

DETERMINACIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LOS BULBOS DEL *ALLIUM SATIVUM* (AJO),  
CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO POR HS-SPME

HERMES JESUS DELGADO DELGADO  
PAULO CESAR TOVAR MEDINA

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

DETERMINACION DEL COMPORTAMIENTO DE LOS METABOLITOS  
SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL *ALLIUM SATIVUM* (AJO),  
CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO POR HS-SPME

HERMES JESUS DELGADO DELGADO  
PAULO CESAR TOVAR MEDINA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de:  
Químico

Asesora

M.S.c. Alba Teresa Alvarez M.

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

“Las ideas y conclusiones aportadas en la tesis de grado, son responsabilidad exclusiva de sus autores”

Artículo 1. del acuerdo No, 324 de octubre 14 de 1966, emanada del Honorable Consejo Directivo de la Universidad de Nariño”

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente del jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

San Juan de Pasto, 20 de febrero de 2006

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Departamento de Química por la colaboración prestada.

A la M.S.c. ALBA TEREZA ALVAREZ por su asesoría.

A los Doctores ANDRES HURTADO Y NELSON HURTADO por la revisión y la atención prestada al trabajo de grado.

A la M.S.c. JAQUELINE MENA por su colaboración en la realización y en el desarrollo del trabajo de grado.

A la M.S.c. OLGA LUCIA por su interés en la culminación de este trabajo de grado.

A la UNIVERSIDAD DEL VALLE por colaboración es Espectrometría de Masas

Y en general a todos los que intervinieron de una u otra manera en el desarrollo y culminación de este trabajo de grado.

## DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Dios, a mi hijo Jesús Estevan, a mis padres, hermanos, a mi sobrino Luis Gabriel que fueron un gran apoyo y a todas las personas que con sus recomendaciones colaboraron de una manera muy especial en el desarrollo de este trabajo.

HERMES JESÚS DELGADO D.

Este trabajo lo dedico a mi madre STELLA MEDINA por su apoyo incondicional; a mi padre por su conocimiento, a mi hijo JOSE GABRIEL y a mi querida esposa KARINA con nuestro bebe.

PAULO CESAR TOVAR MEDINA

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. MARCO TEORICO	23
1.1 ACEITES ESENCIALES	23
1.1.1 Composición	23
1.1.2 Métodos de extracción	26
1.2 <i>ALLIUM SATIVUM</i> L.	26
1.2.1 Descripción botánica	27
1.2.2 Fitoquímica	28
1.2.3 Atributos	31
1.3 DESTILACION EXTRACCIÓN SIMULTANEA (DES)	32
1.4 MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA CON ESPACIO DE CABEZA (HS-SPME)	33
1.4.1 Tiempo de deserción	37
1.4.2 Tiempo de exposición	38
1.4.3 Optimización de las condiciones de extracción	39
1.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES	42
1.5.1 Cromatografía de gases (GC)	42
1.5.2 Espectrometría de masas (GC-MS)	42
2. METODOLOGÍA	43

2.1 MANEJO DE LA MATERIA PRIMA	43
2.2 OBTENCION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> POR DES	43
2.3 OBTENCION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> POR HS-SPME	43
2.4 COMPORTAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO POR HS – SPME	45
2.5 ANÁLISIS POR GC DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLÁTILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i>	45
2.5.1 Análisis Cualitativo de los Metabolitos Secundarios Volátiles de los Bulbos del <i>A. Sativum</i>	47
2.5.2 Análisis Cuantitativo de los Metabolitos Secundarios Volátiles de los Bulbos del <i>A. Sativum</i>	48
2.6 ANÁLISIS POR GC-MS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS <i>A. Sativum</i>	51
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS	52
3.1 ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> POR GC EXTRAIDOS POR DES	52
3.1.1 Cuantificación de los metabolitos secundarios de los bulbos del <i>A. Sativum</i> extraídos por DES	57
3.2 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> POR GC-MS	61
3.3 ANÁLISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> POR GC. EXTRAIDOS POR HS – SPME	67
3.3.1 Tiempo de Deserción	67
3.3.2 Tiempo de exposición	67

3.4 SEMICUANTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> OBTENIDOS POR HS-SPME	75
3.5 COMPORTAMIENTO CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LOS COMPONENTES VOLÁTILES DE LOS BULBOS DEL <i>A. Sativum</i> ANALIZADOS POR HS – SPME	77
CONCLUSIONES	87
RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFÍA	89
ANEXOS	92

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de Terpenoides	24
Tabla 2. Algunos componentes de los A.E	25
Tabla 3. Clasificación de fibras, utilizadas en SPME	35
Tabla 4. Tratamientos aplicados para la extracción de metabolitos secundarios volátiles del A. Sativum por DES	52
Tabla 5. Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum extraído por DES	53
Tabla 6. Datos del numero de compuestos extraídos por cada tratamiento	56
Tabla 7. ANDEVA para el numero de compuestos extraídos por DES	56
Tabla 8. Prueba de TUKEY para el numero de compuestos extraídos por DES	56
Tabla 9. Datos de áreas cromatográficas de n-tetradecano para la curva de cuantificación para DES	57
Tabla 10. Concentración de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum obtenidos por DES	59
Tabla 11. Andeva para la concentración de los compuestos del A.E. de los bulbos del A. Sativum extraídos por DES	59
Tabla 12. Prueba de TUKEY para la concentración de los compuestos extraídos por DES	60
Tabla 13. Iones característicos en los espectros de masas de compuestos identificados en los extractos de A. Sativum.	61
Tabla 14. Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum extraído por HS – SPME	68
Tabla 15. Datos de dos compuestos principales Volátiles de los bulbos del A. Sativum obtenidos por HS - SPME para los cuatro tratamientos	69
Tabla 16. Reproducibilidad de Áreas de los dos compuestos principales Volátiles de los bulbos del A. Sativum en los tiempos de equilibrio de cada tratamiento	70
Tabla 17. Datos de áreas cromatográficas de n-tetradecano para la curva de semicuantificación para HS-SPME	75
Tabla 18. Semicuantificación de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum obtenidos por HS – SPME en el tratamiento SMC con tiempo de equilibrio de 30 minutos	77
Tabla 19. Semicuantificación del comportamiento de los componentes volátiles de los bulbos del A. Sativum con respecto al tiempo de almacenamiento obtenidos por HS-SPME	82

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Compuestos característicos de los A.E	24
Figura 2. Estructuras de algunos componentes de los A.E	25
Figura 3. Bulbos de <i>A. sativum</i>	26
Figura 4. Plantación de <i>A. sativum</i>	27
Figura 5. Estructura del grupo Alilo	28
Figura 6. Estructuras de algunos componentes del A.E. del <i>A. Sativum</i>	29
Figura 7. Transformación de la Aliina en algunos compuestos principales	30
Figura 8. Aparato utilizado para la extracción destilación simultanea (DES)	33
Figura 9. Instrumento utilizado para la microextracción de analitos HS-SPME	34
Figura 10. Tipos básicos de extracción realizados por SPME	36
Figura 11. Esquema del procedimiento para la extracción por HS-SPME	38
Figura 12. Efecto de la temperatura en la sensibilidad del método de extracción	40
Figura 13. Montaje DES	44
Figura 14. Indicación de la medida del headspace en HS-SPME	44
Figura 15. Montaje HS – SPME en Cromatografía de Gases	46
Figura 16. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T1 (30 minutos) obtenido por DES	54
Figura 17. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T2 (60 minutos) obtenido por DES	54
Figura 18. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T3 (90 minutos) obtenido por DES	55
Figura 19. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T4 (120 minutos) obtenido por DES	55
Figura 20. Perfil cromatográfico por GC-ECD del tratamiento T3 (90 minutos) obtenido por DES	60
Figura 21. Espectro de masas del DIALILDISULFURO	62
Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del DIALILDISULFURO	62
Figura 23. Espectro de masas del METILALILDISULFURO	63
Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del METILALILDISULFURO	63
Figura 25. Espectro de masas del PROPILALILDISULFURO	64
Figura 26. Posibles rutas de fragmentación del PROPILALILDISULFURO	64
Figura 27. Espectro de masas del DIALILTRISULFURO	65
Figura 28. Posibles rutas de fragmentación del DIALILTRISULFURO	65
Figura 29. Espectro de masas del DIALILTETRASULFURO	66
Figura 30. Posibles rutas de fragmentación del DIALILTETRASULFURO	66
Figura 31. Perfil Cromatográfico del tratamiento SM por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del <i>A. Sativum</i> a un tiempo de	

equilibrio de 30 minutos	72
Figura 32. Perfil Cromatográfico del tratamiento SMA por GC-FID de Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 30 minutos	73
Figura 33. Perfil Cromatográfico del tratamiento SMCA por GC-FID de los Componentes de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	73
Figura 34. Perfil cromatográfico por GC-FID/Carbowax obtenido por HS-SPME en el tratamiento SMC con tiempo de equilibrio de 30 minutos	74
Figura 35. Perfil cromatográfico por GC-ECD obtenido por HS-SPME en el tratamiento SMC con tiempo de equilibrio de 30 minutos	74
Figura 36. Perfil Cromatográfico de t1 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	78
Figura 37. Perfil Cromatográfico de t2 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	78
Figura 38. Perfil Cromatográfico de t3 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	79
Figura 39. Perfil Cromatográfico de t4 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	79
Figura 40. Perfil Cromatográfico de t5 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	80
Figura 41. Perfil Cromatográfico de t6 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del A. Sativum a un tiempo de equilibrio de 20 minutos	80

## LISTA DE GRAFICOS

	Pág.
Grafico 1. Determinación del factor de respuesta para DES	58
Grafico 2. Comportamiento del compuesto DIALILDISULFURO en los cuatro tratamientos	71
Grafico 3. Comportamiento del compuesto DIALILTRISULFURO en los cuatro tratamientos	71
Grafico 4. Determinación del factor de respuesta para HS - SPME	76
Grafico 5. Comportamientos de los compuestos volátiles presentes en los bulbos del <i>A. Sativum</i> con respecto al tiempo de almacenamiento	83
Grafico 6. Comportamiento de algunos compuestos volátiles presentes en los bulbos del <i>A. Sativum</i> obtenidos por HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento, con una concentración inicial del orden de $10^{-1}$ ppm.	84
Grafico 7. Comportamiento de algunos compuestos volátiles presentes en los bulbos del <i>A. Sativum</i> obtenidos por HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento, con una concentración inicial del orden de $10^{-2}$ ppm.	84
Grafico 8. Comportamiento de algunos compuestos volátiles presentes en los bulbos del <i>A. Sativum</i> obtenidos por HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento, con una concentración inicial del orden de $10^{-3}$ ppm.	85

## LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C <sub>6</sub> -C <sub>18</sub> en columna MDN-5, por DES	92
Anexo B. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C <sub>6</sub> -C <sub>18</sub> en columna MDN-5, por HS-SPME	93
Anexo C. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C <sub>6</sub> -C <sub>18</sub> en columna Carbowax, por HS-SPME	94
Anexo D. Ecuaciones para el calculo de ANDEVA	95

## GLOSARIO

AE: Aceite Esencial  
AEs: 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  
CV: Coeficiente de Variación  
DIA: Diseño irrestrictamente al azar  
DES: Destilación Extracción Simultánea  
DMS: Diferencia Mínima significativa.  
EE: Error Experimental.  
EM: Error de Muestreo.  
Fcal: F calculada.  
FID: Detector de ionización en llama  
F tab: F tabulada.  
GL: Grados de libertad  
GC: Cromatografía de Gases o Cromatógrafo de Gases según contexto.  
GC – MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas o Cromatógrafo de Gases acoplado a un Espectrómetro de Masas según contexto  
HS–SPME: Micro Extracción en Fase Sólida (espacio cabeza)  
 $I_K$ : Índice de retención de Kovats.  
ISTD: Estándar interno.  
MS: Espectrometría de Masas.  
 $m/z$  : Relación masa ( $m$ ) carga ( $z$ ) del ión  
S: Desviación estándar.  
SC: Suma de cuadrados.  
SPME: Micro Extracción en Fase Sólida  
 $t_R$  : Tiempo de retención

## RESUMEN

Se obtuvieron los componentes volátiles de los bulbos del *A. sativum* utilizando como método de extracción Destilación Extracción Simultanea con Solvente (DES), obteniendo un tiempo de extracción del material vegetal de 30 minutos. Se extrajeron los metabolitos secundarios volátiles responsables del aroma de los bulbos del *A. Sativum* por Microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HS – SPME) con un tiempo de exposición de la fibra de 20 minutos a una temperatura de 25°C.

Se analizo los componentes volátiles del ajo por GC-FID utilizando una columna de Carbowax. Mediante los índices de Kovats ( $I_k$ ) se determinaron 20 compuestos y se identifico por MS 7 compuestos sulfurados y 1 oxigenado.

La cuantificación se realizo por el método del estándar interno utilizando n-tetradecano y una columna MDN-5 en (GC-FID). El compuesto con mayor concentración obtenido por DES como por HS-SPME fue el Dialildisulfuro con 12.41ppm y 3.52ppm respectivamente.

Los compuestos que fueron extraídos por la fibra hasta las 130 horas fueron 5 disulfuros con las siguientes concentraciones: Propilalildisulfuro  $2.67 \cdot 10^{-3}$  ppm; Dialildisulfuro  $1.27 \cdot 10^{-2}$  ppm (E)1-Propenilalildisulfuro  $1.74 \cdot 10^{-3}$  ppm; 1,2 Ditiaciclopentan-3-ene  $9.21 \cdot 10^{-3}$  ppm; 3-vinil-4H-1,2-Ditiino  $2.06 \cdot 10^{-3}$  ppm, 1 trisulfuro: Propilaliltrisulfuro  $2.24 \cdot 10^{-3}$  ppm, 1 tetrasulfuro: Dialiltetrasulfuro  $1.08 \cdot 10^{-3}$  ppm y 1 compuesto no identificado con  $5.47 \cdot 10^{-3}$  ppm.

## ABSTRACT

The volatile components of the bulbs of the *A. Sativum* were obtained using as method of extraction Extraction Destillation Simultaneous with Solvent (DES), obtaining a time of extraction of the vegetable material of 30 minutes. The volatile secondary metabolites responsible for the aroma of the bulbs of the *A. Sativum* was extracted by Solid Phase Microextraction with head space (HS-SPME) with a time of the fiber of 20 minutes to a temperature of 25°C.

Analyzes the volatile components of the garlic for GC-FID using a column of Carbowax. By means of the indexes of Kovats ( $I_K$ ) 20 compounds were determined and it identifies for MS 7 sulfurated compounds and 1 oxygenated.

The quantification one carries out for the method of the internal standard using n-tetradecane and a column MDN-5 in (GC-FID). The made up with bigger concentration obtained by DES like for HS-SPME it was the Diallyldisulfide respectively with 12.41 ppm and 3.52 ppm.

The compounds that were extracted by the fiber until 130 hours were 5 disulfuros with the following concentrations: propylallyldisulfide  $2.67 \cdot 10^{-3}$  ppm.; Diallyldisulfide  $1.27 \cdot 10^{-3}$  ppm.; (E) 1-propenylallyldisulfide  $1.74 \cdot 10^{-3}$  ppm.; 1,2-dithiacyclopent-3-ene  $9.21 \cdot 10^{-3}$  ppm.; 3-vinyl-4H-1,2-dithiin  $2.06 \cdot 10^{-3}$  ppm.; 1 trisulfide: propylallyltrisulfide  $2.24 \cdot 10^{-3}$  ppm.; 1 tetrasulfide: diallyltetrasulfide  $1.08 \cdot 10^{-3}$  ppm.; and 1 compound not identified with  $5.47 \cdot 10^{-3}$  ppm.

## INTRODUCCION

El estudio científico moderno de las actividades alelopáticas y fisiológicas de las plantas permite descubrir propiedades que incluso van más allá de los usos tradicionalmente conocidos<sup>1</sup>; teniendo en cuenta las propiedades y efectos de las plantas sobre algunos organismos se han motivado múltiples estudios e investigaciones, en la búsqueda de sustancias que por su origen natural son biodegradables disminuyendo la contaminación ambiental.

La gran variedad de flora que hay en nuestra región, permite desarrollar investigaciones relacionadas con las propiedades de dichos recursos, particularmente el estudio del Aceite Esencial (A.E.) del *Allium Sativum* (ajo).

El ajo contiene compuestos con actividad terapéutica<sup>2</sup> enmarcada en el estudio de los efectos contra la bacteria *Helicobacter Pilyori*<sup>3</sup>; además contiene propiedades antisépticas, depurativas, activador de varias funciones orgánicas y también actúa como agente alelopático<sup>4,5</sup>.

El compuesto principal del ajo es el óxido de disulfuro de dialilo (alicina)<sup>6</sup>, responsable del olor fuerte y del efecto antibacteriano, que proviene de la acción enzimática de la alinaza sobre la aliina<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> GARCIA, Hernando, FLS. Flora Medicinal de Colombia, editores Tercer Mundo, 1992. p.17

<sup>2</sup> FALCAO, José Universidad CICCIO, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Química de Costa Rica.1998. p. 87-95

<sup>3</sup> VASQUEZ, Rosa Maria, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo[en línea]. [Perú].Abril 2003 . [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL : <http://www.unitro.edu.pe/old/publicacion/sciendo/sciendoll/> >

<sup>4</sup> CAICEDO, Luis A. Federación Nacional de Cafeteros. El cultivo del ajo. 1982. p.14-22.

<sup>5</sup> RAMÓN y Cejal, Hospital Departamento de Gastroenterología, [en línea]. [España] marzo 2002. [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL : [http:// www. Ondasalud.com. pdf](http://www.Ondasalud.com.pdf) / >

<sup>6</sup> BLOCK. Erik. Revista Investigación y Ciencia. Barcelona mayo de 1985. Pág. 23-25

<sup>7</sup> PIERSON, Herbert. Artículo revista Medico de la Familia. Centro de Investigación sobre la Nutrición. Washington. [en línea]. [Estados Unidos] febrero 2001. [citado may.,2004]. Disponible en Internet:<URL : [http:// www.saludpi.com/](http://www.saludpi.com/) >

Teniendo en cuenta que hay compuestos volátiles en el ajo se utilizan como métodos de extracción la técnica de Microextracción en Fase Sólida con espacio de cabeza (HS-SPME)<sup>9</sup>, la Destilación Extracción Simultanea con solvente (DES), entre otros, que permiten el estudio de compuestos volátiles.

La característica general de los compuestos volátiles, es que a medida que pasa el tiempo, la cantidad residente en la especie va disminuyendo o cambiando la composición química de los compuestos volátiles en condiciones tales como la temperatura, humedad, etc. Para ello es necesario elaborar un diseño experimental que abarque el estudio con respecto al tiempo de los principales componentes volátiles.

---

<sup>8</sup> THRASH, Ágata. Remedios caseros. Instituto Pines. Departamento de salud y Educación. Edición 1981. seattle Alabama. [en línea]. [Estados Unidos] junio 2003. [citado may., 2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www. Pes.13.tripod.com / >](http://www.Pes.13.tripod.com/)

<sup>9</sup> PAWLISZYN Janusz, Solid Phase Microextracción, Theory and Practice, Willey-VCH, Waterloo, Ontario. Canadá, 1997.Pág. 97

## 1. MARCO TEORICO

### 1.1 ACEITES ESCENCIALES

Los A.E. aceites volátiles, aceites etéreos o esencias, son identificados por su olor y sabor<sup>10</sup>, estos se forman como subproducto del metabolismo de las plantas. Una definición general es que son cuerpos odoríferos de naturaleza oleosa, obtenidos exclusivamente de fuentes vegetales y generalmente son líquidos<sup>11</sup>.

Dos son las funciones básicas del A.E, por un lado protegen a algunas plantas de plagas, enfermedades, e incluso de la invasión de otras plantas<sup>12</sup>. Por otra parte, las flores expiden su aroma que ejerce atracción sobre insectos y aves, favoreciendo el proceso de polinización<sup>10</sup>. Los A.E. son sustancias sensibles a la acción de los rayos ultravioleta como también a las condiciones extremas de temperatura que afectan su estructura y su cantidad en la planta<sup>13</sup>.

Estos compuestos son susceptibles de ser aislados y utilizados en orden a sus características fisicoquímicas<sup>14</sup>.

1.1.1 Composición. Al estudiar los A.E. se encontró que en las fracciones mas volátiles de muchos de ellos había un gran numero de hidrocarburos de formula  $C_{10}H_{16}$ , a los que se los denomino terpenos, poco después se aislaron compuestos oxigenados conocidos como terpenoides<sup>15</sup>.

El estudio de fracciones de mayor punto de ebullición permite caracterizar compuestos de 15 átomos de carbono (sesquiterpenos), que junto con los de 10 átomos de carbono (monoterpenos), indicadas en la Tabla 1; están presentes por lo general en los aceites volátiles de las plantas.

---

<sup>10</sup> WREN, R. Potrees New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations, editorial Grijalvo, 1944. pag 112-123

<sup>11</sup> RAYMAND E. Kirk, Enciclopedia de la Tecnología Química, editorial Hispanoamericana, tomo II. Pág. 119

<sup>12</sup> GROG. Eduardo, Pumillo Alicia, Introducción al Estudio de los Productos Naturales, Buenos Aires Argentina. Pág. 25

<sup>13</sup> VASQUEZ, Rosa Maria, Op.cit.,

<sup>14</sup> BLOCK. Erik. Op.cit 27-30

<sup>15</sup> OSORIO P Rafael, Química Orgánica II Estereoquímica y Química de los productos naturales. México 1985. Pág. 230-245

Se observó que los A.E. estaban compuestos por una unidad formada por cinco átomos de carbono<sup>16</sup>, como se muestra en la Figura 1; a la cual se la denominó unidad isopreno (1) o isopentano (2).

Figura 1. Compuestos característicos de los A.E.



Fuente: OSORIO P. Rafael.

Tabla 1. Clasificación de Terpenoides

NOMBRE	FORMULA MOLECULAR	No. DE UNIDADES
Monoterpenos	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1
Sesquiterpenos	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>	2
Diterpenos	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub>	3
Sesterterpenos	C <sub>25</sub> H <sub>40</sub>	4
Triterpenos	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub>	5
Tetraterpenos	C <sub>40</sub> H <sub>64</sub>	6
Politerpenos	C <sub>5n</sub> H <sub>8n</sub>	N

Fuente: OSORIO P. Rafael.

La mayor parte de los A.E. están compuestos por terpenos, sustancias oxigenadas, sesquiterpenos y una pequeña cantidad de residuos no volátiles<sup>17</sup> según los principales componentes de los A.E, estos se pueden dividir en dos grupos, representados en la Tabla 2.

<sup>16</sup> OSORIO P Rafael. Op.cit., p. 209-210

<sup>17</sup> MORRISON, Robert. Química Orgánica, Iberoamerica. México 1990. PO. 202

Las estructuras juegan un papel importante para determinar sus propiedades físicas y químicas, como también para determinar su clasificación química. Algunas estructuras de los componentes de los A.E. estas representadas en las Figura 2.

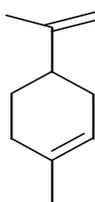
Tabla 2. Algunos componentes de los A.E.

CARBONO E HIDRÓGENO	CARBONO, HIDRÓGENO Y OXIGENO	EXCEPCIONES
Alcanos	Alcoholes	Isocianatos Orgánicos
Olefinas	Aldehídos	Disulfuros Orgánicos
Hidrocarburos aromáticos	Cetonas	Cianuros Orgánicos
Terpenos $C_{10}H_{16}$	Esteres aromáticos y	Indol
Sesquiterpenos $C_{15}H_{24}$	Alifáticos	Escatol
Diterpenos $C_{20}H_{32}$	Esteres terpenicos y	Antramilato de metilo
	Sesquiterpenos	

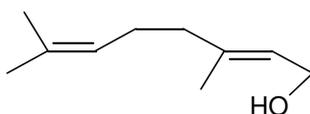
Fuente: OSORIO P. Rafael.

Figura 2. Estructuras de algunos componentes de los A.E.

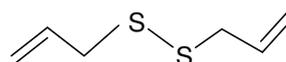
LIMONENO



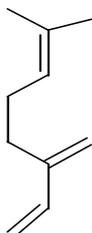
GERANIOL



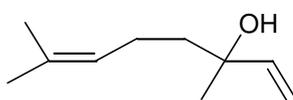
DISULFURO DE DIALILO



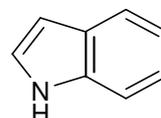
MIRCENO



LINALOL



INDOL



Fuente: RAYMAND E. Kirk,

1.1.2 Métodos de extracción. Los A.E. se pueden extraer de muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, enfleurage, fluido supercrítico<sup>18</sup>, extracción con solventes volátiles<sup>19</sup>, destilación con vapor de agua y métodos modernos como extracción en fase sólida (EFS)<sup>20</sup>, hidrodestilación asistida por microondas, DES y HS-SPME<sup>21</sup>. Las dos últimas técnicas se utilizaron en esta investigación y se describirán en la sección 1.3 y 1.4 respectivamente.

## 1.2 *ALLIUM SATIVUM* L.

En la Figura 3 se muestra una cabeza de ajo del cultivo en Catambuco.

Figura 3 bulbos de *A. sativum*.



Fuente: cultivo de ajo Catambuco

---

<sup>18</sup> PARRY, E. J. Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes, 4<sup>a</sup> editorial Scott, Greenwood, Londres, Vol. I, 1922. p. 245

<sup>19</sup> E.O.A. Determinations and standards, Essential Oil Assoc. of U.S.A. Scientific, section, N.Y. 1947-1951. p.112

<sup>20</sup> WU, C. M.; Chen, S. Y. Volatile compounds in oil after deep frying or stir frying and subsequent storage. J. Am. Oil Chem. Soc. Japón 1992, 69. p. 858-865

<sup>21</sup> 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 : Universidad Industrial de Santander 2002. p.4 -20

1.2.1 Descripción botánica. *A. sativum*, es una hierba de bulbos grandes. Sistema radicular: raíz bulbosa, compuesta de 20 a 30 bulbillos (“dientes de ajo”) e irregulares, reunidos en su base por medio de una película delgada, formando lo que se conoce como “cabeza de ajos”, ver Figura 3 y 4. Cada bulbillo se encuentra envuelto por una túnica blanca, membranosa, transparente y muy delgada<sup>22</sup>.

Familia: Liliáceas.

Nombre científico: *Allium sativum* L.

Planta: bulbosa, vivaz y rústica. Nativa de Asia central<sup>22</sup>.

Figura 4. Plantación de *A. sativum*



Fuente: cultivo de ajo Catambuco

El almacenamiento debe tener una humedad de 65-70%, por encima de este valor los bulbos se pudren<sup>23</sup>. Los ajos se pueden conservar durante 6 a 7 meses a 0°C, con correcto curado o a una temperatura de 32°C hasta por un mes, si la humedad relativa es baja<sup>23</sup>.

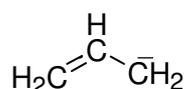
---

<sup>22</sup> HERBARIO de la Universidad de Nariño Pasto.2004

<sup>23</sup> CAICEDO, Luis. Op.cit., p.16

1.2.2 Fitoquímica. En 1844 el químico Alemán Theodor Wertheim, obtuvo aceite de ajo por destilación al vapor separando sustancias que contenían un olor fuerte. Wertheim propuso el nombre de alilo (de Allium), para el grupo hidrocarburo del aceite y sulfoalilos para sustancias volátiles<sup>23</sup>. En 1892 el químico F. W. Semmler, por medio de la destilación al vapor obtuvo uno a dos gramos del aceite por kilogramo de ajo<sup>24</sup>. Este aceite a su vez contenía sustancias con base en el grupo alilo, indicado en la Figura 5; tales como el disulfuro de dialilo junto con cantidades mas pequeñas de trisulfuro y tetrasulfuro de dialilo<sup>25</sup>.

Figura 5. Estructura del grupo Alilo



El ajo contiene un porcentaje de A.E. entre 0,2 y 0,5 %<sup>24</sup>. Además, contiene más de 100 metabolitos secundarios biológicos útiles en el A.E. incluyendo aliína o sulfóxido de alilcisteína, oxido de disulfuro de dialilo que fue denominada por Chester J. Cavallito en 1944 como alicina<sup>25</sup>, el cual era un líquido incoloro, químicamente inestable, al que se debe el olor del ajo mucho mas que a los sulfuros de dialilo<sup>26</sup>.

---

<sup>23</sup> BLOCK, E.; Bentley, M. D.; Davis, F. A.; Douglas, I. B.; Locadie, J. A. Electron impact induced process of thermally and photochemically labile organic sulfur compounds. A mass spectral study of dialkyl disulfides, trisulfides, and  $\alpha$ -disulfones. J. Org. Chem. 1975, 40. p. 2770-2773

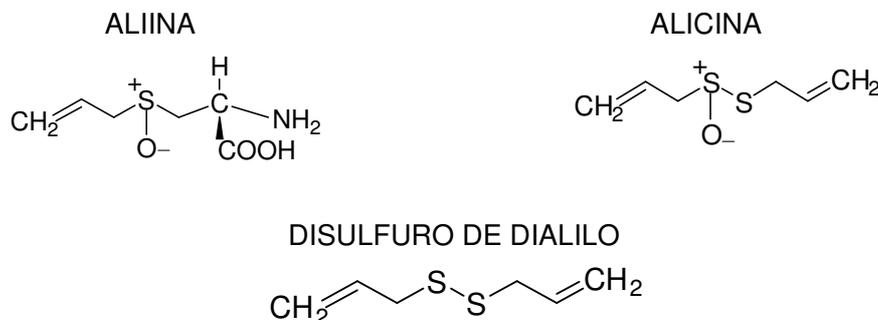
<sup>24</sup> YU, T. H.; Wu, C. M. Stability of allicin in garlic juice. J. Food Sci. 1889, 54. p. 977-981

<sup>25</sup> CAVALLITO, J. Bailey, and J. Hays, Allicin, the Antibacterial principle of Allium Sativum I. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. Contribution from the Research Laboratories of Winthrop Chemical. Co. Inc., 1994. p. 1950-1951

<sup>26</sup> CAMARGO, A. B, Adecuación del método de análisis de dialiltiosulfonato en polvo de ajo, mediante HPLC, Laboratorio de Análisis de Residuos Tóxicos, Facultad de ciencias Agrarias, U.N.C. Argentina. Inc. 1995. p.145

La alicina se transforma rápidamente en disulfuro de dialilo. Las estructuras están representadas en la figura 6.

Figura 6. Estructuras de algunos componentes del A.E. del *A. Sativum*



Arthur Stoll y Ewald Seebeck en 1948 descubrieron que la alicina se formaba cuando la enzima (aliinaza (+)-S-alil-L-cisteinilsulfoxido) actuaba sobre un precursor (aliina)<sup>27</sup>. El aceite del ajo puede producir aproximadamente el 60% de su peso en alicina después de ser expuesto a la enzima cuando el ajo es cortado<sup>27</sup>. Además de la aliina hay otros compuestos muy reactivos que se transforman espontáneamente en otros compuestos orgánicos azufrados que participan en transformaciones posteriores<sup>28</sup>.

Ciertas formas de compuestos semejantes a la alicina están presentes solamente en el estado crudo del ajo<sup>29</sup>. La aliina es estable al almacenamiento por largos periodos de tiempo, la alicina en forma acuosa no es estable al almacenamiento por largos periodos de tiempo y pierde su poder activo antibacterial<sup>30</sup>.

En el ajo la esencia proviene no de un heteróxido sino del aminoácido azufrado que es la aliina, que está presente en la planta fresca<sup>29</sup>. Otro componente activo es el ajoeno, sustancia que se forma por la condensación de la alicina como lo muestra la Figura 7 el cual es un agente antitrombogénico, este actúa inhibiendo los receptores del fibrinógeno de las plaquetas<sup>30</sup>.

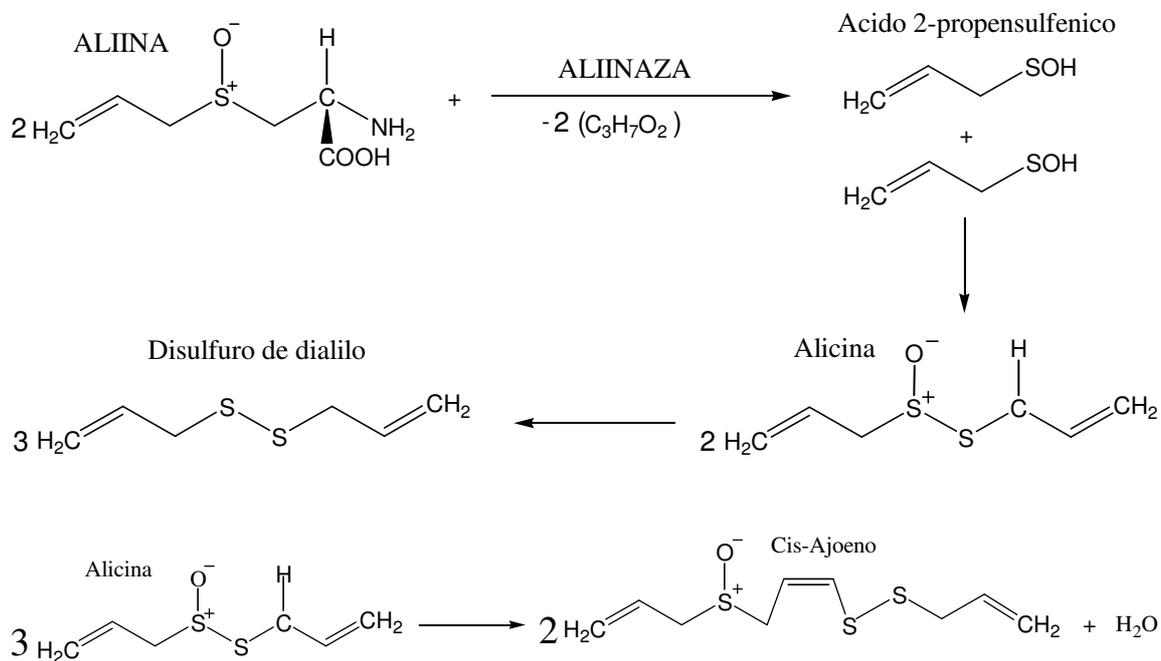
<sup>27</sup> YU, T.H.;Wu, C. M. Op. cit., p. 997-981

<sup>28</sup> BLOCK, E.; Bentley. Op. cit., p.2770-2773

<sup>29</sup> YU, Thung-Hsi,. Volatile compounds from garlic. J Agric. Food Chem 1989, 37.p. 725-730.

<sup>30</sup> MARTINEZ, Sonano, Uriel. Escuela de ciencias Químicas. Universidad Autonoma. Benito Juárez de Oaxaca. México.1998. [en línea]. [México] julio 2003. [citado may., 2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www. Geocities.com/capecanaveral/runway /](http://www.Geocities.com/capecanaveral/runway/) >

Figura 7. Transformación de la Aliina en algunos compuestos principales



Fuente: Caballito, J. Bailey

El ajo incluye varios minerales: manganeso, cobre, hierro, zinc, calcio, aluminio y es especialmente rico en selenio, posiblemente sea la fuente vegetal más rica en este elemento<sup>31</sup>. El selenio estimula la respuesta inmunológica y actúa de la misma manera antioxidante como la vitamina E, a esto se debe la cualidad antioxidante del ajo<sup>32</sup>. Posee principios activos: A.E. (0,2-0,3%): garlicina, pequeñas cantidades de vitaminas (A, B1, B2, B6, C), adenosina, sales minerales: hierro, sílice, azufre, yodo<sup>31,32</sup>.

<sup>31</sup> MEJIA C. Jaime. Manual de Alelopatía Básica y Productos Botánicos. Kingraft Ltda. México 2002. p. 115

<sup>32</sup> GUENTHER, E. Ed. The essential Oils, Van Nostrand, N.Y. vol. I. 1948.p. 123

1.2.2 Atributos. Algunos efectos terapéuticos que se le atribuyen al ajo son el efecto anti-hemolítico y anti-artrítico, es regulador del azúcar, anticoagulante (inhibiendo la agregación de la proteína fibrina con las plaquetas de la sangre), antibacterial, anti-fúngico y antiviral<sup>33</sup>. Varios componentes del ajo poseen propiedades antioxidantes que ayudan a reducir los niveles de colesterol en la sangre<sup>34</sup>.

Los diferentes tipos de componentes como los disulfuros han sido probados sobre bacterias como *Tineolla bisselliella*, los tiosulfanatos sobre *Callosobruchus maculatus*, *Sitophilus oryzae*, *Sitophilus granarius*, *Ephestia kuehniella* y *Plodia interpunctella*<sup>35</sup>. El ajo inhibe el crecimiento de *H. pylori*, una bacteria que puede promover la aparición de úlceras y cáncer gástrico<sup>36</sup>.

El principio antibacteriano del ajo ha sido demostrado que es efectivo contra Gram-positivas, Gram-negativas y contra organismos fungoideos, aún aquellas bacterias que eran resistentes con los antibióticos comúnmente usados mostraron inhibición al crecimiento usando el extracto de ajo. Esta propiedad quedó completamente inactiva a los 100°C en apenas cinco minutos<sup>37</sup>.

Se ha informado el descubrimiento de un factor inhibidor que contiene el ajo para contrarrestar el cáncer, generalmente una sustancia que contiene un grupo de átomos en el orden: -SO-S-S-, es asociado a la inhibición del crecimiento de las células, donde la división de las células y la mitosis es promovida por la presencia de los grupos sulfhidrúlicos (-SH). Cualquier agente que se junte ó se oxide en presencia de compuestos sulfhídricos inhibirá la división celular. Se ha descubierto que la alicina inhibe las enzimas sulfhídricas<sup>37</sup>.

---

<sup>33</sup> RAMÓN y Cejal, Op.cit., [en línea]. [España] marzo 2002. [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www. Ondasalud.com. pdf](http://www.Ondasalud.com.pdf) / >

<sup>34</sup> PIERSON, Herbert. Op.cit., [en línea]. [Estados Unidos] febrero 2001. [citado may.,2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www.saludpi.com](http://www.saludpi.com) / >

<sup>35</sup> VASQUEZ, Rosa Maria, Op.cit., [en línea]. [Perú].Abril 2003 . [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL :<http://www.unitro.edu.pe/old/publicacion/sciendo/sciendoll> / >

<sup>36</sup> Ibid., [en línea]. [Perú].Abril 2003 . [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL :<http://www.unitro.edu.pe/old/publicacion/sciendo/sciendoll> / >

<sup>37</sup> VASQUEZ, Rosa Maria, Op.cit., [en línea]. [Perú].Abril 2003 . [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL :<http://www.unitro.edu.pe/old/publicacion/sciendo/sciendoll> / >

El ajo es utilizado como repelente de Insectos, promueve el crecimiento de vegetales e inhiben el crecimiento de la arveja y el fríjol, el extracto controla el tizón tardío o goteo (*Phytophthora infestans*) en papa y tomate, la pudricia marrón en frutales, controla escarabajos, radica pulgones, afidos, chinches, moscas, zancudos, nemátodos<sup>38</sup>.

Como agente alelopático, los componentes del A.E. del *A. Sativum* se evaluaron comparativamente con otros productos pesticidas utilizados contra insectos, un ejemplo es el reemplazo del bromuro de metilo que ha sido utilizado por mucho tiempo como funguicida y es el responsable del 10% de todos los factores que destruyen la capa de ozono, los componentes del ajo son biodegradables y esta propiedad hace que sea una mejor opción<sup>39</sup>.

### 1.3 DESTILACION EXTRACCIÓN SIMULTANEA CON SOLVENTE (DES)

Con este método se pueden extraer cantidades considerables de componentes, partiendo de muestras liquidas o sólidas, utilizando cantidades de solvente muy pequeñas.

La muestra a extraer es colocada en el balón A y en el balón B el solvente, cada uno de estos balones esta conectado al mismo sistema de condensación C , como se muestra en la Figura 8. Estos balones se calientan por separado a diferentes temperaturas, el balón A se lleva hasta ebullición, mientras el balón B se mantiene a temperaturas por debajo del punto de ebullición del solvente para evitar su evaporación total. El agua, el solvente y el extracto se condensan al mismo tiempo, el solvente arrastra y concentra el extracto en el balón que contiene el solvente separándolo del vapor de agua, este es un proceso continuo<sup>40</sup>.

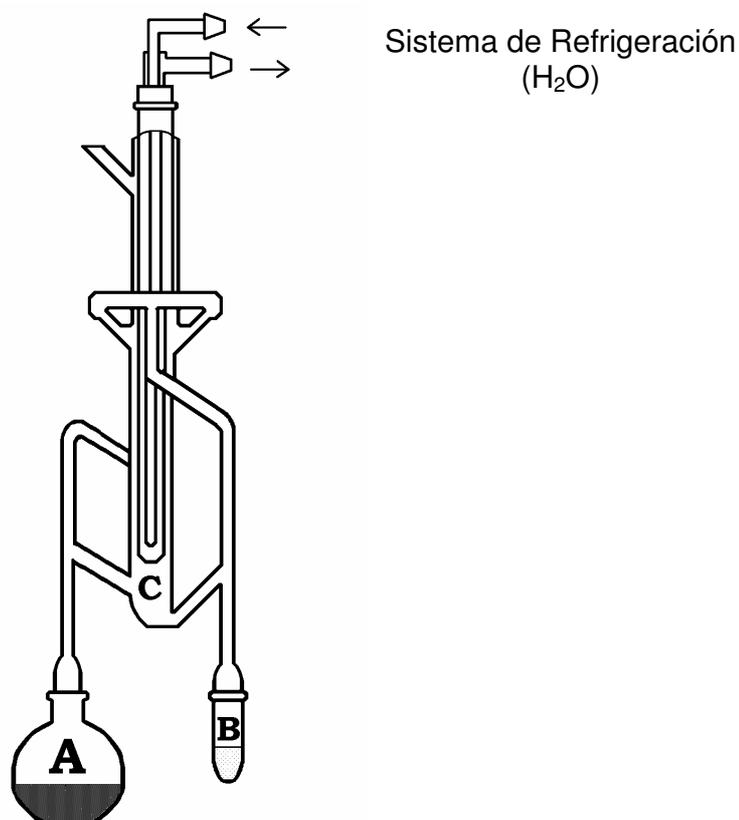
---

<sup>38</sup> MEJIA C. Jaime. Op.cit.,. p. 115

<sup>39</sup> Ibid.,p.118

<sup>40</sup> SERRANO. Martín.Op.cit., p 35

Figura 8. Aparato utilizado para la extracción destilación simultanea (DES).



#### 1.4 MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA CON ESPACIO DE CABEZA (HS-PME)

La microextracción en fase sólida facilita la preparación rápida de una muestra, reúne varias ventajas entre las cuales se encuentran: la eliminación del uso de solventes, el bajo costo, la disminución del tiempo de análisis y la selectividad. Se puede utilizar para concentrar componentes volátiles y poco volátiles en muestras líquidas, sólidas y gaseosas<sup>41</sup>.

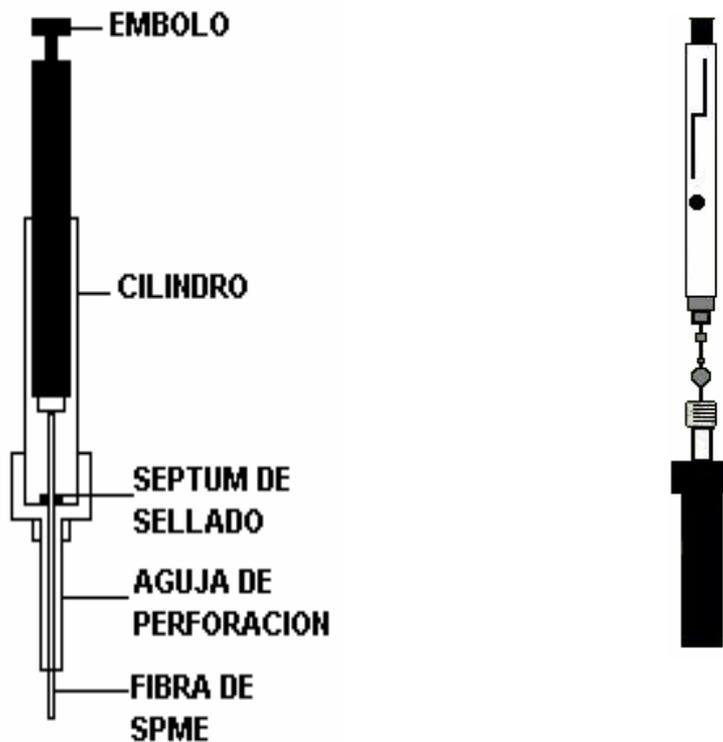
La técnica consiste en exponer una fibra de sílice fundida recubierta con un material extractor (recubrimiento), incorporada en una jeringa como se muestra en la Figura 9, a una muestra en un vial cerrado, logrando con ello el transporte de analitos de la matriz al recubrimiento<sup>42</sup>.

---

<sup>41</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p. 55

<sup>42</sup> Ibid., p. 70

Figura 9. Instrumento utilizado para la microextracción de analitos con HS-SPME.



Fuente: PAWLISZYN Janusz

Cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución, entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra la extracción finaliza, con el tiempo las moléculas del analito se difunden progresivamente mas profundamente en el recubrimiento y se alcanza el equilibrio, se retira la fibra con los analitos extraídos y se analizan en un instrumento analítico, mediante GC, GC/MS<sup>43</sup>. La concentración inicial del analito en la muestra es hallada por la Ecuación 1:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_o}{V_s + K_{fs} V_f} \quad \text{Ecuación 1}$$

---

<sup>43</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p. 99

donde:

- n : Cantidad del analito extraído por la fibra.
- Kfs : Constante de distribución del analito entre la fibra y la muestra.
- Vf : Volumen de la fibra.
- Vs : Volumen de la muestra.
- Co : Concentración inicial del analito en la muestra.

La naturaleza química de un analito determina el tipo de recubrimiento usado y su selectividad puede darse principalmente a las diferencias en polaridades y volatilidades (pesos moleculares) entre las moléculas<sup>44</sup>. El uso del material extractor (recubrimiento) se basa en fenómenos de absorción y adsorción y sus diferencias se muestran en la Tabla 3.

La cantidad de analito extraído corresponderá directamente a su concentración en la matriz sin ser dependiente en el volumen de la muestra. La extracción completa puede lograrse con volúmenes de muestra pequeños, cuando Kfs es bastante alta entre el recubrimiento y la muestra, donde dicha constante predice la distribución del analito en el sistema<sup>45</sup>.

Tabla 3. Clasificación de fibras, utilizadas en SPME.

FIBRAS ADSORBENTES	FIBRAS ABSORBENTES
Material poroso	Fase líquida
Derivatización química	Retención de analitos por el espesor de la capa
Competición de analitos por sitios en la fibra	No hay competición de los analitos por los sitios de la fibra
Capacidad limitada	Capacidad alta de extracción
	Extracción por partición de los analitos

Fuente: PAWLISZYN Janusz

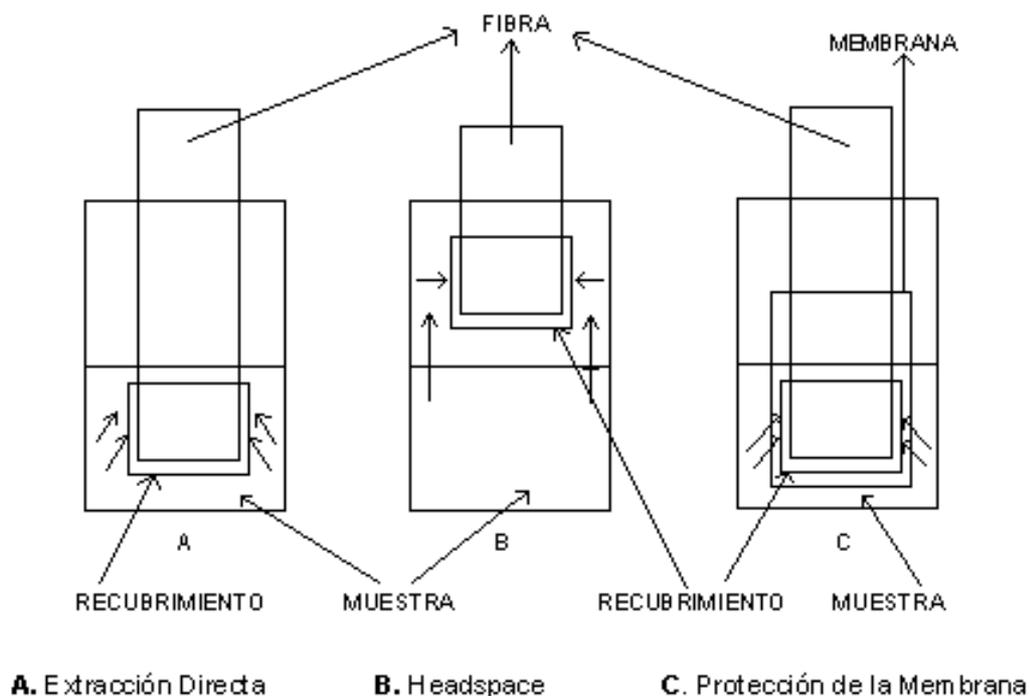
<sup>44</sup> Ibid., p. 113

<sup>45</sup> Ibid., p. 115

Tres tipos básicos de extracción pueden ser realizados en SPME:

Extracción Directa, Protección con Membrana y Headspace. En la Figura 10 se muestran los modos de operación de SPME.

Figura 10. Tipos básicos de extracción realizados por SPME.



Fuente: PAWLISZYN Janusz

En la Extracción Directa, la fibra recubierta se inserta directamente en la muestra y los analitos son transportados directamente desde la matriz de la muestra a la fase de extracción<sup>46</sup>.

En la Extracción con Membrana, la barrera que se origina con la membrana protege la fibra contra daños cuando hay muestras muy sucias. Sin embargo, la membrana de protección es ventajosa para determinar los analitos que tiene volatilidad demasiado baja, los analitos necesitan difundirse a través de la membrana antes de que ellos puedan alcanzar el recubrimiento<sup>47</sup>.

<sup>46</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p. 99

<sup>47</sup> Ibid., p. 113

El Headspace se refiere al espacio que existe entre la superficie de la muestra y la parte superior del vial que contiene la muestra. Los analitos necesitan ser transportados a través de la barrera de aire antes de que ellos puedan alcanzar el recubrimiento, esta modificación sirve principalmente para proteger el recubrimiento de la fibra de daños por compuestos con pesos moleculares altos y otras interferencias no volátiles presentes en la matriz de la muestra, como materiales humicos o proteínas. Este modo de headspace permite una modificación de la matriz como un cambio del pH sin dañar la fibra<sup>48</sup>.

1.4.1 Tiempo de desorción. El proceso de desorción es la difusión de analitos desde el recubrimiento hacia el flujo del fluido transportador donde una rata de flujo se exige para asegurar que la desorción de los analitos sea rápida y no interactúen con el recubrimiento y retarden el proceso de desorción, los analitos son removidos desde la capa del recubrimiento al final de la interfase y desde las partes mas profundas del recubrimiento<sup>49</sup>.

El tiempo de desorción es independiente de la constante de distribución del recubrimiento y gas de arrastre e independiente de la concentración inicial en la fibra, puede calcularse que el tiempo es un segundo para un recubrimiento de 100  $\mu\text{m}$  cuando se usa una temperatura de 200<sup>0</sup>C en el inyector para analitos de bajo peso molecular. Sin embargo, en práctica el flujo de la fase móvil tiene un valor límite finito y por consiguiente el tiempo de desorción sea más largo para analitos de alto peso molecular. En la utilización del HS-SPME ningún solvente está presente y por consiguiente el split necesita cerrarse para transferir todos los analitos hacia el frente del instrumento analítico para una sensibilidad óptima. Puede enfatizarse que el split puede ser cerrado al calibrar la respuesta del detector para asegurar que todos los analitos alcancen el detector<sup>50</sup>.

---

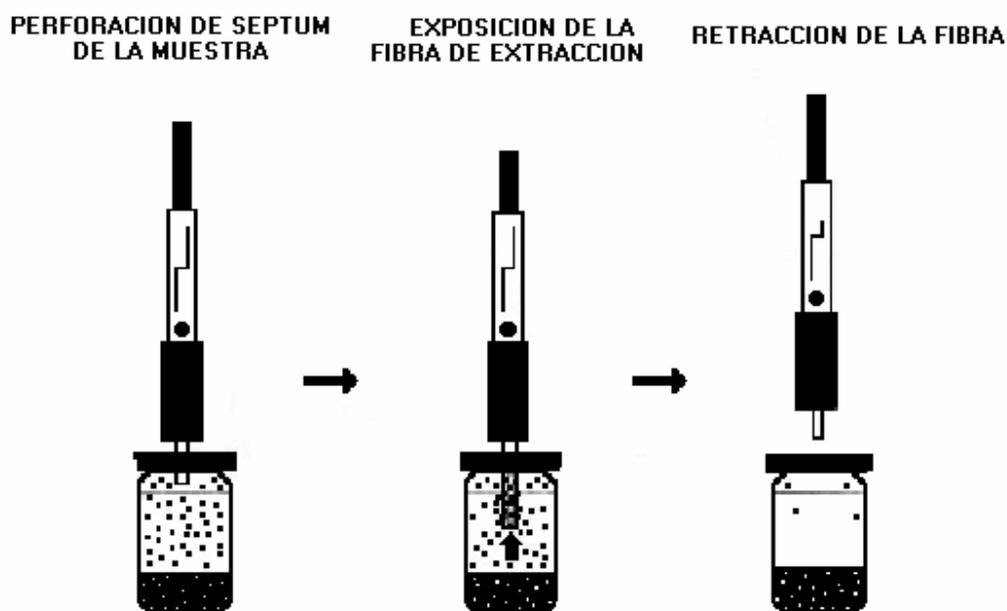
<sup>48</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p.113

<sup>49</sup> Ibid., p. 110

<sup>50</sup> Ibid., p. 111

1.4.2 Tiempo de exposición. Cuando el recubrimiento de la fibra está en el headspace los analitos son removidos primero desde el headspace seguido por la extracción indirecta desde la matriz, como se muestra en la Figura 11. Por consiguiente, los analitos volátiles son extraídos más rápidamente que los semivolátiles por tener una concentración más alta en el headspace y contribuye al transporte de masa a través del headspace<sup>51</sup>.

Figura 11. Esquema del procedimiento para la extracción por HS-SPME.



Fuente: PAWLISZYN Janusz

El tiempo de exposición es el tiempo mínimo que se requiere para que la cantidad de analitos extraídos sea constante y corresponda dentro de los límites del error experimental a la cantidad extraída en tiempo de extracción infinita denominado como tiempo de equilibrio<sup>52</sup>.

<sup>51</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p.122-124

<sup>52</sup> Ibid., p. 122-124

La determinación de la cantidad extraída en el equilibrio permite el cálculo de la constante de distribución, esta información frecuentemente puede ser usada para compensar cualquier variación en las condiciones de extracción que pueden ocurrir durante el experimento<sup>53</sup>.

Cuando se usan tiempos de extracción cortos comparados al tiempo de equilibrio, se debe controlar el tiempo de la exposición, usando un tiempo de extracción mas largo. Cuando el tiempo de equilibrio es demasiado largo, pueden escogerse tiempos del extracción más cortos para la cuantificación<sup>54</sup>.

1.4.1 Optimización de las condiciones de extracción. Una optimización de las condiciones de extracción modifica ciertas condiciones de sensibilidad de la extracción e indica parámetros para controlar la reproducibilidad, estos parámetros pueden usarse para perfeccionar las condiciones de extracción con un número mínimo de experimentos y para corregir las variaciones de extracción sin la necesidad de repetir la calibración en las nuevas condiciones. Por ejemplo pueden hacerse análisis de SPME al aire libre a temperatura ambiente donde puede variar las condiciones de extracción significativamente<sup>55</sup>. Las condiciones de extracción que afectan la constante de distribución (fibra/ muestra), incluyen básicamente: temperatura, pH y adición de sal.

En HS-SPME un aumento en la temperatura de extracción lleva a un aumento de concentración del analito en el headspace facilitando un tiempo de equilibrio más rápido, temperaturas elevadas pueden efectivamente disociar analitos de la matriz y los pasa al headspace para la rápida extracción del recubrimiento de la fibra, la figura 12 ilustra el aumento en la temperatura de extracción produciendo un incremento de la rata de extracción para compuestos de peso moleculares altos. Sin embargo; el aumento de temperatura produce una disminución de Kfs y pérdida de sensibilidad para especies menos volátiles<sup>56</sup>.

---

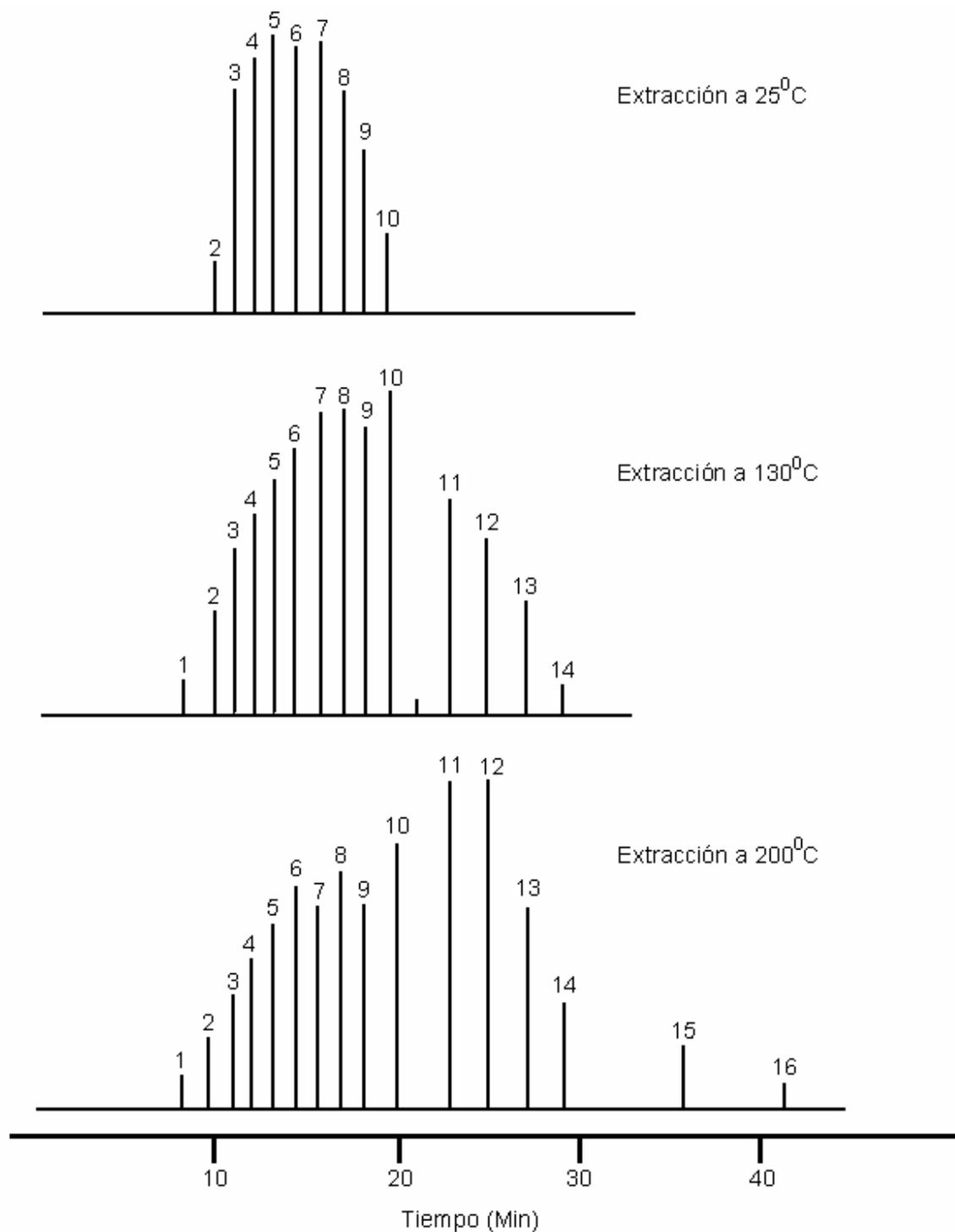
<sup>53</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p.126

<sup>54</sup> Ibid., p. 126

<sup>55</sup> Ibid., p. 127-128

<sup>56</sup> Ibid., p. 130

Figura 12. Efecto de la temperatura en la sensibilidad del método de extracción.



Fuente: PAWLISZYN Janusz

La combinación de agua con un incremento en la temperatura permite que los analitos sean liberados con mayor facilidad ya que la constante dieléctrica del agua disminuye al aumentar la temperatura y permite que los analitos pierdan solubilidad en el sistema matriz –agua y sean mas rápidamente extraídos<sup>57</sup>.

El control de pH en la muestra tiene un principio similar a la extracción con solventes, ajustando el pH de una solución acuosa cambiarán las constantes para especies disociables asumiendo que solamente la no disociación de un ácido o una base puede ser extraído desde el recubrimiento de la fibra. Yang y Peppard en la extracción de ácidos, observaron que al disminuir el pH hay una sensibilidad mas alta, al obtener la sensibilidad más alta y para la conversión de especies neutrales el pH puede por lo menos bajar dos unidades del pK de un analito dado. Para analitos básicos, el pH debe ser más grande que el pK + 2, la optimización de pH incluye verificación experimental de los resultados esperados al adicionar un buffer a la muestra modificando la matriz, donde produce cambios en la constante de distribución, el headspace es una opción para el uso del cambio de pH en una matriz porque protege el recubrimiento de la fibra<sup>58</sup>.

La adición de sal pueden aumentar o disminuir la cantidad extraída dependiendo del compuesto y la concentración salina, el efecto de la sal en SPME se determina solo por experimentación, con el 1% de sal adherida aumenta la polaridad de los analitos en la matriz e incrementando en un 30% en sensibilidad<sup>59</sup>.

---

<sup>57</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p.130

<sup>58</sup> Ibid., p. 131-132

<sup>59</sup> Ibid., p. 132-134

## 1.5 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL ANÁLISIS DE LOS ACEITES ESENCIALES.

1.5.1 Cromatografía de gases (GC). La GC es un método de separación en el cual los componentes de una mezcla se reparten entre dos fases: la fase estacionaria (líquida), que posee una superficie de exposición muy grande y la otra es la fase móvil, que es un gas inerte (helio o nitrógeno) que circula en contacto con la fase estacionaria, la muestra se vaporiza en el sistema de inyección y es transportada por el gas portador a través de la columna<sup>60</sup>. El reparto o partición de los componentes de la muestra con la fase estacionaria se basa en sus diferentes solubilidades en esta fase a una temperatura dada.<sup>61</sup>

Los analitos pasan por detectores como el detector de ionización de llama FID, detector de captura de electrones ECD, detector de nitrógeno-fósforo NPD, detector de conductividad electrolítica CED<sup>62</sup>.

1.5.2 Espectrometría de masas. La espectrometría de masas se basa en la relación de la fracción masa/carga de los iones con sus respectivas concentraciones en la corriente iónica total producidas por la ionización de las moléculas del analito en la cámara de ionización; es altamente sensible pero es un método destructivo, es rápido y permite obtener la máxima información sobre la estructura molecular con una mínima cantidad de muestra ( $10^{-6}$ - $10^{-14}$  g)<sup>63</sup>.

Usando el sistema de ionización por impacto de electrones se bombardea el compuesto vaporizado a presiones bajas ( $10^{-6}$  mmHg) con electrones que tienen elevada energía se divide la molécula en varios iones positivos y fragmentos neutros<sup>64</sup>, las masas resultantes son diferentes y presentan relaciones masa-carga. Hay que tener en cuenta que la mayoría de los iones tiene una sola carga y la separación se basa en sus masas, así se obtiene el espectro, en el cual entre mas larga sea la señal o pico significa que hay mayor cantidad de los iones de masa específica<sup>65</sup>.

---

<sup>60</sup> HOBAR, H. Willard, Métodos Instrumentales de Análisis, Wadsworth, USA. 1998 p 125

<sup>61</sup> HOBAR, H. Willard, Op. cit., p.127

<sup>62</sup> SKOOG, Douglas A., Principles of Instrumental Analysis, N.Y., Hoit, 1971. p 201

<sup>63</sup> SKOOG, Douglas A. Op., cit. p. 215

<sup>64</sup> GOTTLIEB, Richard., Introducción a la Espectrometría de Masas de Sustancias. Eva V. Washington. 1983 p. 65

<sup>65</sup> L.G.. Wade, Jr Química Orgánica, Prentice Hall, USA. 1993 p 226

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 MANEJO DE LA MATERIA PRIMA

El material vegetal fue obtenido en terrenos del kilómetro 2 vía Catambuco; este fue conservado a temperatura ambiente (aprox. 19<sup>0</sup>C) en un recipiente cerrado.

El ajo se sometió al siguiente proceso:

Se tomaron bulbos de ajo y se picaron en trozos pequeños homogéneos.

Para HS-SPME se peso 1 gramo y para DES se pesaron 25 gramos del material vegetal en balanza analítica.

Para el análisis del ajo con respecto al tiempo de almacenamiento se pesaron 100 gramos.

### 2.2 OBTENCION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL *A. Sativum* POR DES

Para la obtención de los metabolitos secundarios volátiles de *A. sativum* por DES, se utilizó como solvente diclorometano por su mayor capacidad de extracción de los analitos de la muestra estudiada, en total se emplearon 6 ml, de los cuales 5 ml se adicionaron en el balón B y 1ml en C con 5 ml de agua; se pesaron 25 gramos de material vegetal en una balanza analítica y se deposito en el balón A con 20 ml de agua, el balón A se lo sumergió en glicerina hasta que el nivel de glicerina quede por encima del nivel de la muestra con agua, para una mejor homogenización de calor dentro del balón y el balón B se lo sumergió en agua, luego se calentaron los dos balones teniendo en cuenta que la ebullición de ambos sea al mismo tiempo. Se realizaron las siguientes extracciones a diferentes tiempos así: 30, 60, 90 y 120 minutos.

Después de obtener el extracto, se deposito 1 ml en viales de 1.5 ml y el exceso de agua se elimino adicionando sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

### 2.3 OBTENCION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL *A. Sativum* POR HS-SPME

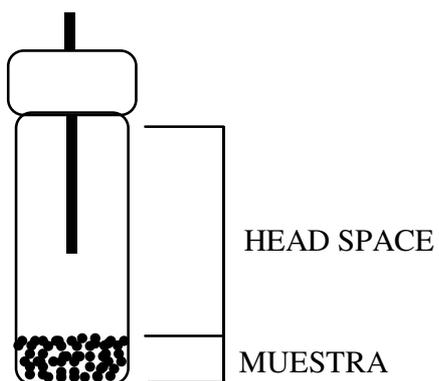
la fibra utilizada fue de polidimetilsiloxano – divinilbenceno (PDMS / DVB) de 65µ m de Supelco para compuestos volátiles

Figura 13. Montaje DES



El gramo de muestra se introdujo en un vial de 8 ml dejando el espacio para el headspace como se indica en la Figura 14.

Figura 14. Indicación de la medida del headspace en HS-SPME.



Se realizaron cuatro tratamientos cada uno por triplicado así:

- SM : Muestra a temperatura ambiente ( $19^{\circ}\text{C} \pm 1$ ).
- SMA : Muestra con agua a temperatura ambiente ( $19^{\circ}\text{C} \pm 1$ ).
- SMC : Muestra con calentamiento a  $25^{\circ}\text{C}$ .
- SMAC : Muestra con agua y calentamiento a  $25^{\circ}\text{C}$ .

Para hallar el tiempo de equilibrio a cada tratamiento se expuso la fibra de acuerdo a los siguientes tiempos: 3, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos. Se utilizó un sistema de calentamiento con control de temperatura.

Al colocar la muestra en el vial, este se tapó inmediatamente y se introdujo la fibra para la respectiva extracción.

#### 2.4 COMPORTAMIENTO DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL *A. Sativum* CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO POR HS - SPME

Después de encontrar el tratamiento de acuerdo al mejor tiempo de equilibrio se determinó el comportamiento de los metabolitos secundarios volátiles del ajo con respecto al tiempo de almacenamiento. Se depositó la muestra en un beaker controlando las condiciones de almacenamiento como la temperatura. Para realizar las extracciones con la fibra, se tomó 1g de muestra de 100 g de muestra inicial ubicados en el beaker en los siguientes tiempos: 0(t0), 10(t1), 20(t2), 30(t3), 70(t4), 100(t5) y 130(t6) horas. Cada uno por triplicado.

#### 2.5 ANÁLISIS POR GC DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS *A. sativum*

Se analizaron las muestras en un cromatógrafo de gases SHIMADZU GC-17a equipado con detectores de ionización en llama (FID) y de captura de electrones (ECD), inyectores split/splitless y se operó bajo las siguientes condiciones:

- Inyector split/splitless,  $250^{\circ}\text{C}$ , relación split 2 : 20.
- Detector de ionización en llama,  $250^{\circ}\text{C}$ .
- Detector de captura de electrones,  $250^{\circ}\text{C}$ .

El material de la fibra tiene condiciones similares al de la columna cromatográfica por esta razón se cuantificó utilizando una columna capilar de silica fundida de MDN-5 con una longitud de 30 m y un diámetro interno de 0.25 mm, cubierta con una película de 0.25  $\mu\text{m}$  de espesor de fase estacionaria y para cualificar se utilizó una columna capilar de Carbowax de longitud 30 m y un diámetro interno de 0.25 mm por referencia literaria de los Ik.

La programación de temperatura en el horno fue de 40°C por 10 min. @ 3°C/1min a 100°C, @ 2°C/1min a 160°C @ 10°C/1min a 250°C por 6 min. Para los dos métodos de extracción utilizados.

Los parámetros utilizados para la corrida cromatográfica fueron los siguientes:

Flujo óptimo: se determinó que el flujo óptimo fue de 1ml/min tomado como referencia del trabajo de investigación: Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis Hooker filius* realizado por Gómez D y Moran M<sup>66</sup>.

Nivel mínimo de detección: el valor mínimo de detección fue de 0.8 ppm.

Nivel mínimo de cuantificación: el valor fue de 3.8 ppm<sup>67</sup>.

Figura 15. Montaje HS – SPME en Cromatografía de Gases



---

<sup>66</sup> GOMEZ, D. Moran, M. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis Hoorker filius*. Trabajo de grado San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2005. p.128

<sup>67</sup> GOMEZ, D. Moran, Op., cit. p.128

2.5.1 Análisis Cualitativo de los Metabolitos Secundarios Volátiles de los Bulbos *A. Sativum*. Los índices de Kovats ( $I_k$ ) son una herramienta para la identificación de compuestos definido por E. Kovats como la medida de retención relativa como estándar de referencia; para un compuesto el  $I_k$  es cien veces su número de átomos de carbono<sup>68</sup>.

Para condiciones isotérmicas los tiempos de retención aumentan exponencialmente con el número de carbonos como lo indica la Ecuación 2. Cuando se utiliza temperatura programada los tiempos de retención aumentan linealmente con el número de átomos de carbono y se calculan los índices por interpolación lineal. Como se muestra en la Ecuación 3<sup>69</sup>.

$$I_k = 100 * n + 100 * \frac{\text{Log } t_{R_x} - \text{Log } t_{R_n}}{\text{Log } t_{R_N} - \text{Log } t_{R_n}} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$I_k = 100 * n + 100 * \frac{t_{R_x} - t_{R_n}}{t_{R_N} - t_{R_n}} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde:

$I_k$  : Índice de Kovats.

X : Analito problema.

n : Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye antes de X.

N : Número de átomos de carbono del n-alcano que eluye después de X.

$t_{R_x}$  : Tiempo de retención ajustado del analito X.

$t_{R_n}$  : Tiempo de retención ajustado del n-alcano que eluye antes que X.

$t_{R_N}$  : Tiempo de retención del n-alcano que eluye después de X.

---

<sup>68</sup> HOBAR, H. Willard, Op. cit., p.127

<sup>69</sup> HOBAR, H. Willard, Op. cit., p.129

2.5.2 Análisis Cuantitativo de los Metabolitos Secundarios Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum*. Para la cuantificación por DES y semicuantificación por HS-SPME se utilizó n-tetradecano como estándar interno ISTD y se realizó la respectiva curva de calibración para obtener el factor de respuesta (Rf). Para cada método de extracción se prepararon soluciones de estándar a partir de una solución Stock de 100 ppm así: 0.5, 1, 5, 10, 20 y 50 ppm, se corrieron por triplicado por DES y por HS-SPME.

Para HS-SPME se expuso la fibra a una solución de diclorometano con n-tetradecano.

En DES se utilizó la siguiente Ecuación<sup>70</sup>:

$$Cx = \frac{Ax}{Rf} \times \frac{Vf}{Wx} \quad \text{Ecuación 4}$$

donde:

Cx : Concentración del compuesto de interés (mg/Kg de material vegetal).

Ax : Área cromatográfica del compuesto de interés (cuentas).

Rf : Factor de respuesta del estándar interno (cuentas\*L/mg).

Vf : Volumen final del extracto (L).

Wx : Peso de la muestra tomado (Kg).

En HS-SPME el analito se distribuye en tres fases: Muestra/headspace, headspace/fibra y fibra/muestra, por lo que es necesario hallar las constantes de distribución de los analitos para su semicuantificación. Como el cálculo de índices de Kovats requiere una operación cromatográfica isotérmica, los compuestos pueden ser estudiados en una corrida y existiendo una relación entre la constante de distribución del analito entre la fibra y la fase gaseosa (Kfg) y los tiempos de retención de los analitos, Kfg se puede calcular con la Ecuación 5.<sup>71</sup>

$$\text{Log } Kfg = 0.00415 \times Ik - 0.188 \quad \text{Ecuación 5}$$

---

<sup>70</sup> SERRANO. Martín. Op.cit., p 45

<sup>71</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p.126

Esta ecuación se puede utilizar si el material de la fibra tiene condiciones similares al material de la columna cromatográfica, en este caso PDMS y MDN-5 respectivamente.  $K_{fg}$  es igual a  $K_{fh}$  ( constante de distribución del analito entre la fibra y el headspace)<sup>72</sup>.

Si la cantidad del analito extraído dentro de la fibra es relativamente pequeño a la cantidad del analito contenido en el headspace, la cantidad del analito requerido será transferido desde la matriz sólida o acuosa al headspace en el mismo orden de magnitud como el error experimental. Con estas condiciones el resultado es una extracción rápida<sup>73</sup>.

Estas condiciones puede ser representada en la Ecuación 6:

$$\frac{K_{fs} V_f}{K_{hs} V_h} = \frac{E}{100} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde:

- $K_{fs}$  : Constante de distribución del analito entre la fibra y la muestra.
- $K_{hs}$  : Constante de distribución del analito entre el headspace y la muestra.
- $V_f$  : Volumen de la fibra.
- $V_h$  : Volumen del headspace.
- $E$  : Error experimental.

Si tenemos que:

$$K_{fs} = \frac{K_{fh}}{K_{hs}} \quad \text{Ecuación 7}$$

despejamos  $K_{fs}$  y la sustituimos en la Ecuación 6 obtenemos<sup>74</sup>:

$$\frac{K_{fh} V_f}{K_{hs}^2 V_h} = \frac{E}{100} \quad \text{Ecuación 8}$$

---

<sup>72</sup> PAWLISZYN Janusz. Op.cit., p.126

<sup>73</sup> Ibid., p. 128

<sup>74</sup> Ibid., p. 128

despejamos Khs y encontramos Kfs utilizando la Ecuación 7.

Para hallar la cantidad del analito extraído por la fibra se utiliza la siguiente ecuación y tenemos:

$$n = \frac{Ax}{Rf} \times Vf \quad \text{Ecuación 9}$$

donde:

- n : Cantidad del analito extraído por la fibra (mg).
- Ax : Área cromatográfica del compuesto de interés (cuentas).
- Rf : Factor de respuesta del estándar interno (cuentas\*L/mg).
- Vf : Volumen de la fibra. ( $4.52 \times 10^{-7}$  L)

Con Kfs y n hallados calculamos la concentración inicial del analito en la muestra, utilizando la Ecuación 1, como el resultado da en mg/L hacemos una conversión a mg/Kg, multiplicando por el volumen de la muestra y dividiendo por la cantidad de la muestra.

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en las corridas cromatográficas tanto en concentración, áreas y para las curvas de calibración con n-tetradecano y se analizó la reproducibilidad de los datos mediante la desviación estándar; Ecuación 10 y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV); Ecuación 11<sup>75</sup>.

$$S = \sqrt{\sum_i \frac{(x_i - \bar{X})^2}{n - 1}} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\% CV = \left( \frac{\sigma}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

---

<sup>75</sup> HUBER, L. Buenas Practicas de Laboratorio y Buenas Practicas de Fabricación actuales, Miami: HEWLETT PACKARD COMPANY, 1994. p. 160

## 2.6 ANALISIS POR GC-MS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS *A. sativum*

Para el análisis por GC-MS se solicitó la colaboración de la Universidad del Valle, donde se analizó la muestra en un equipo GC-MS Hewlett Packard el cual está equipado con una columna capilar HP-5 y biblioteca Wiley 275L, con un detector selectivo de masas con sistema de ionización por impacto de electrones de 70 eV y un analizador másico cuadrupolar.

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 3.1 ANALISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DEL EXTRACTO DEL *A. sativum* POR GC. EXTRAIDOS POR DES.

Los extractos obtenidos de los bulbos del *A. sativum* por DES a diferentes tiempos de extracción como lo indica la tabla 4 y se analizaron por GC empleando detectores FID y ECD.

Tabla 4. Tratamientos aplicados para la extracción de metabolitos secundarios volátiles del *A. sativum* por DES.

TRATAMIENTO	TIEMPO DE EXTRACCIÓN (min)	SOLVENTE
T1	30	Diclorometano
T2	60	Diclorometano
T3	90	Diclorometano
T4	120	Diclorometano

Utilizando la Ecuación 3 y con los tiempos de retención de los analitos y una mezcla de parafinas (referenciadas en el Anexo A) en columna MDN-5 se cuantificó, se identificó compuestos representativos con sus espectros de masas obtenidos por GC-MS reportados en la sección 3.2

Las corridas cromatográficas en los diferentes tiempos de extracción se representan en las Figuras 16, 17, 18 y 19.

Se identificó 20 compuestos en el aroma de los bulbos del *A. Sativum* en el extracto obtenido por DES ver Tabla 5.

Tabla 5. Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* extraído por DES

PICO	$t_R$ MDN-5	COMPUESTO	Ik
1	4.30	N.I	653
2	4.72	DIMETIL DISULFURO	680
3	6.65	N.I	735
4	7.60	DIALILSULFURO	756
5	12.42	N.I	862
6	14.55	(Z) 1- PROPENILMETILDISULFURO	867
7	16.53	METILALILDISULFURO	890
8	18.89	N.I.	927
9	22.88	DIMETILTRISULFURO	983
10	26.25	PROPILALILDISULFURO	1034
11	27.21	3- METILTIOPROPANAL	1049
12	28.61	(Z) 1-PROPENILALILDISULFURO	1071
13	29.01	Dialildisulfuro	1077
14	29.90	(E) 1- PROPENILALILDISULFURO	1091
15	30.31	1,2- DITIACICLOPENTAN-3-ENE	1098
16	32.56	METILPROPILTRISULFURO	1133
17	35.70	METILALILTRISULFURO	1182
18	39.92	Aliltiopropanal	1246
19	45.09	PROPILALILTRISULFURO	1324
20	45.72	3-VINIL-4H -1,2-DITIINO	1333
21	47.49	N.I	1359
22	49.52	Dialiltrisulfuro	1380
23	53.28	2-VINIL-4H-1,3-DITIINO	1445
24	55.23	2-TRIDECANONA	1474
25	59.62	DIALILTETRASULFURO	1546

N.I. compuesto no identificado.

La identificación de los compuestos es tentativa como la reportada en la fuente literaria (Fuente, Sum Min Kin, Effect of soybean Oil on Garlic Volatile Compounds Isolated by Distillation. J Agric. Food Chem.1995,43, 449-452).

Figura 16. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T1 (30 minutos) obtenido por DES.

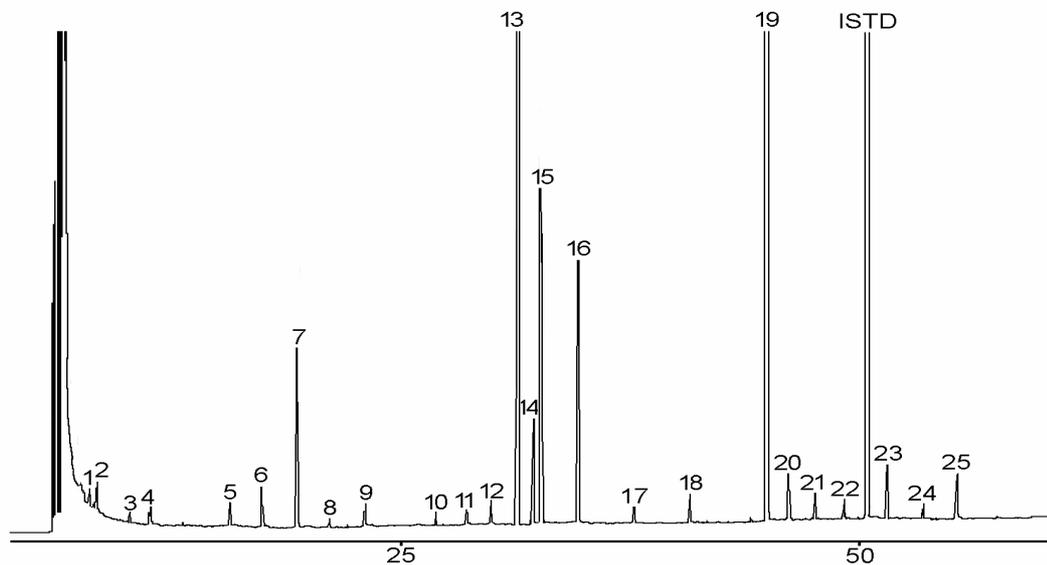


Figura 17. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T2 (60 minutos) obtenido por DES.

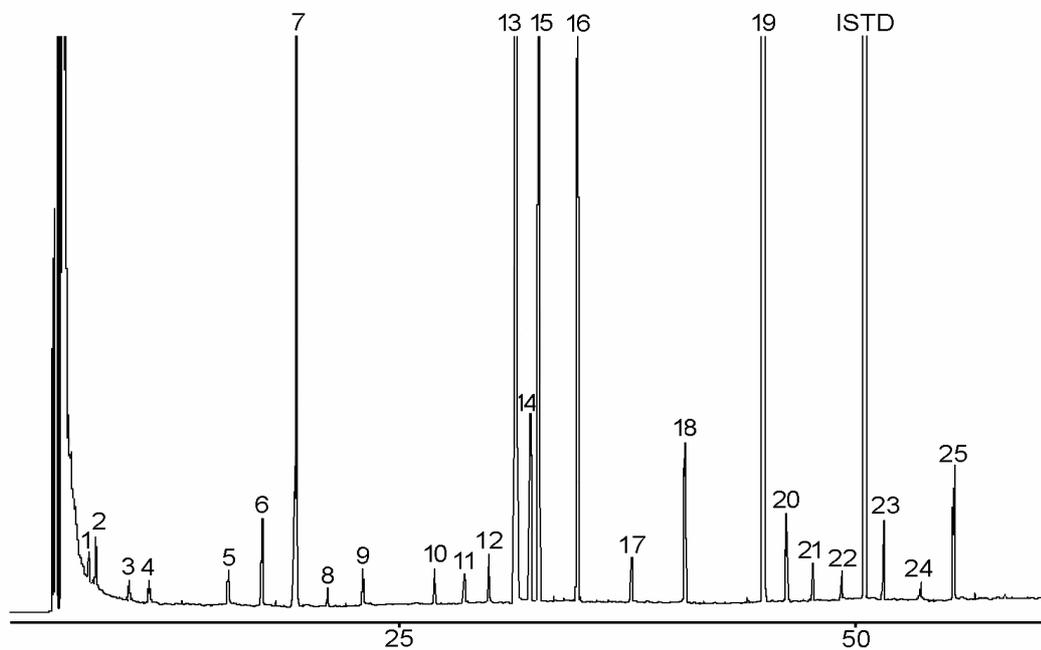


Figura 18. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T3 (90 minutos) obtenido por DES.

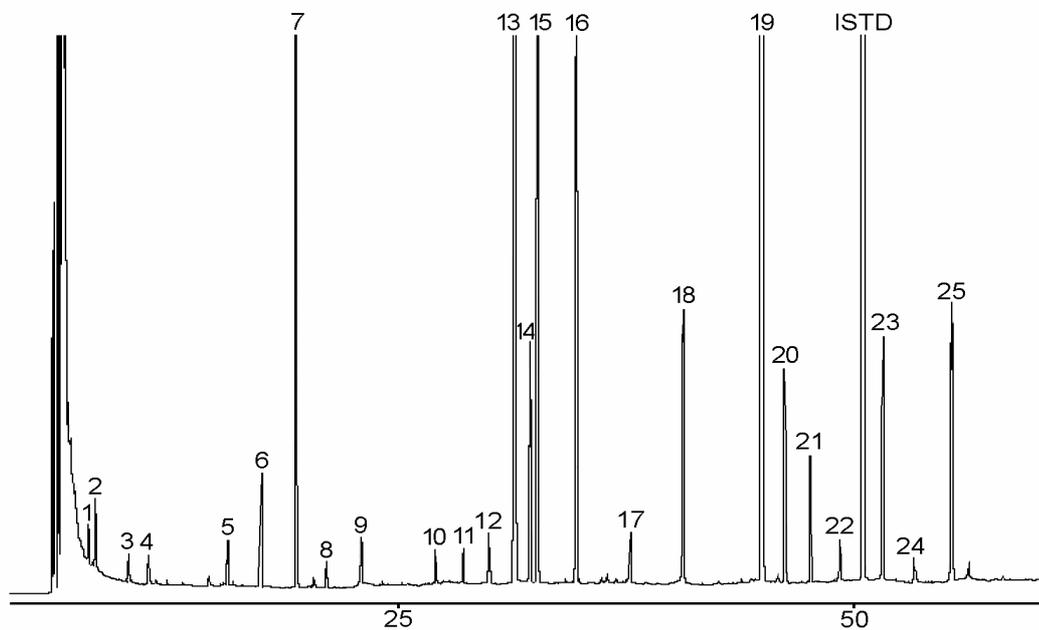
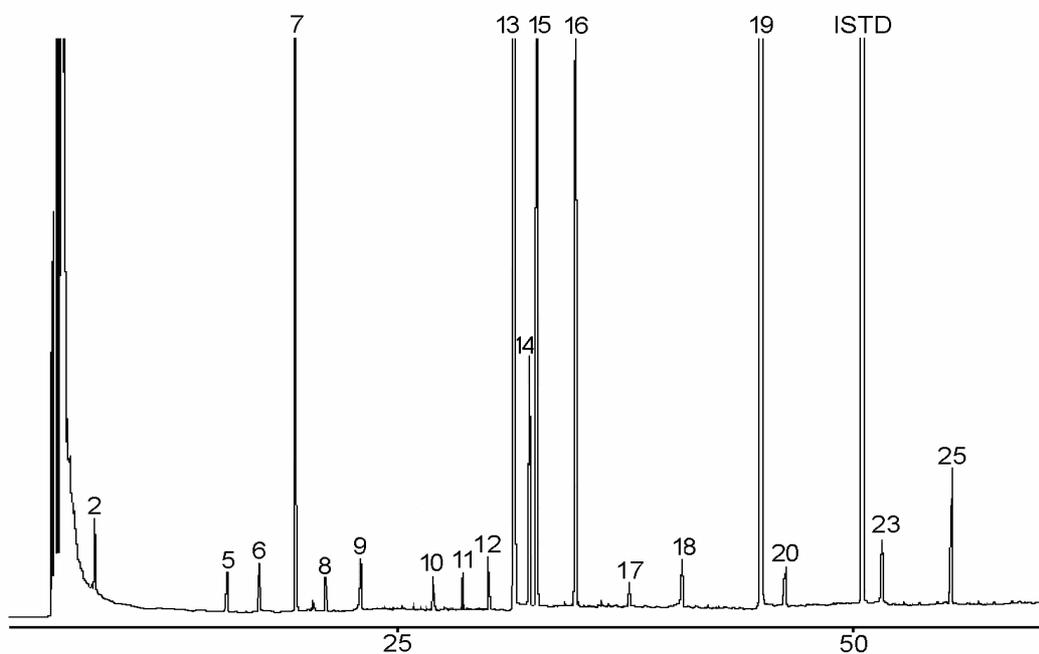


Figura 19. Perfil cromatográfico por GC-FID del tratamiento T4 (120 minutos) obtenido por DES.



Los compuestos 1 (N.I.), 3 (N.I.), 4 (Dialilsulfuro), 21(N.I.), 22 (Dialiltrisulfuro) y 24 (N.I.) en el tratamiento T4 no son extraídos como se observa en la figura 19; en las figuras 16, 17 y 18 correspondientes a los tratamientos T1, T2 y T3 respectivamente, la cantidad de picos son iguales, encontrándose solamente diferencia en las intensidades.

Con los resultados de los cuatro tratamientos se realizó el respectivo análisis de varianza con respecto al número de compuestos extraídos. En las Tablas 6, 7 y 8 se indica el respectivo análisis. Las ecuaciones se muestran en el Anexo D.

Tabla 6. Datos del número de compuestos extraídos por cada tratamiento.

REPETICIONES	T1	T2	T3	T4
1	25	25	25	20
2	25	25	25	19
3	25	25	25	19
$\Sigma$	75	75	75	58
Promedio	25	25	25	19

Tabla 7. ANDEVA para el numero de compuestos extraídos por DES.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	72.25	24.08	301	7.59
Error	8	0.65	0.08		
Total	11	72.9			

El valor en el 99% de confianza de la F tabulada es menor que el valor de F calculada, indicando que existe diferencia significativa entre los tratamientos por el numero de compuestos extraídos, se hace necesario aplicar una prueba de comparaciones con el fin de determinar que tratamientos son diferentes entre si.

Tabla 8. Prueba de TUKEY para el numero de compuestos extraídos por DES.

	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
	25	25	25	19
T <sub>4</sub> 19	6*	6*	6*	----
T <sub>3</sub> 25	----	----	----	----
T <sub>2</sub> 25	----	----		
T <sub>1</sub> 25	----			

El valor de 0.92 obtenido en el comparador de TUKEY al 99% de confianza, indica que hay ligamentos entre los tratamientos T1, T2 y T3, es decir que cualquiera de

estos tres tratamientos se pueden utilizar para la extracción de analitos volátiles; teniendo en cuenta que los tratamientos dependen del tiempo de extracción por lo tanto se establece el tratamiento T1(30 min) como el mas adecuado por su tiempo mínimo de extracción.

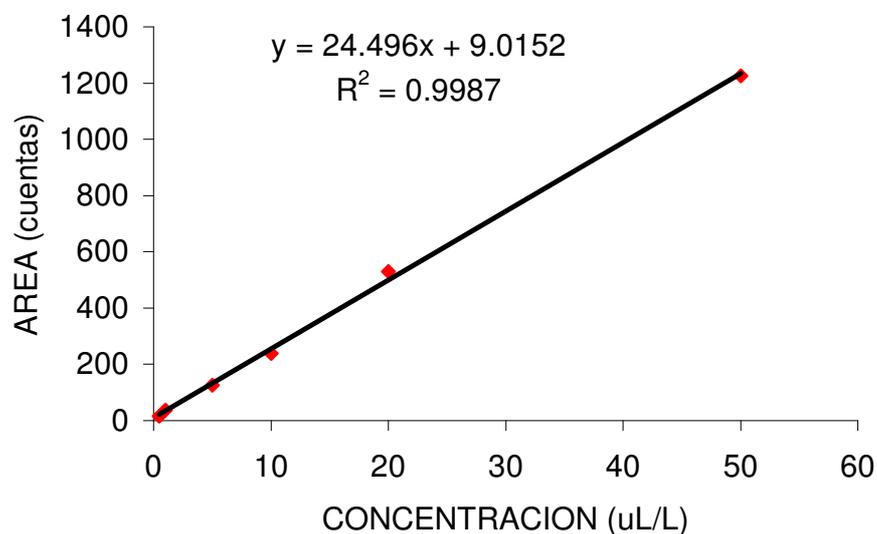
3.1.1 Cuantificación de los metabolitos secundarios del *a. sativum* extraídos por DES. Con las soluciones del estándar n-tetradecano descritas en la sección 2.5.2 se realizó una curva de calibración para encontrar el respectivo factor de respuesta. Utilizando los datos de la tabla 9 se realizó la curva para la cuantificación indicada en la Grafica 1.

Tabla 9. Datos de áreas cromatográficas de n-tetradecano para la curva de cuantificación para DES

CONCENTRACIÓN ml/L	ÁREA (CUENTAS)	ÁREA PROMEDIO	S	%CV
0.5	17	17	0.58	3.41
	16			
	17			
1	38	39	1.15	2.95
	38			
	40			
5	125	125	2.00	1.60
	127			
	123			
10	241	239	1.53	0.64
	239			
	238			
20	530	530	1.53	0.29
	531			
	528			
50	1226	1225	5.03	0.41
	1230			
	1220			

Los coeficientes de variación son una estimación del error relativo que permite comparar la precisión de los resultados; en la tabla 9 se indica que son menores que el 5% como lo recomienda las buenas practicas de laboratorio indicando que el método es altamente reproducible.

Grafico 1. Determinación del factor de respuesta para DES.



El valor de la pendiente obtenido es de 24,496 correspondiente al factor de respuesta, para la corrección de este valor se utilizó la densidad del n-tetradecano (0.763 g/ml), obteniendo así un valor del factor de respuesta de 32,10 cuentas L / mg para la cuantificación de los analitos volátiles de los bulbos del *A. Sativum*, utilizando la Ecuación 4 se obtuvieron las respectivas concentraciones de los analitos extraídos en los diferentes tratamientos y son reportados en la Tabla 10.

Los compuestos mayoritarios identificados en los extractos de los tratamiento T1, T2, T3 y T4 fueron el dialildisulfuro (4.13 - 8.70 - 12.41 - 19.91 ppm), propilaliltrisulfuro (2.29 - 4.36 - 6.12 - 6.64 ppm).

Los compuestos que tuvieron baja concentración fueron el dimetildisulfuro (0.027 – 0.057 – 0.10 – 0.11 ppm), dialilsulfuro (0.015 – 0.029 – 0.060 ppm), dimetiltrisulfuro (0.028 – 0.059 – 0.11 – 0.13 ppm), propilalildisulfuro (0.016 – 0.051 – 0.89 – 0.98 ppm), 3 – metiltiopropanal (0.022 – 0.048 – 0.088 – 0.10 pmm), (z)- 1-propenilalildisulfuro (0.032 – 0.070 – 0.12 – 0.13pmm), metilaliltrisulfuro (0.01 – 0.08 – 0.12 – 0.13 pmm), 2-tridecanona (0.023 – 0.038 – 0.090 pmm), en los tratamientos T1, T2, T3 y T4 respectivamente.

Tabla 10. Concentración de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* obtenidos por DES

PICO	COMPUESTO	Ik MDN-5	CONCENTRACIÓN (mg/Kg)			
			T1	T2	T3	T4
1	N.I.	656	0.013	0.028	0.061	-----
2	DIMETIL DISULFURO	680	0.027	0.057	0.10	0.11
3	N.I.	735	0.012	0.028	0.060	-----
4	DIALILSULFURO	756	0.015	0.029	0.060	-----
5	N.I.	862	0.039	0.066	0.092	0.10
6	(Z) 1- PROPENILMETILDISULFURO	867	0.084	0.17	0.24	0.25
7	METILALILDISULFURO	890	0.433	0.91	1.21	1.37
8	N.I.	927	0.011	0.024	0.056	0.069
9	DIMETILTRISULFURO	983	0.028	0.059	0.11	0.13
10	PROPILALILDISULFURO	1034	0.016	0.051	0.089	0.098
11	3- METILTIOPROPANAL	1049	0.022	0.048	0.088	0.10
12	(Z) 1-PROPENILALILDISULFURO	1071	0.032	0.070	0.12	0.13
13	DIALILDISULFURO	1077	4.13	8.70	12.41	12.91
14	(E) 1- PROPENILALILDISULFURO	1091	0.15	0.32	0.41	0.42
15	1,2- DITIACICLOPENTAN-3-ENE	1098	0.71	1.50	2.67	2.86
16	METILPROPILTRISULFURO	1133	0.52	1.11	1.97	2.16
17	METILALILTRISULFURO	1182	0.01	0.080	0.12	0.13
18	ALILTIOPROPANAL	1246	0.068	0.29	0.47	0.49
19	PROPILALILTRISULFURO	1324	2.29	4.36	6.12	6.64
20	3-VINIL-4H-1,2-DITIINO	1333	0.088	0.18	0.35	0.36
21	N.I.	1359	0.056	0.069	0.24	-----
22	DIALILTRISULFURO	1389	0.038	0.046	0.19	-----
23	2-VINIL-4H-1,3-DITIINO	1445	0.11	0.15	0.44	0.45
24	2-TRIDECANONA	1474	0.023	0.038	0.090	-----
25	DIALILTETRASULFURO	1546	0.098	0.22	0.49	0.62

N.I. compuesto no identificado.

Tabla 11. Andeva para la concentración de los compuestos del A.E. de los bulbos del *A. Sativum* extraídos por DES.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F calculada	F tabulada
Tratamientos	3	1495955	498652	8.60	7.59
Error Experimental EE	8	298	58066		
Error de Muestreo EM	216	13006438			
Total	227	14502690			

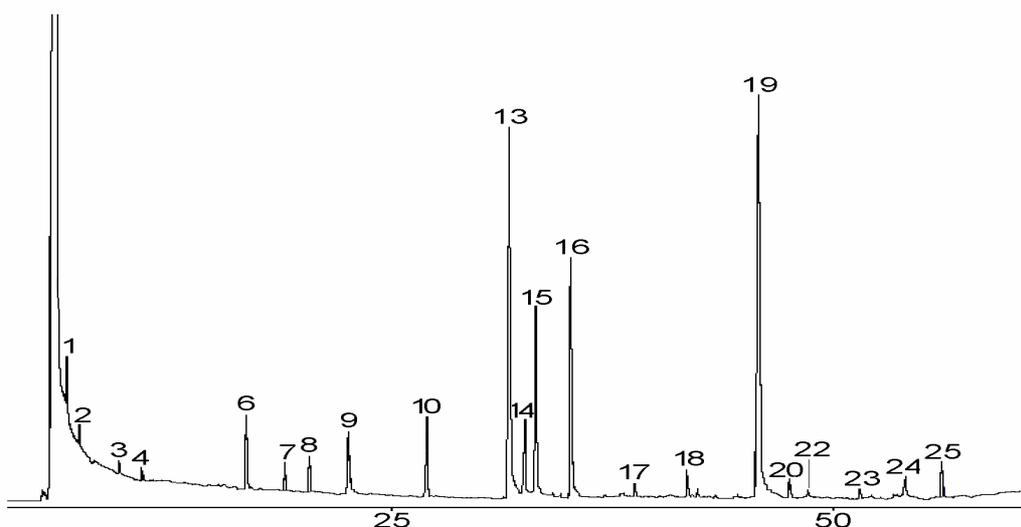
En la tabla 11 la Andeva nos indica que la F. Calculada es mayor que la F. Tabulada al 99% de confianza, lo que nos indica que existen diferencias significativas entre los cuatro tratamientos, por lo tanto es necesario aplicar una prueba de significación estadística que nos determine cual es el mejor tratamiento para la mayor concentración de los compuestos extraídos por DES.

Tabla 12. Prueba de TUKEY para la concentración de los compuestos extraídos por DES.

	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
	890.88	2746.34	4553.35	4651
T <sub>4</sub> 651	3760.12	1904.66	97.65	-----
T <sub>3</sub> 4553.35	3662.47	1807.01	-----	
T <sub>2</sub> 2746.34	1855.46	-----		
T <sub>1</sub> 890.88	-----			

El valor obtenido del comparador de TUKEY al 99% de confianza en la Tabla 12, el cual es de 783.26, nos indica que hay ligamentos entre los tratamientos T3 y T4, es decir que cualquiera de estos dos tratamientos se pueden utilizar para la extracción de analitos volátiles. Por consiguiente, teniendo en cuenta el diseño para el numero de compuestos y el diseño para las concentraciones de los compuestos se concluye que el tratamiento T3 es el mas adecuado. Para reforzar el análisis de compuestos sulfurados se realizo una corrida con detector ECD indicada en la Figura 20.

Figura 20. Perfil cromatográfico por GC-ECD del tratamiento T3 (90 minutos) obtenido por DES



### 3.2. DETERMINACION DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS COMPONENTES VOLATILES DEL *A. sativum* POR GC-MS

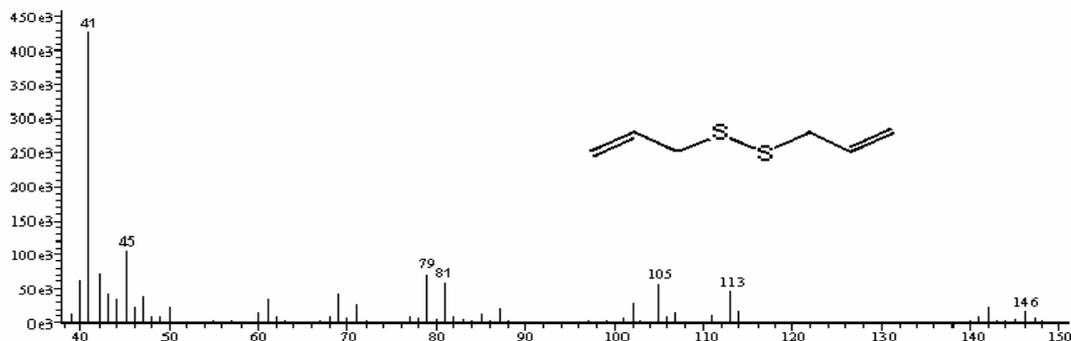
Con la colaboración de la Universidad del Valle se identificaron 8 compuestos utilizando la misma programación cromatográfica referenciada en el punto 2.5 del trabajo. En los espectros de masas de los compuestos sulfoalilicos se presentan posibles fragmentaciones alilicas identificadas por el fragmento en m/z 41 y un posible reordenamiento de la molécula observando un fragmento representativo en m/z 45.

Tabla 13. Iones característicos en los espectros de masas de compuestos identificados en los extractos de *A. Sativum*.

COMPUESTO	PESO MOLECULAR	ESPECTRO DE MASAS m/z
METILALILDISULFURO	120	41, 45, 79, 120
PROPILALILDISULFURO	148	41, 43, 45, 64, 75, 106, 148
DIALILDISULFURO	146	41, 45, 79, 81, 105, 113, 146
3-VINIL-(4H)-1,2-DITIINO	144	45, 71, 72, 97, 103, 111, 144
DIALILTRISULFURO	178	41, 45, 73, 74, 113, 178
2-VINIL-(4H)-1,3-DITIINO	144	45, 71, 72, 103, 111, 144
2-TRIDECANONA	198	43, 55, 58, 59, 71, 198
DIALILTETRASULFURO	210	41, 45, 73, 79, 105, 146, 210

Figura 21. Espectro de masas del DIALILDISULFURO

$t_R$  29.03



El pico base en m/z 41 se forma a partir del ion molecular en m/z 146, como se indica en las posibles rutas de fragmentación de la Figura 22.

Figura 22. Posibles rutas de fragmentación del DIALILDISULFURO

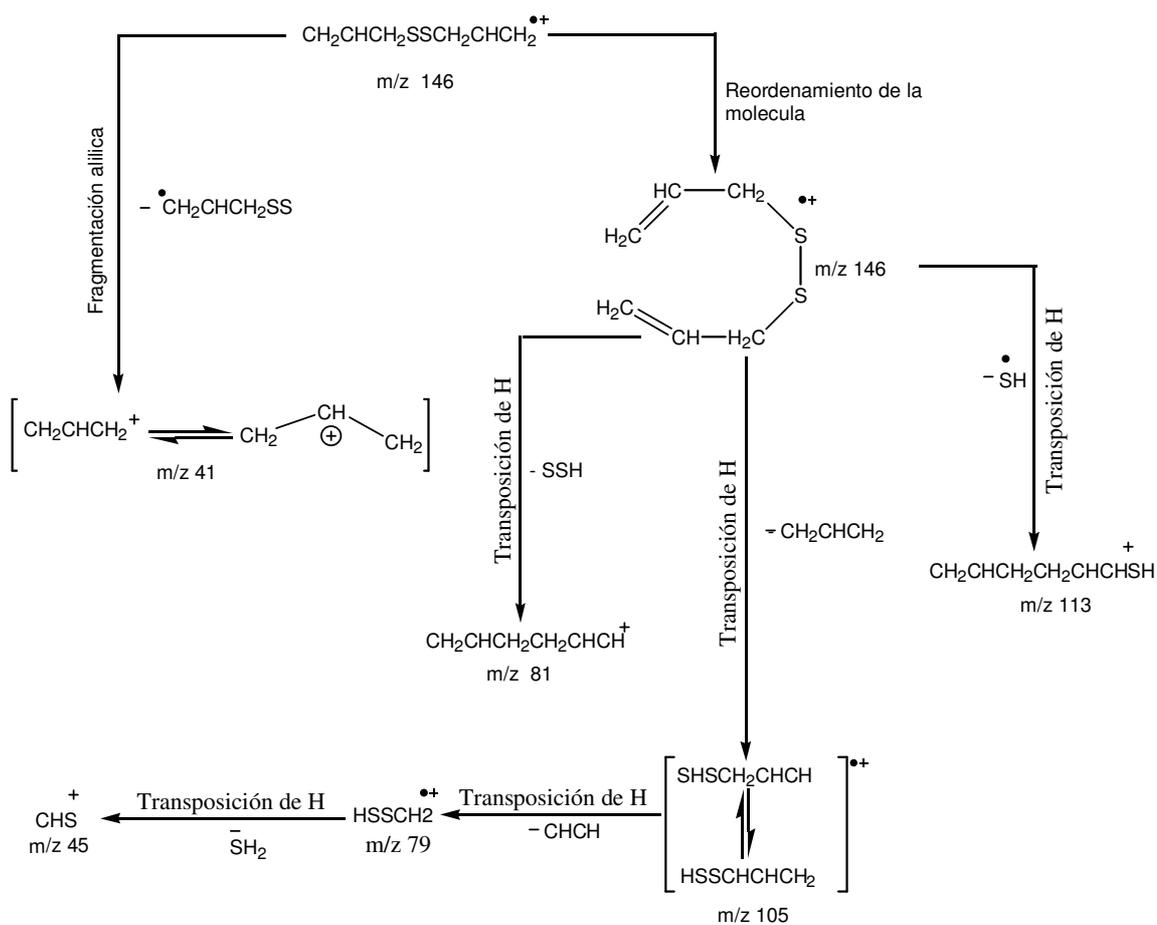
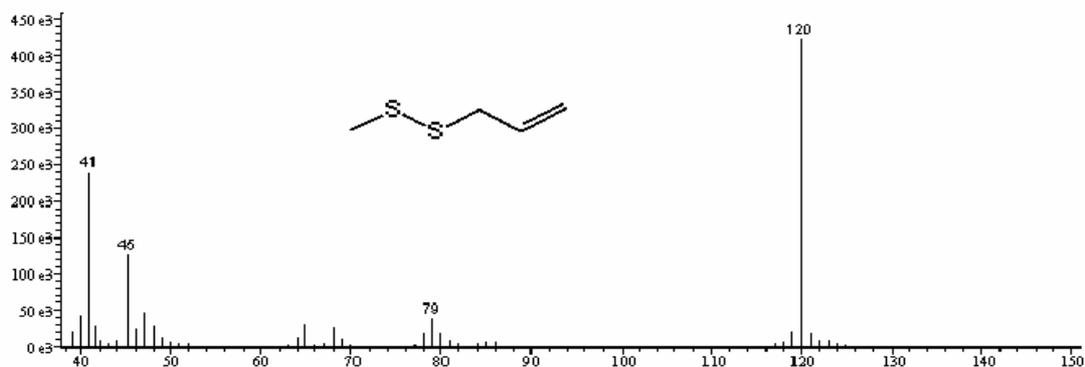


Figura 23. Espectro de masas del METILALILDISULFURO

$t_R$  16.55



El pico base es el ion molecular en m/z 120, como se indica en las posibles rutas de fragmentación de la Figura 24.

Figura 24. Posibles rutas de fragmentación del METILALILDISULFURO

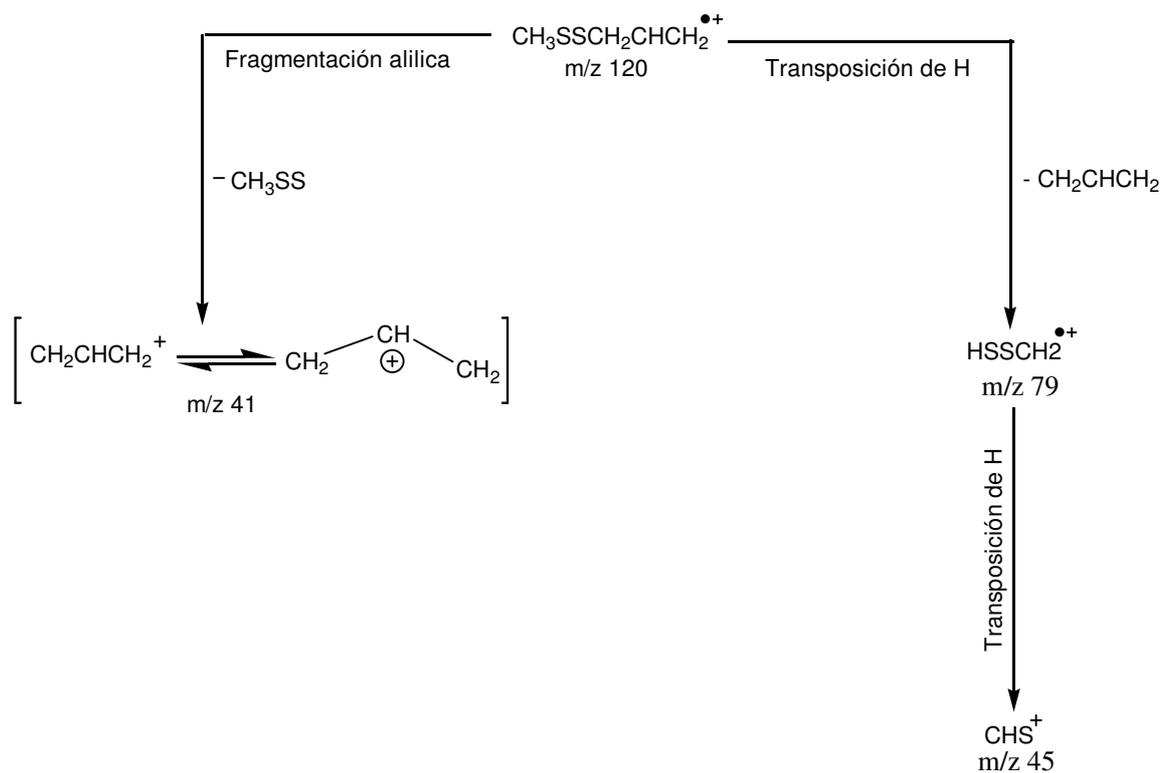
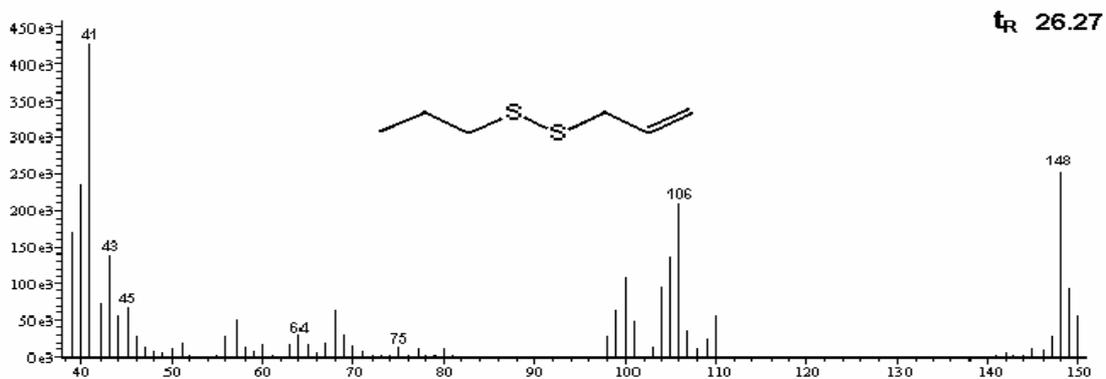


Figura 25. Espectro de masas del PROPILALILDISULFURO



El pico base se presenta en m/z 41 que se forma a partir del ion molecular en m/z 148, como se muestra en las posibles rutas de fragmentación de la Figura 26.

Figura 26. Posibles rutas de fragmentación del PROPILALILDISULFURO

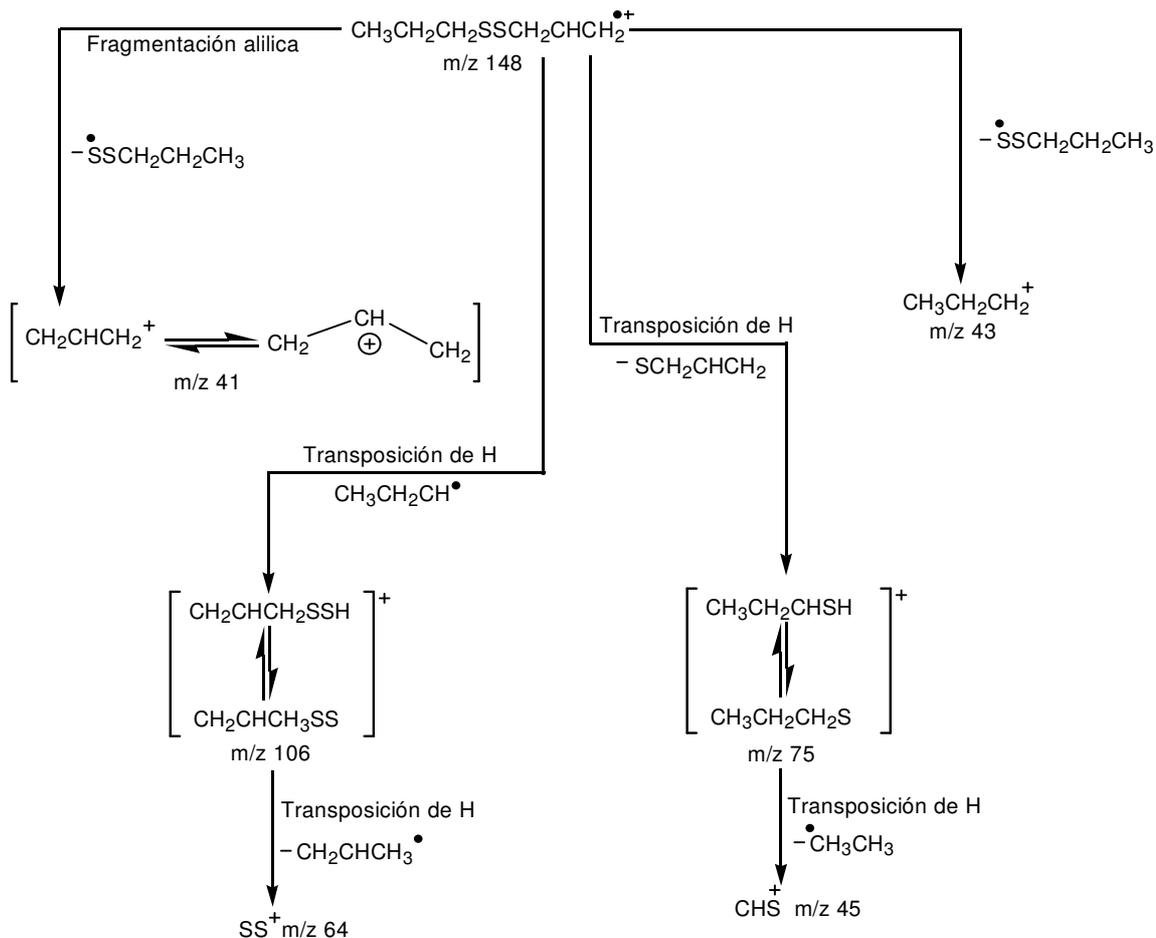
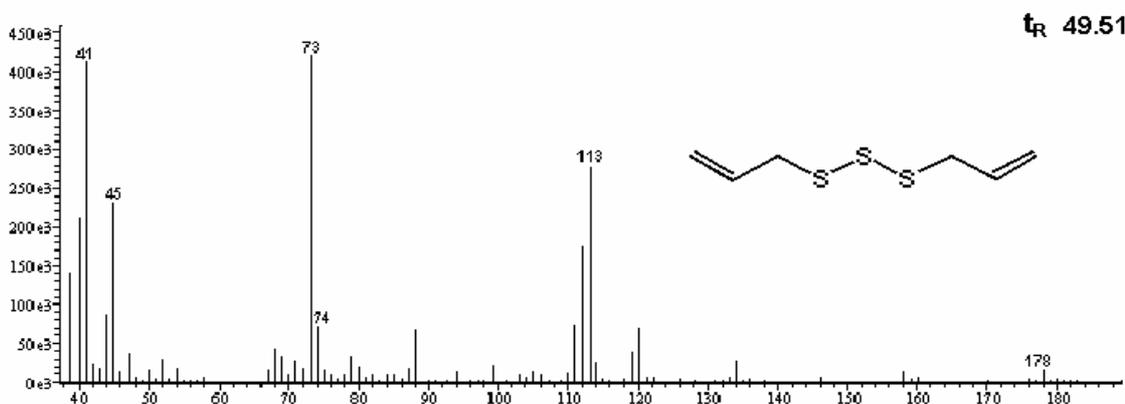


Figura 27. Espectro de masas del DIALILTRISULFURO



El pico base se presenta en m/z 73 y se forma a partir del ion molecular en m/z 178, como se muestra en las posibles rutas de fragmentación de la Figura 28.

Figura 28. Posibles rutas de fragmentación del DIALILTRISULFURO

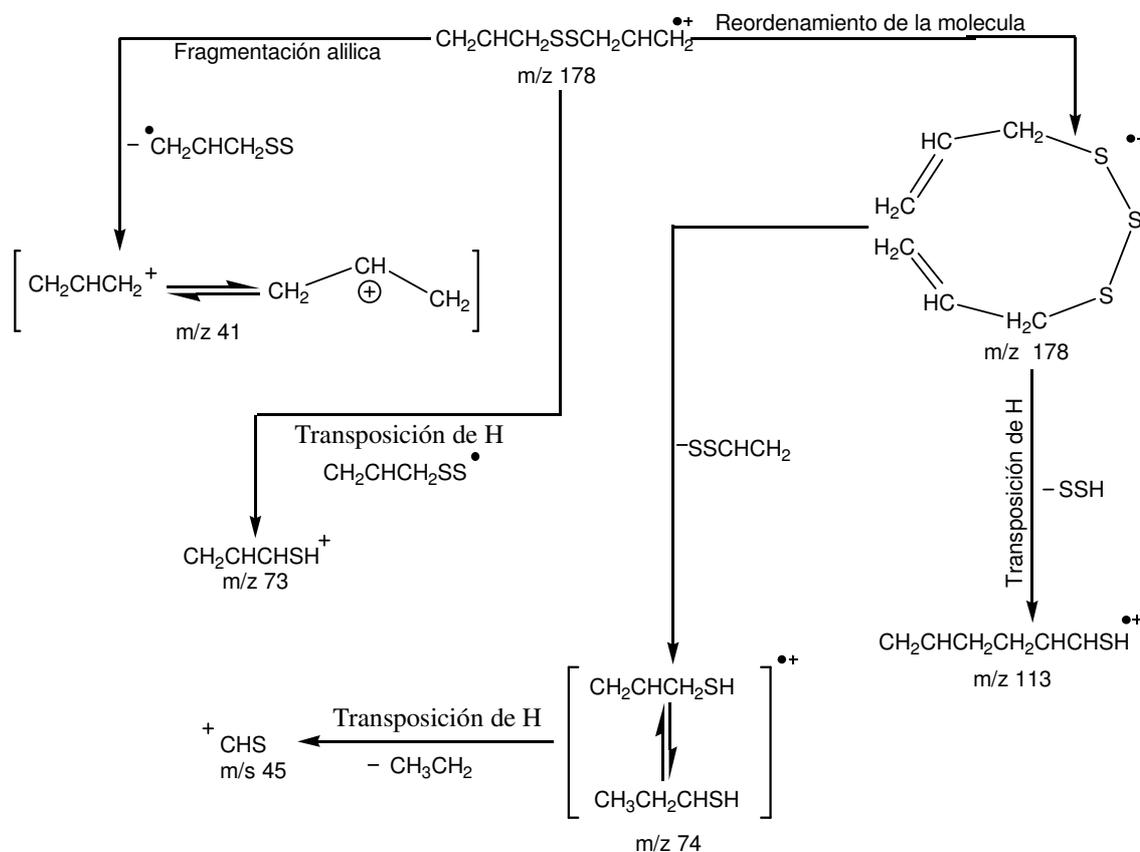
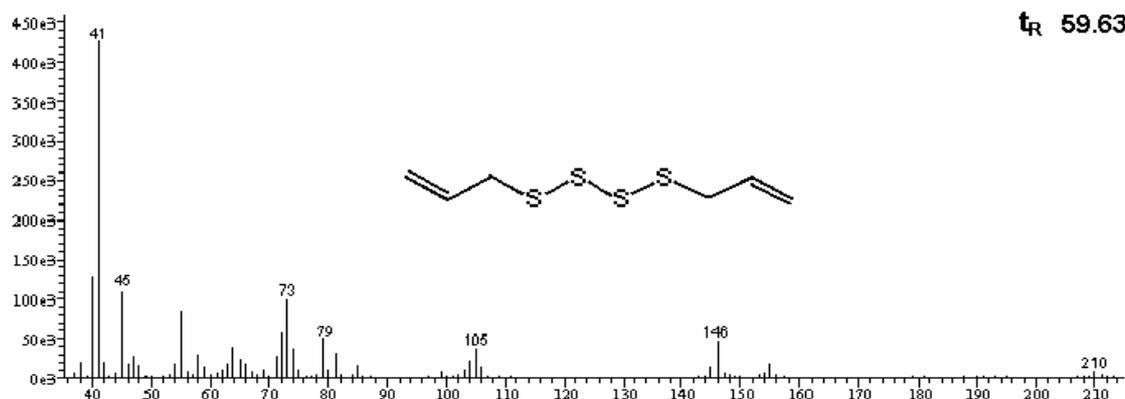
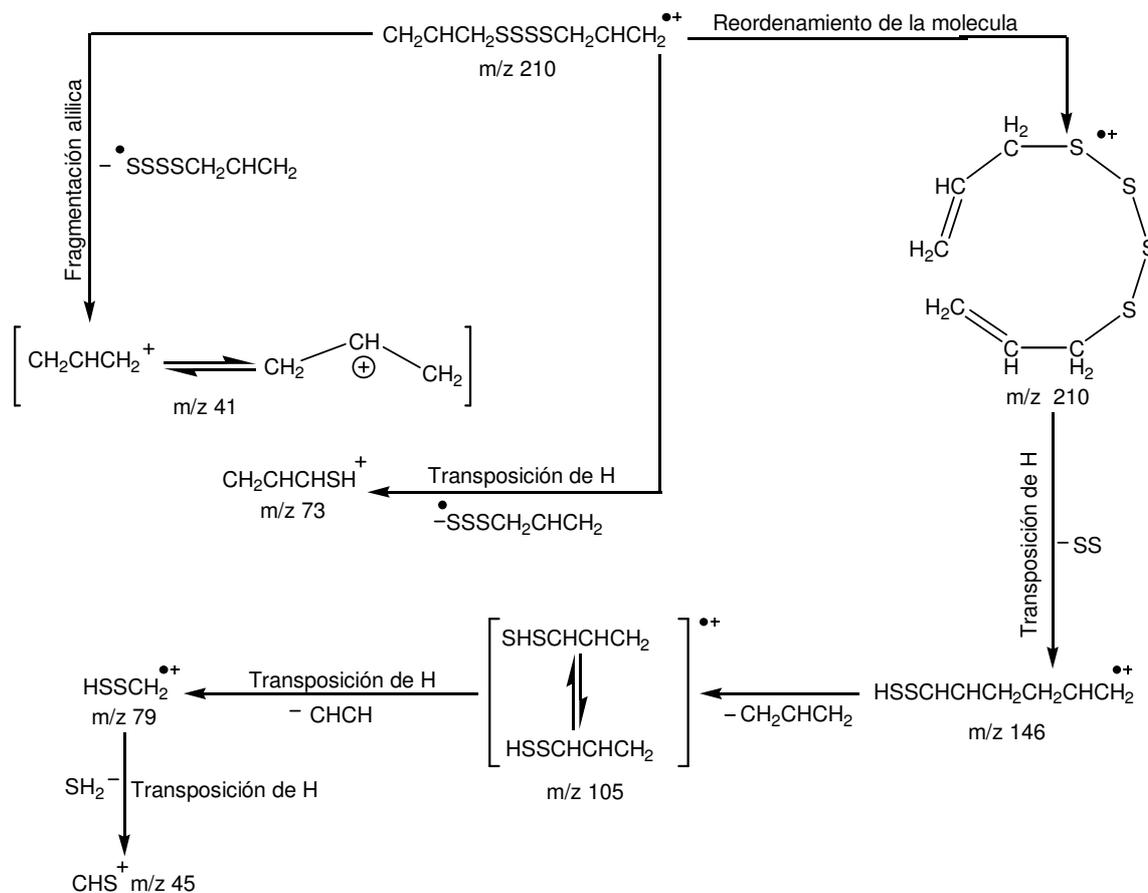


Figura 29. Espectro de masas del DIALILTETRASULFURO



El pico base se presenta en  $m/z$  41 y se forma a partir del ion molecular en  $m/z$  210, como se muestra en las posibles rutas de fragmentación de la Figura 30.

Figura 30. Posibles rutas de fragmentación del DIALILTETRASULFURO



### 3.3 ANALISIS DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DEL EXTRACTO DEL *A. sativum* POR GC. EXTRAIDOS POR HS - SPME.

3.3.1 Tiempo de Desorción. Se determino el tiempo de desorción teniendo en cuenta dos aspectos; la liberación rápida de los analitos de la fibra y el tiempo de limpieza de la fibra. El tiempo de desorción se estableció a diez minutos (10 min), verificando la total desorción de los analitos de la fibra.

3.3.2 Tiempo de exposición. De acuerdo al tiempo de exposición y optimización de las condiciones de extracción en cada tratamiento, se obtuvieron tiempos de equilibrio tomando como referencia dos analitos volátiles representativos de acuerdo con sus intensidades en los cromatógramas; los cuales son el compuesto (13) DIALILDISULFURO y el compuesto (22) DIALILTRISULFURO referenciados en la Tabla 13.

Con los dos compuestos se obtuvieron los datos de las áreas en los tiempos 3, 5, 10, 20, 30 y 40 minutos y se hallaron los tiempos de equilibrio para cada tratamiento indicados en la Tabla 15 y la respectiva reproducibilidad de las áreas en el tiempo de equilibrio para cada tratamiento indicada en la Tabla 16.

La identificación cualitativa se obtuvo a partir de la mezcla de parafinas que se muestran en el Anexo C y utilizando la ecuación 3.

Tabla 14. Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* extraído por HS - SPME

PICO	t <sub>R</sub> carbowax	COMPUESTO	Ik*	Ik**
2	12.88	DIMETIL DISULFURO	1076	1078
4	14.56	DIALILSULFURO	1151	1149
6	19.30	(Z) 1- PROPENILMETILDISULFURO	1263	1267
7	20.98	METILALILDISULFURO	1285	1280
8	21.72	N.I.	1290	-----
9	28.87	DIMETILTRISULFURO	1378	1380
10	32.23	PROPILALILDISULFURO	1430	1428
11	33.01	3- METILTIOPROPANAL	1452	1450
12	34.02	(Z) 1-PROPENILALILDISULFURO	1468	1464
13	35.66	DIALILDISULFURO	1482	1480
14	36.32	(E) 1- PROPENILALILDISULFURO	1488	1485
15	37.59	1,2- DITIACICLOPENTAN-3-ENE	1493	1490
16	39.70	METILPROPILTRISULFURO	1525	1523
17	45.16	METILALILTRISULFURO	1592	1587
18	47.82	ALILTIOPROPANAL	1641	1644
19	49.54	PROPILALILTRISULFURO	1725	1723
20	51.10	3-VINIL-4H -1,2-DITIINO	1736	1731
22	53.37	DIALILTRISULFURO	1780	1784

N.I. compuesto no identifica

Ik\* índice de Kovats experimental.

Ik\*\* índice de Kovats reportado en literatura.

La identificación de los compuestos es tentativa como lo reportada en la fuente literaria (Fuente, Sum Min Kin, Effect of soybean Oil on Garlic Volatile Compounds Isolated by Distillation. J Agric. Food Chem.1995,43, 449-452).

Tabla 15. Datos de dos compuestos principales Volátiles de los bulbos del *A. Sativum* obtenidos por HS - SPME para los cuatro tratamientos.

PICO	COMPUESTO	I <sub>k</sub> MDN-5	TIEMPO DE EXPOSICIÓN (min)	AREA PROMEDIO (CUENTAS)			
				TRATAMIENTOS			
				SM	SMA	SMC	SMCA
13	DIALILDISULFURO	1077	3	60038	60115	66305	124645
			5	80548	80558	79574	144267
			10	102453	102664	170229	216265
			20	133091	133085	178606	210417
			30	163321	162543	178217	199213
			40	162814	162585	178315	106330
22	DIALILTRISULFURO	1389	3	19679	19627	8557	1014
			5	32146	32143	19327	1519
			10	42675	42657	26839	2609
			20	49623	57224	38524	3911
			30	57225	60340	38518	4011
			40	57327	60279	38521	3905

Tabla 16. Reproducibilidad de Áreas de los dos compuestos principales Volátiles de los bulbos del *A. Sativum* en los tiempos de equilibrio de cada tratamiento.

PICO	COMPUESTO	Ik	TRATAMIENTO	TIEMPO DE EQUILIBRIO (MIN)	AREA (CUENTAS)	AREA PROMEDIO	S	%CV
			SM	30	163320 163317 163325	163321	4.06	$2.48 \cdot 10^{-3}$
13	DIALILDISULFURO	1077	SMA	30	162540 162548 162542	162543	4.18	$2.57 \cdot 10^{-3}$
			SMC	20	178604 178608 178605	178606	2.14	$1.20 \cdot 10^{-3}$
			SM	30	57223 57228 57225	57225	2.52	$4.40 \cdot 10^{-3}$
22	DIALILTRISULFURO	1389	SMA	30	60342 60338 60339	60340	2.09	$3.46 \cdot 10^{-3}$
			SMC	20	38521 38529 38521	38524	4.62	0.012

Grafico 2. Comportamiento del compuesto DIALILDISULFURO en los cuatro tratamientos

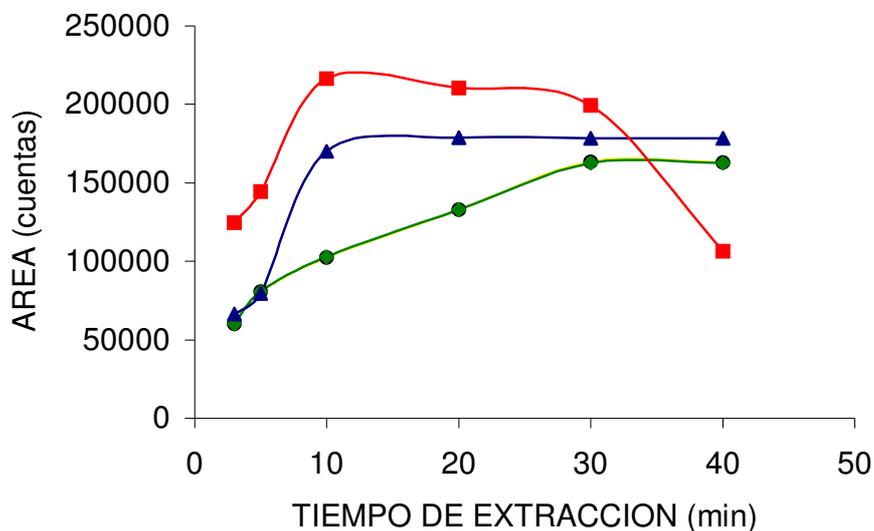
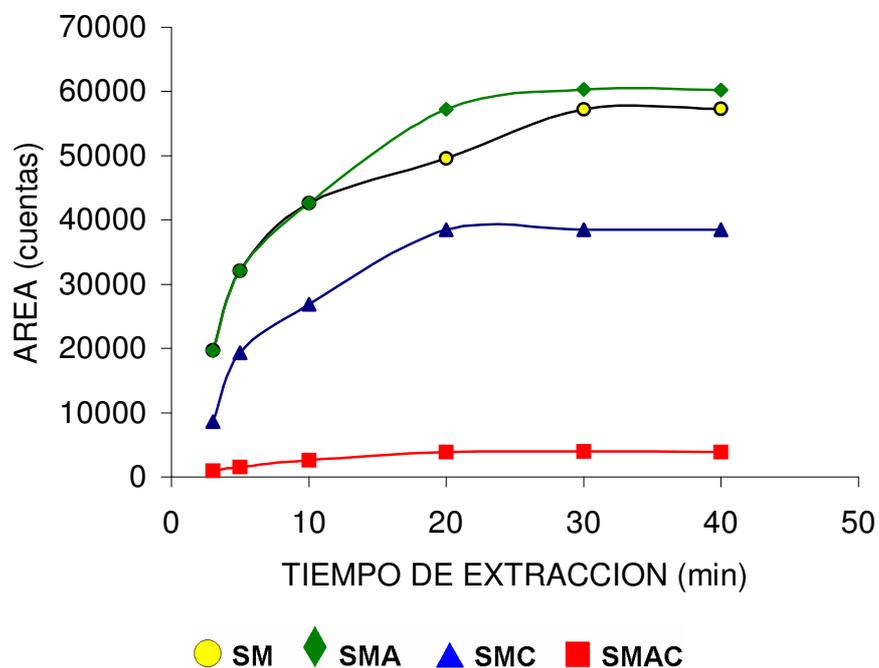


Grafico 3. Comportamiento del compuesto DIALITRISULFURO en los cuatro tratamientos



En las graficas 2 y 3 las curvas nos indican que el tiempo de equilibrio para el tratamiento SM es de 30 minutos y el comportamiento de los analitos extraídos por la fibra es similar.

En el tratamiento SMA el agua es un aditivo eficaz para facilitar la liberación de analitos desde la matriz; en este caso no hubo un efecto por el agua ya que el sistema era estático; teniendo en cuenta que un sistema de agitación posibilitaría la homogenización de la muestra sólida en el agua y no se contaba con un sistema adecuado para la agitación, los resultados obtenidos son similares al tratamiento SM y el tiempo de equilibrio es de 30 minutos.

En el tratamiento SMC la temperatura utilizada fue de 25<sup>0</sup>C ya que al aumentar la temperatura a mas de 25<sup>0</sup>C disminuye la constante de distribución (fibra/muestra) de los analitos afectando negativamente la sensibilidad del método; para esta investigación en este tratamiento se obtuvo un tiempo de equilibrio de 20 minutos.

En el tratamiento SMCA se obtuvieron resultados en intensidad de área altos, esto se debe a que al incrementar la temperatura en el sistema muestra-agua, disminuye rápidamente la constante dieléctrica del agua pero no uniformemente en la matriz debido a la no homogenización del sistema muestra-agua con un sistema dinámico como la agitación. Es decir, que este método de HS-SPME estático no es eficaz para hallar un tiempo de equilibrio menor que el del tratamiento SMC, por lo cual este tratamiento no es aplicable.

Los perfiles cromatográficos de los componentes volátiles de los bulbos del *A. Sativum* obtenidos por HS-SPME se indican a continuación en las Figuras 31, 32 y 33.

Figura 31. Perfil Cromatográfico del tratamiento SM por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 30 minutos.

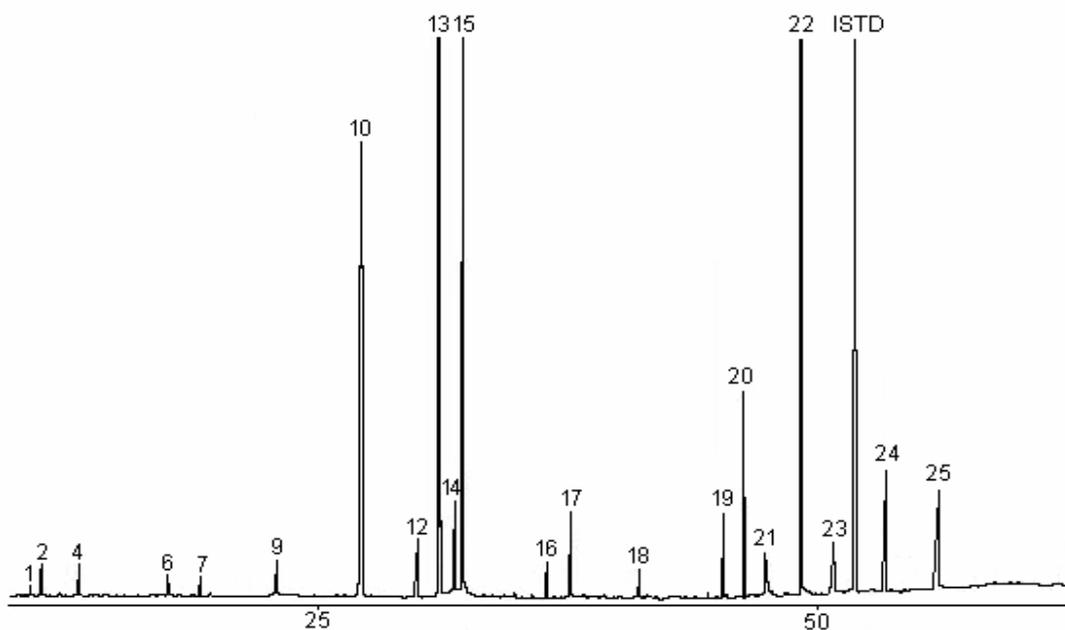


Figura 32. Perfil Cromatográfico del tratamiento SMA por GC-FID de Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 30 minutos.

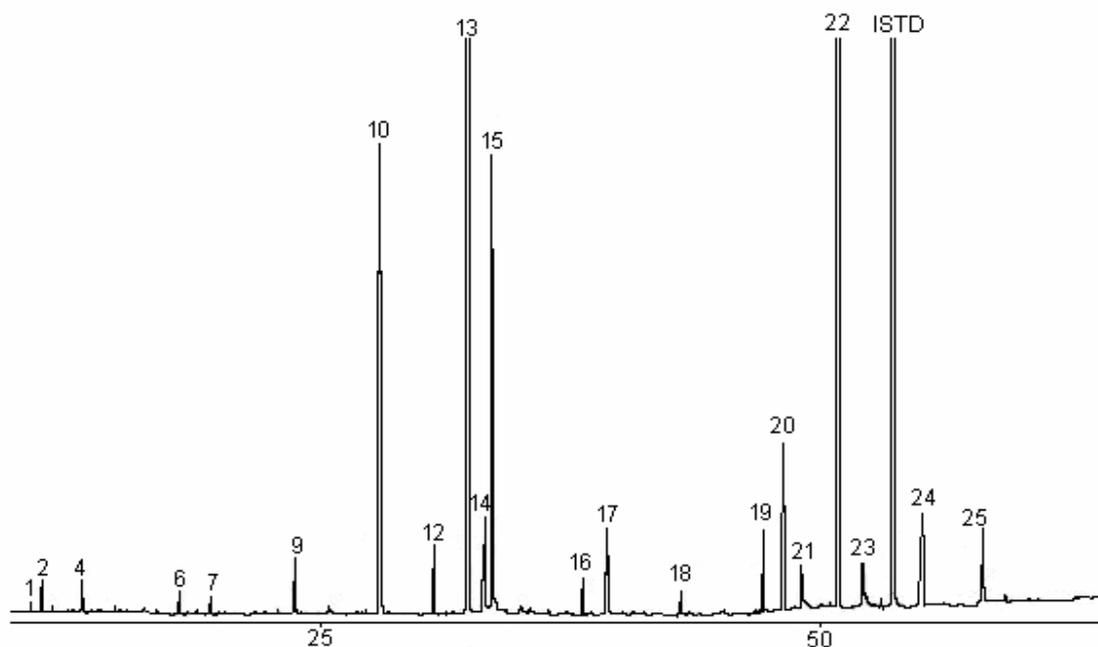
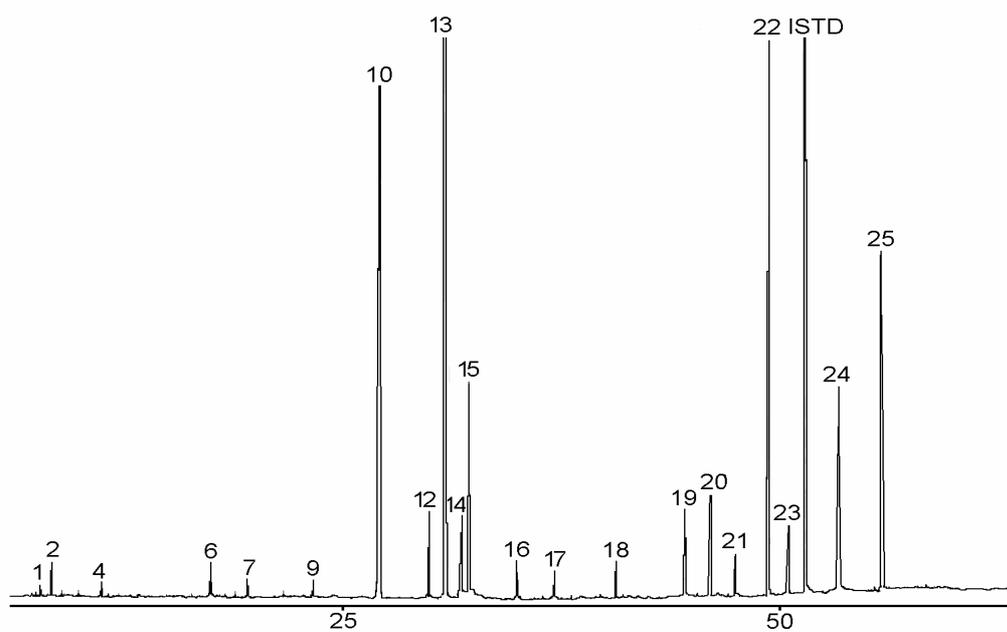


Figura 33. Perfil Cromatográfico del tratamiento SMCA por GC-FID de los Componentes de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos.



En la figura 34 se muestra el cromatograma para la cualificación de los compuestos extraídos por HS-SPME y para reforzar el análisis de compuestos sulfurados se realizo una corrida con detector ECD que se indica en la figura 35.

Figura 34. Perfil cromatográfico por GC-FID/Carbowax obtenido por HS-SPME en el tratamiento SMC con tiempo de equilibrio de 30 minutos.

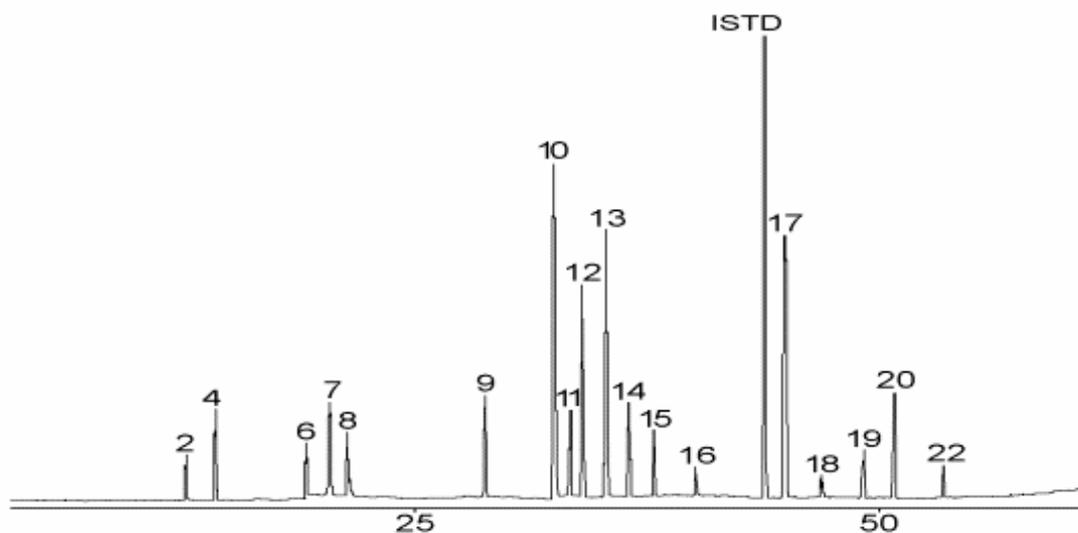
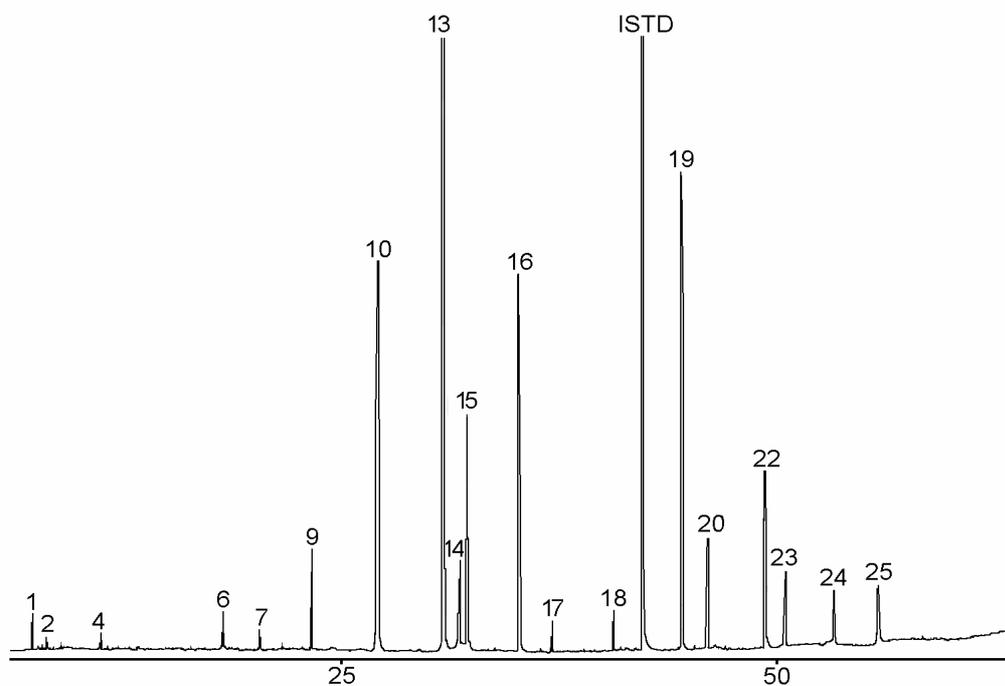


Figura 35. Perfil cromatográfico por GC-ECD obtenido por HS-SPME en el tratamiento SMC con tiempo de equilibrio de 30 minutos.



Con el perfil cromatográfico de la figura 35 se demuestra que la mayoría de los compuestos son azufrados, ya que el azufre presenta en su estructura electrones libres que son susceptibles de analizarlos por el detector ECD.

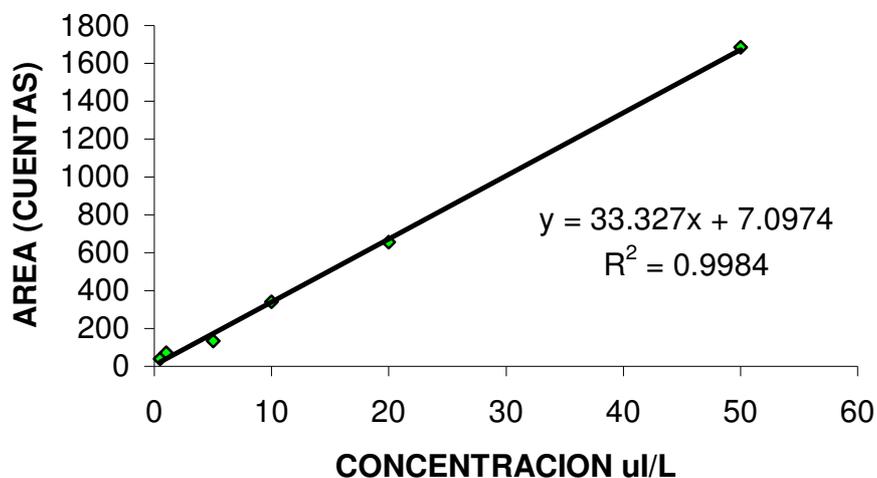
### 3.4 SEMICUANTIFICACION DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS VOLATILES DE LOS BULBOS DEL *A. Sativum* OBTENIDOS POR HS-SPME

Con los datos de la tabla 14 el mejor tratamiento es el SMC (muestra con calentamiento a 25<sup>0</sup>C). Con base en este tratamiento se pasaron muestras patrón n-tetradecano de 0.3, 1, 5 y 10 ppm, a partir de una solución stock de 100 ppm y se obtuvo la curva de semicuantificación mostrada en la grafica 4. Para semicuantificación se utilizó la columna MDN-5, los datos se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Datos de áreas cromatográficas de n-tetradecano para la curva de semicuantificación para HS-SPME.

CONCENTRACIÓN μ/L	ÁREA (CUENTAS)	ÁREA PROMEDIO	S	%CV
0.5	40	40	0.6	1.5
	41			
	40			
1	71	71	1	1.4
	72			
	70			
5	136	135	0.6	0.44
	135			
	135			
10	339	340	1	0.29
	341			
	340			
20	653	655	1.53	0.23
	655			
	656			
50	1683	1684	1	0.06
	1685			
	1684			

Grafico 4. Determinación del factor de respuesta para HS - SPME.



En el Grafico 4 el valor de la pendiente obtenido es de 33.327 correspondiente al factor de respuesta, para la corrección de este valor se utilizó la densidad del n-tetradecano (0.763 g/ml), obteniendo así un valor del factor de respuesta de 43.67 cuentas L / mg para la semicuantificación de los analitos volátiles de los bulbos del *A. Sativum*, los valores de concentración obtenidos se indican en Tabla 18.

Tabla 18. Semicuantificación de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* obtenidos por HS – SPME en el tratamiento SMC con tiempo de equilibrio de 30 minutos.

PICO	COMPUESTO	Ik MDN-5	Kfs	CONCENTRACIÓN (mg/Kg)
1	N.I.	655	575	$1.20 \cdot 10^{-2}$
2	DIMETIL DISULFURO	678	639	$2.80 \cdot 10^{-2}$
4	DIALILSULFURO	755	928	$7 \cdot 10^{-3}$
6	(Z) 1-PROPENILMETILDISULFURO	866	1581	$1.30 \cdot 10^{-2}$
7	METILALILDISULFURO	893	1791	$9 \cdot 10^{-3}$
9	DIMETILTRISULFURO	982	2745	$7 \cdot 10^{-3}$
10	PROPILALILDISULFURO	1033	3508	0.566
12	(Z) 1- PROPENILALILDISULFURO	1070	4179	$2.20 \cdot 10^{-2}$
13	DIALILDISULFURO	1077	4326	3.518
14	(E) 1- PROPENILALILDISULFURO	1091	4622	$2 \cdot 10^{-2}$
15	1,2-DITIACICLOPENTAN-3-ENE	1097	4754	0.726
16	METILPROPILTRISULFURO	1132	5625	$6 \cdot 10^{-3}$
17	METILALILTRISULFURO	1182	7145	$4 \cdot 10^{-3}$
18	ALILTIOPROPANAL	1246	9691	$5 \cdot 10^{-3}$
19	PROPILALILTRISULFURO	1324	14068	$1.5 \cdot 10^{-2}$
20	3-VINIL-4H-1,2-DITIINO	1334	14761	$1.6 \cdot 10^{-2}$
21	N.I.	1359	16630	$5 \cdot 10^{-3}$
22	DIALILTRISULFURO	1389	19196	$2.3 \cdot 10^{-2}$
23	2-VINIL-4H-1,3-DITIINO	1445	25090	$5 \cdot 10^{-3}$
24	2-TRIDECANONA	1473	28674	$2 \cdot 10^{-2}$
25	DIALILTETRASULFURO	1545	40454	$4.4 \cdot 10^{-2}$

### 3.5 COMPORTAMIENTO CON RESPECTO AL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO DE LOS COMPONENTES VOLATILES DE LOS BULBOS DEL *A. Sativum* ANALIZADOS POR HS – SPME.

Al determinar que el mejor tratamiento para la extracción de los analitos volátiles del *A. Sativum* es el SMC con tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25<sup>0</sup>C, se hicieron las respectivas extracciones de los componentes volátiles de los bulbos

del *A. Sativum* por HS-SPME a los tiempos 10(t1), 20(t2), 30(t3), 70(t4), 100(t5) y 130(t6) horas de almacenamiento; los cromatogramas obtenidos de estas extracciones se representan en las Figuras 36 a 41.

Figura 36. Perfil Cromatográfico de t1 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25°C al cabo de 10 horas de almacenamiento.

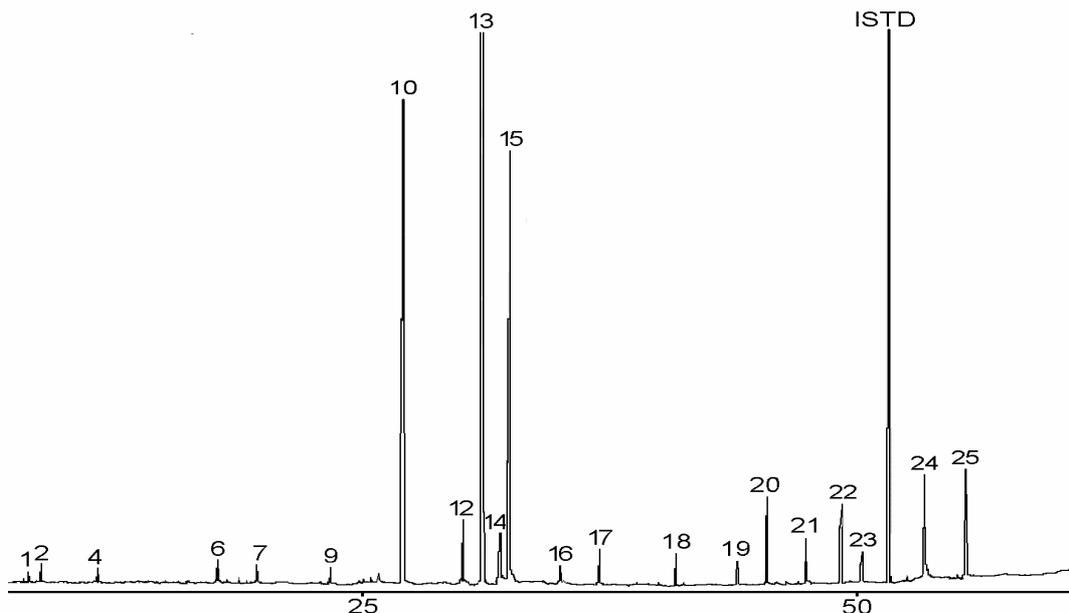


Figura 37. Perfil Cromatográfico de t2 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25°C al cabo de 20 horas de almacenamiento.

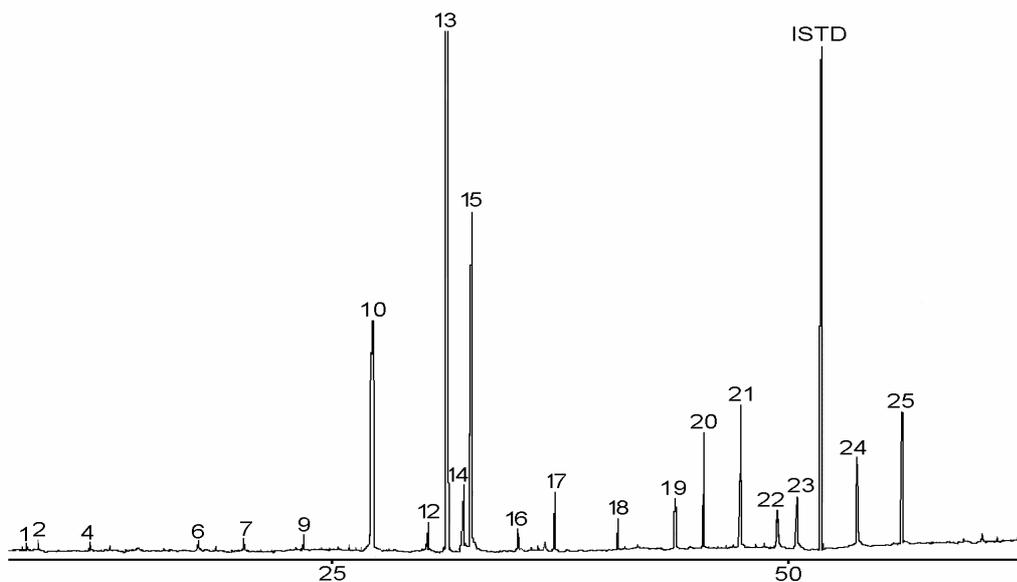


Figura 38. Perfil Cromatográfico de t3 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25°C al cabo de 30 horas de almacenamiento.

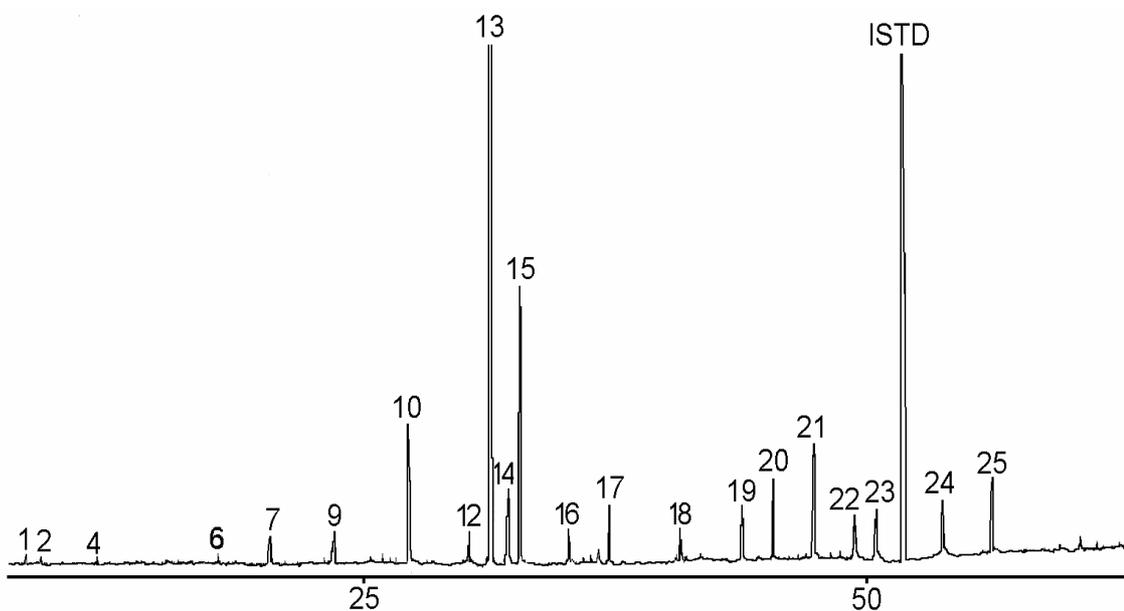


Figura 39. Perfil Cromatográfico de t4 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25°C al cabo de 70 horas de almacenamiento.

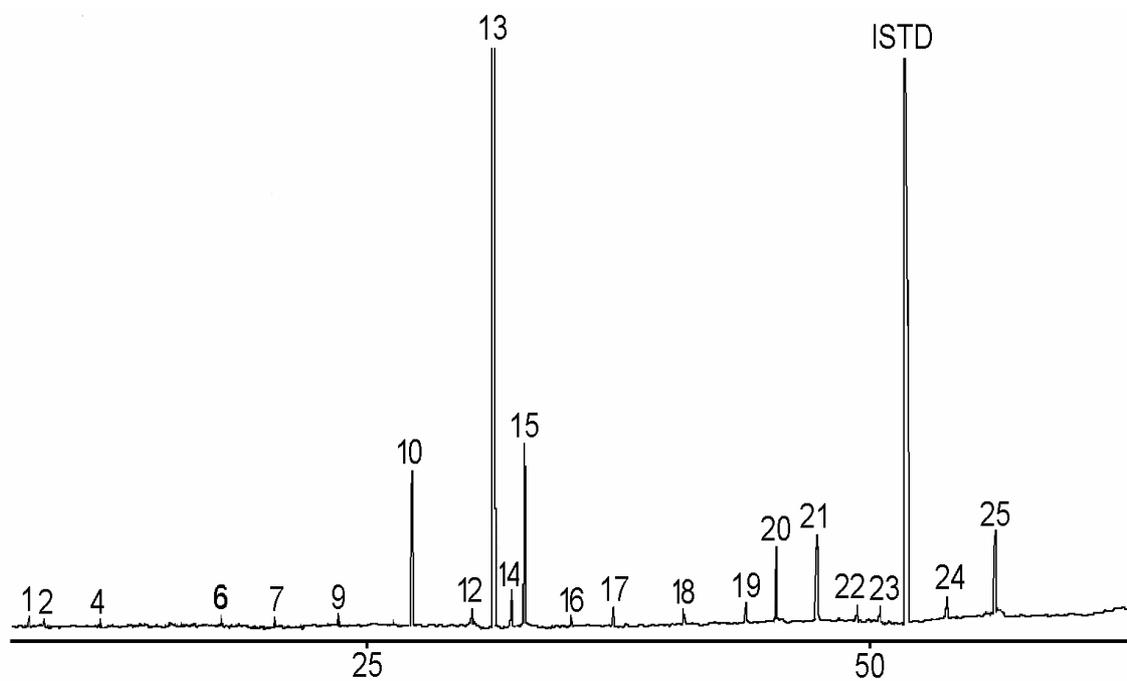


Figura 40. Perfil Cromatográfico de t5 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25°C al cabo de 100 horas de almacenamiento.

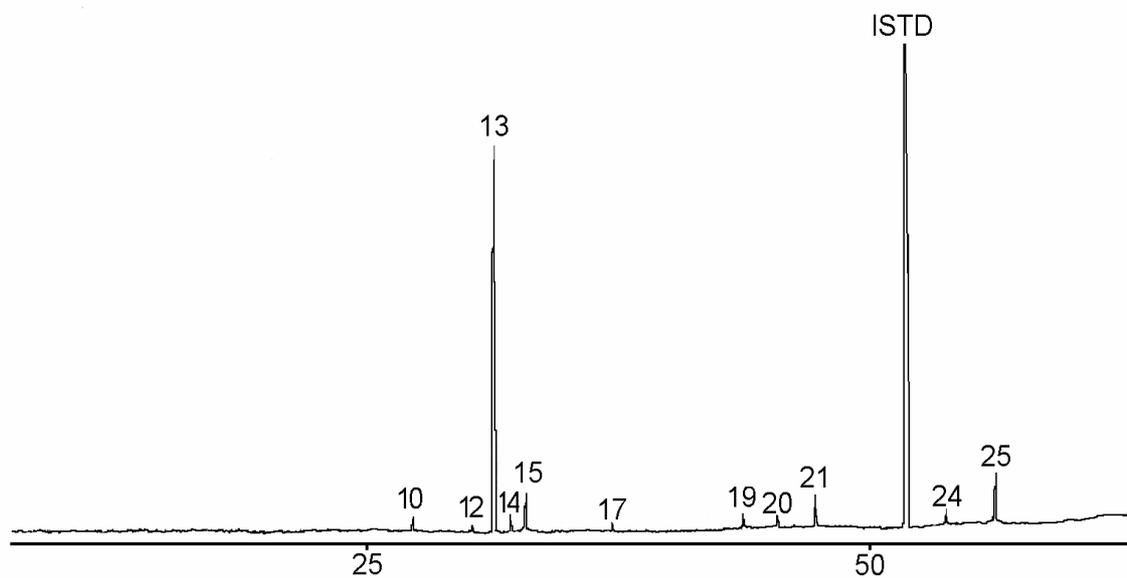
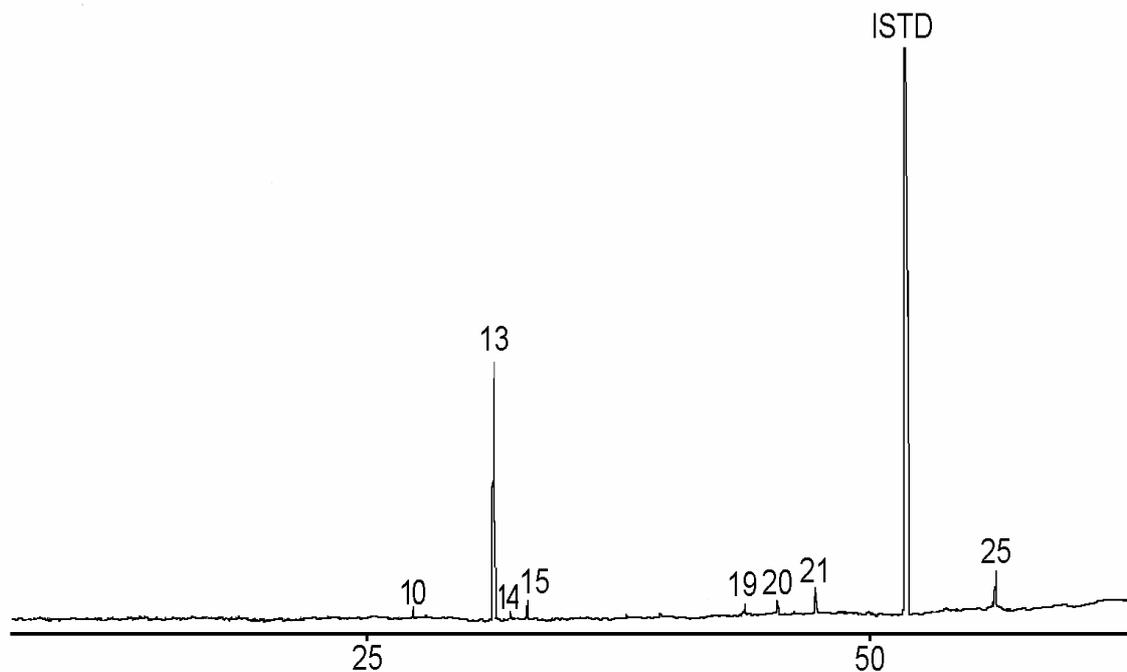


Figura 41. Perfil Cromatográfico de t6 por GC-FID de los Componentes Volátiles de los Bulbos del *A. Sativum* a un tiempo de equilibrio de 20 minutos a 25°C al cabo de 130 horas de almacenamiento.



En la Tabla 19 se indican la concentraciones de los compuestos volátiles del *A. sativum* respecto al tiempo de almacenamiento.

Los compuestos que presentaron mayor concentración en los diferentes tiempos de extracción fueron Dialildisulfuro (1.97 – 1.98 – 0.81 – 0.48 – 0.25 –  $1.27 \cdot 10^{-2}$  ppm), 1,2-ditiaciclopentan-3 –ene (0.30 – 0.26 – 0.17 –  $8.81 \cdot 10^{-2}$  –  $2.77 \cdot 10^{-2}$  –  $9.21 \cdot 10^{-3}$  ppm).

Tabla 19. Semicuantificación del comportamiento de los componentes volátiles de los bulbos del *A. sativum* con respecto al tiempo de almacenamiento obtenidos por HS-SPME.

PICO	COMPUESTO	CONCENTRACION mg/Kg					
		T1	T2	T3	T4	T5	T6
1	N.I.	$9.69 \cdot 10^{-3}$	$3.23 \cdot 10^{-3}$	$2.91 \cdot 10^{-3}$	$3.23 \cdot 10^{-3}$	----	----
2	DIMETILDISULFURO	$1.72 \cdot 10^{-2}$	$1.33 \cdot 10^{-3}$	$1.62 \cdot 10^{-3}$	$1.47 \cdot 10^{-3}$	----	----
4	DIALILSULFURO	$1.06 \cdot 10^{-2}$	$1.46 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-3}$	$2.59 \cdot 10^{-3}$	----	----
6	(Z) 1-PROPENILMETILDISULFURO	$1.05 \cdot 10^{-2}$	$8.3 \cdot 10^{-4}$	$9.7 \cdot 10^{-4}$	$1.08 \cdot 10^{-3}$	----	----
7	METILALILDISULFURO	$6.88 \cdot 10^{-3}$	$4.9 \cdot 10^{-4}$	$3.52 \cdot 10^{-3}$	$1.71 \cdot 10^{-3}$	----	----
9	DIMETILTRISULFURO	$6.32 \cdot 10^{-3}$	$3.44 \cdot 10^{-3}$	$2.61 \cdot 10^{-3}$	$2.16 \cdot 10^{-3}$	----	----
10	PROPILALILDISULFURO	0.40	0.13	$9.53 \cdot 10^{-2}$	$9.07 \cdot 10^{-2}$	$1.67 \cdot 10^{-2}$	$2.67 \cdot 10^{-3}$
12	(Z) 1- PROPENILALILDISULFURO	$1.90 \cdot 10^{-2}$	$5.25 \cdot 10^{-3}$	$9.41 \cdot 10^{-3}$	$5.93 \cdot 10^{-3}$	$7.01 \cdot 10^{-4}$	----
13	DIALILDISULFURO	1.97	1.98	0.81	0.48	0.25	$1.27 \cdot 10^{-2}$
14	(E) 1- PROPENILALILDISULFURO	$1.23 \cdot 10^{-2}$	$1.34 \cdot 10^{-2}$	$1.57 \cdot 10^{-2}$	$6.17 \cdot 10^{-3}$	$3.65 \cdot 10^{-3}$	$1.74 \cdot 10^{-3}$
15	1,2-DITIACICLOPENTAN-3-ENE	0.30	0.26	0.17	$8.81 \cdot 10^{-2}$	$2.77 \cdot 10^{-2}$	$9.21 \cdot 10^{-3}$
16	METILPROPILTRISULFURO	$2.88 \cdot 10^{-3}$	$2.82 \cdot 10^{-3}$	$3.61 \cdot 10^{-3}$	$1.26 \cdot 10^{-3}$	----	----
17	METILALILTRISULFURO	$5.62 \cdot 10^{-3}$	$6.95 \cdot 10^{-3}$	$1.25 \cdot 10^{-2}$	$3.84 \cdot 10^{-3}$	$1.17 \cdot 10^{-3}$	----
18	ALILTIOPROPANAL	$4.21 \cdot 10^{-3}$	$3.46 \cdot 10^{-3}$	$2.74 \cdot 10^{-3}$	$1.38 \cdot 10^{-3}$	----	----
19	PROPILALILTRISULFURO	$2.45 \cdot 10^{-3}$	$5.01 \cdot 10^{-3}$	$8.41 \cdot 10^{-3}$	$3.80 \cdot 10^{-3}$	$3.51 \cdot 10^{-3}$	$2.24 \cdot 10^{-3}$
20	3-VINIL-4H-1,2-DITIINO	$1.60 \cdot 10^{-2}$	$1.73 \cdot 10^{-2}$	$1.61 \cdot 10^{-2}$	$1.12 \cdot 10^{-2}$	$1.86 \cdot 10^{-3}$	$2.06 \cdot 10^{-3}$
21	N.I.	$5.78 \cdot 10^{-3}$	$2.89 \cdot 10^{-2}$	$3.31 \cdot 10^{-2}$	$1.37 \cdot 10^{-2}$	$9.35 \cdot 10^{-3}$	$5.47 \cdot 10^{-3}$
22	DIALILTRISULFURO	$1.31 \cdot 10^{-2}$	$2.50 \cdot 10^{-3}$	$2.65 \cdot 10^{-3}$	$2.44 \cdot 10^{-3}$	-----	----
23	2-VINIL-4H-1,3-DITIINO	$4.21 \cdot 10^{-3}$	$4.38 \cdot 10^{-3}$	$3.56 \cdot 10^{-3}$	$3.60 \cdot 10^{-3}$	----	----
24	2-TRIDECANONA	$1.73 \cdot 10^{-2}$	$8.01 \cdot 10^{-3}$	$7.60 \cdot 10^{-3}$	$7.47 \cdot 10^{-3}$	$4.79 \cdot 10^{-3}$	----
25	DIALILTETRASULFURO	$1.71 \cdot 10^{-2}$	$1.63 \cdot 10^{-2}$	$1.62 \cdot 10^{-2}$	$1.63 \cdot 10^{-2}$	$1.38 \cdot 10^{-3}$	$1.08 \cdot 10^{-3}$

Grafico 5. Comportamientos de los compuestos volátiles presentes en los bulbos del A. Sativum con respecto al tiempo de almacenamiento

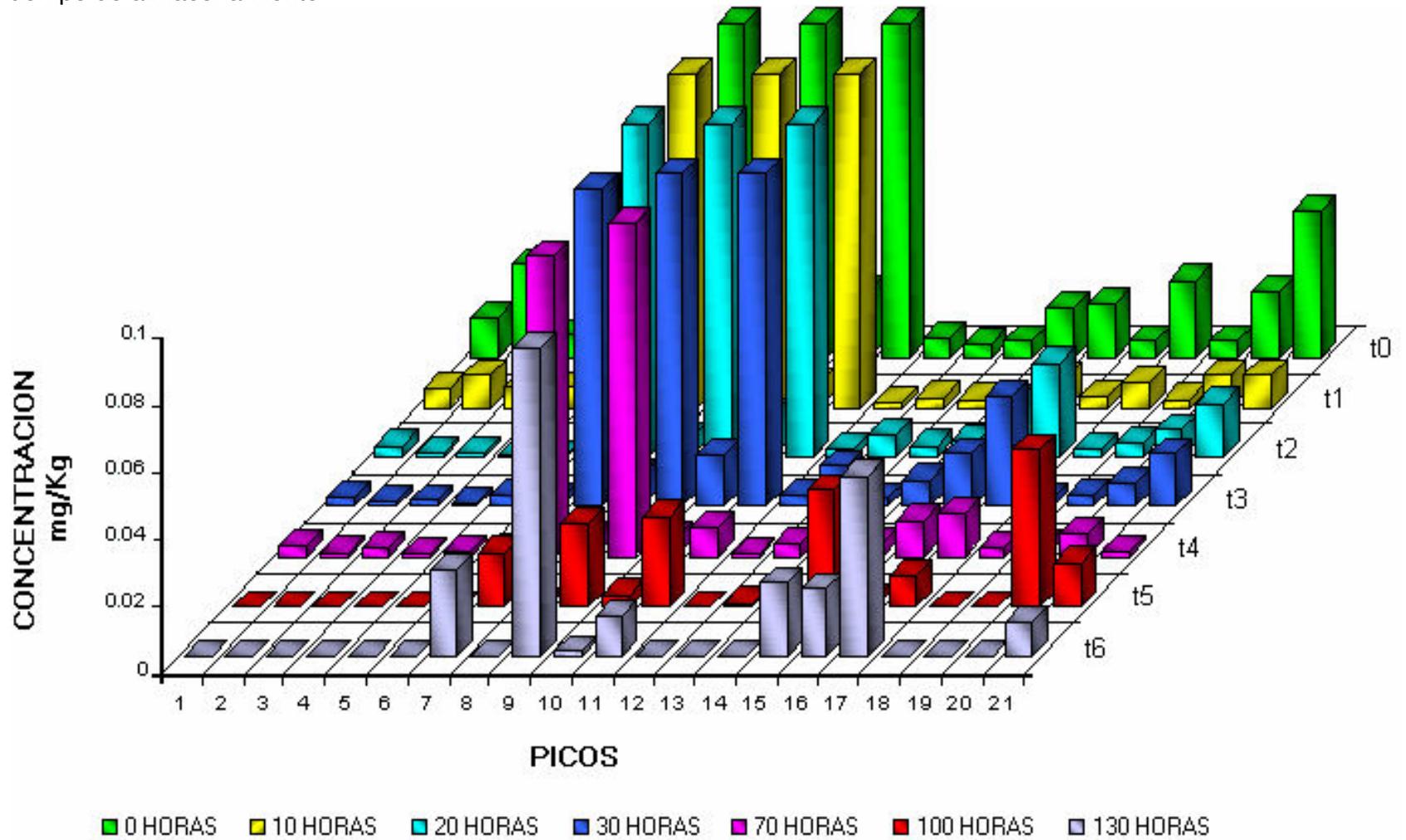


Grafico 6. Comportamiento de algunos compuestos volátiles presentes en los bulbos del *A. Sativum* obtenidos por HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento, con una concentración inicial del orden de  $10^{-1}$  ppm.

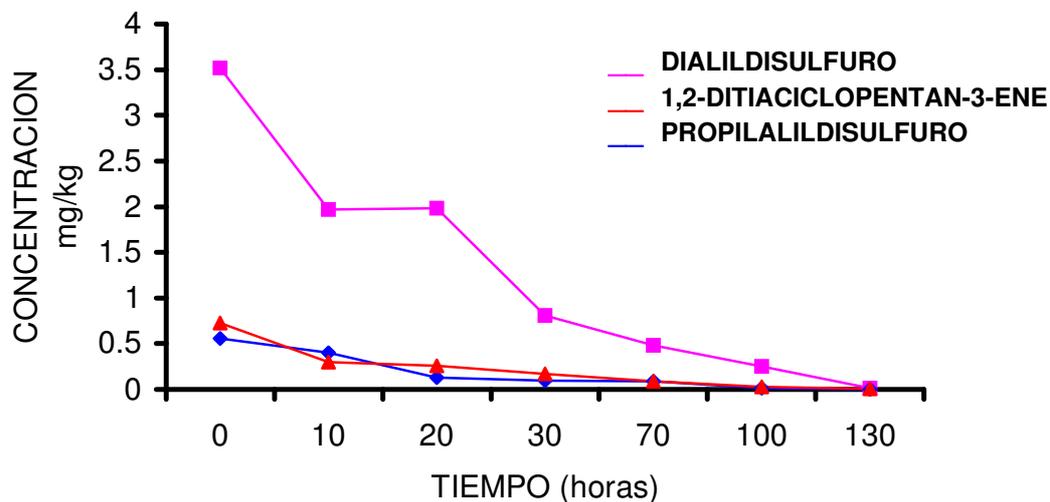


Grafico 7. Comportamiento de algunos compuestos volátiles presentes en los bulbos del *A. Sativum* obtenidos por HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento, con una concentración inicial del orden de  $10^{-2}$  ppm.

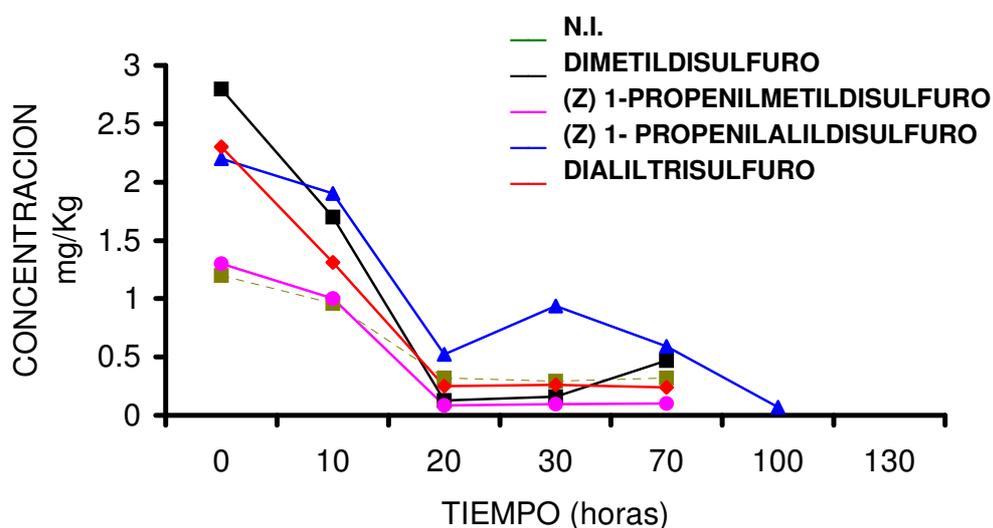
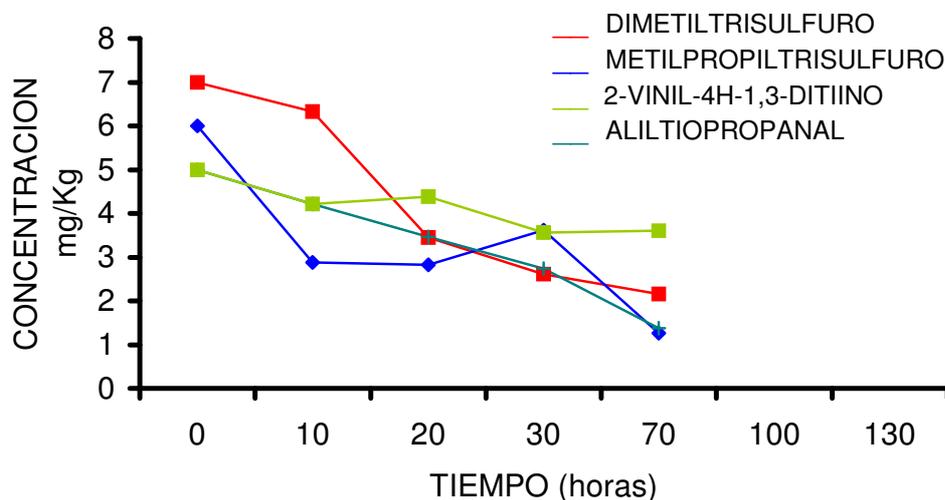


Grafico 8. Comportamiento de algunos compuestos volátiles presentes en los bulbos del *A. Sativum* obtenidos por HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento, con una concentración inicial del orden de  $10^{-3}$  ppm.



Según la tabla 19 al inicio de la exposición de los bulbos del *A. Sativum* a temperatura ambiente los compuestos 1. N.I.; 2. Dimetildisulfuro; 4. Dialilsulfuro; 6. (Z) 1-Propenildimetilsulfuro; 7. Metilalildisulfuro; 12. (Z) 1-Propenilalildisulfuro; 15. 1,2-Ditiaciclopentan-3-ene; 16. Metilpropiltrisulfuro; 17. Metilaliltrisulfuro; 18. Aliltiopropanal; 22. Dialiltrisulfuro; 23. 2-Vinil-4H-1,3-Ditiino; 24. 2-Tridecanona; 25. Dialiltetrasulfuro, disminuyen su concentración hasta las 20 horas y mantienen su concentración hasta las 70 horas.

Los compuestos 9. Dimetil disulfuro; 10. Propilalildisulfuro, disminuyen su concentración hasta las 70 horas.

Los compuestos 13. Dialildisulfuro; 19. Propilaliltrisulfuro, presentan una disminución hasta las 130 horas.

Los compuestos 14. (E) 1-Propenilalildisulfuro; 20. 3-Vinil-4H-1,2-Ditiino; 21. N.I, mantienen su concentración hasta las 70 horas.

Hay que destacar que todos los compuestos están presentes hasta las 70 horas.

Los compuestos 1. N.I; 2. Dimetildisulfuro; 4. Dialilsulfuro; 6. (Z) 1-Propenildimetilsulfuro; 7. Metilalildisulfuro; 9. Dimetildisulfuro; 16. Metilpropiltrisulfuro; 22. Dialiltrisulfuro; 23. 2-Vinil-4H-1,3-Ditiino, sus concentraciones llegan a cero hasta las 100 horas.

Los compuestos 12. (Z) 1-Propenilalildisulfuro; 17. Metilaliltrisulfuro; 18. Aliltiopropanal; 24. 2-Tridecanona, sus concentraciones llegan a hacer cero hasta las 130 horas.

Los compuestos 10. Propilalildisulfuro; 13. Dialildisulfuro; 14. (E) 1-Propenilalildisulfuro; 15. 1,2-Ditiaciclohexan-3-eno; 19. Propilaliltrisulfuro; 20. 3-Vinil-4H-1,2-Ditiino; 21. N.I.; 25. Dialiltetrasulfuro, están presentes hasta las 130 horas.

En el grafico 6 se observa que el compuesto mayoritario de la transformación de la aliina en presencia de la enzima aliinasa es el disulfuro de dialilo presentando una disminución considerable respecto al tiempo de almacenamiento.

En el grafico 7 se observa que las concentraciones de los compuestos presentan una mayor disminución hasta las 20 horas en comparación con los de las graficas 6 y 8, posiblemente estos compuestos tienen una mayor volatilidad.

En el grafico 8 se observan que algunos compuestos tienden a subir su concentración a medida que pasa el tiempo, puede asociarse este fenómeno a la disminución de otros compuestos presentando una mayor competitividad en la fibra.

Se puede concluir que los compuestos que permanecieron hasta las 130 horas son posiblemente productos mayoritarios de las transformaciones del oxido de disulfuro de dialilo (alicina).

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron los metabolitos secundarios volátiles de los bulbos del *A. sativum* por los métodos de DES y HS-SPME.

Se detectaron en total 25 compuestos y 20 con identificación tentativa con base en los índices de Kovats y 8 compuestos por espectrometría de masas.

De acuerdo al análisis estadístico realizado para el método DES, se determinó que el mejor tratamiento para la extracción de los compuestos de los metabolitos secundarios volátiles fue el Tratamiento T3 con un tiempo de extracción de 90 minutos.

En el método DES algunos compuestos no son extraídos al aumentar mas de 90 minutos el tiempo de extracción del *A. Sativum*.

Se determinó que el mejor tiempo de exposición para la extracción los metabolitos secundarios volátiles de los bulbos del *A. sativum* con HS-SPME es de 20 minutos a 25°C.

El compuesto principal en las extracciones con DES y HS-SPME de los bulbos del *A. sativum* es el dialildisulfuro.

Los compuestos que predominaron en las extracciones con HS-SPME con respecto al tiempo de almacenamiento fueron: Propilalildisulfuro, Dialildisulfuro, Propenilalildisulfuro, 1,2-Ditiaciclopentan-3-ene, Propilaliltrisulfuro, 3-Vinil-4H-1,2-ditiino,

A pesar de que se reporto en la literatura que el compuesto principal del aroma del ajo es el oxido de disulfuro de dialilo (alicina), no fue obtenido en las extracciones. Es posible que la transformación de este compuesto sea muy rápida.

## RECOMENDACIONES

Utilizar un método de refrigeración mas adecuado en el montaje del método de DES, para la condensación de los compuestos volátiles y tener un dato cualitativo y cuantitativo mas exacto.

En HS-SPME un sistema de agitación de la muestra para la homogenización de la muestra sólida o líquida para alcanzar tiempos de equilibrios mas rápidos.

Trabajar con el A.E. de los bulbos del *A. sativum* para verificar su actividad antibacteriana contra bacterias causantes del cáncer gástrico.

## BIBLIOGRAFÍA

BLOCK, E.; Bentley, M. D.; Davis, F. A.; Douglas, I. B.; Locadie, J. A. Electron impact induced process of thermally and photochemically labile organic sulfur compounds. A mass spectral study of dialkyl disulfides, trisulfides, and  $\alpha$ -disulfones. J. Org. Chem. 1975, 40. p. 2770-2773

BLOCK, Erik. Revista Investigación y Ciencia. Barcelona mayo de 1985. Pág. 23-25  
CAICEDO, Luis A. Federación Nacional de Cafeteros. El cultivo del ajo. 1982. p.14-22.

CAMARGO, A. B, Adecuación del método de análisis de dialliltiosulfinato en polvo de ajo, mediante HPLC, Laboratorio de Análisis de Residuos Tóxicos, Facultad de ciencias Agrarias, U.N.C. Argentina. Inc. 1995. p.145

CAVALLITO, J. Bailey, and J. Hays, Allicin, the Antibacterial principle of *Allium sativum* L. Isolation, Physical Properties and Antibacterial Action. Contribution from the Research Laboratories of Winthrop Chemical. Co. Inc., 1994. p. 1950-1951

E.O.A. Determinations and standards, Essential Oil Assoc. of U.S.A. Scientific, section, N.Y. 1947-1951. p.112

FALCAO, José Universidad CICCIO, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Química de Costa Rica.1998. p. 87-95

GARCIA, Hernando, FLS. Flora Medicinal de Colombia, editores Tercer Mundo, 1992. p.17

GOMEZ, D. Moran, M. Extracción e identificación de los metabolitos secundarios presentes en los frutos maduros de *Carica Candamarcensis* Hoorker filius. San Juan de Pasto: Universidad de Nariño. Departamento de Química, 2005. p.128

GROG, Eduardo, Pumillo Alicia, Introducción al Estudio de los Productos Naturales, Buenos Aires Argentina. Pág. 25

GOTTLIEB, Richard., Introducción a la Espectrometría de Masas de Sustancias. Eva V. Washington. 1983 p. 65

GUENTHER, E. Ed. The essential Oils, Van Nostrand, N.Y. vol. I. 1948.p. 123

HERBARIO de la Universidad de Nariño Pasto.2004

HOBAR, H. Willard, Métodos Instrumentales de Analizas, Wadsworth, USA. 1998 p 125

HUBER, L. Buenas Practicas de Laboratorio y Buenas Practicas de Fabricación actuales, Miami: HEWLETT PACKARD COMPANY, 1994. p. 160

L.G.. Wade, Jr Química Orgánica, Prentice Hall, USA. 1993 p 226

MARTINEZ, Sonano, Uriel. Escuela de ciencias Químicas. Universidad Autónoma. Benito Juárez de Oaxaca. México.1998. [en línea]. [México] julio 2003. [citado may., 2004]. Disponible en Internet:<URL:[http:// www. Geocities.com/capecanaveral/runway /](http://www.Geocities.com/capecanaveral/runway/)>

MEJIA C. Jaime. Manual de Alelopatia Básica y Productos Botánicos. Kingraft Ltda. México 2002. p. 115

OSORIO P Rafael, Química Orgánica II Estereoquímica y Química de los productos naturales. Mexico 1985. pag 230-245

PARRY, E. J. Chemistry of Essential Oils and Artificial Perfumes, 4<sup>a</sup> editorial Scott, Greenwood, Londres, Vol. I, 1922. p. 245

PAWLISZYN Janusz, Solid Phase Microextracción, Theory and Practice, Willey-VCH, Waterloo, Ontario. Canadá, 1997.Pág. 97

PIERSON, Herbert. Artículo revista Medico de la Familia. Centro de Investigación sobre la Nutrición. Washington. [en línea]. [Estados Unidos] febrero 2001. [citado may.,2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www.saludpi.com /](http://www.saludpi.com/)>

RAMÓN y Cejal, Hospital Departamento de Gastroenterología, [en línea]. [España] marzo 2002. [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www. Ondasalud.com. pdf /](http://www.Ondasalud.com.pdf)>

RAYMAND E. Kirk, Enciclopedia de la Tecnología Química, editorial Hispanoamericana, tomo II. Pág. 119

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 d su posible actividad antioxidante "in vitro" Bucaramanga : Universidad Industrial de Santander 2002. p.4 -20

SKOOG, Douglas A., Principles of Instrumental Anallysis,N.Y., Hoit,1971. p 201

THRASH, Ágata. Remedies caseros. Instituto Pines. Departamento de salud y educación. Edición 1981. seatle Alabama. [en línea]. [Estados Unidos] junio 2003. [citado may., 2004]. Disponible en Internet:<URL :. [http:// www. Pes.13.tripod.com /](http://www.Pes.13.tripod.com/)>

VASQUEZ, Rosa Maria, Facultad de Farmacia y Bioquímica. Ciencias Biológicas. Universidad Nacional de Trujillo[en línea]. [Perú].Abril 2003 . [citado Jun.,2004]. Disponible en Internet:<URL :<http://www.unitro.edu.pe/old/publicacion/sciencdo/sciendoll/>>

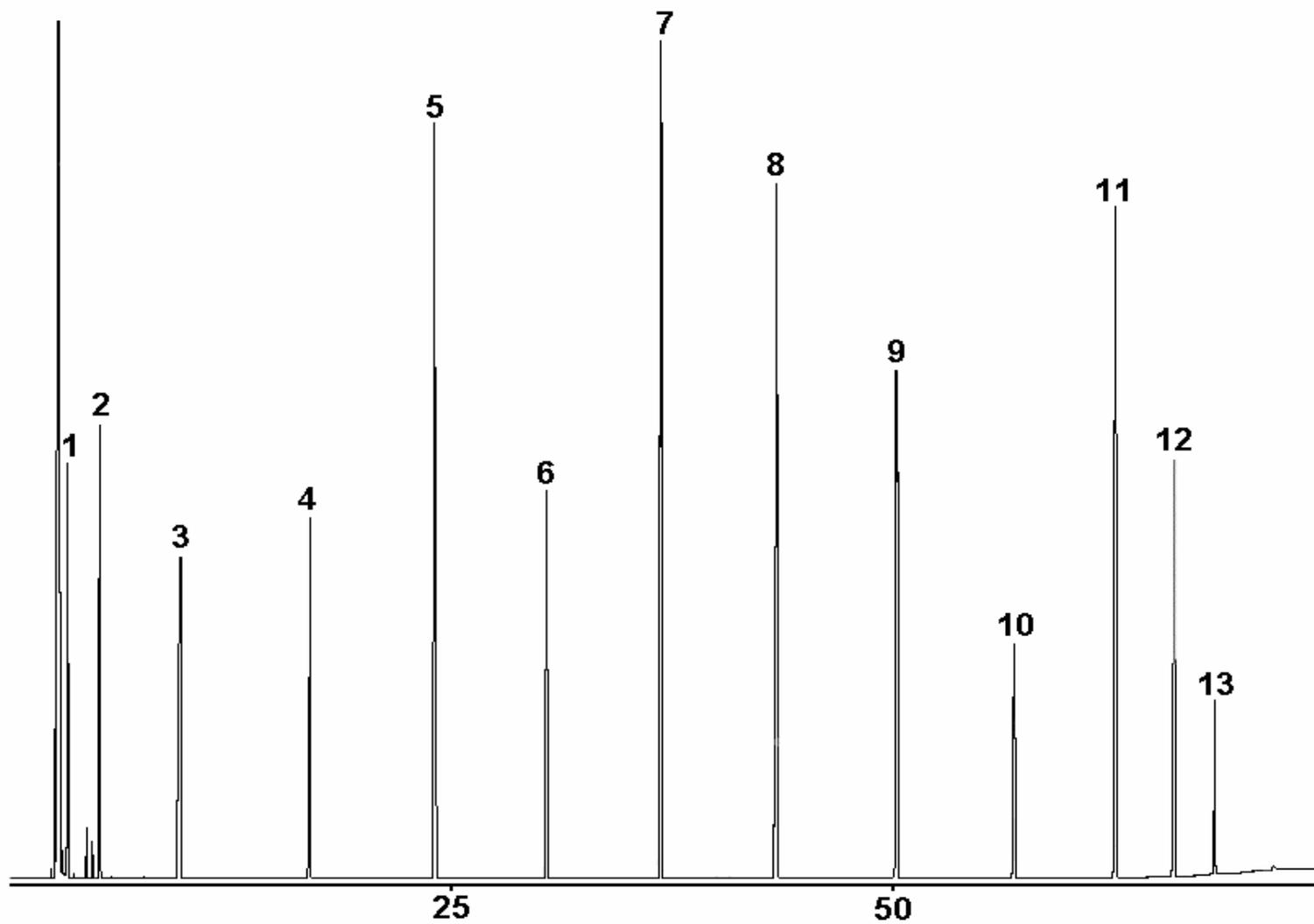
WREN, R. Potrees New Cyclopaedia of Botanical Drugs and Preparations, editorial Grijalvo, 1944. pag 112-123

WU, C. M.; Chen, S. Y. Volatile compounds in oil after deep frying or stir frying and subsequent storage. J. Am. Oil Chem. Soc. Japon 1992, 69. p. 858-865

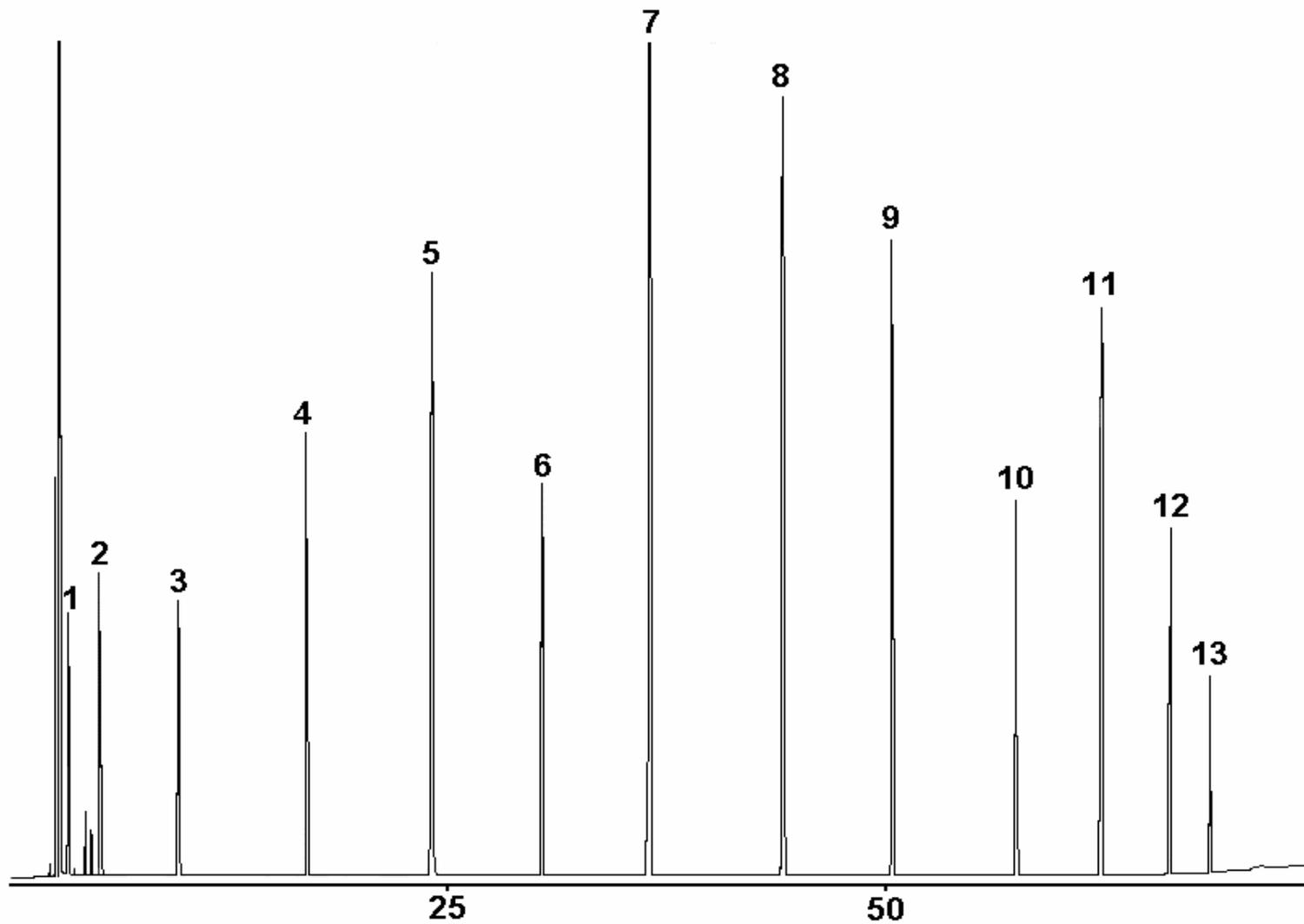
YU, Thung-Hsi,. Volatile compounds from garlic. J Agric. Food Chem 1989, 37.p. 725-730.

YU, T. H.; Wu, C. M. Stability of allicin in garlic juice. J. Food Sci. 1889, 54. p. 977-981

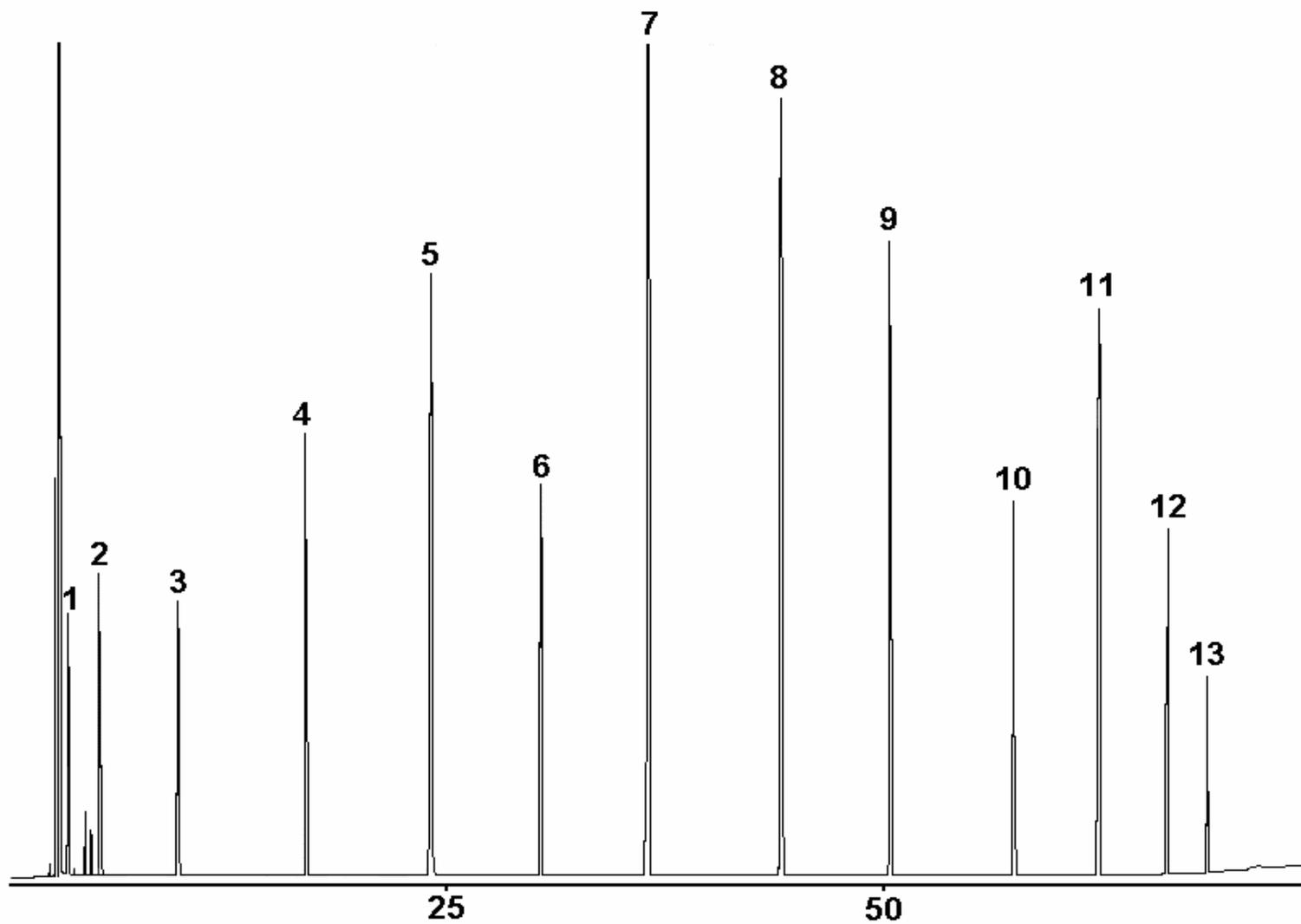
Anexo A. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en columna MDN-5 por DES



Anexo B. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en columna MDN-5 por HS-SPME



Anexo C. Perfil cromatográfico de la mezcla de parafinas C<sub>6</sub>-C<sub>18</sub> en columna Carbowax por HS-SPME



Anexo D.

Ecuaciones para el cálculo de ANDEVA

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

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

Suma de cuadrados

Tratamientos	$SC_t = \sum(Y_i^2/r) - FC$	
Total	$SCT = \sum\sum Y_{ij}^2 - FC$	$Y_{ij} = \text{datos}$
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 corrección  $(\sum\sum X_{ijk})^2/t*r*m$

Suma de cuadrados

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

Cuadrados medios

Tratamientos	$CM_t = SC_t/GL_t$
EE	$CM_{EE} = (SCEE + SC_{EM}) / (GLEE + GLEM)$
EM	
F Tabulada	$F_{cal} = CM_t/CM_{EE}$

## ECUACIÓN PARA EL COMPARADOR DE TUKEY

$$Comp = V_{tt} \left( \sqrt{\frac{CM \text{ Error}}{R}} \right)$$

V<sub>tt</sub>: Valor tabla de Tukey al 99% = 5.63

CM: Cuadrados medios del error.

R: Repeticiones