH adecuado, finalmente, se llevó a volumen con agua destilada en un matraz aforado de 100,00 mL. El gel de separación empleado fue de poliacrilamida al 10 % (preparado por mezcla en vaso de Bohemia de 6,66 mL de acrilamida, 5,00 mL de buffer gel de separación, 7,00 mL de agua destilada, 20  $\mu$ L de *TEMED* y 120  $\mu$ L de persulfato de amonio; cantidad para 4 geles).

**Preparación de las soluciones de veneno, extractos y caseína.** Se preparó una solución madre de veneno de *B. diporus* pesando 2,5 mg de veneno desecado y llevando a volumen en matraz aforado de 10,00 mL por adición de buffer *PBS*. Paralelamente, se pesaron 1,0 mg de cada uno de las muestras (extractos fijos, aceites esenciales o productos de semi-síntesis) en tubos tipo Eppendorf, los que posteriormente fueron adicionados con 130  $\mu$ L de su propio solvente (o etanol, según el caso). De dichas soluciones, se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L, a las que se añadieron 50  $\mu$ L de la solución de veneno y se pre-incubaron por 60 minutos a 37°C en baño de agua. Asimismo, se preparó una solución impura de caseína pesando 0,10 g de leche en polvo comercial y llevando a volumen en un matraz aforado de 10,00 mL por adición de buffer *TRIS-HCl* pH 8,0. Las muestras patrones se prepararon pesando 0,50 mg de cada una (extractos fijos, aceites o productos puros), y resuspendiendo las mismas en 50  $\mu$ L de sus solventes de origen (o etanol, según el caso) con ayuda de un Vórtex.



Luego de la pre-incubación, se colocaron en nuevos tubos Eppendorf 50  $\mu$ L de sobrenadante de la solución de muestra + veneno, junto con 50  $\mu$ L de la solución impura de caseína; y se incubó a 37°C durante 60 minutos. Para propósitos comparativos, también fueron incubados tubos Eppendorf conteniendo 50  $\mu$ L de muestra patrón junto con 50  $\mu$ L de caseína (control negativo), y 50  $\mu$ L de veneno patrón (preparado diluyendo la solución madre de veneno a la mitad con *buffer* PBS) con otros 50  $\mu$ L de solución de caseína (control positivo). También se incubó un tubo adicional conteniendo 50  $\mu$ L de una solución de caseína (preparada por dilución a la mitad de la solución madre de la misma con *buffer* TRIS-HCl pH 8,0) sin adición de veneno. Luego de la incubación se tomaron alícuotas de 50  $\mu$ L del sobrenadante de cada una de las muestras y fueron añadidas con 50  $\mu$ L de *buffer* muestra doblemente concentrado (sección 2.7.2), calentándose a ebullición en baño de agua por 5 minutos, con el objetivo de desnaturalizar las proteínas y detener la interacción veneno-muestras-caseína.

**Siembra, separación, lectura y revelado.** Para el montaje del sistema electroforético se siguió el mismo procedimiento experimental detallado en la sección 2.7.2. En éste caso se sembraron 5  $\mu$ L de cada una de las soluciones a evaluar (muestra + veneno + caseína, muestra + caseína, veneno + caseína y caseína sola) y de patrón de peso molecular, en cada una de los carriles del gel de concentración. Todos los pasos de siembra, separación, lectura y revelado fueron realizados de manera idéntica a lo anteriormente descrito para el caso de *SDS-PAGE* (2.7.2).

#### 2.7.4 Inhibición de la actividad hemolítica

**Preparación de medio agar sangre fosfatidilcolina.** Para preparar las placas de medio agar sangre, se adicionaron en una placa de Petri grande (15 cm de diámetro) una mezcla de 30 mL de solución de agar Columbia junto con 1,5 mL de sangre no coagulada y 1,5 mL de yema de huevo. Sobre el medio se hicieron pocillos en donde se sembraron las diferentes muestras (Figura 5).

**Preparación de las soluciones de veneno y extractos, incubación y siembra.** La solución del veneno de *B. diporus* se preparó por dilución de 2,5 mg del mismo en 50 mL de *buffer* PBS. Por su parte, se pesó 1,0 mg de cada una de las muestras (extractos fijos desecados, aceites esenciales o productos de semi-síntesis) para posterior incubación con el veneno, y 1,0 mg adicional de cada muestra para preparar la “muestra patrón”. En el primero caso, las



muestras fueron reconstituidas en 100  $\mu\text{L}$  de su propio solvente (o etanol, según el caso) en tubos tipo Eppendorf, y posteriormente fueron añadidas con 500  $\mu\text{L}$  de solución de veneno (relación veneno-extracto, 1:40), incubando por 30 minutos a 37°C. Por su parte, las “muestras patrones” fueron retomadas en 600  $\mu\text{L}$  del solvente de origen (o etanol, según el caso) y fueron sometidas a incubación sin adición de solución de veneno. Inmediatamente después de la incubación, se sembraron alícuotas de 8  $\mu\text{L}$  (de cada una de las soluciones de muestra + veneno y muestra patrón) en los pocillos de la placa de Petri. Finalmente, la placa se incubó en estufa a 37°C por 20 horas (Figura 5).

La interpretación de los resultados se realizó midiendo el diámetro de los halos de hemólisis (Figura 5) y comparándolos con los halos producidos por el veneno, expresado la diferencia como porcentaje de inhibición. A menor diámetro del halo, más activa resultó la muestra con la cual se incubó el veneno, significando una inhibición de la actividad hemolítica producidas por las fosfolipasas.

### 2.7.5 Inhibición de la actividad coagulante

**Preparación de las soluciones de veneno y muestras.** La solución de veneno de *B. diporus* se preparó pesando 1,0 mg del mismo y llevando a volumen en matraz aforado de 25,00 mL por adición de *buffer* PBS. Luego, se pesaron en tubos tipo Eppendorf 1,2 mg de las muestras (extractos fijos, aceites esenciales o productos de semi-síntesis) para ser incubadas con el veneno, y 1,1 mg de cada una de ellas para la obtención de muestras patrones (sin adición de veneno). Las muestras a ensayar fueron preparadas en duplicado, retomadas en 40  $\mu\text{L}$  de su respectivo solvente (o etanol, según el caso), adicionadas con 1,0 mL de la solución de veneno, y posteriormente incubadas por 30 minutos a 37°C. Las muestras patrones fueron retomadas con 1,0 mL de su respectivo solvente (o etanol, según el caso) y no fueron incubadas.

**Preparación del plasma citratado.** Se contó con plasma citratado (o sangre, según disponibilidad), obtenido el mismo día del ensayo por centrifugación de sangre de varios pacientes a 10.000 r.p.m durante 15 minutos y adición posterior de una solución al 3,8% de citrato de sodio deshidratado (*Anedra*) (relación sangre-citrato de sodio, 10: 1). El plasma obtenido de ésta manera se separó con pipetas tipo Pasteur del paquete globular (remanente en



el fondo de los tubos de centrifugación) y se dejó reposar durante 40 minutos para estabilización del mismo, tras lo cual se conservó en hielo hasta el momento del ensayo.

**Medición y lectura de los resultados.** Se realizó una mezcla conteniendo 100  $\mu\text{L}$  de solución 0,025 M de  $\text{CaCl}_2$  (*Anedra*), 100  $\mu\text{L}$  de la solución de plasma citratado y 5  $\mu\text{L}$  de las soluciones de muestra + veneno, en recipientes tipo tubos provistos de mini-imanés. Inmediatamente posterior a la adición de las soluciones de muestra + veneno y mezclado por agitación, se colocaron los tubos en un dispositivo coagulómetro *Wiener CoL 1* (*Wiener lab. Group, Rosario, SF, Argentina*) en donde los mismos fueron agitados magnéticamente y mantenidos a 37°C. Cuando se produjo la coagulación, la agitación se detuvo y se registró el tiempo transcurrido en la pantalla del coagulómetro (suministrando el tiempo de coagulación de las muestras: TCV+M). Las lecturas fueron realizadas en duplicado. Como controles, se midieron en las mismas condiciones que las muestras el tiempo de coagulación correspondiente a la adición de 5  $\mu\text{L}$  de *buffer PBS* (tiempo de coagulación normal: TCN) y 5  $\mu\text{L}$  de la solución de veneno (tiempo de coagulación modificado por el veneno: TCV). Los resultados se expresaron como porcentaje, a través de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 \times [((TCV + M) - (TCV)) \div (TCN - TCV)]$$

### 3 RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1 Composición volátil de *Baccharis* spp. del nordeste argentino

En la Tabla 2 y Figura 6 se presentan los compuestos mayoritarios identificados (mayor al 1,0 % en la respectiva muestra) en los aceites esenciales (AEs) de las especies colectadas en el marco de éste capítulo en el nordeste argentino: *B. dracunculifolia* y *B. punctulata*, y del hidrolato (EA) de *B. dracunculifolia*. No se realizó evaluación química del extracto obtenido por *SDE* de *B. dentata*. También se incluye en la Tabla 2 para propósitos comparativos la composición del aceite esencial de *B. trimera* de Uruguay (población de referencia en floración, FL; capítulo 7). El análisis químico de composición de las muestras adicionales de material vegetal colectado en Uruguay y sur de Brasil (sección 2.2) se detalló previamente en los capítulos anteriores.



# Pico	Compuesto	LRIp	LR Ib	AE Bd	EA Bd	AE Bp	AE Bt
1	$\alpha$ -pineno	930	932	4,0	-	-	-
2	$\beta$ -pineno	976	974	16,3	-	1,0	2,9
3	mirreno	991	988	1,4	-	-	-
4	limoneno	1028	1024	14,5	-	4,1	-
5	$\beta$ -felandreno	1028	1025	-	-	-	2,6
6	(Z)- $\beta$ -ocimeno	1038	1032	-	-	33,4	-
7	(E)- $\beta$ -ocimeno	1049	1044	1,2	-	3,7	2,2
8	linalol	1101	1095	-	1,1	-	-
9	terpinen-4-ol	1177	1174	-	2,3	-	-
10	$\alpha$ -terpineol	1189	1186	-	3,5	-	-
11	acetato de bornilo	1290	1284	-	-	1,0	-
12	acetato de carquejilo	1300	1298	-	-	-	72,5
13	(E)- $\beta$ -cariofileno	1419	1417	5,6	-	4,1	-
14	$\alpha$ -patchuleno	1448	1454	1,1	-	-	-
15	$\alpha$ -humuleno	1453	1452	1,1	-	-	-
16	$\alpha$ -amorfenol	1483	1483	1,0	-	-	-
17	germacreno D	1483	1484	5,4	1,7	8,3	2,3
18	biciclogermacreno	1498	1500	9,0	1,6	14,8	1,2
19	$\alpha$ -muruleno	1502	1500	1,2	-	0,9	-
20	$\gamma$ -cadineno	1516	1513	1,4	-	1,3	-
21	$\delta$ -cadineno	1525	1522	5,2	-	3,5	-
22	(E)-nerolidol	1565	1561	13,8	6,8	-	-
23	palustrol	1574	1567	-	-	-	4,5
24	germacreno D 4-ol	1582	1574	-	-	4,9	-
25	espatulenol	1582	1577	7,8	23,2	-	-
26	óxido de cariofileno	1587	1582	2,8	-	-	-
27	viridiflorol	1596	1592	2,5	1,9	-	1,0
28	iso-espatulenol	1636	1632	-	1,5	-	-
29	$\zeta$ -murrolol	1646	1640	1,3	3,8	1,6	-
	<b>% Identificación</b>	-	-	<b>96.6</b>	<b>47.4</b>	<b>82.6</b>	<b>89.2</b>

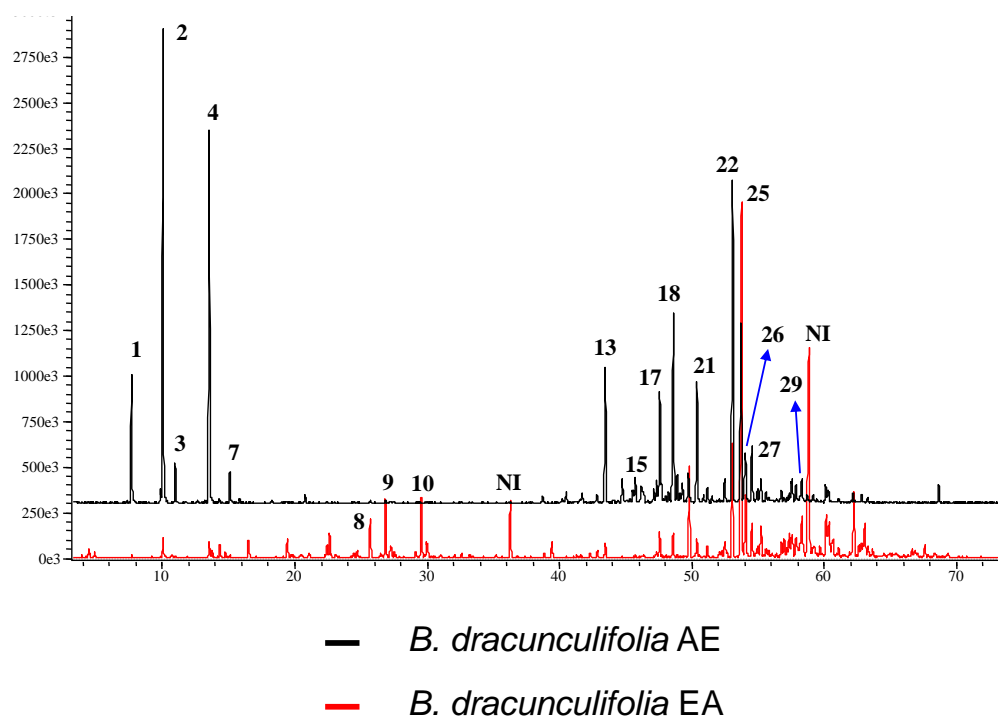
**Tabla 2:** Composición mayoritaria de los aceites esenciales (AEs) de *Baccharis dracunculifolia* (Bd) y *B. punctulata* (Bp), y del hidrolato (EA) de *B. dracunculifolia* de especímenes colectados en el nordeste argentino (provincia de Corrientes). También se presenta la composición mayoritaria del aceite esencial de *B. trimera* (Bt) de Uruguay (población de referencia; capítulo 7). Referencias: LR Ie: índice de retención lineal obtenido en éste experimento; LR Ib: índice reportado en bibliografía (Adams, 2007).

Al igual que en la mayoría de las especies anteriormente analizadas en ésta tesis (material vegetal colectado en Uruguay y sur de Brasil), la composición de los aceites esenciales de *B. dracunculifolia* y *B. punctulata* nativas del nordeste argentino (Corrientes) fue casi exclusivamente integrada por compuestos terpénicos (Tabla 1).

Para la especie *B. dracunculifolia*, el aceite esencial presentó una composición con los siguientes compuestos principales:  $\beta$ -pineno (16,3%), limoneno (14,5%), (E)-nerolidol (13,8%), biciclogermacreno (9,0%), espatulenol (7,8%), (E)- $\beta$ -cariofileno (5,6%), germacreno D (5,4%) y  $\delta$ -cadineno (5,2%) (Tabla 1). Como puede verse asimismo en la Figura 6 y la Tabla 1, la composición obtenida del aceite esencial resultó bastante diferente a la que se obtuvo para el hidrolato, donde un gran porcentaje de los compuestos no pudieron ser identificados (identificación: 47,4%). En el hidrolato se evidenció una importante proporción



de alcoholes terpénicos [mono y sesquiterpenos; principalmente espatulenol y (*E*)-nerolidol], lo que es coherente con su polaridad (Bandoni, 2000; Torres *et al.*, 2014). Coincidentemente con éste trabajo, Queiroga *et al.* (2008) reportaron que dicha fracción acuosa (“aceite soluble en agua”) de *B. dracunculifolia* se encuentra mayormente compuesta por alcoholes terpénicos [linalol, terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, espatulenol y (*E*)-nerolidol] y por componentes polares presentes en el aceite esencial únicamente a nivel de trazas.



**Figura 6:** Perfiles de composición del aceite esencial (AE) e hidrolato (EA: esencia de agua) de *B. dracunculifolia* colectada en Corrientes (Argentina). Referencias: los números que aparecen en los cromatogramas representan el número de pico de los componentes identificados en la Tabla 2. NI: compuestos no identificados.

En la comparación de los resultados obtenidos del aceite esencial de *B. dracunculifolia* de las muestras argentinas con los propios de los capítulos 4 (departamento de Paysandú, Uruguay) y 6 (departamento de Canelones, Uruguay); se apreció una composición parecida a la del primer caso, con una alta proporción de hidrocarburos monoterpénicos ( $\beta$ -pineno y limoneno) y del alcohol sesquiterpénico (*E*)-nerolidol. Resultados semejantes a los anteriores también han sido reportados para la composición de aceites esenciales de *B. dracunculifolia* originaria del sudeste y sur de Brasil, así como para la provincia argentina de Buenos Aires (Ferracini *et al.*, 1995; Queiroga *et al.*, 1990; Frizzo *et al.*, 2008; Schossler *et al.*, 2009; Parreira *et al.*, 2010; González y Luis, 2018). En tanto, existen grandes diferencias entre los presentes resultados con la composición reportada para el sur de Uruguay y de Bolivia (Frizzo *et al.*,



2008), y con los resultados obtenidos en el marco del capítulo 6. Dado que la provincia argentina de Corrientes es limítrofe al estado brasileño de Rio Grande do Sul, es coherente que exista una continuidad razonable en la composición de los aceites debido a que las plantas crecen en la misma región biogeográfica (Heiden *et al.*, 2007).

En cuanto a la especie *B. punctulata*, los componentes mayoritarios identificados en su aceite esencial fueron: (*Z*)- $\beta$ -ocimeno (33,4%), biciclogermacreno (14,8%), germacreno D (8,3%), germacreno D-4-ol (4,9%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (4,1%) y (*E*)- $\beta$ -cariofileno (4,1%) (Tabla 1).

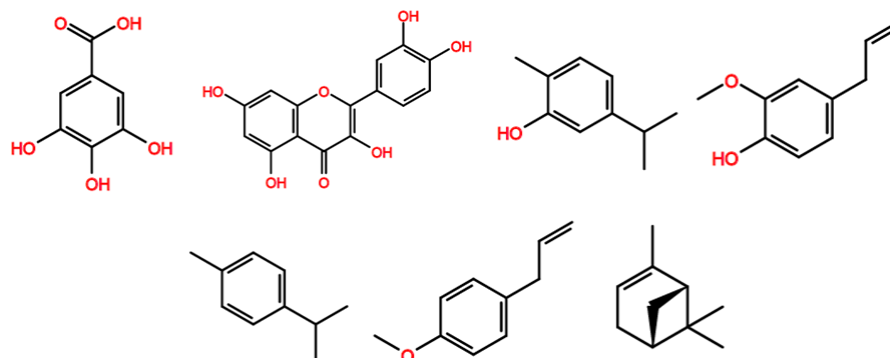
Estos resultados son altamente contrastantes con los obtenidos para la misma especie en el marco del capítulo 4 de ésta tesis (material vegetal originario de Paysandú, Uruguay), en el que se reportó la presencia de los compuestos mayoritarios:  $\beta$ -felandreno (5,2%), acetato de bornilo (5,2%),  $\alpha$ -cadinol (4,2%),  $\delta$ -elemeno (3,7%) y shyobunona (3,5%). Por otra parte, también existe una gran diferencia entre la composición de *B. punctulata* obtenida en éste capítulo con reportes anteriores de Argentina y Brasil (Schoosler *et al.*, 2009; González y Luis, 2018; Budel *et al.*, 2018; González 2019), lo que podría indicar un quimiotipo diferente.

## 3.2 Actividad antiradicalaria

### 3.2.1 Actividad de extractos de *Baccharis* spp.

Para efectuar las mediciones cuantitativas de actividad antiradicalaria de extractos de *Baccharis* spp. y compuestos semisintéticos mediante el método de decoloración del DPPH, se emplearon estándares con fines comparativos. Los compuestos elegidos fueron: polifenoles no volátiles (quercetina y ácido gálico), fenoles volátiles (eugenol y carvacrol), un alcohol-éter aromático (estragol), un hidrocarburo volátil aromático (*p*-cimeno) y un hidrocarburo volátil no aromático ( $\alpha$ -pineno) (Figura 7). Los primeros cuatro compuestos fueron controles positivos de actividad y los últimos tres fueron controles negativos.



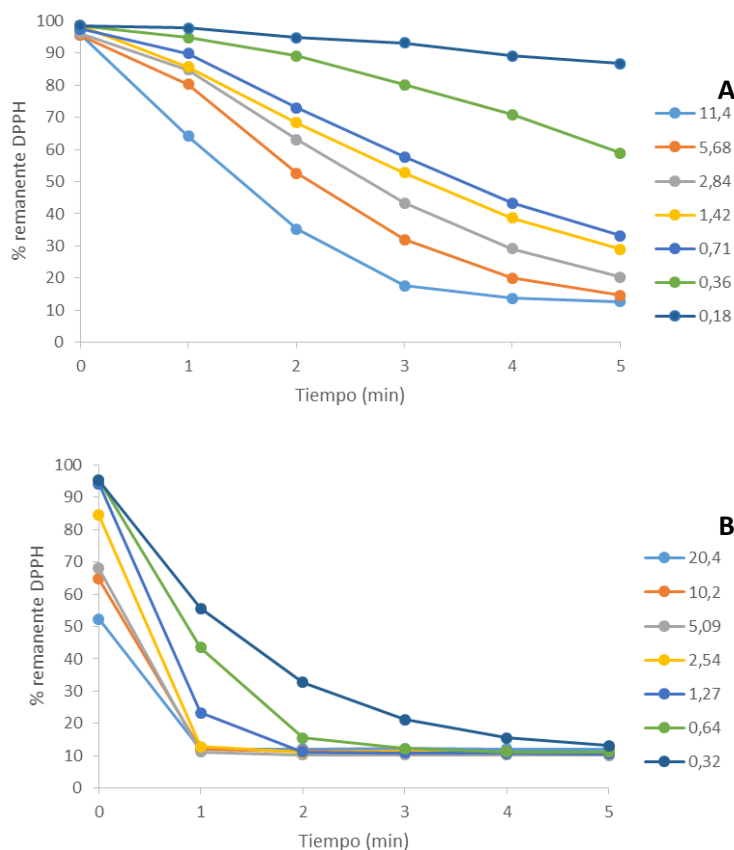


**Figura 7:** Compuestos estándares empleados para evaluación de la actividad antiradicalaria (parte superior; de izquierda a derecha): ácido gálico, quercetina, carvacrol y eugenol. Controles negativos (parte inferior; de izquierda a derecha): *p*-cimeno, estragol y  $\alpha$ -pineno.

Las medidas de actividad antiradicalaria con el método del *DPPH* se deben realizar en estado estacionario y no a un tiempo fijo, porque si el compuesto o extracto a evaluar presenta una cinética lenta, se cometerán errores de subestimación de la actividad (**Brand-Williams *et al.*, 1995**). Por ello es relevante estudiar la cinética de la reacción de interés antes de realizar las mediciones espectrofotométricas cuantitativas.

En la Figura 8 se presenta la cinética de la reacción de decoloración del *DPPH* para los estándares polifenólicos no volátiles (quercetina y ácido gálico) a las distintas concentraciones evaluadas, según el estudio propuesto por Brand-Williams *et al.* (1995) y Sánchez-Moreno *et al.* (1998). La elección de ambos estándares para realizar la evaluación cinética fue debido a que la quercetina y el ácido gálico son ubicuos en los extractos medianamente polares y polares de *Baccharis* spp. (Abad y Bermejo, 2007; Campos *et al.*, 2016), y porque los mismos fueron previamente identificados por *TLC* en los extractos fijos de *B. trimera* de la población de referencia (capítulo 7).

En la Figura 8, se puede visualizar que para fracciones molares equivalentes de antioxidante/*DPPH*, la estabilización del radical se produjo en menor tiempo para el caso del ácido gálico que para la quercetina, lo que significa una mayor actividad antiradicalaria para el primer compuesto (**Brand-Williams *et al.*, 1995; Sánchez-Moreno *et al.*, 1998**). Por ejemplo, para una fracción molar de quercetina/*DPPH* de 11,4 el estado estacionario se alcanzó a los 4 minutos, mientras que para una fracción molar de ácido gálico/*DPPH* de 10,2 se llegó al mismo en menos de 1 minuto (Figura 8).



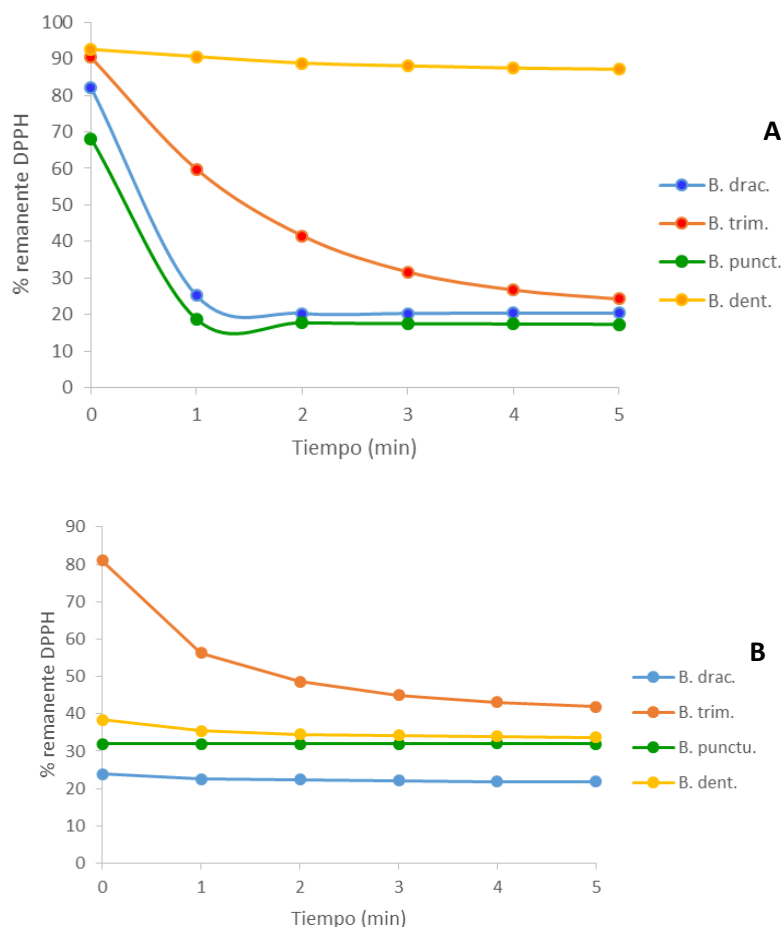
**Figura 8:** Cinética de la reacción de captura del radical DPPH para los estándares de quercetina (A) y ácido gálico (B). Tiempo de reacción: 5 minutos. Las concentraciones son expresadas en fracción molar de antioxidante a DPPH.

En consecuencia, el ácido gálico presentó una cinética rápida correspondiente al mecanismo antiradicalario *SET*, mientras que la quercetina presentó una cinética del tipo moderada que en general corresponde a una combinación de mecanismos *SET* y *HAT* (Figuras 2 y 8 ) (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Xie y Schaich, 2014; Schaich *et al.*, 2015). La diferencia de actividad entre ambos estándares evaluados se debería a factores tales como: diferentes energías de disociación de los enlaces O-H, estructuras resonantes distintas para la deslocalización del radical resultante, e impedimento estérico propio de patrones diferentes de sustitución (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Molyneux, 2004; Schaich *et al.*, 2015). A pesar de ello, el tipo de cinética depende indudablemente de la concentración evaluada (Figura 8), lo que implica que a mayor dilución del compuesto antioxidante mayor tiempo se requiere para alcanzar el estado estacionario (Brand-Williams *et al.*, 1995).

En la Figura 9 se presentan los gráficos cinéticos de la reacción del DPPH para los extractos etanólicos y acuosos de *B. dentata*, *B. dracunculifolia* y *B. punctulata* colectadas en el nordeste argentino; y para el mismo tipo de extracto de *B. trimera* de Uruguay (población de



referencia). Los extractos hexánicos de dichas especies no demostraron reacción apreciable con el radical *DPPH* luego de 30 minutos de ensayo.



**Figura 9:** Cinética de la reacción antiradicalaria de diferentes extractos de *Baccharis* spp.: (A): extractos alcohólicos, (B): extractos acuosos. Concentración de trabajo: 1,0 mg/mL. Tiempo de reacción: 5 minutos. Referencias: *B. drac.* (*Baccharis dracunculifolia*); *B. trim.* (*Baccharis trimera*); *B. punct.* (*Baccharis punctulata*); *B. dent.* (*Baccharis dentata*).

En la Figura 9A se observa que la cinética de la reacción del extracto alcohólico de *B. dentata* con *DPPH* fue muy lenta, lo que sugiere que el mecanismo antiradicalario para éste extracto es el *HAT* de transferencia de átomos de hidrógeno (Grupo 4) (Xie y Schaich, 2014; Schaich et al., 2015). Por otra parte, para los extractos alcohólicos de *B. dracunculifolia*, *B. trimera* y *B. punctulata* se observó una cinética moderada (Figura 9A), lo que indica que ambos mecanismos (*HAT* y *SET*) se produjeron en la reacción como causa de la actividad antiradicalaria (Xie y Schaich, 2014; Schaich et al., 2015). Por otra parte, para los extractos acuosos de *B. dracunculifolia*, *B. dentata* y *B. punctulata* se observaron cinéticas de reacción extremadamente rápidas (semejantes a la constatada para el ácido gálico) (Figura 9B), lo que



sugiere un mecanismo del tipo *SET* (Xie y Schaich, 2014; Schaich *et al.*, 2015). Por otra parte, la cinética para el extracto acuoso de *B. trimera* fue moderada (Figura 9B).

En la Figura 9 se puede apreciar que, a la concentración evaluada (1,0 mg/mL de extracto) a un tiempo de reacción de 5 minutos, todas las muestras alcanzaron el estado estacionario, por lo cual fue ese el tiempo seleccionado para efectuar las medidas cuantitativas para los extractos fijos, lo que se presenta en las Tablas 3 y 4. Para los aceites esenciales, hidrolato y compuestos puros de semi-síntesis, las medidas se realizaron a los 25 minutos de reacción (ver más adelante) y se presentan en las Tablas 3, 5 y 6.

Especie	Maceración			Destilación arr. vapor	
	H <sub>2</sub> O	EtOH	Hex.	AE	Hidrolato
<b>% Remanente DPPH (5 minutos)</b>					
<i>B. dentata</i>	33,7	87,1	100	100	*
<i>B. dracunculifolia</i>	21,8	20,5	100	100	17,2
<i>B. punctulata</i>	32,0	17,4	100	100	*
<i>B. trimera</i>	41,9	24,3	100	97,0	*
<b>% Inhibición (Q)</b>					
<i>B. dentata</i>	63,3	12,9	0	0	*
<i>B. dracunculifolia</i>	78,2	79,5	0	0	82,8
<i>B. punctulata</i>	68,0	82,6	0	0	*
<i>B. trimera</i>	58,1	75,7	0	3,0	*
<b>mg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto o µL de AE/hidrolato</b>					
<i>B. dentata</i>	1,5	0,2	0	0	*
<i>B. dracunculifolia</i>	1,7	1,4	0	0	0,4
<i>B. punctulata</i>	1,5	1,4	0	0	*
<i>B. trimera</i>	1,3	1,1	0	0,01	*
<b>mg equivalentes de eugenol/ mg de extracto o µL de AE/hidrolato</b>					
<i>B. dentata</i>	4,2	0,7	0	0	*
<i>B. dracunculifolia</i>	4,8	3,8	0	0	1,0
<i>B. punctulata</i>	4,2	3,9	0	0	*
<i>B. trimera</i>	3,6	3,1	0	0,04	*

**Tabla 3:** Actividad antiradicalaria en el ensayo de DPPH de extractos acuosos (H<sub>2</sub>O), etanólicos (EtOH) y hexánicos (Hex.) de *Baccharis* spp. obtenidos por maceración. También se presenta los resultados correspondientes a los aceites esenciales (AE) de las mismas especies y el hidrolato de *B. dracunculifolia* obtenidos por destilación con arrastre por vapor (SDE para el caso de *B. dentata*). Tiempo de reacción: 5 minutos para extractos y 25 minutos para aceites esenciales e hidrolato. Los resultados se expresan como % remanente de DPPH, % de inhibición (Q) del radical, y mediante sus respectivas masas equivalentes de extracto a los estándares ácido gálico y eugenol. (\*) No evaluado.



Especie	Extracción por dispositivo de Soxhlet	
	MeOH	AcOEt
% Remanente DPPH (5 min)		
<i>B. trimera</i>	31,1	30,5
<i>B. articulata M</i>	56,9	100
<i>B. articulata F</i>	43,4	100
% Inhibición (Q)		
<i>B. trimera</i>	68,9	69,5
<i>B. articulata M</i>	43,1	0
<i>B. articulata F</i>	56,6	0
mg equivalentes de ácido gálico/mg de extracto		
<i>B. trimera</i>	1,5	1,4
<i>B. articulata M</i>	0,9	0
<i>B. articulata F</i>	1,1	0
mg equivalentes de eugenol/mg de extracto		
<i>B. trimera</i>	4,2	3,9
<i>B. articulata M</i>	2,4	0
<i>B. articulata F</i>	3,2	0

**Tabla 4:** Actividad antiradicalaria en el ensayo de DPPH de extractos metanólicos (MeOH) y en acetato de etilo (AcOEt) de *B. trimera* y *B. articulata* (individuos masculinos *M* y femeninos *F*) obtenidos por dispositivo de Soxhlet. Tiempo de reacción: 5 minutos. Los resultados se expresan como % remanente de DPPH, % de inhibición (Q) del radical, y mediante sus respectivas masas equivalentes de extracto a los estándares ácido gálico y eugenol.

En la Tabla 4 se indica una ausencia completa de actividad antiradicalaria por parte de los extractos hexánicos, lo que se debe a que dicho solvente en general extrae componentes de naturaleza apolar, mientras que los compuestos antiradicalarios en general son polares (polifenólicos) (Kohen y Nyska, 2002; Muschietti y Martino, 2009). Los mejores resultados de inhibición de la actividad del radical DPPH (valores mayores al 75%) fueron obtenidos para los extractos obtenidos por maceración con etanol de *B. punctulata* (82,6%), *B. trimera* (75,7%) y *B. dracunculifolia* (79,5%), así como para el extracto acuoso de ésta última especie (78,2%) (Tablas 3 y 4). Dichos valores de inhibición son relevantes para extractos vegetales, dado que en bibliografía se reporta por ejemplo valores de 61-73% en extractos acuosos y alcohólicos de *B. grisebacchi* a una concentración de 0,1 mg/mL (Tapia *et al.*, 2004). Por otra parte, una planta medicinal conocida por su capacidad antioxidante como *Ilex paraguariensis* presentó un 71,8% de inhibición del radical DPPH en sus extractos acuosos a una concentración de 1,0 mg/mL (Dudonne *et al.*, 2009). El porcentaje de inhibición del radical DPPH se encuentra fuertemente correlacionado al contenido fenólico total y a la concentración de flavonoides, lo que además está vinculado a aspectos ambientales y estacionales (capítulos 6 y 7) (Muschietti y Martino, 2009; Vieira *et al.*, 2011; Sartor *et al.*, 2013).



Es de destacar que el extracto metanólico de individuos femeninos de *B. articulata* presentó mayor inhibición radicalaria que el extracto correspondiente a las plantas masculinas (Tabla 4), lo que está de acuerdo con una posible diferencia química entre ambos sexos (capítulo 5). Por su parte, los extractos en acetato de etilo de ambos sexos de *B. articulata* no presentaron actividad (Tabla 4).

La actividad antiradicalaria constatada para el extracto metanólico de *B. trimera* (población de referencia; capítulo 7) obtenido por dispositivo de Soxhlet fue menor que la actividad del extracto etanólico de maceración de la misma especie (Tablas 3 y 4). Dicha disparidad radica en las diferencias propias de las metodologías empleadas, ya que la extracción por Soxhlet fue realizada de forma secuencial obteniendo primero el extracto en acetato de etilo para posteriormente obtener el extracto metanólico; mientras que el extracto etanólico obtenido por maceración se obtuvo directamente del material vegetal crudo. Como se indicó anteriormente en el capítulo 7, los extractos metanólico y en acetato de etilo de *B. trimera* presentaron una composición primaria caracterizada por el contenido polifenólico (quercetina, rutina, ácido gálico y ácido clorogénico), los que serían los responsables de la actividad constatada en éste trabajo (Muschietti y Martino, 2009; Vieira *et al.*, 2011; Sartor *et al.*, 2013; Gómez *et al.*, 2016).

En términos absolutos, el extracto acuoso obtenido por maceración de *B. dracunculifolia* fue el que mayor actividad antiradicalaria demostró comparado a los estándares: cada mg del extracto fue equivalente a 1,7 mg de ácido gálico y 4,8 mg de eugenol (Tabla 3). Otros extractos destacados en éste sentido fueron: el acuoso de *B. dentata* y de *B. punctulata*, y el metanólico de *B. trimera* (un mg de cada uno de ellos fue equivalente a 1,5 mg de ácido gálico y 4,2 mg de eugenol) (Tablas 3 y 4).

Es pertinente establecer que los resultados del método del *DPPH* aquí presentados se encuentran condicionados por la presencia de pigmentos vegetales en los extractos, aspecto cuya influencia se ha constatado y cuantificado recientemente por Yeo y Shahidi (2019). Según éstos autores, la absorción de los pigmentos (especialmente polifenoles) a 517 nm hace que se subestimen los valores de actividad antiradicalaria hasta un 16 %, sugiriendo el empleo de la espectroscopía de resonancia paramagnética de electrón (*EPR*) en reemplazo de la UV.

En la Tabla 5 se presentan los resultados obtenidos de actividad antiradicalaria para varios aceites esenciales de *Baccharis* spp., así como se presenta para propósitos comparativos los resultados correspondientes al aceite esencial de *Conyza bonariensis* (capítulo 9).



Aceite Esencial (hidrodestilación)	% Rem. DPPH	% Inhib. (Q)	mg equiv. AG/ $\mu$ L AE	mg equiv. Eug/ $\mu$ L AE
<i>B. dracunculifolia</i> Pdú M	99,6	0,4	0	0
<i>B. dracunculifolia</i> Pdú F	99,4	0,6	0	0,01
<i>B. dracunculifolia</i> Can	100	0	0	0
<i>B. palustris</i>	100	0	0	0
<i>B. tridentata</i>	98,4	1,6	0,01	0,02
<i>C. bonariensis</i>	98,5	1,5	0,01	0,02

**Tabla 5:** Actividad antiradicalaria en el ensayo de DPPH de aceites esenciales de *Baccharis* spp. obtenidos por hidrodestilación. Para fines comparativos, también se presenta los resultados correspondientes al aceite esencial de *Conyza bonariensis* (capítulo 9). Tiempo de reacción: 25 minutos. Referencias: *B. dracunculifolia* Pdú M (material vegetal colectado en Paysandú, Uruguay; sexo masculino); *B. dracunculifolia* Pdú F (material vegetal colectado en Paysandú, Uruguay; sexo femenino); *B. dracunculifolia* Can (material vegetal colectado en Canelones, Uruguay). Los resultados se expresan como % remanente de DPPH, % de inhibición (Q) del radical, y mediante sus respectivos coeficientes equivalentes de volumen de aceite a los estándares ácido gálico (AG) y eugenol (Eug).

Ninguno de los los aceites esenciales de *Baccharis* spp. analizados en éste trabajo presentó actividad antiradicalaria apreciable, siendo el mayor porcentaje de inhibición observado el correspondiente al aceite de *B. trimera* con un valor de 3,0% (Tablas 3 y 5). Tampoco hubieron diferencias de actividad entre los sexos masculino y femenino de *B. dracunculifolia* (Tabla 5). Cuando se consideraron muestras de aceites esenciales de ésta última especie de diferentes orígenes geográficos (departamentos de Paysandú y Canelones en Uruguay, y provincia de Corrientes en Argentina), tampoco se encontraron diferencias apreciables de actividad (Tablas 3 y 5). La ausencia de acción antiradicalaria también se constató cuando se analizaron en otro panel de experimentos muestras obtenidas de aceites esenciales de *B. uncinella* y extractos volátiles obtenidos mediante CO<sub>2</sub> supercrítico de la misma especie (capítulo 3) (resultados no mostrados).

La ausencia de actividad antiradicalaria en los aceites esenciales de *Baccharis* spp. se debe a que la composición química de los mismos no incluye concentraciones apreciables de fenoles volátiles (como eugenol, timol y carvacrol) (Tabla 2; capítulo 4 y posteriores) (Bakkali *et al.*, 2008). Esta ausencia de actividad antiradicalaria para los aceites de *Baccharis* L. ya ha sido previamente informada en la literatura (Sobrinho *et al.*, 2016). Por otra parte, es de destacar que el hidrolato de *B. dracunculifolia* presentó mejor actividad antiradicalaria que el correspondiente aceite esencial de la especie (Tabla 3), lo que puede deberse a que en éste extracto existan compuestos fenólicos simples solubles en agua (no identificados en éste

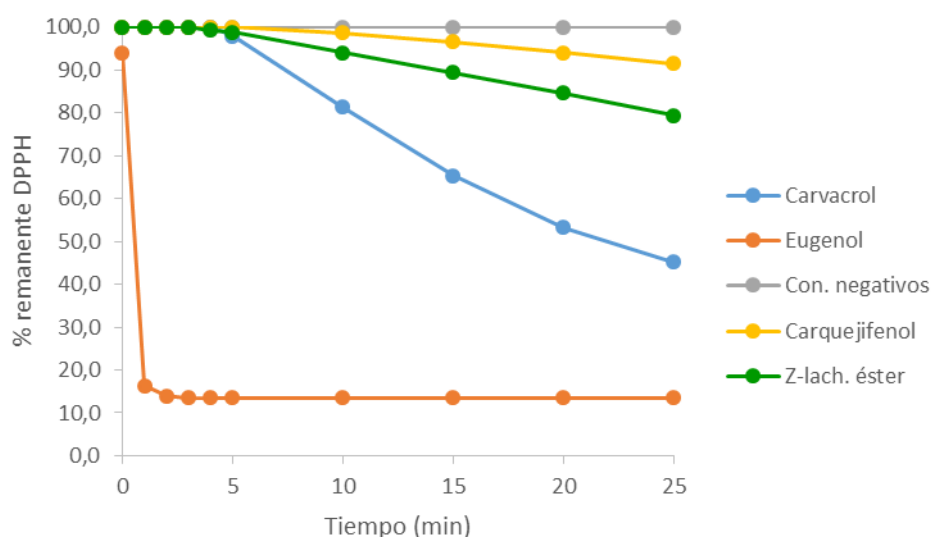


trabajo) responsables por tal comportamiento. De hecho, en términos absolutos cada  $\mu\text{L}$  de hidrolato fue equivalente a 1,0 mg de eugenol (Tabla 3). Hasta el momento no existen en la literatura del género *Baccharis* L. reportes de actividad antiradicalaria ni de bioactividad de dicha fracción acuosa, por lo que los resultados presentados en éste trabajo son originales.

### 3.2.2 Actividad de compuestos puros

En cuanto a los compuestos puros evaluados, en la Figura 10 se presenta la cinética de reacción de los mismos con el *DPPH*, comparando con los estándares volátiles empleados (Figura 7). Asimismo, en la Tabla 6 se presentan los resultados cuantitativos de dicha evaluación.

En la Figura 10 se puede ver la gran diferencia de actividad del eugenol (control positivo) comparado con el resto de los compuestos evaluados, presentando una cinética rápida (semejante al ácido gálico) que permite inferir la posibilidad del mecanismo *SET* en su acción de estabilización del radical. Por su parte, el resto de los compuestos evaluados de la Figura 10 presentaron una cinética lenta/moderada que indicaría que su actividad antiradicalaria seguiría un mecanismo del tipo *HAT* (Xie y Schaich, 2014; Schaich *et al.*, 2015). Debido a ésta cinética lenta, se decidió evaluar la actividad de éstos compuestos a los 25 minutos de reacción con el *DPPH* (Figura 10).



**Figura 10:** Cinética de la reacción antiradicalaria de los patrones eugenol, carvacrol y los controles negativos (Con. negativos)  $\alpha$ -pineno, *p*-cimeno y estragol. También se presenta el comportamiento del compuesto de semi-síntesis carquejifenol (capítulo 8) y del poliacetileno (Z)-éster de lachnophyllum (capítulo 9). Tiempo de reacción: 25 minutos. Concentración: 5,0  $\mu\text{L}/\text{mL}$ .

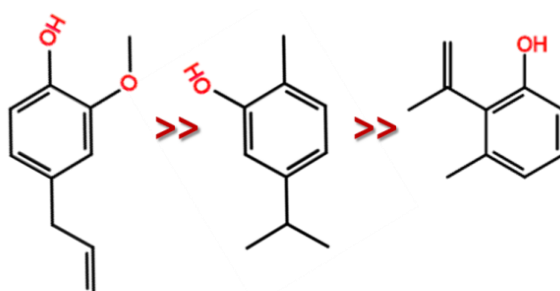




Compuesto	% Rem. DPPH	% Inhib. (Q)	mg equiv. AG/mg comp.	mg equiv. Eug/mg comp.
Carquejol	100	0	0	0
Carquejona	100	0	0	0
Carquejifenol	91,5	8,5	0,04	0,10
(Z)-éster de lachnophyllum	79,5	20,5	0,09	0,25
eugenol (control positivo)	13,6	86,4	0,38	1,0
carvacrol (control positivo)	45,2	54,8	0,24	0,67
estragol (control negativo)	100	0	0	0
p-cimeno (control negativo)	100	0	0	0
$\alpha$ -pineno (control negativo)	100	0	0	0

**Tabla 6:** Actividad antiradicalaria en el ensayo de DPPH de los productos de semi-síntesis carquejol, carquejona y carquejifenol (capítulo 8) y del compuesto poliacetilénico (Z)-éster de lachnophyllum presente en *Baccharis palustris* y *C. bonariensis* (capítulo 9). Tiempo de reacción: 25 minutos. Los resultados se expresan como % remanente de DPPH, % de inhibición (Q) del radical, y mediante sus respectivas masas equivalentes de los estándares empleados (ácido gálico y eugenol).

De los monoterpenos irregulares evaluados (capítulo 8), el carquejifenol (como era de esperar debido a su estructura fenólica) presentó cierto nivel de actividad antiradicalaria, mientras que la carquejona y el carquejol no exhibieron actividad (Figura 10 y Tabla 6). Sin embargo, la actividad antiradicalaria del carquejifenol fue inferior al de ambos estándares fenólicos evaluados como controles positivos (eugenol y carvacrol), debido posiblemente al impedimento estérico que ejercería el grupo isopropenilo en la posición contigua al grupo hidroxilo activo (Figura 11).



**Figura 11:** estructuras del eugenol, carvacrol y carquejifenol y sus órdenes de actividad antiradicalaria evaluadas experimentalmente mediante el ensayo del DPPH.

Sin embargo, el hidroxilo del eugenol también se encuentra impedido estéricamente (Figura 11), lo que indica que la reacción de captura del radical DPPH depende de muchos factores



del medio de reacción (temperatura, acidez, presencia de impurezas, etc.), y no sólo de aspectos estructurales de los compuestos a evaluar (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Kohen y Nyska, 2002; Molyneux, 2004; Yeo y Shahidi, 2019).

Por otra parte, para la existencia de la actividad antiradicalaria debe existir en la estructura un grupo fenólico libre, ya que la sola presencia del grupo metoxilo unido a un núcleo aromático es insuficiente para la actividad, como lo demuestra el caso del control negativo estragol (Figuras 7,10 y 11; Tabla 6). En tanto, como era de esperar los hidrocarburos monoterpénicos *p*-cimeno (aromático) y  $\alpha$ -pineno (olefínico) no presentaron actividad antiradicalaria en las condiciones experimentales, lo que se debe a que los mismos no pueden establecer ninguno de los mecanismos de acción (*HAT*, *SET* ni quelación) debido a la carencia de grupos hidroxilo y/o de grupos polarizables (Sánchez-Moreno *et al.*, 1998; Kohen y Nyska, 2002; Molyneux, 2004). La elección del *p*-cimeno y  $\alpha$ -pineno como controles negativos se debió además a que los mismos son compuestos presentes en la mayoría de los volatílicos de *Baccharis* spp. (Tabla 2, capítulo 4 y posteriores).

Otro resultado interesante de éstos experimentos fue que se constató actividad antiradicalaria por parte del (*Z*)-éster de lachnophyllum (capítulo 9; Tabla 6 y Figura 10), lo que posiblemente se deba a la estabilización por resonancia del radical resultante de reacción en la estructura poliacetilénica. La actividad antiradicalaria de éste compuesto sería la causa de que el aceite esencial de *C. bonariensis* (contenido de 32,0% de dicho componente) presentase un bajo nivel de actividad antiradicalaria (Q: 1,5%; Tabla 5). En el estudio de Sobrinho *et al.* (2016) se constató actividad antiradicalaria para el aceite esencial de *B. trinervis*, lo que puede estar asociado a su alto contenido de (*Z*)-éster de lachnophyllum, siendo éste un caso atípico de actividad para los aceites de *Baccharis* spp.

### 3.3 Actividad alexitérica

#### 3.3.1 Actividad de extractos de *Baccharis* spp. contra el veneno de *B. diporus*

En las Tablas 7, 8 y 9 se resumen los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad alexitérica de los distintos extractos de *Baccharis* spp. de acuerdo a las pruebas *in-vitro* realizadas.



Especie	Maceración			Destilación
	H <sub>2</sub> O	EtOH	Hex.	AE
<b>SDS-PAGE (1:10)</b>				
<i>B. dentata</i>	No	No	No	No
<i>B. dracunculifolia</i>	No	Sí	No	No
<i>B. punctulata</i>	No	No	Sí	No
<i>B. trimera</i>	No	No	No	Sí
<b>Inhibición de la actividad proteolítica</b>				
<i>B. dentata</i>	No	Sí (+++)	No	Sí (+++)
<i>B. dracunculifolia</i>	No	Sí (+++)	No	Sí (+++)
<i>B. punctulata</i>	No	Sí (+++)	No	Sí (+++)
<i>B. trimera</i>	No	Sí (+++)	No	Sí (+++)
<b>Inhibición de la actividad hemolítica (1:40)</b>				
<i>B. dentata</i>	No	Sí (26,3%)	Sí (36,8%)	Sí (10,5%)
<i>B. dracunculifolia</i>	No	Sí (26,4%)	No	Sí (21,1%)
<i>B. punctulata</i>	No	Sí (12,6%)	No	Sí (15,8%)
<i>B. trimera</i>	No	No	No	No
<b>Inhibición de la actividad coagulante</b>				
<i>B. dentata</i>	Sí (20,8%)	Sí (17,2%)	Sí (19,0%)	No
<i>B. dracunculifolia</i>	Sí (29,8%)	Sí (56,5%)	Sí (12,6%)	No
<i>B. punctulata</i>	Sí (22,1%)	Sí (26,0%)	Sí (25,4%)	Sí (13,1%)
<i>B. trimera</i>	Sí (29,2%)	Sí (38,5%)	Sí (11,9%)	No

**Tabla 7:** Resultados de las pruebas in-vitro de actividad alexitérica contra el veneno de *Bothrops diporus* por parte de extractos acuosos (H<sub>2</sub>O), etanólicos (EtOH) y hexánicos (Hex.) de *Baccharis* spp. obtenidos por maceración. Para fines comparativos, también se presenta los resultados correspondientes a los aceites esenciales (AE) obtenido por destilación con arrastre por vapor (SDE para el caso de *B. dentata*). Se expresa arbitrariamente el resultado de inhibición de la actividad proteolítica como: (+): poco activo; (++) medianamente activo; (+++): muy activo.

Especie	Decocción	Extracción por dispositivo de Soxhlet		
	H <sub>2</sub> O	MeOH	AcOEt	Hex.
<b>SDS-PAGE (1:10)</b>				
<i>B. trimera</i>	No	No	Sí	No
<i>B. articulata M</i>	No	No	Sí	No
<i>B. articulata F</i>	No	No	Sí	No
<b>Inhibición de la actividad proteolítica</b>				
<i>B. trimera</i>	Sí (+)	Sí (++)	No	No
<i>B. articulata M</i>	No	Sí (+++)	No	No
<i>B. articulata F</i>	No	Sí (+++)	No	No
<b>Inhibición de la actividad hemolítica (1:40)</b>				
<i>B. trimera</i>	No	Sí (47,4%)	Sí (10,5%)	No
<i>B. articulata M</i>	No	Sí (31,6%)	Sí (63,2%)	Sí (52,6%)
<i>B. articulata F</i>	No	Sí (15,8%)	Sí (52,6%)	No



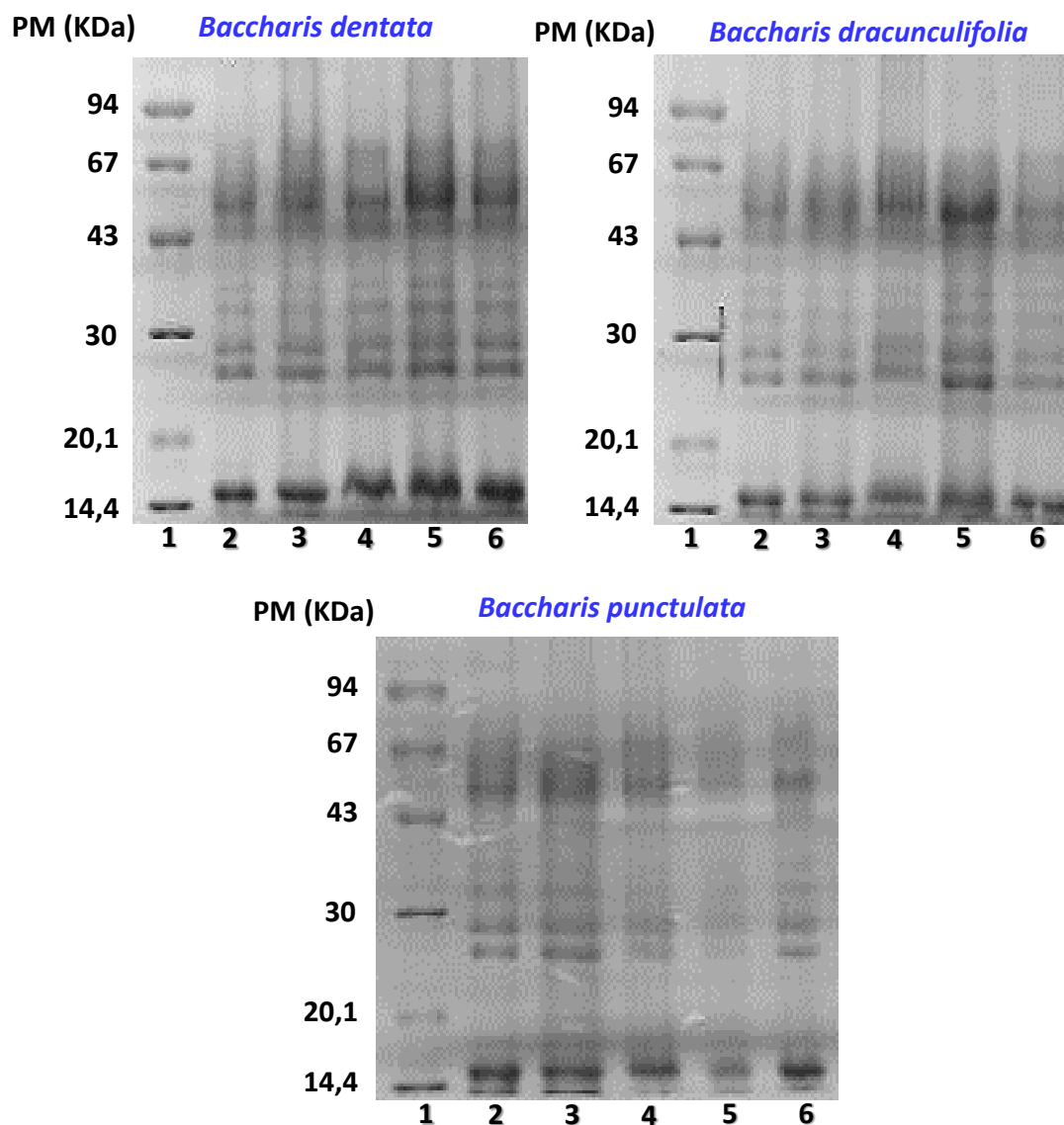
<b>Tabla 8, continuación</b>				
<b>Inhibición de la actividad coagulante</b>				
<i>B. trimera</i>	Sí (49,1%)	Sí (49,9%)	Sí (57,1%)	Sí (35,8%)
<i>B. articulata M</i>	Sí (49,3%)	Sí (51,2%)	Sí (100%)	Sí (18,9%)
<i>B. articulata F</i>	Sí (40,6%)	Sí (54,1%)	Sí (100%)	Sí (15,3%)

**Tabla 8:** Resultados de las pruebas in-vitro de actividad alexitérica contra el veneno de *Bothrops diporus* por parte de extractos metanólicos (MeOH), en acetato de etilo (AcOEt) y hexánicos (Hex.) de *Baccharis* spp. obtenidos por dispositivo de Soxhlet. Para fines comparativos, también se presenta los resultados correspondientes a la decocción del material vegetal en medio acuoso (H<sub>2</sub>O). Se expresa arbitrariamente el resultado de inhibición de la actividad proteolítica como: (+): poco activo; (++) medianamente activo; (+++): muy activo.

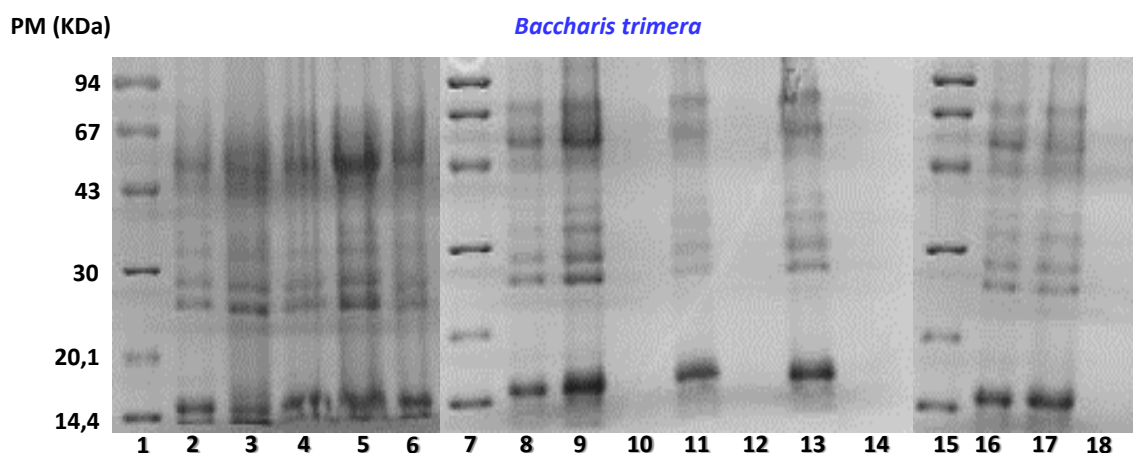
<b>Aceite esencial</b>	<b>SDS-PAGE</b>	<b>Inhib. Proteol.</b>	<b>Inhib. Hemol.</b>	<b>Inhib. Coagul.</b>
<i>B. dracunculifolia Pdú</i>	No	Sí (+++)	Sí (10,5%)	No
<i>B. palustris</i>	No	Sí (+++)	Sí (12,3%)	No
<i>B. tridentata</i>	No	Sí (+++)	Sí (26,3%)	Sí (15,1%)
<i>C. bonariensis</i>	Sí	Sí (+++)	Sí (26,3%)	No

**Tabla 9:** Resultados de las pruebas in-vitro de actividad alexitérica contra el veneno de *Bothrops diporus* por parte de aceites esenciales de *Baccharis* spp. obtenidos por hidrodestilación. Para propósitos comparativos también se presentan los resultados obtenidos para el aceite esencial de *C. bonariensis* (capítulo 9). Se expresa arbitrariamente el resultado de inhibición de la actividad proteolítica como: (+): poco activo; (++) medianamente activo; (+++): muy activo.

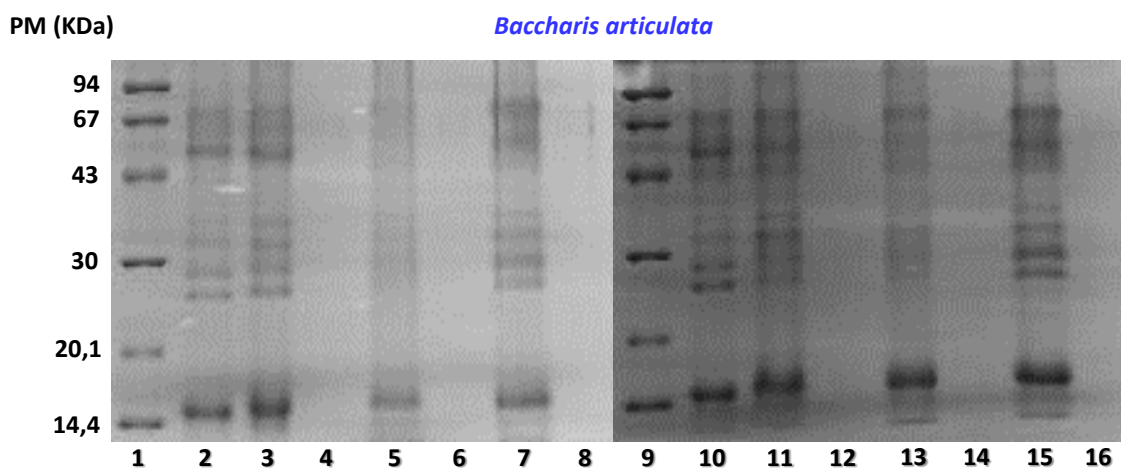
**SDS-PAGE.** En las Figuras 12-15 se presenta el registro fotográfico de los ensayos mediante la técnica de SDS-PAGE empleada en éste trabajo como *screening* para evaluar actividad alexitérica de los extractos fijos y aceites esenciales de *Baccharis* spp.



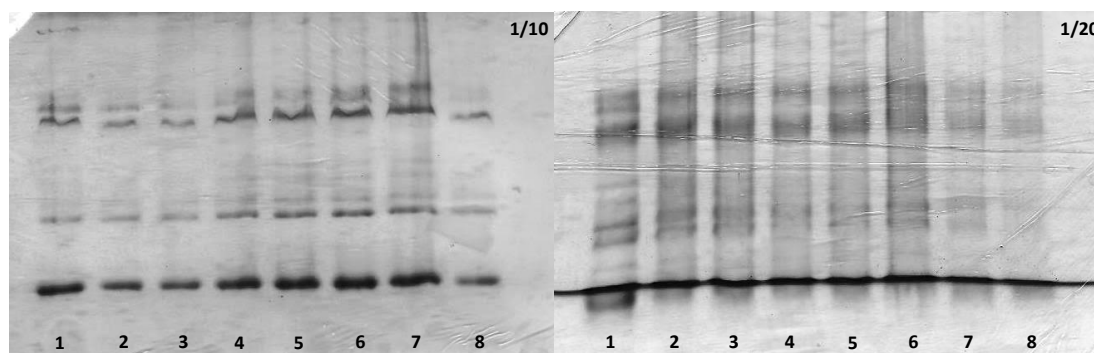
**Figura 12:** Geles de SDS-PAGE para los extractos de *Baccharis* spp. de Corrientes (Argentina) y su interacción con el veneno de *B. diporus*. Referencias: **1.** patrón de PM (con los pesos moleculares respectivos detallados a la izquierda de la imagen); **2.** veneno (V); **3.** extracto acuoso + V; **4.** extracto etanólico + V; **5.** extracto hexánico + V; **6.** aceite esencial + V. Nota: en el caso de *B. dentata*, en el carril 6 se presenta el extracto obtenido por SDE.



**Figura 13:** Geles de SDS-PAGE para *Baccharis trimera* de Paysandú (Uruguay; población de referencia) y su interacción con el veneno de *B. diporus*. Referencias: **1, 7 y 15.** patrón de PM (con los pesos moleculares respectivos detallados a la izquierda de la imagen); **2, 8 y 16.** veneno (V); **3.** extracto acuoso (maceración) + V; **4.** extracto etanólico (maceración) + V; **5.** extracto hexánico (maceración) + V; **6.** aceite esencial + V; **9.** extracto hexánico (Soxhlet) + V; **10.** extracto hexánico (Soxhlet); **11.** extracto en acetato de etilo (Soxhlet) + V; **12.** extracto en acetato de etilo (Soxhlet); **13.** extracto metanólico (Soxhlet) + V; **14.** extracto metanólico (Soxhlet); **17.** extracto acuoso (decocción) + V; **18.** extracto acuoso (decocción).



**Figura 14:** Geles de SDS-PAGE para *Baccharis articulata* de Paysandú (Uruguay), individuos masculinos (M) y femeninos (F); y su interacción con el veneno de *B. diporus*. Referencias: **1 y 9.** patrón de PM (con los pesos moleculares respectivos detallados a la izquierda de la imagen); **2 y 10.** veneno (V); **3.** extracto hexánico M + V; **4.** extracto hexánico M; **5.** extracto en acetato de etilo M + V; **6.** extracto en acetato de etilo M; **7.** extracto metanólico M + V; **8.** extracto metanólico M; **11.** extracto hexánico F + V; **12.** extracto hexánico F; **13.** extracto en acetato de etilo F + V; **14.** extracto en acetato de etilo F; **15.** extracto metanólico F + V; **16.** extracto metanólico F. Todos los extractos en éste caso fueron obtenidos mediante dispositivo de Soxhlet.



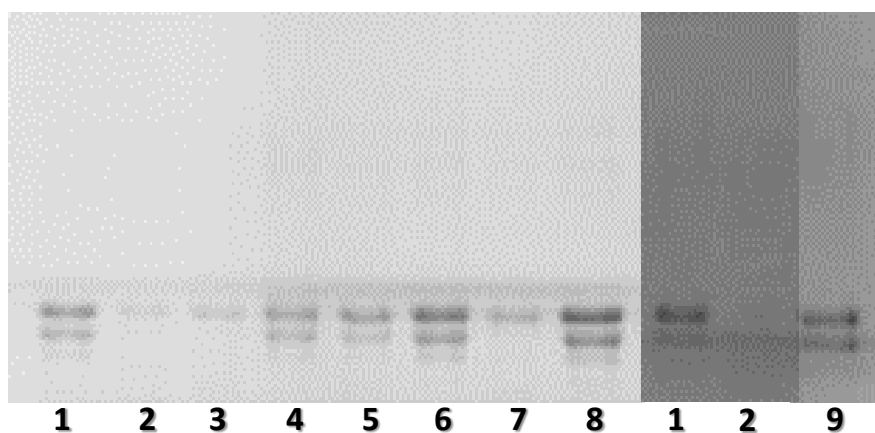
**Figura 15:** Geles de SDS-PAGE de aceites esenciales (AEs) de *Baccharis* spp. y su interacción con el veneno de *B. diporus*. Relaciones veneno : AE empleadas (1:10) y (1:20). Referencias: 1. veneno (V); 2. *B. tridentata* M + V; 3. *B. tridentata* F + V; 4. *B. dracunculifolia* (Paysandú) M + V; 5. *B. dracunculifolia* F (Paysandú) + V; 6. *B. dracunculifolia* (Canelones) + V; 7. *B. microdonta* + V; 8. *B. trimera* + V. Para el caso de *B. tridentata* y *B. dracunculifolia* se evaluaron aceites obtenidos de individuos masculinos (M) y femeninos (F).

En éste ensayo, se pudo observar una leve disminución de intensidad de las bandas proteicas del veneno de *B. diporus* para el extracto hexánico de *B. punctulata* (carril 5 Figura 12; particularmente en aquellas bandas localizadas entre 43 y 67 KDa, y las de alrededor de 30 KDa), y en menor medida para el extracto alcohólico de *B. dracunculifolia* (carril 4; Figura 12). Sin embargo, los extractos que mayormente modificaron el perfil electroforético de bandas proteicas del veneno fueron los obtenidos de las especies *B. trimera* (carril 11, Figura 13) y *B. articulata* (carriles 5 y 13, Figura 14) mediante dispositivo de Soxhlet con acetato de etilo. Para el caso de los aceites esenciales, el único que disminuyó en algún grado la intensidad de las bandas fue el de *B. trimera* (carril 8, Figura 15), tanto en la proporción de 1:10 como de 1:20 (veneno: aceite esencial). Como conclusión de éste panel de experimentos se comprobó que la técnica de *SDS-PAGE* resultó poco efectiva como técnica de *screening* para evaluación de la actividad alexitérica, contrario a lo obtenido para otras especies vegetales (Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015).

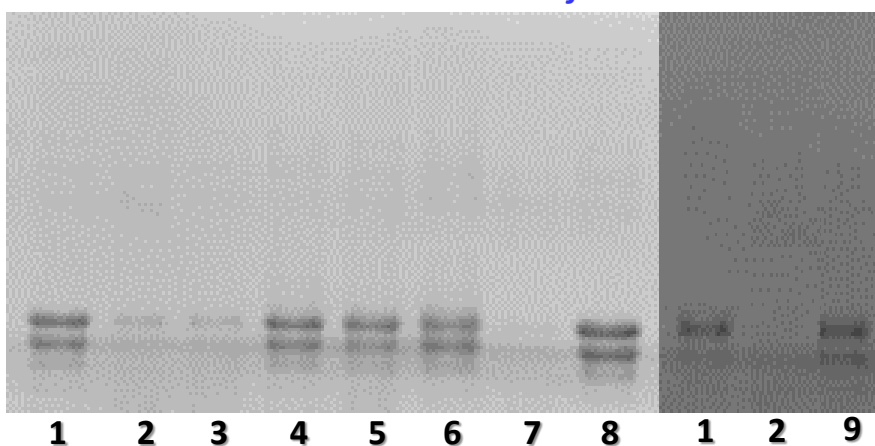
**Inhibición de la actividad proteolítica.** En las Figuras 16-19 se presenta el registro fotográfico de las corridas de *SDS-PAGE* para ensayo de la actividad inhibitoria de la proteólisis por parte de extractos fijos y aceites esenciales de *Baccharis* spp.



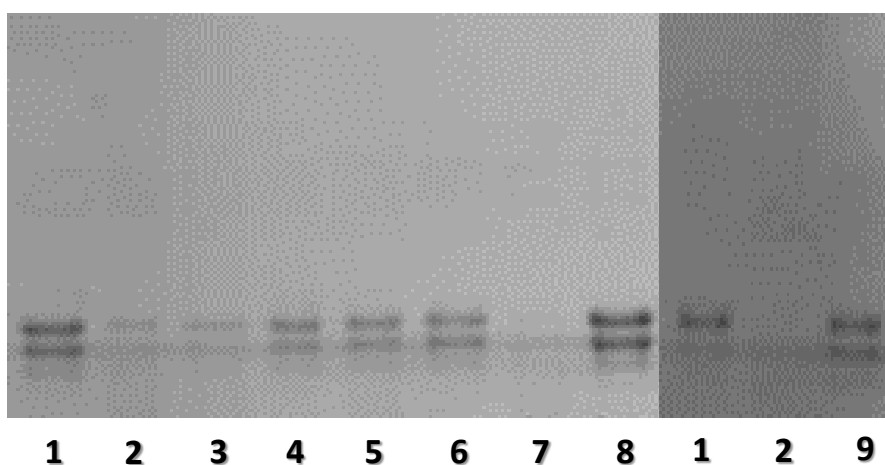
*Baccharis dentata*



*Baccharis dracunculifolia*



*Baccharis punctulata*



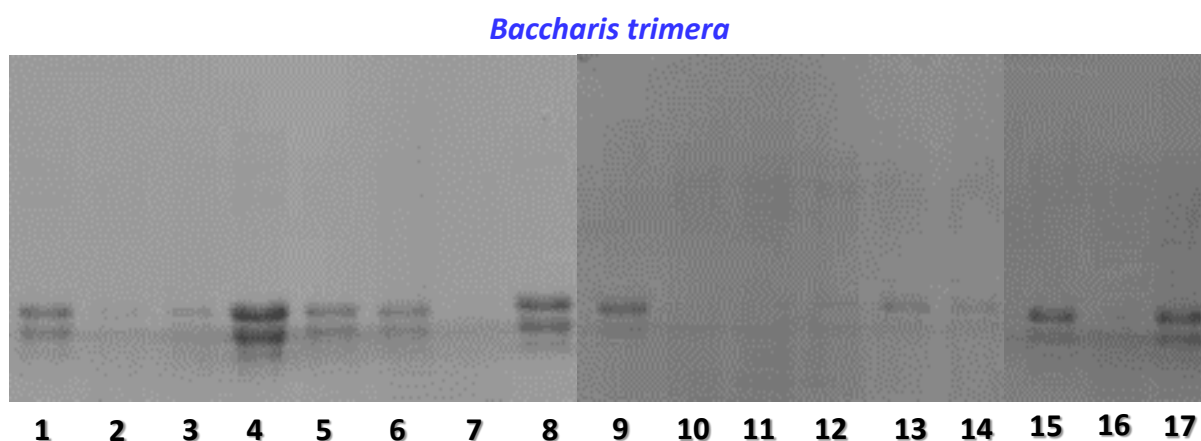
**Figura 16:** Geles de inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus* seguida por SDS-PAGE para *Baccharis* spp. nativas del noreste argentino. Referencias: 1. caseína (C); 2. veneno (V) + C; 3. extracto acuoso + V + C; 4. extracto acuoso + C; 5. extracto etanólico + V + C; 6. extracto etanólico + C; 7. extracto hexánico + V + C; 8. extracto hexánico + C; 9. aceite esencial + V + C. Nota: 1) en la posición 9 en todos los casos se corrió en geles independientes de los principales. 2) Para *B. dentata* se considera en la posición 9 el extracto de SDE.





De acuerdo a los resultados (Figuras 16-19), la incubación de varios de los extractos de *Baccharis* spp. con el veneno de *B. diporus* posibilitó la preservación de las bandas proteicas de la caseína, inhibiendo la acción proteolítica del veneno. Todos los extractos alcohólicos de las tres especies colectadas en el nordeste argentino (*B. dentata*, *B. dracunculifolia* y *B. punctulata*) demostraron actividad en éste ensayo, mientras que los extractos acuosos y hexánicos fueron inactivos (Figura 16 y Tabla 7).

Para las especies colectadas en Uruguay, el extracto etanólico obtenido por maceración de *B. trimera* también exhibió actividad de inhibición de la actividad proteolítica del veneno, como así también lo hizo el extracto metanólico de la misma especie obtenido por dispositivo de Soxhlet (Figura 17 y Tabla 8). Por su parte, el decocto en agua presentó una muy leve actividad (Figura 17, carril 14).

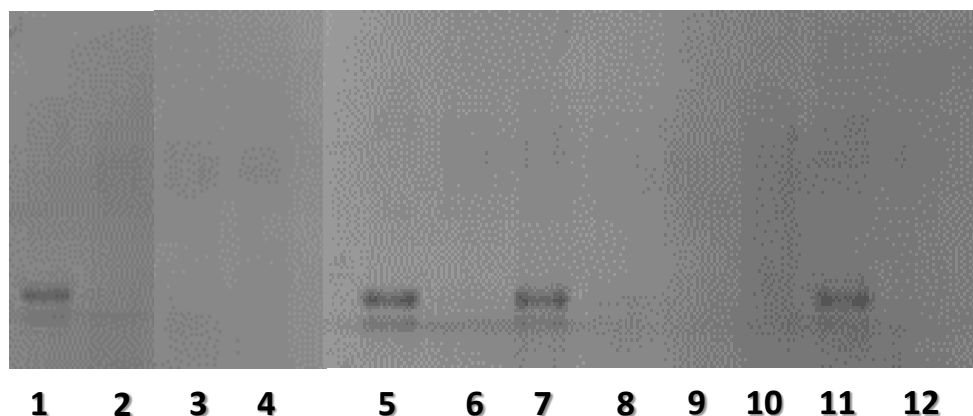


**Figura 17:** Geles de inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus* seguida por SDS-PAGE para *Baccharis trimera* nativa de Paysandú (Uruguay; población de referencia). Referencias: **1, 9 y 15.** caseína (C); **2, 10 y 16.** veneno (V) + C; **3.** extracto acuoso (maceración) + V + C; **4.** extracto acuoso (maceración) + C; **5.** extracto etanólico (maceración) + V + C; **6.** extracto etanólico (maceración) + C; **7.** extracto hexánico (maceración) + V + C; **8.** extracto hexánico (maceración) + C; **11.** extracto hexánico (Soxhlet) + V + C; **12.** extracto en AcOEt (Soxhlet) + V + C; **13.** extracto metanólico (Soxhlet) + V + C; **14.** extracto acuoso (decocción) + V + C; **17.** aceite esencial + V + C.

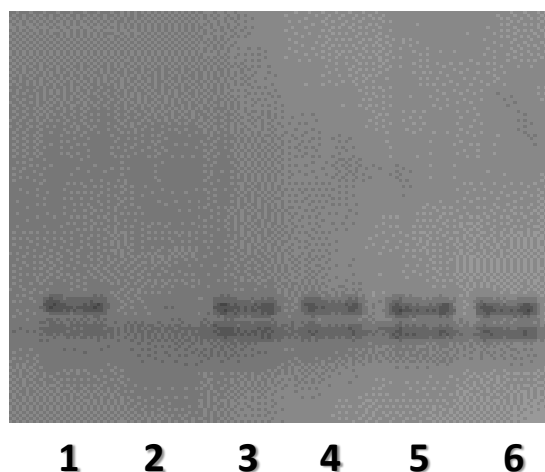
Para el caso de la especie *B. articulata* (especímenes masculinos y femeninos), solamente los extractos en metanol fueron activos, mientras que los obtenidos mediante hexano, acetato de etilo y decocción en agua resultaron inactivos en el ensayo (Figura 18 y Tabla 8).



### *Baccharis articulata*



**Figura 18:** Geles de inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus* seguida por SDS-PAGE para *Baccharis articulata* nativa de Paysandú (Uruguay; población de referencia), individuos masculinos (M) y femeninos (F). Referencias: **1 y 5.** caseína (C); **2 y 6.** veneno (V) + C; **3.** extracto hexánico M + V + C; **4.** extracto en AcOEt M + V + C; **7.** extracto metanólico M + V + C; **8.** extracto acuoso M + V + C; **9.** extracto hexánico F + V + C; **10.** extracto en AcOEt F + V + C; **11.** extracto metanólico F + V + C; **12.** extracto acuoso + V + C.



**Figura 19:** Geles de inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus* seguida por SDS-PAGE para aceites esenciales (AE) de *Baccharis* spp. Referencias: **1.** caseína (C); **2.** veneno (V) + C; **3.** AE de *B. palustris* + V + C; **4.** AE de *B. tridentata* + V + C; **5.** AE de *B. dracunculifolia* (Paysandú) + V + C; **6.** AE de *Conyza bonariensis* + V + C.

Todos los aceites esenciales de *Baccharis* spp. evaluados en éste trabajo presentaron inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus*, (Tablas 7 y 9, Figuras 16, 17 y 19). Por otra parte, los extractos acuosos (salvo para el caso de *B. trimera*), hexánicos y en acetato de etilo de *Baccharis* spp. fueron inactivos (Tablas 7 y 8). Lo anterior sugiere que los compuestos responsables por la actividad inhibitoria de la proteólisis son de naturaleza volátil y solubles únicamente en solventes alcohólicos. Otra posibilidad, es que los mismos



compuestos, aún cuando fueren solubles en otros solventes sean “enmascarados” en su bioactividad por otros componentes de los extractos.

Anteriormente, Januário *et al.* (2004) realizando el mismo ensayo detallado en éste trabajo, determinaron completa inhibición de la acción proteolítica del veneno de *Bothrops* spp. por parte de un diterpeno del tipo *neo-clerodano* aislado de *B. trimera* (Figura 4). Inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *B. diporus* también ha sido verificada previamente para extractos y aceites esenciales de: *Nectandra megapotamica* (Lauraceae; Torres *et al.*, 2014), *Asclepias mellodora* (Asclepiadaceae; Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2016) y *Aloysia citriodora* (Verbenaceae; Cáceres *et al.*, 2017).

**Inhibición de la actividad hemolítica.** Para las especies de *Baccharis* spp. colectadas en el nordeste argentino (*B. dentata*, *B. dracunculifolia* y *B. punctulata*) se constató inhibición de la actividad hemolítica del veneno de *B. diporus* en su mayoría para los extractos etanólicos y aceites esenciales (extracto volátil en el caso de *B. dentata*) con valores entre 10,5 % y 26,4 % (Tabla 7). Sin embargo, los mejores resultados fueron obtenidos para el extracto hexánico de *B. dentata*, el que redujo el halo de hemólisis en un 36,8 % (Tabla 7; Figura 5). Por otro lado, los extractos acuosos no presentaron actividad.

Para los especímenes colectados en Uruguay, se evidenció apreciable actividad inhibitoria de la hemólisis (10,5%-63,2%) de los extractos de *B. trimera* y *B. articulata* obtenidos por dispositivo de Soxhlet en metanol y acetato de etilo (Tabla 8). Ello representa una diferencia respecto de la ausencia constatada de actividad de los extractos de *B. trimera* obtenidos por maceración en frío (Tabla 7), lo que se debe seguramente a que la extracción mediante dispositivo de Soxhlet es más exhaustiva. En todos los casos, los extractos de los individuos masculinos de *B. articulata* inhibieron en mayor extensión la hemólisis que los extractos de individuos femeninos de la misma especie (Tabla 8), lo que refleja diferencias sexuales de composición (capítulo 5). Ninguno de los extractos acuosos de las especies colectadas en Uruguay resultó activo, al igual que lo previamente descrito para las especies colectadas en Argentina.

Todos los aceites esenciales fueron activos inhibiendo en alguna medida la hemólisis (valores entre 10,5 % y 26,3 %) producida por el veneno de *B. diporus* en condiciones *in-vitro*, con la excepción del aceite de *B. trimera* (Tablas 7 y 9).



Los valores de inhibición obtenidos en éste trabajo son relevantes cuando se compara con los valores publicados en bibliografía para extractos de otras especies vegetales contra el mismo veneno (Torres *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2014; Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2016; Cáceres *et al.*, 2017).

**Inhibición de la actividad coagulante.** Del material vegetal obtenido del nordeste argentino, únicamente las muestras volátiles de *B. dentata* y *B. dracunculifolia* (extracto SDE y aceite esencial, respectivamente) no exhibieron inhibición de la actividad coagulante del veneno de *B. diporus*, siendo todos los demás extractos activos (Tabla 7). La muestra que mayor actividad presentó en éste caso fue el extracto etanólico de *B. dracunculifolia*, el que restituyó en un 56,5% el tiempo normal de coagulación del plasma recalcificado luego de haber sido incubado con el veneno (Tabla 7).

La gran mayoría de los aceites esenciales evaluados no presentaron actividad inhibitoria de la coagulación del plasma, con excepción del aceite de *B. punctulata* y *B. tridentata* (Tablas 7 y 9). Por otra parte, excelentes resultados de inhibición (entre 50% y 100% de restitución del tiempo normal de coagulación) fueron evidenciados para extractos de las especies *B. trimera* y *B. articulata* obtenidos mediante dispositivo de Soxhlet con acetato de etilo y metanol como solventes (Tabla 8), valores en general superiores a los obtenidos mediante extracción por maceración simple (Tabla 7). Lo anterior confirma que éste último tipo de metodología no agota completamente a la droga vegetal en su contenido de metabolitos bioactivos, realzando la importancia de una adecuada elección del método.

Evaluando resultados publicados en la literatura en ensayos con el mismo veneno de *B. diporus* (Torres *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2014; Ricciardi-Verrastro *et al.*, 2016; Cáceres *et al.*, 2017), los extractos en acetato de etilo de *B. articulata* (Soxhlet) resultaron muy activos (100% de restitución del tiempo normal de coagulación), lo que demuestra el potencial anti-veneno de ésta especie vegetal. Tal información podría ser de utilidad como información de base para la elaboración de preparados fitoterápicos con *B. articulata* que pudieran neutralizar los efectos indeseables producidos por el veneno de *Bothrops* spp.



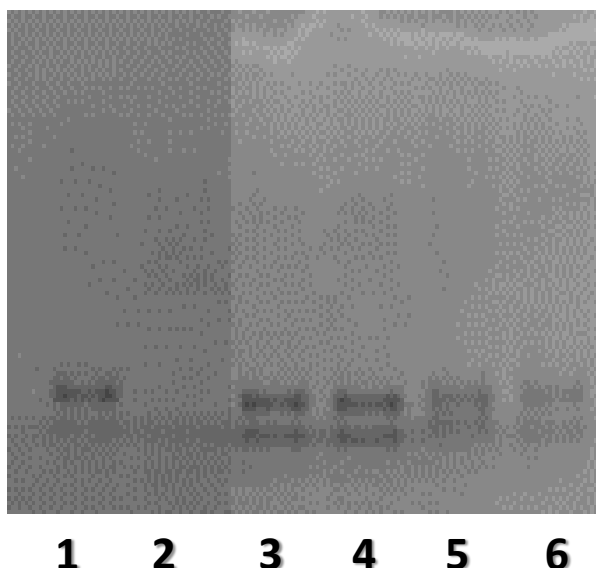
### 3.3.2 Actividad de compuestos puros contra el veneno de *B. diporus*

En la Tabla 10 se presenta el resumen de los resultados de evaluación de la actividad alexitérica para los compuestos puros de semi-síntesis derivados del carquejol obtenidos en el marco del capítulo 8, y para el (Z)-éster de lachnophyllum aislado de *C. bonariensis* (capítulo 9).

Compuesto	SDS-PAGE	Inhib. Proteol.	Inhib. Hemol.	Inhib. Coagul.
<i>Carquejol</i>	Sí	Sí (+++)	Sí (10,5%)	No
<i>Carquejifenol</i>	Sí	Sí (+++)	No	No
<i>Carquejona</i>	Sí	Sí (+++)	Sí (50,0%)	Sí (20,4%)
(Z)-éster de <i>lachnophyllum</i>	Sí	Sí (+++)	Sí (57,9%)	Sí (60,6%)

**Tabla 10:** Resultados de las pruebas *in-vitro* de actividad alexitérica contra el veneno de *Bothrops diporus* por parte de compuestos puros de semi-síntesis derivados del carquejol (capítulo 8) y del (Z)-éster de *lachnophyllum* presente en *B. palustris* y *C. bonariensis* (capítulo 9). Se expresa arbitrariamente el resultado de inhibición de la actividad proteolítica como: (+): poco activo; (++) medianamente activo; (+++): muy activo.

Todos los compuestos puros analizados (*carquejol*, *carquejona*, *carquejifenol* y (Z)-éster de *lachnophyllum*) modificaron el perfil de bandas proteicas en la electroforesis por *SDS-PAGE*, presentando un comportamiento relevante de “borrado de bandas” (Tabla 10 y Figura 21), típico de compuestos con alta actividad alexitérica (Camargo *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2015). Coincidentemente, todos los compuestos evaluados presentaron importante inhibición de la actividad proteolítica en ensayos *in-vitro* realizado por *SDS-PAGE* (Figura 20 y Tabla 10).



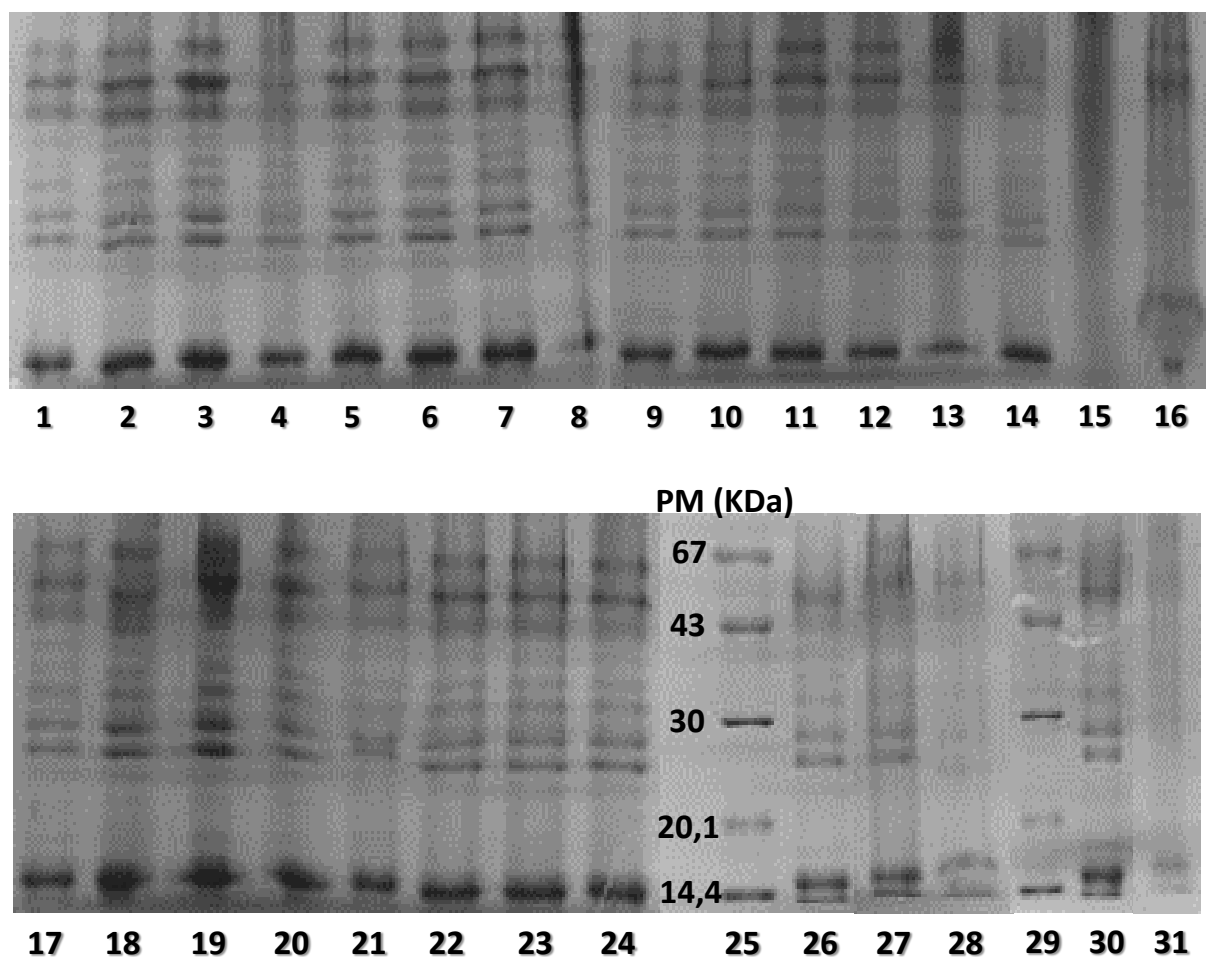
**Figura 20:** Gel de inhibición de la actividad proteolítica del veneno de *Bothrops diporus* seguida por SDS-PAGE para compuestos puros. Referencias: **1.** caseína (C); **2.** veneno (V) + C; **3.** carquejol + V + C; **4.** carquejifenol + V + C; **5.** carquejona + V + C; **6.** (Z)-lachnophyllum éster + V + C.

En lo que respecta a la inhibición de la actividad hemolítica, solo el carquejifenol no presentó ninguna actividad, mientras que el resto de los compuestos fueron activos (Tabla 10). Tanto la carquejona como el (Z)-éster de lachnophyllum demostraron muy buena capacidad de neutralización de la capacidad hemolítica del veneno de *B. diporus*, reduciendo el halo correspondiente en 50,0% y 57,9%, respectivamente (Tabla 10). Es interesante resaltar que el (Z)-éster de lachnophyllum, compuesto mayoritario del aceite esencial de *C. bonariensis* (32,0 % de la composición; capítulo 9), presentó más del doble de actividad que el aceite esencial puro (Tablas 9 y 10). En el ensayo de inhibición de la actividad coagulante, nuevamente la carquejona y el (Z)-éster de lachnophyllum se destacaron, con porcentajes de restitución del tiempo normal del coagulación del plasma recalcificado del 20,4% y 60,6%, respectivamente (Tabla 10).

Todos los resultados presentados anteriormente demuestran una muy buena actividad alexitérica de la carquejona (derivado monoterpénico irregular) y el (Z)-éster de lachnophyllum (poliacetileno), lo que es una información de relevancia para futuras investigaciones de actividad *in-vitro* e *in-vivo*, y para la evaluación de los posibles mecanismos de acción. La novedad de éstos resultados se debe a que en general dicho tipo de componentes monoterpénicos y poliacetilénicos no presentan actividad como componentes neutralizantes de los venenos de serpientes (Mors *et al.*, 2000; Dellacassa *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2015), lo que puede abrir nuevos caminos de investigación.

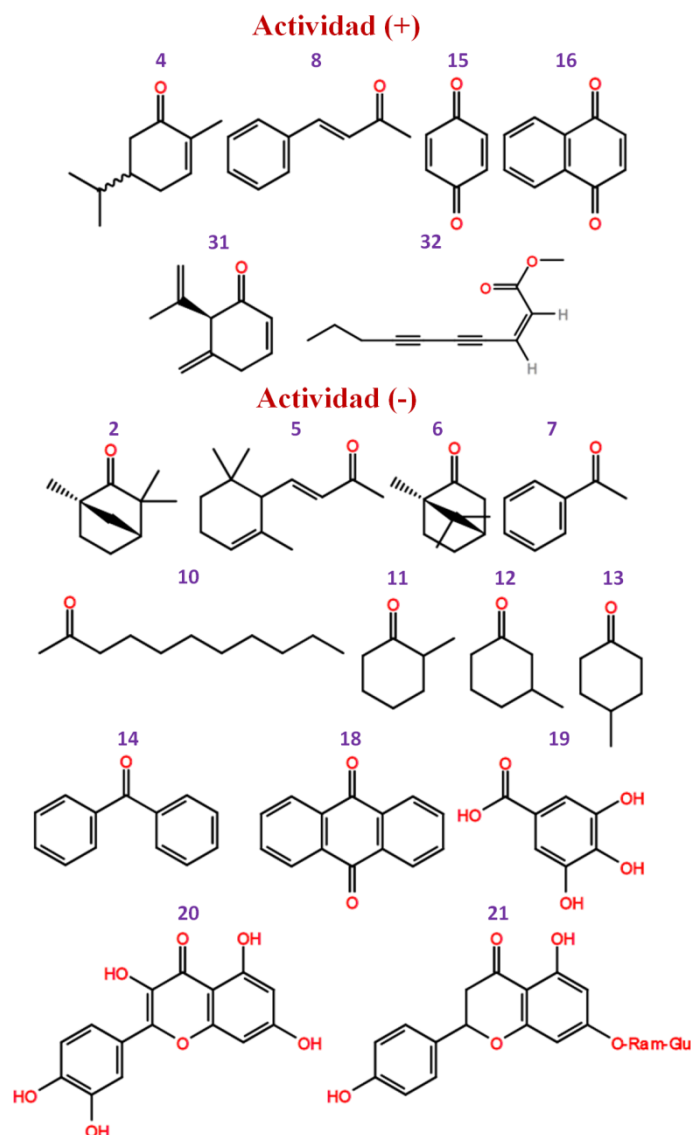


Con el objetivo de investigar alguna posible relación estructura-actividad que explicase la acción neutralizante del veneno para el caso de la carquejona y el (Z)-éster de lachnophyllum, se ensayaron una batería de estándares contra el veneno de *B. diporus* mediante el método de screening de SDS-PAGE, lo que se presenta en la Figura 21.



**Figura 21:** Geles de SDS-PAGE para compuestos puros y su interacción con el veneno de *B. diporus*. Todos los compuestos fueron incubados con el veneno (los resultados que se muestran corresponden a la interacción veneno-compuesto). Referencias: **1, 9, 17, 26 y 30.** veneno (V); **2.** fenchona; **3.** semicarbazona de piperitona; **4.** carvona; **5.**  $\alpha$ -ionona; **6.** alcanfor; **7.** acetofenona; **8.** benzalacetona; **10.** metilnonilcetona; **11.** 2-metilciclohexanona; **12.** 3-metilciclohexanona; **13.** 4-metilciclohexanona; **14.** benzofenona; **15.** p-benzoquinona; **16.** 1,4 naftoquinona; **18.** antraquinona; **19.** ácido gálico; **20.** quercetina; **21.** naringina; **22.** ramnosa; **23.** glucosa; **24.** manosa; **25 y 29.** patrón de PM (con los pesos moleculares respectivos detallados a la izquierda); **27.** carquejol; **28.** carquejifenol; **31.** carquejona.

De los estándares ensayados, los que presentaron modificaciones importantes en los perfiles proteicos del veneno de *B. diporus* fueron: carvona, benzalacetona, p-benzoquinona, 1,3-naftoquinona, además de la carquejona y el (Z)-éster de lachnophyllum (Figuras 21 y 22).



**Figura 22:** Estructura química de los estándares para los cuales se ensayó su interacción con el veneno mediante SDS-PAGE en la búsqueda de relaciones estructura/actividad. Se indica los compuestos que fueron activos (actividad +) y aquellos que no lo fueron (actividad -). Los números de los compuestos corresponde a los adoptados en la Figura 21: 2. fenchona; 4. carvona; 5.  $\alpha$ -ionona; 6. alcanfor; 7. acetofenona; 8. benzalacetona; 10. metilnonilcetona; 11. 2-metilciclohexanona; 12. 3-metilciclohexanona; 13. 4-metilciclohexanona; 14. benzofenona; 15. *p*-benzoquinona; 16. 1,4 naftoquinona; 18. antraquinona; 19. ácido gálico; 20. quercetina; 21. naringina; 31. carquejona; 32. (*Z*)-éster de lachnophyllum.

Cuando se observa la estructura de los compuestos que presentaron actividad modificando el patrón de bandas proteicas del veneno por SDS-PAGE, se constata que todas las estructuras presentan como característica un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado (conjugado) (Figuras 21 y 22). Particular destaque merece el caso del (*Z*)-éster de lachnophyllum, en cuya estructura el grupo carbonilo forma parte de una función éster  $\alpha,\beta$ -conjugada, teniendo una muy buena actividad alexitérica como se reportó anteriormente. Sin embargo, la  $\alpha$ -ionona (compuesto 5) si bien presenta dicha característica estructural no exhibió actividad (Figura 21), lo que puede deberse a que la misma tenga una concentración umbral de acción mayor a la concentración

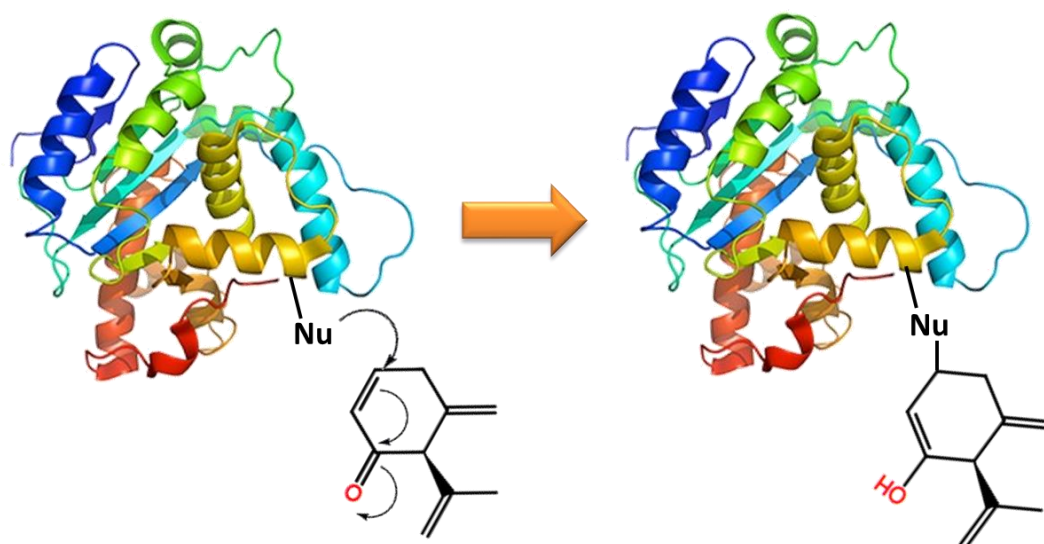




evaluada para interactuar apreciablemente con las proteínas del veneno, o a impedimentos estéricos de los grupos metilo más próximos al doble enlace (Figura 22).

Por otra parte, la sólo presencia del grupo carbonilo en las estructuras no generó ninguna actividad (Figuras 21 y 22). Si bien la quercetina (compuesto **20**) presenta la característica estructural de un grupo carbonilo  $\alpha,\beta$ -conjugado, también presenta como sustituyente del doble enlace un grupo hidroxilo, lo que puede conspirar contra una adecuada interacción con el veneno (además del impedimento estérico que constituye la estructura flavonoide) (Figuras 21 y 22). Ninguno de los azúcares evaluados (glucosa, manosa, ramnosa) ni la semicarbazona de la piperitona presentaron actividad (Figura 21).

Basado en los datos presentados anteriormente, se postuló un posible mecanismo de acción en que un grupo nucleófilo de las proteínas (como por ejemplo residuos de tirosina, serina, cisteína, ácido glutámico o aspártico) pueda realizar un ataque al doble enlace conjugado a carbonilo del tipo adición de Michael (**Carey, 2008**), de manera que la proteína quede “complejada” o “bloqueada” y no pueda ejercer su acción (formación de aductos) (Figura 23). Indudablemente para confirmar ésta hipótesis deben realizarse más ensayos con las proteínas aisladas, y con modificaciones sintéticas dirigidas en los ligandos carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturados, para dilucidar los requisitos específicos de la actividad. Otra opción es realizar modelado molecular por cálculos computacionales a partir de la estructura del sitio activo de las diferentes enzimas del veneno.



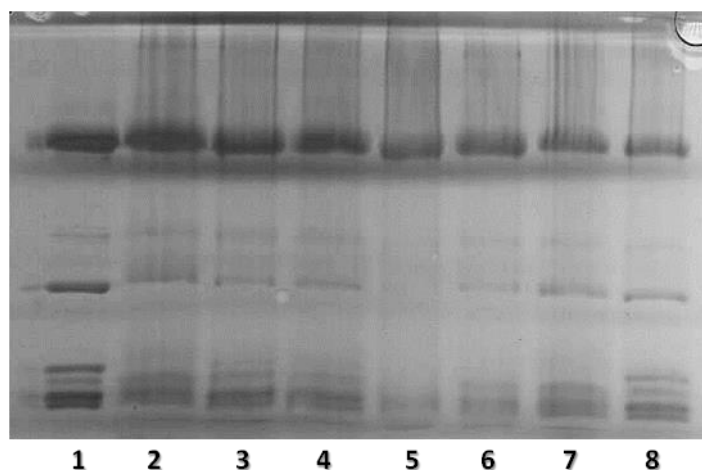
**Figura 23:** Hipotético mecanismo de acción alexitérica en que un grupo nucleófilo (Nu) de una proteína del veneno de *B. diporus* que podría atacar el ligando carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado produciendo un “bloqueo” con la



consiguiente pérdida de la actividad (formación de aducto). Notas: la proteína del esquema es sólo un ejemplo y no es específica del veneno, y dicho esquema no se encuentra a escala molecular.

### 3.3.3 Actividad contra el veneno de *B. alternatus*

Finalmente, aquellas fracciones y compuestos puros que presentaron mayor actividad en las pruebas *in-vitro* contra el veneno de *B. diporus* (“yará chica”) fueron seleccionados para realizar un ensayo de *screening* de actividad mediante *SDS-PAGE* contra el veneno de *B. alternatus* (“yará grande”) (Figura 24). Como en el caso del veneno de *B. diporus*, todas las muestras resultaron activas modificando el perfil de bandas proteicas del veneno, teniendo mayor destaque el caso de la carquejona que produjo el característico “borrado” de bandas (carril 5, Figura 24).



**Figura 24:** Geles de SDS-PAGE para compuestos puros y su interacción con el veneno de *B. alternatus* (“yará grande”). Referencias: **1.** veneno (V); **2.** extracto etanólico (maceración) de *B. dracunculifolia* + V; **3.** extracto etanólico (maceración) de *B. dentata* + V; **4.** extracto etanólico (maceración) de *B. punctulata* + V; **5.** carquejona + V; **6.** (Z)-éster de *lachnophyllum* + V; **7.** extracto en AcOEt (Soxhlet) de *B. articulata* + V; **8.** extracto en AcOEt (Soxhlet) *B. trimera* + V.

Estos resultados confirman la potencialidad de los extractos seleccionados de *Baccharis* spp. para inhibir los efectos del veneno de *Bothrops* sp., así como reafirman la actividad alexitérica de la carquejona y del (Z)-éster de *lachnophyllum* en modelos *in-vitro*.

## 4 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El estudio de bioactividad de los extractos de *Baccharis* spp. permitió obtener algunos de importante actividad antiradicalaria como por ejemplo para los etanólicos de *B. punctulata*, *B.*



*trimera* y *B. dracunculifolia*, y los acuosos de ésta última especie. El carquejifenol y el (Z)-éster de lachnophyllum presentaron cierta actividad antiradicalaria aunque menor a la de los controles positivos volátiles analizados (eugenol y carvacrol). Sin embargo, la actividad antiradicalaria del hidrolato de *B. dracunculifolia* fue del mismo orden que la del eugenol. Por otra parte, los extractos obtenidos mediante dispositivo de Soxhlet de *B. articulata* y *B. trimera* exhibieron muy buena actividad alexitérica. Sin embargo, los mejores resultados de neutralización del veneno de *Bothrops* sp. fueron obtenidos para los compuestos puros carquejona y (Z)-éster de lachnophyllum, lo que podría deberse a su estructura con grupos carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

## 5 BIBLIOGRAFIA

1. M.J. Abad, P. Bermejo. 2007. *Baccharis* (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7: 76-96.
2. R.P. Adams. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, 4<sup>th</sup> edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 804 pp.
3. G. Ares, C. Barreiro, A. Gámbaro. 2010. Evaluation of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: importance of sensory characteristics. *CyTA-J. Food*, 8: 201-207.
4. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar. 2008. Biological effects of essential oils. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 446-475.
5. A. Bandoni (ed.). 2000. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina. 410 pp.
6. P. Bernard, T. Scior, B. Didier, M. Hibert, J.Y. Berthon. 2001. Ethnopharmacology and bioinformatic combination for leads discovery: application to phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors. *Phytochemistry*, 58: 865-874.
7. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. u. Technol.*, 28: 25-30.
8. J.M. Budel, M. Wang, V. Raman, J. Zhao, S.I. Khan, J.U. Rehman, N. Techen, B. Tekwani, L.M. Monteiro, G. Heiden, I.J.M. Takeda, P.V. Farago, I.A. Khan. 2018. Essential oils of five *Baccharis* species: investigations on the chemical composition and biological activities. *Molecules*, 23, 2620: pp. 1-19.
9. S. Bustillo, H. Lucero, L.C. Leiva, O. Acosta, E.B. Kier Joffé, J.O. Gorodner. 2009. Citotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the Northeast of Argentina. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 15: 28-42.
10. F.R. Campos, J. Bressan, V.C.G. Jasinski, T. Zuccolotto, L.E. da Silva, L.B. Cerqueira. 2016. *Baccharis* (Asteraceae): Chemical Constituents and Biological Activities. *Chem. Biodiversity*, 13: 1-17.
11. M.I. Cáceres, G.A. Ricciardi, A.M. Torres, B.V. Ricciardi, S. Ferrero, E. Dellacassa. 2017. *In vitro* anti-snake venom activities of *Aloysia citriodora* Palau: New Possibilities for a Known Aromatic Plant. *J. Essent. Oil Bear. Plants*, 20: 132-140.
12. F. Camargo, A.M. Torres, G. Ricciardi, A. Ricciardi, E. Dellacassa. 2011. SDS-PAGE: una herramienta útil en la evaluación preliminar de la actividad alexitérica de extractos vegetales. *BLACPMA*, 10: 429-434.
13. F. A. Carey. 2008. Química orgánica. Sexta Edición. Mc Graw-Hill Interamericana, México D.F., México. 1421 pp.
14. S. Carreira, M. Meneghel, F. Achaval. 2005. Reptiles del Uruguay. Ed. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 640 pp.
15. V.X. da Silva, M.T. Rodrigues. 2008. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa*, 7: 45-90.
16. C.B. de Oliveira, L.N. Comunello, A. Lunardelli, R.H. Amaral, M.G.S. Pires, G.L. da Silva, V. Manfredini, C.R. Vargas, S.C.B. Gnoatto, J.R. de Oliveira, G. Gosmann. 2012. Phenolic enriched extract of *Baccharis trimera* presents anti-inflammatory and antioxidant activities. *Molecules*, 17: 1113-1123.
17. E. Dellacassa, A.M. Torres, G.A.L. Ricciardi, F.J. Camargo, S.G. Tressens, A.I.A. Ricciardi. 2014. Anti-venom activity of medicinal plants from South America. En: V.K. Gupta (ed.), Utilisation and management of medicinal plants. Vol. 2. Daya Publishing House, New Delhi, India; pp. 1-11.



18. J.A. dos Santos Gomes, J. Félix-Silva, J.M. Fernandes, J.G. Amaral, N.P. Lopes, E.S. Tabosa do Egito, A.A. da Silva-Júnior, S.M. Zucolotto, M.F. Fernandes-Pedrosa. **2016**. Aqueous leaf extract of *Jatropha mollissima* (Pohl) bail decreases local effects induced by Bothropic venom. *BioMed Res. Int.*, Article ID 6101742.
19. S. Dudonne, X. Vitrac, P. Coutière, M. Woillez, J.L. Mérillon. **2009**. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 57: 1768-1774.
20. S. Echeverría, E. Leiguez, C. Guijas, N.G. do Nascimento, O. Acosta, C. Teixeira, L.C. Leiva, J.P. Rodríguez. **2018**. Evaluation of pro-inflammatory events induced by *Bothrops alternatus* snake venom. *Chem. Biol. Interact.*, 281: 24-31.
21. V. L. Ferracini, L.C. Paraíba, H.L. Leitão Filho, A.G. da Silva, L.R. Nascimento, A.J. Marsaioli. **1995**. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. *J. Essent. Oil Res.*, 7: 355-367.
22. A.S.G. Figueiredo-Rinhel, L.M. Kabeya, P.C.P. Bueno, R.F. Jorge-Tiossi, A.E.C.S. Azzolini, J.K. Bastos, Y.M. Lucisano-Valim. **2013**. Inhibition of the human neutrophil oxidative metabolism by *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) is influenced by seasonality and the ratio of caffeic acid to other phenolic compounds. *J. Ethnopharmacol.*, 150: 655-664.
23. A.I. Floegel, D.O. Kim, S.J. Chung, S.I. Koo, O.K. Chun. **2011**. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.*, 24: 1043-1048.
24. C.D. Frizzo, L. Atti-Serafini, S.E. Laguna, E. Cassel, D. Lorenzo, E. Dellacassa. **2008**. Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* DC growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay. *Flavour Fragr. J.*, 23: 99-106.
25. C. Gay, L. Sanz, J.J. Calvete, D. Pla. **2016**. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops diporus*, a medically important Pitviper in Northeastern Argentina. *Toxins*, 8: 1-13.
26. M.A. Gómez, I. Miguez, M. Caggiani, X. Arias, M. Laprovitera, F. Blanco, M.V. Cesio, E.R. Migliaro. H. Heinzen. **2016**. Vasorelaxant effect of a *Baccharis trimera* infusion on precontracted rat aortic rings. *Nat. Prod. Comm.*, 11: 283-286.
27. M.D. González, C.M. Luis. **2018**. Estudio químico de *Baccharis punctulata* DC. *Dominguezia*, 34: 31-36.
28. M.D. González. **2019**. Chemical composition of the leaf oil from *Baccharis punctulata* DC. at two phenological stages. *J. Essent. Oil Res.*, in press. DOI: 10.1080/10412905.2019.1612472.
29. N.S.S. Guimarães, J.C. Melo, J.S. Paiva, P.C.P. Bueno, A.A. Berretta, R.J. Torquato, I.L. Nantes, T. Todrigues. **2012**. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food Chem. Toxicol.*, 50:1091-1097.
30. G. Heiden, J.R. Vieira Iganci, V.L. Bobrowski, L. Macias. **2007**. Biogeografia de *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rodriguésia*, 58:787-796.
31. A.H. Janúario, S.L. Santos, S. Marcussi, M.V. Mazzi, R.C.L.R. Pietro, D.N. Sato, J. Ellena, S.V. Sampaio, S.C. França, A.M. Soares. **2004**. Neo-clerodane diterpenoid, a new metalloprotease snake venom inhibitor from *Baccharis trimera* (Asteraceae): anti-proteolytic and anti-hemorrhagic properties. *Chem. Biol. Int.*; 150: 243-251.
32. R. Kohen, A. Nyska. **2002**. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxic. Path.*, 30: 620-650.
33. I.I. Koleva, T.A. van Beek, J.P.H. Linssenn, A de Groot, L.N. Evstatieva. **2002**. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytochem. Anal.*, 13: 8-17.
34. L.L. Mensor, F.S. Menezes, G.G. Leitão, A.S. Reis, T.C. dos Santos, C.S. Coube, S.G. Leitão. **2001**. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the use of DPPH Free Radical Method. *Phytoter. Res.*, 15: 127-130.
35. V.E. Moreira, C.M. Gasparetto, L.A. Chibli, G.D.V. Vieira, O.B. de Sousa. **2012**. Teores de fenóis totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante de *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae). *HU Revista*, 38: 45-51.
36. W.B. Mors, M.C. Nascimento, B.M. Ruppelt Pereira, N.Alvares Pereira. **2000**. Plant natural products active against snakebite—the molecular approach. *Phytochemistry*, 55: 627–642.
37. P. Molyneux. **2004**. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26: 211-219.
38. L.V. Muschietti, V.S. Martino. **2009**. Atividades biológicas dos flavonóides naturais. Em: R.S. Yunes, V. Cechinel Filho (eds.): Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna Farmacognosia. Editorial Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, Brasil; pp. 191-218.
39. O.C. Nunes, C.M. Jamal, R.R. Kitagawa, R.C.R. Gonçalves. **2016**. Anti-*Helicobacter pylori* effect of the antioxidant extract from *Baccharis trimera* (Less.) DC. *Int. J. Phytomed.*, 8: 472-481.
40. M. Öhler, D. Georgiev, J. Seifert, M. von Bergen, R.K. Arni, N. Genov, C. Betzel. **2010**. The venomomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. *J. Proteome Res.*, 9: 2422-2437.



41. K.B. Pandey, S.I. Rizvi. **2009**. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2: 270-278.
42. N.A. Parreira, L.G. Magalhães, D.R. Morais, S.C. Caixeta, J.P.B. de Sousa, J.K. Bastos, W.R. Cunha, M.L.A. Silva, N.P.D. Nanayakkara, V. Rodrigues, A.A. da Silva Filho. **2010**. Antiprotozoal, schistosomicidal and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *Chem. Biodiversity*, 7: 993-1001.
43. M.A. Puertollano, G.A. de Cienfuegos, M.A. de Pablo. **2011**. Dietary antioxidants: immunity and host defense. *Curr. Top. Med. Chem.*, 11: 1752-1766.
44. C.L. Queiroga, A. Fukai, A.J. Marsaioli. **1990**. Composition of the essential oil of Vassoura. *J. Braz. Chem. Soc.*, 1:105-109.
45. C.L. Queiroga, J.K. Bastos, J.P.B. de Sousa, P.M. de Magalhães. **2008**. Comparison of the Chemical Composition of the Essential Oil and the Water Soluble Oil of *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae). *J. Essent. Oil Res.*, 20: 111-114.
46. B.V. Ricciardi-Verrastro, A.M. Torres, F.J. Camargo, E. Dellacassa. **2016**. Validación del uso tradicional de especies de *Asclepias* contra el veneno de *Bothrops diporus* (yará chica) en el Nordeste de Argentina. *BLACPMA*, 15: 112-121.
47. R.A. Ricco, I.J. Aguledo, M.L. Wagner. **2015**. Métodos empleados en el análisis de los polifenoles en un laboratorio de baja complejidad. *Lilloa*, 52: 161-174.
48. M.S.M. Rufino, R.E. Alves, E.S. de Brito, S.M. de Morais, C.G. Sampaio, J. Pérez-Jiménez, F.D. Saura-Calixto. **2007**. metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico *on-line* 127, EMBRAPA, Fortaleza, Brasil. 4 pp.
49. C. Sánchez-Moreno, J.A. Larrauri, F. Saura-Calixto. **1998**. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agr.*, 76: 270-276.
50. T. Sartor, V.B. Xavier, M.A. Falcão, C.A. Mondin, M.A. dos Santos, E. Cassel, L.V. Astarita, E.R. Santarem. **2013**. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. *Ind. Crops Prod.*, 51: 355-359.
51. K.M. Schaich, X. Tian, J. Xie. **2015**. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: a critical evaluation of ABTS, DPPH and ORAC assays. *J. Funct. Foods*, 14: 111-125.
52. P. Schossler, G.L. Schneider, D. Wunsch, G.L.G. Soares, C.A. Zini. **2009**. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20: 277-287.
53. A.M. Soares, F.K. Tieli, S. Marcussi, M.V. Lourenço, A.H. Januário, S.V. Sampaio, J.R. Giglio, B. Lomonte, P.S. Pereira. **2005**. Medicinal plants with inhibitory properties against snake venoms. *Curr. Med. Chem.*, 12: 2625-2641.
54. H. Soicke, E. Leng-Peschlow. **1987**. Characterization of Flavonoids from *Baccharis trimera* and their anti-hepatotoxic properties. *Planta Med.*, 53: 37-39.
55. A.C.N. Sobrinho, E.B. de Souza, M.F.G. Rocha, M.R.J.R. Albuquerque, P.N. Bandeira, H.C. dos Santos, C.S. de Paula Calvacante, S.S. Oliveira, P.R. Aragão, S.M. de Morais, R.O. dos Santos Fontenelle. **2016**. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). *Ind. Crops Prod.*, 84: 108-115.
56. A. Tapia, J. Rodríguez, C. Theoduloz, S. Lopez, G.E. Feresin, G. Schmeda-Hirschmann. **2004**. Free radical scavengers and antioxidants from *Baccharis grisebachii*. *J. Ethnopharmacol.*, 95: 155-161.
57. A.M. Torres, F.J. Camargo, G.A.L. Ricciardi, A.I.A. Ricciardi, E. Dellacassa. **2011**. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Nat. Prod. Comm.*; 6: 1393-1396.
58. A.M. Torres, F.J. Camargo, G.A.L. Ricciardi, A.I.A. Ricciardi, E. Dellacassa. **2014**. *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez.: phytochemical characterization and neutralizing effect on *Bothrops diporus* snake venom. *J. Essent. Oil Res.* 26: 197-203.
59. A.M. Torres, F. Camargo, B.V. Ricciardi-Verrastro, G. Ricciardi, E. Dellacassa. **2015**. Plantas como antiveneno: del mito al logos. Unidad de Comunicación de la Universidad de la República (UCUR), Montevideo, Uruguay. 106 pp.
60. T.O. Vieira, I. Seifriz, C.C.T. Charão, S.Q. de Oliveira, T.B. Creczynski-Pasa. **2011**. Antioxidant effects of crude extracts from *Baccharis* species: inhibition of myeloperoxidase activity, protection against lipid peroxidation, and action as oxidative species scavenger. *Braz. J. Pharmacogn.*, 21: 601-607.
61. V.B. Xavier, R.M.F. Vargas, E. Cassel, A.M. Lucas, M.A. Santos, C.A. Mondin, E.R. Santarem, L.V. Astarita, T. Sartor. **2011**. Mathematical modelling for extraction of essential oil from *Baccharis* spp. by steam distillation. *Ind. Crops Prod.*, 33: 599-604.
62. J.D. Yeo, F. Shahidi. **2019**. Critical re-evaluation of DPPH assay: Presence of pigments affects the results. *J. Agric. Food Chem.*, in press; DOI: 10.1021/acs.jafc.9b02462.
63. J. Xie, K.M. Schainch. **2014**. Re-evaluation of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical (DPPH) assay for antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 62: 4251-4260.



## Capítulo 11

### Conclusiones Finales

- 1. CAPÍTULO 3.** Se obtuvieron perfiles de composición volátil diferenciales de *Baccharis uncinella* (modelo de trabajo) aplicando diferentes metodologías extractivas sobre sus partes aéreas: destilación con arrastre por vapor en escala de laboratorio y piloto (*LSD* y *PSD*), extracción-destilación simultáneas (*SDE*) y extracción con CO<sub>2</sub> supercrítico (*SFE*). La técnica de *SDE* permitió extraer la mayor cantidad de metabolitos volátiles de la matriz vegetal (129; en su mayoría componentes terpénicos), por lo que se seleccionó como metodología modelo para estudios ulteriores del volatiloma de *Baccharis* spp. Mediante la metodología de *SFE* fue posible la identificación de metabolitos que no fueron detectados mediante las otras técnicas extractivas: óxidos de  $\alpha$ -pineno y limoneno, acetato de carquejilo, (*Z*)-tuyona, alcanfor, verbenona, e hidrocarburos sesquiterpénicos del tipo poliquineno, entre otros; los que podrían degradarse en las condiciones de *LSD*, *PSD* y *SDE*.
- 2. CAPÍTULO 4.** Mediante *SDE/GC-MS* se caracterizó el volatiloma de partes aéreas de 19 especies de *Baccharis* L. (*B. articulata*, *B. crispa*, *B. cultrata*, *B. dentata*, *B. dracunculifolia*, *B. genistifolia*, *B. gibertii*, *B. gnaphalioides*, *B. linearifolia*, *B. microdonta*, *B. milleflora*, *B. ochracea*, *B. palustris*, *B. phyteumoides*, *B. punctulata*, *B. spicata*, *B. tridentata*, *B. trimera* y *B. uncinella*) en condiciones ambientales definidas de Uruguay y del sur de Brasil. Se pudieron identificar más de 250 componentes volátiles (muchos de ellos no reportados previamente para algunas de las especies) principalmente de la familia de los terpenos, lo que refleja la gran quimiodiversidad de éste género. Varios de los componentes identificados en alta proporción en los volatilomas presentan reportes en la literatura sobre aplicaciones farmacológicas y/o cosméticas relevantes, por lo que se confirmó el potencial medicinal y aromático de éste género. Se caracterizó por primera vez en la literatura la composición volátil de *B. cultrata*, *B. genistifolia*, *B. gibertii*, *B. gnaphalioides* y *B. palustris*. Asimismo, se diferenció el volatiloma de individuos masculinos y femeninos de *B. crispa*, *B. dracunculifolia*, *B. linearifolia* y *B. spicata*, encontrándose una alta similitud cualitativa y cuantitativa entre los mismos.



- 3. CAPITULO 5.** Dado el resultado previamente obtenido en cuanto a la similitud de los volatílicos de individuos masculinos/femeninos de *Baccharis* spp., se estudiaron las diferencias sexuales químicas de dos especies seleccionadas (*B. articulata* y *B. tridentata*) mediante técnicas cromatográficas no convencionales: *GC-O* (cromatografía gaseosa-olfatometría) y *eGC* (cromatografía gaseosa enantioselectiva). Por medio de *GC-O* se determinaron diferencias apreciables en el perfil aromático de ambos sexos de *B. articulata*, exhibiendo los extractos provenientes de individuos masculinos los odorantes más fuertes en número e intensidad. No obstante, no se apreciaron diferencias intersexuales en la distribución enantiomérica de los principales monoterpenos quirales de *B. tridentata* mediante *eGC*, incluyendo al acetato de bornilo aislado y estudiado separadamente. En forma paralela, también se realizó la identificación de los perfiles volátiles de ambas especies modelo por *GC-MS* y la cuantificación de los componentes principales por *GC-FID* (*B. tridentata*). A pesar de la similitud cualitativa constatada, se verificó la existencia de importantes diferencias cuantitativas para la mayoría de los componentes individuales de *B. tridentata*, lo que podría tener significado ecológico.
  
- 4. CAPITULO 6.** Se realizó un estudio estacional de la composición de los volatílicos de dos especies morfológicamente similares (*B. dracunculifolia* y *B. microdonta*) en poblaciones estables del sur de Uruguay (departamento de Canelones), realizando un monitoreo en paralelo de las variables agro-climáticas en el lugar de colecta. Los perfiles volátiles demostraron patrones de emisión anuales especie-específicos representados por los mismos componentes terpénicos principales, siendo constatadas diferencias a nivel cuantitativo entre ambas especies a lo largo del período de muestreo. Asimismo, cada especie presentó un patrón definido de distribución enantiomérica de sus monoterpenos quirales (obtenido por *eGC*), lo que puede ser de utilidad para la diferenciación química de las especies y para establecer estándares de genuinidad de ambas.
  
- 5. CAPITULO 7.** Se caracterizó morfo-anatómicamente un biotipo de *B. trimera* considerado como referencia para Uruguay, particularmente en cuanto a la distribución de los tejidos dermales, fundamentales y vasculares en cladodios y raíz (ésta última descrita por primera vez en la bibliografía). La mayoría de las características anatómicas de dicho biotipo coincidieron con reportes bibliográficos de



la especie, sin embargo la presencia de canales esquizógenos con epitelio secretor biestratificado descrita en éste trabajo constituye una información original. Los ensayos histoquímicos permitieron establecer el almacenamiento de aceites esenciales en tricomas glandulares, canales esquizógenos y células epidérmicas presentes en los márgenes de los cladodios; así como la presencia de compuestos polifenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos) en canales secretores y células epidérmicas. Mediante análisis del volatilo de la población de referencia y de otras poblaciones de *B. trimera* de Uruguay y del sur de Brasil fue posible identificar 193 componentes (de los cuales 118 no habían sido reportados para la especie, particularmente por la descripción original de derivados de estructura norisoprenoide), siendo el principal de ellos en cuanto a su abundancia el monoterpene irregular acetato de carquejilo. El enfoque estadístico quimiométrico realizado permitió posicionar a las poblaciones analizadas dentro de dos quimiotipos principales diferenciables por la presencia/ausencia del acetato de carquejilo en sus volatilos.

6. **CAPITULO 8.** Debido a la importancia del acetato de carquejilo descrita en el capítulo 7 y a su estructura irregular poco frecuente (esqueleto del *o*-mentano), se decidió estudiar su entorno químico-molecular para lo cual se aisló desde el aceite esencial de *B. trimera*, y se obtuvo derivados semi-sintéticos por medio de reacciones orgánicas clásicas: carquejol, carquejifenol, carquejona, *iso*-carquejona y óxido de carquejol. De los anteriores, los tres últimos no han sido reportados con anterioridad en la literatura química por lo que representa un aporte original. La elucidación estructural de cada uno de los compuestos fue realizada mediante un panel de métodos espectroscópicos (RMN 1D y 2D), MS, IR, Raman, UV y DC. Para el acetato de carquejilo, carquejol y carquejifenol se realizaron además estudios computacionales con el objetivo de predecir sus propiedades fisico-químicas en diferentes medios.
7. **CAPITULO 9.** Mediante técnicas espectroscópicas (RMN, MS, IR, y UV) se identificaron en el volatilo de *B. palustris* componentes mayoritarios C<sub>9</sub> poliacetilénicos no descritos previamente en la literatura: 1-nonen-3,5-diino, 1,7(*Z*)-nonadien-3,5-diino y 1,7(*E*)-nonadien-3,5-diino. Asimismo, se identificaron otros compuestos poliacetilénicos previamente descritos: 3,5-nonadiino, (*Z*)-éster de lachnophyllum y (*E*)-éster de lachnophyllum. La estructura de los componentes identificados permitió hipotetizar que el origen de todos ellos sería el (*Z*)-éster de





lachnophyllum mediante reacciones de hidrólisis, descarboxilación, desaturación e isomerización; lo que en consecuencia incrementaría la complejidad química del volatilo de *B. palustris*.

- 8. CAPITULO 10.** Se estudió el perfil de bioactividad antiradicalaria y alexitérica de extractos fijos y aceites esenciales de *Baccharis* spp. Se pudo identificar extractos con importante actividad antiradicalaria (alcohólicos de *B. punctulata*, *B. trimera* y *B. dracunculifolia*, y los acuosos de ésta última especie, particularmente su hidrolato) y alexitérica (alcohólicos y en acetato de etilo de *B. articulata* y *B. trimera*). Por otra parte, dos de los compuestos puros obtenidos [carquejifenol y (*Z*)-éster de lachnophyllum] presentaron cierta actividad antiradicalaria. En tanto, los mejores resultados de inhibición *in vitro* del veneno de *Bothrops* sp. fueron obtenidos para la carquejona y el (*Z*)-éster de lachnophyllum, lo que podría deberse a su estructura particular con grupos carbonilos  $\alpha,\beta$ -insaturados.

