



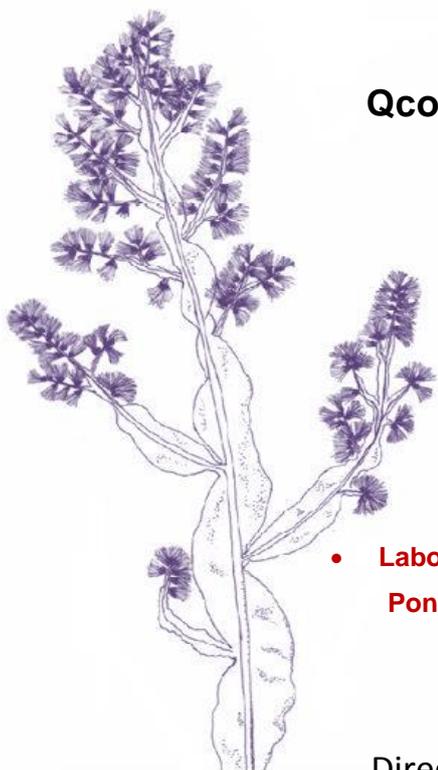
Estudio de la evolución de Baccharis sp. (Asteraceae) en situaciones ambientales definidas mediante la expresión de sus metabolitos volátiles.

Evaluación de actividades biológicas de especies seleccionadas.

Informe de Defensa Intermedia. Posgrado en Química, Plan 2004.

Período: Agosto 2011- Octubre 2013.

Qco. Manuel Minteguiaga Carbajal.



• **Cátedra de Farmacognosia y Productos Naturales.
Facultad de Química. Universidad de la República (FQ-UdelaR).
Montevideo, Uruguay.**

• **Laboratório de Operações Unitárias (LOPE). Faculdade de Engenharia.
Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (FENG-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).

1. INTRODUCCIÓN:

1.1 Metabolismo volátil, aromas y plantas aromáticas

Las plantas son organismos con un gran potencial de adaptación a las condiciones ambientales en que se desarrollan, lo que en gran medida depende de su restricción de movimiento. Esto les ha condicionado a valerse de un gran número de sustancias químicas para sus funciones básicas de supervivencia y preservación de la especie⁽¹⁾.

En fisiología vegetal es común distinguir entre dos tipos de metabolismo bien diferenciados: primario y secundario. El primero refiere a los procesos presentes en todos los vegetales (fotosíntesis, ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa, procesos de replicación, transcripción y traducción del material genético, etc.), mientras que el segundo involucra procesos biosintéticos restringidos y diferenciales al taxón considerado y a variaciones individuales^(1,2). El metabolismo secundario depende de las condiciones ambientales en las que se desarrolla y prospera el organismo, 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, altitud.)^(1,2).

El número de metabolitos secundarios, o productos naturales, aislados e identificados es enorme, incluyendo diferentes grupos biosintéticos: policétidos, terpenos, fenilpropanoides, flavonoides, alcaloides, compuestos alifáticos derivados de ácidos grasos⁽³⁾. Los metabolitos secundarios que forman parte del metabolismo volátil son los llamados compuestos orgánicos volátiles biogénicos (COVBs). Los mismos son compuestos de bajo peso molecular y alta presión de vapor, lo que los hace analitos ideales para el análisis por cromatografía de gases (GC). Derivan biosintéticamente de las rutas de los terpenos (principalmente mono y sesquiterpenos), fenilpropanoides, norisoprenoides y los llamados “volátiles de hoja verde” (VHVs) que se generan a partir de ácidos grasos como consecuencia del daño en las estructuras foliares⁽⁴⁾. Algunos COVBs presentan la particularidad de interactuar con receptores del epitelio nasal, generando la percepción sensorial de aroma⁽⁵⁾. Una medida de este efecto se logra mediante la aplicación de la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O). En esta metodología se cuenta con un panel de jueces sensoriales entrenados que, a tiempo real, describen los aromas que perciben a la salida de la columna cromatográfica⁽⁶⁾. La GC-O es una herramienta útil para evaluar la potencialidad de un extracto volátil, ya que permite identificar entre todos los componentes volátiles aquellos que son sensorialmente activos.

En general, todas las plantas pueden emitir COVBs a la atmósfera, aunque sólo sea bajo la forma de VHV^s(⁴). Sin embargo, aquellas plantas que poseen la particularidad de acumular COVBs altamente aromáticos como mezclas líquidas en estructuras glandulares (tricomas o pelos, canales o tubos oleíferos y células modificadas del parénquima foliar), son conocidas como plantas aromáticas. Dichas mezclas, en general complejas, se encuentran constituidas hasta por 200 o más componentes y son conocidas como aceites esenciales (AEs)⁽¹⁻³⁾. La flora aromática está constituida por plantas pertenecientes a una variedad de familias botánicas que incluyen Asteraceae, Lamiaceae, Verbenaceae, Rutaceae, Piperaceae, Lauraceae, Myrtaceae y Apiaceae⁽⁷⁾. Las plantas aromáticas constituyen la base de una industria catalogada como no tradicional (industria esenciera), que se caracteriza por la obtención de aromas, sabores, fragancias y productos naturales diversos para su aplicación en la industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica, así como en la agricultura^(3,5,7).

1.2 Quimiotaxonomía y quimiotipos

La utilización de la química de productos naturales como herramienta para la clasificación botánica data desde fines del siglo XIX⁽⁸⁾. La base de la clasificación es que una química parecida es consecuencia de un complejo enzimático semejante, lo cual indica en última instancia un genoma similar⁽¹⁾. Es por ello que las plantas pueden clasificarse en categorías por el estudio de su química secundaria, lo que se conoce como quimiotaxonomía. A pesar de ello, la química de los productos naturales puede ir un paso más allá, ya que puede agrupar a las plantas en quimiotipos, los que son definidos como grupos de individuos dentro de una especie que difieren por su perfil químico de otros individuos de la misma especie⁽⁸⁾. Ello implica que tanto a nivel anatomorfológico como genético ambos tipos de individuos son indistinguibles, por lo que la clasificación en quimiotipos no tiene carácter taxonómico aunque sí significado ecológico.

1.3 Extracción de COVBs

Los métodos empleados para la extracción de COVBs son variados e incluyen: procesos de extracción con solventes y destilación; técnicas de muestreo de “espacio de cabeza” (*headspace techniques*); extracción en fase sólida y extracción por fluidos supercríticos⁽⁹⁾.

De las técnicas citadas, la empleada tradicionalmente para la obtención de los volátiles de plantas es la destilación con arrastre por vapor (DAV), la que es además la técnica de referencia de la industria. Esta metodología aprovecha el vapor de agua producido en una fuente externa

(caldera) para “arrastrar” los COVBs a una temperatura menor que las de sus puntos de ebullición y que la del agua misma, existiendo posteriormente una etapa de separación por condensación⁽⁹⁾. De ésta última etapa se obtiene el agua impregnada en compuestos aromáticos (hidrolato) y el AE puro. En escala de trabajo de laboratorio, es usual utilizar la llamada “trampa de Clevenger” (Figura 1a) para la obtención de AEs por DAV.

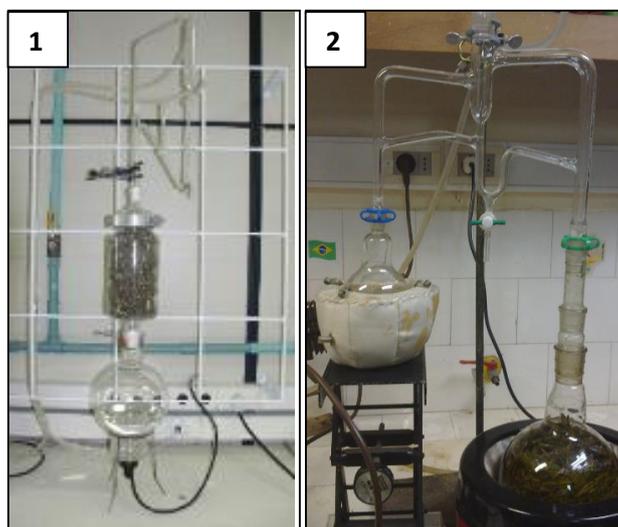


Figura 1: a) Sistema de destilación con arrastre por vapor en condiciones de laboratorio: trampa de Clevenger y b) dispositivo de EDS (Likens-Nickerson).

En la técnica de extracción-destilación simultáneas (EDS) se emplea la hidrodestilación (arrastré por vapor cuando el material vegetal se coloca sumergido en agua) de los COVBs desde la matriz vegetal hasta la etapa de condensación, donde los mismos son transferidos (extraídos) a un solvente orgánico en ebullición⁽⁹⁾. La técnica se vale de un dispositivo llamado de Likens-Nickerson (figura 1b), el que posee dos brazos, a cada uno de los cuales se adosa un balón con muestra (material vegetal en agua) y el otro con solvente de extracción. Ambos balones se someten a calentamiento hasta ebullición, de manera que sus vapores condensen juntamente a través de un refrigerante colocado en la parte superior del dispositivo. En la parte central del mismo se produce una separación de fases (orgánica/acuosa), resultando en que la fase orgánica se enriquece en los COVBs. Este sistema presenta como ventaja respecto a la extracción con trampa de Clevenger, una menor pérdida de componentes medianamente solubles o miscibles en agua (los que generan el hidrolato) o muy volátiles (que se pierden con la trampa de Clevenger) por la disolución de los mismos en el solvente de extracción⁽⁹⁾. La técnica de EDS formalmente permite obtener un extracto volátil de los COVBs y no un AE.

Los fluidos supercríticos son sustancias que sometidas a temperaturas y presiones superiores a las del punto crítico, adquieren propiedades mixtas entre gases y líquidos; lo cual es empleado como fundamento para la extracción con fluidos supercríticos (EFS)⁽¹⁰⁾. Ésta 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 solventes son mejores que los gases o líquidos por separado⁽¹⁰⁾. La baja viscosidad del fluido permite una rápida transferencia de masa para la mayoría de los fluidos, y la posibilidad de ingresar fácilmente en las partículas sólidas del material vegetal trozado, penetrando en las estructuras celulares y disolviendo compuestos que puedan encontrarse compartimentados. A pesar de que existen varios compuestos que pueden ser consideradas como solventes para EFS, en la práctica el CO₂ es el más conveniente no sólo por su baja temperatura y presión crítica (31,2°C; 73 bar) sino también por su falta de toxicidad, su disponibilidad en alta pureza, su bajo costo y su estabilidad química⁽¹⁰⁾. Adicionalmente, dado que en condiciones de temperatura y presión ambiente el CO₂ es un gas, es muy fácil la separación del mismo del extracto bruto, despresurizando el sistema para que el gas se disperse en la atmósfera y deje un residuo resinoso (llamado concreto). La baja polaridad del CO₂ supercrítico permite la extracción de compuestos lipofílicos (particularmente COVBs), aunque el poder solvente puede ser modificado por ajustes de presión y temperatura, con lo cual se amplía el rango de extracción a flavonoides, alcaloides, cumarinas, ácidos fenólicos, etc. La selectividad de extracción también se puede lograr por la adición de modificadores (generalmente solventes como ciclohexano, metanol, etc.)⁽¹⁰⁾.

1.4 El género *Baccharis*: dioicismo y quimiodiversidad

Baccharis es el género más numeroso perteneciente a la familia Asteraceae, con más de 500 especies distribuidas a lo largo de todo el continente americano⁽¹¹⁾. La mayor diversidad se encuentra presente en países de clima cálido como es el caso de Brasil, Colombia, Argentina y México, con dos centros de distribución bien definidos: la región centro-sur de Brasil y los Andes⁽¹²⁾. El género incluye plantas herbáceas perennes, arbustos, arbustos trepadores y hasta pequeños árboles. Una de las características notables del género es que está compuesto por plantas dioicas, es decir, con ejemplares masculinos y femeninos separados⁽¹²⁾.

Varias plantas del género tiene uso etnomedicinal, bajo la forma de decocciones e infusiones para el tratamiento de heridas, úlceras, fiebre, diabetes y desórdenes intestinales⁽¹¹⁾. Al género pertenece la “carqueja” (*Baccharis trimera*), la que ha sido ampliamente reconocida como

planta medicinal y aceptada como oficial por las farmacopeas argentina y brasileña ⁽¹²⁾. Sin embargo, la identificación taxonómica inequívoca de la misma es dificultosa, ya que son reconocidas varias especies de “carquejas”, lo que ha justificado el empleo del término “complejo *Baccharis trimera*”^(12,13). Las carquejas se clasifican dentro de la sección Caulopterae, la que se caracteriza por poseer individuos con tallos trialados⁽¹²⁾.

En cuanto a la fitoquímica de *Baccharis*, el género es muy rico en productos naturales terpénicos; además de compuestos polifenólicos como flavonoides, cumarinas y derivados fenólicos simples⁽¹¹⁾. Dentro de los compuestos terpénicos, son bastante ubicuos en el género los monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀) y triterpenos (C₃₀)⁽¹¹⁾.

1.5 Avance del Trabajo de Tesis

En éste trabajo se presentan una descripción de los estudios realizados hasta el momento sobre el metabolismo volátil de *Baccharis* desde diferentes abordajes: bioprospección, estudios de métodos de extracción, diferenciación química macho-hembra, búsqueda de quimiotipos y estudio del potencial aromático

2. MATERIALES Y MÉTODOS:

2.1 Colecta del material vegetal

El material vegetal estudiado fue colectado en diversos lugares, los que incluyen: Reserva Pró-Mata (São Francisco de Paula, RS, Brasil), Santa María (RS, Brasil), Estación Porvenir (Paysandú), Los Cerrillos (Canelones), Antoniópolis (Rocha), Quebrada de los Cuervos (Treinta y Tres) y Salto (Salto); procurando abarcar diferentes condiciones ambientales. El material vegetal fue secado en condiciones controladas, y muestras representativas del mismo fueron herborizadas en los herbarios de la Facultad de Química, Facultad de Agronomía y en el herbario de la PUCRS (Porto Alegre, RS, Brasil). El material vegetal fue secado en condiciones controladas por un período de 20-25 días bajo sombra hasta el momento en que se realizó la extracción. A continuación se detallan las especies trabajadas junto a su estado fisiológico al momento de colecta: *B. dracunculifolia* (floración), *B. trimera* (floración), *B. milleflora* (vegetativo), *B. uncinella* (floración), *B. tridentata* (floración), *B. articulata* (floración), *B. gibertii* (vegetativo), *B. genistifolia* (vegetativo), *B. gnaphalioides* (vegetativo), *B. palustris* (vegetativo), *B. crispa* (floración), *B. ochracea* (vegetativo), *B. cultrata* (vegetativo), *B. rufescens* (floración) y *B. spicata* (floración).

2.2 Extracción de los COVBs

Destilación con arrastre por vapor (DAV): Estos experimentos fueron realizados únicamente para *B. uncinella*. Para la extracción en condiciones de laboratorio con trampa de Clevenger, se colocaron 200 g del material vegetal finamente trozado en un lecho uniformemente empacado (figura 1). Para las condiciones de extracción a escala piloto fue empleado un dispositivo presente en el LOPE-PUCRS, en el cual el vaso extractor fue llenado uniformemente con 550 g de material vegetal. En ambos casos el vapor fue generado externamente en caldera, pasándose a través de los vasos extractores. El volumen de AE obtenido fue medido en los brazos graduados de los dispositivos cada 5 minutos hasta 3 medidas constantes, calculándose el rendimiento como volumen de AE por kg de material vegetal. Con dichas medidas fueron elaboradas curvas de extracción. El tiempo total de extracción fue en todos los casos menor a una hora y media. Los AEs fueron almacenados bajo refrigeración para posteriores análisis.

Extracción-Destilación Simultáneas (EDS): Para cada uno de los experimentos se colocaron 120 g de material vegetal trozado finamente sumergido en agua en el balón de muestra (ver figura 1), y 90 mL de n-hexano en el balón de solvente de extracción. El tiempo de extracción efectivo (desde que ambos solventes se encontraron en ebullición) se optimizó en 120 minutos. El extracto de COVBs fue posteriormente evaporado a vacío en condiciones suaves, obteniéndose un concentrado que se almacenó bajo refrigeración para posteriores análisis.

Extracción con Fluidos Supercríticos (EFS): Al igual que los experimentos de arrastre con vapor, la EFS fue realizada únicamente para muestras de *B. uncinella*. El equipo con que se trabajó fue diseñado y montado en el LOPE-PUCRS. El material vegetal pulverizado fue secado en estufa y se controló que previo a la extracción la humedad fuese menor al 10%. En el vaso de extracción fueron colocados 130 g de material vegetal, y el mismo se lo sometió a extracción con CO₂ supercrítico a 40°C y 80 bar, con un flujo de CO₂ a través del sistema de 1.0 mL/min. Luego de pasar por el vaso extractor, el CO₂ fue conducido hacia una cámara de despresurización, donde al final quedó un concreto muy aromático y resinoso. El CO₂ gaseoso, antes de liberarse a la atmósfera, se hizo barbotar en un recipiente con ciclohexano, de manera que los COVBs más volátiles se disolvieran en el mismo (obteniendo el residuo de extracción). El concreto fue posteriormente disuelto en ciclohexano, y junto al residuo fueron refrigeradas hasta análisis químico. Para EFS también fue realizada la curva de extracción del proceso, pesando la masa del recipiente con concreto cada 10 minutos hasta 3 medidas constantes, lo que insumió 160 minutos.

2.3 Análisis químico

El análisis químico de los extractos hexánicos volátiles y AEs obtenidos se realizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en dos columnas de diferente polaridad: polar (polietilenglicol) y apolar (5 % difenil-95 % dimetilpolisiloxano). La identificación de los compuestos fue realizada por comparación de espectros de masas con bibliotecas comerciales⁽¹⁴⁾ (NIST, Wiley, Adams) y por cálculo de índice de retención lineal de Kovats (IRL) mediante la inyección de una solución de una serie homóloga de hidrocarburos lineales (C₉-C₂₆). La cuantificación en todos los casos fue realizada por normalización de áreas.

El análisis apolar fue realizado en un GC Agilent 7890A acoplado a un MS Agilent 5975C VL. El volumen de inyección fue de 0.2 µL en modalidad Split (55:1). La fase móvil fue He (0.8 mL/min). La columna empleada fue una HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 25 µm i. d.). El programa de temperaturas empleado fue: 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 iones fue de 250°C, la temperatura de la interfase fue de 280°C. El análisis polar fue realizado en un GC-MS Shimadzu GC-17 acoplado a un Shimadzu QP 5050 MSD. El volumen de inyección fue de 0.2 µL en modalidad Split (25:1). La fase móvil fue He (1.2 mL/min). La columna empleada fue una DB-Wax (30 m x 0.25 mm x 25 µm i. d.). El programa de temperaturas empleado fue el siguiente: 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 iones e interfase fue establecida en 250°C. Ambos análisis de masas fueron realizados a 70 eV, y se empleó la metodología de SCAN en el rango de 40-400 u.m.a.

2.4 Análisis olfatométrico

Los análisis fueron efectuados en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-14B, acoplado a un puerto olfatométrico ODO-1 (SGE, Australia). La línea de transferencia fue mantenida a 250°C, al final de la cual se adosó un cono olfatorio ergonómico de vidrio. Las condiciones cromatográficas fueron las detalladas previamente para el análisis polar.

Para el análisis por GC-O fueron empleados extractos hexánicos volátiles de *B. articulata* y AE de *B. dracunculifolia*, ambas en floración. El material vegetal fue separado en individuos masculinos y femeninos, haciendo las extracciones de manera independiente. Para el trabajo en GC-O se contó con un panel de 5 jueces previamente entrenados. En cada una de las corridas los jueces puntuaron la intensidad aromática que percibieron (0-3), suministrando un descriptor del mismo, en base a familias de aromas⁽¹⁵⁾. A partir de la intensidad percibida (I) y teniendo

en cuenta la frecuencia de detección (F), se calculó la frecuencia modificada (FM), según la siguiente fórmula ⁽¹⁵⁾: $FM = [F (\%) * I (\%)]^{(1/2)}$.

Con los datos de FM se pudieron identificar los componentes sensorialmente activos para los especímenes masculinos y femeninos.

3. RESULTADOS:

3.1 Bioprospección química volátil

Para la bioprospección de la química volátil del género se tomó como modelo la metodología EDS, ya que la misma ha demostrado ser la técnica de extracción de COVBs de laboratorio más representativa de la composición real en diferentes matrices biológicas⁽⁹⁾. De los experimentos de extracción y análisis de COVBs realizados hasta el momento, se han identificado más de 200 compuestos, principalmente de naturaleza terpenoide, fenilpropanoide y VHV. El análisis por GC-MS de los extractos de EDS ha demostrado ser altamente dificultoso debido al elevado número de sustancias presentes, así como a la posibilidad de co-eluciones. Lo anterior determina que el porcentaje de identificación usual sea del orden del 70-80 %, habiéndose registrado casos (por ejemplo para *B. genistifolia*, *B. gnaphalioides*, *B. palustris*, *B. spicata* y *B. ochracea*) con componentes mayoritarios (cerca del 20 % del área total en el cromatograma) no identificados según sus espectros de masas. Para la identificación de los mismos se deberá realizar aislamiento y aplicar otras técnicas de elucidación estructural (RMN, IR, MS de alta resolución).

A continuación se presenta la composición agrupada de especies cuyo porcentaje de identificación fue superior al 90 %: *B. trimera*, *B. milleflora*, *B. tridentata*, *B. uncinella*. Dichas especies fueron colectadas en la misma fecha y en el mismo lugar (Reserva Pró-Mata), asegurando las mismas condiciones ambientales.

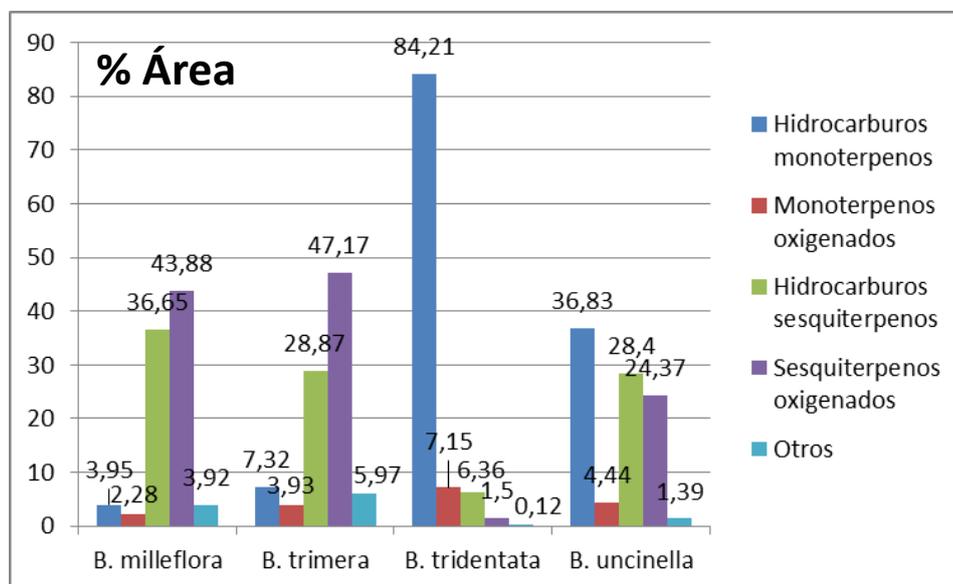


Figura 2: Gráfico de composición de acuerdo a agrupamiento por estructura química de sus compuestos para las 4 especies con % identificación superior al 90 %.

El perfil volátil de *B. tridentata* es simple, con sólo 44 compuestos identificados (99,34 % del área total en GC-MS), siendo los compuestos mayoritarios los hidrocarburos monoterpénicos α y β -pineno, y limoneno (46,7 %, 11,4 % y 14,1 %; respectivamente), lo que ha sido reportado previamente⁽¹⁶⁾. *B. uncinella*, presentó un perfil complejo con 127 compuestos (95,4 % de identificación) donde además de los monoterpenos α -pineno, β -pineno, y limoneno (11,7 %, 7,6 % y 8,6 % respectivamente), destaca el sesquiterpeno oxigenado espatulenol (10.2 %), lo que también es coincidente con datos bibliográficos⁽¹⁷⁾.

Como puede observarse en la Figura 2, las especies *B. milleflora* y *B. trimera* presentan una composición (agrupada en familia de compuestos) semejante, caracterizada por su riqueza en compuestos sesquiterpénicos. Lo mismo es coherente con la clasificación de las especies dentro de la misma sección infragenérica (Caulopterae)^(12,13). Para *B. trimera* fueron identificados 111 componentes (93,26 % de identificación), en donde la mayor proporción es de los sesquiterpenos oxigenados palustrol (20,0 %), espatulenol (8,5 %) y óxido de cariofileno (7,5 %). Por su parte, para *B. milleflora* se pudieron identificar 104 componentes (90,68 % de identificación) dentro de los cuales los de mayor proporción es de espatulenol (19,2 %), y el hidrocarburo sesquiterpénico germacreno D (8,0 %).

Es importante destacar que en la bibliografía, tanto para *B. trimera* como para *B. milleflora*, se han detectado grandes contradicciones en la composición para muestras del mismo lugar de colecta⁽¹⁸⁾, lo que podría indicar la presencia de quimiotipos distintos, identificaciones taxonómicas incorrectas o épocas de muestreo diferentes. Lo anterior ha demostrado ser particularmente importante para *B. uncinella*, con composición similar en otoño y primavera (época de floración) y grandes cambios para el período estival e invernal^(17,19). En época de floración se destaca la mayor producción de componentes oxigenados⁽¹⁷⁾, lo que puede tener valor para su empleo en perfumería. Lo anteriormente enunciado destaca el valor de hacer muestreos teniendo en cuenta la variación estacional en la composición, lo que en éste trabajo se ha venido haciendo para las especies *B. dracunculifolia* y *B. microdonta* (experimentos aún en curso).

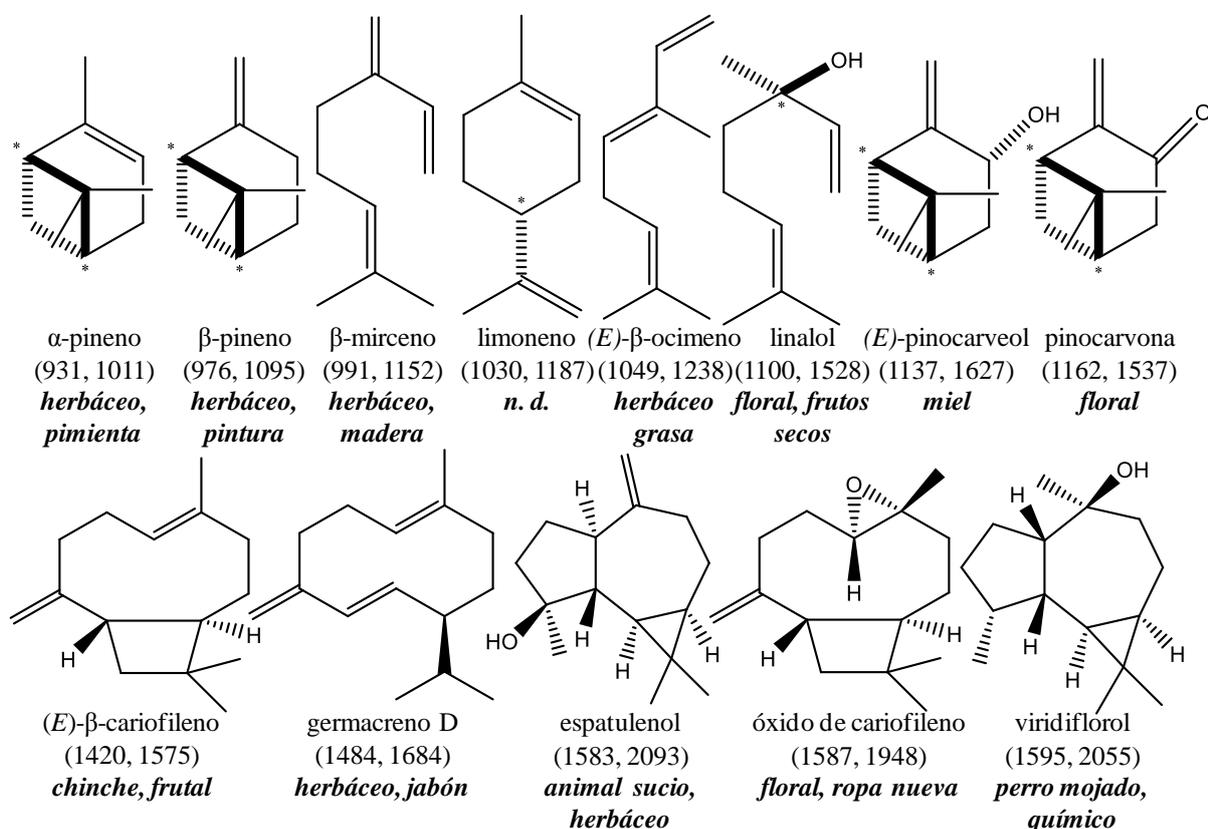


Figura 3: COVBs comunes a todas las especies de *Baccharis* estudiadas. Entre paréntesis se representan los IRL (Apolar, Polar), y en negrita la nota aromática asociada percibida en los experimentos de GC-O. n. d.: no detectado por GC-O.

Respecto de la identidad de los compuestos comunes identificados a todas las especies de *Baccharis*, en la Figura 3 se representan algunos de los mismos, junto a las notas aromáticas que los caracterizan de acuerdo a los experimentos de olfatometría (ver más adelante).

3.2 Influencia de la metodología de extracción sobre la composición volátil

De acuerdo a la comparación de las curvas de extracción (Figura 4) de las diferentes metodologías para *B. uncinella*, el rendimiento de DAV en escala de laboratorio es mayor que en la escala piloto (1,6 mL/kg vs. 1,2 mL/kg, respectivamente). Lo anterior ya ha sido observado⁽²⁰⁾ y se debe a la mejor distribución del vapor en el seno del material vegetal a menor escala (con un mejor empacamiento y mayor porosidad) y a que la relación solvente (vapor)/material vegetal en la escala de laboratorio es mayor, siendo con ello más eficaz la extracción. La forma de la curva de extracción fue la esperada según un trabajo previo sobre *B. uncinella*⁽¹⁹⁾, con dos tramos bien diferenciados:

1) lineal, en que se extraen los compuestos desde las estructuras glandulares (tricomas) destruidos de la matriz vegetal, y

2) exponencial, en que se extraen los compuestos desde los tricomas intactos.

De acuerdo a la densidad del AE de *B. uncinella* obtenido por hidrodestilación (0.915 g/mL⁽²¹⁾), el rendimiento a escala de laboratorio fue de 1.5 g/kg y en la escala piloto 1.1 g/kg (0.11-0.15 % p/p). Es decir que el rendimiento de la EFS fue menor, pero hay que tener en cuenta que su rendimiento fue subestimado, ya que sólo se consideró la masa de concreto y no la masa de residuo. Respecto de la forma del gráfico, la misma es semejante a la obtenida previamente para *B. trimera*⁽²²⁾.

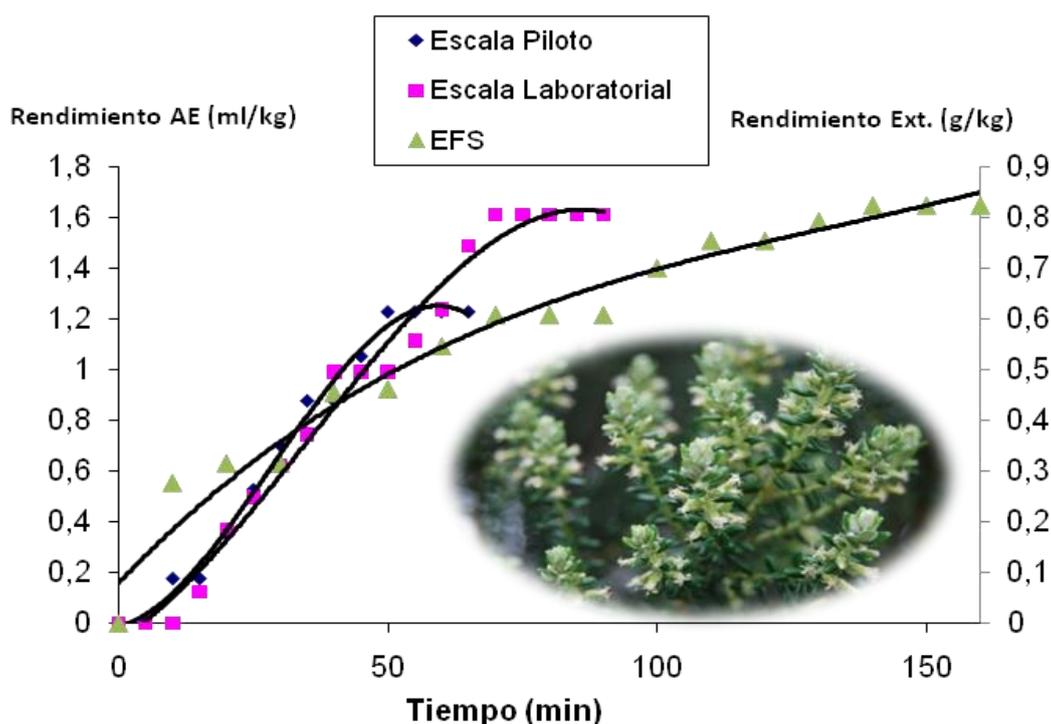


Figura 4: Curva de extracción de diferentes metodologías para la obtención de COVBs de *B. uncinella*.

Cuando se compara el perfil químico de los AEs obtenidos por DAV en las dos escalas (piloto y laboratorio) se observan diferencias cuantitativas entre ellas, con una tendencia general de aumento de la composición en hidrocarburos y disminución de los compuestos oxigenados para la escala piloto (Tabla 1). Dado que la calidad de un AE depende de la composición oxigenada (relacionado a notas aromáticas agradables), es perceptible que la calidad de un AE obtenido a escala piloto es menor que el obtenido en condiciones de laboratorio. Es importante recalcar que los AEs producidos en escala piloto, en general son más parecidos en cuanto a su composición a los AEs industriales que a los Aes obtenidos a escala de laboratorio.

Las diferencias entre los perfiles volátiles de DAV (tanto a escala piloto como de laboratorio) y EDS también son únicamente a nivel cuantitativo, observándose un aumento del 120 % en la

composición de monoterpenos oxigenados, aunque también se produce un aumento de los hidrocarburos monoterpénicos comparable al DAV piloto.

Grupo de compuestos	% Área DAV (l.)	% Área DAV (p.)	% Área EDS	% Área EFS (c.)	% Área EFS (r.)
Hidrocarburos monoterpénicos	36,5	46,3	42,0	1,5	22,6
Monoterpenos oxigenados	2,1	1,0	4,7	0,6	15,9
Hidrocarburos sesquiterpénicos	33,9	35,3	29,9	74,5	32,2
Sesquiterpenos oxigenados	22,9	14,3	21,6	21,2	10,0
Otros	4,6	3,1	1,8	2,2	19,3

Tabla 1: Composición relativa (% de área en GC-MS) de extractos de *B. uncinella* obtenidos por diferentes metodologías de extracción: destilación con arrastre por vapor en laboratorio (DAV l.), destilación con arrastre por vapor piloto (DAV p.), extracción-destilación simultáneas (EDS) y extracción supercrítica para concreto (EFS c.) y residuo (EFS r.).

Cuando se compara tanto DAV como EDS con EFS, existen notorias diferencias cualitativas y cuantitativas. Para el concreto de EFS hay un aumento en la proporción de los componentes hidrocarburos sesquiterpénicos y marcada disminución de ambos tipos de monoterpenos respecto de las metodologías de destilación. El residuo por su parte, presenta una mayor composición relativa de hidrocarburos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados que el concreto, lo que permite inferir que dichos compuestos (junto a algunos VHV) presentan una volatilidad tal que hace que los mismos se desprendan desde el concreto hacia el residuo cuando se produce la despresurización del CO₂. Es decir, habría un “arrastre” por el CO₂ gaseoso de dichos componentes, generando en el residuo una composición diferente al concreto obtenido en las mismas condiciones supercríticas.

Este comportamiento, para los componentes más volátiles en EFS, ha sido reportado previamente para *B. dracunculifolia*⁽²³⁾ extraída por EFS. Es importante remarcar que tanto en residuo como en el concreto se obtuvo la identificación de los monoterpenos: óxidos de pineno y de limoneno, tuyona, piperitona, entre otros; los que no se identificaron en DAV y EDS, los que pueden ser compuestos que se degraden por la acción de la temperatura en ambos procesos a ebullición, generando artefactos.

3.3 Dioicismo químico en *Baccharis* sp.

Como se ha indicado, *Baccharis* es un género caracterizado por la presencia de plantas dioicas. Hasta el momento se ha trabajado con 6 especies (*B. articulata*, *B. dracunculifolia*, *B. crispa*, *B. trimera*, *B. rufescens* y *B. spicata*) en las que en estado de floración se diferenció entre ejemplares masculinos y femeninos, y se hizo la extracción por EDS. En todos los casos la

composición de ejemplares masculinos y femeninos es semejante, encontrándose apenas diferencias cuantitativas.

Este comportamiento ya ha sido reportado para una variedad de especies⁽²⁴⁾. Sin embargo, existen trabajos dentro del género que contradicen dichos resultados, recalcando que los ejemplares femeninos traslocan más energía y recursos para la reproducción, por lo que deberían estar más defendidas por metabolitos secundarios volátiles ante el ataque de herbívoros y patógenos⁽²⁵⁾.

A modo de ejemplo de los resultados obtenidos en nuestro estudio, en la Figura 5 puede verse la similitud en los perfiles de GC-MS de los extractos de ejemplares masculinos y femeninos de *B. spicata* junto a la especie *B. ochracea*, la que resultó ser químicamente muy similar a pesar de ser clasificadas como especies dentro de diferentes secciones infragenéricas: Baccharis y Paniculatae respectivamente⁽¹³⁾.

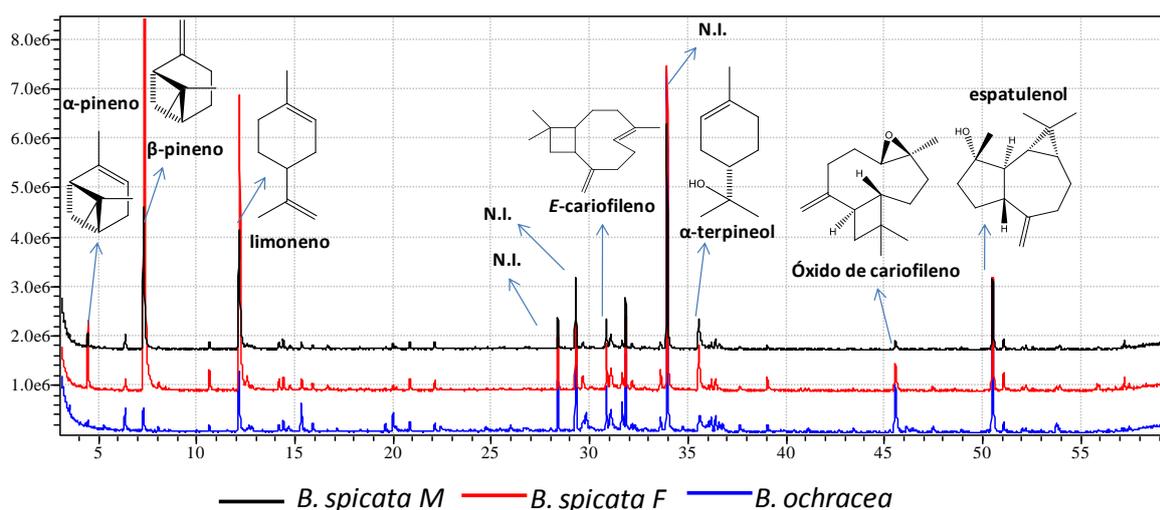


Figura 5: Perfiles volátiles GC-MS de *B. spicata* masculino (negro), femenino (rojo) y de *B. ochracea* (azul). Obsérvese que el pico mayoritario no fue identificado (NI).

Si bien hay una acentuada similitud en la composición macho/hembra, sutiles diferencias cuantitativas permiten una percepción aromática diferencial. De acuerdo a ello, se planteó la posibilidad de evaluar por olfatometría los extractos florales masculinos y femeninos, intentando encontrar notas aromáticas propias de uno u otro sexo.

3.4 Evaluación olfatométrica de *B. articulata* y *B. dracunculifolia*.

Las especies elegidas para hacer éste estudio fueron *B. dracunculifolia* y *B. articulata* en floración. Según bibliografía, el AE de *B. dracunculifolia* (*vassoura oil*) es empleado por la

industria perfumística debido a su alta composición de (*E*)-nerolidol, el que le imprime notas herbáceas⁽¹⁷⁾.

Si bien los compuestos que presentan mayor frecuencia de detección en GC-O son los oxigenados (por presentar mayor difusividad en el epitelio nasal)⁽⁶⁾, en el presente estudio fueron detectados olfativamente componentes de naturaleza hidrocarbonada. Por ejemplo α -pineno y β -pineno presentaron altas FMs en el caso de *B. dracunculifolia*. Sin embargo, para *B. articulata*, los mismos compuestos no presentaron FMs significativas, lo que puede deberse a que la concentración absoluta de los mismos se encuentre por debajo del llamado umbral de percepción, concentración límite por encima de la cual los componentes presentan aroma ⁽⁶⁾.

Como resultado de éste trabajo, se pudo constatar para *B. dracunculifolia* que su compuesto mayoritario (*E*)-nerolidol (24-27 % de la mezcla) fue detectado olfativamente sólo para los individuos masculinos (Tabla 2), aportando notas aromáticas herbáceas como se encuentra descrito en bibliografía⁽¹⁷⁾.

La importancia de los umbrales de percepción se pudo evidenciar para el caso del linalol y el (*E*)-nerolidol: el primero tiene un umbral de detección bajo de 0.1-1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ⁽²⁶⁾, que le permite ser percibido en proporción del 0.1-0.2 % en el AE, mientras que el (*E*)-nerolidol tiene un umbral de 10 a 1000 veces superior: 10-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ⁽²⁶⁾, lo que hace que sea percibido con una menor FM aun siendo el componente mayoritario del AE. Ello repercute en que no haya una correlación directa entre proporción en el AE o extracto y su frecuencia de detección. Para el caso de los compuestos comunes a ambas especies, se pudo determinar que los mismos presentan algunas notas aromáticas independientes de la fuente vegetal (frutos secos para linalol, químico para viridiflorol y madera para espatulenol), así como notas específicas dependiente de la matriz. Lo mismo puede ser explicado no sólo por la concentración de los componentes en la mezcla y su relación con los umbrales de percepción, sino por la posibilidad de coeluciones cromatográficas que alteren la percepción del aroma.

Para *B. dracunculifolia* fueron determinados 32 notas aromáticas (FM > 40), con una predominancia en cantidad de notas y valores de FM para los ejemplares masculinos, como puede verse en la Tabla 2. El AE masculino presentó predominancia de notas aromáticas vegetativas y florales, mientras que el AE femenino presentó buena cantidad de notas vegetativas y frutales. De acuerdo con lo anterior, se comprueba que el *vassoura oil* tiene características olfativas herbáceas.

En el caso de *B. articulata*, el perfil olfatométrico fue más complejo que para *B. dracunculifolia*, con 46 notas aromáticas (FM > 40) determinadas. Individuos masculinos como femeninos aportaron mayor cantidad de notas vegetativas y florales al aroma del extracto. Como en el caso de *B. dracunculifolia*, los ejemplares masculinos presentaron mayor cantidad de notas aromáticas con FMs mayores, lo que puede tener un significado ecológico en la atracción de insectos polinizadores⁽²⁴⁾.

A)

Componente	% Comp. AE M	% Comp. AE F	FM. M	FM. H	Notas aromáticas M	Notas aromáticas F
α-pineno	4,24	3,3	60,6	51,6	vegetativo, pimienta	vegetativo, floral
β-pineno	17,35	20,56	85,6	77,5	combustible, plástico	vegetativo, azufrado
limoneno	12,19	11,85	n.d.	n.d.	*	*
linalol	0,17	0,1	63,2	70,7	floral, azufrado	almendras, eucalipto
(E)-nerolidol	23,83	27,35	54,8	< 40	vegetativo, frutos secos	-
viridiflorol	2,77	2,91	57,7	< 40	químico, floral	-
espatulenol	14,18	13,13	77,5	57,7	madera, moho	madera, humedad

B)

Componente	% Comp. AE M	% Comp. AE F	FM. M	FM. H	Notas Aromáticas M	Notas aromáticas F
α-pineno	3,18	2,52	n.d.	n.d.	*	*
β-pineno	31,39	28,13	n.d.	n.d.	*	*
limoneno	12,75	12,78	n.d.	n.d.	*	*
(E)-β-ocimeno	1,87	2,13	72,6	52,7	grasa, hongos, vegetativo	floral, vegetativo
linalol	0,23	0,25	57,7	62,4	frutos secos, crayola	madera, crayola
metil eugenol	0,53	1,18	62,4	n.d.	floral, humedad	-
(E)-cariofileno	2,24	2,15	70,7	40,8	chinche, geranio	chinche, melón, carqueja
germacreno D	8,79	8,52	68,7	40,8	jabón, vegetativo	vegetativo, eucalipto
viridiflorol	2,44	1,49	76,4	55,3	frutal, químico	perro mojado, químico
espatulenol	3,33	5,14	60,1	66,7	madera, quemado, especias	animal sucio, herbáceo

Tabla 2: Principales resultados de GC-O, para la evaluación del A) AE de *B. dracunculifolia* obtenido por DAV y B) extracto hexánico de *B. articulata* obtenido por EDS. FM: frecuencia modificada de detección olfativa. M y F: denota individuos masculinos y femeninos.

3.5 Quimiotipía de *Baccharis trimera*.

Es usual en fitoquímica, que los quimiotipos se clasifiquen en función del compuesto mayoritario de la fracción que se está analizando⁽⁸⁾. Así un compuesto puede ser de un quimiotipo en cuanto a compuestos volátiles, de otro en cuanto a los flavonoides, de otro por su contenido de ácidos fenólicos, etc. Para la definición de un quimiotipo, la colecta de material vegetal, extracción y análisis de los compuestos que lo definen deben ser realizados de idéntica forma. Además, se deben coleccionar individuos en diferentes localidades y diferentes épocas del año. La notación para los quimiotipos es como en el siguiente ejemplo: *Thymus vulgaris* ct. timol⁽⁸⁾.

De acuerdo a ello se han colectado individuos de *B. trimera* en diferentes localidades de Uruguay y el estado de Rio Grande do Sul, en diferentes épocas del año. La extracción en todos los casos se hizo por EDS y el análisis de la composición volátil por GC-MS.

Hasta el momento se han encontrado dos quimiotipos bien diferenciados: *B. trimera* ct. acetato de carquejilo y *B. trimera* ct. palustrol. En un trabajo previo, se citó al acetato de carquejilo como un quimiomarcador de *B. trimera*⁽¹⁸⁾ de Argentina y el sur de Brasil, pero estudios posteriores lo descartaron⁽²⁵⁾. En nuestro caso, el acetato de carquejilo fue identificado para todas las especies de *Caulopterae* estudiadas, además de *B. trimera*: *B. articulata*, *B. crispa* y *B. milleflora*, confirmando que el mismo no puede ser quimiomarcador para la especie. Tampoco puede ser considerado quimiomarcador para la sección, ya que el mismo fue determinado en el AE de *Eupatorium buniifolium* proveniente de Uruguay⁽²⁷⁾.

En Uruguay sólo fue relevado el quimiotipo *B. trimera* ct. acetato de carquejilo. Las poblaciones estudiadas fueron: Los Cerrillos, Estación Porvenir, Salto, Quebrada de los Cuervos y Antoniópolis (figura 6). El mismo quimiotipo fue encontrado en Santa María (Rio Grande do Sul, Brasil). Por su parte *B. trimera* ct. palustrol sólo fue determinado en São Francisco de Paula (Rio Grande do Sul, Brasil), no presentando dichos ejemplares cantidad detectable de acetato de carquejilo. Como fue mencionado anteriormente, el mismo estudio que reportó dicho compuesto como quimiomarcador⁽¹⁸⁾, reporta en el mismo lugar de colecta una población de *B. trimera* ct. acetato de carquejilo. Las diferencias podrían radicar en la época de colecta del material vegetal, influencia del método de extracción empleado o identificaciones botánicas incorrectas. Existe también la posibilidad de que ambos posibles quimiotipos convivan en el mismo sitio geográfico, dadas las características ambientales particulares en São Francisco de Paula, la que se encuentra en el ecosistema conocido como “*Floresta Ombrófila Mista*” a una altitud de 1000-1200 m sobre el nivel del mar (ver mapa físico en Figura 6). La altitud es uno de los factores que más afecta la composición volátil, ya que implica diferentes condiciones pedoclimáticas con mayores niveles de radiación luminosa, adicionalmente a condiciones bióticas particulares⁽¹⁷⁾. En este ecosistema existe la mayor diversidad de especies de *Baccharis* de Rio Grande do Sul, ya que es un área de transición entre las regiones fisiográficamente diferentes de los *Campos de cima da Serra* y la *Encosta Litoral*, teniendo una amplia diversidad de ambientes y siendo zona de convergencia de contingentes migratorios y centro de diversidad de especie de *Baccharis*⁽²⁸⁾.

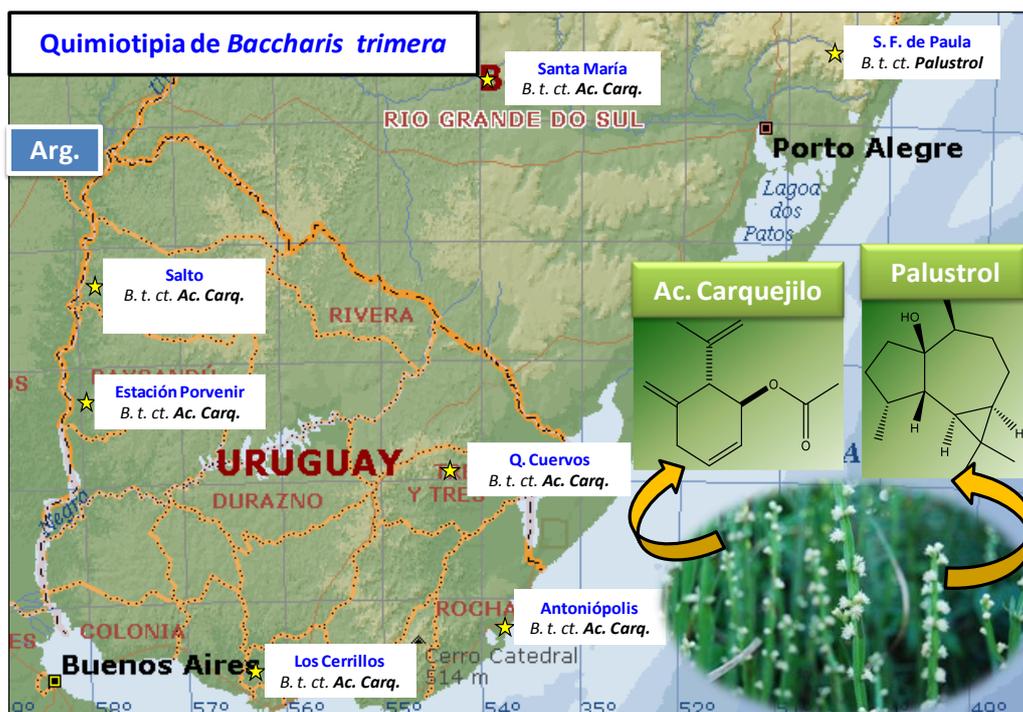


Figura 6: Quimiotipía de *B. trimera*: situación en la región según relevamientos propios.

4. CONCLUSIONES PARCIALES Y PERSPECTIVAS:

El trabajo desarrollado hasta el momento ha permitido el estudio de especies de *Baccharis* cuya composición volátil no ha sido previamente descrita en literatura: *B. gnaphalioides*, *B. palustris*, *B. gibertii*, *B. genistifolia* y *B. cultrata*.

Por otra parte, de las restantes especies se ha podido identificar composiciones diferentes a las reportadas en la bibliografía, lo que podría indicar nuevos quimiotipos. De acuerdo a los trabajos sobre métodos de extracción, se ha demostrado la variabilidad de la composición volátil obtenida en función de aquellos.

Para la diferenciación de volátiles florares masculinos y femeninos, se aplicó el estudio por GC-O, metodología novedosa para el género con sólo un reporte de nuestro grupo de investigación⁽²⁸⁾. Ello ha permitido la identificación de notas aromáticas típicas, permitiendo, eventualmente, decidir acerca de notas específicas (obtenidas en fracciones seleccionadas del AE) requeridas para aplicaciones particulares y absolutamente independientes del perfil aromático global y directo del AE⁽²⁹⁾.

Para la continuación de estudios de Doctorado en Química se plantea completar actividades en el estudio de componentes volátiles así como comenzar a trabajar sobre la composición química

de la fracción no volátil de especies del género seleccionadas, y estudiar la actividad biológica de los mismos como antioxidantes, antifúngicos y antimicrobianos.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Kaufman, P. B.; Cseke, L. J.; Warber, S.; Duke, J. A.; Brielmann, H. L.; Natural Products from Plants; Ed. CRC Press; Boca Raton, 1999.
2. Torsell, K. B. G.; Natural Product Chemistry. A mechanistic, biosynthetic and ecological approach; Apotekarsocieteten, Swedish Pharmaceutical Society, Stockholm, 1997.
3. Evans, W. C.; Farmacognosia; Ed. Interamericana-Mc Graw-Hill; 13a edición; México D. F., 1991.
4. Kesselmeier, J.; Staudt, M.; 1999; Biogenic Volatile Organic Compounds (VOCs): An Overview on Emission, Physiology and Ecology; *J. Atmosph. Chem.*; 33: 23–88.
5. German, J.B.; Yeritzian, C.; Tolstoguzov, V. B.; Olfaction, where Nutrition, Memory and Immunity Intersect; in Berger, R. G.; Flavours and Fragrances. Chemistry, Bioprocessing and Sustainability; Springer-Verlag Edit.; Berlin, 2007.
6. Aceña Muñoz, L.; 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, 2011.
7. Bandoni, A. (Ed.); 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, 2000.
8. Desjardins, A. E.; 2008; Natural Product Chemistry Meets Genetics: When Is a Genotype a Chemotype?; *J. Agric. Food Chem.*; 56: 7587-7592.
9. Parliment, T.; Solvent Extraction and Distillation Techniques; in Marsili, R.; Flavor, Fragrances and Odor Analysis; Marcel Dekker Inc.; New York, 2002.
10. Pourmortazavi, S. M.; Hajimirsadeghi, S. S.; 2007; Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis; *J. Chrom. A*; 1163: 2-24.
11. Abad, M. J.; Bermejo, P.; 2007; *Baccharis* (Compositae): a review update; *Arkivoc*; 7: 76-96.
12. Schneider, A. A.; Estudo taxonômico de *Baccharis* L. sect. Caulopterae DC. (Asteraceae:Astereae) no Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Porto Alegre, 2009.

13. Giuliano, D. A.; 2001; Clasificación infragenérica de las especies argentinas de *Baccharis* (Asteraceae, Astereae); *Darwiniana*; 39: 131-154.
14. Adams, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry; Allured Publishing Corporation; Carol Stream; 2007.
15. Fariña, L.; Escudero, A.; Campo, E.; Ferreira, V.; Cacho, J.; Carrau, F.; Boido, E.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E.; 2008; Caracterización químico-sensorial del perfil aromático del vino Tannat; *Revista Enología*; 2:32–38.
16. Souza, S. P.; Carodoso, M. G.; Souza, P. E.; Guimarães, L. G. L.; Andrade, J.; Mallet, A. C. T.; Nelson, D. L.; 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.
17. Frizzo, C. D., Atti-Serafini, L.; Etcheverrigaray, S.; Cassel, E.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E.; 2008; Essential oil variability in *Baccharis uncinella* DC and *Baccharis dracunculifolia* growing wild in southern Brazil, Bolivia and Uruguay; *Flav. Fragr. J.*; 23: 99-106.
18. Simões-Pires, C. A.; Debenedetti, S.; Spegazzini, E.; Mentz, L. A.; Matzenbacher, N. I.; Limberger, R. P.; Henriques, A. T.; 2005; Investigation of the essential oil from eight species of *Baccharis* belonging to sect. Caulopterae (Asteraceae, Astereae): a taxonomic approach; *Pl. Syst. Evol.*; 253: 23–32.
19. Xavier, V. B.; Vargas, R. M. F.; Cassel, E.; Lucas, A. M.; Santos, M. A.; Mondin, C. A.; Santarem, E. R.; Astarita, L. V.; Sartor, T.; 2011; Mathematical modeling for extraction of essential oil from *Baccharis spp.* by steam distillation; *Ind. Crops and Prod.*; 33: 599-604.
20. Cassel, E.; Vargas, R. M. F.; 2006; Experiments and Modeling of the *Cymbopogon winterianus* Essential Oil Extraction by Steam Distillation; *J. Mex. Chem. Soc.*; 50 (3): 126-129.
21. Fabiane, K. C.; Ferronato, R.; dos Santos, A. C.; Onofre, S. B.; 2008; Physicochemical characteristics of the essential oils of *Baccharis dracunculifolia* and *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae); *Braz. J. Pharmacogn.*; 18: 197-203.
22. Silva, D. C. M. N.; Bresciani, L. F. V.; Dalagnol, R. L.; Danielski, L.; Yunes, R. A.; Ferreira, S. R. S.; 2009; Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: process parameters and composition profiles; *Food Bioprod. Process.*; 87: 317-326.

23. Cassel, E.; Frizzo, C. D.; Vanderlinde, R.; Atti-Serafini, L.; Lorenzo, D.; Dellacassa, E.; 2000; Extraction of *Baccharis* Oil by Supercritical CO₂; **Ind. Eng. Chem. Res.**; 39: 4803-4805.
24. Besten, M. A.; Jasinski, V. C. G; Costa, A. G. L. C.; Nunes, D. S.; Sens, S. L.; Wisniewski Jr., A.; Simionatto, E. L.; Riva, D.; Dalmarco, J. B.; Granato, D; 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.
25. Lago, J. H. G.; Romoff, P.; Fávero, O. A.; Souza, F. O.; Soares, M. G.; Baraldi, P. T.; Corrêa, A. G.; 2008; Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.)DC. (Asteraceae) essential oils; **Bioch. Syst. Ecol.**; 36: 737-740.
26. Larsen, M.; Poll, L.; 1992; Odour thresholds of some important aroma compounds in strawberries; **Z LebensmUntersForsch**; 195:120-123.
27. Lorenzo, D.; Paz, D.; Davies, P.; Villamil, J.; Vila, R.; Cañigüeral, S.; Dellacassa, E.; 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.
28. Heiden, G.; Vieira Iganci, J. R.; Bobrowski, V. L.; Macias, L.; 2007; Biogeografía de *Baccharis* sect. Caulopterae (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil; **Rodriguésia**; 58: 787-796.
29. Xavier, V. B.; Vargas, R. M. F.; Minteguiaga, M.; Umpiérrez, N.; Dellacassa, E.; Cassel, E.; 2013; Evaluation of the key odorants of *Baccharis anomala* DC essential oil: New applications for known products; **Ind. Crops Prod.**; 49: 492-496.
30. Minteguiaga Carbajal, M.; Umpierrez, N.; Schinca, F.; Fariña, L.; Cassel, E., González, A.; Bonifacino, M.; Speroni, G.; González, S.; Lombardo, P.; Alves, P.; Guimaraens, A.; Rodríguez, A.; Pardo, H.; Pérez, E.; Dellacassa, E.; 2013; Generación de conocimiento y aplicaciones novedosas a partir de productos de la flora aromática nativa; **Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay**; 67: 27-31.

Anexo I: Tabla de composición para las 4 especies con % identificación superior al 90 %, junto a sus índices de retención en columna apolar y polar.

# Pico	Compuesto	LRI DB-5	LRI CW-20M	<i>B. milleflora</i>	<i>B. trimera</i>	<i>B. tridentata</i>	<i>B. uncinella</i>
1	1-hexen-3-ona	-	1084	0,01	-	-	tr
2	hexanal	801	1067	0,12	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	n-hexanol	871	1343	0,02	0,04	-	-
8	heptanal	903	1171	0,02	-	-	0,02
9	trícicleno	916	1013	0,01	-	0,04	0,01
10	α -luyeno	922	1020	-	0,07	1,31	3,37
11	α -pineno	928	1012	0,09	0,91	46,72	11,68
12	canfeno	941	1050	-	-	1,36	0,08
13	α -fencheno	947	1042	-	-	-	0,05
14	ácido hexanoico	955	1809	0,07	tr	-	tr
15	2-(<i>E</i>)-heptenal	957	1302	-	-	-	tr
16	benzaldehído	958	-	0,02	-	-	-
17	sabineno	969	1108	0,02	0,15	3,09	2,48
18	β -pineno	972	1093	0,26	3,42	11,36	7,56
19	mirreno + β -felandreno	990	1155, 1193	0,12	0,62	1,84	0,98
20	2-amil furano	991	1220	0,21	tr	-	tr
21	α -felandreno	1003	1151	-	0,07	-	0,09
22	octanal	1004	1274	0,03	tr	-	-
23	δ -3-careno + 2-(<i>E</i>)-acetato de hexenilo	1009	1135, 1311	-	-	-	0,13
24	α -terpineno	1014	1163	0,03	0,05	0,14	0,3
25	2,4-(<i>E,E</i>)-heptadienal	1012	-	0,04	0,07	-	-
26	m-cimeno	1021	1251	-	-	-	0,06
27	p-cimeno	1024	1252	0,06	0,3	0,06	0,39
28	limoneno	1028	1185	3,24	1,15	14,06	8,63
29	1,8-cineol	1030	1193	0,03	0,1	-	0,03
30	alcohol bencílico	1036	-	0,03	-	-	0,05
31	(<i>Z</i>)- β -ocimeno	1039	1207	-	0,03	0,14	0,05
32	benceno acetaldehído	1043	-	0,09	0,04	-	0,04
33	(<i>E</i>)- β -ocimeno	1049	1240	0,07	0,17	3,63	0,3
34	γ -terpinene + <i>E</i> -2-octenal	1058	1230, 1407	0,03	0,16	0,22	0,46
35	(<i>Z</i>)-hidrato de sabineno	1066	1450	-	-	0,05	0,1
36	(<i>Z</i>)-óxido de linalol (furanóide)	1074	1424	0,08	0,1	-	tr
37	terpinoleno	1086	1267	-	0,12	0,24	0,18
38	p-cimeno	1088	1264	0,02	0,1	-	-
39	(<i>E</i>)-óxido de linalol (furanóide)	1091	1452	0,03	tr	-	-
40	linalol	1101	1530	0,08	1,11	0,1	0,14
41	(<i>E</i>)-hidrato de sabineno + nonanal	1104	-, 1377	-	0,19	0,07	0,14
42	hotrienol	1105	1585	0,24	-	-	0,11
43	1,3,8-p-mentatrieno	1109	1374	-	-	-	0,03
44	endo-fenchol	1111	1565	-	-	-	0,14
45	(<i>Z</i>)-p-ment-2-en-1-ol	1120	-	-	0,03	0,05	0,17
46	(<i>E</i>)-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1121	-	0,1	-	-	-
47	α -canfolenal	1125	-	-	-	-	0,03
48	(<i>Z</i>)-óxido de limoneno	1134	-	0,02	-	-	-
49	(<i>E</i>)-pinocarveol	1136	1630	0,07	0,25	0,04	0,14
50	(<i>E</i>)-p-menth-2-en-1-ol	1138	-	-	-	-	0,13
51	(<i>E</i>)-acetato de crisantemilo	1143	1781	-	-	0,14	-
52	(<i>E</i>)-verbenaol	1143	1656	-	-	-	0,14
53	exo-metil-canfelinol	1145	-	-	-	-	0,07
54	2,6-(<i>E,Z</i>)-nonadienal	1148	1560	-	-	-	0,08
55	citronelal	1154	-	-	0,06	-	-
56	pinocarvona	1160	1539	-	0,19	-	0,11
57	borneol	1164	-	-	-	0,04	0,16
58	p-menta-1,5-dien-8-ol + (<i>E</i>)-óxido de linalol (piranoide)	1166	-, 1756	-	-	0,03	0,08
59	isopinocanfona + isopinocanfeol + 4-terpineol	1176	1516, 1544, 1581	-	0,22	0,45	1,28
60	(<i>E,E</i>)-1,3,5-undecatriene	1182	1379	-	-	-	0,09
61	p-cimen-8-ol	1185	1821	-	0,17	-	0,18
62	α -terpineol	1189	1674	0,09	0,51	0,17	0,56

(Continúa)

63	mirtenal + safranal + mirtenol	1194	1597, 1615, 1770	0,15	0,35	-	0,19
64	(E)-piperitol	1202	1724	-	-	-	0,04
65	verbenona + decanal	1206	-, 1481	-	-	-	0,14
66	β -ciclocitral	1218	-	-	0,09	-	-
67	(E)-carveol	1219	1810	0,32	-	-	0,08
68	citronelol	1223	1780	-	tr	-	-
69	nerol	1229	1825	-	0,13	-	-
70	(Z)-carveol	1231	-	0,11	-	-	-
71	3-(Z)-isovalerato de hexenilo + neral	1234	1458, 1663	-	-	-	0,04
72	timol metil éter	1235	-	-	0,05	-	-
73	carvona	1243	-	0,3	-	-	0,03
74	canfenoato de metilo	1250	1545	0,32	-	-	0,06
75	geraniol	1253	1825	-	0,3	-	0,06
76	2-(E)-decanal	1263	-	0,08	0,03	-	-
77	geranial	1271	-	-	0,06	-	-
78	(E)-cinamaldehído + perilla aldehído	1273	-, -	0,16	-	-	0,04
79	acetato de bornilo	1284	-	-	0,03	6,01	-
80	safrol	1288	1836	0,17	-	-	-
81	perilla alcohol	1297	-	-	0,04	-	0,03
82	acetato de carquejilo	1300	1685	0,18	-	-	-
83	p-vinil guaiaacol	1313	-	0,32	0,11	-	0,03
84	2-(E,E)-decadienal	1316	1467	0,06	0,11	-	0,03
85	geranato de metilo	1324	-	-	-	-	0,02
86	α -longipineno	1347	-	-	0,34	-	-
87	α -cubebeno	1349	-	0,18	-	-	0,17
88	eugenol	1357	-	-	-	-	0,12
89	ciclosativeno	1366	-	0,12	0,09	-	-
90	α -ylangeno	1370	1468	0,13	0,16	-	0,3
91	α -copaeno	1375	1476	0,56	0,85	0,02	0,34
92	(E)- β -damascenona	1385	1790	0,62	0,57	-	-
93	β -bourboneno	1386	1499	0,32	-	-	0,11
94	β -cubebeno	1389	1519	0,35	0,38	-	0,26
95	β -elemeno	1392	1572	0,85	0,77	0,04	0,18
96	β -longipineno	1396	1609	-	0,04	-	0,04
97	tetradecano + longifoleno	1401	1402, 1584	-	0,1	-	0,07
98	α -cedreno	1406	-	0,19	-	-	-
99	α -gurjuneno + (Z)-cariofileno	1407	1513, 1587	-	0,59	-	0,34
100	metil eugenol	1407	-	-	-	0,07	-
101	cipereno	1410	-	0,07	-	-	-
102	(E)-cariofileno	1418	1575	2,07	4,11	0,81	3,3
103	β -cedreno	1417	1690	0,63	tr	-	-
104	β -copaeno	1428	-	0,5	0,16	-	0,1
105	α -guaieno	1437	-	-	0,72	-	0,7
106	α -(E)-bergamoteno + aromadendreno	1437	1566, 1615	1,61	-	0,04	0,7
107	(Z)- β -farneseno	1442	1619	-	-	-	0,32
108	(Z)-murola-3,5-dieno	1445	-	-	0,06	-	-
109	α -himachaleno	1446	-	-	-	-	0,31
110	(E)-murola-3,5-diene	1449	-	-	0,16	-	0,17
111	α -humulene	1453	1645	3,1	1,12	0,03	0,96
112	(E)- β -farneseno + geranil acetona	1456	1669, 1829	0,27	tr	-	tr
113	allo-aromadendreno	1459	1774	0,65	0,96	-	0,51
114	(Z)-murola-4(14),5-dieno	1461	-	-	0,14	-	-
115	ϵ -epi-(E)-cariofileno	1464	1625	-	-	-	0,14
116	γ -gurjuneno	1471	-	-	0,72	-	0,17
117	(E)-cadina-1(6),4-dieno + propionato de geranilo	1474	1761, 1841	0,22	0,38	-	0,29
118	γ -muuroleño	1477	1671	0,47	1,15	0,02	0,67
119	α -amorfenó + germacreno D	1481	1671, 1685	4,2	3	1,49	4,25
120	ar-curcumeno	1485	1749	7,97	-	-	1,54
121	β -selineno	1486	-	-	1,3	0,06	-
122	δ -selineno	1491	-	-	-	-	0,64
123	(E)-murola-4(14),5-dieno	1494	-	0,28	0,25	-	-
124	biclogermacreno	1497	1709	4,45	2,87	3,4	4,61
125	α -selineno	1498	1690	-	tr	-	-

(Continúa)

126	α -muroloeno	1501	1704	0,9	0,94	0,06	0,78
127	germacreno A	1504	-	-	0,68	-	0,19
128	(<i>E,E</i>)- α -farneseno	1505	1700	1,87	-	0,03	0,19
129	β -bisaboleno	1510	-	0,44	0,19	-	0,48
130	γ -cadineno	1514	-	0,54	0,94	0,08	0,78
131	δ -amorfino	1516	1736	1,51	-	-	0,37
132	β -curcumeno	1518	1759	-	0,21	-	-
133	δ -cadineno	1527	1735	0,44	3,46	0,28	2,74
134	(<i>E</i>)-cadin-1,4-dieno	1532	-	-	0,19	-	0,14
135	(<i>Z</i>)-nerolidol	1532	1949	-	tr	-	tr
136	α -cadineno	1539	-	0,17	0,22	-	0,22
137	α -calacoreno	1543	1888	0,44	0,51	-	0,65
138	(<i>E</i>)-nerolidol	1555	2010	0,65	0,5	-	0,22
139	germacreno B	1557	1802	0,27	0,37	-	-
140	β -calacoreno	1563	1929	-	-	-	0,13
141	palustrol	1570	1903	0,52	20	-	1,45
142	espatulenol	1582	2095	19,19	8,53	0,93	10,23
143	óxido de cariofileno + globulol	1585	1952, 2050	4,11	7,14	0,2	4,26
144	viridiflorol	1592	2059	-	0,46	-	0,35
145	ledol	1606	2001	0,55	2,34	-	1,22
146	tetradecanal	1609	1913	-	1,28	-	0,63
147	aristol-9-en-3-ol	1612	-	-	-	-	0,31
148	epóxido de humuleno II	1614	2007	4,36	-	-	-
149	junenol	1618	-	-	0,39	-	0,31
150	murolo-4,10(14)-dien-1- β -ol	1622	-	0,38	-	-	-
151	α -colocaleno	1623	-	-	0,37	-	0,31
152	<1-epi> cubenol	1629	2040	-	0,59	-	0,27
153	<1, 10-di-epi> cubenol	1633	2116	0,87	-	-	0,68
154	iso espatulenol	1641	-	1,93	0,81	-	-
155	ζ -murolo	1645	-	1,14	1,36	-	-
156	α -murolo	1648	-	-	0,6	0,25	0,68
157	ζ -cadinol	1655	2143	1,3	1,71	0,12	1,18
158	allo-óxido de aromadendreno	1658	-	-	0,55	-	-
159	α -cadinol	1659	-	1,96	-	-	-
160	<14-hidroxi-9-epi> (<i>E</i>)-cariofileno	1663	-	0,7	-	-	0,25
161	eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	1667	-	1,11	-	-	0,44
162	óxido de aromadendreno	1674	-	1,42	1,23	-	-
163	cadaleno	1676	2188	0,88	0,37	-	0,54
164	germacra-4(15),5,10(14)-trien-1 α -ol	1690	1771	1,25	0,58	-	1,33
165	heptadecano	1700	-	-	0,1	-	-
166	<14-hidroxi>- α humuleno	1715	-	0,76	-	-	0,31
167	longifolol	1718	-	0,33	-	-	-
168	isobiciclogermacrenal	1735	-	-	0,38	-	0,22
169	oplopanona	1742	-	0,53	-	-	0,07
170	xantorrizol	1753	-	0,27	-	-	-
171	esquamulosona	1766	-	-	-	-	0,15
172	<14-hidroxi>- α murolo	1780	-	0,24	-	-	-
173	octadecano	1800	-	-	0,15	-	-
174	<14-hidroxi- δ > cadineno	1808	-	0,18	-	-	-
175	neofitadieno	1849	-	1,01	2,6	-	-
176	hexahidrofarnesil acetona	1853	-	0,25	0,18	-	0,22
177	nonadecano	1900	-	-	0,08	-	-
178	5,9-(<i>E,E</i>)-farnesil acetona	1925	-	0,15	-	-	0,22
179	ácido palmítico	1969	2829	0,55	0,47	-	-
Total Identificado (%)				90,68	93,26	99,34	95,43