

**Caracterización por GC-MS de las fracciones volátiles de las orquídeas
Cattleya trianae y *Cattleya mendelii*, a diferentes horas del día,
utilizando HS-SPME *in vivo* e *in vitro*.**

Wendy Loraine Hernández Plata

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2015

**Caracterización por GC-MS de las fracciones volátiles de las orquídeas
Cattleya trianae y *Cattleya mendelii*, a diferentes horas del día,
utilizando HS-SPME *in vivo* e *in vitro*.**

Wendy Loraine Hernández Plata

Tesis de grado para optar al título de Químico

Directores:

Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

Jairo R. Martínez, Químico, Ph.D.

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2015

AGRADECIMIENTOS

A la vida misma, por permitir estar en este tiempo, en este espacio y compartir con las personas que me rodean.

A los doctores, Elena Stashenko y Jairo René Martínez, por todo el conocimiento aportado, por su contribución al desarrollo de la ciencia en el país, y por el aporte a mi formación integral como persona y profesional.

A mis padres, Rosalba y Faustino, por ser mi mayor fuente amor, comprensión y apoyo incondicional, con su ejemplo y carácter me enseñan cómo ser humanos en estos difíciles tiempos. A mi hermano, que lo llevo presente todos los días y en cada momento de mi vida.

Finalmente agradecer, a mis amigos cercanos, especialmente a Silvia, más que amiga se ha convertido en una hermana, a todos mis compañeros del Centro de Excelencia CENIVAM, y a mis compañeros de CROM-MASS.

“Hay hombres que luchan un día y son buenos.

Hay otros que luchan un año y son mejores.

Hay quienes luchan muchos años, y son muy buenos.

Pero hay los que luchan toda la vida, esos son los imprescindibles”.

Berthold Brecht.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	21
1. MARCO REFERENCIAL	24
1.1. ORQUÍDEAS	24
1.1.1. Morfología floral	25
1.1.2. Género <i>Cattleya</i>	27
1.1.3. <i>Cattleya trianae</i>	28
1.1.4. <i>Cattleya mendelii</i>	30
1.1.5. Formación y función de los componentes volátiles en las plantas	32
1.1.6. Fragancia en las orquídeas	33
1.2 TÉCNICA EXTRACTIVA	34
1.2.1. Micro-extracción en fase sólida	34
1.2.2. Modos de extracción	35
1.2.2.1. Muestreo <i>in vivo</i> en SPME	36
1.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS	37
1.3.1. Cromatografía de gases	37
1.3.2. Espectrometría de masas	37
1.3.3. Identificación	38
1.4. MARCO DE ANTECEDENTES	39
2. METODOLOGÍA	44
2.1. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS AUXILIARES	44
2.2. MATERIAL VEGETAL	45
2.3. MUESTREO POR SPME DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE LAS FLORES	45
2.3.1. Muestreo por HS-SPME de la fracción volátil <i>in vitro</i> de la <i>C.trianae</i> y la <i>C.mendelii</i>	45
2.3.2. Muestreo por HS-SPME de la fracción volátil <i>in vivo</i> de la	49

	<i>C.trianae</i> y la <i>C.mendelii</i>	
2.4.	IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS	51
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
3.1.	MUESTREO POR HS-SPME Y CARACTERIZACIÓN POR GC-MS DE LAS FRACCIONES VOLÁTILES DE LAS FLORES DE <i>C.trianae</i> y <i>C.mendelii</i>	54
3.1.1.	Muestreo por HS-SPME <i>in vitro</i> y caracterización por GC-MS de las fracciones volátiles	54
3.1.2.	Muestreo y caracterización de la fracción volátil <i>in vivo</i> por medio de SPME	78
4.	CONCLUSIONES	92
5.	RECOMENDACIONES	94
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
	ANEXOS	114

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Inflorescencia en forma de racimo de la orquídea <i>Phalaenopsis</i> . Fuente: Lecoufle, Marcel. Atlas ilustrado de las orquídeas. Susaeta Ediciones, S.A. España. 2008.	19
Figura 2. Inflorescencia en forma de espiga de la orquídea <i>Orchis simia</i> . Fuente: Flora de Navarra y Aragón. [Online]. Disponible en: http://florainavarra.blogspot.com/2012/06/oroz-betelu-azparren-13-05-12.html Visitado: 12 de octubre de 2014.	20
Figura 3. Inflorescencia con muchas flores de la orquídea <i>Angraecum calceolus</i> . Fuente: Lecoufle, Marcel. Atlas ilustrado de las orquídeas. Susaeta Ediciones, S.A. España. 2008.	20
Figura 4. Flor de la orquídea <i>Cattleya trianae</i> . Fuente: Fotografía tomada por Helmar Cáceres Cárdenas. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 29 de agosto de 2014.	23
Figura 5. Morfología del pétalo modificado, denominado labelo, de la orquídea <i>Cattleya trianae</i> . Fuente: Fotografía tomada por Helmar Cáceres Cárdenas. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 29 de agosto de 2014.	24
Figura 6. Flor de la orquídea <i>Cattleya mendelii</i> . Fuente: Fotografía tomada por Helmar Cáceres Cárdenas. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 29 de agosto de 2014.	25
Figura 7. Procedimiento en micro-extracción en fase sólida. A. Extracción de los analitos de la muestra. 1. Perforación del <i>septum</i> del vial. 2. Exposición de la fibra. 3. Retracción de la fibra dentro del vial. B. Desorción de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. 1. Perforación del <i>septum</i> del puerto de inyección. 2. Desorción de la fibra. 3. Retracción de la fibra del puerto de inyección [29].	28
Figura 8. Relación de publicaciones científicas por año. Fuente: <i>Scopus</i>	33

(Elsevier). Período de observación: 1990-2014. Fecha de búsqueda: 10 de octubre de 2014. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (“orchids”) AND TITLE-ABS-KEY (“cattleya”)).

Figura 9. Relación de publicaciones por áreas de conocimiento. Fuente: 34
Scopus (Elsevier). Período de observación: 1990-2014. Fecha de búsqueda: 10 de octubre de 2014. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (“orchids”) AND TITLE-ABS-KEY (“cattleya”)).

Figura 10. Planta *Plumeria rubra* (Familia: *Apocynaceae*). **A.** Ramillete de 39
flores. **B.** Flor de *P.rubra*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 4 de junio de 2014.

Figura 11. Exposición de la fibra de SPME al espacio de cabeza del vial 41
ámbar que contiene la muestra (flores). Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 12 de junio de 2014.

Figura 12. Monitoreo de la fracción volátil de las flores de *Cattleya*. 42
Exposición de la fibra de SPME en el frasco de vidrio, durante 30 min. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 9 de septiembre de 2014.

Figura 13. Muestreador de flores fabricado en acrílico 100%. Fuente: 43
Fotografía tomada por la autora. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 21 de mayo de 2014.

Figura 14. Monitoreo de la fracción volátil de la *C.trianae*. **A.** Flor de 44
C.trianae introducida en el muestreador de flores. **B.** Exposición de la fibra de SPME dentro del muestreador de flores. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 4 de septiembre de 2014.

Figura 15. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network* 45
Series GC, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies*

MSD 5973. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 3 de septiembre de 2014.

Figura 16. Selección del recubrimiento polimérico de la fibra de SPME: respuesta del GC-MS (área total, cuentas) a los volátiles de las flores de *P.rubra* (temperatura: 40°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra: 30 min) aislados por HS-SPME *in vitro*. 48

Figura 17. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles aislados de las flores de *P.rubra* por HS-SPME *in vitro* (temperatura: 40°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 30 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**. 49

Figura 18. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles aislados de las flores de *P.rubra* por HS-SPME *in vitro* (temperatura: 60°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 70 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**. 50

Figura 19. Experimentos de SPME para extraer las fracciones volátiles de las flores de *P.rubra*, usando el recubrimiento polimérico PDMS/DVB, a 40°C, y diferentes tiempos de exposición de la fibra. 52

Figura 20. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles, extraídos por HS-SPME, de las flores de *P.rubra*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 µm). Temperatura: 60°C. 53

Figura 21. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles, extraídos por HS-SPME, de las flores de *P.rubra*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 µm). Temperatura: 70°C. 55

Figura 22. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles, extraídos por HS-SPME, de las flores de *P.rubra*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 µm). Temperatura: 80°C. 59

Figura 23. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{std}}$, según la familia de compuestos 61

presentes en la fracción volátil de las flores de *P.rubra*, a diferentes temperaturas (40, 60, 70 y 80°C). M: Monoterpenoides. S: Sesquiterpenoides. Benz: Benzenoides. CN: Compuestos nitrogenados.

Figura 24. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles aislados por HS-SPME, de las flores de *C.mendelii* (temperatura: 60°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 70 min), monitoreado a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**. 65

Figura 25. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en las fracciones volátiles de las flores de *C.mendelii*, del monitoreo *in vitro* por HS-SPME a diferentes horas del día. HM: Hidrocarburos monoterpénicos. MO: Monoterpenos oxigenados. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. SO: Sesquiterpenos oxigenados. BENZ: Benzenoides. CA: Compuestos alifáticos. 66

Figura 26. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**. 68

Figura 27. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.trianae*, obtenidos *in vitro* por HS-SPME a diferentes horas del día. Benz: Benzenoides. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. CA: Compuestos alifáticos. 71

Figura 28. Evaluación del tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm) de SPME para el monitoreo *in vivo* de las flores de *P.rubra* usando el muestreador de flores (**Figura 13**). 72

Figura 29. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME *in vivo* [tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 70 min], monitoreo a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La 74

identificación de los picos aparece en la **Tabla 13**.

Figura 30. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{std}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.mendelii*, del monitoreo *in vivo* por HS-SPME a diferentes horas del día. HM: Hidrocarburos monoterpénicos. MO: Monoterpenos oxigenados. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. BENZ: Benzenoides. CA: Compuestos alifáticos. 76

Figura 31. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.triana*, aislados por HS-SPME *in vivo* [tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μm): 70 min], monitoreo a las 7 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14**. 78

Figura 32. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{std}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.triana*, del monitoreo *in vivo* por HS-SPME a diferentes horas del día. HM: Hidrocarburos monoterpénicos. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. Benz: Benzenoides. 80

Figura 33. Comparación de la composición química, según familias de compuestos, aislados por HS-SPME *in vivo* de las flores de *C.mendelii* y *C.triana* monitoreadas a diferentes horas del día. **A.** 7 a.m. **B.** 11 a.m. **C.** 3 p.m. **D.** 7 p.m. 82

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Identificación taxonómica de la <i>Cattleya trianae</i> .	23
Tabla 2. Identificación taxonómica de la <i>Cattleya mendelii</i> .	25
Tabla 3. Materiales, reactivos, equipos analíticos y menores.	37
Tabla 4. Descripción de los recubrimientos poliméricos de las fibras de SPME usados en los ensayos preliminares.	40
Tabla 5. Condiciones experimentales para la exposición de la fibra a los volátiles de las flores de <i>P.rubra</i> .	41
Tabla 6. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME <i>in vitro</i> , de las flores de <i>P.rubra</i> , a diferentes temperaturas, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB, 70 min.	51
Tabla 7. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME <i>in vitro</i> , de las flores de <i>P.rubra</i> , a 40°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.	54
Tabla 8. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME <i>in vitro</i> , de las flores de <i>P.rubra</i> , a 60°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.	57
Tabla 9. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME <i>in vitro</i> , de las flores de <i>P.rubra</i> , a 70°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.	58
Tabla 10. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME <i>in vitro</i> , de las flores de <i>P.rubra</i> , a 80°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.	60
Tabla 11. Cantidad relativa (%) de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de <i>C.mendelii</i> , del monitoreo <i>in vitro</i> por HS-SPME (fibra PDMS/DVB (65 µm), temperatura, 60°C, tiempo de exposición de la fibra, 70 min), según la hora del día.	63
Tabla 12. Cantidad relativa (%) de compuestos presentes en la fracción	69

volátil de las flores de *C.trianae*, aislados por el monitoreo *in vitro* por HS-SPME (fibra PDMS/DVB (65 μ m), temperatura, 60°C, tiempo de exposición de la fibra, 70 min), según la hora del día.

Tabla 13. Relación $\text{Área}_{\text{comp}}/\text{Área}_{\text{istd}}$ de los compuestos presentes aislados *in vivo* por HS-SPME (fibra PDMS/DVB (65 μ m), tiempo de exposición de la fibra: 70 min), de las flores de *C.mendelii*, a diferentes horas del día. 73

Tabla 14. Relación $\text{Área}_{\text{comp}}/\text{Área}_{\text{istd}}$ de los compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.trianae*, aislados por HS-SPME *in vivo* (fibra: PDMS/DVB (65 μ m), tiempo de exposición de la fibra: 70 min), a diferentes horas del día. 77

Tabla 15. Comparación de la relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en las fracciones volátiles de las flores de *C.mendelii* y *C.trianae*, aisladas *in vivo* por HS-SPME a diferentes horas del día. 81

LISTADO DE ANEXOS

	Pag.
ANEXO A. Blancos de instrumentos menores (fibras de SPME, vial ámbar, frasco de vidrio para monitoreo <i>in vitro</i> y muestreador de acrílico para flores).	93
ANEXO B. Cromatogramas obtenidos por SPME-GC-MS de la fracción volátil de las flores de <i>P.rubra</i> .	97
ANEXO C. Cromatogramas obtenidos por SPME-GC-MS, del monitoreo <i>in vitro</i> , de la fracción volátil de las flores <i>C.trianae</i> y <i>C.mendelii</i> , cada 4 horas durante el día, a 60°C.	100
ANEXO D. Cromatogramas obtenidos por SPME-GC-MS, del monitoreo <i>in vivo</i> , de la fracción volátil de las flores <i>C.trianae</i> y <i>C.mendelii</i> , cada 4 horas durante el día.	105

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ASORQUISAN	Asociación de Orquideología de Santander
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos
CENIVAM	Centro Nacional de Investigación para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CAR/PDMS	Carboxen/Poli (dimetilsiloxano)
D.I.	Diámetro interno de la columna
d_f	Espesor de la fase estacionaria de la columna
EI	<i>Electron Impact</i> (Impacto de electrones)
e.g.	Por ejemplo
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-MS	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HS-SPME	<i>Headspace-Solid-Phase Microextraction</i> (Micro-extracción en fase sólida en espacio de cabeza)
i.e.	Es decir
IRL	Índice(s) de retención lineal(es)
LC/MS	<i>Liquid Chromatography/Mass Spectrometry</i> (Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de masas)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i> (Ionización-desorción por láser asistida por la matriz)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MSD	<i>Mass Spectrometry Detector</i> (Detector selectivo de masas)
ORQUISANDER	Asociación Orquideológica del Gran Santander
PDMS	Poli (dimetilsiloxano)
PDMS/DVB	Poli (dimetilsiloxano)/Divinilbenceno
SCO	Sociedad Colombiana de Orquideología

SPME

Solid-Phase Microextraction (Micro-extracción en fase sólida)

t_R

Tiempo de retención

RESUMEN

TITULO: CARACTERIZACIÓN POR GC-MS DE LAS FRACCIONES VOLÁTILES DE LAS ORQUÍDEAS *Cattleya trianae* Y *Cattleya mendelii*, A DIFERENTES HORAS DEL DÍA, UTILIZANDO HS-SPME *IN VIVO* E *IN VITRO**.

AUTOR: Wendy Loraine Hernández Plata**.

PALABRAS CLAVE: Fracción volátil, orquídeas, *Cattleya trianae*, *Cattleya mendelii*, micro-extracción en fase sólida.

Las plantas objeto de estudio del proyecto de investigación, fueron orquídeas del género *Cattleya*, las dos endémicas de Colombia, la *Cattleya trianae*, oriunda de Huila y Cundinamarca, flor nacional desde el 16 de noviembre de 1936, y la *Cattleya mendelii*, endémica del Norte de Santander y Santander. Son plantas pertenecientes a la familia *Orchidaceae*, distinguidas por sus fragantes y hermosas flores, importantes en la industria de la floristería.

Se estudió los metabolitos secundarios volátiles de las flores de las orquídeas, utilizando micro-extracción en fase sólida en espacio de cabeza (HS-SPME), técnica analítica promisoría para el análisis de volátiles. Se realizó en el modo *in vitro*, cortando las flores de las orquídeas y analizándolas en el laboratorio, e *in vivo*, sin necesidad de cortar la flor del sistema biológico, para tener un acercamiento real de la emisión de volátiles por parte de las orquídeas.

Los metabolitos secundarios encontrados en la *C.mendelii*, por HS-SPME, monitoreados *in vitro* e *in vivo*, pertenecen a la familia de compuestos monoterpénicos, sesquiterpénicos, benzenoides y compuestos alifáticos.

Los volátiles de la flor de la *C.trianae*, por HS-SPME, encontrados en el monitoreo *in vitro*, pertenecen a la familia de compuestos sesquiterpénicos, benzenoides y compuestos alifáticos. Y los encontrados por HS-SPME, *in vivo*, fueron de las familias de los hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y benzenoides.

*Trabajo de grado.

**Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena Stashenko, Química, Ph.D. y Jairo Martínez, Químico, Ph.D.

ABSTRACT

TITLE: CHARACTERIZATION BY GC-MS OF VOLATILE FRACTION OF ORCHIDS *Cattleya trianae* AND *Cattleya mendelii*, AT DIFFERENT TIMES OF DAY, USING HS-SPME *IN VIVO* AND *IN VITRO*.**

AUTHOR: Wendy Loraine Hernández Plata**

KEYWORDS: Volatile fraction, orchids, *Cattleya trianae*, *Cattleya mendelii*, solid phase micro-extraction.

The plants subject of study in the research Project, were orchids of the genus *Cattleya*, the *Cattleya trianae*, a native of Huila and Cundinamarca, national flower since november 16th, 1936, and *Cattleya mendelii* endemic of North Santander and Santander. They are plants belonging to the orchid family, distinguished by its fragrant and beautiful flowers, important in the florist industry.

Secondary metabolites of orchid flowers were studied, using micro-solid phase extraction in headspace (HS-SPME), promising technique for volatile analyzing . It performed *in vitro*, cutting orchid flowers and analyzing them, and *in vivo*, without cutting flower, to have a realistic approach to the emission of volatile by orchids.

The secondary metabolites found in the *C.mendelii*, by HS-SPME, monitored *in vitro* and *in vivo*, belong to the family of monoterpene compounds, sesquiterpene, benzenoids and aliphatic compounds.

The volatile metabolites of *C.trianae*, by HS-SPME, found in the monitoring *in vitro*, belong to the family of sesquiterpene, benzenoids and aliphatic compounds. And the metabolites found by HS-SPME, *in vivo*, were of the families of the monoterpene hydrocarbons, sesquiterpene and benzenoids.

*College thesis.

**Science Faculty. School of Chemistry. Directed by Elena Stashenko, Química, Ph.D. and Jairo Martínez, Químico, Ph.D.

INTRODUCCIÓN

Las orquídeas son una familia de plantas que ofrece una amplia y variada gama de flores, constituida por más de 25000 especies. Son plantas jóvenes en evolución y presentan una gran facilidad para dar híbridos entre especies del mismo género, y también entre los distintos géneros existentes [1]. Pertenecen a las angiospermas que, a su vez, se dividen en dos subclases: monocotiledóneas y dicotiledóneas. Las orquídeas son monocotiledóneas y se desarrollan en dos modos vegetativos: monopódicos y simpódicos. Las monopódicas crecen cada año en la parte superior del tallo de la planta, produciendo en dicho extremo las flores. Las simpódicas se desarrollan mediante brotes horizontales cortos o largos, cada brote nuevo surge de una yema anterior y de dichos brotes nuevos salen las flores [2].

Las orquídeas del territorio colombiano están catalogadas entre las flores más hermosas del mundo; sin embargo, la cantidad de especies amenazadas en el país, ha hecho que el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos “Alexander von Humboldt” presente el Libro Rojo de Orquídeas, que recoge el proceso de categorización para 207 especies de orquídeas colombianas, de las 3500 especies, que se creen presentes en Colombia; de este libro, se deriva que 6 especies se encuentran en peligro crítico, 64, en peligro (estando presente la *Cattleya trianae*) y 137, en condición de vulnerabilidad [3].

En Colombia, existen entidades sin ánimo de lucro como la Sociedad Colombiana de Orquideología (SCO), la Asociación de Orquideología de Santander (ASORQUISAN), la Asociación Orquideológica del gran Santander (ORQUISANDER), entre otras, encargadas del cultivo, propagación, conservación, publicación de revistas y libros de las distintas especies de orquídeas en el país [4-6]. Sin embargo, los estudios científicos sobre dichas plantas son escasos, y la información, que se ha podido extraer del estado de las poblaciones silvestres, ha sido limitada. Se conocen cerca de 3500 especies en Colombia, de las cuales

solo 371 están categorizadas, ellas representan aproximadamente el 10,5% de la flora de orquídeas en el país [3].

La flor nacional de Colombia es la orquídea *Cattleya trianae*, conocida como flor de mayo; lleva este nombre en honor al botánico, explorador y médico colombiano José Jerónimo Triana [7]. Fue escogida como flor nacional, según un concepto emitido por la Academia Colombiana de Historia el 16 de noviembre de 1936, aun cuando no ha sido consagrada oficialmente por ley [8].

La *C.mendelii*, otra especie del género *Cattleya*, es una flor nativa de Colombia que crece en afloramientos rocosos y las copas de los árboles en la cordillera Oriental de los Andes, en los departamentos de Santander y Norte de Santander [9]. Las flores tienen valor ornamental y económico, por su tamaño y color.

Este proyecto busca aportar bases científicas para el conocimiento de las especies *C.trianae* y *C.mendelii*. En el trabajo, se estudiaron las fracciones volátiles de las flores, por diferentes métodos y monitoreando a cuatro horas diferentes durante el día. El monitoreo *in vivo* se realizó por medio de un muestreador de flores acoplado con un dispositivo de micro-extracción en fase sólida (SPME), que permite la extracción de los metabolitos volátiles de la planta. Este instrumento posibilita el análisis de los metabolitos de la planta, sin su alteración y sin afectar el estado natural de la flor. El modo de análisis *in vitro* se desarrolló por medio de la técnica de micro-extracción en fase sólida. Este procedimiento de extracción se realizó cada cuatro horas, durante el día, para evaluar la variabilidad en el tipo de metabolitos encontrados. Los volátiles colectados se analizaron e identificaron por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

El desarrollo de este trabajo hace parte de la investigación propuesta en el Proyecto: “Búsqueda sistemática de especies vegetales promisorias de la biodiversidad colombiana, extracción, caracterización y evaluación de sus metabolitos secundarios y derivados funcionalizados”, que se encuentra en

ejecución por parte del Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, y que pertenece al programa “Bioprospección y desarrollo de ingredientes naturales para las industrias cosmética, farmacéutica y de productos de aseo con base en la biodiversidad colombiana”, que lleva a cabo la Unión Temporal Bio-Red-CO-CENIVAM, de la que es integrante la Universidad Industrial de Santander.

1. MARCO REFERENCIAL

1.1 ORQUÍDEAS

La familia Orchidaceae es la más grande del reino vegetal, pertenece a las angiospermas y, como el resto de organismos vivos, ha evolucionado a partir de formas ancestrales, como resultado de la selección natural y adaptación. Las orquídeas muestran diversas formas de crecimiento y han colonizado con éxito casi todos los hábitats en la tierra. El ancestro común más reciente de las orquídeas existentes vivió a finales del Cretácico [10]. La morfología especializada de las flores de las orquídeas, su olor característico y sus colores hacen que estas flores sean atractivas tanto para los polinizadores, como para las personas [11].

Las orquídeas se cultivan, principalmente, como plantas ornamentales y se valoran como flores de corte, no sólo por su belleza exótica, sino también por su larga vida útil. Estas plantas aportan millones de dólares a la industria, en varios países como: Tailandia, Australia, Singapur, Malasia, entre otros [12]. Aunque las orquídeas se cultivan principalmente, de forma ornamental, algunas, se emplean como plantas medicinales y como alimentos (tubérculos de *Cynorchis* y *Eulophia*) por muchas culturas y tribus diferentes [13]. Varias especies pertenecientes a los géneros *Anoectochilus*, *Goodyera*, *Ludisia*, *Macodesy* *Cattleya*, se denominan orquídeas “joya” y se cultivan por su hermoso follaje.

Estas plantas emiten compuestos volátiles, entre ellos, terpenoides, benzenoides, derivados de ácidos grasos, entre otros, y lo hacen para atraer a sus polinizadores, de modo tal que las orquídeas que engañan morfológicamente a los polinizadores cambian con facilidad los volátiles florales que producen. Sin embargo, aquellas orquídeas, que ofrecen alguna recompensa al polinizador, sí muestran baja variabilidad en el tipo de metabolitos volátiles emitidos [14].

Esta familia de plantas cuenta con alrededor de 35000 especies, divididas en aproximadamente 800 géneros distribuidos por todo el mundo. Colombia cuenta con 3500 especies aproximadamente, ocupando el tercer lugar a nivel mundial; las orquídeas se concentran, principalmente, en la región Andina (87.2%), donde la región paramuna posee el 15% de las especies; le siguen las regiones Pacífica y Amazónica, con un 10.6% cada una. Las regiones más pobres en especies son la región Caribe y la Orinoquía con un cinco y cuatro por cientos, respectivamente [15].

1.1.1 Morfología floral

Los siguientes son los caracteres distintivos de las flores de las orquídeas: inflorescencia en forma de racimo, espiga, y varias flores (**Figuras 1-3**).

Figura 1. Inflorescencia en forma de racimo de la orquídea *Phalaenopsis*. Fuente: Lecoufle, Marcel. Atlas ilustrado de las orquídeas. Susaeta Ediciones, S.A. España. 2008.



Figura 2. Inflorescencia en forma de espiga de la orquídea *Orchis simia*. Fuente: Flora de Navarra y Aragón. [Online]. Disponible en:

<http://florainavarra.blogspot.com/2012/06/oroz-betelu-azparren-13-05-12.html>

Visitado: 12 de octubre de 2014.



Figura 3. Inflorescencia con muchas flores de la orquídea *Angraecum calceolus*. Fuente: Lecoufle, Marcel. Atlas ilustrado de las orquídeas. Susaeta Ediciones, S.A. España. 2008



En general, todas las flores se componen de diferentes partes dispuestas en verticilo, que se describen como órganos dispuestos en forma de círculo, sobre un mismo plano, alrededor de un eje común. Los sépalos son partes exteriores de la flor (dos laterales y uno dorsal) y protegen los órganos internos. Los pétalos son las partes internas de la flor más coloreadas y vistosas. Uno de los pétalos que está altamente modificado, se denomina, labelo; este puede ser más grande o pequeño que los demás pétalos, tener forma lobulada, fimbriada, en tubo o cornete y puede estar provisto de un saco o espolón en la parte trasera. El color del labelo es distinto al de los otros pétalos, puede presentar combinación de tonalidades, manchas, puntos o líneas [2].

Los estambres, partes masculinas de la flor, y el pistilo, parte femenina, están total o parcialmente unidos formando una columna o ginostemo. Estas partes, puede o no, estar fijadas al labelo. Debido a la cantidad de óvulos que pueden ser fecundados, el polen que está en la antera no se presenta en forma de polvo, como en otras plantas, sino en masas esféricas u ovoides llamadas polinios, que están dispuestas en dos, cuatro, seis u ocho pares, dependiendo de la planta. Pueden tener consistencia dura, cerosa, gelatinosa o pegajosa [2].

La flor de las orquídeas no está concebida para ser autofecundada. Por tanto, presenta un rostelo, situado en la columna, que permite al insecto penetrar hasta el centro de la flor, protegiendo el polen. Cuando el insecto se retira, el polen queda adherido a su cuerpo y sirve para fecundar otra flor. Típicamente, las flores son hermafroditas; solo hay tres géneros que tienen flores femeninas y masculinas en una misma vara floral: *Catasetum*, *Cycnoches* y *Mormodes* [2].

1.1.2 Género *Cattleya*

Este género lleva su nombre en honor a William Cattley, orquideólogo inglés y cultivador de plantas exóticas [16]. Estas plantas fueron apreciadas por la magnificencia de sus grandes flores, generalmente perfumadas. Son originarias de

América Central y América del Sur, la mayoría de especies viven en áreas montañosas, con una altitud entre 600 y 1800 m [2].

Las *Cattleyas* se pueden clasificar como unifoliadas y bifoliadas. Las unifoliadas tienen flores grandes, de pétalos anchos y de una sola hoja grande que sale del ápice del pseudobulbo. Producen dos o tres flores, dos veces al año aproximadamente, que duran de una a cuatro semanas. Las *Cattleyas* bifoliadas tienen flores pequeñas (en racimos de 20 o más flores) de color más intenso y variado que las unifoliadas y, también, su textura es diferente. Tienen de dos a tres hojas y florecen con más frecuencia que las unifoliadas [1].

En Colombia existen 11 especies del género *Cattleya*, todas apetecidas por su belleza y valor comercial. Sin embargo, la mayor parte de las poblaciones de orquídeas silvestres se encuentran amenazadas por la tala indiscriminada de árboles que les sirven de soporte, sumado a la colecta desmedida de orquídeas con fines económicos, que pone en peligro su existencia en el medio [17].

1.1.3 *Cattleya trianae*

La flor de mayo o *Cattleya trianae* (**Figura 4**), considerada símbolo colombiano, lleva este nombre en honor al naturalista colombiano José Jerónimo Triana. Es una planta epífita, de hojas carnosas, oriunda de Colombia. Por la vistosidad y el notable tamaño de sus flores, se incluyó en los símbolos nacionales a partir de noviembre de 1936, para acompañar al himno, la bandera, el escudo, la palma de cera y la esmeralda, a solicitud de la Academia de Historia de Colombia [18]. En la **Tabla 1**, se encuentra la identificación taxonómica de la *C. trianae*.

Figura 4. Flor de la orquídea *Cattleya trianae*. Fuente: Fotografía tomada por Helmar Cáceres Cárdenas. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 29 de agosto de 2014



Tabla 1. Identificación taxonómica de la *Cattleya trianae*.

REINO	PLANTAE
Phylum	Euphyta
Clase	Monocotiledónea
Orden	Gynandreae
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Género	<i>Cattleya</i>
Especie	<i>trianae</i>

Es una orquídea de hábito epífita, es decir, crece sobre los árboles, que son su soporte pero, sin alimentarse de éstos. Nativa de los departamentos de Tolima, Huila y Cundinamarca, es la orquídea que más se cultiva y la más característica de Colombia.

La flor está compuesta por tres sépalos: dos pétalos superiores, generalmente, del mismo color, más anchos y con márgenes rizados; y un labelo o labio central, con

el borde también rizado y con manchas de colores diferentes al resto de la flor (**Figura 5**). En cuanto al color de la flor, se encuentran en variedades desde blanco hasta el rojo, en diversas gamas [19].

Figura 5. Morfología del pétalo modificado, denominado labelo, de la orquídea *Cattleya trianae*. Fuente: Fotografía tomada por Helmar Cáceres Cárdenas. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 29 de agosto de 2014.



1.1.4 *Cattleya mendelii*

En Norte de Santander se han descrito 37 géneros y 105 especies de la familia de las *Orchidaceae*, dentro de las cuales se destaca la *Cattleya mendelii* [20] (**Figura 6**), que es una flor nativa de Colombia que crece en ambientes rocosos y en las copas de árboles frondosos en la Cordillera de los Andes; en Colombia, se encuentra principalmente en los departamentos de Norte de Santander y Santander.

Las plantas poseen flores vistosas y grandes, lo que les da un alto valor económico y ornamental. Generalmente, florece una vez al año, entre abril y mayo [21].

Figura 6. Flor de la orquídea *Cattleya mendelii*. Fuente: Fotografía tomada por Helmar Cáceres Cárdenas. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 29 de agosto de 2014.



Tabla 2. Identificación taxonómica de la *Cattleya mendelii*.

REINO	PLANTAE
Phylum	Euphyta
Clase	Monocotiledónea
Orden	Gynandreae
Familia	Orchidaceae
Subfamilia	Epidendroideae
Género	<i>Cattleya</i>
Especie	<i>mendelii</i>

La *C.mendelii*, se encuentra en peligro de extinción [3] debido a la tala de árboles, a la destrucción de su hábitat natural, al deterioro de la población en estado silvestre y a la recolección excesiva e ilegal con fines comerciales. Además, la

germinación de estas plantas en estado silvestre presenta limitaciones, como la poca reserva de nutrientes en las semillas, que es un factor limitante para la germinación y supervivencia en el hábitat natural [22].

1.1.5 Formación y función de los compuestos volátiles en las plantas

Las plantas sintetizan y emiten una gran variedad de compuestos orgánicos volátiles, siendo los dominantes los terpenos y los derivados de ácidos grasos. Mientras que algunos compuestos volátiles son, probablemente, comunes a casi todas las plantas, otros, son específicos de uno o varios géneros. Estos compuestos florales sirven como atrayentes para los polinizadores, mientras que los compuestos volátiles emitidos por las otras partes de la planta, parece que protegen a las plantas, al disuadir a los herbívoros y atraer a los enemigos de los herbívoros, en algunos casos [23].

En los últimos años, se ha avanzado enormemente en la comprensión de las rutas biosintéticas para la producción de compuestos volátiles y los mecanismos moleculares que regulan su formación. Además, muchos de estos compuestos están asociados con funciones defensivas y atractivas. Este progreso se debe, tanto a los avances generales en las técnicas bioquímicas y moleculares, como al desarrollo de nueva instrumentación para la recopilación y análisis de sustancias volátiles [24].

Algunas plantas emiten volátiles para atraer a sus polinizadores; esto se podría probar por manipulación genética de la emisión floral, usando mutantes y transformadores apropiados [25]. Para realizar estos procedimientos, es necesario conocer la biosíntesis de los compuestos volátiles florales, un campo en el que se ha progresado rápido en los últimos años [26]. Los primeros avances se produjeron, cuando la (S)-linalool sintasa se aisló de flores de *Clarkia breweri* y se purificó. Esta fue la primera enzima, que se extrajo durante el proceso de la formación de volátiles en flores, y proporcionó información sobre la secuencia de aminoácidos, lo que facilita el aislamiento del gen correspondiente, que se expresa

únicamente en las flores [26]. Estas investigaciones revelaron, que la formación de la fragancia, se regula principalmente mediante el control transcripcional de la expresión génica biosintética en las células epidérmicas de diversas partes florales, especialmente, en los pétalos.

La generación de compuestos volátiles no solo se presenta en las flores, sino también en otras partes de la planta [27]. Entre los más conocidos compuestos volátiles no florales, figura el isopreno, un terpeno que se libera del follaje de muchas especies, especialmente, en los árboles. Algunos estudios sugieren que el isopreno ayuda a que el aparato fotosintético de las plantas, se recupere de episodios breves de exposición a temperaturas superiores a 40°C, que a menudo ocurren, incluso en ambientes templados, por las hojas iluminadas por el sol en las copas de los árboles [28]. También, la producción de compuestos volátiles en el follaje de la planta sirve como repelente de ciertos herbívoros que se alimentan de ella.

1.1.6 Fragancia en las orquídeas

No todas las orquídeas emiten fragancia, pero algunas especies son tan aromáticas, que es posible conocer su identidad con solo olerlas, como es el caso de las flores de *Gymnadenia odoratissima* [2].

Los olores emitidos por las orquídeas no son producidos constantemente. Antes de hacerlo, las flores deben desplegarse completamente y coincidir con las horas en las que los insectos llegan a extraer el néctar o en busca de la hembra para la copulación.

Existen especies de orquídeas que emiten fragancias variables, es decir, diferentes con el pasar del día [2].

El labelo es el órgano que contiene, total o parcialmente, el perfume. Los labelos con espolón grande contienen el néctar en el fondo de este, como sucede en el caso de *Angraecum sesquipedale* [2]. Algunas orquídeas tienen las hojas

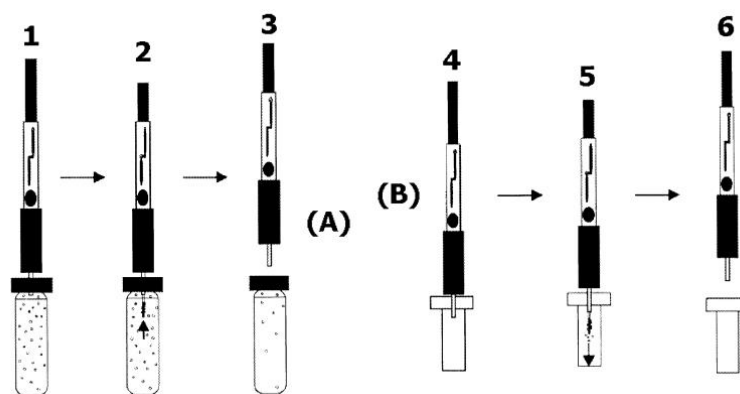
olorosas. Al secar, las hojas de *Dendrobium salaccense* desprenden un olor fuerte, penetrante. Basta con frotar las hojas de *Jumellea fragans*, para que los dedos queden perfumados. Las descripciones botánicas no incluyen las fragancias de las flores. Sin embargo algunas especies deben el nombre a su olor, e.g., *Vanilla fragans*, *Brassavola fragans*, *Epidendrum fragans*, *Sobralia fragans*, *Aspasia odorata*, *Epidendrum odoratissimum*, *Oncidium odoratissimum*, *Cymbidium suavissimum*, *Dendrobium suavissimum*, entre otras [2].

1.2 TÉCNICA EXTRACTIVA

1.2.1 Micro-extracción en fase sólida

Una de las tendencias en el desarrollo de las técnicas analíticas modernas, es evitar el uso de solventes. Se monitorean los metabolitos secundarios en fase vapor, por medio de crio-atrapamiento, con sorbentes sólidos (ad(b)sorbentes), entre otros, buscando optimizar los métodos rápidos, efectivos, robustos y seguros [29] (**Figura 7**).

Figura 7. Procedimiento en micro-extracción en fase sólida. **A.** Extracción de los analitos de la muestra. 1. Perforación del *septum* del vial. 2. Exposición de la fibra. 3. Retracción de la fibra dentro del vial. **B.** Desorción de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. 1. Perforación del *septum* del puerto de inyección. 2. Desorción de la fibra. 3. Retracción de la fibra del puerto de inyección [29].



Una de las técnicas analíticas más promisorias para el monitoreo de metabolitos volátiles de plantas es la micro-extracción en fase sólida (SPME). Fue desarrollada hace 25 años por Pawliszyn y Arthur en 1990 [30], para evaluar contaminantes tipo BTEX en agua; se usó en modo de inmersión directa y se planteó como alternativa la extracción líquido-líquido. Esta técnica permite la extracción y concentración simultánea de metabolitos volátiles y semivolátiles en alimentos, cosméticos, fármacos, plantas y polímeros volátiles, en el medio ambiente, entre otros [31-34]. Hay varios parámetros que se pueden modificar para mejorar la eficiencia de extracción de los metabolitos volátiles, a saber: la agitación de la muestra, el pH, la temperatura, adición de sal, el tiempo de equilibrio y el tiempo de exposición de la fibra de SPME [35].

Las fibras de SPME están hechas de sílice fundida, que se recubre con un material polimérico (adsorbente o absorbente). El polímero, que recubre la fibra, opera como fase estacionaria, que extrae y concentra los compuestos en un solo paso; los analitos luego se desorben o eluyen en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases o líquido, respectivamente [36].

El dispositivo usado en SPME, se conoce como *holder* y está diseñado como una cámara que guarda la fibra polimérica de SPME y cumple la función de jeringa, retrayendo y contrayendo la fibra en un tubo cilíndrico.

El modo de seleccionar el recubrimiento de la fibra polimérica, depende de la tarea analítica, *e.g.*, características fisicoquímicas de los compuestos, afinidad del analito por la fibra, punto de ebullición, presión de vapor, polaridad, concentración a la que se encuentra, entre otros [34]. Sin embargo, también, se deben considerar las características de la fibra, como su espesor, la polaridad, la estabilidad del polímero a altas temperaturas o el uso de solventes.

1.2.2 Modos de extracción

Existen tres modos de extracción, que pueden ser considerados: extracción directa, extracción en espacio de cabeza y extracción con protección de membrana [35]. En la extracción directa, la fibra es directamente inmersa en la muestra y los metabolitos se transportan de la matriz de la muestra al recubrimiento de la fibra. En el modo espacio de cabeza o *headspace*, los analitos son transportados a la fibra a través del espacio de cabeza. En este caso, la fibra polimérica queda protegida de los compuestos de alto peso molecular que estén dentro de la matriz y de las interferencias presentes. En el modo con protección de membrana, se usa la membrana para proteger la fibra de los posibles daños y contaminación severa, permitiendo el paso de analitos de bajo peso molecular, sin dejar pasar interferencias a la fibra [33].

1.2.2.1 Muestreo *in vivo* en SPME

La investigación *in vivo* tiene la ventaja de que el sistema experimental es un sistema biológico más complejo, y da una mayor aproximación a lo que sucede en el mundo real. Las muestras *in vitro*, normalmente, pueden no corresponder exactamente a la combinación de compuestos químicos producidos por un organismo o sistema no perturbado. La técnica de muestreo *in vivo* debe ser portátil, libre de solventes y permitir la integración de la etapa de muestreo, preparación y análisis de la muestra [37].

Una de las técnicas más prometedoras para la preparación rápida de muestras y su posterior análisis, es la micro-extracción en fase sólida. Este procedimiento de muestreo provoca alteraciones mínimas al sistema investigado. El análisis *in vivo* es un área de aplicación especial donde SPME está ganando terreno debido a sus características únicas: toma de muestras en el lugar, de fácil extracción y el análisis de toda la cantidad de analitos extraída. Las investigaciones *in vivo* están centradas en fragancias emitidas por insectos, hongos y bacterias. Estas investigaciones se han extendido a compuestos orgánicos volátiles biogénicos

emitidos por animales y plantas [38], se usó para el análisis *in vivo* de drogas por vía intravenosa en animales vivos [37]. Para la mayoría de aplicaciones *in vivo* de SPME, su sensibilidad y precisión fueron comparables o mejores que las de las técnicas tradicionalmente empleadas para las mismas muestras [39].

1.3 ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

1.3.1 Cromatografía de gases

A principios del siglo XIX, Mikhail Tswett, botánico ruso, trabajó en la Universidad de Varsovia, separó pigmentos naturales, pasando extractos vegetales a través de columnas adsorbentes empacadas; se designó como “cromatografía” al efecto observado en los experimentos [40]. Este término se emplea para referirse a todos los procesos que conlleven la distribución de analitos en dos fases, una móvil y una estacionaria. La cromatografía de gases es un método de separación, en el que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases, una, la estacionaria, con un área superficial relativamente grande, y otra, la fase móvil, que es un gas que se percola en la fase estacionaria [41].

La cromatografía de gases tiene su más grande fortaleza en la determinación de cuántos componentes se encuentran en una mezcla y en qué proporción [42]. Sin embargo, la capacidad de establecer la naturaleza y la estructura química de estos compuestos separados y cuantificados, es ambigua y reducida y requiere de detectores espectroscópicos. El más usado es el detector espectrométrico de masas, que permite obtener el espectro de masas de la molécula, que proporciona la información sobre la masa molecular, composición elemental (si se usan espectrómetros de masas de alta resolución), grupos funcionales presentes y, en algunos casos, la geometría e isomería espacial de la molécula.

1.3.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica altamente desarrollada, acompañada del desarrollo tecnológico de los sistemas de datos en donde se

almacenan los espectros de masas. Es una técnica de separación y detección de iones-fragmento, cuyo análisis permite conocer la estructura molecular de la sustancia ionizada [43].

La identificación confirmatoria de un compuesto en una mezcla compleja, requiere necesariamente la obtención de la “huella digital”, *i.e.*, espectral, del compuesto. La información complementaria a la de los tiempos o índices de retención, obtenidos por GC, es el espectro de masas, que presenta una combinación única de fragmentos cargados (iones) generados durante la disociación o fragmentación de la molécula. La complementariedad del análisis cromatográfico (*screening*) con datos espectrales confirmatorios, se logra usando la combinación de GC-MSD [44].

MS es una técnica analítica, tanto cualitativa como cuantitativa. Se usa para elucidar la estructura de compuestos desconocidos, en áreas de aplicación como productos naturales, compuestos sintéticos, farmacéutica, metabolitos de drogas, entre otras [45].

1.3.3 Identificación

Los compuestos volátiles se identifican utilizando criterios cromatográficos (tiempos e índices de retención) y espectrométricos (espectros de masas, patrones de fragmentación y composición elemental).

Parámetros cromatográficos: índices de retención lineal IRL, se calculan de acuerdo con la **Ecuación 1**, obtenidos por la comparación de los tiempos de retención t_R de una serie homóloga de hidrocarburos lineales, por GC bajo las mismas condiciones operacionales que la muestra.

$$IRL = 100 \times n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

donde;

n : Número de átomos de carbono del hidrocarburo que eluye antes del compuesto de interés.

t_{RX} : Tiempo de retención del compuesto de interés.

t_{RN} : Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye antes del analito de interés.

t_{RN} : Tiempo de retención del hidrocarburo que eluye después del analito de interés.

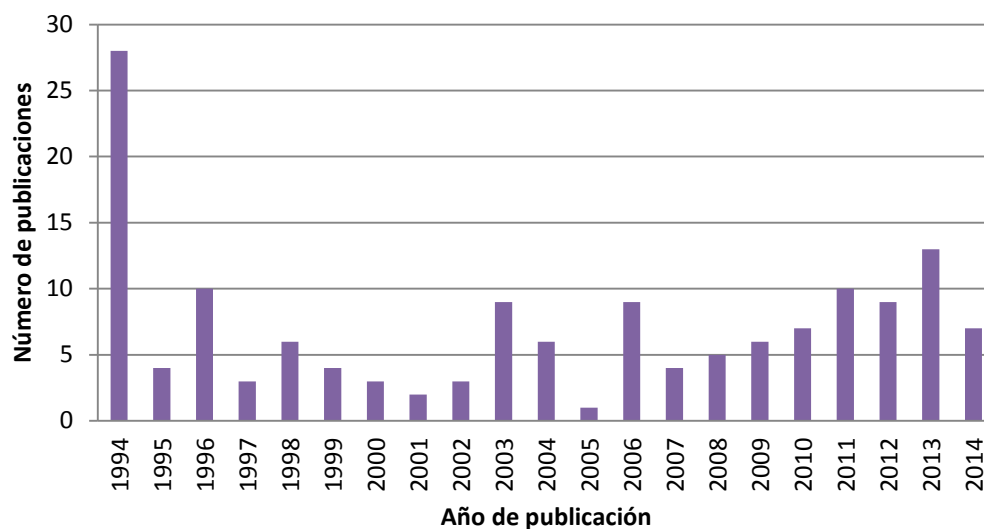
Parámetros espectrométricos: los espectros de masas se obtienen para cada uno de los compuestos presentes en las muestras; se comparan luego con los de las bases de datos (*Adams, Willey y NIST*) para realizar la identificación presuntiva, o con los espectros de masas de sustancias-patrón, para la identificación confirmatoria.

1.4 MARCO DE ANTECEDENTES

La cienciometría como herramienta para buscar, organizar, analizar y comparar información de la producción científica en función del tiempo, permite situar a las personas, disciplinas científicas, instituciones o países dentro de la productividad científica [46].

Para analizar el número de investigaciones recientes, que se han desarrollado sobre la *C. trianae*, se efectuó un estudio cienciométrico de la producción científica existente empleando la base de datos *Scopus (Elsevier)* (Veánse **Figuras 8 y 9**).

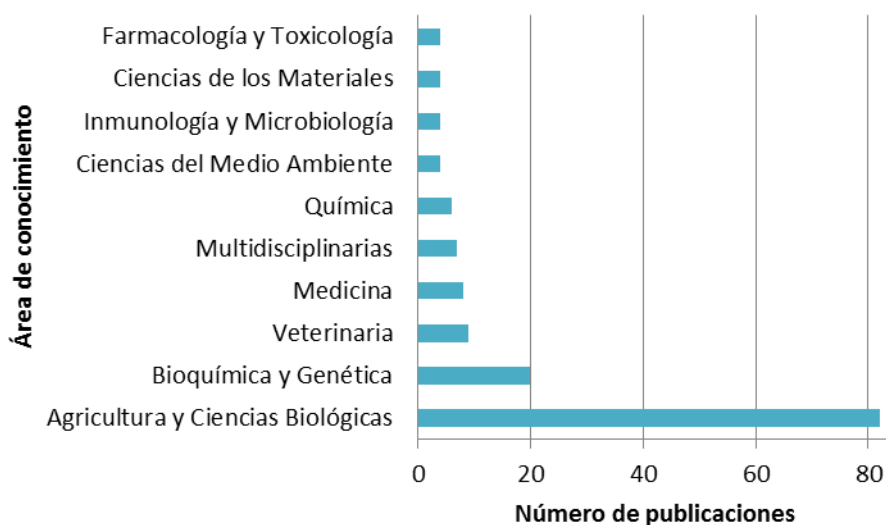
Figura 8. Relación de publicaciones científicas por año. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1990-2014. Fecha de búsqueda: 10 de octubre de 2014. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (“orchids”) AND TITLE-ABS-KEY (“cattleya”)).



En la **Figura 8**, se muestra la relación de publicaciones científicas por año, durante los últimos veinticuatro años. Utilizando como palabras-clave de búsqueda TITLE-ABS-KEY (“orchids”) AND TITLE-ABS-KEY (“cattleya”), se realizó la consulta en octubre de 2014, con un total de 149 artículos científicos publicados. Se puede observar que, con el avance de los años, no hay un aumento en el número de publicaciones; por el contrario, se evidencia que año tras año, cambia la relación de artículos publicados. Durante los últimos siete años, se ve el crecimiento de la producción científica, siendo el año 2013, es el año con mayor número de publicaciones anuales (14).

La mayoría de investigaciones abarcan el estudio de temáticas que van, desde la evolución de las inflorescencias de las orquídeas [47], estudio de antocianinas en flores [48], propagaciones *in vitro* de diferentes especies de orquídeas [49], micropropagación, descontaminación, crecimiento hidropónico de orquídeas del género *Cattleya* [50], el rol del etileno en el crecimiento del óvulo de las orquídeas [51], hasta el estudio de orquídeas transgénicas [52].

Figura 9. Relación de publicaciones por áreas de conocimiento. Fuente: *Scopus (Elsevier)*. Período de observación: 1990-2014. Fecha de búsqueda: 10 de octubre de 2014. Ecuación de búsqueda: (TITLE-ABS-KEY (“orchids”) AND TITLE-ABS-KEY (“cattleya”)).



En la **Figura 9**, se observa que las áreas, que suscitan mayor interés por el estudio de las orquídeas del género *Cattleya* son las ciencias biológicas y la agricultura, representadas por 82 publicaciones científicas. En el área de Química, se cuenta con menos de diez artículos científicos, lo que evidencia los pocos estudios químicos sobre este género de orquídeas.

Entre los estudios más importantes desarrollados sobre este género de orquídeas, se encuentran los siguientes:

Adelberg J. y col. [53] estudiaron la micropropagación, descontaminación y crecimiento de la *Cattleya* en vasijas con membranas semipermeables; las plántulas se cultivaron *in vitro*, y se encontró que los procesos de descontaminación no afectaron significativamente la biomasa, el grosor de la raíz y las concentraciones de almidón en la planta. Respecto a la micropropagación, se

observó que las plántulas sembradas en el invernadero crecieron el doble que las que se cultivaron por medio hidropónico.

Minoru I. y col. [54] se encargaron de encontrar y aislar compuestos fenólicos de la orquídea *C. trianae* para evaluar su actividad biológica; la extracción se hizo de flores con butanol y se encontró que los compuestos derivados de la estructura química del ácido eucómico, fueron los responsables de inhibir la elongación de las raíces y del tallo de la planta e impedir su crecimiento.

Kikuchi O. [55] evaluó la tolerancia de las flores de orquídeas a la radiación gama, como alternativa al uso de fumigantes, como el bromuro de metilo, al tratar las flores para exportación. Se encontró, que las flores de las orquídeas eran relativamente sensibles a la radiación, empero las flores del género *Cattleya* mostraron tolerancia a dosis altas de radiación gama en las plantas jóvenes.

Chugh S. y col. [56] estudiaron el potencial de las distintas especies de orquídeas para micropropagarse. Hallaron que el uso generalizado de micropropagación modificaba la producción de metabolitos como los compuestos fenólicos. También encontraron que el cultivo de tejidos vegetales como el de células, embriones somáticos, microtubérculos o brotes en suspensión líquida en biorreactores, ayudaba en la producción a gran escala y permitió disminuir el costo de producción de las nuevas plantas.

Franco, M. y col. [57] evaluaron diez tipos de sustratos en los cuales puede crecer la *C. trianae*. Se observaron en la planta los porcentajes de supervivencia, la longitud de la hoja más larga, biomasa y el número de raíces y hojas al principio y al final del experimento. La fibra de coco, sola o mezclada en partes iguales con la corteza de pino, fue el sustrato más eficiente: mostró características cualitativas como la dureza y textura cerosa, verdor intenso en las hojas y la formación de velamen.

Wei-Ling, S y col. [58] usaron cromatografía líquida y espectrometría de masas como herramientas para una detección rápida de dos virus presentes en las orquídeas, el método permitió medir la masa molecular en muestras biológicas con alta velocidad, precisión y sensibilidad alta. Se estudiaron dos virus comunes en las orquídeas, el *potexvirus Cymbidium mosaico* (CymMV), y *tobamovirus*, la mancha anular *Odontoglossum* (ORSV), por medio de una proteína cubierta de CymMV y ORSV, utilizando un extracto de 1 g de flor de la orquídea del género *Oncidium* infectado por virus. Este, fue el primer informe sobre la aplicación de LC/MS y/o MALDI para la detección simultánea de dos virus de plantas a partir de un extracto de la planta infectada.

Con respecto a la *C.mendelii*, los estudios son muy escasos. El estudio más relevante fue realizado por Salazar Seir Antonio [59] en el año 2012; el autor estudió la germinación asimbiótica y el cultivo *in vitro* de plántulas de *C.mendelii*, como alternativa de conservación y comercialización de esta planta endémica del departamento de Santander y Norte de Santander. Se estudiaron los porcentajes de germinación de las plántulas en diferentes medios de cultivo. Se encontró, que el uso de agua de coco y jugo de piña, como suplementos en el medio de cultivo, permitía que la germinación asimbiótica de especie se diera de forma más eficiente.

2. METODOLOGÍA

2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS AUXILIARES

Los materiales, reactivos, equipos analíticos y menores utilizados en este trabajo de investigación, se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Materiales, reactivos, equipos analíticos y menores.

MATERIAL	ESPECIFICACIONES
Reactivos	
<i>n</i> -Tetradecano	Pureza: 99%; <i>Sigma Aldrich</i> , Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.
Diclorometano	Grado analítico, <i>Emscience</i> , <i>Merck KgaA</i> , Darmstadt, Alemania.
Material de laboratorio	
Balones aforados	1 mL; <i>Pyrex</i> [®] , México.
Jeringa de vidrio	1-10 µL, <i>Agilent Technologies</i> , G10-C7947, Australia.
Micropipetas	2–20, 25–250 µL, <i>Brand</i> , Wertheim, Alemania.
Microviales	150 µL, Microviales inserto de vidrio; Referencia 5183-2088; Lote: 14891; <i>Agilent Technologies</i> , California, EE.UU.
Viales	20 mL, Viales ámbar estándar para SPME; <i>Supelco</i> ; Catálogo N° 27006.
Septa	Septa de silicona blanca recubiertas con teflón blanco para viales de 15 x 45 mm; <i>Supelco</i> ; Catálogo N° 27369-U.
Pipetas Pasteur	230 mm, <i>Brand GMBH Co.</i> Wertheim, Alemania.
Vasos de precipitado	50 mL; <i>Scott</i> , Texas, EE.UU.
Frasco de vidrio transparente	Frasco de vidrio comercial de 14 x 6 cm, con tapa plástica de 6 cm de diámetro.
Equipos de laboratorio	
Balanza analítica	<i>Mettler Toledo</i> AL204, Suiza.
Plancha de calentamiento	Rango: 0-500 °C; Modelo 505-03-1; Serie

81250694; *Heidolp MR-Hei Standard*,
Nuremberg, Alemania.

Tabla 3. Continuación.

Equipos menores utilizados

Muestreador de flores <i>in vivo</i>	Caja en acrílico 100% cristal, calibre 4 mm, dimensiones 15 x 14 cm, con tapa removible.
--------------------------------------	--

Fibras de SPME

Poli(dimetilsiloxano) (PDMS)	100 μm , código de color: rojo; <i>Supelco</i> ; Catálogo N° 57324-U. St. Louis, MO, EE.UU.
------------------------------	--

Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno (PDMS/DVB)	65 μm , código de color: azul; <i>Supelco</i> ; Catálogo N° 57320-U. St. Louis, MO, EE.UU.
---	---

Carboxen/poli(dimetilbenceno) (CAR/PDMS)	85 μm , código de color: celeste; <i>Supelco</i> ; Catálogo N° 57334-U. St. Louis, MO, EE.UU.
--	--

2.2 MATERIAL VEGETAL

La especie *C.mendelii* se cultivó en el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales (CENIVAM), en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (UIS), Bucaramanga, Colombia.

La *C.trianae* se cultivó y se colectó en el patio de la zona residencial, La Salle Plaza, ubicada en la Cra 28 N° 75-11.

2.3 MUESTREO POR SPME DE LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE LAS FLORES

2.3.1 Muestreo por HS-SPME de la fracción volátil *in vitro* de la *C.trianae* y la *C.mendelii*

Las fracciones volátiles de las flores, *C.trianae* y *C.mendelii*, se obtuvieron por *headspace*-micro-extracción en fase sólida (HS-SPME), bajo mejores condiciones,

que se obtuvieron en ensayos preliminares. Los ensayos preliminares no se llevaron a cabo con las orquídeas del género *Cattleya*, debido a su escasa floración (una vez al año, a veces, dos), y a la poca cantidad de flores que se dan en la inflorescencia (dos o tres flores), para el número alto de experimentos a realizar. Los ensayos preliminares para establecer las mejores condiciones de extracción, se realizaron con flores de *Plumeria rubra*, de la familia *Apocynaceae*, que aparecen en la **Figura 10**.

Figura 10. Planta *Plumeria rubra* (Familia: *Apocynaceae*). **A.** Ramillete de flores. **B.** Flor de *P.rubra*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 4 de junio de 2014.



La preparación de la muestra se realizó de la siguiente forma: en un vial ámbar de 20 mL, se depositaron flores (1,252 g), junto con un microvial de vidrio que contenía 20 μ L de solución *stock* de patrón *n*-tetradecano, que se preparó adicionando *n*-tetradecano (1 mg) a un balón aforado de 1 mL. Se aforó con diclorometano y de ahí se tomaron 20 μ L de solución, que se depositaron en un microvial. Esta cantidad se evaporó con una corriente de nitrógeno, hasta sequedad. Finalmente, se situó el microvial dentro del vial ámbar que contenía la flor. Se tapó y se acondicionó durante 10 min en una placa de calentamiento (40°C).

Para el desarrollo de los demás experimentos, se usó la misma cantidad de material vegetal y se trabajó bajo las mismas condiciones operacionales establecidas en experimentos previos.

Selección de variables y parámetros experimentales

Selección del recubrimiento de la fibra, que sea capaz de ab(d)sorber la mayor cantidad de metabolitos volátiles presentes en la muestra.

La fracción volátil de las flores de *P.rubra* se extrajo usando tres fibras de recubrimiento polimérico diferente (**Tabla 4**). Para la evaluación de cada fibra, se realizaron los experimentos por triplicado. Para estudiar otros parámetros operacionales, se escogió el recubrimiento de la fibra que permitió extraer la cantidad más alta de volátiles, expresada en la mayor área cromatográfica total. Los blancos de las fibras y demás instrumentos utilizados para el desarrollo de la metodología se encuentran en el **Anexo A..**

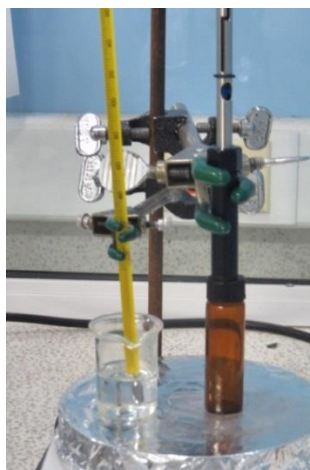
Tabla 4. Descripción de los recubrimientos poliméricos de las fibras de SPME usados en los ensayos preliminares.

Fibra	Código	Código de color	Espesor, μm	Referencia*
Poli(dimetilsiloxano)	PDMS	Roja	100	57324-U
Poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno	PDMS/DVB	Azul	65	57320-U
Carboxen/poli(dimetilsiloxano)	CAR/PDMS	Celeste	85	57334-U

*Supelco S.A.

Las condiciones de extracción para escoger el mejor recubrimiento de la fibra, en los experimentos, se realizaron bajo las mismas condiciones operacionales, a saber: tiempo de equilibrio térmico, 10 min; temperatura, 40°C; tiempo de exposición de la fibra, 30 min (**Figura 11**); tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, 15 min.

Figura 11. Exposición de la fibra de SPME al espacio de cabeza del vial ámbar que contiene la muestra (flores). Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 12 de junio de 2014.



Estudio de la temperatura y el tiempo de exposición de la fibra (**Tabla 4**), realizados con la flor de *P.rubra*.

Tabla 5. Condiciones experimentales para la exposición de la fibra a los volátiles de las flores de *P.rubra*.

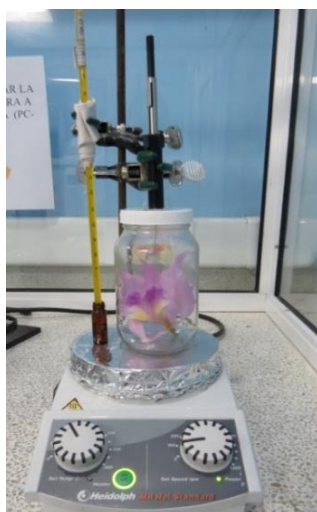
Variables	Niveles			
Temperatura, °C	40	60	70	80
Tiempo de exposición de la fibra, min	20	30	50	70

La preparación de la muestra se realizó de la misma forma que se usó para seleccionar el mejor recubrimiento de la fibra. Con la flor y el microvial con la solución *stock* de *n*-tetradecano dentro del vial ámbar para SPME: para cada temperatura se varió el tiempo de exposición de la fibra, según los niveles de la **Tabla 5**. Las mejores condiciones encontradas para SPME, en los ensayos preliminares, se aplicaron a las flores de las *Cattleyas*.

Monitoreo de la fracción volátil de las flores de *C.trianae* y *C.mendelii*.

La muestra se preparó según la misma metodología, descrita para las flores de *P.rubra*. Los experimentos se realizaron durante el día, desde las 7 a.m. hasta las 7 p.m., cada cuatro horas (**Figura 12**).

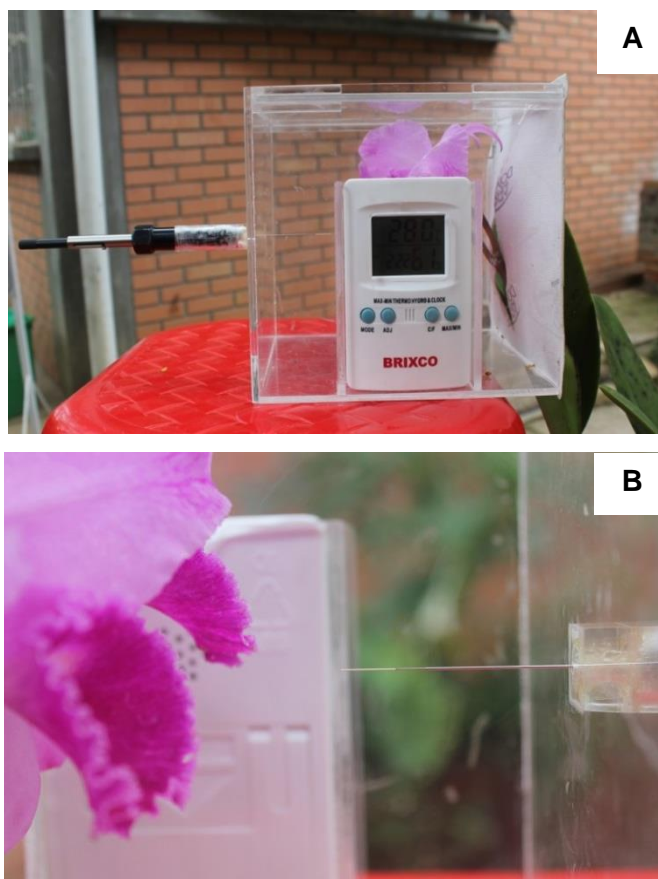
Figura 12. Monitoreo de la fracción volátil de las flores de *Cattleya*. Exposición de la fibra de SPME en el frasco de vidrio, durante 30 min. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 9 de septiembre de 2014.



2.3.2 Muestreo por HS-SPME de la fracción volátil *in vivo* de *C.trianae* y *C.mendelii*

Para la evaluación de las fracciones volátiles *in vivo* de las *C.trianae* y *C.mendelii*, se utilizó un dispositivo de muestreo, que fue modificado por la autora e integrantes del Centro de Investigación de Excelencia CENIVAM; este dispositivo fue fabricado en acrílico (Véase **Figura 13**).

Figura 14. Monitoreo de la fracción volátil de la *C.trianae*. **A.** Flor de *C.trianae* introducida en el muestreador de flores. **B.** Exposición de la fibra de SPME dentro del muestreador de flores. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Centro de Investigación CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 4 de septiembre de 2014.



2.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

La separación, detección, cuantificación e identificación de los compuestos volátiles florales, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC* (Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973* (**Figura 15**), equipado con inyector automático *Agilent Technologies 7683B*, con una columna de 60 m con fase estacionaria polar, DB-WAX.

Figura 15. Cromatógrafo de gases *Agilent Technologies 6890N Network Series GC*, acoplado a un detector selectivo de masas *Agilent Technologies MSD 5973*. Fuente: Fotografía tomada por la autora. Lugar: Laboratorio de Cromatografía y Espectrometría de Masas CROM-MASS, CENIVAM, UIS-Bucaramanga, el 3 de septiembre de 2014.



Los espectros de masas y corrientes iónicas totales (*TIC*, por sus siglas en inglés), se obtuvieron mediante impacto de electrones (EI), de una energía de 70 eV. Las corrientes iónicas se obtuvieron de un analizador cuadrupolar, por medio de un barrido automático de frecuencia (*full scan*) $3,58 \text{ scan s}^{-1}$, en el rango de masas m/z 40-350. Los datos cromatográficos y espectrométricos se procesaron usando el sistema de datos *Chemstation* (*Agilent Technologies G1701DA*). Se compararon los índices de retención lineales y los espectros de masas obtenidos experimentalmente con los reportados en las bases de datos *Adams* [60], *NIST* [61] y *Wiley*.

La separación cromatográfica se realizó en una columna polar de sílice fundida, DB-WAX (*J & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU*), de dimensiones 60 m, L x 0,25 mm, d.i. x 0,25 μm , d_f, cubierta con poli(etilenglicol), usando como gas de arrastre, helio (99.995%, Linde, Bucaramanga, Colombia), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 16,47 psi, y una velocidad volumétrica de flujo de 1mL/min. La temperatura del puerto de inyección fue de 250 °C. El modo de

inyección fue manual y el tiempo de desorción fue de 15 min. La velocidad lineal media del gas fue de 26 cm/s. La temperatura de la fuente de ionización se mantuvo a 230 °C, mientras que la del cuadrupolo, a 150 °C. La programación de la temperatura en el horno fue 50 °C (5 min) hasta 150 °C (2 min), a razón de 5 °C/min, finalmente, para alcanzar una temperatura de 230 °C (10 min), a razón de 5 °C/min.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 MUESTREO POR HS-SPME Y CARACTERIZACIÓN POR GC-MS DE LAS FRACCIONES VOLÁTILES DE LAS FLORES DE *C.trianae* Y *C.mendelii*

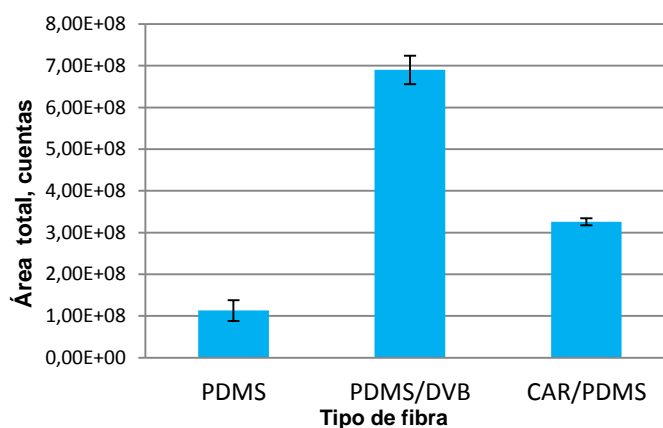
3.1.1 Muestreo por HS-SPME *in vitro* y caracterización por GC-MS de las fracciones volátiles

Selección del recubrimiento de la fibra que sea capaz de ab(d)sorber la mayor cantidad de metabolitos secundarios volátiles emanados por la flor.

El recubrimiento de la fibra se seleccionó según su capacidad para extraer el mayor número de metabolitos secundarios volátiles presentes en la matriz; esto se midió con base en la respuesta del detector, *i.e.*, el área cromatográfica total. Se utilizaron tres fibras de diferente polaridad: PDMS, PDMS/DVB y CAR/PDMS, bajo las mismas condiciones operacionales, a saber: tiempo de equilibrio térmico, 10 min; temperatura, 40°C; tiempo de exposición de la fibra, 30 min, y tiempo de desorción de la fibra, 15 min; los ensayos se realizaron por triplicado.

En la **Figura 16**, se observan las áreas cromatograficas totales, obtenidas para diferentes recubrimientos poliméricos de las fibras utilizadas para el muestreo de volátiles de las flores de *P.rubra*. Las fibras con polaridad media y alta, PDMS/DVB y CAR/PDMS, presentaron mayor respuesta del sistema de detección, debido a su mayor afinidad con los volátiles de las flores de *P.rubra*.

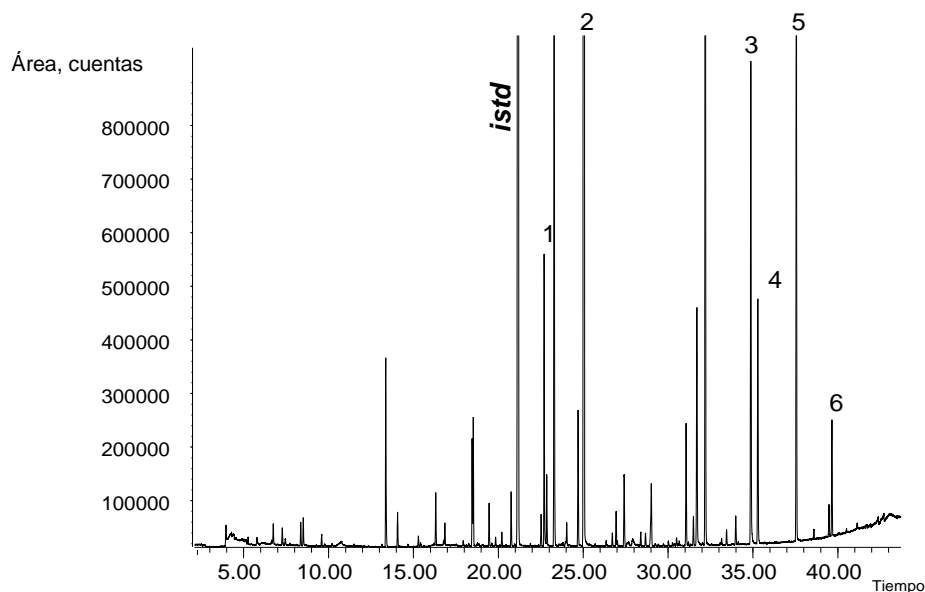
Figura 16. Selección del recubrimiento polimérico de la fibra de SPME: respuesta del GC-MS (área total, cuentas) a los volátiles de las flores de *P.rubra* (temperatura: 40°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra: 30 min) aislados por HS-SPME *in vitro*.



En la fracción volátil de las flores de *P.rubra*, se encontraron volátiles de diferentes familias: monoterpenoides, como el linalol y su óxido; benzenoides, como el fenil acetoneitrilo y el benzoato de hexen-1-ilo; y compuestos sesquiterpenoides, como el nerolidol. El recubrimiento polimérico de la fibra de SPME que aisló mayor cantidad de metabolitos secundarios, según el área cromatográfica total, fue PDMS/DVB. Esta fibra se escogió para desarrollar los demás experimentos.

En la **Figura 17**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles de las flores de *P.rubra*, aislados por HS-SPME, temperatura, 40°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m), 30 min. En la **Tabla 5**, se reportan los metabolitos principales y sus cantidades relativas (%).

Figura 17. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles aislados de las flores de *P.rubra* por HS-SPME *in vitro* (temperatura: 40°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 30 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.



Estudio de los parámetros operacionales, la temperatura y el tiempo de exposición de la fibra, para extracción de volátiles de las flores de *P.rubra*.

Se estudió la extracción de volátiles de la flor de *P.rubra*, variando la temperatura y el tiempo de exposición de la fibra.

Para cada temperatura, 40, 60, 70 y 80°C, se varió el tiempo de exposición de la fibra, a saber: 20, 30, 50 y 70 min.

La selección de las mejores condiciones para extraer una mayor cantidad de metabolitos secundarios volátiles de las flores de *P.rubra*, se hizo del siguiente modo: **1.** A 40°C, se escogió el tiempo de exposición de la fibra que mostrara mayor área cromatográfica total (**Figura 19**); **2.** Se realizó el mismo proceso con cada una de las temperaturas trabajadas (**Figuras 19-22**); **3.** Teniendo para cada

valor de temperatura, un tiempo de exposición de la fibra, se evaluó la variación de las familias de compuestos mayoritarios con respecto al área del patrón interno. Siguiendo los pasos anteriores, se analizaron los volátiles que variaron y la proporción en que lo hicieron y se eligieron la temperatura y el tiempo de exposición bajo las cuales la fibra extrajera mayor cantidad de compuestos volátiles. Los compuestos principales de la fracción volátil, aislados por HS-SPME, se reportan en la **Tabla 6**. En la **Figura 18**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los volátiles de las flores de *P.rubra*, aislados por HS-SPME (temperatura: 60°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min y el tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 30 min). Los demás cromatogramas típicos, se encuentran en el **Anexo B**.

Figura 18. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles aislados de las flores de *P.rubra* por HS-SPME *in vitro* (temperatura: 60°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 70 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

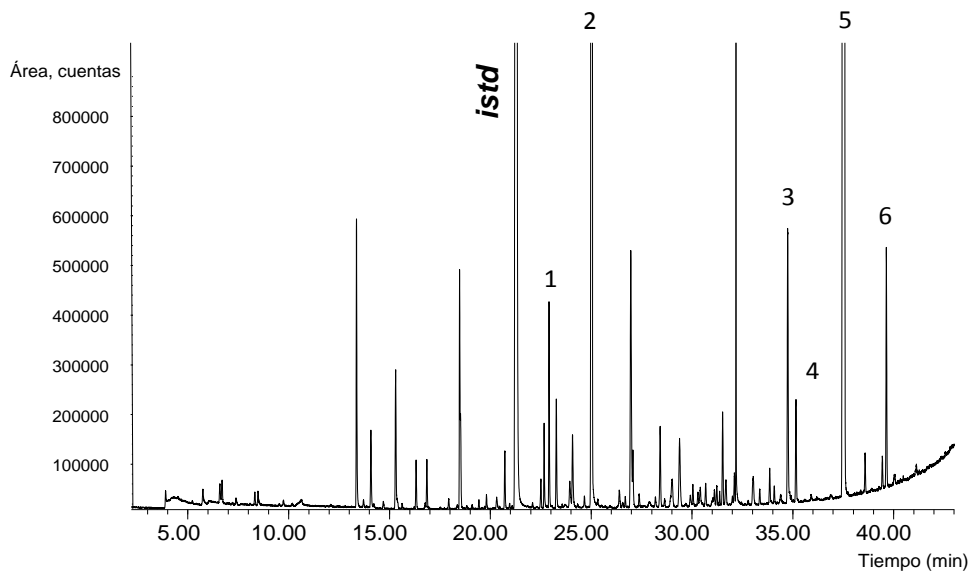
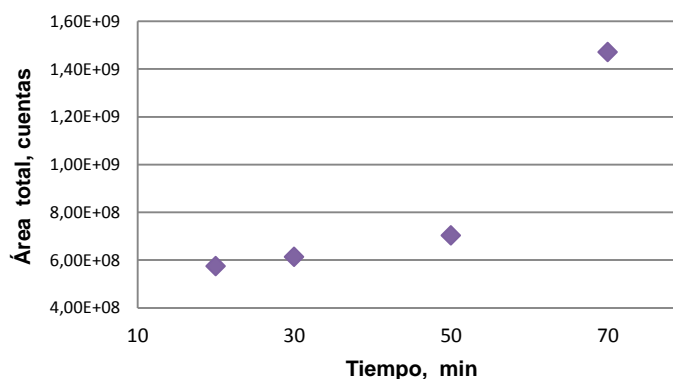


Tabla 6. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME *in vitro*, de las flores de *P.rubra*, a diferentes temperaturas, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB, 70 min.

N°	Compuesto	DB-WAX		Cantidad relativa, % / temperatura, °C			
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	40	60	70	80
1	Óxido de linalol	1474	1475 [62]	2	1	3	1
2	Linalol	1529	1526 [63]	57	58	39	7
3	Alcohol fenil etílico	1901	1901 [64]	1	1	3	1
4	Fenil acetnitrilo	1917	1919 [65]	2	1	5	1
5	Nerolidol	2020	2010 [63]	8	8	12	33
6	Benzoato de hexen-1-ilo	2119	2104 [66]	2	1	2	2
	Monoterpenoides			59	59	42	8
	Sesquiterpenoides			8	8	12	33
	Compuestos nitrogenados			2	1	5	1
	Benzenoides			3	2	5	3

Figura 19. Experimentos de SPME para extraer las fracciones volátiles de las flores de *P.rubra*, usando el recubrimiento polimérico PDMS/DVB, a 40°C, y diferentes tiempos de exposición de la fibra.



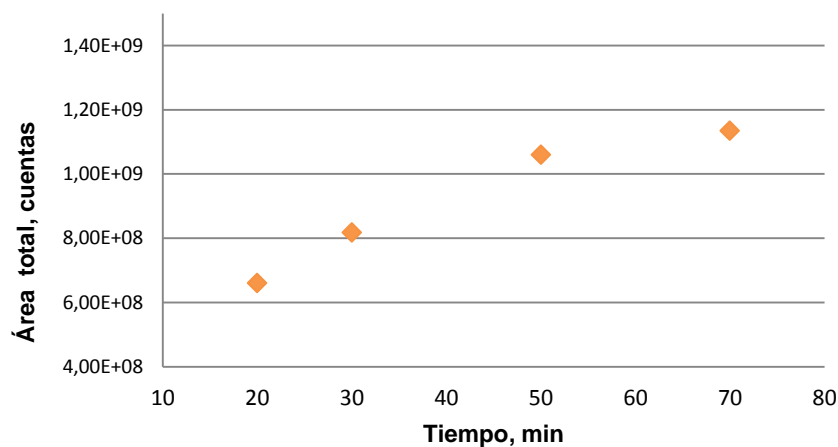
En la **Figura 19**, se evidencia que a mayor tiempo de exposición de la fibra en el espacio de cabeza del vial, mayor es el área cromatográfica total, es decir, con el aumento del tiempo de exposición del recubrimiento polimérico, PDMS/DVB, se logra aislar mayor cantidad de volátiles, debido a que más metabolitos volátiles pueden ocupar los sitios del polímero. Esto, sin considerar la posible competencia o desplazamiento de compuestos volátiles, conforme a la afinidad que tengan por el recubrimiento polimérico a las condiciones experimentales dadas.

El muestreo de las flores de *P.rubra* por HS-SPME *in vitro* realizado a 40°C y a diferentes tiempos de exposición de la fibra (20, 30, 50 y 70 min) mostró que algunos monoterpenos oxigenados y benzenoides, como: óxido de linalol, salicilato de metilo y alcohol fenil etílico, aumentaron su cantidad relativa, con el tiempo de exposición de la fibra hasta 50 min; después, su cantidad disminuyó con el tiempo de exposición. Este comportamiento se puede atribuir al ocupamiento de los sitios de adsorción en la fibra, ya que con el tiempo de exposición de la fibra, la competencia entre metabolitos secundarios con mayor afinidad hace que se desplacen otros metabolitos secundarios volátiles, más

livianos. El linalol disminuyó su cantidad con el aumento del tiempo de exposición de la fibra. Los sesquiterpenos oxigenados y algunos benzenoides, nerolidol y fenil acetonitrilo, aumentaron su cantidad relativa, con el incremento del tiempo de exposición de la fibra (Véase **Tabla 7**).

Con base en los experimentos realizados a 40°C, se concluye, que la exposición de la fibra de SPME durante 70 min permite aislar una mayor cantidad de compuestos volátiles, entre ellos, los componentes de interés para la industria de perfumes.

Figura 20. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles, extraídos por HS-SPME, de las flores de *P.rubra*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 µm). Temperatura: 60°C.



En la **Figura 20**, se observa que con el aumento del tiempo de exposición de la fibra, el área cromatográfica total es mayor: se aísla mayor cantidad de volátiles a los 70 min de exposición de la fibra.

Tabla 7. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME *in vitro*, de las flores de *P.rubra*, a 40°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.

Compuesto	Cantidad relativa, % / tiempo de exposición, min				Familia de compuestos
	20	30	50	70	
Óxido de linalol	1	2	5	2	MO
Linalol	84	78	67	57	MO
Salicilato de metilo	1	1	2	1	Benz
Alcohol fenil etílico	3	3	4	2	Benz
Fenil acetonitrilo	1	1	2	2	CN
Nerolidol	2	3	4	8	SO
Benzoato de hexen-1-ilo	ND	1	1	2	Benz

MO: Monoterpenos oxigenados

Benz: Benzenoides

CN: Compuestos nitrogenados

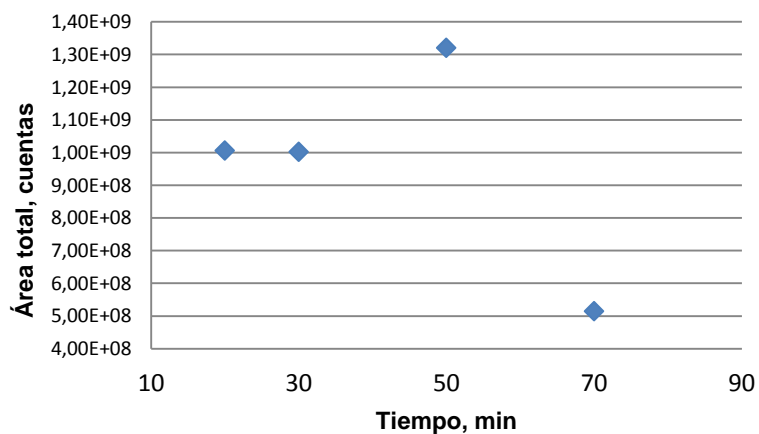
SO: Sesquiterpenos oxigenados

ND: No detectado

El muestreo de las flores de *P.rubra* por HS-SPME *in vitro*, a 60°C, y a diferentes tiempos de exposición de la fibra, mostró que los monoterpénos oxigenados disminuyeron en la cantidad relativa, con el aumento en el tiempo de exposición de la fibra. Los benzenoides no mostraron un comportamiento uniforme, el alcohol fenil etílico y el salicilato de metilo, aumentaron su cantidad hasta 50 min de exposición de la fibra, y después, disminuyeron, el benzoato de hexen-1-ilo, mantuvo su cantidad relativa constante, durante el tiempo de exposición comprendido entre 30 y 70 min. Los sesquiterpenos oxigenados y compuestos nitrogenados, como nerolidol y fenil acetónitrilo, presentaron un aumento de la cantidad relativa con el tiempo de exposición (Véase **Tabla 8**).

Según lo observado en los experimentos realizados a 60°C, se concluye, que la exposición de la fibra durante 50 min, permite aislar una mayor cantidad de metabolitos.

Figura 21. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles, extraídos por HS-SPME, de las flores de *P.rubra*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 µm). Temperatura: 70°C



En la **Figura 21**, se observa la relación entre el tiempo de exposición de la fibra y el área total de picos cromatográficos de sustancias extraídas por ella, a 70°C. El tiempo de exposición que mostró mayor extracción de volátiles fue 50 y no 70 min, como en los casos anteriores. Con respecto a los cambios en la cantidad relativa de los volátiles, los monoterpenos oxigenados, como el linalol, disminuyeron su cantidad relativa con el tiempo de exposición. Los benzenoides, no mostraron un comportamiento uniforme de sus cantidades relativas frente al tiempo de exposición de la fibra, mientras, que el nerolidol, sesquiterpeno oxigenado, aumentó su cantidad con el tiempo de exposición (Véase **Tabla 9**).

Se observó, que a 70°C y 50 min de exposición de la fibra de SPME, se aisló la mayor cantidad de metabolitos secundarios volátiles de las flores; también, que en general, con el aumento del tiempo de exposición de la fibra se incrementó la cantidad de los volátiles aislados.

Tabla 8. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME *in vitro*, de las flores de *P.rubra*, a 60°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.

Compuesto	Cantidad relativa, % / tiempo de exposición, min				Familia de compuestos
	20	30	50	70	
Óxido de linalol	3	1	2	1	MO
Linalol	79	69	59	58	MO
Salicilato de metilo	1	1	1	0,2	Benz
Alcohol fenil etílico	3	4	4	2	Benz
Fenil acetonitrilo	1	1	2	2	CN
Nerolidol	2	4	8	8	SO
Benzoato de hexen-1-ilo	0,3	1	1	1	Benz

MO: Monoterpenos oxigenados

Benz: Benzenoides

CN: Compuestos nitrogenados

SO: Sesquiterpenos oxigenados

Tabla 9. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME *in vitro*, de las flores de *P.rubra*, a 70°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.

Compuesto	Cantidad relativa, % / tiempo de exposición, min				Familia de compuestos
	20	30	50	70	
Óxido de linalol	2	2	2	3	MO
Linalol	77	70	51	39	MO
Salicilato de metilo	0,2	0,2	0,2	1	Benz
Alcohol fenil etílico	1	1	2	3	Benz
Fenil acetonitrilo	1	1	1	2	CN
Nerolidol	5	7	11	12	SO
Benzoato de hexen-1-ilo	2	2	2	2	Benz

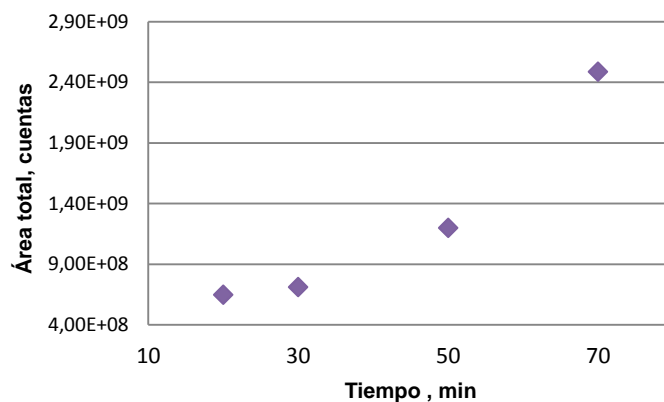
MO: Monoterpenos oxigenados

Benz: Benzenoides

CN: Compuestos nitrogenados

SO: Sesquiterpenos oxigenados

Figura 22. Cantidad de metabolitos secundarios volátiles, extraídos por HS-SPME, de las flores de *P.rubra*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 μm). Temperatura: 80°C.



La **Figura 22** muestra, que a 80°C, con el aumento del tiempo de exposición de la fibra, se incrementa el área cromatográfica total, es decir, más metabolitos secundarios se trasladaron al recubrimiento polimérico.

Los monoterpenos oxigenados como linalol y óxido de linalol, aislados a 80°C, disminuyeron su cantidad relativa con el tiempo de exposición de la fibra. Lo mismo sucede con los benzenoides, excepto, el benzoato de hexen-1-ilo, que aumentó su cantidad relativa con el tiempo de exposición. El nerolidol, sesquiterpeno oxigenado, aumentó su cantidad relativa con el tiempo de exposición de la fibra (Véase **Tabla 10**).

De acuerdo con lo anterior, la mayor cantidad de metabolitos volátiles aislados a 80 °C, se dio con el tiempo de exposición de la fibra de 70 min.

Tabla 10. Cantidad relativa (%) de los compuestos principales aislados por HS-SPME *in vitro*, de las flores de *P.rubra*, a 80°C y diferentes tiempos de exposición de la fibra PDMS/DVB.

Compuesto	Cantidad relativa, % / tiempo de exposición, min				Familia de compuestos
	20	30	50	70	
Óxido de linalol	2	1	1	0,2	MO
Linalol	70	70	26	8	MO
Salicilato de metilo	1	0,3	0,3	0,2	Benz
Alcohol fenil etílico	2	2	1	0,4	Benz
Fenil acetonitrilo	1	1	1	1	CN
Nerolidol	9	10	18	33	SO
Benzoato de hexen-1-ilo	1	1	2	2	Benz

MO: Monoterpenos oxigenados

Benz: Benzenoides

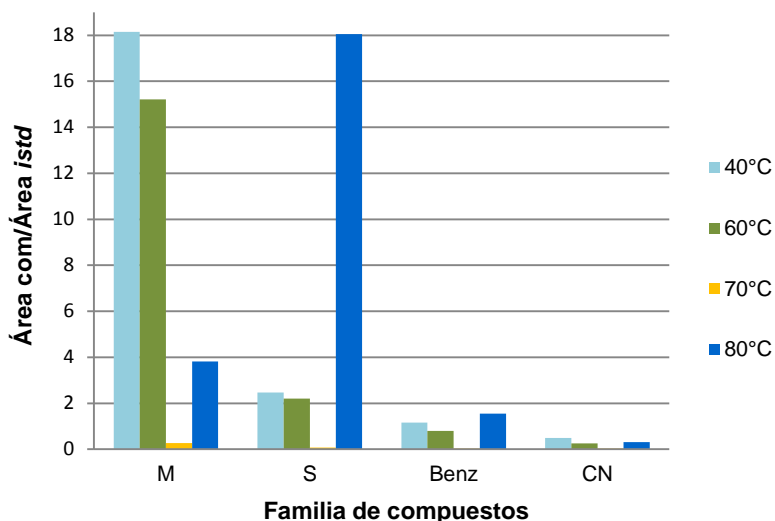
CN: Compuestos nitrogenados

SO: Sesquiterpenos oxigenados

Para la elección de las mejores condiciones de extracción para SPME, no se consideró el valor de temperatura 80°C, debido que, a temperaturas tan altas, la flor puede deteriorarse y los metabolitos secundarios pueden modificarse químicamente.

Se evaluó la variación de los metabolitos secundarios con respecto al área del patrón interno y a la temperatura a la que se realizaron los experimentos. Estos metabolitos secundarios como, limoneno, óxido de linalol, linalol, salicilato de metilo, nerolidol, entre otros, son de interés en la industria de perfumes.

Figura 23. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *P.rubra*, a diferentes temperaturas (40, 60, 70 y 80°C). M: Monoterpenoides. S: Sesquiterpenoides. Benz: Benzenoides. CN: Compuestos nitrogenados.



La **Figura 23**, muestra que la relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$ de la fracción volátil de las flores de *P.rubra*, a 40 y 60°C, es alta, para los monoterpenoides. Para los compuestos sesquiterpénoides, la relación más alta se presentó a 80°C; a 40 y 60°C, esta relación fue baja. La cantidad de benzenoides, con respecto a los monoterpenoides y sesquiterpenoides fue baja y, a 80°C, se obtuvo la relación

$\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{std}}$ más alta, con respecto a las demás temperaturas. Los compuestos nitrogenados se extrajeron en menor proporción, en relación con los monoterpenoides y sesquiterpenoides.

Los monoterpenoides y sesquiterpenoides se encontraron en cantidades más altas a 40 y 60°C, con relación a las otras temperaturas (70 y 80°C), debido a que son más volátiles que los compuestos nitrogenados y benzenoides, los últimos, a altas temperaturas (70 y 80°C) desplazan a los demás metabolitos volátiles para ocupar los espacios en el recubrimiento polimérico de la fibra.

Con base en los resultados mostrados en las **Figuras 19-23**, se consideró que las mejores condiciones para la extracción de metabolitos secundarios por HS-SPME, utilizando la fibra PDMS/DVB (65 μm) son: tiempo de equilibrio térmico, 10 min; temperatura, 60°C; tiempo de exposición de la fibra, 70 min.

Monitoreo *in vitro* de la fracción volátil de las flores de *C.trianae* y *C.mendelii*.

Monitoreo *in vitro* de la fracción volátil de las flores de *C.mendelii*

Los metabolitos secundarios volátiles de las flores de la orquídea *C.mendelii* son: compuestos alifáticos, como octan-3-ona y acetato de isoamilo; monoterpenos, como β -mirceno y limoneno; sesquiterpenos, como α -copaeno y α -farneseno; sesquiterpenos oxigenados, como el nerolidol; y benzenoides, como el benzaldehído. La composición química, determinada por HS-SPME y GC-MS *in vitro* de las fracciones volátiles, monitoreadas a las 7 y 11 a.m., y a las 3 y 7 p.m., aparece en la **Tabla 11**. Muchos de estos compuestos coinciden con los reportados por Zhao Z, y col. [79], quienes estudiaron la variación temporal de la esencia floral emitida por una *Cattleya* híbrida, llamada *Brassolaelio cattleya*.

Tabla 11. Cantidad relativa (%) de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.mendelii*, del monitoreo *in vitro* por HS-SPME (fibra PDMS/DVB (65 µm), temperatura, 60°C, tiempo de exposición de la fibra, 70 min), según la hora del día.

N°	Compuesto	IRL (DB-WAX)		Cantidad relativa %, ± SD, n=3			
		Exp	Lit	7 a.m.	11 a.m.	3 p.m.	7 p.m.
1	α-Pineno	1024	1034[63]	ND	1,0±0,8	1±1	1±1
2	β-Mirceno	1164	1168[63]	31±8	21±10	21±2	19±7
3	Limoneno	1203	1212[63]	2±2	3±4	4±3	2±1
4	<i>cis</i> -β-Ocimeno	1254	1245[62]	40±19	10±7	7±3	1±1
5	Octan-3-ona	1258	1259[67]	1,8±0,4	5,8±0,2	8±7	7±6
6	Acetato de isoamilo	1297	1294[62]	0,8±0,1	0,9±0,1	2,9±0,1	2,0±0,3
7	3-Metil butanoato de butilo	1325	1295[63]	ND	ND	0,9±0,8	0,8±0,1
8	<i>p</i> -Cimeno	1353	1303[63]	ND	ND	0,4±0,3	5±4
9	Octan-3-ol	1393	1400[68]	0,1±0,1	0,5±0,1	0,7±0,3	0,3±0,2
10	Óxido de linalol	1451	1450[62]	ND	1,2±0,6	0,6±0,5	0,7±0,6
11	α-Cubebeno	1469	1463[63]	ND	2,3±0,2	1,2±0,1	1,7±0,4
12	α-Copaeno	1507	1487[69]	7±9	38±13	33±2	35±13
13	Benzaldehído	1534	1525[70]	0,5±0,5	0,5±0,1	0,4±0,3	ND
14	Linalol	1544	1554[63]	14±2	0,6±0,1	0,4±0,3	ND
15	Terpinen-4-ol	1614	1616[63]	ND	0,5±0,2	ND	ND
16	β-Cubebeno	1650	1558[62]	ND	ND	ND	0,9±0,5
17	Aromandendreno	1668	1662[71]	ND	1,5±0,7	1,4±0,1	ND
18	γ-Muuroleno	1706	1684[63]	ND	0,8±0,7	0,4±0,4	2±2
19	Germacreno D	1730	1722[63]	ND	0,8±0,7	0,9±0,3	0,7±0,6
20	Acetato de bencilo	1739	1733[72]	0,1±0,1	ND	ND	ND
21	α-Muuroleno	1741	1728[62]	ND	0,7±0,3	ND	0,3±0,2
22	α-Farneseno	1752	1740[73]	2±2	ND	ND	ND
23	γ-Cadineno	1774	1772[74]	ND	2±1	1,5±0,2	2,6±0,7
24	Salicilato de metilo	1794	1787[67]	3±3	ND	3±3	ND

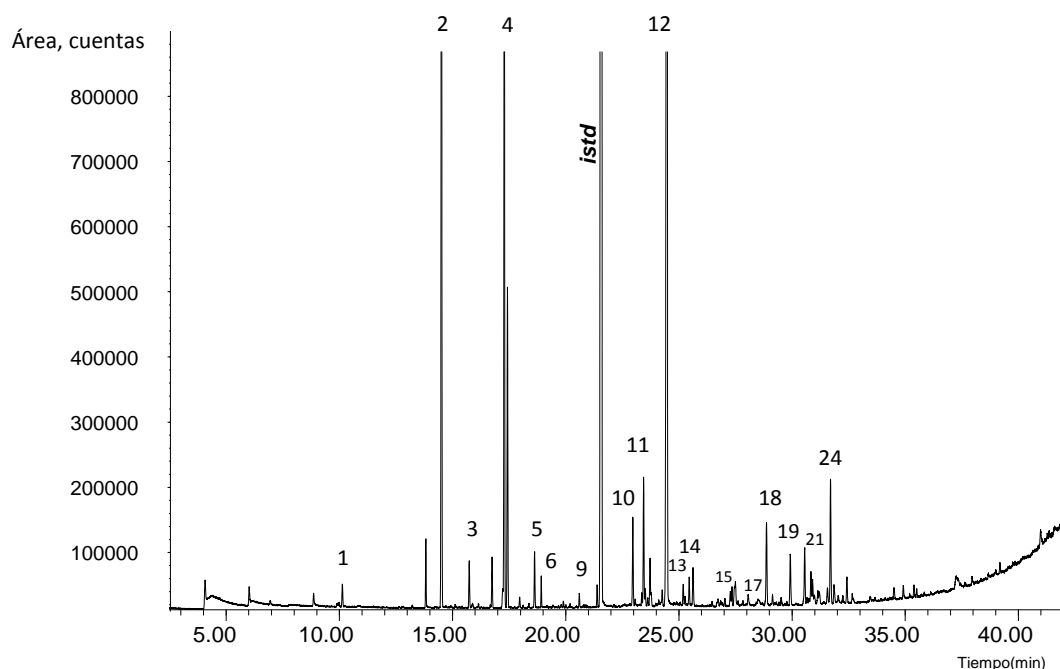
Tabla 11. Continuación.

25	Alcohol fenil etílico	1901	1901[73]	2±2	ND	2±2	0,3±0,2
26	Nerolidol	2020	2010[65]	0,6±0,3	ND	ND	ND
	Monoterpenos			81	37	34	34
	Sesquiterpenos			10	48	39	44
	Benzenoides			6	1	7	0,3
	Compuestos alifáticos			3	8	13	10

ND: no detectado.

En la **Figura 24**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los volátiles aislados por HS-SPME, de las flores de *C.mendelii*, monitoreado a las 11 a.m., temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min. Los demás cromatogramas típicos, se encuentran en el **Anexo C.**

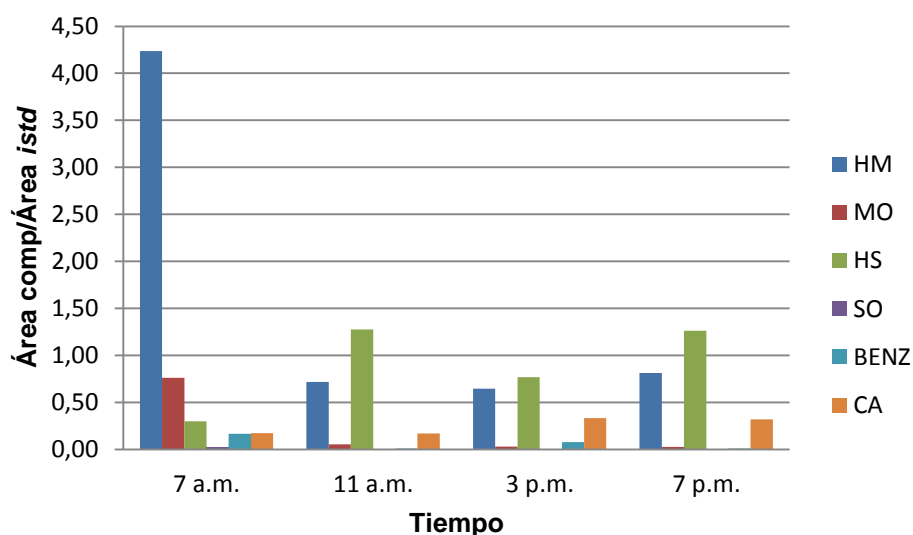
Figura 24. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles aislados por HS-SPME, de las flores de *C.mendelii* (temperatura: 60°C; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm): 70 min), monitoreado a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.



La **Figura 25** muestra la variación de la relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según las familias de compuestos de la fracción volátil de las flores de *C.mendelii*, a diferentes horas del día. Se observa, que a las 7 a.m., los volátiles presentes en mayor cantidad, fueron los hidrocarburos monoterpénicos, como el β -mirceno y

cis-ocimeno. En las demás horas del día, la cantidad de los hidrocarburos monoterpénicos se mantuvo constante.

Figura 25. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en las fracciones volátiles de las flores de *C.mendelii*, del monitoreo *in vitro* por HS-SPME a diferentes horas del día. HM: Hidrocarburos monoterpénicos. MO: Monoterpenos oxigenados. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. SO: Sesquiterpenos oxigenados. BENZ: Benzenoides. CA: Compuestos alifáticos.



Los hidrocarburos sesquiterpénicos, por ejemplo, el α -copaeno, fueron los metabolitos secundarios predominantes, en los monitoreos realizados a las 11 a.m. y 3 y 7 p.m., seguidos de los hidrocarburos monoterpénicos. Los benzenoides y sesquiterpenos oxigenados como benzaldehído y nerolidol, se presentaron en cantidades bajas.

A las 7 a.m., la fracción volátil de la orquídea estuvo compuesta, mayoritariamente, por hidrocarburos monoterpénicos y monoterpenos oxigenados. Los tres componentes mayoritarios fueron: *cis*- β -ocimeno ($35\pm 19\%$), β -mirceno ($31\pm 8\%$) y linalol ($14\pm 2\%$) (Véase **Tabla 11**). Estos compuestos volátiles presentaron un olor floral y sus posibles usos se dan en

las industrias de perfumes y alimenticia (como sabores). Algunos compuestos como el acetato de bencilo ($0,1\pm 0,1\%$), el α -farneseno ($2\pm 2\%$) y el nerolidol ($0,6\pm 0,3\%$) solo fueron emitidos por la planta a esta hora del día.

A las 11 a.m., la fragancia de la flor se compuso principalmente de hidrocarburos sesquiterpénicos y monoterpénicos. Los compuestos mayoritarios fueron: α -copaeno ($40\pm 13\%$), β -mirceno ($21\pm 10\%$) y *cis*- β -ocimeno ($10\pm 7\%$). El compuesto principal en la fracción volátil aislada a las 11 a.m., fue distinto al de las 7 a.m., ya que *cis*- β -ocimeno, a las 11 a.m., se presentó en menor cantidad. El terpinen-4-ol ($0,5\pm 0,2\%$), compuesto alifático, solo se registró en la fragancia de la flor a esta hora del día.

A las 3 p.m., las familias de compuestos presentes en cantidad más alta fueron hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos. Los componentes mayoritarios fueron α -copaeno ($33\pm 2\%$), β -mirceno ($21\pm 2\%$).

A las 7 p.m., los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos, seguidos de los compuestos alifáticos, fueron las familias de compuestos presentes en mayor cantidad en la fracción volátil de la orquídea. α -Copaeno ($40\pm 13\%$), β -mirceno ($19\%\pm 7\%$) y 3-octanona ($7\%\pm 6\%$) fueron los componentes mayoritarios aislados, los mismos presentes a las 3 pm. β -Cubebeno ($0,9\pm 0,5\%$), solo se presentó en la fracción volátil de las flores a esta hora.

El β -mirceno, se detectó en las diferentes horas de monitoreo de la fracción volátil, como uno de los componentes mayoritarios. El salicilato de metilo, estuvo presente a las 7 a.m. y a las 3 p.m. El aromandendreno, se detectó solo a las 11 a.m. y 3 p.m. 3-Metil butanoato de butilo y *p*-cimeno aparecieron en la fragancia por la tarde, a las 3 y 7 p.m.

Monitoreo *in vitro* de la fracción volátil de las flores de *C.trianae*:

Los metabolitos secundarios volátiles de las flores de la orquídea *C.trianae*, pertenecen a la familia de los sesquiterpenos (β -cariofileno), benzenoides (benzaldehído, alcohol fenil etílico y salicilato de metilo) y a los compuestos alifáticos (nonanal). En la **Figura 26**, se encuentra el perfil de un cromatograma típico de los volátiles de las flores de *C.trianae* obtenidos por HS-SPME, a las 11 a.m. Los demás cromatogramas están en el **Anexo C..** La composición química, determinada por HS-SPME-GC-MS, *in vitro*, de las fracciones volátiles, monitoreadas a las 7 y 11 a.m., y a las 3 y 7 p.m., se muestra en la **Tabla 12**.

Figura 26. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos secundarios volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m), 70 min), monitoreado a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**.

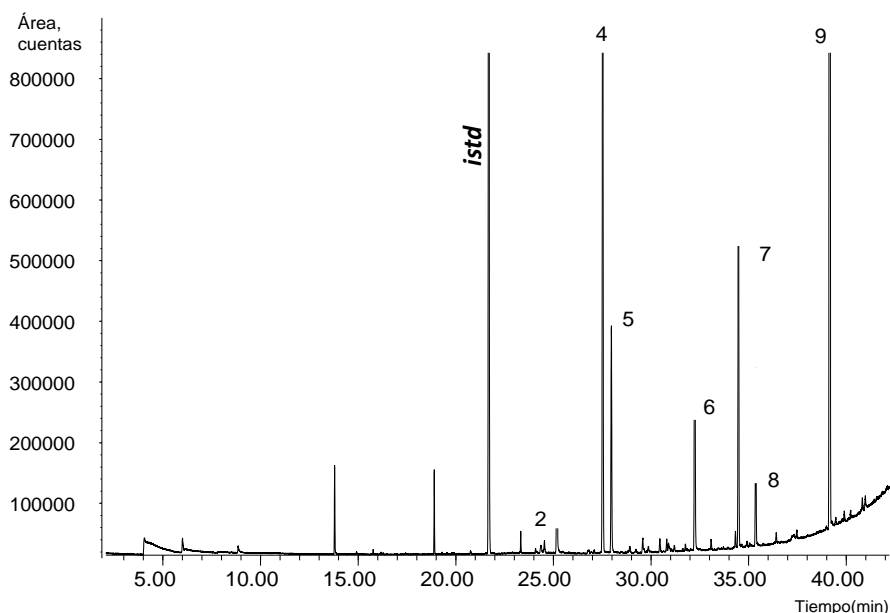


Tabla 12. Cantidad relativa (%) de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.trianae*, aislados por el monitoreo *in vitro* por HS-SPME (fibra PDMS/DVB (65 µm), temperatura, 60°C, tiempo de exposición de la fibra, 70 min), según la hora del día.

N°	Compuesto	DB-WAX		Cantidad relativa, (%), ±SD, n=3			
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	7 a.m.	11 a.m.	3 p.m.	7 p.m.
1	Nonanal	1399	1402[74]	9±7	ND	ND	ND
2	Benzaldehído	1534	1525[70]	ND	2±2	11±7	27±18
3	β-Bourboneno	1538	1518[69]	28,0±0,8	ND	ND	ND
4	β-Cariofileno	1621	1618[63]	ND	5±4	15±5	28±2
5	Benzoato de metilo	1636	1635[75]	ND	2±1	5±5	ND
6	Salicilato de metilo	1794	1787[65]	ND	4±3	10±3	15±2
7	Alcohol fenil etílico	1901	1901[73]	15±6	3±3	17±3	12±1
8	2-Fenil metanol	1922	1931[75]	36±6	1,2±0,6	3,6±0,4	ND
9	Cinamato de metilo	2096	2080[65]	ND	73±3	27±11	ND
	Sesquiterpenos			28	8	25	44
	Benzenoides			51	80	58	39
	Compuestos alifáticos			9	2	5	-

ND: no detectado

A las 7 a.m., la fracción volátil estuvo compuesta por cuatro metabolitos, a saber: nonanal ($9\pm 7\%$), β -bourboneno ($28,0\pm 0,8\%$), alcohol fenil etílico ($15\pm 6\%$) y 2-fenil etanol ($36\pm 6\%$). Los olores característicos de estos compuestos fueron florales, maderosos y frutales. El nonanal y el β -bourboneno solo se detectaron en la mañana (7 a.m.) (Véase **Tabla 12**).

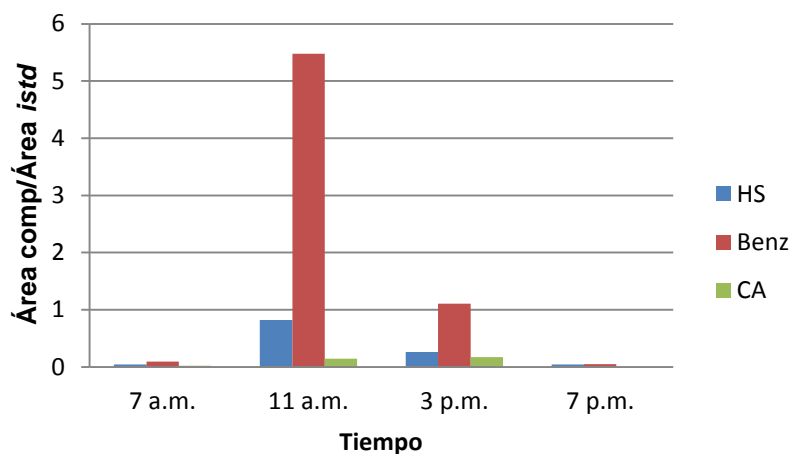
A las 11 a.m., los metabolitos secundarios presentes en la fracción volátil de *C.trianae* fueron de la familia de los benzenoides, los hidrocarburos sesquiterpénicos y los compuestos alifáticos. El cinamato de metilo ($73\pm 3\%$), fue el componente principal. Volátiles como 2-fenil etanol y benzoato de metilo, solo se registraron a las 11 a.m. y a las 3 p.m.

La fracción, que se monitoreó a las 3 p.m., tuvo la misma composición química que la aislada a las 11 a.m., aunque los metabolitos volátiles presentaron cantidades relativas diferentes (Véase **Tabla 12**). El compuesto mayoritario fue el cinamato de metilo ($27\pm 11\%$).

A las 7 p.m., se aislaron solo cuatro metabolitos secundarios, que también se detectaron en las fracciones volátiles de las 11 a.m. y las 3 p.m. Estos compuestos fueron: benzaldehído ($27\pm 18\%$), β -cariofileno ($28\pm 2\%$), salicilato de metilo ($15\pm 2\%$) y 2-fenil metanol ($27\pm 11\%$). La cantidad relativa de estos compuestos aumentó significativamente con respecto a las encontradas a las 11 a.m. y 3 p.m.

Los compuestos mayoritarios aislados de la *C.trianae*, aunque en diferentes cantidades, coinciden con los reportados por Zhao, Z., y col. [79].

Figura 27. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.trianae*, obtenidos *in vitro* por HS-SPME a diferentes horas del día. Benz: Benzenoides. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. CA: Compuestos alifáticos.



En la **Figura 27**, se observa que en los monitoreos realizados a diferentes horas del día, los benzenoides, como benzaldehído y cinamato de metilo, predominaron en la fracción volátil aislada de la *C.trianae* y los compuestos alifáticos, por ejemplo, el nonanal, se detectaron en cantidades más bajas.

3.1.2 Muestreo y caracterización de la fracción volátil *in vivo* por medio de SPME

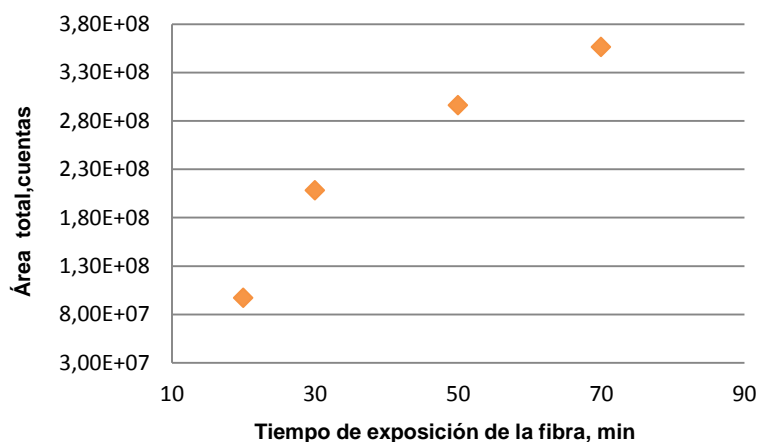
Evaluación del tiempo de exposición de la fibra en el que se obtenga mayor cantidad de compuestos volátiles.

Se utilizó la fibra con recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 μm), que fue escogida en los ensayos preliminares.

En la **Figura 28**, se muestra la relación entre el tiempo de exposición de la fibra y el área cromatográfica total. Se observa que, con el tiempo de exposición de la fibra a la flor, el área cromatográfica de volátiles aislados, aumenta. Se

escogieron 70 min, como tiempo de exposición de la fibra a los volátiles de la flor, ya que permite aislar la mayor cantidad de metabolitos secundarios.

Figura 28. Evaluación del tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μm) de SPME para el monitoreo *in vivo* de las flores de *P.rubra* usando el muestreador de flores (**Figura 13**).



Monitoreo *in vivo* de volátiles de las flores de *C.trianae* y *C.mendelii*.

Monitoreo *in vivo* de la fracción volátil de la *C.mendelii*:

Los metabolitos volátiles aislados de la *C.mendelii* pertenecen a la familia de los monoterpenos, sesquiterpenos, benzenoides y de los compuestos alifáticos. La composición química de la fracción volátil aislada a las 7 y 11 a.m. y a las 3 y 7 p.m., se encuentra en la **Tabla 13**.

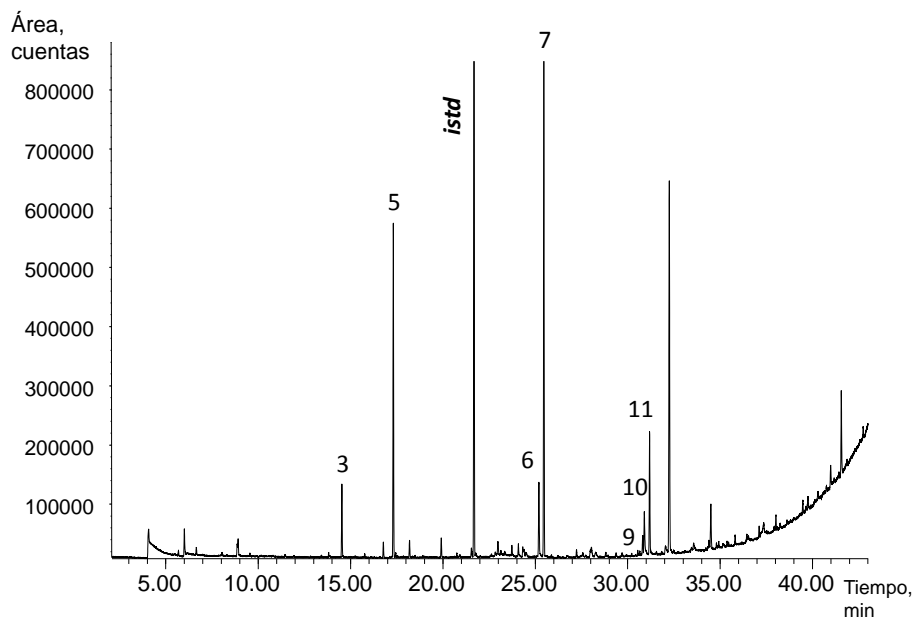
En la **Figura 29**, se presenta un perfil cromatográfico típico de los volátiles de las flores de *C.mendelii* monitoreado a las 11 a.m., aislados por HS-SPME *in vivo*, tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μm), 70 min. Los demás cromatogramas típicos, se encuentran en el **Anexo D**.

Tabla 13. Relación $\text{Área}_{\text{comp}}/\text{Área}_{\text{istd}}$ de los compuestos presentes aislados *in vivo* por HS-SPME (fibra PDMS/DVB (65 μm), tiempo de exposición de la fibra: 70 min), de las flores de *C.mendelii*, a diferentes horas del día.

N°	Compuesto	IRL, DB-WAX		Cantidad relativa %, \pm SD, n=3			
		Exp	Lit	7 a.m.	11 a.m.	3 p.m.	7 p.m.
1	Hexano	580	600[76]	ND	ND	17 \pm 1	ND
2	β -Mirceno	1162	1168[63]	16 \pm 4	4 \pm 0,2	ND	5 \pm 0,2
3	Limoneno	1200	1212[63]	2 \pm 2	ND	ND	24 \pm 1
4	<i>cis</i> - β -Ocimeno	1250	1245[62]	54 \pm 3	22 \pm 9	ND	ND
5	Benzaldehído	1530	1525[70]	ND	3 \pm 3	ND	ND
6	Linalol	1540	1548[63]	25 \pm 7	33 \pm 1	13 \pm 1	12 \pm 1
7	Germacreno D	1730	1732[63]	ND	ND	23 \pm 2	ND
8	Acetato de bencilo	1735	1739[72]	ND	1 \pm 1	ND	ND
9	α -Farneseno	1752	1740[68]	ND	5 \pm 4	13 \pm 1	17 \pm 1
10	Alcohol bencílico	1790	1786[78]	ND	2 \pm 2	ND	ND
11	Salicilato de metilo	1794	1786[65]	3 \pm 1	19 \pm 8	26 \pm 2	20 \pm 1
	Monoterpenos			97	59	13	49
	Sesquiterpenos			3	24	62	37
	Benzenoides			-	6	-	-
	Compuestos alifáticos			-	-	17	-

ND: no detectado.

Figura 29. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME *in vivo* [tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m): 70 min], monitoreo a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 13**.



Los tres componentes mayoritarios aislados a las 7 a.m. fueron: *cis*- β -ocimeno (54 \pm 3%), linalol (25 \pm 7%) y β -mirceno (16 \pm 4%). La fracción volátil estuvo compuesta, principalmente, por monoterpenos (97%). A las 11 a.m., los componentes mayoritarios fueron: linalol (33 \pm 1%), *cis*- β -ocimeno (22 \pm 9%) y salicilato de metilo (19 \pm 8%); metabolitos secundarios, *e.g.*, acetato de bencilo (1 \pm 1%) y alcohol bencílico (2% \pm 2), solo se detectaron a esta hora del monitoreo.

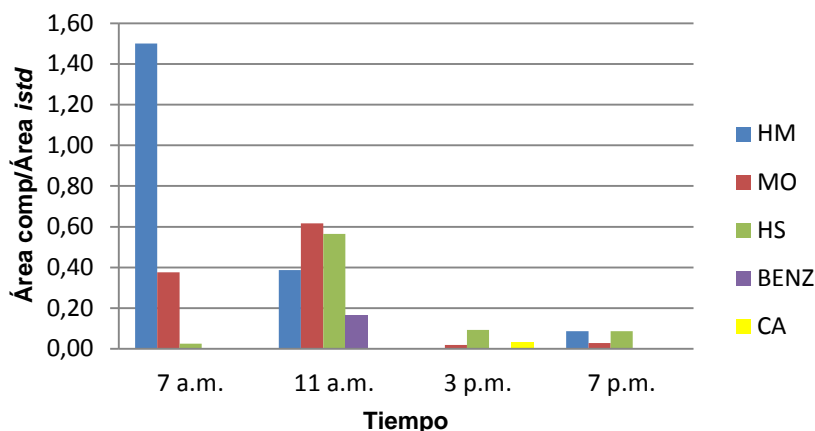
A las 3 p.m., se aislaron solamente cinco componentes de la fracción volátil; el salicilato de metilo (26 \pm 2%), el germacreno D (23 \pm 2%) y el linalol (13 \pm 1%), que fueron los metabolitos principales. El hexano y germacreno D, se detectaron solamente a las 3 p.m. Durante el monitoreo realizado a las 7 p.m., los

compuestos mayoritarios fueron limoneno ($24\pm 1\%$), salicilato de metilo ($20\pm 1\%$) y α -farneseno ($17\pm 1\%$).

Si se comparan dos muestreos de la *C.mendelii*, por HS-SPME *in vivo* e *in vitro*, se puede observar que la fracción volátil aislada *in vivo* la conforman, casi en un 80%, tres compuestos: linalol, *cis*- β -ocimeno y salicilato de metilo, mientras que, en la de *in vitro*, los compuestos mayoritarios fueron: β -mirceno, *cis*- β -ocimeno y α -copaeno.

La diferencia entre los dos métodos usados, se ve enmarcada, en parte, por el calentamiento al que fue sometida la flor de la orquídea en HS-SPME *in vitro*, lo que permitió que los metabolitos volátiles se desplazaran al espacio de cabeza con mayor facilidad; en cambio, por HS-SPME *in vivo*, el aislamiento de los volátiles se hizo a temperatura ambiente. También, el espacio de cabeza en el que se encontraron los metabolitos en HS-SPME *in vitro*, fue mucho más pequeño que el espacio de cabeza en HS-SPME *in vivo*, lo que permitió, en el primer caso, concentrar más fácilmente los metabolitos. Además, en HS-SPME *in vivo*, como el muestrador de acrílico no estuvo cerrado completamente, es probable que los metabolitos más volátiles se escaparan, lo que se vio reflejado en la cantidad y el tipo de compuestos aislados.

Figura 30. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.mendelii*, del monitoreo *in vivo* por HS-SPME a diferentes horas del día. HM: Hidrocarburos monoterpénicos. MO: Monoterpenos oxigenados. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. BENZ: Benzenoides. CA: Compuestos alifáticos.



En la **Figura 30**, se observa que la fracción volátil aislada a las 7 a.m. fue rica en hidrocarburos monoterpénicos. A las 11 a.m., las cantidades entre los hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpénicos fueron similares, siendo los hidrocarburos sesquiterpénicos los más abundantes. A las 3 p.m., las cantidades de las familias de compuestos fueron más bajas, con respecto a las detectadas en el monitoreo realizado a las 7 y 11 a.m. A las 7 p.m., los hidrocarburos monoterpénicos y los benzenoides predominaron en la fracción volátil de la *C.mendelii*.

Monitoreo *in vivo* de la fracción volátil de la *C.triana*:

Los metabolitos secundarios volátiles aislados de la *C.triana* pertenecen a la familia de los monoterpenos, e.g., limoneno; sesquiterpenos, e.g., α -farneseno, y benzenoides, por ejemplo, el alcohol fenil etílico. La composición química de la fracción volátil aislada a las 7 y 11 a.m. y a las 3 y 7 p.m., se encuentra en la **Tabla 14**.

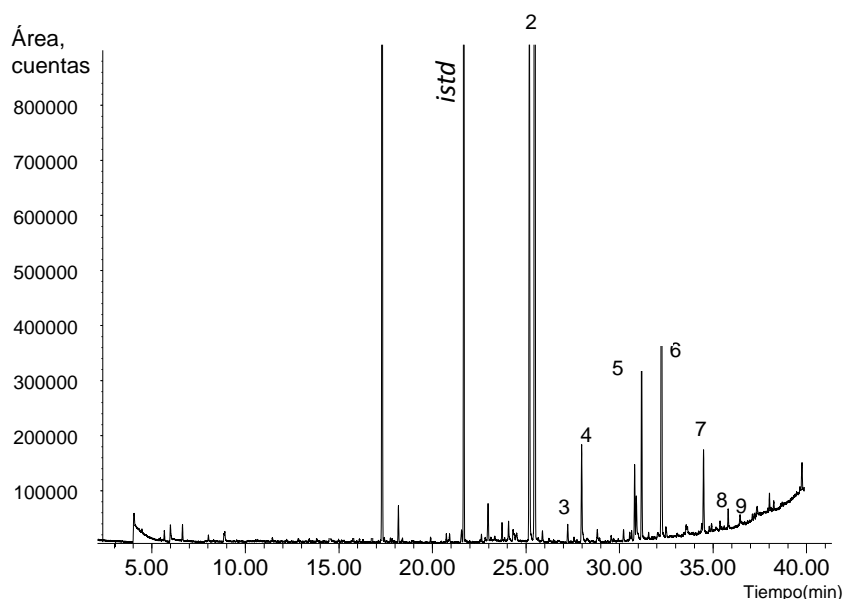
Tabla 14. Relación $\text{Área}_{\text{comp}}/\text{Área}_{\text{std}}$ de los compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C. trianae*, aislados por HS-SPME *in vivo* (fibra: PDMS/DVB (65 μm), tiempo de exposición de la fibra: 70 min), a diferentes horas del día.

N°	Compuesto	DB-WAX		Cantidad relativa, (%), $\pm\text{SD}$, n=3			
		IRL _{exp}	IRL _{lit}	7 a.m.	11 a.m.	3 p.m.	7 p.m.
1	Limoneno	1203	1212[63]	ND	ND	ND	15 \pm 13
2	Benzaldehído	1530	1525[70]	63 \pm 4	44 \pm 6	40 \pm 6	ND
3	β -Cariofileno	1615	1628[63]	0,4 \pm 0,6	ND	ND	ND
4	Benzoato de metilo	1632	1635[75]	18 \pm 4	19 \pm 5	13 \pm 2	ND
5	α -Farneseno	1739	1740[68]	2,1 \pm 0,5	6 \pm 7	25 \pm 3	61 \pm 3
6	Salicilato de metilo	1789	1786[65]	2,4 \pm 0,6	7 \pm 2	ND	ND
7	Alcohol fenil etílico	1901	1901[73]	6,9 \pm 0,5	16 \pm 5	20 \pm 4	ND
8	2-Fenil etanol	1919	1905[73]	2,6 \pm 0,4	1,6 \pm 0,1	ND	ND
9	Cinamato de metilo	2065	2056[65]	3,9 \pm 0,5	9 \pm 3	ND	ND
	Monoterpenos			-	-	-	15
	Sesquiterpenos			5	13	26	60
	Benzenoides			95	92	74	-

ND: no detectado.

En la **Figura 31**, se presenta un perfil cromatográfico de los volátiles de las flores de *C.triana*e aislados por HS-SPME *in vivo*, a las 7 a.m.; tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m): 70 min. Los demás cromatogramas se encuentran en el **Anexo D.**

Figura 31. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.triana*e, aislados por HS-SPME *in vivo* [tiempo de equilibrio térmico: 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m): 70 min], monitoreo a las 7 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14.**



En la **Figura 32**, se muestra la variación de la relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según las familias de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.triana*e, monitoreada *in vivo*, a diferentes horas del día. Las familias de compuestos aislados fueron: hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos benzenoides.

A las 7 a.m., la fracción volátil estuvo compuesta, principalmente, por benzenoides: el benzaldehído (63 \pm 4%) fue el compuesto mayoritario. El β -

cariofileno solo fue detectado a esta hora del día. Compuestos como 2-fenil etanol y cinamato de metilo, se detectaron a las 7 y 11 a.m.

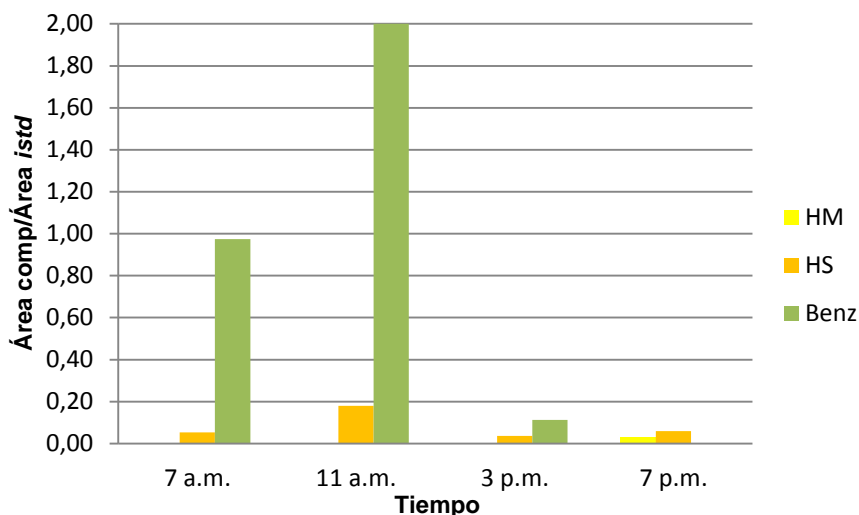
A las 11 a.m., los benzenoides fueron la familia de compuestos predominantes. El compuesto mayoritario, al igual que en el monitoreo realizado a las 7 a.m., fue el benzaldehído ($44\pm 6\%$), seguido del benzoato de metilo ($19\pm 5\%$) y el alcohol fenil etílico ($16\pm 5\%$).

Los benzenoides e hidrocarburos sesquiterpénicos fueron las familias de compuestos más abundantes en la fracción volátil de la *C.trianae*, obtenida a las 3 p.m. El benzaldehído ($40\pm 6\%$) fue el compuesto mayoritario.

A las 7 p.m., solo se detectaron dos volátiles de las flores de la orquídea, el α -farneseno ($61\pm 3\%$) como compuesto mayoritario y el limoneno ($15\pm 13\%$).

Si se compara la composición de las fracciones volátiles, obtenidas por HS-SPME *in vivo*, con la de HS-SPME *in vitro*, se observa que, la primera, la conforman, casi en un 80%, tres compuestos: benzaldehído, benzoato de metilo y alcohol fenil etílico; mientras que, en la segunda, los volátiles que aportan un 80% de la fracción total aislada por HS-SPME *in vitro*, fueron: β -cariofileno, alcohol fenil etílico y cinamato de metilo.

Figura 32. Relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.trianae*, del monitoreo *in vivo* por HS-SPME a diferentes horas del día. HM: Hidrocarburos monoterpénicos. HS: Hidrocarburos sesquiterpénicos. Benz: Benzenoides.



Comparación de la relación $\text{Área}_{\text{com}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en la fracción volátil de las flores de *C.mendelii* y *C.trianae* aislada *in vivo* por HS-SPME, a diferentes horas del día.

Las dos especies de orquídeas estudiadas, *C.mendelii* y *C.trianae*, pertenecen al género *Cattleya*. Sin embargo, al analizar sus fracciones volátiles, se aprecian diferentes familias de compuestos presentes y las diferentes cantidades relativas, lo que evidencia diferente metabolismo secundario de la planta, según el tipo de metabolitos volátiles emitidos (Véase **Tabla 15**).

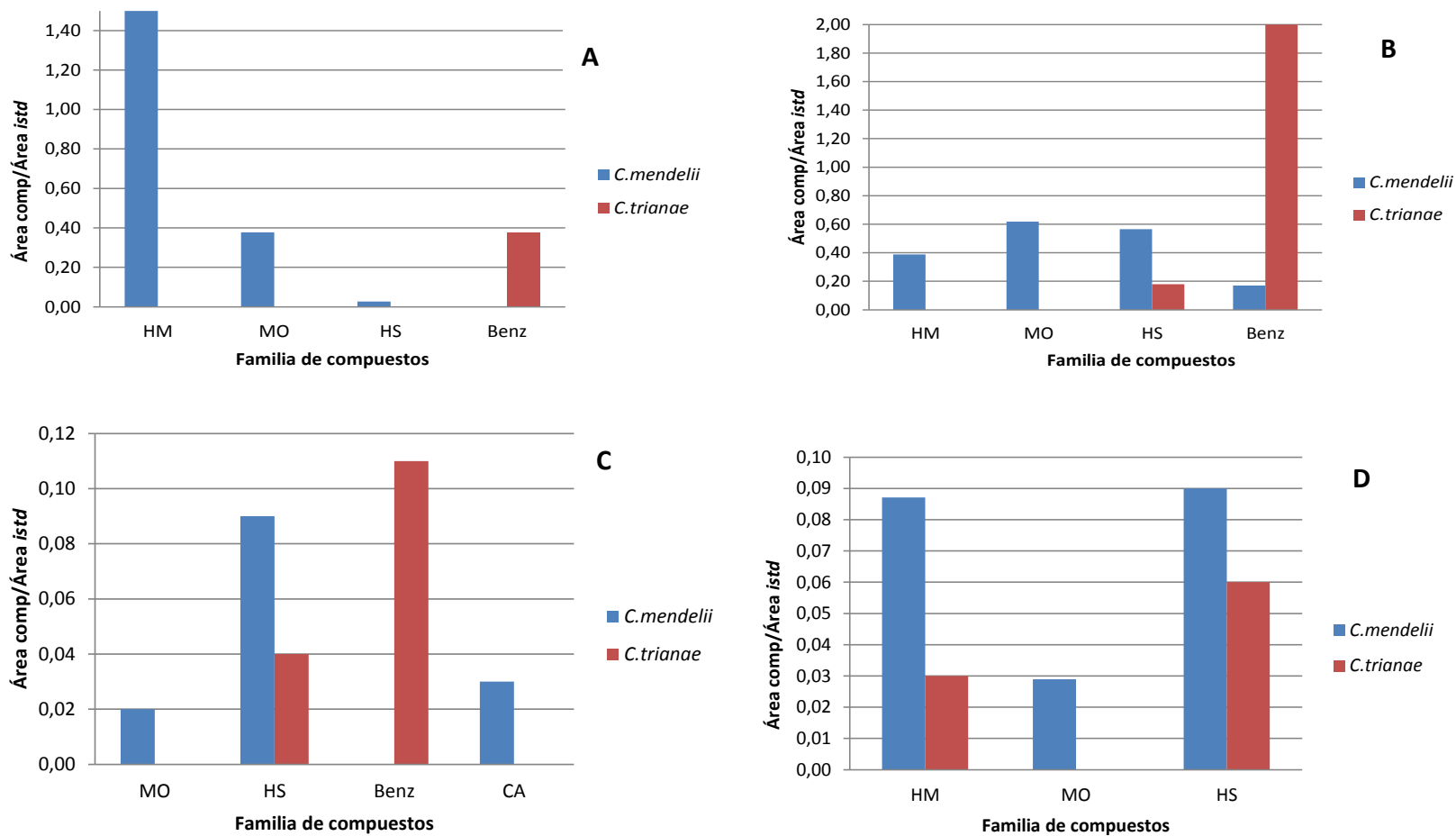
Tabla 15. Comparación de la relación $\text{Área}_{\text{comp}}/\text{Área}_{\text{istd}}$, según la familia de compuestos presentes en las fracciones volátiles de las flores de *C.mendelii* y *C.trianae*, aisladas *in vivo* por HS-SPME a diferentes horas del día.

Familia de compuestos	Relación $\text{Área}_{\text{comp}}/\text{Área}_{\text{istd}}$ / tiempo							
	<i>C.mendelii</i>				<i>C.trianae</i>			
	7 a.m.	11 a.m.	3 p.m.	7 p.m.	7 a.m.	11 a.m.	3 p.m.	7 p.m.
Hidrocarburos monoterpénicos	1,5	0,4	-	0,1	-	-	-	0,1
Monoterpenos oxigenados	0,4	0,6	0,1	0,1	-	-	-	-
Hidrocarburos sesquiterpénicos	0,1	0,6	0,1	-	0,1	0,2	0,1	0,1
Benzenoides	-	1,2	-	-	1,0	2,0	0,1	-
Compuestos alifáticos	-	-	0,1	-	-	-	-	-

A las 7 a.m., la fracción volátil de la *C.mendelii* estuvo compuesta mayoritariamente, por monoterpenos, mientras que la *C.trianae*, por hidrocarburos sesquiterpénicos y benzenoides. A las 11 a.m., los volátiles de la *C.mendelii* y *C.trianae* presentes en mayor proporción fueron los benzenoides. En horas de la tarde, 3 p.m., la *C.mendelii* presentó metabolitos secundarios que pertenecen a los monoterpenos oxigenados, hidrocarburos sesquiterpénicos y compuestos alifáticos. La *C.trianae*, en cambio, generó volátiles tipo benzenoides e hidrocarburos sesquiterpénicos. A las 7 pm, la fragancia de la *C.mendelii* estuvo compuesta principalmente por monoterpenos (hidrocarburos y oxigenados), a diferencia de la fracción volátil de la *C.trianae*, que estuvo compuesta por hidrocarburos monoterpénicos y benzenoides, como se observa en la **Tabla 15**.

En la **Figura 33**, se aprecia la comparación de la composición química, por familia de compuestos, aislados *in vivo* por HS-SPME de las flores de *C.mendelii* y *C.trianae* monitoreadas a diferentes horas del día.

Figura 33. Comparación de la composición química, según familias de compuestos, aislados por HS-SPME *in vivo* de las flores de *C.mendelii* y *C.triana* monitoreadas a diferentes horas del día. **A.** 7 a.m. **B.** 11 a.m. **C.** 3 p.m. **D.** 7 p.m.



Aunque las orquídeas estudiadas pertenezcan al mismo género, muchos de sus metabolitos secundarios volátiles fueron diferentes o estaban presentes en cantidades distintas, debido a que son plantas diferentes y su metabolismo es diferente [80]. Según el tipo de insecto polinizador, la cantidad de metabolitos emitidos puede variar. Si la flor ya fue polinizada, probablemente, disminuya la emisión de volátiles para no ser visitada por otros polinizadores [81]. También, esta emisión de compuestos se puede ver afectada, según las etapas de madurez de las flores y los procesos florales que tuvieron [82].

Los monoterpenos y sesquiterpenos encontrados en las dos especies de *Cattleya*, también se encontraron en la esencia floral de otras orquídeas, como en la *Dendrobium beckleri* y la *Phalaenopsis violácea* [83]. Los terpenos aislados en las *Cattleyas*, también se reportaron en la *Vanda Mimi Palmer* [84] y *Anthirrhinum* [85].

3. CONCLUSIONES

En comparación con los recubrimientos usados PDMS y CAR/PDMS, la fibra con recubrimiento polimérico PDMS/DVB (65 µm) mostró mayor capacidad de extracción de metabolitos secundarios volátiles de las flores (*Plumeria rubra*) usadas en los ensayos preliminares.

Las mejores condiciones para aislar volátiles de las flores por HS-SPME *in vitro*, fueron las siguientes: tiempo de equilibrio térmico, 10 min; tiempo de exposición de la fibra, 70 min; temperatura, 60°C. Para los experimentos realizados *in vivo*, fueron los siguientes: tiempo de equilibrio térmico, 10 min y 70 min de exposición de la fibra de SPME.

Los metabolitos secundarios volátiles encontrados en la flor de la *C.mendellii*, por HS-SPME, monitoreados *in vitro* e *in vivo*, pertenecen a la familia de compuestos monoterpénicos, sesquiterpénicos, benzenoides y compuestos alifáticos.

Los metabolitos volátiles encontrados en la flor de la *C.trianae*, por HS-SPME, monitoreo *in vitro*, pertenecen a la familia de compuestos sesquiterpénicos, benzenoides y compuestos alifáticos. Y los metabolitos encontrados por HS-SPME, *in vivo*, fueron de las familias de los hidrocarburos monoterpénicos, sesquiterpénicos y benzenoides.

Las dos especies estudiadas, a pesar de pertenecer al mismo género (*Cattleya*), presentaron diferentes familias de compuestos y diferentes cantidades, según la hora del día en la que se monitorearon los metabolitos secundarios volátiles.

Las cantidades relativas (%) de compuestos volátiles extraídos por medio de HS-SPME *in vitro*, fueron mayores que aquellas de los compuestos extraídos *in vivo*, debido a que el tamaño del espacio de cabeza del montaje usado en HS-

SPME *in vivo*, es más grande que el usado *in vitro*, lo que condujo a la pérdida de los compuestos volátiles.

5. RECOMENDACIONES

En la metodología planteada para los experimentos HS-SPME *in vitro* con las orquídeas del género *Cattleya*, se recomienda colocar el frasco de vidrio que se usa para realizar el monitoreo de los volátiles, en un baño de María, para evitar que la flor sufra daños por la temperatura utilizada.

Con respecto al monitoreo de la fracción volátil de las flores por HS-SPME *in vivo*, es necesario sellar completamente el orificio por donde se introduce la flor en el muestreador, para evitar la pérdida de los metabolitos secundarios volátiles. También, se recomienda reducir el tamaño del muestreador, de acuerdo con el tamaño de la flor, para que el espacio de cabeza sea más pequeño y permita que el recubrimiento polimérico de la fibra esté más cerca a la flor y, así, extraer con más facilidad los metabolitos secundarios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Freuler, María Julia. Orquídeas. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina. **2008**. 1. 8-14.
- [2] Lecoufle Marcel. Atlas ilustrado de las orquídeas. Editorial Susaeta S.A. España. **2008**. 72. 54-102.
- [3] Calderón-Sáenz Eduardo. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Editor: Eduardo Calderón. Ed. IAVH. Bogotá, Colombia. **2006**. 3. 8-13.
- [4] Sociedad Colombiana de Orquideología. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.sco.org.co/>, Acceso: el 17 de mayo de 2014.
- [5] Asociación de Orquideología de Santander, ASORQUISAN. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://asociacionorquideologia.blogspot.com/>, Acceso: el 16 de mayo de 2014.
- [6] Asociación Orquideológica del Gran Santander, ORQUISANDER. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://orquisander.blogspot.com/>, Acceso: el 17 de mayo de 2014.
- [7] López-Cárdenas, D.; Arias-García, J.; López-Camargo, R. Árboles y arbustos de la ciudad de Leticia. Editorial Equilátero. **2004**. Leticia. 1.18.
- [8] COLOMBIA Presidencia de la Republica. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://web.presidencia.gov.co/asiescolombia/simbolos1.htm>, Acceso: el 3 de abril de 2014.
- [9] Santos, C.; Ordoñez, J.; Morales, L. Colección viva de especies amenazadas, contribución del Jardín Botánico José Celestino Mutis. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá, Colombia. **2010**. 1. 20.
- [10] Ramírez, S.; Gravendeel, B.; Singer, R.; Marshall, C.; Pierce, N. Dating the origin of the *Orchidaceae* from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*. **2007**. 1. 1042-1045.

- [11] Adelberg, J.; Pollock, R.; Rajapakse, N.; Young, R.; Micropropagation, decontamination, transcontinental shipping and hydroponic growth of *Cattleya* while sealed in semipermeable membrane vessels. *Scientia Horticulturae*. **1998**. 73. 23–35.
- [12] Chugh, S.; Guha, S.; Rao, U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, **2009**. 122. 507-520.
- [13] Arditti, G. J. Fundamentals of Orchid Biology. Ed. John Wiley & Sons. New York. **1992**. 1.100-110.
- [14] Dormont, L.; Delle-Vedove, R.; Bessière, J.; Schatz B. Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. *Phytochemistry*. **2014**. 100. 51.
- [15] Armenia Hotel [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.armeniahotel.com.co/blog/orquideas-de-colombia.html>, Acceso: el 30 de marzo de 2014.
- [16] Plitt, J. J. La flor y otros órganos derivados. Editorial Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. **2006**. 1. 61-78.
- [17] Jones, W. E.; Kuehnle, A. R.; and Arumuganathan, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*. **1998**. 82. 189-190.
- [18] Parques Nacionales Naturales de Colombia. Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.parquesnacionales.gov.co/PNN/portel/libreria/php/decide.php?patron=01.180101>, Acceso: el 10 de abril de 2014.
- [19] Plantas & Jardín. Pasión por la jardinería. *Cattleya trianae*, la flor nacional de Colombia. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://plantasyjardin.com/2013/02/cattleya-trianae-la-flor-nacional-de-colombia/>, Acceso: el 13 de octubre de 2014.
- [20] Díaz, J.; Solano, F.; Sánchez, L.; y Espinosa, F. Riqueza y distribución de las *Orchidaceae* en la provincial de Pamplona. *Bistua*. **2004**. 2. 106-112.

- [21] Salazar-Mercado, S.A. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Catleya mendelii* Drombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*. **2012**. 61. 69-70.
- [22] Chen, W. y Chen, H. Orchid Biotechnology. World Scientific. Ed. World Scientific Pub Co Inc. Taiwan. **2007**. 1. 50.
- [23] Pichersky, E.; Gershenzon, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Plant Biology*. **2002**. 5. 237.
- [24] Millar, J.G.; Sims, J.J. Preparation, clean-up and preliminary fractionation of extracts. *Methods in Chemical Ecology*. **1998**. 1. 1-37.
- [25] Dobson, H.E.M. 1994. Floral volatiles in insect biology. *Insect-plant Interactions*. Ed. E. Bernays. Boca Raton. **1994**. 47-81.
- [26] Pichersky, E.; Raguso, R. A.; Lewinsohn, E.; Croteau R. Flower scent production in *Clarkia* (Onagraceae). Localization and developmental modulation of monoterpenes emission and linalool synthase activity. *Plant Physiology*, **1994**, 106, 1533-1540.
- [27] Marín, J. C.; Céspedes, C. L.; Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. *Fitotecnia Mexicana*. **2007**. 30. 4. 327.
- [28] Sharkey TD, Chen XY, Yeh S: Isoprene increases thermo tolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology*. **2001**. 125. 2001-2006.
- [29] Augusto, F.; Pires, A. L. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in analytical chemistry*. **2002**. 21. 428.
- [30] Arthur, C.; Pawliszyn, J. Solid phase microextraction with termal desorption used fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. **1990**. 62. 2145-2148.
- [31] Morales-Valle, H.; Silva, L.; Paterson, R.; Oliveira, J.; Venancio, A.; Lima, A. Microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for improved analysis of geosmin and other fungal "off" volátiles en grapes juice. *Journal of Microbiological Methods*. **2010**. 83. 48-52.

- [32] Stashenko, E.; Martínez, J. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*. **2007**. 235-242.
- [33] García-Esteban, M.; Ansorena, D.; Astiasarán, I.; Ruiz, J. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*. **2004**. 1. 64
- [34] Mills, G. A.; Walker, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 1. 267-287.
- [35] Stashenko, E.; Martínez, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. **2011**. 3. 29.
- [36] Mester, Z.; Sturgeona R.; Pawliszyn J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. *Spectrochimica Acta Part B*. **2001**. 236-237.
- [37] Musteata, F. M.; Pawliszyn, J. *In vivo* sampling with solid phase microextraction. *Journal of Biochemistry and Biophysics*. **2007**. 70. 181-182.
- [38] Snow, N. A.; Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *Journal of Chromatography A*. **2000**. 1. 445–455.
- [39] Valente, L. P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*. **2002**. 21. 428–438.
- [40] Jennings, W.; Mittlefehldt, E.; Stremple, P. Analytical gas chromatography. *Academic Press*. **1987**. 2. 1-287.
- [41] Grob, R.L. Modern practice of gas chromatography. *John Willey & Sons*. New York. **1995**. 1. 1-44.
- [42] Stashenko, E.; Martínez, J. ¿Cuántos componentes hay en una muestra? Respuesta cromatográfica. *Scientia Chromatographica*. **2009**. 1-24.
- [43] Kellner, R.; Mermet, J.; Otto, M.; Valcarcel, M.; Widmwer, H. *Analytical Chemistry*. Willey-VCH, Verlag GmbH & Co. Berlin. **2004**. 1. 407-409.
- [44] Stashenko, E.; Martínez, J. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*. **2009**. 1. 31-32.

- [45] Stashenko, E.; Martínez, J. Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*. **2009**. 1. 19-36.
- [46] Rossi, J.P.; Delfino, J.M. Cienciometría, instrumentos de evaluación y crítica. *Ciencia en Línea*. Universidad de Buenos Aires. **2005**. [Sitio en Internet]. Disponible en: www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm, Acceso: el 30 de enero de 2014.
- [47] Rudall, P. J.; Bateman, R. M. Evolutionary change in flowers and inflorescences: evidence from naturally occurring terata. *Trends in Plant Science*. **2003**. 8. 76-82.
- [48] Fossen, T.; Øvstedal, D.O. Anthocyanins from flowers of the orchids *Dracula chimaera* and *D. cordobae*. *Phytochemistry*. **2003**. 63. 783-787.
- [49] Martin, K. P.; Madassery, J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae*. **2000**. 108. 95-99.
- [50] Adelberg, J.; Pollock, R.; Rajapakse, N.; Young, R. Micropropagation, decontamination, transcontinental shipping and hydroponic growth of *Cattleya* while sealed in semipermeable membrane vessels. *Scientia Horticulturae*. **1998**. 73. 23-35.
- [51] Tsai, W.; Hsiao, Y.; Pan, Z.; Kuoh, C.; Chen, W.; Chen, H. The role of ethylene in orchid ovule development. *Plant Science*. **2008**. 175. 98-145.
- [52] Teixeira da Silva, J.; Chin, D.; Van Pam, T.; Mii, M. Transgenic orchids. *Scientia Horticulturae*. **2009**. 130. 590-598.
- [53] Adelberg, J.; Pollock, R.; Rajapakse, N.; Young, R. Micropropagation, decontamination, transcontinental shipping and hydroponic growth of *Cattleya* while sealed in semipermeable membrane vessels. *Scientia Horticulturae*. **1998**. 73. 23-35.
- [54] Minoru, I.; Shijnpei, U.; Kljnimitsu, F.; Mizuo, N.; Yukihiro, S.; Yumi, M.; and Ttsuo, N. A new biologically active phenolic from *Cattleya trianaei*. *Phytochemistry*. **1979**. 18. 1211-1213.

- [55] Kikuchi, O. Orchid flowers tolerance to gamma-radiation. *Radiation Physics and Chemistry*. **2000**. 57. 555-557.
- [56] Chugh, S.; Guha, S.; Rao, U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. **2009**. 122. 507–520.
- [57] Franco, M.; Guevara, G.; Mesa, N.; Urueña, G. Hardening of the national flower of Colombia, the threatened *Cattleya trianae* (Orchidaceae), from *in vitro* culture with previous invigoration phase. *Biologia Tropical*. **2007**. 55.681-691.
- [58] Wei-Ling, Tan S.; Wong, S.; Kini, M. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI mass spectrometry. *Journal of Virological Methods*. **2000**. 85. 93-99.
- [59] Salazar-Mercado, S. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Drombrain (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, **2012**. 61. 69-67.
- [60] Adams, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Ed. Allured Publishing Corporation. Illinois. **2004**. 456.
- [61] NIST Standard Reference Database. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program. Gaithersburg, MD, USA. Data Version 05. **2008**.
- [62] Davies, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*. **1990**. 503. 1-24.
- [63] Choi, H. S. Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**. 51. 2687-2692.
- [64] Yamaguchi, K.; Shibamoto, T., Volatile constituents of green tea, Gyokuro (Camellia sinensis L. var Yabukita). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1981**. 29. 2. 366-370.
- [65] Pino, J. A.; Mesa, J.; Muñoz, Y.; Marti, M. P.; Marbot, R. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**. 53. 2213-2223.

- [66] Binder, R. G.; Flath, R. A. Volatile components of pineapple guava. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1989**. 37. 734-736.
- [67] Pontes, M.; Marques, J. C.; Camara, J. S. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta*. **2007**. 74. 91-103.
- [68] Shellie, R.; Mondello, L.; Marriott, P.; Dugo, G.; Characterisation of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2002**. 1. 225-234.
- [69] Chung, T. Y.; Eiserich, J. P.; and Shibamoto, T. Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **1993**. 41. 1693-1697.
- [70] Valim, M. F.; Rouseff, R. L.; and Lin, J. Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **2003**. 51. 1010-1015.
- [71] Szafranek, B.; Chrapkowska, K.; Ska, M. P.; and Szafranek, J. Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **2005**. 53. 2817-2822.
- [72] Sotomayor, J. A.; Martinez, R. M.; Garcia, A. J.; and Jordan, M. J. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **2004**. 52. 5418-5424.
- [73] Howard, K. L.; Mike, J. H.; Riesen, R. Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for Headspace. *Analysis of Wine Aroma Components*. **2005**. 52. 1. 37-45.
- [74] Hognadottir, A.; and Rouseff, R. L. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography - olfactometry and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**. 998: 201-211.
- [75] Ferreira, V., Aznar, M., Lopez, R., and Cacho, J. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key

differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. **2001**. 49. 4818-4824.

[76] Hoekman, S.K. Improved gas chromatography procedure for speciated hydrocarbon measurements of vehicle emissions, *Journal of Chromatography A*. **1993**, 639, 2, 239-253.

[78] Chang, L.P.; Sheng, L.S.; Yang, M.Z. and An, D.K., Retention index of essential oil in temperature-programmed capillary column gas chromatography, *Acta of Pharmacology*. **1989**, 24, 11, 847-852.

[79] Zhao, Z.; Wang, Y.; Ren J. Temporal variation of floral scent emitted from a *Cattleya* hybrid. *Chemistry of Natural Compounds*. **2004**. 50,4, 741-743.

[80] Dudareva, N.; y Pichersky, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology*. **2000**. 122, 627–633.

[81] Proffit, M.; Schatz, B.; Bèssiere, J.; Chen, C.; Soler, C., Hossaert-MkKey, M. Signalling receptivity: comparison of the emission of volatile compounds by figs of *Ficus hispida* before, during and after the phase of receptivity to pollinators. *Symbiosis*. **2008**. 45, 15–24.

[82] Kaiser, R. The scent of orchids: olfactory and chemical investigations. *Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam. Países Bajos*. **1993**. 1. 20-40.

[83] Tsai, W.; Hsiao, Y.; Pan, Z.; Chihsu, C.; Pingyang, Y.; Hueichen, W.; Chen, H. Molecular Biology of Orchid Flowers: With Emphasis on *Phalaenopsis*. *Advances in Botanical Research*. **2008**. 47. 100-135.

[84] Mohd-Hairul, R.; Namasivayam, P.; Cheng Lian, G.; Abdullah, J. Terpenoid, Benzenoid, and Phenylpropanoid Compounds in the Floral Scent of *Vanda Mimi* Palmer. *Journal of Plants and Biology*. **2010**. 53. 358–366.

[85] Dudareva, N.; Martin, D.; Kish, C.; Kolosova, N.; Gorestein, N.; Faldt, J.; Miller, B.; Bohlman, J. (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Functional and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *The Plant Cell*. **2003**. 15. 1227–1241.

BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Editorial Allured Publishing Corporation. Illinois. **2004**, Vol.1, pp. 456.

ADELBERG, J, et al. Micropropagation, decontamination, transcontinental shipping and hydroponic growth of *Cattleya* while sealed in semipermeable membrane vessels. *Scientia Horticulturae*. **1998**, Vol. 73, pp. 23–35.

ARDITTI, G. J. Fundamentals of Orchid Biology. Editorial John Wiley & Sons. New York. **1992**, Vol. 1, pp. 100-110.

Armenia Hotel, <http://www.armeniahotel.com.co/blog/orquideas-de-colombia.html>, fecha de consulta: marzo 30 de 2014.

ARTHUR, C. y PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption used fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. **1990**, Vol. 62, pp. 2145-2148.

Asociación de Orquideología de Santander, ASORQUISAN, <http://asociacionorquideologia.blogspot.com/>, fecha de consulta: mayo 16 de 2014.

Asociación Orquideológica del Gran Santander, ORQUISANDER, <http://orquisander.blogspot.com/>, fecha de consulta: mayo 17 de 2014.

AUGUSTO, F y PIRES, A. L. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in analytical chemistry*. **2002**. Vol. 21, pp. 428.

BINDER, R. y FLATH, R. Volatile components of pineapple guava. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1989**, Vol. 37, pp. 734-736.

CALDERÓN-SÁENZ Eduardo. Libro Rojo de Plantas de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto Alexander von Humboldt - Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Editorial Eduardo Calderón. Bogotá, Colombia. **2006**, Vol. 3, pp. 8-13.

CHANG, L, et al. Retention index of essential oil in temperature-programmed capillary column gas chromatography, *Acta of Pharmacology*. **1989**, Vol. 24, pp. 847-852.

CHEN, W. y CHEN, H. Orchid Biotechnology. World Scientific. Editorial World Scientific Pub Co Inc. Taiwan. **2007**, Vol. 1, pp. 50.

CHOI, H. Character impact odorants of citrus hallabong [(C. unshiu Marcov x C. sinensis Osbeck) x C. reticulata Blanco] cold-pressed peel oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, Vol. 51, pp. 2687-2692.

CHUGH, S, GUHA, S, y RAO, U. Micropropagation of orchids: A review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*, 2009, Vol. 122, pp. 507-520.

CHUNG, T, EISERICH, J y SHIBAMOTO, T. Volatile compounds isolated from edible Korean chamchwi (*Aster scaber* Thunb). *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **1993**, Vol. 41, pp. 1693-1697.

DAVIES, N. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A*. 1990, Vol. 503, pp. 1-24.

DÍAZ, J, et al. Riqueza y distribución de las *Orchidaceae* en la provincial de Pamplona. *Bistua*. **2004**, Vol. 2, pp. 106-112.

DOBSON, H. Floral volatiles in insect biology. *Insect-plant Interactions*. Editorial E. Bernays. Boca Raton. **1994**, Vol. 1, pp. 47-81.

DORMONT, L, et al. Floral scent emitted by white and coloured morphs in orchids. *Phytochemistry*. **2014**, Vol. 100, pp. 51.

DUDAREVA, N. y PICHERSKY, E. Biochemical and molecular genetic aspects of floral scents. *Plant Physiology*. **2000**, Vol. 122, pp. 627–633.

DUDAREVA, N, et al. (E)- β -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: Functional and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *The Plant Cell*. **2003**, Vol. 15, pp. 1227–1241.

FERREIRA, V, et al. Quantitative gas chromatography-olfactometry carried out at different dilutions of an extract. Key differences in the odor profiles of four high-quality Spanish aged red wines. *Journal of Agriculture Food Chemistry*. **2001**, Vol. 49, pp. 4818-4824.

FOSSSEN, T y OVSTEDAL, D. Anthocyanins from flowers of the orchids *Dracula chimaera* and *D. cordobae*. *Phytochemistry*. **2003**, Vol. 63, pp. 783-787.

FRANCO, M, et al. Hardening of the national flower of Colombia, the threatened *Cattleya trianae* (Orchidaceae), from *in vitro* culture with previous invigoration phase. *Biologia Tropical*. **2007**, Vol. 55, pp. 681-691.

FREULER, M. Orquídeas. Editorial Albatros. Buenos Aires, Argentina. **2008**, Vol. 1, pp. 8-14.

GARCÍA-ESTEBAN, M, et al. Study of the effect of different fiber coatings and extraction conditions on dry cured ham volatile compounds extracted by solid-phase microextraction (SPME). *Talanta*. 2004, Vol.1, pp. 64.

GROB, R. Modern practice of gas chromatography. *John Willey & Sons*. New York. **1995**, Vol. 1, pp. 1-44.

HOEKMAN, S. Improved gas chromatography procedure for speciated hydrocarbon measurements of vehicle emissions, *Journal of Chromatography A*. **1993**, Vol. 2, pp. 239-253.

HOGNADOTTIR, A y ROUSEFF, R. Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. **2003**, Vol. 998, pp. 201-211.

HOWARD, K, MIKE, J, y RIESEN, R. Validation of a Solid-Phase Microextraction Method for Headspace. *Analysis of Wine Aroma Components*. **2005**, Vol. 52, pp. 37-45.

Presidencia de la república de Colombia,
<http://web.presidencia.gov.co/asiescolombia/simbolos1.htm>, fecha de consulta:
abril 3 de 2014.

JENNINGS, W, MITTFEHLDT, E y STREMPLE, P. Analytical gas chromatography. *Academic Press*. **1987**, Vol. 2, pp. 1-287.

JONES, W, KUEHNLE, A y ARUMUGANATHAN, K. Nuclear DNA content of 26 orchid (Orchidaceae) genera with emphasis on *Dendrobium*. *Annals of Botany*. **1998**, Vol. 82, pp. 189-190.

KAISER, R. The scent of orchids: olfactory and chemical investigations. *Elsevier Science Publishers B.V.* Amsterdam. Países Bajos. **1993**, Vol. 1, pp. 20-40.

KIKUCHI, O. Orchid flowers tolerance to gamma-radiation. *Radiation Physics and Chemistry*. **2000**, Vol. 57, pp. 555-557.

LECOUFLE, M. Atlas ilustrado de las orquídeas. Editorial Susaeta S.A. España. **2008**, Vol. 72, pp. 54-102.

LÓPEZ-CÁRDENAS, D, ARIAS, J y LÓPEZ, R. Árboles y arbustos de la ciudad de Leticia. Editorial Equilátero. **2004**, Vol. 1, pp.18.

MARÍN, J, y CÉSPEDES, C. Volatile compounds from plants. Origin, emission, effects, analysis and agro applications. *Fitotecnia Mexicana*. **2007**, Vol. 30, pp. 327.

MARTIN, K y MADASSERY, J. Rapid *in vitro* propagation of *Dendrobium* hybrids through direct shoot formation from foliar explants, and protocorm-like bodies. *Scientia Horticulturae*. **2000**, Vol. 108, pp. 95-99.

MILLAR, J y SIMS, J. Preparation, clean-up and preliminary fractionation of extracts. *Methods in Chemical Ecology*. **1998**, Vol. 1, pp. 1-37.

MILLS, G, y WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *Journal of Chromatography A*. **2000**, Vol. 1, pp. 267-287.

MINORU, I, et al. A new biologically active phenolic from *Cattleya trianaei*. *Phytochemistry*. **1979**, Vol. 18, pp. 1211-1213.

MOHD-HAIRUL, R, et al. Terpenoid, Benzenoid, and Phenylpropanoid Compounds in the Floral Scent of *Vanda Mimi* Palmer. *Journal of Plants and Biology*. **2010**, Vol. 53, pp. 358–366.

MORALES-VALLE, H, et al. Microextraction and gas chromatography/mass spectrometry for improved analysis of geosmin and other fungal “off” volátiles en grapes juice. *Journal of Microbiological Methods*. **2010**, Vol. 83, pp. 48-52.

MUSTEATA, F, y PAWLISZYN, J. *In vivo* sampling with solid phase microextraction. *Journal of Biochemistry and Biophysics*. 2007, Vol. 70, pp. 181-182.

NIST Standard Reference Database. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library with Search Program. Gaithersburg, MD, USA. Data Version 05. **2008**.

Parques Nacionales Naturales de Colombia. Ministerio de Ambiente, <http://www.parquesnacionales.gov.co/PNN/portel/libreria/php/decide.php?patron=01.180101>, fecha de consulta: abril 10 de 2014.

PICHERSKY, E y GERSHENZON, J. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Plant Biology*. **2002**, Vol. 5, pp. 237.

PICHERSKY, E, et al. Flower scent production in *Clarkia* (Onagraceae). Localization and developmental modulation of monoterpenes emission and linalool synthase activity. *Plant Physiology*, **1994**, Vol. 106, pp. 1533-1540.

PINO, J, et al. Volatile components from mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, Vol. 53, pp. 2213-2223.

Plantas & Jardín. Pasión por la jardinería. *Cattleya trianae*, la flor nacional de Colombia, <http://plantasyjardin.com/2013/02/cattleya-trianae-la-flor-nacional-de-colombia/>, fecha de consulta: octubre 13 de 2014.

PLITT, J. La flor y otros órganos derivados. Editorial Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. **2006**, Vol. 1, pp. 61-78.

PONTES, M, MARQUES, J y CAMARA, J. Screening of volatile composition from Portuguese multifloral honeys using headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-quadrupole mass spectrometry. *Talanta*. **2007**, Vol. 74, pp. 91-103.

PROFFIT, M, et al. Signalling receptivity: comparison of the emission of volatile compounds by figs of *Ficus hispida* before, during and after the phase of receptivity to pollinators. *Symbiosis*. **2008**, Vol.45, pp. 15–24.

RAMÍREZ, S, et al. Dating the origin of the *Orchidaceae* from a fossil orchid with its pollinator. *Nature*. **2007**, Vol.1, pp. 1042-1045.

Cienciometría, instrumentos de evaluación y crítica. *Ciencia en línea*. Universidad de Buenos Aires. **2005**, www.cienciahoy.org.ar/ln/hoy89/cienciometria.htm,_fecha de consulta: enero 30 de 2014.

RUDALL, P y BATEMAN, R. Evolutionary change in flowers and inflorescences: evidence from naturally occurring terata. *Trends in Plant Science*. **2003**, Vol. 8, pp. 76-82.

SALAZAR, S. Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo *in vitro* de plántulas de *Cattleya mendelii* Drombrain (*Orchidaceae*). *Acta Agronómica*, **2012**, Vol. 61, pp. 69-67.

SANTOS, C, ORDOÑEZ, J y MORALES, L. Colección viva de especies amenazadas, contribución del Jardín Botánico José Celestino Mutis. Jardín Botánico José Celestino Mutis. Bogotá, Colombia. **2010**, Vol. 1, pp. 20.

SHARKEY, T, CHEN, X, y YEH, S. Isoprene increases thermo tolerance of fosmidomycin-fed leaves. *Plant Physiology*. **2001**, Vol. 125, pp. 2001-2006.

SHELLIE, R, et al. Characterization of lavender essential oils by using gas chromatography-mass spectrometry with correlation of linear retention indices and comparison with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. **2002**, Vol. 1, pp. 225-234.

SNOW, N. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *Journal of Chromatography A*. **2000**, Vol. 1, pp. 445–455.

Sociedad Colombiana de Orquideología, <http://www.sco.org.co/>, fecha de consulta: mayo 17 de 2014.

SOTOMAYOR, J, et al. *Thymus zygis* subsp. *gracilis*: watering level effect on phytomass production and essential oil quality. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **2004**, Vol. 52, pp. 5418-5424.

STASHENKO, E y MARTÍNEZ, J. ¿Cuántos componentes hay en una muestra? Respuesta cromatográfica. *Scientia Chromatographica*. **2009**, Vol.1, pp. 1-24.

STASHENKO, E y MARTÍNEZ, J. Aspectos prácticos de la ionización con electrones en la obtención de espectros de masas y su interpretación. *Scientia Chromatographica*. **2009**, Vol. 1, pp. 19-36.

STASHENKO, E y MARTÍNEZ, J. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Scientia Chromatographica*. **2011**, Vol. 3, pp. 29.

STASHENKO, E y MARTÍNEZ, J. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical methods*. **2007**, Vol.1, pp. 235-242.

SZAFRANEK, B, et al. Analysis of leaf surface sesquiterpenes in potato varieties. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **2005**, Vol. 53, pp. 2817-2822.

TEIXEIRA, J, et al. Transgenic orchids. *Scientia Horticulturae*. **2009**, Vol. 130, pp. 590-598.

TSAI, W, et al. Molecular Biology of Orchid Flowers: With Emphasis on Phalaenopsis. *Advances in Botanical Research*. **2008**, Vol. 47, pp. 100-135.

TSAI, W, et al. The role of ethylene in orchid ovule development. *Plant Science*. **2008**, Vol. 175, pp. 98-145.

VALENTE, L. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. *Trends in Analytical Chemistry*. 2002, Vol. 21, pp. 428–438.

VALIM, M, ROUSEFF, R y LIN, J. Gas chromatographic-olfactometric characterization of aroma compounds in two types of cashew apple nectar. *Journal of Agricultural Food of Chemistry*. **2003**, Vol. 51, pp. 1010-1015.

WEI-LING, S, WONG, S y KINI, M. Rapid simultaneous detection of two orchid viruses using LC- and/or MALDI mass spectrometry. *Journal of Virological Methods*. **2000**, Vol. 85, pp. 93-99.

YAMAGUCHI, K y SHIBAMOTO, T. Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinensis* L. var Yabukita). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1981**, Vol. 29, pp. 366-370.

ZHAO, Z y WANG, Y, y REN, J. Temporal variation of floral scent emitted from a *Cattleya* hibrid. *Chemistry of Natural Compounds*. **2004**, Vol.4, pp, 741-743.

ANEXOS

ANEXO A. Blancos de instrumentos menores (fibras de SPME, vial ámbar, frasco de vidrio para monitoreo *in vitro* y muestreador de acrílico para flores).

Figura 1. Blanco de fibra, recubrimiento polimérico, PMDS (100 μm). GC- MSD (EI, 70 eV). Columna DB-WAX (60 m). Tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección, 15 min. Temperatura del puerto de inyección, 250°C.

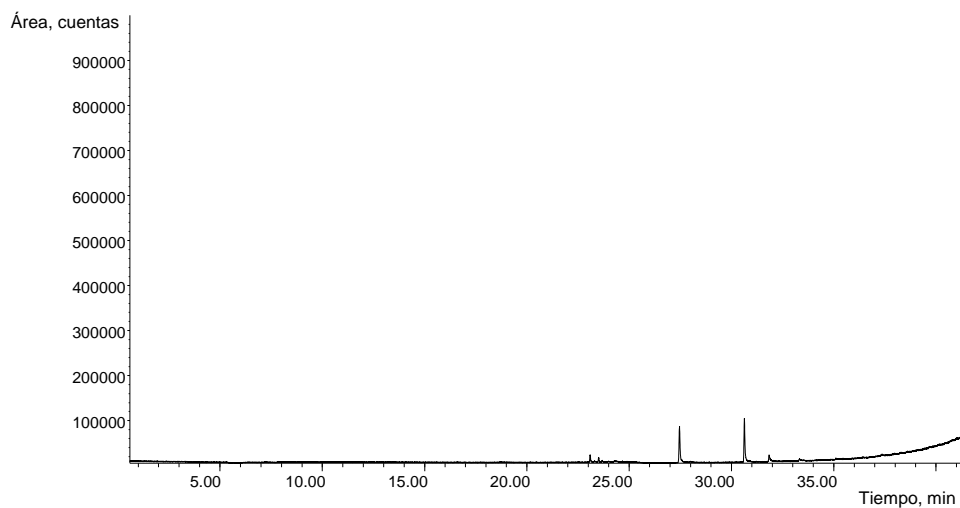


Figura 2. Blanco de fibra, recubrimiento polimérico, PMDS/DVB (65 μm). GC- MSD (EI, 70 eV). Columna DB-WAX (60 m). Tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección, 15 min. Temperatura del puerto de inyección, 250°C.

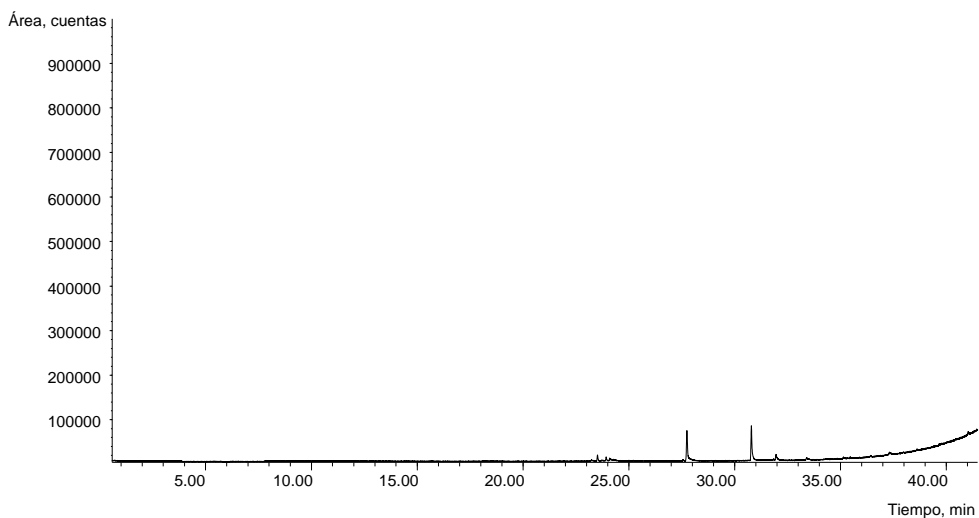


Figura 3. Blanco de fibra, recubrimiento polimérico, CAR/PMDS (85 μm). GC- MSD (EI, 70 eV). Columna DB-WAX (60 m). Tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección, 15 min. Temperatura del puerto de inyección, 250°C.

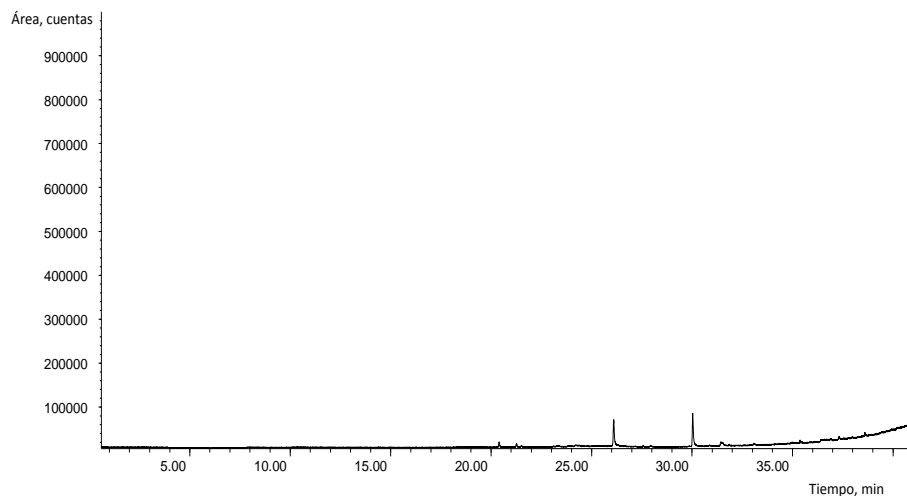


Figura 4. Blanco del vial ámbar (15 mL) para SPME, por HS-SPME *in vitro* (temperatura, 40°C, tiempo de exposición de la fibra, 30 min, recubrimiento de la fibra, PDMS/DVB), GC- MSD (EI, 70 eV). Columna DB-WAX (60 m).

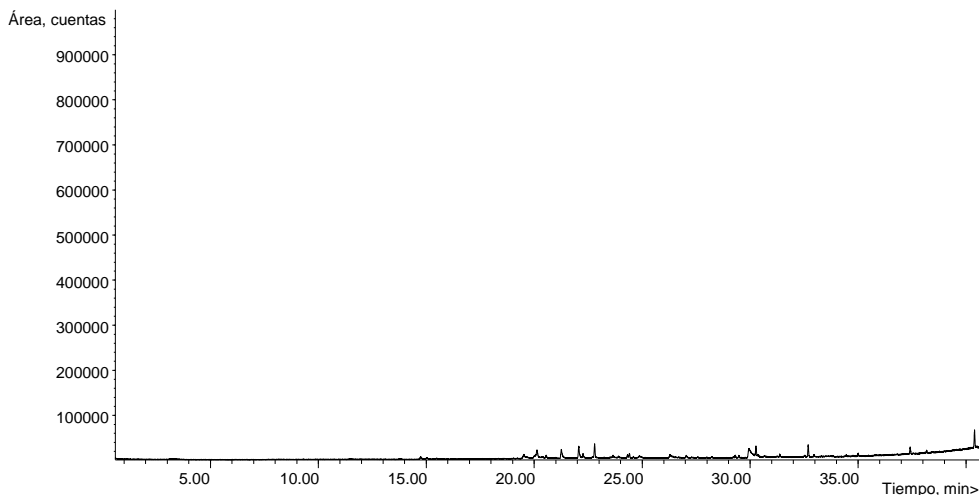


Figura 5. Blanco del frasco de vidrio para el muestreo HS-SPME *in vivo* (temperatura, 40°C, tiempo de exposición de la fibra, 30 min, recubrimiento de la fibra, PDMS/DVB) , GC- MSD (EI, 70 eV). Columna DB-WAX (60 m).

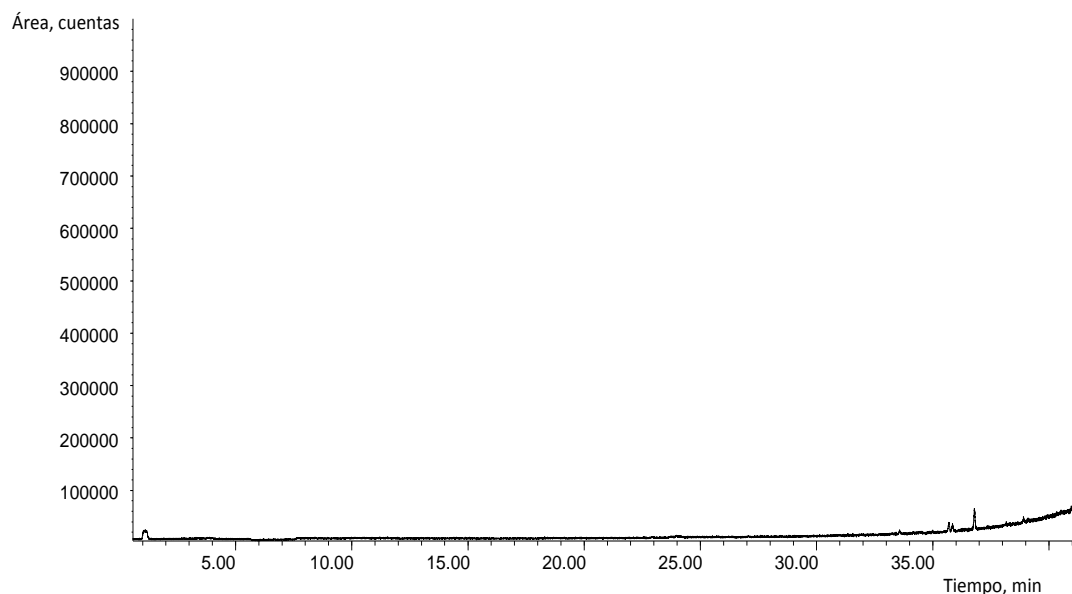
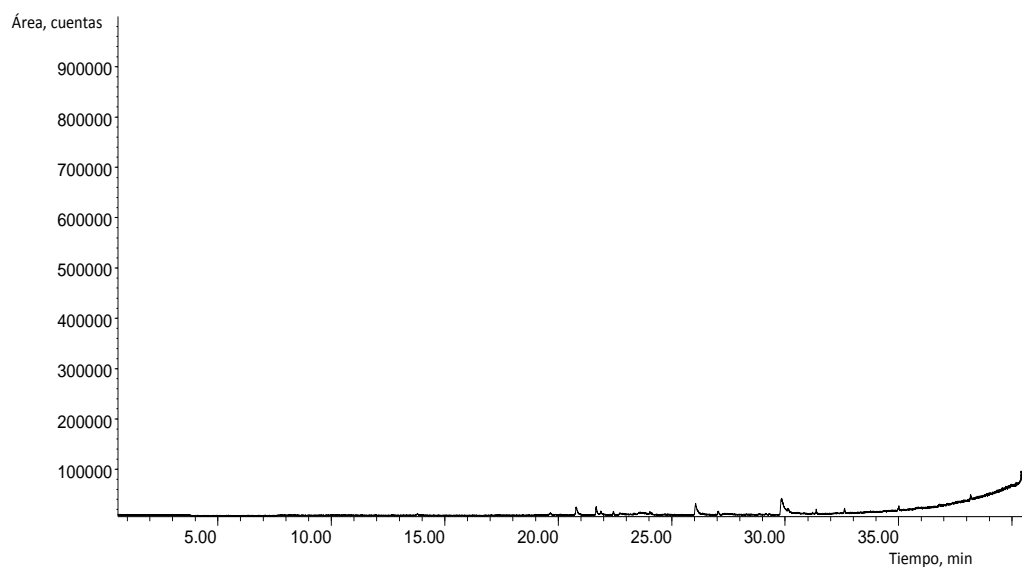


Figura 6. Blanco del muestreador de acrílico para flores, por HS-SPME *in vivo* (tiempo de exposición de la fibra, 30 min, recubrimiento de la fibra, PDMS/DVB), GC- MSD (EI, 70 eV). Columna DB-WAX (60 m).



ANEXO B. Cromatogramas obtenidos por SPME-GC-MS de la fracción volátil de las flores de *P.rubra*.

Figura 1. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *P.rubra* por HS-SPME (temperatura, 40°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

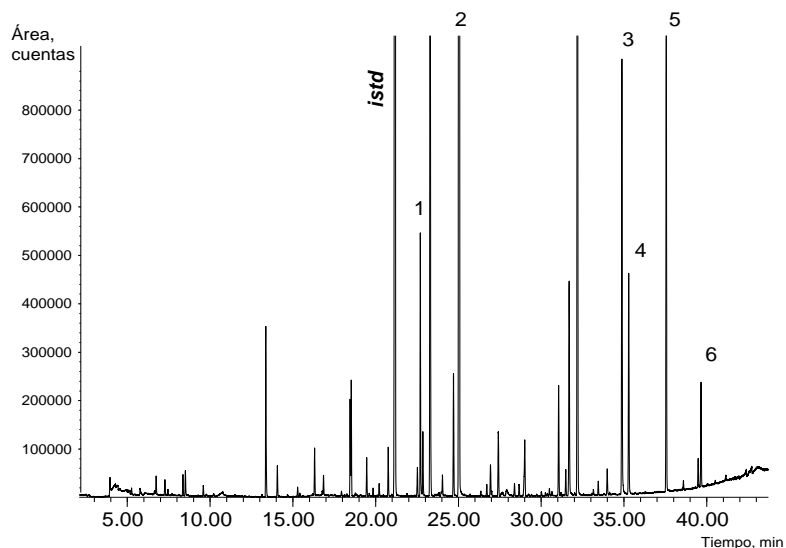


Figura 2. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *P.rubra* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

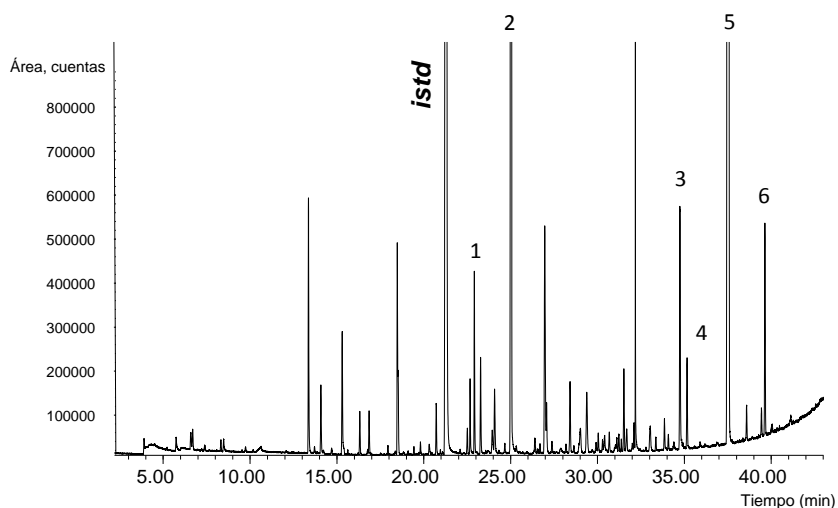


Figura 3. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *P.rubra* por HS-SPME (temperatura, 70°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.

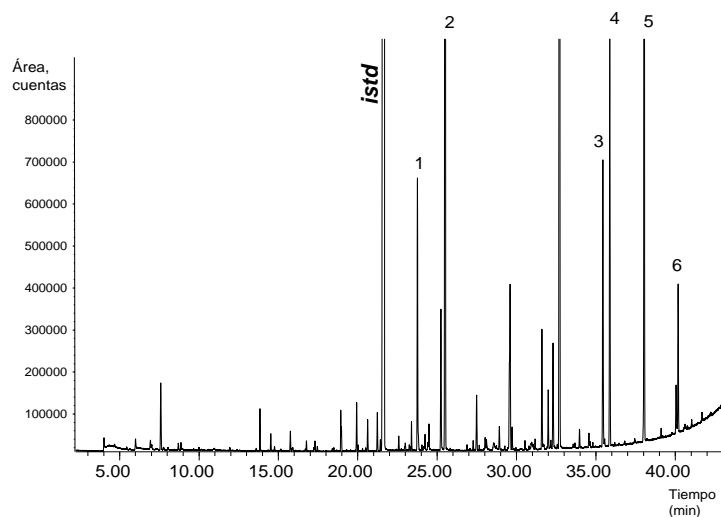
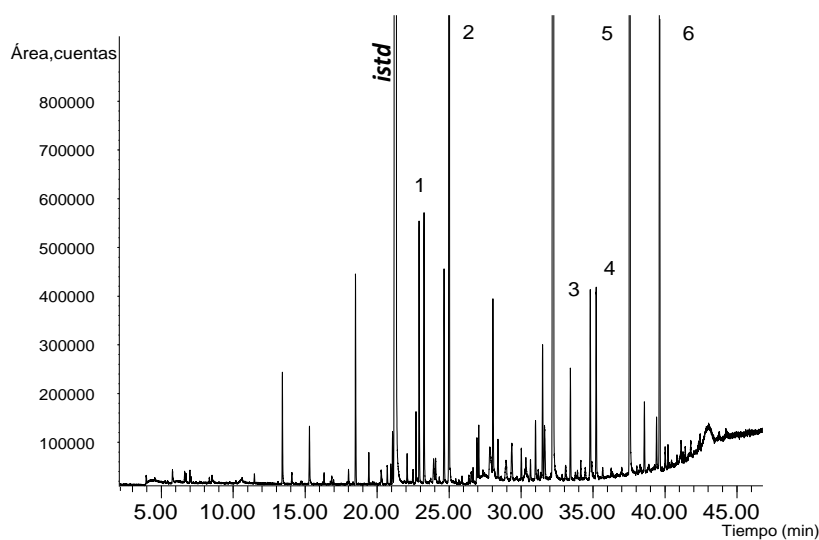


Figura 4. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *P.rubra* por HS-SPME (temperatura, 80°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 6**.



ANEXO C. Cromatogramas obtenidos por SPME-GC-MS, del monitoreo *in vitro*, de la fracción volátil de las flores *C.trianae* y *C.mendelii*, cada 4 horas durante el día, a 60°C.

Figura 1. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 7 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

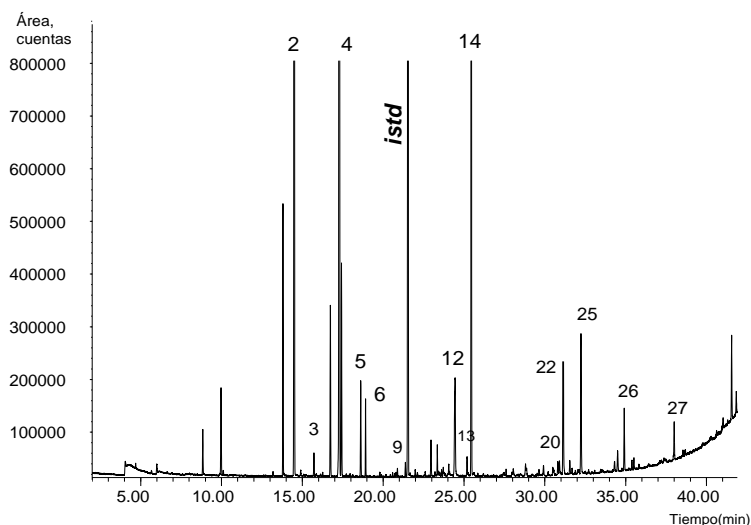


Figura 2. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

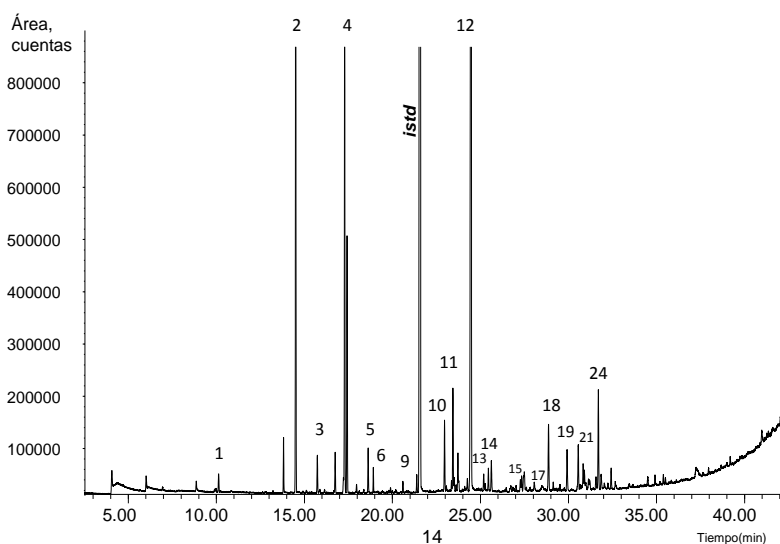


Figura 3. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 3 p.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

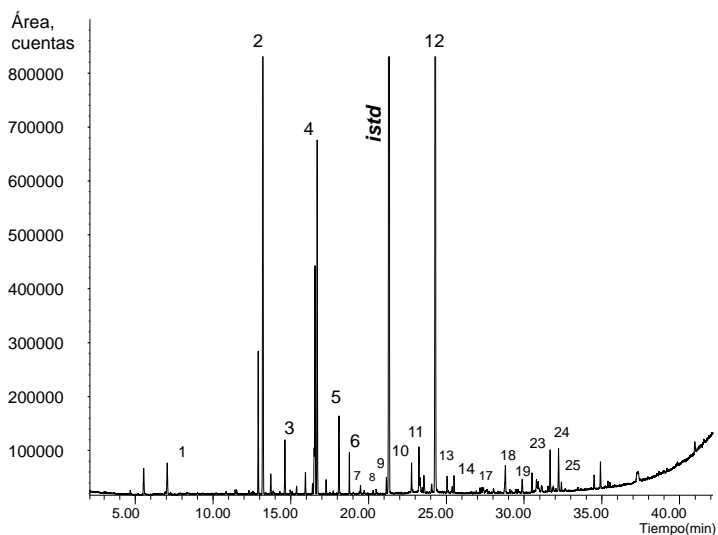


Figura 4. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 7 p.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 11**.

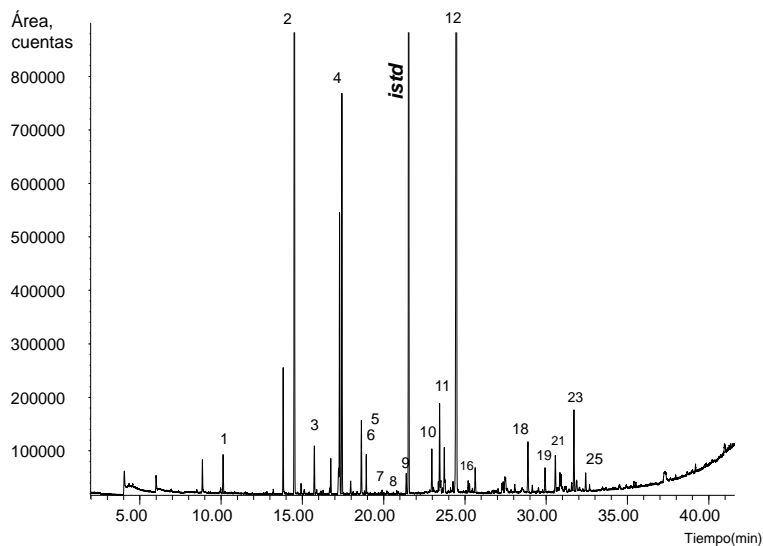


Figura 5. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 7 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**.

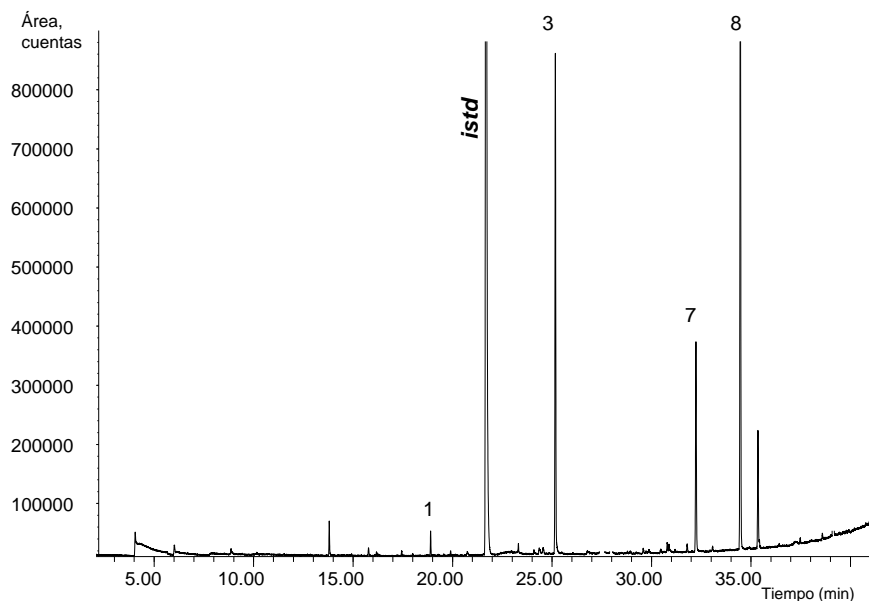


Figura 6. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 11 a.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**.

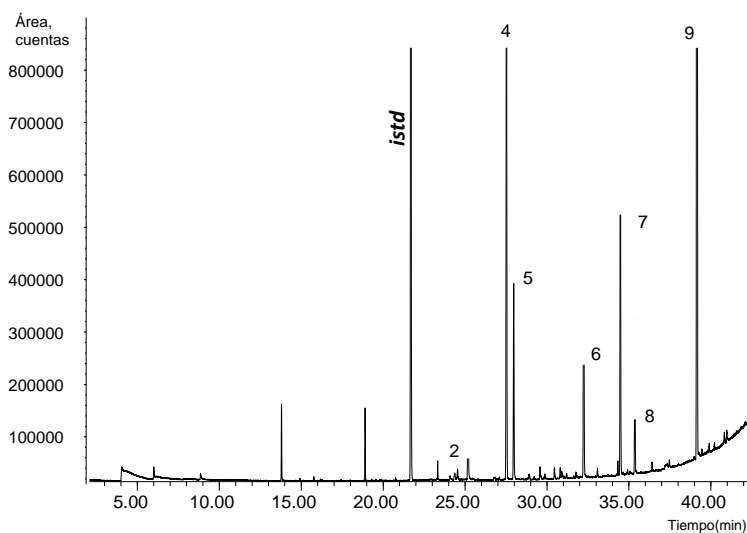


Figura 7. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 3 p.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**.

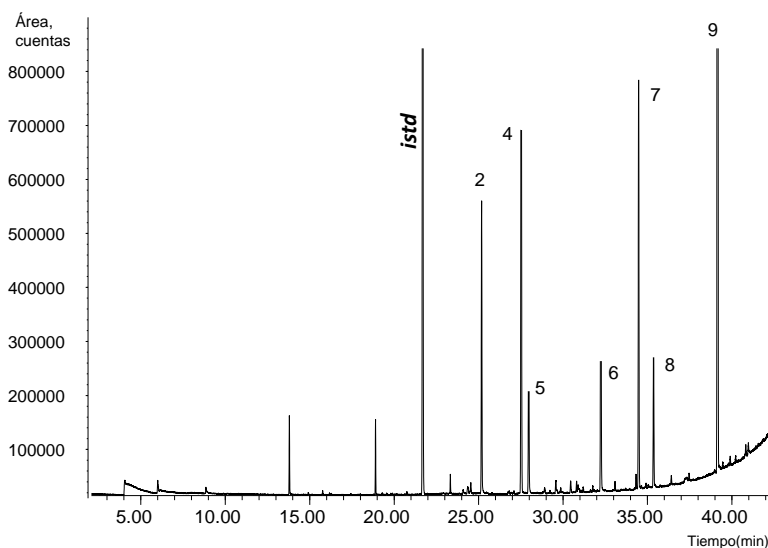
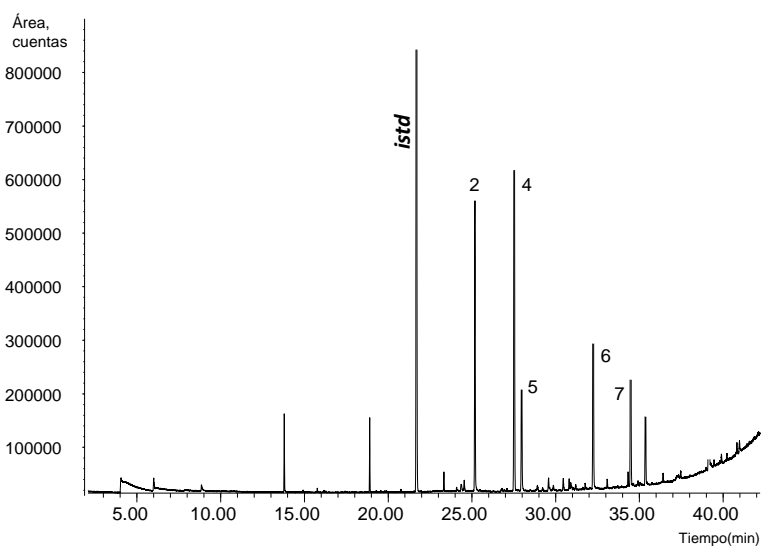


Figura 8. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME (temperatura, 60°C; tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreado a las 7 p.m. Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 12**.



ANEXO D. Cromatogramas obtenidos por SPME-GC-MS, del monitoreo *in vivo*, de la fracción volátil de las flores *C.trianae* y *C.mendelii*, cada 4 horas durante el día.

Figura1. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreo a las 7 a.m. (temperatura, 22,6°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 13**.

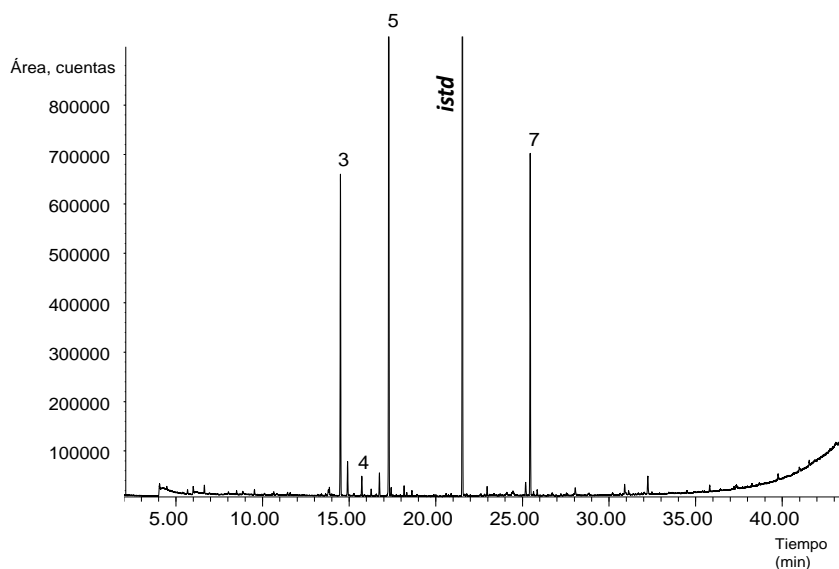


Figura 2. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreo a las 11 a.m. (temperatura, 28°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 13**.

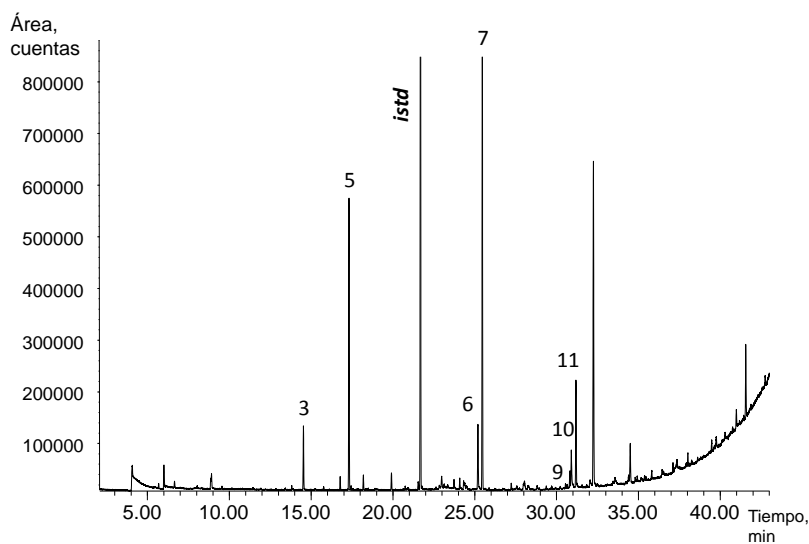


Figura 3. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m), 70 min), monitoreo a las 3 p.m. (temperatura, 26,6°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 13**.

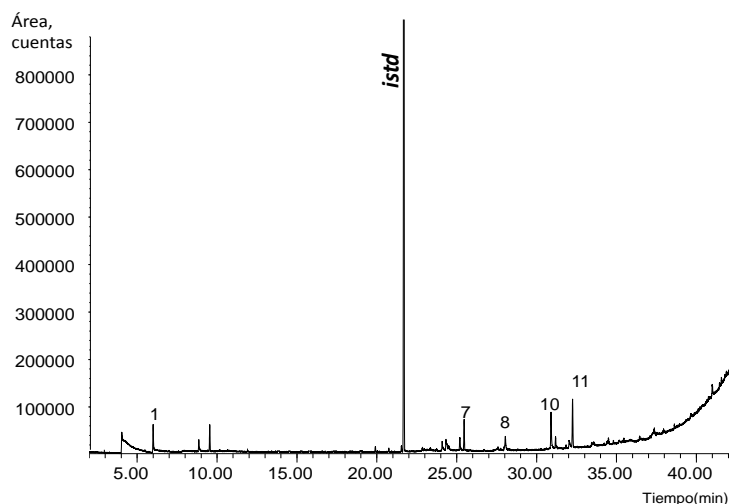


Figura 4. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.mendelii* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m), 70 min), monitoreo a las 7 p.m. (temperatura, 22°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 13**.

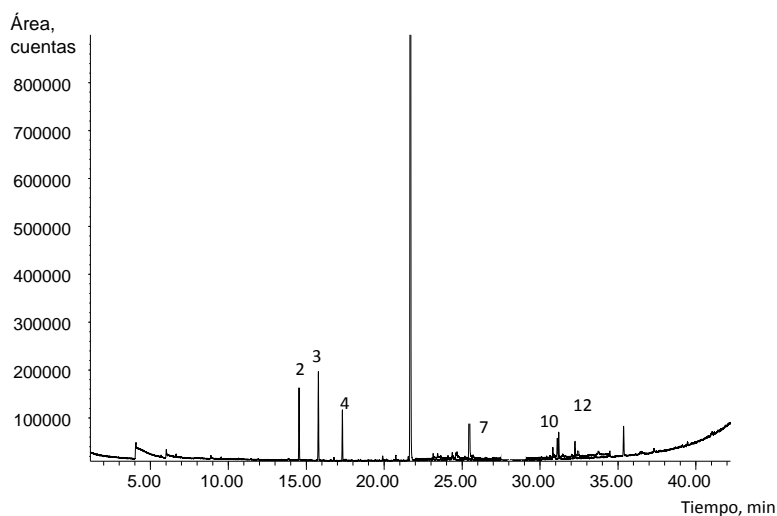


Figura 5. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreo a las 7 a.m. (temperatura, 23,3°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14**.

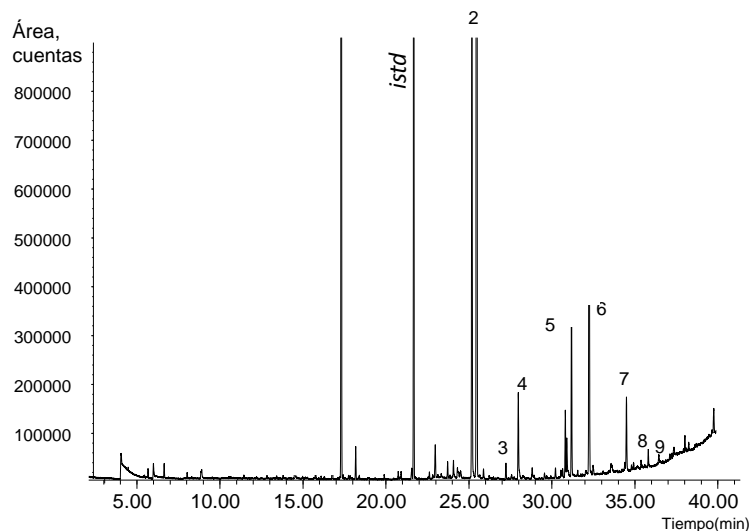


Figura 6. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 µm), 70 min), monitoreo a las 11 a.m. (temperatura, 28,2°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14**.

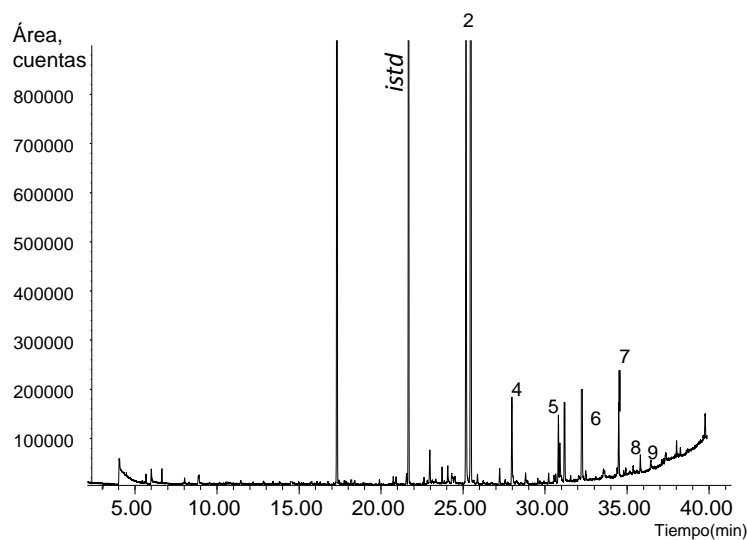


Figura 7. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m), 70 min), monitoreo a las 3 p.m. (temperatura, 26,5°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14**.

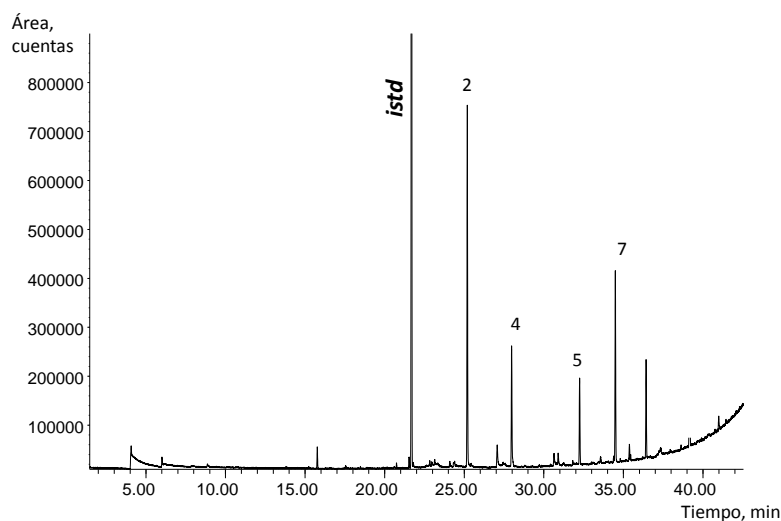


Figura 8. Perfil cromatográfico típico de los metabolitos volátiles de las flores de *C.trianae* por HS-SPME *in vivo* (tiempo de equilibrio térmico, 10 min, y tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB (65 μ m), 70 min), monitoreo a las 7 p.m. (temperatura, 23°C). Columna DB-WAX (60 m). MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos aparece en la **Tabla 14**.

