

**ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES ACTIVOS
DEL AJO (*Allium sativum* L.) CULTIVADO EN EL MUNICIPIO DE SILVIA,
DEPARTAMENTO DEL CAUCA, QUE ACTÚAN COMO INSECTICIDAS**

VICTORIA EUGENIA GALVIS CALAMBÁS

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN (CAUCA)
2009**

**ESTUDIO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES ACTIVOS
DEL AJO (*Allium sativum* L.) CULTIVADO EN EL MUNICIPIO DE SILVIA,
DEPARTAMENTO DEL CAUCA, QUE ACTÚAN COMO INSECTICIDAS**

VICTORIA EUGENIA GALVIS CALAMBÁS

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

DIRECTORA

MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D

Grupo de Investigación en Biotecnología, Calidad Medioambiental y Seguridad
Agroalimentaria (BICAMSA)
Universidad del Cauca, Colombia

ASESORES

JOAQUÍN ALTAREJOS CABALLERO, Ph.D

Grupo de Investigación en Compuestos de Interés Biológico (GICIP)
Universidad de Jaén, España

MARIA CRISTINA GALLEGO ROPERO, M.Sc.

Grupo de Investigación en Estudios Ambientales (GEA)
Universidad del Cauca, Colombia

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN (CAUCA)**

2009

AGRADECIMIENTOS

Doctora Maite del Pilar Rada Mendoza, por su colaboración y confianza depositada para el desarrollo y feliz culminación de este trabajo.

Doctor Joaquín Altarejos Caballero, por su gran disposición y apoyo incondicional para poder llevar a cabo la estancia de investigación en su laboratorio. Gracias por ser un gran padrino.

Doctora Sofía Salido Ruiz, por su inmensa ayuda y asesoría en los cálculos analíticos. Gracias por ser una amiga y una gran consejera.

Doctora María Cristina Gallego, por sus aportes y disponibilidad para llevar a cabo los ensayos biológicos. Gracias por regalarme su confianza.

A los integrantes del grupo de investigación GICIP de la Universidad de Jaén, por brindarme su amistad y por permitirme hacer parte del grupo durante la estancia de investigación.

A los Jurados por su gran colaboración en la estructuración, sugerencias y tiempo dedicado a la evaluación de este trabajo.

A mi familia, en especial a mis padres por su comprensión y ayuda incondicional. Mami, gracias por ser en mi vida el ángel que ha guiado mis pasos desde mi niñez.

A mi esposo, por su enorme contribución en la realización de este trabajo, por su incalculable tolerancia y comprensión en los momentos difíciles, por levantar mi ánimo cada vez que decaía y por ser mí constante apoyo.

A mi compañero de carrera, Sebastián Salinas, por regalarme su amistad y por la ayuda recibida en los momentos que más lo necesite.

A todos los profesores del Departamento de Química, por aportar valiosos conocimientos a mi vida profesional.

A DIOS por iluminar cada momento de mi vida y por permitir hacer realidad este sueño.

MUCHAS GRACIAS.

Nota de aceptación

MAITE DEL PILAR RADA MENDOZA, Ph.D
Directora Trabajo de Grado

ALEJANDRO MONCAYO LASSO, Ph.D
Jurado

JOSÉ ANTONIO GALLO, M.Sc.
Jurado

Fecha de sustentación: Popayán, Noviembre 10 de 2009.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Componentes del ajo	5
2.1.1 Compuestos azufrados presentes en el ajo	5
2.2 Obtención de compuestos azufrados presentes en el ajo	7
2.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (US)	7
2.2.2 Extracción por hidrodestilación (HI)	8
2.3 Evaluación de la capacidad toxicológica	10
2.4 Biología y comportamiento de <i>Tecia solanivora</i> (Polvony)	12
2.5 Marco de referencia para el análisis estadístico	13
3 OBJETIVOS	15
4. METODOLOGÍA	16
4.1 ZONA DE ESTUDIO	16
4.1.1 Ubicación geográfica	16
4.1.2 Muestreo	16
4.1.3 Recolección	17
4.1.4 Preparación y tratamiento de la muestra	17
4.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE DE AJO	17
4.2.1 Hidrodestilación (HI)	17
4.2.2 Extracción asistida por ultrasonido (US)	19
4.2.3 Caracterización organoléptica del aceite extraído por hidrodestilación y ultrasonido	20
4.3 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO CG-EM PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS AZUFRADOS PRESENTES EN ACEITE DE AJO	20
4.4 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO	21
4.4.1 Preparación de la curva de calibración	21

4.4.2	Parámetros estadísticos	22
4.4.2.1	Intervalo lineal	22
4.4.2.2	Sensibilidad analítica	23
4.4.2.3	Precisión	23
4.4.2.3.1	Repetibilidad	23
4.4.2.3.2	Reproducibilidad	24
4.4.2.4	Exactitud del método de extracción	24
4.5	ESTABILIDAD DEL DISULFURO DE DIALILO	24
4.5.1	Estabilidad de los estándares	24
4.5.2	Estabilidad de las muestras	25
4.6	IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS EN LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-EM	25
4.7	ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO EN MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-EM	25
4.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO OBTENIDO POR ULTRASONIDO	26
4.9	ENSAYOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES	26
4.9.1	Preparación del aceite de ajo	26
4.9.2	Población evaluada en las pruebas biológicas	27
4.9.3	Cuidado del material (Larvas y adultos de <i>Tecia solanivora</i>)	27
4.9.4	Diseño del ensayo	27
4.9.4.1	Ensayo con larvas de <i>T.solanivora</i>	28
4.9.4.1	Ensayo con adultos de <i>T.solanivora</i>	28
4.9.5	Aplicación del aceite	29
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1.1	Caracterización organoléptica del aceite de ajo extraído por hidrodestilación y ultrasonido	32
5.2	OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO	32
5.2.1	Curva de calibración	32
5.2.2	Parámetros estadísticos	36

5.2.2.1	Intervalo lineal	36
5.2.2.2	Sensibilidad analítica	39
5.2.2.3	Precisión	40
5.2.2.3.1	Repetibilidad	40
5.2.2.3.2	Reproducibilidad	41
5.2.2.4	Exactitud del método de extracción	42
5.3	ESTABILIDAD DEL DISULFURO DE DIALILO	44
5.3.1	Estabilidad de los estándares	44
5.3.2	Estabilidad de las muestras	46
5.4	IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS EN LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-EM	48
5.4.1	Identificación de compuestos azufrados en aceite de ajo extraído por hidrodestilación	48
5.4.2	Identificación de compuestos azufrados en aceite de ajo extraído por ultrasonido	51
5.4.2.1	Compuestos azufrados identificados utilizando éter como disolvente a diferentes tiempos de extracción	51
5.4.2.2	Compuestos azufrados identificados utilizando hexano como disolvente a diferentes tiempos de extracción	53
5.5	ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO EN MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-MS	58
5.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO OBTENIDO POR ULTRASONIDO	61
5.7	ENSAYOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES	63
6.0	CONCLUSIONES	72
7.0	BIBLIOGRAFÍA	73
8.0	ANEXOS	71

LISTA DE TABLAS

		Pág.
Tabla 1	Resultados del análisis CG-EM del aceite de ajo extraído por hidrodestilación y fluidos supercríticos	8
Tabla 2	Resultados (g aceite / 100 g de ajo) obtenidos de la extracción del aceite de ajo por SDE, MWHD y USE, usando éter etílico, hexano y acetato de etilo	10
Tabla 3	Susceptibilidad comparativa de larvas <i>T. castaneum</i> y adultos <i>S. zeamais</i> al aceite de ajo	12
Tabla 4	Volúmenes empleados de patrón (5000 mg/L) para preparar la curva de calibración	22
Tabla 5	Descripción del diseño del bioensayo realizado sobre larvas y adultos de <i>T. solanivora</i>	30
Tabla 6	Áreas (Y), promedio (\bar{Y}), desviación estándar (s), desviación estándar relativa (RSD) y coeficiente de variación para los estándares de disulfuro de dialilo (rango de 39 a 5000 mg/L), preparadas en éter etílico y hexano	34
Tabla 7	Valores calculados de coeficiente de correlación (r) y t de student, en las curvas de calibración preparadas en éter etílico (Curva 1) y hexano (Curva 2)	37
Tabla 8	Valores de $t_{crítico}$ y t_{calc} usados para determinar si las pendientes de la figura de β vs concentración difieren de cero	38
Tabla 9	Repetibilidad cromatográfica ($n=5$) de un estándar de disulfuro de dialilo de concentración 5000 mg/L preparado en éter etílico y de muestras de aceite medidos en 5 días consecutivos	41
Tabla 10	Reproducibilidad cromatográfica ($n=5$) de un estándar de disulfuro de dialilo de concentración 5000 mg/L (en éter etílico) y de las muestras de aceite	42
Tabla 11	Porcentajes de recuperación en las muestras de aceite de ajo	43
Tabla 12	Concentraciones para el estándar de disulfuro de dialilo (2500 mg/L) evaluados durante 10 días consecutivos, para la prueba de estabilidad	44

Tabla 13	Concentraciones del disulfuro de dialilo obtenidas en la estabilidad de la muestra Hid.2 durante 10 días, para la prueba de estabilidad	46
Tabla 14	Concentraciones del disulfuro de dialilo obtenidas en la estabilidad de las muestras Éter 30.2, Éter 45.2 y Éter 60.2, para la prueba de estabilidad	47
Tabla 15	Concentraciones del disulfuro de dialilo obtenidas en la estabilidad de las muestras Hex.30.2, Hex.45.2 y Hex.60.2, para la prueba de estabilidad	47
Tabla 16	Compuestos identificados en los aceites de ajo extraídos por hidrodestilación (HI) y (US)	55
Tabla 17	Cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo (n=3) extraído con hidrodestilación (disolvente agua)	58
Tabla 18	Cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo (n=3) extraído con ultrasonido utilizando éter y hexano como disolventes	58
Tabla 19	Efecto del tratamiento con enzimas sobre volátiles del ajo (% de área relativa) en el trabajo de Sowbhagya	61
Tabla 20	Resultados obtenidos en las pruebas de análisis estadístico para cada variable	63
Tabla 21	Observaciones realizadas a las 6 horas de aplicación de los tratamientos	65
Tabla 22	Observaciones realizadas a las 12 horas de aplicación de los tratamientos	66
Tabla 23	Observaciones realizadas a las 24 horas de aplicación de los tratamientos	67
Tabla 24	Observaciones realizadas a las 48 horas de aplicación de los tratamientos	68
Tabla 25	Datos de mortalidad de larvas obtenida en los tratamientos a través del tiempo	69

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Cultivo de ajo muestreado en el municipio de Silvia, Cauca	4
Figura 2	Esquema de la reacción enzimática de la aliína	6
Figura 3	Estado de larva, pupa y adulto de la polilla <i>Tecia solanivora</i>	13
Figura 4	Recolección del ajo en el sitio del muestreo	17
Figura 5	Montaje de extracción por hidrodestilación	18
Figura 6	Unidad muestral con larvas aplicando el tratamiento T1, del ensayo biológico con <i>T. solanivora</i>	28
Figura 7	Curva de calibración del patrón disulfuro de dialilo en éter etílico (A) y hexano (B)	35
Figura 8	Comportamiento de β en función de las concentraciones del disulfuro de dialilo.	38
Figura 9	Estabilidad del patrón de concentración 2500 ppm (en éter etílico)	45
Figura 10	Conteo de iones totales (TIC) del aceite de ajo obtenido por hidrodestilación	49
Figura 11	TIC del aceite de ajo extraído por ultrasonido (durante 30 minutos) utilizando éter etílico como disolvente	51
Figura 12	TIC del aceite de ajo extraído por ultrasonido (durante 30 minutos) utilizando hexano como disolvente	53
Figura 13	Descomposición de la alicina en distintos compuestos azufrados	56
Figura 13A	Formación de 2-vinil-[4H]-1,3-ditiino y 3-vinil-[4H]-1,2-ditiino mediante reacción de Diels-Alder a partir de la acroleína	57
Figura 14	Concentraciones de disulfuro de dialilo cuantificadas en las muestras de aceite de ajo extraído por	60

ultrasonido durante 30, 45 y 60 min., utilizando éter y hexano como disolventes

LISTADO DE ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

A	Hidrodestilado
ACSOs	S-alquenil cisteín sulfóxidos
ANOVA	Análisis de varianza
B	US: Éter etílico: 30 min.
C	US: Éter etílico: 45 min.
CG - EM	Cromatografía de gases - espectrometría de masas
CV	Coeficiente de variación
D	US: Éter etílico: 60 min.
DADS	Disulfuro de dialilo
DATS	Trisulfuro de dialilo
DATTS	Tetrasulfuro de dialilo
3-VDT	3-vinil-[4H]-1,2-ditiíno
2-VDT	2-vinil-[4H]-1,3-ditiíno
DSR	Desviación estándar relativa
E	US: Hexano: 30 min.
F	US: Hexano: 45 min.
G	US: Hexano: 60 min
HI	Hidrodestilación
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MWHD	Microondas asistido
mg/L	Miligramos por litro
R	Coeficiente de correlación momento-producto
R²	Coeficiente de determinación
s	Desviación estándar
SDE	Destilación con solventes en un equipo de baja densidad
<i>S. zeamais</i>	<i>Sitophilus zeamais</i> (Motsch)
<i>T. castaneum</i>	<i>Tribolium castaneum</i> (Herbst)

TIC	Conteo de iones totales
Hid.1	Aceite de ajo extraído por hidrodestilación, réplica 1
Hid.2	Aceite de ajo extraído por hidrodestilación, réplica 2
Hid.3	Aceite de ajo extraído por hidrodestilación, réplica 3
Éter 30.1	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante 30 min., réplica 1
Éter 30.2	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante 30 min., réplica 2
Éter 30.3	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante 30 min., réplica 3
Éter 45.1	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante 45 min., réplica 1
Éter 45.2	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante 45 min., réplica 2
Éter 45.3	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, por un periodo de 45 min., réplica 3
Éter 60.1	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante 60 min., réplica 1
Éter 60.2	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante de 60 min., réplica 2
Éter 60.3	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando éter etílico, durante de 60 min., réplica 3
Hex. 30.1	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 30 min., réplica 1
Hex. 30.2	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 30 min., réplica 2
Hex. 30.3	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 30 min., réplica 3
Hex. 45.1	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, por un periodo de 45 min., réplica 1
Hex. 45.2	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano,

	durante 45 min., réplica 2
Hex. 45.3	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 45 min., réplica 3
Hex. 60.1	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 60 min., réplica 1
Hex. 60.2	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 60 min., réplica 2
Hex. 60.3	Aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano, durante 60 min., réplica 3
T 1	Ensayo biológico, utilizando aceite de ajo extraído por hidrodestilación
T 2	Ensayo biológico, utilizando aceite de ajo extraído por ultrasonido, utilizando hexano durante 30 min.
T E	Testigo o blanco de larvas en el ensayo biológico
T E A	Testigo o blanco de adultos en el ensayo biológico
US	Ultrasonido
USE	Ultrasonido asistido

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las principales hortalizas estudiadas, debido a sus propiedades farmacológicas, atribuidas en su mayoría a la riqueza que posee en compuestos organoazufrados.

En la actualidad, se cuenta con una amplia información, que relaciona los efectos benéficos con diversas preparaciones del ajo, tales como son los concentrados, extractos y especialmente, el aceite esencial.

Dentro de este trabajo de investigación, se evaluó la extracción del aceite esencial por dos métodos de extracción: Hidrodestilación y ultrasonido, aplicando para la identificación de los compuestos presentes, la técnica analítica de cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM).

Otra propiedad con la que cuenta el ajo, es su poder insecticida, y es por este motivo, que se realizó un pre-ensayo de toxicidad con *Tecia solanivora* (Polvony), una de las principales plagas que ataca al cultivo de papa en el Cauca y en Latinoamérica. Este tubérculo, para no ser atacado por esta plaga, es fumigado con productos químicos que causan contaminación en el producto, el medio ambiente, en las fuentes de agua y deterioro de la fauna y la microflora del suelo.

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de pisos térmicos con que cuenta el Departamento del Cauca, lo hace una región rica en productos agrícolas cultivados a gran escala como es el caso del ajo (*Allium sativum* L.).

Esta raíz bulbosa es cultivada en grandes cantidades por un grupo de indígenas pertenecientes al grupo de los Guambianos, en el cabildo indígena de Guambia, en el municipio de Silvia, Cauca.

A nivel regional, el ajo cultivado en esta zona del Cauca se ha caracterizado por tener un olor fuerte, que lo identifica como una de las variedades con sabor más concentrado. En la actualidad, este condimento alimenticio es utilizado como agente antibacteriano, antioxidante, fungicida, anticancerígeno y, adicionalmente, tiene efectos benéficos sobre las enfermedades de tipo cardiovascular, debido a sus propiedades biológicas y químicas [1]-[2].

Los estudios orientados hacia la identificación de los compuestos azufrados que tiene el ajo, de la variedad cultivada en esta región del Cauca son limitados. Por esta razón, en este trabajo de investigación se evaluó la extracción del aceite esencial del ajo mediante dos métodos, hidrodestilación y ultrasonido, con el objeto de estudiar los componentes presentes en él. Una vez identificadas las sustancias antes mencionadas, se estandarizó un método analítico mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), que permitió cualificar y cuantificar los componentes de interés, entre ellos el disulfuro de dialilo, compuesto al que se le atribuyen la mayoría de las propiedades biológicas con las que cuenta el ajo.

En la cuantificación del disulfuro de dialilo, llevada a cabo por curva de calibración, se hallaron los valores de los parámetros que establecen el rendimiento del método, como son: Intervalo lineal (39 a 5000 mg/L), linealidad (0,9997), límite de detección y cuantificación del método ($0,375 \pm 0,015$ mg/L y $1,251 \pm 0,049$ mg/L), al igual que la

exactitud y la precisión, mediante la utilización de soluciones patrón del disulfuro de dialilo.

Los aceites de ajo obtenidos por hidrodestilación, reportaron mayor concentración de disulfuro de dialilo que los aceites obtenidos por ultrasonido.

La concentración de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo obtenido por ultrasonido, fueron evaluadas por ANOVA, observando que existen diferencias significativas entre los valores del disulfuro de dialilo al variar los disolventes (éter etílico y hexano) y los tiempos de extracción (30, 45 y 60 minutos).

Considerando el amplio espectro de aplicaciones con las que cuenta el ajo, y centrando nuestra atención en el campo agrícola, se realizó un ensayo preliminar con *Tecia solanivora* (Polvony), plaga que ataca al cultivo de la papa y que causa grandes pérdidas en la producción de este tubérculo; para ello se determinó la capacidad insecticida de los aceites obtenidos de esta variedad de ajo, realizando ensayos mediante la aplicación de una cantidad (2 mL) de aceite de ajo extraído por hidrodestilación y ultrasonido, sobre larvas y adultos de la mencionada polilla de la papa.

Los resultados del ensayo insecticida ofrecieron porcentajes de mortalidad del 100% con la aspersion del aceite de ajo obtenido por hidrodestilación y del 95% con la aspersion del aceite obtenido con ultrasonido (extracción con hexano), a las 48 horas de realizado el ensayo.

2. MARCO TEÓRICO

El ajo (*Allium sativum* L.) es una planta bulbosa, que pertenece a la familia Alliaceae y a la subfamilia Allioideae [3]. Su sistema radicular está compuesto por una raíz bulbosa con 6 a 12 bulbillos (“dientes de ajo”), reunidos en su base por medio de una película delgada, que forma lo que se conoce como “cabeza de ajos”. Cada bulbillito se encuentra envuelto por una túnica blanca, en ocasiones rojiza, membranosa, transparente y muy delgada. De la parte superior del bulbo, nacen las partes fibrosas que se introducen en la tierra para alimentar y anclar la planta.

A largo de la historia se ha utilizado en innumerables aplicaciones de tipo culinario, pero también se ha usado como elemento religioso, higiénico y medicinal [4].

Existen diversas variedades de ajo, dependiendo principalmente del clima y de las condiciones del suelo en donde es cultivado [5]; entre estas variedades se encuentran:

Ajos blancos (Blanco Zacatecas, Cristal, Chino, Early California e Iraquí): son rústicos, de buena productividad y conservación. Suelen consumirse secos.

Ajos rosados: poseen las túnicas envolventes de color rojizo. No se conservan muy bien.

Ajos Rojos (Taiwán, Chileno, Criollo de Anambarri, Criollo de Aguascalientes, Cadereyta y Celaya): poseen envoltura roja y la pigmentación pasa a los dientes, que suelen ser gruesos y cortos [6].

La importancia del ajo en Colombia, se evidencia al conocer que su cultivo conforma cerca del 25% de la superficie dedicada a las hortalizas, lo que lo coloca en el primer sitio de la horticultura colombiana. Los cultivos de ajos se localizan en los climas medios y fríos moderados de las regiones andinas y en zonas de producción cercanas a los centros de consumo. El área de ajo sembrada en Colombia se aproxima a las 14 mil hectáreas, repartidas entre los departamentos de Cundinamarca, Nariño y Cauca [7].

El ajo cultivado en el municipio de Silvia, Cauca, es del tipo de los ajos blancos, con un tamaño de bulbo mediano, denominado “macho”; es reconocido por su olor fuerte y

concentrado y su sabor picante. La temperatura de la región donde éste es cultivado, se encuentra entre 11 y 14 °C respectivamente, razón por la que principalmente se le atribuyen sus propiedades, ya que se ha estudiado que en climas fríos el sabor del ajo se hace más fuerte (Figura 1) [8].



Figura 1. Cultivo de ajo muestreado en el municipio de Silvia, Cauca (Fotos: Galvis, V. E.)

2.1 Componentes del ajo

El ajo comprende una variedad de compuestos que lo hacen un alimento con un amplio espectro de uso y aplicación; entre dichos compuestos se pueden citar: aminoácidos (principalmente ácido glutamínico y aspártico, argenina, leucina, lisina y valina), compuestos organoazufrados (entre ellos ajoeno, alicina, aliína, sulfuros de dialilo), minerales (calcio, fósforo, manganeso, y potasio, y en cantidades menores cobre,

hierro, selenio, sodio y zinc) y vitaminas (ácido ascórbico o vitamina C, piridoxal ó vitamina B6 y en cantidades menores ácido fólico, ácido pantoténico y niacina) [9].

2.1.1 Compuestos azufrados presentes en el ajo

El ajo contiene compuestos organoazufrados como ningún otro vegetal, los cuales le proveen las características de sabor y olor, siendo la mayoría biológicamente activos [7]. Caben destacar los S-alquenil cisteín sulfóxidos (ACSOs), que constituyen el grupo a partir del cual se originan el resto de los compuestos a los que se les atribuyen las propiedades fitoterapéuticas; químicamente, los ACSOs son aminoácidos azufrados no proteicos, de ellos, la aliína es la que se encuentra en mayor proporción en los dientes de ajo fresco [10].

Cuando el tejido del ajo fresco es dañado, la enzima alinasa (S-alquenil L-cistein sulfóxido liasa) actúa sobre los ACSOs, liberando ácido sulfénico (muy reactivo), amonio y piruvato [9]. Dos moléculas del ácido 2-propeno sulfénico reaccionan para formar alicina (allil-2-propentiosulfinato) por pérdida de agua (Figura 2).

Aunque la alicina es considerado el compuesto biológicamente activo más importante encontrado en el ajo cortado, en presencia de altas temperaturas o disolventes orgánicos, sufre una serie de transformaciones que originan otras especies químicas [11]; de acuerdo con la polaridad del medio o de los disolventes utilizados se formarán distintos productos de transformación de la alicina, especialmente vinil ditiíños, ajoenos y disulfuros de dialilo. En medios más apolares se obtendrá una mayor proporción de ajoeno, mientras que en medios menos apolares prevalecerá la formación de vinil ditiíños [12].

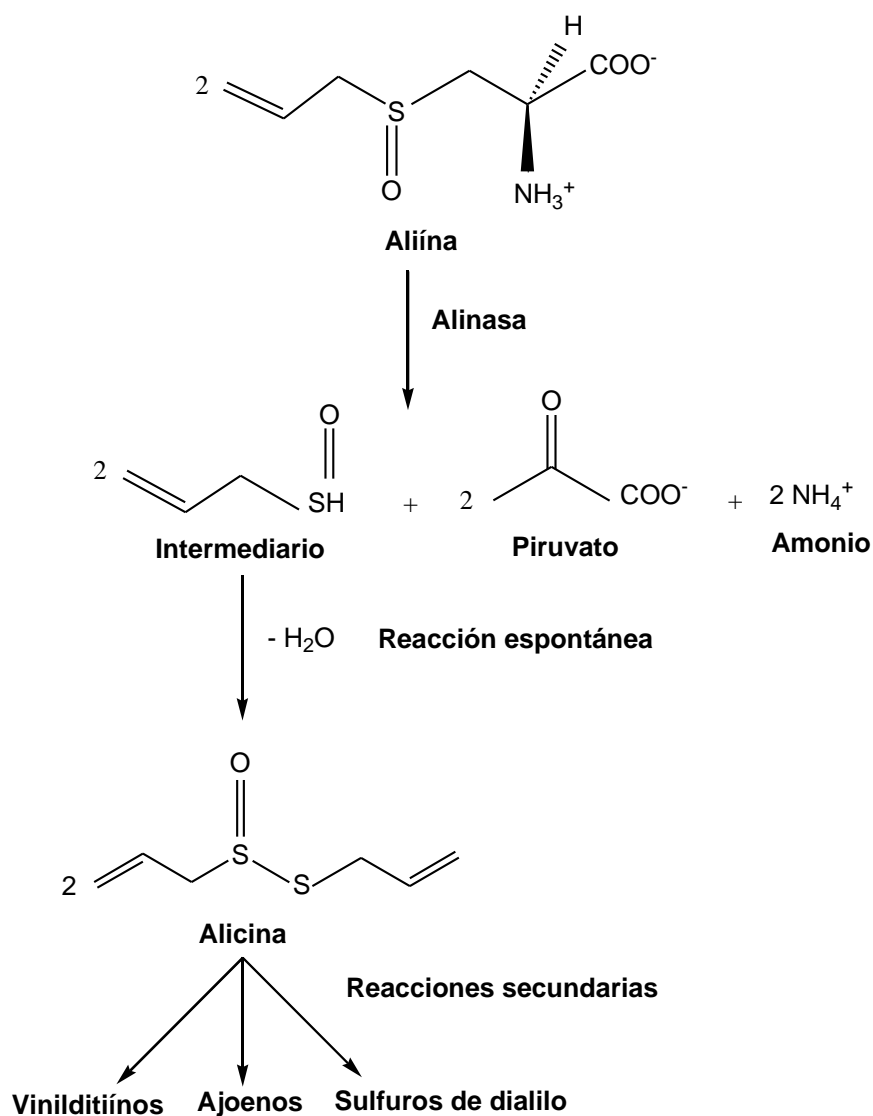


Figura 2. Esquema de la reacción enzimática de la aliína [13]

2.2 Obtención de compuestos azufrados presentes en el ajo

La obtención y concentración de los componentes activos presentes en el aceite de ajo, dependen de la técnica utilizada para extraerlo. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la destilación, hidrodestilación y la extracción asistida por ultrasonido y por microondas [14].

2.2.1 Extracción asistida por ultrasonido (US)

La extracción asistida por ultrasonido utiliza sonidos de alta frecuencia, con el fin de desprender el compuesto buscado del material vegetal. Las partículas sólidas y líquidas vibran y se aceleran ante la acción ultrasónica, como resultado el soluto pasa rápidamente de la fase sólida al solvente [15]. Según Rostagno y colaboradores en 2003, esta técnica es la más económica y tiene los requerimientos instrumentales más bajos entre las últimas técnicas de extracción desarrolladas [16].

Los fenómenos físicos que afectan la extracción de sustancias se ven afectados por la sonificación, ya que las sustancias de interés se encuentren en células internas o externas del tejido. Al reducir el tamaño de las partículas del material vegetal se aumenta el área de exposición al solvente y a la cavitación [17].

El uso del ultrasonido para la extracción del aceite esencial del ajo, ha demostrado numerosas ventajas, entre ellas, una disminución de la degradación térmica, además de que en el proceso de extracción se reduce el tiempo y la cantidad de solvente. El efecto mecánico del ultrasonido, provee una penetración mayor del solvente dentro de los tejidos de la célula, lo que favorece la obtención de componentes azufrados tales como los vinil ditíinos [18].

2.2.2 Extracción por hidrodestilación (HI)

La extracción de aceites esenciales por hidrodestilación, separa mediante calor, los diferentes componentes líquidos de una mezcla, aprovechando las diferencias de volatilidades de los compuestos por separar [19].

El aceite de ajo obtenido por metodologías que requieren calor y largos períodos de extracción (hidrodestilación), presentan una alta concentración de sulfuros de dialilo [20].

En investigaciones realizadas por Andreatta y colaboradores en 2004 sobre la extracción de aceite de ajo empleando metodologías tradicionales como la hidrodestilación y la extracción por fluidos supercríticos, se comprobó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), que el aceite de ajo obtenido por hidrodestilación y por fluidos supercríticos, mostraron algunas diferencias en los porcentajes de área de los picos cromatográficos de los compuestos mono, di y trisulfuros.

En la tabla 1 se describen los porcentajes de área del pico cromatográfico, obtenidos para los sulfuros de dialilo en cada método de extracción.

Tabla 1. Resultados del análisis CG-EM del aceite de ajo extraído por hidrodestilación y fluidos supercríticos

Compuesto	% de área del pico cromatográfico	
	Hidrodestilación	Fluidos supercríticos
Sulfuro de dialilo	2,783	2,207
Disulfuro de dialilo	34,276	25,838
Trisulfuro de dialilo	27,635	24,252

Los resultados anteriores, muestran que al utilizar la hidrodestilación como método de extracción del aceite de ajo, se aumenta la proporción de tener compuestos como los sulfuros de dialilo, en especial el disulfuro de dialilo (en mayor concentración), que utilizando la extracción por fluidos supercríticos, lo que hace que la hidrodestilación sea mejor método para extraer el principal componente de este aceite [21].

En otros estudios realizados por Calvo y colaboradores en 2004, se observó que el principal compuesto presente en el aceite de ajo obtenido por hidrodestilación, fue el disulfuro de dialilo. Esta cuantificación se llevó a cabo utilizando como técnica analítica la microextracción en fase sólida acoplada a CG-EM [22].

En un estudio realizado por Kimbaris y colaboradores en 2005 [23], se compararon tres métodos de extracción para la obtención del aceite de ajo: destilación con disolventes

(SDE), microondas asistido (MWHD) y ultrasonido asistido (USE), utilizando como disolventes en los tres métodos, éter etílico, hexano y acetato de etilo. Los resultados de los componentes azufrados más representativos presentes en el aceite de ajo, tales como disulfuro de dialilo (DADS), trisulfuro de dialilo (DATS), tetrasulfuro de dialilo (DATTS), 3-vinil-[4H]-1,2-ditiíno (3-VDT) y 2-vinil-[4H]-1,3-ditiíno (2-VDT) fueron comparados (Tabla 2).

En este estudio los tres métodos proporcionaron características cualitativas y cuantitativas diferentes, así, en los aceites a los cuales se les aplicó calor para la extracción, presentaron mayor concentración en compuestos de sulfuros de dialilo, mientras que los aceites que fueron extraídos a temperatura ambiente, presentaron una mayor concentración en vinil ditiíno y una baja concentración en sulfuros de dialilo; adicionalmente, al comparar SDE y MWHD con USE, en este último se disminuyó el daño por la degradación térmica de los compuestos volátiles presentes en el ajo.

Tabla 2. Resultados (g aceite / 100 g de ajo) obtenidos de la extracción del aceite de ajo por SDE, MWHD y USE, usando éter etílico, hexano y acetato de etilo.

Compuestos azufrados	Éter etílico			Hexano			Acetato de etilo		
	SDE*	MWHD*	USE**	SDE	MWHD	USE	SDE	MWHD	USE
Disulfuro de dialilo (DADS)	28,4	17,6	8,2	25,5	17,8	7,3	23,1	6,8	6,0
Trisulfuro de dialilo (DATS)	20,4	9,1	0,2	18,2	9,5	1,3	22,1	14,1	0,7
Tetrasulfuro de dialilo (DATTS)	0,7	0,1	-	0,5	0,3	0,1	0,6	0,4	-
3-vinil-[4H]-1,2-ditiíno (3-VDT)	4,0	15,9	32,7	4,5	15,4	26,3	4,5	14,5	25,7
2-vinil-[4H]-1,3-ditiíno (2-VDT)	5,5	17,7	38,1	7,8	23,2	43,2	8,7	27,7	34,4

* Extracción con calor, ** Extracción a T ambiente.

2.3 Evaluación de la capacidad toxicológica

Los insecticidas naturales derivados de los extractos de las plantas, han sido usados para el control de plagas desde la antigüedad [24]. Una de las razones para buscar insecticidas en plantas naturales, es que estas se caracterizan por tener gran número de sustancias químicas que pueden actuar como repelente contra insectos [25]; como ejemplo de ello, tenemos la *Lantana camara* L. (Verbenaceae), cuyo extracto floral presenta actividad repelente contra mosquitos del género *Aedes* (Diptera: Culicidae) [26].

En la sierra del Perú se usa tradicionalmente una planta de la familia de las labiadas llamada "muña", para proteger a la papa almacenada contra las polillas de la papa y el gorgojo de los Andes [27]. Otras plantas con acción repelente son la ruda, que controla al escarabajo, la salvia, que controla la polilla del repollo y la mosca de la zanahoria, y el tomillo, que controla al gusano del repollo [28].

El ajo (*Allium sativum* L.), al tener productos azufrados como la aliína, la alicina y los disulfuros de dialilo con propiedades repelentes, ha resultado eficaz en la reducción de daños por insectos en cultivos de algodón [29].

En investigaciones realizadas por Ramakrishnan y colaboradores en 1989, para demostrar el efecto insecticida del ajo, se comprobó que el extracto de ajo (*Allium sativum* L.) a una concentración de 50 mg/L es tóxico en un 90%, contra la larva del mosquito *Culex pipiens* después de ocho horas de exposición [30].

En estudios efectuados por Kirtaniya y colaboradores en 1980 [31] con aceite de ajo obtenido en una fracción metanólica, se reportó que los componentes del ajo fueron tóxicos para tres generaciones de larvas en algunas especies de mosquitos, entre ellas *Spodoptera litura*, *Euproctis sp* y *Culex sp*.

Ensayos biológicos de toxicidad realizados por Ho y colaboradores en 1996 [32] para comprobar los efectos del aceite de ajo como insecticida sobre *Tribolium castaneum* (Herbst) y *Sitophilus zeamais* (Motsch), determinaron que los adultos de *T. castaneum* fueron más susceptibles al aceite de ajo [en una concentración de 0,5 g/mL (=1,32 mg/cm²)] que las larvas, las cuales fueron más tolerantes con la edad; además, los adultos de *T. castaneum* fueron más susceptibles al aceite que los *S. zeamais* (Tabla 3).

Tabla 3. Susceptibilidad comparativa de larvas *T. castaneum* y adultos *S. zeamais* al aceite de ajo

Insecto	Especie / edad	CD (mg / cm ²) (95% de efectividad)	
		CD ₅₀	CD ₉₅
<i>T. castaneum</i>	Larva de 10 días	5,17	11,79
	Larva de 12 días	6,06	15,57
	Larva de 14 días	13,94	31,74
	Adultos	1,32	1,86
<i>S. zeamais</i>	Adultos	7,65	11,34

Estos y muchos otros estudios realizados [33]-[34], muestran la gran importancia de utilizar el aceite de ajo como un insecticida natural contra insectos y termitas.

2.4 Biología y comportamiento de *Tecia solanivora* (Polvony)

Tecia solanivora es un lepidóptero de la familia Gelichiidae, que en su estado larval habita los tubérculos de la papa; inicialmente raspa la superficie y penetra por debajo de la epidermis, luego va hacia su interior abriendo galerías mientras se alimenta, ocasionando un grave daño, el cual se ve reflejado por las grandes pérdidas en la producción. Las larvas son capaces de alimentarse de tubérculos en estado de descomposición y pueden encontrarse gran cantidad de ellas en un solo tubérculo. El ataque se acentúa en las épocas secas. A nivel regional, se le conoce como polilla guatemalteca, polilla gigante, guata o tomineja [35].

Como cualquier otro lepidóptero, la polilla guatemalteca tiene metamorfosis completa, pasando por huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3). Su ciclo de desarrollo varía entre 65 y 93 días, dependiendo principalmente de la temperatura ambiental. Los adultos viven de 15 a 20 días. Este insecto se caracteriza por tener una fácil adaptación a diferentes pisos altitudinales, comprendidos entre los 2000 y 3500 msnm, con una alta fecundidad de las hembras [36].

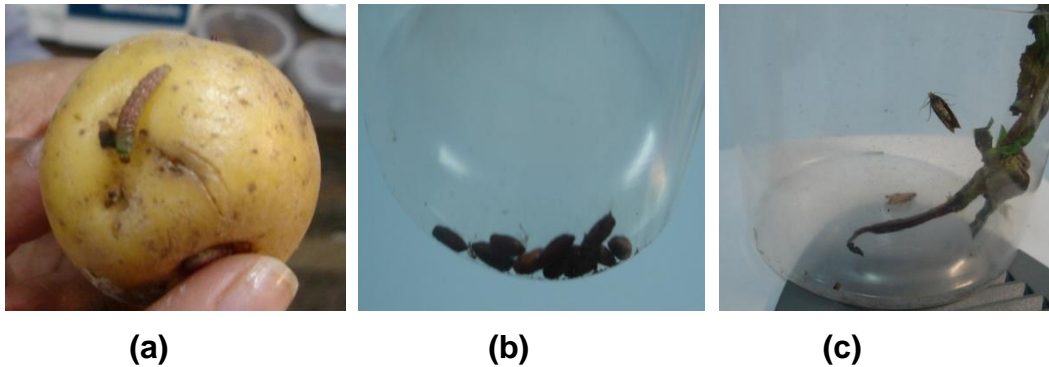


Figura 3. Estado de larva (a), pupa (b) y adulto (c) de la polilla *Tecia solanivora* (Fotos: Galvis, V. E).

2.5 Marco de referencia para el análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA), es un método estadístico que sirve para evaluar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los valores promedio entre tres ó más poblaciones estadísticas a comparar para cada variable de interés.

Cuando se requiere hacer un contraste de hipótesis para el caso de variables cuantitativas, se cuenta con dos tipos de análisis de varianza: 1. Los paramétricos, en los cuales se requieren que se cumplan estos dos supuestos: la normalidad de las distribuciones o poblaciones y 2. Los no paramétricos, que no exigen supuestos para ser aplicados [37].

Para evaluar la normalidad, la prueba más utilizada es la de Shapiro-Wilk (para $n \geq 30$) y la de Kolmogorov-Smirnov (para $n \leq 30$), debido a que estas pruebas calculan un estadístico W que contrasta si una muestra aleatoria x_1, x_2, \dots, x_n ,

procede de una distribución específicamente normal. Pequeños valores de W son una evidencia de salida de la normalidad; así, para evaluar la homogeneidad de varianza, se utiliza la prueba de Levene, debido a que este test aplica para el contraste de la hipótesis nula (H_0) de la homogeneidad de las varianzas, y además de rechazar la H_0 si la significancia de su estadístico es $< 0,05$ [37].

Después de verificar el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se pueden aplicar las pruebas paramétricas tales como: la prueba de Tukey, de Duncan, de Bonferoni o de Dunnet, que compara cada grupo con un grupo de control.

Al no lograr satisfacer los supuestos de ANOVA paramétricos, en la mayoría de los casos se utilizan métodos estadísticos no paramétricos de pruebas de hipótesis. Estos procedimientos se basan en las magnitudes comparativas de las mediciones y son efectivas y poderosas para detectar diferencias en los promedios de las poblaciones a comparar. De las pruebas no paramétricas, la más empleada es la prueba de Kruskal-Wallis, que es el equivalente de la prueba F de ANOVA paramétrica. Esta prueba se denomina también prueba de ANOVA para rangos, pues considera la magnitud de cada observación con relación a las otras observaciones. La prueba de Kruskal-Wallis se complementa con una prueba de comparación por parejas como la de U de Mann Whitney [37].

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar los componentes azufrados presentes en el aceite de ajo (*Allium sativum* L.) cultivado en el municipio de Silvia, Departamento del Cauca, y que actúan como insecticidas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Evaluar la eficiencia de los procedimientos hidrodestilación y ultrasonido en la extracción del aceite esencial del ajo (*Allium sativum* L.).

3.2.2. Estandarizar una metodología analítica mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para identificar los componentes volátiles presentes en el aceite de ajo.

3.2.3. Cuantificar uno de los componentes activos del aceite de ajo, disulfuro de dialilo, utilizando CG-EM.

3.2.4. Realizar un análisis estadístico de los resultados obtenidos por medio de análisis ANOVA factorial, complementado con la respectiva prueba de comparaciones múltiples.

3.2.5. Comprobar la acción insecticida de los componentes presentes en el aceite de ajo, mediante un ensayo biológico preliminar realizado con *Tecia solanivora* (Polvony), plaga que ataca al cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.).

4. METODOLOGÍA

4.1 ZONA DE ESTUDIO

4.1.1 Ubicación geográfica

La muestra de ajo para los análisis, fue recolectada en la finca Sierra Morena, ubicada a 2521 msnm, en la vereda Alto de los Tróchez, la cual pertenece al resguardo indígena de Guambía del municipio de Silvia, Departamento del Cauca; el lugar se caracteriza por tener una temperatura promedio de 12 °C y una humedad relativa del 75%.

El periodo de cultivo del ajo en esta región, está entre 6 y 8 meses. La mayor cosecha se dá en el mes de abril, aunque generalmente en todos los meses del año se puede cosechar ajo.

4.1.2 Muestreo

Teniendo en cuenta la distribución de las plantas, se realizó un muestreo al azar, en una hectárea de cultivo para obtener una muestra compuesta y representativa de toda la cosecha.

Una muestra del material vegetal fue llevada al herbario de la Universidad del Cauca, donde el botánico M.Sc. Bernardo Martínez, asignó el código 01 para el ajo (*Allium sativum* L.) cultivado en el municipio de Silvia, Departamento del Cauca.

4.1.3 Recolección

Los ajos cultivados se arrancaron de la tierra y se limpiaron de hojas y flores, como se muestra en la figura 4.



Figura 4. Recolección del ajo en el sitio del muestreo. (Fotos: Galvis, V. E.)

4.1.4 Preparación y tratamiento de la muestra

La muestra húmeda sin cáscara y limpiada manualmente, se almacenó en bolsas plásticas y se mantuvo refrigerada a una temperatura de 4 °C hasta el momento de realizar el procedimiento de extracción del aceite esencial.

4.2 OBTENCIÓN DEL ACEITE DE AJO

Para la obtención del aceite de ajo, se evaluaron los métodos de hidrodestilación y ultrasonido.

4.2.1 Hidrodestilación (HI)

100 g de ajo sin cáscara, cortados en finas capas y lavados con agua destilada, se adicionaron a un balón de 750 mL, que contenía 200 mL de agua destilada y se calentó hasta ebullición durante dos horas. La mezcla de agua-aceite se recogió en un erlenmeyer de 125 mL sobre un baño de agua-hielo; el aceite se extrajo con la adición de 25 mL de éter etílico (99,9%, Mallinckrodt) en un embudo de separación; este mismo procedimiento se realizó dos veces más, utilizando un volumen final de disolvente de 75

mL. Finalmente, la fase orgánica fue lavada con una porción de 5 mL de una solución de cloruro de sodio (4,4M; 99,9%, Aldrich Chemical Co, Inc.).

A la fase orgánica se le añadió 0,5 g de sulfato de sodio anhidro (99,5%, Mallinckrodt). Para evaporar el disolvente y concentrar el aceite, se realizó una purga con nitrógeno en el erlenmeyer sobre un baño de agua-hielo, hasta obtener un volumen final de 10 mL aproximadamente. El ensayo de extracción se realizó por triplicado.

En la figura 5 se muestra el montaje de la hidrodestilación.



Figura 5. Montaje de extracción por hidrodestilación (Foto: Galvis, V. E.)

4.2.2 Extracción asistida por ultrasonido (US)

La metodología empleada para llevar a cabo la extracción del aceite de ajo por ultrasonido, fue tomada del trabajo reportado por Kimbaris y colaboradores [23]; la extracción se llevó a cabo en un baño de ultrasonido (BRANSON, 1510), en el modo de sonicación indirecta, a una frecuencia de 90 KHz y temperatura de 20 °C. Para ello, 100 g de ajo sin cáscara, cortado en finas capas, se agregaron a un erlenmeyer de 250 mL que contenía 100 mL de agua destilada y 50 mL de éter etílico; el tiempo de sonicación fue de 30 min. Seguidamente, la fase orgánica se adicionó a un embudo de separación que contenía 20 mL de solución de cloruro de sodio (4,4M). La fase orgánica fue

recolectada, y de nuevo llevada al erlenmeyer que contenía el material vegetal, para sonificar por 30 minutos más; una vez terminado el proceso de sonicación, la fase orgánica fue adicionada en un embudo de separación que contenía 20 mL de solución de cloruro de sodio; la separación se realizó inmediatamente. El procedimiento finalizó adicionando 0,5 g de sulfato de sodio anhidro a la fase orgánica en el erlenmeyer, además de evaporar y concentrar el aceite con una purga de nitrógeno hasta obtener un volumen de 10 mL, aproximadamente.

El mismo procedimiento descrito se repitió con otras muestras de ajo, pero variando el tiempo de sonicación a 45 y 60 minutos y el disolvente (Hexano, Grado analítico, Fischer chemicals). Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Los aceites obtenidos por hidrodestilación y ultrasonido, fueron depositados en recipientes ámbar y almacenados bajo refrigeración a una temperatura de 4 °C hasta el momento de ser inyectados en el cromatógrafo de gases.

4.2.3 Caracterización organoléptica del aceite de ajo extraído por hidrodestilación y ultrasonido

Una vez obtenidos los aceites empleando las dos metodologías de extracción (HI y US), se realizó una caracterización organoléptica a los aceites de ajo, para evaluar diferencias en olor y color entre ellos.

4.3 PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO CG-EM PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS AZUFRADOS PRESENTES EN ACEITE DE AJO

A partir de las diferentes referencias citadas anteriormente [19]-[20]-[21]-[22]-[23] acerca de las condiciones para la cuantificación de los compuestos azufrados presentes en el aceite de ajo por medio de la técnica CG-EM, se optimizaron las temperaturas del detector e inyector, la rampa de temperatura de la columna y el volumen de la muestra a inyectar.

Para ello, se preparó una solución de concentración de 1000 mg/L del disulfuro de dialilo en éter etílico, con la cual se realizaron las inyecciones respectivas para encontrar las condiciones óptimas.

La estandarización del método analítico CG-EM y la identificación de los compuestos presentes en los aceites de ajo, fueron evaluados en un cromatógrafo de gases Trace GC Ultra (dos puertos de inyección, split/splitless y *on-column*; servido por un automuestreador) acoplado a un espectrómetro de masas Thermo modelo DSQ II, equipado con fuente de iones de impacto electrónico y analizador de iones cuadrupolo. La energía de ionización fue 70 eV.

Las condiciones de trabajo que ofrecieron picos gaussianos con buena separación entre ellos, se describen a continuación:

- T. de Detector: 300 °C
- T. Inyector: 250 °C, modo Split 1:30

- Rampa de temperatura de la columna (capilar WCOT 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm): 40 °C por 5 min., luego se incrementó a 150 °C a una velocidad de 3,0 °C/min., y finalmente se aumentó hasta 250 °C a una velocidad de 10 °C/min.
- Flujo: 1,0 mL / min
- Gas de arrastre: Helio
- Volumen de muestra: 4 µL

4.4 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO

Una vez definidos los parámetros de trabajo, se preparó la curva de calibración del patrón disulfuro de dialilo, en concentraciones de 39, 312, 625, 1250, 2500, 4000 y 5000 mg/L en éter etílico (99,9%, Mallinckrodt) y hexano (Grado analítico, Fischer chemicals). Cada patrón se inyectó cinco veces con automuestreador y se relacionó el área del pico cromatográfico versus concentración.

4.4.1 Preparación de la curva de calibración

Para la cuantificación del disulfuro de dialilo en el aceite de ajo extraído por HI y US, se preparó una solución stock de disulfuro de dialilo de concentración 5000 mg/L en éter etílico y hexano; para ello, se adicionaron 0,155 mL de disulfuro de dialilo (80%, Aldrich Chemical Co, Inc., $\rho = 1,008 \text{ g/L}$), a un balón aforado de 25 mL. La solución se aforó con éter etílico. Este mismo procedimiento se realizó utilizando hexano.

A partir de la solución stock de 5000 mg/L, se prepararon los siguientes estándares de disulfuro de dialilo, en balones aforados de 10 mL, enrazando con el disolvente (Tabla 4).

Tabla 4. Volúmenes empleados de patrón de concentración 5000 mg/L, para preparar la curva de calibración empleada en la cuantificación de disulfuro de dialilo

Volumen de la solución stock de disulfuro de dialilo de 5000 mg/L (mL)	Concentración final del estándar de disulfuro de dialilo (mg/L)
0,078	39
0,624	312
1,25	625
2,5	1250
5,0	2500
8,0	4000

Los valores de concentración empleados en la curva de calibración (39 a 5000 mg/L) para la cuantificación del disulfuro de dialilo fueron propuestos al realizar un análisis previo a los aceites de ajo en donde se midió aproximadamente el área del compuesto a cuantificar.

A partir de una solución stock de 1000 mg/L de patrón, se realizaron los cálculos respectivos para obtener una curva de calibración que cubriera las distintas concentraciones de disulfuro de dialilo que pudieran tener los diferentes aceites de ajo obtenidos por las dos metodologías de extracción (HI y US).

4.4.2 Parámetros estadísticos

4.4.2.1 Intervalo lineal

La linealidad de las curvas de calibración se evaluó en términos del coeficiente de correlación momento-producto (R), del coeficiente de determinación (R^2), el coeficiente de variación (CV) y el factor de respuesta (β).

4.4.2.2 Sensibilidad analítica

Los parámetros empleados para determinar la sensibilidad analítica fueron los límites de detección y cuantificación que se describen a continuación:

Para calcular el límite de detección y el límite de cuantificación, se inyectó un blanco (10 veces; éter etílico y hexano) y tres soluciones estándar de 39, 312 y 625 mg/L; se calculó la mínima concentración de disulfuro de dialilo detectable y cuantificable por el método CG-EM.

4.4.2.3 Precisión

Con el fin de analizar el grado de concordancia entre los datos individuales obtenidos cuando el método se aplica repetidamente, cada muestra (Éter 30.1, Hex. 30.2, Hid. 2) y/o estándar (5000 mg/L) se inyectó cinco veces, determinándose la desviación estándar (s), la desviación estándar relativa (DSR) y el coeficiente de variación (CV).

La precisión se evaluó a dos niveles: Repetibilidad y reproducibilidad.

4.4.2.3.1 Repetibilidad

Fue analizada realizando inyecciones durante cinco días del estándar de disulfuro de dialilo de concentración de 5000 mg/L (en éter etílico) por el mismo analista. El estándar se preparó el primer día de trabajo y se conservó bajo refrigeración para ser inyectada durante los cinco días siguientes, bajo las mismas condiciones de operación.

El mismo procedimiento fue realizado para las 3 muestras de aceite de ajo: Éter 30.1, Hex. 30.2 e Hid. 2.

4.4.2.3.2 Reproducibilidad

Se expresó como la precisión entre los resultados obtenidos mediante inyecciones durante 5 días del estándar de concentración de 5000 mg/L (en éter etílico) preparado diariamente.

Para las muestras seleccionadas de aceite de ajo, (Éter 30.1, Hex. 30.2 e Hid. 2) se realizó el mismo procedimiento.

4.4.2.4 Exactitud del método de extracción

Se evaluó como porcentaje de recuperación y consistió en adicionar cantidades conocidas de patrón de disulfuro de dialilo, a muestras de aceite de ajo (Éter 60.1, Hex. 60.1, Hid.2), las cuales presentaron la concentración más baja del compuesto azufrado disulfuro de dialilo por cada técnica de extracción.

Con los resultados obtenidos, se halló cada una de las concentraciones en la curva de calibración y se utilizó la ecuación 1 para calcular el porcentaje de recuperación:

$$\%R = \frac{\text{Cantidad recuperada}}{\text{Cantidad inicial} + \text{cantidad añadida}} * 100 \quad (1)$$

4.5 ESTABILIDAD DEL DISULFURO DE DIALILO

4.5.1 Estabilidad de los estándares

Para evaluar la estabilidad de los patrones en el tiempo, se preparó una solución patrón de disulfuro de dialilo de concentración 2500 mg/L en éter etílico. El tratamiento

consistió en preparar el patrón el primer día y almacenarlo (refrigeración 4 °C) [23] para leerlo durante 10 días consecutivos.

4.5.2 Estabilidad de las muestras

Para evaluar la estabilidad de las muestras (Hid. 2, Éter 30.2, Éter 45.2, Éter 60.2, Hex. 30.2, Hex. 45.2 y Hex. 60.2) en el tiempo, cada una se extrajo el primer día de trabajo y se almacenaron (refrigeración 4 °C) para leerlas durante 10 días consecutivos.

4.6 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS EN LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-EM

La identificación de los compuestos azufrados se llevó a cabo por comparación de sus espectros de masas con la librería NIST MS versión 2.0 y Wiley 7 del sistema GC/EM, tomando como base el ión molecular para cada compuesto.

4.7 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO EN MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-MS

Una vez definidas las condiciones de trabajo (numeral 4.3) y evaluados los parámetros estadísticos (numeral 4.4.2), se procedió a cuantificar la cantidad de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo obtenidas por hidrodestilación y ultrasonido.

4.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO OBTENIDO POR ULTRASONIDO

Para los análisis de regresión lineal, se empleó el programa Microcal Origin versión 6.0. La comparación de medias y los análisis de varianza ANOVA, fueron llevados a cabo utilizando el programa estadístico SPSS para Windows, versión 11.5.

El análisis estadístico, se llevó a cabo para las muestras de aceite de ajo extraídas con ultrasonido. Los datos se sometieron a análisis estadístico descriptivo y al análisis de

varianza ANOVA, para conocer si los datos se ajustaban o no a la normalidad y a la homogeneidad de varianzas mediante la aplicación del paquete estadístico.

4.9 ENSAYOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES

4.9.1 Preparación del aceite de ajo

El aceite de ajo empleado en los ensayos biológicos, se obtuvo con las mismas técnicas que se utilizaron para cuantificar los componentes activos del ajo: extracción por hidrodestilación y por ultrasonido.

La dosis aplicada fue de 2 mL del aceite obtenido por el proceso de hidrodestilación en 8 mL de agua destilada; la concentración utilizada fue del 20%. Este mismo procediendo se llevó a cabo utilizando 2 mL del aceite obtenido por la técnica de ultrasonido con hexano, por un periodo de 30 min (Hex.30.1).

4.9.2 Población evaluada en las pruebas biológicas

100 larvas y 56 adultos de *Tecia solanivora*, fueron colectadas, una parte directamente de los cultivos de papa en el municipio de Coconuco, Cauca y otra parte en el depósito de papa Santa Marta, ubicado en la plaza de mercado del barrio Bolívar del municipio de Popayán, Cauca.

4.9.3 Cuidado del material (Larvas y adultos de *Tecia solanivora*)

Todas las larvas y todos los adultos se depositaron en tarros plásticos (12 cm de diámetro x 7 cm de alto) considerada la unidad muestral (Figura 6).

Previamente se les realizó a los tarros, un orificio en la tapa y se les pegó una tela tipo tull para permitir el intercambio gaseoso. Cada recipiente contenía un círculo de papel absorbente del tamaño de la base, tres porciones de papa amarilla previamente lavada

y una mota de algodón con agua, para permitir que los insectos tuvieran una dieta que les permitiera mantenerse alimentados durante el tiempo del ensayo.

4.9.4 Diseño del ensayo

El diseño del ensayo consistió de dos tratamientos más un testigo o blanco. El tratamiento uno (T1) fue el aceite de ajo extraído por hidrodestilación y el tratamiento dos (T2) el aceite de ajo extraído por ultrasonido (Hex.30.1). Se escogió esta extracción, ya que fue la que originó la mayor concentración de disulfuro de dialilo entre los aceites obtenidos por ultrasonido de acuerdo a las mediciones preliminares realizadas en el análisis CG-EM.

A los testigos (TE) se les asperjó agua destilada.

4.9.4.1 Ensayo con larvas de *Tecia solanivora*

Para el ensayo con las larvas, se hicieron cuatro repeticiones por tratamiento, teniendo cuatro unidades muestrales para el tratamiento con el aceite de ajo extraído por hidrodestilación (T1:1, T1:2, T1:3, T1:4) y cuatro unidades muestrales para el tratamiento con el aceite de ajo extraído por ultrasonido (T2:1, T2:2, T2:3, T2:4) (Figura 6); en cada unidad muestral habían cinco larvas. Para el caso de los testigos, se tuvieron tres unidades muestrales, cada una con cinco larvas (TE1, TE2, TE3).



Figura 6. Unidad muestral con larvas aplicando el tratamiento T1, del ensayo biológico con *T. solanivora* (Fotos: Galvis, V. E).

4.9.4.2 Ensayo con adultos de *Tecia solanivora*

En el caso de los adultos, se hicieron tres repeticiones por tratamiento, teniendo tres unidades muestrales para el tratamiento con el aceite de ajo extraído por hidrodestilación (T1:1A, T1:2A, T1:3A) y tres unidades muestrales para el tratamiento con el aceite de ajo extraído por ultrasonido (T2:1A, T2.2A, T2:3A); en cada unidad habían 6 ó 7 adultos. Para los testigos, se tuvieron tres unidades muestrales cada una con 6, 5 y 5 adultos (TE1A, TE2A, TE3A).

El material biológico (larvas y adultos de *Tecia solanivora*) se dejó en el laboratorio de BICAMSA, el cual presentó unas condiciones de temperatura promedio de 19°C y una humedad relativa entre 67 y 70%.

4.9.5 Aplicación del aceite

Para realizar la aspersión de la solución del aceite de ajo extraído por hidrodestilación, se colocaron sobre el papel las cinco larvas y las tres porciones de papa de cada unidad muestral. Enseguida se realizaron tres aplicaciones con un micro aspersor plástico, cuyo volumen total de la solución aplicada fue de 1 mL de la solución, con tamaño de gota 0,1 mL.

Una vez aplicado el producto sobre las larvas, se introdujeron de nuevo al recipiente, se taparon y se dejaron en reposo. Cada recipiente fue debidamente rotulado con la información correspondiente.

Este mismo procedimiento se repitió sobre los adultos y realizando aplicaciones con el aceite de ajo extraído por ultrasonido, por cada unidad muestral.

En la tabla 5 se describe el bioensayo realizado.

Tabla 5. Descripción del diseño del bioensayo realizado sobre las larvas y los adultos de *T. solanivora*.

Identificación	Ciclo de vida del insecto	Tratamiento aplicado	Número de individuos por unidad muestral
T 1:1	Larva	Hidrodestilación ^a	5
T 1:2	Larva	Hidrodestilación	5
T 1:3	Larva	Hidrodestilación	5
T 1:4	Larva	Hidrodestilación	5
T 2:1	Larva	Ultrasonido ^b	5
T 2:2	Larva	Ultrasonido	5
T 2:3	Larva	Ultrasonido	5
T 2:4	Larva	Ultrasonido	5
T E 1	Larva	Agua destilada	5
T E 2	Larva	Agua destilada	5
T E 3	Larva	Agua destilada	5
T 1:1A	Adulto	Hidrodestilación	7
T 1:2A	Adulto	Hidrodestilación	7
T 1:3A	Adulto	Hidrodestilación	6
T 2:1A	Adulto	Ultrasonido	7
T 2:2A	Adulto	Ultrasonido	7
T 2:3A	Adulto	Ultrasonido	6
T E 1A	Adulto	Agua destilada	6
T E 2A	Adulto	Agua destilada	5
T E 3A	Adulto	Agua destilada	5

^a Aceite extraído por hidrodestilación

^b Aceite extraído por ultrasonido

El pre ensayo se inició el día Miércoles 1 de Abril de 2009 a las 4:30 p.m. Se realizaron observaciones sobre su comportamiento y actividad a las 6, 12, 24 y 48 horas después de iniciado el ensayo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 OBTENCIÓN DEL ACEITE DE AJO

5.1.1 Caracterización organoléptica del aceite de ajo extraído por hidrodestilación y ultrasonido

El aceite de ajo obtenido por hidrodestilación presentó un color amarillo oscuro y olor concentrado a ajo cocido; mientras el aceite de ajo extraído por ultrasonido no presentó color, su consistencia fue la de un líquido aceitoso con olor característico a ajo fresco; esta diferencia en las propiedades físicas de color y olor de los aceites extraídos puede estar relacionada con la degradación térmica de la enzima alinasa presente en los dientes de ajo, al estar sometida a altas temperaturas como en el caso de la extracción por hidrodestilación.

Estudios reportados [38] muestran que factores como el pH, la temperatura y el tiempo de calentamiento contribuyen a la formación de pigmentos solubles en agua, los cuales están asociados a múltiples procesos de descomposición de la enzima alinasa.

5.2 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO

5.2.1 Curva de calibración

Las soluciones estándar de disulfuro de dialilo fueron preparadas en el rango de concentraciones de 39 a 5000 mg/L en éter etílico y hexano; estas soluciones fueron empleadas en la construcción de una curva de calibración, en la cual se graficó la concentración de las soluciones estándar de disulfuro de dialilo versus el área bajo la curva del pico cromatográfico.

Las áreas (Y), promedios (\bar{Y}), desviaciones estándar (s) y coeficientes de variación (CV) obtenidos en las curvas de calibración se detallan en la Tabla 6.

El criterio del coeficiente de variación con el que se analizaron los resultados obtenidos en este trabajo, para su aceptación, fue del 5%.

Tabla 6. Áreas (Y), promedios (\bar{Y}), desviaciones estándar (s) y coeficientes de variación (CV) para las soluciones estándar de disulfuro de dialilo (rango de 39 a 5000 mg/L), preparadas en éter etílico y hexano.

Concentración (mg/L)	Área Éter (Y)	Promedio Éter (\bar{Y})	Área Hexano (Y)	Promedio Hexano (\bar{Y})
39	11813432	1,18593 E7 ($\pm 27519,90$) CV = 0,232%	11825643	1,18560 E7 ($\pm 19198,5$) CV = 0,162%
	11884503		11856012	
	11866577		11868739	
	11857483		11875630	
	11874599		11853723	
312	90383987	9,03747 E7 ($\pm 12136,90$) CV = 0,013%	90397364	9,03751 E7 ($\pm 21734,41$) CV = 0,024%
	90375290		90389584	
	90354679		90369483	
	90384789		90378212	
	90374638		90341293	
625	173480438	1,75376 E8 ($\pm 2300796,99$) CV = 1,312%	174175309	1,75333 E8 ($\pm 164181,1$) CV = 0,094%
	174956463		173976854	
	174926145		174349920	
	174172637		176574890	
	179345263		177590000	
1250	304923877	3,04931 E8 ($\pm 32289,20$) CV = 0,011%	304899840	3,04931 E8 ($\pm 47611,97$) CV = 0,015%
	304938915		304901237	
	304982814		304976031	
	304912663		304989320	
	304898799		304888793	
2500	620318401	6,20403 E8 ($\pm 304932,23$) CV = 0,049%	620210201	6,20440 E8 ($\pm 512889,60$) CV = 0,082%
	620724866		620924352	
	620692212		620863721	
	620283747		620193821	
	619998875		620009832	
4000	946542387	9,45531 E8 ($\pm 1395711,09$) CV = 0,148%	945746382	9,45678 E8 ($\pm 464173,3$) CV = 0,049%
	945588719		945998584	
	946752310		944876954	
	945540097		946001312	
	943234454		945768403	
5000	1184039274	1,18311 E9 ($\pm 2369426,25$) CV = 0,200%	1183841240	1,18366 E9 ($\pm 563865,02$) CV = 0,048%
	1182115768		1184129302	
	1183134638		1183009322	
	1186354677		1183121989	
	1179935678		1184210294	

En la figura 7 se graficaron las curvas de calibración de las soluciones estándar del disulfuro de dialilo vs el área bajo la curva del pico cromatográfico, preparadas en éter etílico y hexano.

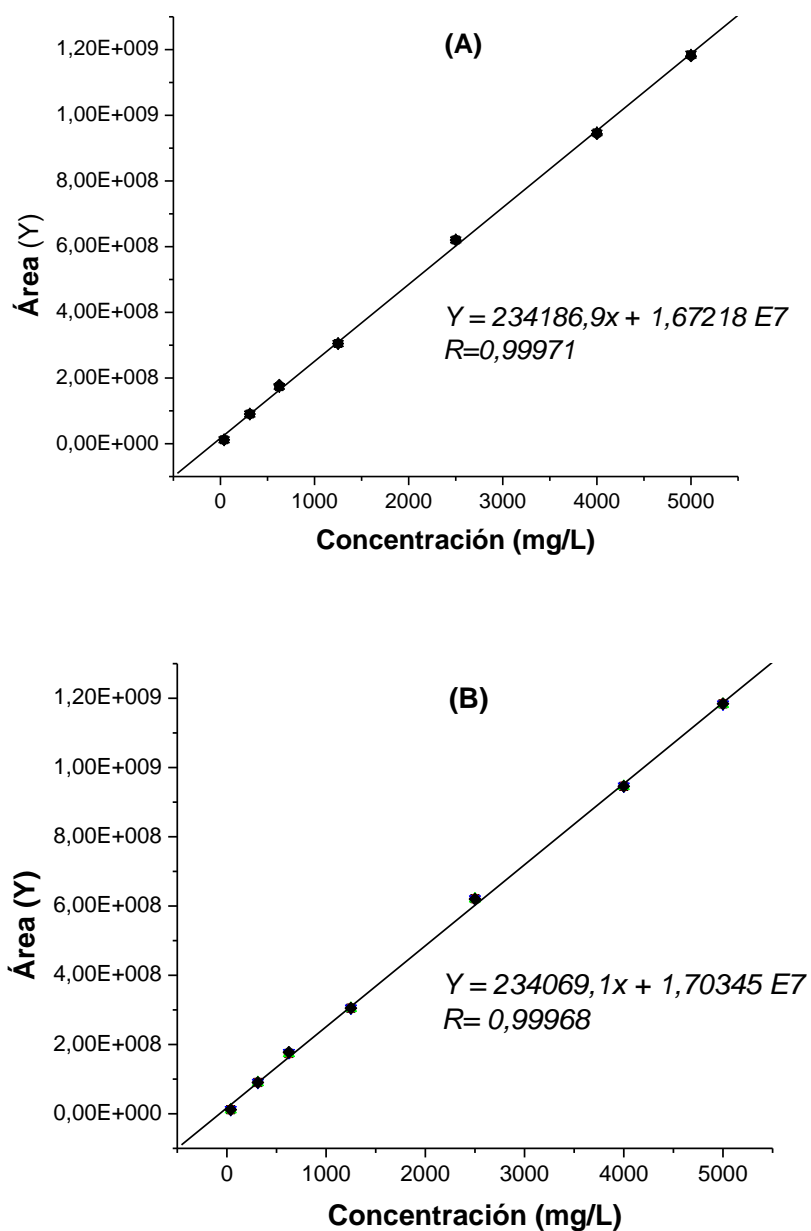


Figura 7. Curva de calibración del patrón disulfuro de dialilo en éter etílico (A) y hexano (B) por CG-EM.

5.2.2 Parámetros estadísticos

5.2.2.1 Intervalo lineal

De acuerdo a la curva de calibración analizada por el método de mínimos cuadrados (Figura 7) en el intervalo de concentraciones de 39 a 5000 mg/L de disulfuro de dialilo, la ecuación de la recta obtenida fue $Y = 234186,9x + 1,67218E7$, para la curva preparada en éter etílico y $Y = 234069,1x + 1,70345 E7$ para la curva preparada en hexano, donde x es la concentración en mg/L de disulfuro de dialilo inyectados, e Y son las áreas obtenidas; los coeficientes de correlación momento-producto R fueron de 0,99971 y 0,99968, los coeficientes de determinación R^2 0,99942 y 0,99936 y los coeficientes de variación fueron $\leq 5\%$.

Otro parámetro importante con el que se confirmó la correlación lineal entre X e Y en el modelo $Y = bx + a$, es la t de student para $n - 2$ grados de libertad [39] (Ecuación 8).

$$t_r = |r| \sqrt{\frac{(n-2)}{(1-r^2)}} \quad (8)$$

Se especifica una hipótesis nula H_0 , que plantea la no correlación lineal entre los valores de X e Y al 95 % de confianza.

En la tabla 7 se muestran los valores obtenidos de t_r para las curvas de calibración del disulfuro de dialilo preparadas en éter etílico y hexano; éstos se compararon con el de las tablas estadísticas, a un nivel de confianza del 95 % correspondiente a 2.57 [39]. Como t calculado es mayor que t crítico se rechaza la hipótesis nula, siendo la correlación lineal significativa al nivel de confianza escogido.

Tabla 7. Valores calculados de coeficiente de correlación (r) y t de student, en las curvas de calibración preparadas en éter etílico (Curva 1) y hexano (Curva 2).

Curva	r	t_r
1	0,99971	92,60
2	0,99968	88,15

Para confirmar la linealidad de las curvas de calibración, se analizó el comportamiento del factor de respuesta (β_i) en función de la concentración de los estándares utilizados en las curvas de calibración. Este factor corresponde a un estimado de la pendiente y se define mediante la siguiente ecuación:

$$\beta_i = \frac{y_i - a}{x_i} \quad (9)$$

Donde y_i es la señal analítica; a el intercepto de la línea y x_i la concentración del disulfuro de dialilo.

La figura 8 muestra la dispersión de los factores de respuesta en función de la concentración del disulfuro de dialilo en un rango de concentraciones entre 39 y 5000 mg/L preparada en éter etílico. Se observa que el factor de respuesta no depende de la concentración, lo cual se comprobó mediante una prueba estadística, aplicando la ecuación 10 para obtener los t_{calc} .

En la tabla 8 se resumen los resultados arrojados para las dos curvas de calibración.

$$t_{calc} = \frac{|b-0|\sqrt{n}}{s} \quad (10)$$

Donde b corresponde a la pendiente de la línea de tendencia, n el número de puntos y s la desviación estándar de la pendiente.

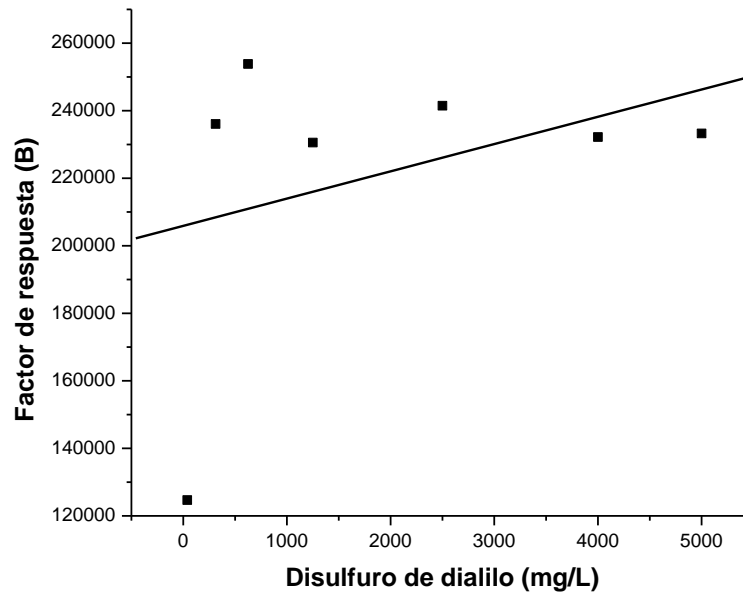


Figura 8. Comportamiento de β en función de las concentraciones del disulfuro de dialilo.

Tabla 8. Valores de $t_{crítico}$ y t_{calc} usados para determinar si las pendientes de la figura de β vs concentración difieren de cero.

	Curva 1	Curva 2
b	8,0754	7,4954
S_b	158491,5	158473,9
$t_{calculado}$	1,35 E-4	1,25 E-4
$t_{crítico}$	2,57	2,57

Como $t_{calculado}$ es menor que $t_{crítico}$ se acepta que el factor de respuesta no depende de la concentración.

Todo lo anterior indica que existe una relación lineal entre la concentración de los patrones de disulfuro de dialilo con el área de los picos cromatográficos; así, las ecuaciones de la recta que describen este comportamiento, se utilizaron para cuantificar el contenido de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo analizadas.

5.2.2.2 Sensibilidad analítica

La sensibilidad del método analítico utilizado en la cuantificación de disulfuro de dialilo, fue determinada con los límites de detección y de cuantificación. En la tabla 1 (Ver anexo 1) se muestran los datos de las áreas registrados para el blanco (éter etílico y hexano) y los estándares de disulfuro de dialilo, con sus respectivas desviaciones estándar (s), y coeficientes de variación (CV).

Los porcentajes de coeficientes de variación para los patrones fueron menores a 1,52%; para el blanco, el CV fue 19,97 y 18,66% para éter etílico y hexano, respectivamente.

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), se calcularon determinando el cociente del área promedio de cada patrón entre el área promedio del blanco, obteniendo de esta manera la relación señal/ruido para cada patrón, la cual se hizo corresponder a 3 veces para el límite de detección y a 10 veces para el límite de cuantificación.

El límite de detección del disulfuro de dialilo obtenido fue de 0,375 (\pm 0,015) mg/L, calculado como la relación señal/ruido en un factor de 3. Ésta es la menor concentración de disulfuro de dialilo que se puede detectar, mas no cuantificar en una muestra de aceite de ajo en las condiciones estipuladas.

El límite de cuantificación del disulfuro de dialilo obtenido fue de 1,25 (\pm 0,049) mg/L, el cual se calculó teniendo en cuenta la relación señal/ruido en un factor de 10. Esta concentración es la menor concentración de disulfuro de dialilo que se puede cuantificar y que se encuentra como límite inferior del intervalo lineal de trabajo.

Al analizar los resultados obtenidos para el límite de detección y cuantificación se observó que la concentración mínima detectable para la técnica analítica CG-EM fue

baja, indicando así una buena sensibilidad para detectar y cuantificar el disulfuro de dialilo presente en las muestras de aceite de ajo.

5.2.2.3 Precisión

La precisión hace referencia a la reproducibilidad y repetibilidad de un conjunto de medidas realizadas con el mismo método de cuantificación.

5.3.2.3.1 Repetibilidad

La repetibilidad cromatográfica (Tabla 9) fue evaluada por inyecciones repetidas (n=5) de un patrón de concentración de 5000 mg/L preparado en éter etílico y de muestras de aceite (Éter 30.1, Hex. 30.2 e Hid. 2), las cuales se prepararon el primer día de trabajo y se conservaron bajo refrigeración, para ser inyectadas durante los cinco días siguientes, bajo las mismas condiciones de operación; con los valores de las áreas encontrados se halló su respectiva concentración.

Tabla 9. Repetibilidad cromatográfica (n=5) de un estándar de disulfuro de dialilo de concentración 5000 mg/L preparado en éter etílico y de muestras de aceite medidos en 5 días consecutivos.

Muestra	Concentración					Parámetros estadísticos
	[ppm] _{día1}	[ppm] _{día 2}	[ppm] _{día 3}	[ppm] _{día 4}	[ppm] _{día 5}	
Estándar 5000 mg/L	4980 (± 8,67) CV =0,17%	4985 (± 3,35) CV =0,07%	4988 (± 6,32) CV =0,13%	4982 (± 9,60) CV =0,19 %	4990 (± 3,51) CV =0,07 %	4985 (± 4,12) CV = 0,08%
Éter 30.1	338 (± 0,24) CV =0,07%	338 (± 0,09) CV =0,03%	337 (± 0,16) CV =0,05%	338 (± 0,41) CV =0,12%	337 (± 0,11) CV =0,03%	337,6 (± 0,54) CV =0,16%
Hex.30.2	372 (± 3,75) CV =1,01%	376 (± 1,47) CV =0,39%	376 (± 0,69) CV =0,18%	377 (± 0,41) CV =0,11%	375 (± 0,44) CV =0,12 %	375,2 (± 1,92) CV =0,51%
Hid.2	3921 (± 1,37) CV =0,04%	3922 (± 0,73) CV =0,02%	3920 (± 1,60) CV =0,04%	3919 (± 1,63) CV =0,04%	3919 (± 1,76) CV =0,04%	3920,2 (± 1,30) CV =0,03%

Como se observa en la Tabla 9, las desviaciones estándar y el coeficiente de variación de las concentraciones leídas para el patrón de disulfuro de dialilo y para las muestras

de aceite son < 5% (valor aceptado en este estudio), lo cual indica que el método analítico para la cuantificación del disulfuro de dialilo presenta repetibilidad.

5.2.2.3.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad se examinó mediante las lecturas repetidas del área de un patrón de disulfuro de dialilo de concentración de 5000 mg/L en éter etílico y de las muestras de aceite (Éter 30.1, Hex. 30.2 e Hid. 2), las cuales se prepararon diariamente durante cinco días, bajo las mismas condiciones de operación.

En la Tabla 10 se muestran las concentraciones del estándar de 5000 mg/L y de las muestras de aceite, las desviaciones estándar y el coeficiente de variación para las inyecciones realizadas (n=5) durante los 5 días.

Tabla 10. Reproducibilidad cromatográfica (n=5) de un estándar de disulfuro de dialilo de concentración 5000 mg/L (en éter etílico) y de las muestras de aceite.

Muestra	Concentración					Parámetros estadísticos
	[ppm] _{día1}	[ppm] _{día 2}	[ppm] _{día 3}	[ppm] _{día 4}	[ppm] _{día 5}	
Estándar 5000 mg/L	4980 (± 9,96) CV=0,20 %	4985 (± 2,77) CV= 0,05	4988 (± 6,26) CV=0,12 %	4981 (± 9,60) CV =0,19 %	4990 (± 3,58) CV = 0,07 %	4984,8 4,32 CV= 0,09%
Éter 30.1	338 (± 4,47E-3) CV=0,03%	338 (± 0,07) CV=0,02%	339 (± 0,18) CV =0,05%	338 (± 0,03) CV=0,03%	338 (± 0,07) CV =0,02%	338,2 (± 0,44) CV =0,13%
Hex.30.2	380 (± 1,94) CV=0,51 %	380 (± 1,02) CV=0,27%	380 (± 1,15) CV=0,30%	379 (± 1,77) CV=0,47 %	378 (± 1,26) CV=0,33 %	379,4 (± 0,89) CV=0,23%
Hid.2	3929 (± 1,64) CV=0,04 %	3928 (± 0,14) CV=0,03%	3928 (±1,84) CV=0,05 %	3929 (± 1,98) CV=0,05 %	3926 (± 2,04) CV=0,05 %	3928 (± 1,22) CV=0,03%

La Tabla 10 indica que existe reproducibilidad del método en la cuantificación de disulfuro de dialilo en el estándar de 5000 mg/L en éter etílico y en las muestras de aceite de ajo, debido a que las desviaciones estándar y los coeficientes de variación fueron 0,09; 0,13; 0,23 y 0,03%, respectivamente, concluyendo así que el método es reproducible.

5.2.2.4 Exactitud del método de extracción

La exactitud del método de extracción se analizó adicionando 0,25; 0,4 y 0,7 mL de patrón de disulfuro de dialilo de concentración 625 mg/L a una muestra de aceite de ajo (Éter 60.1, Hex.60.1, Hi.2), las cuales contenían la más baja concentración de disulfuro de dialilo (227,4, 249,6 y 3922,1 mg/L) por cada técnica de extracción. A las muestras se les midió la concentración correspondiente al disulfuro de dialilo sin adición de patrón y con adición de patrón; igualmente, se midió el área de las alícuotas de adición. A cada una de las mediciones anteriores se le calcularon los miligramos de disulfuro de dialilo presentes en la solución, los cuales se reemplazaron en la ecuación 1 (Numeral 4.4.2.4).

Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de recuperación en las muestras de aceite de ajo.

Muestra	Cantidad inicial	Cantidad añadida	Cantidad recuperada	Recuperación
	mg de disulfuro de dialilo			%
Éter 60.1	0,057	0,156	0,2069	97,15
	0,057	0,250	0,3011	98,07
	0,057	0,437	0,4750	96,15
				97,12 ($\pm 1,00$)
Hex. 60.1	0,0624	0,155	0,2121	97,60
	0,0624	0,249	0,3039	97,59
	0,0624	0,436	0,4952	99,35
				98,18 ($\pm 1,01$)
Hid.2	0,9805	0,156	1,108	97,57
	0,9805	0,250	1,210	98,36
	0,9805	0,437	1,3652	96,31
				97,41 ($\pm 1,03$)

Según la Tabla 11, los porcentajes de recuperación del método en las tres adiciones, en las tres muestras, fueron altos, mayores al 95%.

Para comprobar qué tan alejados se encuentran estos datos del 100%, se realizó una prueba de significancia estadística para lo cual se aplicó la siguiente ecuación:

$$t = (\bar{x} - \mu)\sqrt{n}/s \quad (11)$$

Donde \bar{x} = media muestral, s = desviación estándar muestral, n = tamaño muestral.

La media de los porcentajes de recuperación es de 97,57% y la desviación estándar de 0,8478%. Si se adopta la hipótesis nula de que no hay error sistemático, es decir, $\mu = 100\%$ y se aplica la ecuación 11, resulta $t_{calculado} = 4.05$. El valor crítico para $t = 4.30$ ($P= 0.05$). Puesto que el valor observado de t es menor que el crítico, la hipótesis nula se acepta: no hay error sistemático.

Lo anterior permite concluir que el método presenta buena exactitud.

5.3 ESTABILIDAD DEL DISULFURO DE DIALILO

5.3.1 Estabilidad de los estándares

En la tabla 12 se dan a conocer los datos obtenidos para la solución patrón de 2500 mg/L (en éter etílico) con la cual se midió la estabilidad del estándar de disulfuro de dialilo. El patrón se preparó el primer día y se almacenó en refrigeración a 4 °C, para ir midiendo su concentración, mediante el método indicado en el numeral 4.3, durante 10 días consecutivos.

Tabla 12. Concentraciones para el estándar de disulfuro de dialilo (2500 mg/L) evaluados durante 10 días consecutivos, para la prueba de estabilidad.

Día	[ppm]
1	2573,8
2	2573,7
3	2573,6
4	2573,7
5	2573,0
6	2573,0
7	2572,2
8	2571,7
9	2571,6
10	2571,1
s	1,01
DSR	3,93 E-4
CV	0,04 %

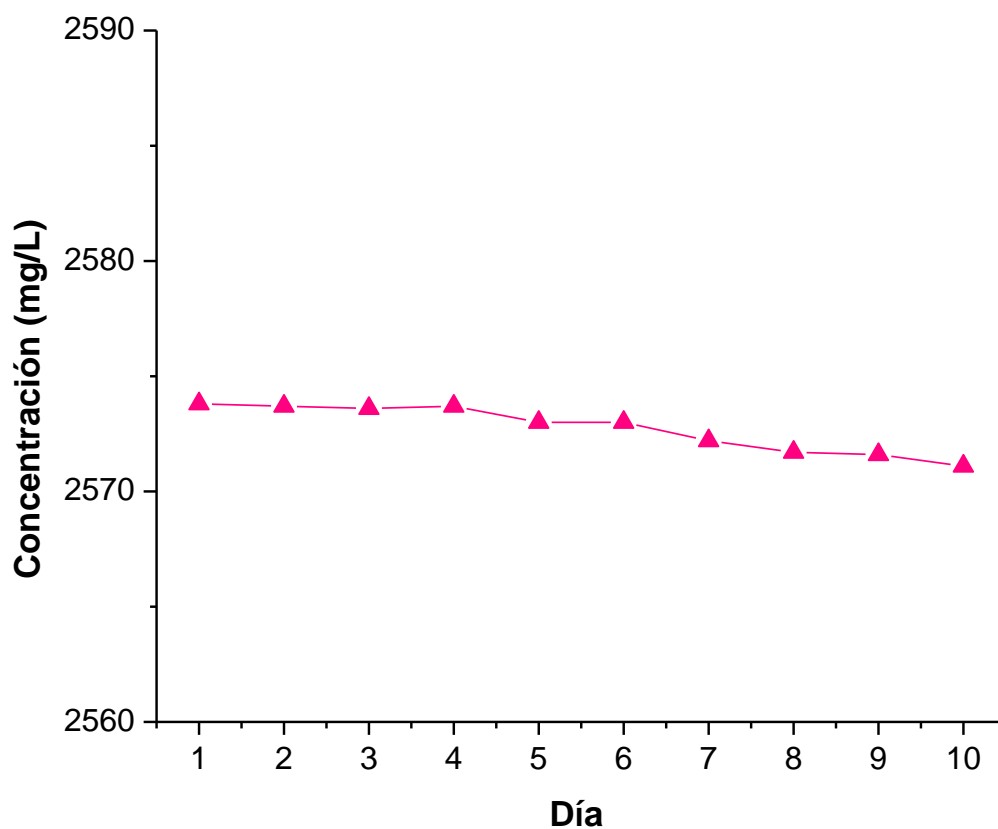


Figura 9. Estabilidad del patrón de concentración 2500 mg/L (en éter etílico).

Según los valores mostrados en la tabla 12 no existen diferencias significativas entre los diez días analizados (Kolmogorov-Smirnov: $p = 0,200$). La desviación estándar ($\pm 1,01$) y el coeficiente de variación (0,04%) fueron bajos, lo cual permite considerar que la solución es estable y que se puede utilizar para los análisis hasta por un periodo de diez días.

5.3.2 Estabilidad de las muestras

Para el estudio de la estabilidad en muestras se escogió una por tratamiento de obtención del aceite de ajo (Hid. 2, Éter 30.2, Éter 45.2, Éter 60.2, Hex. 30.2, Hex. 45.2 y Hex. 60.2); cada muestra se preparó el primer día y se almacenó en refrigeración a 4 °C para leerla (ver 4.3) durante 10 días consecutivos.

A continuación se presentan las tablas 13, 14 y 15 de resultados, en donde se reporta la concentración del disulfuro de dialilo medido cada día y el porcentaje de pérdida del compuesto en las muestras de aceite de ajo.

Tabla 13. Concentraciones del disulfuro de dialilo de la muestra Hid.2 durante 10 días, para la prueba de estabilidad.

Día	[mg/L]	Pérdida (%)
1	3923,8	-
2	3921,9	0,048
3	3921,7	0,056
4	3921,0	0,073
5	3920,9	0,075
6	3920,5	0,086
7	3919,9	0,101
8	3918,2	0,143
9	3916,3	0,192
10	3910,7	0,335
s	3,70	
DSR	9,44 E-4	
CV	0,09%	

Tabla 14. Concentraciones del disulfuro de dialilo de las muestras Éter 30.2, Éter 45.2 y Éter 60.2, para la prueba de estabilidad.

Día	Muestra					
	Éter 30.2		Éter 45.2		Éter 60.2	
	[mg/L]	Pérdida (%)	[mg/L]	Pérdida (%)	[mg/L]	Pérdida (%)
1	344,2	-	263,7	-	211,9	-
2	344,1	0,029	263,6	0,037	211,8	0,047
3	344,0	0,058	263,4	0,113	211,7	0,094
4	344,0	0,058	263,4	0,113	211,7	0,094
5	343,7	0,145	263,4	0,113	211,6	0,141
6	343,7	0,145	263,3	0,151	211,5	0,188
7	343,7	0,145	263,2	0,189	211,5	0,188
8	343,7	0,145	262,9	0,303	211,4	0,235
9	343,6	0,174	262,9	0,303	211,3	0,283
10	343,6	0,174	262,9	0,303	211,2	0,330
s	0,22		0,29		0,22	
DSR	6,44 E -4		1,10 E -3		1,04 E -3	
CV	0,06 %		0,11 %		0,10%	

Tabla 15. Concentraciones del disulfuro de dialilo de las muestras Hex.30.2, Hex.45.2 y Hex.60.2, para la prueba de estabilidad.

Día	Muestra					
	Hex. 30.2		Hex. 45.2		Hex. 60.2	
	[mg/L]	Pérdida (%)	[mg/L]	Pérdida (%)	[mg/L]	Pérdida (%)
1	378,1	-	258,9	-	246,4	-
2	377,5	0,158	258,8	0,038	246,3	0,040
3	375,8	0,608	258,7	0,077	246,3	0,040
4	375,8	0,608	258,6	0,116	246,2	0,081
5	375,7	0,634	258,6	0,116	246,0	0,162
6	375,7	0,634	258,4	0,193	246,0	0,162
7	374,9	0,846	258,3	0,231	245,8	0,243
8	372,6	1,455	258,3	0,231	245,7	0,284
9	372,0	1,613	258,2	0,270	245,6	0,324
10	371,8	1,666	258,1	0,308	245,5	0,365
s	2,19		0,27		0,32	
DSR	5,84 E-3		1,04 E-3		1,30 E -3	
CV	0,58%		0,10 %		0,13	

Como se observa en las tablas 13, 14 y 15 las muestras no varían significativamente (Kolgomirov-Smirnov: $p = 0,100$) la proporción de disulfuro de dialilo durante los diez días de análisis. El porcentaje de pérdida del compuesto disulfuro de dialilo en los

aceites analizados del primer día al décimo día no fue significativo (Kolgomirov-Smirnov: $p = 0,100$). De esta forma, se concluye que la cantidad de compuesto que se pierde en este periodo no alcanza un valor superior al 1%, lo cual permite aceptar el análisis y por lo tanto, se considera que las muestras presentan estabilidad para un periodo de tiempo de 10 días.

5.4 IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS AZUFRADOS EN LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-EM

Los compuestos azufrados presentes en los aceites de ajo obtenidos por hidrodestilación y ultrasonido fueron identificados con la librería NIST MS versión 2.0 y Wiley 7 del sistema CG-EM (numeral 4.6); adicionalmente, los picos de los espectros de masas obtenidos fueron analizados para corroborar las fragmentaciones de los compuestos azufrados encontrados.

5.4.1 Identificación de compuestos azufrados en aceite de ajo obtenido por hidrodestilación

En la Figura 12 y en la tabla 16 se muestran los compuestos azufrados presentes en el aceite de ajo obtenido por hidrodestilación.

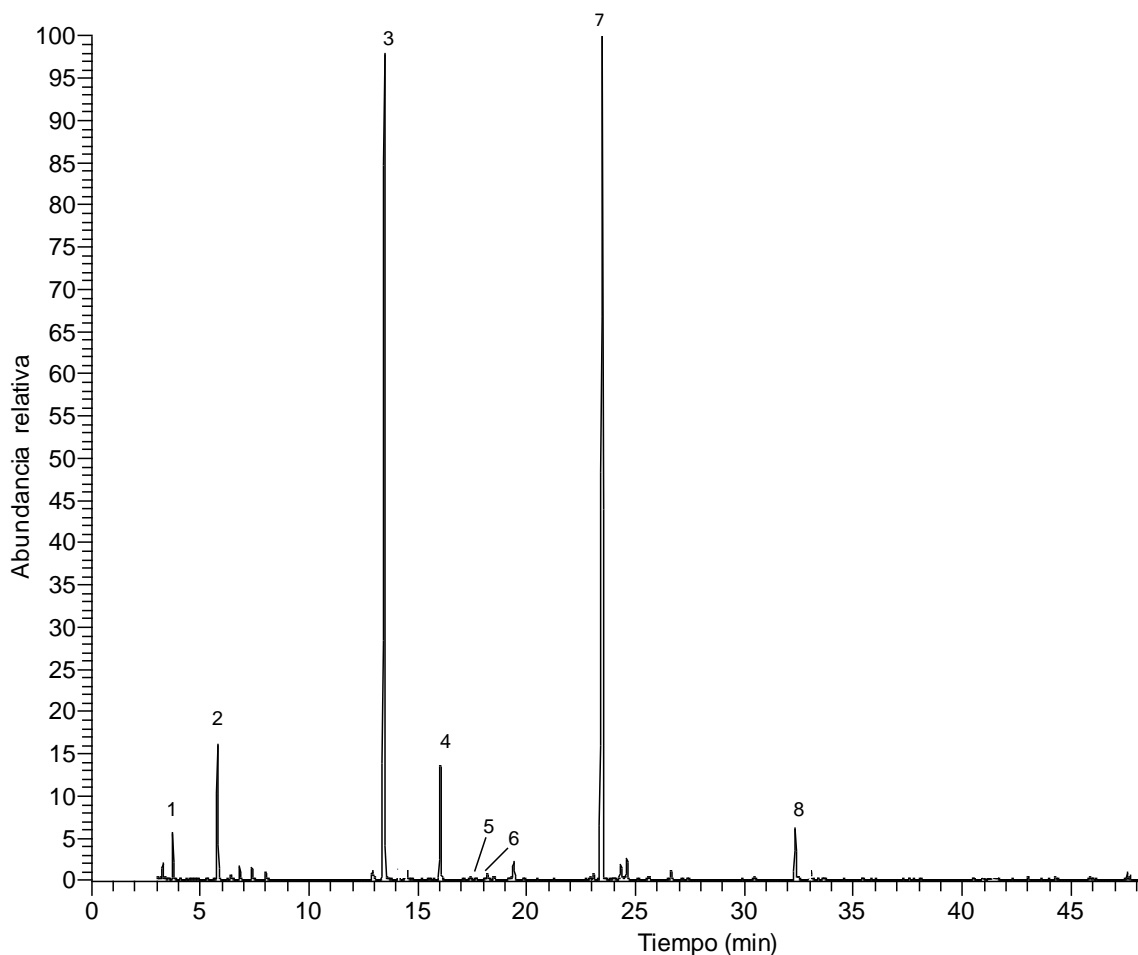


Figura 10 Conteo de iones totales (TIC) del aceite de ajo obtenido por hidrodestilación.

En el aceite de ajo obtenido por HI se identificaron ocho compuestos azufrados, los cuales pueden ser clasificados en tres grupos:

- 1.** Sulfuros de dialilo: aquí se incluyen el sulfuro de dialilo (pico N° 1), disulfuro de dialilo (pico N° 3), trisulfuro de dialilo (pico N° 7) y tetrasulfuro de dialilo (pico N° 8).
- 2.** Metil alil sulfuros: metil alil disulfuro (pico N° 2) y metil alil trisulfuro (pico N° 4).
- 3.** Vinil ditiínos: 3-vinil-[4*H*]-1,2-ditiíno (pico N° 5) y 2-vinil-[4*H*]-1,3-ditiíno (pico N° 6).

Se puede apreciar en la Figura 12 que los componentes mayoritarios del aceite de ajo obtenido por HI son el trisulfuro de dialilo (pico N° 7) y el disulfuro de dialilo (pico N° 6)

Los componentes azufrados caracterizados en este trabajo para el aceite de ajo obtenido por HI, concuerdan con los reportados en estudios [20-40], entre ellos, los obtenidos por Yu y colaboradores en 1989, en donde se menciona que en una muestra

de aceite de ajo obtenido por hidrodestilación, los componentes en mayor proporción fueron el tri y disulfuro de dialilo, seguido de los metil alil sulfuros y los vinil ditíinos, a pesar de que la muestra de ajo utilizada para el análisis pertenecía a una variedad distinta.

5.4.2 Identificación de compuestos azufrados en aceites de ajo extraídos por ultrasonido

5.4.2.1 Compuestos azufrados identificados utilizando éter como disolvente a diferentes tiempos de extracción

En la figura 11 y en la tabla 16 se muestran los compuestos azufrados identificados en los aceites de ajo obtenidos por ultrasonido utilizando éter etílico como disolvente.

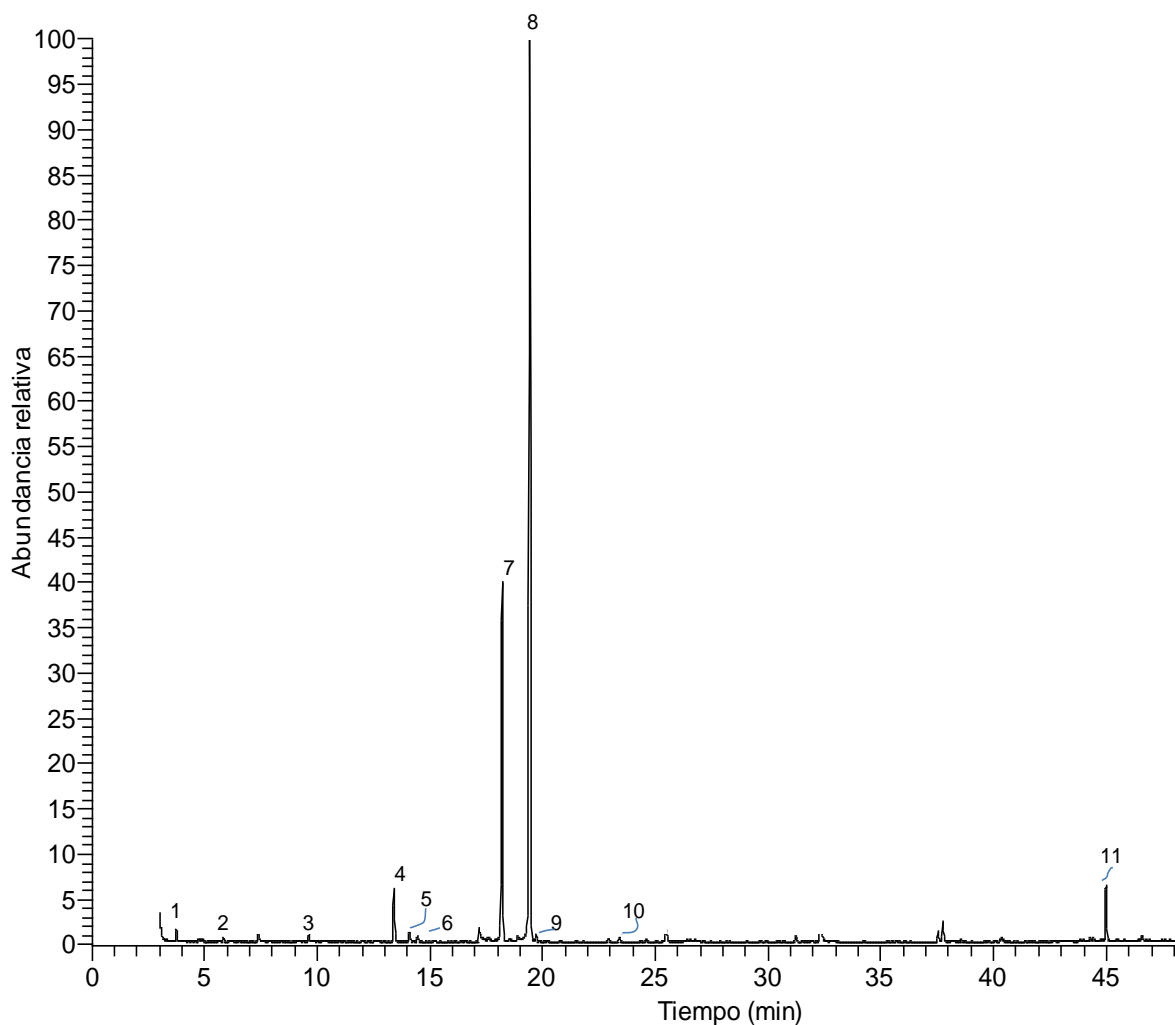


Figura 11. Conteo de iones totales (TIC) del aceite de ajo extraído por ultrasonido (durante 30 minutos) utilizando éter etílico como disolvente.

En las muestras de aceite de ajo obtenidas por ultrasonido, empleando éter como disolvente a diferentes tiempos de extracción (30, 45 y 60 minutos), se obtuvieron 11 compuestos azufrados, nombrados en la Tabla 17. En la figura 11 se observa que los

compuestos mayoritarios son los vinil ditiíno, 3-vinil-[4*H*]-1,2-ditiíno (pico N° 7) y 2-vinil-[4*H*]-1,3-ditiíno (pico N° 8), seguido del disulfuro de dialilo (pico N° 4), sulfuro de dialilo (pico N° 1) y del trisulfuro de dialilo (pico N° 10); los compuestos *cis* o *trans* metil alil disulfuro (pico N° 2), 2-etiltiofeno (pico N° 3), *trans*-propenil propil disulfuro (pico N° 5), diciticlopropil disulfuro (pico N° 6) y 2-(1-tia-2-ciclohexen-6-il)-1,3-ditia-5-ciclohexeno (pico N° 11) fueron identificados como los componentes minoritarios en los aceites de ajo.

Los resultados de este trabajo concuerdan con los reportados por Kimbaris y colaboradores en 2004 [23], en donde los compuestos azufrados antes mencionados fueron identificados en una muestra de aceite de ajo obtenido con US, utilizando éter etílico y hexano como disolventes, a un tiempo de extracción de 30 minutos.

Es importante mencionar que en el aceite de ajo obtenido por US utilizando éter como disolvente durante 60 minutos, no se encontraron los compuestos metil alil disulfuro (pico N° 2), 2-etiltiofeno (pico N° 3), diciticlopropil disulfuro (pico N° 6) y 2-(1-tia-2-ciclohexen-6-il)-1,3-ditia-5-ciclohexeno (pico N° 7). Lo anterior pudo deberse a la inestabilidad de estos compuestos, los cuales se degradan a medida que pasa el tiempo, lo que supone una dificultad para su observación en el cromatograma, aunque pudieran estar presentes en baja concentración.

5.4.2.2 Compuestos azufrados identificados utilizando hexano como disolvente a diferentes tiempos de extracción

En la figura 14 y en la tabla 16 se muestran los compuestos azufrados identificados en los aceites de ajo obtenidos por ultrasonido utilizando hexano como disolvente.

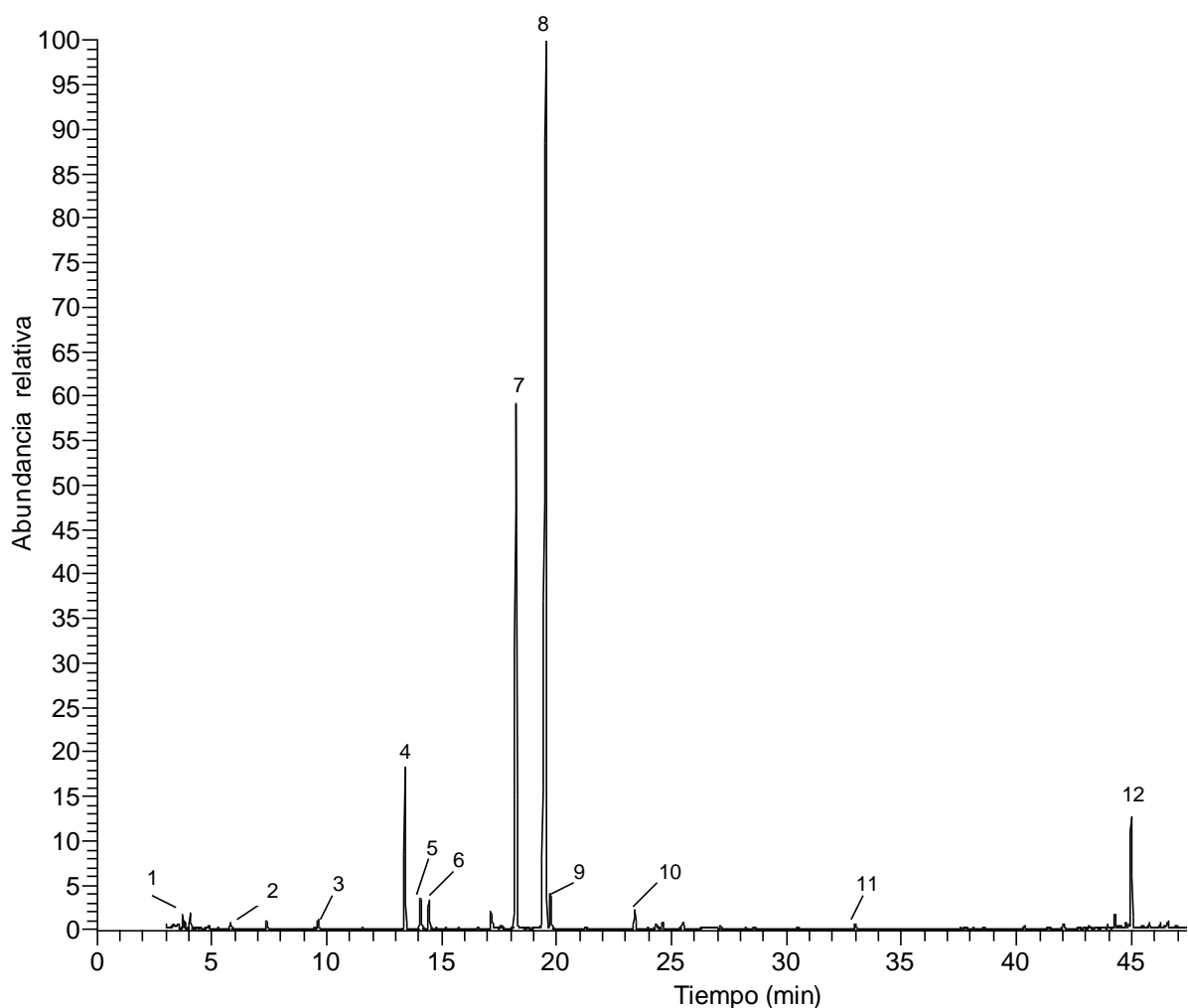


Figura 12. TIC del aceite de ajo extraído por ultrasonido (durante 30 minutos) utilizando hexano como disolvente.

En el aceite de ajo extraído por ultrasonido utilizando hexano como disolvente, a diferentes tiempos de extracción (30, 45 y 60 minutos), se identificaron 12 compuestos presentes en mayor proporción como el 3-vinil-[4*H*]-1,2-ditiíno (pico N° 7) y 2-vinil-[4*H*]-1,3-ditiíno (pico N° 8), y en menor proporción, los componentes disulfuro de dialilo (pico N° 4), 2-(1-tia-2-ciclohexen-6-il)-1,3-ditia-5-ciclohexeno (pico N° 12), sulfuro de dialilo

(pico N° 1), *cis* o *trans* metil alil disulfuro (pico N° 2), 2-etiltiofeno (pico N° 3), *trans*-propenil propil disulfuro (pico N° 5), dicitlopropil disulfuro (pico N° 6) y tetrasulfuro de dialilo (pico N° 11). Es importante mencionar que en este aceite se identificó el tetrasulfuro de dialilo (pico N° 11), compuesto no encontrado en el aceite de ajo obtenido por US, utilizando éter como disolvente. La identificación de este compuesto puede estar relacionada con la mejor solubilidad que éste tiene con el disolvente de extracción, cuya polaridad es más baja que la del éter etílico.

Pico No. ^a	Pico No. ^b	Pico No. ^c	Compuesto	Fórmula molecular	Masa molecular	Relación m/z (intensidad relativa)*	Metodología de extracción
1	1	1	Sulfuro de dialilo	C ₆ H ₁₀ S	114	114 (100), 99 (86,26), 73 (70,64), 72 (48,63), 45 (33,26)	A, B, C, D, E, F, G
2	2	2	<i>cis o trans</i> Metil alil disulfuro	C ₄ H ₈ S ₂	120	120 (100), 41 (13,21), 79 (6,79), 45 (5,94), 64 (3,48)	A, B, C, E, F, G
	3	3	2-Etiltiofeno	C ₆ H ₈ S	112	112 (100), 97 (71,74), 79 (50,77), 77 (29,85), 85 (28,61)	B, C, E, F, G
3**	4**	4**	Disulfuro de dialilo	C₆H₁₀S₂	146	41 (100), 113 (91,48), 146 (89,45), 81 (81,08), 105 (68,45)	A, B, C, D, E, F, G
4			Metil alil trisulfuro	C ₄ H ₈ S ₃	152	87 (100), 73 (58,25), 111 (20,37), 152 (18,52), 45 (16,53)	A
	5	5	<i>trans</i> -propenil propil disulfuro	C ₆ H ₁₂ S ₂	148	148 (100), 106 (42,72), 146 (41,66), 73 (18,01), 118 (17,50)	B, C, D, E, F, G
	6	6	Diciclopropil disulfuro	C ₆ H ₁₀ S ₂	146	146 (100), 73 (35,79), 81 (35,63), 105 (33,92), 104 (24,39)	B, C, E, F, G
5	7	7	3-Vinil-[4 <i>H</i>]-1,2-ditiíno	C ₆ H ₈ S ₂	144	144 (100), 111 (92), 97 (55,81), 103 (43,81), 71 (23,53)	A, B, C, D, E, F, G
6	8	8	2-Vinil-[4 <i>H</i>]-1,3-ditiíno	C ₆ H ₈ S ₂	144	144 (100), 71 (68,09), 111 (67,83), 72 (66,10), 97 (24,06)	A, B, C, D, E, F, G
	9	9	2-Vinil-1,3-ditiano	C ₆ H ₁₀ S ₂	146	146 (100), 117 (38,46), 74 (17,30), 73 (16,01), 72 (14,43)	B, C, D, E, F, G
7	10	10	Trisulfuro de dialilo	C ₆ H ₁₀ S ₃	178	113 (100), 73 (50,89), 41 (13,43), 178 (10,02), 114 (9,16)	A, B, C, D, E, F, G
8		11	Tetrasulfuro de dialilo	C ₆ H ₁₀ S ₄	210	146 (100), 41 (46,15), 64 (44,29), 105 (41,52), 210 (16,39)	A, E, F, G
	11	12	2-(1-tia-2-ciclohexen-6-il)-1,3-ditia-5-ciclohexeno	C ₉ H ₁₂ S ₃	216	111 (100), 216 (86,92), 117 (57,21), 144 (40,15), 97 (39,20)	B, C, E, F, G

^a Número de referencia en la figura 10 (HI). ^b Número de referencia en las figura 11 (US con éter etílico). ^c Número de referencia en las figura 12 (US con hexano).

* Número en el paréntesis indica porcentaje relativo del fragmento molecular en orden de abundancia.

**Compuesto cuantificado en los aceites de ajo.

Nota: En el anexo 1 se encuentran reportados los espectros de masas de cada uno de los compuestos nombrados en la Tabla 16, con sus fragmentaciones.

A = HI; **B** = US: Éter etílico: 30 min.; **C** = US: Éter etílico: 45 min.; **D** = US: Éter etílico: 60 min.; **E** = US: Hexano: 30 min.; **F** = US: Hexano: 45 min.; **G** = US: Hexano: 60 min.

Como se mencionó anteriormente, en el aceite de ajo obtenido por HI se logró identificar el trisulfuro de dialilo y disulfuro de dialilo como compuestos mayoritarios, debido a que dependiendo de las condiciones de extracción que se utilicen se favorecen determinados procesos de descomposición de la alicina. Para el caso de la extracción por HI se favorece el camino (i) de la descomposición de la alicina (Figura 13), que corresponde a procesos de descomposición influenciados por la temperatura (90 °C) y por el tiempo de calentamiento (2h) en el proceso de obtención del aceite esencial [41].

En este proceso la acción enzimática no tiene un papel predominante debido a que la temperatura inhibe las enzimas presentes, causando una degradación térmica que favorece la formación de compuestos como los sulfuros de dialilo (mono a tetra) tal y como se observa en el TIC del aceite de ajo obtenido por HI, y en el camino de reacción (i) de la Figura 13.

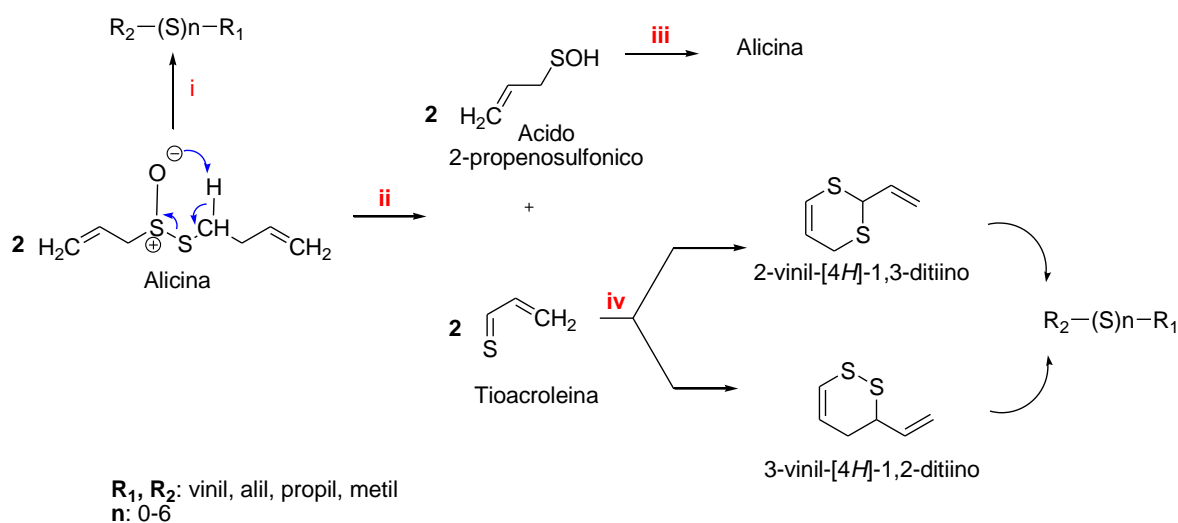


Figura 13. Descomposición de la alicina en distintos compuestos azufrados [41]

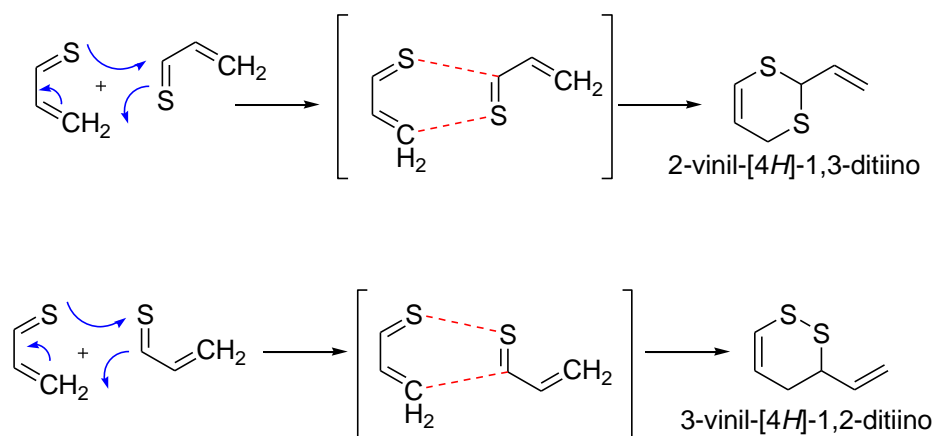


Figura 13A. Formación de 2-vinil-[4H]-1,3-ditiino y 3-vinil-[4H]-1,2-ditiino mediante reacción de Diels-Alder a partir de la acroleína

Por otro lado, la utilización de la técnica de extracción con US, implica condiciones de descomposición más suaves en términos de temperatura (25 °C), lo que favorece la degradación de la alicina produciendo principalmente la formación de vinil ditiíno, como se observa en los TIC (Figura 11 y 12) de los aceites de ajo obtenidos con US, en los cuales los compuestos 3-vinil-[4H]-1,2-ditiíno y 2-vinil-[4H]-1,3-ditiíno son los componentes mayoritarios. Lo anterior permite sugerir que la descomposición de la alicina se lleva a cabo por la acción de enzimas presentes en el ajo. Como resultado de esta degradación, se forma tioacroleína la cual se autocondensa para generar dos tipos de compuestos cíclicos mediante la reacción de Diels-Alder (Figura 13, camino (ii) de la reacción de descomposición de la alicina). Además, el proceso de reacción de Diels-Alder (Figura 13A) se ve favorecido por disolventes de extracción de baja polaridad (hexano y éter etílico), que en este caso actúan como medio de reacción, y por las bajas temperaturas que se utilizan en la extracción.

5.5 ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DISULFURO DE DIALILO EN MUESTRAS DE ACEITE DE AJO POR CG-MS

Una vez determinados los parámetros de cuantificación por curva de calibración (pendiente e intercepto) del disulfuro de dialilo, se prosiguió a encontrar la concentración de cualquier valor de y , en este caso, el contenido de disulfuro de dialilo

en las muestras de aceite de ajo extraídos por hidrodestilación y ultrasonido utilizando como disolventes éter y hexano.

En las tablas 17 y 18 se indica el contenido de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo extraídas por hidrodestilación y ultrasonido, empleando las ecuaciones $Y = 234186,9x + 1,67218E7$ y $Y = 234069,1x + 1,70345E7$.

Tabla 17. Cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo (n=3) obtenido con hidrodestilación (disolvente: agua).

Muestra	Disulfuro de dialilo (mg/L)	
	Promedio	CV (%)
Hid.1	4048,4 (± 2,39)	0,06
Hid.2	3922,1 (± 1,57)	0,04
Hid.3	3947,3 (± 3,18)	0,08

Tabla 18. Cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo (n=3) extraído con ultrasonido (disolventes: éter y hexano)

Muestra	Disulfuro de dialilo (mg/L)	
	Promedio	CV (%)
Éter 30.1	337,9 (± 0,32)	0,09
Éter 30.2	342,4 (± 3,59)	1,05
Éter 30.3	341,4 (± 0,71)	0,21
Éter 45.1	266,8 (± 0,23)	0,09
Éter 45.2	259,8 (± 4,68)	1,80
Éter 45.3	266,5 (± 0,30)	0,11
Éter 60.1	227,4 (± 0,10)	0,04
Éter 60.2	221,5 (± 1,48)	0,67
Éter 60.3	222,8 (± 0,15)	0,07
Hex.30.1	391,4 (± 0,10)	0,02
Hex.30.2	386,8 (± 1,27)	1,65
Hex.30.3	384,9 (± 1,11)	0,29
Hex.45.1	308,9 (± 0,21)	0,07
Hex.45.2	302,8 (± 1,41)	0,46
Hex.45.3	305,6 (± 1,25)	0,41
Hex.60.1	249,6 (± 0,25)	0,10
Hex.60.2	246,4 (± 0,06)	0,02
Hex.60.3	253,5 (± 0,06)	0,02

Las desviaciones estándar y los coeficientes de variación encontrados para la cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo dieron valores inferiores al 2%, lo cual indica que las tres inyecciones por muestra obtuvieron resultados homogéneos (Tabla 17 y 18).

De los resultados obtenidos para la cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo reportado en la tablas 17 y 18, se puede observar que el aceite de ajo obtenido por hidrodestilación reportó la mayor concentración de disulfuro de dialilo entre las muestras de aceite, con un valor promedio de 3972,6 mg/L de disulfuro de dialilo.

La concentración de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite obtenido por US utilizando éter y hexano, presentaron disminución al aumentar el tiempo de extracción (Figura 14). Así, los valores de concentración de disulfuro de dialilo para 30, 45 y 60 minutos, utilizando éter etílico como disolvente, fueron de 340,6, 264,4 y 223,9 ppm, y utilizando hexano, de 387,7, 308,8 y 249,8 ppm, respectivamente.

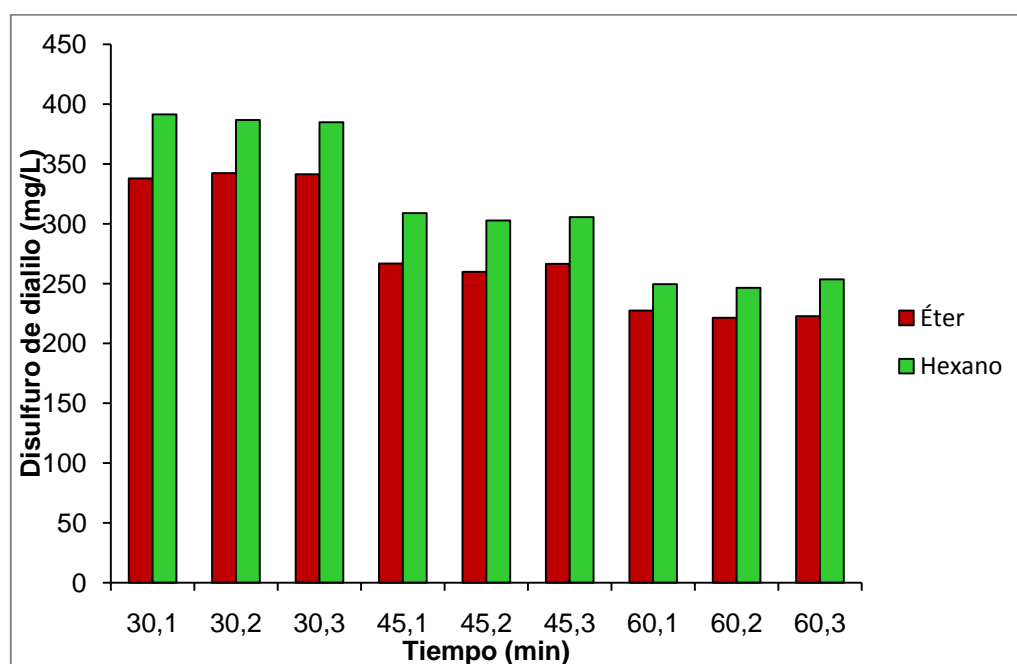


Figura 14. Concentraciones de disulfuro de dialilo cuantificadas en las muestras de aceite de ajo extraído por ultrasonido durante 30, 45 y 60 min., utilizando éter y hexano como disolventes.

La disminución de la concentración del disulfuro de dialilo a medida que aumenta el tiempo de extracción es un indicativo adicional que muestra cómo el proceso de descomposición enzimática de la alicina es el más relevante en la extracción con US,

llevando principalmente a la formación de vinil ditiíinos y a la disminución de sulfuros de dialilo, como se argumentó en el numeral 5.4, Figura 13.

Los resultados obtenidos en este trabajo, concuerdan con el trabajo de Sowbhagya y colaboradores en 2009 [42], en donde se puede apreciar cómo la adición de enzimas a muestras de ajo al ser extraídas, incrementa la abundancia de vinil ditiíinos y disminuye la de sulfuros de dialilo. En la tabla 19 se muestran los resultados obtenidos de Sowbhagya.

Tabla 19. Efecto del tratamiento con enzimas sobre volátiles del ajo (% de área relativa) en el trabajo de Sowbhagya [42].

Compuesto	Control	Tratamiento con enzima
Disulfuro de dialilo	13,07	11,09
3-vinil-[4 <i>H</i>]-1,2-ditiino	1,00	1,91
2-vinil-[4 <i>H</i>]-1,3-ditiino	1,85	7,97
Trisulfuro de dialilo	60,0	51,5
Tetrasulfuro de dialilo	5,01	4,85

5.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO PARA LAS MUESTRAS DE ACEITE DE AJO OBTENIDO POR ULTRASONIDO

El análisis estadístico ANOVA factorial se llevó a cabo en la cuantificación del disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo extraído por ultrasonido, debido a que en esta extracción se tuvieron dos variables: disolvente empleado (éter etílico y hexano) y tiempo de extracción (30, 45 y 60 minutos). Los datos empleados en este análisis corresponden a muestras independientes, las cuales fueron extraídas y analizadas.

A los valores de la Tabla 18, se le realizaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk [43], observando que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en las concentraciones de disulfuro de dialilo al variar los disolventes y los tiempos de extracción. Por esta razón, los datos obtenidos en la tabla 18 no se ajustan a la distribución normal (Shapiro

Wilk: $p < 0,05$) ni a la homogeneidad de varianzas (Levene: $p < 0,05$), como se observa en el anexo 3.1.

De esta forma, el análisis comparativo se realizó aplicando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis [43] para el tiempo de extracción, complementada con una prueba de comparación por parejas, tal como la de Man-Whitney [43] para los disolventes empleados.

- Para la variable tiempo se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual originó un valor significativo (Kruskal-Wallis: $p = 0,001$), como se observa en el anexo 3.2. De esta prueba se puede concluir que el tiempo de extracción influye significativamente en la concentración del disulfuro de dialilo.
- Para la variable disolvente se realizó la prueba de Man-Whitney la cual originó un valor significativo (Man-Whitney: $p = 0,036$), como se observa en el anexo 3.3. De lo anterior se puede concluir que existen diferencias significativas en la concentración de disulfuro de dialilo al variar el disolvente de extracción.
- Para la combinación disolvente-tiempo se realizó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual dio un valor significativo (Kruskal-Wallis: $p = 0,001$), como se observa en el anexo 3.4.

La combinación solvente-tiempo originó un orden de rango de muestras que permite saber cuál de las combinaciones fue la mejor, es decir, que permite cuantificar la mayor concentración de disulfuro de dialilo. A continuación se presentan los resultados de este orden:

1. Hexano 30 min
2. Éter 30 min
3. Hexano 45 min
4. Éter 45 min
5. Hexano 60 min

6. Éter 60 min

Para saber si las muestras difieren significativamente unas de otras se aplicó la prueba de Man-Whitney, tomando la muestra 1 y 2, 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5 y 5 y 6.

De esta prueba se concluye que todas las muestras difieren significativamente ($p = 0,001$), es decir, que ninguna de las muestras presenta resultados similares de concentración del compuesto disulfuro de dialilo, como se observa en el anexo 3.5.

En la tabla 20, se resumen los resultados obtenidos con sus respectivos valores de p para cada prueba.

Tabla 20. Resultados obtenidos en las pruebas de análisis estadístico para cada variable.

TIEMPO (min)	SOLVENTE		TOTAL	
	ÉTER	HEXANO		
	Disulfuro de dialilo (mg/L)			
30	340,6	387,6	364,122	Significancia Kruskal-Wallis: $p = 0,001$
45	264,4	306,8	285,606	
60	223,8	248,4	236,117	
TOTAL	276,3	314,3		
	Significancia Man-Whitney: $p = 0,036$			Significancia Kruskal-Wallis: $p = 0,001$

5.7 ENSAYOS BIOLÓGICOS PRELIMINARES

Al momento de realizar la aspersion sobre los insectos con los tratamientos de aceite de ajo, se observó que tanto las larvas como los adultos mostraron una reacción casi inmediata a la solución aplicada de aceite de ajo obtenido por cualquiera de los dos métodos. En las larvas, los movimientos eran bruscos y rápidos sobre la superficie del recipiente, mientras que para los adultos se observó una actividad rápida en el vuelo al sentir la presencia de la solución azufrada.

A los 15 minutos de aplicación en los adultos se notó una disminución en el movimiento que hacían con las antenas y las alas, de tal manera que las polillas escasamente caminaban. Un comportamiento similar se observó al aplicar los dos tratamientos (T1 y T2).

En las tablas 21, 22, 23 y 24 se describen las observaciones realizadas en las diferentes horas después de iniciado el bioensayo.

Tabla 21. Observaciones realizadas a las 6 horas de aplicación de los tratamientos.

Tratamiento	Observación
T1:1	Todas las larvas se observan lentas al caminar
T1:2	3 larvas muertas, 2 caminan lentamente
T1:3	3 larvas muertas, 2 caminan lentamente
T1:4	4 larvas muertas, 1 camina lentamente
T2:1	Todas las larvas se muestran levemente activas
T2:2	Todas las larvas se muestran levemente activas
T2:3	Todas las larvas se muestran levemente activas
T2:4	3 larvas muertas, 2 levemente activas.
T1:1A	Todos se encuentran muertas
T1:2A	Todos se encuentran muertas
T1:3A	Todos se encuentran muertas
T2:1A	Todos se encuentran muertas
T2:2A	3 adultos mueven sus patas lentamente, 4 se muestran muertas
T2:3A	2 adultos mueven sus patas lentamente, 4 se muestran muertas
TE1	Activos
TE2	Activos
TE3	Activos
TE1A	Activos
TE2A	Activos
TE3A	Activos

Tabla 22. Observaciones realizadas a las 12 horas de aplicación de los tratamientos.

Tratamiento	Observación
T 1:1	Todas las larvas se muestran lentas al caminar. Cuando se tocan, intentan responder
T 1:2	4 larvas muertas, 1 camina lentamente
T 1:3	4 larvas muertas, 1 camina lentamente
T 1:4	4 larvas muertas, 1 camina lentamente
T 2:1	Todas las larvas se muestran lentas al caminar
T 2:2	4 larvas levemente activas, 1 inmóvil
T 2:3	Todas las larvas se muestran levemente activas
T 2:4	4 larvas muertas, 1 levemente activa
T1:1A	Todos se encuentran muertas
T1:2A	Todos se encuentran muertas
T1:3A	Todos se encuentran muertas
T2:1A	Todos se encuentran muertas
T2:2A	Todos se encuentran muertas
T2:3A	Todos se encuentran muertas
TE1	Activos
TE2	Activos
TE3	Activos
TE1A	Activos
TE2A	Activos
TE3A	Activos

Tabla 23. Observaciones realizadas a las 24 horas de aplicación de los tratamientos.

Tratamiento	Observación
T 1:1	4 larvas muertas, 1 camina lentamente
T 1:2	Todas las larvas muertas
T 1:3	4 larvas muertas, 1 camina lentamente
T 1:4	Todas las larvas muertas
T 2:1	3 larvas muertas y 2 levemente activas
T 2:2	3 larvas se mueven lentamente, 2 larvas muertas
T 2:3	3 larvas muertas y 2 levemente activas
T 2:4	4 larvas muertas, 1 levemente activa
T1:1A	Todos se encuentran muertas
T1:2A	Todos se encuentran muertas
T1:3A	Todos se encuentran muertas
T2:1A	Todos se encuentran muertas
T2:2A	Todos se encuentran muertas
T2:3A	Todos se encuentran muertas
TE1	Activos
TE2	Activos
TE3	Activos
TE1A	Activos
TE2A	Activos
TE3A	Activos

Tabla 24. Observaciones realizadas a las 48 horas de aplicación de los tratamientos.

Tratamiento	Observación
T 1:1	Todas las larvas muertas
T 1:2	Todas las larvas muertas
T 1:3	Todas las larvas muertas
T 1:4	Todas las larvas muertas
T 2:1	Todas las larvas muertas
T 2:2	Todas las larvas muertas
T 2:3	4 larvas muertas y 1 levemente activa
T 2:4	Todas las larvas muertas
T1:1A	Todos se encuentran muertas
T1:2A	Todos se encuentran muertas
T1:3A	Todos se encuentran muertas
T2:1A	Todos se encuentran muertas
T2:2A	Todos se encuentran muertas
T2:3A	Todos se encuentran muertas
TE1	Activos
TE2	Activos
TE3	Activos
TE1A	Activos
TE2A	Activos
TE3A	Activos

A los datos de las mortalidades obtenidas en los diferentes tratamientos se les aplicó una prueba de Análisis de Varianza (ANOVA), obteniéndose diferencias significativas (Shapiro-Wilk: $p = 0,017$) entre los tratamientos comparados con el testigo (Anexo 3.6).

De acuerdo con los resultados obtenidos, los aceites de ajo obtenidos por hidrodestilación y por ultrasonido presentaron una buena acción insecticida contra la polilla de la papa *Tecia solanivora*, tanto para las larvas como para los adultos.

El aceite de ajo obtenido por hidrodestilación presentó mortalidades más rápidas en el tiempo, de acuerdo con las evaluaciones realizadas para la polilla en estado larval y en estado adulto. Además, al cabo de las 48 horas se obtuvo un 100% de mortalidad en las larvas de *T. solanivora*.

En el caso del aceite de ajo obtenido con ultrasonido, utilizando hexano como disolvente, el efecto sobre las larvas fue más lento y las mortalidades obtenidas alcanzaron el 95% (Tabla 25).

Tabla 25. Datos de mortalidad de larvas obtenida en los tratamientos a través del tiempo.

Tratamiento	Tiempo de evaluación (horas)							
	6		12		24		48	
	% Vivas	% Muertas	% Vivas	% Muertas	% Vivas	% Muertas	% Vivas	% Muertas
T1	50	50	40	60	10	90	0	100
T2	85	15	60	40	35	65	5	95
Testigo	100	0	100	0	100	0	100	0

En los adultos se presentó un comportamiento diferente, ya que la mortalidad de los adultos después de 1 hora de la aplicación del aceite fue del 50% y se obtuvo una mortalidad del 100% a las 6 horas.

Considerando los resultados obtenidos, se concluye que el pre-ensayo realizado presentó buenos resultados, siendo mejor el aceite de ajo obtenido por hidrodestilación, ya que inmovilizó mayor cantidad de larvas y adultos en menor tiempo, que el aceite de ajo extraído por ultrasonido. Lo anterior, puede sustentarse debido a que el aceite de ajo obtenido por hidrodestilación, presenta componentes azufrados (como los sulfuros de dialilo) en mayor cantidad que el aceite obtenido por ultrasonido. Aunque el aceite de

ajo extraído por ultrasonido también es rico en compuestos azufrados, éste se diferencia del aceite obtenido por hidrodestilación en que contiene compuestos vinil ditínicos en mayor concentración y compuestos sulfuros de dialilo en menor proporción, como se observó en la cuantificación de los componentes activos del aceite de ajo estudiado en este mismo trabajo (Numeral 5.6).

En estudios realizados por Auger *et al.* (2004) [33], se reportó que dentro de los compuestos azufrados, los sulfuros de dialilo, son los que presentan mayor acción insecticida en relación a los otros compuestos que se encuentran reportados como principios activos del ajo. Al realizar un ensayo de toxicidad con la especie de termitas *Reticulitermes santonensis*, utilizando disulfuro de dialilo, disulfuro de dimetilo y disulfuro de dicitropililo como elementos insecticidas, encontraron que el porcentaje de mortalidad de los insectos después de 24 horas fue del 90% [33].

Otros estudios sobre el uso potencial insecticida fueron realizados sobre larvas del mosquito *Culex pipiens* obteniendo mortalidades de hasta un 75% al cabo de 90 horas [34]. Algunas investigaciones reportan el efecto insecticida del ajo sobre algunas especies de coleópteros de las familias Tenebrionidae y Curculionidae, donde se realizaron bioensayos sobre los estados de huevo, larvas y adultos de *Tribolium castaneum* y sobre adultos de *Sitophilus zeamais*. Los resultados mostraron una acción ovicida, lo cual demostró que los huevos fueron más susceptibles que las larvas y adultos. La eclosión de los huevos se redujo entre un 68% y un 95%, dependiendo de la dosis (0,27 mg/cm²; 1,1 mg/cm²) [32].

Al comparar los resultados mostrados anteriormente con los obtenidos en nuestro ensayo biológico, se puede afirmar que el aceite de ajo obtenido por las dos técnicas de extracción (HI y US) es un buen agente insecticida. Además, podría ser utilizado y aplicado sobre grandes cantidades de cultivos sin causar contaminación al medio ambiente y al producto, como lo hacen otros productos químicos, los cuales son utilizados para eliminar este tipo de plagas.

6. CONCLUSIONES

- Se validó un método analítico para la determinación de compuestos azufrados y para la cuantificación del disulfuro de dialilo en muestras de aceite de ajo, por CG-EM, usando como método de extracción la hidrodestilación y el ultrasonido.
- Se comprobó que los aceites de ajo obtenidos por hidrodestilación, presentaron abundancia relativa mayor para los sulfuros de dialilo debido posiblemente a procesos de descomposición de la alicina influenciados por la temperatura de extracción; mientras que los aceites de ajo obtenidos por ultrasonido originaron mayor abundancia relativa para los compuestos vinil ditíínicos debido a la descomposición enzimática de la alicina.
- El análisis estadístico para los aceites obtenidos por ultrasonido, mostró que existen diferencias significativas para la concentración de disulfuro de dialilo al variar el disolvente empleado y el tiempo de extracción.
- El ensayo biológico preliminar de acción insecticida llevado a cabo con aceite de ajo obtenido por hidrodestilación y ultrasonido sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora*, presentó porcentajes de mortalidad entre el 95 y 100% respectivamente, a las 48 horas de realizado el ensayo.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ankri S., Mirelman D. **1999**. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*. 2, 125-129.
- [2] Kamel A., Saleh M. **2000**. Recent studies on chemistry and Biological activities of the organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). *Studies in Natural Products Chemistry*. 23, 455-485.
- [3] Infoagro. Propiedades del ajo. <<http://www.infoagro.com/hortalizas/ajo.htm>> [Citado, Abril de 2008].
- [4] Soto-Vargas V., Camargo A., González R., Galmarini C. **2007**. Síntesis y purificación de ajoeno y su cuantificación en aceites comerciales de ajo. *FCA Uncuyo*. 39, (1), 93-100.
- [5] Botanical-online. <<http://www.botanicalonline.com/medicinalsalliumsativum.htm>> [Citado, Abril de 2008].
- [6] Everhart E., Hagnes C., Jauron R. Guía de horticultura de Iowa State University. <<http://www.extension.iastate.edu/Publications/PM18945.pdf>> [Citado, Septiembre de 2009].
- [7] López-Ávila A. El cultivo del ajo y las cebollas en Colombia <http://www.lalibreriadelau.com/catalog/product_info.php/products_id/12508?sid=78c67e751521c80b1114efb8dffef10a> [Citado, 4 de Mayo de 2009].
- [8] El cultivo del ajo. ABC Agro. <<http://www.abcagro.com/hortalizas/ajo.asp>> [Citado Abril de 2008].
- [9] Alimentación Sana. Sección alimentos que curan. <<http://www.alimentacion-sana.com.ar/Informaciones/novedades/ajo2.htm>> [Citado, Abril de 2008].

- [10] Block E. **1985**. The chemistry of garlic and onion. *Scientific American*. 252. 114-119.
- [11] Randle W., Lancaster J. **1990**. Sulphur compounds in Alliums in relation to flavour quality. In: Allium crop science: Recent advances. Ed. Rabbinowitch, H. D and Currah, L. CABI Publishing. U.K. 329-355.
- [12] Brewster J. Onions and other Vegetable *Alliums*. **1994**. The Biochemistry and Food Science of Alliums. *Crop Production Science in Horticulture*. 9, 203-212.
- [13] Kuettner E. B., Hilgenfeld R., Weiss M. S. **2002**. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 402, 192-200.
- [14] Lee S. N., Kim N. S., Lee D. S. **2003**. Comparative study of extraction techniques for determination of garlic flavor components by gas chromatography–mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 377, 749–756.
- [15] Mason T. J., Paniwnyk L., Lorimer J. P. **1996**. The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics Sonochemistry*. 3, S253-S260.
- [16] Rostagno M., Palma M., Barroso C. **2003**. Ultrasound assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*. 1012, 119-128.
- [17] Mason T J. **1999**. Sonochemistry: in the chemical and processing industries. *Mathematics Physical and Engineering Sciences*. 357, 355-369.
- [18] Azuola R., Vargas P. **2007**. Extracción de sustancias asistida por Ultrasonido (EUA). *Tecnología en marcha*. 20, 30-40.
- [19] Martínez A. **2003**. Aceites esenciales. Universidad de Antioquia, Facultad de Química farmacéutica. Medellín, 1-34.

[20]. Yu T., Wu C., Liou Y. **1989**. Volatile Compounds from Garlic, *J. Agric. Food Che.*, 37, 725-730.

[21]. Andreatta A.E., Foco G., Bottini S.B. **2005**. Extraction of garlic oil with Quasi-Critical Solvents. 4th Mercosur Congress on Process Systems Engineering. Universidad Federal de Rio de Janeiro, 1-9.

[22] Calvo-Gomez O., Morales-López J., López M. **2004**. Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. *J. of Chromatography A*. 1036, 91-93 .

[23] Kimbaris Athanasios C., Nikolaos G. Siatis, Dimitra J. **2006**. Comparison of distillation and ultrasound- assisted extraction methods for the isolation of sensitive aroma compounds from garlic (*Allium sativum*). *Ultrasonics Sonochemistry*. 13, 54-60.

[24] Wood R. **1981**. Insecticide resistance: genes and mechanisms. *Genetic consequences of man-made change*. Academic Press, London and New York. Chap.3, 97-127.

[25]. Arnason J., Philogene B., Morand F. **1989**. Insecticides of Plant Origin. *American Chemical Society*. Washington, DC. 387, 25-43.

[26] Iannacone J., Lamas G. **2003**. Efecto insecticida de cuatro extractos botánicos y del cartap sobre la polilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera: Gelechiidae), en el Perú. *Entomotropica*. 18, 95-105.

[27] Cisneros F. **1995**. Control de Plagas Agrícolas. Disponible en http://www.avocadosource.com/books/CisnerosFausto1995/CPA_10_PG_248-257.pdf [Acceso Noviembre de 2004].

[28] Redepapa. **2000**. Plantas insecticidas y plantas vivas como repelentes. Disponible en <http://www.redepapa.org/plantasinsecticidas.pdf> . [Acceso 10 de noviembre de 2004].

[29] Maturana C., Oteiza P. **1996**. Recetario de productos alternativos. Corporación de Investigación en Agricultura Orgánica (CIAL). Universidad Santiago de Chile. Santiago de Chile. 65-81.

[30]. Ramakrishnan V., Chintalwar G., Banerji A. **1989**. Environmental persistence of diallyl disulphide, an insecticidal principle of garlic and its metabolism in mosquitoes. *Chemosphere*. 18, 1525-1529.

[31]. Kirtaniya D., Ghosh S., Adityachaudhury N., Chatterjee A. **1980**. Extracts of garlic as possible source of insecticides. *Indian J. Agric. Sci.* 50, 507-510.

[32]. Ho S., Koh L., Ma Y., Huang Y., Sim K. **1996**. The oil of garlic, (*Allium sativum* L.) as a potential grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* (Motsch). *Postharvest Biology and Technology*. 9, 41-48.

[33]. Auger J., Arnault I., Diwo-Allain S. **2004**. Insecticidal and fungicidal potential of *Allium* substances as biofumigants. *Agroindustria*. 3,3, 5-8.

[34]. Callaghan A., Thomas C. **1999**. The use of garlic (*Allium Sativa*) y Lemon Peel (*Citrus Limon*) extracts as *culex pipiens* Larvacides: Persistence and interaction with an organophosphate resistance mechanism. *Chemosphere*, 39, 14, 2489-2496.

[35]. Niño L. **2004**. Revisión sobre la Polilla de la Papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. Suplemento revista latinoamericana de la papa. 4-21.

[36]. Herrera F. **1998**. La polilla guatemalteca de la papa. Biología, comportamiento y prácticas de manejo integrado. Programa regional agrícola (Boyacá-Cundinamarca). Segunda edición. Corpoica.

[37] González G. C. **2006**. Tratamiento de datos, Ediciones Díaz Santos,. ANOVA.

[38] Lee E. J., Cho J. E., Kim J. H., Lee S. K. **2007**. Green pigment in crushed garlic (*Allium sativum* L.) cloves: Purification and partial characterization. *Food chemistry*. 101, 1677-1686.

[39] Miller J. C., Miller J. N. **1993**. Estadística para química analítica. Segunda edición. Addison-Wesley Iberoamericana. EEUU. 96.

[40] Martín-Lagos R. A., Olea-Serrano M. F., Ruiz-López M. D. **1992**. Comparative study by gas chromatography-mass spectrometry of methods for the extraction of sulfur compounds in *Allium cepa* L. *Food chemistry*. 44, 305-308.

[41] Block E. **1985**. The chemistry of garlic and onions. *Scientific American*. 3, 94-103.

[42] Sowbhagya H. B., Purnina K. T., Florence S. P., Appu-Rao A.G., Srinivas P. **2009**. Evaluation of enzyme-assisted extraction on quality of garlic volatile oil. *Food chemistry*. 113, 1234-1238.

[43] SPSS, Statistical Package for the Social Sciences, version 11,5.

8. ANEXOS

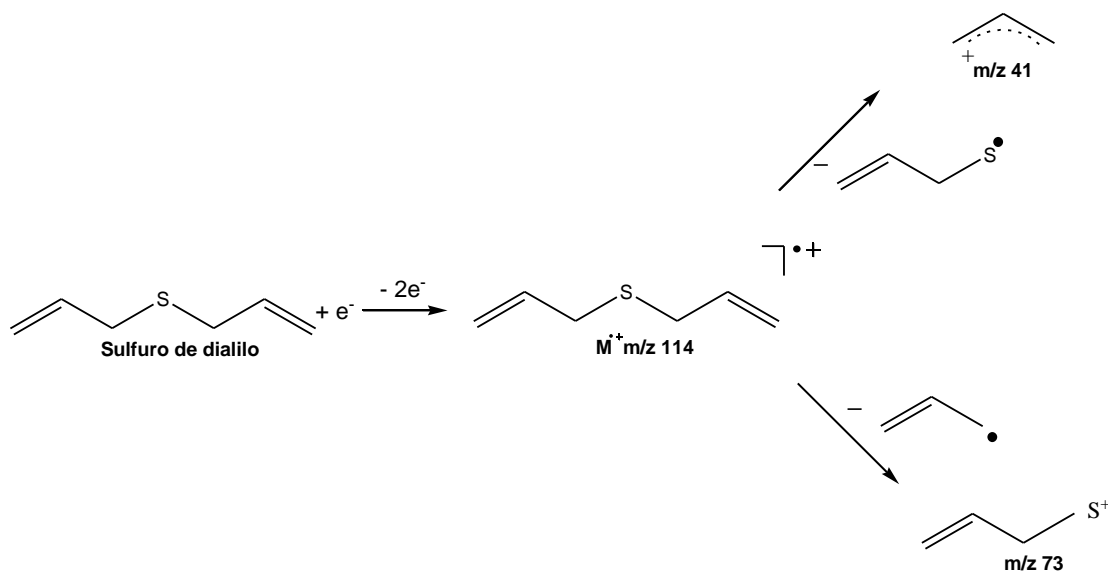
ANEXO 1. Áreas del blanco (éter etílico y hexano) y las soluciones estándar de disulfuro de dialilo (39, 312 y 625 mg/L) con sus desviaciones estándar y coeficientes de variación respectivos, para encontrar sensibilidad analítica del método analítico CG-EM.

	Área (Y)	Promedio de Área (\bar{Y})	Coefficiente de variación (%)
Blanco (Éter etílico)	47972	36461,2 (±7281,9)	19,97
	32896		
	39311		
	28392		
	44308		
	27393		
	43802		
	31313		
	30886		
	38339		
Blanco (Hexano)	46873	36308,1 (±6776,7)	18,66
	33463		
	40002		
	28374		
	41343		
	28637		
	44738		
	32783		
	29384		
	37483		
39 ppm	11884374	1,18525 E7 (±29548,9)	0,25
	11835640		
	11816211		
	11867457		
	11877005		
	11816483		
	11847839		
	11855120		
	11824384		
	11900465		
312 ppm	90164324	9,01893 E7 (±45457,3)	0,05
	90111260		
	90132658		
	90246012		
	90212869		
	90213240		
	90252370		
	90174854		
	90200321		
	90184594		
625 ppm	174123789	1,75938 E8 (±2,67571 E6)	1,52
	175356976		
	174825676		
	179181099		
	178999902		
	179648398		
	175637483		
	176478403		
	173748392		

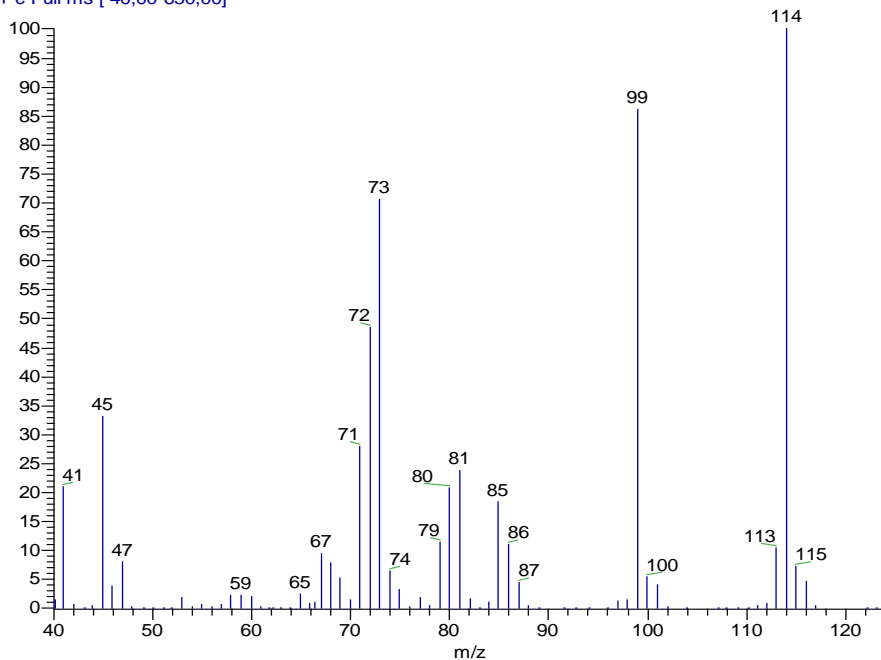
171384793

ANEXO 2. Espectros de masas y patrones de fragmentación de los compuestos identificados en el aceite de ajo por medio de las técnicas HI y US.

- Compuesto: Sulfuro de dialilo. $C_6H_{10}S$. MW: 114.
Identificado en: A, B, C, D, E, F, G

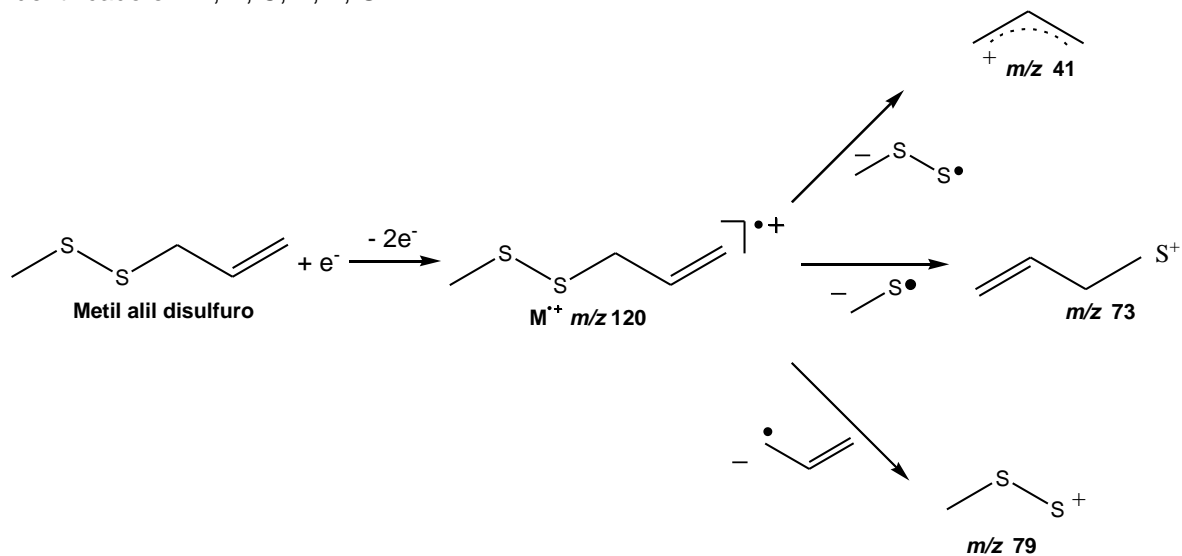


08121210 #36-37 RT: 3,73-3,75 AV: 2 SB: 27 3,41-3,68, 3,81-4,06 NL: 5,71E5
T: + c Full ms [40,00-650,00]

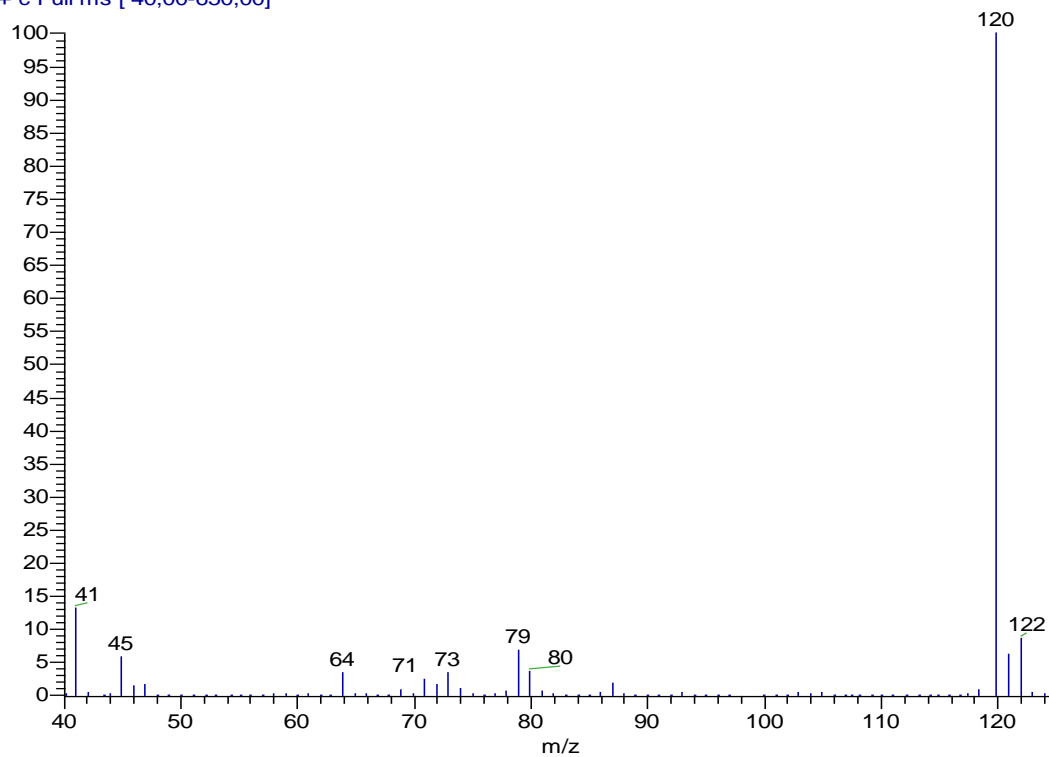


A = HI; B = US: Éter etílico: 30 min.; C = US: Éter etílico: 45 min.; D = US: Éter etílico: 60 min.; E = US: hexano: 30 min.; F = US: Hexano: 45 min.; G = US: hexano: 60 min.

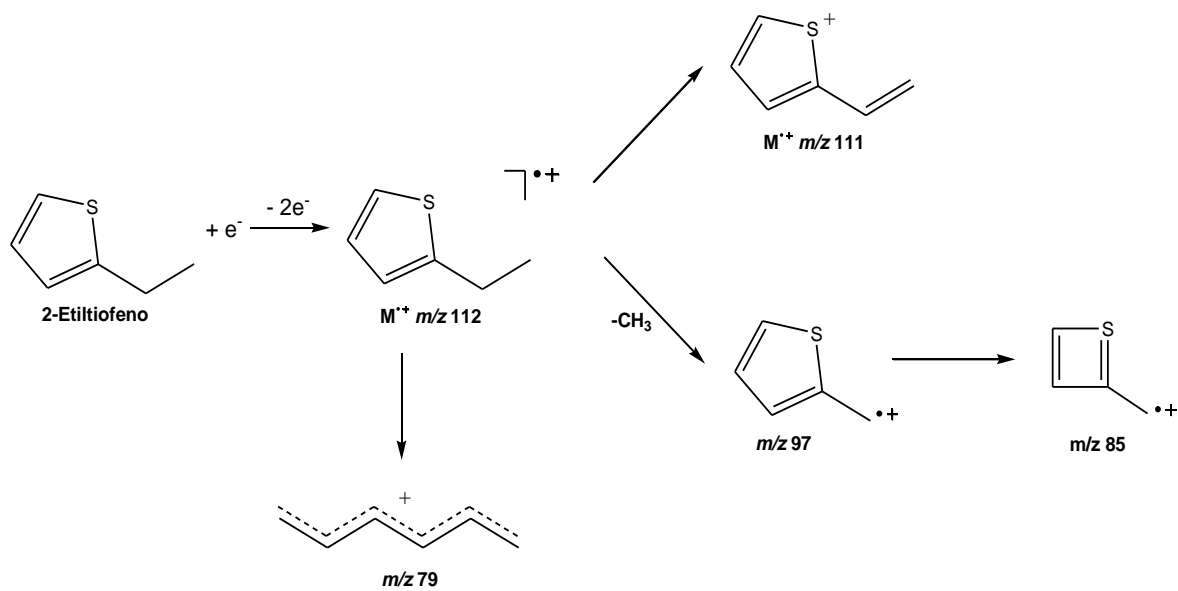
- Compuesto: Metil alil disulfuro. $C_4H_8S_2$. MW: 120.
Identificado en: A, B, C, E, F, G



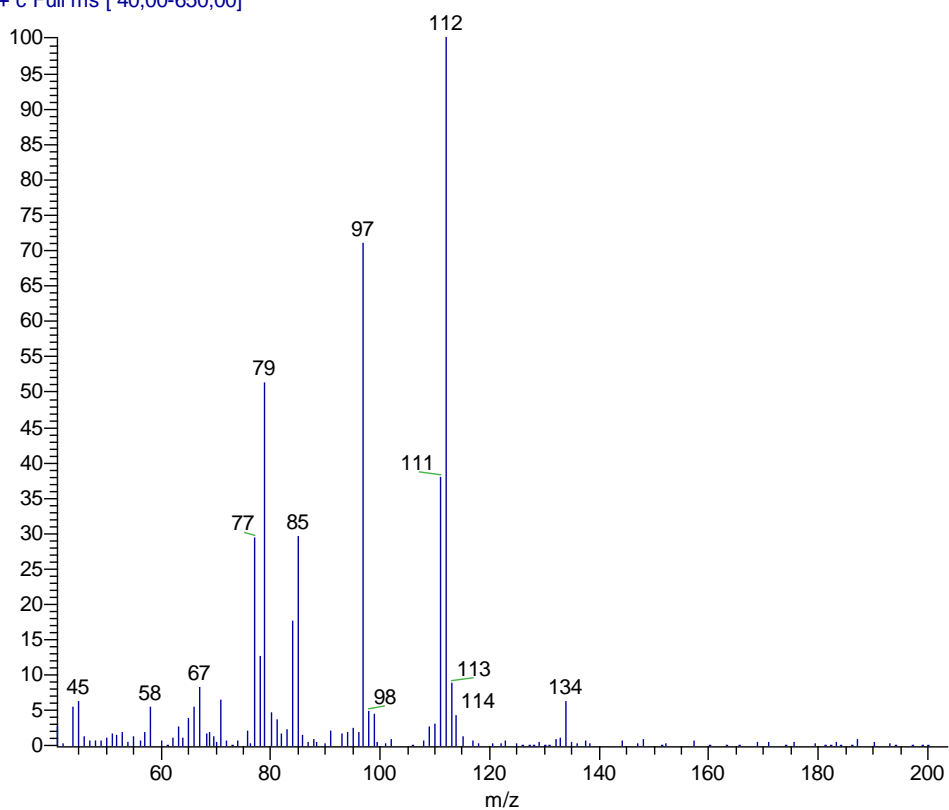
08121210 #135-137 RT: 5,77-5,82 AV: 3 SB: 22 5,51-5,73 , 5,88-6,06 NL: 4,85E6
T: + c Full ms [40,00-650,00]



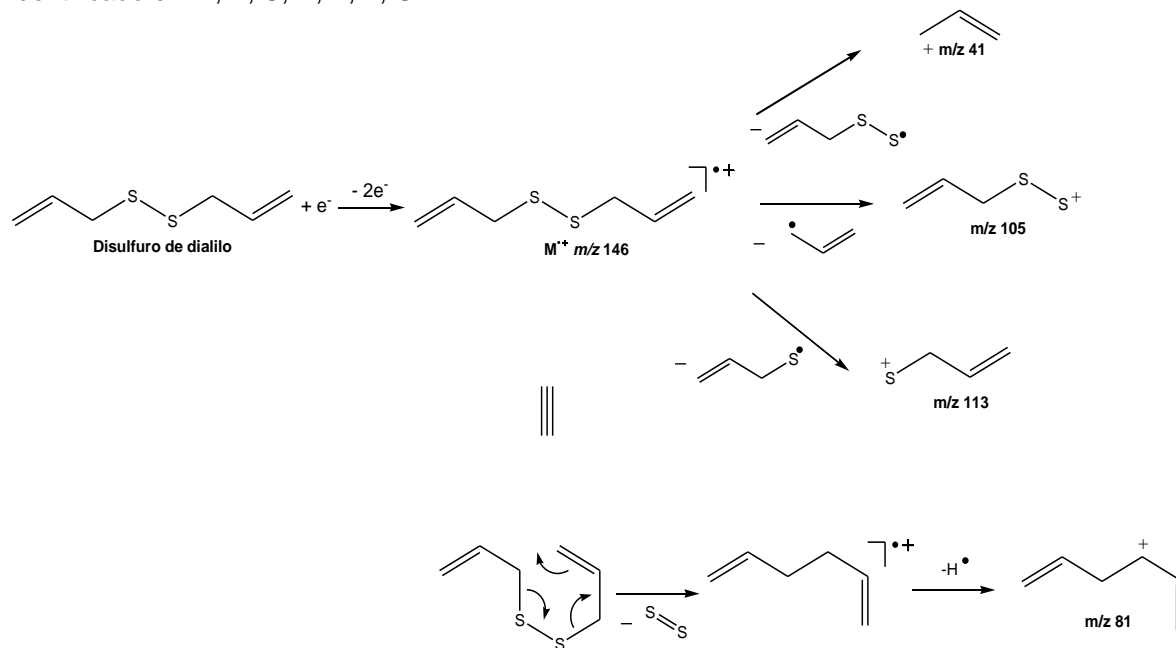
- Compuesto: 2-Etiltiofeno. C_6H_8S . MW: 112.
Identificado en: B, C, E, F G



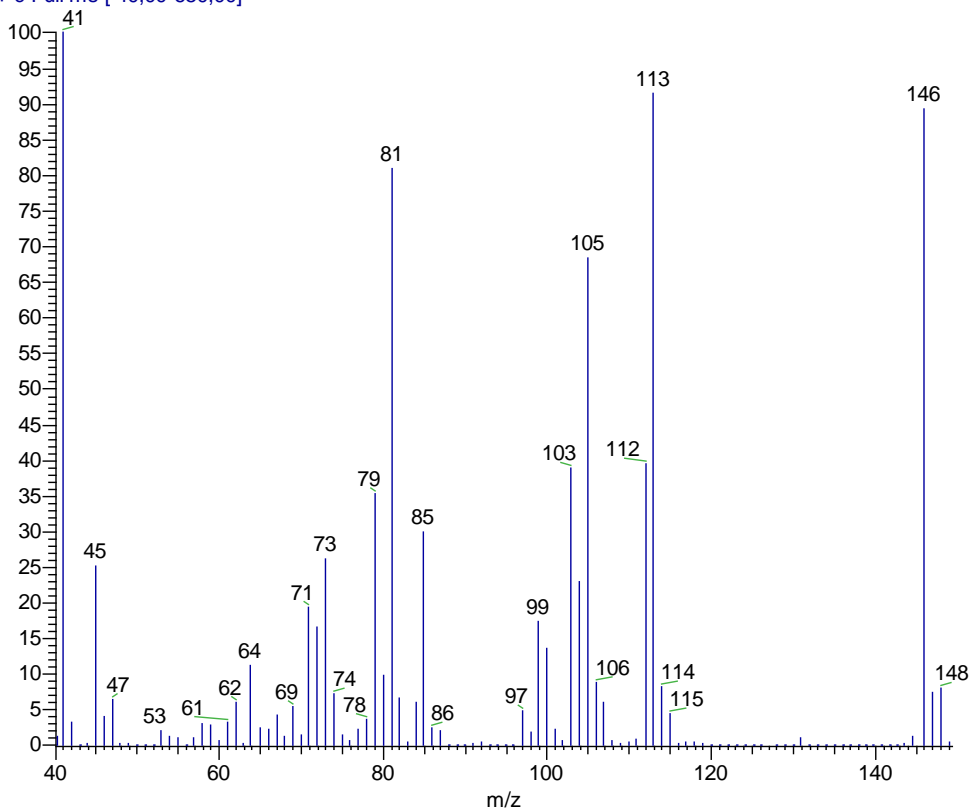
08121202 #320-322 RT: 9,61-9,65 AV: 3 SB: 17 7,16-7,33 , 7,47-7,62 NL: 4,26E4
T: + c Full ms [40,00-650,00]



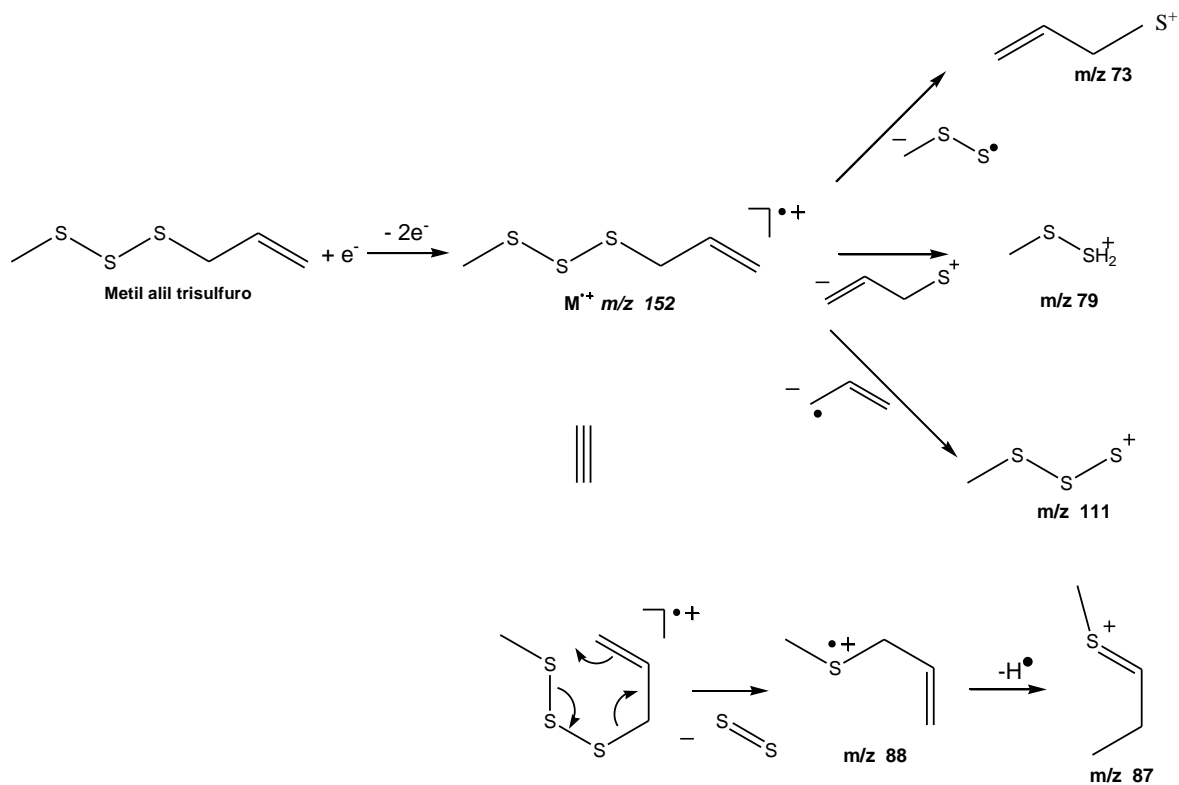
- Compuesto: Disulfuro de dialilo. $C_6H_8S_2$. MW: 146.
Identificado en: A, B, C, D, E, F, G



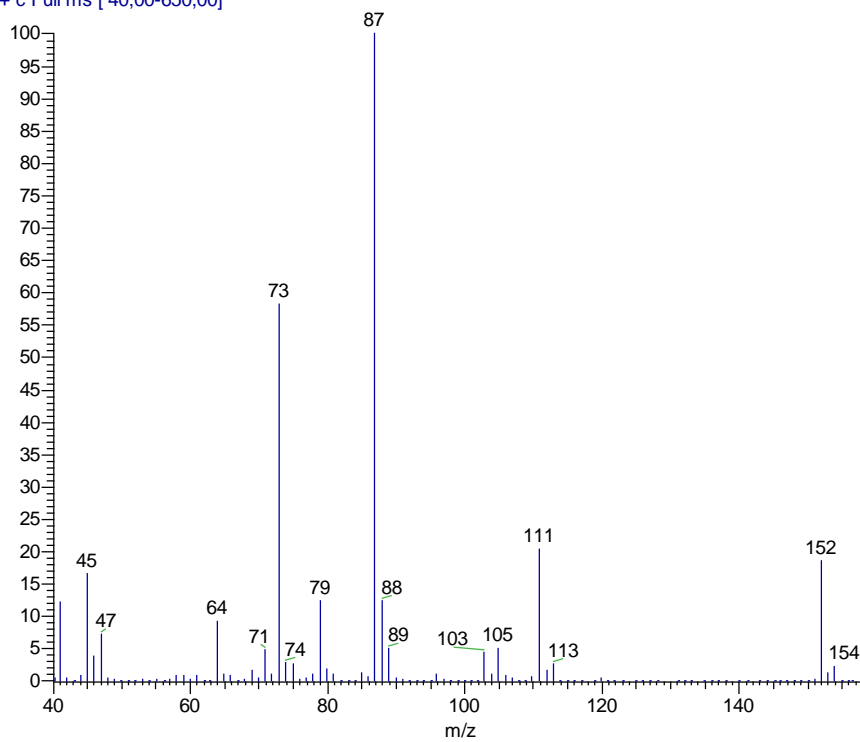
08121210 #505-508 RT: 13,44-13,50 AV: 4 SB: 28 13,12-13,35 , 13,54-13,85 NL: 5,67E6
T: + c Full ms [40,00-650,00]



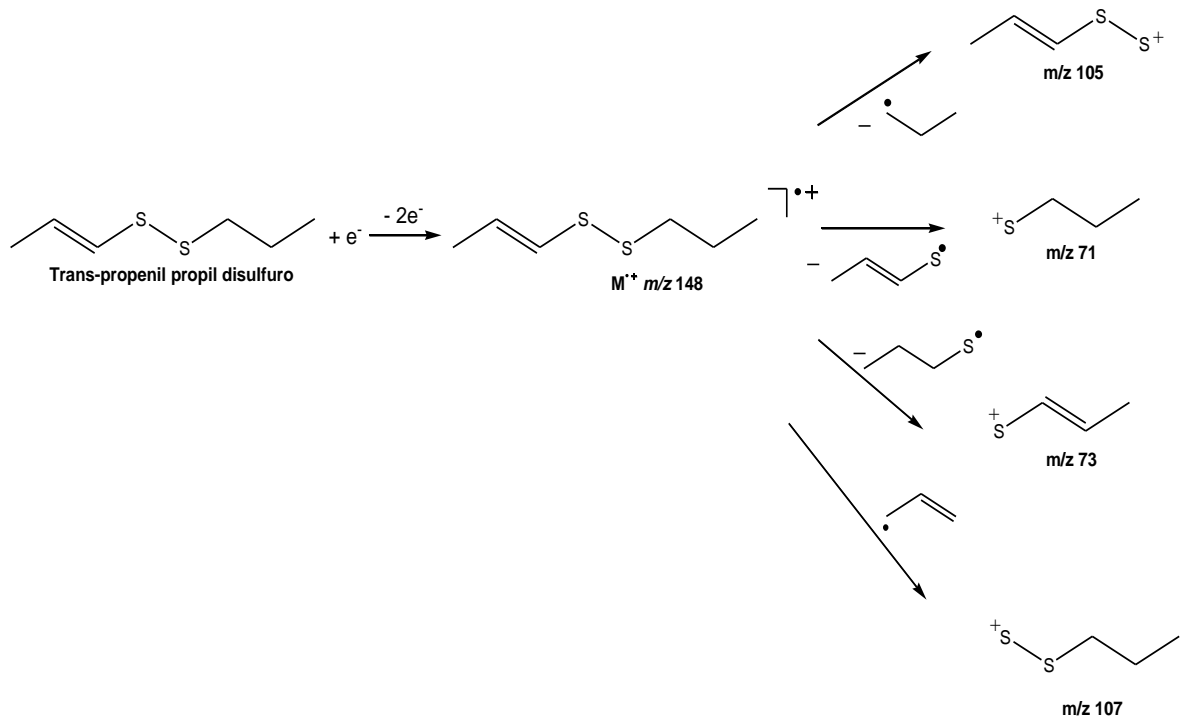
- Compuesto: Metil alil Trisulfuro. $C_4H_8S_3$. MW: 152.
Identificado en: A



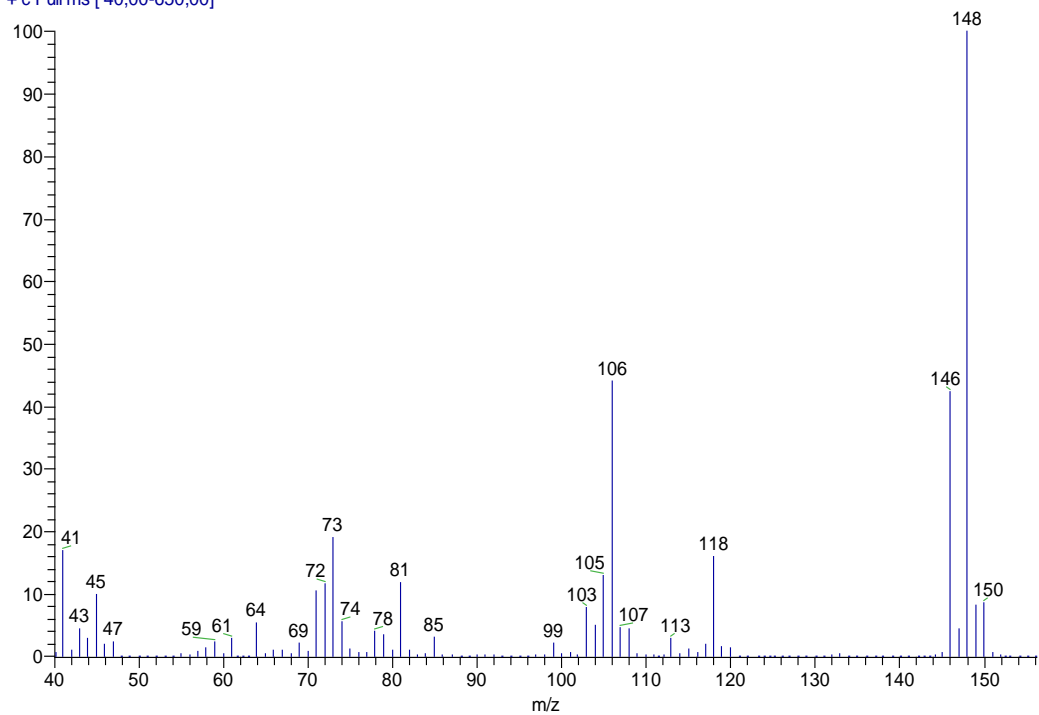
08121210 #629-631 RT: 16,00-16,04 AV: 3 SB: 20 15,77-15,94 , 16,11-16,31 NL: 2,39E6
T: + c Full ms [40,00-650,00]



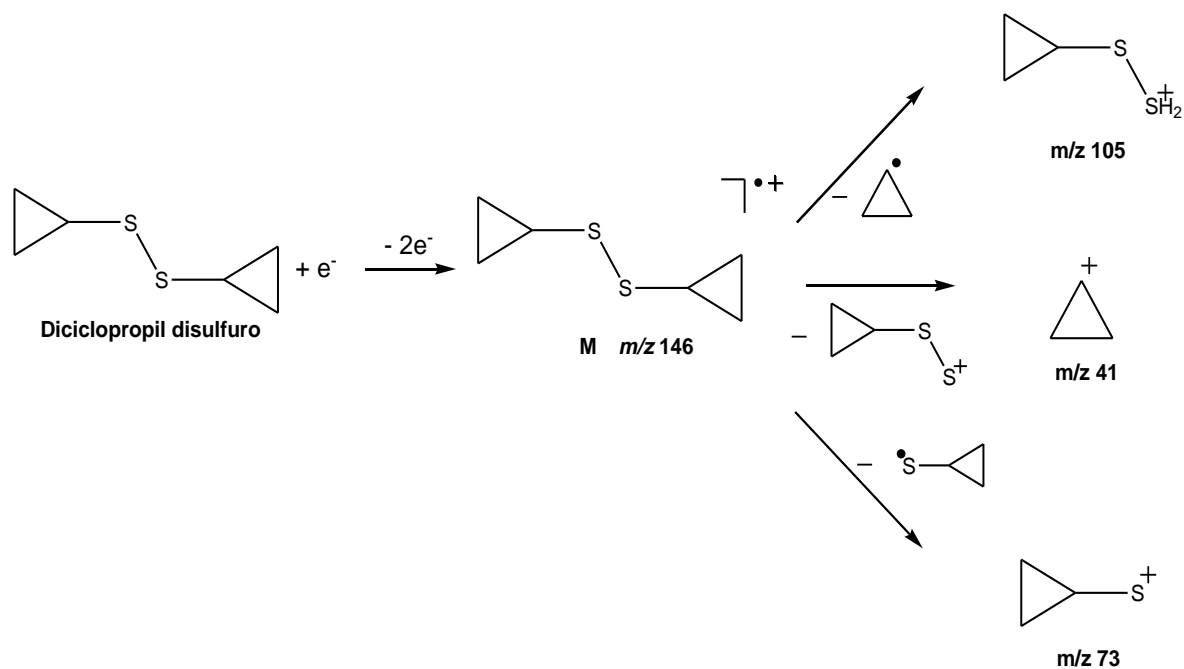
- Trans-propenil propil disulfuro. C₆H₁₂S₂. MW: 148.
Identificado en: B, C, D, E, F, G



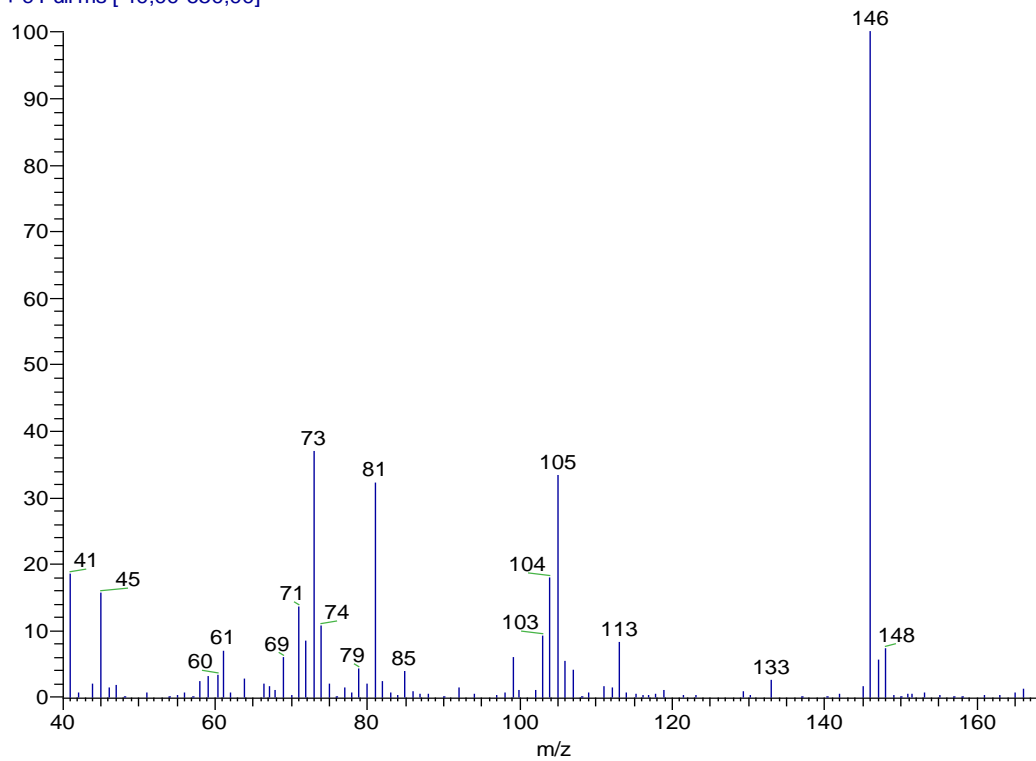
08121205 #535-538 RT: 14,06-14,12 AV: 4 NL: 7,47E5
T: + c Full ms [40,00-650,00]



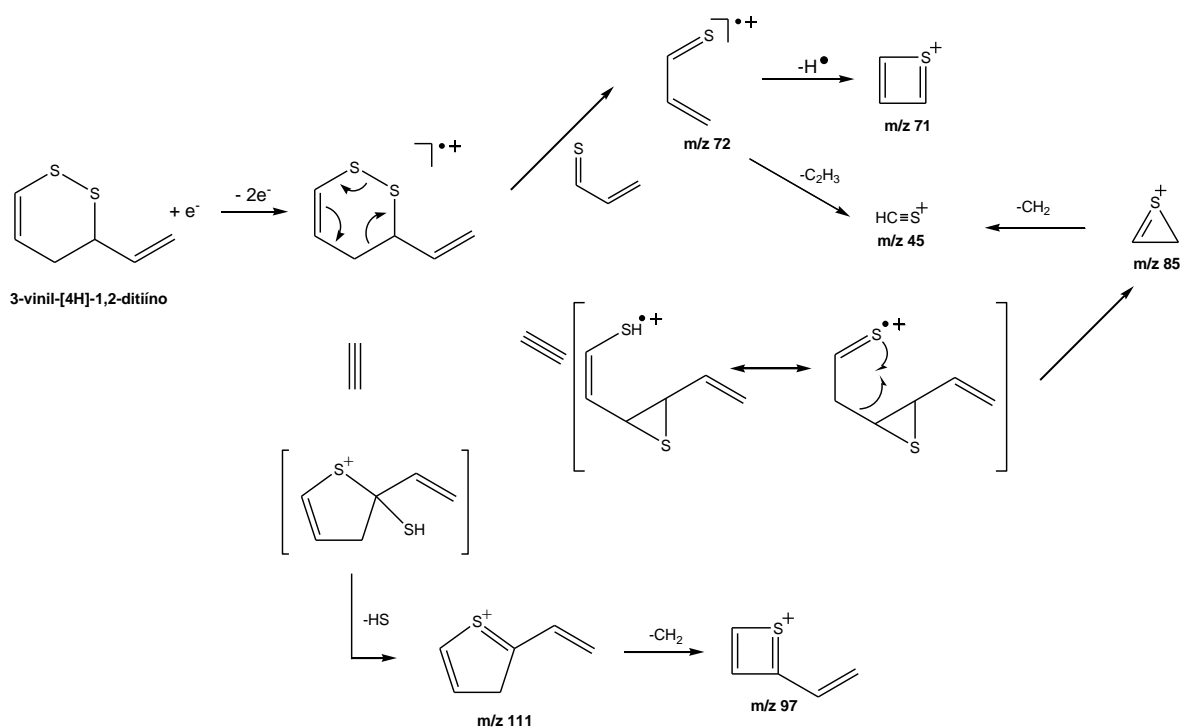
- Compuesto: Diciclopropil disulfuro. $C_6H_{10}S_2$. MW: 146
Identificado en: B, C, E, F G



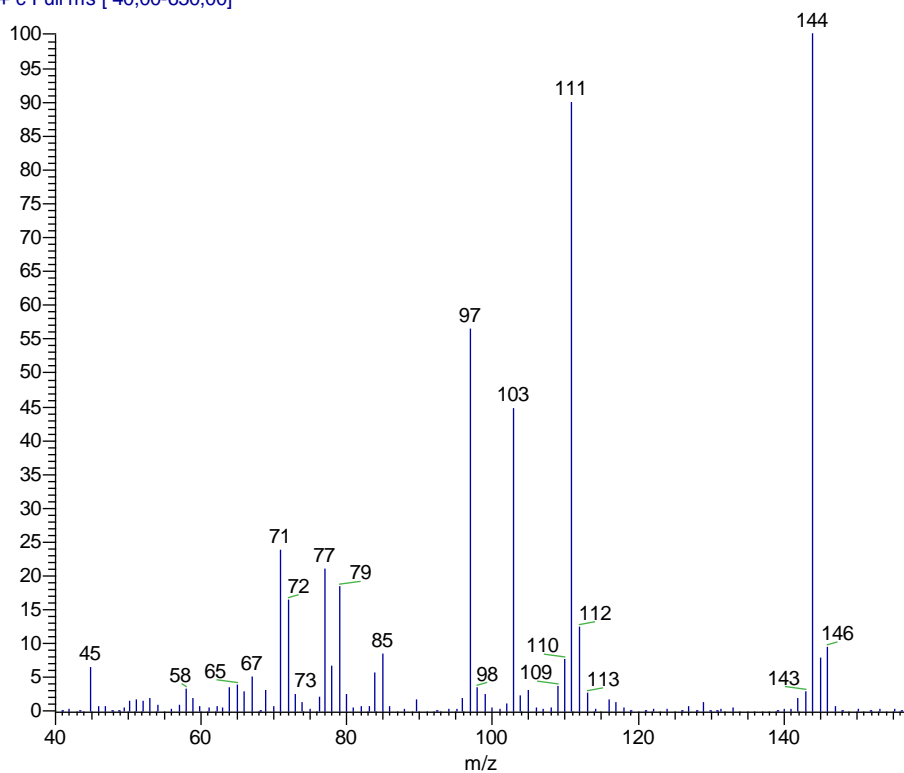
08121202 #553-555 RT: 14,43-14,47 AV: 3 SB: 17 14,25-14,41 , 14,49-14,64 NL: 4,10E4
T: + c Full ms [40,00-650,00]



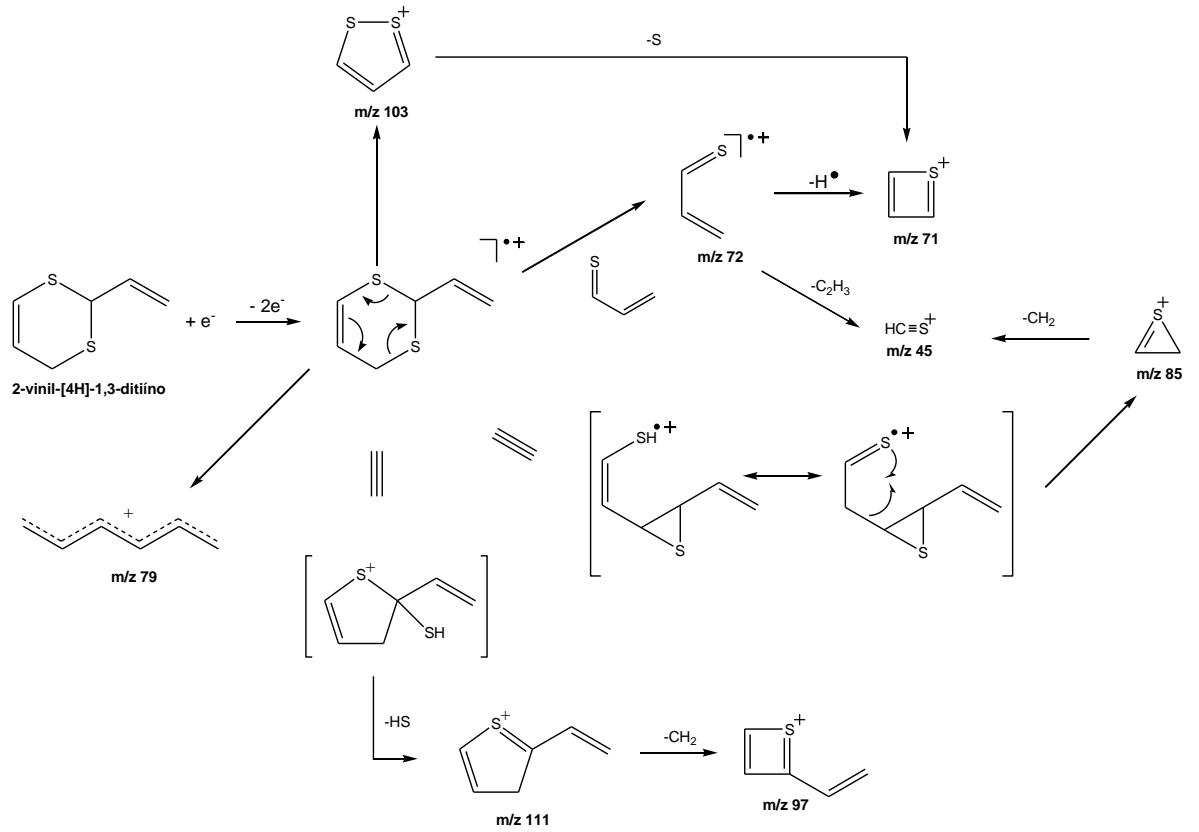
- Compuesto: 3-Vinil-[4H]-1,2-ditióno, (3-VDT). C₆H₈S₂. MW: 144.
Identificado en: A, B, C, D, E, F, G



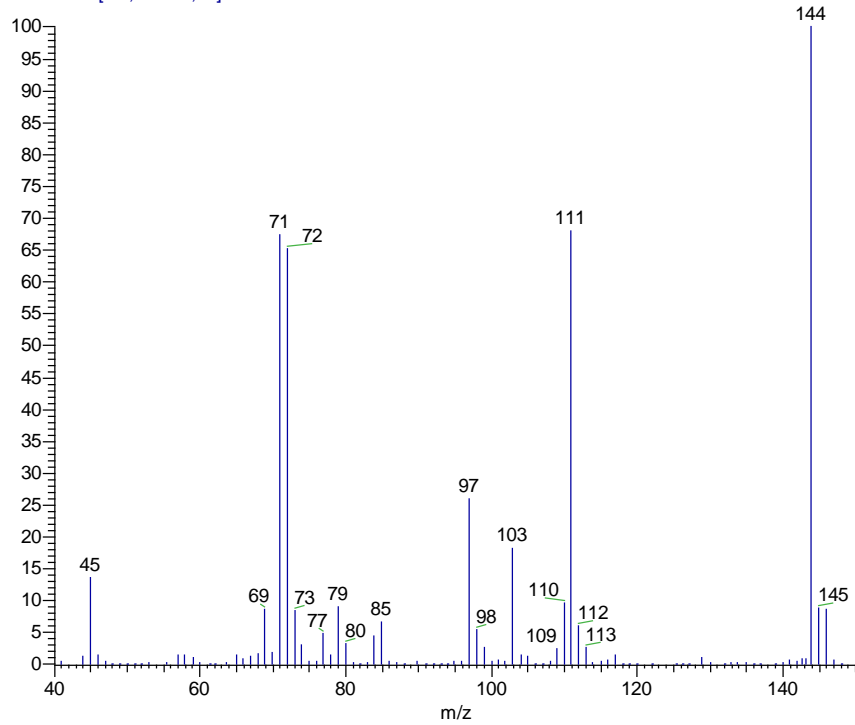
08121210 #733-736 RT: 18,16-18,22 AV: 4 SB: 31 17,62-18,07 , 18,28-18,42 NL: 6,59E4
T: + c Full ms [40,00-650,00]



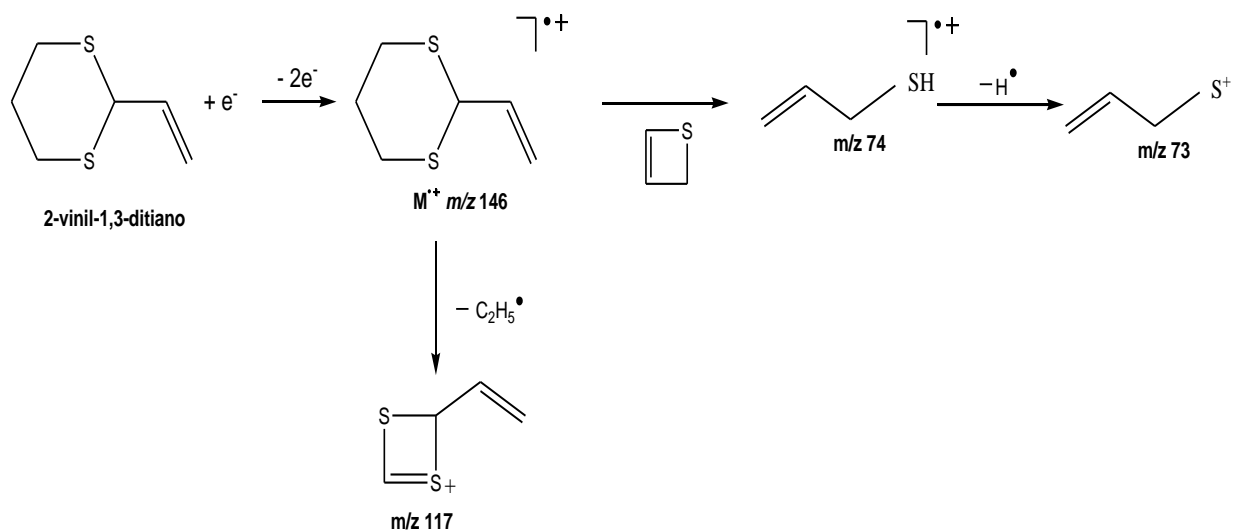
- Compuesto: 2-Vinil-[4H]-1,3-ditióno, (2-VDT). $C_6H_8S_2$. MW: 144
Identificado en: A, B, C, D, E, F, G



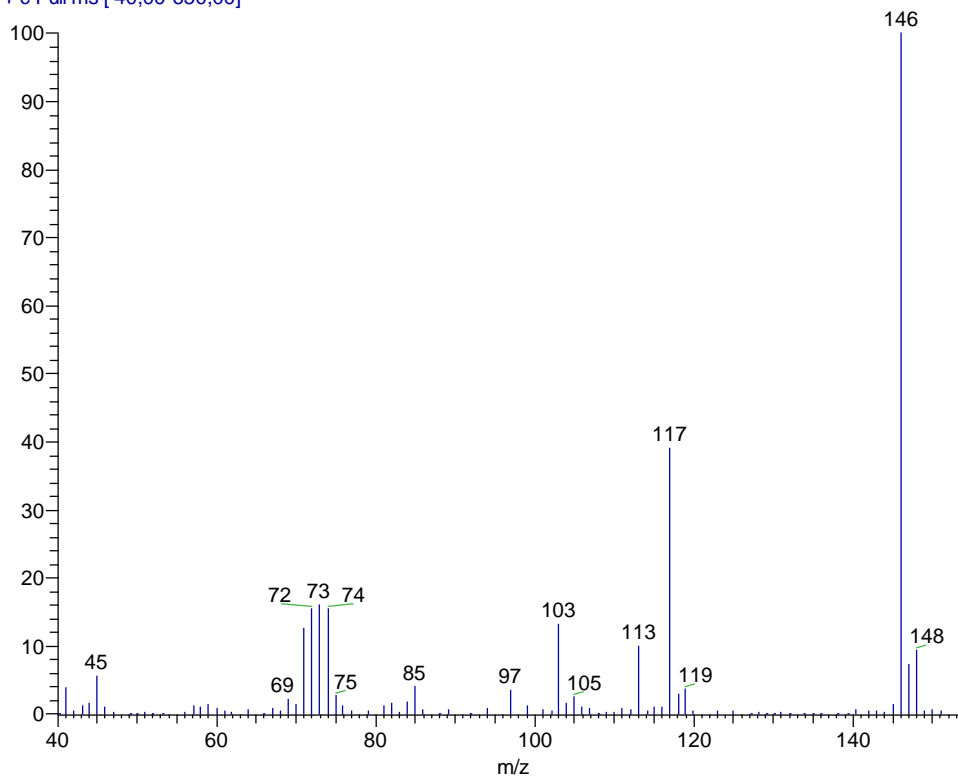
08121210 #792-794 RT: 19,38-19,42 AV: 3 SB: 39 18,80-19,29, 19,48-19,75 NL: 2,48E5
T: + c Full ms [40,00-650,00]



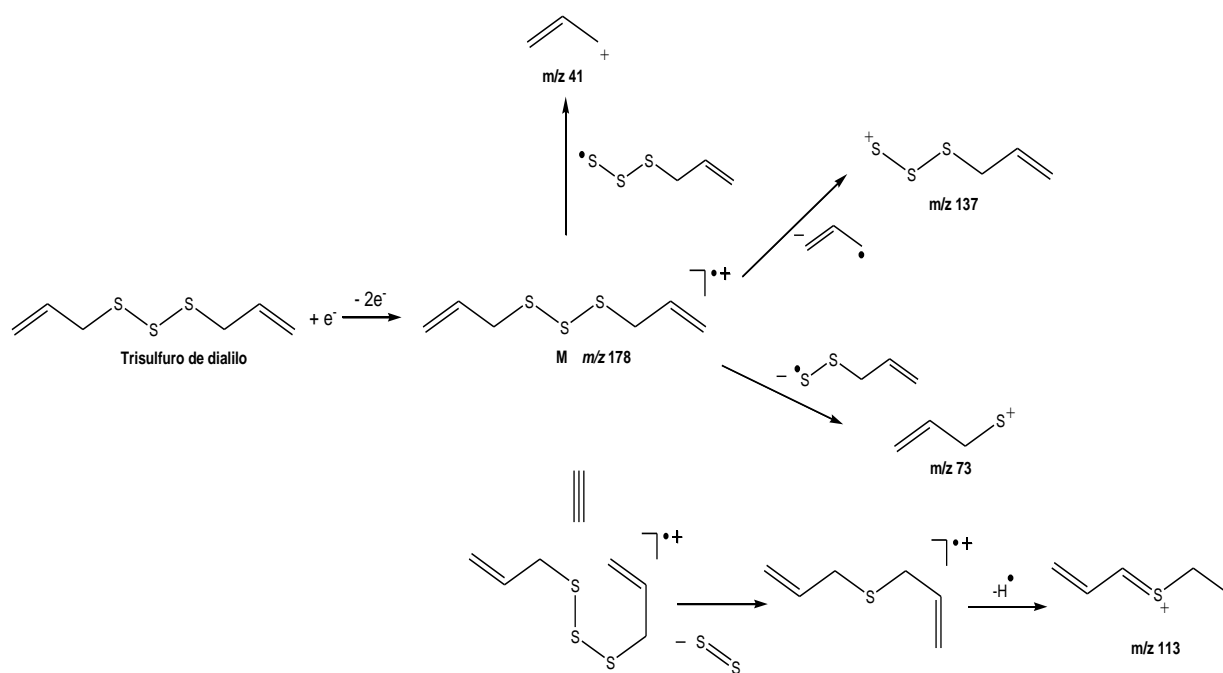
- Compuesto: 2-Vinil-1,3-ditiano. $C_6H_{10}S_2$. MW: 146.
Identificado en: B, C, D, E, F, G



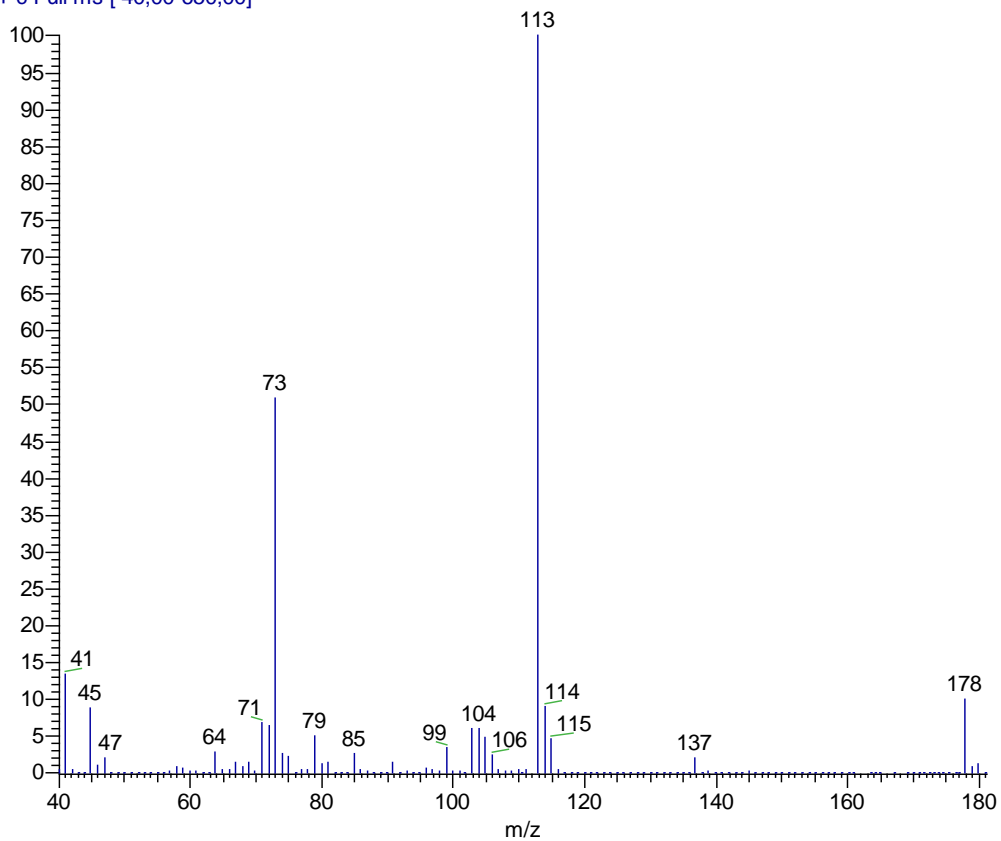
08121202 #805-810 RT: 19,65-19,75 AV: 6 SB: 15 19,55-19,65 , 19,75-19,92 NL: 4,23E4
T: + c Full ms [40,00-650,00]



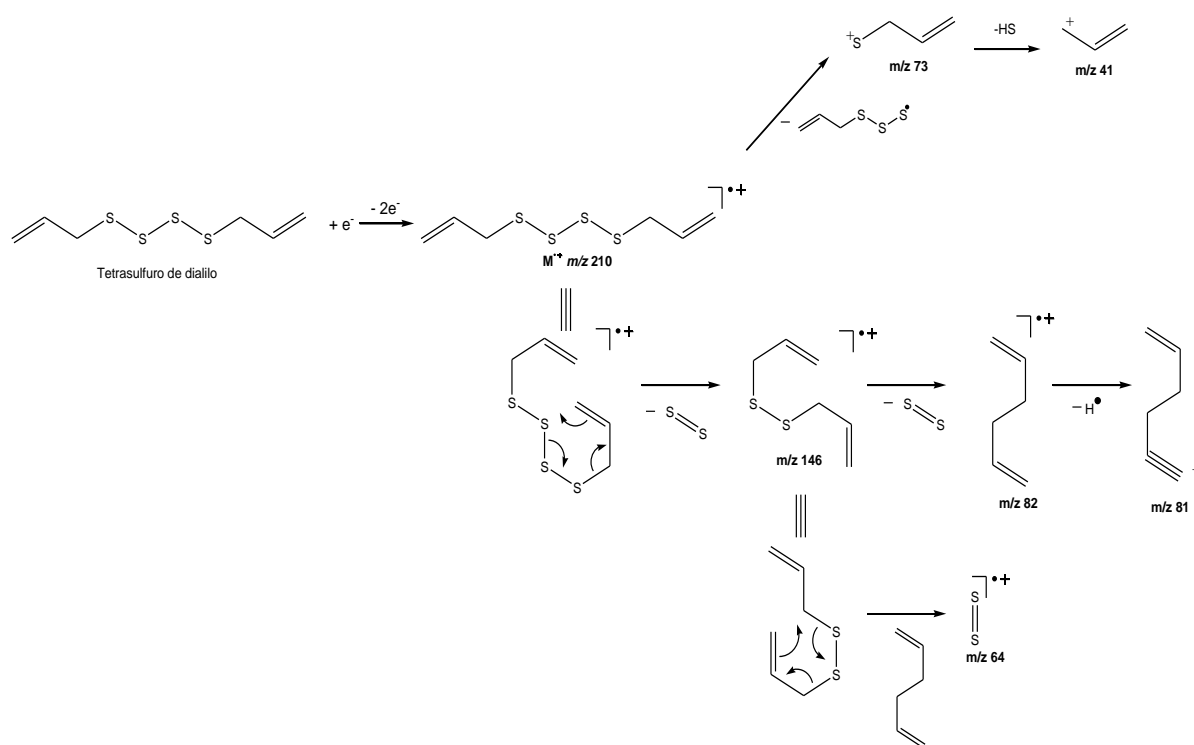
- Compuesto: Trisulfuro de dialilo. $C_6H_{10}S_3$. MW: 178.
Identificado en: A, B, C, D, E, F, G



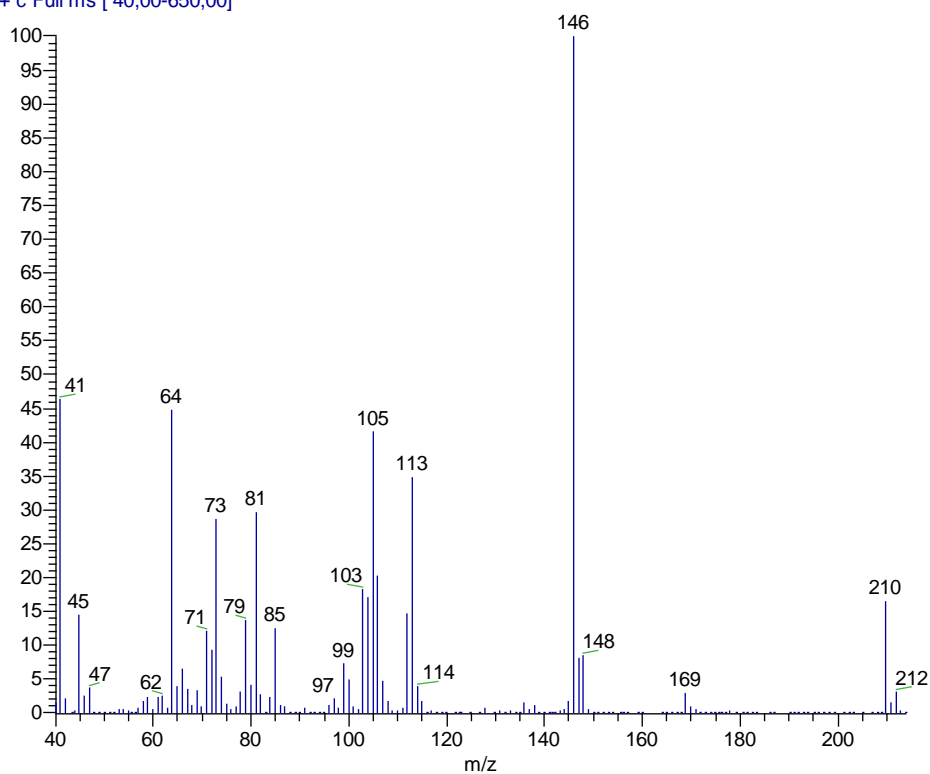
08121210 #988-990 RT: 23,44-23,48 AV: 3 SB: 40 22,94-23,33 , 23,52-23,91 NL: 2,11E7
T: + c Full ms [40,00-650,00]



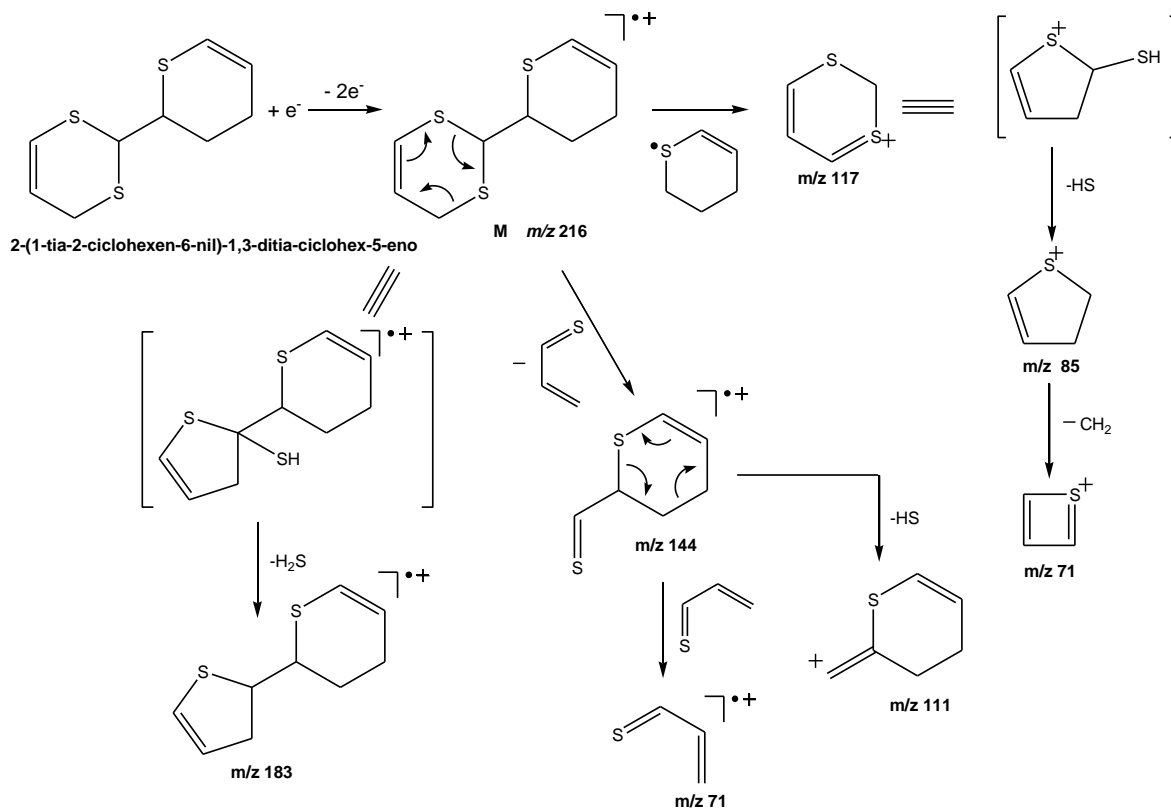
- Compuesto: Tetrasulfuro de dialilo. $C_6H_{10}S_4$. MW: 210.
Identificado en: A, E, F, G



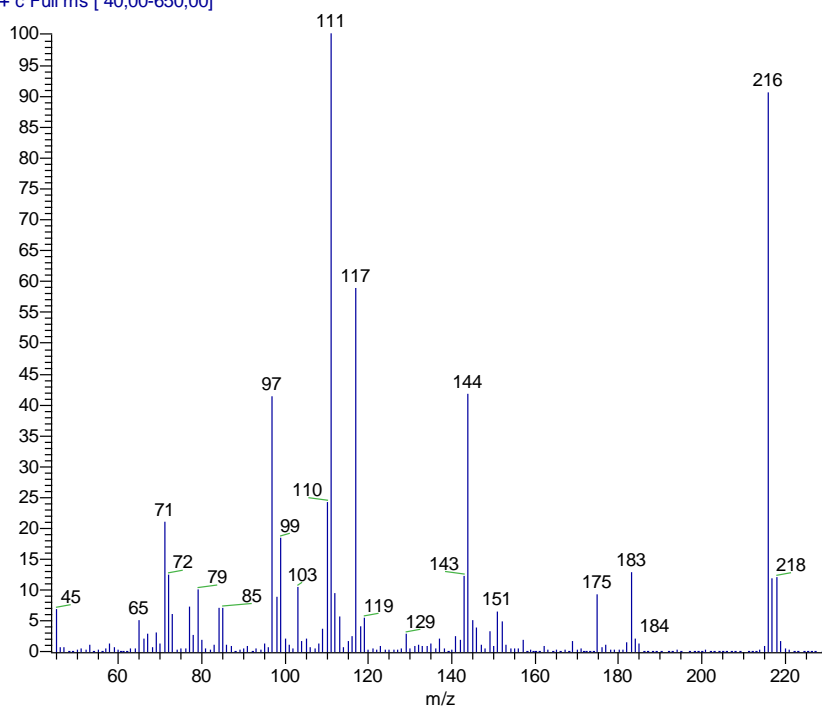
08121210 #1449-1451 RT: 32,98-33,02 AV: 3 SB: 19 32,71-32,90 , 33,06-33,23 NL: 8,31E5
T: + c Full ms [40,00-650,00]



- Compuesto 2-(1-tia-2-ciclohexen-6-il)-1,3-ditia-5-ciclohexeno. C₉H₁₂S₃. MW: 216. Identificado en: B, C, E, F, G



08121202 #2026-2031 RT: 44,93-45,03 AV: 6 SB: 17 7,16-7,33 , 7,47-7,62 NL: 2,10E5
T: + c Full ms [40,00-650,00]



ANEXO 3. Análisis estadístico de la cuantificación de disulfuro de dialilo en las muestras de aceite de ajo obtenido con US.

3.1 Pruebas de normalidad para las muestras de aceite de ajo obtenido con ultrasonido

DISOLVENTE

Pruebas de normalidad

DISOLVENTE	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
[DISULFURO DE DIALILO ÉTER	,242	27	,000	,809	27	,000
HEXANO	,216	27	,002	,814	27	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Pruebas de normalidad

TIEMPO DE EXTRACCIÓN	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
[DISULFURO DE DIALILO 30 min	,287	18	,000	,737	18	,000
45 min	,303	18	,000	,750	18	,000
60 min	,286	18	,000	,761	18	,000

a. Corrección de la significación de Lilliefors

3.2 Prueba de Kruskal-Wallis

Estadísticos de contraste^{a,b}

	[DISULFURO DE DIALILO
Chi-cuadrado	47,136
gl	2
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: TIEMPO DE EXTRACCIÓN

3.3 Prueba de Mann-Whitney

Estadísticos de contraste^a

	[DISULFURO DE DIALILO
U de Mann-Whitney	243,000
W de Wilcoxon	621,000
Z	-2,102
Sig. asintót. (bilateral)	,036

a. Variable de agrupación: DISOLVENTE

3.4. Prueba de Kruskal-Wallis para la combinación SOLVENTE-TIEMPO

Rangos

	SOLVENTE-TIEMPO	N	Rango promedio
[DISULFURO DE DIALILO	ÉTER-30 min	9	41,00
	ÉTER -45 min	9	23,00
	ÉTER-60 min	9	5,00
	HEXANO-30 min	9	50,00
	HEXANO-45 min	9	32,00
	HEXANO-60 min	9	14,00
	Total	54	

Estadísticos de contraste^{a,b}

	[DISULFURO DE DIALILO
Chi-cuadrado	51,555
gl	5
Sig. asintót.	,000

a. Prueba de Kruskal-Wallis

b. Variable de agrupación: SOLVENTE-TIEMPO

3.5 Prueba de Mann-Whitney para las muestras Hexano 30 min y Éter 30 min.

Rangos

	SOLVENTE-TIEMPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
[DISULFURO DE DIALILO	ÉTER-30 min	9	5,00	45,00
	HEXANO-30 min	9	14,00	126,00
	Total	18		

Estadísticos de contraste(b)

	[DISULFURO DE DIALILO
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	45,000
Z	-3,578
Sig. asintót. (bilateral)	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: SOLVENTE-TIEMPO

3.5.2 Prueba de Mann-Whitney para las muestras Éter 30 min y Hexano 45 min.

Rangos

	SOLVENTE-TIEMPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
[DISULFURO DE DIALILO	ÉTER-30 min	9	14,00	126,00
	HEXANO-45 min	9	5,00	45,00
	Total	18		

Estadísticos de contraste(b)

	[DISULFURO DE DIALILO
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	45,000
Z	-3,580
Sig. asintót. (bilateral)	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: SOLVENTE-TIEMPO

3.5.3 Prueba de Mann-Whitney para las muestras Hexano 45 min y Éter 45 min.

Rangos

	SOLVENTE-TIEMPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
[DISULFURO DE DIALILO	ÉTER -45 min	9	5,00	45,00
	HEXANO-45 min	9	14,00	126,00
	Total	18		

Estadísticos de contraste(b)

	[DISULFURO DE DIALILO
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	45,000
Z	-3,580
Sig. asintót. (bilateral)	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: SOLVENTE-TIEMPO

3.5.4 Prueba de Mann-Whitney para las muestras Éter 45 min y Hexano 60 min.

Rangos

	SOLVENTE-TIEMPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
[DISULFURO DE DIALILO	ÉTER -45 min	9	14,00	126,00
	HEXANO-60 min	9	5,00	45,00
	Total	18		

Estadísticos de contraste(b)

	[DISULFURO DE DIALILO
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	45,000
Z	-3,582
Sig. asintót. (bilateral)	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: SOLVENTE-TIEMPO

3.5.5 Prueba de Mann-Whitney para las muestras Hexano 60 min y Éter 60 min.

Rangos

	SOLVENTE-TIEMPO	N	Rango promedio	Suma de rangos
[DISULFURO DE DIALILO	ÉTER-60 min	9	5,00	45,00
	HEXANO-60 min	9	14,00	126,00
	Total	18		

Estadísticos de contraste(b)

	[DISULFURO DE DIALILO
U de Mann-Whitney	,000
W de Wilcoxon	45,000
Z	-3,580
Sig. asintót. (bilateral)	,000
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	,000(a)

a No corregidos para los empates.

b Variable de agrupación: SOLVENTE-TIEMPO

3.6 Análisis de varianza (ANOVA) para las mortalidades obtenidas en la aplicación del aceite de ajo obtenido por HI y US sobre T. solanivora.

Pruebas de normalidad

Tiempos: 0, 6, 12, 24 y 48 horas	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Tratamientos	,227	11	,120	,819	11	,017

a Corrección de la significación de Lilliefors

LOGROS OBTENIDOS

- **ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN**

Asesor: Joaquín Altarejos Ph.D.

Grupo de Investigación de Compuestos de Interés Biológico

Universidad de Jaén

Jaén-España

4 meses, Octubre de 2008 a Enero de 2009.

- **PONENCIA ORAL**

“Estudio preliminar de los componentes activos presentes en el ajo (*Allium sativum* L.) cultivado en el municipio de Silvia, departamento del Cauca, Colombia”

VII Congreso Iberoamericano de Alimentos, CIBIA 2009, Bogotá Octubre 8 de 2009.

- **PRESENTACIÓN DE PÓSTER**

VII Congreso Iberoamericano de Alimentos, CIBIA 2009, Bogotá Octubre 8 de 2009.

- **ARTÍCULOS**

Para ser sometidos a evaluación en las revistas *Journal Agricultural Chemistry* y *Food Chemistry*

- “In Vivo Insecticide Activity of the Essential Oil of Garlic (*Allium sativum* L.) against potato tuber moth, *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelichiidae) “

-“Sulphur Compounds identification and Diallyl disulfide quantification in essential oil from garlic (*Allium sativum* L.) by hydrodistillation and ultrasound-assisted extraction.”

