

Estudio por técnicas Cromatográficas y de Espectrometría de Masas de los metabolitos secundarios de *Pogostemon cablin* Benth (Fam. Lamiaceae) en función de diferentes métodos de extracción.

Cristian Andrés Oliveros

Trabajo de investigación para optar al título de Magister en Química

Directora:

Elena E. Stashenko

Química, Ph.D.

Codirector:

Jairo R. Martínez Morales,

Químico, Ph. D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Maestría en Química

Bucaramanga

2020

Dedicatoria

A todos aquellos que incansablemente luchan por construir la Paz con Justicia Social en Colombia.

A todos los profesionales que trabajan en Ciencia e Investigación, motores de transformación social y cultural.

A mi madre por darme la vida, acompañarme en todo mi proceso de crecimiento integral y ser el ejemplo esperanzador para seguir adelante.

Agradecimientos

A la Universidad Industrial de Santander, a la Facultad de Ciencias y a la Escuela de Química, por la formación académica e integral.

A Colciencias, por la financiación de este proyecto por medio de la Bio-Red-CO-CENIVAM y el programa de Colombia Científica Bio-Reto XXI 15:50.

A la profesora Elena Stashenko y el profesor Jairo René Martínez, maestros ejemplares, por sus enseñanzas, conocimientos científicos y humanismo transmitidos.

A los amigos y compañeros de CENIVAM, por el intercambio de conocimientos y los momentos agradables.

Contenido

	Pág.
Introducción	23
1. Estado del Arte.....	26
1.1 Estado actual de las investigaciones científicas sobre <i>Pogostemon cablin</i>	26
1.2 La planta de pachulí - <i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth	30
1.2.1 Generalidades y aspectos botánicos	30
1.2.2 Aspectos agronómicos	33
1.2.2.1 Cultivos mixtos con pachulí.....	34
1.2.2.2 Propagación de plantas	35
1.2.2.3 Nutrientes en los cultivos.....	36
1.2.2.4 Enfermedades.....	38
1.2.3 Metabolitos secundarios volátiles	38
1.2.4 Metabolitos secundarios no volátiles	48
1.3 El mercado de los productos de valor del pachulí	55
2. Parte Experimental.....	61
2.1 Materiales, reactivos y equipos auxiliares de laboratorio	61
2.2 Material vegetal	63
2.3 Obtención de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles	65
2.3.1 Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	65
2.3.2 Obtención de los aceites esenciales por arrastre con vapor	68
2.3.3 Obtención de los extractos por dispersión de la matriz en fase sólida.....	70

2.3.4 Obtención de los extractos por extracción con solventes asistida por ultrasonido	71
2.4 Análisis instrumental	73
2.4.1 Caracterización química de los aceites esenciales	73
2.4.2 Caracterización química de los extractos.....	75
3. Resultados.....	77
3.1 Pérdida de peso de las plantas de pachulí cosechadas	77
3.2 Rendimientos de los extractos de pachulí obtenidos por MSPD y UAE	82
3.3 Caracterización química y cuantificación de los sesquiterpenoides contenidos en los aceites esenciales de pachulí.....	84
3.4 Caracterización química y cuantificación de los polifenoles contenidos en los extractos de pachulí.....	101
4. Discusión y Análisis de Resultados.....	112
4.1 Influencia del tiempo de secado, parte de la planta, tiempo de la destilación y tamaño de partícula sobre el rendimiento y la calidad del aceite esencial de pachulí obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas	112
4.2 Influencia del tiempo de la destilación y fraccionamiento sobre el rendimiento y la calidad del aceite esencial de pachulí obtenido por arrastre con vapor.....	117
4.3 Análisis de costos del aceite esencial de pachulí	121
4.4 Análisis descriptivo y comparativo de los extractos de pachulí obtenidos por MSPD y UAE	124
4.5 Comparación del contenido de flavonoides en los extractos de pachulí obtenidos por MSPD y UAE	129
5. Conclusiones.....	133

Referencias Bibliográficas.....	136
Apéndices.....	148

Listado de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Identificación taxonómica de la especie <i>Pogostemon cablin</i>	31
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de pachulí.	40
Tabla 3. Rangos permitidos de algunos componentes del aceite esencial de pachulí, según la norma ISO 3757:2002.	43
Tabla 4. Componentes mayoritarios (%) del AE de pachulí, según la región de su cultivo.	49
Tabla 5. Países con mayores importaciones y exportaciones de aceites esenciales, extractos y derivados (código arancelario 3301) en el año 2019.	56
Tabla 6. Materiales, reactivos y equipos empleados en el presente estudio.	62
Tabla 7. Condiciones experimentales usadas en el tratamiento enzimático con <i>Celluclast</i> [®]	67
Tabla 8. Diseño experimental factorial para MSPD, con triplicado en los puntos bajos y altos. .	70
Tabla 9. Diseño experimental factorial para UAE, con triplicado en los puntos bajos y altos.	72
Tabla 10. Resultados de la pérdida de peso de las plantas de pachulí cosechadas del monocultivo en función del secado postcosecha a la sombra.	78
Tabla 11. Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD, según el tiempo de secado postcosecha.	79
Tabla 12. Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD, según diferentes partes de la planta.	79
Tabla 13. Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD con un tratamiento enzimático (<i>Celluclast</i> [®]).	80
Tabla 14. Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD, según el tiempo de destilación para dos tamaños de partícula diferentes.	80

Tabla 15. Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por AV, según el tiempo de destilación.	81
Tabla 16. Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por AV en función de un fraccionamiento cada 30 min.	82
Tabla 17. Resultados de los rendimientos obtenidos de las extracciones por MSPD.....	82
Tabla 18. Resultados de los rendimientos obtenidos de las extracciones por UAE.	83
Tabla 19. Composición elemental y medición de las masas exactas del ion molecular e iones-producto de la pogostona.	87
Tabla 20. Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) del aceite esencial de <i>P. cablin</i> (toda la planta, hojas y tallos), obtenido por MWHD.	89
Tabla 21. Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) del aceite esencial de <i>P. cablin</i> (toda la planta, hojas y tallos), obtenido por MWHD. Cantidades se expresan en equivalentes de <i>n</i> -tetradecano.	90
Tabla 22. Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) de los aceites esenciales de <i>P. cablin</i> , obtenidos por MWHD, según las partes de la planta: hojas y tallos	91
Tabla 23. Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) de los aceites esenciales de <i>P. cablin</i> , obtenidos por MWHD, según las partes de la planta: hojas y tallos. Cantidades se expresan en equivalentes de <i>n</i> -tetradecano.	93
Tabla 24. Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) de los aceites esenciales de <i>P. cablin</i> , obtenidos por MWHD, usando un tratamiento enzimático con <i>Celluclast</i> [®]	94

Tabla 25. Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) de los aceites esenciales de *P. cablin*, obtenidos por MWHD, usando un tratamiento enzimático con *Celluclast*[®].

Cantidades se expresan en equivalentes de *n*-tetradecano..... 95

Tabla 26. Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) del aceite esencial de *P. cablin* (material vegetal fresco), obtenido por AV, en función del tiempo de la destilación. 96

Tabla 27. Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) del aceite esencial de *P. cablin* (material vegetal fresco), obtenido por AV, en función del tiempo de la destilación. Cantidades se expresan en equivalentes de *n*-tetradecano 98

Tabla 28. Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) del aceite esencial de *P. cablin* (material vegetal seco), obtenido por AV, fraccionado en el tiempo (30 min) de la destilación..... 99

Tabla 29. Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) del aceite esencial de *P. cablin* (material vegetal seco), obtenido por AV, fraccionado en el tiempo (30 min) de la destilación. Cantidades se expresan en equivalentes de *n*-tetradecano..... 100

Tabla 30. Identificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los flavonoides en los extractos etanólicos de *P. cablin* 110

Tabla 31. Cuantificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los flavonoides contenidos en los extractos etanólicos MSPD de *P. cablin* 111

Tabla 32. Cuantificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los flavonoides contenidos en los extractos etanólicos UAE de *P. cablin*..... 111

Tabla 33. Comparación de los aceites esenciales, obtenidos por MWHD y AV, en el presente estudio, según los criterios de calidad, establecidos por la norma ISO 3757:2002. 121

Tabla 34. Costos de producción del AE y ganancia por hectárea de cultivo sin suministro de abono.....	122
Tabla 35. Costos de producción del AE y ganancia por hectárea de cultivo con suministro intenso de abonado.	123
Tabla 36. Factores y niveles en el diseño factorial correspondientes a la extracción por MSPD.....	126
Tabla 37. Factores y niveles en el diseño factorial correspondientes a la extracción por UAE	126
Tabla 38. Hipótesis de prueba del ANOVA para la extracción por MSPD.....	127
Tabla 39. Hipótesis de prueba del ANOVA para la extracción por UAE.	127
Tabla 40. Análisis de varianza para el rendimiento obtenido por extracción MSPD. A: Concentración de etanol; B: Soporte sólido; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio. ..	128
Tabla 41. Análisis de varianza para el rendimiento obtenido por extracción MSPD. A: Concentración de etanol; B: Tiempo; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio.	129

Listado de Figuras

	Pág.
Figura 1. Desarrollo cronológico de publicaciones científicas sobre <i>P. cablin</i>	26
Figura 2. Top diez de las revistas principales, en las cuales se publicó el número mayor de trabajos sobre la especie <i>P. cablin</i>	27
Figura 3. Planta de pachulí completa y la morfología de su hoja.	32
Figura 4. Estructuras químicas de los metabolitos secundarios más representativos en un aceite esencial de <i>P. cablin</i>	41
Figura 5. Países asociados con el mayor número de publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de <i>P. cablin</i>	45
Figura 6. Estructuras químicas de los flavonoides derivados de flavona en <i>P. cablin</i>	53
Figura 7. Estructuras químicas de los flavonoides derivados de flavona en <i>P. cablin</i>	53
Figura 8. Estructuras químicas de los flavonoides derivados de flavonol en <i>P. cablin</i>	54
Figura 9. Estructura química de licochalcona A.	54
Figura 10. Variación de precios del AE de pachulí indonesio.....	58
Figura 11. Diagrama metodológico general desarrollado en el presente estudio.	61
Figura 12. Parcelas experimentales de <i>P. cablin</i> , en monocultivo con sombra parcial y en cultivo mixto con papaya.	64
Figura 13. Montaje MWHD con tratamiento enzimático.. A. Calentamiento de la solución buffer; B. Incubación de <i>Celluclast</i> [®] en el material vegetal; C. Obtención del AE; D. Separación del AE e hidrolato en la trampa <i>Dean-Stark</i> y E. Secado del AE.	68
Figura 14. Destilador de acero inoxidable (0,1 m ³) y sistema de recolección de fracciones de AE en el tiempo.....	69

Figura 15. Extracción MSPD. A. Homogeneizado de la mezcla del material vegetal y el soporte sólido; B. Homogeneizado transferido al cartucho prefabricado y C. Elución con el solvente y recolección del extracto.	71
Figura 17. Equipos analíticos instrumentales usados en la presente investigación. A. GC-MS; B. GC-FID; C. GCxGC-HRTOF-MS y D. UHPLC-ESI-HRMS-Orbitrap.	76
Figura 18. Curva de humedad de las plantas de <i>P. cablin</i> en función del secado postcosecha a la sombra.	77
Figura 19. Curva de rendimiento acumulativo de extracción del AE obtenido por MWHD, de dos tamaños de partícula diferentes de pachulí.	81
Figura 20. Comparación de las corrientes iónicas totales (TIC, cromatogramas GC/MS) del AE de pachulí obtenido por MWHD en las columnas capilares.	85
Figura 21. Perfil cromatográfico obtenido por GCxGC/HRTOF-MS del AE de los tallos de <i>P. cablin</i>	86
Figura 22. A. Espectro de masas experimental obtenido por GCxGC/HRTOF-MS (resolución: 40000; EI, 70 eV) de pogostona; B. Espectro de masas de pogostona de la base de datos NIST-2017.	87
Figura 23. Esquema de fragmentación de pogostona ($C_{12}H_{16}O_4$, m/z 224,1043) propuesto en el presente estudio con base en la medición de las masas exactas de los iones-fragmento obtenidos por GCxGC/HRTOF-MS.	88
Figura 24. Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC/MS (<i>full scan</i>), del AE de <i>P. cablin</i> (toda la planta). Columna DB-WAX (60 m), inyección <i>split</i> 1:30, MSD (EI, 70 eV).	89

Figura 25. Espectros de masas experimentales obtenidos por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ -HRMS- <i>Orbitrap</i>) de los patrones de: A. Apigenina (C ₁₅ H ₁₁ O ₅ , <i>m/z</i> 271,06100) y B. Naringenina (C ₁₅ H ₁₃ O ₅ , <i>m/z</i> 273,07575).	103
Figura 26. Formación de los principales iones-producto en el espectro de masas de apigenina (C ₁₅ H ₁₁ O ₅ , <i>m/z</i> 271,06100), obtenido por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ /HRMS- <i>Orbitrap</i>).104	
Figura 27. Formación de los principales iones-producto en el espectro de masas de naringenina (C ₁₅ H ₁₃ O ₅ , <i>m/z</i> 273,07575), obtenido por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ /HRMS- <i>Orbitrap</i>).	104
Figura 28. Esquema general de fragmentación de los flavonoides derivados de flavona y flavonol reportados en la literatura para <i>P. cablin</i>	105
Figura 29. Esquema general de fragmentación de los flavonoides derivados de flavanona reportados en la literatura para <i>P. cablin</i>	106
Figura 30. Espectros de masas experimentales obtenidos por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ -HRMS- <i>Orbitrap</i> ; HCD, 40 V) de: A. Apigenina (C ₁₅ H ₁₁ O ₅ , <i>m/z</i> 271,06100); B. 5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona (C ₁₇ H ₁₇ O ₆ , <i>m/z</i> 317,10196) y C. 3,5-Dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona (C ₁₇ H ₁₄ O ₆ , <i>m/z</i> 315,08631) presentes en los extractos de pachulí.	107
Figura 31. Relación isotópica en los espectros de masas obtenidos por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ -HRMS- <i>Orbitrap</i> ; <i>Full MS Scan</i>) de las moléculas protonadas de: A. Apignenina, <i>m/z</i> 271,06044 (C ₁₅ H ₁₁ O ₅ , 100%); <i>m/z</i> 272,06325 (C ₁₄ ¹³ CH ₁₁ O ₅ , 17%); B. 5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, <i>m/z</i> 317,10147 (C ₁₇ H ₁₇ O ₆ , 100%); <i>m/z</i> 318,10542 (C ₁₆ ¹³ CH ₁₇ O ₆ , 19%) y C. 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, <i>m/z</i> 315,08575 (C ₁₇ H ₁₅ O ₆ , 100%); <i>m/z</i> 316,08948 (C ₁₆ ¹³ CH ₁₅ O ₆ , 19%) en el extracto de <i>P. cablin</i>	108

Figura 32. Corriente iónica extraída (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$, obtenida por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ -HRMS-Orbitrap), de los compuestos identificados en los extractos etanólicos de <i>P. cablin</i>	109
Figura 33. Rendimientos del AE de pachulí en función de los días de secado postcosecha.	112
Figura 34. Transformación de pachulol a β -pachuleno.	116
Figura 35. Variabilidad de la composición química del AE de <i>P. cablin</i> , agrupado por familias estructurales, en función del tiempo de la destilación	119
Figura 36. Variabilidad de la composición química del AE de <i>P. cablin</i> , de α -pachuleno, β -pachuleno, α -guaieno y α -bulneseno, en función del tiempo de la destilación.	120
Figura 37. Variabilidad de la composición química del AE de <i>P. cablin</i> , de los compuestos norpachulenol, pachulol, pogostol y pogostona, en función del tiempo de la destilación.....	120
Figura 38. Comparación de los rendimientos medio obtenidos de las extracciones por MSPD variando la concentración de etanol y el tipo de soporte sólido.	125
Figura 39. Comparación de los rendimientos medio obtenidos de las extracciones por UAE variando la concentración de etanol y el tiempo de extracción.	125
Figura 40. Cantidades de apigenina, apigetrina y el diglicósido de apigenina (μ g de sustancia/ mg de extracto) presentes en los extractos etanólicos de <i>P. cablin</i> , obtenidos por: A. MSPD y B. UAE.	130
Figura 41. Cantidades de 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona y 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona (μ g de sustancia/ mg de extracto) presentes en los extractos etanólicos de <i>P. cablin</i> , obtenidos por: A. MSPD y B. UAE.....	131

Figura 42. Cantidades de 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, ombuina, pachipodol y retusina -5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona- (μg de sustancia/ mg de extracto) presentes en los extractos etanólicos de *P. cablin*, obtenidos por A. MSPD y B. UAE..... 132

Lista de Apéndices

	Pág.
Apéndice A. Curvas de calibración, obtenidas por LC/MS (UHPLC-ESI ⁺ -HRMS- <i>Orbitrap</i>), de las sustancias de referencia de apigenina y naringenina	148

Abreviaturas y Acrónimos

AE	Aceite(s) esencial(es).
AV	Destilación por arrastre con vapor.
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales.
CI	<i>Chemical Ionization</i> (Ionización química).
CROM-MASS	Centro de Cromatografía y de Espectrometría de Masas.
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas.
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de arreglo de diodos).
DB-5MS	Columna cromatográfica apolar de 5%-fenil-poli(metilsiloxano).
DB-WAX	Columna cromatográfica polar de polietilenglicol.
<i>e.g.</i>	<i>exempli gratia</i> (Por ejemplo).
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones).
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización).
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (y otros).
eV	Electrón-Voltios.
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama).

GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases o cromatógrafo de gases).
GC-MS	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas).
GCxGC-MS	<i>Comprehensive Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases completa acoplada a espectrometría de masas).
HCD	<i>High Energy Collision-Dissociation Cell</i> (Celda de colisiones de alta energía).
HD	<i>Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación).
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia).
HRMS	<i>High Resolution Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas de alta resolución).
HSCCC	<i>High Speed Counter Current Chromatography</i> (Cromatografía en contracorriente de alta velocidad).
<i>i.e.</i>	<i>id est</i> (Es decir, esto es).
IR	<i>Infrared</i> (Infrarrojo).
IRL	Índice(s) de retención lineal(es).
ITC	<i>International Trade Center</i> (Centro de Comercio Internacional).

	<i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>
LC-MS	(Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas).
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (Extracción líquido-líquido).
m s. n. m.	Metros sobre el nivel del mar.
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas, espectrómetro de masas, espectro de masas, según el contexto).
MSD	<i>Mass Spectrometry Detector</i> (Detector selectivo de masas).
MSPD	<i>Matrix Solid-Phase Dispersion</i> (Dispersión de la matriz en fase sólida).
MWHD	<i>Microwave-Assisted Hydrodistillation</i> (Hidrodestilación asistida por la radiación de microondas).
<i>m/z</i>	<i>Mass-to-Charge Ratio</i> (relación masa/carga)
NIST	<i>National Institute for Standards and Technology</i>
NPK	Fertilizante inorgánico: mezcla de nitrógeno, fósforo y potasio.
Orbitrap-MS	Analizador de masas <i>Orbitrap</i> .
PAF	<i>Platelet-Activating Factor</i> (Factor activador de plaquetas).
PAM	Plantas aromáticas y medicinales.

SE	<i>Solvent Extraction</i> (Extracción con disolventes).
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i> (Extracción con fluidos supercríticos).
SLE	<i>Solid-Liquid Extraction</i> (Extracción sólido-líquido).
RI	Índice(s) de retención.
RMN	Resonancia magnética nuclear.
TIC	<i>Total Ion Current</i> (Corriente iónica total).
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i> (Cromatografía en capa fina).
TOF-MS	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo, analizador de masas de tiempo de vuelo).
UAE	<i>Ultrasonic-Assisted Extraction</i> (Extracción con disolventes asistida por ultrasonido).
UIS	Universidad Industrial de Santander.
UHPLC	<i>Ultra-High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de ultra-alta eficiencia).
UV	<i>Ultraviolet</i> (Ultravioleta).

Resumen

Título: Estudio por técnicas Cromatográficas y de Espectrometría de Masas de los metabolitos secundarios de *Pogostemon cablin* Benth (Fam. Lamiaceae) en función de diferentes métodos de extracción*.

Autor: Cristian Andrés Oliveros**

Palabras Clave: *Pogostemon cablin*, metabolitos secundarios, Cromatografía, Espectrometría de Masas.

Descripción:

En este trabajo de investigación, se aislaron los metabolitos secundarios volátiles y no volátiles de la especie vegetal *Pogostemon cablin*, usando diferentes técnicas de extracción, a saber: hidrodestilación asistida por la radiación de microondas, destilación por arrastre con vapor, extracción con solvente asistida por ultrasonido y dispersión de la matriz en fase sólida. Los aceites esenciales y los extractos se estudiaron por técnicas de Cromatografía y Espectrometría de Masas, *i.e.*, GC-FID, GC-MS, GCxGC-HRTOF-MS y UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap.

Las herramientas usadas para la identificación de los metabolitos secundarios fueron los datos espectrales experimentales (espectros de masas de baja y alta resolución, los índices de retención lineales obtenidos en columnas cromatográficas con fases estacionarias apolar y polar), el establecimiento de la fórmula elemental de los iones-producto, ion molecular, molécula protonada [M+H]⁺, la medición de las masas exactas y la relación isotópica, y, el estudio de los patrones de fragmentación de terpenoides y flavonoides.

Los resultados obtenidos mostraron que la variación del rendimiento y la composición química del aceite esencial y del extracto etanólico de *P. cablin*, dependió de varios parámetros estudiados, según la técnica de extracción utilizada. El alto contenido de pachulol en los aceites esenciales reveló un producto de alta calidad y valor comercial. El presente trabajo es un aporte con conocimiento científico, al estudio de la viabilidad del cultivo agroindustrial de pachulí en el país y la obtención de sus productos de valor agregado.

* Trabajo de Investigación.

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Maestría en Química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez

Abstract

Title: Study by Chromatographic and Mass Spectrometry techniques of the secondary metabolites of *Pogostemon cablin* Benth (Fam. Lamiaceae) based on different extraction methods*.

Author: Cristian Andrés Oliveros**

Key Words: *Pogostemon cablin*, secondary metabolites, Chromatography, Mass Spectrometry.

Description:

In this work, volatile and non-volatile secondary metabolites of *Pogostemon cablin* were isolated using different extraction techniques: Microwave-Assisted Hydrodistillation, Steam Distillation, Ultrasonic-Assisted Extraction and Matrix Solid-Phase Dispersion. Essential oils and extracts were studied by Chromatography and Mass Spectrometry, *i.e.*, GC-FID, GC-MS, GCxGC-HRTOF-MS and UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap.

The tools used for identification of the secondary metabolites were the experimental spectral data (low and high resolution mass spectra, the linear retention indices, measured on both polar and non-polar columns), the determination of elemental formula of product-ions, molecular ion, protonated molecule [M+H]⁺, measurement of exact masses and isotopic relation, and, the fragmentation patterns of terpenoids and flavonoids.

The results showed that variation of yields and chemical composition of essential oils and ethanolic extracts of *P. cablin*, depended on several parameters studied, according to the extraction technique. The high content of patchoulol in essential oils revealed a product of high quality and commercial value. This research is a contribution with scientific knowledge, to the viability of patchouli agroindustrial-crop in Colombia and the obtaining of its added value products.

* Graduation Project.

** Science Faculty. School of Chemistry. Master in Chemistry. Directors: Elena E. Stashenko and Jairo René Martínez.

Introducción

Las plantas aromáticas y medicinales (PAM) se han usado desde antaño para sanar, curar enfermedades, mejorar la salud y el bienestar de las poblaciones. Hoy en día, a pesar del desarrollo de química farmacéutica, los usos tradicionales de las plantas aromáticas y medicinales para prevenir, diagnosticar y tratar los problemas de salud siguen siendo una práctica en muchos lugares del mundo; se calcula que aproximadamente 60.000 especies vegetales se utilizan por sus propiedades aromáticas, medicinales y nutricionales y se comercializan más de 500.000 toneladas de su biomasa por un valor cercano a los 2,5 mil millones de dólares (WHO, 2013; Barata *et al.*, 2016). La evidencia empírica de los beneficios de las plantas medicinales junto con el desarrollo científico de la identificación de sus componentes químicos, las pruebas de actividad biológica y las relaciones de estructura molecular con actividad biológica, son explicaciones para una tendencia creciente en la elaboración de nuevos productos basados en ingredientes naturales con verdadero valor medicinal (Petrovska, 2012).

Las PAM se definen como aquellas plantas usadas por sus propiedades medicinales y aromáticas en el campo la farmacia y la perfumería (Overwalle, 2006). Dichas plantas, se encuentran en casi todas las regiones cubiertas de vegetación en el mundo, se comercializan como especias y son fuente de materia prima para la industria de los ingredientes naturales en la producción de medicamentos crudos, aceites esenciales, extractos o tinturas, pesticidas botánicos, repelentes de insectos, productos cosméticos y farmacéuticos (Verma, 2002; Chomchalow, 2002).

Pogostemon cablin Benth (pachulí, familia Lamiaceae) es una especie aromática y medicinal, originaria de Filipinas, ampliamente cultivada a escala agroindustrial en Asia, para el uso tradicional y para la obtención de productos de valor agregado, *i.e.*, aceites esenciales y extractos,

con una demanda alta para la industria de aromas y sabores, industrias farmacéutica, cosmética, de perfumería y alimentaria (Chen *et al.*, 2012; Ramya *et al.*, 2013). En Colombia, la experiencia científica y tecnológica del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM) ha permitido sentar las bases técnicas para incursionar en el desarrollo de ingredientes naturales, con un valor agregado alto, que suplan la demanda interna de las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo, y aporten al crecimiento de la economía del país. Actualmente, el CENIVAM desarrolla proyectos productivos de investigación y desarrollo en los departamentos de Arauca, Santander y en la región del Magdalena Medio, donde se realiza el escalamiento agroindustrial de plantas nativas y comerciales (incluido el pachulí) con fines de producción de aceites esenciales y extractos para el mercado nacional e internacional.

En este proyecto de investigación, se estudiaron los metabolitos secundarios del *P. cablin*, a nivel de laboratorio, usando metodologías de extracción convencionales y modernas, y equipos de alta tecnología de cromatografía y espectrometría de masas. Los resultados obtenidos mostraron que la variación del rendimiento y la composición química del aceite esencial y del extracto etanólico de *P. cablin*, dependió de varios parámetros estudiados, según la técnica de extracción utilizada. El alto contenido de pachulol en los aceites esenciales estudiados reveló un producto de alta calidad y valor comercial. El presente trabajo es un aporte con conocimiento científico, al estudio de la viabilidad del cultivo agroindustrial de pachulí en el país y la obtención de sus productos de valor agregado.

Los resultados de esta investigación se presentaron en diferentes eventos científicos, a saber:

- *International Conference “Renewable Plant Resources: chemistry, technology, medicine”* - RR2017. Modalidad póster. Trabajo titulado: *Secondary metabolites in essential oils and extracts*

from patchouli cultivated in Colombia. San Petersburgo, Rusia. Septiembre, 2017.

Reconocimiento: mejor trabajo en la modalidad de presentación de póster.

- Semana Internacional de la Ciencia - UIS. Modalidad póster. Trabajo titulado: Rendimiento y composición química del aceite esencial de pachulí, según la parte de la planta, tiempo de destilación y pre-tratamiento enzimático. Bucaramanga, Colombia. Septiembre de 2018.

- 50th International Symposium on Essential Oils - ISEO 2019. Modalidad póster. Trabajo titulado: *Study of patchouli essential oil chemical composition as a function of part of the plant, distillation time and enzymatic treatment*. Viena, Austria. Septiembre de 2019. Reconocimiento: *Young Scientist Fellowship*.

- Cátedra: Ciencia, Cultura y Educación. Modalidad póster. Trabajo titulado: *Study of patchouli essential oil chemical composition as a function of part of the plant, distillation time and enzymatic treatment*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Septiembre de 2019.

1. Estado del Arte

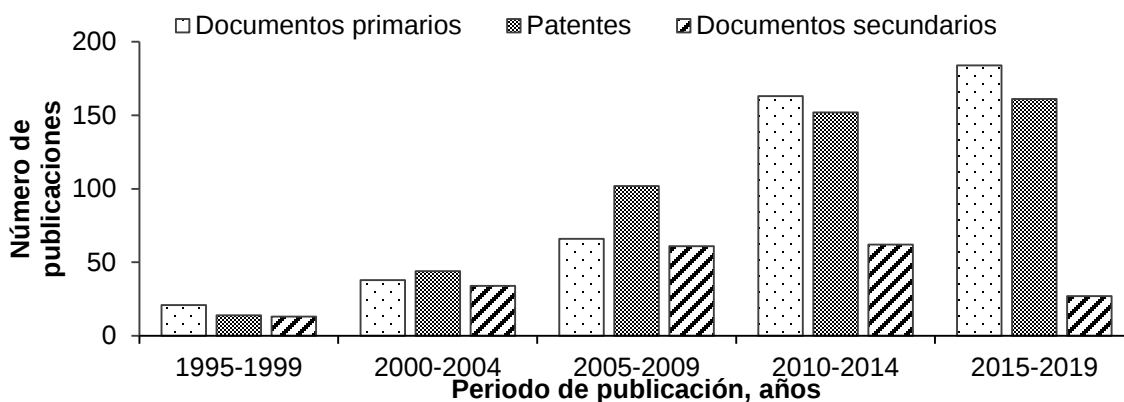
1.1 Estado actual de las investigaciones científicas sobre *Pogostemon cablin*

Usando la base de datos *Scopus* (*Elsevier*), se revisó el estado de las investigaciones científicas asociadas a la especie bajo estudio en la presente investigación. Para ello, se tuvieron en cuenta tres tipos de publicaciones: documentos primarios (publicaciones indexadas dentro de *Scopus*), secundarios (publicaciones no indexadas) y patentes.

En la búsqueda, se consideraron solamente las publicaciones de los últimos 25 años que contienen el nombre científico de la planta (ecuación: TITTLE-ABS-KEY “*Pogostemon cablin*”) en su título, resumen o palabras-clave. La fecha de consulta fue el 15 de febrero de 2020. En este periodo se reportaron en total 1142 publicaciones, clasificadas en 472 documentos primarios, 473 patentes y 197 documentos secundarios (**Figura 1**).

Figura 1.

Desarrollo cronológico de publicaciones científicas sobre P. cablin.



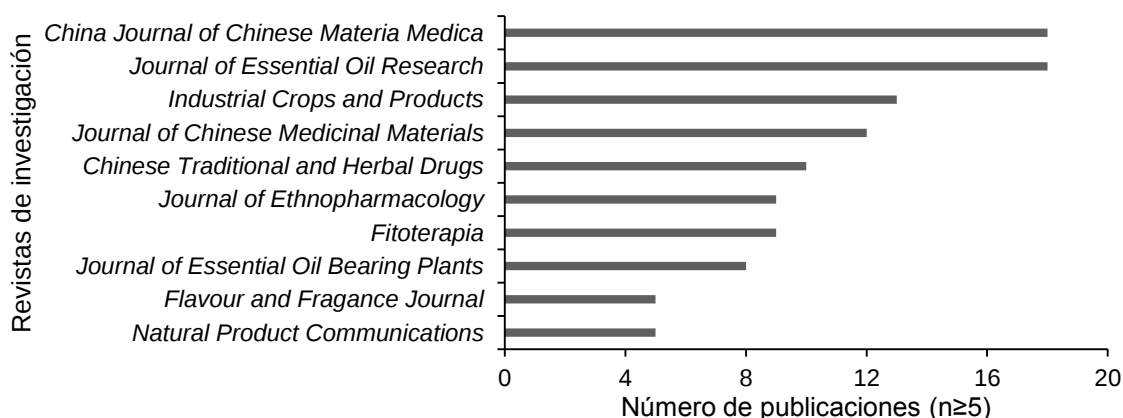
Nota: Base de datos: Scopus (Elsevier, 2020). Periodo de observación: 1995 - 2019. Palabra-clave: “Pogostemon cablin”. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2020.

El aporte de las publicaciones científicas de *P. cablin* fue liderada por los investigadores en el continente asiático (76,5%), seguido por, América (10,9%) y Europa (10,0%); en cuanto a las patentes, la mayoría fueron registradas en EE.UU. (*United States Patent & Trademark Office*, 60,5%), Japón (*Japan Patent Office*, 14,2%) y Naciones Unidas con su sede en Ginebra, Suiza (*World Intellectual Property Organization*, 13,3%).

Las siguientes son el top diez de las revistas en donde hubo mayor número de publicaciones sobre esta especie, en orden decreciente: *China Journal of Chinese Materia Medica* (*Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 18), *Journal of Essential Oil Research* (18), *Industrial Crops and Products* (13), *Journal of Chinese Medicinal Materials* (*Zhong Yao Cai*, 12), *Chinese Traditional and Herbal Drugs* (12) y otras (**Figura 2**), se evidenció la relación predominantemente de estudios con el uso tradicional de la planta y su aceite esencial.

Figura 2.

*Top diez de las revistas principales, en las cuales se publicó el número mayor de trabajos sobre la especie *P. cablin*.*



Nota: Base de datos: *Scopus* (*Elsevier*, 2020). Periodo de observación: 1995 - 2019. Palabra-clave:

“*Pogostemon cablin*”. Fecha de consulta: 15 de febrero de 2020.

China es el país con el número de publicaciones más alto (196) y su aporte correspondió al 41,6% de toda literatura científica sobre *P. cablin*, indexada en *Scopus*; el pachulí (Guanghuoxiang) hace parte del compendio de Materia Medica y de la Farmacopea China, se usa ampliamente para la fiebre, dolor de cabeza, náusea, vómito, resfriados, diarrea, dolor abdominal y picaduras de insectos y serpientes (Zhu, 1998; Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015). El aceite esencial (AE) del pachulí es muy apetecido, particularmente, por sus compuestos mayoritarios, a ellos, se debe un olor exótico, maderable, terroso y acre (Deguerry *et al.*, 2006). El AE de pachulí tiene una demanda alta por parte de la industria de aromas y sabores, alimentos, farmacéutica, perfumes y cosmética (jabones, toallas de papel, cremas dentales, productos de belleza). En consecuencia, la especie vegetal se cultiva a escala industrial y es una fuente de ganancias económicas en los países tropicales de Indonesia, India, China, entre otros (Husain, 1994; Chen *et al.*, 2012).

De acuerdo con el tipo de revistas, las áreas de investigación de *P. cablin* que más se destacaron fueron la agricultura y ciencias biológicas (18,8%), farmacología, toxicología y farmacéutica (18,1%), bioquímica, genética y biología molecular (15,7%), medicina (15,5%), química (11,9%) y microbiología e inmunología (4,3%), entre otras. En general, estas áreas de investigación están directamente relacionadas con los tres bloques de la cadena de valor para una especie aromática y medicinal: 1) la biomasa, 2) los productos de valor agregado, *e.g.*, aceite esencial, extractos, pigmentos, y 3) la aplicación de los productos de valor agregado en diferentes industrias.

Algunos artículos de revisión han condensado gran parte del conocimiento alrededor de *P. cablin*. Se destacó el trabajo de Swamy y Sinniah (2016), sobre la botánica de la especie vegetal, las condiciones agrícolas de su cultivo (propagación vegetativa, siembra y nutrimentos del suelo, irrigación, enfermedades, *etc.*) y los aspectos biotecnológicos para el mejoramiento de su biomasa

(propagación *in vitro*, semillas de calidad, regeneración rápida de tejidos, banco de germoplasma, etc.). Los trabajos de Chen *et al.* (2012), Chakrapani *et al.* (2013) y, Swamy y Sinniah (2015b), se centraron en los metabolitos volátiles y no volátiles reportados en el pachulí, sus actividades farmacológicas y algunos aspectos comerciales. La publicación más completa sobre el AE de pachulí la realizaron van Beek y Joulain (2018), contiene un estudio exhaustivo de las condiciones que afectan el rendimiento y la calidad del AE, las técnicas analíticas que se han usado para determinar la composición química, los posibles adulterantes y contaminantes encontrados en un AE comercial, entre otros aspectos.

La búsqueda general sobre el estado actual de las investigaciones de *P. cablin*, permite concluir que los documentos primarios y las patentes tienen una tendencia creciente, lo que podría suponer que en los siguientes años el conocimiento alrededor de la especie vegetal y sus moléculas siga aumentando. Esta predicción, también se sustenta por el acelerado avance tecnológico de los últimos años que permitieron el acceso a la información científica contenida en la nube en tiempo real y facilitaron que el conocimiento sea creado de forma colaborativa más rápidamente. Por ello, cobra relevancia la cantidad de patentes otorgadas con relación al pachulí, ya que con el aumento del acceso a la información, aumentó la necesidad de la protección de la propiedad intelectual del conocimiento generado.

Cabe destacar, que en Colombia no hay publicaciones ni patentes sobre *P. cablin* y que, durante el desarrollo de la presente investigación, se reportaron 108 publicaciones nuevas y 100 patentes, que corresponden al 22,9% y al 21,2% de los resultados para el periodo evaluado (1995 - 2019), cifras relevantes para justificar una gran oportunidad para la ciencia en el país y la nascente industria de los ingredientes naturales, ya que el territorio nacional se sitúa sobre la región tropical de América del Sur. Actualmente, se reconoce el aporte de la Universidad Industrial de Santander,

por medio del CENIVAM, en el desarrollo de la cadena de valor agregado de las plantas aromáticas y medicinales en el país. La incorporación del pachulí en los proyectos productivos que se desarrollan en Arauca, Santander y el Magdalena Medio, abre la posibilidad de producción de aceites esenciales y extractos con fines comerciales al mercado nacional e internacional.

1.2 La planta de pachulí - *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth

1.2.1 Generalidades y aspectos botánicos

La especie vegetal *P. cablin*, de nombre común pachulí, pertenece a la familia Lamiaceae, es endémica de Filipinas, crece de forma salvaje en Malasia, Indonesia y en países de Asia meridional. Es una hierba aromática tropical, perenne, fragante, resistente y adaptada a una variedad de condiciones climáticas (Ramya *et al.*, 2013).

La planta, fue descrita por primera vez como *Mentha cablin* Blanco, por el botánico Francisco Manuel Blanco en 1837 (*Flores de Filipinos*), luego, fue transferida al género *Pogostemon* y George Benthham la renombró ***Pogostemon cablin*** en 1948; Pelletier-Sautelet en Francia (1945) y Hooker en Inglaterra (1949), la nombraron *Pogostemon patchouli*. La palabra “Pachulí” parece que tiene su origen en el Tamil “*pacchilai*”, que significa hoja verde (*pacci-verde* e *ilai-hoja*) y se ha usado durante siglos para nombrar las plantas del género *Pogostemon* en la india, cuyo espécimen más común es *P. heyneanus*; la palabra “*cablin*” se deriva del vernáculo filipino “*cablan*” (Murugan y Livingstone, 2010). Su clasificación botánica se muestra en la **Tabla 1** (Herbario UIS, N° 20890, Universidad Industrial de Santander, 2020).

En China, el pachulí fue introducido para usos medicinales desde antes de la dinastía Liang (420 - 589 e.c.) y se cultivó en la provincia sur de Guangdong, a partir del siglo XI. La planta solía confundirse por su morfología y olor similar con *Agastache rugosa* (Huoxiang), especie endémica

y cultivada al norte del país asiático, pero dicha confusión fue resuelta con investigaciones sobre literatura histórica, usos medicinales y composición química (Wu *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2013). En India, *P. cablin* se introdujo en 1834, a través del *Royal Botanic Garden, Calcutta* (hoy Jardín Botánico de India, Howrah), los especímenes fueron enviados por G. Porter, encargado del Jardín Botánico de Penang, desde las Colonias del Estrecho, donde la especie vegetal ya era cultivada en parcelas de campo por inmigrantes provenientes del sur de China (Murugan y Livingstone, 2010).

Tabla 1.

Identificación taxonómica de la especie Pogostemon cablin.

Rango	
Reino (subreino)	Plantae (Tracheobionta)
División	Magnoliophyta
Clase (subclase)	Magnoliopsida (Asteridae)
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae/Labiatae
Género	<i>Pogostemon</i>
Especie	<i>cablin</i>
Nombre binomial	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth
Sinonimia	<i>P. patchouly</i> , <i>P. patchouli</i> , <i>P. suavis</i> , <i>P. patchouli</i> var. <i>suavis</i> , <i>P. javanicus</i>

Por muchos años, las hojas secas de las plantas del género *Pogostemon* se han usado para empacar y aromatizar las telas indias exportadas a Europa para evitar daños por insectos y hongos. En 1844, un cargamento de chales indios envueltos en pachulí llegó por primera vez a Londres y se descubrió esta esencia única. Poco después, los franceses empezaron a aromatizar chales con

hojas de pachulí importadas de las Colonias del Estrecho, donde los cultivos fueron ampliados a gran escala y se extendieron a Java, Sumatra y otras islas indonesias. Las primeras destilaciones de las hojas de pachulí se realizaron en Malasia e Indonesia (Husain, 1994; Holmes, 1997; Vijaykumar, 2004).

Morfológicamente, el pachulí se considera una hierba aromática, crece en promedio de 1,0 - 1,2 m de altura, con un tallo cuadrangular erecto y ramificado, con abundantes hojas anchas de 10 - 12 cm (**Figura 3**). Las márgenes de las hojas son lobuladas, en su superficie dorsal, se pueden observar pequeños pelos abundantes (tricomas glandulares) en los que se acumulan los metabolitos secundarios; el color de las hojas varía de verde pálido a violáceo en cultivos abiertos y, bajo sombra, denotan un verde brillante. La planta produce pequeñas flores blancas y rosadas pálidas (Angadi y Vasanthakumar, 1995).

Figura 3.

Planta de pachulí completa y la morfología de su hoja.



Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Jardín Botánico con Sentido, Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, el 12 de diciembre de 2019.

La producción de las moléculas volátiles en las hojas y los tallos del pachulí tiene lugar en tricomas glandulares internos y externos (pelos superficiales). Las glándulas internas y externas, secretan y acumulan los metabolitos secundarios. En los tallos y en las hojas, el sitio principal de la síntesis molecular, ocurre en los plastidios y los cloroplastos, respectivamente. En ambos casos, las moléculas se transportan por pequeñas vesículas y luego se almacenan en las vacuolas (Guo *et al.*, 2013; Feng *et al.*, 2007). La diversidad estructural de los metabolitos secundarios de *P. cablin* son los que hacen que la especie vegetal se cultive a gran escala en muchos países, incluidos Indonesia, India, China, Singapur, Vietnam, África Occidental, Brasil, entre otros (Swamy y Sinniah, 2015b; Maheshari *et al.*, 1993).

1.2.2 Aspectos agronómicos

Una búsqueda rápida en *Scopus (Elsevier)*, combinando las palabras-clave del nombre científico de la especie con cultivos, agricultura y fertilizantes, dieron como resultado 25, 10 y 15 publicaciones, respectivamente (ecuación: TITTLE-ABS-KEY “*Pogostemon cablin*” AND “*Crops*”, “*Pogostemon cablin*” AND “*Agriculture*” y “*Pogostemon cablin*” AND “*Fertilizers*”; periodo: 1995 - 2019, fecha: 20 de febrero de 2020). Los estudios agronómicos alrededor de *P. cablin* se han enfocado en las condiciones agrícolas (reproducción, tipo y nutrimentos del suelo) y geobotánicas del medio (clima, altitud, cantidad de lluvias) para obtener cultivos con la mayor biomasa y el rendimiento más alto de su aceite esencial.

El cultivo de pachulí prospera bien en suelos fértiles, drenados, franco-arcilloso medios, ricos en nutrientes y materia orgánica. La planta puede ser cultivada en todas las áreas tropicales donde la temperatura sea moderada (20 - 35 °C), con lluvias de 150 - 300 cm por año. Se recomienda el

cultivo en suelos con un pH de 5,5 - 7,5 y altitud de los 800 - 1000 m s. n. m. y un espaciado de plantas entre 45 - 60 cm (Das, 2015; Angadi y Vasanthakumar, 1995).

Las plantas mejoran su crecimiento bajo sombra parcial y condiciones de humedad alta, por ello, se siembran en cultivos mixtos, debajo de las palmeras de cocos o de otros tipos de plantación (Husain *et al.*, 1988; Sarwar *et al.*, 1983). En un estudio realizado por Puttana *et al.* (2005), el pachulí se sembró en condiciones de exposición a la luz solar y diferentes niveles de sombra. Los resultados de la investigación mostraron que las plantas cultivadas con 75 y 50% de sombra tuvieron un mayor crecimiento y área foliar.

1.2.2.1 Cultivos mixtos con pachulí

Debido a que el crecimiento de las plantas de pachulí se favorece en condiciones de sombra parcial, una buena alternativa para su siembra está en la instalación de cultivos mixtos con árboles frutales, plantaciones de coco, palmas, caucho, *etc.* Para un agricultor en Colombia, sembrar pachulí dentro de sus cultivos de pancoger (platanales, cítricos, aguacates, cacao, cafetales, entre otros) podría proporcionar algunos ingresos adicionales.

Muni-Ram *et al.* (1999) investigaron la incidencia del cultivo mixto con papaya sobre el rendimiento del aceite esencial de pachulí y su composición química y encontraron un aumento en la cantidad de AE producido (76%) y mejor calidad, por el incremento del contenido de pachulol del 8 - 11%. Los resultados se compararon con los de una parcela de monocultivo, bajo las mismas condiciones agronómicas.

Sujatha *et al.* (2011) estudiaron la viabilidad de cultivos mixtos de la palma de areca de 20 años de edad, con 16 parcelas experimentales, cada una con especies de plantas aromáticas y medicinales diferentes. Las plantas de pachulí se sembraron con un espaciado de 45 cm entre

plantas y a una distancia de 75 cm del surco de las palmas. De los experimentos, 12 parcelas prosperaron, incluido pachulí. La producción de pachulí (hoja fresca) anual en promedio fue de 9082 kg/ha. En general, la producción de nueces de areca aumentó en los cultivos mixtos en comparación con la parcela blanco de monocultivo.

En un sistema de cultivo mixto con plantaciones de coco de 32 años de edad, realizado en la Estación de Investigación Hortícola de la Universidad Agrícola de Assam (India), el rendimiento del AE de pachulí producido disminuyó (5,2%) en comparación con una parcela de monocultivo. Sin embargo, la producción de frutos de coco aumentó, en consecuencia, se obtuvieron ingresos netos más altos (Nath *et al.*, 2015).

1.2.2.2 Propagación de plantas

El cultivo de pachulí, en proceso de escalamiento, tiene su cuello de botella en la disponibilidad de plántulas para la siembra (en promedio se necesitan 25.000 plantas por ha). La producción de semillas en las plantas adultas es escasa debido a la poca floración, tradicionalmente, se usa la propagación vegetativa, por lo general, con esquejes juveniles sanos que garantizan un rápido enraizamiento y una menor variabilidad genética (Hartmann y Kester, 2011). En algunos casos, se recomienda el uso de esquejes con meristemos apicales (propagación clonal por cogollos). Lo más adecuado, es la selección de tallos de 10 - 12 cm de largo y 3 - 4 nodos, con un par de hojas enteras o partidas por la mitad (Garbuio *et al.*, 2007).

El uso de las auxinas y citoquininas, *e.g.*, ácido 1H-indol-3-butanoico (IBA), ácido α -naftalenacético (NAA), ácido giberélico (GA3), 6-bencilaminopurina (BAP), en soluciones de concentraciones bajas (< 500 ppm), permite acelerar el enraizamiento y crecimiento de los esquejes que fueron expuestos durante 20 - 30 s antes de la siembra (Venugopal *et al.*, 2008; Kumar *et al.*,

2014). Paul *et al.* (2010), reportaron eficiencias de propagación superiores al 90% en explantes de hojas, cultivadas *in vitro* en un medio de *Murashige & Skoog* (M&S) con una solución 2,5 M de BAP y 0,5 M de NAA. En el mismo estudio, la incorporación de una solución 1,0 M de GA3 en el medio M&S, aumentó en 1,8 veces el alargamiento del brote en dos semanas.

Bajo las condiciones expuestas de la propagación vegetativa, la aplicación de los promotores de enraizamiento y crecimiento y la infraestructura de un vivero, se garantiza el suministro continuo de plántulas para un cultivo a gran escala.

1.2.2.3 Nutrientes en los cultivos

Sobre la demanda de nutrientes en los cultivos de pachulí, se han realizado varios estudios sobre la aplicación de fertilizantes inorgánicos, orgánicos y micorrizas para mejorar el crecimiento de las plantas y la producción foliar. En general, el pachulí responde benéficamente a las fuentes orgánicas e inorgánicas de nutrientes.

En el Instituto Central de Plantas Aromáticas y Medicinales-CIMAP (Bangalore, India), Singh y Ganesh Rao (2009), desarrollaron una investigación de la influencia que tiene la aplicación de nitrógeno y potasio sobre la cantidad de biomasa de pachulí y la cantidad del AE obtenido en cultivos experimentales. Se escogieron suelos pobres y arenosos con un pH de 6,2, se sembraron plantas de *P. cablin* var. Johore, con 45 días de crecimiento, en surcos de 50 cm y espaciado entre plántulas de 45 cm. Se aplicaron diferentes concentraciones de nitrógeno en forma de urea (0, 100 y 200 kg N/ha) y de potasio en forma de superfosfato (0; 41, d5; 83,0 kg K/ha), de acuerdo con un diseño experimental con tres repeticiones en cada punto. Se realizaron dos cosechas, en los meses seis y nueve. La combinación de 200 kg de N/ha y 41,5 kg de K/ha presentó el mejor desarrollo de las plantas y el AE producido (23,88 t/ha de biomasa y 166,04 kg/ha de AE) en comparación

con el cultivo control (8,85 t/ha y 64,95 kg/ha).

Sumathi *et al.* (2012) demostraron que la aplicación de nitrógeno y micorrizas arbusculares (*Vesicular arbuscular mycohyrrizae*, VAM), aumenta la cantidad de biomasa y el rendimiento del AE en las plantas de pachulí. Las plantas se cultivaron en plantaciones de coco. En el muestreo, se realizaron las aplicaciones de 0, 50, 100, 150 y 200 kg/ha de nitrógeno con 0; 12,5; 25; 37,5 y 50 kg/ha de VAM. La mayor cantidad de biomasa (13,6 t/ha fresca y 4,07 t/ha seca) y aceite esencial (110,42 kg/ha) se logró con la mezcla de 150 kg/ha de nitrógeno y 50 kg/ha de VAM.

Singh *et al.* (2015) realizaron una investigación detallada de los efectos de los fertilizantes orgánicos (*vermicompost*, VC) e inorgánicos (NPK) sobre el cultivo de pachulí, observando los cambios en el crecimiento de las plantas, la producción de la biomasa, el rendimiento del aceite esencial y su composición química. El crecimiento de las plantas de pachulí mejoró con el tratamiento de la mezcla de 75% de VC (3,75 t/ha) y 25% de NPK (16,5:15:15 kg/ha), con un aumento en la altura de las plantas (15%), extensión (33%) y número de ramas (54%), en comparación con el blanco (suelo sin ningún tratamiento). La cantidad de biomasa fresca de pachulí mejoró significativamente en todos los experimentos, el mayor rendimiento se logró con 100% NPK (66:60:60 kg/ha), seguido de 75% VC y 25% NPK. Igualmente, el rendimiento del aceite esencial aumentó en todos los ensayos y la mayor cantidad producida se logró con la mezcla de 75% VC y 25% NPK. No se observaron cambios significativos en la composición química del AE, cuyos metabolitos secundarios volátiles mayoritarios fueron, pachulol (41,26 - 43,55%), α -bulneseno (13,11 - 13,98%), α -guaieno (7,99 - 8,24%), seicheleno (5,51 - 5,65%), α -pachuleno (4,38 - 4,55%), *trans*- β -cariofileno (3,33 - 3,91%) y β -pachuleno (1,22 - 1,25%).

1.2.2.4 Enfermedades

En la escala de cultivo agroindustrial, en algunos casos, la especie vegetal ha presentado inconvenientes en la propagación y persistencia en el tiempo, consecuencia de los ataques por insectos (Adria *et al.*, 1990), ácaros y nematodos (Khan y Reddy, 1991), también, por algunas enfermedades fúngicas y virus, que causan daños graves, o, en el peor de los casos, la muerte masiva de los especímenes. Entre las diversas enfermedades fúngicas de pachulí, la más destructiva es la del marchitamiento de sus hojas causada por *Rhizoctia solani* (Narayanappa *et al.*, 1984). Los virus asociados al pachulí se transmiten en las plantas como vectores en la propagación de injertos y esquejes; se han detectado varios virus en cultivos situados en Indonesia, Japón, China y Brasil, *e.g.*, el del mosaico amarillo (Zaim *et al.*, 2013) y el potivirus (Noveriza *et al.*, 2012).

1.2.3 Metabolitos secundarios volátiles

Los metabolitos secundarios volátiles de *P. cablin* (aceite esencial) se obtienen por destilación con arrastre con vapor (principalmente, a escala industrial) o por hidrodestilación (a escala de laboratorio). El AE de pachulí tiene una demanda comercial particularmente grande en la industria de perfumes, posee propiedades fijadoras y es un ingrediente natural clave en la elaboración de cosméticos, jabones, champús y perfumes exóticos a los que les da una nota fragante de fondo, terrosa, leñosa y picante; incluso, el aceite mismo, puede ser utilizado como perfume (Farooqui y Sreeramu, 2001; Anonis, 2007; Bhatia *et al.*, 2008).

El contenido de aceite esencial en *P. cablin* depende del órgano de la planta, se encuentra mayoritariamente en sus hojas y, en una pequeña cantidad, en sus tallos; el rendimiento de un AE obtenido únicamente de las hojas cosechadas y secadas a la sombra está en el rango de 2,5 - 3,5%

(Vijaykumar, 2004). Si se destilan las hojas frescas, el rendimiento aproximado es de 0,3% (Verma *et al.*, 2012). Según Husain *et al.* (1988), un rendimiento de 2,5% es satisfactorio para fines comerciales.

Molecularmente, el AE de pachulí es rico en sesquiterpenos (representan más del 95% de su composición química), con compuestos mayoritarios pertenecientes a las clases estructurales del guaiano, α - y γ -pachulanos, β - y δ -pachulanos, deoxipachulol, seichelano y cariofilano, y en menor cantidad, de las clases elemmano, eudesmano, germacrano, humulano, farnesano, cicloseichelano, nortetraciclopachulol y copaano. Las moléculas más representativas son pachulol, α -guaieno, α -bulneseno (δ -guaieno), α -, β -, y γ -pachulenos, seichelano, *trans*- β -cariofileno, norpachulenol, pogostol, entre otras (**Figura 4**); todas estas moléculas han sido elucidadas previamente de forma individual por las técnicas espectroscópicas de IR, UV, RMN y MS, por lo que no se duda de sus estructuras y se encuentran en bases de datos espectrales (van Beek y Joulain, 2018).

En la Farmacopea China reportaron técnicas de *screening* para identificar las hojas de *P. cablin* y su aceite esencial. Las hojas se identifican por microscopía y cromatografía en capa fina (TLC) usando un patrón de pachulol. La cantidad mínima de pachulol en las hojas secas debe ser del 0,10%. El AE de pachulí se identifica por las propiedades fisicoquímicas (color, índice de refracción, gravedad y rotación específica), TLC de gel de sílice (sustancias de referencia de pachulol y pogostona), y la solubilidad en etanol al 90% (relación 1:10); el contenido mínimo de pachulol en el AE debe ser del 26% (Chinese Pharmacopoeia Commission, 2015). En la **Tabla 2**, se muestra la comparación de las propiedades fisicoquímicas del AE de pachulí entre la Farmacopea China y la normatividad internacional (*International Standard ISO 3757*, 2002).

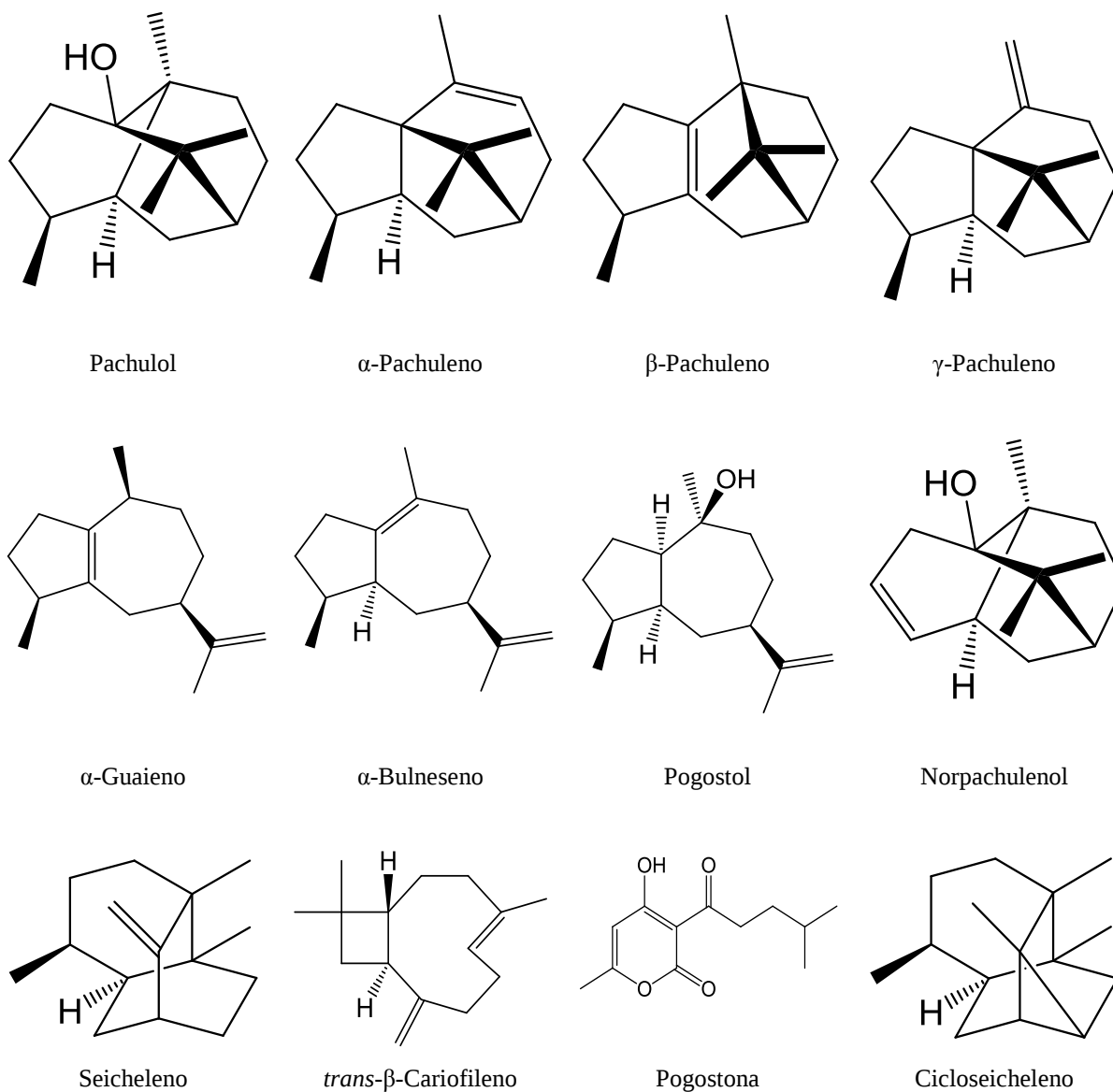
Tabla 2.*Propiedades fisicoquímicas del aceite esencial de pachulí.*

Referencia	Farmacopea China	ISO 3757:2002
Gravedad específica (g/mL)	0,950 - 0,980	0,952 - 0,975
Índice de refracción	Entre -66° y -43°	Entre -60° y -40°
Rotación óptica	1,503 - 1,513	1,5050 - 1,5150
Miscibilidad con 90% etanol.	Totalmente miscible	Totalmente miscible
Mezcla 1:10		
Color	Marrón rojizo	Amarillo a marrón rojizo

La caracterización del AE de pachulí se realiza con base en su composición química, por medio del acoplamiento GC-MS; las características fisicoquímicas del AE, la separación de sus compuestos por destilación al vacío, cristalización y elucidación (análisis elemental, puntos de fusión y ebullición, derivación y degradación química), aunque fueron importantes en el siglo XX, quedaron atrás, producto del avance tecnológico de las técnicas analíticas instrumentales (UV, IR, rayos X, RMN, GC, MS). Actualmente, GC/MS es una herramienta ampliamente disponible y las bases de datos espectrales de masas (Wiley, NIST) se pueden adquirir con la compra del instrumento.

Figura 4.

Estructuras químicas de los metabolitos secundarios más representativos en un aceite esencial de P. cablin.



Sin embargo, por la cantidad de hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados, el análisis de un AE de pachulí por GC/MS no es trivial. La separación cromatográfica puede ser pobre, dando como resultado una mayor coelución que afecta a los espectros de masas, y conduce,

a realizar una identificación errónea de las sustancias por la comparación de sus espectros de masas experimentales con los de las bases de datos espectrales (van Beek y Joulain, 2018). El uso correcto de la cromatografía de gases, *i.e.*, la inyección del AE diluido, la elección de la columna (dimensiones y polaridad) y la programación de la temperatura del horno cromatográfico, mejoran la separación de los componentes en una mezcla (Stashenko y Martínez, 2011 y 2014).

Otro inconveniente en la identificación de los componentes químicos del AE de pachulí radica en que las bases de datos espectrales, *e.g.*, NIST y Wiley, no están dedicadas únicamente a los metabolitos secundarios de los AE, lo que significa, que muchos espectros de masas de sesquiterpenos no se encuentran en estas bases de datos; a pesar de que se pueden encontrar publicaciones con más del 90% de los compuestos identificados en el AE, en realidad, es más lo que se desconoce de las sustancias a nivel de trazas (concentración de 0,01 a 0,5%) de lo que se conoce (van Beek y Joulain, 2018). Los índices de retención (RI o LRI = índices de retención lineales), obtenidos en columnas apolar y polar, son necesarios para dar un grado mayor de confianza con los compuestos identificados por comparación de los espectros de masas y las bases de datos espectrales (Stashenko y Martínez, 2010).

El perfil cromatográfico del aceite esencial de pachulí es único y puede servir como una huella digital para controlar la calidad, adulteración e impurezas de un aceite producido o comercial (Hu *et al.*, 2006; Milchard *et al.*, 2010). El AE se compone de concentraciones altas de pachulol, α -bulneseno y α -guaieno, concentraciones medias de pogostol, β -pachuleno, α -pachuleno, *trans*- β -cariofileno y acifileno, y concentraciones bajas de norpachulenol, α -humuleno, cicloseicheleno, δ -elemeno y β -elemeno (van Beek y Joulain, 2018).

El valor comercial del AE de pachulí depende, en parte, de las concentraciones de los sesquiterpenoides responsables predominantemente de su aroma particular, *i.e.*, pachulol,

norpachulenol y β -pachuleno. Un contenido alto de pachulol indica un AE de alta calidad (Akhila y Nigam, 1984; Deguerry *et al.*, 2006).

No obstante, la calidad de AE de pachulí está regulada por la norma ISO 3757 de 2002; los metabolitos de interés son β -pachuleno (1,80 - 3,50%), α -guaieno (11,0 - 16,0%), α -bulneseno (13,0 - 21,0%), pachulol (27,0 - 35,0%), pogostol (1,00 - 2,50%), entre otros (**Tabla 3**). Los valores reportados en la norma ISO 3757 son algo restrictivos y en muchos casos los vendedores hacen mezclas para cumplir con la norma, *e.g.*, el AE de pachulí de alta calidad de Indonesia con alto contenido de pachulol se mezcla con el de baja calidad de China con bajo contenido de pachulol (van Beek y Joulain, 2018).

Tabla 3.

Rangos permitidos de algunos componentes del aceite esencial de pachulí, según la norma ISO 3757:2002.

Sustancia química	Mínimo, %	Máximo, %
β -Pachuleno	1,80	3,50
Copaeno	trazas	1,00
α -Guaieno	11,0	16,0
<i>trans</i> - β -Cariofileno	2,00	5,00
α -Bulneseno	13,0	21,0
Norpachulenol	0,35	1,00
Pachulol	27,0	35,0
Pogostol	1,00	2,50

Nota: Se puede encontrar hasta un 0,2% de α -gurjuneno en los aceites esenciales destilados en la producción a escala no industrial.

La composición química de un AE depende de la planta, su variedad, quimiotipo, estado fenológico, órgano, estructura secretora, de condiciones ambientales (clima, estación, factores edáficos, polución, enfermedades y plagas), factores genéticos y evolutivos (cultivares), origen

geográfico, forma de almacenamiento, cantidad del material vegetal, entre otros factores (Figueiredo *et al.* 2008). En el caso de *P. cablin*, la variación del contenido y la composición química del AE está influenciado por algunos de estos factores, por lo que en la presente investigación, algunos de estos parámetros se estudiaron, *e.g.*, secado de la planta, órganos de la planta, tratamiento enzimático de la planta antes de su destilación y el tiempo de destilación.

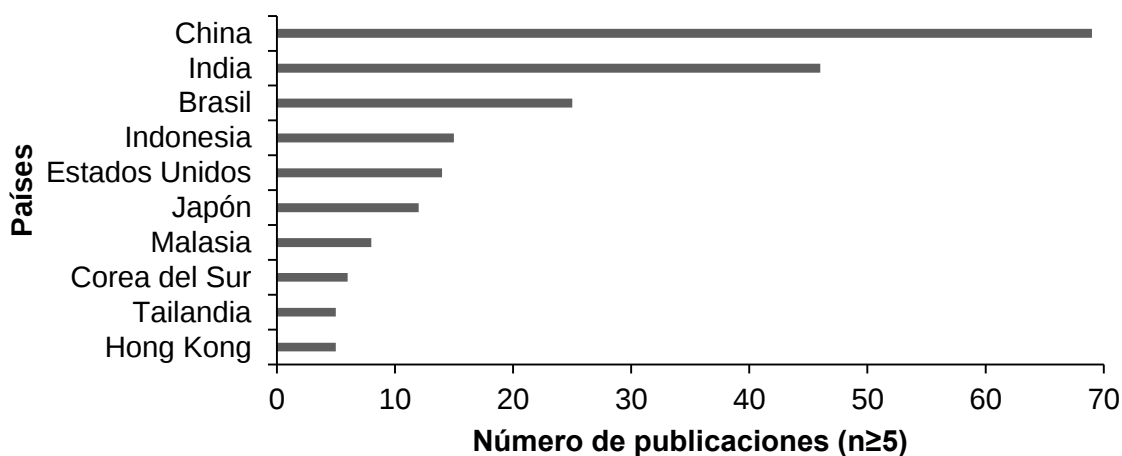
Li *et al.* (2004) indicaron que hay un efecto significativo, según los hábitats en donde se cultiva *P. cablin*. Swamy *et al.* (2015a), concluyeron que el crecimiento de las plantas y la calidad del aceite esencial producido está directamente influenciado por las variedades genéticas del pachulí. La conclusión se fundamentó en un estudio de altura de la planta, producción de hojas, rendimiento de AE obtenido y cantidad de pachulol, con seis cultivares genéticos, adquiridos en el Departamento de Horticultura, Gandhi Krishi Vignana Kendra-GCVK de la Universidad de Ciencias Agrícolas (variedad Johore, Singapur y CIM-Shrestha) y en la empresa *Rishi Herbal Technologies*, en Bangalore, India. Las seis parcelas experimentales contaron con las mismas condiciones ambientales y agrícolas. Luo *et al.* (1999), estudiaron el AE de pachulí en función de las partes de la planta en cultivos del condado de Gaoyao, provincia de Guangdong, China. Como resultado, los autores reportaron la presencia de pachulol (37,53% en hojas y 10,26% en tallos), pogostona (21,31% en hojas y 30,99% en tallos), α -guaieno (6,18% en hojas y 2,27% en tallos), entre otros. De acuerdo con Luo *et al.* (2003), en *P. cablin* existen los quimiotipos de pachulol y pogostona.

La variación de la composición química del AE de pachulí se puede evaluar por las publicaciones, según diferentes ubicaciones geográficas. En *Scopus (Elsevier)*, aparecen registradas 230 publicaciones asociadas con el aceite esencial, de las cuales, China, India, Brasil e Indonesia lideran los estudios (**Figura 5**). A continuación, se muestran algunas publicaciones,

según la región del cultivo, la elección de estas se realizó de forma aleatoria con artículos reportados para cada país.

Figura 5.

Países asociados con el mayor número de publicaciones sobre la composición química del aceite esencial de P. cablin.



Nota: Base de datos: *Scopus* (Elsevier, 2019). Periodo de observación: 1990 - 2019. Palabra-clave: “*Pogostemon cablin*” AND “Essential oil*”. Fecha de consulta: 2 de marzo de 2020.

Sugimura *et al.* (1990), compararon la composición química de los AE obtenidos por AV de cultivos de *P. cablin* en Taiwán (I), Filipinas (II) y Japón (III). El material vegetal de cada cultivo, se cosechó a los cuatro meses, se secó al sol durante tres días y se almacenó a condiciones ambientales. En el cultivo III se obtuvo el mayor contenido de biomasa (140,6 g/planta) y AE (1,66 g/planta). Sin embargo, el mayor rendimiento de extracción (1,60% p/p) se logró con las plantas del cultivo I. En todos los AE, el compuesto mayoritario fue el pachulol [29,07% (I), 22,83% (II) y 19,02% (III)], y los demás metabolitos variaron significativamente, *e.g.*, α -guaieno [17,37% (I),

13,99% (II) y 5,06% (III)], α -pachuleno [12,32% (I), 8,93% (II) y 6,55% (III)], β -guaiano [18,80% (I), 13,21% (II) y 2,88% (III)].

Buré y Sellier (2004) determinaron la composición química de un AE de pachulí de los cultivos de Indonesia; el AE fue suministrado por la Sociedad Jean Niel (Grasse, Francia). Como resultado, por cromatografía de gases se separaron 41 compuestos y 28 fueron identificados por GC/MS (92,9% de la corriente iónica total, TIC). Los compuestos mayoritarios fueron pachulol (32,2%), δ -guaiano (16,7%), α -guaiano (15,6%), α -pachuleno (5,5%) y seicheleno (5,3%). La naturaleza química de los 13 compuestos no identificados se determinó por ionización química de iones positivos (CI), usando amoniaco deuterado ND₃ como gas reactivo. Como conclusión, los autores encontraron siete hidrocarburos sesquiterpénicos (2,0% de la TIC) y seis alcoholes sesquiterpénicos (3,0% de la TIC).

Bunrathep *et al.* (2006) identificaron por GC/MS, 22 compuestos en el AE, obtenido por hidrodestilación (HD) en un equipo tipo *Clevenger*, de las hojas de pachulí cultivadas en Bangkok, Tailandia. El rendimiento de extracción del material vegetal fresco fue del 0,30% (v/p). Pachulol (60,30%), germacreno A (11,73%), α -guaiano (7,22%), globulol (4,62%), γ -pachuleno (3,89%), α -pachuleno (2,27%) y *trans*- β -cariofileno (2,24%), fueron los componentes mayoritarios. También, en esta investigación se obtuvo AE de cultivos celulares de *P. cablin* y su composición química fue similar al AE de las hojas frescas. En esta publicación causa curiosidad la alta cantidad de germacreno A, mientras el α -bulneseno se reportó en baja concentración (0,86%). Los espectros de masas son similares, por lo que quizá los autores se equivocaron en la identificación de las dos sustancias, la cantidad reportada de germacreno A sería la de α -bulneseno.

Tsai *et al.* en Taiwán, China (2007), obtuvieron el AE de las partes aéreas de *P. cablin* usando destilación por arrastre con vapor (AV); el AE se analizó por GC/MS y se identificaron 41

metabolitos secundarios, entre ellos, α -guaieno (20,62%), α -bulneseno (16,18%), β -pachuleno (12,12%), pachulol (11,12%) y α -pachuleno (10,52%) fueron los componentes mayoritarios. Se realizaron fraccionamientos del AE y se encontró que la fracción enriquecida con α -bulneseno tuvo actividad inhibitoria alta contra el factor activador de plaquetas (PAF). PAF es un mediador fosfolipídico inflamatorio y está involucrado en patologías como asma, trombosis e infarto de miocardio.

Sundaresan *et al.* (2009) usando GC/MS, realizaron un estudio comparativo de los componentes del AE de *P. cablin* y *P. travancoricus*. Las plantas se cultivaron en India, se destilaron por HD, usando un equipo tipo *Clevenger*, a partir de material vegetal fresco, durante ocho horas, con rendimientos de extracción de 0,3% (p/p) y 0,2% (p/p), respectivamente. Se identificaron 11 compuestos en *P. cablin* y 13 compuestos en *P. travancoricus*; α - y β -pachulenos, pachulol, *trans*- β -cariofileno, α -guaieno y seicheleno, fueron comunes para ambas especies. Los compuestos mayoritarios en el AE de *P. cablin* fueron pachulol (23,2%), α -guaieno (14,6%), seicheleno (5,6%), *trans*- β -cariofileno (4,5%) y β -pachuleno (4,2%).

Hussin *et al.* (2012) determinaron la variabilidad de la composición química, según la edad de la materia prima de *P. cablin* y el almacenamiento del AE. Las plantas usadas en la investigación provenían del vivero MARDI, en Malacca, Malasia. Los AE se obtuvieron por HD de plantas frescas (A), plantas secas con un año de almacenadas y fermentadas con calentamiento durante siete días en agua (B), plantas secas con un año de almacenadas (C) y AE comerciales de Indonesia (D) y Malasia (E). El mayor rendimiento se obtuvo en C (1,12%), seguido de B (0,64%) y A (0,38%). En todos los AE, el componente mayoritario fue pachulol. Los componentes mayoritarios del AE comercial de Malasia fueron pachulol (45,9 - 46,3%), α -bulneseno (9,2 - 14,4%), α -guaieno (5,8 - 9,4%) y seicheleno (6,2 - 7,3%).

Albuquerque *et al.* (2013) demostraron la actividad bioinsecticida y repelente del AE de pachulí contra tres especies de hormigas, *Camponotus melanoticus*, *C. novogranadensis* y *Dorymyrmex thoracicus*. En la investigación, el AE se obtuvo por HD en un equipo tipo *Clevenger*, a partir de material vegetal seco, cultivado en San Cristóbal, Brasil. El AE se analizó por GC/MS y se identificaron 17 compuestos. Los componentes mayoritarios fueron pachulol ($36,60 \pm 0,04\%$), α -bulneseno ($13,95 \pm 0,04\%$), α -guaiano ($11,96 \pm 0,06\%$), seicheleno ($7,85 \pm 0,01\%$) y α -pachuleno ($5,58 \pm 0,03\%$).

En la **Tabla 4**, se registran algunos metabolitos secundarios presentes en el AE y sus cantidades relativas, reportadas según la región de cultivo. Se puede observar, que la composición química y las cantidades relativas de los metabolitos secundarios volátiles en el AE varían significativamente.

1.2.4 Metabolitos secundarios no volátiles

Los metabolitos secundarios no volátiles de *P. cablin* pertenecen a los alcaloides, flavonoides, glucósidos, triterpenos, ligninas, entre otros (Swamy *et al.*, 2015b). Para la presente investigación solo se tuvieron en cuenta los flavonoides y glucósidos reportados en la literatura. En *Scopus* (Elsevier), aparecen registradas 21 publicaciones (ecuación: TITTLE-ABS-KEY “*Pogostemon cablin*” AND “Flavonoid*” OR “Glucoside*”; periodo: todos los años, fecha: 31 de marzo de 2020), de las cuales, al revisar los títulos y resúmenes, 14 están directamente relacionadas: dos artículos de revisión generales, seis de aislamiento e identificación de flavonoides y glucósidos y seis sobre actividad biológica. A continuación, se enuncian las investigaciones relacionadas a los flavonoides y glucósidos identificados en *P. cablin*.

Itokawa *et al.* (1981) determinaron los flavonoides pachipodol, ombuina, apigenina, ramnetina y apigetrina y un glucósido, apigenin-7-O- β -D-(6''-p-cumaroil)-glucósido, de las partes aéreas de

P. cablin. Los compuestos se identificaron por comparación de los datos experimentales de espectros de ultravioleta, infrarrojo, espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de ^{13}C , con los de la literatura (Valesi *et al.*, 1972; Jurd, 1962; Ternai y Markham, 1976; Mabry *et al.*, 1970). A las partes aéreas de *P. cablin*, se les realizaron extracciones con hexano y con acetato de etilo; pachipodol y ombuina se aislaron del extracto con hexano, ombuina, apigenina, ramnetina, apigetrina y el glucósido, con acetato de etilo. La técnica empleada para el aislamiento de los compuestos fue la cromatografía en columna con gel de sílice, utilizando como eluyentes hexano, acetato de etilo y metanol.

Tabla 4.

Componentes mayoritarios (%) del AE de pachulí, según la región de su cultivo.

Compuestos	China (Tsai <i>et al.</i>)	India (Sundaresan <i>et al.</i>)	Brasil (Albuquerque <i>et al.</i>)	Indonesia (Buré y Sellier)	Japón (Sugimura <i>et al.</i>)	Malasia (Hussin <i>et al.</i>)	Tailandia (Bunrathep <i>et al.</i>)
β -Pachuleno	12,12	4,2	$2,54 \pm 0,04$	2,3	0,51	0,8-1-5	tr,
<i>trans</i> - β -Cariofileno	3,89	4,5	$2,62 \pm 0,05$	3,3	-	1,1-2,0	2,24
α -Guaieno	20,62	14,6	$11,96 \pm 0,06$	15,6	5,06	5,8-9,4	7,22
Seicheleno	-	5,6	$7,85 \pm 0,01$	5,3	-	6,2-7,3	0,98
α -Pachuleno	10,52	3,3	$5,58 \pm 0,03$	5,5	-	4,0-4,2	2,27
γ -Pachuleno	-	-	-	-	-	-	3,89
α -Bulneseno	16,18	-	$13,95 \pm 0,04$	16,7	6,55	9,2-14,4	11,73
Norpachulenol	-	-	-	0,6	0,08	2,2-4,0	-
Pogostol	-	-	$3,11 \pm 0,06$	0,2	-	3,5-3,7	-
Pachulol	11,12	23,2	$36,60 \pm 0,76$	32,2	19,02	45,9-46,3	60,30

Nota: tr. Trazas

Park *et al.* (1988) aislaron por cromatografía en capa fina, con diferentes gradientes de elución con cloroformo-metanol, los compuestos licochalcona A, ombuina y 5,7-dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavanona. El aislamiento se realizó a partir de los extractos con metanol, hexano y cloroformo de las partes aéreas de *P. cablin*. La elucidación de los compuestos aislados se realizó usando las técnicas instrumentales de espectroscopia ultravioleta, infrarrojo, espectrometría de

masas y resonancia magnética nuclear, y su comparación con los datos espectrales en la literatura. En la investigación se estudió la actividad antitumoral y citotóxica de la licochalcona A, en diferentes líneas celulares humanas y se evidenció una potente actividad. La licochalcona A, también, mostró una buena actividad antimalárica. Por ello, los autores sugieren en sus conclusiones, que este compuesto es útil como agente quimioterapéutico y quimiopreventivo contra cualquier tipo de cáncer.

Guan *et al.* (1994) aislaron por primera vez retusina de *P. cablin*. En el estudio, otras ocho moléculas fueron aisladas (sesquiterpenoides, compuestos oxigenados y triterpenoides) e identificadas usando las bases de datos espectrales de RMN-1H, IR, MS y UV.

Zhou *et al.* (2011) aislaron por cromatografía en columna, nueve sesquiterpenoides y cinco flavonoides del extracto metanólico de partes aéreas secas de pachulí. Los flavonoides aislados fueron 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona, 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona, 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona y pachipodol. Todas las estructuras fueron elucidadas por RMN 1D y 2D.

Li *et al.* (2011) desarrollaron un método utilizando la cromatografía en contracorriente de alta velocidad (HSCCC) y HPLC-preparativa para el aislamiento y la purificación de flavonoides en *P. cablin*. Las cantidades de los compuestos aislados fueron 18,5 mg de pogostona, con una pureza del 95%; 11,5 mg de 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, con una pureza del 99%; 20,3 mg de 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona, con una pureza de 98%; 18 mg de pachipodol, con una pureza del 96%, y 8 mg de retusina, con una pureza del 98%. Las estructuras de los compuestos, se elucidaron por medio de las técnicas instrumentales de espectrometría de masas con interfaz de electronebulización (ESI-MS) y resonancia magnética nuclear (^1H -NMR y ^{13}C -NMR). Los flavonoides y la pogostona se obtuvieron a partir de la extracción con etanol al 80% de las partes

aéreas de *P. cablin*. El extracto etanólico se filtró y se llevó a sequedad bajo presión reducida. El extracto seco se redisolvió en etanol al 20% y se extrajo con hexano. El extracto con hexano se llevó a sequedad, y luego, se realizó la separación por HSCCC. Para la HSCCC se optimizaron las condiciones de separación usando diferentes cantidades de disolventes. La mejor separación se logró usando un sistema de disolvente difásico hexano-acetato de etilo-metanol-agua (11:5:11:5, v/v/v/v) y se obtuvieron tres picos cromatográficos bien separados. En dos picos cromatográficos hubo coelución de dos flavonoides. Estas dos fracciones fueron separadas y purificadas por HPLC-preparativo. Las mejores condiciones de separación se lograron usando una fase móvil de metanol con 0,1% del ácido acético en agua, modo de elución isocrática (0 - 25 min, 70:30, fracción 1) y (0 - 20 min, 75:25, fracción 2), un flujo de 5,0 mL min⁻¹ y una temperatura de 30 °C. La longitud de onda del detector se fijó en $\lambda=276$ nm.

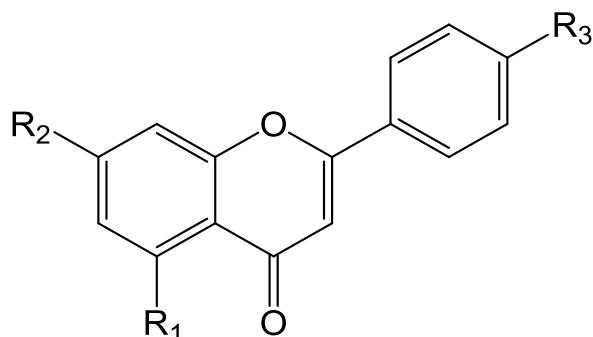
Li *et al.* (2014) validaron un método en términos de linealidad, sensibilidad, precisión, estabilidad y exactitud para la detección por HPLC-DAD de pogostona y compuestos no volátiles de *P. cablin*. Los compuestos no volátiles fueron apigenina, ramnetina, ombuina, pachipodol, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona, 5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona, 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona y 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona. El método validado se aplicó a 13 muestras reales de pachulí, que se compraron en tiendas locales herbolarias o fueron recogidas en la provincia de Guangdong, China; se llevó a cabo el análisis cualitativo y cuantitativo de los nueve compuestos estudiados. Los compuestos se aislaron de *P. cablin* por cromatografía en columna a partir de extractos, obtenidos con éter de petróleo, acetato de etilo y butanol, y su estructura se elucidó por comparación de los datos espectrales experimentales de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear, con los de la literatura. Los extractos se obtuvieron de la siguiente forma: a las partes aéreas de *P. cablin*, se les realizó una extracción con etanol al 95%. El extracto

etanólico se filtró y se concentró a sequedad, luego, se suspendió en agua y se extrajo sucesivamente con éter de petróleo, acetato de etilo y butanol. La cuantificación de los compuestos en las 13 muestras de pachulí se realizó usando las condiciones operacionales optimizadas de la extracción y la separación por HPLC-DAD. Para la extracción se utilizó un equipo *Syncore® Polyvap Analyst Reactor*, y los parámetros estudiados en la optimización fueron el disolvente de extracción (metanol, etanol, metanol-agua 1:1), la temperatura (70, 80, 90, 100 °C), el tiempo (0,5; 1,0; 1,5 y 2,0 horas), el tamaño de partícula (0,25; 0,18; 0,15 y 0,125 mm) y la relación sólido-líquido (1/10, 1/20, 1/30, 1/40). Los mejores resultados de la extracción se obtuvieron usando metanol, con una relación sólido-líquido 1:10, con un tamaño de partícula de la muestra sólida de 0,15 mm, a 90 °C y 1,5 h. Para el análisis por HPLC-DAD, se optimizaron los parámetros como el tipo de columna, la composición de la fase móvil y el modo de elución. Las mejores condiciones de separación se lograron con una columna *Cosmosil 5C18-AR-II* (250 mm, 4,6 mm d.i., 5 µm), fase móvil de A (agua con ácido fórmico al 0,2%) y B (acetonitrilo) en modo de elución con gradiente, así: 0 - 10 min, 30 - 33% B; 10 - 15 min, 33% B; 15 - 20 min, 33 - 41% B; 20 - 45 min, 41% B; 45 - 50 min, 41 - 56% B; 50 - 70 min, 56 - 57% B; 70 - 72 min, 57 - 100% B.

Según las anteriores publicaciones, hay 14 compuestos polifenólicos en *P. cablin*. En las **Figuras 6-9**, se muestran sus estructuras químicas. En este trabajo de investigación, estas moléculas fueron las únicas tenidas en cuenta en la identificación y cuantificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-*Orbitrap*) de los extractos obtenidos por dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y extracción con disolventes asistida por ultrasonido (UAE) a partir del material vegetal seco de *P. cablin*.

Figura 6.

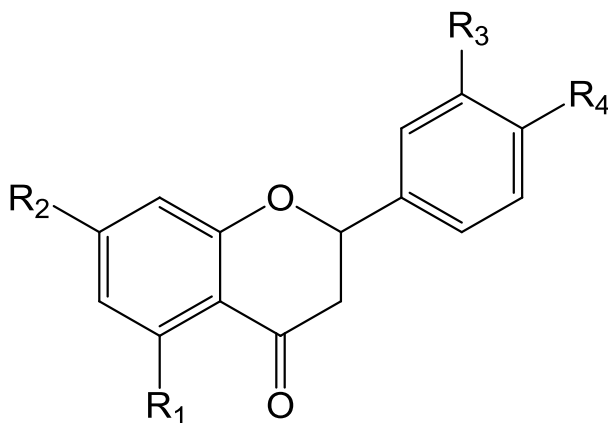
Estructuras químicas de los flavonoides derivados de flavona en P. cablin.



Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃
Apigenina	OH	OH	OH
Apigetrina (apigenin-7-O-glucósido)	OH	7-O-β-D-glucopiranósido	OH
Apigenin-7-O-β-D-(6''-p-cumaroil)-glucósido	OH	7-O-β-D-(6''-p-cumaroil)-glucósido	OH

Figura 7.

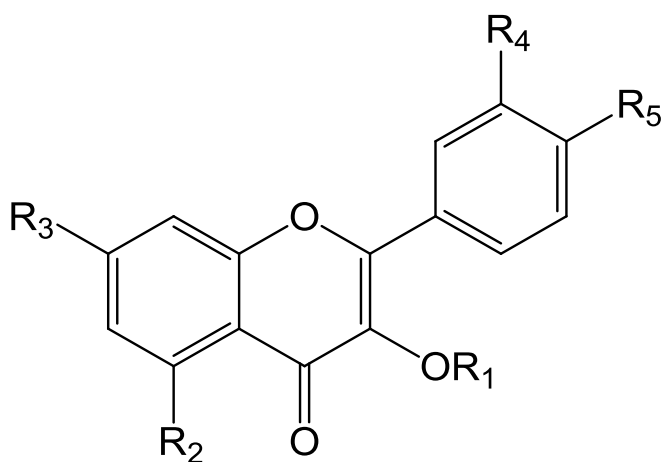
Estructuras químicas de los flavonoides derivados de flavona en P. cablin.



Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona	OH	OCH ₃	H	OCH ₃
5-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
5,7-Dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavanona	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃
5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH

Figura 8.

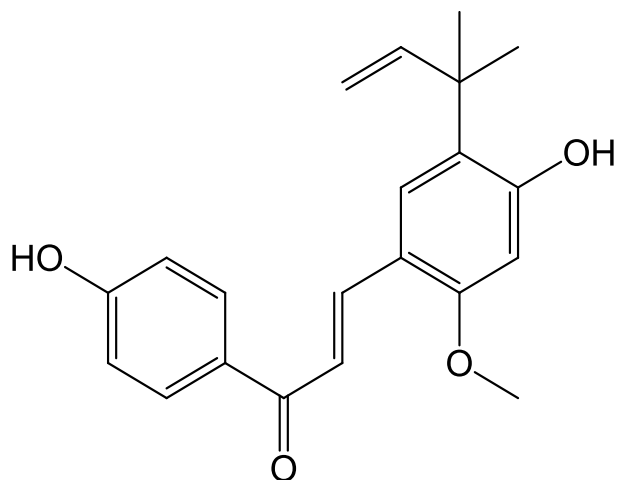
Estructuras químicas de los flavonoides derivados de flavonol en P. cablin.



Flavonoide	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	H	OH	OCH ₃	H	OCH ₃
Ramnetina (3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona)	H	OH	OCH ₃	OH	OH
5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	CH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃
Ombuina (3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona)	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃
Pachipodol (5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetoxiflavona)	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH
Retusina (5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona)	CH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

Figura 9.

Estructura química de licochalcona A.



1.3 El mercado de los productos de valor del pachulí

Sobre el mercado de los productos de valor de pachulí se tienen dos evidencias, la primera, un mercado internacional amplio y conocido para los AE (predominantemente, en la perfumería e industria de sabores y fragancias) y un mercado local (poco conocido) para los extractos en ciertos países, *e.g.*, China e India. A pesar de que no existe una clasificación arancelaria específica para el AE de pachulí en todos los países, que permita saber cuál es la producción anual en el mundo, el estado de las importaciones y exportaciones, y su representación en dinero (USD), se puede tener una idea general, según los reportes de algunas empresas comercializadoras sobre el precio y producción, y lo que se encuentra en publicaciones científicas.

El código arancelario 3301, agrupa de forma amplia, los aceites esenciales, extractos y productos derivados. Según el *International Trade Center* (ITC), para el 2019, en el mundo, se movió un capital de 6.019.312.000 dólares en importaciones y 6.251.062.000 de dólares en exportaciones. Estados Unidos, India, Francia, Alemania y Países Bajos fueron los países que realizaron mayores importaciones, mientras que, en exportaciones fueron India, Estados Unidos, Emiratos Árabes Unidos, Francia y China (**Tabla 5**). Aunque no se puede saber con certeza la clase del producto importado o exportado (implicaría pagar por esa información concreta), las cifras dan una idea general de un mercado grande en dinero y volumen. Una tendencia observable, son los países desarrollados, que importan materias primas, crean productos derivados finales de mayor valor agregado y luego los exportan. Para citar un caso, Estados Unidos importa mayoritariamente de India (176.648.000 USD, 6.474 t), Francia (116.944.000 USD, 1.329 t) Brasil (103.733.000 USD, 14.158 t), Argentina (103.140.000 USD, 3.115 t) y China (81.205.000 USD, 3.965 t), y exporta, a China (103.881.000 USD, 2.588 t), Canadá (84.518.000, 4.854 t), Países

Bajos (76.081.000 USD, 3.066 t), Japón (67.649.000 USD) y Reino Unido (45.082.000 USD, 2.179 t).

Tabla 5.

Países con mayores importaciones y exportaciones de aceites esenciales, extractos y derivados (código arancelario 3301) en el año 2019.

Importaciones				
País	Valor, miles de USD	Crecimiento, %	Cantidad, toneladas	Crecimiento, %
Estados Unidos	1.095.691	5	48.734	1
India	712.929	43	26.558	35
Francia	443.553	6	11.170	7
Alemania	378.190	6	20.704	0
Países Bajos	291.658	15	13.324	1
Reino Unido	273.652	-2	11.371	-8
China	263.938	6	9.461	-4
Irán	245.365	86	803	16
Japón	206.699	8	13.644	17
Singapur	172.909	8	No reportado	-
Exportaciones				
País	Valor, miles de USD	Crecimiento, %	Cantidad, toneladas	Crecimiento, %
India	1.206.534	20	No reportado	-
Estados Unidos	787.938	8	35.238	5
Emiratos Árabes	504.472	117	No reportado	-
Francia	459.094	8	6.547	4
China	349.893	-15	19.415	-24
Brasil	313.938	7	58.459	1
Argentina	216.963	2	7.091	2
Reino Unido	210.412	-2	8.004	1
Países Bajos	206.943	10	11.893	1
Alemania	200.185	4	7.198	-1
Indonesia	198.812	-2	No reportado	-

Nota: ITC. Fecha de consulta: 25 de mayo de 2020. Disponible en:

https://www.trademap.org/Country_SelProduct.aspx

La producción mundial del AE de pachulí está alrededor de 1200-1500 t por año, con una cuota mayor del 80% de Indonesia, seguida de China, India y Malasia (Lawrence, 2009; Howarth, 2015; Vijaykumar, 2004). La demanda global es de 1600 ton por año (Chakrapani *et al.*, 2013) y supone un camino viable para aumentar la producción en países con cultivos a gran escala. En términos de volumen de producción, ocupa el décimo puesto entre los aceites esenciales más importantes. Para el 2006, se estimó un mercado mundial del AE de pachulí de aproximadamente 30 millones de dólares (Anonis, 2007).

Las tendencias de los consumidores indican que la demanda del AE de pachulí crecerá a un ritmo constante. Con base en la producción histórica, el principal proveedor seguirá siendo Indonesia que domina el suministro de AE de pachulí en el mundo (Bulliqli, 2018). China e India tienen muy bien establecidos sus cultivos de *P. cablin*, pero la producción de material vegetal, AE y extractos se destinan a los mercados internos para sus preparados medicinales.

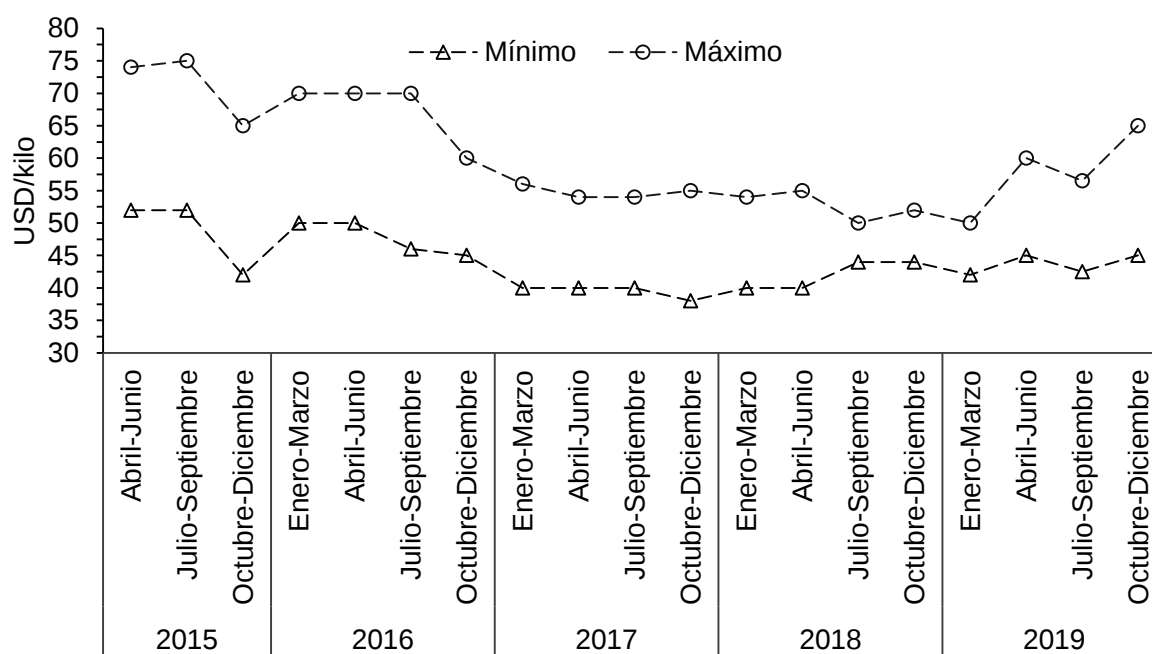
En el mundo, el AE producido en Indonesia pone el precio regular. Para entender un poco la dinámica de los precios del AE de pachulí, se consultaron todos los reportes trimestrales (*Essential Oils Market Report*) de la empresa comercializadora *Ultra International B.V.*, desde el año 2015 hasta 2019 (**Figura 10**). En promedio, el precio mínimo fue de 44,1 USD/kg y el máximo de 60,3 USD/kg. En el periodo de 2015 – 2016, los precios fueron ligeramente más altos que en 2017 - 2018. Para el 2019, el precio volvió a subir. El precio promedio para el año 2015, según el ITC, fue de 48 - 72 USD/kg y para un AE de pachulí orgánico de 175 USD/kg (*Essential Oils Price Information*, 2015).

La variabilidad de precios ha tenido dos razones: periodos de baja oferta por enfermedades y condiciones climáticas (impacto de la sequía de El Niño, terremotos y tsunamis), y, la migración de cultivos. Esta última es la principal razón. En los últimos 20 años, los cultivos han cambiado

de una isla a otra debido a la sobreexplotación agrícola y a la necesidad de la planta de suelos frescos y con buena cantidad de nutrientes. En el año 2000, Sumatra representaba el 100% de la oferta, cinco años después, Java representaba el 80% y Sumatra el 20%. A partir del 2010, los cultivos migraron a Sulawesi. Para el 2018, Sulawesi representó el 80% de la producción, Sumatra, el 15% y Java, el 5% (Bulliqli, 2018; *Essential Oils and Oleoresins Market Insider*, 2016).

Figura 10.

Variación de precios del AE de pachulí indonesio.



Nota: Periodo de observación: 2015 - 2020. Fuente: *Ultra International B.V.*, en abril y mayo de 2020. Disponible en: ultranl.com/market/

No obstante, la migración de los cultivos significó un cambio en la calidad del AE y en la nota de olor, características que son fundamentales para las empresas de perfumería y para la industria de sabores y fragancias. Así, el AE de Sumatra (nota: leñosa, almizclada y balsámica; 30 - 34% de

pachulol) tiene un precio más alto, seguido del AE de Java (nota: leñosa y hoja verde; 30 - 31% de pachulol) y el más barato, pero altamente disponible, es el AE de Sulawesi (nota: leñosa y hoja verde; 26 - 28% de pachulol). Los cambios de calidad se deben a la acidez del suelo en las islas, entre más ácido, menos contenido de pachulol (Howarth, 2015; *Essential Oils and Oleoresins Market Insider*, 2016). Actualmente, las empresas compradoras del AE de pachulol en Indonesia invirtieron en Investigación y Desarrollo (R&D) para mejorar la calidad del AE, por medio de tratamientos sostenibles a los terrenos de los cultivos y a la remediación de los suelos en las Islas de Sumatra y Java (*Essential Oils Market Report*, primavera 2020). En el hipotético caso de que las islas indonesias no puedan soportar la producción por el desgaste del suelo, las empresas compradoras pondrán la mirada a otros países tropicales en Asia, pero también, en Latinoamérica.

Chen *et al.*, (2012) estudiaron el mercado de *P. cablin* en China. El caso es interesante. Según los estándares de medicamentos del Ministerio de Salud, en el mercado hay 41 productos farmacéuticos que contienen *P. cablin*, que incluyen píldoras, tabletas, gránulos, capsulas, líquidos orales, vinos medicinales, jarabes, té, entre otros. Los productos sirven para tratar trastornos gastrointestinales, mejorar la función digestiva, contener la diarrea, aliviar el vómito, tratar resfriados, dolores de cabeza, mareos, espasmos abdominales, entre otros. Se manejan cinco tipos de incorporación de pachulol en los productos finales: la hierba molida (20 productos, especialmente en píldoras), el extracto acuoso del material vegetal postdestilado (12 productos), el aceite esencial (seis productos), el extracto etanólico (dos productos) y el extracto acuoso (un producto). Se prefiere la hierba molida ya que facilita la preparación de los productos finales y es más económica, por evitar los costos de destilación y extracción. Cabe destacar que estos productos, junto a los 729 registrados en la Administración Estatal de Alimentos y Medicamentos de China (hoy Administración Nacional de Productos Médicos) hacen parte de la Medicina

Tradicional China y carecen de estudios clínicos a profundidad que verifiquen su efectividad. Lo que sí es cierto, es que alrededor de la planta existe un mercado interno local y solamente en estos productos farmacéuticos representó 11.903 millones de yuanes en 2006 y aumentó a 14.527 millones de yuanes en 2011, a una tasa de crecimiento anual de 3,94%.

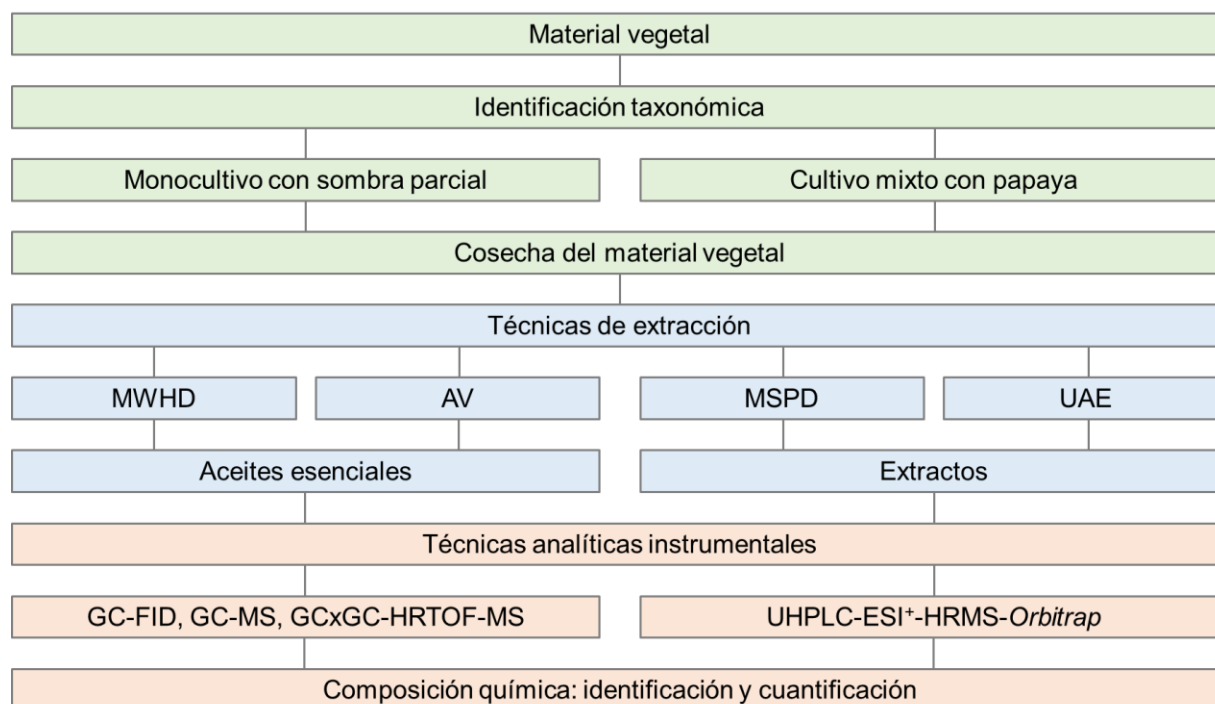
En conclusión, los productos de valor del pachulí tienen un mercado mundial, establecido y posicionado, con una muy buena demanda y precios atractivos. Estos factores, en parte, justificaron el desarrollo de la presente investigación. Por ello, se estableció el cultivo experimental de *P. cablin* y se estudiaron los metabolitos secundarios obtenidos en los AE y extractos por las técnicas cromatográficas y de espectrometría de masas. La finalidad fue dar un criterio científico y técnico de la viabilidad del pachulí en Colombia con miras a un escalamiento agroindustrial en los proyectos productivos y de investigación en departamentos de Arauca, Santander y Magdalena Medio.

2. Parte Experimental

A continuación, se presentan las tres etapas desarrolladas en la presente investigación (**Figura 11**).

Figura 11.

Diagrama metodológico general desarrollado en el presente estudio.



2.1 Materiales, reactivos y equipos auxiliares de laboratorio

En la **Tabla 6**, se encuentran los materiales, equipos auxiliares, reactivos y sus especificaciones, que se emplearon en esta investigación.

Tabla 6.*Materiales, reactivos y equipos empleados en el presente estudio.*

Nombre	Especificaciones
Materiales	
Balones aforados	1, 5, 25, 50 y 100 mL; Pyrex®, México.
Balón aforado	1 L, <i>Brand GMBH Co.</i> Wertheim, Alemania.
Pipetas Pasteur	230 mm, <i>Brand GMBH Co.</i> Wertheim, Alemania.
Equipo de hidrodestilación MWH	Balón fondo redondo de 2 L, reductor de 45/50 a 24/40, alargadera 24/40, trampa <i>Dean – Stark</i> , condensador de bolas y condensador de espiral.
Equipo de destilación AV	Alambique de 0,1 m ³ , cuello de cisne, condensador y vaso florentino de acero inoxidable.
Frascos ámbar con tapa y septum	4 mL, <i>Agilent Technologies</i> , Santa Clara, California, EE.UU.
Probetas	25, 100, 500 y 1000 mL; <i>Brand GMBH Co.</i> Wertheim, Alemania.
Vasos de precipitados	50, 100, 250, 400 mL; Pyrex®, México.
Viales para cromatografía con tapa y septa	2 mL, <i>Agilent Technologies</i> , Santa Clara, California, EE.UU.
Reactivos	
Ácido cítrico monohidratado	Pureza: 99%; <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Ácido fórmico	Grado LC-MS, <i>J.T. Baker</i> , Phillipsburg, EE.UU.
Agua	Tipo I, Sistema de purificación <i>Synergy UV</i> , Millipore S.A.S. Molsheim, Francia.
<i>Celluclast</i> ® 1,5 L	<i>Cellulase from Trichoderma reesei</i> ; <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, MO, EE.UU.
Diclorometano	Analítico 99,8%, <i>Emscience</i> , <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Etanol absoluto	EMSURE®, ACS, ISO, Reag. Ph Eur, <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Gel de sílice modificado- C ₁₈	Carbono 23%, Tamaño de partícula: 40-63 µm, <i>Silicycle Inc.</i> Québec, Canadá.
Iso-propanol	ACS Reagent 99,8%, <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, MO, EE.UU.

Tabla 6. Continuación...

Metanol	Grado LC-MS, <i>J.T. Baker</i> , Phillipsburg, EE.UU.
Na ₂ HPO ₄	Pureza: 99%; <i>Merck KGaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Sulfato de sodio anhidro	Pureza: 99,1%; <i>J. T. Baker</i> , Phillipsburg, NJ, EE.UU.
Apigenina	Pureza: 95%; <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, MO, EE.UU.
Naringenina	Pureza: 98%; <i>Sigma-Aldrich</i> , Saint Louis, MO, EE.UU.
<i>n</i> -Tetradecano	Pureza: 99%; <i>Sigma-Aldrich</i> , Milwaukee, WI, EE.UU.
Equipos auxiliares	
Balanzas analíticas	<i>Mettler Toledo</i> AL204 y PB1502-S, Nänicon, Suiza.
Baño de ultrasonido	S15H <i>Elmasonic</i> , <i>Elma- Hans Schmidbauer GmbH & Co</i> , Singen, Alemania.
Baño refrigerante	<i>Chiller</i> 28L20K, <i>Phaber</i> , Colombia.
Horno microondas doméstico	Modelo DH3009656, <i>Whirlpool</i> , Benton Harbor, MI, Estados Unidos.
Micropipetas	2 – 20, 25 – 250 y 100 – 1000 µL, <i>Brand</i> , Wertheim, Alemania.
Agitador	<i>Minishaker IKA</i> , Hofheim, Alemania.
pH-metro	MPC227, <i>Mettler Toledo</i> , Schwezenbach, Suiza.
Rotoevaporador	<i>Heidolph G1</i> , Schwabach, Alemania.

2.2 Material vegetal

La especie estudiada, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth (Herbario UIS, N° 20890), se cultivó y se recolectó en el Complejo Agroindustrial Piloto de CIBIMOL-CENIVAM (977 m s. n. m., N 07°08,422' W 073°06,960'), ubicado en la zona noroeste del *campus* principal de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Se establecieron dos parcelas experimentales, una de tipo monocultivo con sombra parcial (polisombra al 70%) y otra, en cultivo mixto con papaya. En cada parcela, las plantas (200) se sembraron en triángulo, a una distancia de 60 cm x 50 cm entre ellas y a 1 m entre surcos (**Figura 12**). La cosecha de las plantas adultas se realizó a los seis meses de establecidos los cultivos, las

plantas se secaron a la sombra (25 -28 °C), tomando pequeñas porciones y atándolas a una cuerda durante 30 días. Una muestra representativa del monocultivo (12 plantas), se usó para medir la pérdida de peso del pachulí en función de los días, hasta lograr un secado completo.

El material vegetal se homogeneizó después de los 30 días de secado, con los procesos de picado o molienda, según la técnica de extracción utilizada. Para el picado, se usó una picadora PE800 (Penagos Hermanos & Cía, Bucaramanga, Colombia) y se obtuvo un tamaño de partícula promedio de 2 - 5 cm (hojas y tallos); la molienda, se realizó a partir del material vegetal picado, en un molino de cuchillas Retsch SM100 (*Retsch GmbH*, Haan, Alemania) acondicionado con un tamiz de 2 mm. El material vegetal picado se almacenó en costales y el molido en contenedores plásticos.

Figura 12.

Parcelas experimentales de P. cablin, en monocultivo con sombra parcial y en cultivo mixto con papaya.



Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Jardín Botánico con Sentido, Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, el 9 de agosto de 2018.

2.3 Obtención de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles

2.3.1 Obtención de aceites esenciales por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

El material vegetal cosechado de la parcela de monocultivo se hidrodestiló en un equipo tipo *Clevenger*, con una trampa *Dean - Stark* como reservorio del destilado, y con adaptación para calentamiento por radiación de microondas, a través de un horno doméstico *Whirlpool*, modelo DH3009656, potencia de salida de 1350 Watt y una frecuencia de radiación de 2,5 GHz. La potencia del horno se fijó al 60% del total del equipo.

Se evaluó el rendimiento y la calidad del AE de pachulí, obtenido por MWHD, en función del tiempo de secado postcosecha, órganos de la planta y tratamiento enzimático; también, se estudió la influencia del tiempo de la destilación y del tamaño de partícula sobre el rendimiento del AE.

Los AE obtenidos se secaron con Na₂SO₄ anhidro, se pesaron en la balanza analítica y el rendimiento de la extracción se calculó con base en la **Ecuación 1**.

$$\%Rendimiento = \frac{P_{AE}}{P_{MV}} * 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde, P_{AE} es el peso del AE y P_{MV} es el peso del material vegetal.

Para el estudio de la influencia del tiempo de secado, el material vegetal se picó manualmente y se destiló en función de los días postcosecha (0, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15, 20, 25, 30) hasta completar un mes. El tiempo de destilación fue 60 min, en cuatro tandas de 15 min.

Para el estudio de la influencia de las partes de la planta, se realizaron destilaciones de hojas picadas, tallos picados y su mezcla. El tiempo de destilación fue 60 min, en cuatro tandas de 15 min. Las plantas empleadas tenían entre 15 - 20 días de secado postcosecha.

Para determinar la influencia del tratamiento enzimático, se empleó la enzima *Celluclast*[®] (*Sigma-Aldrich*, Saint Louis, MO, EE.UU.), en una solución amortiguadora (pH 4,5), con una temperatura de 50 °C, y un tiempo de incubación de 30 min en contacto con el material vegetal molido. La metodología se desarrolló con base en los trabajos de Hosni *et al.* (2013), y Baby y Ranganathan (2016a, 2016b), con algunas modificaciones. El experimento se realizó de la siguiente forma: se preparó una solución amortiguadora a pH 4,5. Para ello, se prepararon dos soluciones: 1) una solución de Na₂PO₄ anhidro (28,4 g) en 1 L de agua destilada y 2) una solución de ácido cítrico (21 g) en 1 L de agua destilada. Se mezclaron 500 mL de solución de ácido cítrico con 312 mL de solución de Na₂PO₄, la mezcla se aforó con agua destilada (1 L). La solución amortiguadora a pH 4,5, se depositó en un balón de 2 L y se sumergió a un baño María de 50 °C. Una vez la solución amortiguadora alcanzó la temperatura de 50 °C, se añadió la enzima *Celluclast*[®] (375 mg), se adicionaron 150 g de material vegetal y un tiempo de incubación se dejó de 30 min. El balón de 2 L se retiró del baño María y se sometió a destilación durante 90 min en cuatro ciclos de 15 min, con descanso de 5 min entre ciclos (**Figura 13**). Se emplearon dos tipos de blanco para comparar la acción de la enzima sobre el rendimiento de extracción del aceite esencial. El blanco A consistió en una destilación convencional con agua destilada y sin incubación previa; el blanco B correspondió a una destilación con los mismos parámetros del tratamiento enzimático pero sin la enzima (hidrólisis ácida). En la **Tabla 7** se comparan las condiciones experimentales usadas.

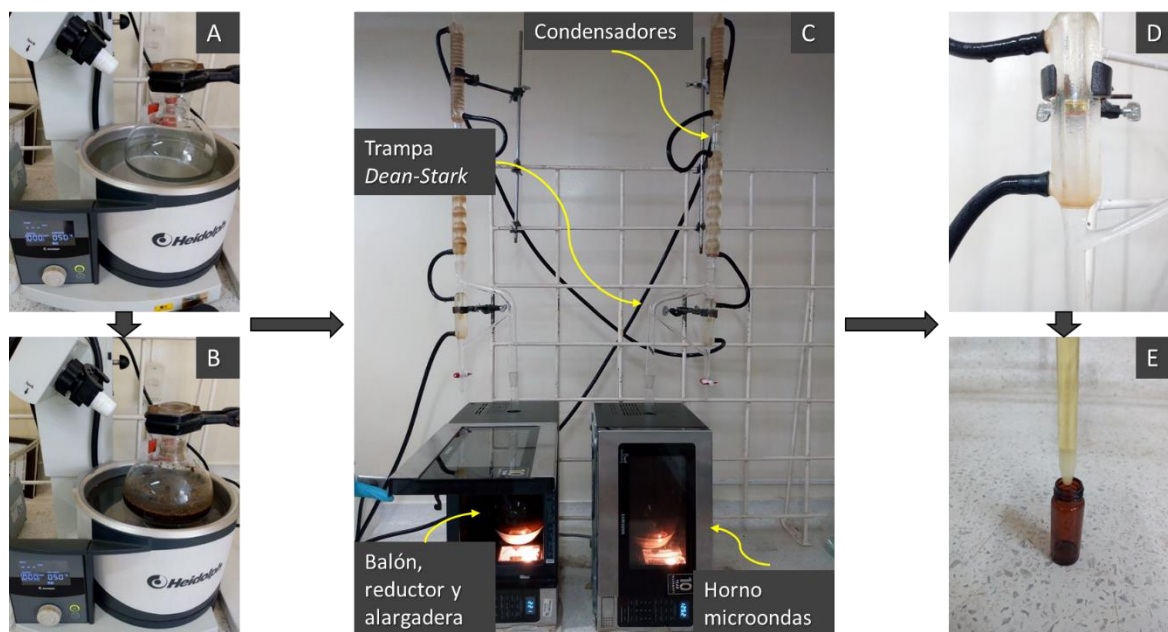
Tabla 7.

Condiciones experimentales usadas en el tratamiento enzimático con Celluclast®.

Variables	Blanco A	Blanco B	Tratamiento enzimático
Material vegetal, g	150	150	150
Solución buffer, L	1 (agua)	1	1
pH	7	4,5	4,5
Temperatura, °C	25	50	50
Tiempo de incubación, min	0	30	30
Concentración de enzima, % (p/p)	0	0	0,25

Para determinar la influencia del tiempo de la destilación y del tamaño de partícula del material vegetal (picado y molido) se realizaron 16 destilaciones, ocho para cada tipo de tamizado; en cada destilación, se varió el tiempo de la extracción en un gradiente de 15 min, desde 45 min (tres ciclos de 15 min y descanso entre ciclos del horno microondas de 5 min) hasta 150 min (10 ciclos de 15 min e igual tiempo de descanso del horno).

Figura 13. Montaje MWHD con tratamiento enzimático. **A.** Calentamiento de la solución buffer; **B.** Incubación de Celluclast® en el material vegetal; **C.** Obtención del AE; **D.** Separación del AE e hidrolato en la trampa Dean-Stark y **E.** Secado del AE.

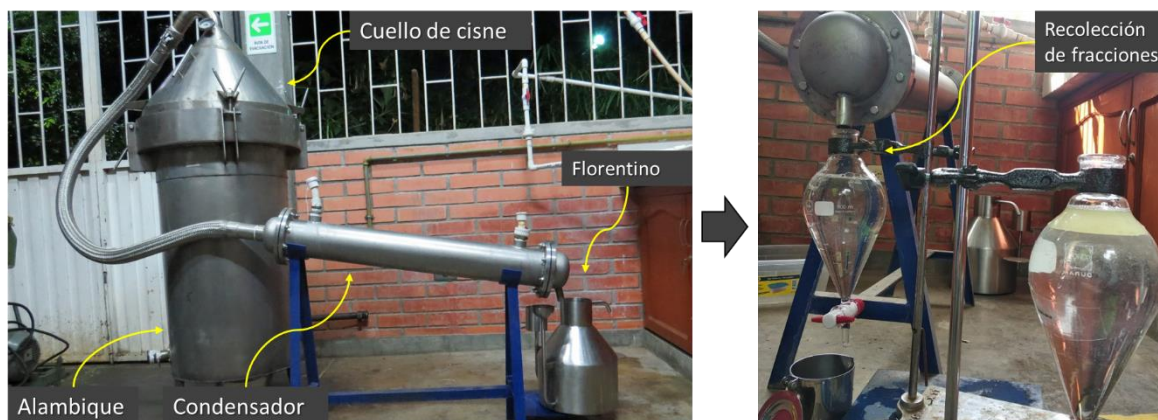


Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, el 1 de noviembre de 2018.

2.3.2 Obtención de los aceites esenciales por arrastre con vapor

El material vegetal (partes aéreas, hojas y tallos) cosechado de la parcela de cultivo mixto con papaya, se destiló por AV, empleando un sistema conformado por un alambique de acero inoxidable de 0,1 m³, un intercambiador de calor y su vaso separador Florentino (**Figura 14**). Se utilizó una caldera como generador de vapor (Tecnik, Bogotá, Colombia) de 4,41 kW. La caldera operó a una presión de vapor de 4,86 bar, la densidad de carga en el alambique fue de 200 kg/m³ y el flujo de condensados de 130 mL/min.

Figura 14. Destilador de acero inoxidable ($0,1\text{ m}^3$) y sistema de recolección de fracciones de AE en el tiempo.



Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, el 20 de febrero de 2019.

El rendimiento y la calidad del AE de pachulí obtenido por AV se evaluaron en función del estado del material vegetal, fresco o seco, el tiempo total de la destilación y el fraccionamiento en el tiempo. Los AE obtenidos se secaron con Na_2SO_4 anhidro, se pesaron en la balanza analítica y se calculó el rendimiento de su extracción, según la **Ecuación 1**.

Para el material vegetal fresco (10 kg), se realizaron dos destilaciones, por tres y diez horas. En ambos casos, el material vegetal se picó para garantizar el área de transferencia de masa y energía, entre el vapor de agua y el material vegetal. Para el material vegetal seco (10 kg), previamente picado, se realizaron dos destilaciones, con un tiempo de duración de tres horas. En la primera destilación, se recolectó el AE acumulado de las tres horas; en la segunda destilación, se recolectaron fracciones cada 30 min, en embudos de decantación.

2.3.3 Obtención de los extractos por dispersión de la matriz en fase sólida

La obtención de los extractos por MSPD se desarrolló con base en los trabajos previos de la técnica de extracción (Barker, 2007) y sus avances hacia el estudio de los polifenoles (Xiao *et al.*, 2004; Žiaková *et al.*, 2003), con algunas modificaciones.

Para determinar las mejores condiciones de la extracción, se realizó un diseño experimental factorial. Las variables independientes fueron la naturaleza del soporte sólido [gel de sílice (GS) y sílice modificada $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ (GSM- C_{18})] y la concentración del eluyente (50% etanol: 50% agua; 75% etanol: 25% agua; 100% etanol); el peso de la muestra (0,5 g), la relación muestra - soporte sólido (1:4) y el volumen de elución (10 mL) se mantuvieron constantes. En la **Tabla 8**, se muestra el número de experimentos y las condiciones de cada uno.

Tabla 8.

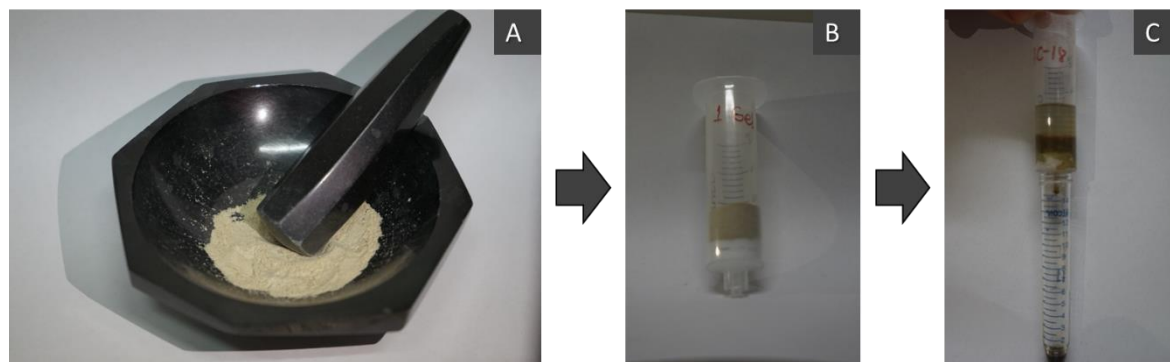
Diseño experimental factorial para MSPD, con triplicado en los puntos bajos y altos.

N° de experimento	Soporte sólido	Concentración del eluyente etanol, %
1	GS	50
2	GS	50
3	GS	50
4	GS	75
5	GS	100
6	GS	100
7	GS	100
8	GSM- C_{18}	50
9	GSM- C_{18}	50
10	GSM- C_{18}	50
11	GSM- C_{18}	75
12	GSM- C_{18}	100
13	GSM- C_{18}	100
14	GSM- C_{18}	100

El material vegetal (0,5 g), previamente seco y molido, proveniente del monocultivo, se mezcló con el soporte sólido (1,5 g) y el dispersante *iso*-propanol (2 mL); posteriormente, la mezcla se homogeneizó por 30 min y se transfirió a un cartucho tipo jeringa de 20 mL que contenía en el fondo una trampa de algodón y soporte sólido (0,5 g), se compactó y se eluyó con el solvente (10 mL). El extracto se concentró con corriente de nitrógeno y se llevó a sequedad completa en el liofilizador (**Figura 15**).

Figura 15.

Extracción MSPD. A. Homogeneizado de la mezcla del material vegetal y el soporte sólido; B. Homogeneizado transferido al cartucho prefabricado y C. Elución con el solvente y recolección del extracto.



Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, el 28 de noviembre de 2019.

2.3.4 Obtención de los extractos por extracción con solventes asistida por ultrasonido

Para determinar las mejores condiciones de la UAE se desarrolló un diseño experimental factorial. Las variables independientes fueron el tiempo de extracción (15 y 30 min) y la concentración del solvente (50% etanol: 50% agua; 75% etanol: 25% agua; 100% etanol); el peso

de la muestra (1,5 g), el volumen del solvente (30 mL) y la temperatura (30 °C) se mantuvieron constantes. En la **Tabla 9** se muestra el número de experimentos y las condiciones de cada uno.

El material vegetal seco y molido (1,5 g), proveniente del monocultivo, se sometió a extracción con una mezcla hidroalcohólica (agua: etanol, 30 mL) en un baño de ultrasonido. Luego, la solución se filtró, se concentró en el rotoevaporador y el extracto concentrado se llevó a sequedad en el liofilizador (**Figura 16**).

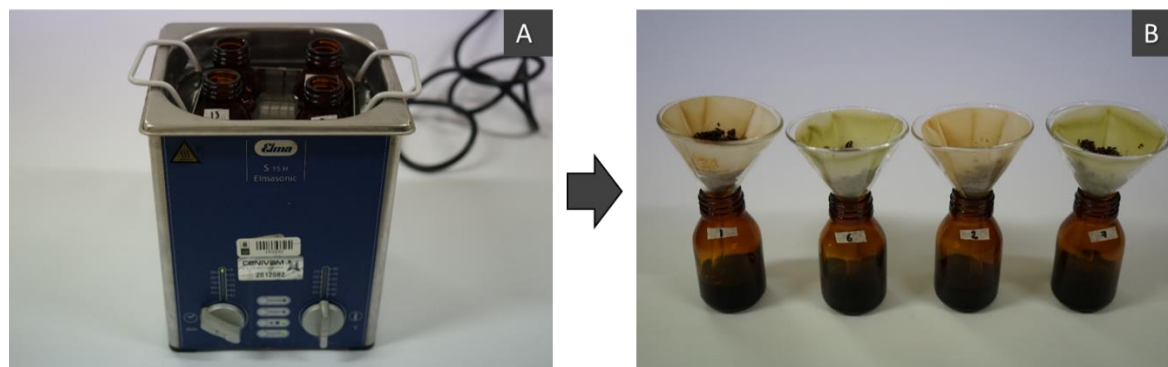
Tabla 9.

Diseño experimental factorial para UAE, con triplicado en los puntos bajos y altos.

N° de experimento	Tiempo de extracción, min	Concentración de etanol, %
1	15	50
2	15	50
3	15	50
4	15	75
5	15	100
6	15	100
7	15	100
8	30	50
9	30	50
10	30	50
11	30	75
12	30	100
13	30	100
14	30	100

Figura 16.

Extracción UAE. A. Baño de ultrasonido y B. Filtración de los extractos.



Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, 17 de octubre de 2019.

2.4 Análisis instrumental

2.4.1 Caracterización química de los aceites esenciales

Los aceites esenciales se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), en los equipos GC-MS AT 6890 Series Plus (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.) con detector selectivo de masas (AT, MSD 5973) y GC-MS AT 7890A (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.) con detector selectivo de masas (AT, MSD 5975C), operados en modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*), columnas capilares DB-5MS [5%-fenil-poli(metilsiloxano), 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m] y DB-WAX [poli(etilenglicol), 60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m], respectivamente, se usó la ionización por impacto con electrones (*EI*, 70 eV), modo de inyección fue *split* (1:30), temperatura del inyector: 250 °C, volumen de inyección: 1 μ L. La información espectral de masas, junto con los índices de retención lineales obtenidos en las columnas con dos fases estacionarias, polar y apolar, se utilizaron para hacer una identificación tentativa basada en la comparación con los datos disponibles en la literatura

científica (Babushok *et al.*, 2011) y en las bases de datos espectrales (NIST, Adams, Wiley). Los datos obtenidos se analizaron con el *software MSDChemStation* de ATG1701DA.

El análisis se complementó con el uso de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (GCxGC/HRTOF-MS) en un equipo *AT 7890B GC-System* (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.) con detector de masas de alta resolución de tiempo de vuelo con varios reflectrones *LECO Pegasus® GC-HRT 4D* (Saint Joseph, Michigan, EE.UU.), operado en modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) y resolución 40000. Para el sistema GCxGC/HRTOF-MS, las columnas capilares fueron: 1D, Rxi-5MS [5%-fenil-poli(metilsiloxano), 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm] y 2D, Rxi-17Sil MS [50%-fenil-poli(metilsiloxano), 2 m x 0,25 mm x 0,25 µm], tiempo de modulación 5 s, se usó ionización por impacto con electrones (*EI*, 70 eV), modo de inyección fue *split* (1:30) y la temperatura del inyector: 250 °C, volumen de inyección: 1 µL. La información espectral de alta resolución se usó para confirmar la identidad de las sustancias por medio de la comparación con las bases de datos espectrales (NIST), el establecimiento de la fórmula elemental de las sustancias y de sus iones-fragmento, la medición de las masas exactas, relación isotópica. Los datos obtenidos fueron analizados usando el *software ChromaTOF*, versión 1.9 de *LECO*.

La cuantificación de los componentes químicos en el aceite esencial se realizó por cromatografía de gases con detector de ionización en llama (FID) en un equipo *AT 6890N* (Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE.UU.). Columna capilar DB-WAX [poli (etilenglicol), 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm], modo de inyección fue *split* (1:30), temperatura del inyector: 250 °C, volumen de inyección: 1 µL. Temperatura del FID se mantuvo a 280 °C. Se usó un patrón de *n*-tetradecano para la cuantificación por estandarización interna de los sesquiterpenoides, suponiendo que el factor de respuesta relativo del estándar y de los componentes del AE fueron iguales.

2.4.2 Caracterización química de los extractos

Los extractos se analizaron por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap). Se empleó un cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiencia (UHPLC) *DionexTM UltimateTM 3000* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), equipado con un degasificador (SRD-3400), una bomba binaria de gradiente (HPG3400RS), un inyector automático de muestras (WPS 300TRS) y una unidad termostada para la columna (TCC 3000). Columna *Hypersil GOLDTM aQ* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.; 100 x 2,1 mm, 1,9 μ m de tamaño de partícula), a 30 °C. La fase móvil fue ácido fórmico al 0,2% en agua (A) y ácido fórmico al 0,2% en metanol (B), flujo de la fase móvil fue 300 μ L min⁻¹ y el volumen de inyección: 1 μ L. El UHPLC se acopló a un espectrómetro de masas de alta resolución con un sistema de detección de corrientes de iones *Orbitrap* (*Exactive Plus*, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.), a través de una interfaz de electronebulización con calefacción (HESI-II), operada en modo de iones positivos, a 350 °C, voltaje de capilar +3500 V, temperatura del capilar 320 °C. El *Orbitrap* operó en modo de barrido completo (*Full MS Scan*) con resolución 70000. Los iones se enviaron para su fragmentación a la celda de colisiones HCD, a diferentes energías (10, 20, 30, 40 y 50 V). Los espectros de masas de obtuvieron en el rango de m/z 80 – 1000 u. La identificación de las sustancias se realizó con base en la corriente iónica extraída (EIC) de iones [M+H]⁺, el estudio de los patrones de fragmentación, la medición de las masas exactas y la relación isotópica de las moléculas protonadas [M+H]⁺ e iones-producto. Los datos obtenidos fueron analizados usando el *software* *Thermo Xcalibur v3.1* (Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, EE.UU.).

Los patrones de apigenina y naringenina se usaron para la cuantificación por estandarización externa. Para cada patrón, se prepararon dos curvas de calibración: nivel de concentraciones bajas y nivel de concentraciones altas (**Apéndice A**); las regresiones lineales de apigenina, se utilizaron

para cuantificar los flavonoides derivados estructuralmente de flavona y flavonol, mientras que las de naringenina, se utilizaron para los derivados estructurales de flavanona. La cuantificación se realizó suponiendo que el factor de respuesta es el mismo para los patrones usados y las sustancias para cada caso. En la **Figura 17** se muestran los equipos analíticos instrumentales usados.

Figura 17.

Equipos analíticos instrumentales usados en la presente investigación. A. GC-MS; B. GC-FID; C. GCxGC-HRTOF-MS y D. UHPLC-ESI-HRMS-Orbitrap.



Nota: Fotografías tomadas por el autor en el Centro Piloto CIBIMOL - CENIVAM, UIS - Bucaramanga, el 16 de julio de 2018.

3. Resultados

3.1 Pérdida de peso de las plantas de pachulí cosechadas

Para medir la pérdida de peso de las plantas de pachulí cosechadas, se tomaron 12 individuos del monocultivo y se agruparon en tres lotes. Cada lote picado, se pesó diariamente hasta encontrar un secado completo. El peso promedio de las plantas frescas en los tres lotes fue 770 ± 91 g ($n = 3$). El peso promedio aproximado de cada planta por lote fue el siguiente, lote 1: 177 g; lote 2: 188 g; y lote 3: 220 g. Para efectos de cálculos de producción se podría usar una base de cálculo de 200 g/planta.

Se obtuvo una curva de pérdida de humedad con base en los resultados obtenidos (**Figura 18**). En la **Tabla 10** se muestran los resultados de la pérdida de peso de las plantas de pachulí medidos diariamente después de la cosecha. Se determinó que una planta fresca contiene en promedio $80,8 \pm 0,2\%$ ($n = 3$) de humedad; a partir del décimo día, se consideró que las plantas estaban totalmente secas.

Figura 18.

*Curva de humedad de las plantas de *P. cablin* en función del secado postcosecha a la sombra.*

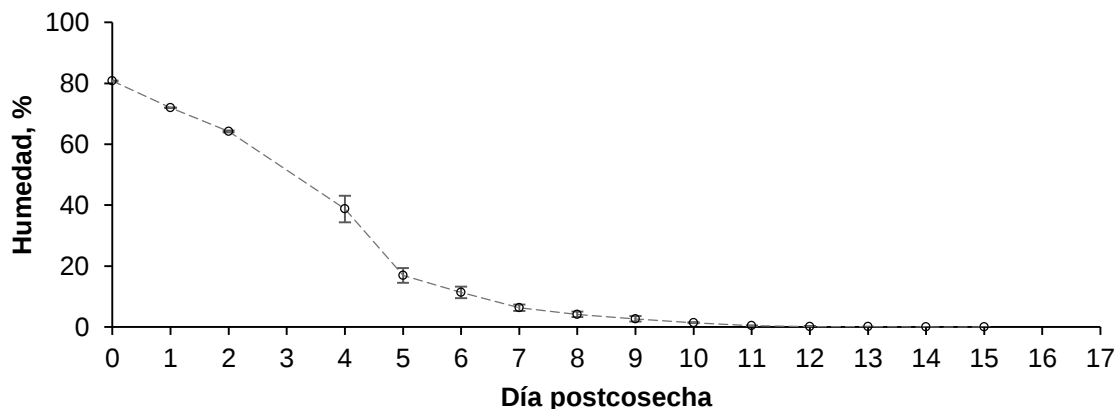


Tabla 10.

Resultados de la pérdida de peso de las plantas de pachulí cosechadas del monocultivo en función del secado postcosecha a la sombra.

Día postcosecha	Peso de material vegetal, g			
	Lote 1	Lote 2	Lote 3	$\sigma \pm s$ (n = 3)
0	710,1	734,8	878,6	770 $\pm$ 91
1	491,3	501,1	599,4	530 $\pm$ 60
2	384,0	391,7	472,4	420 $\pm$ 49
4	216,7	220,6	298,3	250 $\pm$ 46
5	162,0	168,1	208,8	180 $\pm$ 25
6	151,9	162,5	189,8	170 $\pm$ 20
7	145,2	152,2	179,2	160 $\pm$ 18
8	142,1	148,1	175,8	160 $\pm$ 18
9	140,0	145,5	173,4	150 $\pm$ 18
10	139,4	143,3	170,2	150 $\pm$ 17
11	138,1	141,7	168,6	150 $\pm$ 17
12	137,7	141,3	168,0	150 $\pm$ 17
13	137,7	141,2	167,8	150 $\pm$ 16
14	137,7	141,2	167,7	150 $\pm$ 16
15	137,7	141,2	167,7	150 $\pm$ 16

3.2 Rendimientos de los aceites esenciales de pachulí obtenidos por MWHD y AV

3.2.1. Aceites esenciales obtenidos por MWHD

Para evaluar el rendimiento del AE en función del tiempo de secado postcosecha, se realizaron destilaciones desde el día 0 hasta el día 30. Cada experimento se realizó por triplicado, a partir de toda la planta (partes aéreas, hojas y tallos). En la **Tabla 11**, se muestran los rendimientos de extracción obtenidos. El mayor rendimiento se obtuvo el día 15 de cosechadas las plantas de *P. cablin*. Se evidenció un descenso del rendimiento a partir del día 20.

Para determinar la influencia de las partes de la planta sobre el rendimiento del AE, se realizaron destilaciones por separado de hojas y tallos. Los experimentos se realizaron por triplicado. Se tomó el AE de toda planta obtenido en el día 15 (Véase **Tabla 11**) como factor de comparación. En la

Tabla 12, se muestran los rendimientos de extracción obtenidos. Las hojas de *P. cablin* dieron el mayor contenido de aceite esencial.

Tabla 11.

Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD, según el tiempo de secado postcosecha.

Día postcosecha	Rendimiento, % (p/p) ($\bar{X} \pm s$, n = 3)
0 (fresco)	0,2 $\pm$ 0,17
1	0,3 $\pm$ 0,20
2	0,4 $\pm$ 0,17
3	0,6 $\pm$ 0,22
4	0,7 $\pm$ 0,27
5	0,9 $\pm$ 0,35
8	1,2 $\pm$ 0,19
10	1,66 $\pm$ 0,09
15	1,9 $\pm$ 0,10
20	1,80 $\pm$ 0,02
25	1,66 $\pm$ 0,06
30	1,58 $\pm$ 0,07

Tabla 12.

Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD, según diferentes partes de la planta.

Parte de la planta	Rendimiento, % (p/p) ($\bar{X} \pm s$, n = 3)
Hojas	3,70 $\pm$ 0,02
Tallos	0,18 $\pm$ 0,02
Toda la planta (hojas y tallos)	1,90 $\pm$ 0,10

El tratamiento enzimático con *Celluclast*[®], se realizó sobre el material vegetal molido, almacenado durante 90 días. Las destilaciones de cada experimento se llevaron a cabo por triplicado. En la **Tabla 13** se muestran los rendimientos de extracción obtenidos para el tratamiento enzimático y los blancos. En comparación con la destilación convencional (blanco A), el contenido

de AE se incrementó en un 10% para el tratamiento con la enzima *Celluclast*[®] y con la hidrólisis ácida (blanco B).

Tabla 13.

Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD con un tratamiento enzimático (Celluclast[®]).

Experimento	Rendimiento, % (p/p) ($\bar{X} \pm s$, n = 3)
Blanco A	1,00 $\pm$ 0,03
Blanco B	1,10 $\pm$ 0,03
Enzima <i>Celluclast</i> [®]	1,10 $\pm$ 0,04

Se estudió el rendimiento del AE en función del tiempo de la destilación y del tamaño de partícula (molido y picado). El material vegetal estuvo almacenado durante 90 días. La destilación de cada experimento se realizó una sola vez. En la **Tabla 14**, se muestran los rendimientos de extracción obtenidos. Los resultados mostraron una tendencia lineal: con el material vegetal molido, se obtuvo más aceite esencial (**Figura 19**).

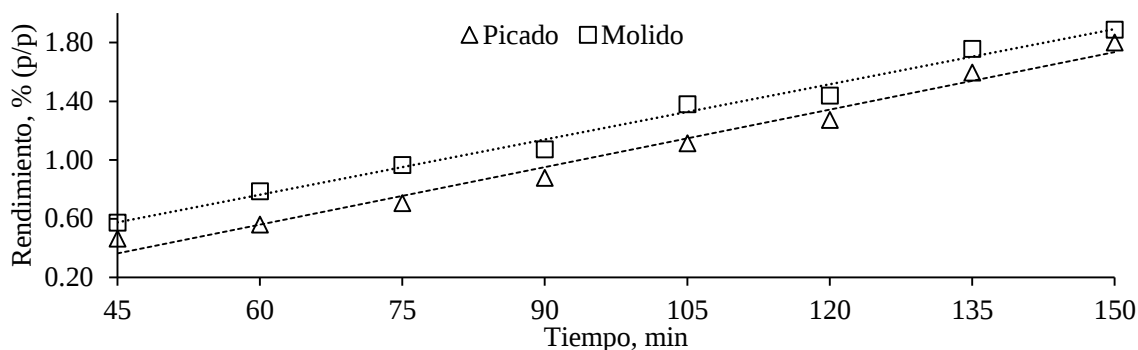
Tabla 14.

Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por MWHD, según el tiempo de destilación para dos tamaños de partícula diferentes.

Tiempo de la destilación, min	Rendimiento, % (p/p) (n = 1)	
	Tamaño de partícula	
	Picado, 2-5 cm	Molido, 2 mm
45	0,46	0,57
60	0,56	0,79
75	0,71	0,97
90	0,88	1,07
105	1,11	1,38
120	1,12	1,44
135	1,59	1,76
150	1,80	1,89

Figura 19.

Curva de rendimiento acumulativo de extracción del AE obtenido por MWHD, de dos tamaños de partícula diferentes de pachulí.



3.2.2. Aceites esenciales obtenidos por AV

El rendimiento del AE obtenido por AV se estudió en función del tiempo de la destilación (3 h y 10 h) a partir de material vegetal fresco del cultivo mixto. El material vegetal recién cosechado se picó y se sometió a destilación. La destilación de cada experimento se realizó una sola vez. En la **Tabla 15**, se muestran los rendimientos obtenidos.

Tabla 15.

Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por AV, según el tiempo de destilación.

Parte de la planta	Rendimiento, % (p/p) (n=1)	
	3 h	10 h
Toda la planta fresca	0,13	0,22

Para evaluar la cantidad de AE esencial obtenido en función del tiempo, se realizaron dos destilaciones (3 h) de material vegetal seco. En la primera destilación se recolectó el AE acumulado (blanco del experimento) y en la segunda, se tomaron las fracciones cada 30 min por separado. En

la **Tabla 16** se presentan los resultados obtenidos. En la primera hora de la destilación se recolectó el 68% del total de AE.

Tabla 16.

Resultados de los rendimientos de extracción del AE de pachulí obtenidos por AV en función de un fraccionamiento cada 30 min.

Fracción	Tiempo, min	Rendimiento, % (p/p) (n = 1)
1	0 - 30	0,65
2	30 - 60	0,31
3	60 - 90	0,17
4	90 - 120	0,13
5	120 - 150	0,09
6	150 - 180	0,06
Total		1,41
Blanco		1,50

3.2 Rendimientos de los extractos de pachulí obtenidos por MSPD y UAE

En la **Tabla 17** se presentan los valores de rendimientos obtenidos de los extractos por MSPD, según los experimentos planteados.

Tabla 17.

Resultados de los rendimientos obtenidos de las extracciones por MSPD.

N° de experimento	Soporte sólido	Concentración del eluyente etanol, %	Rendimiento, % (p/p)
1	GS	50	10,72
2	GS	50	10,38
3	GS	50	10,80
4	GS	75	8,18
5	GS	100	4,22
6	GS	100	4,26
7	GS	100	4,64
8	GSM-C ₁₈	50	8,78

Tabla 17. Continuación...			
9	GSM-C ₁₈	50	9,50
10	GSM-C ₁₈	50	9,40
11	GSM-C ₁₈	75	7,78
12	GSM-C ₁₈	100	4,42
13	GSM-C ₁₈	100	4,14
14	GSM-C ₁₈	100	3,88

De los resultados obtenidos se dedujo que el rendimiento fue más alto, cuando la concentración de etanol fue del 50% para ambos soportes sólidos. Sin embargo, se obtuvo mayor contenido de extracto con el soporte de gel de sílice.

En la **Tabla 18** se presentan los valores de rendimientos obtenidos de los extractos por UAE, según los experimentos planteados. De los resultados obtenidos se observó que el rendimiento fue mayor cuando la concentración de etanol fue del 50%, y la extracción duró 30 min.

Tabla 18.

Resultados de los rendimientos obtenidos de las extracciones por UAE.

N° de experimento	Tiempo de extracción, min	Concentración de etanol, %	Rendimiento, % (p/p)
1	15	50	5,69
2	15	50	6,19
3	15	50	5,81
4	15	75	3,98
5	15	100	1,45
6	15	100	1,44
7	15	100	1,23
8	30	50	6,55
9	30	50	6,81
10	30	50	6,90
11	30	75	4,71
12	30	100	2,11
13	30	100	1,91
14	30	100	1,62

3.3 Caracterización química y cuantificación de los sesquiterpenoides contenidos en los aceites esenciales de pachulí

La caracterización química de los AE de *P. cablin*, obtenidos por MWHD y AV, se realizó con base en los siguientes criterios de identificación: 1) la evidencia científica de los compuestos reportados en el AE de *P. cablin* (van Beek y Joulain, 2018); 2) la comparación de los datos espectrales experimentales (espectros de masas e índices de retención lineales obtenidos en fases estacionarias apolar y polar) con los datos disponibles en la literatura científica (Babushok *et al.*, 2011) y en las bases de datos (Adams, NIST, Wiley); y 3) el establecimiento de la fórmula elemental del ion molecular, iones-producto y la medición de las masas exactas de los componentes mayoritarios.

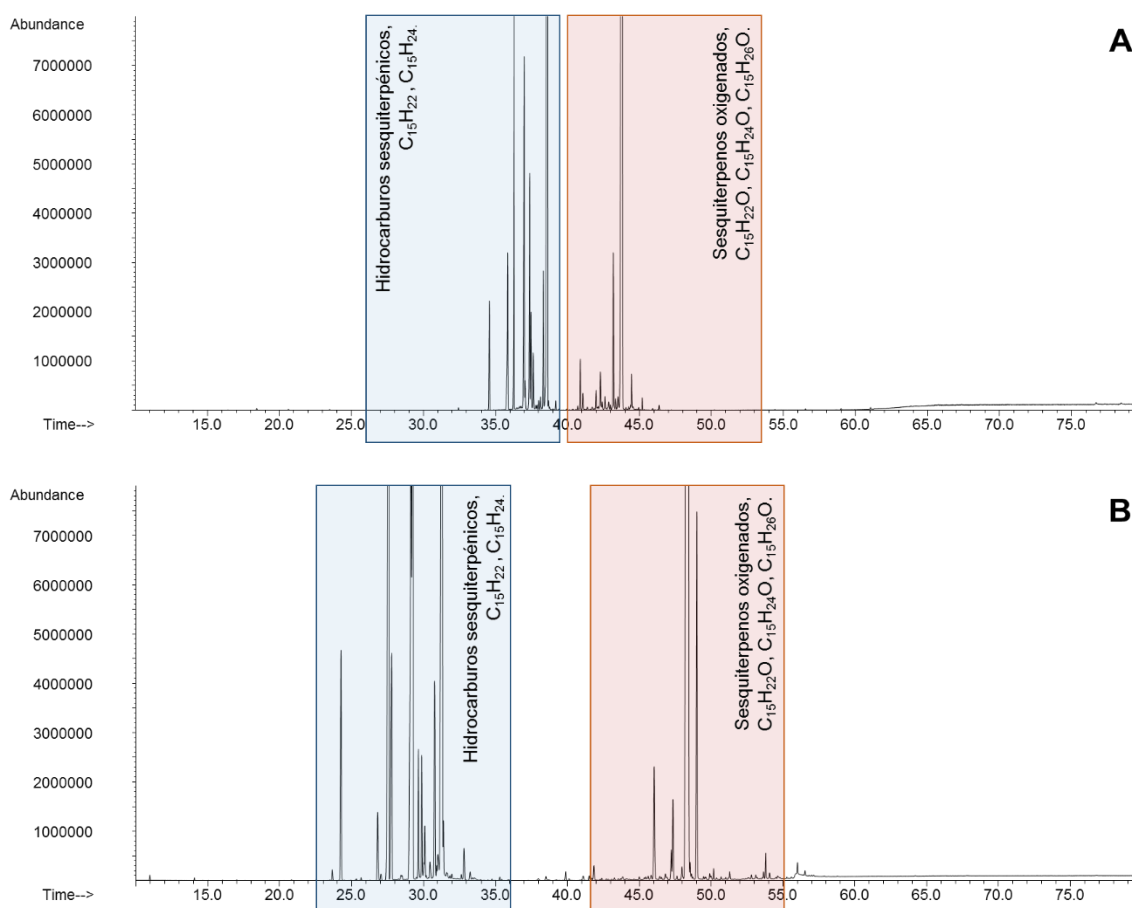
La identificación y la cuantificación de los componentes del AE de pachulí se basaron en los datos obtenidos de las corridas cromatográficas GC/FID y GC/MS en la columna de fase estacionaria polar. La columna polar se eligió, porque separa mejor los componentes del AE, debido a que los momentos dipolares de los sesquiterpenos son distintos (en una columna apolar, la separación de los componentes es menos favorable porque los sesquiterpenos tienen temperaturas de ebullición muy cercanos). La comparación entre las fases estacionarias apolar y polar, se realizó bajo las mismas condiciones cromatográficas, *i.e.*, modo de inyección de la muestra y su cantidad, longitud de la columna y programación del horno cromatográfico (**Figura 20**).

Los espectros de masas experimentales de alta resolución, obtenidos por GCxGC/HRTOF-MS, se compararon con los datos espectrales de la base de datos NIST-2017 para confirmar la identidad de algunos compuestos. Además, se establecieron las fórmulas elementales de los iones-producto característicos para los compuestos mayoritarios, midiendo sus masas exactas. En algunos casos,

no fue posible identificar la sustancia, porque no se encontraba en las bases de datos, entonces, simplemente se dejó su composición elemental.

Figura 20.

Comparación de las corrientes iónicas totales (TIC, cromatogramas GC/MS) del AE de pachulí obtenido por MWHF en las columnas capilares: **A.** DB-5MS, 60 m y **B.** DB-WAX, 60 m. Split 1:30. Impacto de electrones, 70 eV.

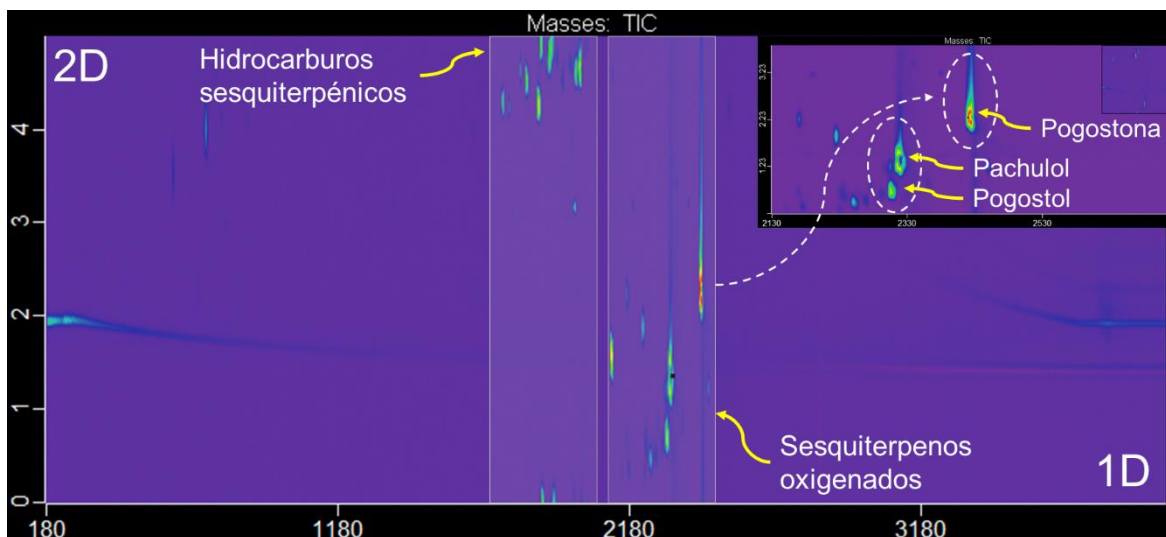


Nota: Se logra una mejor separación de los sesquiterpenoides del AE de *P. cablin* en la columna con fase estacionaria polar.

Se muestra, a manera de ejemplo, la identificación de pogostona en el AE de los tallos de *P. cablin* (**Figuras 21 y 22**). En la **Tabla 19** se presenta la medición de sus masas exactas del ion molecular y de los iones-producto; con base en sus fórmulas moleculares, se estableció el esquema de fragmentación (**Figuras 23**). El patrón de fragmentación consistió en rupturas simples de un radical metilo (F_1) y propilo (F_2), una reacción de transposición de McLafferty por migración de hidrógeno al oxígeno carbonílico (F_3) y finalmente, la formación de dos iones-producto complementarios F_4 y F_5 .

Figura 21.

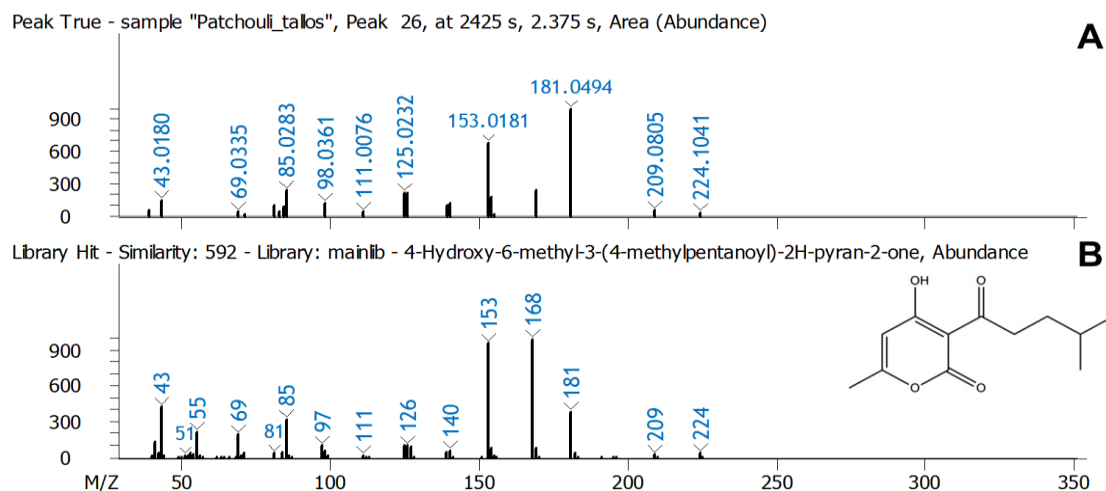
Perfil cromatográfico obtenido por GCxGC/HRTOF-MS del AE de los tallos de P. cablin.



Nota: Columnas 1D: Rxi-5MS, 30 m y 2D: Rxi-17Sil MS, 2m. *Split* 1:30. Impacto de electrones, EI, 70 eV. Analizador de masas de tiempo de vuelo con varios reflectrones (Resolución: 40000).

Figura 22.

A. Espectro de masas experimental obtenido por GCxGC/HRTOF-MS (resolución: 40000; EI, 70 eV) de pogostona; **B.** Espectro de masas de pogostona de la base de datos NIST-2017.

**Tabla 19.**

Composición elemental y medición de las masas exactas del ion molecular e iones-producto de la pogostona.

Fórmula	Masa experimental	Δ ppm
$C_{12}H_{16}O_4 (M^+)$	224,1041	0,94
$C_{11}H_{13}O_4$	209,0805	1,60
$C_9H_9O_4$	181,0494	0,75
$C_8H_8O_4$	168,0415	1,25
$C_7H_5O_4$	153,0181	0,88
$C_6H_6O_3$	126,0310	0,89
$C_6H_5O_3$	125,0232	0,96
$C_6H_{10}O$	98,0361	0,93

En la **Figura 24** se presenta un perfil cromatográfico típico del AE de *P. cablin*. En las **Tablas 20 - 29**, se reportan los compuestos identificados y su cuantificación expresada en cantidades relativas (área GC, %) y en miligramos (mg) de compuesto por gramo (g) de AE, para los

experimentos realizados por las técnicas de MWH y AV. Los compuestos, cuya área GC relativa fue menor del 0,2%, se consideraron trazas.

Figura 23.

Esquema de fragmentación de pogostona ($C_{12}H_{16}O_4$, m/z 224,1043) propuesto en el presente estudio con base en la medición de las masas exactas de los iones-fragmento obtenidos por GCxGC/HRTOF-MS.

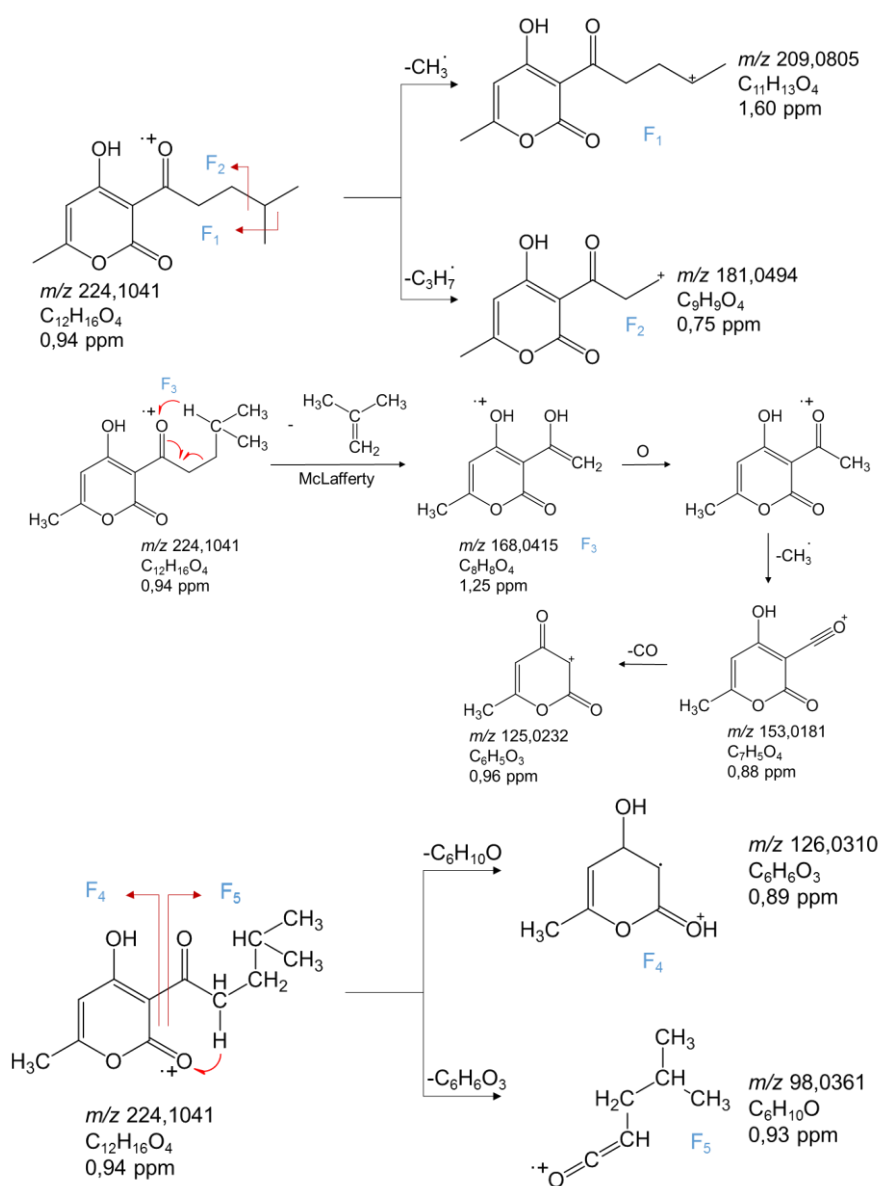
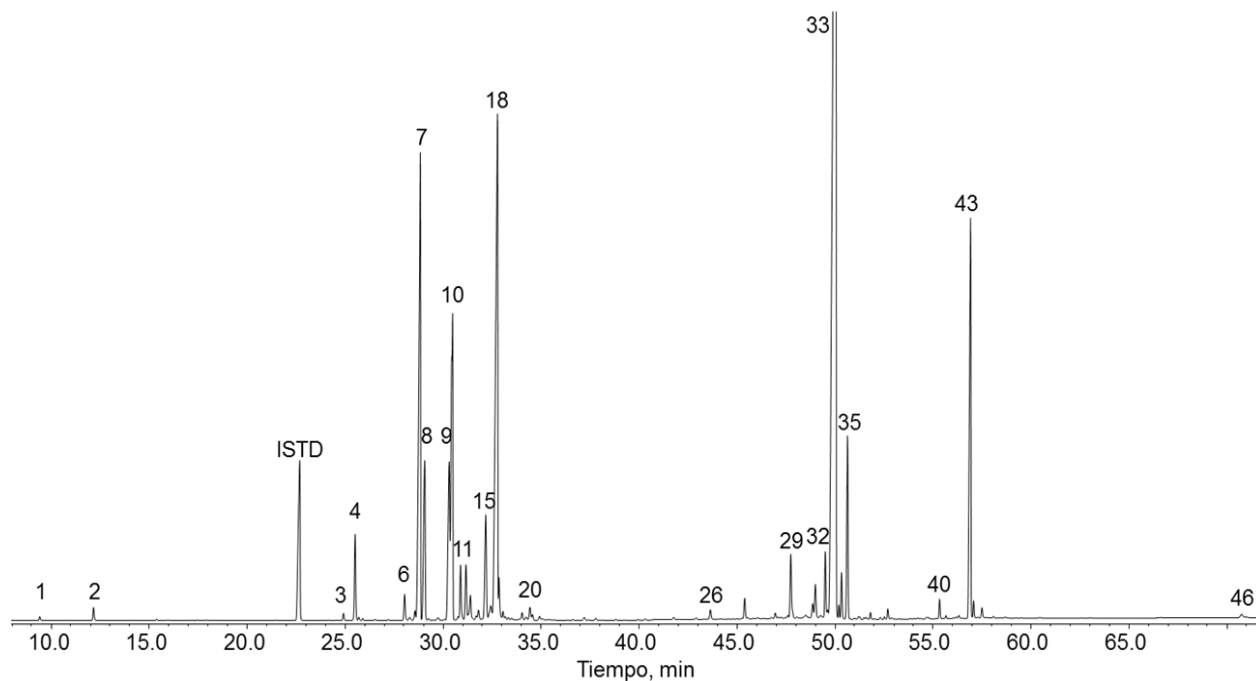


Figura 24.

Perfil cromatográfico típico, obtenido por GC/MS (full scan), del AE de *P. cablin* (toda la planta).

Columna DB-WAX (60 m), inyección split 1:30, MSD (EI, 70 eV).

**Tabla 20.**

Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) del aceite esencial de *P. cablin* (toda la planta, hojas y tallos), obtenido por MWHD.

Nº Fig. 24	Compuestos	Tipo	Índices de retención lineal				Cantidad relativa GC, % ($\bar{X} \pm s$, n = 3)
			DB-WAX		DB-5MS		
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	
2	β -Pinenoa, b, c	HM	1105	1110	980	978	tr
4	β -Pachulenoa, b, c	HS	1489	1478	1398	1379	1,09 $\pm$ 0,06
6	Cicloseichelena	HS	1571	-	-	1406	0,53 $\pm$ 0,01
7	α -Guaiena, b, c	HS	1596	1596	1448	1440	9,2 $\pm$ 0,2
8	<i>trans</i> - β -Cariofilena, b, c	HS	1603	1599	1434	1420	1,7 $\pm$ 0,2
9	α -Pachulena, b, c	HS	1645	1658	1480	1464	4,1 $\pm$ 0,3
10	Coelución de compuestos: γ -gurjunena, b + seichelena, b, c	HS	1650	1659	1470	1460	6,7 $\pm$ 0,2
11	γ -Pachulena, b, c	HS	1664	1664	1483	1474	0,93 $\pm$ 0,02
12	α -Humulena, b	HS	1674	1667	1469	1452	0,66 $\pm$ 0,02

Tabla 20. Continuación...

13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1681	-	1487	1464	0,29 $\pm$ 0,04
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1705	-	1506	1501	1,7 $\pm$ 0,1
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1712	1708	-	1481	0,24 $\pm$ 0,04
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1719	1730	1516	1509	11,4 $\pm$ 0,2
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1722	1717	1500	1486	0,27 $\pm$ 0,04
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1764	1764	1519	1517	<i>tr</i>
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1939	-	-	-	0,6 $\pm$ 0,21
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1988	1986	1596	1582	0,8 $\pm$ 0,22
29	Norpachuleno ^{a, c}	CO	2112	-	1591	-	1,2 $\pm$ 0,1
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2147	-	-	-	0,27 $\pm$ 0,01
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2154	-	-	-	0,70 $\pm$ 0,01
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2187	2188	1698	1660	50 $\pm$ 1,7
34	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2193	-	-	-	<i>tr</i>
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2210	2191	1679	1655	3,54 $\pm$ 0,01
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2274	-	-	1695	0,26 $\pm$ 0,07
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2396	-			0,27 $\pm$ 0,02
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2411	-	-	-	0,3 $\pm$ 0,14
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2472	2458	-	-	<i>tr</i>

Nota: HC: Hidrocarburo; HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. ND: No detectado; *tr*: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, *EI*, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX y DB-5MS (Adams, 2007; Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 21.

Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) del aceite esencial de *P. cablin* (toda la planta, hojas y tallos), obtenido por MWHD. Cantidades se expresan en equivalentes de *n*-tetradecano.

Nº Fig. 24	Compuestos	Tipo	Índices de retención lineal				mg de sustancia/ g AE ($\bar{X} \pm s$, n = 3)
			DB-WAX		DB-5MS		
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	
2	β -Pineno ^{a, b, c}	HM	1105	1110	980	978	0,7 $\pm$ 0,1
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1489	1478	1398	1379	10,2 $\pm$ 0,5
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1571	-	-	1406	4,9 $\pm$ 0,2
7	α -Guaieno ^{a, b, c}	HS	1596	1596	1448	1440	90 $\pm$ 2
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1603	1599	1434	1420	20 $\pm$ 1
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1645	1658	1480	1464	40 $\pm$ 3
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1650	1659	1470	1460	60 $\pm$ 1
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1664	1664	1483	1474	8,7 $\pm$ 0,3

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	Índices de retención lineal				mg de sustancia/ g AE ($\bar{X} \pm s$, n = 3)
			DB-WAX		DB-5MS		
			Exp.	Lit.	Exp.	Lit.	
Tabla 21. Continuación...							
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1674	1667	1469	1452	6,2 $\pm$ 0,2
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1681	-	1487	1464	2,8 $\pm$ 0,4
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1705	-	1506	1501	15,5 $\pm$ 0,4
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1712	1708	-	1481	2,3 $\pm$ 0,4
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1719	1730	1516	1509	80 $\pm$ 3
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1722	1717	1500	1486	2,5 $\pm$ 0,3
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1764	1764	1519	1517	1,70 $\pm$ 0,08
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1939	-	-	-	5 $\pm$ 2
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1988	1986	1596	1582	7 $\pm$ 2
29	Norpachulenol ^{a, c}	CO	2112	-	1591	-	11,3 $\pm$ 0,6
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2147	-	-	-	2,54 $\pm$ 0,04
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2154	-	-	-	6,55 $\pm$ 0,05
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2187	2188	1698	1660	470 $\pm$ 13
34	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2193	-	-	-	1,6 $\pm$ 0,2
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2210	2191	1679	1655	33,1 $\pm$ 0,3
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2274	-	-	1695	2,5 $\pm$ 0,6
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2396	-	-	-	2,5 $\pm$ 0,2
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2411	-	-	-	3 $\pm$ 1,3
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2472	2458	-	-	1,7 $\pm$ 0,6

Nota: HC: Hidrocarburo; HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. ND: No detectado; tr: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX y DB-5MS (Adams, 2007; Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 22.

Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) de los aceites esenciales de P. cablin, obtenidos por MWDH, según las partes de la planta: hojas y tallos.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		Cantidad relativa GC, % ($\bar{X} \pm s$, n = 3)	
			Exp.	Lit.	Hojas	Tallos
2	β -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1105	1110	tr	0,62 $\pm$ 0,02
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1488	1478	1,6 $\pm$ 0,10	0,29 $\pm$ 0,06

Nº Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		Cantidad relativa GC, % ($\bar{X} \pm s$, n = 3)	
			Exp.	Lit.	Hojas	Tallos
Tabla 22. Continuación...						
5	Pentadecano ^{a,b}	HC	1499	1500	ND	0,29 ± 0,06
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1570	-	0,61 ± 0,03	0,22 ± 0,04
7	α -Guaieno ^{a, b, c}	HS	1593	1596	12,6 ± 0,5	2,30 ± 0,05
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1601	1599	2,52 ± 0,07	0,5 ± 0,12
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1642	1658	5,1 ± 0,2	1,5 ± 0,3
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1648	1659	7,9 ± 0,3	2,9 ± 0,5
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1662	1664	1,08 ± 0,03	0,40 ± 0,07
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1671	1667	0,88 ± 0,02	0,16 ± 0,04
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1680	-	0,46 ± 0,01	ND
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1702	-	2,3 ± 0,1	0,4 ± 0,10
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1709	1708	0,35 ± 0,01	<i>tr</i>
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1716	1730	14,8 ± 0,3	2,8 ± 0,7
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1719	1717	0,28 ± 0,02	0,21 ± 0,03
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1762	1764	0,23 ± 0,01	<i>tr</i>
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1938	-	0,30 ± 0,02	0,9 ± 0,11
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1986	1986	0,45 ± 0,03	0,8 ± 0,14
29	Norpachuleno ^{a, c}	CO	2110	-	0,91 ± 0,01	0,5 ± 0,19
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2147	-	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2152	-	0,58 ± 0,02	0,64 ± 0,02
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2187	2188	42 ± 1,3	38,2 ± 0,6
34	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	2192	-	<i>tr</i>	0,83 ± 0,05
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2208	2191	2,8 ± 0,1	3,4 ± 0,1
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2272	-	<i>tr</i>	0,27 ± 0,06
38	C ₁₁ H ₁₄ O ₄ ^c	CO	2286	-	ND	1,11 ± 0,07
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2394	-	<i>tr</i>	0,30 ± 0,01
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2408	-	<i>tr</i>	0,35 ± 0,09
42	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2437	-	ND	0,23 ± 0,01
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2470	2458	ND	31 ± 2,4
44	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2490	-	ND	0,40 ± 0,03
46	Ácido Hexadecanoico ^{a, b}	CO	2879	2886	ND	0,93 ± 0,04

Nota: HC: Hidrocarburo; HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. ND: No detectado; *tr*: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, *EI*, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 23.

Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) de los aceites esenciales de P. cablin, obtenidos por MWHD, según las partes de la planta: hojas y tallos. Cantidades se expresan en equivalentes de n-tetradecano.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		mg de sustancia/ g AE ($\bar{X} \pm s$, n = 3)	
			Exp.	Lit.	Hojas	Tallos
2	β -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1105	1110	0,27 $\pm$ 0,01	5,0 $\pm$ 0,3
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1488	1478	15,1 $\pm$ 0,5	2,3 $\pm$ 0,5
5	Pentadecano ^{a, b}	HC	1499	1500	ND	2,3 $\pm$ 0,5
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1570	-	5,9 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,4
7	α -Guaíeno ^{a, b, c}	HS	1593	1596	120 $\pm$ 2	20 $\pm$ 5
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1601	1599	24,2 $\pm$ 0,4	4 $\pm$ 1,1
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1642	1658	50 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1648	1659	75,4 $\pm$ 0,7	20 $\pm$ 4
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1662	1664	10,4 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,6
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1671	1667	8,4 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,3
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1680	-	4,4 $\pm$ 0,1	ND
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1702	-	22,3 $\pm$ 0,3	3,3 $\pm$ 0,9
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1709	1708	3,4 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,1
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1716	1730	140 $\pm$ 2	20 $\pm$ 6
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1719	1717	2,7 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,3
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1762	1764	2,2 $\pm$ 0,1	0,36 $\pm$ 0,08
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1938	-	2,9 $\pm$ 0,1	7,2 $\pm$ 0,8
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1986	1986	4,3 $\pm$ 0,2	7 $\pm$ 1,1
29	Norpachuleno ^{a, c}	CO	2110	-	8,7 $\pm$ 0,4	40 $\pm$ 2
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2147	-	2,3 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,1
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2152	-	5,6 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 0,3
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2187	2188	410 $\pm$ 27	310 $\pm$ 16
34	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2192	-	1,1 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,5
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2208	2191	30 $\pm$ 2	30 $\pm$ 2
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2272	-	1,3 $\pm$ 0,04	2,2 $\pm$ 0,4
38	C ₁₁ H ₁₄ O ₄ ^c	CO	2286	-	ND	9,0 $\pm$ 0,4
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2394	-	1,7 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2408	-	1,00 $\pm$ 0,06	2,8 $\pm$ 0,7
42	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2437	-	ND	1,88 $\pm$ 0,03
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2470	2458	ND	250 $\pm$ 19
44	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2490	-	ND	3,2 $\pm$ 0,1
46	Ácido Hexadecanoico ^{a, b}	CO	2879	2886	ND	7,5 $\pm$ 0,2

Nota: HC: Hidrocarburo; HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpeno. ND: No detectado; tr: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 24.

Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) de los aceites esenciales de P. cablin, obtenidos por MWH, usando un tratamiento enzimático con Celluclast®

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		Cantidad relativa GC, % ($\bar{X} \pm s$, n = 2)		
			Exp.	Lit.	Blanco A	Blanco B	Celluclast®
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1485	1478	1,3 $\pm$ 0,1	4,39 $\pm$ 0,05	3,4 $\pm$ 0,1
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1565	-	0,70 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,03
7	α -Guaieno ^{a, b, c}	HS	1592	1596	9,2 $\pm$ 0,8	10,9 $\pm$ 0,4	11 $\pm$ 1,0
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1599	1599	2,1 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,3
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1641	1658	4,6 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,3	4,9 $\pm$ 0,3
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1648	1659	7,77 $\pm$ 0,03	7,89 $\pm$ 0,03	7,85 $\pm$ 0,03
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1659	1664	1,13 $\pm$ 0,01	1,12 $\pm$ 0,09	1,11 $\pm$ 0,07
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1668	1674	0,81 $\pm$ 0,06	0,98 $\pm$ 0,04	0,93 $\pm$ 0,08
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1675	-	0,36 $\pm$ 0,03	0,53 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,05
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1700	-	1,8 $\pm$ 0,3	2,4 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,3
16	C ₁₅ H ₂₂	HS	1704	-	<i>tr</i>	0,26 $\pm$ 0,01	0,26 $\pm$ 0,02
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1707	1708	0,28 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,01	0,37 $\pm$ 0,04
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1715	1730	11 $\pm$ 1,1	12,9 $\pm$ 0,4	13 $\pm$ 1,0
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1717	1717	0,28 $\pm$ 0,02	<i>tr</i>	<i>tr</i>
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1758	1764	0,25 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,01	0,29 $\pm$ 0,02
21	Nootkateno ^{a, b}	HS	1772	1815	<i>tr</i>	0,28 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,03
22	C ₁₅ H ₂₂	HS	1782	-	0,27 $\pm$ 0,06	<i>tr</i>	<i>tr</i>
23	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1887	-	0,29 $\pm$ 0,07	<i>tr</i>	<i>tr</i>
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1933	-	2,0 $\pm$ 0,5	0,56 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,27
25	C ₁₅ H ₂₂ O	SO	1973	-	0,33 $\pm$ 0,08	<i>tr</i>	<i>tr</i>
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1982	1986	1,6 $\pm$ 0,3	0,76 $\pm$ 0,06	0,73 $\pm$ 0,30
27	Epóxido de humuleno II ^{a, b}	SO	2036	2047	0,26 $\pm$ 0,05	<i>tr</i>	<i>tr</i>
29	Norpachulenol ^{a, c}	CO	2103	-	1,57 $\pm$ 0,04	1,57 $\pm$ 0,01	1,55 $\pm$ 0,05
29	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	2107	-	0,43 $\pm$ 0,06	0,44 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,06
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2143	-	0,38 $\pm$ 0,04	0,37 $\pm$ 0,01	0,36 $\pm$ 0,02
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2148	-	0,95 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,04
-	Timol (contaminación) ^{a, b}	MO	2166	2164	0,21 $\pm$ 0,09	<i>tr</i>	<i>tr</i>
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2182	2188	38,9 $\pm$ 0,4	34 $\pm$ 1,1	34 $\pm$ 1,6
34	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2186	-	0,27 $\pm$ 0,02	0,31 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01
-	Carvacrol (Contaminación) ^{a, b}	MO	2193	2211	0,8 $\pm$ 0,4	<i>tr</i>	<i>tr</i>
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2202	2191	4,40 $\pm$ 0,04	3,62 $\pm$ 0,03	3,6 $\pm$ 0,25
36	Selin-11-en-4 α -ol ^{a, b}	SO	2247	2252	0,33 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,01	0,34 $\pm$ 0,04
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2266	-	0,6 $\pm$ 0,2	0,25 $\pm$ 0,03	0,20 $\pm$ 0,11

Tabla 24. Continuación...							
38	C ₁₁ H ₁₄ O ₄ ^c	CO	2280	-	tr	0,23 ± 0,01	0,22 ± 0,03
-	Dietilftalato (Plastificante) ^{a, b}	CO	2354	2319	0,29 ± 0,02	tr	tr
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2388	-	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2401		0,20 ± 0,04	tr	tr
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2454	2458	tr	3,47 ± 0,02	3,3 ± 0,4

Nota: MO: Monoterpeno oxigenado; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado;
CO: Compuesto oxigenado no terpénico. tr: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 25.

Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) de los aceites esenciales de P. cablin, obtenidos por MWDH, usando un tratamiento enzimático con Celluclast®. Cantidades se expresan en equivalentes de n-tetradecano.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		mg de sustancia/ g AE ($\bar{X} \pm s$, n = 2)		
			Exp.	Lit.	Blanco A	Blanco B	Celluclast®
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1485	1478	14 ± 1	37 ± 1	35 ± 2
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1565	-	7,28 ± 0,05	7,1 ± 0,1	7,0 ± 0,4
7	α -Guaieno ^{a, b, c}	HS	1592	1596	100 ± 10	115 ± 1	110 ± 14
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1599	1599	21 ± 3	28,3 ± 0,1	28 ± 4
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1641	1658	48 ± 3	52,3 ± 0,7	51 ± 4
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1648	1659	81 ± 1	84 ± 4	82 ± 2
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1659	1664	11,8 ± 0, 1	11,9 ± 0,4	12 ± 1
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1668	1674	8,5 ± 0,8	10,4 ± 0,1	10 ± 1
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1675	-	3,8 ± 0, 3	5,62 ± 0,01	5,6 ± 0,6
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1700	-	19 ± 3	25,6 ± 0,2	25 ± 4
16	C ₁₅ H ₂₂	HS	1704	-	1,2 ± 0,2	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1707	1708	3,0 ± 0,3	3,8 ± 0,1	3,8 ± 0,5
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1715	1730	110 ± 14	136 ± 3	130 ± 14
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1717	1717	2,9 ± 0, 2	0,90 ± 0,01	0,90 ± 0,01
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1758	1764	2,6 ± 0,2	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3
21	Nootkateno ^{a, b}	HS	1772	1815	1,7 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,2
22	C ₁₅ H ₂₂	HS	1782	-	2,8 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,35 ± 0,65

Tabla 25. Continuación...							
23	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	1887	-	3,0 ± 0,7	1,5 ± 0,2	1,39 ± 0,51
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1933	-	20 ± 4	5,9 ± 0,7	6,0 ± 2,7
25	C ₁₅ H ₂₂ O	SO	1973	-	3,5 ± 0,7	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,15
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1982	1986	17 ± 3	8,0 ± 1,0	8,0 ± 2,9
27	Epóxido de humuleno II ^{a, b}	SO	2036	2047	2,7 ± 0,5	1,5 ± 0,2	1,4 ± 0,4
29	Norpachulenol ^{a, c}	CO	2103	-	16,3 ± 0,1	16,7 ± 0,9	16,1 ± 0,1
29	C ₁₅ H ₂₄ O	SO	2107		4,5 ± 0,6	4,6 ± 0,3	4,5 ± 0,5
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2143		3,9 ± 0,3	3,9 ± 0,2	3,8 ± 0,1
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2148		9,9 ± 0,2	9,3 ± 0,5	8,9 ± 0,2
-	Timol (contaminación) ^{a, b}	MO	2166	2164	2,0 ± 1,0	0,7 ± 0,1	2,0 ± 1,3
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2182	2188	404 ± 5	360 ± 29	348 ± 7
34	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2186	-	2,8 ± 0,1	3,3 ± 0,2	3,19 ± 0,04
-	Carvacrol (Contaminación) ^{a, b}	MO	2193	2211	8,0 ± 4,5	2,0 ± 0,2	6,0 ± 4,8
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2202	2191	45,8 ± 0,6	38 ± 2	37 ± 2
36	Selin-11-en-4 α -ol ^{a, b}	SO	2247	2252	3,47 ± 0,03	3,7 ± 0,2	3,5 ± 0,3
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2266	-	6,0 ± 1,5	2,6 ± 0,5	2,0 ± 1,3
38	C ₁₁ H ₁₄ O ^c	CO	2280	-	0,22 ± 0,09	2,4 ± 0,1	2,3 ± 0,2
-	Diethylftalato (Plastificante) ^{a, b}	CO	2354	2319	3,0 ± 0,3	1,4 ± 0,4	2,0 ± 1,1
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2388	-	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,64 ± 0,03
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2401		2,1 ± 0,3	1,45 ± 0,06	1,40 ± 0,45
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2454	2458	0,65 ± 0,08	37 ± 2	35 ± 3

Nota: MO: Monoterpeno oxigenado; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. *tr*: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, *EI*, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 26.

Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) del aceite esencial de *P. cablin* (material vegetal fresco), obtenido por AV, en función del tiempo de la destilación.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		Cantidad relativa GC, %	
			Exp.	Lit.	Tiempo de la destilación	
					3 h	10 h
1	α -Pineno ^{a, b, c}	HM	1019	1025	<i>tr</i>	<i>tr</i>
2	β -Pineno ^{a, b, c}	HM	1105	1110	0,2	0,2
3	δ -Elemeno ^{a, b, c}	HS	1471	1469	<i>tr</i>	<i>tr</i>
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1489	1478	0,9	1,4

Tabla 26. Continuación...						
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1571	-	0,3	0,4
7	α -Guaieno ^{a, b, c}	HS	1597	1596	7,5	10,4
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1604	1599	2,3	3,4
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1645	1658	2,9	3,7
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1651	1659	5,3	6,6
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1664	1664	0,7	0,9
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1672	1667	0,8	1,0
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1680	-	0,4	0,5
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1704	-	1,6	2,1
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1711	1708	0,3	0,4
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1720	1730	10,4	13,6
19	β -Selineno ^{a, b}	HS	1722	1717	0,3	0,6
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1763	1764	0,2	0,3
21	Nootkateno ^{a, b}	HS	1776	1815	<i>tr</i>	<i>tr</i>
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1938	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1987	1986	<i>tr</i>	0,2
27	Epóxido de humuleno II ^{a, b}	SO	2038	2047	<i>tr</i>	0,3
29	Norpachuleno ^{a, c}	CO	2110	-	1,4	1,1
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2150	-	0,4	0,3
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2155	-	0,9	0,6
32	<i>epi</i> - α -Cadinol ^{a, b}	SO	2170	2170	0,3	1,0
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2192	2188	53,7	37,4
34	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	2195	-	0,4	0,7
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2210	2191	3,9	2,8
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2272	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
38	C ₁₁ H ₁₄ O ₄ ^c	CO	2286	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2394	-	0,3	0,3
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2408	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2462	2458	3,0	7,3
44	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2489	-	0,2	0,2

Nota: HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado;

CO: Compuesto oxigenado no terpénico. *tr*: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, *EI*, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 27.

Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/ g AE) del aceite esencial de P. cablin (material vegetal fresco), obtenido por AV, en función del tiempo de la destilación. Cantidades se expresan en equivalentes de n-tetradecano.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		mg de sustancia/ g AE	
			Exp.	Lit.	Tiempo de la destilación	
					3 h	10 h
1	α -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1019	1025	0,6	0,6
2	β -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1105	1110	2,2	2,1
3	δ -Elemol ^{a, b, c}	HS	1471	1469	0,6	1,1
4	β -Pachulol ^{a, b, c}	HS	1489	1478	9,2	14,5
6	Cicloseichelol ^a	HS	1571	-	3,5	4,6
7	α -Guaiol ^{a, b, c}	HS	1597	1596	80,4	109,8
8	<i>trans</i> - β -Cariofilol ^{a, b, c}	HS	1604	1599	24,7	35,5
9	α -Pachulol ^{a, b, c}	HS	1645	1658	31,5	39,1
10	Coelución de compuestos: γ -gurjunol ^{a, b} + seichelol ^{a, b, c}	HS	1651	1659	57,0	70,1
11	γ -Pachulol ^{a, b, c}	HS	1664	1664	7,5	9,0
12	α -Humulol ^{a, b}	HS	1672	1667	8,2	10,2
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofilol ^a	HS	1680	-	4,5	5,5
15	Acifilol ^{a, c}	HS	1704	-	17,2	22,5
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1711	1708	3,1	3,8
18	α -Bulnesol ^{a, b, c}	HS	1720	1730	112,4	144,0
19	β -Selinol ^{a, b}	HS	1722	1717	3,1	5,9
20	7- <i>epi</i> - α -Selinol ^{a, b, c}	HS	1763	1764	2,0	2,7
21	Nootkatol ^{a, b}	HS	1776	1815	0,6	0,5
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1938	-	0,9	1,0
26	Óxido de cariofilol ^{a, b}	SO	1987	1986	1,6	2,0
27	Epóxido de humulol II ^{a, b}	SO	2038	2047	1,0	3,4
29	Norpachulol ^{a, c}	CO	2110	-	14,8	11,9
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2150	-	3,9	2,8
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2155	-	9,3	6,5
32	<i>epi</i> - α -Cadinol ^{a, b}	SO	2170	2170	2,9	10,3
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2192	2188	577,3	394,9
34	C ₁₅ H ₂₆ O	SO	2195	-	4,4	7,2
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2210	2191	42,2	29,5
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2272	-	0,8	0,4
38	C ₁₁ H ₁₄ O ^c	CO	2286	-	0,8	1,6
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2394	-	3,5	2,9
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2408	-	0,5	0,6
43	Pogostonol ^{a, b, c}	CO	2462	2458	31,7	76,9
44	C ₁₂ H ₁₆ O ^c	CO	2489	-	2,2	1,8

Tabla 27. Continuación...

Nota: HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. *tr*: Trazas (< 0,2%)

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, *EI*, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 28.

Identificación por GC/MS y cuantificación por GC/FID (cantidades relativas, %) del aceite esencial de P. cablin (material vegetal seco), obtenido por AV, fraccionado en el tiempo (30 min) de la destilación.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		Cantidad relativa GC, %						
			Exp.	Lit.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Blanco
1	α -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1019	1025	0,3	<i>tr</i>	ND	ND	ND	ND	<i>tr</i>
2	β -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1105	1110	0,7	0,2	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1489	1469	3,7	1,7	1,5	1,3	1,1	1,1	2,2
5	Pentadecano ^{a,b}	HC	1501	1500	0,2	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1571	-	1,2	0,6	0,5	0,3	0,3	0,3	0,7
7	α -Guaíeno ^{a, b, c}	HS	1597	1596	25,3	15,5	10,9	8,8	6,8	6,1	16,4
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1604	1599	1,0	1,5	1,8	1,3	1,2	1,2	1,4
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1645	1658	14,2	8,2	5,8	4,4	3,0	2,6	8,6
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1651	1659	5,1	5,0	4,8	3,9	3,7	3,6	5,1
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1664	1664	1,5	1,0	1,0	0,7	0,5	0,5	1,1
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1672	1667	1,3	1,0	0,9	0,6	0,5	0,5	1,0
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1680	-	0,8	0,5	0,5	0,4	0,3	0,3	0,4
14	δ -Selineno ^{a, b}	HS	1693	1707	0,2	0,2	<i>tr</i>	<i>tr</i>	ND	ND	0,2
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1704	-	2,3	2,9	3,1	2,2	1,8	1,6	3,0
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1711	1708	2,1	0,8	0,3	0,2	0,2	<i>tr</i>	0,2
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1720	1730	22,1	20,0	15,7	12,4	10,0	8,9	16,5
20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1763	1764	0,3	0,3	0,3	0,2	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,3
21	Nootkateno ^{a, b}	HS	1776	1815	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1937	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,2
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1986	1986	<i>tr</i>	0,2	0,3	0,2	0,2	<i>tr</i>	0,3
29	Norpachuleno ^{a, c}	CO	2109	-	0,7	1,2	1,7	1,5	1,4	1,3	0,8
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2147	-	<i>tr</i>	0,3	0,5	0,5	0,4	0,4	0,3
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2152	-	0,2	0,5	0,9	0,8	0,9	0,9	0,5
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2187	2188	15,3	33,5	41,2	49,4	51,7	54,0	36,5
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2208	2191	1,0	2,4	4,5	4,7	5,1	5,2	2,8
36	Selin-11-en-4 α -ol ^{a, b}	SO	2246	2252	ND	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,2	0,2	0,3	0,2

Tabla 28. Continuación...

37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2272	-	ND	ND	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
39	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	CO	2286	-	ND	ND	ND	0,2	0,2	0,2	0,2
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2393	-	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,3	0,4	0,5	0,6	0,2
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2408	-	ND	ND	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>	<i>tr</i>
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2459	2458	0,2	0,7	2,0	4,2	6,2	9,3	0,3
44	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2488	-	ND	ND	0,4	0,5	0,7	0,8	ND

HC: Hidrocarburo; HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. ND: No detectado; *tr*: Trazas (< 0,2%).

F1: Fracción 1, 0 - 30 min; F2: Fracción 2, 30 - 60 min; F3: Fracción 3, 60 - 90 min; F4: Fracción 4, 90 - 120 min; F5: Fracción 5, 120 - 150 min; F6: Fracción 6, 150 - 180 min; Blanco: destilación de 3 h.

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, *EI*, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

Tabla 29.

Cuantificación por GC/FID (mg sustancia/g AE) del aceite esencial de P. cablin (material vegetal seco), obtenido por AV, fraccionado en el tiempo (30 min) de la destilación. Cantidades se expresan en equivalentes de n-tetradecano.

N° Fig. 24	Compuestos	Tipo	IRL, DB-WAX		mg de sustancia/ g AE						
			Exp.	Lit.	F1	F2	F3	F4	F5	F6	Blanco
1	α -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1019	1025	2,8	1,0	ND	ND	ND	ND	0,8
2	β -Pinenol ^{a, b, c}	HM	1105	1110	7,1	2,8	1,1	1,5	0,9	0,6	2,2
4	β -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1489	1469	40,6	19,9	13,5	14,1	12,9	11,7	18,6
5	Pentadecano ^{a, b}	HC	1501	1500	2,1	1,6	1,4	1,1	1,1	0,9	0,5
6	Cicloseicheleno ^a	HS	1571	-	13,4	6,8	4,4	3,7	3,4	2,9	6,5
7	α -Guaieno ^{a, b, c}	HS	1597	1596	275,8	180,3	98,1	94,7	78,0	65,7	148,3
8	<i>trans</i> - β -Cariofileno ^{a, b, c}	HS	1604	1599	10,8	16,9	16,4	13,5	14,4	12,8	29,3
9	α -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1645	1658	154,9	95,0	52,2	46,9	34,7	28,0	53,9
10	Coelución de compuestos: γ -gurjuneno ^{a, b} + seicheleno ^{a, b, c}	HS	1651	1659	55,5	58,4	43,6	42,0	43,3	38,7	87,1
11	γ -Pachuleno ^{a, b, c}	HS	1664	1664	16,2	12,1	8,7	7,2	6,2	5,3	11,4
12	α -Humuleno ^{a, b}	HS	1672	1667	14,3	11,4	8,2	6,8	5,8	5,0	10,4
13	9- <i>epi-trans</i> - β -Cariofileno ^a	HS	1680	-	8,8	6,2	4,6	3,8	3,3	2,9	6,0
14	δ -Selineno ^{a, b}	HS	1693	1707	2,4	2,7	1,8	1,5	ND	ND	1,7
15	Acifileno ^{a, c}	HS	1704	-	25,4	33,3	28,2	24,1	21,0	17,7	28,9
17	Germacreno D ^{a, b}	HS	1711	1708	23,2	9,8	3,1	2,4	2,3	1,9	5,2
18	α -Bulneseno ^{a, b, c}	HS	1720	1730	240,5	231,8	142,1	133,7	115,1	95,6	179,9

Tabla 29. Continuación...

20	7- <i>epi</i> - α -Selineno ^{a, b, c}	HS	1763	1764	3,5	3,7	2,9	2,3	2,0	1,6	2,4
21	Nootkateno ^{a, b}	HS	1776	1815	0,8	1,6	1,4	1,5	1,4	1,2	1,2
24	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	SO	1937	-	0,7	1,2	1,9	1,4	1,3	1,2	2,1
26	Óxido de cariofileno ^{a, b}	SO	1986	1986	1,2	2,0	2,5	2,1	2,9	1,7	3,4
29	Norpachulenol ^{a, c}	CO	2109	-	7,2	14,0	15,0	16,0	16,2	14,0	10,3
30	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2147	-	1,2	3,1	4,6	5,6	5,2	4,6	2,4
31	C ₁₅ H ₂₆ O ^c	SO	2152	-	2,5	6,1	8,1	8,9	9,9	9,3	6,2
33	Pachulol ^{a, b, c}	SO	2187	2188	166,4	388,4	372,2	531,4	597,4	581	435,8
35	Pogostol ^{a, b, c}	SO	2208	2191	10,5	27,9	40,7	51,0	58,7	56,2	30,3
36	Selin-11-en-4 α -ol ^{a, b}	SO	2246	2252	ND	1,0	2,0	2,1	2,4	2,7	0,5
37	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2272	-	ND	ND	0,6	0,9	1,2	1,3	1,1
39	C ₁₅ H ₂₄ O ^c	CO	2286	-	ND	ND	ND	2,0	2,4	2,4	0,7
40	Cadin-11-en-4 α -ol ^{a, c}	SO	2393	-	0,5	1,5	2,9	4,0	5,7	6,4	0,7
41	C ₁₅ H ₂₂ O ^c	SO	2408	-	ND	ND	0,6	0,8	1,1	1,3	0,9
43	Pogostona ^{a, b, c}	CO	2459	2458	2,4	8,3	18,4	44,9	72,0	100	11,2
44	C ₁₂ H ₁₆ O ₄ ^c	CO	2488	-	ND	ND	5,6	5,9	8,2	8,5	1,2

Nota: HC: Hidrocarburo; HM: Hidrocarburo monoterpénico; HS: Hidrocarburo sesquiterpénico; SO: Sesquiterpeno oxigenado; CO: Compuesto oxigenado no terpénico. ND: No detectado; tr: Trazas (< 0,2%).

F1: Fracción 1, 0 - 30 min; F2: Fracción 2, 30 - 60 min; F3: Fracción 3, 60 - 90 min; F4: Fracción 4, 90 - 120 min; F5: Fracción 5, 120 - 150 min; F6: Fracción 6, 150 - 180 min; Blanco: destilación de 3 h.

^a Identificación tentativa basada en los espectros de masas (MS, EI, 70eV, coincidencia > 90%).

^b Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en columna DB-WAX (Babushok *et al.*, 2011; NIST, 2011).

^c Identificación basada en la comparación de los espectros de masas de alta resolución (HRMS) con la base de datos NIST 2017 o la determinación de la composición elemental del ion molecular, iones-producto y sus masas exactas.

3.4 Caracterización química y cuantificación de los polifenoles contenidos en los extractos de pachulí

La identificación de los flavonoides contenidos en los extractos etanólicos MSPD y UAE de pachulí (Véanse **Figuras 6-9**) se realizó, según estos pasos: 1) el estudio de los iones-producto característicos acorde con los patrones de fragmentación generales para las moléculas estructuralmente derivadas de flavona, flavanona y flavonol; 2) la extracción de la corriente iónica (EIC) de la molécula protonada $[M+H]^+$ y 3) la medición de la masa exacta y la relación isotópica de la molécula protonada $[M+H]^+$.

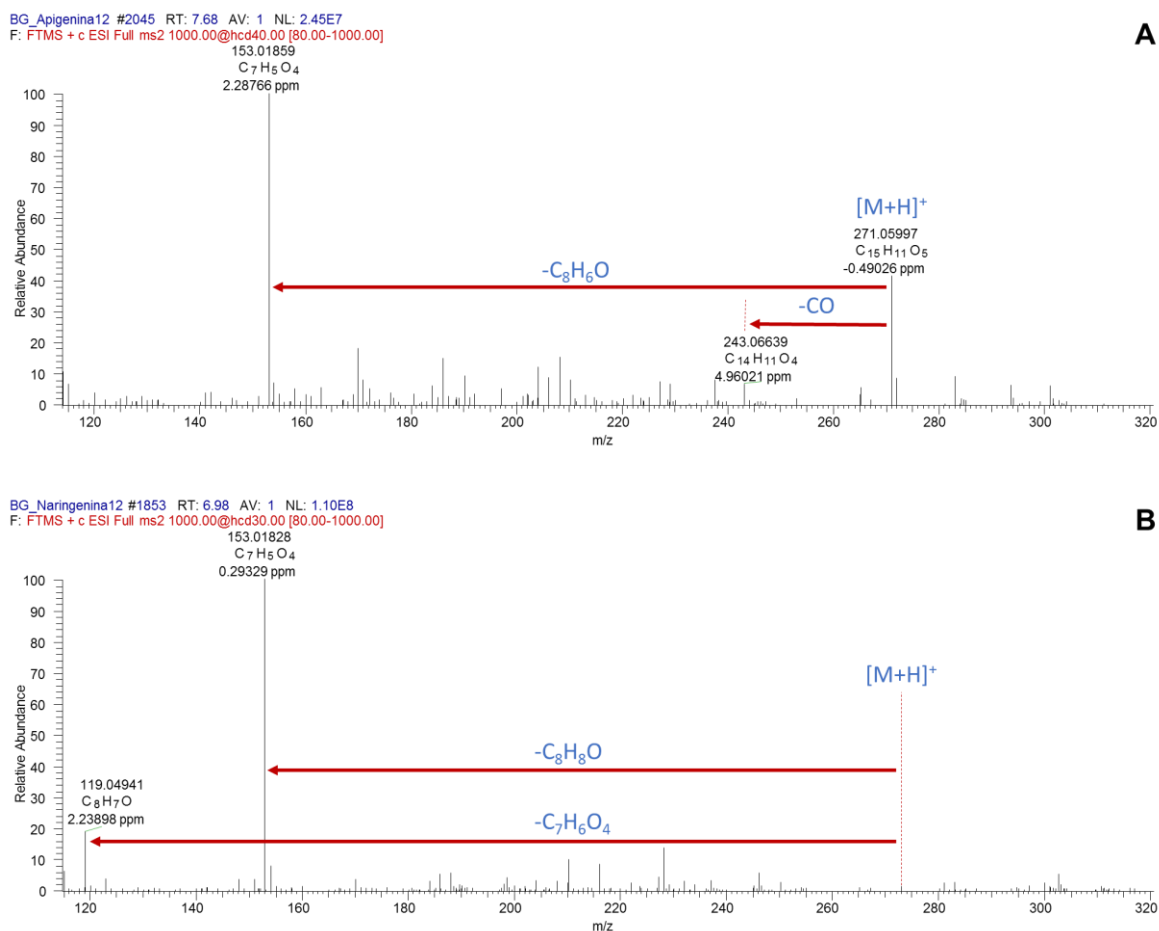
Se escogieron la apigenina (derivada de flavona) y la naringenina para el estudio de los patrones de fragmentación variando la energía en la celda de disociación por colisión (HCD) en el *Orbitrap*.

Los espectros de masas de apigenina (HCD, 40 V) y de naringenina (HCD, 30 V) se usaron para determinar los iones-producto característicos de cada sustancia (**Figura 25**). En apigenina, se observaron los iones $[(M+H)-C_8H_6O]^+$ y $[M+H]-CO]^+$; en naringenina, $[(M+H)-C_8H_6O]^+$ y $[(M+H)-C_7H_5O_4]^+$.

Los iones-producto de naringenina se generaron por una ruptura tipo retro-Diels-Alder (RDA) en el hexaciclo insaturado en el anillo C de su estructura. En apigenina, los iones-producto parece que se generaron por la ruptura de dos enlaces, primero, por el rompimiento del enlace α (C^4-C^5) en el carbono carbonílico que dio apertura del anillo C, y luego, por la escisión del enlace C^4-C^{10} en $[M+H]-CO]^+$ y del enlace $O-C^2$ en $[(M+H)-C_8H_6O]^+$. En las **Figuras 26 y 27**, se proponen los esquemas de fragmentación para las dos sustancias. Con base en los iones-producto de apigenina y naringenina, se crearon dos esquemas generales de fragmentación que permitieron la identificación de los flavonoides en los extractos etanólicos de pachulí. Para cada flavonoide, se midió la masa exacta de la molécula protonada $[M+H]^+$ y de un ion-producto característico. Las **Figuras 28 y 29**, muestran el esquema general para las moléculas derivadas de flavona, flavonol y flavanona en *P. cablin*.

Figura 25.

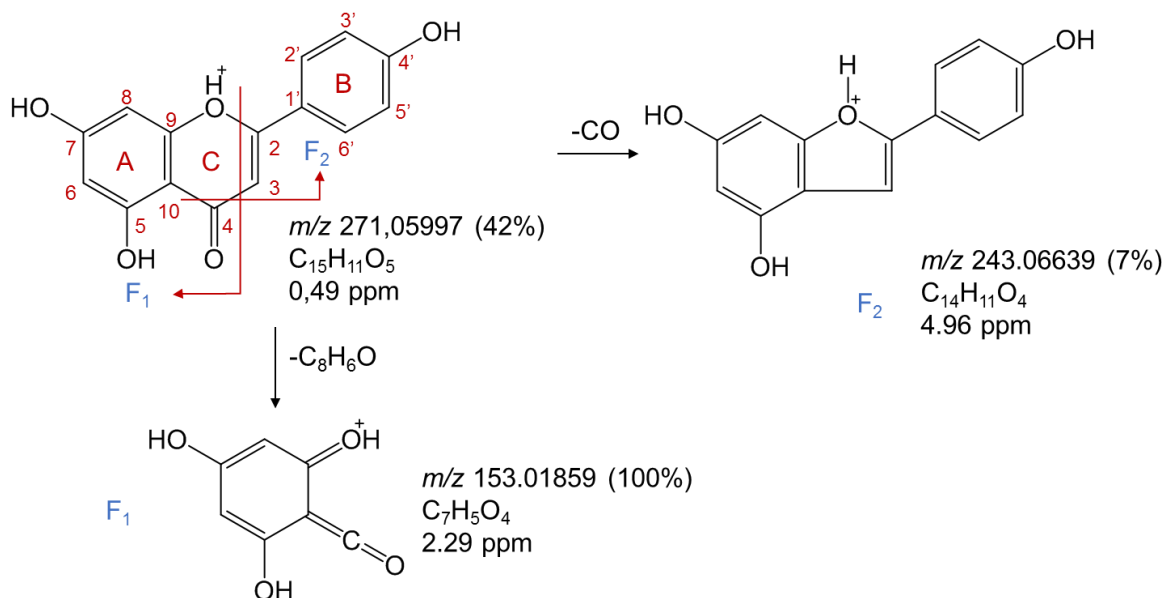
Espectros de masas experimentales obtenidos por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los patrones de: **A.** Apigenina ($C_{15}H_{11}O_5$, m/z 271,06100) y **B.** Naringenina ($C_{15}H_{13}O_5$, m/z 273,07575).



Se presentan, a manera de ejemplo, los espectros de masas (HCD, 40 V) de apigenina, 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona y 3,5-dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona, obtenidas por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), del extracto UAE (100% etanol) de pachulí (**Figura 30**), también, la medición de la relación isotópica de la molécula protonada $[M+H]^+$ en los espectros de masas (*Full MS Scan*) (**Figura 31**).

Figura 26.

Formación de los principales iones-producto en el espectro de masas de apigenina ($C_{15}H_{11}O_5$, m/z 271,06100), obtenido por LC/MS (UHPLC-ESI⁺/HRMS-Orbitrap).

**Figura 27.**

Formación de los principales iones-producto en el espectro de masas de naringenina ($C_{15}H_{13}O_5$, m/z 273,07575), obtenido por LC/MS (UHPLC-ESI⁺/HRMS-Orbitrap).

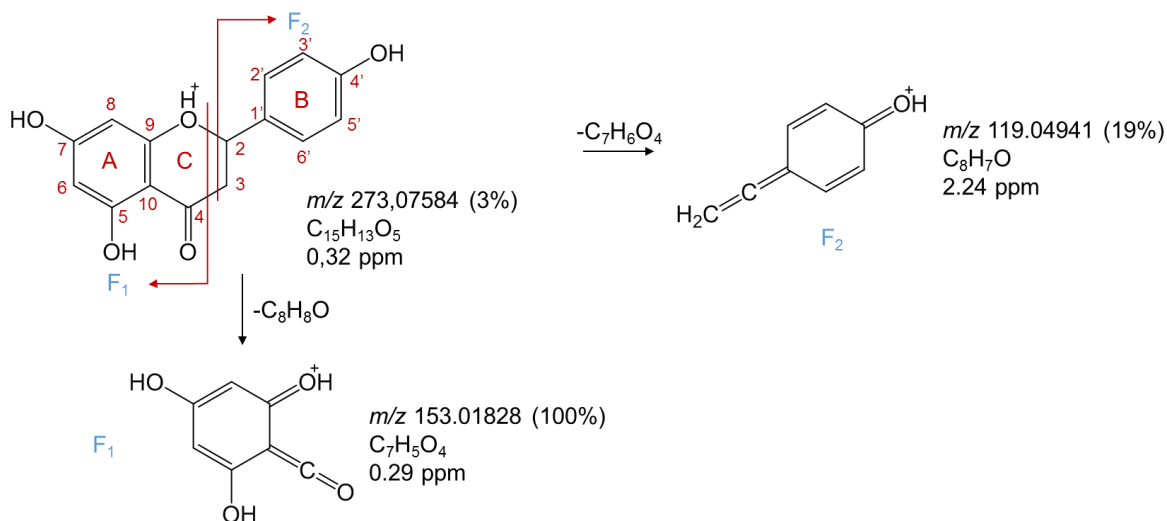
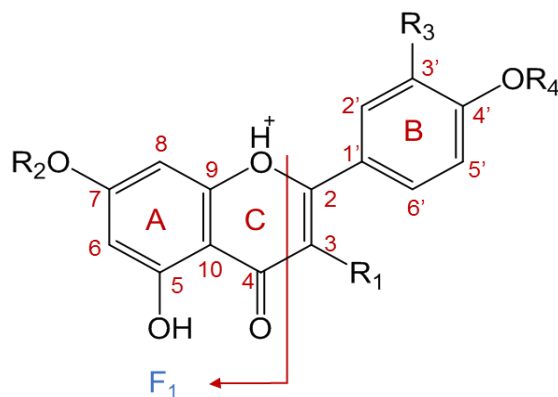


Figura 28.

Esquema general de fragmentación de los flavonoides derivados de flavona y flavonol reportados en la literatura para P. cablin



Flavonoide	Sustituyentes				Masa exacta		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	[M+H] ⁺	F ₁ ⁺	F ₂ ⁺ *
Apigenina	H	H	H	H	271,06100	153,01844	243,06519
Apigetrina*	H	C ₆ H ₁₁ O ₅	H	H	433,11292	271,06100	-
Apigenin-7-O-β-D-(6''-p-cumaroyl)-glucósido*	H	C ₁₅ H ₁₇ O ₇	H	H	579,14970	271,06100	-
3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	OH	CH ₃	H	CH ₃	315,08631	167,03388	287,09140
Ramnetina (3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona)	OH	CH ₃	OH	H	317,06558	167,03388	289,09140
5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	OCH ₃	CH ₃	H	CH ₃	329,10196	167,03388	314,07849
Ombuina (3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona)	OH	CH ₃	OH	CH ₃	331,08123	167,03388	303,08631
Pachipodol (5,4'-dihidroxi-3,7,3'-trimetoxiflavona)	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃	H	345,09688	167,03388	330,07340
Retusina (5-Hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona)**	OCH ₃	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	359,11253	167,03388	344,08905

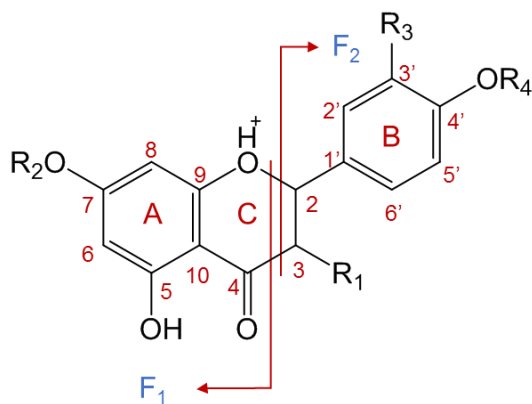
* En los compuestos de tipo flavona y flavonol (R₁ = H, OH), es común observar el ion-producto [(M+H)-CO]⁺; en los derivados sustituidos de flavonol (R₁ = O-CH₃), se presenta el ion-producto [(M+H)-CH₃]⁺.

**En los compuestos glucosilados, el ion-producto característico siempre corresponde a su aglicona.

Nota: moléculas reportadas por Itokawa *et al.*, 1981; Park *et al.*, 1988; Guan *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014.

Figura 29.

Esquema general de fragmentación de los flavonoides derivados de flavanona reportados en la literatura para P. cablin



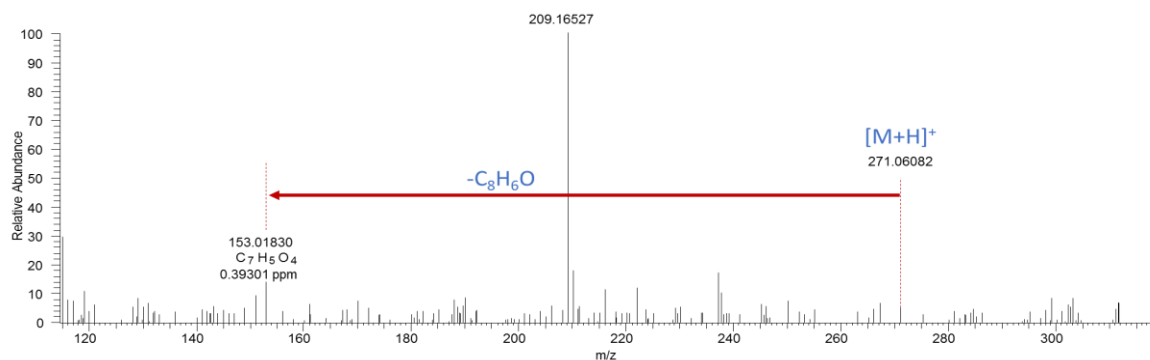
Flavonoide	Sustituyentes				Masa exacta		
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	[M+H] ⁺	F ₁ ⁺	F ₂ ⁺
5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona	H	CH ₃	H	CH ₃	301,10705	167,03388	133,06479
5,7-Dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavanona	H	H	OCH ₃	CH ₃	317,10196	153,01824	163,07536
5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona	H	CH ₃	OCH ₃	H	317,10196	167,03388	149,05971
5-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona	H	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	331,11761	167,03388	163,07536

Nota: moléculas reportadas por Park *et al.*, 1988; Zhou *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014.

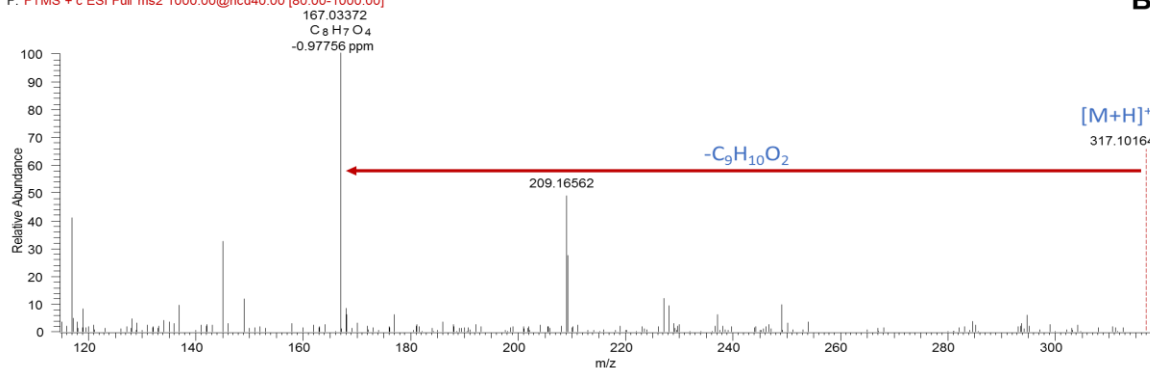
Figura 30.

Espectros de masas experimentales obtenidos por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap; HCD, 40 V) de: **A.** Apigenina (C₁₅H₁₁O₅, *m/z* 271,06100); **B.** 5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona (C₁₇H₁₇O₆, *m/z* 317,10196) y **C.** 3,5-Dihidroxi-4',7-dimetoxiflavona (C₁₇H₁₄O₆, *m/z* 315,08631) presentes en los extractos de pachulí.

BG_EPC_UAE13 #2045 RT: 7.67 AV: 1 NL: 7.84E6
F: FTMS + c ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

A

BG_EPC_UAE13 #2090 RT: 7.84 AV: 1 NL: 1.57E7
F: FTMS + c ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

B

BG_EPC_UAE13 #2295 RT: 8.58 AV: 1 NL: 7.70E6
F: FTMS + c ESI Full ms2 1000.00@hcd40.00 [80.00-1000.00]

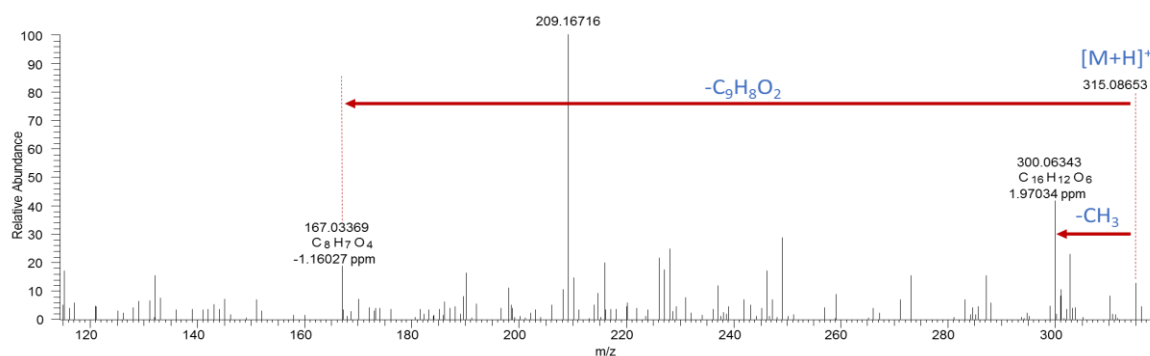
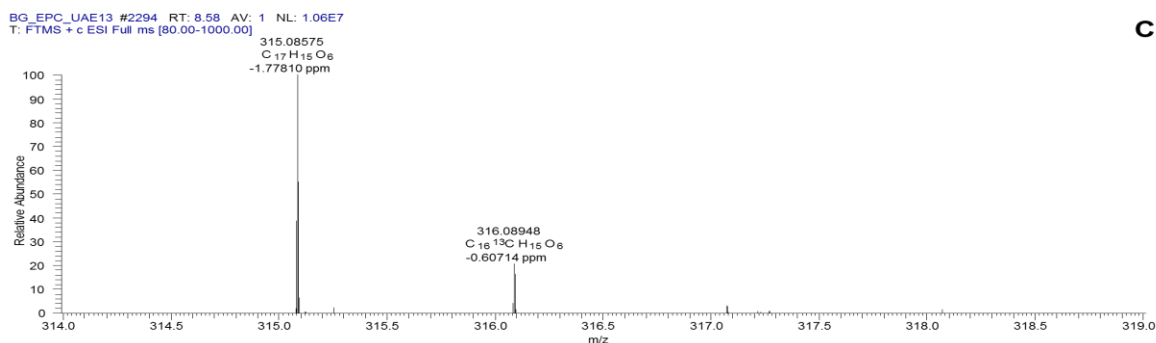
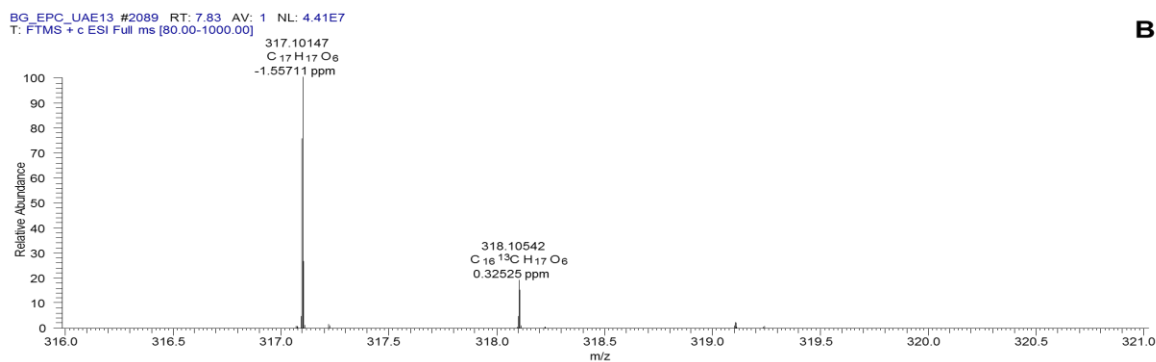
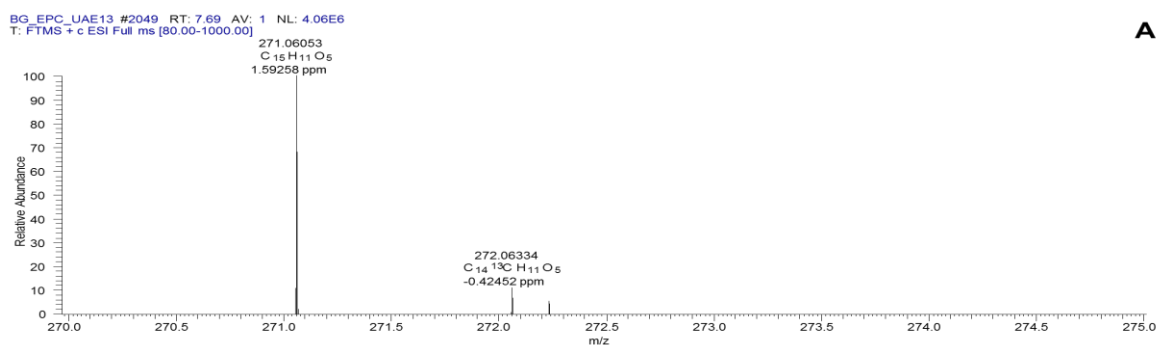
C

Figura 31.

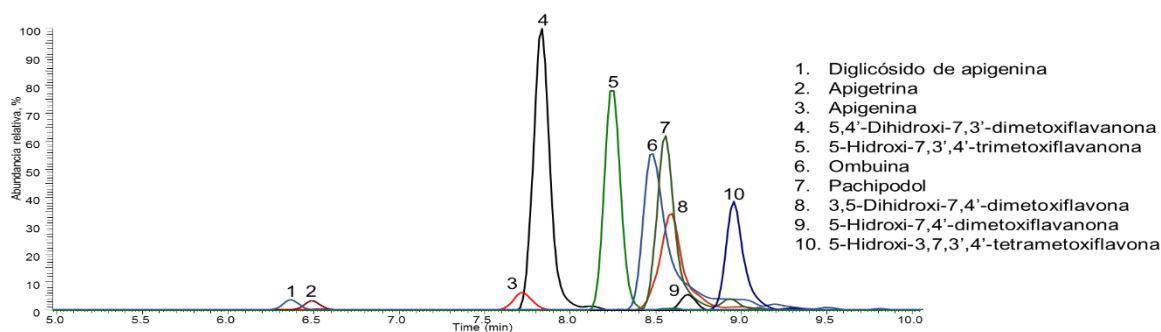
Relación isotópica en los espectros de masas obtenidos por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap; Full MS Scan) de las moléculas protonadas de: **A.** Apigenina, m/z 271,06044 ($C_{15}H_{11}O_5$, 100%): m/z 272,06325 ($C_{14}^{13}CH_{11}O_5$, 17%); **B.** 5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, m/z 317,10147 ($C_{17}H_{17}O_6$, 100%): m/z 318,10542 ($C_{16}^{13}CH_{17}O_6$, 19%) y **C.** 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, m/z 315,08575 ($C_{17}H_{15}O_6$, 100%): m/z 316,08948 ($C_{16}^{13}CH_{15}O_6$, 19%) en el extracto de *P. cablin*.



En la **Figura 32**, se muestran las corrientes iónicas extraídas de las moléculas protonadas obtenidas por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), del extracto UAE (100% etanol) de pachulí. En la **Tabla 30**, se presentan los flavonoides identificados; se encontraron nueve flavonoides de los 14 reportados en la literatura (Itokawa *et al.*, 1981; Park *et al.*, 1988; Guan *et al.*, 1994; Zhou *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014), en concentraciones por encima del nivel mínimo de detección. Los compuestos apigenin-7-O-β-D-(6''-p-cumaroil)-glucósido, licochalcona A, ramnetina, 5,7-dihidroxi-3',4'-dimetoxiflavanona y 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona no se detectaron en ninguno de los extractos etanólicos del presente estudio. También, se identificó un diglicósido de apigenina en el extracto UAE de pachulí. Este compuesto se reporta por primera vez en la planta.

Figura 32.

Corriente iónica extraída (EIC) de las moléculas protonadas $[M+H]^+$, obtenida por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), de los compuestos identificados en los extractos etanólicos de *P. cablin*.



La cuantificación de los diez compuestos identificados en los extractos etanólicos MSPD y UAE de pachulí, se realizó con base en el método de estandarización externa, usando patrones de

apigenina y naringenina (**Apéndice A**) y suponiendo que, el factor de respuesta es el mismo para los patrones y las sustancias presentes en los extractos. Las flavonas y flavonoles se cuantificaron con las curvas de calibración de apigenina y las flavanonas, con naringenina. En las **Tablas 31** y **32** se presentan las cantidades de los flavonoides ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de extracto) de *P. cablin*, contenidos en los extractos MSPD y UAE, respectivamente.

Tabla 30.

Identificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los flavonoides en los extractos etanólicos de P. cablin.

N° Fig. 32	Flavonoide	[M+H] ⁺		Iones-producto				
		Fórmula	Masa experimental	Δ ppm	HCD, V	Pérdida	Masa experimental	Δ ppm
1	Diglicósido de apigenina	C ₂₆ H ₂₉ O ₁₄	565,15343	1,75	40	[(M+H)-C ₁₁ H ₁₈ O ₉] ⁺	271,05978	1,17
2	Apigetrina	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	433,11279	0,30	30	[(M+H)-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁺	271,05951	2,18
3	Apigenina	C ₁₅ H ₁₁ O ₅	271,06053	1,59	40	[(M+H)-C ₈ H ₆ O] ⁺	153,01830	0,39
4	5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona	C ₁₇ H ₁₇ O ₆	317,10147	1,55	40	[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O ₂] ⁺	167,03372	0,98
5	5-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona	C ₁₈ H ₁₉ O ₆	331,11796	0,23	30	[(M+H)-C ₁₀ H ₁₂ O ₂] ⁺	167,03381	0,43
6	Ombuina	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	331,08078	1,36	40	[(M+H)-C ₉ H ₈ O ₃] ⁺	167,03366	1,34
7	Pachipodol	C ₁₈ H ₁₇ O ₇	345,09694	0,17	30	[(M+H)-C ₁₀ H ₁₀ O ₃] ⁺	167,03418	1,76
8	3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	315,08575	1,78	40	[(M+H)-C ₉ H ₈ O ₂] ⁺	167,03369	1,16
9	5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona	C ₁₇ H ₁₇ O ₅	301,10663	1,40	40	[(M+H)-C ₉ H ₁₀ O] ⁺	167,03374	0,89
10	Retusina	C ₁₉ H ₁₉ O ₇	359,11298	1,24	30	[(M+H)-C ₁₁ H ₁₂ O ₃] ⁺	167,03360	1,71

Tabla 31.

Cuantificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los flavonoides contenidos en los extractos etanólicos MSPD de P. cablin.

N° Fig. 32	Flavonoide	µg/mg ± s (n = 3)			
		Concentración de etanol, %			
		50		100	
		Soporte sólido			
		GS	GSM-C18	GS	GSM-C18
1	Diglicósido de apigenina	ND	ND	ND	ND
2	Apigetrina	ND	ND	ND	ND
3	Apigenina	3,7 ± 0,52	5 ± 1,7	1,5 ± 0,67	1,7 ± 0,65
4	5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona	5,2 ± 0,93	8 ± 2,4	8 ± 2,0	8,2 ± 0,68
5	5-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona	3,3 ± 0,41	5 ± 1,1	4,9 ± 0,82	6 ± 1,5
6	Ombuina	0,44 ± 0,23	0,2 ± 0,07	5,3 ± 0,79	10 ± 1,1
7	Pachipodol	3,1 ± 0,44	4 ± 1,8	6,5 ± 0,57	6 ± 1,1
8	3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	1,6 ± 0,48	3 ± 1,0	4,6 ± 0,56	4,6 ± 0,87
9	5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona	ND	0,24 ± 0,10	0,44 ± 0,13	0,55 ± 0,11
10	Retusina	1,0 ± 0,57	2,2 ± 0,87	3,0 ± 0,74	3 ± 1,0

Nota: ND-No detectado

Tabla 32.

Cuantificación por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) de los flavonoides contenidos en los extractos etanólicos UAE de P. cablin.

N° Fig. 32	Flavonoide	µg/mg ± s (n = 3)			
		Concentración de etanol, %			
		50		100	
		Tiempo de extracción, min			
		15	30	15	30
1	Diglicósido de apigenina	0,1 ± 0,09	0,12 ± 0,12	ND	0,1 ± 0,03
2	Apigetrina	0,1 ± 0,09	0,1 ± 0,05	ND	ND
3	Apigenina	1,0 ± 0,32	0,93 ± 0,34	2,0 ± 0,35	1,8 ± 0,57
4	5,4'-Dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona	4,8 ± 0,37	5 ± 1,2	13 ± 1,7	10 ± 4,1
5	5-Hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona	2,4 ± 0,42	3,0 ± 0,05	5,3 ± 0,50	6 ± 1,9
6	Ombuina	ND	ND	6 ± 1,0	10 ± 6,0
7	Pachipodol	1,9 ± 0,41	2,3 ± 0,21	6,2 ± 0,69	7 ± 2,6
8	3,5-Dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	0,9 ± 0,02	1,3 ± 0,16	5 ± 1,0	5 ± 1,6
9	5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona	0,2 ± 0,03	0,25 ± 0,12	0,74 ± 0,27	0,63 ± 0,18
10	Retusina	1,1 ± 0,11	1,3 ± 0,37	3,5 ± 0,66	4 ± 1,6

Nota: ND-No detectado

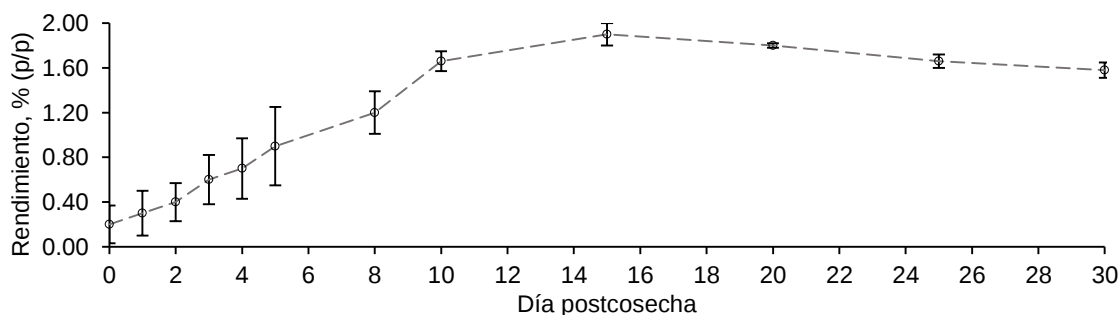
4. Discusión y Análisis de Resultados

4.1 Influencia del tiempo de secado, parte de la planta, tiempo de la destilación y tamaño de partícula sobre el rendimiento y la calidad del aceite esencial de pachulí obtenido por hidrodestilación asistida por la radiación de microondas

Los rendimientos de los AE de pachulí en función de los días de secado postcosecha, fueron variables para todos los experimentos planteados. Se determinó que bajo las condiciones ambientales y a la sombra, las plantas cosechadas pierden todo su contenido de humedad a los diez días. El rendimiento máximo del AE esencial se alcanzó entre los 15 y 20 días, probablemente, producto del secado completo, que, según Guenther, garantiza que la pared celular de las plantas de pachuli sea más permeable, facilitando la extracción de los metabolitos secundarios volátiles (Guenther, 1972). En este estudio no hubo fermentación, por lo que el rendimiento solo se atribuye al secado. Los resultados obtenidos mostraron que, antes de que se alcance el secado completo, el rendimiento del AE es muy variable. También, se observó una disminución del rendimiento posterior a los 20 días, lo más seguro, debido a una evaporación lenta de los terpenoides volátiles en las plantas secas (**Figura 33**).

Figura 33.

Rendimientos del AE de pachulí en función de los días de secado postcosecha.



En un estudio similar, Storck y Deschamps (2015), evaluaron el efecto del secado sobre el rendimiento y la composición del AE de pachulí, en plantas secadas a temperatura ambiente y en estufa. Aunque las condiciones de los experimentos fueron diferentes, los autores también reportaron un descenso del rendimiento de AE después del octavo día. Curiosamente, la humedad de las plantas secadas a temperatura ambiente fue del 36% y el máximo rendimiento del AE se alcanzó entre los 4 y 8 días, cuando la humedad aún estaba alrededor del 5%. Se concluyó que el secado de las plantas sí influyó sobre el rendimiento del AE, pero no sobre la composición química.

Con los resultados de la influencia de las partes de la planta sobre el rendimiento y la composición química del AE de pachulí, se evidenció que el mayor rendimiento de extracción del AE lo dieron las hojas ($3,70 \pm 0,02\%$) frente a un aporte pobre de los tallos ($0,18 \pm 0,02\%$). La composición química de los AE obtenidos definitivamente fue diferente, se encontraron algunas sustancias en los tallos que no estaban presentes en las hojas. Los siguientes compuestos se detectaron únicamente en el AE de los tallos: pentadecano ($0,29 \pm 0,06\%$, $2,3 \pm 0,5$ mg/g AE), $C_{11}H_{14}O_4$ ($1,11 \pm 0,07\%$, $9,0 \pm 0,4$ mg/g AE), pogostona ($31 \pm 2,4\%$, 250 ± 19 mg/g AE), dos isómeros estructurales de pogostona [$C_{12}H_{16}O_4$ ($0,23 \pm 0,01\%$, $1,88 \pm 0,03$ mg/g AE) y ($0,4 \pm 0,03\%$, $3,2 \pm 0,1$ mg/g AE)] y el ácido hexadecanoico ($0,93 \pm 0,04\%$, $7,5 \pm 0,2$ mg/g AE). En el AE de las hojas, se produce el compuesto 9-*epi-trans*- β -cariofileno ($0,46 \pm 0,01\%$, $4,4 \pm 0,1$ mg/g AE), ausente en los tallos.

En el AE obtenido de las hojas, los componentes mayoritarios fueron pachulol ($42 \pm 1,3\%$, 410 ± 27 mg/g AE), α -bulneseno ($14,8 \pm 0,3\%$, 140 ± 2 mg/g AE), α -guaieno ($12,6 \pm 0,5\%$, 120 ± 2 mg/g AE), la mezcla γ -gurjuneno-seicheleno ($7,9 \pm 0,3\%$, $75,4 \pm 0,7$ mg/g AE) y α -pachuleno ($5,1 \pm 0,2\%$, 50 ± 2 mg/g AE); en el AE de los tallos, pachulol ($38,2 \pm 0,6\%$, 310 ± 16 mg/g AE), pogostona ($31 \pm 2,4\%$, 250 ± 19 mg/g AE), pogostol ($3,4 \pm 0,1\%$, 30 ± 2 mg/g AE), la mezcla γ -

gurjuneno-seicheleno ($2,9 \pm 0,5\%$, 20 ± 4 mg/g AE) y α -bulneseno ($2,8 \pm 0,7\%$, 20 ± 6 mg/g AE). En la literatura, se reportan los trabajos de Luo *et al.* (1999, 2002), que estudiaron el AE de los tallos y hojas de *P. cablin*, en las provincias de Guandong y Hainan en China. Los componentes principales reportados en la provincia de Guandong fueron pogostona (30,99% en el AE de tallos y 21,31% en el AE de hojas), pachulol (10,26% y 37,53%, respectivamente), *trans*- β -cariofileno (4,92% y 6,75%), α -guaieno (2,27% y 6,18%) y seicheleno (1,56% y 1,99%), en la provincia de Hainan, reportaron pachulol (36,06% en el AE de tallos y 37,74% en el AE de hojas) y pogostona (17,08% y 0,85%, respectivamente). En otra publicación más reciente, Verma *et al.* (2019), ampliaron el estudio de los metabolitos secundarios volátiles en las hojas, inflorescencias, partes aéreas enteras (hojas, inflorescencias y tallos) y raíz. Los AE de las partes aéreas (hojas, inflorescencias y partes aéreas enteras) tuvieron en común los componentes mayoritarios pachulol (42,2 - 57,7%), α -bulneseno (9,0 - 15,2%), α -guaieno (6,4 - 17,9%) y seicheleno (3,4 - 6,9%), y minoritarios, pogostona (0,1 - 0,2%). Sorprendentemente, el AE de la raíz tenía un alto contenido de pogostona (70,2%) y un bajo contenido de pachulol (4,0%).

Con base en los componentes mayoritarios en los AE de las hojas y los tallos de *P. cablin*, los resultados de la presente investigación fueron similares a los reportados por los anteriores investigadores. Sin embargo, el contenido de pogostona en el AE de las hojas es contradictorio, definitivamente, el compuesto no está presente. De hecho, parece ser que la pogostona se biosintetizara únicamente en los tallos y en la raíz, por lo que la propuesta de variedades quimiotípicas de *P. cablin* (Luo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2002), necesitaría de otros estudios complementarios que incluyesen hasta tres generaciones de un cultivar y el estudio de la variabilidad de los metabolitos secundarios volátiles, según la parte de la planta en el quimiotipo pachulol. Los resultados obtenidos, sitúan el cultivar de *P. cablin* del presente estudio en el

quimiotipo pachulol. Se precisa que cuando se destiló toda la planta (tallos y hojas), el aporte de pogostona en el AE obtenido lo dieron los tallos.

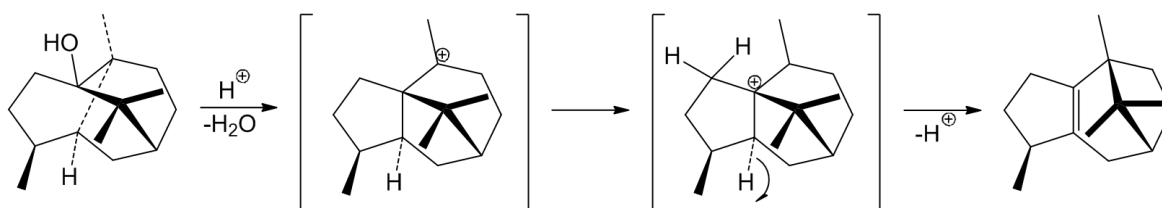
Los resultados obtenidos del tratamiento enzimático fueron interesantes con respecto a los rendimientos y la composición química del AE de toda la planta (hojas y tallos). En comparación con la destilación convencional (blanco A), el rendimiento del AE se incrementó en un 10% para el tratamiento con la enzima *Celluclast*[®] y la hidrólisis ácida (blanco B). En la literatura científica, solo se reporta el trabajo de Yu *et al.*, (2012), en el que encontraron un incremento de 41% del AE usando hemicelulasa bajo los siguientes parámetros: pH 4,5, temperatura 45 °C, tiempo de incubación 1 h y concentración de la enzima 1% (p/p). Infortunadamente, solo se pudo acceder al resumen del trabajo, por lo que no se pudieron discutir más a fondo los resultados de composición química del AE.

La composición química del AE del blanco B (hidrólisis ácida) y de la hidrólisis enzimática (*Celluclast*[®]) fueron similares entre sí y diferentes con el AE del blanco A. En el AE del blanco A, la sumatoria del promedio de los hidrocarburos sesquiterpénicos (HS) fue menor que los sesquiterpenos oxigenados (SO) (41,8%, 438 mg/g AE de HS y 51,2%, 531 mg/g AE de SO). En los AE de la hidrólisis ácida y de la enzima, ocurrió lo contrario, predominó la cantidad de hidrocarburos sesquiterpénicos (blanco B: 50,7%, 527 mg/g AE de HS y 41,6%, 443 mg/g AE de SO; *Celluclast*[®]: 49,6%, 518 mg/g AE de HS y 41,3%, 432 mg/g AE de SO); en general, aumentaron las cantidades relativas de β -pachuleno, α -guaieno, α -bulneseno, *trans*- β -cariofileno, α -humuleno, *etc.*, y disminuyeron las cantidades de pachulol, óxido de cariofileno, epóxido de humuleno II, entre otros. Ante la similitud de las composiciones químicas de los AE obtenidos por la hidrólisis ácida y la hidrólisis enzimática, no se pudo afirmar que la enzima haya tenido alguna acción sobre la planta de *P. cablin*.

Aunque el tratamiento enzimático sobre las especies aromáticas busca mejorar el rendimiento y la calidad de sus aceites esenciales (Hosni *et al.*, 2013; Baby y Ranganathan, 2016a, 2016b), el presente estudio muestra que ante la disminución del contenido de pachulol, el resultado, que se obtuvo en términos comerciales, es el de un AE de calidad más baja. Parte de la cantidad de pachulol, en el medio de la hidrólisis ácida y enzimática (pH 4,5), se transformó predominantemente a β -pachuleno, por una reacción de su deshidratación. De hecho, la transformación del pachulol a β -pachuleno está referenciada en una patente, con un 80% de rendimiento de la reacción (Su *et al.*, 2019). En la **Figura 34** se presenta el mecanismo de reacción propuesto en la patente.

Figura 34.

Transformación de pachulol a β -pachuleno.



Nota: Esquema de reacción adoptado de: Su *et al.*, 2019.

Otra observación sobre los experimentos con el tratamiento enzimático, mostró que los rendimientos ($1,00 \pm 0,03\%$, blanco A; $1,10 \pm 0,03\%$, blanco B; $1,10 \pm 0,04\%$, *Celluclast*[®]) fueron notablemente bajos en comparación con los obtenidos en el estudio del efecto del secado postcosecha (Véase **Figura 33**) y debidos al tiempo de almacenamiento de 90 días, antes de la destilación. Se comprobó que el tiempo de almacenamiento de *P. cablin*, afectó el rendimiento de

extracción del AE y que la única forma de lograr rendimientos mayores es aumentando el tiempo de la destilación (Véase **Figura 19**), lo que implicaría, mayores costos en el proceso. Consecuentemente, esta observación permite plantear la hipótesis de que el descenso del rendimiento de extracción del AE en el tiempo, se debe a la evaporación lenta de los terpenoides volátiles en los tricomas glandulares externos y, también, que el aumento del tiempo de la destilación permite extraer los metabolitos volátiles de los tricomas glandulares internos.

Finalmente, hay unas diferencias en la cantidad de los componentes individuales del AE de *P. cablin* del estudio postcosecha (Véanse **Tablas 20 y 21**) y del blanco A del tratamiento enzimático (Véanse **Tablas 24 y 25**). Tales diferencias se debieron a que el AE del estudio de postcosecha, llevaba aproximadamente 105 días más de almacenado (envejecimiento) y quizás no quedó bien empaquetado. En la literatura, para fines de la perfumería, se recomienda el envejecimiento y el mal empaquetado a propósito, para que el olor leñoso y terroso mejore notablemente y se pierden las notas verdes más duras (Guenther, 1972; Howart, 2015; Ramya *et al.*, 2013). La composición química más precisa del AE de pachulí (toda la planta) es el del blanco A del experimento del tratamiento enzimático.

4.2 Influencia del tiempo de la destilación y fraccionamiento sobre el rendimiento y la calidad del aceite esencial de pachulí obtenido por arrastre con vapor

El rendimiento de la destilación por arrastre con vapor de las plantas frescas (toda la planta) aumentó en un 69% al incrementar el tiempo de la destilación, de tres horas (0,13%) a diez horas (0,22%). El tiempo de diez horas se determinó como el límite de la destilación debido a que el contenido de AE que se produjo en la última hora fue insignificante. Según Sarma y Sarma (2003),

la destilación por AV de las hojas frescas (80 - 87% de humedad) produjo AE solo en las primeras tres horas con un 1,82% de rendimiento. Luego, no se obtuvo más AE.

En el presente trabajo, el AE destilado por tres horas tuvo un 0,3% de hidrocarburos monoterpénicos (HM), 34,1% de HS, 60,4% de SO y 4,7% de compuestos oxigenados no terpénicos; en el AE destilado por diez horas se obtuvo un 0,3% de HM, 45,5% de HS, 43,9% de SO y 8,7% de CO. Los cambios de composición química fueron más notables en pachulol (577,3 mg/g AE en el de tres horas y 394,9 mg/g AE en el de diez horas), α -guaieno (80,4 mg/g AE y 109,8 mg/g AE, respectivamente), α -bulneseno (112,4 mg/g AE y 144 mg/g AE) y pogostona (31,7 mg/g AE y 76,9 mg/g AE). Este resultado no se comparó con otras investigaciones debido a que, comúnmente, la destilación por arrastre con vapor se realiza únicamente del material vegetal seco, preferiblemente, de hojas (Guenther, 1972; Vijaykumar, 2004, van Beek y Joulain, 2018). Como se discutió en los experimentos de los aceites esenciales obtenidos por MWHD, el rendimiento del AE y su composición química dependen de varios factores, *e.g.*, la parte de la planta, el secado postcosecha y su almacenamiento, el tiempo de la destilación y el envejecimiento del AE.

El fraccionamiento del AE cada 30 min, a partir de toda la planta seca de *P. cablin* fue novedoso y permitió profundizar el conocimiento de la extracción de los metabolitos secundarios volátiles en el tiempo. En la **Figura 35** se muestra la obtención de los componentes volátiles agrupados por las familias de los hidrocarburos sesquiterpénicos y sesquiterpenos oxigenados sumados con compuestos oxigenados no terpénicos; la primera fracción del AE, recogido a los 30 min contenía mayormente hidrocarburos sesquiterpénicos. Luego, éstos descendieron mientras que el contenido de sesquiterpenos oxigenados y otros compuestos oxigenados aumentó.

En las **Figuras 36** y **37** se muestra la variabilidad en el tiempo de algunos hidrocarburos sesquiterpénicos, sesquiterpenos oxigenados y compuestos oxigenados característicos en el AE de

pachulí. Según las tendencias observadas en las figuras, si se recogieran otras fracciones después de los 180 min, se esperaría que el contenido de pogostona siguiera aumentando. Los experimentos de fraccionamiento en el presente estudio, podrían servir para “ajustar” la composición química de un AE de pachulí, según la norma internacional de calidad (ISO).

Figura 35.

Variabilidad de la composición química del AE de P. cablin, agrupado por familias estructurales, en función del tiempo de la destilación.

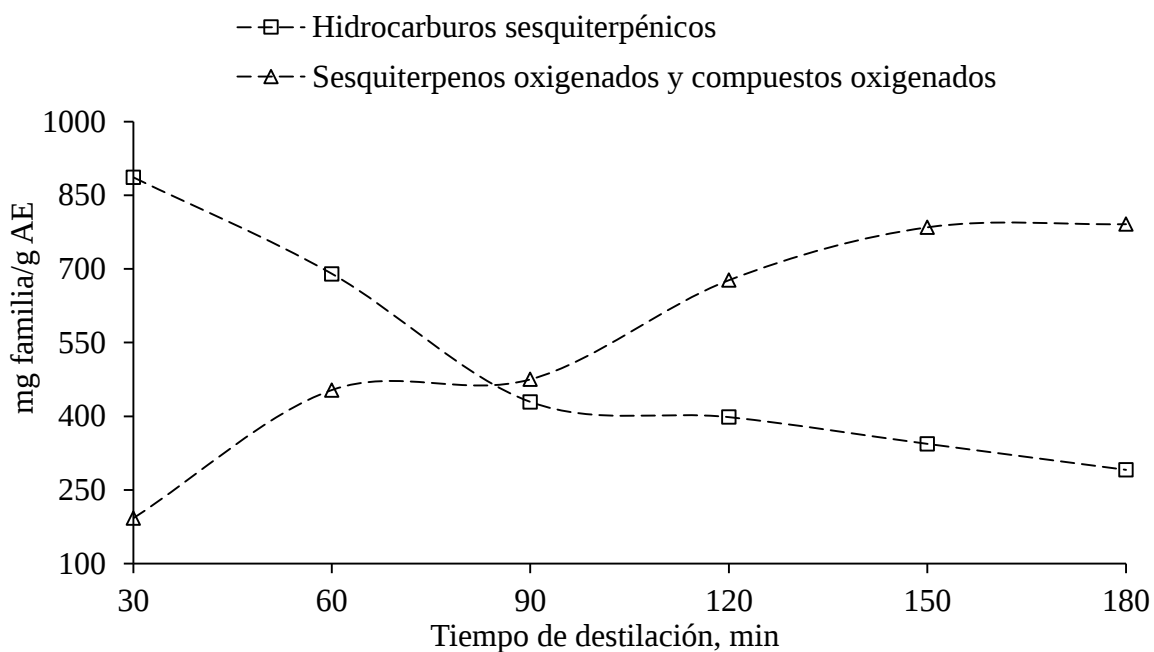
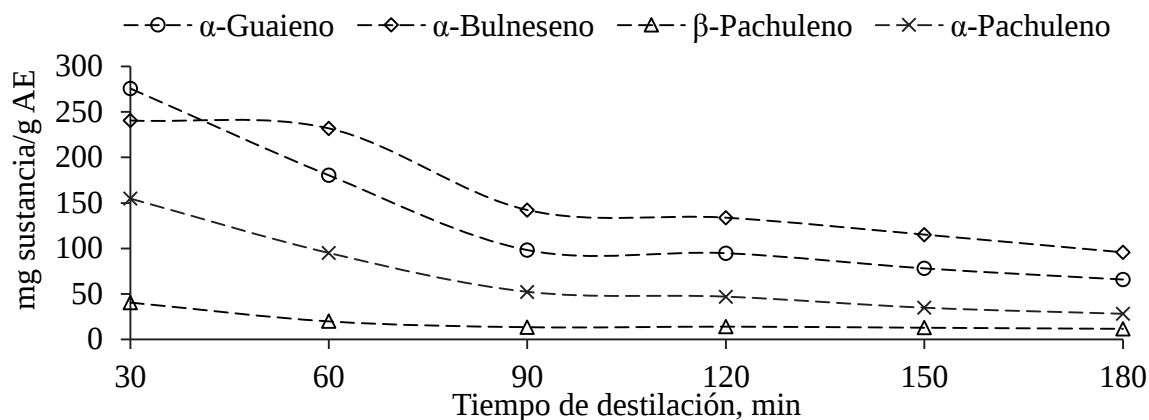
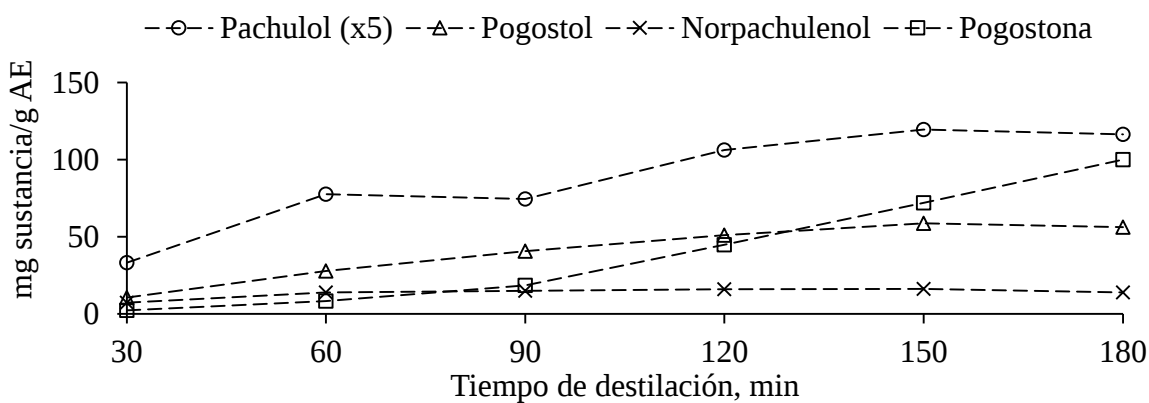


Figura 36.

Variabilidad de la composición química del AE de P. cablin, de α -pachuleno, β -pachuleno, α -guaieno y α -bulneseno, en función del tiempo de la destilación.

**Figura 37.**

Variabilidad de la composición química del AE de P. cablin, de los compuestos norpachulenol, pachulol, pogostol y pogostona, en función del tiempo de la destilación.



Finalmente, en la **Tabla 33** se presenta una comparación de la composición de los AE de *P. cablin* (toda la planta) con la de la norma ISO 3757:2002. De acuerdo con la comparación, los

valores encontrados son cercanos a los rangos establecidos por la norma, empero, el alto contenido de pachulol permite concluir que los AE del presente estudio son de alta calidad a nivel comercial.

Tabla 33.

Comparación de los aceites esenciales, obtenidos por MWH y AV, en el presente estudio, según los criterios de calidad, establecidos por la norma ISO 3757:2002.

Compuesto	ISO 3757, %	MHWD, %		AV, %	
		Seco	Seco (envejecido)	Fresco (10 h)	Seco (3 h)
β -Pachuleno	1,80 - 3,50	$1,3 \pm 0,1$	$1,09 \pm 0,06$	1,4	2,2
Copaeno	<i>tr</i> - 1,00	-	-	-	-
α -Guaieno	11,0 - 16,0	$9,2 \pm 0,8$	$9,2 \pm 0,2$	10,4	16,4
<i>trans</i> - β -Cariofileno	2,00 - 5,00	$2,1 \pm 0,2$	$1,7 \pm 0,2$	3,4	1,4
α -Bulneseno	13,0 - 21,0	$11 \pm 1,1$	$11,4 \pm 0,2$	13,6	16,5
Norpachulenol	0,35 - 1,00	$1,57 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,1$	1,1	0,8
Pachulol	27,0 - 35,0	$38,9 \pm 0,4$	$50 \pm 1,7$	37,4	36,5
Pogostol	1,00 - 2,50	$4,40 \pm 0,04$	$3,54 \pm 0,01$	2,8	2,8

4.3 Análisis de costos del aceite esencial de pachulí

Un estudio general de los costos de producción del AE de *P. cablin*, se llevó a cabo teniendo en cuenta los dos tipos de cultivos (monocultivo y cultivo mixto), la mano de obra de la cosecha y postcosecha, el pago del servicio de la destilación y el precio del AE, para un cultivo de una hectárea. Se plantearon dos casos, el primero sin abonar los cultivos (peso promedio por planta fresca de 200 g, tres cosechas por año y un rendimiento de destilación de 1,5%) y el segundo, con fertilización intensa de los cultivos (50 g de fertilizante NPK por planta cada dos meses, peso promedio por planta fresca de 600 g, cuatro cosechas por año y un rendimiento de destilación de 1,5%). Es importante destacar, que los valores de la base de cálculo en la producción del caso 1,

se hicieron de acuerdo con los resultados del presente estudio, donde no se fertilizaron los cultivos, se obtuvieron plantas frescas con un promedio aproximado de 200 g y humedad del 80%, y el rendimiento obtenido por la destilación por AV fue de 1,5%. Para el caso 2, se tuvieron en cuenta los reportes de los investigadores sobre nutrimentos del suelo (Véase **Sección 2.2.2.3**) y, lógicamente, los resultados del rendimiento del AE por arrastre con vapor. Las **Tablas 34** y **35** muestran los resultados obtenidos para el caso 1 y 2, respectivamente. Los precios de los AE usados son los que aparecen en el estado del arte de este trabajo (Véase **Sección 2.3**).

En el caso 1, el ingreso bruto del cultivo de *P. cablin* es bajo debido a que sin los suministros agrícolas de abonado (fertilizantes orgánicos e inorgánicos), la producción de biomasa es baja; para el caso del cultivo mixto, sucede lo mismo, pero, si se suma la ganancia del cultivo de pachulí a las ganancias de producción del otro cultivo, *e.g.*, papaya (1000 individuos/ha), seguramente, el resultado será atractivo para el productor. En el caso 2, la fertilización intensa mejora el ingreso bruto en los dos cultivos, precisamente, porque se podría triplicar la cantidad de biomasa (plantas más grandes con mayor producción de hojas) y reducir el periodo de cosecha a tres meses (cuatro cosechas por año). Sin embargo, el precio elevado de los fertilizantes en Colombia, aumenta drásticamente los costos de la producción, dando como resultado una ganancia total menor comparada con el caso 1 (usando el precio máximo del AE/kg, USD).

Tabla 34.

Costos de producción del AE y ganancia por hectárea de cultivo sin suministro de abono.

Detalles de la producción	Monocultivo	Cultivo mixto
Número de plantas/ha	22.250	20.000
Peso promedio de la planta, kg	0,2	0,2
Peso promedio de la planta seca, kg	0,04	0,04
Número de cosechas por año	3	3
Peso biomasa seca/año, kg	2.670	2.400

Tabla 34. Continuación...		
Rendimiento del AE por AV, % (p/p)	1,5	1,5
Cantidad de AE producido/año, kg	40,05	36
Precio mínimo del AE/kg, USD	44,1	44,1
Precio máximo del AE/kg, USD	60,3	60,3
Precio dólar, COP (28 de mayo de 2020)	3.700	3.700
Ingreso bruto mínimo, COP	6'534.958.5	5'874.120
Ingreso bruto máximo, COP	8'935.555.5	8'031.960
Costos de la producción		
Cosecha (corte de las plantas y transporte), COP	3'000.000	3'000.000
Postcosecha (secado y picado), COP	500.000	500.000
Destilación (destilador de 1 m ³ con capacidad de 250 kg de material vegetal)		
Precio de la destilación, COP	35.000	35.000
Cantidad de destilaciones	11	10
Costo destilaciones, COP	373.800	336.000
Costo total de la producción, COP	3'873.800	3'836.000
Ganancia total mínima, COP	2'661.158.5	2'038.120
Ganancia total máxima, COP	5'061.755.5	4'195.960

Tabla 35.

Costos de producción del AE y ganancia por hectárea de cultivo con suministro intenso de abonado.

Detalles de la producción	Monocultivo	Cultivo mixto
Número de plantas/ha	22.250	20.000
Peso promedio de la planta, kg	0,6	0,6
Peso promedio de la planta seca, kg	0,12	0,12
Número de cosechas por año	4	4
Tabla 35. Continuación		
Peso biomasa seca/año, kg	10.680	9.600
Rendimiento del AE por AV, % (p/p)	1,5	1,5
Cantidad de AE producido/año, kg	160,2	144
Precio mínimo del AE/kg, USD	44,1	44,1
Precio máximo del AE/kg, USD	60,3	60,3
Precio dólar, COP (28 de mayo de 2020)	3.700	3.700
Ingreso bruto mínimo, COP	26'139.834	23'496.480
Ingreso bruto máximo, COP	35'742.222	32'127.840

Tabla 35. Continuación...

Costos de la producción		
Fertilización (NPK, 50 kg/bulto)		
Precio del fertilizante por bulto + mano de obra de aplicación	85.000	85.000
Cantidad de bultos de fertilizante	133,5	120
Costo de la fertilización	11'347.500	10'200.000
Cosecha (corte de las plantas y transporte), COP	17'000.000	16'000.000
Postcosecha (secado y picado), COP	2'000.000	1'500.000
Destilación (destilador de 1 m ³ con capacidad de 250 kg de material vegetal)		
Precio de la destilación, COP	35.000	35.000
Cantidad de destilaciones	43	38
Costo destilaciones, COP	1'495.200	1'344.000
Costo total de la producción, COP	31'842.700	29'044.000
Ganancia total mínima, COP	- 5'702.866	- 5'547.520
Ganancia total máxima, COP	3'899.522	3'083.840

4.4 Análisis descriptivo y comparativo de los extractos de pachulí obtenidos por MSPD y UAE

Para la extracción por MSPD, los valores promedio de los experimentos, cuando se usaron la concentración de etanol del 50% y los soportes sólidos de gel de sílice ($10,6 \pm 0,22\%$) y sílice modificada-C₁₈ ($9,2 \pm 0,39\%$) permitieron concluir que hubo una diferencia significativa en la cantidad de extracto obtenido, cuando se cambiaba la naturaleza del soporte sólido. Para los valores promedio con la concentración de etanol del 100%, no hubo una diferencia significativa en la cantidad de extracto obtenido cuando se cambiaba naturaleza del soporte sólido (GS, $4,4 \pm 0,23\%$ y GSM-C₁₈, $4,1 \pm 0,27\%$) (**Figura 38**).

En la extracción por UAE, los valores promedio de los experimentos demuestran que, además de la concentración del etanol, el tiempo de extracción influyó en la cantidad del extracto obtenido,

es decir, se confirmó la influencia de los dos factores en el proceso de extracción para parámetros planteados en este estudio (**Figura 39**).

Figura 38.

Comparación de los rendimientos medio obtenidos de las extracciones por MSPD variando la concentración de etanol y el tipo de soporte sólido.

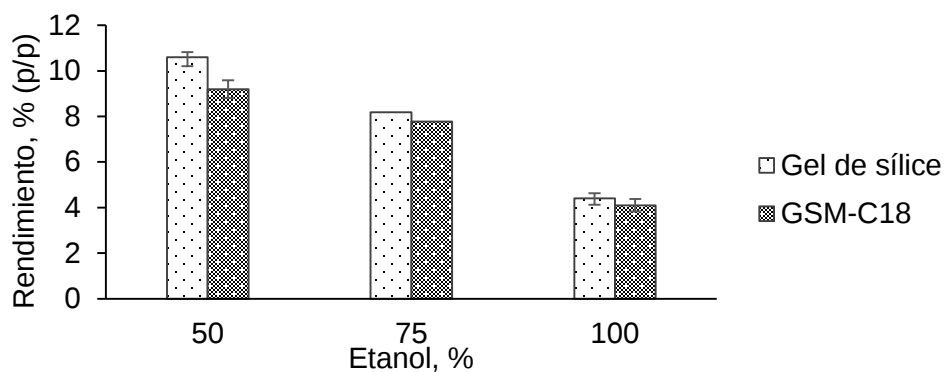
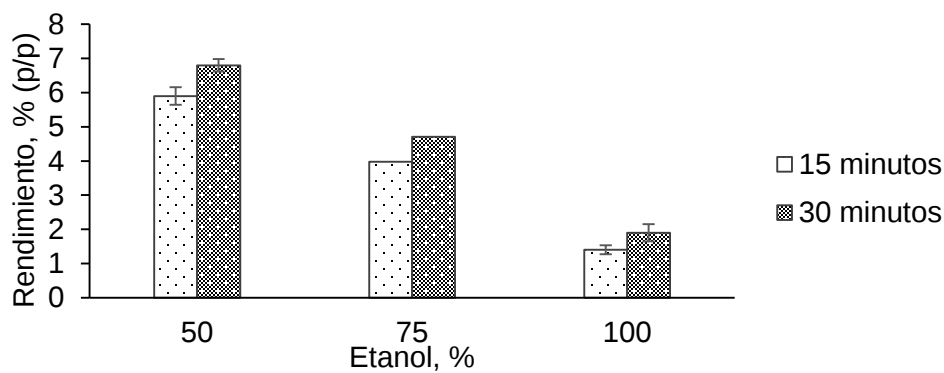


Figura 39.

Comparación de los rendimientos medio obtenidos de las extracciones por UAE variando la concentración de etanol y el tiempo de extracción.



Para las técnicas MSPD y UAE se realizó un diseño experimental factorial para determinar cuál o cuáles de los factores tenían incidencia significativa sobre el rendimiento de extracción en cada proceso. En las **Tablas 36 y 37**, se observan las variables y los niveles del diseño correspondientes a la extracción MSPD y UAE, respectivamente.

Tabla 36.

Factores y niveles en el diseño factorial correspondientes a la extracción por MSPD.

Factores	Niveles		
Soporte sólido*	GS	GSM-C ₁₈	
Concentración de etanol, % (p/p)	50	75	100
Nota: * GS Gel de sílice; GSM-C ₁₈ Sílice modificada-C ₁₈			

Tabla 37.

Factores y niveles en el diseño factorial correspondientes a la extracción por UAE

Factores	Niveles		
Tiempo de extracción, min	15	30	
Concentración de etanol, % (p/p)	50	75	100

El análisis de la varianza ANOVA, permitió evaluar estadísticamente los factores y sus múltiples combinaciones sobre el rendimiento de extracción para el MSPD y el UAE. Esto se hizo comparando las medias agrupadas para cada factor o su combinación, mediante la varianza y el modelo estadístico de prueba de hipótesis. Si las medias fueran iguales, se aceptaría la hipótesis de no influencia significativa. Si fueran diferentes, se rechazaría. Los cálculos para este estudio se realizaron en el *software Statgraphics Centurion*. Las observaciones de los diseños experimentales pueden describirse por medio del siguiente modelo de análisis de varianza:

$$\gamma_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde, γ_{ijk} es la observación ijk -ésima, μ es la media global, τ_i es el efecto del nivel i -ésimo de la concentración de etanol, β_j es el efecto del nivel j -ésimo del soporte sólido para el MSPD o del tiempo de extracción para UAE; $(\tau\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre τ_i y β_j , y ε_{ijk} es un componente del error aleatorio. ε_{ijk} incorpora las demás fuentes de variabilidad del experimento, incluyendo mediciones, factores no controlados, diferencias entre los materiales de prueba, efectos de variables ambientales, entre otros. En las **Tablas 38 y 39**, se presentan las hipótesis de prueba del ANOVA.

Tabla 38.

Hipótesis de prueba del ANOVA para la extracción por MSPD.

Concentración de etanol	Soporte sólido	Interacción de factores
$H_0: \tau_i = 0,$	$H_0: \beta_j = 0,$	$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0, \text{ para toda } i, j$
$H_1: \text{al menos una } \tau_i \neq 0,$	$H_1: \text{al menos una } \beta_j \neq 0,$	$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0$
$i = 50\%, 75\%, 100\%$	$j = GS, GSM - C18$	$k = 1, 2, 3 \text{ para } i = 50\%, 100\%$ $k = 1 \text{ para } i = 75\%$

Tabla 39.

Hipótesis de prueba del ANOVA para la extracción por UAE.

Concentración de etanol	Tiempo de extracción	Interacción de factores
$H_0: \tau_i = 0,$	$H_0: \beta_j = 0,$	$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0, \text{ para toda } i, j$
$H_1: \text{al menos una } \tau_i \neq 0,$	$H_1: \text{al menos una } \beta_j \neq 0,$	$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0$
$i = 50\%, 75\%, 100\%$	$j = 15\text{min}, 30\text{min}$	$k = 1, 2, 3 \text{ para } i = 50\%, 100\%$ $k = 1 \text{ para } i = 75\%$

En la **Tabla 40**, se muestran los resultados del análisis de varianza para el rendimiento de la extracción por MSPD.

Tabla 40.

Análisis de varianza para el rendimiento obtenido por extracción MSPD. A: Concentración de etanol; B: Soporte sólido; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	CM	Razón-F	Valor-P
A	977,894	2	488,947	595,31	0,0000
B	124,033	1	124,033	15,10	0,0046
AB	11,187	2	0,559	6,81	0,0187
Residuos	0,657	8	0,082		
Total	101,572	13			

Según la **Tabla 40**, el valor-P fue menor de 0,05 en los dos factores, por lo tanto, se rechazaron las tres hipótesis nulas que indicaban que tanto los factores como sus combinaciones no tenían influencia significativa sobre el rendimiento. Es decir, se concluye que la concentración de etanol y el soporte sólido sí tienen un efecto estadísticamente relevante con un nivel de confianza de 95,0%.

En la **Tabla 41**, se muestran los resultados del análisis de varianza para el rendimiento de la extracción por UAE. Según la **Tabla 41**, el valor-P fue menor de 0,05 en los dos factores, es decir, se concluye que la concentración de etanol y el tiempo de extracción sí tienen un efecto estadísticamente relevante con un nivel de confianza de 95,0%. Sin embargo, el valor-P de la combinación entre la concentración de etanol y el tiempo mostró que ésta no influye mayormente sobre el rendimiento de la extracción.

Tabla 41.

Análisis de varianza para el rendimiento obtenido por extracción MSPD. A: Concentración de etanol; B: Tiempo; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio.

Fuente	Suma de cuadrados	GL	CM	Razón-F	Valor-P
A	664,566	2	332,283	749,65	0,0000
B	131,461	1	131,461	29,66	0,0006
AB	0,0928762	2	0,0464381	1,05	0,3943
Residuos	0,3546	8	0,044325		
Total	685,636	13			

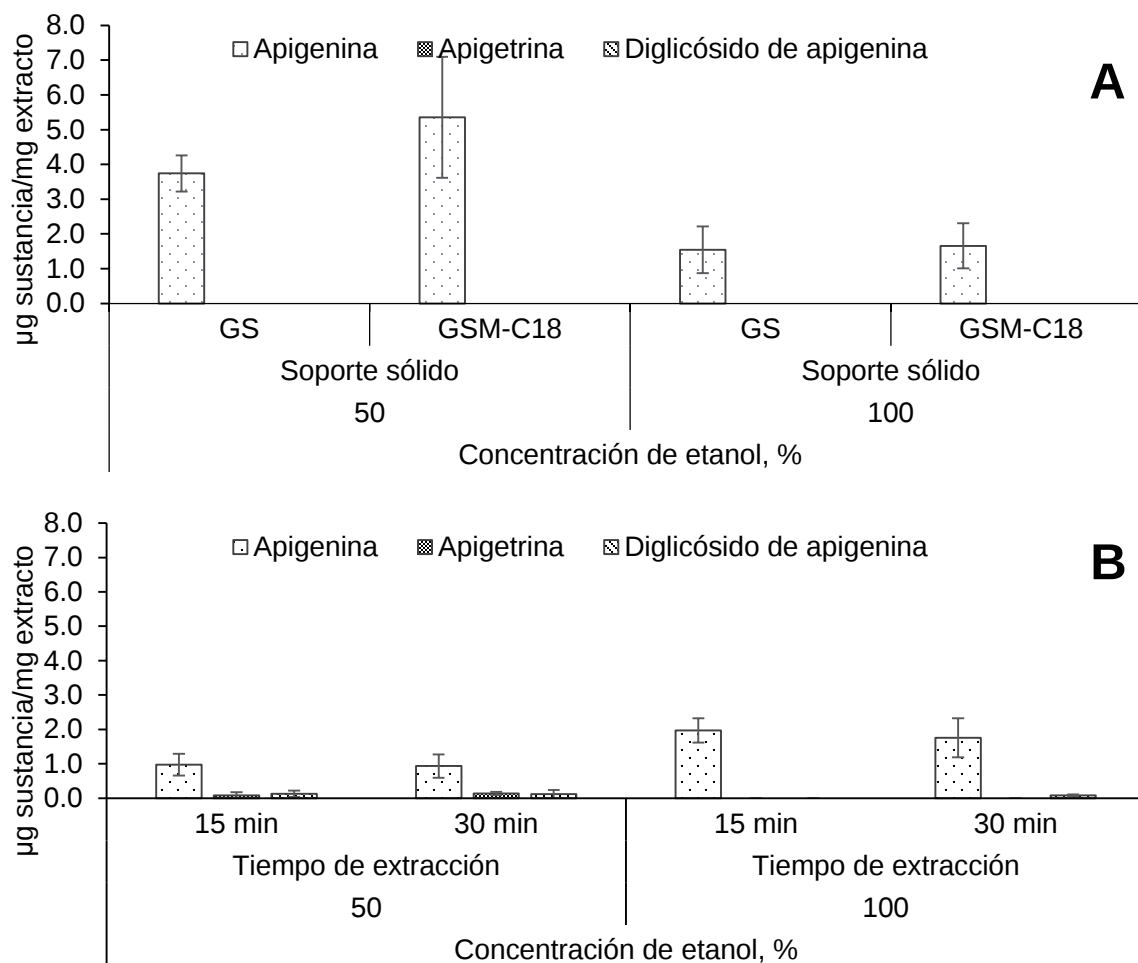
4.5 Comparación del contenido de flavonoides en los extractos de pachulí obtenidos por MSPD y UAE

El contenido de los flavonoides en todos los extractos de pachulí varió según el parámetro evaluado para cada técnica de extracción. En MSPD y UAE, el mayor contenido de flavonoides se obtuvo con una concentración de etanol del 100%, con aproximadamente 40,42 µg de flavonoides/ mg de extracto para MSPD (GSM-C₁₈) y 43,96 µg de flavonoides/ mg de extracto para UAE (30 min de extracción). Con base en lo anterior, se concluyó que aunque los rendimientos de extracción con etanol al 100% fueron los más bajos (Véanse **Tablas 17 y 18**), la calidad de los extractos fue la más alta en términos de la cantidad de polifenoles presentes en *P. cablin*.

Según el contenido de flavonoides, clasificados según su familia estructural, el mayor contenido de las moléculas derivadas de flavonas se obtuvo en el extracto MSPD con GSM-C₁₈ y 50% de etanol ($5 \pm 1,7$ µg de apigenina/ mg de extracto etanólico). Sin embargo, solo en los extractos por UAE aparecen apigetrina y el diglicósido de apigenina (**Figura 40**).

Figura 40.

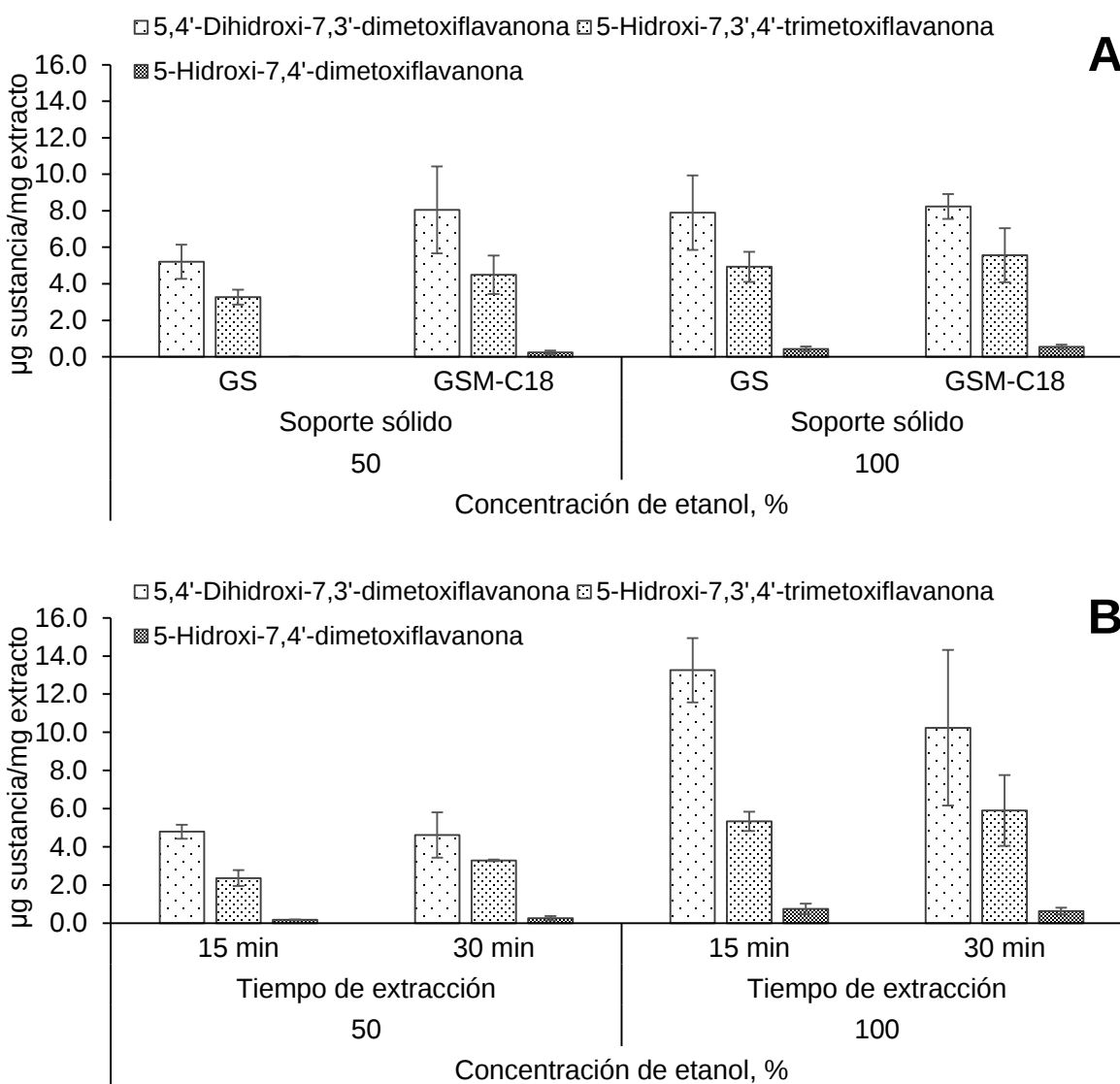
Cantidades de apigenina, apigetrina y el diglicósido de apigenina (μg de sustancia/ mg de extracto) presentes en los extractos etanólicos de *P. cablin*, obtenidos por: **A.** MSPD y **B.** UAE.



Para las moléculas derivadas de flavanona, se determinó que en la extracción por MSPD, el soporte sólido GSM-C₁₈ fue el mejor absorbente y que la concentración de etanol del 100% extrajo el mayor contenido de estas moléculas. El efecto del solvente sobre la extracción de las flavanonas se vio más pronunciado en la extracción por UAE, indiferentemente del tiempo de extracción (Figura 41).

Figura 41.

Cantidades de 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona, 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona y 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona (μg de sustancia/ mg de extracto) presentes en los extractos etanólicos de *P. cablin*, obtenidos por: **A.** MSPD y **B.** UAE.

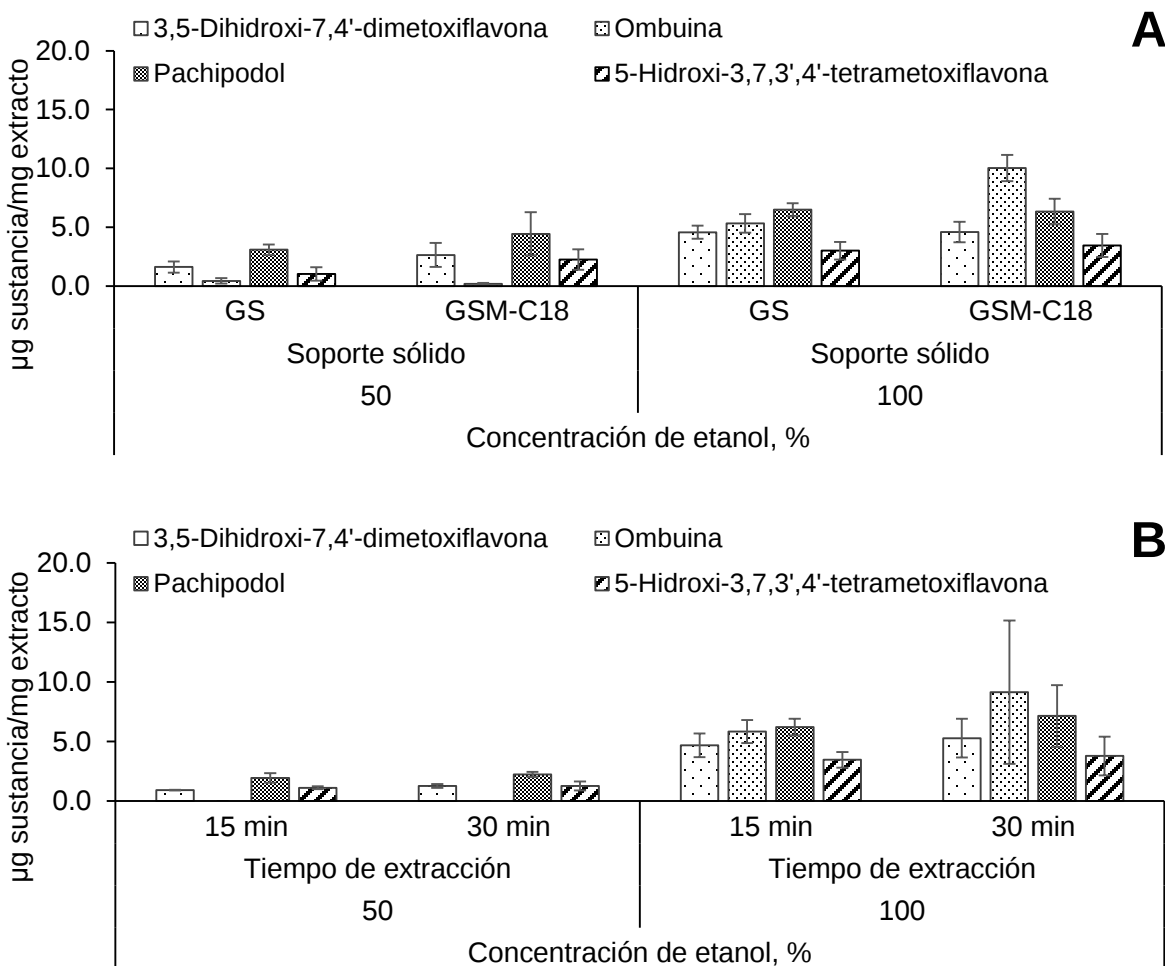


Para las moléculas derivadas de flavovol, se determinó que en la extracción por MSPD, la concentración de etanol del 100% permitió extraer el mayor contenido flavonoles; entre los soportes sólidos de gel de sílice y sílice modificada C₁₈, no hubo diferencias significativas. En la

extracción por UAE, se evidenció que la concentración de etanol del 100% extrajo mayoritariamente los flavonoles sin diferencias significativas entre los dos tiempos de extracción evaluados (**Figura 42**).

Figura 42.

Cantidades de 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, ombuina, pachipodol y retusina -5-hidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona- (μg de sustancia/ mg de extracto) presentes en los extractos etanólicos de *P. cablin*, obtenidos por **A. MSPD** y **B. UAE**.



5. Conclusiones

Los metabolitos secundarios volátiles de *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth (familia Lamiaceae) (Herbario UIS, N° 20890), se aislaron de las partes aéreas de la planta (hojas, tallos y su mezcla), usando las técnicas destilativas de hidrodestilación asistida por la radiación de microondas (MWHD) y arrastre con vapor (AV). Los aceites esenciales (AE) obtenidos mostraron variaciones en su rendimiento y composición química de acuerdo con el tiempo de secado postcosecha, la parte de la planta, el tratamiento de hidrólisis ácida, la técnica y el tiempo de destilación, y el almacenamiento del AE (envejecimiento). Los componentes mayoritarios en los aceites esenciales fueron pachulol (33,5 - 53,7%), α -bulneseno (10,4 - 16,5%) y α -guaieno (7,5 - 16,4%), excepto en el AE de los tallos, cuyos compuestos fueron pachulol (38,2%), pogostona (31%) y pogostol (3,4%). El rendimiento del AE de *P. cablin* dependió mayormente de las hojas. Con base en los resultados de composición química de todos los AE analizados, se determinó que la planta bajo estudio fue quimiotipo pachulol, cuyo alto contenido reveló un AE de alta calidad y valor comercial.

Se identificaron por GC/MS y GCxGC/HRTOF-MS 46 compuestos en los AE de *P. cablin*. La identificación tentativa de las sustancias, se realizó por la comparación de los datos espectrales experimentales (espectros de masas de baja y alta resolución e índices de retención lineales obtenidos en columnas cromatográficas con fases estacionarias apolar y polar) con los datos disponibles en la literatura científica y en las bases de datos. El establecimiento de la fórmula elemental del ion molecular, iones-producto y la medición de las masas exactas, confirmó la identidad de la mayoría de las sustancias presentes en los AE. En los casos en que no fue posible confirmar la identidad de la sustancia, únicamente se enunció su fórmula elemental.

Los metabolitos secundarios no volátiles de *P. cablin*, se aislaron por las técnicas de dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) y extracción con disolventes asistida por ultrasonido (UAE), usando etanol como solvente de extracción. El análisis de varianza del diseño experimental planteado en la extracción por MSPD mostró que la combinación de la concentración de etanol y la naturaleza del soporte sólido tuvieron un efecto estadísticamente relevante sobre el rendimiento de extracción. En cambio, el análisis de varianza de los experimentos de extracción por UAE reveló que la combinación de la concentración de etanol y el tiempo de extracción no influyeron mayormente sobre el rendimiento de extracción. En MSPD y UAE, se obtuvieron rendimientos más altos con etanol al 50%.

Se identificaron por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap) diez flavonoides en los extractos etanólicos de *P. cablin*. El conjunto de datos espectrales, *i.e.*, espectros de masas obtenidos en modos de barrido completo (*Full MS Scan*) y a diferentes energías de colisión (HCD, 10 - 40 V), medición de masas exactas y relación isotópica, fórmulas elementales de los iones-producto y estudio de los patrones de fragmentación, permitió confirmar la identidad química de los flavonoides aislados. En el presente estudio, se reportó por primera vez un diglicósido de apigenina, de fórmula C₂₆H₂₈O₁₄, en el extracto etanólico de *P. cablin*.

Los extractos etanólicos obtenidos por MSPD y UAE, mostraron variaciones significativas en la cantidad de flavonoides, según la concentración de solvente usada. La concentración de etanol (100%), extrajo el mayor contenido de flavonoides en MSPD (40,42 µg de flavonoides/ mg de extracto, con un soporte sólido de sílice modificada C₁₈) y en UAE (43,96 µg de flavonoides/ mg de extracto, durante 30 min de extracción). Para ambas técnicas de extracción, los compuestos mayoritarios fueron los mismos, 5,4'-dihidroxi-7,3'-dimetoxiflavanona (8,2 ± 0,68 y 10 ± 4,1 µg de sustancia/ mg de extracto, respectivamente), ombuina (10 ± 1,1 y 9 ± 6,0 µg de sustancia/ mg

de extracto), pachipodol ($6 \pm 1,1$ y $7 \pm 2,6$ μg de sustancia/ mg de extracto) y 5-hidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavanona ($6 \pm 1,5$ y $6 \pm 1,9$ μg de sustancia/ mg de extracto).

Referencias Bibliográficas

- Adams, R. (2007). *Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry*. Cuarta edición. Illinois, EE.UU: Editorial Allured Publishing Corporation.
- Adria, J.; Hasan, Z. & Idris, H. (1990). *Some pest of patchouli (Pogostemon cablin Benth.)*. Pemberitaan Penelitian Tanaman Industri. 16 (2). 59-64.
- Akhila, A. & Nigam, M. (1984). *Gas chromatography-mass spectroscopy analysis of the essential oil of Pogostemon cablin (Patchouly oil)*. Fitoterapia. (55). 363-365.
- Albuquerque, E.; Lima, J.; Souza, F.; Silva, I...; Santos, A.; Araújo, A.; Blank, A.; Lima, R.; Alves, P. & Bacci, L. (2013). *Insecticidal and repellence activity of the essential oil of Pogostemon cablin against urban ants species*. Acta Tropica. (127). 181-186.
- Angadi, S. & Vasanthakumar, T. (1995). *Patchouli*. Advances in Horticulture: Medicinal and Aromatic Plants. (11). 751-771.
- Anonis, D. (2007). Woody notes in perfumery: Patchouli in fragrances, part II. *Fragrance & Flavorist*. (32). 30-35.
- Babushok, V.; Linstrom, P. & Zenkevich, I. (2011). *Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils*. Journal of Physical and Chemical Reference Data. 40 (4). 1-47.
- Baby, K. & Ranganathan, T. (2016a). Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomun maton.*) volatile oil. *Industrial Crops and Products*. 89. 200-206.

- Baby, K. & Ranganathan, T. (2016b). *Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of fennel (Foeniculum vulgare) volatile oil*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 8. 248-256.
- Barata, A.; Rocha, F.; Lopez, V. & Carvalho, A. (2016). *Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare*. Industrial Crops and Products. 88. 8-11.
- Barker, S. (2007). *Review: Matrix solid-phase dispersion (MSPD)*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 70. 151-162.
- Bhatia, S. & Letizia, C.; Api, A. (2008). *Fragrance material review on patchouli alcohol*. Food and Chemical Toxicology. 46. S255-S256.
- Bulliqli, E. (2018). *Optimising social ecosystems: how improving the lives of patchouli farmers improves the patchouli product*. Essential Oils Market Report, winter 2018, Ultra International B.V. 46-50. Enlace: ultranl.com/market/. Fecha de consulta: abril y mayo de 2020.
- Bunrathep, S.; Lockwood, G.; Songsak, T. & Ruangrunsi, N. (2006). *Chemical Constituents from Leaves and Cell Cultures of Pogostemon cablin and Use of Precursor Feeding to Improve Patchouli Alcohol Level*. Science Asia. 293-296.
- Buré, C. & Sellier, N. (2004). *Analysis of the Essential Oil of Indonesian Patchouli (Pogostemon cablin Benth.) Using GC/MS (EI/CI)*. Journal of Essential Oil Research. 16. 17-19.
- Chakrapani, P.; Venkatesh, K.; Chandra, B.; Arun, B.; Prem, K.; Amareshwari, P. & Roja, A. (2013). *Phytochemical, pharmacological importance of Patchouli [Pogostemon cablin (Blanco) Benth] an aromatic medicinal plant*. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 21(2). 7-15.

- Chen, M.; Zhang, J.; Lai, Y.; Wang, S.; Li, P.; Xiao, J.; Fu, C.; Hu, H. & Wang, Y. (2012). Analysis de *Pogostemon cablin* from pharmaceutical research to market performances. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 1-13.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. (2015). *Chinese Pharmacopoeia of the People's Republic of China*. China. Décima edición. Beijing, China. Medical Science and Technology Press. 1. (45), 397.
- Chomchalow, N. (2002). Production of aromatic plants in Asia - An Overview. *AU Journal of Technology*. 6. (1). 43-53.
- Das, K. (2015). Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety. Cap. 72. Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) Oils. Primera Edición. San Diego, Estados Unidos. Academic Press. 633-639.
- Deguerri, F.; Pastore, L.; Wu, S.; Clark, A.; Chappell J. & Schalk, M. (2006). The diverse sesquiterpene profile of patchouli, *Pogostemon cablin*, is correlated with limited number of sesquiterpene synthases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 454. 123–126.
- Essential Oils and Oleoresins Market Insider. (2016). International Trade Center. 1-31. Boletín de Octubre - 2016. Intracen. www.intracen.org.
- Essential Oils Price Information. (2015). International Trade Center. 1-14. Intracen. www.intracen.org.
- Essential Oils Market Report. (2020). Spring 2020. Ultra International B.V. 36-44. Ultranal. <http://ultranl.com/market/>.
- Farooqui, A. & Sreeramu, B. (2001). *Cultivation of medicinal and aromatic crops*. Bangalore, India. Universities Press Ltd. 424.
- Feng, C.; Sui, C. & Wu, H. (2007). Synthesizing site and storing position of essential oil in

- Pogostemon cablin*. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 38. (1). 116-119.
- Figueiredo, A.; Barroso, J.; Pedro, L. & Scheffer, J. (2008). Factors affecting secondary metabolites production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*. 23. 213-226.
- Garbuio, C.; Biasi, L.; Kowalski, A.; Signor, D.; Machado, E. & Deschamps, C. (2007). Cutting propagation of patchouli with different number of leaves and types of cuttings. *Scientia Agricola*. 8. 391-398.
- Guan, L.; Quan, L...; Xu, L. & Cong, P. (1994). Chemical constituents of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 19 (6). 355-356.
- Guenther, E. (1972). The Essential Oils. Vol III. Essential oils of the plant family Labiatae. New York. EE.UU. Krieger Publishing Company. 552-575.
- Guo, J.; Yuan, Y.; Liu, Z. & Zhu, J. (2013). Development and structure of internal glands and external glandular trichomes in *Pogostemon cablin*. *Plos One*. 8. 10. 1-12.
- Hartmann, H. & Kester, D. (2011). *Plant propagation: principles and practices*. Octava edición. New York, EE.UU. Prentice-Hall. 915.
- Holmes, P. (1997). Patchouli – The colours within the darkness. *The International Journal of Aromatherapy*. 8. (1). 18-22.
- Hosni, K.; Hassen, I.; Chaâbane, H.; Jemli, M.; Dallali, S.; Sebei, H. & Casabianca, H. (2013). Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. *Industrial Crops and Products*. 47. 291-299.
- Howarth, J. (2015). Natural product supply bulletin: Patchouli, Mexican Lime and the Crimean Conflict. *Perfumer & Flavorist*. 40. 32-37.

- Hu, L.; Li, S.; Cao, H.; Liu, J.; Gao, J.; Yang, F. & Wang, Y. (2006). GC-MS fingerprint of *Pogostemon cablin* in China. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 42. 200-206.
- Husain, A.; Virmani, O.; Sharma, A.; Kumar, A. & Misra, L. (1988). Major Essential Oil-Bearing Plants of India. Primera edición. Lucknow, India. *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*. 237.
- Husain, A. (1994). *Essential Oil Plants and Their Cultivation*. Primera edición. Lucknow, India: Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants. 136-139.
- Hussin, N.; Mondello, L.; Costa, R.; Dugo, P.; Yusoft, N.; Yarmo, M.; Wahab, A. & Said, M. (2012). Quantitative and physical evaluation of patchouli essential oils obtained from different sources of *Pogostemon cablin*. *Natural Product Communications*. 7. (7). 927-930.
- International Standard (2002). . Oil of Patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]. *International Organization for Standardization*. Segunda edición. 1-6.
- Itokawa, H.; Suto, K. & Takeya, K. (1981). Studies on a Novel *p*-Coumaroyl glucoside of apigenin and on other flavonoids isolated from Patchouli (Labiatae). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 29 (1). 254-256.
- Jurd, L. (1962). The selective alkylation of polyphenols. II. Methylation of 7-, 4'-, and 3'-Hydroxyl groups in flavonols. *Journal of Organic Chemistry*. 27. 1294-1297.
- Khan, R. & Reddy, P. (1991). Occurrence and distribution of potentially pathogenic endophytic nematodes associated with some ornamental medicinal and aromatic crops. *Indian Phytopathology*. 44 (4). 501-504.
- Kumar, D.; Mehera, B.; Kalra, A.; Bijalwan, A. & Tripathi, M. (2014). Effect of growth regulators on vegetative propagation and growth of patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.)

- cuttings. *Asian Journal of Science and Technology*. 5. (6). 335-339.
- Lawrence, B. (2009). A preliminary report on the world production of some selected essential oils and countries. *Perfumer & Flavorist*. 34. 38-44.
- Li, K.; Zhang, H.; Xie, H.; Liang, Y.; Wang, X. & Ito, Y. (2011). Preparative isolation and purification of five flavonoids from *Pogostemon cablin* Benth by high-speed countercurrent chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 34. 1617-1629.
- Li, P; Yin, Z.; Li, S.L.; Huang, X.; Ye, W. & Zhang, Q. (2014). Simultaneous determination of eight flavonoids and pogostone in *Pogostemon cablin* by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 37. 1771-1784.
- Li, W.; Wei, G.; Pan, C.M.; Liu, X.X.; Huang, S. & Xiu, H. (2004). Investigation on the influential factors of the volatile oil and main constituent content in *Pogostemon cablin*. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 29. 28-31.
- Liu, Y.; Luo, J.; Feng, Y.; Guo, X. & Cao, H. (2002). DNA profiling of *Pogostemon cablin* chemotypes differing in essential oil composition. *Acta Pharmaceutica Sinica*. 37. (4). 304-308.
- Luo, J.; Feng, Y.; Guo, X. & Li, X. (1999). GC-MS analysis of volatile oil of *Herba Pogostemonis* collected from Gaoyao county. *Journal of Chinese Medicinal Material*. 22. (1). 25-28.
- Luo, J.; Guo, X. & Feng, Y. (2002). Constituents analysis on volatile oil of *Pogostemon cablin* from different collection time cultivated in Hainan. *Journal of Chinese Medicinal Materials*. 25. (1). 21-23.
- Luo, J.; Liu, Y.; Feng, Y.; Guo, X. & Cao H. (2003). Two chemotypes of *Pogostemon cablin* and

- influence of region of cultivation and harvesting time on volatile oil composition. *Acta Pharmacologica Sinica*. 38. 307-310.
- Mabry, T.; Markham, K. & Thomas, M. (1970). The systematic identification of flavonoids. New York, EE.UU. Springer. 1-175.
- Maheshari, M.; Vasantha-Kumar, T.; Sharma, N. & Chandel, K. (1993). Patchouli - An Indian perspective. *Indian Perfumer*. 37. 9-11.
- Milchard, M.; Clery, R.; Esdale, R.; Gates, L.; Judge, F.; Moss, N.; Moyler, D.; Sherlock, A.; Starr, B.; Webb, J. & Newman, E. (2010). Application of gas-liquid chromatography to the analysis of essential oils: GLC fingerprint chromatograms of five essential oils. *Perfumer & Flavorist*. 35. 34-39.
- Murugan, R. & Livingstone, C. (2010). Origin of the name “patchouli” and its history. *Current Science*. 99 (9). 1274-1276.
- Muni-Ram; Dasha-Ram; Singh, H. & Naqvi, A.; Sushil-Kumar. (1999). Studies on intercropping of patchouli (*Pogostemon cablin*) with papaya (*Carica papaya*). *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 21 (2). 358-360.
- Narayanappa, M.; Chacko, C. & Vasantha, T. (1984). Wild of patchouli – a new disease caused by *Rhizoctia solani*. *Current Science*. 53 (13). 707.
- Nath, J.; Deka, K.; Saud, B.; Maheswarappa, H. (2015). Intercropping of medicinal and aromatic crops in adult coconut garden under Brahmaputra valley region of Assam. *Journal of Plantation Crops*. 43 (1). 17-22.
- Noveriza, R.; Suastika, G.; Hidayat, S. & Kartosuwondo, U. (2012). Potyvirus associated with mosaic disease on patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth) plants in Indonesia. *Journal of ISSAAS*. 18 (1). 131-146.

- Overwalle, G. (2006). Medicinal and Aromatic Plants. Cap. 9. Intellectual Property Protection for Medicinal and Aromatic Plants. Holanda. 121-128. Library. https://library.wur.nl/frontis/medicinal_aromatic_plants/09_van_overwalle.pdf. Fecha de acceso: 30 de abril de 2020.
- Paul, A.; Thapa, G.; Basu, A.; Mazumdar, P.; Kalita, M. & Sahoo, L. (2010). Rapid plant regeneration, analysis of genetic fidelity and essential aromatic oil content of micropropagated plants of patchouli, *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. –An industrially important aromatic plant. *Industrial Crops and Products*. 32. 366-374.
- Park, E.; Park, H.; Lee, J. & Kim, J. (1988). Licochalcone A: An inducer of cell differentiation and cytotoxic agent from *Pogostemon cablin*. *Planta Medica*. 64. 464-466.
- Petrovska. B. (2012). Historial review of medicinal plants usage. *Pharmacological Reviews*. 6. 1-5.
- Puttana, K.; Rao, P.; Gopinath, T. & Ramesh, S. (2005). Effect of shade and nitrogen on herb yield and longevity of patchouli (*Pogostemon cablin*). *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 27 (2). 297-300.
- Ramya, H. & Palanimuthu, V. (2013). Singla, Rachna. An introduction to patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) – A medicinal and aromatic plant: It's importance to mankind. *Agricultural Engineering International*. 15 (2). 243-250.
- Sarma, A. & Sarma, T. (2003). Patchouli oil recovery and effect of leaf ageing. *Indian Perfumer*. 47. 151-154.
- Sarwar, M.; Narayana, M. & Virmani, O. (1983). Patchouli and its cultivation in India. *Central Institute of Medicinal and Aromatic Plants*. 13.
- Singh, M. & Ganesh Rao, R. (2009). Influence of sources and doses of N and K on herbage, oil

- yield and nutrient uptake of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.] in semi-arid tropics. *Industrial Crops and Products*. 29. 229-234.
- Singh, R.; Singh, M.; Srinivas, A.; Prakasa Rao, E. & Puttana, K. (2015). Assessment of organic and inorganic fertilizers for growth, yield and essential oil quality of industrially important plant patchouli (*Pogostemon cablin*) (Blanco) Benth. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18: (1). 1-10.
- Stashenko, E. & Martínez, J. (2010). Algunos aspectos prácticos para la identificación de analitos por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Scientia Chromatographica*. 2 (1). 28-46.
- Stashenko, E. & Martínez, J. (2011). Algunos consejos útiles para el análisis cromatográfico de compuestos orgánicos volátiles. *Scientia Chromatographica*. 3 (3). 199-221.
- Stashenko, E. & Martínez, J. (2014). Gas chromatography-mass spectrometry. *Advances in gas chromatography*, Rijeka, Croacia. *IntechOpen*. 1-38.
- Storck, R. & Deschamps, C. (2015). Teor e composição do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) após diferentes tempos de secagem em estufa e temperatura ambiente. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 17. 4. 570-576.
- Su, Z.; Li, Y.; Liu Y.; Chen J. & Lai, X. (2019). Application of β -patchoulene and application of pharmaceutical composition including β -patchoulene. *State Intellectual Property Office of the P.R.C.* 2019. Número de patente: 110151739 A. 1-9.
- Sugimura, Y.; Ichikawa, Y.; Otsuji, K.; Fujita, M.; Toi, N.; Kamata, N.; del Rosario, R.; Luingas, G.R. & Taga-an, G. (1990). Cultivarietal comparison of patchouli plants in relation to essential oil production and quality. *Flavour and Fragrance Journal*. 5. 109-114.
- Sujatha, S.; Ravi-Bhat; Kannan, C.; Balasimba, D. (2011). Impact of intercropping of medicinal

- and aromatic plants with organic farming approach on resource use efficiency in arecanut (*Areca catechu L.*) plantation in India. *Industrial Crops and Products*. 33. 78-83.
- Sumathi, M.; Shashekala, S.; Shankaraiah, N.; Ravi-Kumar, P. & Kavitha, V. (2012). Effect of nitrogen and VAM levels on herbage and oil yield of patchouli (*Pogostemon patchouli* Pettle.). *International Journal of Science and Nature*. 3 (3). 571-579.
- Sundaresan, V.; Singh, S.; Mishra, A.; Shasany, A.; Darokar, M.; Kalra, A. & Naqvi, A. (2009). Composition and comparison of essential oils of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. (Patchouli) and *Pogostemon travancoricus* Bedd. var. *travancoricus*. *Journal of Essential Oil Research*. 21. 220-222.
- Swamy, M.; Mohanty, S.; Sinniah, U. & Maniyam, A (2015a). Evaluation of Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) Cultivars for growth, yield and quality parameters. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 18 (4). 826-832.
- Swamy, M.; Sinniah, U. (2015b). A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth: an aromatic medicinal plant of industrial importance. *Molecules*. 20. 8521-8547.
- Swamy, M. & Sinniah, U. (2016). Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Botany, agrotechnology and biotechnological aspects. *Industrial Crops and Products*. 87. 161-176.
- Ternai, B & Markham, K. (1976). Carbon-13 NMR studies of flavonoids - I: flavones and flavonols. *Tetrahedron*. 32. 5. 565-569.
- Tsai, Y. Hsu, H.; Yang, W.; Tsai, W.; Chen C. & Watanabe, T. (2007). α -Bulnesene, a PAF inhibitor isolated from the essential oil of *Pogostemon cablin*. *Fitoterapia*. 78. 7-11.
- Valesi, A, Rodríguez, E., Vander-Velde G. & Mabry, T. (1972). Methylated flavonols in *Larrea cuneifolia*. *Phytochemistry*. 11. (9). 2821-2826.

- Van Beek, T.A.; Joulain, D. (2018). The essential oil of patchouli, *Pogostemon cablin*: A review. *Flavour and Fragrance Journal*.33. 6-51.
- Venugopal, C.; Mokashi, A.N & Jholgiker, P. (2008). Influence of different propagation environment and IBA treatments on rooting efficiency of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) cuttings. *Journal of Medicinal and Aromatic Plant Sciences*. 30. 146-148.
- Verma, R. (2002). Distillate water: Overlooked golden drops. *Medicinal & Aromatic Plants*. 1. (3). 1-2.
- Verma, R.S.; Rajendra, C.; Chauhan, P.; Chauhan, A. (2012). Assessment of similarities and dissimilarities in the essential oils of patchouli and Indian valerian. *Journal of Essential Oil Research*. 24. (5). 487-491.
- Verma, R.; Padalla, R.; Chauhan, A.; Singh, V. (2019). Chemical composition of leaves, inflorescence, whole aerial-parts and root essential oils of patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.}. *Journal of Essential Oil Research*. 1-7.
- Vijaykumar, K. (2004). Patchouli and India – A great leaf forward. *National Seminar of Prospectus and Potentials of Medicinal and Aromatic Crops*. 106-107.
- World Health Organization (WHO). (2013). Traditional Medicine Strategy 2014-2023. Geneva.
- Wu, Y.; Li, C.; Li, X.; Yuan, M.; Hu, X. (2013). Comparison of the essential oil compositions between *Pogostemon cablin* and *Agastache rugosa* used as herbs. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 16. (6). 705-713.
- Wu, Y.; Guo, Q. & Zheng, H. (2007). Textual research on history of introduction and herbal medicine of *Pogostemon cablin*. *China Journal of Chinese Materia Medica*. 32 (20). 2114-2117.

- Xiao, H.; Krucker, M.; Albert, K. & Liang, X. (2004). Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1032. 117-124.
- Yu, J.; Qi, Y.; Luo, G.; Duan, H. & Zhou, J. (2012). Extraction and analysis of the essential oil in *Pogostemon cablin* by enzymatic hydrolysis and inhibitory activity against Hela cell proliferation. *Journal of Chinese Medicinal Materials*. 35. (5). 796-799.
- Zaim, M.; Ali, A.; Joseph, J. & Khan, F. (2013). Serological and molecular studies of a novel virus isolate causing yellow mosaic of patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.]. *Plos One*. 8 (12). 1-10.
- Zhou, L.; Xu, M.; Yang, C.; Wang, Y. & Zhang, Y. (2011). New patchoulol-type sesquiterpenoids from *Pogostemon cablin*. *Helvetica Chimica Acta*. 94 (2). 218-223.
- Zhu, Y. (1998). Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and applications. Edición Ilustrada. Florida, Estados Unidos. *CRC Press*. 307-308.
- Žiaková, A.; Brandšteterová, E. & Blahová, E. (2003). Matrix solid-phase dispersion for the liquid chromatographic determination of phenolic acids in *Melissa officinalis*. *Journal of Chromatography A*. 983. 271-275.

Apéndices.

Apéndice A. Curvas de calibración, obtenidas por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap), de las sustancias de referencia de apigenina y naringenina

Figura A1.

Curvas de calibración en niveles bajo (28,5 - 2850 ppb) y alto (1140 - 22800 ppb) de apigenina, obtenidas por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap).

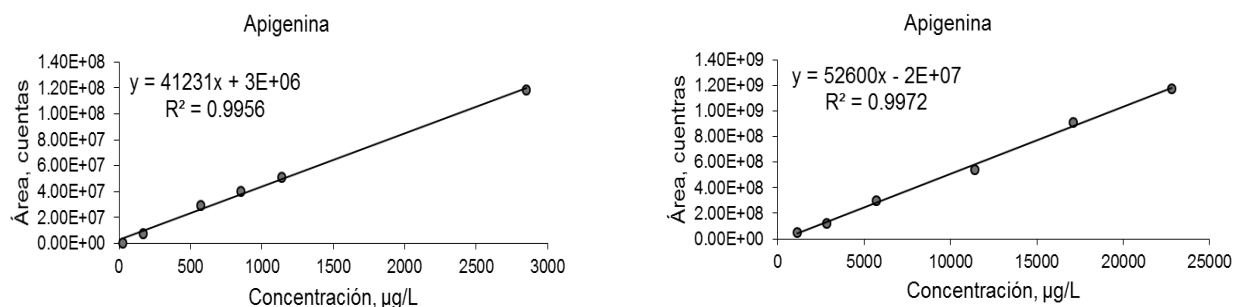


Figura A2.

Curvas de calibración en niveles bajo (34 - 1360 ppb) y alto de naringenina (1020 - 13600 ppb), obtenidas por LC/MS (UHPLC-ESI⁺-HRMS-Orbitrap).

