

**CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LA ESPECIE “*Pogostemon cablin*” Y
ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SU ACEITE ESENCIAL**

LAURA MILENA CASTRILLÓN VALBUENA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

**CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LA ESPECIE “*Pogostemon cablin*” Y
ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SU ACEITE ESENCIAL**

LAURA MILENA CASTRILLÓN VALBUENA

Tesis de grado presentada como requisito
parcial para optar al título de Química

Directores:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph.D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA
BUCARAMANGA**

2012

DEDICATORIA

En primer lugar, este logro es para mis padres, Esperanza Valbuena y José de Jesús Castrillón, que son los dos seres que más amo en la vida, gracias a su esfuerzo, lucha y dedicación, he tenido una familia maravillosa.

A mis hermanos, Andrea, Sirley, Ana y Jesús Hernán Castrillón, que son uno de los motores de mi vida; deseo que tomen esto como un ejemplo superación y espero que nunca, a pesar de los obstáculos que se presenten en el camino, dejen apagar la llama de sus sueños, puesto que con verriquera y sacrificio se pueden conseguir muchas cosas.

A mi flaquito, por permitirme entrar en su vida, gracias a esto, he conocido una persona maravillosa, que siempre ha estado acompañándome en las buenas y no tan buenas, apoyándome y brindándome su amor.

A doña Graciela Calderón, por ser un ejemplo para mí de superación y lucha.

AGRADECIMIENTOS

Manifiesto mis más sinceros agradecimientos a:

A la Dra. Elena E. Stashenko, directora de esta investigación, por su compromiso, trabajo y dedicación con el Centro de Investigación, gracias a su ardua labor muchos de nosotros podemos realizar nuestros trabajos de grado con todos los recursos y equipos necesarios para ello.

Al Dr. Jairo René Martínez, Co-director de esta investigación, por sus valiosas observaciones.

A la Universidad industrial de Santander, al Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM, al Laboratorio de Cromatografía, por proporcionar los recursos necesarios para el desarrollo de esta investigación.

A mis calificadores: Hernando Moncaleano y Jorge Enrique Ávila Reyes, por toda la colaboración que me brindaron en la evaluación de este trabajo.

A mi amigo, Arvind Kumar, por su valiosa colaboración en la culminación de esta investigación, por su apoyo moral y por todos esos momentos alegres.

A mis amig@s y compañer@s del laboratorio, especialmente a Marcela Domínguez, Mario Llinás, Mónica Cala, Nestor Marín, Claudia Durán, Carolina Quiroga, Ximena Cascavita, Nathalie Gómez, Mónica Pinto, Vanesita, Cristina Pinto, Edwin Ramírez, Paolita, Churco, Gustavito, Carlos Rueda, Carlos Bathuel, Yaride Pérez, Elizabeth Mateus, Andreita Agudelo, Ginna Arias, Carlitos Ruiz, por ser esas personitas que alegraron muchos momentos de mi vida, gracias, por tener siempre esa disposición de escucharme y darme sus mejores consejos.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	22
1. ESTUDIO CIENCIOMÉTRICO	25
1.1 BASE DE DATOS <i>Elsevier (Scopus)</i>	25
1.2 BASE DE DATOS <i>Web of Science</i>	28
2. ESTADO DEL ARTE	32
2.1 ACEITES ESENCIALES	32
2.1.1 Definición	32
2.1.2 Composición química	32
2.1.3 Tratamiento postcosecha del material vegetal	33
2.1.4 Fermentación	34
2.2 GENERALIDADES DE <i>Pogostemon cablin</i>	34
2.2.1 Hábitat	36
2.2.2 Composición química	36
2.2.3 Propiedades biológicas	38
2.2.4 Usos	38
2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES	39
2.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	39
2.3.2 Destilación por arrastre con vapor	41
2.4 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS	42

	SECUNDARIOS	
2.4.1	Cromatografía de gases	42
2.4.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	43
2.5	TÉCNICAS DE SEPARACIÓN	44
2.5.1	Cromatografía en capa fina	44
2.5.2	Cromatografía en columna	45
2.6	TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS	47
2.6.1	Espectroscopía de infrarrojo	47
2.6.2	Resonancia magnética nuclear (RMN)	48
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN	50
4.	OBJETIVOS	52
4.1	OBJETIVO GENERAL	52
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
5.	HIPÓTESIS	53
6.	METODOLOGÍA	54
6.1	MATERIAL VEGETAL	55
6.1.1	Cultivo y propagación	55
6.1.2	Recolección	57
6.1.3	Secado	58
6.2	EXTRACCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	59
6.2.1	Extracción por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	59
6.2.2	Destilación por arrastre con vapor	61
6.3	RENDIMIENTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES	61

6.4	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS	62
6.5	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	62
6.5.1	Columna apolar	62
6.6	IDENTIFICACIÓN	64
6.7	SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DEL COMPONENTE MAYORITARIO	65
6.7.1	Cromatografía en columna	65
6.7.2	Cromatografía en capa fina	66
6.8	CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA	66
6.8.1	Espectroscopía de infrarrojo	66
6.8.2	Espectroscopía de resonancia magnética nuclear	66
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	67
7.1	IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA	67
7.2	ANÁLISIS DE SUELOS	70
7.3	RENDIMIENTOS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Pogostemon</i> sp.	71
7.4	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS AE	72
7.4.1	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Pogostemon</i> sp., aislados por AV	72
7.4.2	Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de <i>Pogostemon</i> sp., aislados por MWHD	77
7.5	AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE UN SESQUITERPENOIDE MAYORITARIO PRESENTE EN EL AE DE <i>Pogostemon</i> sp.	82
7.5.1	Separación del AE mediante cromatografía en capa fina	83
7.5.2	Fraccionamiento del AE mediante cromatografía en columna	84
7.6	CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UN	87

SESQUITERPENO MAYORITARIO PRESENTE EN EL AE
DE *Pogostemon* sp.

7.6.1	Espectroscopía de infrarrojo	87
7.6.2	Resonancia magnética nuclear	88
7.6.3	Espectrometría de masas	95
8.	CONCLUSIONES	98
9.	RECOMENDACIONES	100
10.	BIBLIOGRAFÍA	101

ANEXOS

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Componentes mayoritarios del AE de patchoulí, según la región de cultivo.	37
Tabla 2. Serie eluotrópica, según Snyder, de algunos disolventes con sus constantes dieléctricas [67, 83].	47
Tabla 3. Condiciones de trabajo utilizadas en la MWHD.	60
Tabla 4. Resumen del análisis fisicoquímico del suelo de áreas de cultivo con <i>Pogostemon</i> sp.	70
Tabla 5. Rendimientos de los AE de <i>Pogostemon</i> sp., extraídos por MWHD, de plantas colectadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.	71
Tabla 6. Composición química del AE de <i>Pogostemon</i> sp., obtenido por AV de plantas secas.	75
Tabla 7. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los AE de <i>Pogostemon</i> sp., aislado por MWHD de plantas frescas y secas, cultivadas a la sombra (I, II) y al sol (III, IV), respectivamente.	78
Tabla 8. Resumen de los principales hallazgos encontrados en los espectros de RMN.	94

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Relación de año - número de publicaciones sobre <i>P. cablin</i> . Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> . Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (" <i>Pogostemon cablin</i> "). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].	26
Figura 2. Relación del área de conocimiento - número de publicaciones sobre <i>P. cablin</i> . Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> . Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (" <i>Pogostemon cablin</i> "). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].	27
Figura 3. Relación de revistas - número de publicaciones sobre <i>P. cablin</i> . Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos <i>Elsevier (Scopus)</i> . Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (" <i>Pogostemon cablin</i> "). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].	28
Figura 4. Relación de año - número de publicaciones sobre <i>P. cablin</i> . Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos: <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> . Ecuación de búsqueda: TS= (" <i>Pogostemon cablin</i> "). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].	29

Figura 5.	Relación de revistas - número de publicaciones sobre <i>P. cablin</i> . Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> . Ecuación de búsqueda: TS= (" <i>Pogostemon cablin</i> "). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].	30
Figura 6.	Relación de países - número de publicaciones sobre <i>P. cablin</i> . Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos <i>Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)</i> . Ecuación de búsqueda: TS= (" <i>Pogostemon cablin</i> "). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].	31
Figura 7.	Esquema del montaje de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas.	40
Figura 8.	Esquema del montaje de destilación por arrastre con vapor.	41
Figura 9.	Tipos de silanol.	46
Figura 10.	Diagrama de flujo de la metodología desarrollada durante la investigación.	54
Figura 11.	Cultivos de <i>Pogostemon cablin</i> .	55
Figura 12.	Esquema general del método de propagación de <i>Pogostemon cablin</i> .	56
Figura 13.	Fotografías de los cultivos de <i>Pogostemon cablin</i> expuestos al sol y a la sombra.	57

Figura 14.	Fotografías del proceso de secado del material vegetal.	58
Figura 15.	Fotografía del equipo utilizado para obtener los AE por la técnica de MWHD.	60
Figura 16.	Fotografías del equipo a escala piloto empleado para la obtención de los AE por el método de destilación por arrastre con vapor.	61
Figura 17.	Fotografía del cromatógrafo de gases <i>Agilent Technologies 6890 Plus</i> , con detector selectivo de masas <i>Agilent Technologies MSD 5973 Network</i> . Columna DB-5: (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) con fase estacionaria de 5% fenil-poli(metilsiloxano).	63
Figura 18.	Fotografías de la especie <i>Pogostemon cablin</i> : plantas, hojas y flores. Izquierda: Cultivada en Bucaramanga (Complejo Piloto de CENIVAM). Derecha: Cultivada en India.	69
Figura 19.	Perfil cromatográfico típico del AE de <i>Pogostemon</i> sp., obtenido por AV de las plantas secas. Columna DB-5MS (60m), <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV).	77
Figura 20.	Perfiles cromatográficos típicos de los AE de <i>Pogostemon</i> sp., obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas a la sombra; I. Plantas frescas, II. Plantas secas. Columna DB-5MS (60m), <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV).	80
Figura 21.	Perfiles cromatográficos típicos de los AE de <i>Pogostemon</i>	81

sp., obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas al sol; **III.** Plantas frescas, **IV.** Plantas secas. Columna DB-5MS (60m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV).

Figura 22.	Cromatografía en capa fina del control del AE de <i>Pogostemon</i> sp. Los cromatofolios se eluyeron con: A. Hexano; B. Hexano:acetato de etilo (95:5).	83
Figura 23.	Cromatografía en columna del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	85
Figura 24.	Cromatografía en capa fina del control de fracciones de <i>Pogostemon</i> sp., obtenidas por CC. A. Columna de fraccionamiento inicial; B. Columna de purificación.	86
Figura 25.	Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS para el componente mayoritario aislado por CC, del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	86
Figura 26.	Espectro infrarrojo del compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	87
Figura 27.	Espectro RMN ^1H del compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	89
Figura 28.	Espectro HSQC del compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	91
Figura 29.	Espectros de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	92

Figura 30.	Espectro de correlación homonuclear ^1H , ^1H -COSY del compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	93
Figura 31.	Espectro HMBC del compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	95
Figura 32.	Espectro de masas del componente mayoritario aislado por CC, del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	96
Figura 33.	iones principales en el espectro de masas del compuesto mayoritario aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	96
Figura 34	Estructura propuesta para el compuesto mayoritario, aislado del AE de <i>Pogostemon</i> sp.	97

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Certificación del X Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Popayán del 9 al 12 de junio de 2009.	112
Anexo 2. Certificación del XXIX Congreso Latinoamericano de Química, XVI Congreso Colombiano de Química, VI Congreso Colombiano de Cromatografía, realizado en Cartagena del 27 de septiembre al 1 de octubre del 2010.	113
Anexo 3. Certificación del XI Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Medellín del 5 al 7 de octubre del 2011.	114
Anexo 4. Metabolitos secundarios volátiles presentes en el AE de <i>P. cablin</i> .	115
Anexo 5. Resultado de la identificación botánica de la especie <i>P. cablin</i> .	116
Anexo 6. Resultado del análisis de suelos.	117

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AE	Aceite esencial o aceites esenciales.
AV	Destilación por arrastre con vapor.
ca.	Aproximadamente.
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas Medicinales Tropicales.
DB-5MS	<i>5%-Phenyl-poly(dimethylsiloxane)</i> [Fase estacionaria de 5%-Fenil-poli(dimetilsiloxano)].
DB-WAX	<i>Poly(ethyleneglycol)</i> [Fase estacionaria de poli(etilenglicol)].
DEPT-135	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i> (Intensificación por transferencia de polarización sin distorsión).
d_f	Espesor de la fase estacionaria, μm .
D.I.	Diámetro interno, mm.
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo).
f.e.	Fase estacionaria.
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> (Correlación heteronuclear

a multiples enlaces).

HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i> (Correlación heteronuclear a un enlace entre un protón y el heteronúcleo al que está directamente unido).
IR	Espectroscopía de infrarrojo.
LSC	Cromatografía líquido-sólido.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas).
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
Rf	Factor de retención.
RMN	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Resonancia magnética nuclear).
RMN-¹H	Resonancia magnética nuclear de protones.
RMN-¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono.
δ	Desplazamiento químico (ppm).
t_R	Tiempo de retención, min.
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina).
u.i.	Unidades de isopreno.
UIS	Universidad Industrial de Santander.

RESUMEN

TÍTULO: CULTIVO Y PROPAGACIÓN DE LA ESPECIE “*Pogostemon cablin*.” Y ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE SU ACEITE ESENCIAL

AUTOR: Laura Milena Castrillón Valbuena**

PALABRAS CLAVES: *Pogostemon cablin*, hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD), destilación por arrastre con vapor (AV), cromatografía en columna (CC), cromatografía en capa fina (CCF), resonancia magnética nuclear (RMN).

En la naturaleza es muy frecuente encontrar individuos de una misma especie botánica, conocidos como quimiotipos, que son idénticos morfológicamente, pero difieren en sus metabolitos secundarios, los cuales dependen de las condiciones genéticas, geobotánicas y agrícolas del cultivo.

En la presente investigación, se aislaron los metabolitos secundarios volátiles de plantas de *Pogostemon cablin*, cultivadas al sol y a la sombra, por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y destilación por arrastre con vapor (AV), usando material vegetal fresco y seco cultivado y recolectado en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, ubicado en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS), en la ciudad de Bucaramanga.

La identificación de los componentes presentes en el aceite esencial (AE) se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) en columna apolar (DB-5), empleando criterios cromatográficos y espectroscópicos.

Los compuestos mayoritarios identificados en los AE de *Pogostemon cablin* fueron: *trans*- β -cariofileno (5,45-9,16 %), zonareno (10,1 %), δ -cadineno (6,78-9,02 %) y germacreno D-4-ol (4,71-5,57 %). Sin embargo, el sesquiterpeno mayoritario no fue identificado usando criterios cromatográficos, se aisló y purificó por cromatografía en columna y cromatografía en capa fina y se propuso una estructura con base en los datos de espectroscopía infrarroja, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN).

* Trabajo de grado

** Universidad Industrial de Santander, Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora, Elena E. Stashenko; Co-director: Jairo René Martínez.

ABSTRACT

TITLE: CULTIVATION AND PROPAGATION OF THE SPECIES "*Pogostemon cablin*." AND STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF HIS ESSENTIAL OIL

AUTOR: Laura Milena Castrillón Valbuena**

KEYWORDS: *Pogostemon cablin*, assisted hydrodistillation microwave radiation (MWHD) by steam stripping distillation (AV), column chromatography (CC), thin layer chromatography (TLC), nuclear magnetic resonance (NM)

In the nature it is very common to find individuals of the same botanical species, known as chemotypes, which are morphologically identical but differ in their secondary metabolites, which depend on genetic conditions and agricultural crop geobotanical.

In this research were isolated the volatile secondary metabolites of plants *Pogostemon cablin*, cultivated in the sun and shade, assisted hydrodistillation microwave radiation (MWHD) and by steam stripping distillation (AV), using fresh plant material and dry grown and harvested in the Pilot Agroindustrial Complex CENIVAM located in the principal campus of the Universidad Industrial de Santander (UIS), in the city of Bucaramanga.

The identification of the components present in the essential oil (AE) was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) in apolar column (DB-5), using chromatographic and spectroscopic criteria.

The compounds identified in the AE majority of *Pogostemon cablin* were: trans- β -caryophyllene (5.45 to 9.16%), zonareno (10.1%), δ -cadinene (6.78 to 9.02%) and germacrene D-4-ol (4.71 to 5.57%). However, the majority sesquiterpene was not identified using chromatographic criteria was isolated and purified by column chromatography and thin layer chromatography was proposed structure data based on infrared spectroscopy, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR) .

* College thesis

** Industrial University of Santander, Sciences Faculty, School of Chemistry. Director, Elena E. Stashenko; Co-director, Jairo René Martínez.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos orgánicos biosintetizados por los organismos vivos suelen dividirse en dos grandes grupos: los denominados metabolitos primarios, que poseen una función esencial en el organismo (carbohidratos, aminoácidos, lípidos, nucleótidos, etc.), y los metabolitos secundarios, producidos por un gran número de organismos, y que aparentemente tienen un papel secundario. Algunos metabolitos secundarios se sintetizan durante etapas específicas de crecimiento, períodos de estrés causados por limitaciones nutricionales o condiciones climáticas extremas, o durante ataques de agentes externos. Aunque no se tiene claro la función que muchos de estos compuestos desempeñan en los organismos que los producen, el interés en estos compuestos ha crecido en los últimos años de forma exponencial debido a la variedad de actividades biológicas que presentan.

A pesar de que nuestro país cuenta con una inmensa variedad de plantas aromáticas y medicinales, se han introducido nuevas especies vegetales que poseen diversas propiedades biológicas. Cuando una especie es introducida e intenta adaptarse, se pueden producir cambios morfológicos y en su perfil de metabolitos secundarios. Esto ocurre por la influencia que tienen ciertos factores como las condiciones ambientales durante el desarrollo vegetativo, condiciones de cultivo, cosecha, tratamiento postcosecha, métodos de extracción. Estos factores desempeñan un papel determinante en la producción de ciertos metabolitos secundarios en las plantas. Por este motivo, es frecuente encontrar individuos de una misma especie botánica, que son idénticos morfológicamente, pero difieren en sus metabolitos secundarios, según las condiciones genéticas, geobotánicas y agrícolas del cultivo, ellos se conocen como quimiotipos.

Este estudio se enfocó en el análisis de la composición química de la especie *Pogostemon cablin* perteneciente a la familia Lamiaceae, una planta nativa de Filipinas, que ha sido objeto de diversos estudios a nivel mundial, puesto que su aceite esencial tiene una composición única y compleja. El estudio de los metabolitos secundarios en diferentes partes del mundo ha revelado la presencia de compuestos con características principalmente antioxidantes, antidepresivas, antibacterianas y analgésicas. Además, las propiedades organolépticas de este aceite esencial (AE), debidas principalmente a la presencia del patchoulol y el patchouleno, que son componentes mayoritarios que aun no han sido sintetizados, hacen a este AE único [19].

El presente estudio comprende la identificación de los componentes del AE de *Pogostemon cablin*, obtenidos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y destilación por arrastre con vapor (AV), de plantas cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM. También, se aisló y purificó el componente mayoritario del AE mediante cromatografía en columna y cromatografía en capa fina. La caracterización estructural de este componente se realizó mediante resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopía de infrarrojo y espectrometría de masas.

Entre los principales resultados obtenidos en este trabajo, se destaca el conocimiento de los bajos rendimientos de los AE tanto del material vegetal fresco como del seco, lo que dificultará su comercialización. En cuanto a la composición química de los metabolitos secundarios de esta especie, se encontró que tiene metabolitos secundarios que coinciden con los reportados en la literatura [19, 80]. Sin embargo, el patchoulol (principal metabolito del AE de *Pogostemon cablin*) no se encontró, ni siquiera, a nivel de trazas en el AE analizado. Uno de los hallazgos más importantes de esta investigación, es que el componente

mayoritario del AE analizado, no aparece registrado en las principales bases de datos de sesquiterpenos. Por tal razón, se hizo necesario su aislamiento y purificación a partir de la matriz compleja. Los resultados obtenidos mediante RMN, espectroscopia infrarrojo y espectrometría de masas, dieron como resultado proposición de una estructura para este compuesto mayoritario.

Es de resaltar, que en este trabajo de investigación se tuvo la colaboración del señor Arvind Kumar, estudiante de Doctorado en Química procedente de India, quien aportó sus conocimientos y experiencia en el área de fitoquímica.

Se presentaron los resultados parciales de esta investigación en los siguientes congresos, bajo la modalidad de poster, a saber: X Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Popayán (Cauca), en junio del 2009 (**Anexo 1**), XXIX Congreso Latinoamericano de Química XVI Congreso Colombiano de Química -VI Congreso Colombiano de Cromatografía, realizado en Cartagena (Bolívar), en septiembre del 2010 (**Anexo 2**), así como, en el XI Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Medellín (Antioquia), en octubre del 2011 (**Anexo 3**).

1. ESTUDIO CIENCIOMÉTRICO

La permanente necesidad de conocer los últimos avances de la ciencia y las tendencias tecnológicas requiere la aplicación de modernas herramientas como las bases de datos de artículos y patentes, para la generación de conocimiento [81]. Los análisis cientíomicos permiten cuantificar la actividad científica, comparar las políticas de investigación desarrolladas por distintos países y sus resultados, desde una perspectiva económica y social [68].

Con el objetivo de conocer la producción científica sobre la especie *P. cablin* en los últimos 10 años, se realizó una búsqueda empleando dos bases de datos, *Scopus (Elsevier)* [8] y *Web of Science (ISI, Web of Knowledge Thomson)* [9], usando como palabra clave "*Pogostemon cablin*", sin restricción alguna de categorías. Esto con el fin de acceder a las revistas y artículos de investigación y revisar las principales áreas de estudio. En el periodo de búsqueda de 2002 a junio de 2012, se encontraron 161 publicaciones en la base de datos *Scopus (Elsevier)* y de 65, en *Web of Science*.

1.1 BASE DE DATOS *Scopus (Elsevier)*

El análisis cientíomico usando la base de datos *Scopus (Elsevier)*, muestra una variación en el número de publicaciones entre los años 2002 y 2012 (**Figura 1**). Es importante resaltar, que el número de publicaciones reportadas en el año 2003 es el más bajo con respecto a las publicaciones reportadas en otros años. Los años 2002, 2010 y 2011 son los que tienen un mayor número de publicaciones. En general, existe una tendencia actual de aumento en las publicaciones, es decir, es un tema actual y de interés.

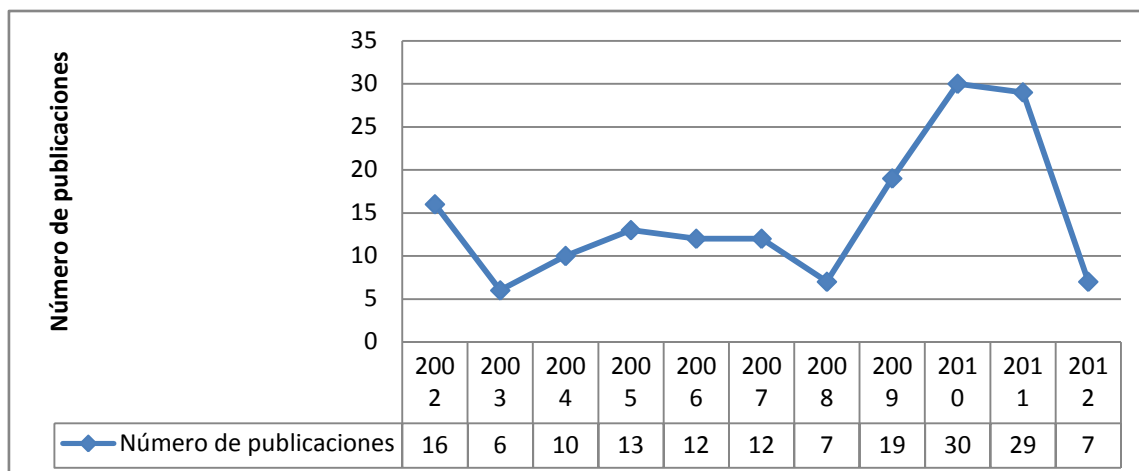


Figura 1. Relación de año - número de publicaciones sobre la especie *P. cablin*. Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: base de datos *Scopus* (*Elsevier*). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY ("*Pogostemon cablin*"). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].

P. cablin es una planta que pertenece a la familia Lamiaceae, es endémica de Filipinas, ha sido ampliamente utilizada en la medicina tradicional, por sus propiedades curativas en diferentes tipos de afecciones. El AE extraído de esta planta posee características organolépticas interesantes (aroma exótico), y propiedades como fijador, que lo hace un AE apetecido en la industria de perfumes. Sin embargo, se han tenido inconvenientes en cuanto a su propagación, porque los cultivos son atacados por algunas enfermedades, que causan daños graves, o, en el peor de los casos, la muerte de la planta. Por tal razón, se ha aumentado la producción científica en ciertas áreas de conocimiento como la agricultura y ciencias biológicas, medicina, química, toxicología y farmacéutica. En la **Figura 2**, se muestra la relación entre el número de publicaciones y las diferentes áreas de conocimiento sobre *P. cablin*.

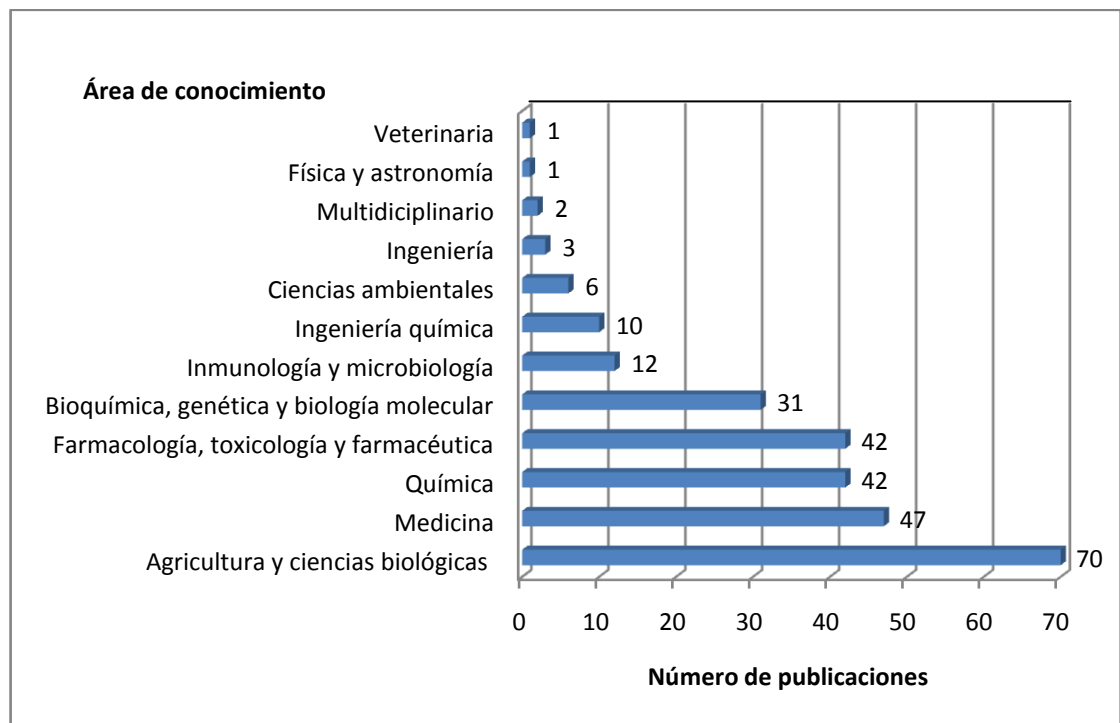


Figura 2. Relación del área de conocimiento - número de publicaciones sobre la especie *P. cablin*. Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: Base de datos *Scopus* (Elsevier). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*Pogostemon cablin*”). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].

En diversas revistas científicas aparecen publicaciones relacionadas con el cultivo de *P. cablin*, su AE y sus propiedades medicinales. En la **Figura 3**, se muestra el número de publicaciones en revistas científicas entre los años 2002 y 2012; las revistas *Journal of Essential Oil Research*, *Zhongguo Zhongyao Zazhi* y *Journal of Chinese Medicinal Materials* tienen un mayor número de publicaciones.

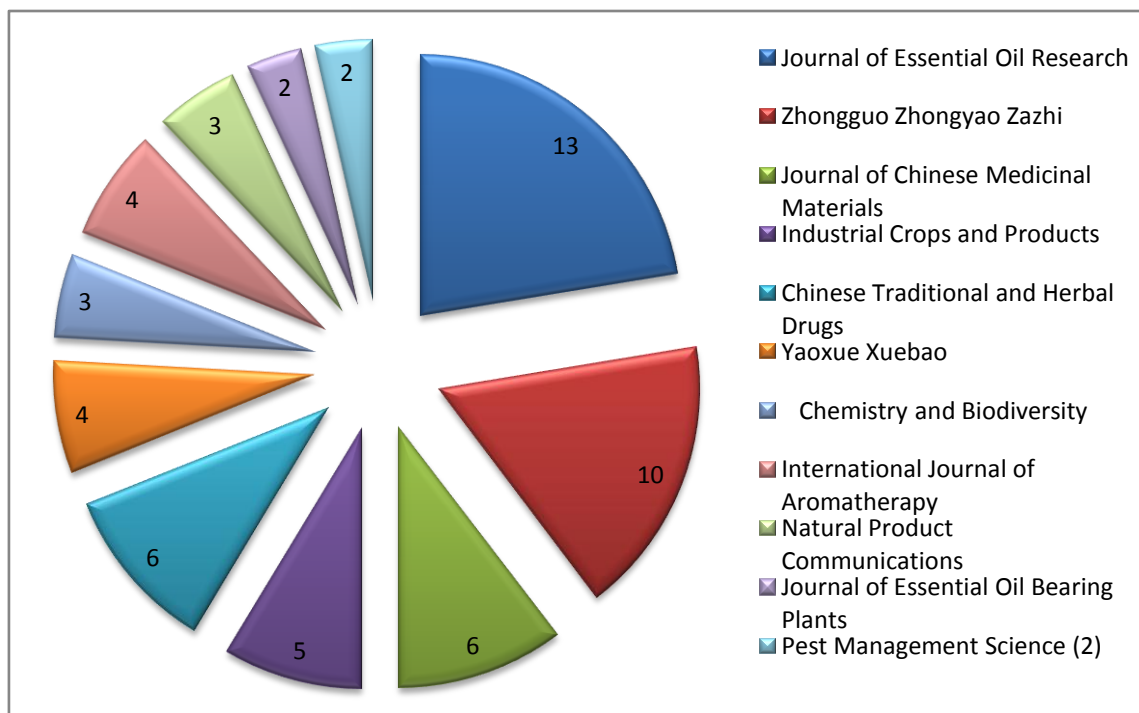


Figura 3. Relación de revistas - número de publicaciones sobre *P. cablin*. Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: base de datos Scopus (Elsevier). Ecuación de búsqueda: TITLE-ABS-KEY (“*Pogostemon cablin*”). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].

1.2 BASE DE DATOS *Web of Science*

En esta base de datos se consultaron los artículos publicados entre los años 2002 y 2012, lo cual permitió obtener una visión actualizada sobre los últimos avances y estudios sobre *P. cablin* (**Figura 4**). El año con mayor número de registros es 2011, con 18 publicaciones, seguido de los años 2010, con 18 publicaciones, y 2009 y 2007 con menos de la mitad de publicaciones con respecto al año 2011.

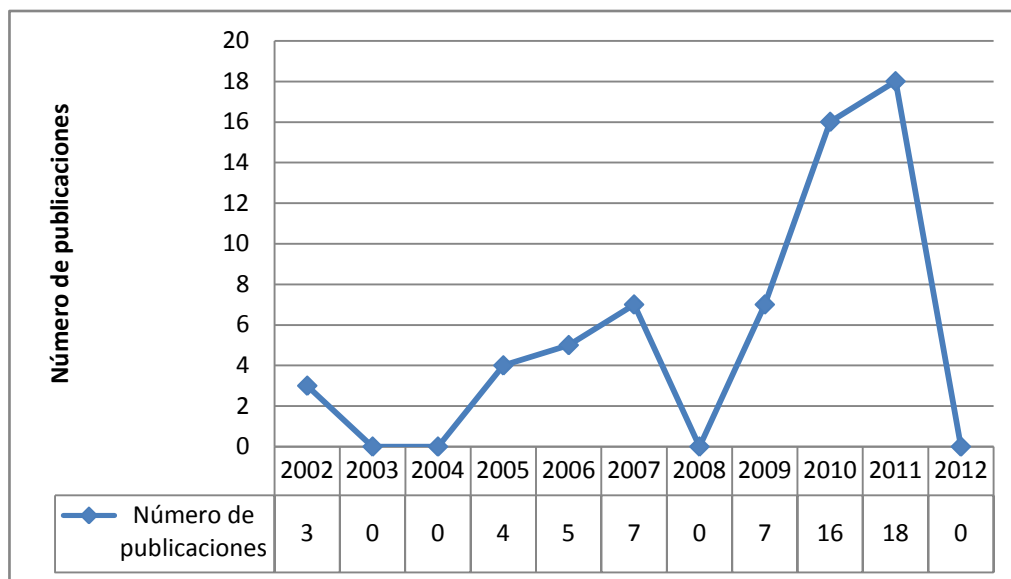


Figura 4. Relación de año - número de publicaciones sobre la especie *P. cablin*. Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: base de datos: *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*. Ecuación de búsqueda: TS= ("*Pogostemon cablin*"). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].

En esta base de datos, las revistas científicas que presentan la mayor cantidad de artículos publicados sobre *P. cablin* son: *Journal of Essential Oil Research* e *Industrial Crops and Products* (**Figura 5**).

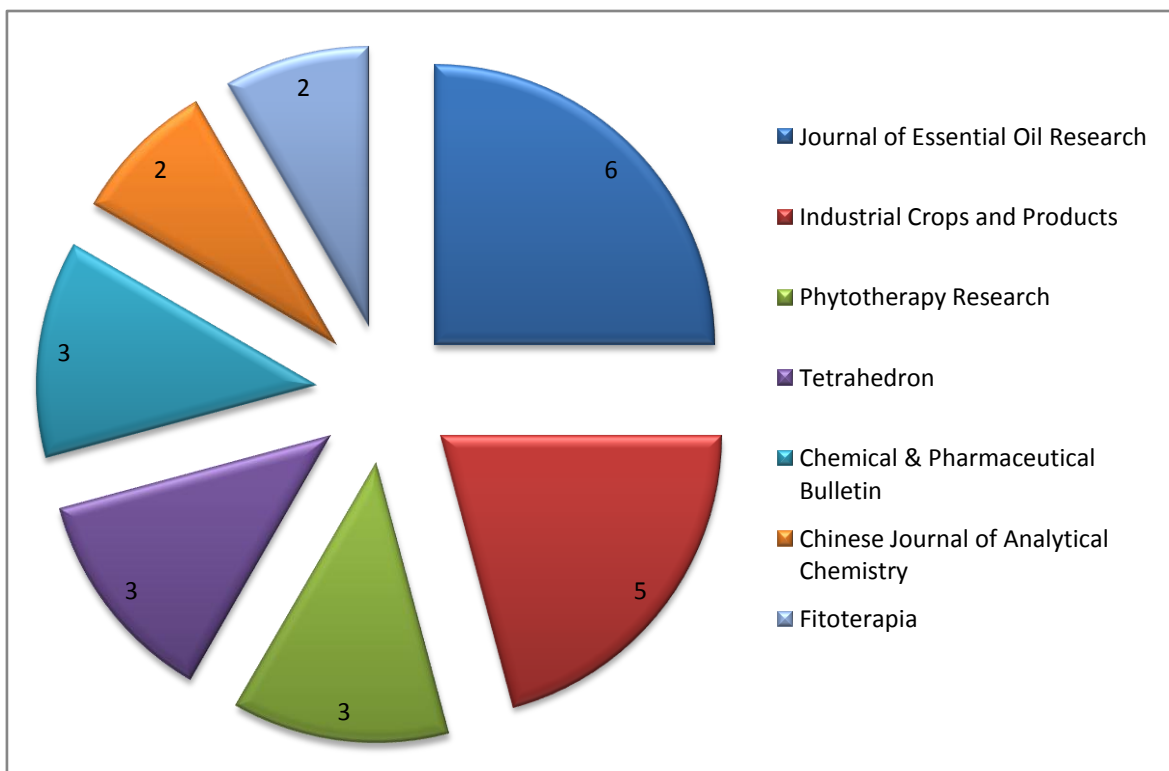


Figura 5. Relación de revistas - número de publicaciones sobre la especie *P. cablin*. Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*. Ecuación de búsqueda: TS= ("*Pogostemon cablin*"). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].

El patchoulí, por ser endémico de Filipinas, se ha introducido principalmente en países del continente asiático. Entre los países, que tienen un gran interés por el estudio de esta especie se destacan China, India y Japón; esto se puede observar en la **Figura 6**.

Con el análisis cuantitativo efectuado, se pudo concluir *grosso modo*, que el número de publicaciones sobre *P. cablin* presentó un aumento en los últimos 10 años, lo cual muestra el interés de la comunidad científica por el estudio de esta especie. Sin embargo, a pesar de la importancia de esta planta y su AE, en Latinoamérica solo existen estudios reportados en Brasil, siendo el único país de América del Sur que ha introducido esta especie. Por tal razón, la propagación de

esta planta en nuestro país representaría un aporte significativo para el desarrollo de investigaciones en algunas áreas del conocimiento como la medicina, agricultura, química, bioquímica, etc. Además, diferentes sectores de la industria se verían beneficiados puesto que se pueden generar bienes de gran valor agregado, que incentiven su desarrollo y, asimismo, permitan generar fuentes de empleo.

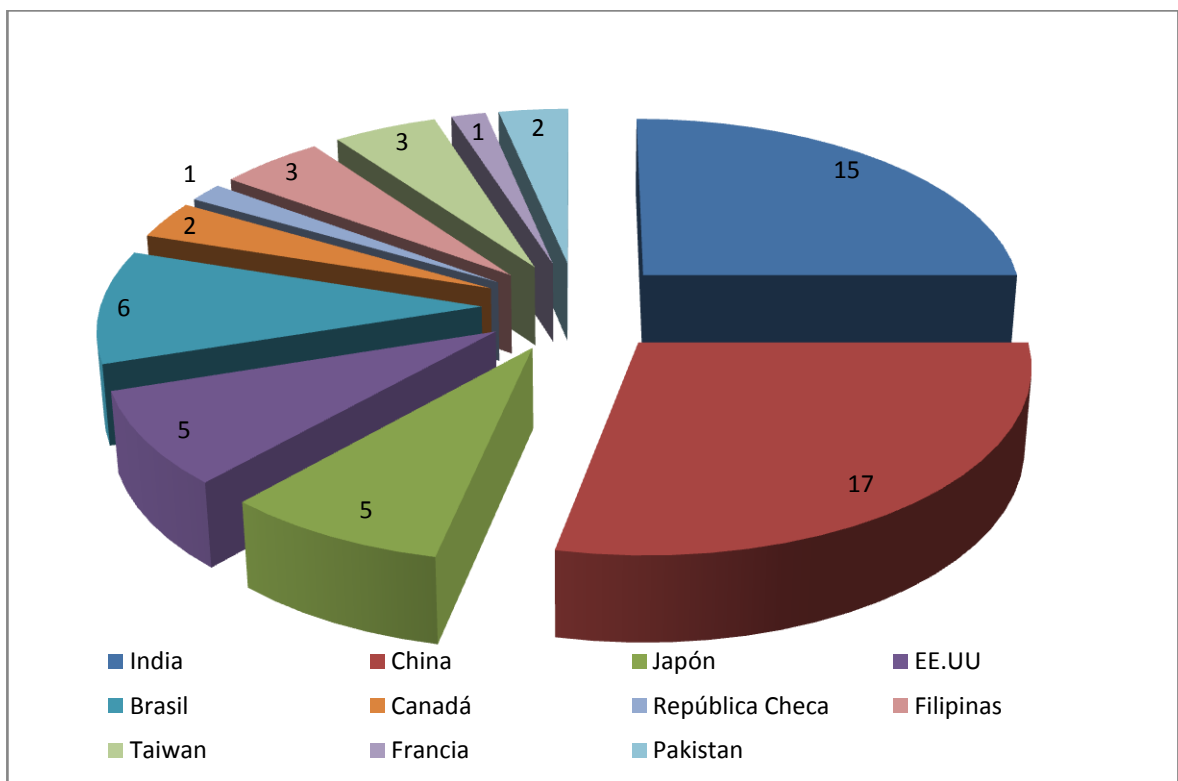


Figura 6. Relación de países - número de publicaciones sobre la especie *P. cablin*. Periodo de observación: 2002-2012. [Fuente: base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson)*. Ecuación de búsqueda: TS= ("*Pogostemon cablin*"). Fecha de consulta: 21 de junio de 2012].

2. ESTADO DEL ARTE

2.1 ACEITES ESENCIALES

2.1.1 Definición. Los AE son una mezcla compleja de compuestos producto del metabolismo secundario de las plantas, extraídos mediante destilación por arrastre con vapor o hidrodestilación. En la composición química de los AE intervienen hidrocarburos de la serie polimetilénica del grupo de los terpenos con fórmula molecular $(C_5H_8)_n$ junto con otros compuestos, casi siempre oxigenados (alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos), que son los que transmiten a los aceites el aroma que los caracteriza [7, 45].

La biosíntesis de estos metabolitos secundarios suele hallarse restringida a fases específicas del desarrollo, tanto del organismo, como de de las células especializadas, y a periodos de estrés, e.g, por la deficiencia de nutrientes, factores ambientales, o el ataque de microorganismos, entre otros [5, 64].

2.1.2 Composición química. El metabolismo secundario de las plantas es muy variable, ya que depende de diversos factores. Por esta razón, pueden producirse cambios en las proporciones de los analitos; así como transformarse unos en otros. Algunos factores que afectan la composición química de los AE son el estado y procedencia de la planta, el método de cultivo (uso de fertilizantes, abonos, pesticidas, etc.), el estado fenológico, el modo de manejo y almacenamiento del material vegetal (fresco, seco, fermentado, etc.), las condiciones geobotánicas del medio (clima, altitud, tipo de suelo, cantidad de lluvias, etc.); ciertas variables del proceso o método de extracción, su duración, temperatura, y la parte de la planta usada para la extracción [69]. Debido a los

cambios que se pueden presentar en el perfil de los metabolitos secundarios, aparecen quimiotipos que dependen de la genética de la planta y de las condiciones geobotánicas de su crecimiento [16, 24].

2.1.3 Tratamiento postcosecha. El proceso de secado representa una de las mejores alternativas de estabilización y conservación del material vegetal. Este proceso permite retirar la humedad y, posiblemente, con esto retardar la acción de enzimas que actúen y produzcan oxidaciones u otros procesos destructivos. Además, permite estabilizar el olor, color, textura, composición química, reducir el volumen y el peso del material vegetal; con lo que se facilita su almacenamiento, transporte y manipulación durante la extracción, lo que da como resultado, una reducción en los fletes y costos de embalaje [7, 15].

Los principales tipos de secado son:

- ✓ **Secado a campo:** el material vegetal cosechado se deja en el lugar de cultivo por un tiempo, lo que permite que gran parte del agua contenida en sus tejidos se evapore.
- ✓ **Secado al aire libre:** el material se deja expuesto a la radiación solar durante un tiempo determinado, siendo éste un proceso económico, pero poco adecuado, debido al deterioro que puede sufrir el material vegetal a causa de la radiación solar.
- ✓ **Secado a la sombra:** este tipo de secado se lleva a cabo a temperatura ambiente, siendo un sistema que actúa por convección de aire, en el cual, el material vegetal debe permanecer bajo la sombra o en lugares cubiertos. A pesar de ser un proceso económico y de no presentarse descomposición de los productos, causado por las temperaturas no controladas o exceso de

luminosidad, existen algunos inconvenientes que se presentan debido a que se requiere un mayor tiempo para alcanzar un secado homogéneo; así como la imposibilidad de controlar las condiciones climáticas, e.g, si el momento de la cosecha coincide con días de alta humedad, lluvia, baja temperatura, etc., no se obtendrá un buen secado y, por ende, se tendrá una conservación deficiente del material vegetal [7, 51].

2.1.4 Fermentación. Después del tratamiento postcosecha, ciertas plantas requieren de un proceso de fermentación adicional; con el fin de liberar los metabolitos secundarios volátiles y de mejorar las propiedades organolépticas de los AE extraídos.

En los tejidos vegetales de algunas plantas se almacenan, en forma natural, compuestos glicosilados, que son precursores no volátiles importantes en la producción de aromas y saborizantes. Estos compuestos se forman a partir de la unión de los terpenos a la D-glucosa, que también puede estar unida a otros azúcares como L-arabinosa, D-xilosa, entre otros. En su estructura, estos precursores poseen una aglicona terpénica, que se libera durante el proceso de fermentación, por hidrólisis ácida o enzimática, lo que permite aumentar la cantidad de volátiles presentes en la fracción aromática [18].

2.2 GENERALIDADES DE *Pogostemon cablin*

La planta *P. cablin*, conocida comúnmente como patchouli, es una hierba perenne que pertenece a la familia Lamiaceae. Esta planta puede alcanzar entre 0,5 y 1 m de altura; sus hojas tienen forma ovalada, aserradas y poseen tricomas abaxiales presentes en el envés; sus flores son pequeñas e irregulares de color blanco a

púrpura [36, 85]. Fue descrita en 1896 por el botánico Holmes, quien identificó la especie como *P. cablin* Benth, endémica de Filipinas.

Se encuentra distribuida en el continente asiático, principalmente, en Indonesia, China, India, Pakistán, Malasia y en otros países como Brasil [46, 64]. En muchos países, introducir esta especie no ha sido tarea fácil, pues la propagación se ha dificultado debido a las diversas enfermedades que atacan las partes aéreas y las raíces de la planta, e.g, los nemátodos y fitoparásitos dañan las raíces de la planta y reducen su capacidad de absorción de agua y de los nutrientes disponibles en el suelo; como consecuencia, las plantas paralizan su crecimiento y, finalmente, mueren, [27, 44, 45].

Hasta el momento, se realizaron muchos estudios enfocados en la erradicación de plagas y determinación de condiciones favorables para el desarrollo de la especie, puesto que no existe en el mercado un análogo sintético de este AE debido a la complejidad en su composición química. A pesar de que la especie *P. cablin* es la principal fuente de AE de patchoulí, existen otras especies del género *Pogostemon* como *P. hortensis*, *P. comosum*, *P. heyneanus* y *P. plectranthoides*, que producen AE; sin embargo, el aceite obtenido de estas especies es de inferior calidad y se utiliza con el propósito de aumentar la cantidad de AE de patchoulí y disminuir el costo de este [39, 85].

El AE de patchoulí se obtiene principalmente mediante destilación por arrastre con vapor de las hojas secas fermentadas, las cuales durante el proceso de fermentación mejoran el rendimiento y la calidad del AE. En un estudio publicado por Kongkathip y colaboradores [39], se encontró que las hojas fermentadas durante 77 días produjeron un rendimiento de 2,48%, en peso seco, mayor que el obtenido de la planta seca en horno a 50 °C durante 40 h (0,30% peso seco).

2.2.1 Hábitat. La planta crece en climas templados y húmedos y prefiere suelos bien drenados, ricos en nutrientes y materia orgánica. Esta especie prefiere ambientes sombreados. En un estudio realizado en el 2005, se cultivó patchoulí bajo diferentes niveles de sombra: un mayor crecimiento y área foliar se presentó cuando la planta se cultivó con 50 y 75% de sombra [58]. De igual forma, el intercalado favorece el desenvolvimiento de esta especie; al intercalar patchoulí con papaya, hubo un aumento en la producción de AE en 76%, y en las cualidades del aceite (presencia del patchoulol del 8 al 11%), comparado con el monocultivo [53].

2.2.2 Composición química. La composición química de esta especie es única y compleja. Está constituida, principalmente, por terpenos derivados de la ruta del mevalonato. Los compuestos derivados de esta ruta, también denominados isoprenos, se clasifican de acuerdo con el número de unidades de isopreno (ui.) así: monoterpenos (C_{10} , dos ui.), sesquiterpenos (C_{15} , tres ui.), diterpenos (C_{20} , cuatro ui.), sesterterpenos (C_{25} , cinco ui.), triterpenos (C_{30} , seis ui.) y tetraterpenos (C_{40} , ocho ui.); los sesquiterpenos son los terpenos más abundantes en el AE de patchoulí [69, 22].

Entre los componentes sesquitérpenicos mayoritarios, se encuentran el (-)-patchoulol y el α -patchouleno (**Anexo 4**), responsables de la calidad del aceite; de sus propiedades farmacológicas y del olor característico del AE [48, 54]. Asimismo, en el aceite se encuentran otros compuestos odoríficos, incluyendo una amplia variedad de hidrocarburos sesquiterpénicos, epóxidos, alcoholes y cetonas, los cuales, en conjunto, son los encargados de darle al AE un aroma amaderado, terroso, con notas herbáceas y florales [48].

En la **Tabla 1**, se registran algunos de los componentes sesquitérpenicos presentes en el AE y sus cantidades relativas, reportadas según la región de

cultivo [76]. En países como Tailandia e India, el AE producido es de calidad más alta; puesto que su composición química tiene un alto contenido de patchoulol (ca. 60%). Sin embargo, esto es relativo, puesto que la composición química y las cantidades relativas de los componentes presentes en el aceite varían significativamente dependiendo del lugar de procedencia del material foliar, la edad de las plantas, fertilización del suelo, riego, proceso de fermentación de las hojas secas y otros factores [19, 23, 28, 79]. El tipo y duración del proceso de extracción también es un factor importante, porque muchos componentes del AE disminuyen o se enriquecen durante el proceso de destilación comercial.

Tabla 1. Componentes mayoritarios del AE de patchoulí según la región de cultivo.

Compuestos	Tailandia [12]	Indonesia [13]	Suiza [19]	Brasil [23]	India [64]
Patchoulol	60,3	32,2	34,8	14,9	60,8
α -Bulneseno	0,9	-	16,6	-	ND
α -Guaieno	7,2	15,6	13,8	23,1	7,3
β -Patchouleno	<i>t</i>	0,2	2,1	2,9	3,0
Pogostol	-	0,2	2,5	-	1,8
β -Elemeno	0,3	1,1	1,0	0,9	ND
α -Humuleno	0,5	0,8	0,8	-	ND
β -Cariofileno	-	3,3	-	5,7	2,8

ND. No detectado

t. Trazas

Teniendo en cuenta que la composición química puede variar no solo de una especie a otra, sino también dentro de la misma especie; es factible encontrar en la naturaleza quimiotipos, es decir, individuos de una misma especie botánica que son idénticos morfológicamente, pero poseen diferente composición química de sus metabolitos secundarios. La producción de estos metabolitos depende de las condiciones genéticas, geobotánicas y agrícolas del cultivo [5, 7, 28]. En un

estudio realizado en el año 2003, se encontraron dos quimiotipos de patchoulí, uno, tipo pogostol y otro, tipo patchoulol [41, 43].

2.2.3 Propiedades biológicas. En un estudio reportado en 2011, se examinó la composición química de los extractos alcohólicos y acuosos obtenidos de las hojas de patchoulí y se evaluó la toxicidad por vía oral en ratas y la actividad antidepresiva, administrando dosis de 250, 500 y 750 mg/kg durante un período de 14 días. Se encontró, que en los extractos no hay peligro de toxicidad, hasta una dosis de 5000 mg/kg, también, se encontró que el extracto alcohólico suministrado en dosis de 500 y 750 mg/kg presentó una potencial actividad antidepresiva. Además, los extractos de esta especie presentaron actividad *in vitro* contra *Tripanosoma cruzi* [38, 47].

El AE se utiliza en la industria farmacéutica por su actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacterium coli*, *Bacterium typhosum* y *Mycobacterium tuberculosis* [34, 37, 84]. En un estudio efectuado por Kongkathip y colaboradores en 2009 [39], se encontró que el aceite que contenía la mayor cantidad de alcohol pachúlico mostró una mayor actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *B. subtilis*, que el extracto crudo de hexano. También se reportaron las actividades analgésica y antiinflamatoria para el extracto metanólico [42].

En general, el AE de patchoulí exhibe potencial como agente antimicrobiano, antiinflamatorio, antifúngico, antioxidante, antibacterial e insecticida [33, 38, 39].

2.2.4 Usos. Las hojas de patchoulí se emplearon inicialmente en India para aromatizar los primeros cargamentos de tela exportados hacia Europa, porque gracias a su olor exótico llamaba la atención de los compradores. Además, por

sus propiedades farmacológicas, esta planta también se aprovechó en la medicina popular, para el tratamiento de múltiples afecciones, como: tratamiento de resfriados, contra picaduras de serpiente, curación de quemaduras, tratamiento de la piel seca, disminuir el apetito, reducir los niveles de *stress* sin ninguna reacción alérgica, estimulante del sistema nervioso, entre otros [12, 86].

El AE se usa ampliamente en las industrias de perfumes y cosmética, principalmente, como base para perfumes, debido a sus propiedades como fijador y a su olor amaderado, terroso y alcanforado, así como en la fabricación de jabones [6], toallas de papel, cremas dentales, enjuagues bucales, productos de belleza. Este AE fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) como una sustancia apta para el consumo humano; por ello, se usa en las industrias de sabores y alimentos como aditivo natural para dar sabor a productos congelados, lácteos y cárnicos [23].

2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

2.3.1 Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Esta técnica se lleva a cabo usando un equipo de destilación tipo *Clevenger*, según los procedimientos descritos por Stashenko y colaboradores [69, 70]; se reemplaza la manta de calentamiento por un horno microondas comercial como fuente de energía (Véase, **Figura 7**). En esta técnica, el material vegetal se introduce en un balón de fondo redondo con agua (aproximadamente la tercera parte del material), y se somete a la radiación de microondas. Este tipo de radiación electromagnética es absorbida por las moléculas polares, en este caso, moléculas de agua, esto hace que las moléculas pasen a un nivel de energía rotacional superior al que se ocupaba inicialmente. Este aumento en la energía promedio del conjunto de moléculas de agua ya no corresponde al que indica el valor inicial de la

temperatura. El nuevo valor de la energía promedio está asociado con un valor de temperatura mayor. Este aumento en la temperatura, permite que el material vegetal se caliente hasta ebullición; mientras que el vapor hace que se rompan los receptáculos oleíferos y se obtenga una mezcla que, por efecto de su presión de vapor, asciende y al condensarse, forma dos capas, una, rica en aceite, y otra, rica en agua, las fases se separan por decantación.

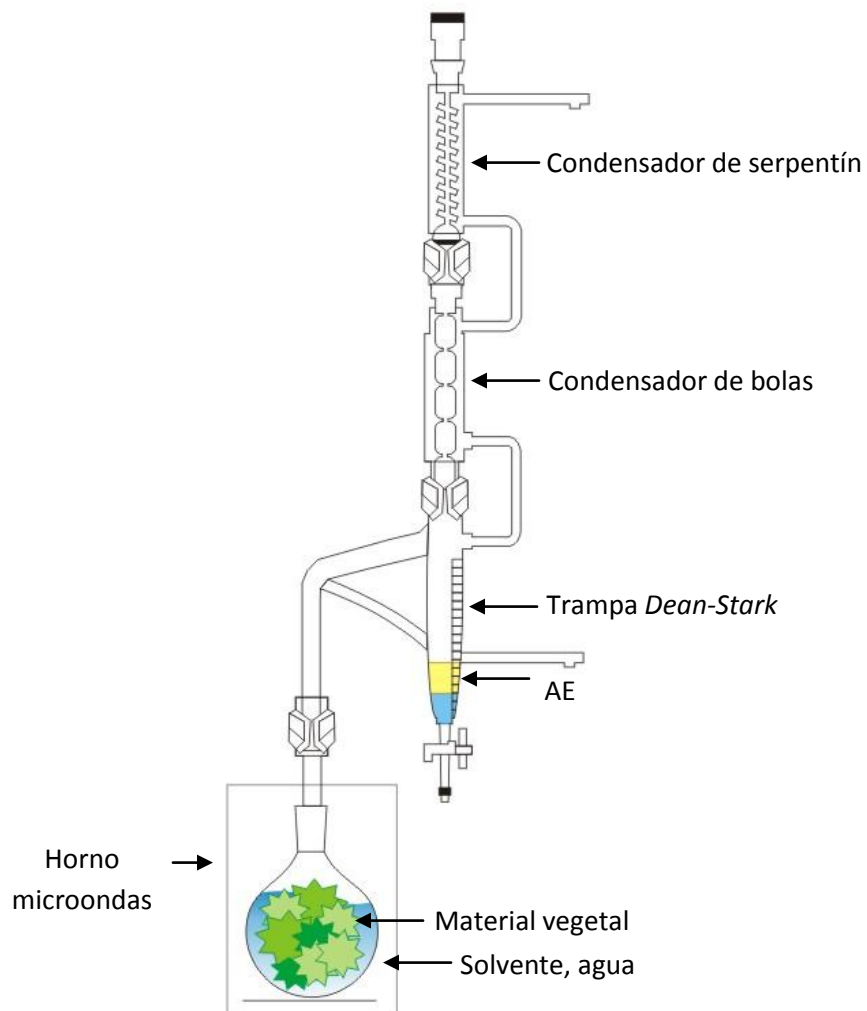


Figura 7. Esquema del montaje de hidroddestilación asistida por la radiación de microondas. Imagen modificada de [61, p.54].

2.3.2 Destilación por arrastre con vapor. Es el método más empleado, tanto a escala industrial, como en el laboratorio; permite trabajar con grandes cantidades de material vegetal y obtener AE con rendimientos altos [20, 21]. Este método consiste en una vaporización a temperaturas inferiores a las de ebullición de cada uno de los componentes volátiles por efecto directo de una corriente de vapor seco sobrecalentado, proveniente de una caldera de gas. El vapor entra en contacto con el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, y rompe los canales oleíferos en la planta, de donde arrastra los componentes volátiles que fluyen hacia un refrigerante, en el cual se condensan, y se obtiene una emulsión inestable, compuesta por agua y AE, la cual se separa por decantación [7, 20, 28]. El esquema se muestra en la **Figura 8**.

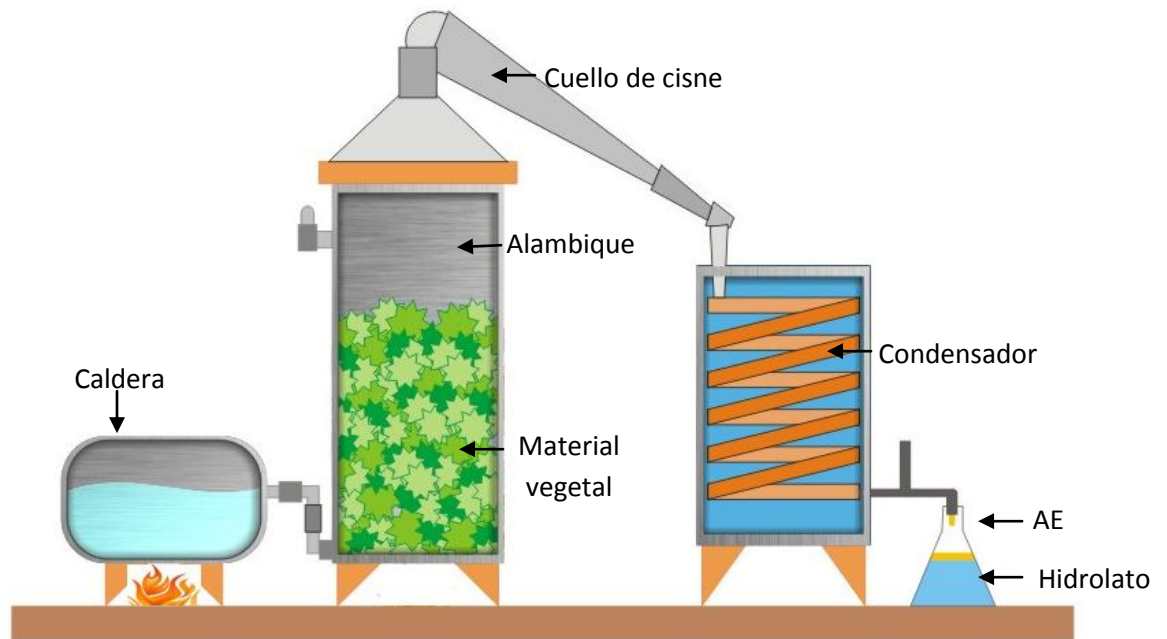


Figura 8. Esquema del montaje de destilación por arrastre con vapor. Imagen modificada de [7, p.65]

Durante la extracción por arrastre con vapor pueden ocurrir procesos colaterales, tales como polimerización y resinificación de los terpenos, hidrólisis de ésteres y formación de algunos artefactos, debido al empleo de temperaturas elevadas [69].

2.4 SEPARACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

2.4.1 Cromatografía de gases. La cromatografía líquido-sólido (LSC), o cromatografía de adsorción, es la modalidad cromatográfica más antigua. Sus orígenes se remontan a los trabajos realizados por el botánico ruso Mikhail Tswett en 1903, y publicados en 1906, en los cuales encontró que los pigmentos vegetales podían separarse en columnas de vidrio con un adsorbente finamente dividido, carbonato cálcico, percolando éter de petróleo y observando la formación de zonas amarillas y verdes. Más tarde, él designó como “cromatografía” (escritura del color) al fenómeno observado [11, 50]. Fue a partir de este momento, que se empleó este término para referirse a todos los procesos que conlleven la distribución de los componentes entre dos fases, una móvil y otra estacionaria, así no sean coloreadas las zonas separadas.

La cromatografía de gases (GC) es una de las múltiples técnicas de la familia grande de “Métodos de Separación” [62, 25, 66], en la cual, la muestra es vaporizada y arrastrada por una fase móvil a través de la columna. Esta técnica se fundamenta en una distribución “asimétrica” de los analitos o componentes de una mezcla, entre dos fases, una móvil gaseosa (e.g., He, Ar, H₂, N₂) y otra estacionaria (f.e.); esta última constituida por un sólido o líquido soportado sobre las paredes de la columna.

En cuanto a la técnica de separación, la GC usa columnas y el modo de desarrollo es la elución de los componentes que se mueven a través de la columna en la misma dirección del gas de arrastre (fase móvil), y con una velocidad que depende de sus afinidades (solubilidad) con la f.e. [26, 50, 52]. Para medir la retención de los compuestos, se utiliza la constante de distribución (K), la cual depende de la composición de la fase estacionaria y la polaridad de la fase móvil [69, 56]. Es importante tener en cuenta que la columna es la parte más importante del sistema cromatográfico y separa los componentes de la mezcla, dependiendo de su eficiencia, capacidad y condiciones operacionales [71].

2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En esta técnica se aprovecha la ventaja que tiene la GC para separar los componentes de una mezcla compleja con la capacidad de la espectrometría de masas (MS) para identificarlos; por tal razón, la técnica GC-MS es una poderosa herramienta, capaz de separar e identificar múltiples componentes presentes en una muestra en cantidades muy pequeñas. Esta técnica se emplea en conjunto con UV-Vis, IR, RMN, rayos X, etc. [1, 75], para establecer la estructura química, masa molecular y composición elemental de moléculas, en su gran mayoría orgánicas.

El principio de operación de la espectrometría de masas consiste en la generación de iones moleculares cargados positivamente y fragmentos de moléculas mediante el bombardeo con electrones (con energía de 70 eV), los cuales impactan las moléculas provenientes de la columna GC. Los iones fragmento producidos entran al filtro de masas, *i.e.*, cuadrupolo, donde se separan de acuerdo con su relación m/z . Después de la detección de los iones en un electromultiplicador, se obtiene la corriente iónica total, la cual se convierte en un cromatograma, que posee información sobre los t_R de cada compuesto y sus espectros de masas, consistentes con sus patrones de fragmentación únicos. MS

es un método de detección de alta sensibilidad, con una cantidad mínima de muestra en el intervalo de 0,1 a 1 ng por compuesto [49, 72, 77].

2.5 TÉCNICAS DE SEPARACIÓN

2.5.1 Cromatografía en capa fina. La cromatografía en capa fina (*Thin-Layer Chromatography*, TLC) tuvo sus inicios en 1938, cuando Izmailov y Shraiber [83] esparcieron óxido de aluminio sobre placas no compactas de vidrio para separar una mezcla de fármacos. El método fue desarrollado más adelante por Kirchner, Miller y Keller [83], y se usó hasta entonces casi exclusivamente para la separación de terpenos. Sin embargo, no se reconoció la importancia general de este método hasta los trabajos de Stahl [78], quien describió el equipo y absorbentes eficientes, y estandarizó el procedimiento para la preparación de las placas [73].

Esta técnica consiste esencialmente en el empleo de capas finas y uniformes de adsorbentes normalizados sobre soportes rígidos (placas de vidrio, porta-objetos de microscopía, poliéster, etc.), en los que se depositan mezclas o sustancias puras, para que, mediante el desarrollo con una fase móvil (disolventes) en una cubeta, puedan separarse e incluso identificarse por medio de la capacidad de adsorción [4]. Algunas de las principales ventajas, por las que este método de separación ha alcanzado gran difusión, son la sencillez, bajo costo, rapidez, sensibilidad en la detección de pequeñas cantidades de sustancia y el uso de diferentes reveladores [29, 60, 78, 83].

Para determinar las posiciones relativas de las señales, una vez revelado el cromatograma, se utiliza el concepto de R_f o factor de retención (**Ecuación 1**), el cual representa la relación entre la distancia recorrida por la sustancia y la

recorrida por el frente del eluyente. Este parámetro indica la afinidad relativa de la sustancia por el adsorbente o por el eluyente.

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida desde el origen por el compuesto}}{\text{Distancia recorrida desde el origen por el frente del eluyente}} \quad \text{Ecuación 1.}$$

El valor del R_f está condicionado por numerosos factores, tales como las variaciones en la composición del líquido de desarrollo, la temperatura que modifica el coeficiente de reparto, la viscosidad del eluyente, la naturaleza del adsorbente y las condiciones de trabajo. Por ello, para dar el valor del R_f como una característica propia de cada sustancia, hay que especificar las condiciones en las cuales se ha ejecutado el ensayo.

2.5.2 Cromatografía en columna. Esta técnica es muy empleada para la separación de mezclas y purificación de sustancias a escala preparativa. La técnica consiste en llenar la columna de vidrio con un adsorbente, el cual se conoce como fase estacionaria y se encuentra constituido por pequeñas partículas sólidas, que tienen la capacidad de retener los componentes de la mezcla. Los adsorbentes más usados son gel de sílice (óxido de silicio), alúmina (óxido de aluminio), celulosa, florisil (silicato de magnesio) y sulfato de calcio.

La retención se debe a la competencia que se establece entre la fase móvil y la superficie de adsorbente, y entre el analito y la superficie de adsorbente. Si las fuerzas de interacción de la fase estacionaria con el analito son débiles, éste será poco retenido, y eluirá rápidamente a través de la columna; por el contrario, si las fuerzas de interacción son muy fuertes, su elución se verá retardada, e incluso puede quedar retenido en la fase estacionaria.

En esta modalidad cromatográfica, el proceso de adsorción del analito está gobernado por los grupos hidroxilo (silanol Si-OH) presentes en la superficie de la sílice o la alúmina.

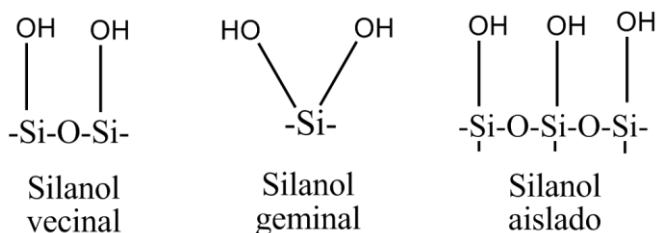


Figura 9. Tipos de grupos silanol.

Diversos grupos de silanol (Véase **Figura 9**) interactúan con el analito, lo que genera atracciones específicas; las más representativas son:

- Interacción dipolo-dipolo; ya sea entre moléculas de momento dipolar permanente o entre dipolos inducidos.
- Interacción por puente de hidrógeno.
- Mecanismos de transferencia de carga.
- Formación de complejos π .

La velocidad de migración de las sustancias sobre un adsorbente determinado depende del disolvente a emplear y varía según las constantes dieléctricas de los mismos. Sobre esta base se construyen las series eluotrópicas (Véase **Tabla 2**).

Tabla 2. Serie eluotrópica según Snyder de algunos disolventes con sus constantes dieléctricas [67, 83].

Solventes	Fuerza de elución ϵ		Constante dieléctrica, D
	Alúmina	Sílica	
<i>n</i> -Pentano	0,00	0,00	1,84
<i>n</i> -Hexano	0,01	0,01	1,88
<i>n</i> -Heptano	0,01	0,01	1,92
Éter etílico	0,38	0,38	4,33
Cloroformo	0,40	0,26	4,8
Acetato de etilo	0,58	0,38	6,11
<i>n</i> -Propanol	0,82	-	21,8
Etanol	0,88	-	25,8
Metanol	0,95	-	33,6

Snyder [59] clasificó empíricamente los disolventes en orden creciente de fuerza de elución (ϵ°), y definió esa fuerza de elución como la energía de absorción del disolvente por unidad de área. En la **Tabla 2** se reportan los valores de ϵ° indicados para los distintos disolventes obtenidos sobre alúmina, con relación a los volúmenes de retención de muestras estándar [59]. Los primeros miembros de la serie poseen un valor muy bajo de fuerza de elución, es decir, producen largos tiempos de retención; todo lo contrario ocurre con los últimos miembros de la lista de disolventes.

2.6 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

2.6.1 Espectroscopía de infrarrojo. La espectroscopía de absorción de infrarrojo es una técnica analítica de gran importancia para la determinación de los grupos funcionales y de la estructura química de un compuesto desconocido. Esta técnica espectroscópica informa sobre la energía de las vibraciones moleculares. Todos los átomos en las moléculas vibran constantemente alrededor de sus posiciones de equilibrio. El registro gráfico del porcentaje de radiación absorbida -

o transmitida-, por una muestra en función de la longitud de onda o del número de ondas de la radiación infrarroja incidente es lo que se llama un espectro infrarrojo [63, 74].

2.6.2 Resonancia magnética nuclear. La resonancia magnética nuclear es una técnica relativamente moderna, en comparación a otras espectroscópicas como UV-Vis e infrarrojo. Fue descubierta en 1946 por dos grupos de físicos, dirigido por el profesor Purcell, de la Universidad de Harvard [56], y el encabezado por el profesor Bloch, de la Universidad de Stanford [10], quienes obtuvieron el premio Nobel de Física en 1952, por la importancia de sus descubrimientos. Desde su desarrollo inicial como técnica espectroscópica, la RMN ha expandido continuamente su área de aplicación, siendo hoy una herramienta imprescindible en la determinación de estructuras químicas; así como en el estudio de la dinámica de procesos en fase condensada.

La RMN se manifiesta en sistemas magnéticos constituidos por elementos, núcleos o electrones, que poseen momento magnético y momento angular no nulos. Esta técnica espectroscópica surge de la interacción lineal de los momentos magnéticos nucleares con un campo magnético constante. La orientación, que adoptan los núcleos en el campo magnético, corresponde a diversos estados de energía; la diferencia entre estos estados es proporcional a la intensidad del campo magnético aplicado. Si dichos núcleos se someten a una radiación electromagnética de frecuencia equivalente a la separación entre tales estados de energía, se logrará inducir en los núcleos un cambio de un estado a otro. El efecto total será una absorción de energía por parte de los núcleos a la frecuencia denominada “de resonancia”.

Generalmente, se emplean campos magnéticos de intensidades entre 10 y 25 kG, y, por lo tanto, las frecuencias de resonancia de los elementos químicos se

localizan en la zona de radiofrecuencias. Las aplicaciones más divulgadas de la RMN están en el área de la elucidación estructural mediante experimentos que hacen uso de los núcleos ($I = \frac{1}{2}$) ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F y ^{31}P . De hecho, estos núcleos se incluyen simultáneamente en muchas sondas de detección de espectrómetros modernos de RMN.

La importancia de la RMN en el análisis químico está en la existencia de una gama de frecuencias de absorción para cada isótopo, las cuales dependen del entorno químico del núcleo observado. Los electrones presentes en el núcleo pueden formar una pantalla magnética, provocando que el campo magnético que experimenta el núcleo observado resulte ligeramente diferente al campo magnético aplicado. Estos efectos se conocen como efectos de protección y son la causa del desplazamiento químico, es decir, de la separación entre una señal de resonancia de interés y otra señal arbitrariamente escogida como término de referencia. Para compuestos diferentes e incluso para núcleos situados en distintos lugares de una misma molécula, se hallan distintas frecuencias de resonancia. El área de cada una de las señales originadas en el espectro de RMN es proporcional al número de núcleos que intervienen en el proceso de absorción de radiofrecuencia [55, 82]. Además, las señales o frecuencias de adsorción pueden presentar ligeras inflexiones o desdoblamientos, provocados por la acción mutua entre núcleos vecinos en la molécula, lo que permite obtener información sobre el número y disposición de los núcleos cercanos. De manera experimental, se han desarrollado tablas de distintos tipos de núcleos que pueden presentarse en diferentes compuestos. De esta manera, se pueden interpretar los espectros de RMN usando las tablas de desplazamientos químicos, tanto de ^1H , como de ^{13}C , para distinguir los diferentes núcleos presentes en la molécula (aromáticos, etilénicos, alifáticos, etc.) [14].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

P. cablin es una planta introducida principalmente en países del continente asiático y en países como Brasil. Introducir esta planta en nuestro país no ha sido tarea fácil, puesto que, la planta es afectada por nematodos y fitoparásitos responsables de atacar las partes aéreas y raíces de la planta, impidiendo el crecimiento y como consecuencia, causando la muerte de la especie. Por este motivo, hasta el momento, no existen reportes en la literatura sobre la composición química del AE obtenido de plantas cultivadas en Colombia.

El AE de *P. cablin* es muy apeteído por la industria perfumística siendo usado como base para perfumes debido a sus propiedades fijadoras, en la industria de alimentos como aditivo natural aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) en la lista de sustancias para el consumo humano [23]. También es usado en la fabricación de productos de aseo, eg toallas de papel, enjuagues bucales, cremas dentales, entre otros. El valor comercial del AE está determinado por la composición química, en el año 2010 se comercializó entre €35-40/kg en Indonesia [23]. La principal ventaja de producir AE de patchoulí es porque hasta el momento no se ha logrado obtener sus componentes mayoritarios (patchouleno y patchoulol), responsables de la calidad y el costo del AE.

Es así, como el estudio de las plantas aromáticas y medicinales es una forma de generar conocimiento de soporte para el desarrollo de la cadena productiva de aceites esenciales y llegar a una situación de desarrollo sostenible, donde se puedan cultivar este tipo de especies, obteniendo beneficios, económicos y ecológicos.

Por estos motivos, por la necesidad y el interés de fomentar el fortalecimiento de la industria de AE en nuestro país, esta investigación busca realizar un estudio de

la composición química del AE obtenido de la especie *P. cablin* cultivada en parcelas experimentales, modificando algunas variables como métodos de extracción y condiciones de cultivo.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar los metabolitos secundarios volátiles y semivolátiles del AE de *Pogostemon cablin* obtenidos mediante diferentes técnicas de extracción y condiciones de cultivo, a partir de plantas cultivadas en las parcelas experimentales.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer y mantener un cultivo en dos áreas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto CENIVAM.
- Obtener mediante diferentes métodos de extracción aceite esencial de *Pogostemon cablin*
- Estudiar la influencia de las condiciones de cultivo (sombra Vs sol) y postcosecha (seca Vs fermentada) sobre la composición química y el rendimiento del AE.
- Identificar los componentes mayoritarios en el AE por técnicas cromatográficas y espectroscópicas.

5. HIPÓTESIS

El AE de patchoulí está compuesto por sesquiterpenos cíclicos, entre los cuales se encuentran el patchoulol (33,7%) y el patchouleno (22,2%) que están directamente relacionados con la calidad del AE [13, 36]. En el presente trabajo, se pretende obtener AE de patchoulí cultivado en Colombia bajo diferentes condiciones de cultivo y extracción. Además, caracterizar los componentes mayoritarios presentes en el AE.

6. METODOLOGÍA

Esta investigación se desarrolló en varias etapas, que se muestran en la **Figura 10**.

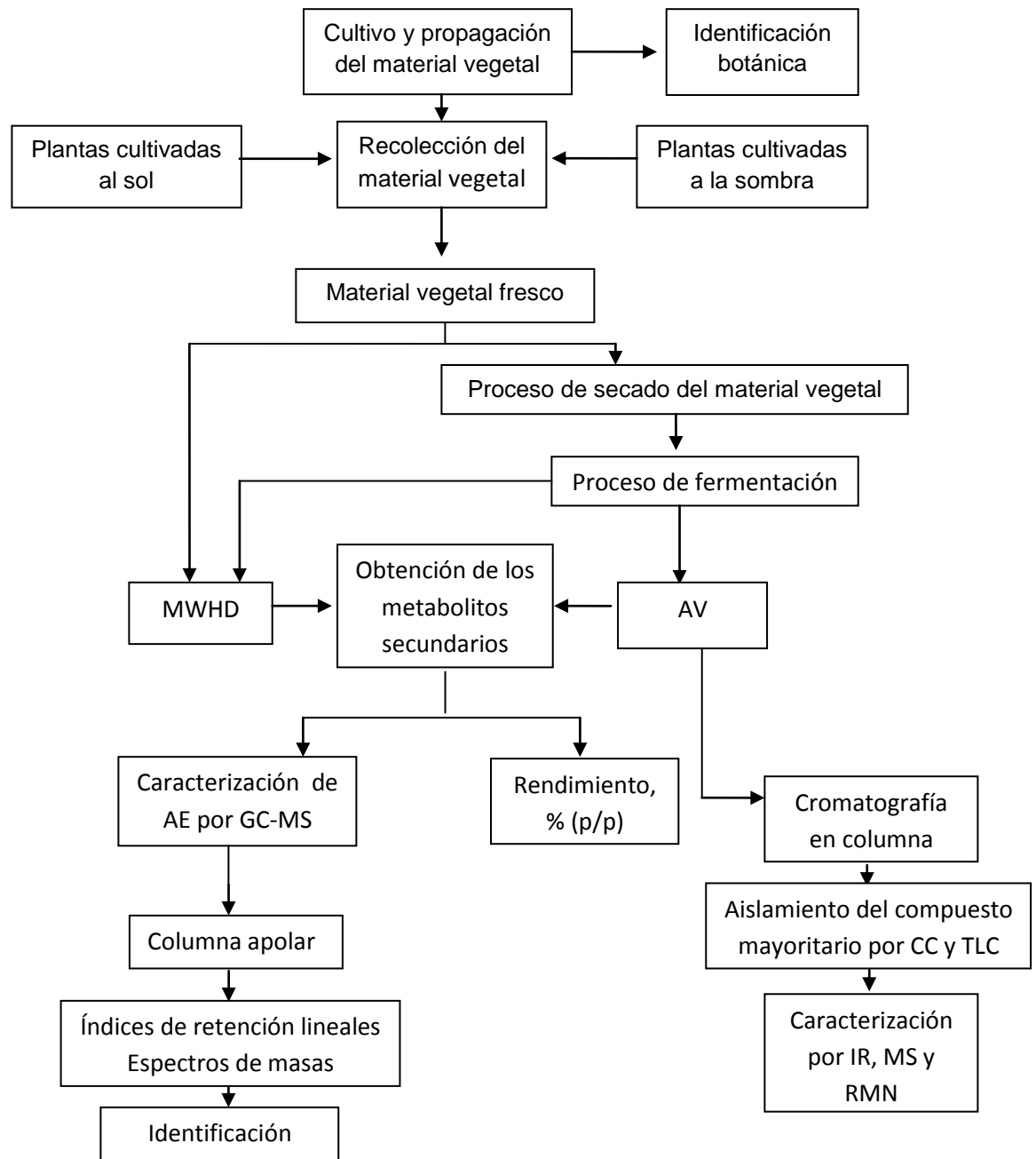


Figura 10. Diagrama de flujo de la metodología desarrollada durante la investigación.

6.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal destinado a las extracciones, se adquirió comprando semillas de *P. cablin* en la página: <http://www.tradewindsfruitstore.com/servlet/StoreFront>, para su posterior siembra y propagación. Se designó un área de 157 m² para la propagación, distribuida en cuatro parcelas experimentales del Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, en el campus universitario de la UIS (**Figura 11**).



Figura 11. Cultivos de “*Pogostemon cablin*” Fuente: Fotografías tomadas por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: abril de 2010.

6.1.1 Cultivo y propagación. Las semillas se sembraron ca. 3 cm de distancia una de la otra, en un germinador que contenía una mezcla de materia orgánica y arena 60:40, respectivamente. Estos germinadores se almacenaron en un vivero con malla polisombra que permitía 50% de radiación incidente, hasta los 60 días de edad, momento en el cual las plántulas se trasladaron a campo. A partir de

estas plantas, se realizó la propagación por medio de esquejes. Se plantaron segmentos nodales de 15 cm de largo sobre bandejas de semilleros, a una profundidad de 4 cm, en un sustrato que contenía una cantidad adecuada de materia orgánica y arena, con un pH entre 6,0 y 7,0. Los esquejes enraizados (35 días de edad) del vivero se trasplantaron a campo, a una distancia de 70 cm, entre surcos, y 60 cm, entre plantas (**Figura 12**).

Los cuidados del cultivo consistieron en la eliminación de malezas cada 40 días, control de enfermedades y plagas (fumigación), abono en cada cosecha (cada 4 meses), y el riego diario de los cultivos todas las mañanas.

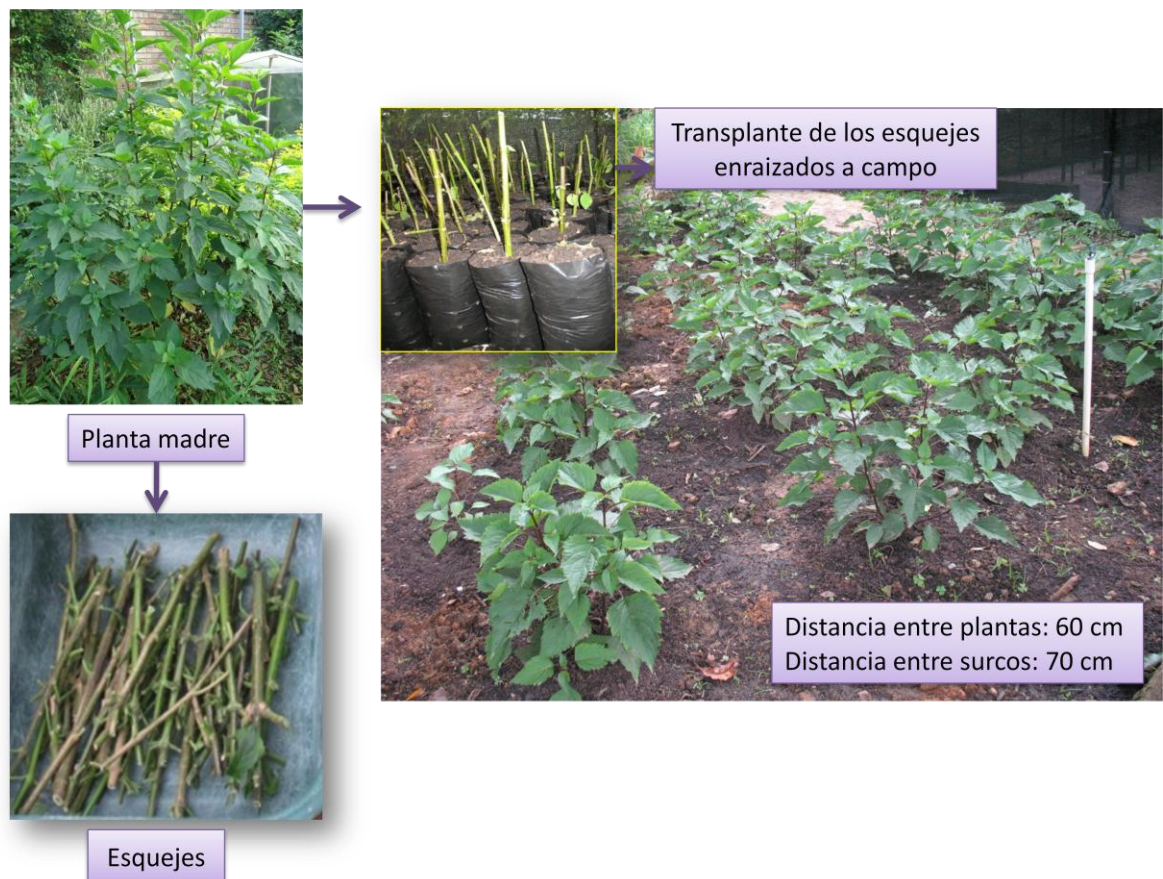


Figura 12. Esquema general del método de propagación de *Pogostemon cablin*. Fuente: Fotografías tomadas por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: abril de 2010.

Con el propósito de conocer el estado nutricional del suelo en el que se cultivó la especie, se hizo un análisis de micronutrientes, macronutrientes y materia orgánica. El análisis se realizó en el Laboratorio Químico de Suelos de la Universidad Industrial de Santander.

6.1.2 Recolección. Se recolectó el material vegetal a los 4 meses de sembrado (Véase **Figura 13**). El material vegetal recolectado se dividió en dos partes, a saber: una parte se usó inmediatamente para realizar la extracción de los metabolitos secundarios volátiles mediante MWHD y AV, mientras que la otra parte, previo su extracción, se sometió a un tratamiento postcosecha.

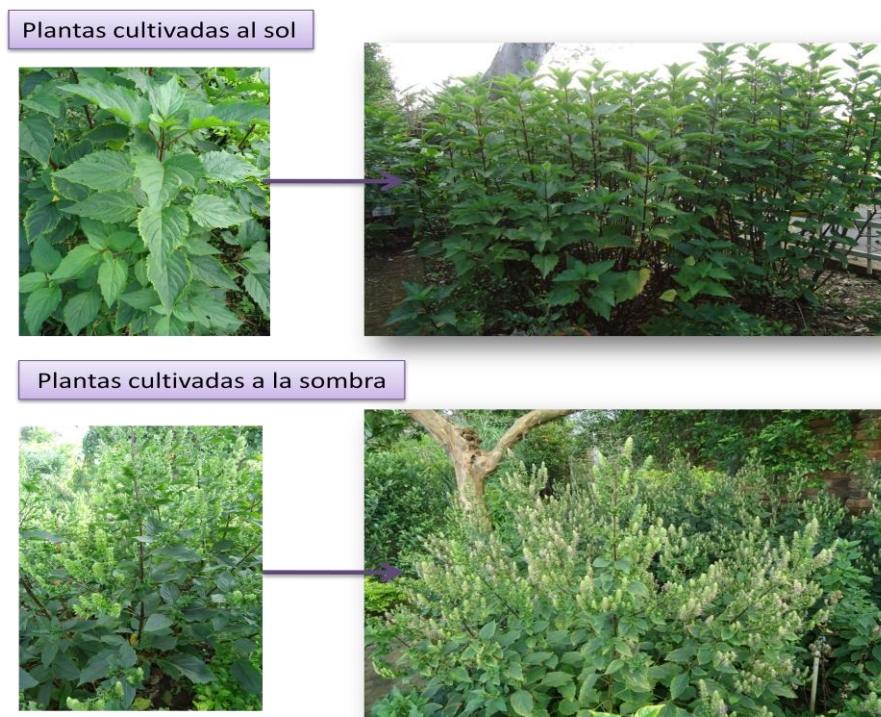


Figura 13. Fotografías de los cultivos de *P. cablin* al sol y a la sombra. Fuente: Fotografías tomadas por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: abril de 2010.

6.1.3 Secado. Como se mencionó anteriormente, una parte del material vegetal se sometió a un tratamiento postcosecha. Este consistió en 12 días de secado a la sombra y 10 días de fermentación. El secado del material vegetal se realizó tomando pequeñas porciones y atándolas mediante una cuerda. Estos manojos de material vegetal se colgaron dejando una distancia de 30 cm entre manojos y manojos, para asegurar la circulación de flujo normal de aire, y así obtener un secado homogéneo y para evitar la aparición de hongos (Véase **Figura 14**).



Figura 14. Fotografías del proceso de secado del material vegetal. Fuente: Fotografías tomadas por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: abril de 2010.

El control del contenido de agua en las plantas se realizó pesándolas diariamente, hasta que el peso se hizo constante. El porcentaje de agua en las plantas se determinó con base en la diferencia de peso entre el material vegetal seco y el fresco.

Una vez se finalizó el proceso de secado, se procedió a realizar la fermentación del material vegetal. Para ello, el material vegetal seco se apiló y almacenó en costales de fique durante 10 días, esto, con el fin de favorecer el proceso enzimático para la producción de metabolitos secundarios.

6.2. OBTENCIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

La extracción de los metabolitos secundarios se realizó por dos técnicas, a saber: Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y destilación por arrastre con vapor. A continuación, se hace una breve descripción de cada una estas técnicas.

6.2.1 Extracción por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas. Esta técnica se utilizó de acuerdo con el procedimiento descrito por Stashenko y colaboradores [70]. El montaje (Véase **Figura 15**) consta de un equipo de destilación tipo *Clevenger*, con reservorio de destilación *Dean-Stark* y adaptación para calentamiento a través de un horno de radiación de microondas, marca SAMSUNG, modelo AMW8113ST (Malasia), con una potencia de salida de 1600 W, y frecuencia de radiación de 60 Hz. Se empleó un balón de fondo redondo con capacidad de 2 L, en el cual se ubicó el material vegetal y la cantidad de agua necesaria.

Una vez listo el montaje de MWHD, se procedió a realizar la extracción del AE bajo las condiciones de trabajo que se registran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Condiciones de trabajo utilizadas en la MWHD.

Parámetros	Descripción
Material vegetal, g	ca. 300
Cantidad de agua, mL	500
Potencia, W	1600 (50%)
Tiempo extracción, min	45 (3x15)

Se recolectó el AE obtenido en el reservorio de destilación *Dean-Stark*, en el cual se dejó decantar para posteriormente ser separado del agua por diferencia de densidades. El AE obtenido se secó agregando Na_2SO_4 anhidro de Merck (Darmstadt, Alemania, lote A0011849). Finalmente, el AE se pesó en una balanza METTLER TOLEDO PB 1502-S (Küsnacht, Suiza). Los pesos se promediaron y el rendimiento del aceite se calculó con base en el peso inicial de material vegetal.

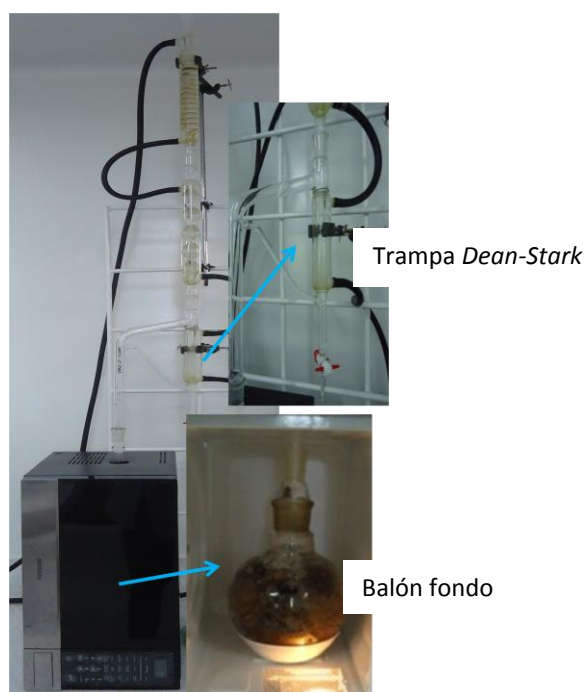


Figura 15. Fotografía del equipo utilizado para obtener los AE por la técnica de MWHD. Fuente: Fotografía tomada por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: octubre de 2011.

6.2.2 Destilación por arrastre con vapor. En este procedimiento se usó un destilador a escala piloto de acero inoxidable (Véase **Figura 16**), conformado por un generador de vapor (caldera de gas), un alambique (extractor), un condensador de serpentín, un cuello de cisne o de ganso y un vaso Florentino. Se introdujo el material vegetal en base seca (ca. 11 kg), en un alambique conectado a un generador de vapor y unido mediante un cuello de cisne a un condensador de serpentín. Los AE se recolectaron en un vaso Florentino y se separaron del agua por decantación. El tiempo de la extracción fue de 90 min.



Figura 16. Fotografías del equipo a escala piloto empleado para la obtención de los AE por el método de destilación por arrastre con vapor. Fuente: Fotografías tomadas por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: abril de 2010.

6.3 RENDIMIENTO DE LOS ACEITE ESENCIALES

Los rendimientos de los AE obtenidos por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas y arrastre con vapor se calcularon mediante la **Ecuación 2**:

$$\text{Rendimiento} = \left[\frac{W_{\text{AE}}}{W_{\text{MV}}} \right] * 100\%$$

Ecuación 2.

donde:

W_{AE} : Peso del aceite esencial (g);

W_{MV} : Peso del material vegetal (g).

6.4 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS POR GC-MS

Una vez se retiró el agua presente en los aceites, se tomó una alícuota de 50 μL , se agregó 1 μL de patrón interno (*n*-tetradecano, pureza 99,5%, Merck, Darmstadt, Alemania) y se disolvió en 1 mL de diclorometano, para el análisis cromatográfico por columna apolar.

6.5 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

La identificación de los metabolitos secundarios volátiles del AE se realizó empleando la técnica analítica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), usando columna capilar de fase estacionaria apolar.

6.5.1 Columna apolar. El análisis por columna apolar se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus* (Palo Alto, CA, EE.UU.) acoplado a un detector selectivo de masas (MSD) *Agilent Technologies MSD 5973 Network* (Véase **Figura 17**), ubicado en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS.

El sistema de inyección está equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (250 °C, relación de *split* 1:30), un inyector automático *Agilent Technologies 7863 Series*. Se empleó helio como gas de arrastre (99,995%, Linde, Bucaramanga), con una presión de entrada en la cabeza de columna de 16,47 psi y una velocidad lineal constante de 26 cm s⁻¹.



Figura 17. Fotografía del cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890 Plus*, con detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973 Network*. Columna DB-5 (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm) con fase estacionaria de 5% fenil- poli(metilsiloxano). Fuente: Fotografía tomada por la autora; lugar: CENIVAM, UIS. Fecha: abril de 2010.

En el proceso de separación se empleó una columna capilar apolar DB-5 MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 60 m x 0,25 mm, D.I. x 0,25 µm, d_f, con fase estacionaria de 5% fenil-poli(metilsiloxano). La programación de la temperatura del horno fue inicialmente de 70 °C durante 1 min, @ 4 °C/min hasta 150 °C, @ 5 °C/min hasta 250 °C, finalmente, la temperatura aumentó @ 6 °C/min hasta llegar

a 280 °C (10 min). En el análisis por espectrometría de masas se usó ionización por impacto de electrones con una energía de 70 eV. Las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron de 230 y 280 °C, respectivamente. El flujo constante de He fue de 1 mL/min. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstituidas (TIC) se obtuvieron en un analizador cuadrupolar (150 °C), por medio de barrido automático de frecuencia (*full scan*) a 4,75 *scan s*⁻¹, en el rango de masas de *m/z* 40-350.

Finalmente, los datos cromatográficos se adquirieron y procesaron en un sistema de datos HP-MS *ChemStation* (Versión 1.05), que incluye las bases de datos ADAMS, NIST y WILEY.

6.6 IDENTIFICACIÓN

La identificación de los metabolitos secundarios se llevó a cabo usando criterios cromatográficos y espectroscópicos.

- ❖ **Parámetros cromatográficos.** Para la identificación de los metabolitos volátiles se emplearon los índices de retención lineales. Estos se calcularon teniendo en cuenta los tiempos de retención, *t_R*, de una serie homóloga de sustancias de referencia, hidrocarburos lineales desde C₁₀ hasta C₂₅, analizados en el GC bajo las mismas condiciones operacionales que los AE, usando columna DB-5MS. Para su determinación se empleó la **Ecuación 3** [35, 40]:

$$I_k = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 3.}$$

donde $n < N$

n = Número de átomos de carbono del hidrocarburo lineal, que eluye antes del compuesto de interés.

t_{Rx} = Tiempo de retención del compuesto de interés (min).

t_{Rn} = Tiempo de retención del hidrocarburo lineal, que eluye antes del compuesto de interés (min).

t_{RN} = Tiempo de retención del hidrocarburo lineal, que eluye después del compuesto de interés (min).

- ❖ **Parámetro espectroscópico.** Los espectros de masas obtenidos de cada uno de los compuestos presentes en los AE y fracciones del aceite, se compararon con los almacenados en las bases de datos NIST, Wiley o Adams [1]. Esta última, es una colección especializada en terpenos y otros componentes presentes en los aceites esenciales de diferentes plantas.

6.7 SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DEL COMPONENTE MAYORITARIO

Teniendo en cuenta que no fue posible la identificación del componente mayoritario usando GC-MS, éste se aisló y se purificó, usando cromatografía de capa fina y cromatografía en columna. El procedimiento, que se empleó para cada una de estas técnicas, se describe a continuación.

6.7.1 Cromatografía en columna. La separación y purificación del compuesto de interés se realizó mediante cromatografía en columna, empleando como adsorbente gel de sílice (70-230 *Mesh* ASTM, Merck, Sigma Aldrich), percolando con mezclas de hexano-acetato de etilo con aumento gradual de polaridad. Para concentrar las fracciones recolectadas de los productos aislados, se usó un rotoevaporador BÜCHI, ROTAVAPOR-R (Flawil, Suiza), y, en algunos casos, nitrógeno.

6.7.2 Cromatografía en capa fina. Para el desarrollo de los cromatofolios, se emplearon como muestras el AE y fracciones del AE recolectadas de la columna (ca. 10 mg); estas muestras se depositaron sobre cromatofolios AL TLC de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck), usando un capilar, a un centímetro de uno de los bordes. En una cámara de vidrio se vertió hexano (ca. 2 mL), para permitir que la cámara se saturara con vapores del eluyente. Luego, se introdujo el cromatofolio y se dejó un tiempo adecuado para la separación; se retiró y se dejó secar a temperatura ambiente. Para la visualización de algunos componentes, no coloreados, se emplearon, como reveladores, ácido sulfúrico al 5% y una cámara Camag UV Cabinet II, a las longitudes de onda de 254 y 366 nm.

6.8 CARACTERIZACIÓN ESPECTROSCÓPICA

Para la identificación del componente mayoritario presente en el AE, se llevó a cabo su purificación y posterior caracterización mediante el uso de las técnicas mencionadas en esta sección.

6.8.1 Espectroscopía de infrarrojo. Los espectros se obtuvieron en un equipo BRUCKER modelo 360 FT-IR, ubicado en el Laboratorio de Análisis Instrumental, Escuela de Química, UIS.

6.8.2 Resonancia magnética nuclear (RMN). Los espectros de RMN ¹H, ¹³C, DEPT135, COSY, HMBC y HSQC se obtuvieron en un espectrómetro BRUKER AM-400, ubicado en la Universidad Industrial de Santander, sede Guatiguará, Bucaramanga. Se empleó cloroformo deuterado (CDCl₃) como solvente y tetrametilsiloxano como referencia interna (TMS).

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Uno de los objetivos principales de esta investigación fue analizar la composición química del AE de la especie *P. cablin*, cultivada en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.

La planta se identificó en el Herbario Nacional Colombiano como *Pogostemon cablin* de la familia Lamiaceae. El estudio cuantitativo y la revisión bibliográfica se realizaron con base en esta especie. No obstante, los resultados obtenidos experimentalmente, al examinar la composición química del AE, demostraron diferencias en los metabolitos secundarios identificados, con los reportados en la literatura [19, 80]. Como se mencionó en el **Numeral 3.1.2** la composición química está sujeta a cambios, puesto que depende de diversos factores geobotánicos y ambientales.

A lo largo de esta investigación, se muestran los resultados obtenidos y las diferencias encontradas en la composición química del AE analizado y el AE reportado en la literatura [19, 80] para esta especie del género *Pogostemon*.

7.1 IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA

La identificación botánica de la planta se realizó en el Herbario Nacional Colombiano (COL, Bogotá), del Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia. La planta fue clasificada por el doctor José Luis Fernández como *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth (N° COL 531010) (Véase **Anexo 5**).

Puesto que se observaron algunas diferencias morfológicas de la especie cultivada en Bucaramanga (Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM) con

respecto a la cultivada en otros países pertenecientes al continente asiático, se decidió enviar nuevamente dos muestras de la especie sin ningún tipo de información al Herbario Nacional, esto con el fin de corroborar los resultados obtenidos de la primera identificación. En esta ocasión, el doctor Fernández coincidió en afirmar que las muestras se trataban de la especie *Pogostemon cablin*. Los pliegos testigo de la especie se depositaron como muestra permanente en el Herbario Nacional Colombiano de la siguiente manera: *Pogostemon cablin* (N° COL 560239 y 560264). En la **Figura 18**, se muestra las diferencias morfológicas encontradas entre estas plantas pertenecientes a la misma especie, pero cultivadas en Bucaramanga y en la India.

Algunas diferencias morfológicas (Véase **Figura 18**) y características de desarrollo vegetativo de esta especie ponen en duda, si efectivamente las semillas propagadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM corresponden a la especie *P. cablin*. Una de las principales características en el desarrollo vegetativo de la especie *P. cablin*, es que esta planta florece una vez en el año; no obstante, la especie analizada florecía cada 4 meses, cada vez que es cosechada. Las diferencias morfológicas, como fisionomía del tallo y la abundancia de vellosidades (tricomos) en el envés de las hojas de patchouli, fueron grandes con respecto a la especie estudiada en Bucaramanga, lo que abre dos interrogantes: ¿Las semillas adquiridas por internet correspondían a *P. cablin* o se trataban de una especie perteneciente al género *Pogostemon* pero a otra especie? o ¿Se trataba de un nuevo quimiotipo de *P. cablin*?. A partir de este momento, la especie analizada se mencionará como *Pogostemon* sp., puesto que no se tiene completa certeza sobre la especie, variedad o quimiotipo de *Pogostemon* sp.



Crecimiento de la planta



Forma y color de la hoja

Forma y color de la hoja



Color de las inflorescencias

Planta colectada en Bucaramanga

Planta cultivada en India

Figura 18. Fotografías de la especie *Pogostemon cablin*: plantas, hojas y flores.
Izquierda: Cultivada en Bucaramanga (Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM).
Derecha: Cultivada en India [30].

7.2 ANÁLISIS DE SUELOS

El análisis de suelos es un valioso instrumento, que permite evaluar la capacidad del suelo para suministrar nutrientes a la planta [17] con base en una adecuada interpretación, prevenir desordenes nutricionales, que pueden afectar la composición y el rendimiento de las diferentes especies cultivadas.

Tabla 4. Resumen del análisis fisicoquímico del suelo de áreas de cultivo con *Pogostemon* sp.

ANÁLISIS QUÍMICO	
NOMBRE DEL ANÁLISIS	INFORMACIÓN REPORTADA
Caracterización	Textura-Franco-Arcilloso-Arenoso, caracterizada por proporciones adecuadas de arena, limo y arcilla; pH de 6,9; el contenido de materia orgánica es medio y contenido de nitrógeno total es medio. El nivel de fósforo y calcio es alto. El nivel de potasio es medio. El nivel de magnesio es bajo. El nivel de sodio es normal. La textura es adecuada.
Elementos menores (EM)	El nivel de cobre y zinc es alto. El nivel de hierro es adecuado. El nivel de boro y manganeso es bajo.

Para efectuar el análisis del suelo en cada una de las parcelas, se realizó la recolección de la muestra, la cual está compuesta por varias submuestras de igual tamaño, siguiendo un patrón en x. Para desarrollar este modelo, se seleccionaron puntos sobre la x, en los cuales se tomaron muestras a la misma profundidad (30 cm) eliminando los bordes, procurando que cada muestra tuviera una cantidad similar de suelo; las submuestras se mezclaron en un balde para homogeneizarlas, esto con el fin, de tener una muestra representativa del terreno analizado. La muestra final se almacenó en una bolsa plástica, que se etiquetó y se entregó en el Laboratorio Químico de Suelos de la Universidad Industrial de

Santander, donde se efectuó el análisis y, luego se reportó cuantitativamente la presencia de elementos menores, la acidez y textura del suelo.

En la **Tabla 4**, se resumen algunos de los resultados obtenidos. En el **Anexo 6**, se encuentra el documento enviado por el Laboratorio de Suelos.

7.3 RENDIMIENTO DE LOS AE DE *Pogostemon* sp.

Para la obtención de los AE de *Pogostemon* sp. mediante MWHD, se empleó material vegetal fresco y seco, proveniente de plantas cultivadas al sol y a la sombra; la extracción de los AE se llevó a cabo bajo las condiciones experimentales que se encuentran en el **Numeral 4.2.1**.

Tabla 5. Rendimientos de los AE de *Pogostemon* sp. extraídos por MWHD, de plantas colectadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM.

Cultivos	Estado	Parte de la planta	Biomasa, g	AE obtenido, g	Rendimiento, % (p/p)	Promedio
Sombra	Fresco	Hojas, flores y tallos	278,99	0,28	0,10	0,11±0,015
			246,55	0,33	0,13	
			255,16	0,27	0,11	
	Seco	Hojas, flores y tallos	137,18	0,28	0,20	
			126,13	0,27	0,21	
			97,67	0,24	0,24	
Sol	Fresco	Hojas y tallos	396,94	0,40	0,10	0,11±0,010
			362,16	0,43	0,12	
			394,62	0,43	0,11	
	Seco	Hojas y tallos	119,80	0,31	0,26	
			108,24	0,31	0,29	
			123,14	0,27	0,22	

En la **Tabla 5**, se presentan los resultados obtenidos en la determinación del rendimiento de los AE de *Pogostemon* sp., el cual se calculó usando la **Ecuación 2**. Como se observa en la **Tabla 5**, los rendimientos de los AE no varían sustancialmente por el crecimiento de las plantas al sol o a la sombra; sin embargo, sí existen diferencias significativas en los rendimientos de los AE cuando el material vegetal es sometido a un proceso de secado.

También, se encontró que el rendimiento para el AE de *Pogostemon* sp. extraído mediante AV, usando material vegetal seco, fue de 0,33% (p/p). Este valor reportado es mayor que el obtenido por MWHD. Finalmente, se puede concluir, que el rendimiento para esta especie se favorece con el proceso de secado y con la extracción mediante arrastre con vapor y no por hidrodestilación.

7.4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LOS AE

Los metabolitos secundarios presentes en los AE de *Pogostemon* sp. se analizaron por GC-MS empleando los parámetros descritos en el **Numeral 4.5** de la Parte Experimental. La identificación tentativa de los metabolitos secundarios, se realizó con base en los índices de retención lineales, hallados experimentalmente y los reportados en la literatura, así como, basada en sus espectros de masas.

7.4.1 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Pogostemon* sp. aislados por AV. En la **Figura 19** se observa el perfil cromatográfico obtenido que corresponde a la mezcla de componentes aislados del material vegetal seco fermentado de *Pogostemon* sp. En el AE analizado por GC-MS se detectaron 50 componentes (> 0,3 %), que representan 90% de la corriente iónica total reconstruida (TIC), bajo los parámetros de integración aplicados (Umbral de

integración, $Thshd=18$ y una anchura de pico $=0,05$). En la **Tabla 6**, se registran los componentes aislados e identificados por GC-MS, según el orden de elución en columna DB-5MS, junto con sus índices de retención lineales y cantidades relativas (%).

El AE de *Pogostemon* sp. presentó un color naranja oscuro y una nota odorífera terrosa-alcanforada intensa. Este aceite es del tipo sesquiterpenoide, puesto que más de 50% de su composición la representan compuestos del tipo $C_{15}H_{24}$, y sus productos de oxidación. Los principales metabolitos secundarios identificados en el AE obtenido por arrastre con vapor fueron: zonareno (10,1%), seguido del elemol (5,07%), γ -patchouleno (4,30%), α -guaiano (3,96%), δ -cadineno (3,15%) y biciclogermacreno (3,00%) (Véase **Tabla 6**).

Se realizó la identificación de 60 % de los metabolitos secundarios presentes en el AE de *Pogostemon* sp., mediante el uso de los índices de retención lineales y los espectros de masas. Sin embargo, no fue posible la identificación del componente mayoritario, porque no existe coincidencia de su espectro de masas con ninguno presente en las bases de datos Adams, NIST o Wiley, que se emplearon para la identificación de los sesquiterpenos presentes en el AE. De acuerdo con su peso molecular, se clasificó el compuesto de manera tentativa como un sesquiterpeno oxigenado $C_{15}H_{26}O$, que está presente en 12,3 % en el AE.

Puesto que la especie analizada en esta investigación es muy similar morfológicamente a la especie *P. cablin*, se realizó la comparación de su composición química [19, 80] y se observó, que algunos componentes presentes en el AE de *P. cablin* tales como β -elemeno, α -guaiano, germacreno D, γ -patchouleno y 6,9-guaiadieno también se encuentran presentes en el AE analizado. A pesar de esto, el patchoulol, que es el principal componente del AE de *P. cablin* [80], no fue encontrado en el AE analizado, ni siquiera a nivel de trazas. Por lo tanto, es posible que la especie analizada sea un nuevo quimiotipo

de *P. cablin* o que las semillas adquiridas no correspondan a esta especie, sino a la otra o a un híbrido o variedad.

Con el fin de indagar sobre la identidad del compuesto mayoritario, se realizó su aislamiento y purificación empleando cromatografía en columna y cromatografía en capa fina; además, se efectuó la identificación tentativa de su estructura mediante el uso de RMN mono- y bidimensional, IR y MS. En el **Numeral 5.6** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 6. Composición química del AE de *Pogostemon* sp. obtenido por AV de plantas secas.

N° pico ^a	Compuesto	Tipo ^b	IRL ^c	IRL ^d	Cantidad relativa, %	Modo de identificación
1	<i>trans</i> -β-Ocimeno	MH	1044	1050	0,82	e, f
2	α-Cubebeno	SH	1353	1351	0,61	e, f
3	N.I.	SH	1390	-	0,95	-
4	β-Elemeno	SH	1407	1391	1,15	e, f
5	α-Guaieno	SH	1445	1440	3,96	e, f
6	6,9-Guaiadieno	MH	1450	1442	2,57	e, f
7	<i>cis</i> -Muurolo-3,5- dieno	SH	1457	1450	1,51	e, f
8	<i>trans</i> -Muurolo-3,5- dieno + N.I.	SH	1462	1454	0,41	f
9	9- <i>epi-trans</i> -Cariofileno	SH	1479	1466	1,19	e, f
10	γ-Muuroleno + <i>cis</i> -β-Guaieno	SH	1486	1480+1493	1,50	e, f
11	Germacreno D	SH	1493	1484	0,34	e, f
12	Pentadecano	MH	1496	1500	1,42	f
13	C ₁₅ H ₂₄	MH	1502	-	1,35	f
14	Biciclogermacreno	SH	1505	1500	3,00	e, f
15	α-Bulneseno + Vidifloreno + <i>trans</i> -β-Guaieno	SH	1512	1502	1,74	e, f
16	γ-Patchouleno	SH	1520	1502	4,30	f
17	Shiobuneno	SO	1522		1,31	e, f
18	δ-Cadineno	SH	1529	1523	3,15	e, f
19	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1533	-	2,84	f
20	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1537	-	3,84	f
21	Zonareno + N.I.	SH	1545	1530	10,1	f
22	α-Cadineno	SH	1551	1539	2,72	e, f
23	Elemol	SO	1558	-	5,07	e, f
24	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1568	-	0,80	f
25	Germacreno B	SH	1575	1561	0,72	e, f
26	N.I.	CO	1588	-	0,86	-
27	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1602	-	2,80	f
28	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1604	-	1,52	f
29	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1610	-	0,71	f

Tabla 6. (Continuación)

30	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1613	-	0,43	f
31	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1618	-	0,81	f
32	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol + C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1635	1619	2,76	f
33	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1641	-	0,87	f
34	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1645	-	0,41	f
35	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1647	-	0,43	f
36	Dihidroxi-isocalamendiol	SO	1653		0,95	e, f
37	<i>epi</i> - α -Muurolol	SO	1661	1642	1,31	e, f
38	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1667	-	2,21	f
39	α -Cadinol	SO	1669	1654	0,67	e, f
40	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1675	-	0,58	f
41	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1680	-	2,33	f
42	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1685	-	0,43	f
43	N.I.	CO	1694	-	1,33	-
44	N.I.	CO	1700	-	0,64	-
45	N.I.	CO	1703	-	0,36	-
46	N.I.	CO	1711	-	0,58	-
47	Shiobunol	SO	1716	1688	0,34	f
48	N.I.	CO	1744	-	12,3	-
49	N.I.	CO	1753	-	0,35	-
50	N.I.	CO	1871	-	0,35	-
Hidrocarburos monoterpénicos					4,82	
Monoterpenos oxigenados					-	
Compuestos oxigenados					16,8	
Hidrocarburos sesquitérpenicos					45,4	
Sesquiterpenos oxigenados					26,8	

N.I. No identificado.

a. Número de pico en la **Fig. 19**.

b. Tipo de componente: Hidrocarburos monoterpénicos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), compuestos oxigenados (OC), hidrocarburos sesquitérpenicos (SH), sesquiterpenos oxigenados (SO).

c. Índices de retención lineales calculados en columna DB-5, 60 m.

d. Índices de retención de la literatura [1].

e. Identificación tentativamente basada en los índices de retención lineales.

f. Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV).

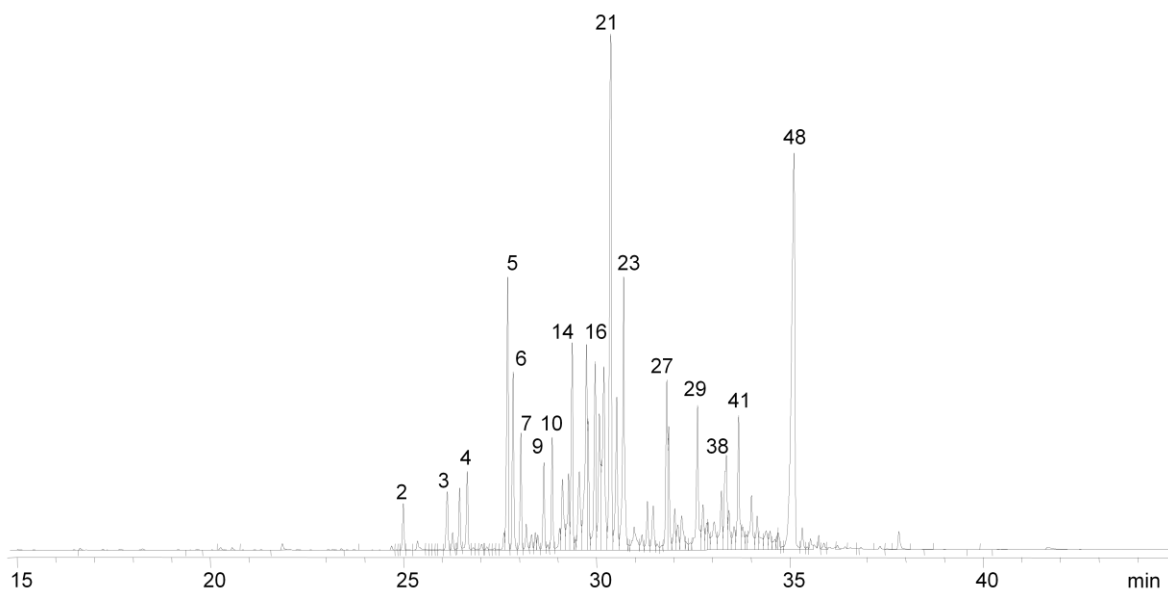


Figura 19. Perfil cromatográfico típico del AE de *Pogostemon* sp., obtenido por AV de las plantas secas fermentadas. Columna DB-5MS (60m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 6**.

7.4.2 Identificación de los metabolitos secundarios volátiles de *Pogostemon* sp. aislados por MWHD. En las **Figuras 20 y 21** se presentan los perfiles cromatográficos de los metabolitos secundarios volátiles obtenidos por MWHD de material vegetal fresco y seco, proveniente de plantas cultivadas al sol y a la sombra de *Pogostemon* sp. En los AE analizados por GC-MS se detectaron 38 compuestos en cantidades relativas mayores que 0,3%. Se identificaron 25 compuestos usando IRL en columna apolar y espectros de masas (EI, 70 eV), bajo los parámetros de integración aplicados (Umbral de integración, *Thshd*=18 y una anchura de pico igual que 0,05). En la **Tabla 7**, se registran los componentes aislados e identificados por GC-MS, según el orden de elución en columna DB-5MS, junto con sus índices de retención lineales y cantidades relativas (%), para cada uno de los experimentos.

Tabla 7. Cantidad relativa (%) de los principales componentes de los AE de *Pogostemon* sp., aislados por MWHD de plantas frescas y secas, cultivadas a la sombra (I, II) y al sol (III, IV), respectivamente.

N° pico ^a	Compuesto	Tipo ^b	IRL ^c	IRL ^d	Cantidad relativa, %				Modo de identificación
					I-fresco	II-seco	III-fresco	IV-seco	
1	<i>trans</i> -β-Ocimeno	MH	1043	1050	2,02	0,58	0,63	-	e, f
2	α-Cubebeno	SH	1353	1351	0,41	-	-	0,46	e, f
3	α-Ylangeno	SH	1379	1375	0,48	1,90	-	1,90	e, f
4	N.I.	SH	1386	-	0,99	1,30	1,07	1,22	-
5	<i>trans</i> -β-Cariofileno	SH	1433	1419	6,77	9,16	2,52	5,45	e, f
6	γ-Elemeno	SH	1436	1437	1,71	1,90	1,24	1,73	e, f
7	α-Guaieno	SH	1444	1440	0,76	1,56	0,43	1,39	e, f
8	α-Humuleno	SH	1469	1455	1,26	1,91	0,67	1,38	e, f
9	9- <i>epi-trans</i> -Cariofileno	SH	1474	1466	0,68	2,17	0,48	2,34	e, f
10	γ-Muuroleno + <i>cis</i> -β-Guaieno	SH	1485	1480+1493	0,48	0,85	-	0,70	e, f
11	α-Muuroleno	SH	1489	1486	1,48	1,85	1,27	2,12	e, f
12	Germacreno D	SH	1493	1485	1,82	2,47	2,11	2,31	e, f
13	C ₁₅ H ₂₄	SH	1497	-	0,38	0,69	-	0,74	f
14	Biciclogermacreno + C ₁₅ H ₂₄	SH	1508	1500	1,95	2,96	1,82	3,07	e, f
15	α-Bulneseno + Vidifloreno+ <i>trans</i> -β-Guaieno	SH	1513	1502	1,87	2,42	1,11	2,10	e, f
16	γ-Patchouleno	SH	1517	1502	1,70	2,32	1,08	1,99	f
17	N.I.	SH	1536	-	3,53	3,99	4,83	4,16	-
18	Shyobuneno	SO	1520	-	10,56	10,16	13,47	4,23	e, f
19	δ-Cadineno	SH	1527	1523	7,21	6,78	9,02	7,44	e, f
20	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1532	-	0,42	0,51	0,50	0,55	f
21	Zonareno + N.I.	SH	1543	1530	2,23	2,91	1,40	2,86	e, f
22	Elemol	SO	1558	-	0,96	0,88	1,04	0,87	e, f
23	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1568	-	1,31	2,88	1,15	2,74	f

Tabla 7. (Continuación)

24	Germacreno B	SH	1575	1561	0,59	1,07	0,44	1,02	e, f
25	Germacreno D-4-ol + N.I.	SO	1590	1576	4,71	5,33	4,76	5,57	f
26	Óxido de cariofileno + N.I.	SO	1599	1583	0,87	2,33	0,72	2,64	f
27	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1606	-	1,28	2,07	1,32	2,20	f
28	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1627	-	0,43	0,47	3,60	0,47	f
29	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1636	-	3,47	6,79	1,37	5,36	f
30	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1641	-	1,48	3,04	2,54	2,79	f
31	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1647	-	2,23	1,71	1,17	1,54	f
32	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1654	-	1,14	1,33	-	1,35	f
33	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1658	-	0,85	1,37	0,89	1,43	f
34	α-Cadinol	SO	1670	1654	4,12	6,25	4,23	5,84	f
35	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1674	-	2,53	0,49	2,92	4,42	f
36	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	1777	-	22,85	4,16	28,11	11,4	f
37	N.I.	OC	1817		0,67	0,50	0,64	0,47	-
38	N.I.	OC	1829		0,79	0,94	-	1,09	-
Hidrocarburos monoterpénicos					2,02	0,58	0,63	-	
Monoterpenos oxigenados					-	-	-	-	
Compuestos oxigenados					1,46	1,44	0,64	1,56	
Hidrocarburos sesquitérpicos					36,3	48,2	29,5	44,4	
Sesquiterpenos oxigenados					59,2	49,8	67,8	53,4	

N.I. No identificado.

a. Número de pico en la **Fig. 20 y 21**.

b. Tipo de componente: Hidrocarburos monoterpénicos (MH), monoterpenos oxigenados (MO), compuestos oxigenados (OC), hidrocarburos sesquitérpicos (SH), sesquiterpenos oxigenados (SO).

c. Índices de retención lineales calculados en columna DB-5MS, 60 m.

d. Índices de retención de la literatura [1].

e. Identificación tentativamente basada en los índices de retención lineales.

f. Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV).

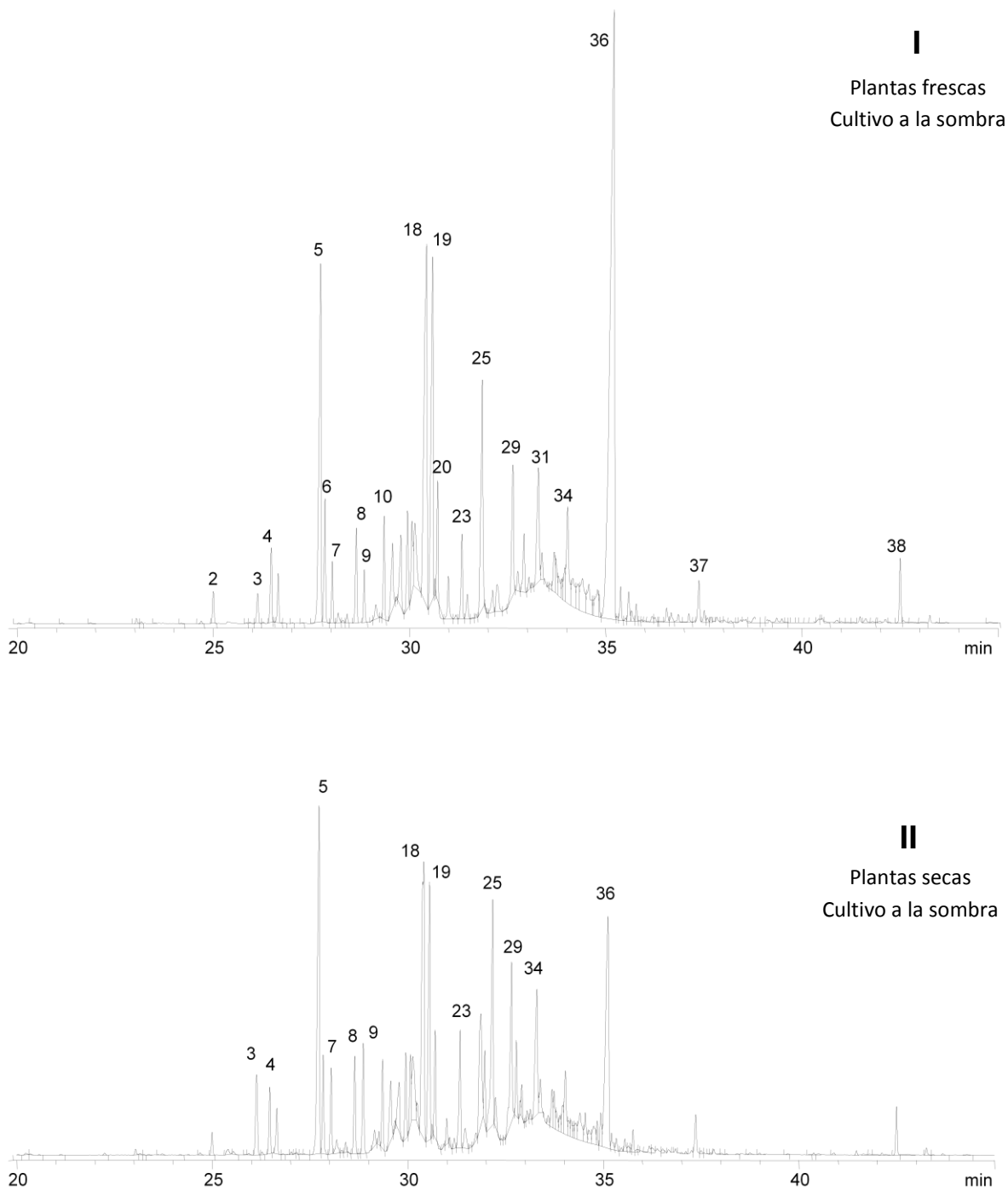


Figura 20. Perfiles cromatográficos típicos de los AE de *Pogostemon* sp., obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas a la sombra: **I.** Plantas frescas, **II.** Plantas secas. Columna DB-5MS (60m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 7.**

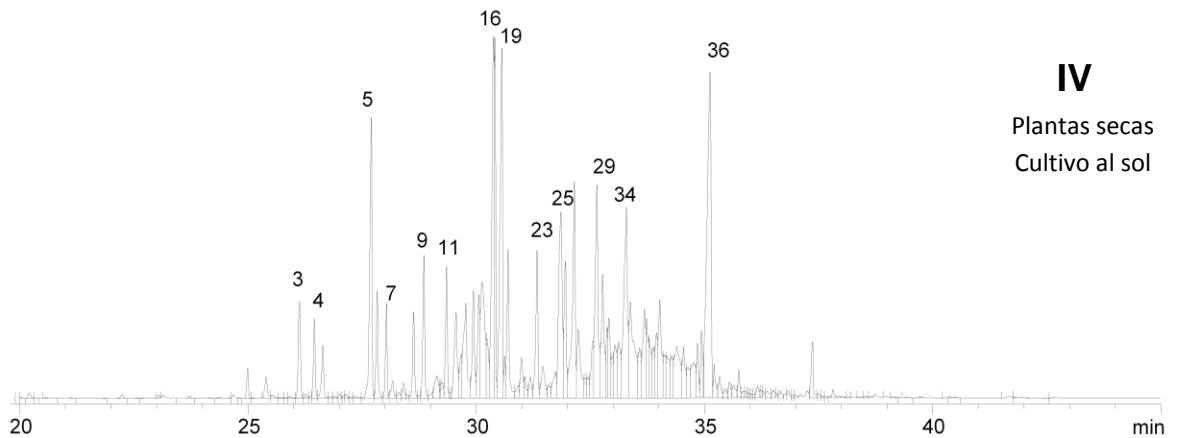
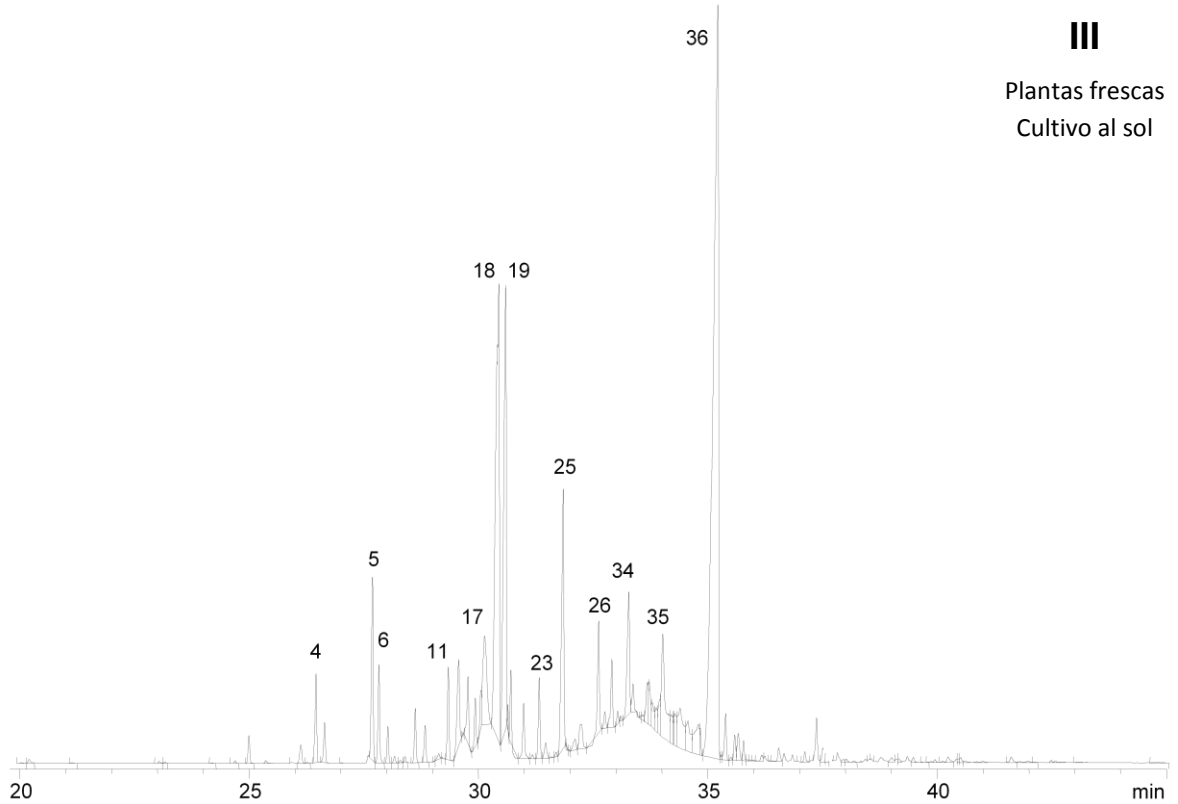


Figura 21. Perfiles cromatográficos típicos de los AE de *Pogostemon* sp., obtenidos por MWHD, de plantas cultivadas al sol: **III.** Plantas frescas, **IV.** Plantas secas. Columna DB-5MS (60m), *split* 1:30, MSD (EI, 70 eV). La identificación de los compuestos se reporta en la **Tabla 7.**

Se encontró que la mayoría de los metabolitos secundarios identificados son similares en cada uno de los experimentos; no obstante, sus cantidades relativas varían de acuerdo con las condiciones de secado y cultivo. Esto se muestra en detalle en la **Tabla 7**.

Los AE obtenidos por MWHD de plantas frescas y secas, cultivadas al sol y a la sombra, son similares cualitativamente pero no cuantitativamente. Entre los principales metabolitos secundarios volátiles presentes en los AE obtenidos por MWHD (véase **Tabla 7**) se encuentran: el *trans*- β -cariofileno (5,45–9,16 %), el shiobuneno (4,23-13,47 %), δ -cadineno (6,78-9,02 %), germacreno D-4-ol (4,71-5,57 %) y α -cadinol (4,12-6,25 %). En la **Tabla 7** se observa que fue mayor el número de los metabolitos producidos por las plantas que se sometieron a un proceso de secado (Columnas II y IV), independiente de si se cultivaron al sol o a la sombra, en comparación con las plantas que fueron destiladas una vez se cosecharon (Columnas I y IV).

Grosso modo, las técnicas de destilación MWHD y AV (**Tablas 6 y 7**) se diferencian principalmente en el principio de extracción de los analitos. Mientras que con MWHD se utiliza radiación electromagnética, con AV se emplea una corriente directa de vapor de agua para lograr aislar los metabolitos secundarios presentes en una matriz vegetal. Teniendo en cuenta esto, se observa que la cantidad de metabolitos secundarios varía con la técnica de extracción. AV fue la técnica que permitió extraer un mayor número de compuestos, principalmente hidrocarburos sesquiterpénicos, con rendimiento del aceite de 0,33 %, en comparación de 0,26 % para el método de MWHD.

7.5 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE UN SESQUITERPENOIDE MAYORITARIO PRESENTE EN EL AE DE *Pogostemon* sp.

Es importante resaltar que en el aislamiento y purificación de este sesquiterpenoide mayoritario presente en el AE de *Pogostemon* sp., fue realizado en colaboración con el señor Arvind Kumar, estudiante de Doctorado de FRI, Derhandun, India, que fue fundamental para el desarrollo de esta etapa de la investigación.

7.5.1 Separación del AE mediante cromatografía en capa fina (CCF). El primer paso para la separación de los analitos presentes en el AE de *Pogostemon* sp. por cromatografía en capa fina fue la selección de un sistema de elución y de revelado. Para ello, se evaluaron eluyentes como el hexano puro, junto con mezclas de hexano:acetona y hexano:acetato de etilo en diferentes proporciones, usando como reveladores yodo, ácido sulfúrico y dos longitudes de onda, $\lambda = 254$ y 366 nm. La mejor separación por cromatografía en capa fina de los componentes presentes en el AE se observa en la **Figura 22**.

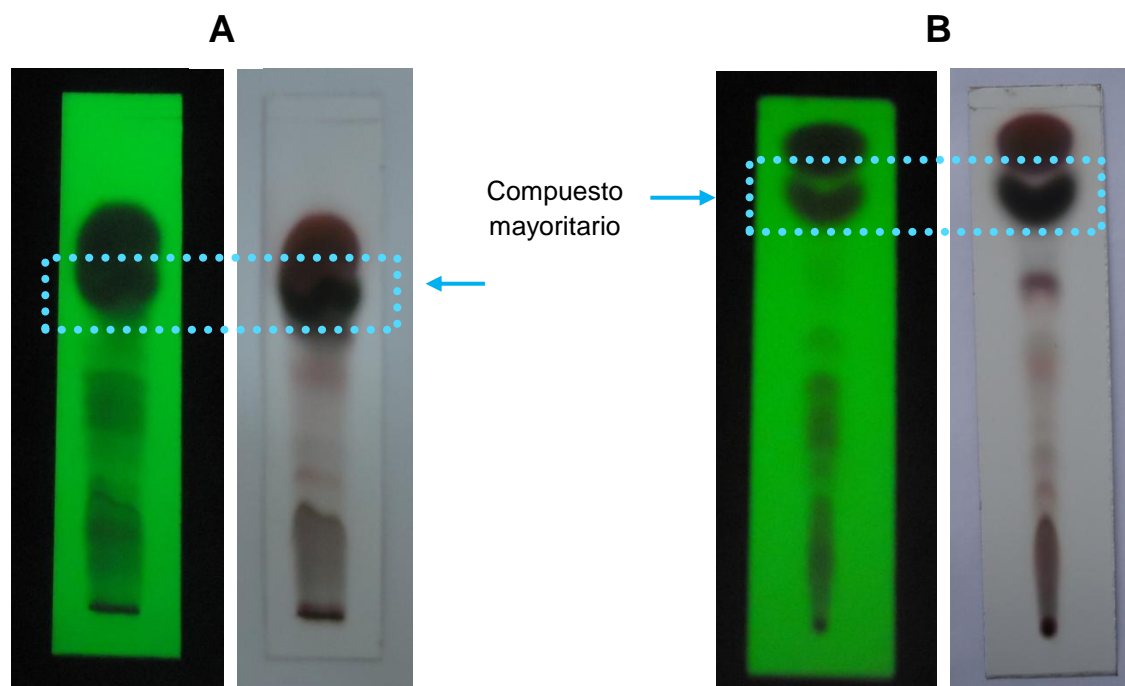


Figura 22. Cromatografía en capa fina del control del AE de *Pogostemon* sp. Los cromatofolios se eluyeron con: **A.** Hexano; **B.** Hexano:acetato de etilo (95:5). En el recuadro de color azul se encuentra señalado el compuesto mayoritario presente en el AE.

Como se observa en la **Figura 22**, al usar la mezcla de hexano:acetato de etilo (95:5), el componente mayoritario se aisló más eficientemente de otros analitos presentes en el AE, que se empleó por tal razón, para realizar el aislamiento del componente mayoritario mediante cromatografía en columna.

7.5.2 Fraccionamiento del AE mediante cromatografía en columna. Se empacó una columna de vidrio con 120 g de gel de sílice (**Figura 23**). En la parte superior se depositó la muestra constituida por 5 g de gel de sílice impregnado con 11 mL de AE. Finalmente, se eluyó la columna con una mezcla hexano:acetato de etilo (95:5) seleccionada previamente. En total, de la columna se recolectaron 100 fracciones con volúmenes de 50 mL cada una. Estas fracciones se monitorearon mediante cromatografía de capa fina y se obtuvieron 25 fracciones en total, porque de acuerdo con los componentes presentes en cada una de las fracciones, se unieron las fracciones con compuestos similares. Posteriormente, de estas fracciones se seleccionaron las número 7 y 8, que contenían el componente mayoritario y la cantidad mínima de otros componentes. El montaje del proceso de separación del AE mediante cromatografía en columna se muestra en la **Figura 23**.

Con el fin de purificar las fracciones de interés (número 7 y 8) recolectadas a partir de la columna de fraccionamiento inicial, se empacó nuevamente una columna de vidrio de menor diámetro. Los eluyentes empleados en esta separación fueron hexano:acetato de etilo, con aumento gradual de polaridad (100%, 95:5, 90:10, 85:15, etc.). Se recolectaron ocho fracciones en total. De estas fracciones, se seleccionó la número 3, por tener un mayor contenido del componente de interés. El monitoreo en cromatografía en capa fina de las fracciones obtenidas mediante CC se muestra en la **Figura 24**.

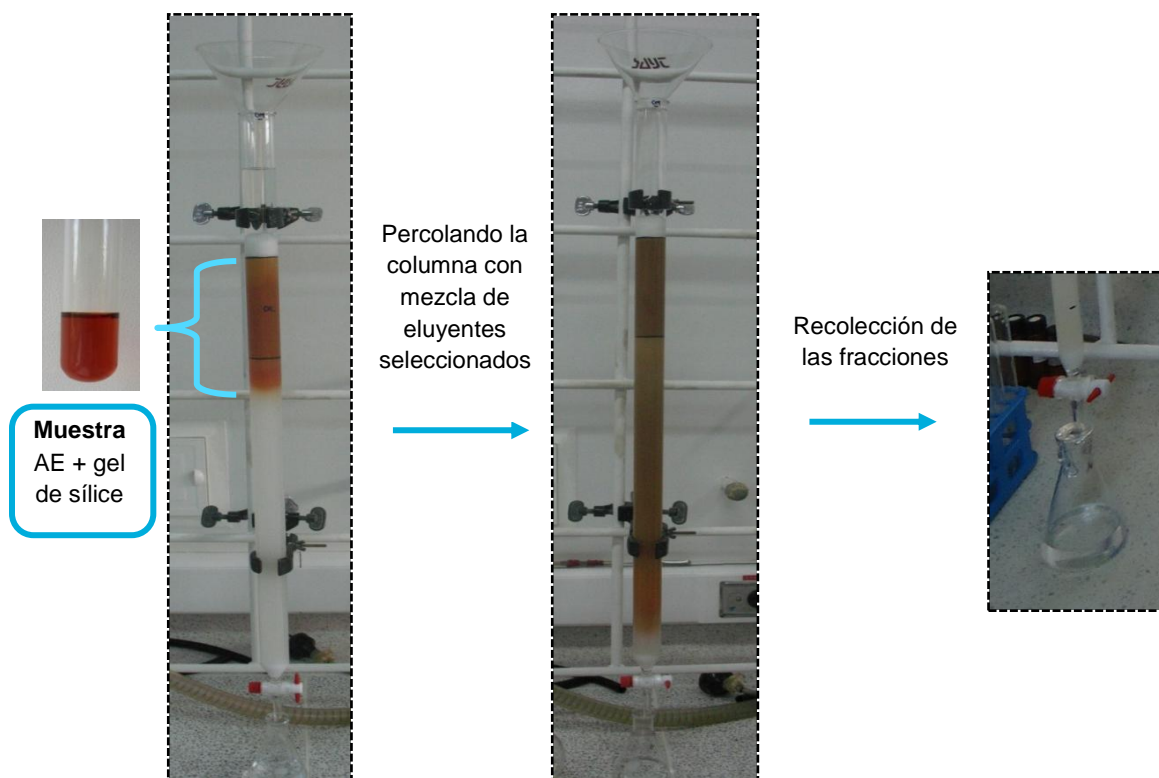


Figura 23. Cromatografía en columna del AE de *Pogostemon* sp.

Una vez obtenida la fracción purificada del componente mayoritario, se corroboró la identidad de este mediante GC-MS, usando los parámetros experimentales descritos en el **Numeral 4.5.1**. El perfil cromatográfico de la fracción aislada se muestra en la **Figura 25**

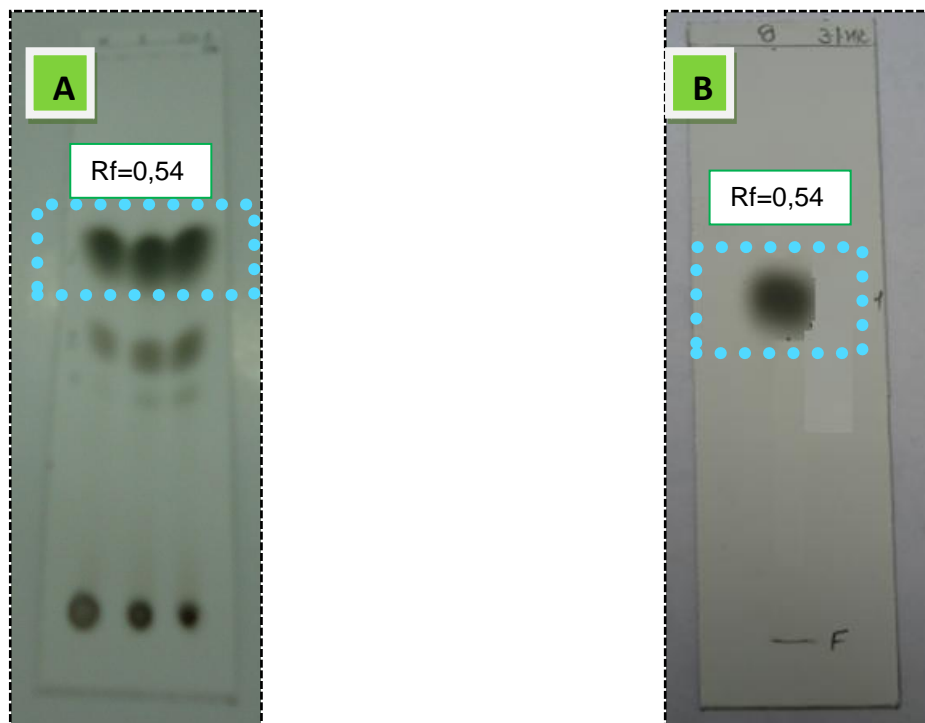


Figura 24. Cromatografía en capa fina del control de fracciones de *Pogostemon* sp., obtenidas por CC. **A.** CCF del fraccionamiento inicial. **B.** CCF de purificación.

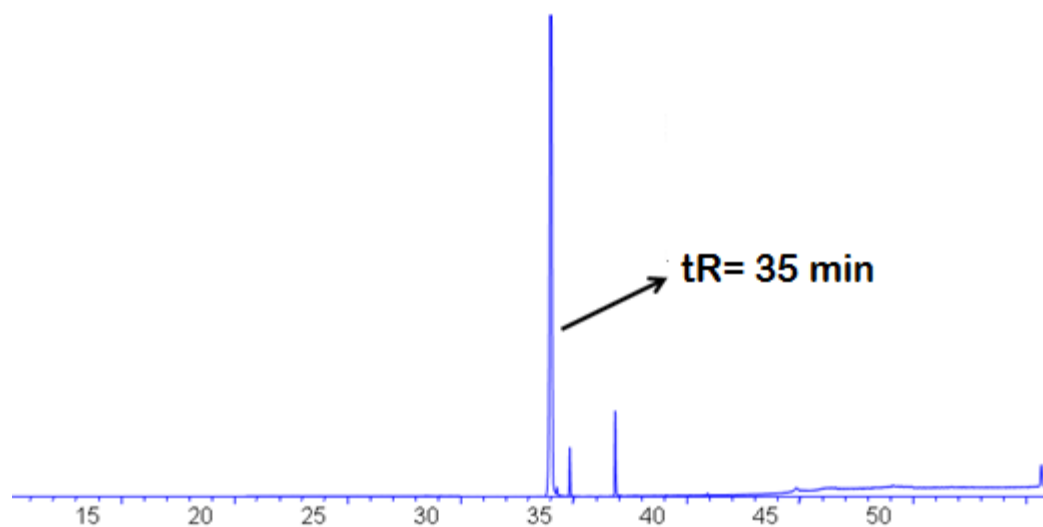


Figura 25. Perfil cromatográfico obtenido por GC-MS para el componente mayoritario aislado por CC, del AE de *Pogostemon* sp.

7.6 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UN SESQUITERPENO MAYORITARIO PRESENTE EN EL AE DE *Pogostemon* sp.

7.6.1 Espectroscopía de infrarrojo. El análisis del espectro infrarrojo del componente mayoritario aislado (**Figura 26**) reveló la presencia de dos bandas de absorción en 2962 y 2927 cm^{-1} , correspondientes a las tensiones asimétricas del $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$, respectivamente; también, se evidencia la presencia de las bandas en 1455 y 1378 cm^{-1} , que corresponden a las flexiones antisimétrica y simétrica del $-\text{CH}_3$. Entre 3100-3000 cm^{-1} se presenta una banda de absorción, que corresponde al estiramiento del CH- , así como, una combinación de bandas entre 1275-1000 y 900-690 cm^{-1} , que representan la flexión de CH- dentro y fuera del plano, respectivamente. Las bandas, que se encuentran en el rango de 1500-1600 cm^{-1} , corresponden al C=C aromático.

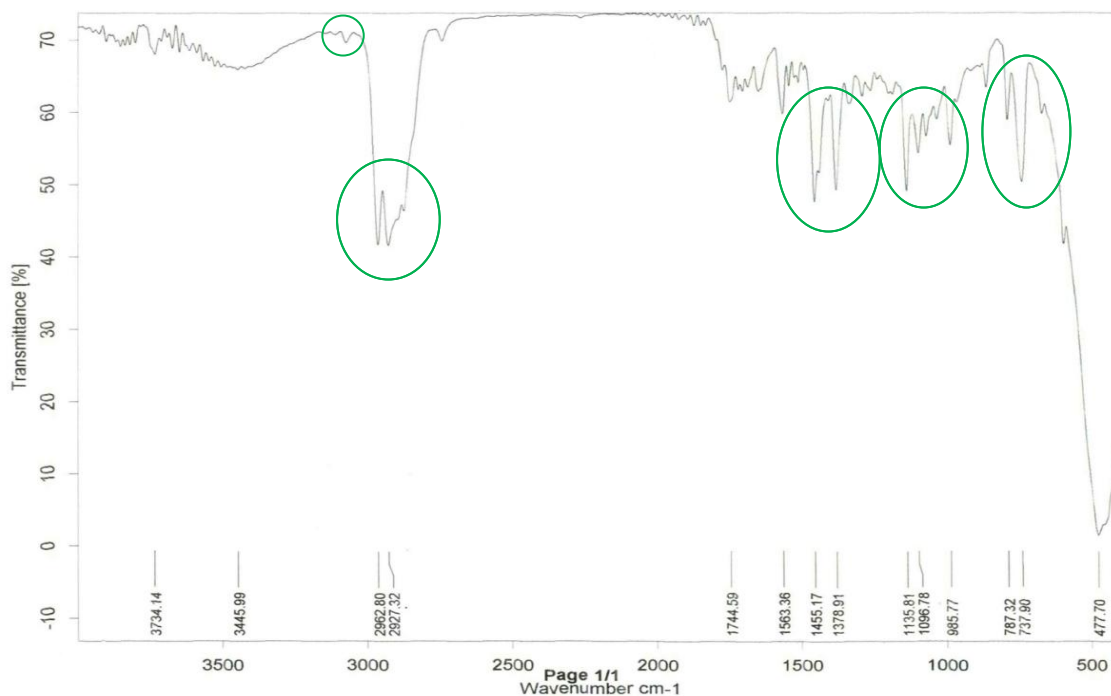


Figura 26. Espectro infrarrojo del compuesto mayoritario, aislado del AE de *Pogostemon* sp.

El análisis del espectro infrarrojo aportó información fundamental, y fue un punto de partida para la elucidación de la posible estructura del sesquiterpenoide mayoritario presente en el AE de *Pogostemon* sp.

7.6.2 Resonancia magnética nuclear. Se obtuvo información para elucidar la estructura del compuesto mayoritario mediante resonancia magnética nuclear (RMN ^1H , ^{13}C y DEPT-135), con experimentos bidimensionales de correlación homonuclear (^1H - ^1H COSY) y heteronuclear (HSQC y HMBC). El análisis permitió determinar cada uno de los desplazamientos químicos de los protones y de los carbonos, y las constantes de acoplamiento. De esta manera, se logró relacionar cada carbono con su respectivo protón, y a su vez, cada uno de los protones con su ambiente químico, para dar como resultado la estructura molecular que está más acorde con los datos obtenidos del conjunto de experimentos, espectros IR y MS.

En la **Figura 27** se presenta el espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3 ; TMS como referencia interna), de la sustancia analizada. En este espectro, se observan las señales correspondientes a los diferentes protones de la molécula, presentes en las regiones alifática, vinílica y aromática, para un total de 18 protones.

Empezando desde los campos bajos hasta campos altos, aparecen las señales en 7,03 ppm, que de acuerdo con el valor del desplazamiento químico corresponden a un protón aromático, y, en 5,90 ppm, a un protón olefínico. Cada una de estas señales está representada en el espectro de RMN ^1H por un singulete intenso. También, se encuentran las señales en 3,39 ppm (d, $J = 16,60$ Hz) y 3,29 ppm (t, $J = 16,60$ Hz), las cuales corresponden a protones diastereotópicos, que según el experimento de acoplamiento heteronuclear ^1H - ^{13}C HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), están enlazados al carbono que aparece a δ 19,98 ppm (Véase **Figura 28**). Este experimento determina la conectividad entre los protones presentes en la molécula y el carbono, al cual están enlazados. También, se

corroboró mediante el experimento de acoplamiento homonuclear ^1H - ^1H COSY, el acoplamiento geminal que existe entre estos protones.

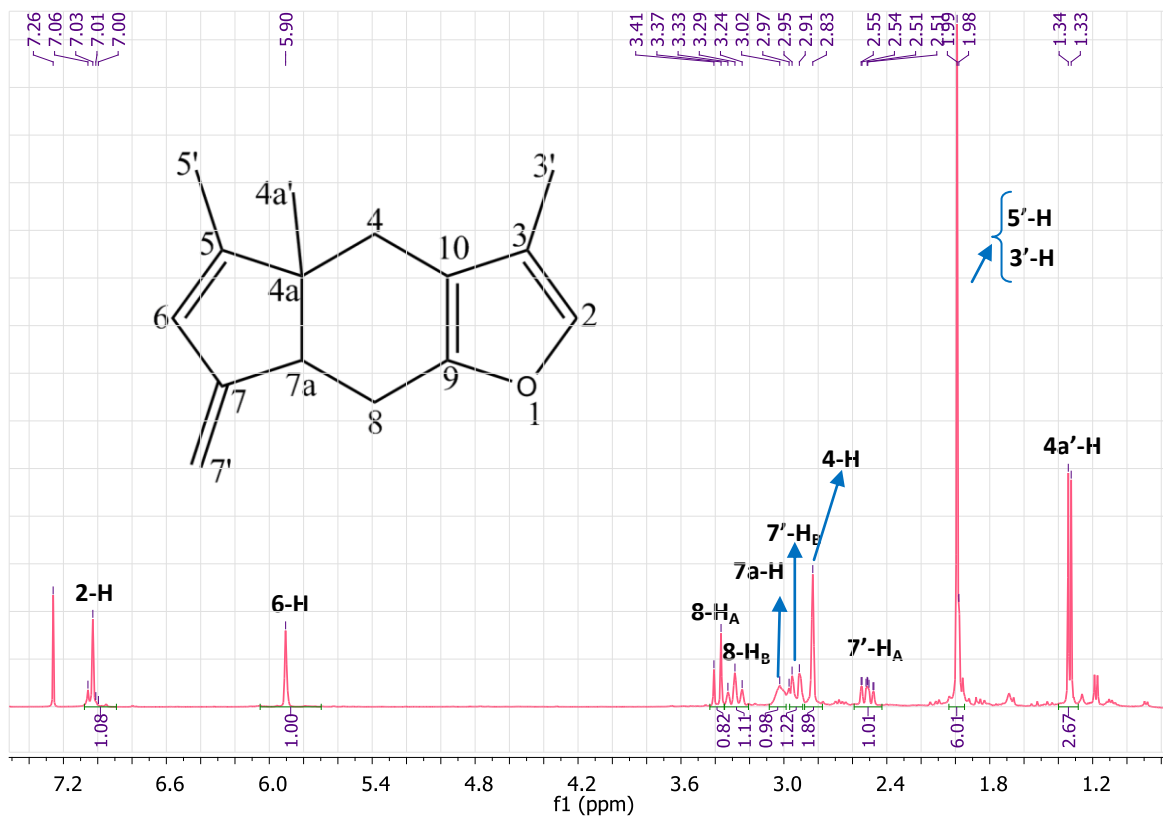


Figura 27. Espectro RMN ^1H del compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

La señal en 3,02 ppm aparece en el espectro de RMN ^1H como un singlete ancho poco intenso, que, al integrarlo, da como resultado un solo protón. De acuerdo con el espectro de HSQC, este protón se encuentra enlazado al carbono que aparece en 30,62 ppm. En 2,83 ppm aparece un singlete intenso que corresponde a dos protones homotópicos, que están enlazados al carbono que aparece en 36,94 ppm. Según el experimento COSY, se presenta un acoplamiento geminal entre estos protones.

En la región alifática se encuentra la señal en 1,99 ppm, representada por un singulete agudo e intenso que integra 6 protones. De acuerdo con el espectro HSQC, estos protones están enlazados con dos carbonos que se encuentran ubicados en 13,59 y 8,57 ppm, por lo que se trata de dos grupos metilo. También, en esta región se ubica la señal en 1,33 ppm (d, $J = 6,76$ Hz) que integra para tres protones, por lo que se trata de un metilo. Al mirar el espectro de HSQC (Véase **Figura 28**), estos protones están acoplados con el carbono que aparece en 19,54 ppm.

El análisis del espectro de RMN- ^{13}C (**Figura 29**) indicó que el número de carbonos presentes en la molécula es 15. Los carbonos cuaternarios aparecen en el espectro de RMN- ^{13}C en 153,02, 150,35, 138,99, 135,51, 117,42 y 120,25 ppm. Esto se corroboró con el experimento de acoplamiento heteronuclear HSQC, puesto que estos carbonos no están asociados a ningún protón.

Los carbonos metilénicos ($-\text{CH}_2$) presentes en la molécula se determinaron superponiendo los espectros de DEPT-135 sobre el de RMN ^{13}C . Esto permitió distinguir que los carbonos metilénicos son tres, puesto que la señal de estos aparece en la fase negativa. También, se determinó, que efectivamente el número de carbonos cuaternarios presentes en la molécula es seis, al no registrar ninguna señal en el DEPT-135 (Véase **Figura 29**).

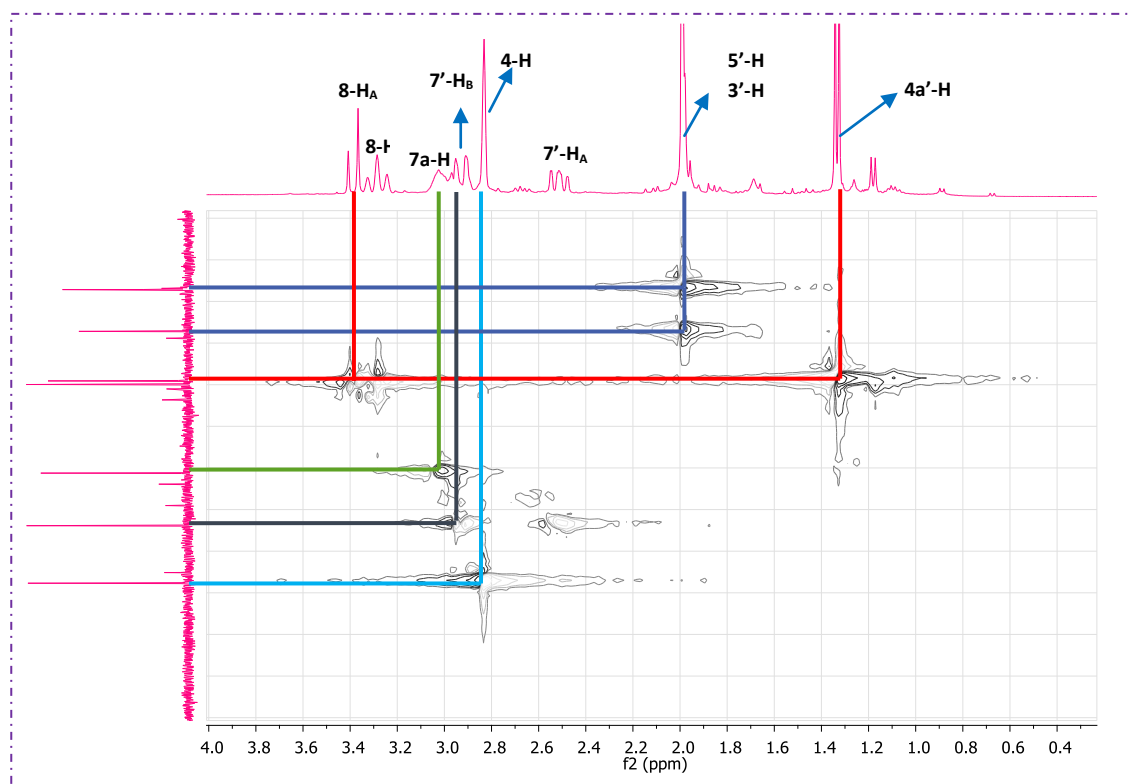
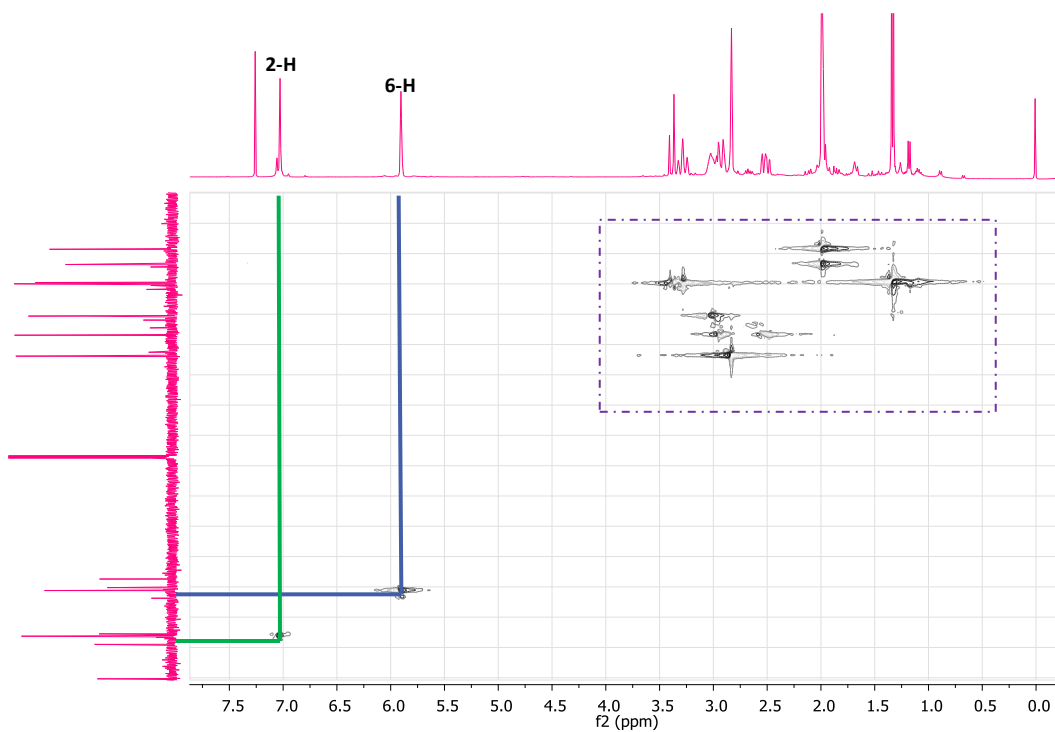


Figura 28. Espectro HSQC del compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

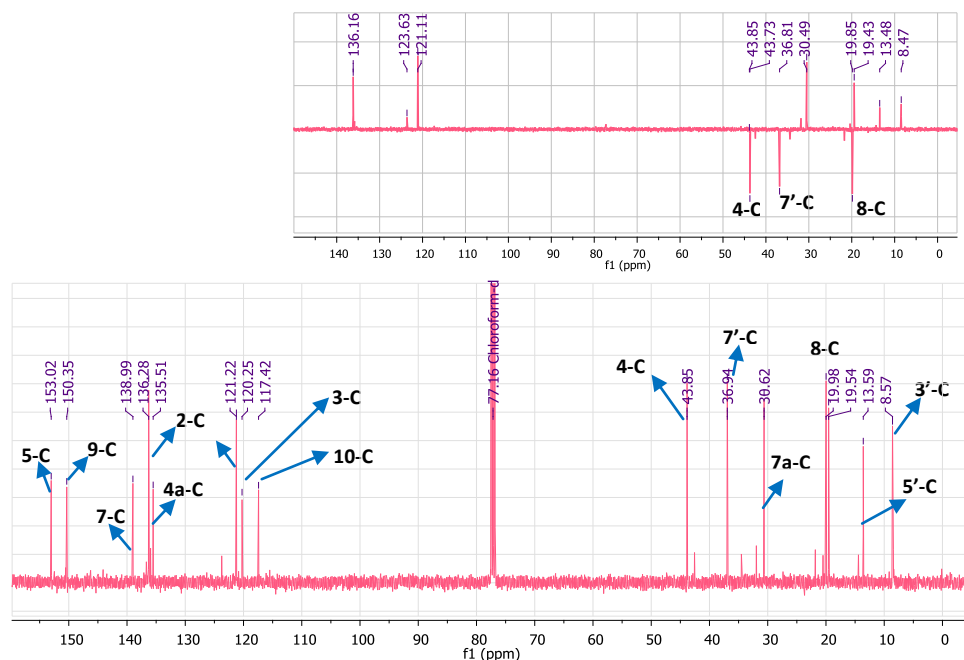


Figura 29. Espectros de RMN ^{13}C y DEPT-135 del compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

En la **Figura 30**, se muestran los espectros bidimensionales ^1H - ^1H -COSY, en los cuales se visualizan las correlaciones gemínales y vecinales entre los protones de la molécula. En el espectro, se pueden observar las correlaciones gemínales entre los protones que aparecen a 3,39 ppm con los de 3,29 ppm (línea roja), los de 2,51 ppm con los de 2,93 ppm (línea morada). También, se observan las correlaciones vecinales entre 3,02 ppm con los de 1,33 ppm (línea verde claro), los de 1,99 ppm con los de 3,29 ppm (línea amarilla), los de 1,99 ppm con 5,90 ppm (línea celeste), los de 5,90 ppm con los de 2,83 ppm (línea rosada) y, finalmente, 7,03 ppm con 1,99 ppm (línea aguamarina).

Antes de continuar con el análisis de los espectros de RMN, se cálculo el índice de insaturación, con el fin de determinar el número de ciclos y de dobles enlaces (π) presentes en la molécula. Cada anillo o ciclo de una molécula implica la pérdida

de dos hidrógenos respecto a un alcano de fórmula C_nH_{2n+2} . Para calcular el índice de insaturación de la molécula, se empleó la **Ecuación 4**.

$$\Omega = n - \frac{m}{2} + 1 \quad \text{Ecuación 4.}$$

donde:

n Número de carbonos.

m Número de hidrógenos.

El índice de insaturación que se determinó para la molécula analizada fue 7. Este dato sirvió como referencia para hallar los posibles dobles enlaces presentes en la molécula, así como, el número de ciclos.

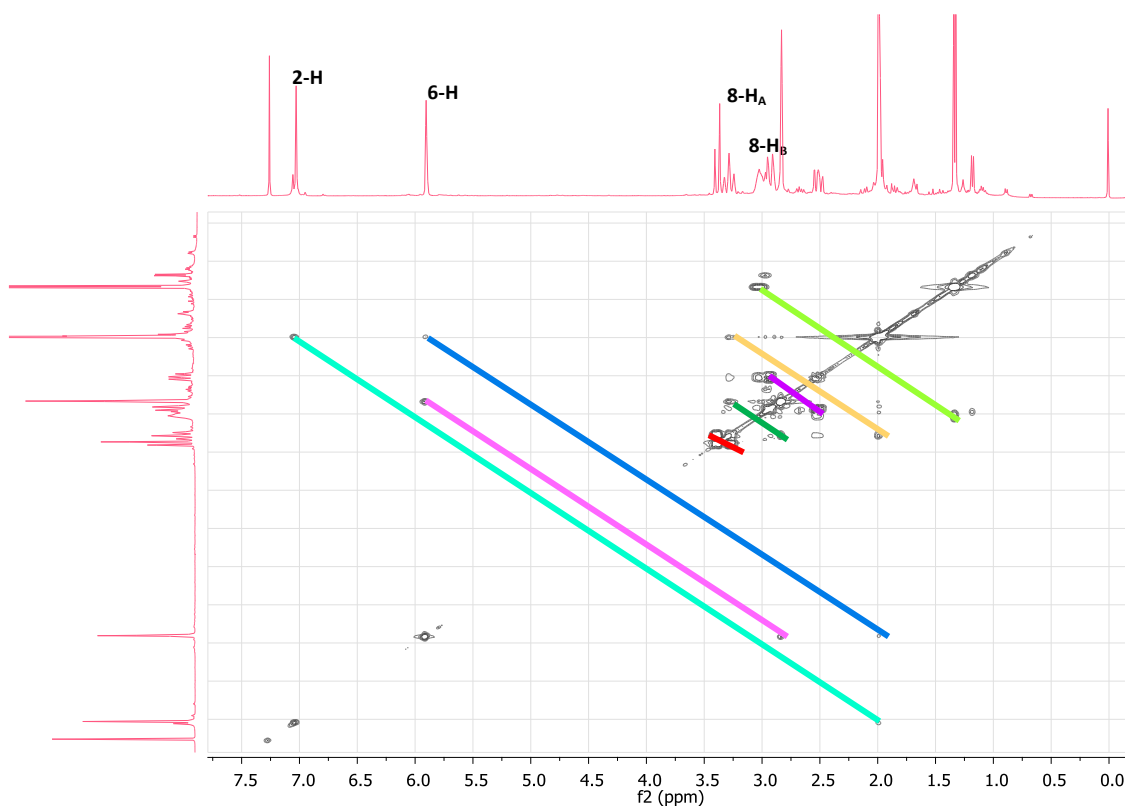


Figura 30. Espectro de correlación homonuclear 1H , 1H -COSY del compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

Finalmente, la elucidación estructural del compuesto mayoritario concluyó con el análisis del espectro HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), el cual se muestra en la **Figura 31**. Por medio de este experimento se pueden revelar las interacciones entre los núcleos ^1H - ^{13}C , a través de dos o más enlaces (predominante a dos y tres enlaces), se pudo rectificar la coherencia en la asignación realizada, observando en el espectro los principales acoplamientos a largo alcance (**Figura 30**).

En la **Tabla 8**, se muestran los principales resultados encontrados en los experimentos de RMN, a saber: RMN ^1H , HSQC, RMN ^{13}C , DEPT-135, RMN ^{13}C y ^1H - ^1H -COSY.

Tabla 8. Resumen de los principales hallazgos encontrados en los espectros de RMN.

RMN ^1H protones, ppm	Integración protones	HSQC, ppm	RMN ^{13}C - DEPT-135	RMN ^{13}C	^1H , ^1H -COSY
1,33	3	19,94	-	CH ₃	1,33 correlación vecinal con 3,02
1,99	6	8,57-13,59	-	CH ₃ , CH ₃	1,99 correlación vecinal con 3,29 y 5,90
2,51	1	36,94	CH ₂	-	2,51 correlación geminal con 2,93
2,93	1	36,94			
2,83	2	43,85	CH ₂	-	2,83 correlación geminal con 2,83
3,02	1	30,62	-	CH	
3,29	1	19,98	CH ₂	-	3,29 correlación geminal con 3,39
3,39	1	19,98			
5,9	1	212,22	-	CH	5,90 Correlación vecinal con 2,83
7,03	1	136,28	-	CH	7,03 correlación vecinal con 1,99
-	-	153,02	C	-	
-	-	150,35	C	-	
-	-	138,99	C	-	
-	-	135,51	C	-	
-	-	117,42	C	-	
-	-	120,25	C	-	

La interpretación de los espectros de **RMN ^{13}C** , correlación heteronuclear **HSQC** y **HMBC** permitió la asignación inequívoca de los desplazamientos químicos de todos los carbonos.

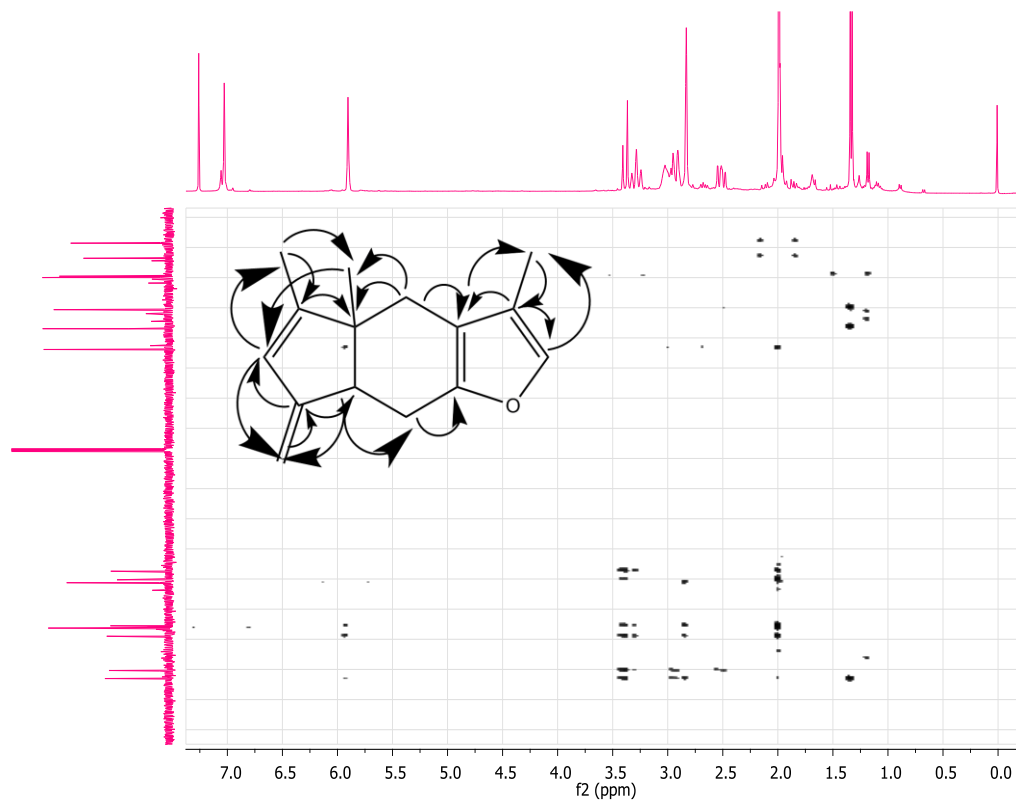


Figura 31. Espectro HMBC del compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

7.6.3 Espectrometría de masas. El espectro de masas del compuesto mayoritario se muestra en la **Figura 32**. El ion molecular en m/z 214 (95 %) tiene una señal intensa en el espectro de masas, que es característica de los compuestos aromáticos o hidrocarburos con enlaces dobles. Las rutas de fragmentación de este sesquiterpenoide según su espectro de masas (EI 70 eV), se muestran en el **Figura 33**.

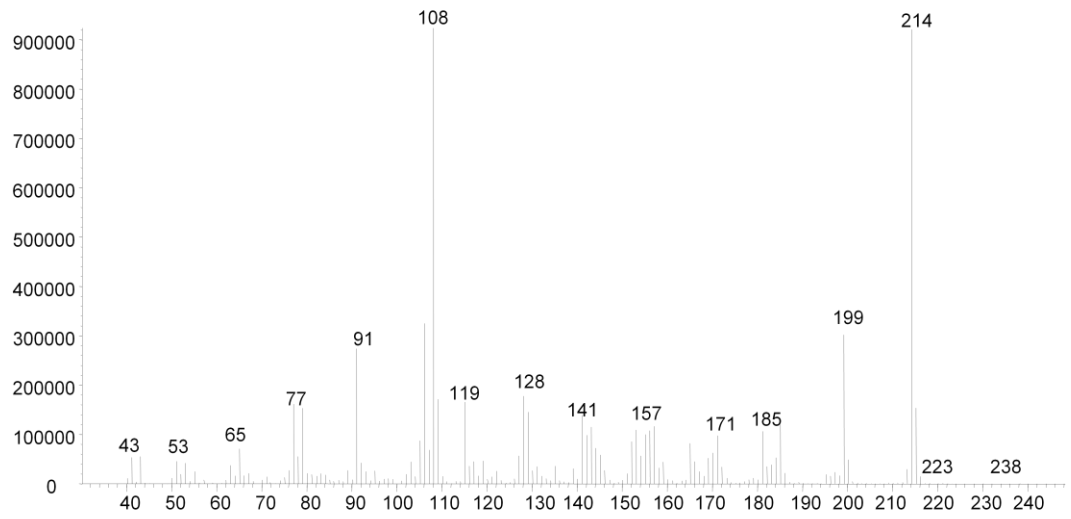


Figura 32. Espectro de masas del componente mayoritario aislado por CC, del AE de *Pogostemon* sp.

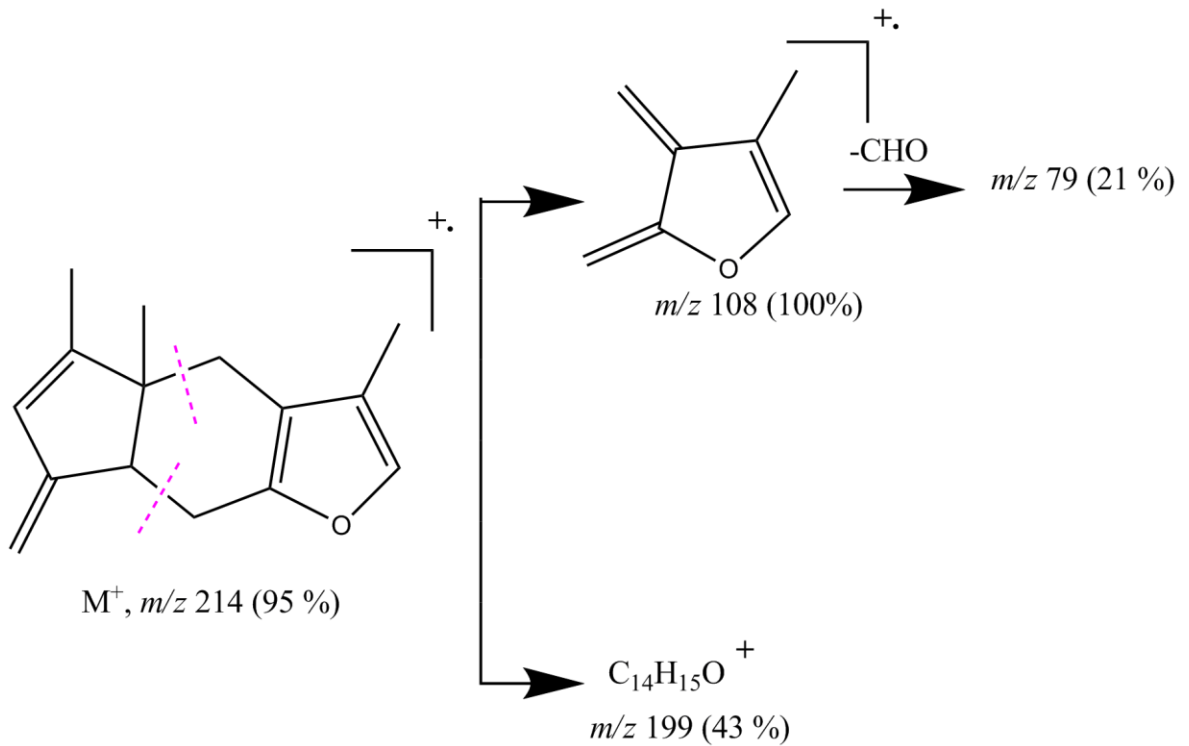
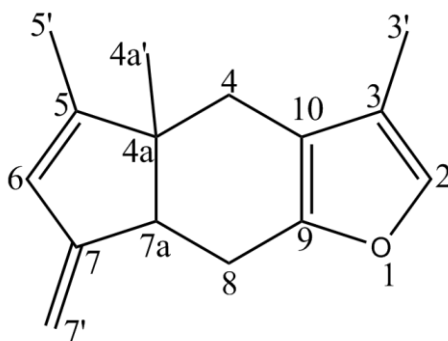


Figura 33. Iones principales en el espectro de masas del compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

La estructura propuesta para el compuesto mayoritario, según los experimentos homonucleares y heteronucleares de RMN y también, según los espectros de masas e infrarrojo, se muestra en la **Figura 34**.



3,4a,5-trimetil-7-metilen-4a,7,7a,8-tetrahidro-4H-indeno[5,6-b]furano

Figura 34. Estructura propuesta para el compuesto mayoritario aislado del AE de *Pogostemon* sp.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó por GC-MS la composición química de los AE de *Pogostemon* sp., extraídos de plantas cultivadas en el Complejo Agroindustrial Piloto de CENIVAM, situado en el campus principal de la UIS, en la ciudad de Bucaramanga, Colombia.
- Por primera vez, en Colombia, se analizó la composición química del AE de *Pogostemon* sp., obtenido por dos técnicas extractivas MWHD y AV, empleando material vegetal fresco y seco. El AE obtenido es rico en hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados.
- Se encontró que el componente mayoritario del AE de *Pogostemon* sp., analizado en el laboratorio, es diferente a los componentes mayoritarios de *Pogostemon cablin* reportados en estudios realizados en otros países donde se cultiva esta especie. El patchoulol, componente principal de la especie de *Pogostemon cablin*, no se encontró inclusive a nivel de trazas (>0,3 %)
- Se aisló y purificó el componente mayoritario del AE de *Pogostemon* sp., mediante cromatografía en columna y cromatografía en capa fina, y su identificación se propuso con base en el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear, puesto que no fue posible su identificación preliminar usando solo parámetros cromatográficos y espectros de masas.
- Teniendo en cuenta que el componente mayoritario identificado en el AE analizado es diferente a los reportados para *Pogostemon cablin* en la literatura científica, se presume que, posiblemente, esta planta sea un

nuevo quimiotipo de la especie *Pogostemon cablin*, su variedad o híbrido, o, no se descarta la especie diferente al *Pogostemon cablin*.

- Se estudiaron las condiciones de cultivo (Sombra Vs sol) y de postcosecha (Planta seca Vs seca y fermentada) sobre el rendimiento del aceite. Se encontró que la técnica destilación por arrastre con vapor y el tratamiento postcosecha mejoran la eficiencia, y aumentan el rendimiento del AE obtenido (0,33 %).

9. RECOMENDACIONES

- Teniendo en cuenta que la composición química obtenida para esta especie varió con relación a los reportes existentes en la literatura, para otros orígenes geográficos, se recomienda realizar un estudio más detallado de esta especie, modificando las localidades de su cultivo en Colombia (altitud, suelo, temperatura, etc.), con el fin de encontrar las mejores condiciones de adaptabilidad y mejoramiento de la producción de biomasa.
- Debido a la importancia de esta especie, principalmente en algunos países del continente asiático, por su uso en la medicina tradicional para el tratamiento de múltiples afecciones, así como, el uso de su AE en las industrias de perfumes y cosmética, sería conveniente realizar pruebas de actividad biológica, a saber: antimicrobial, insecticida, antiparasitaria y antioxidante. Además, se recomienda la evaluación organoléptica del AE obtenido, en virtud del exótico aroma que posee. Todo esto con el fin de tener un conocimiento más amplio de esta especie para definir sus posibles aplicaciones en medicina y en la industria.
- Si se busca aumentar la cantidad de ejemplares de esta especie, se aconseja que la forma más eficiente de realizar la propagación sea mediante la propagación por esquejes, puesto que hay un bajo índice de mortalidad de las plantas al trasplantarlas desde las bandejas de propagación a terreno o bolsas. Todo lo contrario ocurre con la propagación por semillas.
- Teniendo en cuenta, que los rendimientos obtenidos por MWHD, fueron muy bajos, se sugiere usar AV, porque permite trabajar con una mayor cantidad de material vegetal y se obtienen rendimientos más altos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. ADAMS, R.P., Identification of essential oils components by gas chromatography/quadropole mass spectroscopy, Allured Publishing, Carol Stream, IL, **2007**.
2. AHUJA, S.; JESPERSEN, N. Modern instrumental analysis. *Elsevier*, Amsterdam, **2006**, 864 p.
3. HUMBOLDT, A. Instituto Alexander von Humboldt. Biocomercio sostenible. Estudio del mercado Colombiano de aceites esenciales. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos, Bogotá, Colombia, **2003**, 109 p.
4. AREAL, R.; BESSA, J. La cromatografía de capa fina y sus aplicaciones en el campo textil. Laboratorio de Química Textil, E.T.S.I.I. Tarrasa. Francia. <http://upcommons.upc.edu/revistes/bitstream/2099/5544/1/Article02.pdf>, [Consulta: 15 de marzo de 2011].
5. AZCÓN, J.; TALÓN. Fundamentos de fisiología vegetal, McGraw Hill Interamericana, 1 ed, Barcelona, **2000**, pp. 261-283.
6. BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common fragrance and flavour materials: Perparation, Properties and Uses, 3 ed., Wiley-VCH, Weinheim, **1997**, 205 p.
7. BANDONI, A. (Ed). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: La Plata. Red de Editoriales Universitarias. **2000**, pp.13-401.

8. Base de datos *Elsevier (Scopus)*. <http://www.scopus.com/home.url>. [Consulta: 21 de junio de 2012].
9. Base de datos *Web of Science (ISI, Web of Knowledge Thomson)*. <http://portal.isiknowledge.com/portal.cgi?DestApp=WOS&Func=Fra>. [Consulta: 21 de junio de 2012].
10. BLOCH, F.; HANSEN, W.; PACKARD, M. Nuclear induction. *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 127 p.
11. BRAITHWAITE, A.; SMITH, J. *Chromatographic Methods*. Kluwer Academic Publishers, 5 ed. Dordrecht, **1999**, 571 p.
12. BUNRATHEP, S.; LOCKWOOD, G.; SONGSAKC, T.; RUANGRUNGSIA, N. Chemical constituents from leaves and cell cultures of *Pogostemon cablin* and use of precursor feeding to improve patchouli alcohol level. *Science Asia*, **2006**, 32, pp. 293-296.
13. BURÉ, M.; SELLIER, M. Analysis of the essential oil of Indonesian patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) using GC/MS (EI/CI). *J. Essent Oil Res.* **2004**, 16 (1), pp. 17-19.
14. CAREY, A. *Química orgánica*. Ed. McGraw-Hill interamericana, 6 ed., **2006**, 538 p.
15. COMBARIZA, Y.; BLANCO, C. Estudio comparativo de los aceites esenciales de hojas y frutos cítricos colombianos, Tesis de Grado, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, **1995**, pp. 15-20.

- 16.COMBARIZA, Y.; BLANCO, C.; STASHENKO, E.; SHIBAMOTO, T. Limonene concentration in lemon (*Citrus volcamericana*) peel oil as a function of ripeness. *J. High Resol. Chromatogr.*, **1994**, 17, pp. 643-646.
- 17.CUESTA, P.; VILLANEDA, E. El análisis de suelos: toma de muestras y recomendaciones de fertilización para la producción ganadera. <http://www.corpoica.org.co/sitioweb/Archivos/Foros/CAPITULOONO.pdf>, [Consulta: 1 de abril de 2011].
- 18.DE CORT, S.; SHANTHA H.; VERACHTERT, H. Localization and characterization of glucosidase activity in *Lactobacillus Brevis*. *Appl. Microbiol.* **1994**, 60, pp. 3074-3078.
- 19.DEGUERRY, F.; PASTORE, L.; WU, S.; CLARK, A.; CHAPPELL, J.; SCHALK, M. The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with a limited number of sesquiterpene synthases. *Arch. Biochem Biophys.* **2006**, 454, pp. 123-136.
- 20.DENNY, E. Hidro-distillation of oils from aromatic herbs. *Perfumer & Flavorist*, **1989**, 14, 57 p.
- 21.DOMÍNGUEZ, A. Métodos de investigación fotoquímica. Ed. Limusa: México D.F. **1988**, pp. 229, 239, 281.
- 22.DEMYTTENAERE, R. Biotransformation of terpenoids by microorganisms. Atta-ur-Rahman (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, **2001**, 25, 130 p.

23. DONELIAN, A.; CARLSON, C.; LOPES, J.; MACHADO, F. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO₂ and by steam distillation. *J. Supercrit. Fluid*, **2009**, 48, pp.15-20.
24. DURÁN, C. Estudio del aceite esencial de *Lippia alba* (Verbenaceae) y de los aspectos fisiológicos en diferentes etapas de su crecimiento bajo tres niveles de luz, Tesis de grado, Universidad Industrial de Santander, Escuela de Química, Bucaramanga, **2005**, pp. 22-25.
25. ETTRE, L.; HINSHAW, J. Basic relationships of gas chromatography, Ed. Advanstar, Cleveland, **1993**, 177 p.
26. FORGÁCS, E.; CSERHÁTI, T. Molecular basis of chromatographic separation, CRC Press, Boca Raton, **1997**, 243 p.
27. GAMA, S.; KITAJIMA, W.; LIN, T. Properties of a tobacco necrosis virus isolated from *Pogostemon patchouli* in Brazil. *Phytochemistry*, **1982**, 72, pp. 529-532.
28. GUENTHER, E. The essential Oils. History-Origin in plants production-Analysis, Litton Educational, New York, **1948**, 1, pp. 87-119.
29. HARBORNE, J, B. Phytochemical Methods, 2 ed., London, New York, **1984**, pp. 4-282.
30. Henriette's Herbal Homepage. Esta imagen está disponible en: <http://www.henriettesherbal.com/pictures/p11/pages/pogostemon-cablin.htm>, [Consulta: 13 de mayo de 2011].

31. HUSAIN, A.; VIRMANI, P.; SHARMA, A.; KUMAR, A. L.N. MISRA. Major essential oil-Bearing Plants of India. Central Institute of Medicinal & Aromatic Plants, Lucknow, India. **1988**, 237 p.
32. HUSSAIN, A. Characterization and biological activities of essential oils of some species of Lamiaceae. Tesis para optar al título de Doctor en Filosofía en Química. Faisalabad, Pakistan, University of Agriculture, **2009**, pp. 169-175.
33. ICHIKAWA, K.; KINOSHITA, T.; SANKAWA, U. The screening of Chinese crude drugs for calcium antagonist activity: identification of active principles from the aerial part of *Pogostemon cablin* and the fruits of *Prunus mume*. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, pp. 345-8.
34. Indian Medicinal Plants An Illustrated Dictionary. Springer. **2004**, 504 p.
35. JENINGS, W. Analytical Gas Chromatography. San Diego: Academic Press, **1987**, 159 p.
36. JOY, P.; THOMAS, J.; MATHEW, S.; JOSE, G.; JOSEPH, J. Aromatic plants. *Tropical Horticulture*. Naya Prokash, Calcuta. **2001**, 2, pp. 633-733.
37. KHARE, C. P.; Indian Medicinal Plants: an illustrated dictionary, Ed. Springer: New Delhi, **2007**, pp. 504-506.
38. KIUCHI, F.; MATSUO, K.; ITO, M.; QUI, T, K.; HONDA, G. New Sesquiterpene Hydroperoxides with Trypanocidal Activity from *Pogostemon cablin*. *Chem. Pharm. Bull.* **2004**, 52 (12), pp. 1495-1496.

39. KONGKATHIP, N.; SAM-ANG¹, P.; KONGKATHIP, B.; PANKAEW, Y.; TANASOMBAT, M.; UDOMKUSONSRI, P. Development of Patchouli Extraction with Quality Control and Isolation of Active Compounds with Antibacterial Activity. *Kasetsart J. Nat. Sci.*, **2009**, 43(3), pp. 519 – 525.
40. KOVÁTS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Advan. Chromatogr.*, **1965**, 1, pp. 229-247.
41. HU, F.; LI, P.; CAO, H.; LIU, J.; GAO, L.; YANG, Q.; WANG, T. GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, 42, pp. 200-206.
42. LU, T.; LIAO, J.; HUANG, T.; LIN, Y.; LIU, C.; CHIU, Y.; PENG, W. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of the Methanol Extract from *Pogostemon cablin*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2011**, pp.1-9.
43. LUO, P.; LIU, P.; FENG, F.; GUO, L.; CAO, H. *Yao Xue Xue Bao* **2003**, 38, 307 p.
44. MAGUNACELAYA, C.; AHUMANA, T.; PACHECO, H. Aspectos generales de manejo de nemátodos fitoparásitos de importancia agrícola en viñedos en Chile
<http://www.uvademesa.cl/ARCHIVOS%20PDF/Nematodos%20avance%20%20JCM%20Julio04.pdf>, [Consulta: 9 de junio de 2011].
45. MARTÍNEZ, A. Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica. Universidad de Antioquia. Medellín, Febrero **2003**, pp. 1-26.

46. MAHESWARI, L.; VASANT T.; SHARMA, N.; CHANDEL, S. Patchouli: an Indian perspective, *Indian Perfumer*, **1993**, 37, pp. 9-11.
47. MANGLANI, N.; DESHMUKH S.; KASHYAP P. Evaluation of Anti-Depressant Activity of *Pogostemon cablin* (Labiatae). *J. Pharm. Tech Res*, **2011**, 3(1), pp. 58-61.
48. SINGH, M.; SHARMA, S.; RAMESH, S. Herbage, oil yield and oil quality of patchouli *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth] influenced by irrigation, organic mulch and nitrogen application in semi-arid tropical climate. *Ind. Crop. Prod.* **2002**, 16, pp. 101-107.
49. McLAFFERTY, F. W., TURECEK, F. Interpretation of mass spectra. Ed. University Science Books, San Diego, **1993**, 374 p.
50. McNAIR, M.; MILLER, M. Basic gas chromatography: techniques in analytical chemistry. Ed. John Wiley & Sons, 1 ed. New York, **1997**, 208 p.
51. Métodos de secado de hierbas aromáticas y medicinales, www.herbotecnia.com.ar/poscosecha-secadoMetodos.htm, [Consulta: 01 de mayo de 2011].
52. MILLER, J. Chromatography concepts and contrasts, Ed. John Wiley, New York, **1998**, 297 p.
53. MUNI-RAM; DASHA-RAM; SINGH, H.; NAQVI, A.; SUSHIL-KUMAR. Studies on intercropping of patchouli (*Pogostemon cablin*) with papaya (*Carica papaya*). *J. Med. Aromat. Plant Sci.*, Lucknow, **1999**, 21(2), pp. 358-360.

54. NÁF, F; DECORZANT, R; GIERSCH, W. Ohloff, A Stereocontrolled Access to (\pm)-, (-)-, and (+)-Patchouli Alcohol. *Helv. Chim. Acta* 64, **1981**, pp. 1387-1397
55. NATHAN, J. Resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1 y de carbono-13, Washington, D.C. US., Secretaría de la Organización de los Estados Americanos. 2 ed., **1982**, pp. 1-16, 33-68.
56. POOLE, C.; POOLE, S. Chromatography Today, Ed. *Elsevier*, Amsterdam, **1991**, 2, 92 p.
57. PURCELL, M.; TORREY, C.; POUND, V. Resonance Absorption by Nuclear Magnetic Moments in a Solid. *Phys. Rev.*, **1946**, 69, 37 p.
58. PUTTANA, K., RAO, P.; GOPINATH, T; RAMESH, S. Effect of shade and nitrogen on herb yield and longevity of patchoulí (*Pogostemon cablin*). *J. Med. Aromat. Plant Sci.*, Lucknow, **2005**, 27(2), pp. 297-300.
59. QUATTROCCHI, A.; LABA, F.; ANDRIZZI, I. Introducción a la HPLC, Ed Artes Gráficas Farro SA, Argentina **1992**, pp. 138-149.
60. RANDEPATH, K. Thin Layer Chromatography. Academic Press, 2 ed. Alemania, **1964**.
61. REYES, A.; PATIÑO, G. Comparación de los metabolitos secundarios volátiles de dos especies de *Ocimum* sp. (Labiatae), en función del método de extracción y estudio de las actividades antioxidante, citotóxica y antifúngica. Universidad Industrial de Santander. Trabajo de grado. Bucaramanga. **2007**, 54 p.

62. RÖDEL, W.; WÖLM, G. A guide to gas chromatography. Ed. Hüthig, Heidelberg, New York, **1987**, 211 p.
63. RUBIO, M. Espectroscopía de infrarrojo, Secretaría de la Organización de los Estados Americanos. Washington, D.C. 2 ed., **1981**, pp. 25-46.
64. SALISBURY, F.; ROSS, C. Fisiología vegetal, Grupo Editorial Iberoamericana, México D.F, **1994**, pp. 71-98, 515-535.
65. SARMA, T. Patchouli- an Aromatic Oil Crop for Development of Perfumery Industry in Northeast India. (Book Chapter) Aromatic Plants from Asia their Chemistry and Application in Food and Therapy. Ed. Leopold Jirovetz, Nguyen Xuan Dung and V K Varshney, Dehradun, p-197-201
66. SCOTT, P. Introduction to analytical gas chromatography, 2^a Ed, Ed. Marcel Dekker, New York, **1998**, 397 p.
67. SNYDER R. Principles of Adsorption Chromatography, Ed. Marcel, Dekker, New York **1968**, pp. 185- 239.
68. SPINAK, E. Indicadores cuantitativos.
<http://eprints.rclis.org/archive/00001875/01/sci07100.pdf>, [Consulta: 24 de marzo de 2011].
69. STASHENKO, E.; COMBARIZA, Y.; PUERTAS, A. Aceites esenciales: Técnicas de extracción y análisis. Laboratorio de Fitoquímica & Cromatografía, Bucaramanga. Universidad Industrial de Santander. **1998**, pp. 9-25.

70. STASHENKO, E.; JARAMILLO, E.; MARTÍNEZ, J. R. 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*, **2004**, 1025, pp. 93-103.
71. STASHENKO, E., MARTÍNEZ, J. R. GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones. *Scientia Chromatographica*, **2010**, 2(3), 28 p.
72. SKOOG, D. A. Principios de análisis instrumental, McGraw-Hill, 5 ed., Barcelona, **2000**, pp. 490-528.
73. STHAL, E. Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook. Ed. Academic Press, Berlin, Germany, **1965**, pp. 188-189.
74. STUART, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications, Ed. John Wiley & Sons, Sydney, Australia, **2004**, 74 p.
75. SETTLE, F. Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry, Ed. Prentice Hall, New York, **1997**, 995 p.
76. SUGIMURA, Y.; ICHIKAWA, Y.; OTSUJI, K.; FUJITA, M.; TRI, M.; KAMATA, N.; ROSARIO, R.; LUINGAS, R; TAGA-AN L. Cultivarietal comparison of patchouli plants in relation to essential oil production and quality. *Flav. Fragrance J.*, **1990**, 5, pp. 109-114.
77. TAYLOR & FRANCIS Group, Biology of floral scent, Ed. CRC Press, London, **2006**, pp. 14-15.

78. TOUCHSTONE, J. Practice of Thin Layer Chromatography. John Wiley & Sons, 3 ed., Estados Unidos, **1992**.
79. TSAI, Y.; HSU, H.; YANG, W.; TSAI, W.; CHEN, C.; WATANABE, T.; *Fitoterapia*, **2007**, 78, 7 p.
80. TSUBAKI, N; NISHIMURA, K; HIROSE, Y. hydrocarbons in patchouli oil. *Bulletin of the chemical society of Japan*, 1967, 40, pp. 597-600.
81. VARGAS, P.; ORTIZ, I.; ROJAS, V. Vigilancia Tecnológica Aplicada a Nanociencia y Nanotecnología en Países de Latinoamérica. *J. Technol. Manag. Innov.*, **2006**, 1(4), pp. 83-94.
82. VELANDIA, B.; ARIAS, Y. Determinación del número de octano en gasolinas colombianas por RMN-¹H. Universidad Industrial de Santander. Trabajo de grado. Bucaramanga, **2001**, pp. 27-34.
83. WALL, P. Thin Layer Chromatography, A Modern Practical Approach, Ed. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2005**, pp. 2-153.
84. WEI, A.; SHIBAMOTO, T.; Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 1737 p.
85. WEISS A. Lamiaceae, patchouli, capítulo 5, CABI. *Essential Oil Crops*. **1997**, pp. 138-154.
86. ZHAO, Z.; LU, J.; CHAN, C.; JIANG, Z. Determination of patchouli alcohol in Herba *Pogostemonis* by GC-MS-MS. *Chem. Pharm. Bull.* **2005**, 53(7), 8.

ANEXO 1. Certificación del X Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Popayán del 9 al 12 de junio de 2009.

Universidad del Cauca
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación
Departamento de Química
Grupo de Investigación Química de Compuestos Bioactivos

Certifican que:

Laura Milena Castrillon
con C.C. 63453481

Participó en calidad de: **ASISTENTES**

En el X Congreso Colombiano de Fitoquímica
Realizado en Popayán en los días 9 al 12 de junio de 2009

Isabel Bravo R
Msc. ISABEL BRAVO REALPE
Jefe Departamento de Química

Fabio Cabezas
Ph.D. FABIO CABEZAS
Presidente comité organizador



X CONGRESO
COLOMBIANO DE
FITOQUIMICA
9 al 12 de junio de 2009

Universidad
del Cauca
NIT. 891.500.319-2



**COSECHANDO
SOLUCIONES**

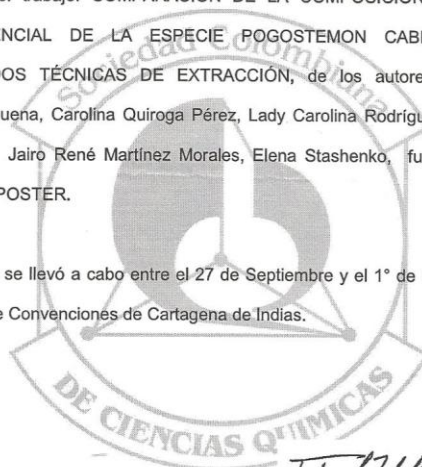
ANEXO 2. Certificación del XXIX Congreso Latinoamericano de Química, XVI Congreso Colombiano de Química, VI Congreso Colombiano de Cromatografía, realizado en Cartagena del 27 de septiembre al 1 de octubre del 2010.

XXIX Congreso
Latinoamericano
de Química CLAQ 2010

Bogotá, D.C, 01 de octubre de 2010

La organización del XXIX Congreso Latinoamericano de Química – CLAQ 2010 certifica que el trabajo: COMPARACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA ESPECIE POGOSTEMON CABLIN OBTENIDO MEDIANTE DOS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN, de los autores Laura Milena Castrillón Valbuena, Carolina Quiroga Pérez, Lady Carolina Rodríguez, Ginna Paola Arias Moyano, Jairo René Martínez Morales, Elena Stashenko, fue presentado en Modalidad de POSTER.

El CLAQ 2010 se llevó a cabo entre el 27 de Septiembre y el 1° de Octubre de 2010 en el Centro de Convenciones de Cartagena de Indias.



Fabián Parada Alfonso

FABIÁN PARADA ALFONSO
Presidente
Comité Organizador – CLAQ 2010

Miguel Tobar Carrizosa

MIGUEL TOBAR CARRIZOSA
Presidente
Comité Científico – CLAQ 2010

Calle 44 No. 45 - 67 Unidad Camilo Torres - Bloque C, Módulo 7, Oficina 202 • Teléfono: (57 1) 221 6920
Fax: (57 1) 315 0751 - E-mail: info@socolquim.com • www.socolquim.com • www.claq2010.com
Bogotá, D. C. - Colombia

ANEXO 3. Certificación del XI Congreso Colombiano de Fitoquímica, realizado en Medellín del 5 al 7 de octubre del 2011.



**LA FACULTAD DE QUIMICA FARMACEUTICA
DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA**

Certifica que:

LAURA MILENA CASTRILLÓN VALBUENA.

Presento en modalidad de poster el trabajo

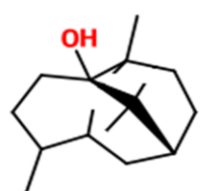
**ESTUDIO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DEL
ACEITE ESENCIAL DE *pogostemon cablin* (PATCHOULI) EN
HOJAS FRESCAS Y SECAS OBTENIDO POR DOS METODOS DE
EXTRACCION.**

en el marco del **XI CONGRESO COLOMBIANO DE FITOQUÍMICA** que
se realizó del 5 al 7 de octubre de 2011 en la ciudad de Medellín

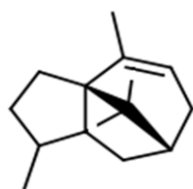
Cordialmente,

Edison Osorio
Presidente Comité Organizador
XI Congreso Colombiano De Fitoquímica
Facultad Química Farmacéutica
Universidad de Antioquia

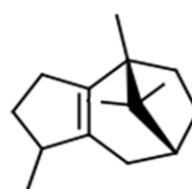
ANEXO 4. Metabolitos secundarios volátiles presentes en el AE de *P. cablin*.



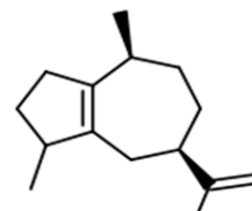
(-)-patchoulol



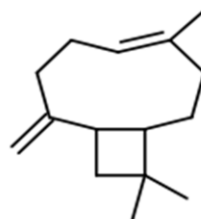
α -patchouleno



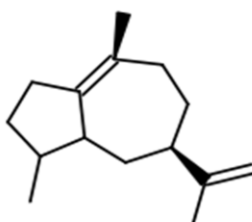
β -patchouleno



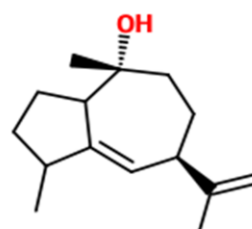
α -guaieno



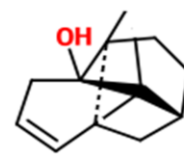
trans- β -cariofileno



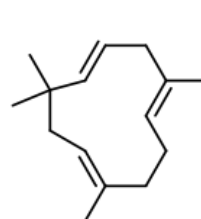
α -bulneseno



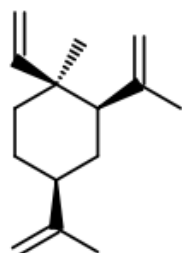
(-)-pogostol



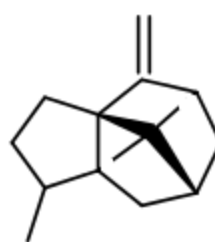
norpatchoulol



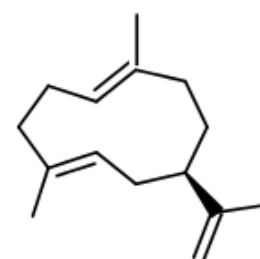
β -Elemeno



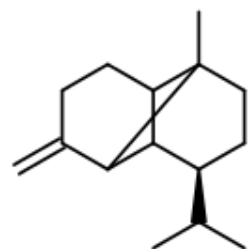
α -Humuleno



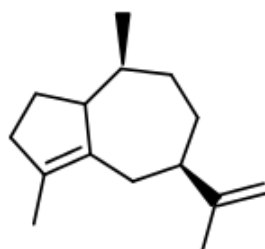
γ -Patchouleno



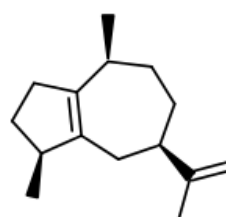
(+)-Germacreno



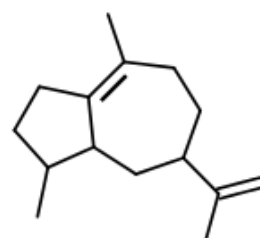
β -Ylangeno



Guai-4,11-dieno



α -Guaieno



δ -Guaieno

ANEXO 5. Resultado de la Identificación botánica de la especie *P. cablin*.



Bogotá D.C., 5 de Junio de 2009
COL-094

Señores
Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y
Medicinales Tropicales - CENIVAM
Atn: Dra. Elena Stashenko
Bucaramanga

Asunto: Identificación Taxonómica.

Cordial Saludo:

Me permito dar respuesta a su solicitud referente a la identificación taxonómica de la(s) muestra(s)
botánica(s):

Especie	Familia	No. COL	No. Colección	Determinó
<i>Cymbopogon citratos</i> (DC.) Stapf.	POACEAE	531013	Martha Ligia Barrera Navarro No.101	O. Rivera-Díaz
<i>Cananga odorata</i> (Lam.) Hook. f & Thomson	ANNONACEAE	531012	Martha Ligia Barrera Navarro No.104	O. Rivera
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	LAMIACEAE	531011	Martha Ligia Barrera Navarro No.105	O. Rivera
<i>Corymbia calophylla</i> (Lindl.) K. D. Hill & L.A.S. Johnson	MYRTACEAE	531009	Martha Ligia Barrera Navarro No.106	O. Rivera
<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.	LAMIACEAE	531010	Carlos Ruiz, Carolina Quiroga, Laura Castrillón, Ginna Arias s.n.	J.L.Fernández

Esta certificación no es válida para trámites ante el INVIMA o el ICA. El (Los) pliego(s) testigo(s) quedará(n)
como muestra permanente en nuestro herbario.

Cordialmente,

Prof. Luis Carlos Jiménez
Administrador General
Herbario Nacional Colombiano (COL)
E-mail Herbario: herbacol_fcbog@unal.edu.co

Copia: Archivo COL


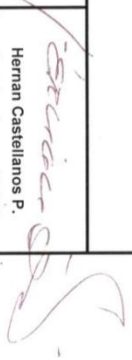
Lucas B.

ciencia y tecnología para el país

Carrera 30 No.45-04, Ciudad Universitaria, Edificio 425, Entrada Calle 53
Tel: (57-1) 3165305 Conmutador: (57-1) 3165000 Ext.11538 - Apartado 7495
Fax (57-1) 3165365 Conmutador: (57-1) 316 50 00 Ext.11502
Correo electrónico: nerojasb@unal.edu.co
Bogotá, Colombia, Sur América

ANEXO 6. Resultado del análisis de suelos.

LABORATORIO QUIMICO DE SUELOS		PROGRAMA DE SUELOS		DIRECCION: Carrera 27 Calle 9		Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2499		Bucaramanga - Santander del Sur		CONVENIO GOBERNACION DE SANTANDER - UIS		SECRETARIA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL		ESCUELA DE QUIMICA - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER		Teléfax: (763)24861 - Correo Electrónico: laboratorioquimicosuelos_uis@yahoo.com		ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO			
CLIENTE: CENIVAM		MUNICIPIO: Bucaramanga		VEREDA:		DEPARTAMENTO:		Santander		CARACTERIZACIÓN		ELEMENTOS MENORES		Cultivo:		Finca:		CENIVAM			
DIRECCION:		TELEFONOS:		ANÁLISIS SOLICITADOS		ANÁLISIS SOLICITADOS		x		x		Cultivo:		CENIVAM		CENIVAM		CENIVAM			
TOPOGRAFIA:		EXTENSION:		ANÁLISIS SOLICITADOS		ANÁLISIS SOLICITADOS		x		x		Cultivo:		CENIVAM		CENIVAM		CENIVAM			
RESULTADO DEL ANÁLISIS DE SUELOS																					
No. Orden	No. Lab.	pH	% C	P (ppm) Bray II	Ca	Mg	Na	K	Al	% Arena	% Limo	% Arcilla	TEXTURA	CIC meq/100g	CE mmhos/cm	S	B	Fe	Mn	Cu	Zn
	8371	6.9	2.11	52.6	12.3	1.04	0.11	0.23	----	64	16	20	Franco-Arcillo-Arenoso	----	-----	-----	0.48	20.4	3.92	13.92	6.00
PARAMETROS					METODO ANALITICO										OBSERVACIONES						
pH: Potencial de Hidrogeno					Electrométrico										N.D. : No detectable a la mínima concentración detectada para el método						
C: Carbono					Colorimétrico										Vobbo						
P: Fósforo disponible					Colorimétrico										Parcela E						
Ca, Mg, Na, K					Absorción Atómica										Copia						
Al: Aluminio intercambiable					Valoración										JAMETH CAMARGO HERNANDEZ						
% Textura					Boyucous:										Mat. Prof. 0047						
B: Boro					Colorimétrico																
Fe, Mn, Cu, Zn					Absorción Atómica																
S: Azufre					Turbidimétrico																
CIC Capacidad Intercambio Catiónico					Electrométrico																
CE: Conductividad Eléctrica					Agua destilada																

 LABORATORIO QUIMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCION: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext: 2499 Bucaramanga - Santander del Sur		CONVENIO GOBERNACION DE SANTANDER - UIS Telefon: 6324861 ESCUELA DE QUIMICA - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Correo Electronico: laboratorioquimico@desuelos_uis@yahoo.com		ANALISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO	
CLIENTE: CENIVAM		MUNICIPIO: Bucaramanga		VEREDA:	
DIRECCION:		TELEFONOS: 6344000 Ext 1133		DEPARTAMENTO: Santander	
TOPOGRAFIA:		EXTENSION:		Finsa: Centivam Cultivo:	
No. Laboratorio: 8371		Lote: Parcela E		Edad: Iniciar	
<p>Análisis de Resultados: La reacción del suelo es Neutro (pH= 6.9). El contenido de Materia Orgánica es Medio. El Contenido de Nitrogeno Total es Medio. El nivel de Fósforo, Calcio, Cobre, Zinc es Alto. El nivel de Hierro es Adecuado. El nivel de Potasio es Medio. El nivel de Magnesio, Boro, Manganeso es Bajo. El nivel de Sodio es Normal. La Textura es Adecuada.</p>					
				 <p>Herran Castellanos P. Ingeniero Agrónomo U. Nal. T.P. 11090</p>	



LABORATORIO QUIMICO DE SUELOS

PROGRAMA DE SUELOS
DIRECCION: Carrera 27 Calle 9
Ciudad Universitaria Telefono: 6344000 Ext. 2499
Bucaramanga - Santander del Sur

CONVENIO GOBERNACION DE SANTANDER - UIS

SECRETARIA DE AGRICULTURA Y DESARROLLO RURAL
ESCUELA DE QUIMICA - UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
Telefax: (76324861 - Correo Electronico: laboratorionquimicosuelos_uis@yahoo.com

ANALISIS DE SUELOS - UN BENEFICIO
MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL
CAMPO

DIA: 7
MES: Septiembre
ANO: 2009

CLIENTE: CENIVAM

MUNICIPIO: Bucaramanga

VEREDA:

DEPARTAMENTO: Santander

CARACTERIZACION: x

Finca: Cénivam

DIRECCION:

TELÉFONOS:

DEPARTAMENTO: ANALISIS SOLICITADOS

Elementos menores: x

Cultivo: AZUFRE

CIC

CE

TOPOGRAFIA:

EXTENSION:

ANALISIS SOLICITADOS

x

Cultivo: AZUFRE

CIC

CE

RESULTADO DEL ANALISIS DE SUELOS

No. Orden	No. Lab.	pH Unidad	% C	P (ppm) Bray II	Ca Mg Na K AI					% Arena	% Limo	% Arcilla	TEXTURA	CIC meq/100g	CE mmhos/cm	S B Fe Mn Cu Zn						
					meq/100g suelo											(ppm)						
	8370	6.9	1.39	21.8	10.3	0.71	0.09	0.18	---	64	18	18	Francoso-Arenoso	---	---	0.39	18.4	3.08	0.56	2.00		

PARAMETROS

pH: Potencial de Hidrogeno
C: Carbono
P: Fósforo disponible
Ca, Mg, Na, K
Al: Aluminio intercambiable
% Textura
B: Boro
S: Fe, Mn, Cu, Zn
CIC Capacidad Intercambio Catiónico
CE: Conductividad Eléctrica

MÉTODO ANALITICO


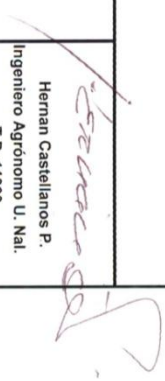
Electrométrico: Relación 1:1 Agua destilada
Colorimétrico: Walkley Black K2C2O7-H2SO4
Colorimétrico: Bray II, HCl 0.1 N-NH4F 0.03 N
Absorción Atómica: Extracción: Acetato de Amonio
Valoración: Extracción KCl
Boyauocous: Agua destilada
Colorimétrico: Extracción Fosfato Monocálcico
Absorción Atómica: Extracción con DTPA
Turbidimétrico: Extracción Fosfato Monocálcico
Electrométrico: Extracción Acetato de Amonio
Agua destilada

OBSERVACIONES

N.D.: No detectable a la mínima concentración detectada para el método
Parcela AB
Copia

Vobo

JAIME H. CAMARGO HERNANDEZ
Químico
Mat. Prof. 0047

 LABORATORIO QUIMICO DE SUELOS PROGRAMA DE SUELOS DIRECCION: Carrera 27 Calle 9 Ciudad Universitaria Teléfono: 6344000 Ext. 2499 Bucaramanga – Santander del Sur		CONVENIO GOBERNACION DE SANTANDER – UIS Telefax: 6324861 ESCUELA DE QUIMICA – UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER Correo Electronico: laboratorioquimicosuelos_uis@yahoo.com		ANÁLISIS DE SUELOS: UN BENEFICIO MAYOR Y PRIORITARIO PARA EL CAMPO	
CLIENTE: CENIVAM		MUNICIPIO: Bucaramanga		VEREDA:	
DIRECCIÓN:		TELÉFONOS: 6344000 Ext 1133		DEPARTAMENTO: Santander	
TOPOGRAFÍA:		EXTENSIÓN:		Fincas: Centivam Cultivo:	
No. Laboratorio: 8370					
Lote: Parcela AB					
Edad: Iniciar					
Análisis de Resultados: La reacción del suelo es Neutro (pH= 6.9). El contenido de Materia Orgánica es Medio. El Contenido de Nitrogeno Total es Medio. El nivel de Calcio es Alto. El nivel de Fósforo es Medio. El nivel de Magnesio, Potasio, Boro, Hierro, Manganeso, Cobre, Zinc es Bajo. El nivel de Sodio es Normal. La Textura es Adecuada.					
					 Hernan Castellanos P. Ingeniero Agronomo U. Nal. T.P. 11090