

**EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
PRESENTES EN LOS FRUTOS MADUROS DE *Carica Candamarcensis*
Hooker *filius***

**DIANA MARÍA GÓMEZ NARVÁEZ
NANCELY MIROSALBA MORÁN PASTÁS**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

**EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS
PRESENTES EN LOS FRUTOS MADUROS DE *Carica Candamarcensis*
Hooker *filius***

**DIANA MARÍA GÓMEZ NARVÁEZ
NANCELY MIROSALBA MORÁN PASTÁS**

Trabajo presentado como requisito parcial para optar el título de
Químico

Asesor

M.Sc. ALBA TERESA ALVAREZ MARTÍNEZ

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
SAN JUAN DE PASTO
2005**

Nota de aceptación

Jurado

Jurado

San Juan de Pasto

Enero de 2005

A mis padres Lizandro Gómez y María Narváez, por su esfuerzo, dedicación y afecto incondicionales a lo largo de toda mi vida.

A mi hijo José Gabriel, por ser la mayor motivación para continuar y a quien amo profundamente.

A Patricia, mi hermana, quien ha sido ejemplo de superación y perseverancia.

Diana María Gómez Narváez

A Dios por darme la fortaleza para continuar a pesar de los obstáculos.

A mis padres Francisco Morán y Doris Pastás por su comprensión y por todos sus esfuerzos.

A mis hermanos Francisco, María Fernanda y Sebastián y a mi familia por su constante apoyo.

Mirosalba Morán Pastás

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos por toda la colaboración prestada, a los departamentos de Química y Biología de la Universidad de Nariño y al Laboratorio de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander bajo la dirección de la Dra. Elena Stashenko.

De manera especial a la M.Sc Alba Teresa Álvarez Martínez, quien hizo posible el desarrollo de esta investigación por su asesoría y constante colaboración.

CONTENIDO

	pág
INTRODUCCIÓN	20
1 DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	22
2 MARCO TEÓRICO	23
2.1 METABOLISMO VEGETAL	23
2.1.1 Metabolitos Primarios	23
2.1.2 Metabolitos secundarios	24
2.1.2.1 Aceites Esenciales	25
2.2 <i>Carica candamarcensis</i> Hooker <i>filius</i>	26
2.2.1 Descripción botánica	27
2.2.2 Origen y distribución	27
2.2.3 Usos	28
2.2.4 Antecedentes	28
2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN	29
2.3.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas	29
2.3.2 Destilación-extracción simultánea con solventes	32
2.4 TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS	34
2.4.1 Cromatografía de gases (GC)	34

2.4.2	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)	34
2.4.2.1	Correlación entre GC-MS e índices de retención de Kováts (I_K)	35
2.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
3	PARTE EXPERIMENTAL	37
3.1	RECOLECCIÓN Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL	37
3.1.1	Sistema de Muestreo	38
3.2	EXTRACCIÓN	39
3.2.1	Ensayos Preliminares	39
3.2.2	Estandarización	40
3.2.2.1	Hidrodestilación asistida por radiación con microondas	40
3.2.2.2	Destilación-extracción simultánea con solventes	40
3.3	ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	41
3.3.1	Ajuste de parámetros	41
3.3.1.1	Flujo óptimo	41
3.3.1.2	Nivel mínimo de detección	42
3.3.1.3	Nivel mínimo de cuantificación	42
3.3.1.4	Factor de respuesta	43
3.3.2	Identificación y cuantificación	43
4	RESULTADOS Y ANÁLISIS	46
4.1	MÉTODO ANALÍTICO	46

4.1.1	Flujo óptimo – Curva de Van Deemter	46
4.1.2	Nivel mínimo de detección	47
4.1.3	Nivel mínimo de cuantificación	47
4.1.4	Factor de respuesta	48
4.2	EXTRACCIÓN	49
4.2.1	Estandarización de las técnicas de extracción	52
4.2.1.1	Hidrodestilación asistida por radiación con microondas	53
4.2.1.2	Destilación-extracción simultánea con solventes	55
4.3	CUANTIFICACIÓN	56
4.4	IDENTIFICACIÓN	61
4.4.1	Clasificación de los compuestos identificados	66
4.4.2	Actividad Biológica	66
5.	CONCLUSIONES	72
6.	RECOMENDACIONES	74
	CITAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXOS	85

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Datos promedio para la determinación del flujo óptimo	46
Tabla 2. Determinación de la relación S/N para el nivel mínimo de cuantificación.	48
Tabla 3. Repetibilidad de las áreas cromatográficas a diferentes concentraciones de n-tetradecano determinado por GC-FID.	48
Tabla 4. Halos de inhibición producidos sobre poblaciones de <i>H. pylori</i> por AE's y extractos acuosos de <i>C.candamarcensis</i>	51
Tabla 5. Tratamientos aplicados en la estandarización de la técnica MWHD	52
Tabla 6. Tratamientos aplicados en la estandarización de la técnica DES	53
Tabla 7. ANDEVA de acuerdo con el número de compuestos extraídos por MWHD	53
Tabla 8. Prueba de comparación de medias (DMS)	54
Tabla 9. ANDEVA de acuerdo con la concentración de compuestos extraídos por MWHD	55
Tabla 10. ANDEVA de acuerdo con el número de COVs extraídos por DES	55
Tabla 11. ANDEVA de acuerdo con la concentración de COVs extraídos por DES	56
Tabla 12. Tiempos de retención, áreas y concentraciones de los compuestos presentes en el AE de los frutos de <i>C.candamarcensis</i>	58
Tabla 13. Tiempos de retención, áreas y concentraciones de los COVs presentes en los frutos de <i>C. candamarcensis</i>	60

Tabla 14	Identificación mediante los I_K de los compuestos del AE de <i>C. candamarcensis</i> extraído por MWHD	62
Tabla 15	Identificación mediante los I_K de los COVs de <i>C. candamarcensis</i> extraídos por DES	63
Tabla 16	Compuestos identificados en el AE de <i>C. candamarcensis</i> extraídos por MWHD	65
Tabla 17	COVs extraídos por DES identificados en <i>C. candamarcensis</i>	65

LISTA DE FIGURAS

	pág
Figura 1. Procesos comprometidos en el metabolismo vegetal	23
Figura 2. Metabolitos secundarios anticancerígenos	25
Figura 3. Frutos de <i>C. candamarcensis</i>	27
Figura 4. Estructuras de metabolitos secundarios volátiles	31
Figura 5. Equipo de destilación Clevenger	32
Figura 6. Equipo a microescala para la extracción de metabolitos volátiles con solventes de alta densidad	33
Figura 7. Frutos de <i>C. candamarcensis</i> con afecciones patógenas	37
Figura 8. Cultivo casero de <i>C. candamarcensis</i>	38
Figura 9. Equipo para MWHD	39
Figura 10. Equipo a microescala para DES	41
Figura 11. Cromatógrafo de gases con detector FID	44
Figura 12. Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas	45
Figura 13. Curva de Van Deemter	46
Figura 14. Determinación de la relación señal/ruido y nivel mínimo de Detección	47
Figura 15. Determinación del factor de respuesta	49
Figura 16. Estructuras de <i>Pucciniopsis</i>	50
Figura 17. Halos de inhibición observados en pruebas con AE de <i>C. candamarcensis</i>	51
Figura 18. Halos de inhibición observados en pruebas con extractos	52

acuosos de *C. candamarcensis*

Figura 19. Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por MWHD	57
Figura 20. Perfil cromatográfico por GC-FID de los COVs obtenidos por DES	60
Figura 21. Perfil cromatográfico por GC-MS del AE de <i>C. candamarcensis</i> extraído por MWHD	61
Figura 22. Perfil cromatográfico por GC-MS de los COVs extraídos por DES	63
Figura 23. Perfil cromatográfico por HRGC-MS del AE de <i>C. candamarcensis</i> extraído por MWHD	64
Figura 24. Abundancia relativa de las diferentes familias de compuestos identificados en el AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenido por MWHD	66
Figura 25. Abundancia relativa de las diferentes familias de compuestos identificados en los extractos de <i>C. candamarcensis</i> obtenidos por DES	67
Figura 26. Espectro de masas del 1-octanol	68
Figura 27. Posibles rutas de fragmentación del 1-octanol	68
Figura 28. Espectro de masas del Linalool	69
Figura 29. Posibles rutas de fragmentación del Linalool	69
Figura 30. Espectro de masas del Farnesol	70
Figura 31. Posibles rutas de fragmentación del Farnesol	70
Figura 32. Espectro de masas del Decanoato de butilo	71
Figura 33. Posibles rutas de fragmentación del Decanoato de butilo	71

LISTA DE ANEXOS

	pág
Anexo A. Metabolitos secundarios volátiles, identificados por Idstein y Col. en <i>C. candamarcensis</i>	85
Anexo B. Perfil cromatográfico por GC-FID de la mezcla de parafinas lineales C ₆ – C ₁₈	86
Anexo C. Tablas de datos ordenados para la estandarización de la técnica MWHD	87
Anexo D. Tablas de datos ordenados para la estandarización de la técnica DES	89
Anexo E. Ecuaciones aplicadas para el análisis de varianza unifactorial de un diseño DIA y un diseño DIA con submuestra	90
Anexo F. Estructuras de los compuestos identificados mediante I _k en el AE de <i>C. candamarcensis</i> extraído por MWHD	91
Anexo G. Estructuras de los COVs identificados mediante I _k extraídos por DES	93
Anexo H. Espectros de masas de los metabolitos secundarios identificados en el AE de <i>C. candamarcensis</i> obtenidos por MWHD y posibles rutas de fragmentación	94
Anexo I. Espectros de masas de los COVs identificados en los extractos de <i>C. candamarcensis</i> obtenidos por DES	117
Anexo J. Espectros de masas de los compuestos no identificados por I _k o por comparación con bases de datos	121
Anexo K. Clasificación por familias de los metabolitos secundarios identificados en los frutos maduros de <i>C. candamarcensis</i>	123

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Aceite esencial
AE's	Aceites esenciales
ANDEVA	Análisis de Varianza
CM	Cuadrados medios
CMe	Cuadrados medios del error
CMET	Cuadrados medios del error total
CMt	Cuadrados medios de los tratamientos
COVs	Compuestos orgánicos volátiles
CV	Coeficiente de variación
DES	Destilación-extracción simultánea con solventes
σ	Desviación estándar
DMS	Diferencia mínima significativa
DIA	Diseño irrestrictamente al azar
Fcal	F calculada
FC	Factor de corrección
FID	Flame Ionization Detector (Detector de ionización en llama)
Ftab	F tabulada
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

GL	Grados de libertad
GLe	Grados de libertad del error
GLEE	Grados de libertad del error experimental
GLEM	Grados de libertad del error de muestreo
GLt	Grados de libertad de los tratamientos
HCD	Codestilación de espacio de cabeza
HD	Hidrodestilación
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HRGC/MSD	High Resolution Gas Chromatography/Mass Selective Detector (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector selectivo de masas)
I_k	Índice de retención de Kováts
Istd	Estándar interno
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
MWHD	Hidrodestilación asistida por radiación con microondas
Rf	Factor de respuesta
SC	Suma de cuadrados
SCe	Suma de cuadrados del error
SCEE	Suma de cuadrados del error experimental
SCEM	Suma de cuadrados del error de muestreo
SCsub	Suma de cuadrados de las submuestras
SCT	Suma de cuadrados del total

SCt Suma de cuadrados de los tratamientos

t_R Tiempo de retención

ABSTRACT

Identification and quantification of main secondary metabolites present in the pulp of ripen fruits of *C. candamarcensis* were done. These metabolites were extracted from two different methods, the hydrodistillation assisted by radiation with microwaves (MWHD) and the simultaneous distillation-extraction helped by solvents (DES). The identification was carried out through the use of chromatography technique of gases with along to spectrometry of masses (GC-MS), while quantification was carried out through the internal estandarization method by using the n-tetradecane, through chromatography of gases with an ionization detector in fire (GC/FID). From obtained extracts by MWHD, 25 compounds were identified from which 72% corresponds to oxygenated compounds and the remaining 28% corresponds to saturated, unsaturated and aromatic hydrocarbons, monoterpenes, sesquiterpenes and nitrogenated compounds. Ten components were identified from extracts obtained by DES, and from which 7 are oxygenated compounds, 2 saturated hydrocarbons and 1 sesquiterpene.

RESUMEN

Se realizó la identificación y cuantificación de los principales metabolitos secundarios presentes en la pulpa de los frutos maduros de *C. Candamarcensis* extraídos por dos métodos diferentes, la hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) y la destilación-extracción simultánea con solventes (DES). La identificación se llevó a cabo mediante el uso de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), mientras que la cuantificación se realizó por el método de la estandarización interna utilizando n-tetradecano, mediante cromatografía de gases con un detector de ionización en llama (GC/FID). De los extractos obtenidos por MWHD se identificaron 25 compuestos de los cuales el 72% corresponde a compuestos oxigenados y el 28% restante a hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos nitrogenados. De los extractos obtenidos por DES se identificaron 10 componentes de los cuales 7 son compuestos oxigenados, 2 hidrocarburos saturados y 1 sesquiterpeno.

INTRODUCCIÓN

La química de los Productos Naturales ha despertado siempre el interés de los investigadores por su amplia distribución en todo el mundo y en las últimas décadas ha experimentado un importante desarrollo, debido a los avances en las técnicas de extracción, separación y medida de parámetros físico-químicos, así como por los nuevos conocimientos en métodos sintéticos, la consolidación de nuevos conceptos y su aplicación en campos interdisciplinarios como la farmacéutica, la industria de alimentos, textil, química orgánica y, sobre todo en cosmética y perfumería.

El estudio de la composición química de muchos organismos vegetales está justificado hoy en día por su empleo en la resolución de problemas de tipo médico, lo que hace suponer que quizá algunas especies vegetales conocidas en nuestra región también sean fuentes potenciales de sustancias con importancia farmacológica.

Debido a esto la Universidad de Nariño mediante la línea de investigación “Medio Ambiente y Salud” del Departamento de Biología planteó un macroproyecto denominado “Evaluación del efecto de los extractos naturales de diez especies regionales promisorias sobre una población de *Helicobacter pylori*” aprobado mediante acuerdo 082 del 2003, que tiene como objetivo principal determinar la actividad bacteriostática, bactericida o bacteriolítica de diferentes extractos de plantas sobre la bacteria mencionada, principal causante de las úlceras gástricas, muy difundidas en nuestro departamento.

Dentro de las plantas incluidas en el macroproyecto se encuentra la especie *Carica Candamarcensis* Hooker filius, sobre la cual se realizó el presente trabajo de investigación, en el que se extrajeron los metabolitos secundarios a partir de la pulpa de los frutos maduros procedentes del municipio de la Florida (Nariño); mediante las técnicas de MWHD y DES.

La cuantificación e identificación tentativa se llevó a cabo en la Universidad de Nariño, empleando las técnicas de GC y GC-MS utilizando el método de estandarización interna y los índices de retención de Kováts (I_K) respectivamente. Sin embargo, el análisis definitivo de la composición e identificación de los metabolitos secundarios se realizó por cromatografía de gases de alta resolución

(HRGC) con detector selectivo de masas (MSD), en el laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander, encontrándose 25 compuestos en el aceite esencial y 10 compuestos volátiles de los cuales la mayoría presentan estructuras de ésteres, algunos alcoholes y un compuesto nitrogenado.

Por último, el aceite esencial de la pulpa de los frutos maduros de *C. candamarcensis* fue sometido a pruebas biológicas con *H. pylori* estableciéndose que el extracto puede inhibir el crecimiento *in vitro* de la bacteria, por tanto el presente estudio representa un aporte importante al conocimiento de las propiedades de la flora del departamento de Nariño.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

En nuestra región existen varias especies vegetales que a pesar de ser tradicionalmente utilizadas con diferentes fines, aún no han sido analizadas detenidamente para determinar aspectos de gran importancia, tales como su composición química y los diferentes tipos de actividades biológicas que pueden exhibir; esto teniendo en cuenta que las condiciones del entorno afectan el metabolismo de cada planta, lo cual puede significar que en las especies residentes en nuestro departamento pueden encontrarse metabolitos diferentes a los reportados en la literatura.

Dentro de este grupo, se encuentra la especie *C. candamarcensis*, a la cual popularmente se le atribuyen algunos beneficios contra enfermedades infecciosas de tipo gástrico y pulmonar, por lo tanto considerando que actualmente el 80% de la población colombiana sufre de problemas gástricos, por causa de la bacteria *H. pylori* y que Nariño es la región que presenta una de las tasas de cáncer gástrico más altas [1-3] además de la presencia de bacterias resistentes a antibióticos [4], han surgido nuevas alternativas que tienen como propósito erradicar o controlar la población de *H. pylori* en pacientes infectados.

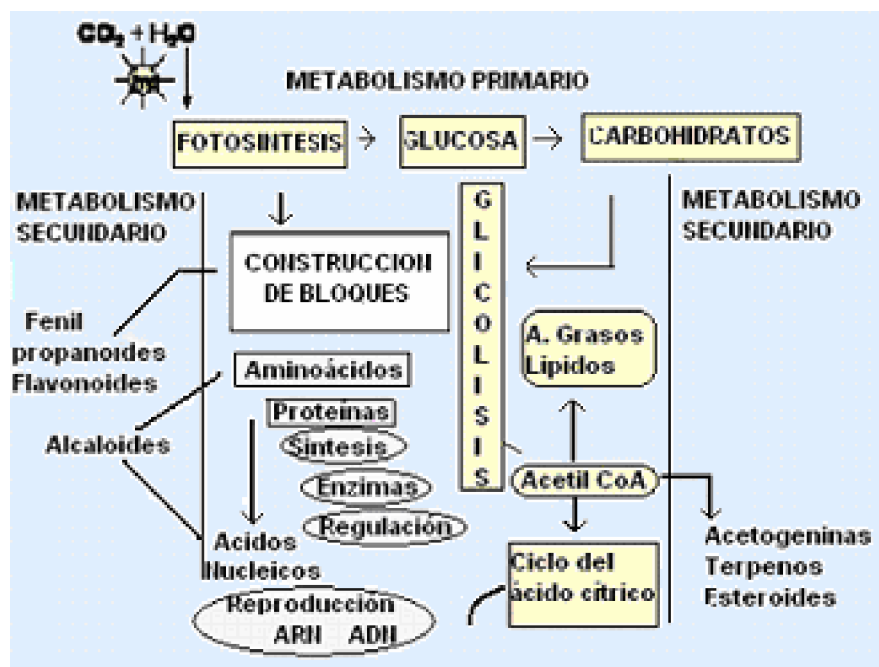
Tales alternativas se basan en el uso de extractos vegetales, de los cuales es necesario llevar a cabo un análisis químico exhaustivo acerca de su composición, con el fin de determinar el tipo de compuestos que pueden ser efectivos contra la bacteria; por lo tanto con el presente estudio se pretende establecer la posible aplicación de la especie *C. candamarcensis* como tratamiento natural para combatir las enfermedades causadas por *H. pylori* y de esta manera contribuir con el uso de los productos naturales en la erradicación de enfermedades importantes que aquejan a un alto porcentaje de la población regional y mundial.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 METABOLISMO VEGETAL

Es el conjunto de fenómenos físico-químicos que se producen en la planta, gracias a los cuales se llegan a sintetizar, en una serie de procesos anabólicos, los diversos elementos que forman el organismo, y los compuestos que son necesarios para sus funciones vitales (metabolismo primario) o para mecanismos de defensa contra el medio que los rodea (metabolismo secundario) [5].

Figura 1. Procesos comprometidos en el metabolismo vegetal.



Fuente: www.ugr.es/~quiored/pnatu/terpenoides.htm

2.1.1 Metabolitos primarios. Los metabolitos primarios comprenden aquellas sustancias de muy amplia difusión en la naturaleza (carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos o clorofilas) que se encuentran en todos los organismos vivos, siendo por lo tanto fisiológicamente esenciales [6].

El metabolismo primario compromete procesos químicos como: fotosíntesis, glicólisis, ciclo del ácido cítrico, síntesis de aminoácidos, transaminación, síntesis de proteínas, enzimas y coenzimas, síntesis de materiales estructurales, duplicación del material genético, reproducción de células (crecimiento), absorción de nutrientes, entre otros, que cada planta debe llevar a cabo para sobrevivir y reproducirse [7].

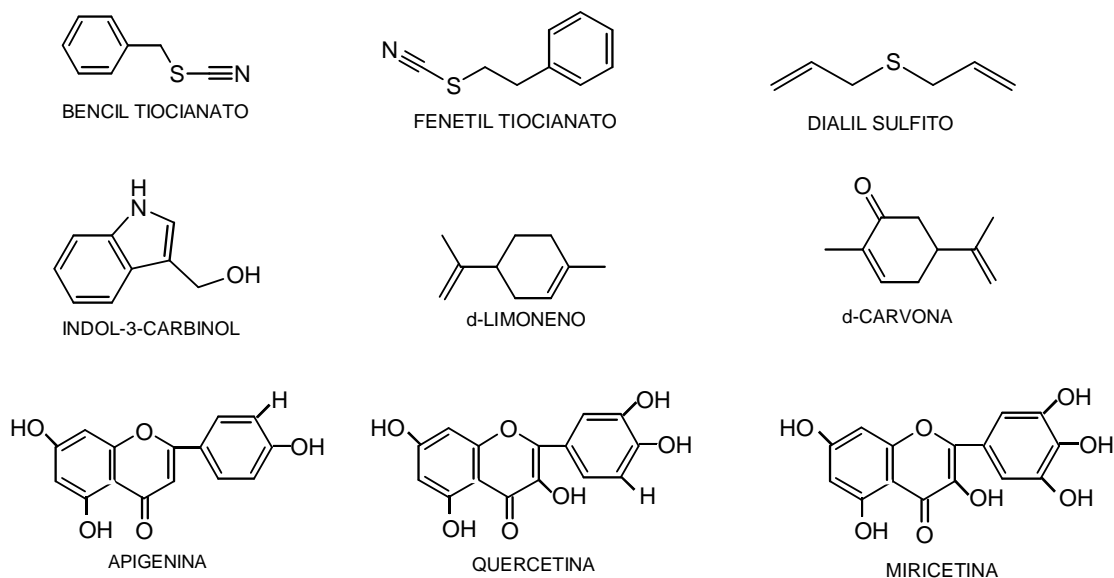
2.1.2 Metabolitos secundarios. Este tipo de compuestos engloban sustancias químicamente muy diversas que se establecen como contraposición a los productos del metabolismo primario, que aparecen en el citoplasma de todas las células vegetales y cuyas diferencias entre plantas son únicamente de índole cuantitativo. En este sentido, se ha propuesto denominar a los metabolitos secundarios como sustancias ecológicamente eficaces, que implican procesos químicos únicos para una planta dada [8,9].

La biosíntesis de estos metabolitos está condicionada por una serie de interacciones variadas con factores medioambientales (exógenos) que se pueden agrupar en: factores bióticos (insectos, herbivoría, agentes patógenos, enfermedades); factores abióticos (luz, humedad, radiación UV, nutrientes, temperatura, pH del suelo); competencia por espacio (agua, luz y nutrientes); polución (metales pesados, ozono, productos químicos); herbicidas y pesticidas [10].

Por lo anterior, se ha establecido que para sobrevivir, las plantas han adoptado como única opción la creación de un metabolismo secundario que actuará sobre el comportamiento y el desarrollo de organismos atacantes [11]. Además de cumplir esta importante función dentro de los ecosistemas, actualmente se sabe que algunos metabolitos secundarios prestan beneficios al hombre, facilitando la eliminación y desintoxicación de cancerígenos presentes en el organismo, modulando la acción de ciertas enzimas, mientras que otros actúan como antioxidantes neutralizando los radicales libres, causantes de enfermedades cardiovasculares y arteriosclerosis [12].

La mayoría de los compuestos anticancerígenos que se han descubierto son componentes que carecen de valor nutritivo. Entre estos compuestos se pueden mencionar: compuestos organosulfurados (bencil y feniltiocianato, sulforafano, dialil sulfito); indoles (indol-3-carbinol); monoterpenos (d-limoneno, d-carvona); flavonoides (apigenina, quercetina, y miricetina) y taninos (ácido elágico), las respectivas estructuras se pueden observar en la figura 2 [13].

Figura 2. Metabolitos secundarios anticancerígenos [13]



2.1.2.1 Aceites esenciales. Son sustancias no grasas, hiperconcentradas y ópticamente activas, que se forman como subproducto del metabolismo de una amplia variedad de flora [14], incluyendo los brotes de algunas frutas; son sensibles a la acción de los rayos ultravioleta, así como también a las condiciones extremas de temperatura [15], insolubles en agua, se disuelven bien en alcohol y se mezclan en forma excelente con ceras, grasas y aceites vegetales [16].

Los aceites esenciales son un grupo de diversos compuestos orgánicos volátiles (COVs) [17], que van desde el isopreno hasta los ácidos orgánicos, pasando por los terpenos, los alcanos, los alquenos, los alcoholes, los aldehidos y los ésteres. Los COVs son producidos en muchos tejidos vegetales diferentes mediante diversos procesos fisiológicos, algunos de estos (metil salicilato, hexenal o terpenos) pueden actuar como compuestos defensivos contra patógenos y herbívoros, y otros (metil jasmonato, alquenos, (E)-3-hexeno-1-ol o terpenos) como compuestos químicos de información entre las distintas partes de una misma planta, entre plantas distintas y entre plantas, animales y microorganismos [18]. Otras posibles funciones de los COVs como el isopreno y los terpenos son la estabilización y protección de las membranas vegetales contra las altas temperaturas o la alteración de la floración de las plantas vecinas [19], los terpenos pueden incluso estar implicados en el desarrollo de incendios forestales [20].

Para la obtención de los COVs a partir de plantas aromáticas se han desarrollado varias técnicas de extracción entre las que figuran hidrodestilación, destilación por arrastre con vapor, destilación sometida a una degradación térmica, expresión y adsorción entre otros [21, 22,23]

La mayoría de monoterpenos y sesquiterpenos que se encuentran presentes en los aceites esenciales de diversas plantas se han aislado mediante la utilización de uno o varios métodos cromatográficos tales como la cromatografía en columna y en capa fina. Sin embargo, actualmente se utilizan técnicas de separación más eficientes y rápidas como la cromatografía líquida de alta eficiencia HPLC, y GC, que permiten analizar mezclas complejas, e identificar los componentes a través de los denominados Índices de retención de Kováts (I_K) [24].

2.2 CARICA CANDAMARCENSIS HOOKER FILIUS

Los países del norte de Suramérica, cuentan con una amplia diversidad de especies de la familia *Carica*; donde además de *C. papaya* L. (papaya), que es el representante con mayor importancia económica, se encuentran las papayuelas o papayas de altura, entre las que se destacan: *C.goudotiana*, *C. microcarpa* Jacquin, *C. candamarcensis*, *C. stipulata* Badilla y el babaco, híbrido natural denominado *C. heilbornii* Badillo [25].

Esta diversidad de especies incluye por supuesto una amplia variabilidad de formas en diferentes poblaciones. En la mayoría de los casos, las papayuelas se encuentran en pequeños grupos o como plantas aisladas en los huertos de agricultores andinos, donde la producción se destina especialmente al consumo doméstico o local [26]. Tal es el caso de la especie *C. candamarcensis* o *C. pubescens* que se encuentra en casas rurales, antejardines y en las márgenes de las carreteras en paisajes planos y ondulados de tierra fría hasta los límites con el páramo; por ello es cultivada en ciudades como Bogotá, Tunja y Pasto [27,28].

La clasificación taxonómica de esta especie corresponde al género: *Carica*; familia: *Caricaceae*; orden: *Violales*; clase: *Magnoliopsida*; división: *Spermatophyta*; reino: *Plantae*.

C. candamarcensis es conocida comúnmente con diferentes nombres de los que se destacan: papayuela, papayuela maligna, tapakuliki, chilacuán, chilhuacán,

papaya de tierra fría , tacapacú, chamburo, cambur, papayo de montaña, paw paw, pan de monte, siglagón, chichuacacón, titi-ish y bonete [29-33].

2.2.1 Descripción botánica. Planta arbórea de 3 a 6 m de alto, erecta, algunas veces ramificada desde la base y su tronco es habitualmente cónico, más ancho en la base, fibroso pero nunca leñoso [34]. Presenta una copa irregular, de follaje poco denso, verde oscuro, con hojas grandes alternas palmatilobadas, generalmente con cinco dedos o lóbulos ...sección 3.1.1 ... Su florescencia es unisexual, encontrándose las flores masculinas en un árbol y en otro las femeninas, ambas de color verde amarillento. La floración se presenta irregularmente a veces cada cuatro meses. Los frutos en número de 20 a 30 por Kg. son bayas poligonales, redondeadas hasta de 20 cm. de longitud, muy olorosos que cuelgan de las axilas inferiores de las plantas femeninas; cuando maduran son de color amarillo (figura 3). Contiene numerosas semillas esferoidales que van de negruzcas a castaño y se encuentran en la cavidad central del fruto. Posee un látex blanquecino astringente que causa alteraciones en la piel a su contacto. [35-37].

Figura 3. Frutos de *C. candamarcensis*



2.2.2 Origen y distribución. La especie *C. candamarcensis* es probablemente originaria de los Andes de la América Meridional, Colombia o Perú [38] y se distribuye desde Panamá hasta los Andes de Bolivia y parte de Chile [39], se encuentra espontánea en el Ecuador y Colombia, en los climas fríos entre los 2000 y 3000 m.s.n.m., con lluvias de 500 a 1200 mm por año [40,41].

2.2.3 Usos. Se conoce de sus aplicaciones en la industria cárnica, la cervecería y la panadería gracias a su alto contenido en papaina, una enzima proteolítica que tiene diferentes usos en la industria de alimentos y bebidas, mientras que en repostería se emplea por sus frutos agradables, jugosos, ácidos y aromáticos [42, 43,44].

En medicina se utilizan la cáscara y la pulpa para eliminar hematomas y por digestión la arterosclerosis; además con la cáscara se prepara una tisana a la que se le atribuyen propiedades pectorales. Por otra parte el látex se emplea en contacto con la piel para quitar las verrugas, y en pinceladas sobre la garganta en las anginas y amigdalitis [45-47], lo que indica una posible actividad antibacteriana.

2.2.4 Antecedentes. Según la revisión bibliográfica, de la especie *C. candamarcensis* se han desarrollado diversas investigaciones en el campo de la bioquímica con respecto a la composición del látex que esta especie produce y a sus posibles aplicaciones médicas y en genética acerca del mejoramiento de *caricaceas*. A continuación se mencionan las investigaciones de mayor importancia.

Walreavens V. y colaboradores [48], en 1993 realizaron el aislamiento y la caracterización preliminar de las enzimas obtenidas a partir del látex de *C. candamarcensis*, buscando encontrar un sustituyente de la quimopapaina difícilmente aislada a partir de *C. papaya* y usada en el tratamiento de hernias discales. Como resultados de esta investigación se logró la identificación de cuatro enzimas denominadas como CC-I, CC-II, CC-III y CC-IV, estableciendo que posiblemente las enzimas CC-I y CC-III correspondían a la papaina y quimopapaina respectivamente. Investigaciones posteriores realizadas por Jaziri M. [49], confirmaron lo anterior estableciendo la secuencia aminoacídica de la proteína CC-III, obtenida a partir del látex de *C. candamarcensis*.

Basándose en estas investigaciones, se han venido desarrollando estudios similares con respecto al látex de la especie *C. candamarcensis* y se ha logrado establecer: la identificación de nuevas enzimas como la cisteína endopeptidasa [50]; una comparación bioquímica entre el látex de *C. candamarcensis* y *C. papaya* [51]; además, del uso de ciertas enzimas de *C. candamarcensis* como agentes protectores en la extracción de ADN [52].

Por otra parte, Álvarez. L. [53], de la Universidad de Caldas durante el periodo de 1998 al 2000, llevó a cabo una investigación acerca de la recolección,

caracterización y evaluación de papayas de altura, con énfasis en papayuelas, con el fin de mejorar la especie *C. papaya*, mediante la manipulación de los recursos genéticos de estas especies. Dentro de este estudio, se tuvo en cuenta que la especie *C. candamarcensis* es tolerante a nemátodos y resistente al virus del anillado, lo que la constituye en fuente potencial de genes transferibles a la papaya, que es el cuarto frutal de importancia económica a nivel mundial.

Los estudios realizados acerca de esta especie en cuanto a metabolitos secundarios son mucho más reducidos, sin embargo, aquí se da mayor importancia a este tipo de investigaciones debido a su similitud con el presente trabajo.

Idstein y colaboradores [54], investigaron acerca de los constituyentes volátiles de la papaya de montaña *C. candamarcensis* en el año de 1985, utilizando como técnica de extracción la destilación al vacío seguida de una extracción con solventes (pentano- diclorometano 2:1). El extracto concentrado se sometió a preseparación por medio de cromatografía de adsorción sobre silica gel, utilizando como eluyente una mezcla de pentano- dietil éter. Los volátiles fueron analizados por HRGC y HRGC-MS. En total fueron identificados 199 compuestos, de los cuales 103 presentaron estructuras de ésteres, entre los que se encontraron sustancias poco comunes tales como: 3-mercaptopropanoato de etilo 4-hidroxi y 4-acetoxibutanoato de etilo, (E)-2- y (E)-3-octenoato de metilo, entre otros (figura 4, Anexo A).

En Colombia, A. Morales y C. Duque [55] de la Universidad Nacional, realizaron en 1987 un estudio detallado acerca de los componentes del aroma de la papaya de montaña. Los metabolitos secundarios volátiles se extrajeron por microdestilación con vapor y extracción con solvente (diclorometano) simultáneas. El análisis se llevó a cabo por GC y GC-MS, encontrándose un total de 53 compuestos de los que solo fue posible identificar 45. El 63% del extracto correspondió a ésteres y el 30% a alcoholes. Los componentes mayoritarios del aroma encontrados fueron: etil butirato, butanol, etil acetato, metil butirato y butil acetato (figura 4).

2.3 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

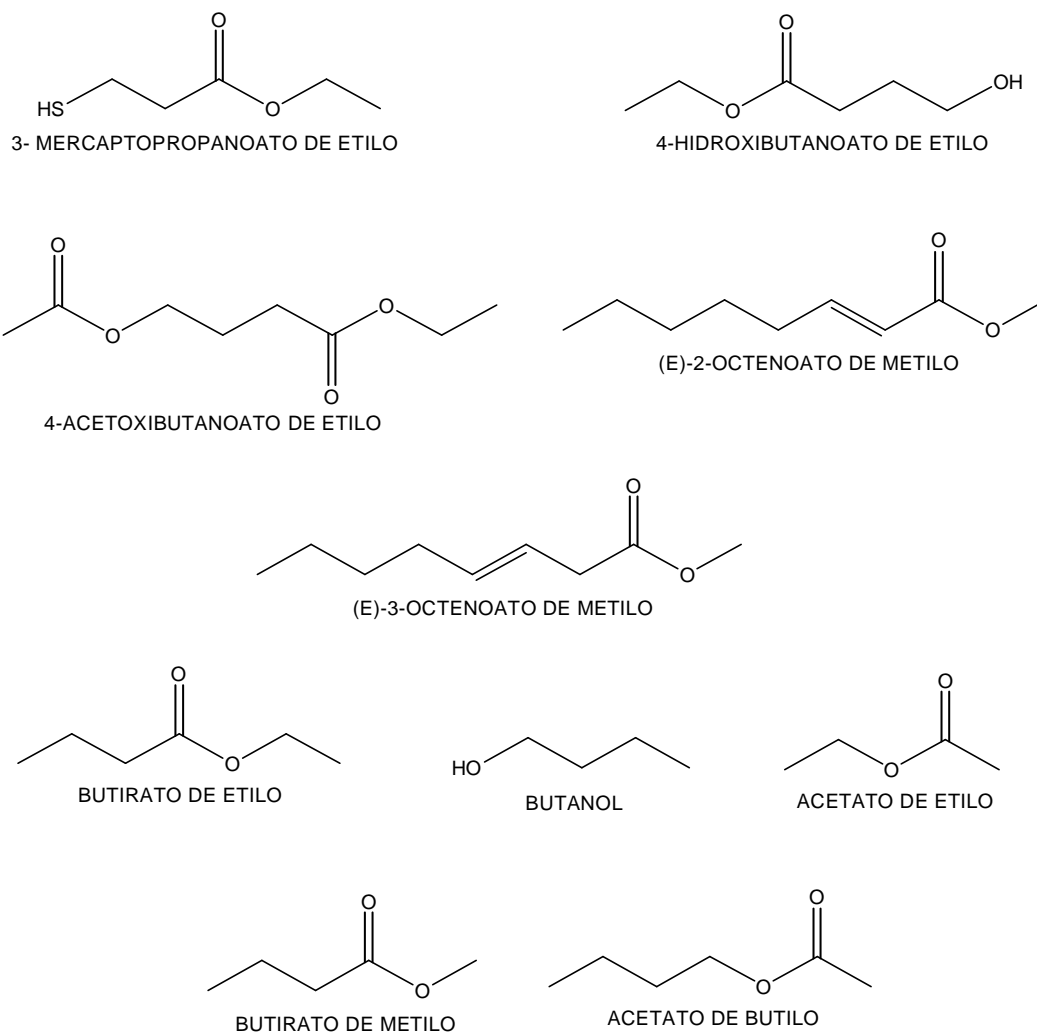
2.3.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas. Actualmente, gracias a la evolución de las técnicas de extracción de compuestos de interés biológico presentes en una amplia diversidad de especies de origen natural, ha sido posible combinar diferentes técnicas de extracción con el fin de encontrar

nuevos metabolitos secundarios [56]. Tal es el caso de la MWHD, que combina la hidrodestilación (HD) y la extracción por microondas.

El principio de la HD es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa de un material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. Mientras que la extracción por microondas patentada originalmente en Canadá (Paré y colaboradores, 1989), consiste en calentar el agua contenida en el material vegetal, que a su vez está inmerso en un disolvente transparente a la radiación de microondas [57].

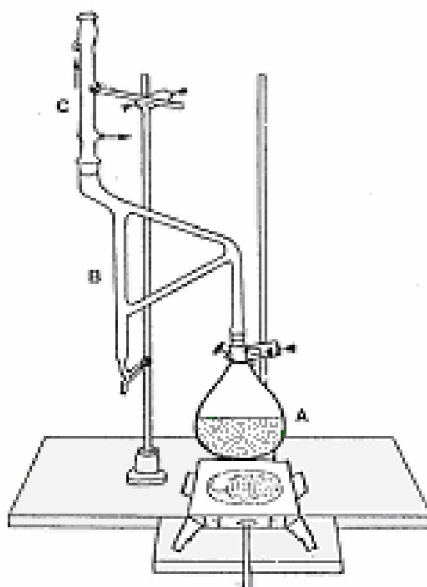
Teniendo en cuenta estos dos principios, en la MWHD, el calor interno del agua por efecto de su presión de vapor hace que se rompan las estructuras celulares del material vegetal que contienen al AE el cual es recogido sobre un solvente [59]. La principal ventaja de esta técnica es su velocidad, pues pueden lograrse extracciones en minutos [58], además, se requiere de poco material vegetal y durante la extracción no se afectan la naturaleza química ni la calidad del aceite, ya que la energía del microondas está por debajo de la energía necesaria para romper los enlaces de las moléculas orgánicas [60,61].

Figura 4. Estructuras de metabolitos secundarios volátiles encontrados en *C. candamarcensis* [54,55].



El montaje consta de un equipo de destilación tipo Clevenger (figura 5), que emplea un horno microondas para el calentamiento [62]. En el balón A, ubicado dentro del horno se introduce el material vegetal, que se cubre por completo con agua destilada; mediante calentamiento programado se produce la ebullición del agua, que en forma de vapor arrastra los compuestos volátiles a través del refrigerador C, en donde se condensan de tal forma que caen hasta el colector B, que puede o no contener un solvente adecuado para atrapar dichos compuestos.

Figura 5. Equipo de destilación Clevenger.

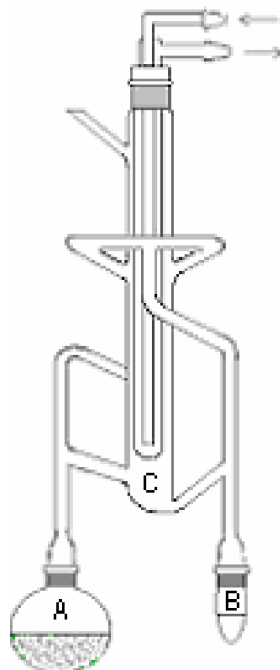


Fuente: Andrés Parra Sánchez. Química orgánica ambiental.
www.ugr.es/~quiored/qoamb/qoamb.htm

Con el fin de verificar las ventajas de esta técnica, se han realizado estudios comparativos con HD y se ha establecido que la MWHD es una buena alternativa para la extracción de AE's a partir de plantas aromáticas, como por ejemplo; ylang-ylang , albahaca, menta de jardín, tomillo, pimienta blanca y negra y algunas especies de la familia *verbenaceae*. Además, se ha utilizado para la extracción de ácidos grasos en semillas de eneldo y cilantro [63-67].

2.3.2 Destilación-extracción con solventes simultánea. En esta técnica de extracción se aprovecha la ventaja de la destilación con vapor para extraer los compuestos volátiles de una muestra vegetal y las ventajas de la extracción con solventes para atraparlos. Para este proceso se utiliza el equipo desarrollado por Likens y Nickerson en 1964 y modificado por Godefroot en 1981(figura 6) [68,69]

Figura 6. Equipo a microescala para la extracción de metabolitos volátiles con solventes de alta densidad.



Fuente: Godefrout, M., Sandra, P., and Verzelle, M., New Method for Quantitative Essential Oil Analysis

El material vegetal con agua destilada se coloca en el balón A y el solvente en el colector B, ambos conectados por vías diferentes al condensador C; los recipientes A y B se calientan separadamente de tal forma que el contenido del recipiente A se lleva hasta ebullición mientras que el contenido del recipiente B se mantiene a temperaturas por debajo del punto de ebullición del solvente para evitar su evaporación total y/o salida brusca del sistema por efectos de la presión. El solvente, el agua y el extracto se condensan al mismo tiempo; el solvente de alta densidad arrastra y concentra el extracto en el balón B, separándolo del vapor de agua; el proceso se lleva a cabo continuamente. Este método hace posible extraer cantidades considerables de componentes volátiles con una cantidad mínima de solvente y además, permite analizar muestras líquidas y sólidas [70-72].

Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para la extracción de COVs, estableciéndose su efectividad para concentrar los compuestos extraídos en relación con otras técnicas como la codestilación de espacio de cabeza (HCD) [73] Precisamente por ello ha tenido aplicación en la obtención de metabolitos secundarios volátiles a partir de plantas aromáticas como el café, el tabaco y el

pimentón; algunas frutas como kiwi y el mango [74-78]; alimentos procesados entre los que se encuentran el queso y los cárnicos; además de productos de consumo como el cigarrillo. Pero su uso, no se limita a la extracción de COV's, sino que también se han realizado optimizaciones de este sistema, para la evaluación de ácidos grasos en alimentos [79-82].

2.4 TÉCNICAS INSTRUMENTALES DE ANÁLISIS

2.4.1 Cromatografía de gases. Keulemans ha definido la cromatografía como un método físico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es la fase estacionaria, de gran área superficial, y la otra es un fluido (fase móvil) que pasa a través o a lo largo de la fase estacionaria [83].

En la cromatografía gaseosa la fase estacionaria es sólida, mientras que la fase móvil es un gas (nitrógeno, helio o hidrógeno) que circula en contacto con la fase estacionaria. La muestra se vaporiza en el sistema de inyección y es transportada por la fase móvil a través de la columna. El reparto de los componentes de la muestra con la fase estacionaria, se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada. Por lo tanto, los componentes de la mezcla se separan de acuerdo a sus afinidades con la fase estacionaria [84].

Las aplicaciones de esta técnica analítica en el estudio de los productos naturales, específicamente de los AE's y de los COVs son innumerables, pues entre muchos otros, todos los análisis realizados para las especies citadas tanto en MWHD, como en DES [85-92], se han llevado a cabo mediante GC.

2.4.2 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La GC es una técnica de separación que ha evolucionado rápidamente y hoy día permite el análisis de mezclas muy complejas. A esta formidable capacidad de separación ha sido posible agregarle la alta especificidad de la espectrometría de masas, en lo que se constituye la técnica combinada GC-MS, una poderosa herramienta analítica que permite la separación y la identificación simultánea de mezclas volátiles complejas. Por medio de la GC-MS los componentes de la mezcla problema son separados, detectados, identificados y cuantificados. El adecuado manejo de los equipos a través del software y de los datos obtenidos durante el análisis instrumental, permite una completa y apropiada interpretación de los resultados, disminuyendo así el tiempo que se invertiría en el procesamiento manual de los mismos y facilitando la implementación de las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) [93,94].

2.4.2.1 Correlación entre GC-MS e Índices de retención de Kováts (I_K). Los tiempos de retención o los datos de espectrometría de masas no son información suficiente por si solos para asegurar una identificación positiva en el caso de mezclas complejas como los AE's. Una aproximación adicional consiste en combinar la especificidad y/o reproducibilidad de los índices de retención con los patrones de fragmentación obtenidos por espectrometría de masas, para el componente correspondiente al tiempo de retención considerado [95].

Los I_K indican el orden de aparición de los compuestos respecto a parafinas lineales [96], su determinación se hace dependiendo de las condiciones de temperatura a las que se haya realizado el análisis de la muestra. Sin embargo, las más comunes son las condiciones de temperatura programada, en donde los tiempos de retención de una serie homóloga aumentan en forma lineal con el número de carbonos y la ecuación que los relaciona tiene la siguiente expresión:

$$I_K = 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Ry}}{t_{Rz} - t_{Ry}} \right] + 100y \quad \text{Ecuación 1}$$

y = número de átomos de carbono del n -alcano menor

t_{Rx} , t_{Ry} , t_{Rz} = tiempos de retención del componente x , y los n -alcanos entre los que se encuentra este componente.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La interpretación de los resultados obtenidos a partir del estudio de cualquier fenómeno natural como la producción de metabolitos secundarios en especies vegetales, requiere tener en cuenta aspectos fundamentales (Heath 1977, Parker 1981), que influyen directamente con el análisis de los mismos:

El carácter variable de estos fenómenos es uno de los rasgos más extendidos y consiste en que sus manifestaciones no se repiten exactamente, de modo que al estudiar las mediciones que se obtienen, éstas nunca son completamente iguales, esto se debe a que además de los factores que hacen parte del estudio, existen factores incontrolables, tales como la heterogeneidad del suelo, diferencia genética entre plantas, influencias climáticas, errores humanos, entre otros, que es necesario considerar a la hora de interpretar los resultados obtenidos. Esta es la principal razón de la variabilidad que se encuentra en el mundo natural [97].

La principal herramienta que permite manejar e interpretar datos de este tipo es el análisis estadístico, (Fowler & Cohen 1992), a través de un diseño de experimentos que relaciona los tratamientos y las unidades experimentales, en términos de estímulos y respuestas, que son evaluadas mediante el Análisis de Varianza (ANDEVA), que determina si las diferencias entre los tratamientos aplicados son significativas o pueden atribuirse al error experimental [98-100].

Dentro de los diferentes modelos de ANDEVA que existen se encuentran los que utilizan una sola variable independiente o factor y una variable dependiente; se analizan mediante un análisis de varianza llamado de un factor o unifactorial, en el que se trata de comparar grupos o muestras que difieren sistemáticamente en un solo factor. El modelo matemático se muestra en la ecuación 2 y las ecuaciones empleadas para desarrollar el ANDEVA unifactorial se muestran en el anexo E.

$$X_{ij} = \mu + T_i + E_{ij} \quad \text{Ecuación 2}$$

X_{ij} = variable de respuesta del tratamiento i, repetición j

μ = media general del experimento

T_i = efecto del tratamiento i

E_{ij} = componente aleatorio llamado error experimental para el tratamiento i, repetición j.

Cuando se establece que existen diferencias entre los tratamientos es necesario realizar pruebas de significación que permiten determinar si las diferencias son significativas o si se pueden justificar solo por variaciones aleatorias. Según Arkin y Colton[101] Hays [102] y Sachs [103] por medio del cálculo de la diferencia mínima significativa (DMS) y su comparación con las diferencias entre las medias de los tratamientos, se puede establecer cual de éstos es el más apropiado, de tal forma que existirán diferencias significativas si el valor absoluto de la diferencia entre las medias es mayor al valor establecido para la DMS, el cual se determina aplicando la ecuación 3.

$$DMS = t^* \sqrt{(2CMe/r)} \quad \text{Ecuación 3.}$$

t, de Student, asociada a la probabilidad en función de los grados de libertad

CMe, corresponde a los cuadrados medios del error y

r, es el número de repeticiones

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 RECOLECCION Y ALMACENAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

Inicialmente la recolección del material vegetal se realizó en el municipio del Encano ubicado a 27 Km de la ciudad de Pasto, con altura de 2830 m.s.n.m y cuya temperatura promedio es de 11°C, en donde, los frutos de la especie *C. candamarcensis* son aprovechados comercialmente por la industria alimenticia, razón por la cual existen algunos cultivos representativos. Además es importante tener en cuenta que estos frutos se encontraban totalmente sanos.

Un segundo muestreo fue realizado en el municipio de la Florida ubicado a 28 Km de la ciudad de Pasto a 2180 m.s.n.m con temperatura media de 17°C, donde a pesar de no encontrar cultivos tecnificados de *C. candamarcensis*, se encontró una población vegetal considerable. Sin embargo, los frutos encontrados en esta región presentaban lesiones en la cáscara, causadas por algún agente patógeno (figura 7), ya que a las plantas no se les aplicaba ningún tipo de fertilizante para prevenir plagas y enfermedades.

Figura 7. Frutos de *C. candamarcensis* con afecciones patógenas.



3.1.1 Sistema de muestreo.

Para obtener una muestra representativa de la población vegetal la recolección de los frutos maduros, se realizó siguiendo el modelo de muestreo aleatorio simple en un cultivo casero de 15 árboles en total (figura 8), a partir de los cuales fueron colectados al azar 150 frutos (aproximadamente 10 por cada árbol) de color semejante (amarillo) y tamaño variable.

Una vez colectados los frutos eran empacados en bolsas plásticas para su transporte y posterior almacenamiento bajo refrigeración; este almacenamiento se daba en el menor tiempo posible.

Figura 8. Cultivo casero de *C. candamarcensis*.



3.2 EXTRACCION

Antes de establecer el diseño experimental adecuado y hacer uso generalizado del mismo, puede ser necesario realizar algunos ensayos preliminares con el fin de determinar las mejores condiciones de trabajo.

3.2.1 Ensayos preliminares. Para la preparación del material vegetal, los frutos provenientes del municipio del Encano se lavaron con solución de hipoclorito al 2% para eliminar cualquier agente contaminante y posteriormente se realizó la separación de la pulpa y la semilla. La pulpa junto con la cáscara se dividieron finamente y se introdujeron (2000 g) en un balón de 4 litros de capacidad, con adición de 200 ml de agua destilada acoplando todo el sistema de acuerdo con el montaje de la figura 9, que se encuentra en el laboratorio de investigación de la Universidad de Nariño.

Figura 9. Equipo para MWHD.



La extracción del AE se realizó utilizando un horno microondas LG, modelo MB-314VG, con una potencia de salida 2450 MHz y nivel de potencia 10 (10 % de la potencia máxima). De igual forma se siguió el mismo procedimiento con 1000g de

semillas licuadas (provenientes de los frutos maduros que producían 2000 g de pulpa) y 100 ml de agua destilada.

También se realizaron pruebas con frutos provenientes del municipio de la Florida, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito.

Se realizaron ensayos a diferentes tiempos y potencias de extracción, con el fin de establecer las condiciones a las cuales se obtendrían mejores resultados en cuanto a la cantidad de AE extraído. Los tiempos evaluados fueron de 45, 60, 90 y 120 minutos, y las potencias de 4, 7, 9 y 10 (correspondientes al 40, 70, 90, y 100% de la potencia máxima).

Sin embargo, al modificar las condiciones de extracción, se observaron diferencias en los resultados en cuanto a cantidad y aspecto del AE obtenido, por lo que se eligieron las más adecuadas, y con ellas se llevó a cabo la estandarización del proceso de extracción.

3.2.2 Estandarización

3.2.2.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas. De acuerdo a los ensayos preliminares las condiciones de extracción más adecuadas correspondieron a las potencias 4 y 7 con tiempos de extracción de 45 y 90 minutos, pues al aplicar potencias mayores el material vegetal se degradaba por exceso de calor, de tal forma que por combinación de estas condiciones se establecieron cuatro tratamientos, que fueron aplicados por triplicado de acuerdo a un diseño irrestrictamente al azar (DIA) ...Sección 4.1.1 ...

Para cada extracción se emplearon 1500 g de pulpa madura con cáscara previamente licuada y 200 ml de agua destilada. El AE extraído por su alta volatilidad se recogió sobre 5 ml de acetato de etilo de los cuales se tomaron 1.5 ml y se eliminaron trazas de agua con Na_2SO_4 anhidro.

3.2.2.2 Destilación-extracción simultánea con solvente. De igual forma que para la MWHD, la estandarización de la extracción de compuestos volátiles por DES se llevó a cabo aplicando un diseño DIA, donde se establecieron cuatro tratamientos, que se aplicaron por triplicado ...Sección 4.1.1 ...

Se emplearon 20g de pulpa madura con cáscara (teniendo en cuenta la capacidad del balón empleado en este montaje), 5 ml de agua destilada y 3.5 ml de solvente,

utilizando un equipo a microescala para solventes de alta densidad (diclorometano, mezcla diclorometano-acetato de etilo 2:1), el montaje ubicado en el laboratorio de investigación de la Universidad de Nariño se muestra en la figura 10. De los compuestos volátiles recogidos sobre el solvente, se tomaron 1.5 ml del extracto eliminando trazas de agua con Na₂SO₄ anhidro.

Figura 10. Equipo a microescala para DES.



Para el correspondiente análisis cromatográfico de los extractos obtenidos por las dos técnicas empleadas, se adicionó 1 μ L del Istd n-tetradecano del 99.9 % de pureza con una densidad de 0.763 g/ml.

3.3 ANALISIS CROMATOGRAFICO

3.3.1 Ajuste de parámetros. Para esta etapa se realizaron modificaciones con base en las condiciones cromatográficas reportadas por Rodríguez C. [104], en su trabajo de investigación acerca de la identificación de los componentes del AE de limonaria. De tal forma que al realizar los correspondientes ajustes se estableció la programación de temperatura como se muestra ...en la sección 3.3.2 ...

3.3.1.1 Flujo óptimo. Empleando una mezcla de parafinas lineales de C₆ -C₁₈ (anexo B), considerando el pico mas alto y de menor ancho (C₁₂, t_r = 20.765) y

aplicando las ecuaciones 4 y 5, se determinó el flujo óptimo mediante la curva de Van Deemter, realizando mediciones por triplicado.

$$N = 16(w / t_R)^2 \quad \text{Ecuación 4}$$

N: número de platos teóricos
w: ancho del pico
t_R: tiempo de retención

$$H = L / N \quad \text{Ecuación 5}$$

H: altura del plato teórico
L: longitud de la columna
N: número de platos teóricos

3.3.1.2 Nivel mínimo de detección. En términos generales se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal de una muestra en “blanco” o “señal de fondo”, descripción que da al analista un buen margen de libertad para decidir la definición exacta del límite de detección. Por lo tanto en la práctica existe muy poco acuerdo entre profesionales y organismos oficiales sobre este punto, por lo que esta área resulta tan controvertida como otros aspectos del tratamiento estadístico del análisis de calibración [105].

De acuerdo a lo anterior, se prepararon soluciones del estándar interno de 0.5, 1 y 5 µL/L equivalentes a 0.4, 0.8 y 3.8 mg/L respectivamente y se inyectaron por triplicado, con el fin de determinar la mínima cantidad de analito detectable, adoptando el concepto propuesto por Huber [106] que afirma que en cromatografía, el límite de detección es la cantidad inyectada que da lugar a un pico con una altura al menos tres veces mayor que el ruido de la línea base de acuerdo a la ecuación 6.

$$\frac{S}{N} = 3 \quad \text{Ecuación 6}$$

S: altura del pico
N: altura de la señal del ruido

3.3.1.3 Nivel mínimo de cuantificación. Se prepararon soluciones de 1, 5, 10 y 50 µL/L equivalentes a 0.8, 3.8, 7.6, 38.2 mg/L respectivamente que se inyectaron por triplicado, para determinar la mínima cantidad cuantificable, para lo que se

requiere que las alturas de pico sean de 10 a 20 veces mayores que el ruido de la línea base [107].

3.3.1.4 Factor de respuesta. Se prepararon soluciones del Istd en concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100, 500 y 1000 µL/L (equivalentes a 0.8, 3.8, 7.6, 38.2, 76.3, 381.5 y 763 mg/L respectivamente), que se inyectaron por triplicado para evaluar la repetibilidad de las áreas cromatográficas, mediante la desviación estándar (ecuación 7) y el coeficiente de variación (ecuación 8). El factor de respuesta se determinó mediante la pendiente de la recta ...sección 4.1.4 ... asociada a la ecuación 9 [108].

$$\sigma = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Ecuación 7

\bar{X} : promedio
 n: número de mediciones
 x_i: valores de la variable

$$CV \% = \frac{\sigma}{\bar{X}} * 100$$

Ecuación 8

CV: coeficiente de variación
 σ: desviación estándar
 \bar{X} : promedio

$$Rf = \frac{\text{Área (cuentas)}}{\text{Concentración (mg / L)}}$$

Ecuación 9

3.3.2 Identificación y cuantificación. La separación y cuantificación de los componentes de los AE's y COVs se llevaron a cabo en un GC Shimadzu 17A (figura 11) con un detector de ionización en llama (FID). Columna MDN-5 (30m x 0.25mm, d.i., 0.25 µm). Las condiciones del gas de arrastre (He) fueron: presión 134 KPa, velocidad lineal de 40 cm/seg, flujo interno 1ml/min, razón split 10 y un flujo total de 25 ml/min. Con programación de temperatura de 40°C (5min) @ 5°C/min hasta 250°C (15min) para un tiempo total de corrida de 62 min. Los compuestos separados fueron cuantificados por el método de la estandarización interna utilizando 1µL de n-tetradecano. El cálculo de las concentraciones se realizó por medio de la ecuación 10.

$$C_x = \frac{A_x}{R_f} * \frac{V_f}{W_x}$$

Ecuación 10

Cx: concentración del compuesto de interés (mg/Kg de material vegetal humedo)

Ax: área cromatográfica del compuesto de interés (cuentas)

Rf: factor respuesta del estándar interno (cuentas.L/mg)

Vf: Volumen final del extracto (L)

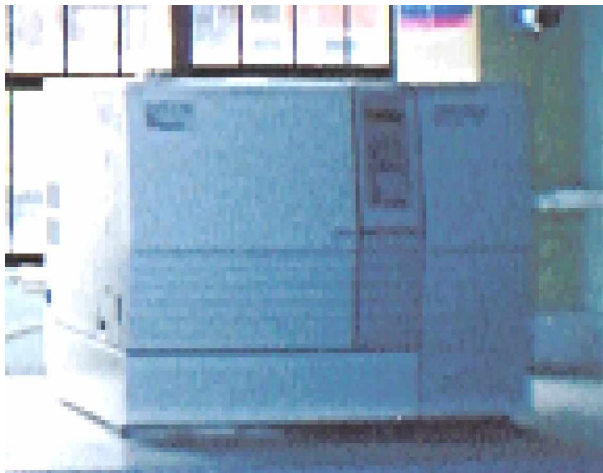
Wx: Peso de la muestra de material vegetal húmedo (kg)

La identificación parcial de los componentes de las muestras tanto de AE como de los extractos obtenidos por DES, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases acoplado a un detector selectivo de masas (GC-MS) Shimadzu QP5000/QP5050A (figura 12), con una biblioteca de espectros de masas WILEY-VCH. Columna DB-5-MS (30m x 0.25mm, d.i., 0.25 μ m) con fase estacionaria ligeramente polar de 5% fenil poli (dimetilsiloxano). Con programación de temperatura de 40°C (5min) @ 5°C/min hasta 250°C (15min) para un tiempo total de corrida de 62 min.

Figura 11. Cromatógrafo de gases con detector FID. Universidad de Nariño.



Figura 12. Cromatógrafo de gases con detector selectivo de masas. Universidad de Nariño.



Como técnica confirmatoria de los compuestos presentes en el aceite esencial se utilizó cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector selectivo de masas (HRGC/MSD), por colaboración de la Dra. Elena Stashenko del laboratorio de cromatografía de la Universidad Industrial de Santander. El análisis se realizó en un HRGC/MSD Hewlett-Packard HP 5890A *Series II*/ HP MSD 5972 operado en el modo *full scan*; un sistema de datos HP MS ChemStation, con dos bibliotecas de espectros de masas NBS75K (75.000 espectros) y WILEY 138 (138.000 espectros). Columna HP-5MS (60 m x 0.25 mm d.i., 0.25 μm f.e.), con fase estacionaria ligeramente polar de 5% de fenil poli(metilsiloxano); con programación de temperatura de 120°C(10 min) @ 4°C/min hasta 280°C (15 min), inyección *splitless*.

4. RESULTADOS Y ANALISIS

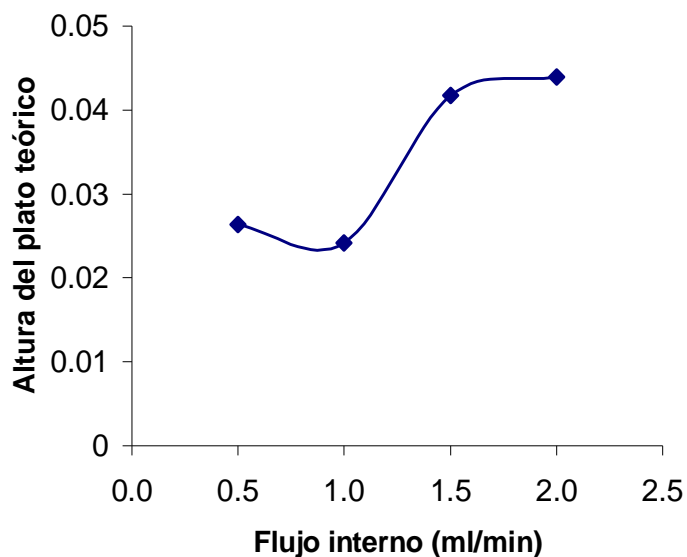
4.1 METODO ANALITICO

4.1.1 Flujo optimo – curva de Van Deemter. El número de platos teóricos y la altura de los mismos se calcularon mediante la aplicación de las ecuaciones 4 y 5. Con base en los datos presentados en la tabla 1, se construyó la curva de Van Deemter (figura 13).

Tabla 1. Datos promedio para la determinación del flujo óptimo.

Flujo (ml/min)	t_R (min)	W (min)	N	H (mm)
0,5	27.407	0.325	1.138×10^5	2.637×10^{-2}
1.0	23.523	0.267	1.242×10^5	2.416×10^{-2}
1,5	21.782	0.325	7.187×10^4	4.174×10^{-2}
2.0	20.707	0.317	6.827×10^4	4.394×10^{-2}

Figura 13. Curva de Van Deemter.



La curva de Van Deemter muestra que el flujo óptimo es de 1ml/min., que corresponde al valor más bajo en la altura del plato teórico (2.416×10^{-2} mm) por lo que a este flujo la columna presenta mayor número de platos (1.242×10^5) y por ende máxima eficiencia.

4.1.2 Nivel mínimo de detección.

Después de realizar las respectivas inyecciones de cada solución ...sección 3.3.1.2 ... y evaluar la relación señal/ruido (ecuación 6) que para este caso tiene un valor de 3.3 se determinó que la mínima cantidad detectable de estándar para el detector FID corresponde a $1 \mu\text{L/L}$ (0.8 mg/L) como se indica en la figura 14.

4.1.3 Nivel mínimo de cuantificación. Teniendo en cuenta el análisis cromatográfico de cada solución ...sección 3.3.1.3 ... como se observa en la tabla 2 se determinó que la mínima cantidad cuantificable de estándar para el detector FID corresponde a $5 \mu\text{L/L}$ (3.8 mg/L) debido a que la relación señal/ruido tiene un valor de 18.6

Figura 14. Determinación de la relación señal/ruido y nivel mínimo de detección.

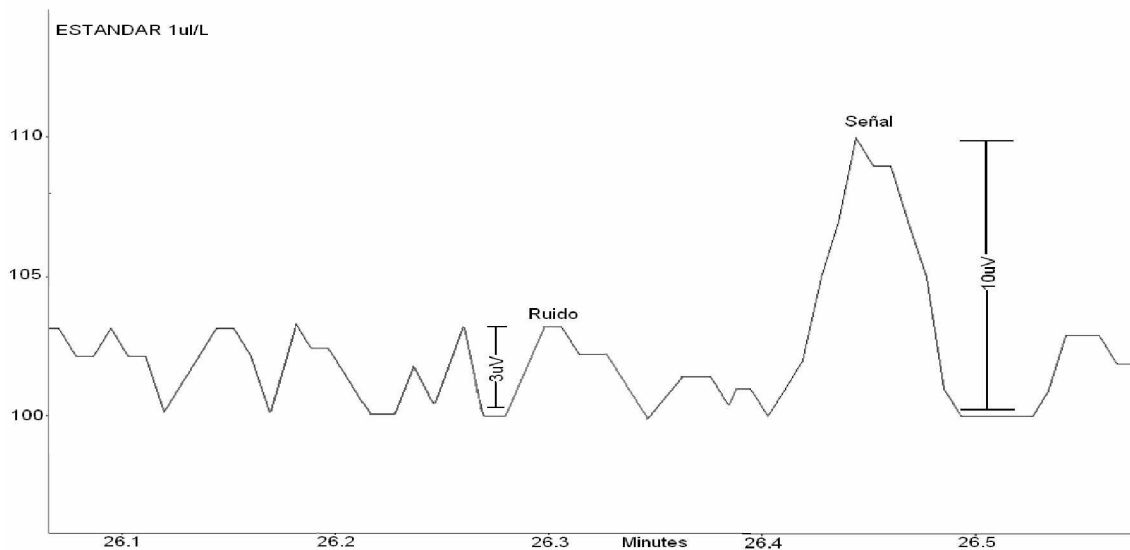


Tabla 2. Determinación de la relación S/N para el nivel mínimo de cuantificación.

Concentración (µL/L)	Altura de la señal (µV)	Altura del ruido (µV)	S/N
1	10	3.0	3.3
5	48.6	2.6	18.6
10	219	1.5	146
50	1519	1.1	1380

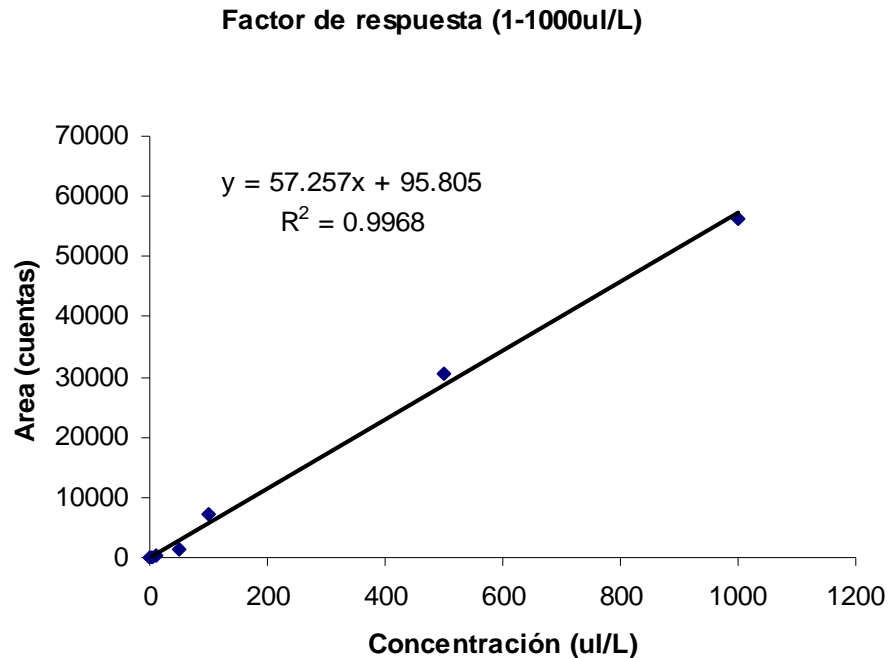
4.1.4 Factor de respuesta. La determinación del factor de respuesta (figura 15) se realizó por medio de la pendiente de la recta asociada a la ecuación 9. Los resultados de este análisis se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Repetibilidad de las áreas cromatográficas a diferentes concentraciones de n-tetradecano, determinado por GC/FID.

Concentración (µL/L)	Área (cuentas)	Área Promedio	σ	%CV
1	28			
1	30	29	1.0	3.4
1	29			
5	127			
5	124	125	1.53	1.22
5	125			
10	228			
10	220	226	4.93	2.18
10	229			
50	1525			
50	1524	1519	9.594	0.632
50	1508			
100	7431			
100	7185	7167	274.0	3.82
100	6884			
500	30177			
500	31640	30673	837.26	2.7296
500	30203			
1000	56465			
1000	58542	56321	2296.4	4.0773
1000	53956			

Teniendo en cuenta que el coeficiente de variación, es una estimación del error relativo que permite comparar la precisión de los resultados, la repetibilidad de las áreas cromatográficas presentan valores aceptables (<5%), de acuerdo con las Buenas Practicas de Laboratorio [109].

Figura 15. Determinación del factor de respuesta



De acuerdo a la ecuación de la recta se estima que el factor de respuesta, necesario para el proceso de cuantificación corresponde a 57.257 cuentas \times L / μ L equivalente a 75.042 cuentas \times L / mg

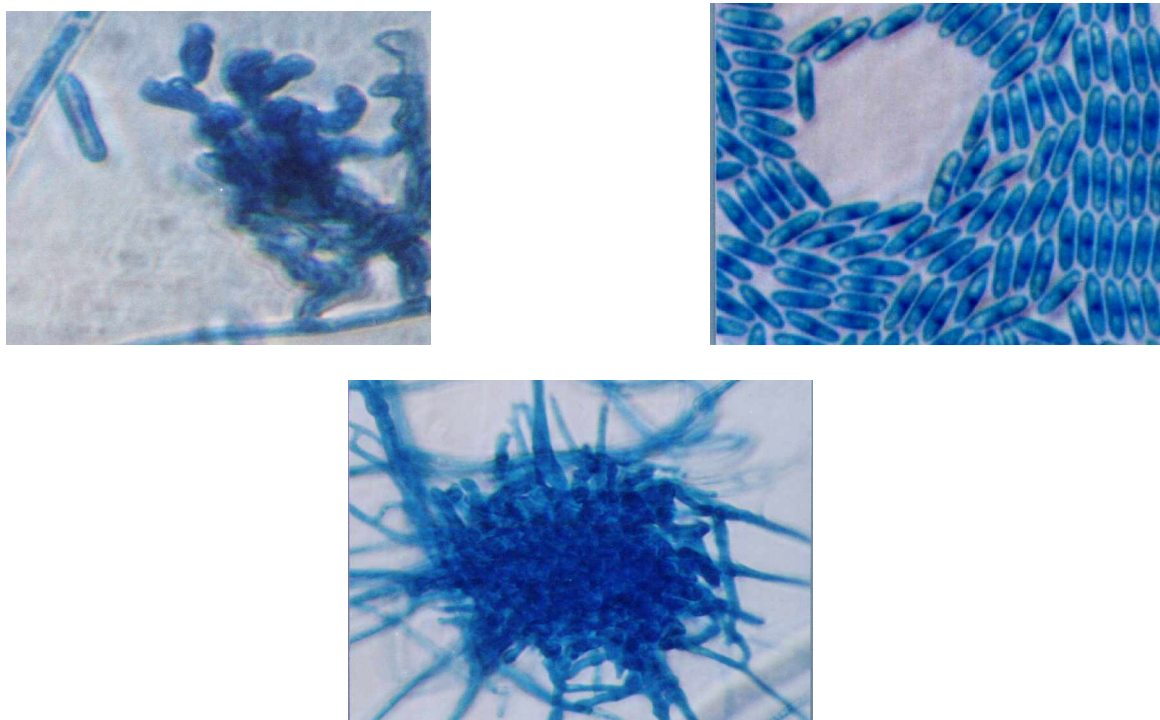
4.2 EXTRACCIÓN

Los resultados de los ensayos preliminares realizados por MWHD con los frutos sanos provenientes del Encano (Nariño), no fueron satisfactorios debido a que fue imposible la obtención del AE tanto de pulpa con cáscara como de semilla, a pesar de haber modificado en varias oportunidades las condiciones de extracción. Sin embargo, con los frutos del municipio de la Florida (Nariño) se obtuvieron cantidades apreciables de AE, dichos frutos se encontraban con señales severas de ataques por microorganismos patógenos. Se ha establecido según las

investigaciones de Mann. J [110], que la producción de los metabolitos secundarios surge como mecanismo de defensa debido a factores de estrés medioambientales ...sección 2.1.2 ..., por lo que se asume que la producción del AE de *C. candamarcensis* se debe a la acción de un agente estresante. Para confirmar lo anterior fue necesario someter el fruto a un estudio fitopatológico que permitió el aislamiento, purificación e identificación del microorganismo. Tales procedimientos se llevaron a cabo en el Laboratorio de microbiología de la Universidad de Nariño.

Los resultados de este análisis indican que el microorganismo que ataca los frutos maduros de *C. candamarcensis*; corresponde a un hongo identificado como *pucciniopsis*, cuyas principales estructuras se muestran en la figura 16.

Figura 16. Estructuras de *Pucciniopsis*



De esta forma, se determinó que los frutos del municipio de la Florida, eran los más adecuados para desarrollar la presente investigación, y se eligió a esta población como el lugar apropiado para la recolección del material vegetal. Una vez establecido el lugar de muestreo se realizaron extracciones tanto de pulpa con

cáscara como de semilla con base en los ensayos preliminares ...sección 3.2.1 ... Los extractos acuosos y los AE's obtenidos, fueron suministrados al grupo de investigación Medio ambiente y salud bajo la dirección de la Mg. Jacqueline Mena, para la realización de las pruebas biológicas con *H. pylori*. Los resultados de estas pruebas (tabla 4) mostraron que los halos de inhibición mas significativos se presentan para el AE de pulpa, mientras que para los demás extractos los halos fueron insignificantes (figuras 17 y 18), de esta manera se estableció llevar a cabo la identificación de los componentes del AE de pulpa de los frutos maduros de la especie *C. candamarcensis* de tal forma que se dio paso al proceso de estandarización de las técnicas de extracción.

Tabla 4. Halos de inhibición producidos sobre poblaciones de *H. pylori*, por AE's y extractos acuosos de *C. candamarcensis*.

Tratamiento	Media de halo de inhibición (mm)
AE de pulpa	8.5
AE de semilla	1.5
Extracto acuoso de pulpa	0.8
Extracto acuoso de semilla	0.5
Testigo absoluto	0.0

Figura 17. Halos de inhibición observados en pruebas con AE de *C. candamarcensis*. Arriba AE de pulpa, abajo AE de semillas, izquierda y derecha testigos absolutos.



Figura 18. Halos de inhibición observados en pruebas con extractos acuosos de *C. candamarcensis*. Arriba extracto acuoso de pulpa, abajo extracto acuoso de semillas, izquierda y derecha testigos absolutos.



4.2.1 Estandarización de las técnicas de extracción. Para llevar a cabo el proceso de estandarización se utilizó un diseño DIA, debido a su simplicidad y a que se emplea en experimentos en donde se pueden controlar factores que aumentan la variabilidad, en este caso la potencia de la radiación microondas, el tiempo de extracción y el tipo de solvente.

La estandarización para cada técnica de extracción se llevó a cabo aplicando los tratamientos descritos en las tablas 5 y 6, los cuales se aplicaron por triplicado teniendo en cuenta que la homogeneidad del material vegetal (frutos maduros) y la uniformidad en las labores propias de cada ensayo hacen que el número de replicas sea menor [111].

Tabla 5. Tratamientos aplicados en la estandarización de la técnica MWHD.

Tratamiento	Potencia del horno microondas	Tiempo de extracción (min)
T1	4	90
T2	4	45
T3	7	90
T4	7	45

Tabla 6. Tratamientos aplicados en la estandarización de la técnica DES.

Tratamiento	Solvente	Tiempo de extracción (min)
T1	Diclorometano	90
T2	Diclorometano	45
T3	Mezcla Diclorometano-acetato de etilo 2:1	90
T4	Mezcla Diclorometano-acetato de etilo 2:1	45

Para cada una de las técnicas empleadas en el proceso de extracción se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) unifactorial, teniendo en cuenta ciertos parámetros como el número de compuestos extraídos por cada repetición y la concentración de los compuestos comunes a todas las repeticiones, de manera que se logró tener dos criterios de decisión sobre la efectividad de algunos tratamientos con respecto a otros. Las tablas de datos ordenados para el desarrollo de los análisis mencionados y las ecuaciones empleadas para los cálculos realizados se muestran en los anexos C, D y E.

4.2.1.1 Hidrodestilación asistida por radiación con microondas. Inicialmente se desarrolló el ANDEVA según el número de compuestos extraídos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. ANDEVA de acuerdo con el número de compuestos extraídos por MWHD.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	774	258	8	4
Error	8	253	32		
Total	11	1027			

La relación entre F calculada (Fcal) y F tabulada (Ftab) al 95% de confianza, indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, por lo que se hace necesario desarrollar una prueba de significación que permita definir cual es el mejor tratamiento para extraer el mayor número de compuestos posible.

- **Diferencia mínima significativa (DMS)**

Para el caso del ANDEVA por número de compuestos extraídos, el cálculo de la DMS se realizó según la ecuación 3, considerando que t tiene un valor de 2.306 para 8 grados de libertad del error al 95% de probabilidad. Bajo estas condiciones el valor de la DMS correspondió a 10.595 que se comparó con las diferencias existentes entre las medias de los tratamientos (tabla 8).

Tabla 8. Prueba de comparación de medias (DMS).

Tratamiento	T4	T3	T2	T1
Medias de tratamientos	\hat{Y}_i4 53.000	\hat{Y}_i3 67.333	\hat{Y}_i2 45.000	\hat{Y}_i1 56.667
\hat{Y}_i1 56.667	10,666*
\hat{Y}_i2 45.000	8	22,333*	11,667*
\hat{Y}_i3 67.333
\hat{Y}_i4 53.000	14,333*	...	3.667

En esta tabla los valores de \hat{Y}_i , corresponden a las medias de cada tratamiento y las diferencias marcadas con asterisco (*) tienen un valor mayor que la DMS. Por lo tanto puede concluirse que el mayor número de diferencias significativas se presentan para el tratamiento 3, que corresponde a un tiempo de extracción de 90 minutos a potencia 7, siendo éstas probablemente las condiciones más apropiadas para la extracción de un mayor número de compuestos de acuerdo con el análisis cromatográfico realizado.

Otro parámetro que se tuvo en cuenta para evaluar la efectividad de los tratamientos fue la concentración de los compuestos comunes que se encontraron en cada repetición, para lo que se aplicó un diseño DIA con submuestra. En los anexos C y D se muestran los datos ordenados para el ANDEVA de este diseño (tabla 9).

Tabla 9. ANDEVA de acuerdo con la concentración de compuestos extraídos por MWHD.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	8141	2714	3	4
Error Experimental (EE)	8	328	1055		
Erro de muestreo (EM)	144	159993			
Total	155	168463			

Analizando el valor de F_{cal} con respecto a F_{tab} se determinó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos aplicados, lo que indica que las condiciones de extracción probadas no alteran de manera significativa la concentración de los componentes presentes en los extractos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a partir de los ANDEVAS realizados, se establecieron las condiciones óptimas para la extracción de los AE's que posteriormente se sometieron al proceso de identificación, teniendo en cuenta que las condiciones de extracción afectan el número de compuestos extraídos pero no alteran la concentración de los mismos.

4.2.1.2 Destilación extracción simultánea con solventes. El proceso de estandarización de esta técnica, se llevó a cabo de forma similar que para la MWHD, de tal manera que se realizaron ANDEVAS en cuanto al número de compuestos extraídos (tabla 10) y a la concentración de los compuestos comunes a todas las repeticiones (tabla 11).

Tabla 10. ANDEVA de acuerdo con el número de COVs extraídos por DES.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	21.583	7.194	1.727	4.07
Error	8	33.333	4.167		
Total	11	54.917			

La relación entre F_{cal} y F_{tab} indica que no existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, por lo tanto se pudo establecer que las condiciones de extracción aplicadas no afectan el número de compuestos extraídos.

Tabla 11. ANDEVA de acuerdo con la concentración de los COVs extraídos por DES.

Fuente de Variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F Calculada	F Tabulada
Tratamientos	3	2963	988	2	4
Error Experimental (EE)	8	1004	564		
Error de muestreo (EM)	48	30569			
Total	59	34536			

El análisis de F_{cal} y F_{tab} muestra que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, por lo tanto, la variación de las condiciones de extracción no altera la concentración de los compuestos extraídos. De acuerdo a lo anterior, para la técnica DES es posible aplicar cualquiera de los tratamientos sin afectar el número de compuestos extraídos ni la concentración de los mismos. Sin embargo, considerando aspectos económicos y de tiempo, se trabajó con el tratamiento 2 que implicaba el uso de un solvente, el diclorometano y el menor tiempo de extracción que corresponde a 45 minutos.

4.3 CUANTIFICACION

El proceso de cuantificación se llevó a cabo empleando n-tetradecano como Istd, por medio de GC-FID.

Para los extractos obtenidos por MWHD, las concentraciones relativas al Istd de cada uno de los 70 compuestos observados en la figura 19 se calcularon de acuerdo a la ecuación 10 teniendo en cuenta que los valores de R_f , V_f y W_x corresponden a 75.042 cuentas \times L / mg, 0.005 L y 1.5 Kg respectivamente. En la tabla 12 se muestran las concentraciones de estos compuestos.

Figura 19. Perfil cromatográfico por GC-FID del AE de *C. candamarcensis* obtenido por MWHD. Ver cuantificación de los compuestos en la tabla 11.

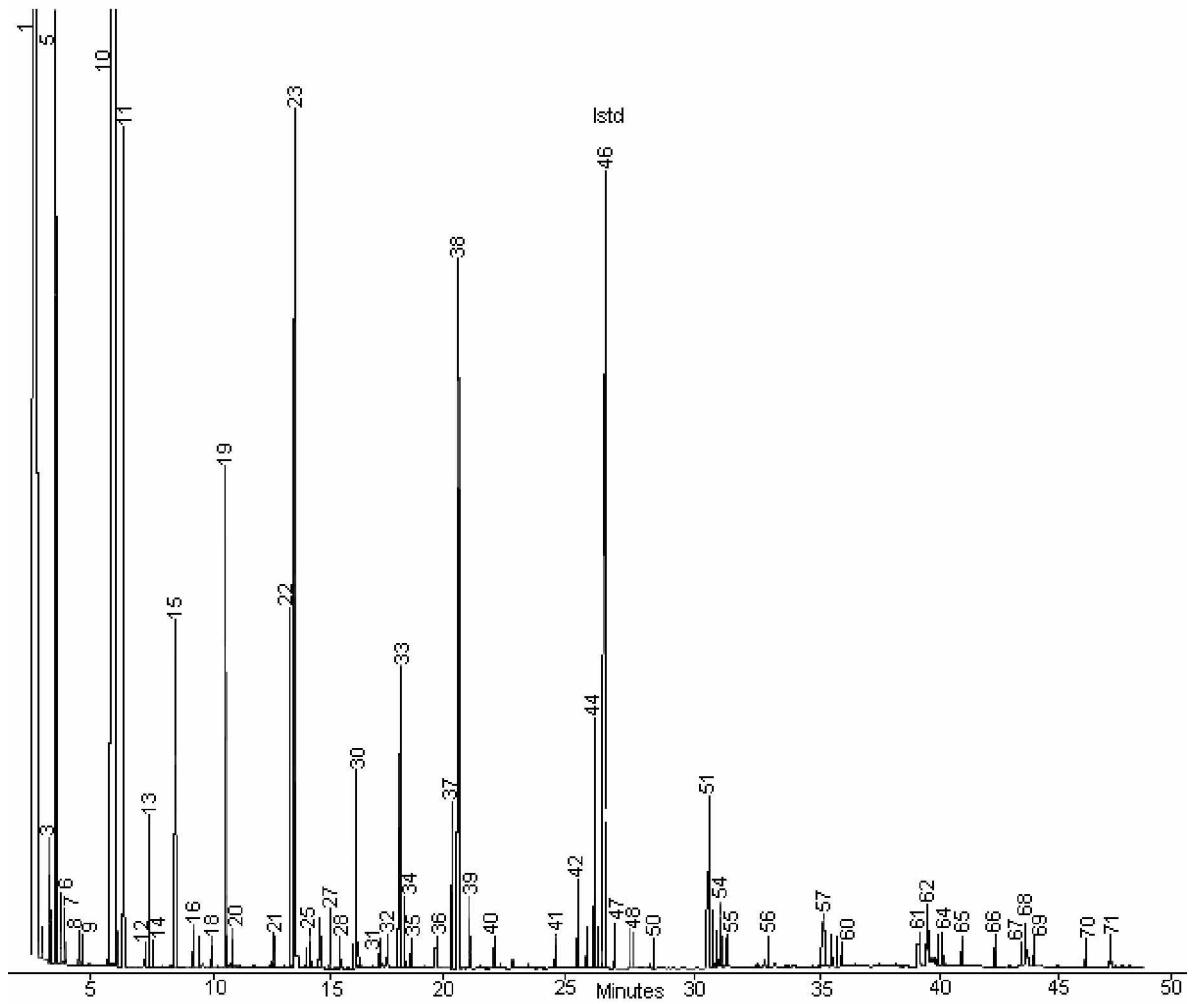


Tabla 12. Tiempos de retención, áreas y concentraciones de los compuestos presentes en el AE de los frutos de *C. candamarcensis*.

Compuesto	t _R . X (min)	Ax (cuentas)	Cx (mg/Kg material húmedo)
1	3.166	3355331	148
2	3.266	3176	141 x 10 ⁻³
3	3.658	29060	129 x 10 ⁻²
4	3.716	5204	230 x 10 ⁻³
5	3.900	461381	204 x 10 ⁻¹
6	4.075	12652	560 x 10 ⁻³
7	4.241	14283	632 x 10 ⁻³
8	4.816	1374	61 x 10 ⁻³
9	4.891	2782	123 x 10 ⁻³
10	6.400	2598737	115
11	6.750	274071	121 x 10 ⁻¹
12	7.566	2941	130 x 10 ⁻³
13	7.741	31881	141 x 10 ⁻²
14	8.008	1554	69 x 10 ⁻³
15	8.833	151709	671 x 10 ⁻²
16	9.499	5588	247 x 10 ⁻³
17	9.633	1818	80 x 10 ⁻³
18	10.266	2092	93 x 10 ⁻³
19	10.899	143066	633 x 10 ⁻²
20	11.191	12170	538 x 10 ⁻³
21	12.849	7738	342 x 10 ⁻³
22	13.591	113778	503 x 10 ⁻²
23	13.782	343176	152 x 10 ⁻¹
24	13.941	2190	97 x 10 ⁻³
25	14.216	3138	139 x 10 ⁻³
26	14.774	11412	505 x 10 ⁻³
27	15.241	13125	581 x 10 ⁻³
28	15.549	3586	159 x 10 ⁻³
29	16.116	3513	155 x 10 ⁻³
30	16.282	54632	242 x 10 ⁻²
31	17.232	7567	335 x 10 ⁻³
32	17.499	2356	104 x 10 ⁻³
33	18.082	77027	341 x 10 ⁻²
34	18.240	13661	604 x 10 ⁻³
35	18.424	2700	119 x 10 ⁻³
36	19.532	6858	303 x 10 ⁻³
37	20.232	108705	481 x 10 ⁻²
38	20.499	289793	128 x 10 ⁻¹
39	20.940	15855	702 x 10 ⁻³
40	21.924	4514	200 x 10 ⁻³
41	24.415	1883	83 x 10 ⁻³
42	25.398	23909	106 x 10 ⁻²

43	25.757	40229	178×10^{-2}
44	26.073	78031	345×10^{-2}
45	26.282	10706	474×10^{-3}
47	26.890	3828	148×10^{-1}
48	27.532	1815	169×10^{-3}
49	27.623	1544	80×10^{-3}
50	28.373	1721	68×10^{-3}
51	30.765	61956	76×10^{-3}
52	30.865	19582	274×10^{-2}
53	31.140	14583	866×10^{-3}
54	31.265	14747	645×10^{-3}
55	31.465	7776	652×10^{-3}
56	33.106	3395	344×10^{-3}
57	35.498	28881	150×10^{-3}
58	35.806	8517	128×10^{-2}
59	35.964	6624	377×10^{-3}
60	36.148	2643	293×10^{-3}
61	39.347	6972	117×10^{-3}
62	39.797	26711	308×10^{-3}
63	40.247	2395	118×10^{-2}
64	40.414	5295	106×10^{-3}
65	41.197	3608	234×10^{-3}
66	42.539	7735	160×10^{-3}
67	43.722	2446	342×10^{-3}
68	43.847	6657	108×10^{-3}
69	44.164	4483	295×10^{-3}
70	46.255	2014	198×10^{-3}
71	47.247	1478	89×10^{-3}

Para los extractos obtenidos por DES, se obtuvieron las concentraciones relativas al Istd de cada uno de los 16 compuestos observados en la figura 20, de acuerdo a la aplicación de la ecuación 10 teniendo en cuenta que los valores de Rf, Vf y Wx corresponden a 75.042 cuentas \times L / mg, 0.003 L y 0.02 Kg respectivamente. En la tabla 13 se muestran las concentraciones de estos compuestos.

Figura 20. Perfil cromatográfico por GC-FID de los compuestos volátiles de *C. candamarcensis* obtenido por DES.

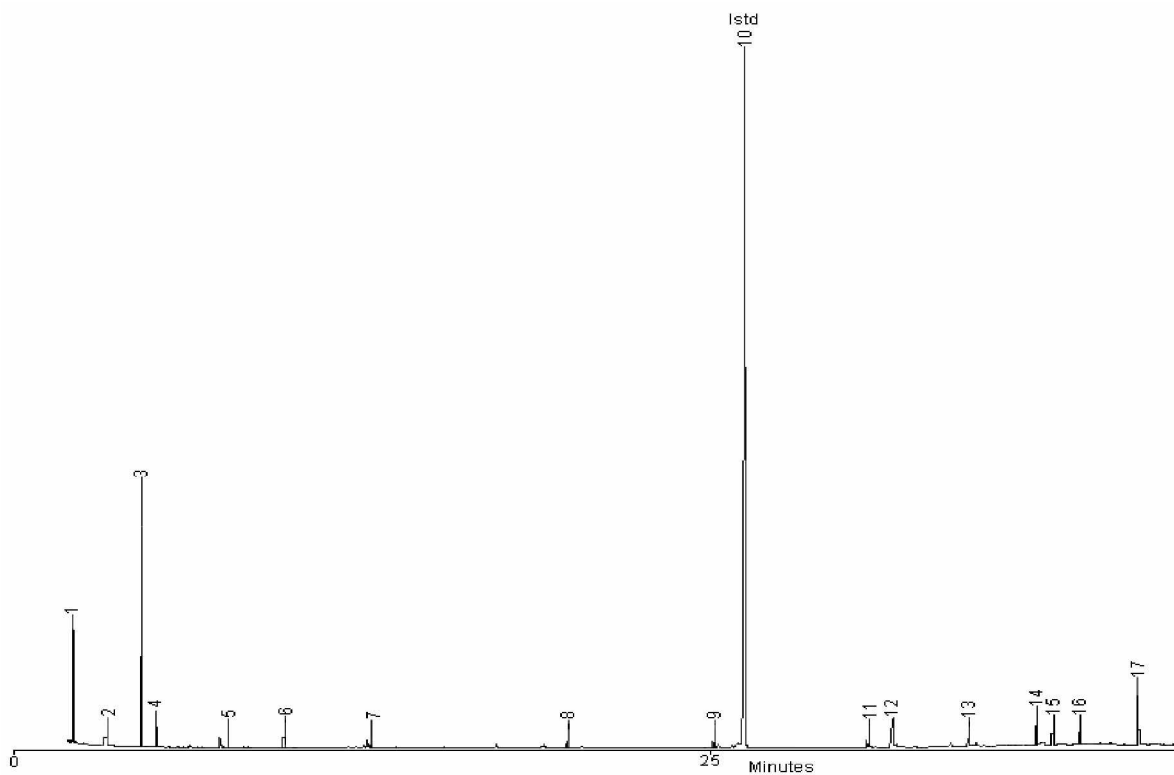


Tabla 13. Tiempos de retención, áreas y concentraciones de los COVs presentes en los frutos de *C. candamarcensis*.

Pico	t_{R-X} (min)	Ax (cuentas)	Cx (mg/Kg material húmedo)
1	3.691	13248	26
2	4.783	1163	23×10^{-1}
3	6.033	33979	68
4	6.541	4858	97×10^{-1}
5	8.683	1730	34×10^{-1}
6	10.816	1999	4
7	13.674	2000	4
8	20.415	808	16×10^{-1}
9	25.382	1131	23×10^{-1}
11	30.598	982	2
12	31.448	6400	13
13	34.006	1169	23×10^{-1}
14	36.289	1205	24×10^{-1}
15	36.839	1800	36×10^{-1}
16	37.781	1746	35×10^{-1}
17	39.772	10246	20

4.4 IDENTIFICACIÓN

La etapa de identificación preliminar se realizó por GC-MS (figuras 21 y 22) mediante el cálculo de los I_K , los cuales se determinaron por comparación de los tiempos de retención con los de una mezcla patrón de hidrocarburos de $C_6 - C_{18}$ aplicando la ecuación 1. Una vez determinados los I_K , éstos se compararon con los reportados en la literatura por R. Adams [112], de tal forma que se asignaron algunos compuestos probables como se muestra en las tablas 14 y 15. Las estructuras de estos compuestos pueden observarse en los anexos F y G.

Figura 21. Perfil cromatográfico por GC-MS del AE de *C. candamarcensis* extraído por MWHD.

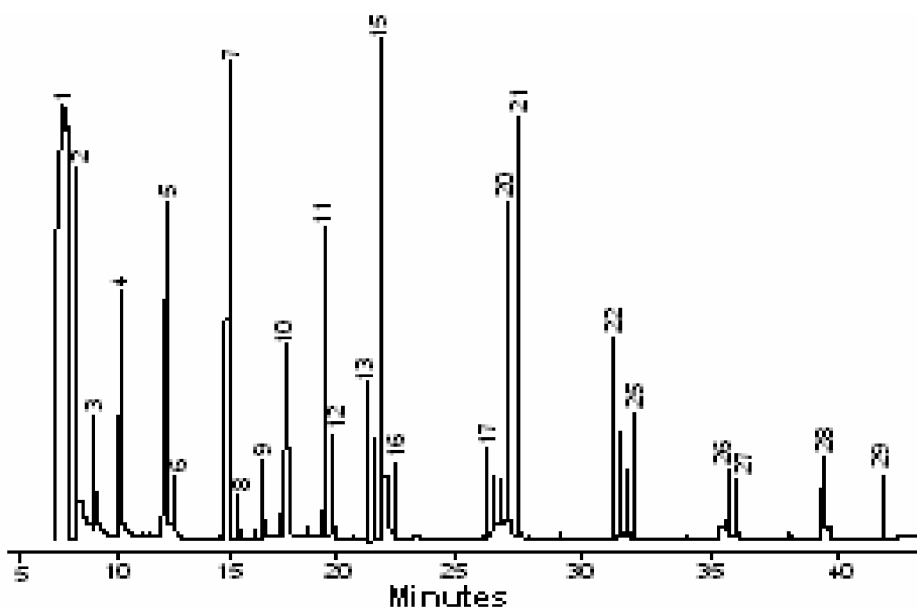


Tabla 14. Identificación mediante los I_K de los compuestos del AE de *C. candamarcensis* extraídos por MWHHD

Pico	t_R	I_K Experimental	I_K Teórico	Compuesto probable
1	7.442	534		NI
2	7.972	563		NI
3	8.940	614		NI
4	10.105	670		NI
5	12.001	731	734	Alcohol Isopentílico
6	12.386	741	740	Tiazol
7	14.885	809	809	2-Octeno (Z)
8	15.225	831	830	Furfural
9	16.358	903	899	n-nonano; Heptanal
10	17.399	956	957	2-etoxitiazol; Thuja-2,4(10)-dieno
11	19.137	1033	1033	1,8-Cineol
12	19.406	1043	1043	Fenilacetaldehído
13	21.309	1148	1148	Mircenona; Hidrato de canfeno,
14	21.601	1184	1184	Dill eter
15	21.858	1204	1204	Decanal; Verbenona
16	22.126	1213	1213	Pulegol (trans)
17	26.567	1365	1365	Dihidroeugenol, Acetato de nerilo
18	26.842	1375	1374	Isobutirato de Linalool, Cinamato de etilo (Z)
19	27.390	1394	1394	Decanoato de Etilo, Jasmona (Z)
20	27.652	1403	1403	β -Isocumeno
21	27.720	1406	1407	Dodecanal, α -thujaplicin
22	31.874	1564	1564	Nerolidol (E)
23	32.136	1574	1574	Dendrolasin, Oxido himachalene, Germacrene D-4-ol
24	32.328	1581	1581	Oxido de Cariofileno, Thujopsan-2-alpha-ol
25	32.441	1585	1585	Gleenol
26	36.800	1773	1772	Guaiazuleno
27	37.007	1782	1782	Acetato de Hinesol
28	41.124			NI
29	43.817			NI

NI : no identificado.

Figura 22. Perfil cromatográfico por GC-MS de los COVs extraídos por DES.

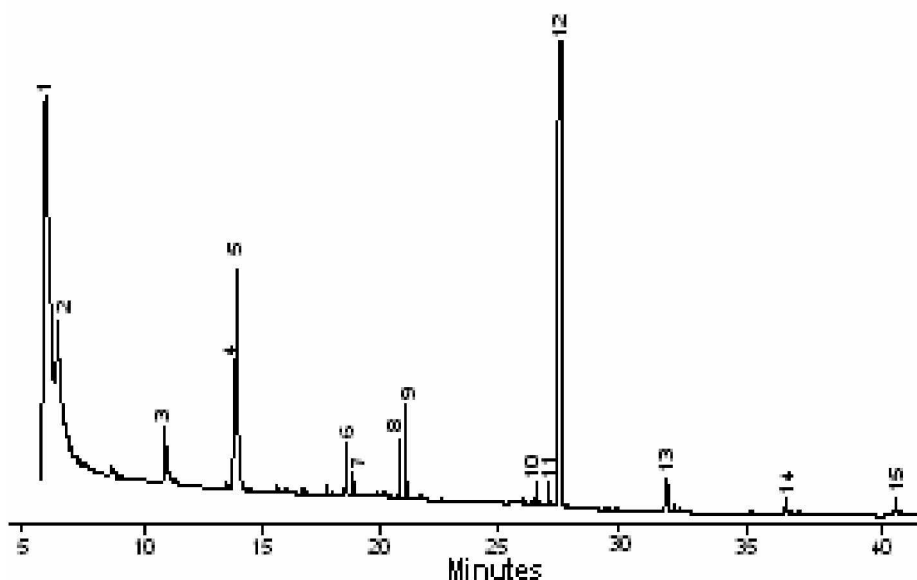
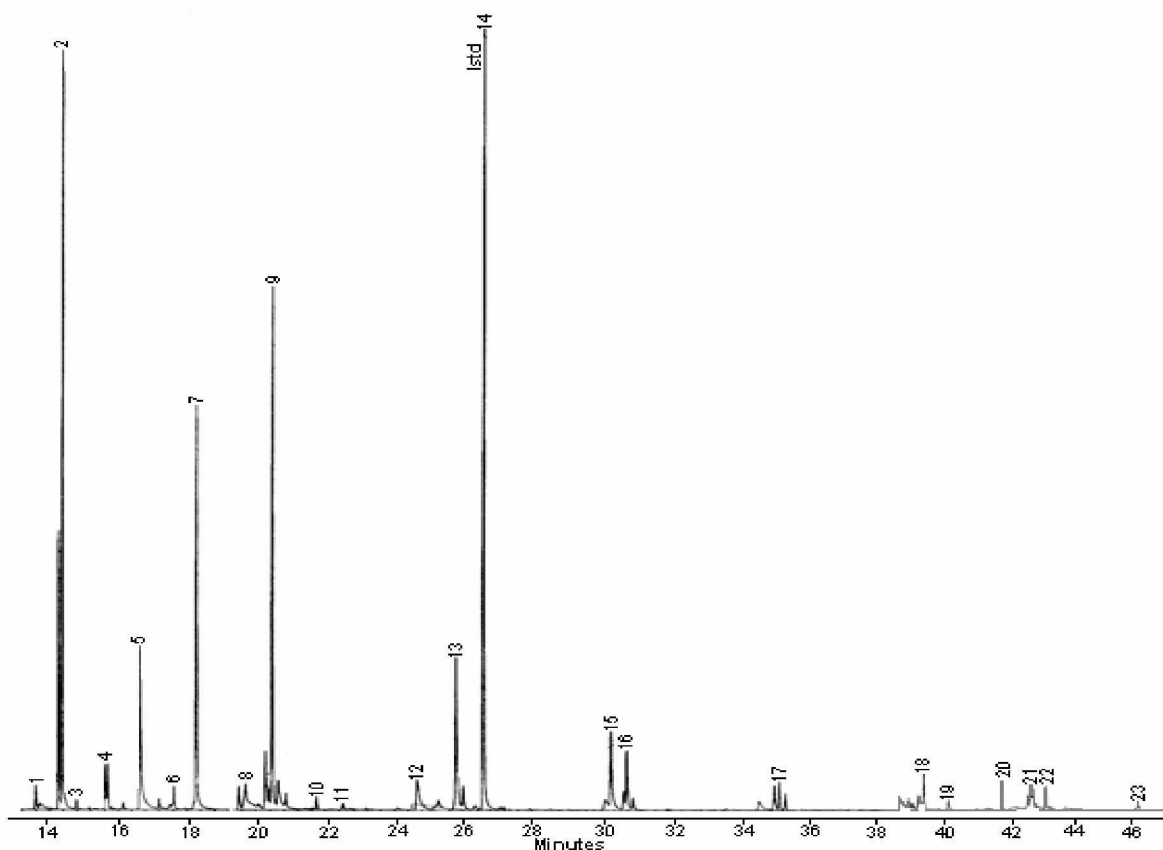


Tabla 15. Identificación mediante los I_K de los COVs de *C. candamarcensis* extraídos por DES.

Pico	t_r	I_K		Compuesto probable
		Experimental	Teórico	
1	7.056	512		NI
2	7.534	539		NI
3	11.814	727	724	Butirato de metilo
4	14.561	795	793	3,4-hexanodiona
5	14.666	798	799	4-octeno (E)
6	19.044	1029	1027	Silvestreno
7	19.300	1039	1039	4-metil-4-vinilbutirolactona
8	21.250	1141	1140	Verbenol (cis); Sabinol (trans); Hidrato de pineno (trans).
9	21.424	1162	1162	Pinocarvona; Crisantenol (cis)
10	26.669	1368	1368	Ciclosativeno
11	27.132	1385	1384	β -Bourboneno
12	27.596	1401	1401	Metil eugenol, Italiceno
13	31.812	1562	1562	Butirato de geranilo
14	36.565	1762	1762	Benzoato de bencilo, Acetato de cedrilo
15	40.944			NI

Para MWHD, además de los análisis realizados por GC-MS, se llevo a cabo una prueba confirmatoria en la Universidad Industrial de Santander, por HRGC-MS. El perfil cromatográfico se muestra en la figura 23.

Figura 23. Perfil cromatográfico por HRGC-MS del AE de *C. candamarcensis* extraído por MWHD.



Aquí se aclara, que para la identificación de los compuestos extraídos por DES el análisis por GC-MS se realizó únicamente en la Universidad de Nariño, aunque los análisis realizados en la UIS para MWHD ayudaron en la identificación de algunos de ellos, puesto que por las dos técnicas se obtuvieron compuestos similares, debido a que el AE es una mezcla de COVs (ver tablas 16 y 17). Los espectros de masas obtenidos para los compuestos extraídos por las dos técnicas se muestran en los anexos H e I, en el anexo J, se presentan los espectros de masas de los compuestos no identificados.

Considerando todos los análisis cromatográficos realizados, puede notarse que el número de compuestos detectados por GC-FID (70) es superior al detectado por GC-MS (29) y por HRGC-MS (23) por lo tanto se identificaron únicamente algunos de los compuestos separados por esta técnica, de tal forma que en el AE de *C. candamarcensis* se lograron identificar 25 compuestos (tabla 16), mientras que para los COVs se identificaron 10 (tabla 17).

Tabla 16. Compuestos identificados en el AE de *C. candamarcensis* extraído por MWHD.

Compuesto	Concentración (mg/Kg material vegetal húmedo)
Acetato de hexilo	97×10^{-3}
Ácido octanoico	481×10^{-2}
Ácido tetradecanoico	150×10^{-3}
Benzoato de butilo	178×10^{-2}
Caprilato de butilo	345×10^{-2}
Caprilato de metilo	633×10^{-2}
Decanoato de butilo	645×10^{-3}
Farnesol	76×10^{-3}
Furancarboxilato de etilo	581×10^{-3}
Heneicosano	180×10^{-3}
Hexadecanoato de butilo	295×10^{-3}
Hexadecanoato de etilo	308×10^{-3}
Hexanoato de etilo	152
2- hidroxibenzoato de etilo	200×10^{-3}
Linalool	335×10^{-3}
5-metil-1-hexeno	128×10^{-2}
2-metil-1-penteno	671×10^{-2}
2-miristinol glicinamida	198×10^{-3}
9,12,15-octadecatrienoato de metilo	108×10^{-3}
Octanoato de etilo	128×10^{-1}
Octanoato de metilo	341×10^{-2}
Octanol	242×10^{-2}
2-octenoato de etilo	702×10^{-3}
1-octen-3-ona	342×10^{-3}
Tolueno	106×10^{-2}

Tabla 17. COVs extraídos por DES, identificados en *C. candamarcensis*.

Compuesto	Concentración (mg/Kg material vegetal húmedo)
Caprilato de butilo	23×10^{-1}
Acetato de metilo	4
Decanoato de butilo	13
Farnesol	2
Heneicosano	20
Hexanoato de etilo	4
2-metil pentano	68
Octanoato de etilo	16×10^{-1}
Octanoato de metilo	NC
Octanol	97×10^{-1}

NC: no cuantificado.

4.4.1 Clasificación de los compuestos identificados. Dentro de los compuestos identificados en los extractos analizados, se presentan varias especies químicas por los que se estableció la abundancia relativa de las mismas.

En las figuras 24 y 25 se observa claramente la predominancia de los compuestos oxigenados tanto en el AE como en los metabolitos secundarios volátiles de *C. candamarcensis*. La clasificación completa se presenta en el anexo K.

4.4.2 Actividad biológica. En la actualidad la relación entre la estructura química y la actividad biológica ha recibido atención considerable en los campos de farmacología y el desarrollo de drogas [113]. De ahí la importancia de evaluar la composición de los extractos naturales que se someten a ensayos biológicos para determinar una posible actividad de los componentes de los extractos analizados.

Dentro de este trabajo de investigación, el AE de pulpa de *C. candamarcensis* presentó actividad sobre poblaciones de *H. pylori* ...sección 4.1 ..., por lo que una vez identificados los componentes, se hizo necesario hacer una revisión bibliográfica acerca de sustancias con alguna actividad. De ahí se estableció que algunos de los componentes de los extractos analizados como: octanol, linalool, farnesol y decanoato de butilo, presentan actividades específicas como la inhibición de ciertos agentes patógenos (hongos), efectos antitumorales y la estimulación de hormonas en insectos. De igual forma se reporta la importancia de gran cantidad de ésteres y sus derivados con varios tipos de actividades [114-122].

Figura 24. Abundancia relativa de las diferentes familias de compuestos identificados en el AE de *C. candamarcensis* obtenido por MWHD.

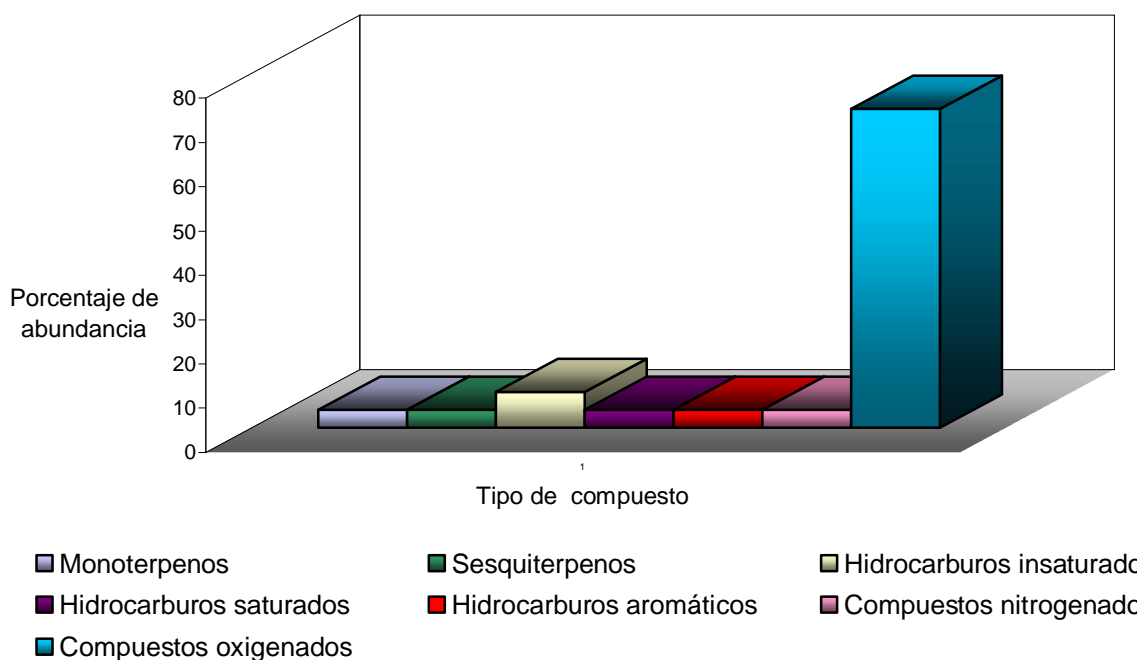
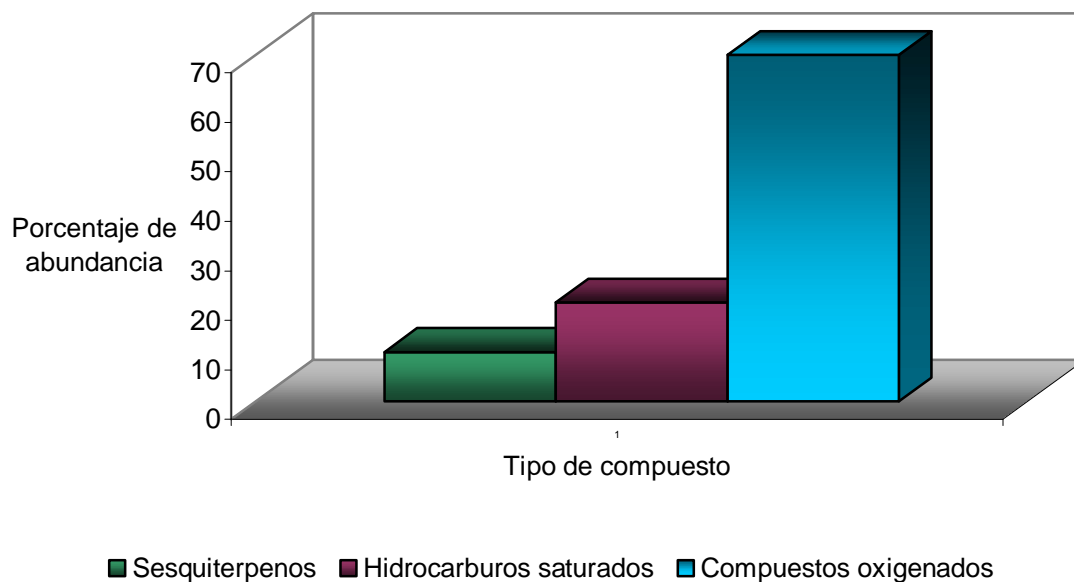


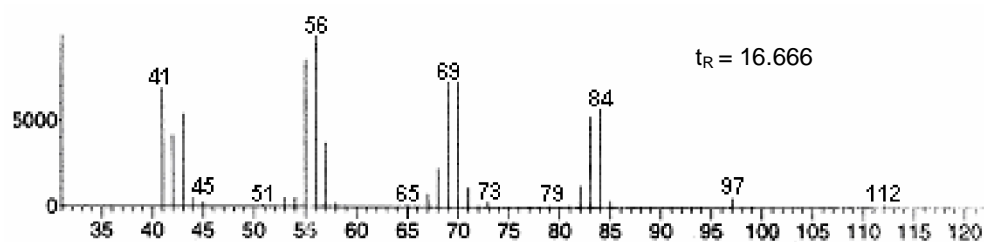
Figura 25. Abundancia relativa de las diferentes familias de compuestos volátiles identificados en *C. candamarcensis* obtenidos por DES



Con lo anterior no se pretende establecer una conexión directa entre los compuestos con reportes de actividad biológica y los compuestos activos en la inhibición del crecimiento de *H. pylori*, pues no se conoce si éstos o cualquiera de los otros sobre los que hasta el momento no se ha reportado alguna actividad son los causantes del efecto sobre la bacteria.

Sin embargo, teniendo en cuenta los antecedentes de estos compuestos con respecto a algún tipo de actividad biológica, a continuación se presentan los espectros de masas y las posibles rutas de fragmentación que sufren éstos al ser sometidos al análisis por GC-MS (figuras 26 – 33).

Figura 26. Espectro de masas del 1-octanol.



El espectro de masas del 1- octanol presenta un pico base en m/z 56, debido a la deshidratación del ion molecular, seguida por la pérdida de un radical métilo y posteriormente un radical alilo, como puede observarse en la figura 27.

Figura 27. Posibles rutas de fragmentación del 1-octanol.

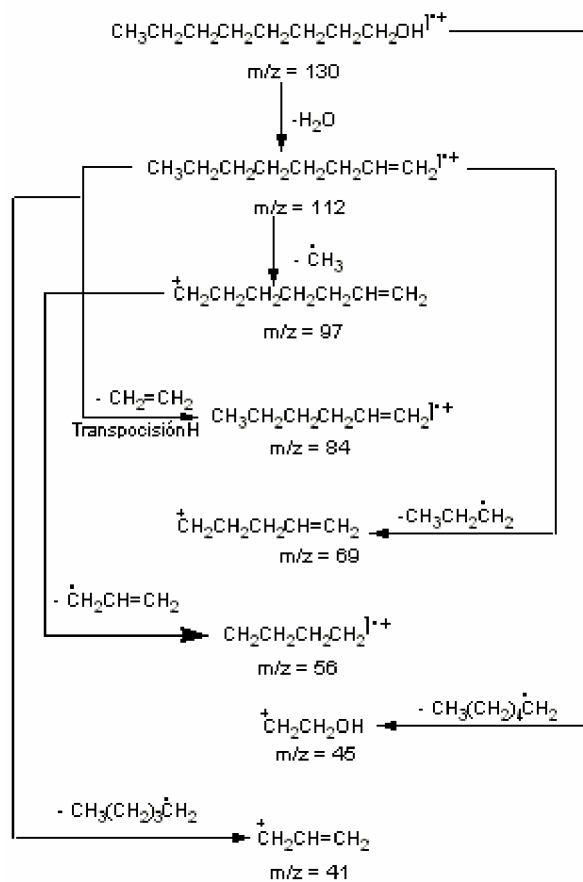
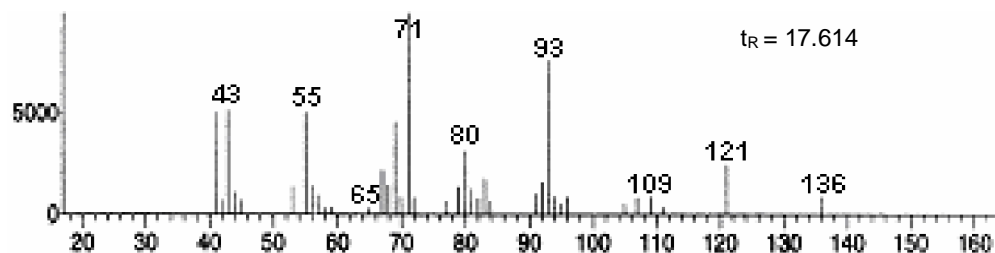


Figura 28. Espectro de masas del linalool.



En el espectro de masas del linalool el pico base corresponde a m/z 71, que se produce por pérdida de un radical alquilo, a partir del ion molecular como se muestra en la figura 29.

Figura 29. Posibles rutas de fragmentación del linalool.

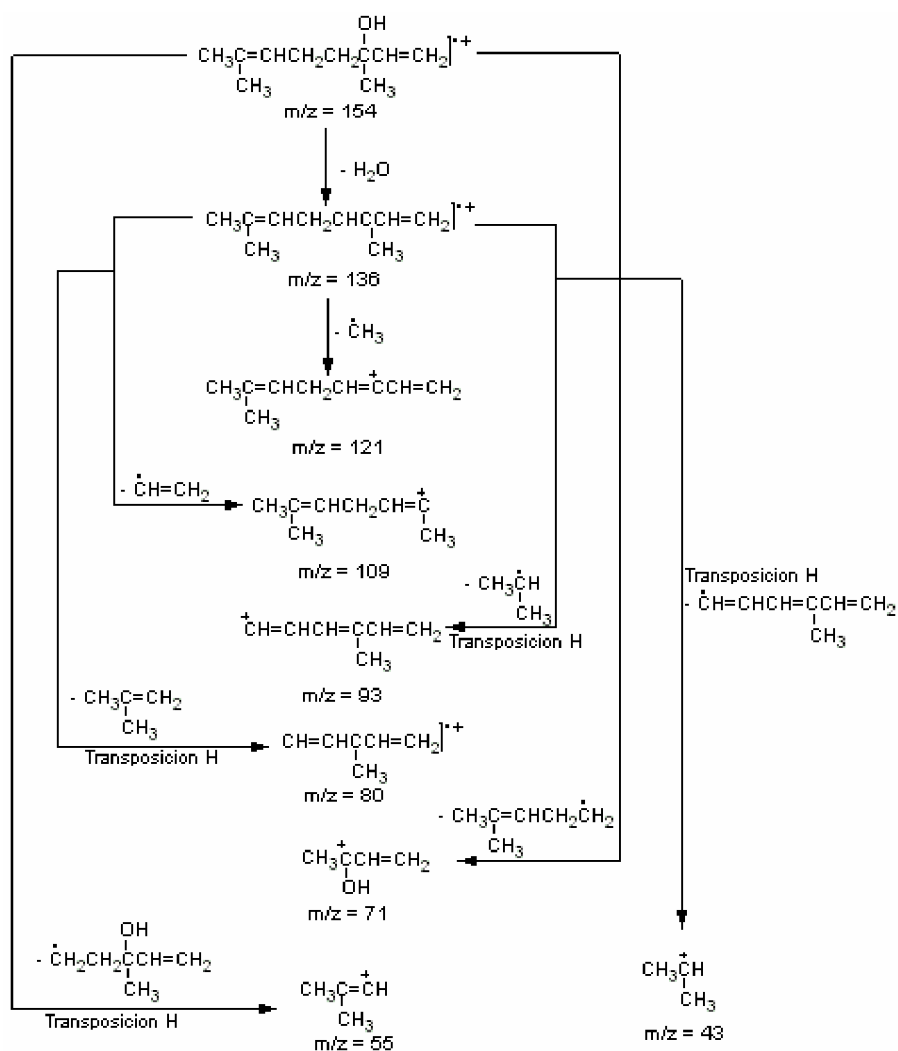
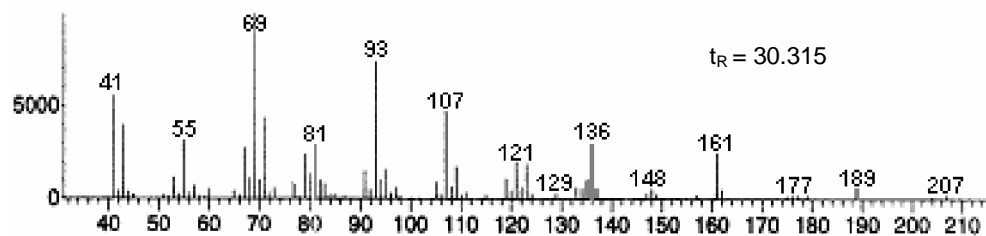


Figura 30. Espectro de masas del farnesol



El pico base a m/z 69 se presenta debido a la pérdida consecutiva de los radicales $^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}^+$ y $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}^+$. En la figura 31 se indican las principales rutas de fragmentación de la molécula.

Figura 31. Posibles rutas de fragmentación del Farnesol.

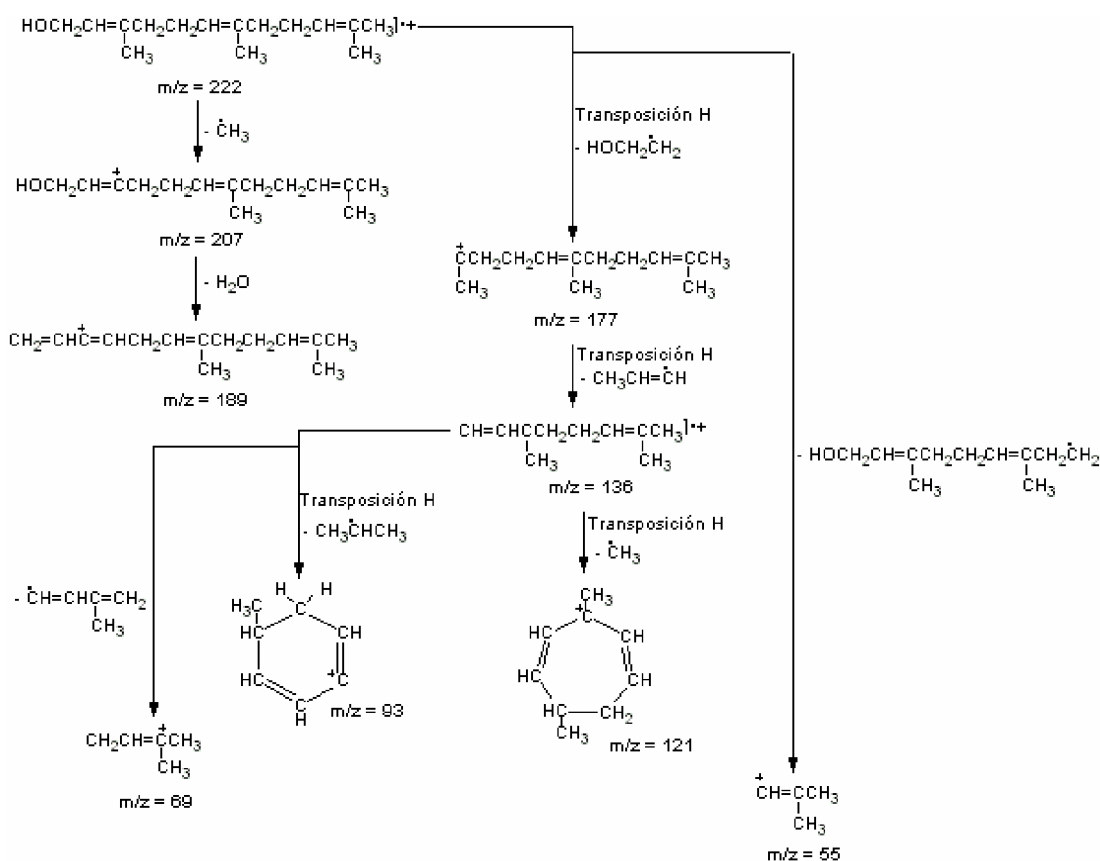
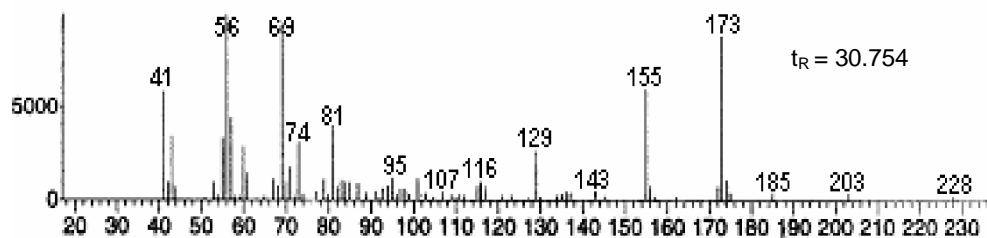
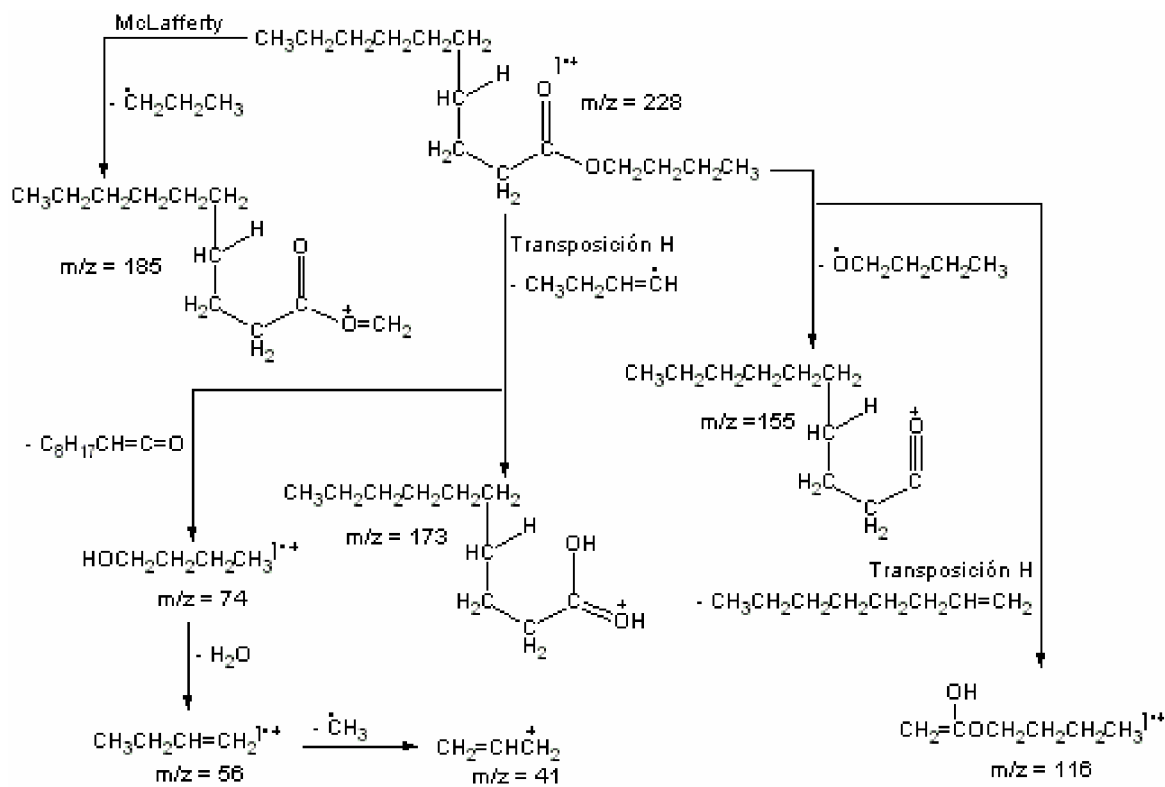


Figura 32. Espectro de masas del Decanoato de butilo.



En el espectro de masas del Decanoato de butilo se observa el pico base a m/z 56 debido a la pérdida de una molécula neutra y posterior deshidratación como se muestra en la figura 33.

Figura 33. Posibles rutas de fragmentación del Decanoato de butilo.



5. CONCLUSIONES

La evaluación del material vegetal de dos lugares diferentes, bajo condiciones de cultivo distintas, permitió establecer que el estrés provocado por agentes patógenos sobre los frutos de *C. candamarcensis* influye directamente en la producción del AE.

Las pruebas biológicas realizadas en los laboratorios de Biología de la Universidad de Nariño con los AE y extractos acuosos de semillas y pulpa de *C. candamarcensis* demostraron que el AE de pulpa, presentó actividad sobre el crecimiento de *H. pylori*, presentando halos de inhibición de 8.5 mm.

La estandarización del proceso de extracción por MWHD indicó que para la especie *C. candamarcensis* las condiciones óptimas para extraer un mayor número de compuestos fueron una potencia de 7 con un tiempo de extracción de 90 minutos.

A partir de la estandarización del proceso de extracción de los COVs por DES, se estableció que el tipo de solvente empleado (diclorometano y mezcla diclorometano-acetato de etilo 2:1) y el tiempo de extracción (45 y 90 min) no afectan el número de compuestos extraídos ni la concentración de los mismos.

El análisis cromatográfico por GC-FID demostró la presencia de 70 compuestos en el AE obtenido por MWHD y 16 COVs obtenidos por DES. La cuantificación se llevo a cabo por el método del Istd con n-tetradecano, encontrándose que la mayoría de los compuestos mencionados se presentan en concentraciones relativamente bajas menores de 10 ppm.

Los I_K por si solos no fueron un parámetro decisivo para el proceso de identificación, debido a que varios compuestos pueden presentar el mismo índice, lo que hizo estrictamente necesario utilizar GC-MS con varias bases de datos para establecer la identidad real de los compuestos encontrados en las muestras analizadas.

En el AE obtenido por MWHD, se logró la identificación de 25 compuestos de los cuales el 72% corresponde a compuestos oxigenados y el 28% restante está conformado por hidrocarburos saturados, insaturados y aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos nitrogenados.

En los extractos obtenidos por DES, de los 17 compuestos observados, solo 10 fueron identificados. De estos, 7 corresponden a compuestos oxigenados, 2 a hidrocarburos saturados y 1 sesquiterpeno.

La identificación de los compuestos extraídos permitió confirmar la presencia de COVs en el AE de *C. candamarcensis*, debido a que se encontraron compuestos comunes en los extractos obtenidos por las dos técnicas empleadas (MWHD, DES), entre ellos se encuentran: farnesol, octanoato de metilo y etilo, caprilato de etilo y decanoato de butilo.

6. RECOMENDACIONES

En este trabajo, se analizaron algunos de los metabolitos secundarios presentes en la pulpa de los frutos maduros de la especie *C. candamarcensis*, la cual aún no ha sido ampliamente investigada, por lo tanto, se podrían plantear nuevas investigaciones para la identificación de los metabolitos presentes en el látex que esta especie produce, pues según la medicina popular este posee propiedades antibacterianas.

Analizar la producción de los metabolitos secundarios presentes en los frutos de *C. candamarcensis* teniendo en cuenta la época de recolección, para establecer el efecto de los cambios climáticos sobre el metabolismo de la planta.

Continuar con el estudio de los metabolitos secundarios de esta especie, debido a su actividad biológica sobre la bacteria *H. pylori*, estableciendo estudios interdisciplinarios que permitan el aislamiento de los principales componentes de las mezclas obtenidas y sus ensayos biológicos correspondientes, para establecer los tipos de compuestos activos sobre la bacteria.

De igual forma, se podrían aplicar otras técnicas de obtención de extractos, con el fin de comparar la efectividad del tipo de extracción de los metabolitos con la posibilidad de la actividad biológica de los mismos, aquí se aclara que en el presente trabajo de investigación solo se realizaron pruebas biológicas con los extractos obtenidos por MWHD.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

1. ASTUDILLO, Myriam. Gastritis, una enfermedad clasista. Cali, 1997, Ciencia al día. [Cited 8 Aug 2004]. Available from Internet: <<http://aupec.univalle.edu.co/informes/mayo97/boletin36/gastritis.html>>
2. BRAVO, Luis Eduardo; CORTEZ, Armando; CARRASCAL, Edwin; PELAYO, C. y ORDÓÑEZ Nora. Seroprevalencia de anticuerpos anti-Helicobacter pylori en donantes de sangre de regiones colombianas con diferencias en la mortalidad por cáncer gástrico. En: Colombia Médica, 2000. v. 31, p. 122-130.
3. RODRIGUEZ, Alberto; ALVARADO Jaime; SANDLER, Robert; HANI, Cecilia; SANMIGUEL, Patricia y GOMEZ Gabriel. Asociación entre infección por Helicobacter Pylori y cáncer gástrico en Colombia. En: Acta Médica Colombiana, 2000. v.25, p. 112-116.
4. ERRADICACIÓN DE Helicobacter pylori. En: Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 1999. v.13, p. 1047-1055.
5. METABOLISMO VEGETAL. En: wikipedia, la enciclopedia libre. [Cited 13 Sep 2004]. Available from Internet: <<http://es.wikipedia.org>>
6. GROS, Eduardo; POMILIO, Alicia; SELDES, Alicia y BURTON Gerardo. Introducción al estudio de los productos naturales. Washington: programa regional de desarrollo científico y tecnológico, 1985. p. 1.
7. METABOLITOS PRIMARIOS y secundarios. Universidad de granada, Facultad de ciencias, Departamento de química, 2002. p. 5 [Cited 26 Aug 2004]. Available from internet <http://www.ugr.es/~quiorred/pnatu/terpenoides.htm>
8. Ibid., p. 3.
9. STRASBURGER, E.; NOLL, F., SCHENK, H. Y SCHIMPER W. Tratado de botánica. Barcelona: Marin, 1994. p.947.
10. MANN, J. Secondary Metabolism. London: Oxford Science Publication, 1996. p. 482-486.

11. MEDINA, Jorge. El concepto de alomonas y sus efectos en la interacción planta-insecto. México, 2003. [Cited 20 Sept 2004]. Available from Internet: <www.agroenmexico.com/agroquímicos/berni_labs/berni_labs.htm>
12. SANCHEZ, Juan. Los fitoquímicos. En: Consejo latinoamericano de información alimentaria, 2001. v.4. p. 523-525.
13. FERREIRA, Eduardo. Ecología: mitos y fraudes. Buenos Aires: Fundación argentina de ecología científica, 2001. [Cited 21 Sept 2004]. Available from Internet: <<http://mitosyfraudes.8k.com/INDICE/CAP13-sintetico.htm>>
14. GROSS, Op. cit., p. 79.
15. METABOLITOS PRIMARIOS., Op. cit., p. 6.
16. EXTRACCION DE los Aceites Esenciales. En: Revista Ciencia, cultos y religiones, 2000. v.3. p. 303-307. [Cited 15 Nov 2002] Available from Internet: <www.mantra.com.ar>
17. MURILLO, Elizabeth y VIÑA Amparo. Determinación de constituyentes volátiles de la albahaca (*Ocimum spp*) mediante dos métodos de extracción. En: Revista colombiana de química, 1999. v. 28.
18. FARMER, E. y RYAN, C. Airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. En: Proc. Nat. Acad Sci, 1990. v.87. p. 7713-7716.
19. SHARKEY, T. y SINGSAAS, E. Why plants emit isoprene. En: Nature, 1995. v.374 .p. 769.
20. OWENS, M.; LIN, C.; TAYLOR, C. y WHISENAT, S. Seasonal patterns of plant flammability and monoterpenoid content in *Juniperus ashei*. En: Journal Chemical Ecology, 1998. v. 24. p. 2115-2129.
21. BANDONI, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2000. p. 149.
22. CABRA, E. Los aceites esenciales: Panorama internacional y del mercado colombiano. Bogota, 1988. 175p.
23. SCHREIER, P. Chromatographic studies of biogenesis of plant volatile: Alfred Hunthig Verlag GmbH, 1984. p. 2-12.
24. MONOTERPENOS Y SESQUITERPENOS. [Cited 26 Aug 2004]. Available from Internet: <<http://www.flissbis.com/aroma/monoterpenos.html>>

25. ALVAREZ, Luis. Recolección, caracterización y evaluación de papayas de altura, con énfasis en papayuelas: Universidad de Caldas, 2000. p. 1. [Cited 25 Sep 2003]. Available from Internet: <<http://ciagrope.tripod.com/ff01.html>>
26. Ibid., p. 2.
27. RODRÍGUEZ, José y PEÑA, José. Flora de los Andes: Cien especies del altiplano Cundiboyasense. Bogota: CAR, 1984. p.146.
28. GARCIA, Hernando. Flora medicinal de Colombia: Botánica médica. Bogotá: Talleres editoriales de la imprenta nacional., 1975. p. 270.
29. RODRIGUEZ, Op. cit., 147.
30. GARCIA, Op. cit., p. 271.
31. ARBELAEZ, Ernesto. Plantas útiles de Colombia. Medellín: Víctor Hugo. 1990, p. 259.
32. PROEXANT. Chamburo: proyectos exitosos para el sector agro-exportador. Quito, 2003 – [Cited 10 Sep 2003]. Available from Internet: <www.proexant.org.ec/HT_chamburo.html>
33. VAN, Patrick; VANDEBROEK, Ina y DECUYPERE, Françoise. “Fruits From America”. Faculty of agricultural and applied Biológicas Sciences. Ghent University. 2000- [Cited 10 Sep 2003] Available from Internet: <www.crat.cgrar.org/ipgri/fruits_from_americas/frutales/cover.htm>
34. GARCIA, Op. cit., p.270.
35. RODRIGUEZ, Op. cit., p. 146.
36. GARCIA, Op. cit., p.272
37. ARBELAEZ, Op. cit., p. 250.
38. GARCIA, Op. cit., p.275.
39. MICHELETTI, Dora. Comportamiento meiotico de la descendencia hibrida producida al transferir el caracter bisexual de *Carica pubescens* A *Carica stipulata*. En: Revista Maracay. v. XI (1-4). p. 5-47.
40. RODRIGUEZ, Op. cit., p. 148.

41. GARCIA, Op. cit., p.271.
42. RODRIGUEZ, Op. cit., p. 146.
43. GARCIA, Op. cit., p.272.
44. ESCOBAR, Diego; RENGIFO, Mercedes y RODRIGUEZ, Maritza. No solo para el jugo vive la papaya. En: Trópico, 2000- [Cited 1 Sep 2004]. Available from Internet<<http://www.cci.org.co>>
45. RODRIGUEZ, Op. cit., p. 148.
46. GARCIA, Op. cit., p.273.
47. ARBELAEZ, Op. cit., p. 256.
48. WALREAVENS, V.; JAZIRI, M.; VAN, J.; SCHNEK, A.; KLEINSCHMIDT, T y LOOZE, Y. Isolation and preliminar y characterization of the cysteine-proteinases from latex of *Carica candamarcensis* Hook. En: Biological Chemistry Hoppe Seyler, 1993. v. 374 (7). p.501-506. [Database online]. Original no consultado. PubMed – Indexed for MEDLINE. [Cited 27 Feb 2004]. PMID: 8216902. Available from Internet: <<http://www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/images/PubMedLInks>>
49. JAZIRI, M.; KLEINSCHMIDT, T WALREAVENS, V.; VAN, J.; SCHNEK, A. y LOOZE, Y. Primary structure of CC-III, the glycosylated cysteine proteinase from the latex of *Carica candamarcensis* Hook. En: Biological Chemistry Hoppe Seyler, 1994. v. 375 (6). p.379-385. [Database online]. Original no consultado. PubMed – Indexed for MEDLINE. [Cited 27 Feb 2004]. PMID: 7980869. Available from Internet: <<http://www.linkinghub.elsevier.com/retrieve/images/PubMedLInks>>
50. GRAVINA, D. y TERMIGNONI, C. Biochemical characterization of a new Cysteine endopeptidase from *Carica candamarcensis* L. En: Plant Science Limerick, 1994. v. 102 (1). p. 11-18.
51. BRAVO, L. y HERMOSILLA, J. A biochemical comparison between latex from *Carica candamarcensis* and *C. papaya*. En: Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1994. v.27 (12). p. 2831-2842.
52. GENELHU, M y SANINI, S. Use of a cysteine proteinase from *Carica candamarcensis* as a protective agent during DNA extraction, 1998. v.31 (9). p. 1129-1132.
53. ALVAREZ, Op. cit., p. 4.

54. IDSTEIN, Heinz; KELLER, Theresia y SCHREIER Peter. Volatile constituents of mountain papaya (*Carica candamarcensis*, Syn. *C. pubescens* Lenne et Koch) fruit. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1985. v. 33. p. 663-666.
55. MORALES, Alicia y DUQUE, Carmenza. Aroma constituents of the fruit of the mountain papaya (*Carica pubescens*) from Colombia. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987. v. 35 (4). p. 538-540.
56. METODOS DE separación en Química Analítica. Universidad del Tolima: Especialización en Productos Naturales, 2004- [Cited 25 Sep 2004]. Available from Internet: <http://www.ut.edu.co/fc/0940/index.htm>
57. BANDONI, Op. cit., 167.
58. *Ibid.*, p. 168.
59. NAVES, R. Volatile plant constituents. En: Bull. Soc. Chim. France, 1971. v.3. p.886-888.
60. *Ibid.*, p. 887.
61. INNOVATEK, 2004- [Cited 25 Jan 2004]. Available from Internet: <www.innovatek.com.co>.
62. STASHENKO, Elena; JARAMILLO, Beatriz y MARTINEZ, Jairo. Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae*. En: Revista Académica Colombiana de Ciencias. v.XXVII (105). p. 579-598.
63. *Ibid.*, p. 584.
64. SERRANO, Martín. Estudio de la variación del aroma de flores de Ylang-Ylang, en función del tiempo de su almacenamiento y hora de recolección, y de su posible actividad antioxidante "*in vitro*". Bucaramanga, 2002, 93p. Tesis (Magíster en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de productos naturales.
65. LUCCHESI, Marie; CHEMAT, Farid y SMADJA, Jacqueline. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. En: Journal of Chromatography A, 2004. v.1043 (2). p. 323-327.

66. PLESSI, M.; BERTELLI, D. y MIGLIETTA, F. Effect of microwaves on volatile compounds in White and Black Pepper. En: Lebensmittel-Wissenschaft und-technologie, 2002. v.35 (3). p. 260-264.
67. KOSAR, Muberra; OZEK, Temel; GÖGER Fatih, KÜRKCÜOĞLU, Minan y CAN BASER, Hüsnü. Comparison of microwave-assisted hydrodistillation and hydrodistillation methods for the analysis of volatile secondary metabolites. [Cited 26 Sep 2004]. Available from internet: <http://pharma.unime.it/foodchem/iseo2004/Posters/P.135.pdf>
68. LIKENS, S. T. and NICKERSON, G. B., Detection of Certain Hop Oil Constituents in Brewing Products. En: Am. Soc. Brew. Proc., 1964. p. 5-13.
69. GODEFROOT, Sandra y VERZELE, M. New Method for Quantitative Essential Oil Analysis. En: Journal of Chromatography, 1981. v. 203. p. 325-335.
70. JENNINGS, W. y RAPP, A. Sample Preparation for Gas Chromatographic Analysis. Heidelberg: Huthig Verlag, 1983. 103 p.
71. NUÑEZ, A. Aislamiento y concentración de trazas orgánicas volátiles en cromatografía gaseosa capilar. La Habana: CENIC, 1992. p. 20 – 26
72. STASHENKO, Elena; QUIROZ, N. y MARTINEZ, J. HRGC/FID/ NPD and HRGC/MSD study of Colombian ylang-ylang (*Cananga odorata*) oils obtained by different extraction techniques. En: Journal of High Resolution Chromatography, 1996. v.19. p. 353-358.
73. PENG, Fumin; SHENG, Liangquan; LIU Baizhan; TONG, Hongwu y LIU Shaomin. Comparison of different extraction methods: steam distillation, simultaneous distillation and extraction and headspace co-distillation, used for the analysis of the volatile components in aged flue-cured tobacco leaves. En: Journal of Chromatography A, 2004. v.1040 (1). p. 1-17.
74. *Ibid.*, p. 2.
75. SARRAZIN, Celine; LE QUÉRÉ, Jean-Luc; GRETSCH, Catherine y LIARDON, Rémy. Representativeness of coffee aroma extracts a comparison of different extraction methods. En: Food Chemistry, 2000. v. 70. p. 99-106
76. KOCSIS, Nandor; AMTMANN, Mária; MEDNYÁNSKY, Szuzsa y KORÁNY, Kornél. GC-MS Investigation of the Aroma Compounds of Hungarian Red Paprika (*Capsicum annuum*) Cultivars. En: Journal of Food composition and Analysis, 2002. v. 15 (2). p. 195-203

- 77.**TALENS, P.; ESCRICHE, I.; MARTINEZ, N. y CHIRALT, A. Influence of osmotic dehydration and freezing on the volatile profile of kiwi fruit. En: Food Research International, 2003. v. 36 (6). p. 635-642.
- 78.**ANDRADE, Helena; MAIA, José y ZOGHBI, Maria. Aroma Volatile Constituents of Brazilian Varieties of Mango Fruit. En: Journal of Food Composition and Analysis, 2000. v. 13 (1). p. 27-33.
- 79.**LARRAYOZ, Patricia; ADDIS, Margherita; GAUCH, Roland y OLIVIER Jacques. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for the analysis of the volatile components in three European PDO ewes' milk cheeses. En: International Dairy Journal, 2001. v.11 (11-12). p. 911-926.
- 80.**ANSORENA, Diana; GIMENO, Olga; ASTIASARÁN, Iciar y BELLO, José. Analysis of volatile compounds by GC–MS of a dry fermented sausage: chorizo de Pamplona. En: Food Research International, 2001. v.34 (1). p. 67-75.
- 81.**FOREHAND, J.; DOOLY, G. y MOLDOVEANU, C. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons, phenols and aromatic amines in particulate phase cigarette smoke using simultaneous distillation and extraction as a sole sample clean-up step. En: Journal of Chromatography A. v. 898 (1). p. 111-124.
- 82.**CARERI, Maria; MANGIA, Alessandro; MORI, Giovanni y MUSCI, Marilena. A new multivariate approach for the optimisation of the simultaneous distillation–extraction technique for free fatty acids using a face centred cube experimental design: application to Parmigiano–Reggiano cheese. En: Analytica Chimica Acta. v.386 (1-2). p. 169-180.
- 83.**CORTEZ, Rubén. Cromatografía de gases, 2004- [Cited 25 Sep 2004]. Available from internet: <http://www.relaq.mx/RLQ/tutoriales/cromatografia/Gas.htm>
- 84.**A., Pablo. Cromatografía gaseosa. p. 18. [Cited 3 Mar 2002]. Available from Internet: <www.bilbo.edu.uy/~planta/pdf/GC.doc>.
- 85.**SARRAZIN, Op. cit., p. 100.
- 86.**KOCSIS, Op. cit., p. 196.
- 87.**TALENS, Op. cit., p. 636.
- 88.**ANDRADE, Op. cit., p. 29.

89. LARRAYOZ, Op. cit., p. 913.
90. ANSORENA, Op. cit., p. 70.
91. FOREHAND, Op. cit., p. 120.
92. CARERI, Op. cit., p. 169.
93. A. PABLO, Op. cit., p.9.
94. STASHENKO, Elena. Acoplamiento GC-MS: Sistemas de datos (Software). Universidad Industrial de Santander. Laboratorio de Cromatografía. Escuela de Química. [Cited 26 Sep 2004]. Available from Internet: <http://cromatografia.uis.edu.co/cursos/acopla_gcms.html>
95. A. PABLO, Op. cit., p.10.
96. ALVAREZ. M., Alba Teresa. Aislamiento, purificación e identificación de principios tóxicos alcaloidales en plantas del genero *crotalaria* y alimento contaminado para aves. Bucaramanga, 2004, 135 p. Tesis (Magíster en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de Productos Naturales.
97. WILDT, A. y AHTOLA, O. Analysis of covariance. London: Sage publications, 1987. Series 07-012.
98. ALVAREZ. M, Op. cit., p. 44.
99. LEGARDA, Lucio; LAGOS Tulio y VICUÑA Luis. Diseño de experimentos agropecuarios. San Juan de Pasto: UNIGRAF, 2001. p. 44-63.
100. TAMHANE, A. A comparison of procedures for multiple comparisons of means with unequal variances. En: Journal of the American Statistical Association, 1979. v. 74. p. 471-480.
101. ARKIN, Herbert y COLTON, Raymond. Métodos estadísticos. México: Continental, 1970. p. 151-169.
102. HAYS, William. Statistics for the social sciences. New York: Hold, Rinehart and Winston, 1973. p. 403-404.
103. SACHS, Lothar. estadística aplicada. Barcelona: Labor, 1978. p.192-196.

- 104.** RODRIGUEZ, Sonia Carolina. Estudio de la composición del aceite esencial de limonaria (*Cymbopogon citratos*), en función de condiciones agroecológicas de su cultivo en las provincias Guanentina y Comunera del Departamento de Santander. Bucaramanga, 2002. Tesis (Magíster en Química). Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Área de productos naturales.
- 105.** MILLER. J. C. y MILLER. J. N. Estadística para química analítica. Wilmington, Addison – Wesley Iberoamericana, 1993, 211p.
- 106.** HUBER. L. Buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas de fabricación actuales. Miami, Hewlett-Packard Company, 1994, 160 p.
- 107.** Ibid., p.67.
- 108.** ALVAREZ. M, Op. cit., 59.
- 109.** HUBER, Op. cit., p.68.
- 110.** MANN, Op. cit., 484.
- 111.** LEGARDA, Op.cit., p. 61.
- 112.** ADAMS, Robert. Identification of essential oil components by Gas Chromatography/ Mass Spectroscopy. Illinois: Allured Publishing Corporation, 1995. 459 p.
- 113.** McKARNS, Susan; HANSCH, Corwin; CALDWELL, William; MORGAN, Walter; MOORE, Sarah y DOOLITTLE, David. Correlation between Hydrophobicity of Short-Chain Aliphatic Alcohols and Their Ability to Alter Plasma Membrane Integrity. En: Fundamental and Applied Toxicology, 1997. v.36 (1). p. 62-70.
- 114.** Ibid., p. 63.
- 115.** STATTI, Giancarlo; CONFORTI, Filomena; SACCHETTI, Gianni; MUZZOLI, Mariavittoria; AGRIMONTI, Caterina y MENICHINI, Francesco. Chemical and biological diversity of Bergamot (*Citrus bergamia*) in relation to environmental factors. En: Fitoterapia, 2004. v. 75 (2). p. 216-216.
- 116.** KOSCHIER, Elisabeth; SEDY, Katrin y NOVAK, Johannes. Influence of plant volatiles on feeding damage caused by the onion thrips *Thrips tabaci*. En: Crop Protection, 2002. v. 21(5). p. 419-425

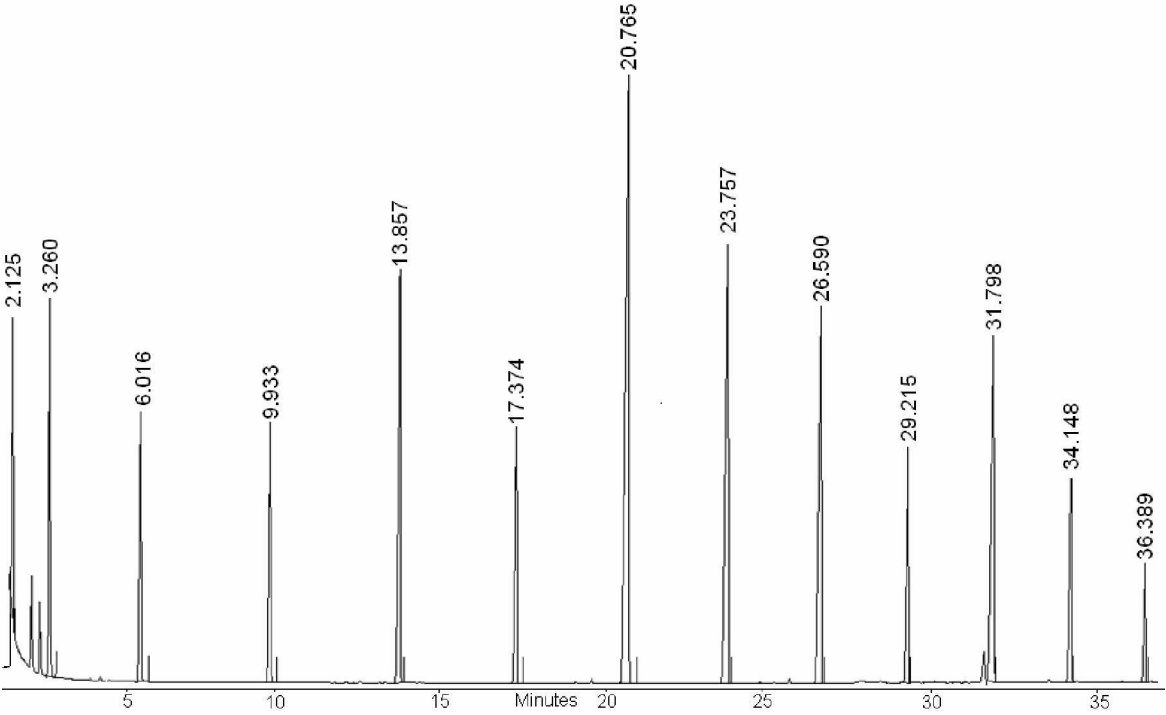
117. DICKENS, Joseph; VISSER, H. y PERS, Van Der. Detection and deactivation of pheromone and plant odor components by the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). En: Journal of Insect Physiology, 1993. v. 39 (6). p.503-516.
118. DeBARBER, Andrea; BLEYLE, Lisa; ROULLE, Jean-Baptiste y KOOP, Dennis. ω -Hydroxylation of farnesol by mammalian cytochromes P450. En: Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Molecular and Cell Biology of Lipids, 2004. v.1682 (1-3). p. 18-27
119. RANER, Gregory; MUIR, April; LOWRY, Clarice y DAVIS, Brian. Farnesol as an inhibitor and substrate for rabbit liver microsomal P450 enzymes. En: Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. v. 293 (1). p. 1-6.
120. RODRIGUEZ, Juan; GROS, Eduardo y STOKA, Angel. Synthesis and biological activity of juvenile hormone analogues (JHA) for *Trypanosoma cruzi*. En: Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1991. v. 1 (12). p. 679-682.
121. BAKER, Fred; TSAI, Leslie; REUTER, Carol y SCHOOLEY, David. The absence of significant levels of the known juvenile hormones and related compounds in the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. En: Insect Biochemistry, 1988. v. 18 (5). p. 453-462.
122. BAKER, Salaam; PEREZ, Roman y KHOKHAR, Abdul. Synthesis and biological studies of new lipid-soluble cisplatin analogues entrapped in liposomes. En: Journal of Inorganic Biochemistry, 1992. v. 47 (2). p. 99-108.

ANEXO A. Metabolitos secundarios volátiles, identificados por Idstein y Col. en *C. candamarcensis*.

Cetonas	Alcoholes	Hidrocarburos
2,3-butadiona.	1-butanol	Alcanos C12-C22.
3-hidroxi-2-butanona.	3-metil-1-butanol	Alquenos C13,15,17,19,21,23.
3-acetoxi-2-butanona.	3-pentanol	<i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -xilenos.
2-ciclohexanona.	1-hexanol	Etil Benceno.
2-hexanona.	1-octanol	1,2,3-trimetilbenceno.
2-heptanona.	1-octen-3-ol	1,2,4,5-tetrametil benceno
6-metil-5-hepten-2-ona	1-decanol	Naftaleno
2-octanona	Alcohol Bencílico	2-metilnaftaleno.
1-octen-3-ona.	Linalool.	<i>B</i> -farneseno.
2-nonanona	α - terpineol	
2-decanona	4-terpineol	
2-tridecanona	Farnesol	
2-tetradecanona	Aldehídos	Lactonas
2-hexadecanona	2-butenal	<i>r</i> -hexalactona
Acetofenona	2-metil-(E)-2-butenal	<i>r</i> -heptalactona
3-metilacetofenona	(E)-2-pentanal.	δ -heptalactona
2-hidroxiacetofenona	Decanal	<i>r</i> -octalactona
Benzofenona	Dodecanal	δ -octalactona
Fenchona.	Tetradecanal	<i>r</i> -nonalactona
<i>B</i> -ionona.	Benzaldehído	δ -nonalactona
	4-metilbenzaldehído	<i>r</i> -undecalactona
	Fenilacetaldehído	
	Furfural	

Fuente: Idstein, Heinz; Keller, Theresia y Schreier, Peter. Volatile constituents of mountain papaya (*Carica candamarcensis*) fruit.

ANEXO B. Perfil cromatográfico (GC-FID) de la mezcla de parafinas lineales C₆ - C₁₈.



ANEXO C. Tablas de datos ordenados para la estandarización de la técnica MWHD.

Datos ordenados de acuerdo con el número de compuestos extraídos.

REPETICION	T1	T2	T3	T4	TOTAL
1	47	48	71	58	
2	57	44	66	51	
3	66	43	65	50	
SUMA Yi	170.000	135.000	202.000	159.000	666.000
PROMEDIO Yi	56.667	45.000	67.333	53.000	55.5

Datos ordenados de acuerdo con las concentraciones (mg/Kg de material vegetal húmedo) de los compuestos extraídos.

REPETICION	SUBMUESTRA	TRATAMIENTOS			
		1	2	3	4
1	1	2846	5328	6692	7359
	2	1781	1176	920	2330
	3	5389	3613	5183	10197
	4	521	220	547	1051
	5	612	407	303	381
	6	478	340	285	738
	7	161	177	227	340
	8	491	354	684	1064
	9	223	97	109	128
	10	217	46	154	319
	11	315	87	578	445
	12	132	37	156	100
	13	142	32	124	97
	Subtotal	13310	11915	15961	24549
2	1	11231	5322	12573	5534
	2	1974	1174	1741	1751
	3	6015	3575	9837	7671
	4	577	219	1033	791
	5	670	400	574	285
	6	530	334	545	558
	7	180	174	431	261
	8	539	346	1304	798
	9	238	95	204	98
	10	240	45	291	242
	11	342	86	1060	338
	12	135	34	279	73
	13	163	28	241	71

	Subtotal	22835	11832	30114	18471
3	1	10676	4804	8986	6001
	2	1855	1065	1234	1914
	3	5612	3254	6945	8441
	4	542	199	731	871
	5	631	364	406	313
	6	495	304	383	618
	7	170	158	312	281
	8	508	316	924	887
	9	227	87	146	108
	10	225	41	206	268
	11	322	78	773	375
	12	134	34	208	80
	13	149	63	157	77
	Subtotal	21547	10768	21414	20234
	TOTAL TRATAMIENTOS	57691	34514	67488	63255

ANEXO D. Tablas de datos ordenados para la estandarización de la técnica DES.

Datos ordenados de acuerdo con el número de compuestos extraídos.

REPETICION	T1	T2	T3	T4	TOTAL
1	17	15	13	14	
2	17	17	14	12	
3	13	12	15	10	
SUMA \bar{Y}_i	47.000	44.000	42.000	36.000	169.000
PROMEDIO \bar{Y}_i	15.667	14.667	14.000	12.000	14.083

Datos ordenados de acuerdo con la concentración (mg/Kg material vegetal húmedo) de los compuestos extraídos.

REPETICION	SUBMUESTRA	TRATAMIENTOS			
		T1	T2	T3	T4
1	1	53	68	40	34
	2	315	171	101	87
	3	56	29	21	20
	4	16	12	11	10
	5	23	21	21	20
	Subtotal	463	301	194	171
2	1	41	73	38	35
	2	227	188	91	89
	3	55	27	21	21
	4	9	35	17	6
	5	16	57	30	14
	Subtotal	348	380	197	165
3	1	62	63	41	43
	2	160	161	104	110
	3	32	22	21	20
	4	12	12	7	15
	5	19	24	14	32
	Subtotal	285	282	187	220
	Total tratamientos	1096	963	578	556

ANEXO E. Ecuaciones aplicadas para el análisis de varianza unifactorial de un diseño DIA y un diseño DIA con submuestra.

Ecuaciones para un diseño DIA.

Grados de libertad (GL)		
Tratamientos	t-1	
Error	t(r-1)	donde r # repeticiones
Total	(t*r)-1	

Factor de corrección

$$F_c = (Y_{..})^2/n$$
n = # datos

Suma de cuadrados		
Tratamientos	$SC_t = \sum(Y_i^2/r) - FC$	
Total	$SCT = \sum\sum Y_{ij}^2 - FC$	Yij = datos
Error	$SC_e = SCT - SC_t$	

Cuadrados medios	
Tratamientos	$CM_t = SC_t/GL_t$
Error	$CME = SC_e/GLE$

Ecuaciones para un diseño DIA con submuestra.

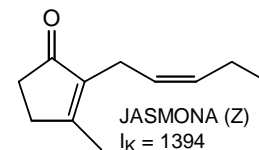
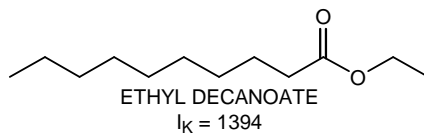
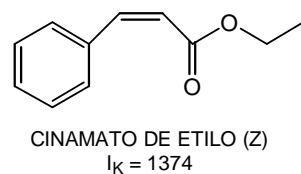
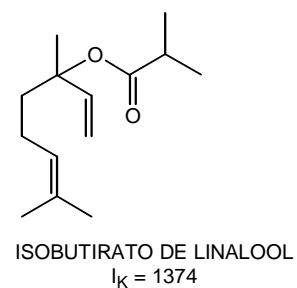
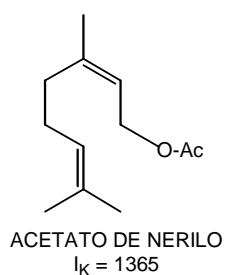
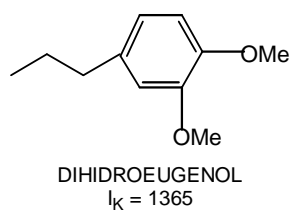
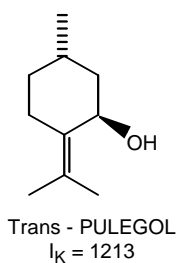
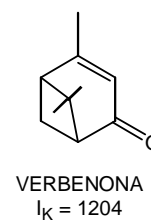
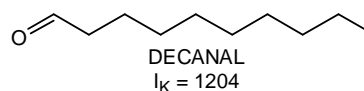
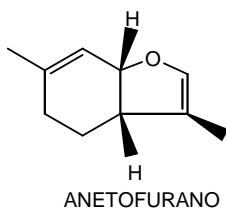
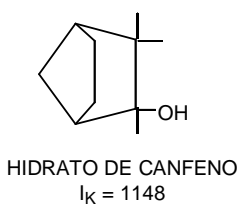
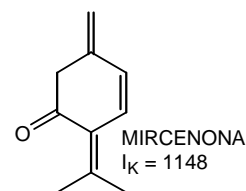
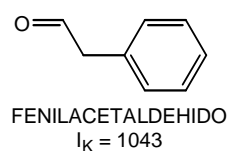
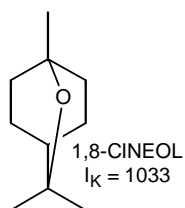
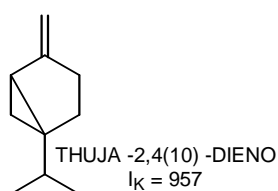
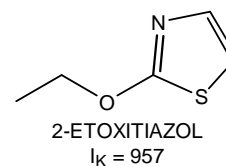
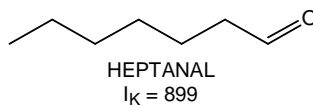
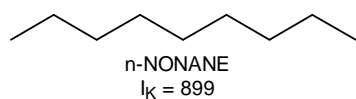
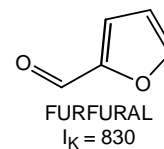
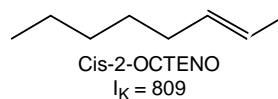
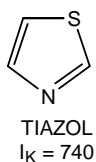
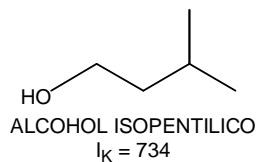
Grados de libertad (GL)		
Tratamientos	t-1	
Error Experimental (EE)	t(r-1)	donde r # repeticiones
Error de Muestreo (EM)	t*r (m-1)	m = Submuestras
Total	(t*r*m)-1	

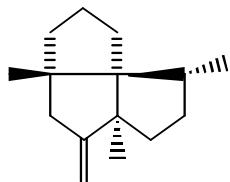
Factor de correccion $(\sum\sum X_{ijk})^2/t*r*m$

Suma de cuadrados		
Tratamientos	$SC_t = \sum(X_i)^2/m*r - FC$	
Total	$SCT = \sum\sum X_{ij}^2 - FC$	Yij = datos
Submuestras	$SC_{sub} = (\sum X_i^2/m) - FC$	
EE	$SCEE = SC_{sub} - SC_t$	
EM	$SCEM = SCT - SC_{sub}$	

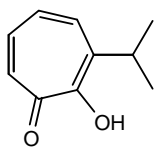
Cuadrados medios	
Tratamientos	$CM_t = SC_t/GL_t$
EE	$CMET: (SCEE+SCEM) / (GLEE+GLEM)$
EM	
F Tabulada	$F_{cal} = CM_t/CMET$

ANEXO F. Estructuras de los compuestos identificados mediante I_K en el AE de *C. candamarcensis* extraído por MWHD.

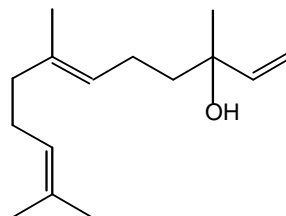




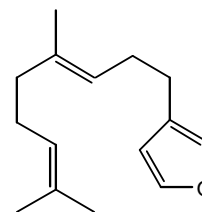
B-ISOCUMENO
I_K = 1403



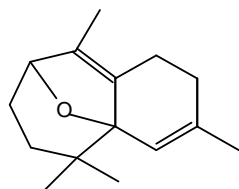
THUJAPLICIN
I_K = 1407



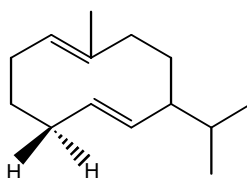
Trans-NEROLIDOL
I_K = 1564



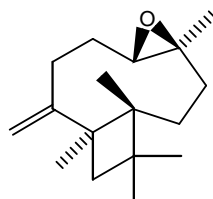
DENDROLASIN
I_K = 1574



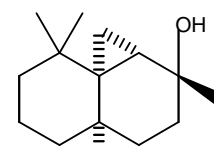
OXIDO HIMACHALENE
I_K = 1574



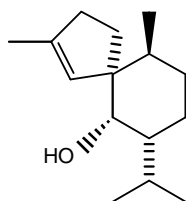
GERMACRENO D-4-OL
I_K = 1574



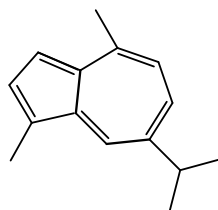
OXIDO DE CARIOFILENO
I_K = 1581



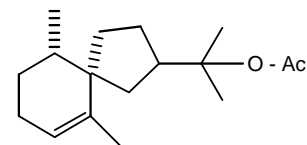
THUJOPSAN-2-ALFA-OL
I_K = 1581



GLEENOL
I_K = 1585

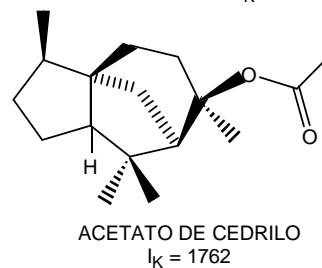
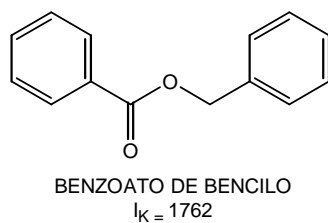
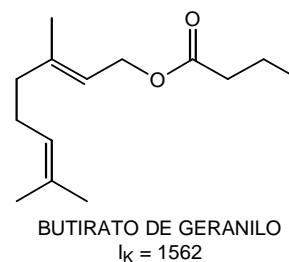
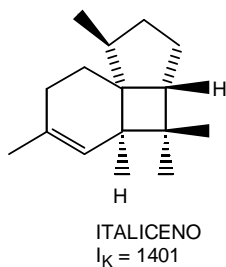
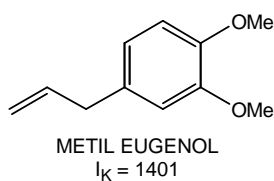
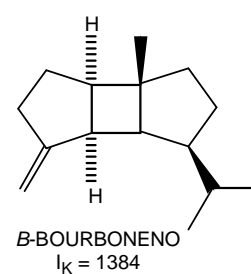
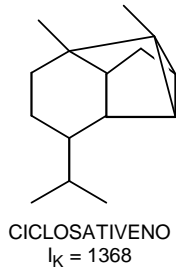
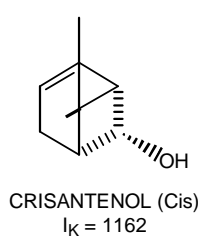
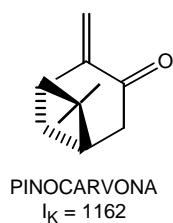
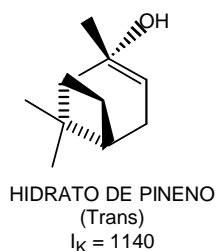
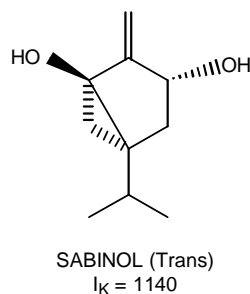
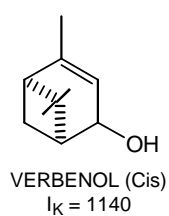
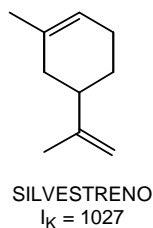
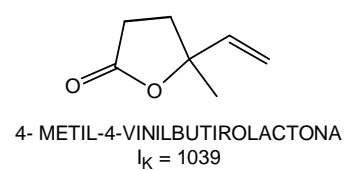
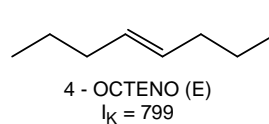
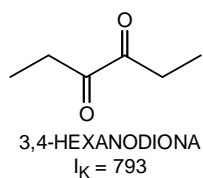
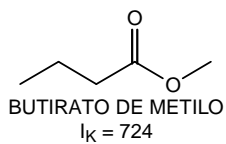


GUAIAZULENO
I_K = 1772



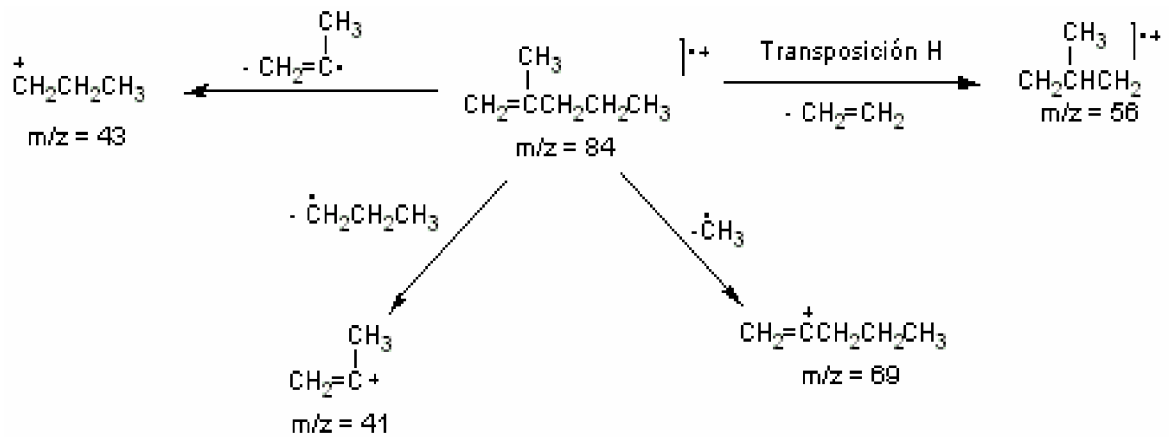
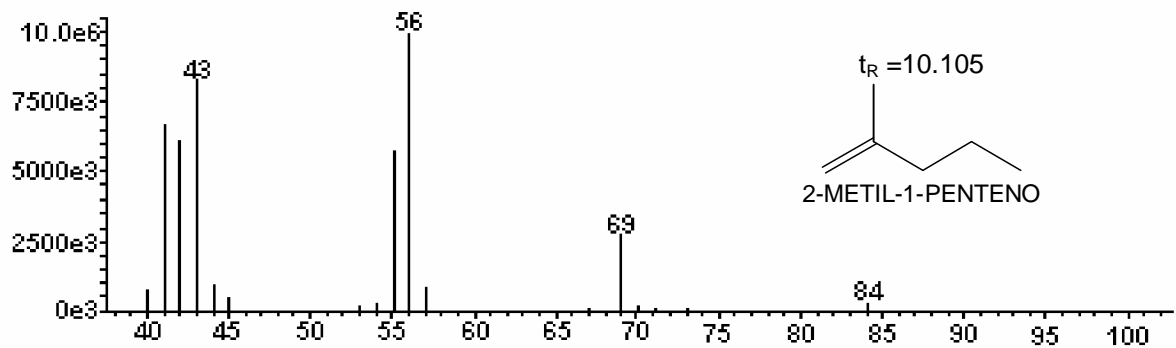
ACETATO DE HINESOL
I_K = 1782

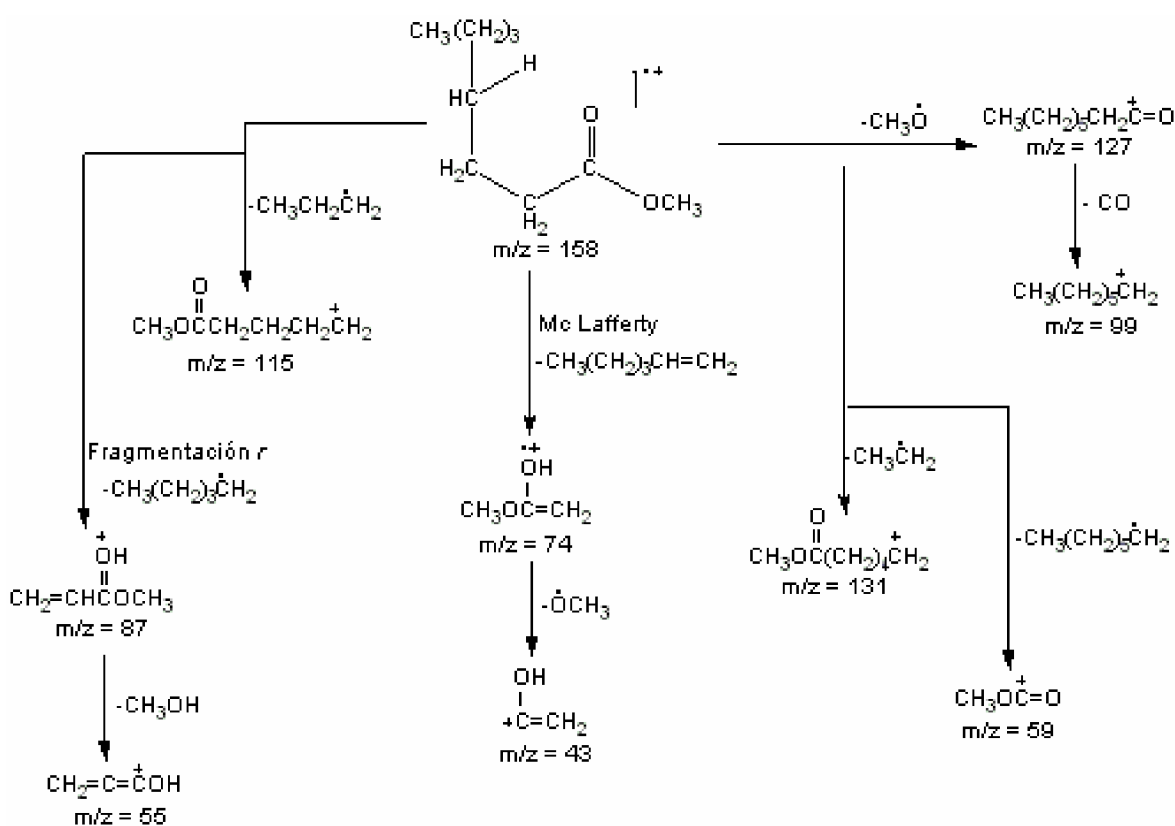
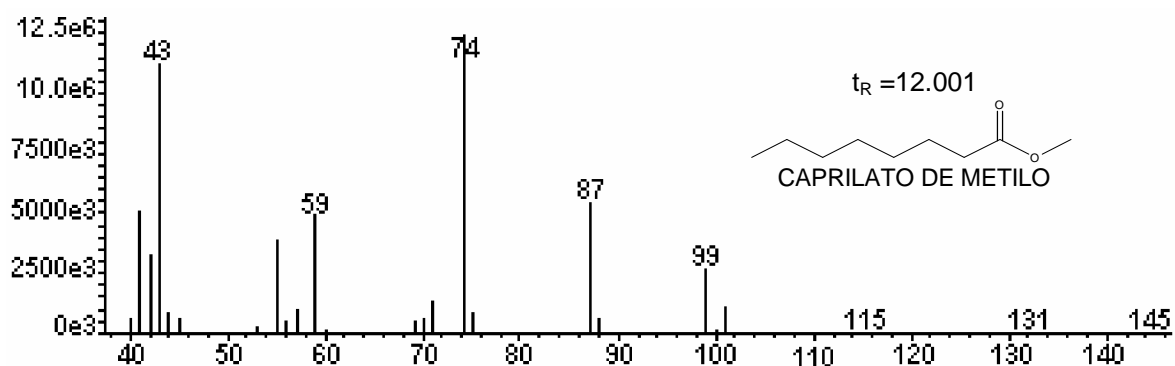
ANEXO G. Estructura de los COVs identificados por I_K extraídos por DES.

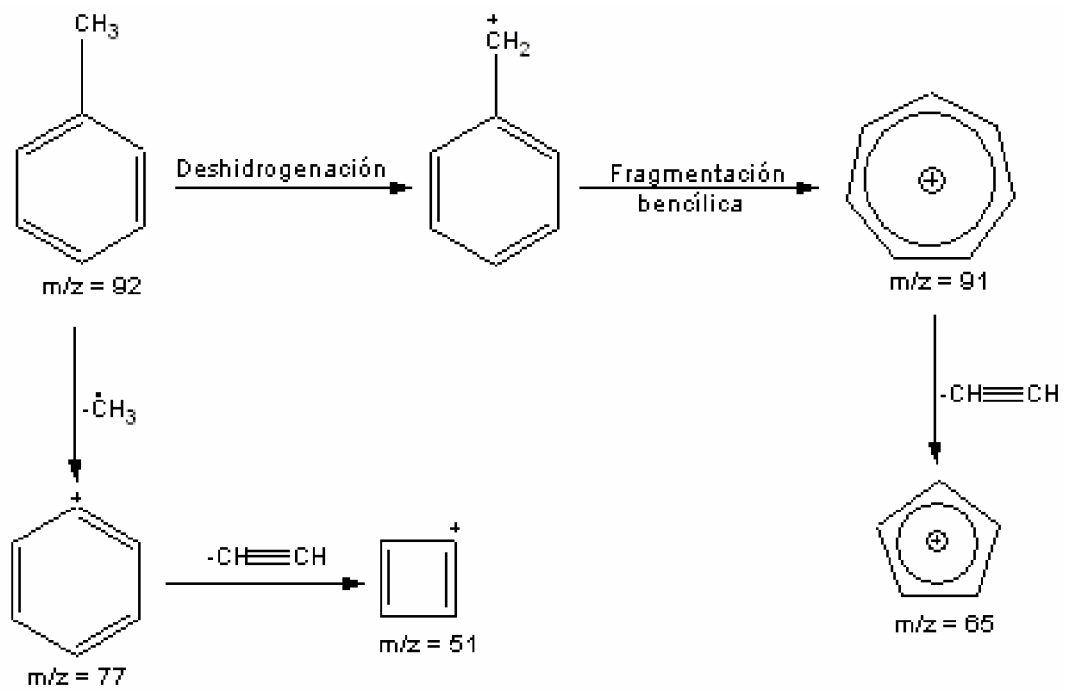
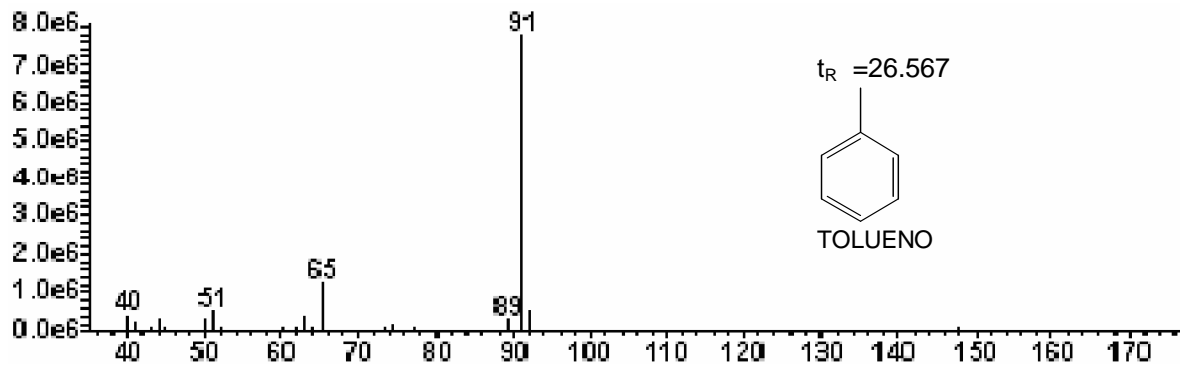


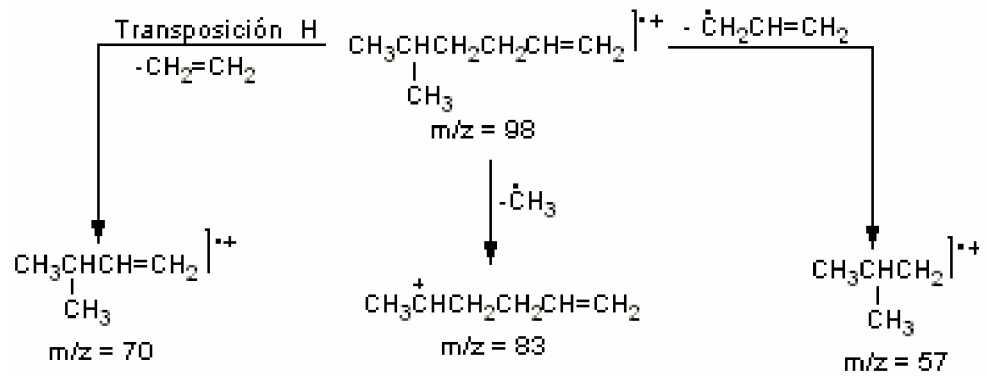
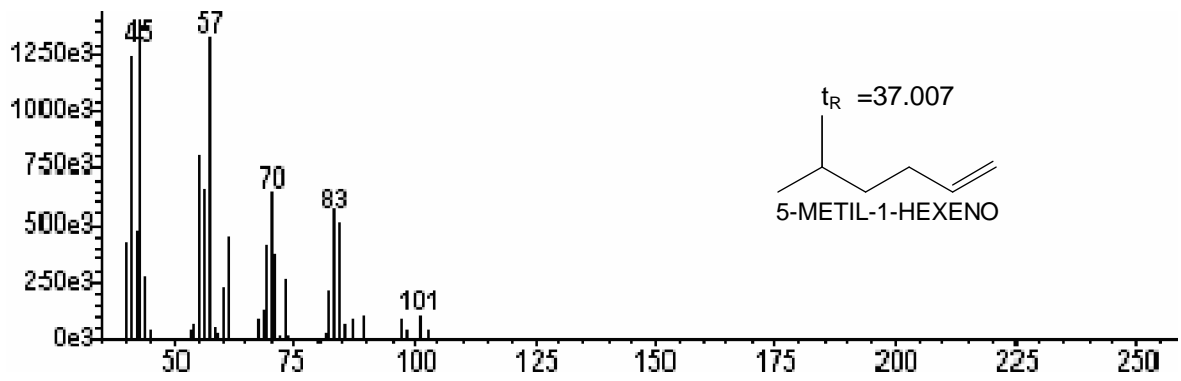
ANEXO H. Espectros de masas de los metabolitos secundarios identificados en e4I AE de *C.candamarcensis* obtenido por MWHD y posibles rutas de fragmentación.

Compuestos identificados por GC-MS en la Universidad de Nariño.

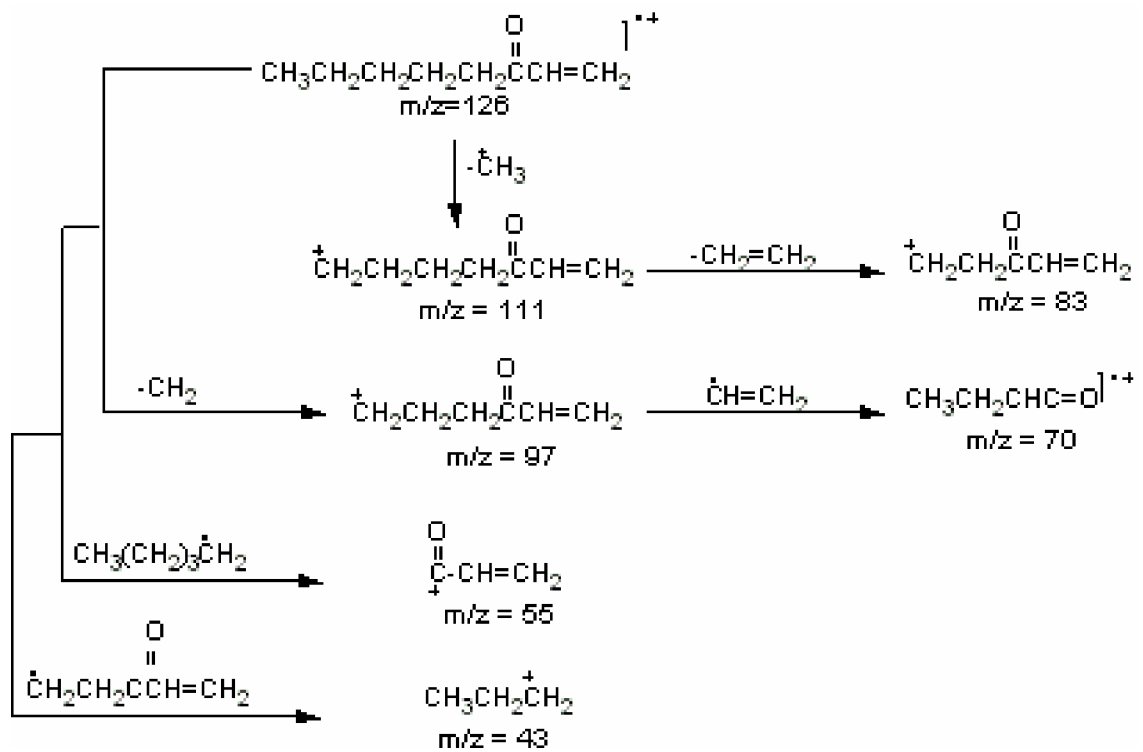
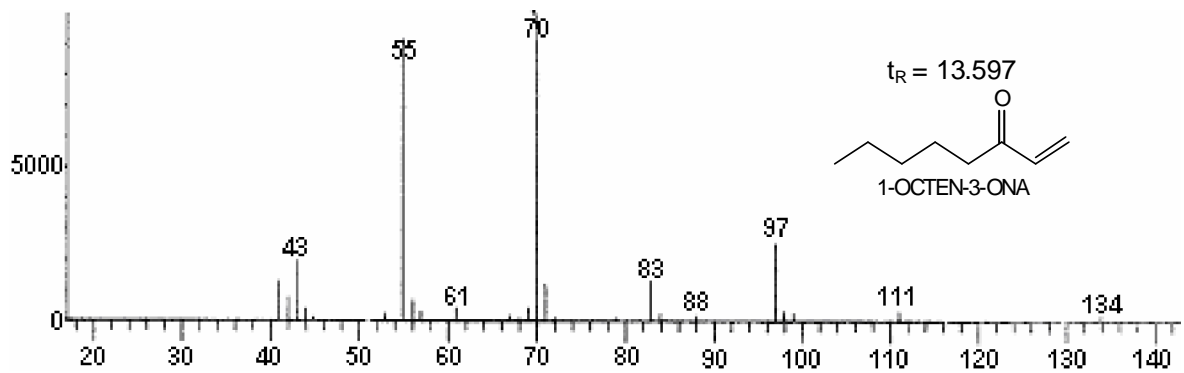


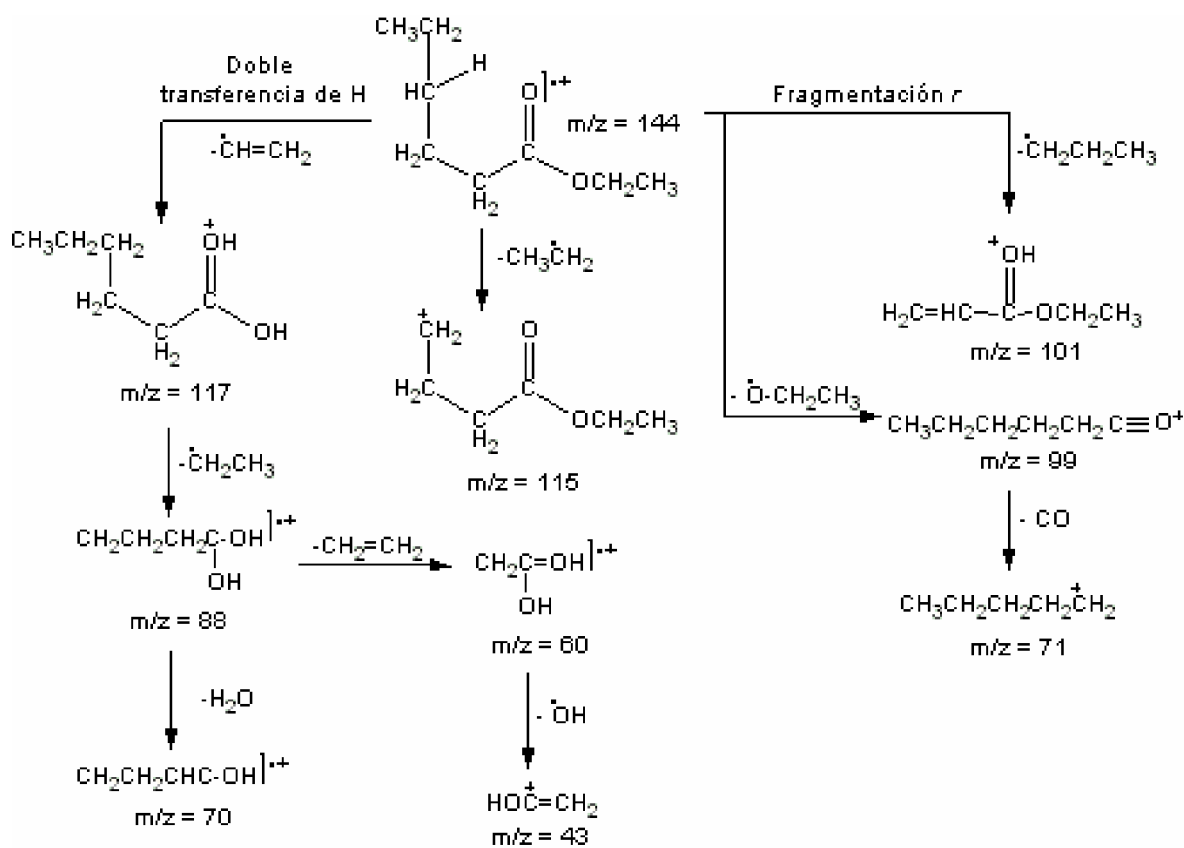
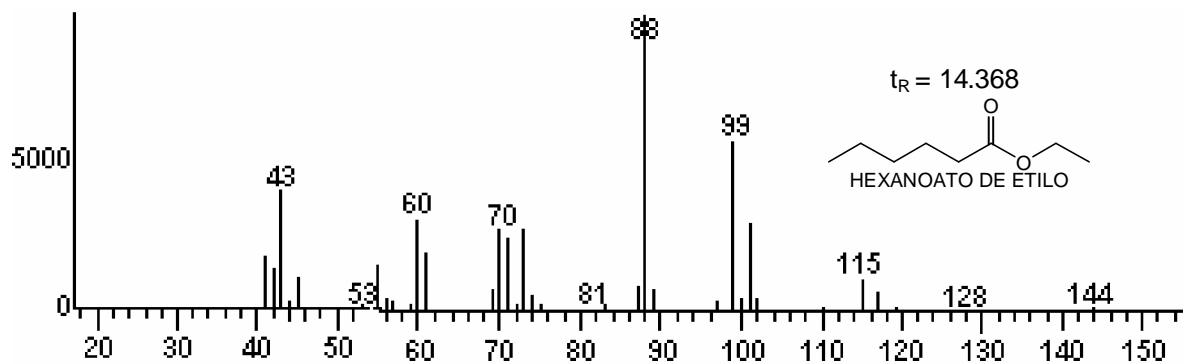


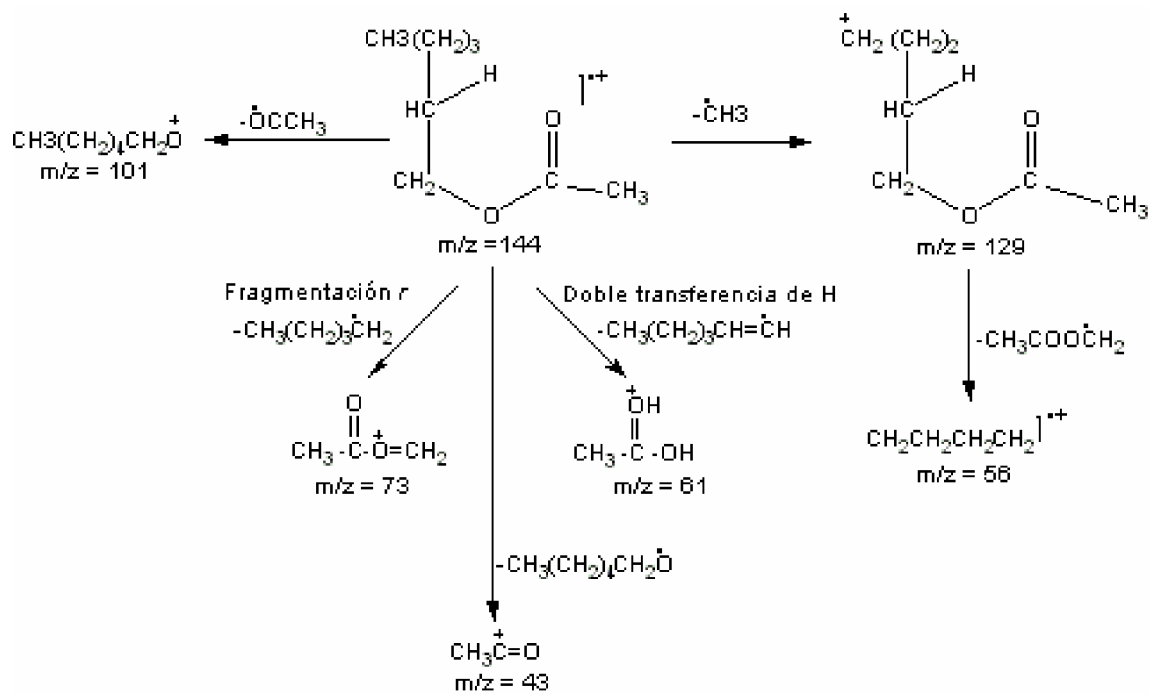
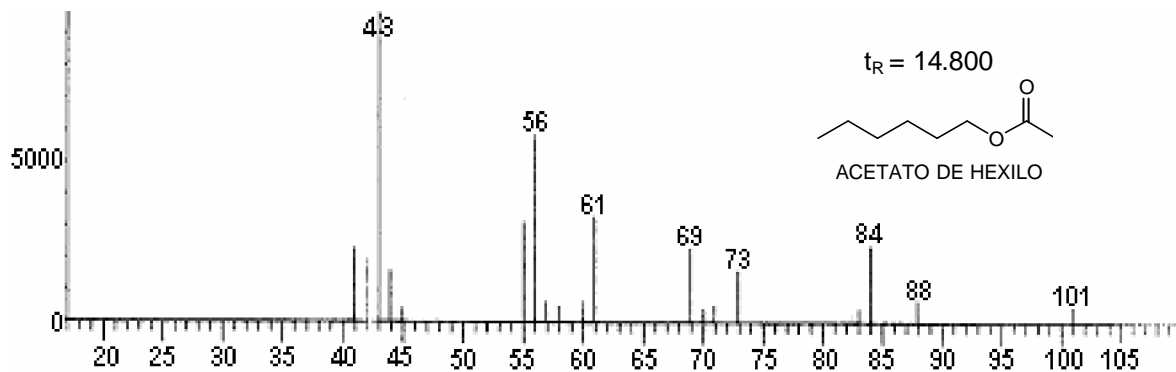


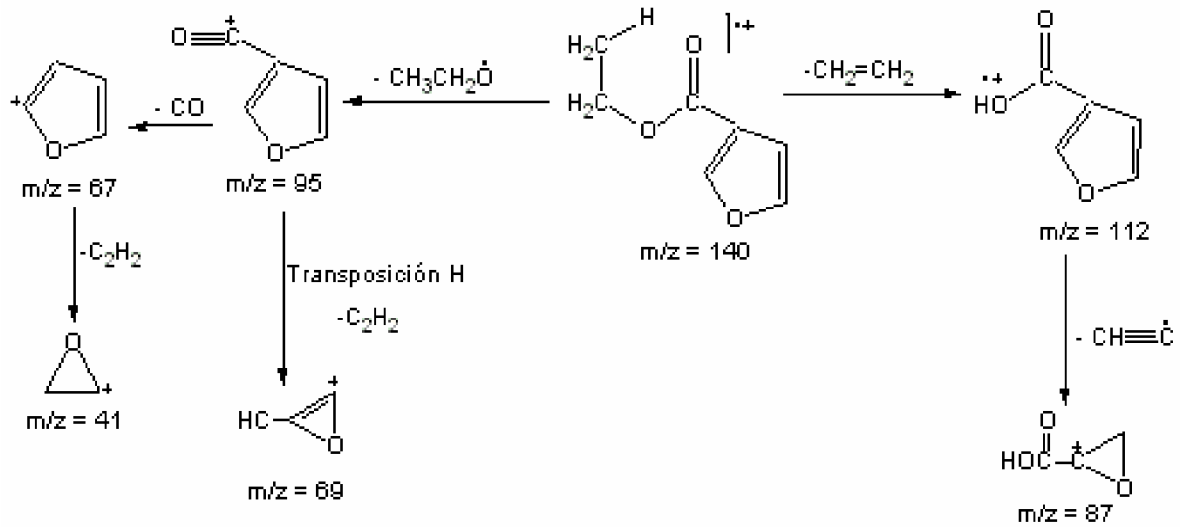
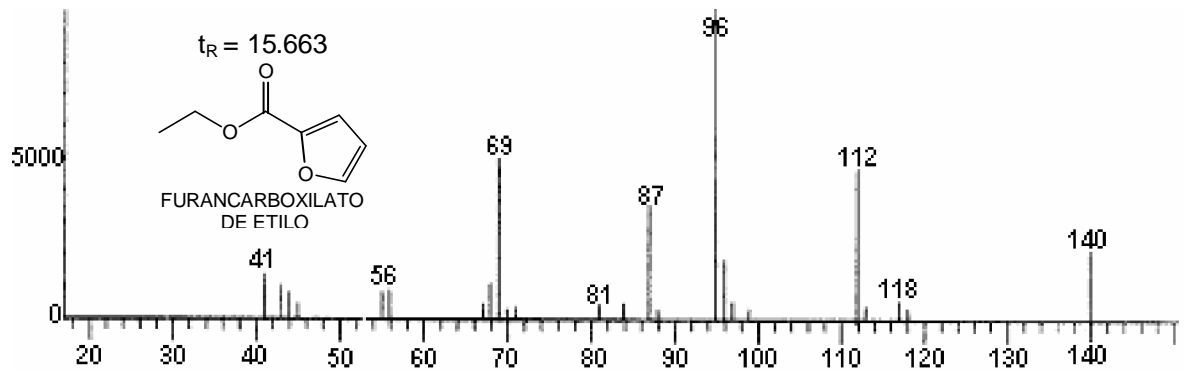


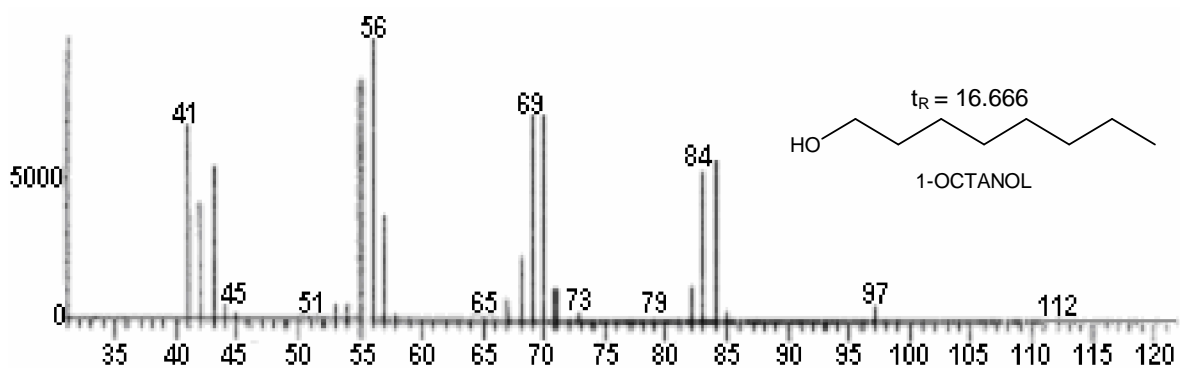
Compuestos identificados por HRGC-MS en la universidad industrial de Santander con sus posibles rutas de fragmentación.



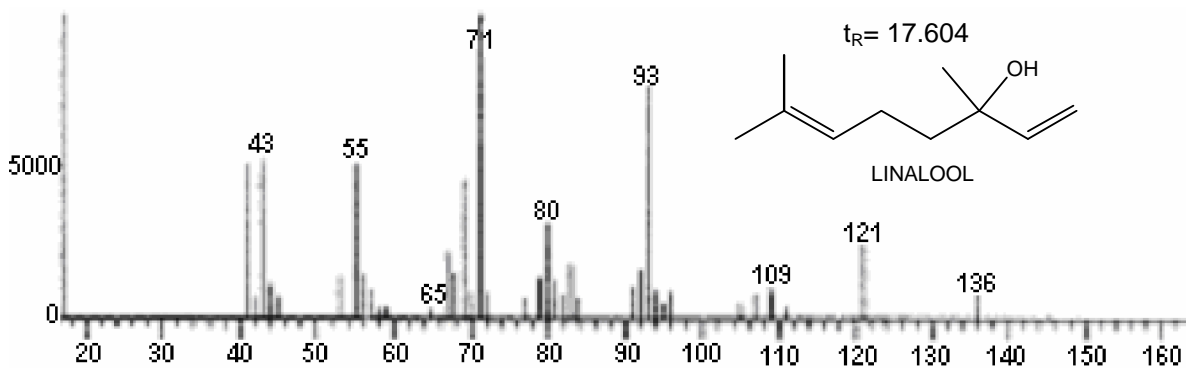




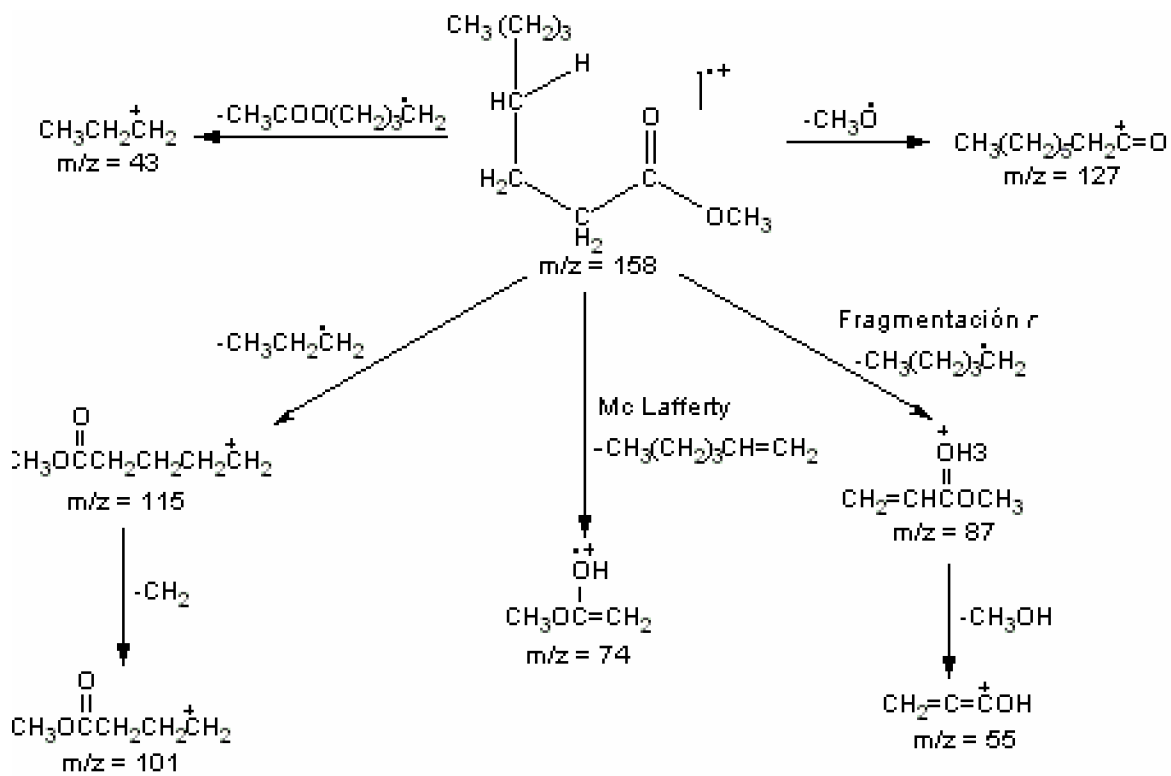
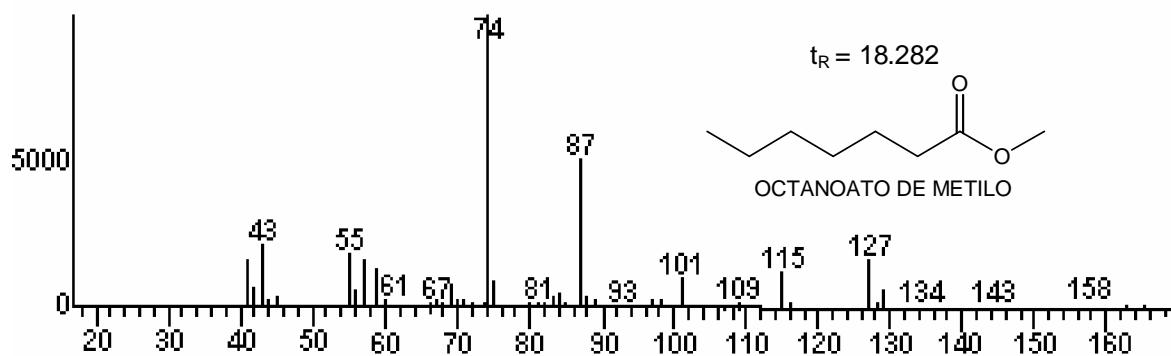


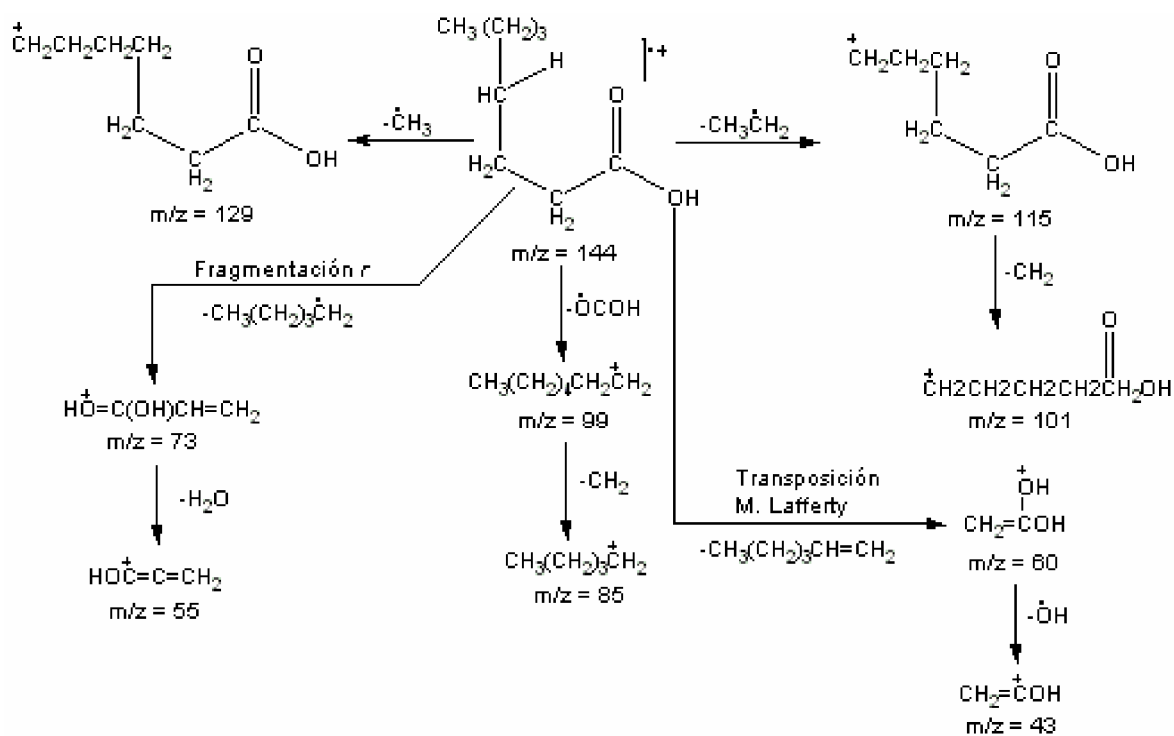
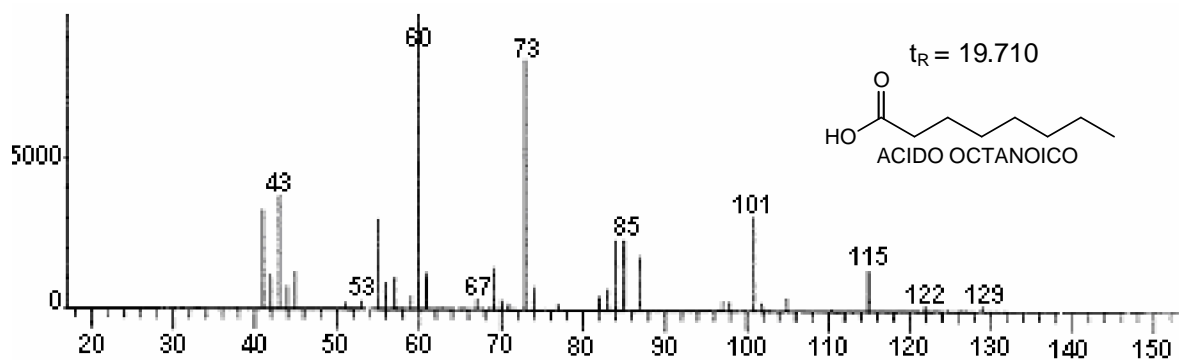


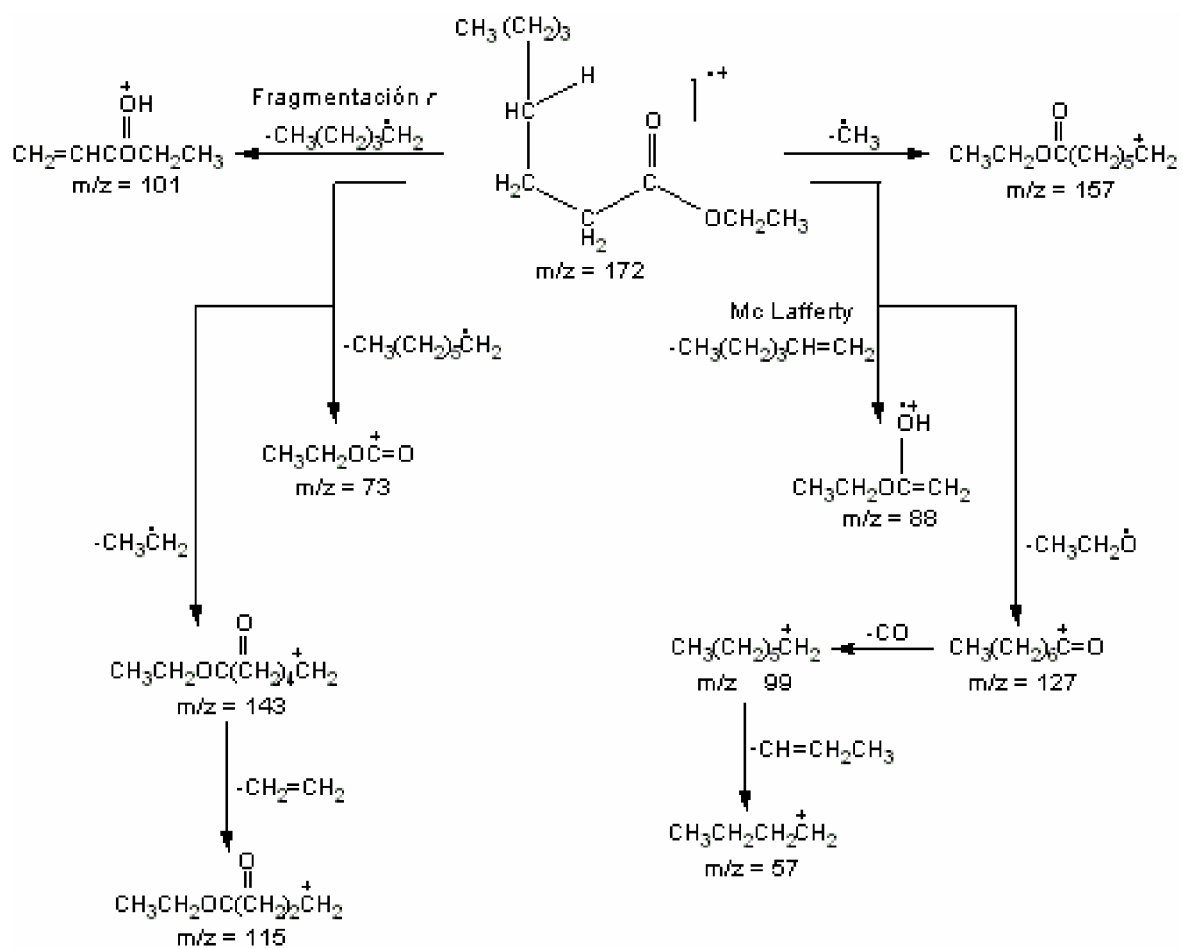
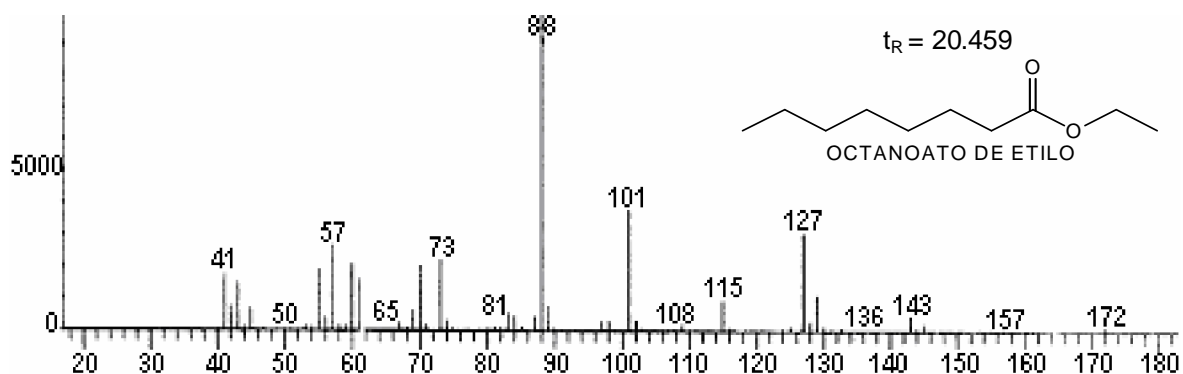
Posibles rutas de fragmentación ver figura 27.

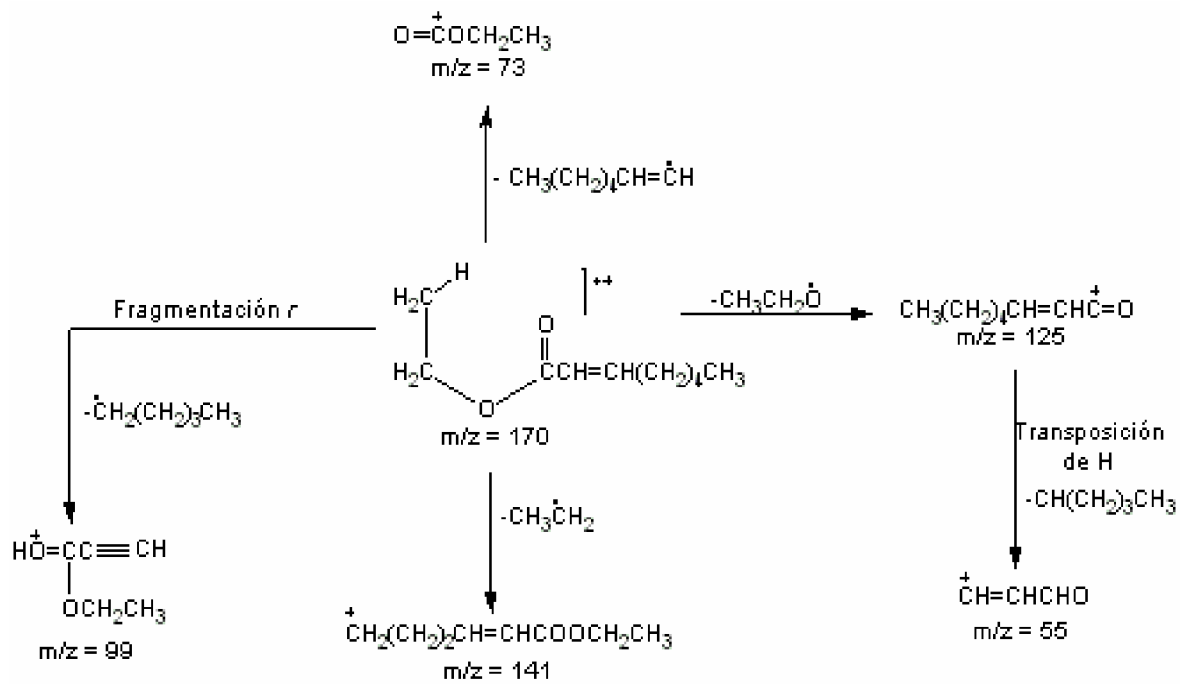
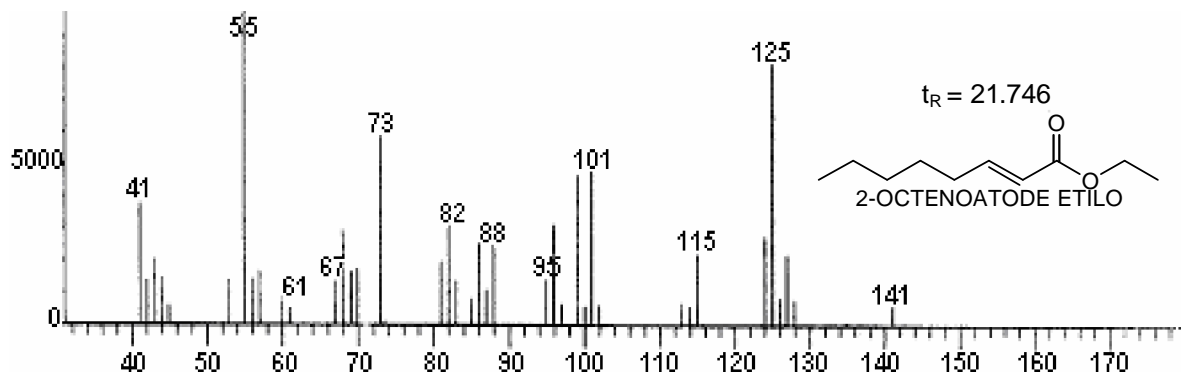


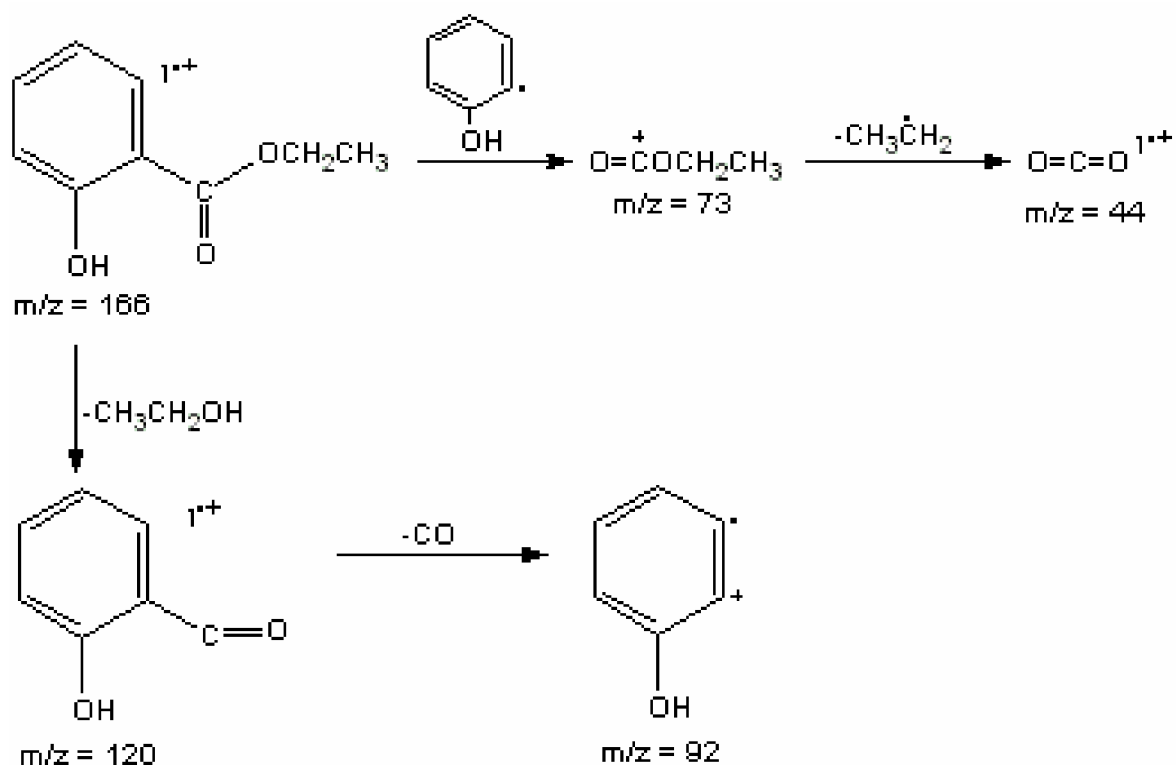
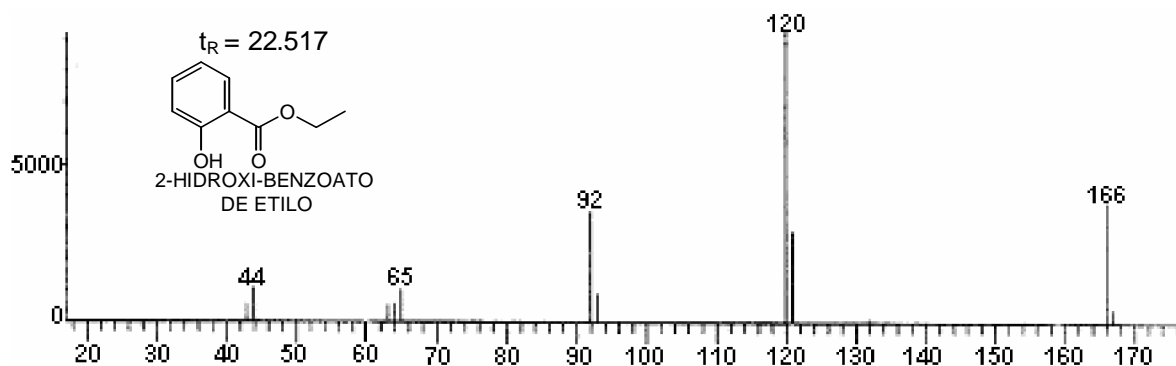
Posibles rutas de fragmentación ver figura 29.

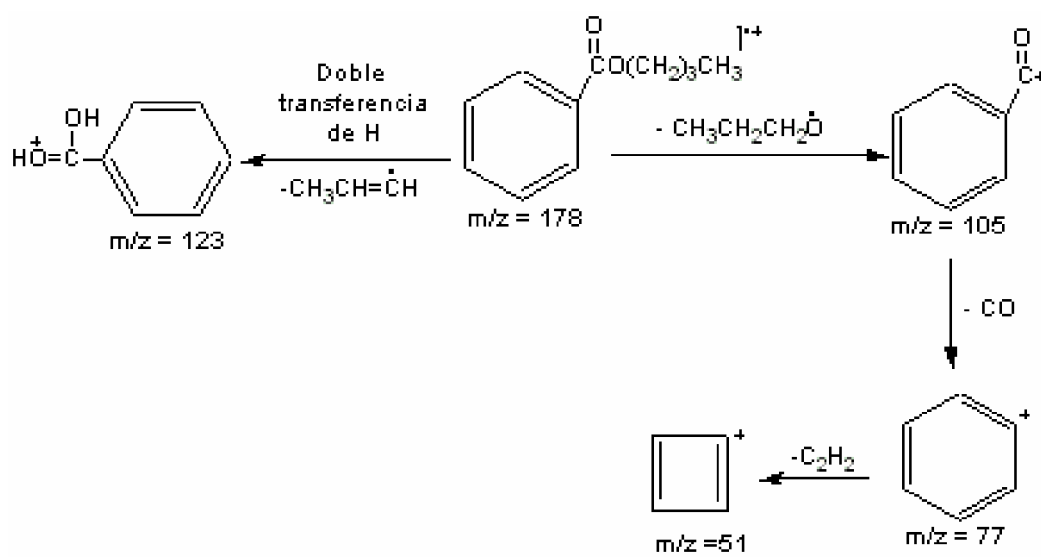
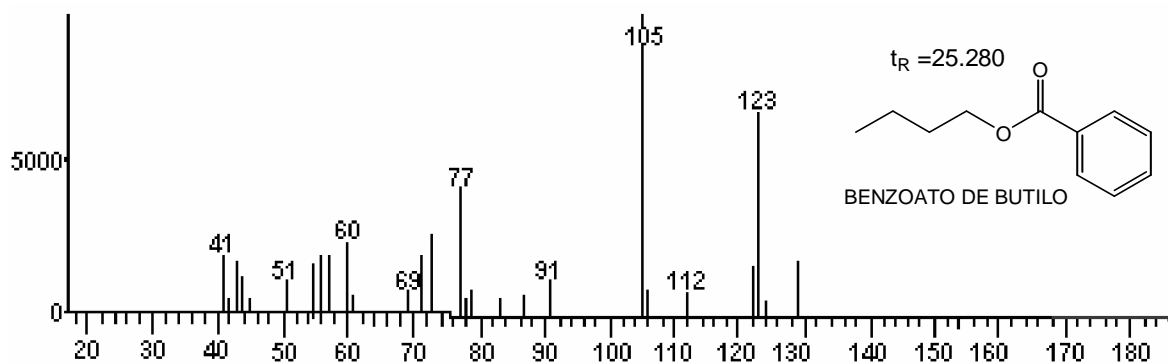


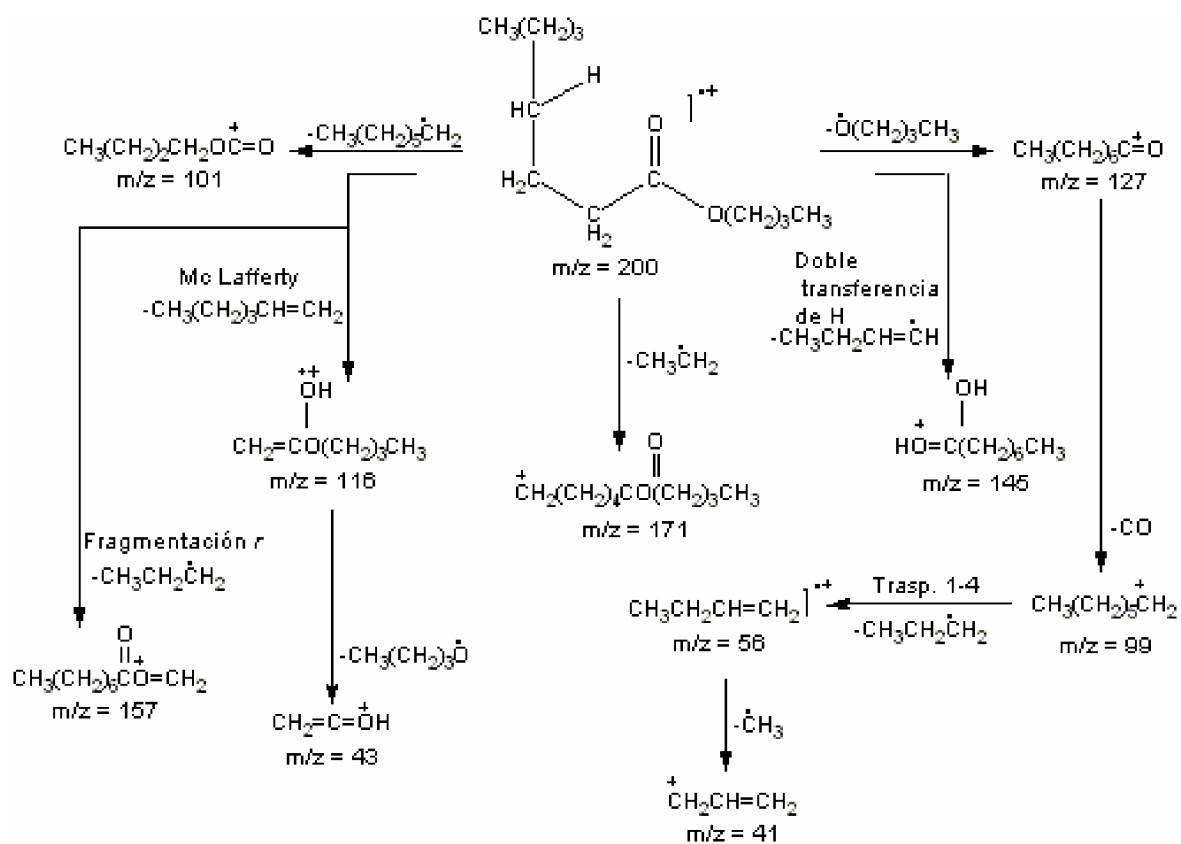
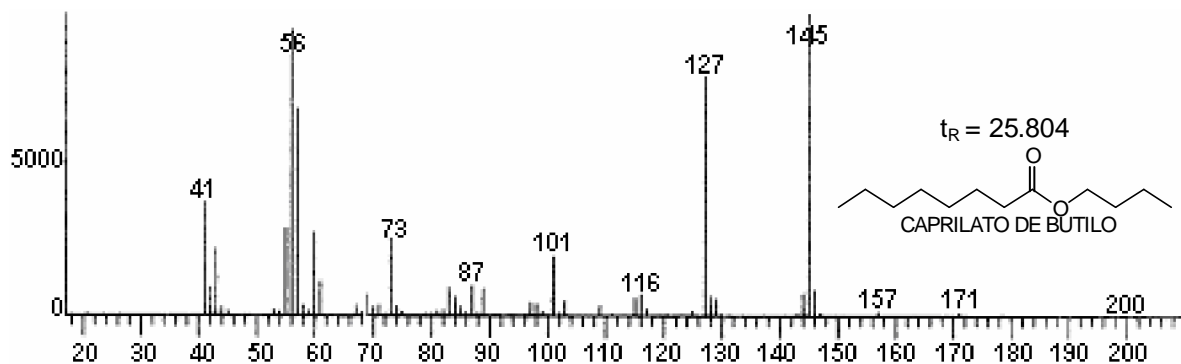


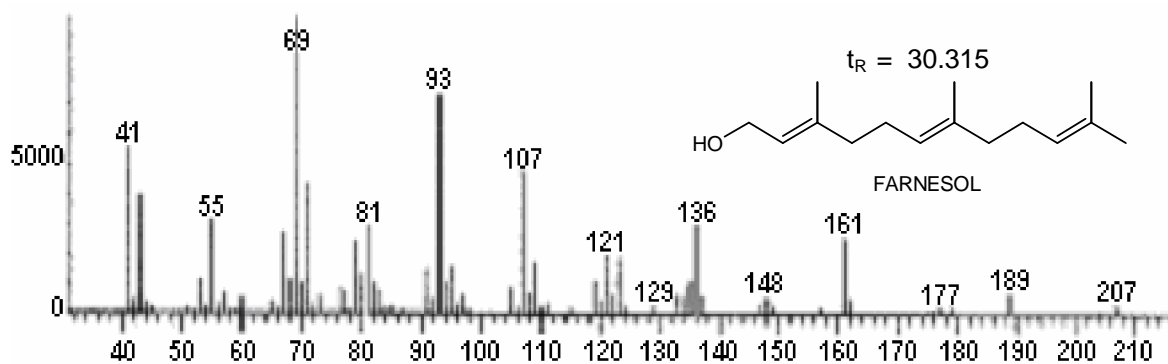




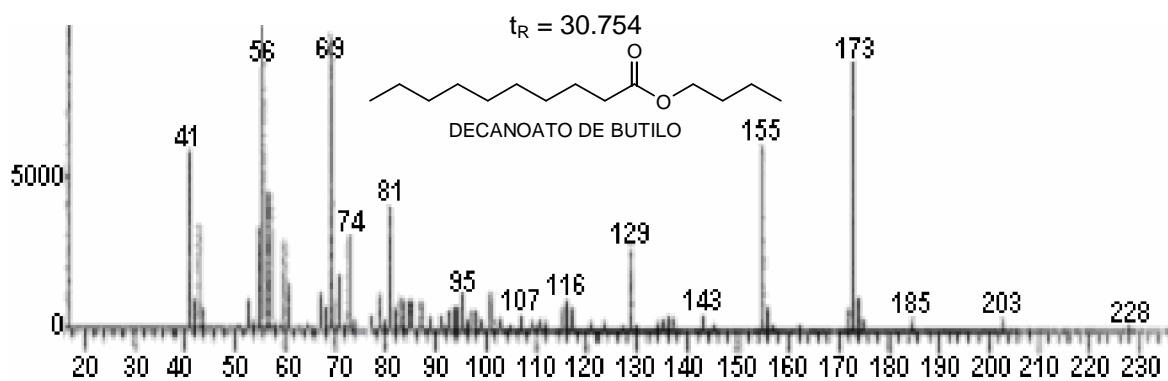




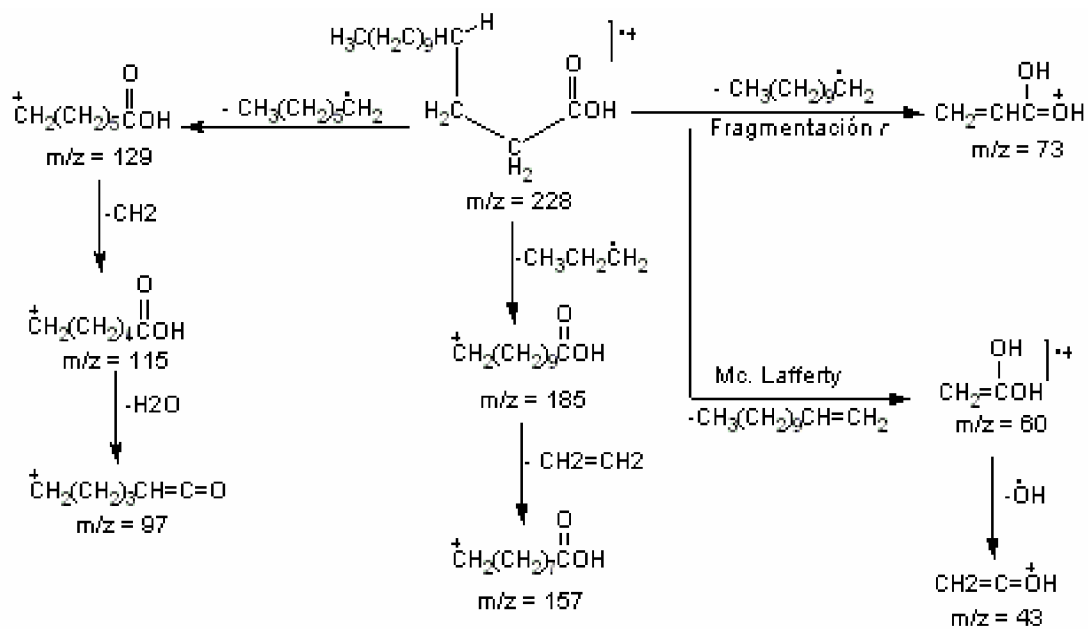
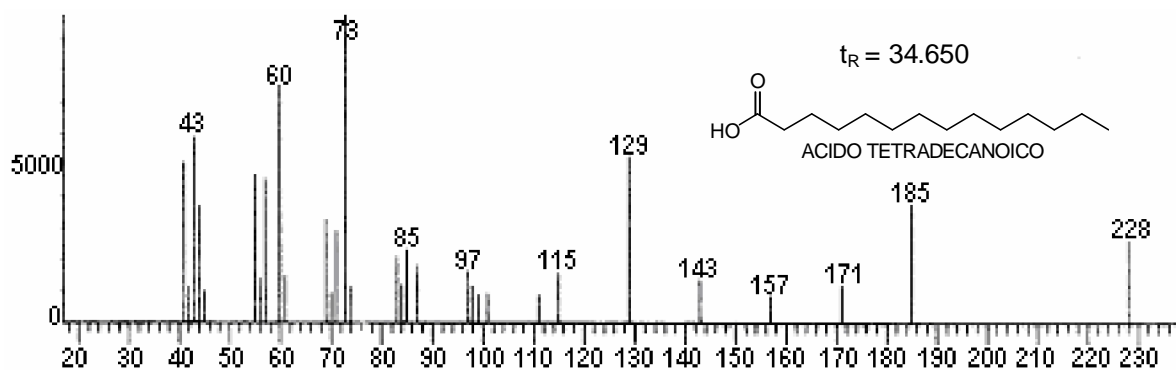


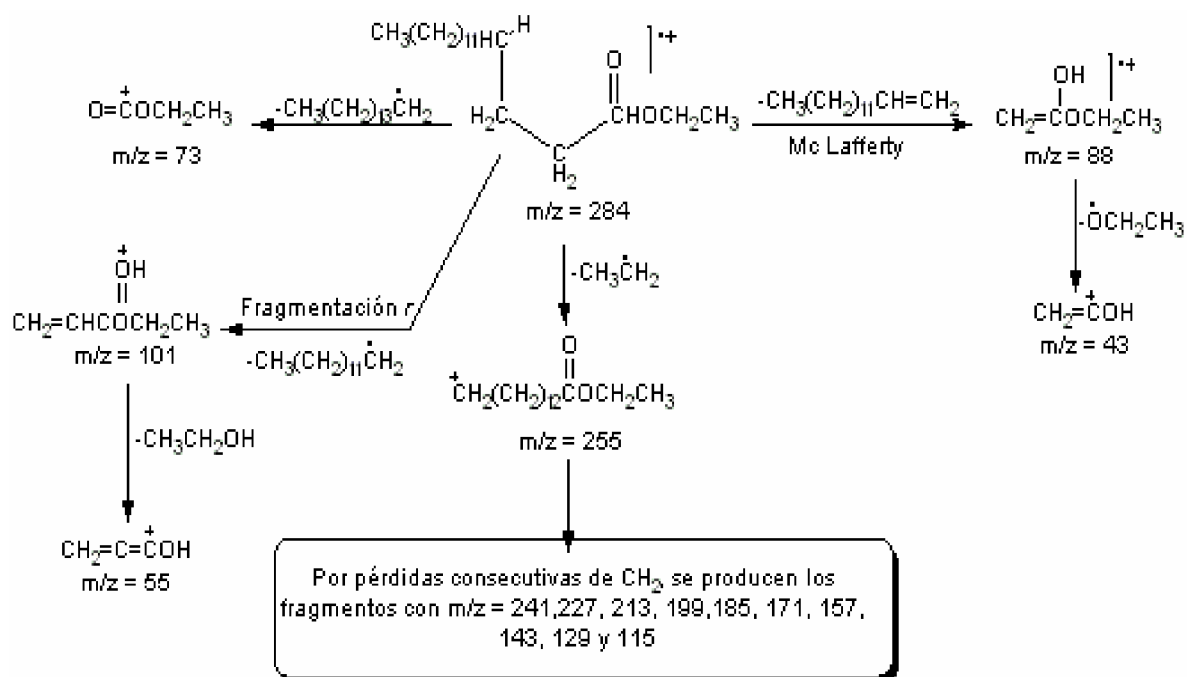
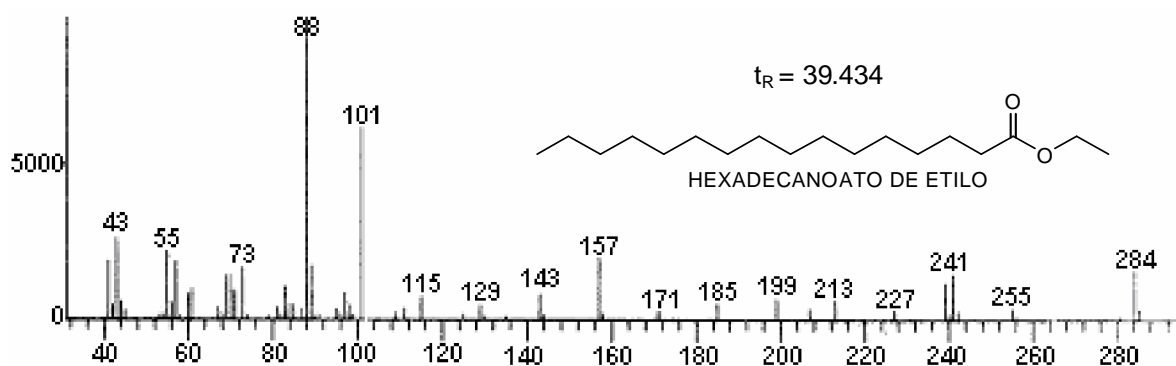


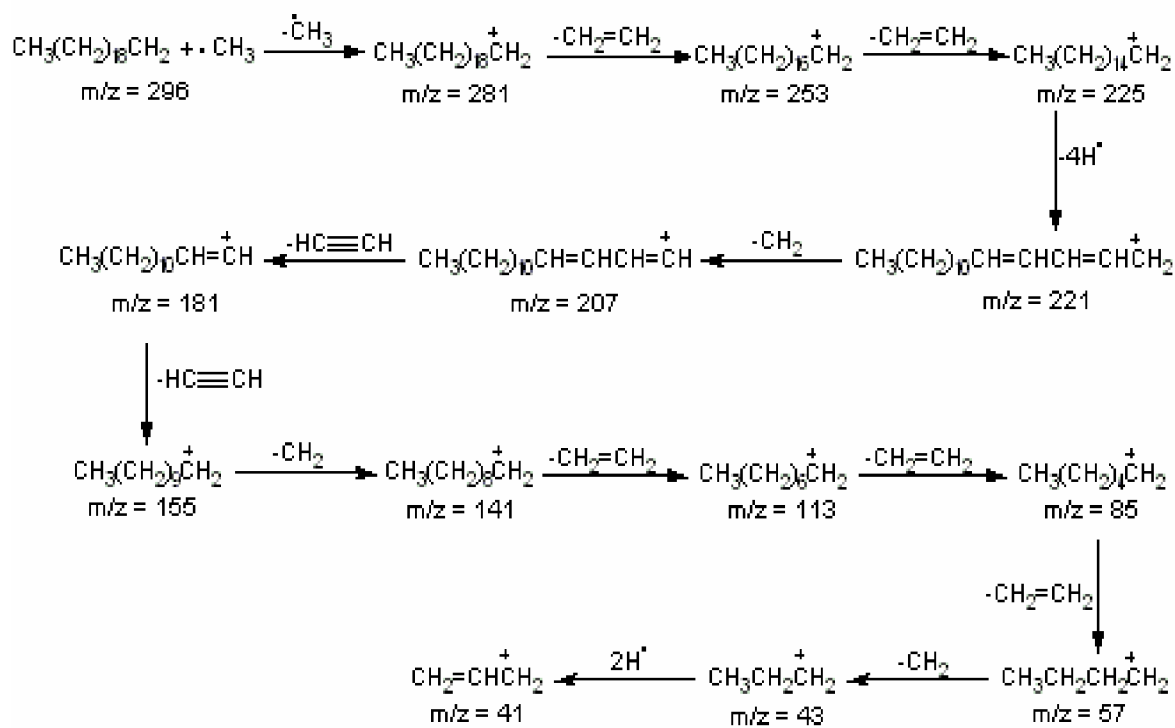
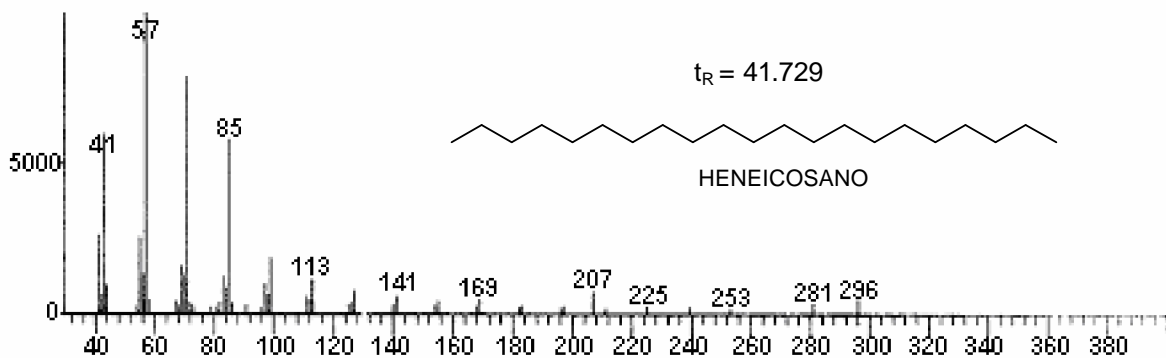
Posibles rutas de fragmentación ver figura 31

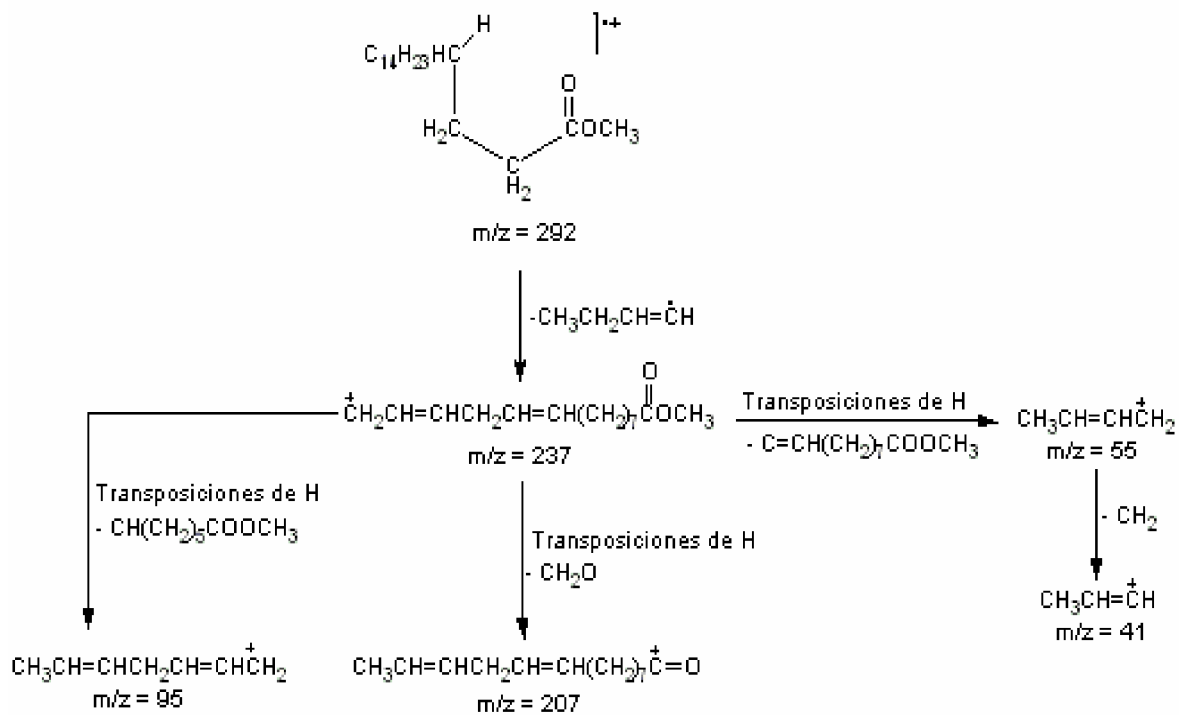
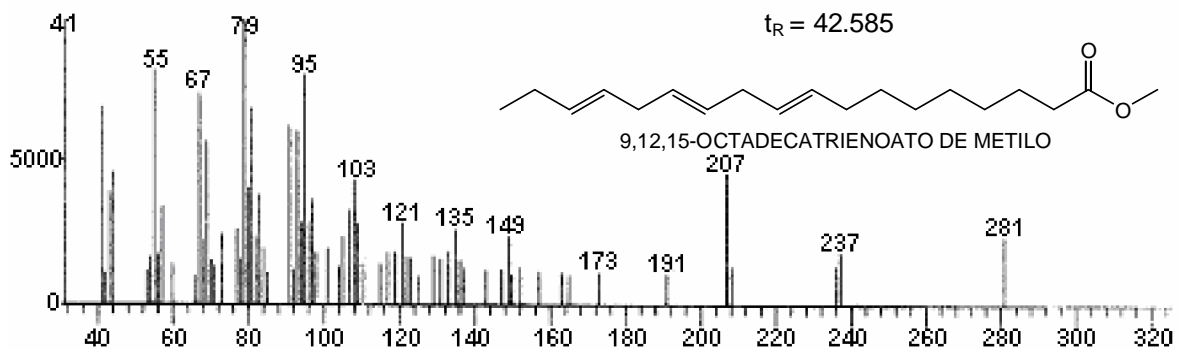


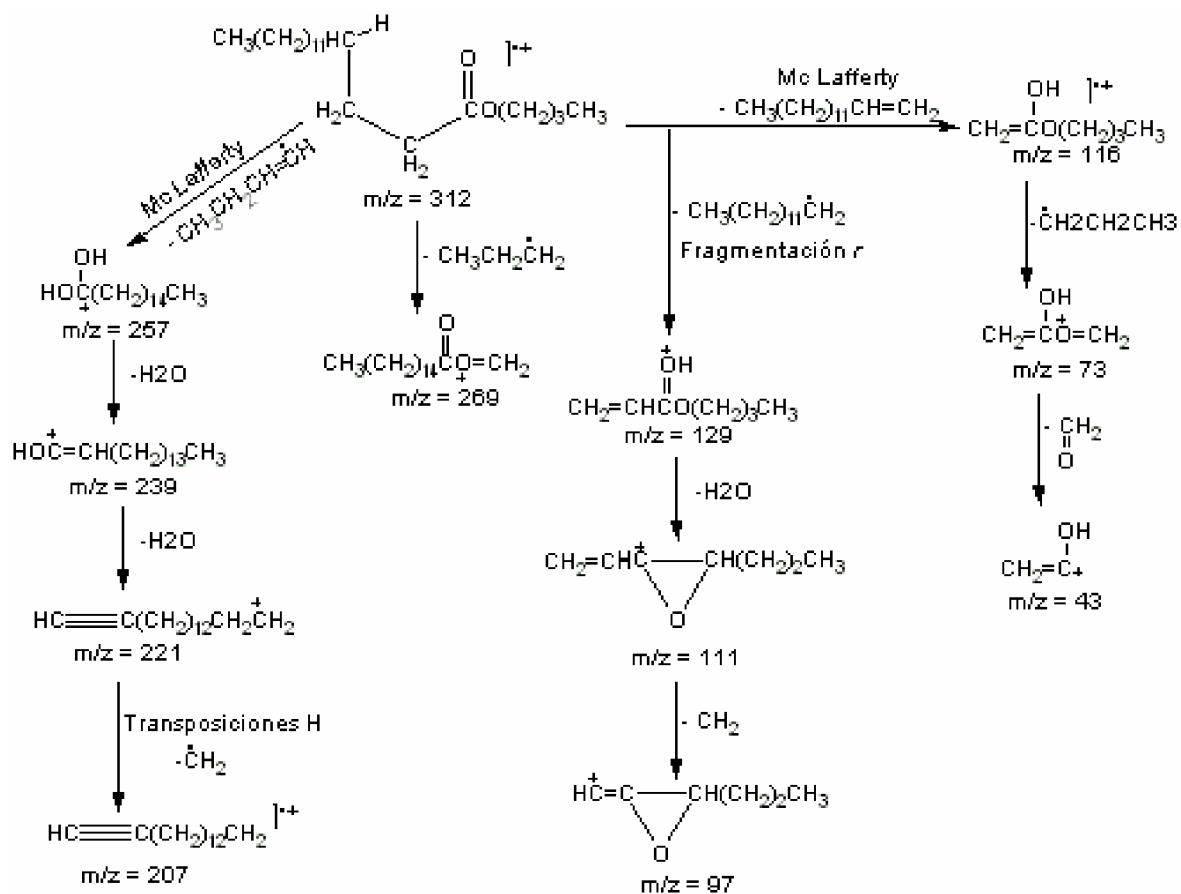
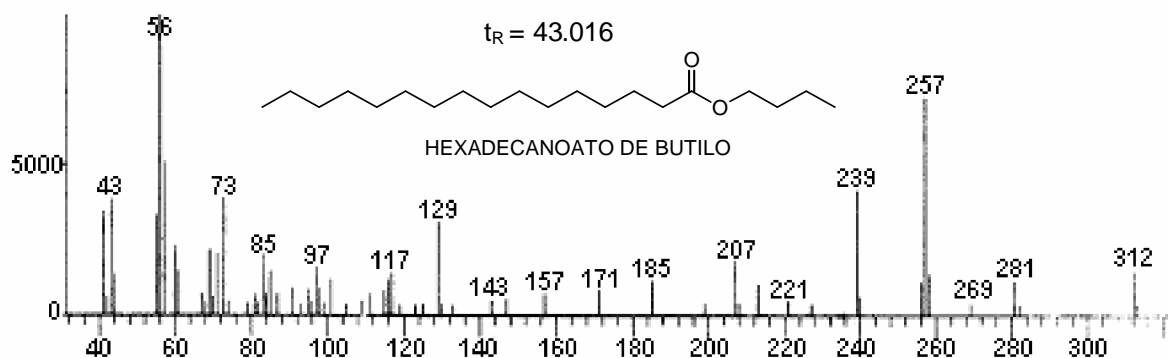
Posibles rutas de fragmentación ver figura 33

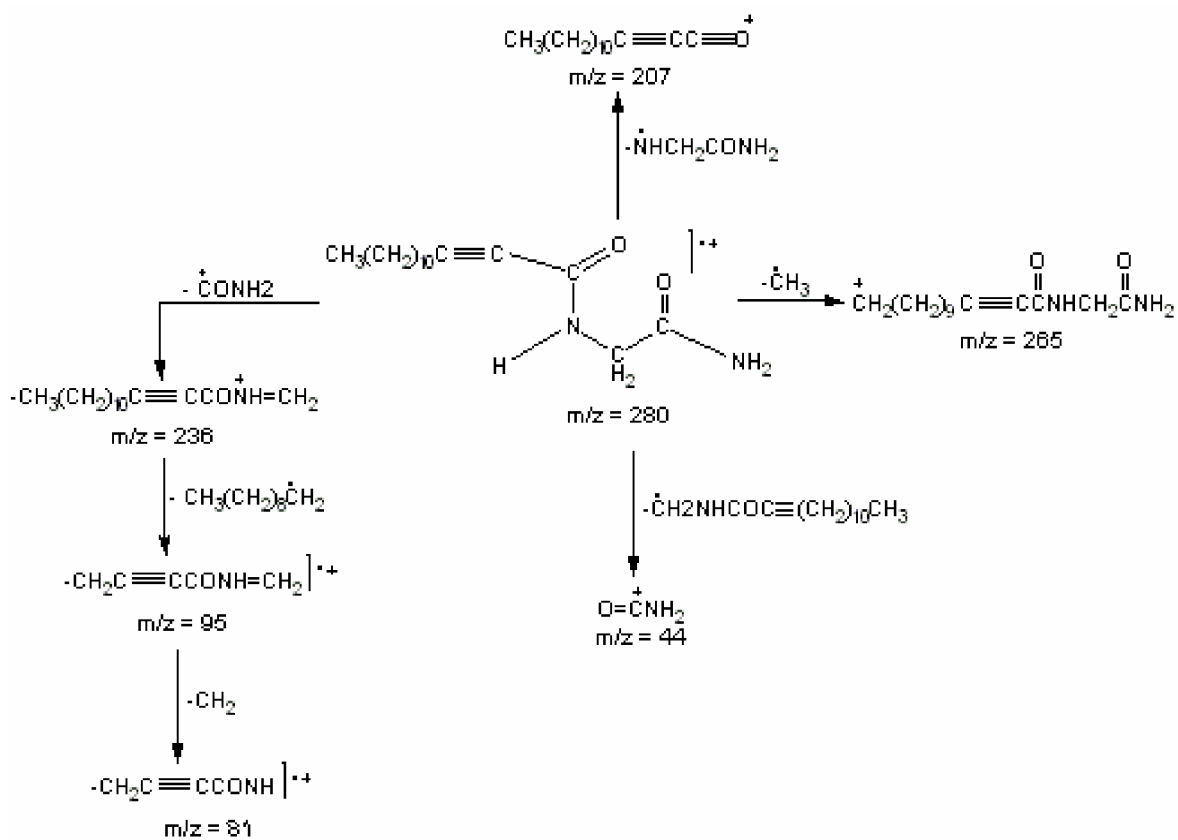
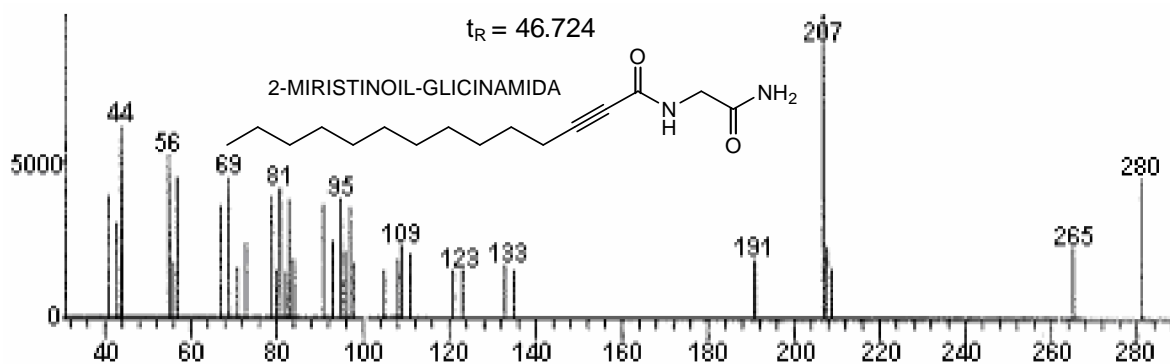




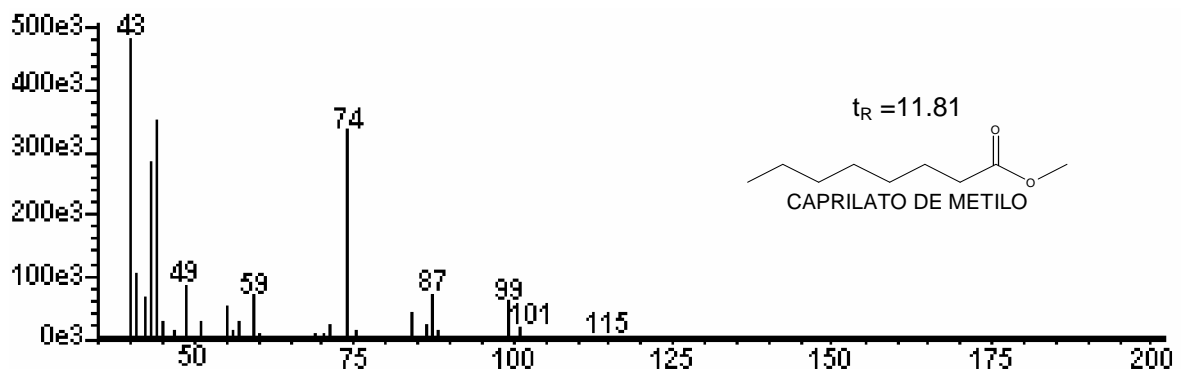
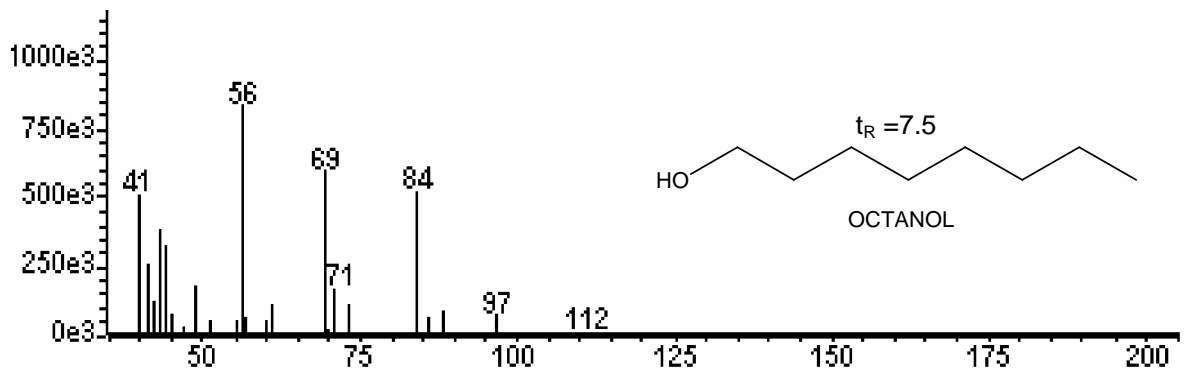
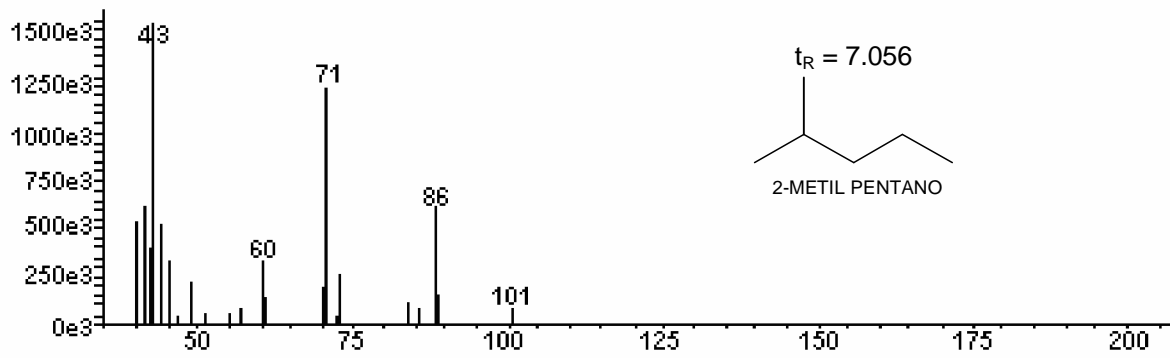


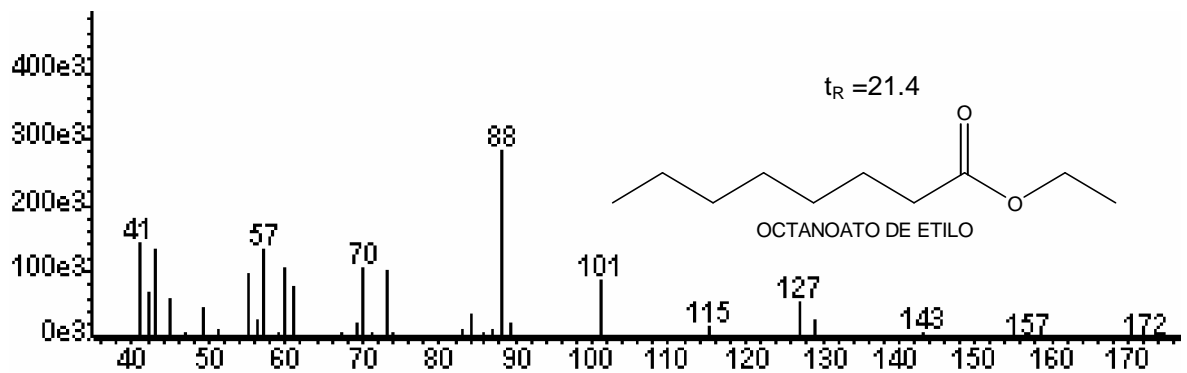
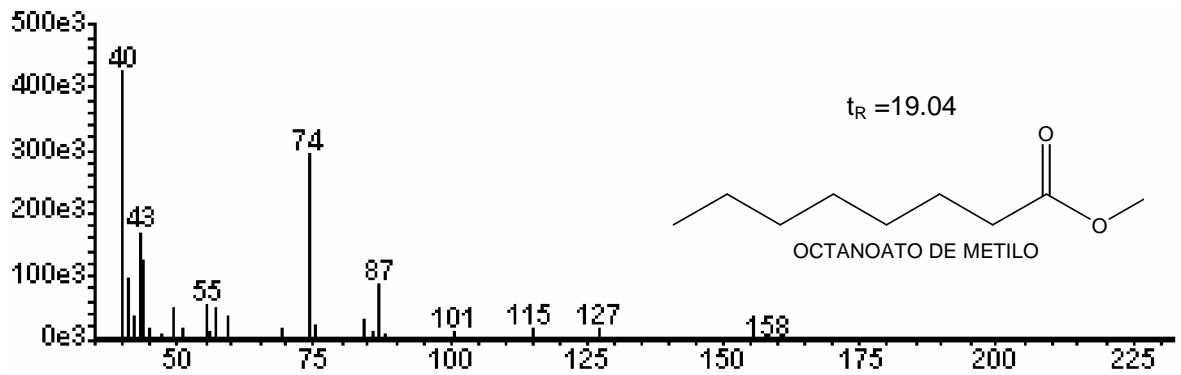
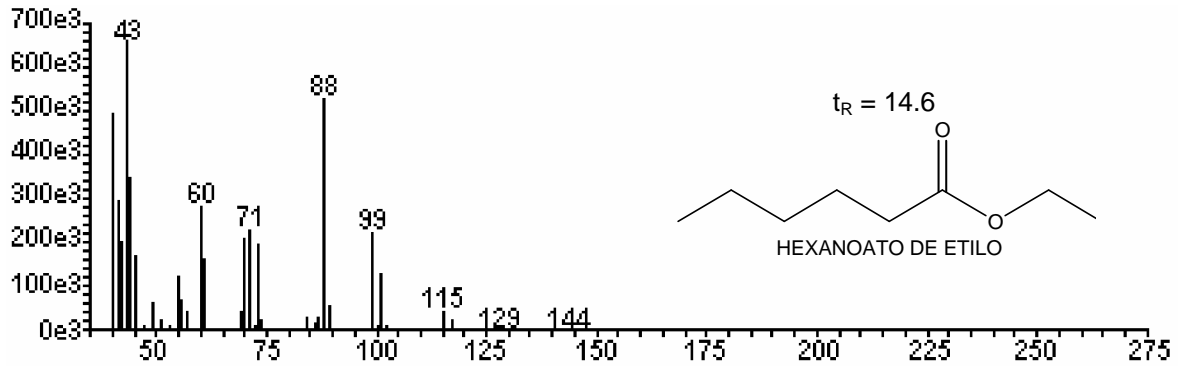


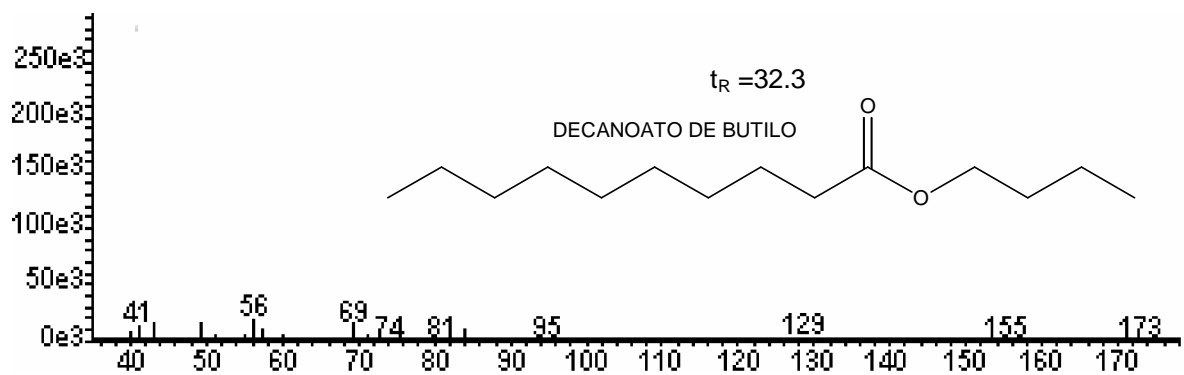
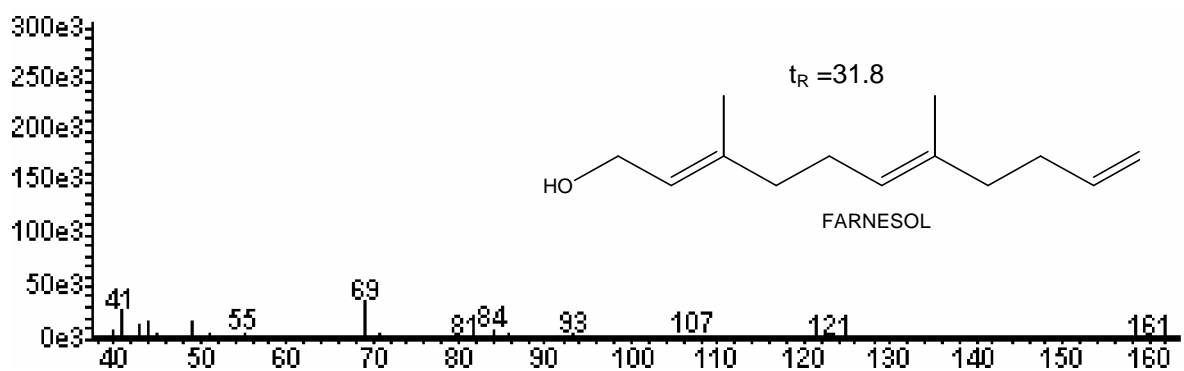
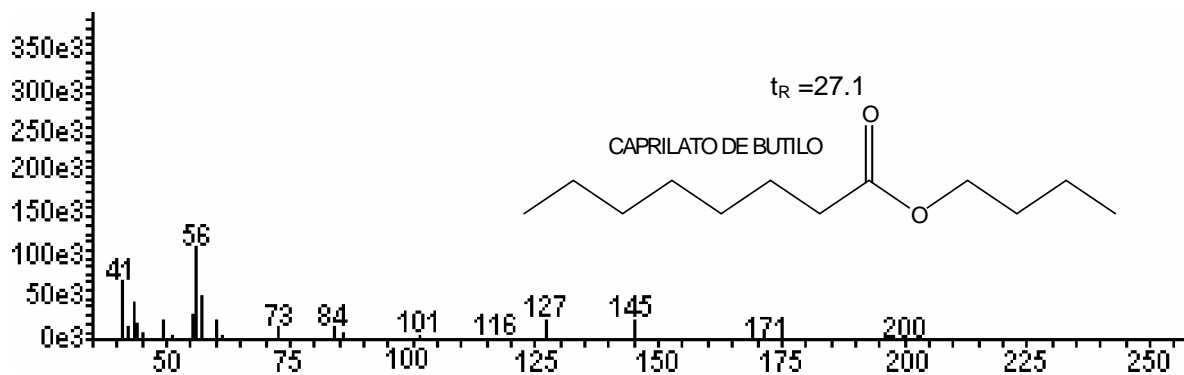


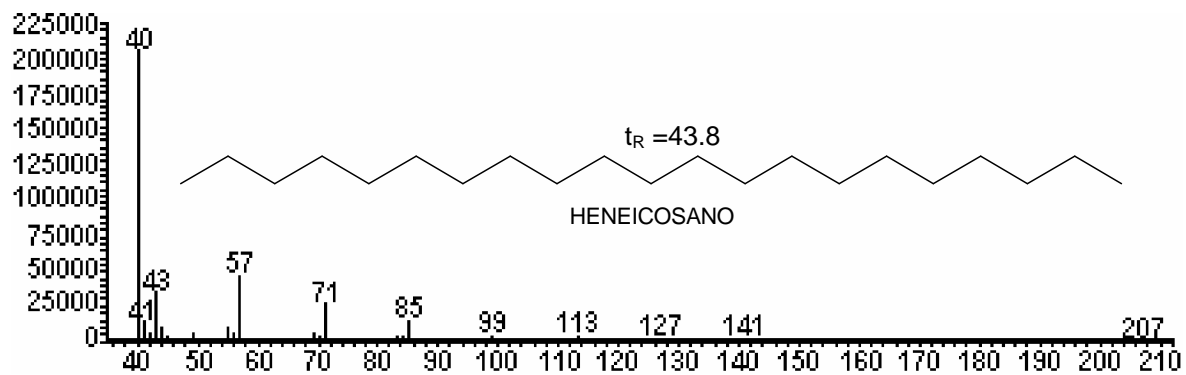


ANEXO I. Espectros de masas de los COVs identificados en los extractos de *C. candamarcensis* obtenidos por DES.



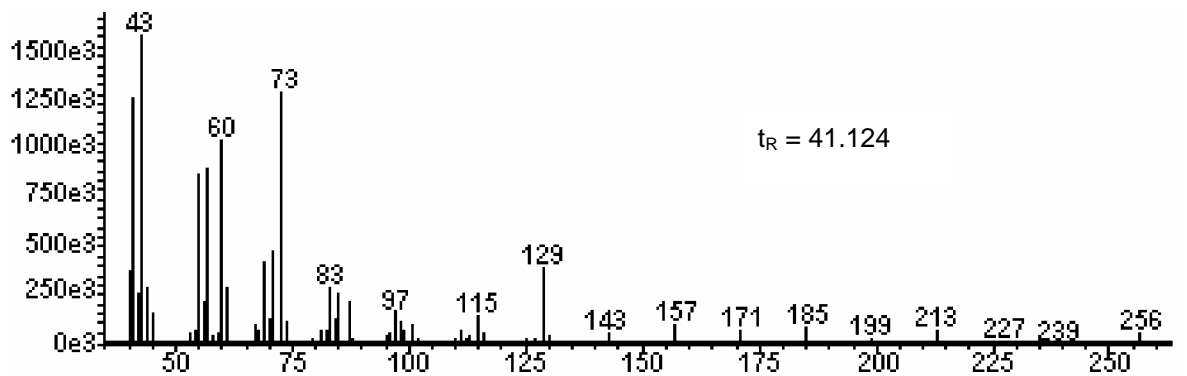
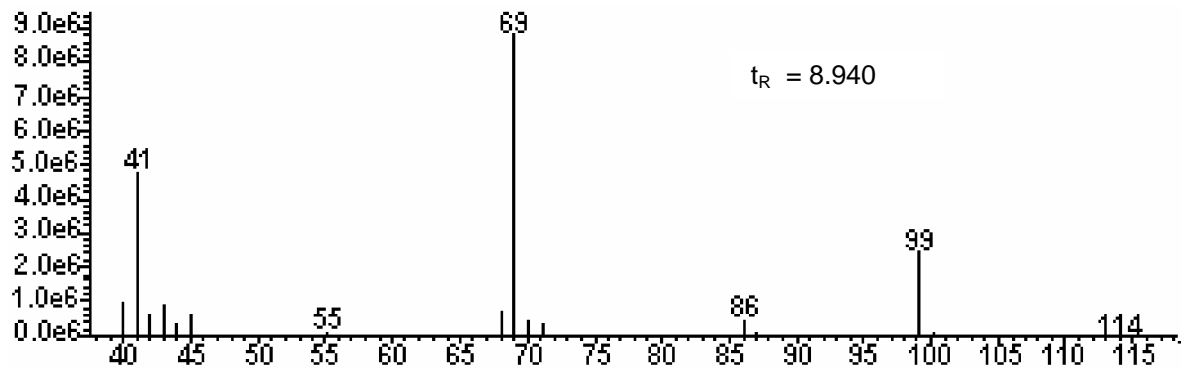
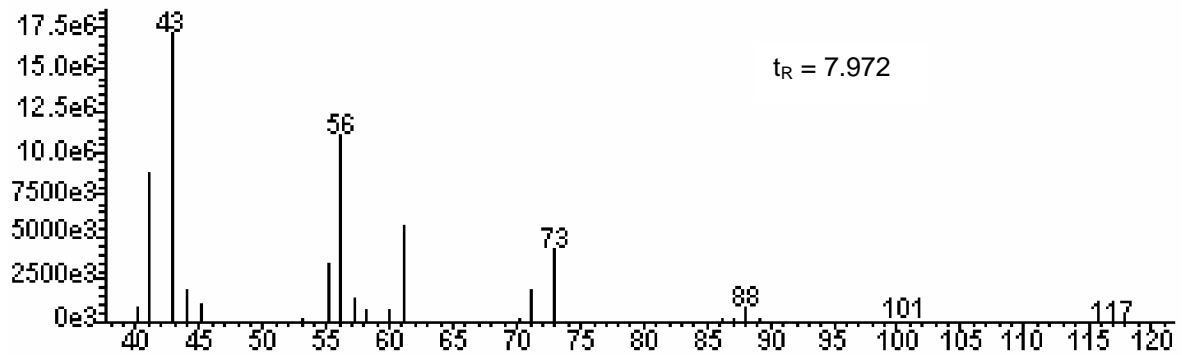




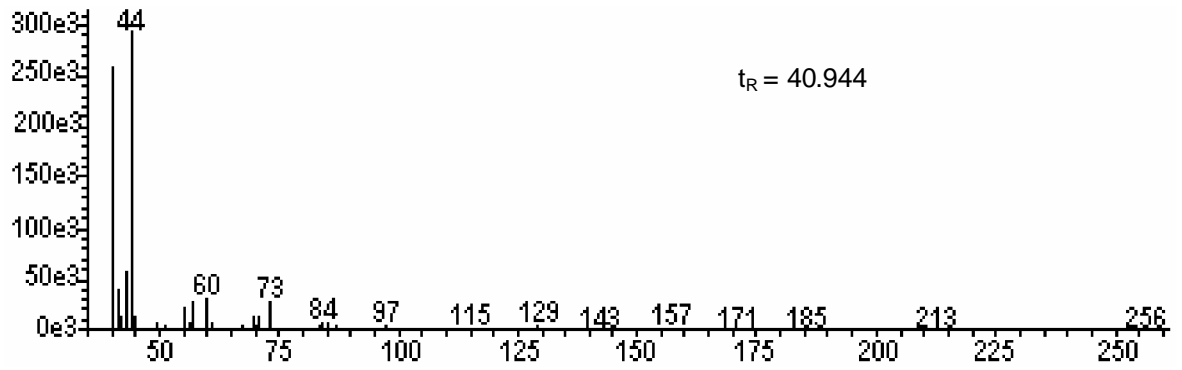


ANEXO J. Espectros de masas de los compuestos no identificados por I_K , o por comparación con bases de datos.

Espectros de masas de los compuestos extraídos por MWHD.



Espectro de masas de compuesto extraído por DES.



ANEXO K. Clasificación por familias de los metabolitos secundarios identificados en los frutos maduros de *C.candamarcencis*.

Clasificación por familias de los compuestos identificados en los extractos obtenidos por MWHD.

Oxigenados	Hidrocarburos insaturados
Benzoato de butilo	2-metil-1-penteno
1-octen-3-ona	5-metil-1-hexeno
hexanoato de etilo	
Caprilato de butilo	Hidrocarburos saturados
Acetato de hexilo	Heneicosano
Furancarboxilato de etilo	
Octanol	Hidrocarburos aromáticos
2-octenoato de etilo	Tolueno
Octanoato de metilo	
Ácido octanoico	Monoterpenos
2-hidroxibenzoato de etilo	Linalool
Octanoato de etilo	
Ácido tetradecanoico	Sesquiterpenos
Decanoato de butilo	Farnesol
Hexadecanoato de etilo	
9,12,15-octadecatrienoato de metilo	Nitrogenados
Hexadecanoato de butilo	2-miristinol glicinamida
Caprilato de metilo	

Clasificación por familias de los COVs identificados en los extractos obtenidos por DES.

Oxigenados	Hidrocarburos saturados
Hexanoato de etilo	Heneicosano
Caprilato de butilo	2-metil pentano
Octanol	
Octanoato de metilo	Sesquiterpenos
Octanoato de etilo	Farnesol
Decanoato de butilo	
Caprilato de metilo	