

**ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA FEROMONA SEXUAL DE LA MOSCA  
DE LA PIÑA *Melanoloma viatrix* Y LOS POSIBLES SEMIOQUÍMICOS  
INVOLUCRADOS EN LA RELACIÓN PLANTA INSECTO.**

**JULIE PAULÍN GARCÍA RODRÍGUEZ  
DEYBER ARLEY VARGAS MEDINA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2010**

**ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA FEROMONA SEXUAL DE LA MOSCA  
DE LA PIÑA *Melanoloma viatrix* Y LOS POSIBLES SEMIOQUÍMICOS  
INVOLUCRADOS EN LA RELACIÓN PLANTA INSECTO.**

**JULIE PAULÍN GARCÍA RODRÍGUEZ  
DEYBER ARLEY VARGAS MEDINA**

**Trabajo de grado presentado como requisito  
para optar al título de Químico**

**Directora: ELENA E. STASHENKO,  
Química, Ph.D.**

**Co-director: ALFONSO VILLALOBOS,  
Biólogo**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2010**

## TABLA DE CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCIÓN	17
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.	19
1.1 LA PIÑA ( <i>Ananas comosus</i> ).	19
1.1.1 Generalidades	19
1.1.2 Taxonomía	19
1.1.3 Cultivo de piña.	20
1.1.4 Caracterización química de la piña.	21
1.1.5 Maduración y <i>flavor</i> de la piña.	21
1.2. <i>MELANOLOMA VIATRIX</i> (Díptera: <i>Richardiidae</i> ): Nuevo insecto perjudicial en los cultivos de piña.	23
1.2.1 Biología y descripción del insecto.	24
1.2.1.1 Ciclo de vida de <i>M. viatrix</i> .	26
1.2.2 Aspectos sexuales de la familia <i>Richardiidae</i> .	27
1.3 FEROMONAS SEXUALES: UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA EL CONTROL DE INSECTOS PERJUDICIALES.	28
1.3.1 Feromonas en <i>Dípteros</i> .	31
1.3.2 Técnicas para el estudio de feromonas.	32
1.3.2.1 Extracción de feromonas.	33
1.3.2.2 Análisis cromatográfico de feromonas.	38
1.3.2.3 Detección y elucidación estructural de feromonas.	39
1.4 PERFIL LIPÍDICO: POSIBLES PERCUSORES EN LA BIOSÍNTESIS DE FEROMONAS.	45
2. PARTE EXPERIMENTAL.	46
2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO.	46
2.2 ANÁLISIS DE LAS EMISIONES VOLÁTILES DE LA MOSCA DE LA PIÑA, <i>Melanoloma viatrix</i> .	47
2.2.1 Obtención de ejemplares de la mosca.	47

2.2.2 Observaciones preliminares.	49
2.2.3 Monitoreo de volátiles de insectos adultos de <i>M. viatrix</i> .	50
2.2.4 Extracción y cuantificación de ácidos grasos.	51
2.2.4.1 Extracción de grasa.	51
2.2.4.2 Conversión de los ácidos grasos a sus ésteres metílicos.	52
2.2.4.3 Identificación de los ácidos grasos.	52
2.2.4.4 Cuantificación de ácidos grasos.	52
2.3 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS VOLÁTILES DEL FRUTO DE LA PIÑA ( <i>Ananas comosus</i> ), EN FUNCIÓN DE SU PROCESO DE MADURACIÓN.	53
2.3.1 Recolección de las muestras.	53
2.3.2 Microextracción en fase sólida en el modo <i>headspace</i> .	53
2.3.3 Selección de la temperatura y tiempo de extracción.	53
2.3.4 Análisis de los volátiles de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) por GC–MS.	54
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	55
3.1 EMISIONES VOLÁTILES DE LA MOSCA DE LA PIÑA, <i>M. viatrix</i> .	55
3.1.1 Obtención de ejemplares.	55
3.1.2 Observaciones preliminares.	56
3.1.3 Monitoreo de volátiles de insectos adultos de <i>M. viatrix</i> .	57
3.1.4 Perfil de ácidos grasos.	63
3.2 VARIACIÓN DE LOS VOLÁTILES PRESENTES EN LOS FRUTOS DE PIÑA ( <i>Ananas comosus</i> ).	67
3.2.1 Determinación de las condiciones de extracción.	67
3.2.2 Análisis de volátiles de muestras de piña de tres edades.	71
CONCLUSIONES	81
RECOMENDACIONES	82
ANEXOS	83
BIBLIOGRAFÍA	85

## ACRÓNIMOS Y SIGLAS

d.i.	Diámetro interno de la columna
EAG	<i>Electroantennography</i> (Electroantenografía)
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones)
eV	Electronvoltio(s)
FA	<i>Fatty Acid</i> [Ácido(s) graso(s)]
FAME's	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i> (Ésteres metílicos de ácidos grasos)
f.e.	Espesor de la fase estacionaria
FID	<i>Flame Ionization Detector</i> (Detector de ionización en llama)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases)
GC-FTIR	<i>Gas Chromatography-Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier)
GC-MS	<i>Gas Chromatography – Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases – espectrometría de masas)
Ha	Hectárea
HP-5	Columna <i>Hewlett-Packard</i> , 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano)
HRGC-MSD	<i>High Resolution Gas Chromatography – Mass Selective Detector</i> (Cromatografía de gases capilar con detector selectivo de masas)
HS-SPME	<i>Headspace Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en modo <i>headspace</i> )
ICA	Instituto Colombiano Agropecuario
<i>M. viatrix</i>	<i>Melanoloma viatrix</i> (Mosca de la piña)
min	Minutos
mL	Mililitro
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i> (Detector selectivo de nitrógeno y fósforo)

PDMS	Poli(dimetilsiloxano)
PDMS–DVB	Poli(dimetilsiloxano)–divinilbenceno
SIM	<i>Selected Ion Monitoring</i> [Monitoreo del ion(es) seleccionado(s)]
SPME	<i>Solid Phase Micro–Extraction</i> (Microextracción en fase sólida)
T	Temperatura
TCD	<i>Thermal Conductivity Detector</i> (Detector de conductividad térmica)
t° eb	Temperatura de ebullición
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención (min)

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Fenología del cultivo de la piña.	20
<b>Figura 2</b>	Dimorfismo sexual en <i>M. viatrix</i> : A. Abdomen de hembra; B. Aparato ovopositor expuesto.	24
<b>Figura 3</b>	Larvas en sus instares. Espiráculos.	25
<b>Figura 4</b>	Imago que emerge de la pupa. Vistas ventral y dorsal. Pupas.	26
<b>Figura 5</b>	Ciclo de vida de <i>M. viatrix</i> .	27
<b>Figura 6</b>	Montaje de condensación para la recuperación de feromonas volátiles.	35
<b>Figura 7</b>	Representación esquemática del sistema para determinación EAG de feromonas.	43
<b>Figura 8</b>	Registro cromatográfico de volátiles de <i>C. capitata</i> , usando simultáneamente detección FID y EAG con antenas de hembra.	44
<b>Figura 9</b>	Piña madura infestada de larvas de <i>M. viatrix</i> . Daños ocasionados por las larvas.	48
<b>Figura 10</b>	Cámaras de empupamiento de larvas <i>M. viatrix</i> .	48
<b>Figura 11</b>	Jaulas de cría en el laboratorio de <i>M. viatrix</i> .	49
<b>Figura 12</b>	Muestreo <i>in vivo</i> de insectos de <i>M. viatrix</i> por medio de la técnica SPME.	50
<b>Figura 13</b>	Extracción de ácidos grasos de ejemplares machos de <i>M. viatrix</i> .	51
<b>Figura 14</b>	Moscas copulando el día 12 después de haber emergido de la pupa.	57
<b>Figura 15</b>	Cromatograma obtenido al muestrear <i>in vivo</i> , ejemplares machos de <i>M. viatrix</i> por medio de la técnica SPME.	58
<b>Figura 16</b>	Espectro de masas del compuesto emitido por los machos de <i>M. viatrix</i> .	59
<b>Figura 17</b>	Perfil cromatográfico de FA presentes en hembras de la mosca <i>M. viatrix</i> .	64

<b>Figura 18</b>	Perfil cromatográfico de FA presentes en machos de la mosca <i>M. viatrix</i> .	65
<b>Figura 19</b>	Comparación del contenido de ácidos grasos, por sexo en <i>M. viatrix</i> .	66
<b>Figura 20</b>	Efecto de la temperatura (°C) y tiempo de exposición (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME de la pulpa y cáscara de la piña madura.	68
<b>Figura 21</b>	Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME de la pulpa y cáscara de la piña madura, a 60°C.	69
<b>Figura 22</b>	Efecto de la temperatura (°C) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME de la pulpa y cáscara de la piña madura, durante 30 min de exposición del recubrimiento.	70
<b>Figura 23</b>	Perfil cromatográfico de los volátiles aislados por HS-SPME de la piña en estado de floración.	73
<b>Figura 24</b>	Perfil cromatográfico de los volátiles aislados por HS-SPME de la piña en estado de post-floración.	74
<b>Figura 25</b>	Perfil cromatográfico de los volátiles aislados por HS-SPME de la piña madura.	75
<b>Figura 26</b>	Espectro de masas (EI, 70 eV) del octanoato de etilo.	78
<b>Figura 27</b>	Espectro de masas (EI, 70 eV) del 3-metiltiopropanoato de etilo.	78
<b>Figura 28</b>	Esquema de la formación de algunos fragmentos del octanoato de etilo.	79
<b>Figura 29</b>	Esquema de la formación de algunos fragmentos del 3-metiltiopropanoato de etilo.	80

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<b>Tabla 1</b>	Composición nutrimental de la piña.	21
<b>Tabla 2</b>	Compuestos responsables del olor en la piña madura.	23
<b>Tabla 3</b>	Ejemplos de extracción con solvente de feromonas en Dípteros	34
<b>Tabla 4</b>	Fases estacionarias empleadas para la separación de feromonas.	38
<b>Tabla 5</b>	Algunas microrreacciones de uso frecuente en la elucidación estructural de feromonas.	41
<b>Tabla 6</b>	Casas distribuidoras y grado de pureza de sustancias químicas utilizadas en este proyecto.	46
<b>Tabla 7</b>	Resultados de los ensayos realizados para la obtención de ejemplares adultos de <i>M. viatrix</i> .	55
<b>Tabla 8</b>	Espectro de masas (EI, 70 eV). Se presentan las intensidades relativas (>1%).	60
<b>Tabla 9</b>	Fragmentos típicos para los valores de <i>m/z</i> del espectro de masas del compuesto emitido por la mosca <i>M. viatrix</i> .	63
<b>Tabla 10</b>	Cantidad relativa (%) de ácidos grasos de los insectos de <i>M. viatrix</i> . Datos para ambos sexos.	66
<b>Tabla 11</b>	Composición de la fracción volátil de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) var. perolera en estado de floración. Los analitos fueron extraídos por medio de la técnica HS-SPME.	73
<b>Tabla 12</b>	Composición de la fracción volátil de la piña ( <i>Ananas comosus</i> ) var. perolera en estado de post-floración. Los analitos fueron extraídos por medio de la técnica HS-SPME.	74
<b>Tabla 13</b>	Composición de la fracción volátil de la piña madura ( <i>Ananas comosus</i> ) var. perolera. Los analitos fueron extraídos por medio de la técnica HS-SPME.	75

## LISTA DE ANEXOS

		<b>Pág.</b>
<b>Anexo 1</b>	Perfil cromatográfico del blanco de la fibra expuesta al vial, obtenido por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 µm). Condiciones cromatográficas: columna DB-5 (30 m). Inyección manual en modo <i>splitless</i> . Detector MS (EI, 70 eV).	83
<b>Anexo 2</b>	Perfil cromatográfico de las emisiones volátiles de las hembras de <i>M. viatrix</i> , obtenido por HS-SPME (PDMS/DVB, 65 µm). Condiciones cromatográficas: columna DB-5 (30 m). Inyección manual en modo <i>splitless</i> . Detector MS (EI, 70 eV).	84

## RESUMEN

**TÍTULO: ESTUDIOS PRELIMINARES SOBRE LA FEROMONA SEXUAL DE LA MOSCA DE LA PIÑA *Melanoloma viatrix* Y LOS POSIBLES SEMIOQUÍMICOS INVOLUCRADOS EN LA RELACIÓN PLANTA INSECTO.**

**Autores:** Julie Paulín García Rodríguez, Deyber Arley Vargas Medina

**Palabras Claves:** *Melanoloma viatrix*, feromonas, semioquímicos, piña (*ananas comosus*), SPME, GC.

*Melanoloma viatrix*, mejor conocida como la mosca de la piña, es un insecto de la familia *Ricardiidae*, es considerada como plaga de éste cultivo, con una incidencia de tal magnitud, que ha ocasionado pérdidas de hasta el 95% de la producción total en el municipio de Lebrija, Santander.

Los semioquímicos son sustancias involucradas en los procesos de comunicación química entre los diferentes organismos, entre los que se destacan dos tipos: las feromonas y los aleloquímicos. El estudio de los semioquímicos resulta de gran importancia, debido al amplio uso de éstos en el manejo de insectos perjudiciales en cultivos comerciales. Las feromonas han demostrado ser altamente específicas y de menor impacto ambiental que los insecticidas comerciales.

La microextracción en fase sólida, SPME, como técnica de preparación y concentración de la muestra libre de solvente, ha resultado de gran utilidad en el estudio y análisis de semioquímicos de insectos y plantas, ya que permite el estudio *in vivo* de los mismo, incluso en su habitat natural.

El muestreo de los volátiles de la mosca *M. viatrix*, se realizó en modo *headspace*, usando como recubrimiento de la fibra PDMS. DVB de 65  $\mu\text{m}$ . Se propone como posibles fórmulas moleculares de la feromona sexual de la mosca de la piña *M. viatrix*,  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$  y  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ .

El estudio de los componentes volátiles de la piña (*ananas comosus*), se llevó a cabo haciendo uso de la técnica SPME en modo *headspace*; los parámetros de extracción fueron 15 min de extracción a 60°C. Se determinaron 18 compuestos para la piña madura (edad: 640 días), 10 compuestos para la piña de 520 días y 10 compuestos para la piña de 490 días.

\* Trabajo de grado

\*\* Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko. Co-director: Alfonso Villalobos

## ABSTRACT

**TITLE: PRELIMINARY STUDIES ON SEX PHEROMONES THE PINEAPPLE FLY'S, *Melanoloma Viatrix*, AND POSSIBLE SEMIOCHEMICALS INVOLVED RELATIONSHIP IN PLANT-INSECT.**

**Authors:** Julie Paulín García Rodríguez, Deyber Arley Vargas Medina. \*\*

**Keywords:** *Melanoloma viatrix*, pheromones, semiochemicals, pineapple (*ananas comosus*), SPME, GC.

The pineapple fruit borer, *Melanoloma viatrix*, is an insect which belongs to the *Ricardiidae* family. This insect has caused considerable damages over pineapple crops, for instance in the community of Lebrija, Santander this pest caused crop damages in the 95 % over the total production.

Semiochemicals, for example pheromones and allelochemicals, are substances involved in chemical communication processes between different organisms. The study of semiochemicals is very important due the wide application that these substances have in the pest management of commercial crops. Pheromones have shown not only a high specific activity but also a lower environmental impact than the commercial pesticides.

Solid phase microextraction, SPME, is a sample preparation technique that has been very useful in the semiochemicals study. This technique permits not only the analysis *in vivo* of semiochemicals, but also in the natural habitat of the organisms.

The sampling of volatile substances from the *M. viatrix* was developed in headspace mode, using a 65  $\mu\text{m}$  PDMS-DVB fiber coating. This work suggests that the possible molecular formulas of the insect sexual pheromone are  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}$  y  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ .

The study of the volatile components from the pineapple (*ananas comosus*) was carried out by HS-SPME technique. The used parameters were: 15 minutes of extraction at 60°C. Finally, there were found 18 volatile compounds in the mature pineapple (640 days), 10 volatile compounds in the 520 days pineapple and 10 compounds in the 490 days pineapple.

\* Undergraduate project.

\*\* Industrial University of Santander. Faculty of Science. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko. Co-director: Alfonso Villalobos

## INTRODUCCIÓN

En el mundo se comercializan actualmente alrededor de 18.2 millones de toneladas de piña anuales. Los principales productores son Tailandia, Brasil y Filipinas. Colombia ocupa el lugar 12 con un volumen anual aproximado de 0.4 millones de toneladas, equivalentes al 2.3% de la producción mundial [1]. Esto hace de la piña un importante fruto comercial de la economía colombiana, y especialmente, del Departamento de Santander, que contribuye con más de la mitad de la producción nacional.

Durante el 2008 se produjeron en el país 387.751 toneladas de piña, donde el Departamento de Santander aportó el 50.42%, seguido por los Departamentos de Valle del Cauca y Norte de Santander, que participaron con el 19.18 y 3.36%, respectivamente [2]. Hacia el mes de octubre de 2009, en Colombia, las exportaciones de piña ascendieron a 123.11 toneladas, lo que equivale a un valor de US\$ 220.641.

En Santander, los cultivos de piña se concentran principalmente en los municipios de Lebrija, Girón y Los Santos, que proporcionan el 66.6, 31.1 y 2.0% de la producción departamental, respectivamente. El municipio de Lebrija es el principal productor nacional de piña, aporta anualmente cerca de 161.000 toneladas [3], de forma tal, que la mayor parte de la actividad agrícola municipal está estrechamente relacionada con este cultivo y su comercialización. Alrededor del 45% del área total del municipio se encuentra plantada en piña [4].

La piña es una fruta susceptible al ataque de plagas y enfermedades; para ésta, se hallan registradas más de diez afecciones a controlar. Adicional a las complicaciones del cultivo tradicionalmente conocidas, hacia principios de la década de los 90, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), reportó la aparición de la *Melanoloma viatrix*, comúnmente conocida como la mosca de la piña, un nuevo insecto perjudicial para este cultivo, con una incidencia de tal magnitud, que para el año de 1994 las pérdidas

ocasionadas por el ataque de *M. viatrix* al fruto, en el municipio de Lebrija, alcanzaron el 95% [4].

Hasta el momento no se ha reportado un método efectivo para controlar la incidencia de la mosca de la piña de forma específica. El ICA ha sugerido el embolsado del fruto, como método de control que mostró excelentes resultados; sin embargo, la aplicación de esta técnica favorece la aparición de otros agentes patógenos, especialmente, hongos. Adicionalmente, la implementación de este método de control ocasiona un incremento de alrededor del 7.5 % de los costos [4].

A partir del descubrimiento de la feromona sexual de *Bombix mori* (mariposa del gusano de la seda) en 1954, los semioquímicos, especialmente las feromonas, se han utilizado ampliamente para el control etológico de insectos; esto como respuesta a los problemas de degradación ambiental y generación de resistencia, ocasionados por los métodos tradicionales de control químico. Se lograron resultados favorables, por ejemplo, en los Estados Unidos, al tratar 40.000 Ha de cultivo de algodón en California y Arizona, con feromona sexual de *P. gossypiella*, que permitió reducir la tasa de apareamiento de la polilla y obtener solamente un 5% de daño de los cultivos, con respecto a otras plantaciones tratadas convencionalmente, que presentaron un daño del 30% [5].

Dado que, de acuerdo con lo reportado por el ICA, los intentos de control químico de *M. viatrix* en cultivos de piña, han mostrado una eficiencia solamente del 30% [6], el presente estudio busca obtener información sobre la composición química de la feromona sexual de la mosca de la piña, así como los posibles semioquímicos, posiblemente provenientes de la piña, involucrados en la relación “planta-insecto”, con miras a posibilitar alternativas que permitan a futuro el control etológico del insecto, de forma económica y con el impacto ambiental negativo mínimo.

## 1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 1.1 LA PIÑA (*Ananas comosus*)

**1.1.1 Generalidades.** La piña es una planta terrestre, de hojas alargadas y lanceoladas, que al cabo de dos años, desarrolla el pedúnculo floral que madura para convertirse en el fruto múltiple característico. Junto a la parte inferior de las hojas de la planta, pueden surgir rosetas basales que permiten la reproducción vegetativa de la planta. Desarrolla flores color lila, de tres pétalos, que crecen en las axilas de unas brácteas apuntadas, de ovario hipógino. Son numerosas y se agrupan en inflorescencias, con espigas de unos 30 cm de longitud y de tallo engrosado. Las flores dan fruto sin necesidad de fecundación; del ovario hipógino, se desarrollan frutos en forma de baya, que conjuntamente con el eje de la inflorescencia y las brácteas, dan lugar a una infrutescencia carnosa (sincarpio). En la superficie de la infrutescencia se ven únicamente las cubiertas cuadradas y aplanadas de los frutos individuales.

Se conocen tres variedades botánicas de la piña: *A. sativus* (sin semillas), *A. comosus* (forma semillas capaces de germinar) y *A. lucidus* (permite una recolección más fácil porque sus hojas no poseen espinas). De igual forma, comercialmente se conocen las variedades *Golden*, *Cayena lisa*, *Perolera*, *Manzana* e *India*.

La piña es originaria de la América tropical; sin embargo, la variedad *Cayena lisa*, la más comercializada en el mercado mundial, es producto del mejoramiento genético realizado por los franceses a mediados de 1800 [7].

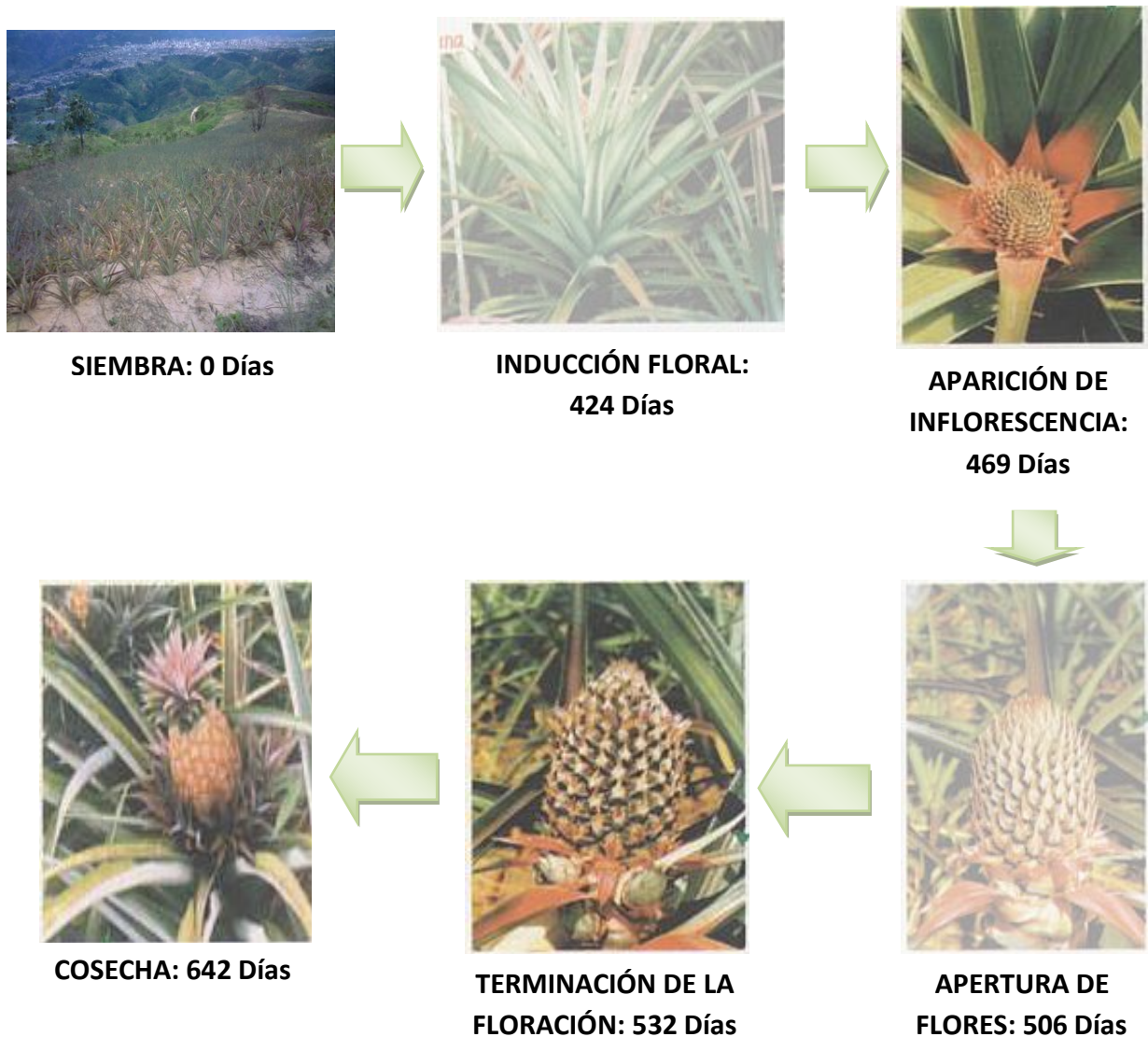
### 1.1.2 Taxonomía

Familia: *Bromeliaceae*

Género: *Ananas*

Especie: *comosus*

**1.1.3 El cultivo de la piña.** El cultivo se desarrolla a una temperatura ambiental entre los 25 y 32°C, y bajo un régimen de precipitaciones regular, comprendido entre los 1.000 y 1.500 mm. Su cultivo y producción están limitados a las zonas tropicales y subtropicales del planeta. Generalmente, su reproducción se hace de forma vegetativa, y la densidad de siembra puede variar de una región a otra, especialmente, dependiendo del destino de la producción, la variedad sembrada, la topografía del terreno y las costumbres de la zona, de forma tal, que se pueden hallar entre 25.000 y 75.000 plantas por hectárea. Una vez iniciada la siembra, la primera cosecha puede tardar de 19 a 22 meses (**Figura 1**).



**Figura 1.** Fenología del cultivo de la piña [6].

**1.1.4 Caracterización química de la piña.** La mayor parte del peso de la piña madura está constituido por agua (alrededor del 86%); sin embargo, la piña es una fruta rica en carbohidratos, lípidos, carotenos, algunos elementos menores, así como algunas vitaminas, tal como se muestra en la **Tabla 1**. Igualmente, se encuentra gran cantidad de ésteres, lactosas, alcoholes y compuestos carbonílicos, presuntamente, responsables de sus características organolépticas.

**Tabla 1.** Composición nutrimental de la piña [8].

Componente	Cantidad/100 g de piña fresca
Agua	86 g
Proteína	1 g
Carbohidratos	8 g
Lípidos	0.1 g
Fibra dietaria	2 g
Sodio	2 mg
Potasio	180 mg
Calcio	27 mg
Magnesio	11 mg
Hierro	3 mg
Zinc	2 mg
β-Caroteno	25 µg
Tiamina	40 µg
Riboflavina	30 µg
Ácido nicótico	0.1 mg
Vitamina C	21 mg

**1.1.5 Maduración y *flavor* de la piña.** La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS), ha permitido que los compuestos volátiles, posibles responsables del olor de la piña, hayan sido ampliamente estudiados, de forma tal, que se

han reportado alrededor de 280 compuestos presentes en los extractos de piña madura, incluyendo ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas, así como monoterpenos y sesquiterpenos; de igual forma, el empleo de cromatografía en fase quiral ha permitido resolver y reconocer isómeros ópticos presentes en la piña, de los cuales solo unos pocos han sido considerados como contribuyentes al *flavor* (aroma y sabor) de la piña [9].

Diversas técnicas han sido empleadas para extraer, reconocer o identificar los volátiles constituyentes del olor de la piña. Shibamoto y colaboradores [10] utilizaron un sistema líquido-líquido continuo, para extraer con diclorometano una infusión acuosa obtenida luego de centrifugar, filtrar y destilar una mezcla, previamente homogeneizada, de trozos de piña y solución acuosa saturada con NaCl; los autores lograron identificar por cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HRGC-MS) 144 compuestos en extractos de piña madura y 127 en extractos de piña verde, 80% de los cuales correspondían a ésteres; los constituyentes principales fueron acetato de etilo y 3-tiopropanoato de metilo en las muestras de piña verde y, acetato de etilo y los diasterómeros de diacetato de butan-2,3-diilo, como los principales volátiles presentes en los extractos de piña madura.

Investigadores de la Universidad de Würzburg (Alemania) mediante extracción continua líquido-líquido, por 48 h a 30 °C con una mezcla de pentano y diclorometano, lograron aislar los volátiles de jugo de piña fresca madura y productos comerciales de piña, identificaron alrededor de 130 componentes en los extractos de piña fresca, corroboraron el predominio de los ésteres entre los constituyentes y reportaron 2-butanoato de metilo, 3-(metiltio)propanoato de metilo, 2,5-dimetil-4-metoxi-3(2H)-furanona y 2,5-metil-hidroxi-3(2H)-furanona como los principales constituyentes [11].

No todos los compuestos volátiles reportados hasta el momento, son considerados directos responsables del olor de la piña y, en realidad, no se podría aseverar con certeza cuáles de éstos contribuyen al *flavor* característico de esta fruta; sin embargo, de acuerdo con los estudios realizados en la Universidad de Yamanashi (Japón), se han reportado 12 componentes, como responsables directos del olor característico de la piña. Estos compuestos se encuentran relacionados en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Compuestos responsables del olor en la piña madura [12].

Compuesto	Olor característico
2 – Metilpropanoato de metilo	Afrutado – dulce
2 – Metilpropanoato de etilo	Afrutado – dulce
2 – Metilbutanoato de metilo	Afrutado – manzana
Butanoato de etilo	Afrutado
2 – Metilbutanoato de etilo	Afrutado
Octanal	Cítrico – grasas
1-(E,Z)-3,5-Undecatrieno	Piña fresca
$\beta$ – Damascenona	Afrutado – dulce
$\delta$ – Octalactona	Coco
4-Hidroxi-2,5-dimetil-3(2H)-furanona	Dulce – piña
$\delta$ – Decalactona	Dulce – coco
Vainilina	Vainilla

## 1.2 *MELANOLOMA VIATRIX* (Díptera: *Richardiidae*): NUEVO INSECTO PERJUDICIAL EN LOS CULTIVOS DE PIÑA.

Comúnmente conocida como la mosca de la piña, la *Melanoloma viatrix*, es un insecto de la familia *Richardiidae*, del orden *Díptera*, reportada como habitante de las zonas boscosas del trópico húmedo. En Colombia, se considera como insecto perjudicial del cultivo de piña desde 1992, tras su primera aparición en el Departamento de Cundinamarca [13]. A partir de allí, se reportó su presencia en los departamentos de Antioquia y Santander, así como en otros países latinoamericanos tales como Brasil, Venezuela, Ecuador y Perú.

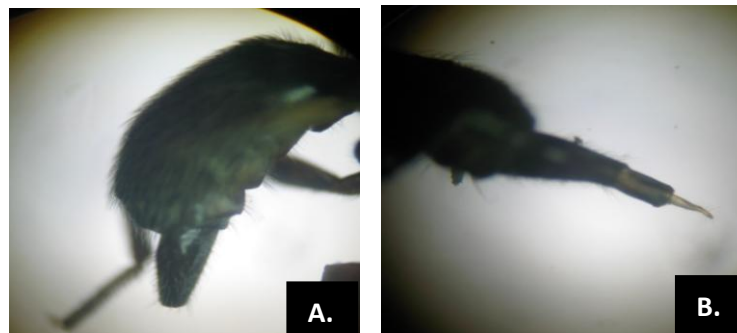
No se ha determinado cómo apareció la mosca de la piña en Colombia. Posiblemente, este insecto se encontraba “en equilibrio” con algunas especies arbóreas presentes en las zonas deforestadas para la implementación de cultivos de piña, y debido a las continuas

deforestaciones y rompimiento del equilibrio, la mosca se desplazó hacia los cultivos de piña, proliferándose de forma indiscriminada.

Se ha observado que las poblaciones del insecto disminuyen durante las épocas de verano e invierno, y se multiplican en los períodos de transición entre lluvias y sequía. Tras su aparición en el departamento de Santander, para el año de 1993 el ICA, estimaba que un 10% del área cultivada de piña, correspondiente a unas 15.000 Ha, se encontraba afectado por la mosca.

**1.2.1 Biología y descripción del insecto.** Las primeras descripciones biológicas de la mosca de la piña fueron realizadas por Arévalo y Osorio [14], quienes reportaron que el adulto llega a medir aproximadamente 6 mm de longitud y hasta 1 cm de envergadura alar. Su cuerpo es de color negro y su tórax se encuentra recubierto de micropubescencias.

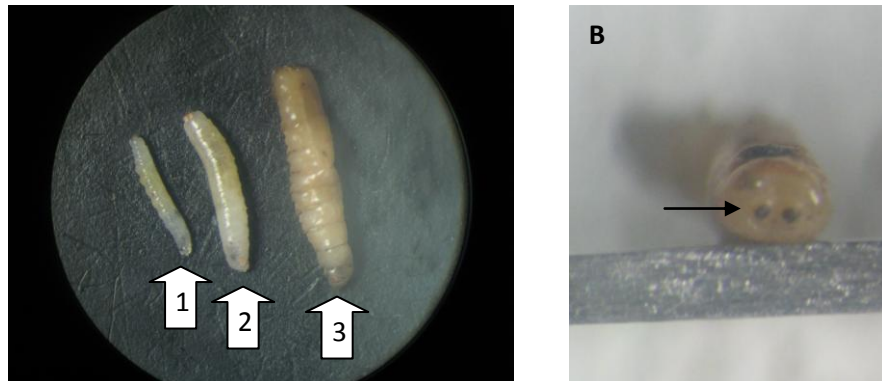
En condiciones de laboratorio, la mosca en estado adulto puede vivir hasta 45 días. El estado adulto presenta dimorfismo sexual, de forma tal que el abdomen de la hembra presenta una proyección puntiaguda en su parte inferior, correspondiente al estuche del ovopositor, lo cual permite diferenciar entre macho y hembra (**Figura 2**).



**Figura 2.** Dimorfismo sexual en *M. viatrix*. **A.** Abdomen de hembra; **B.** Aparato ovopositor expuesto. Fuente: Los autores del presente trabajo.

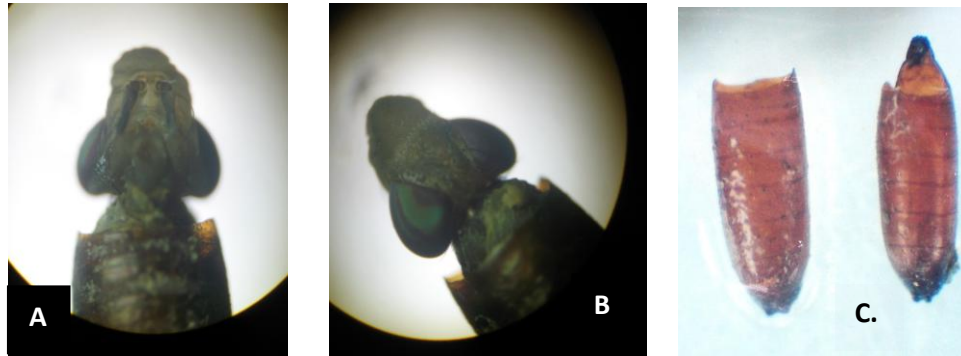
Los huevos son de color blanco, de forma alargada, pueden medir aproximadamente 1,2 mm de largo y, generalmente, son colocados en pequeños grupos.

Las larvas son vermiformes, de color amarillento, su cuerpo está formado por 11 segmentos, 3 torácicos y 8 abdominales, en su máxima madurez pueden medir hasta 9.5 mm; su aparato bucal presenta ganchos mandibulares y se reconocen fácilmente debido a la presencia de un par de espiráculos posteriores en la región caudal (**Figura 3**). Es posible encontrar larvas, principalmente, entre la cáscara y la carnosidad del fruto, siendo posible también localizarlas, en menor proporción, cerca al corazón de la piña.



**Figura 3.** A. Larvas en sus instares 1, 2 y 3, respectivamente; B. Espiráculos. Fuente: Los autores del presente trabajo.

La pupa es una cápsula cilíndrica de color rojizo, de 5 mm de diámetro y 1,8 mm de longitud (**Figura 4**). No se conocen, por el momento, los sitios de empupamiento del insecto; sin embargo, en el laboratorio, el empupado ocurre fuera del fruto, por lo cual Arévalo y Osorio [14] sugieren que al igual que ocurre con las moscas de la fruta de la superfamilia *Tephritoidea*, la larva empuje en el suelo.



**Figura 4.** Imago que emerge de la pupa. Vistas: **A.** ventral y **B.** dorsal. **C.** Pupas. Fuente: Los autores del presente trabajo

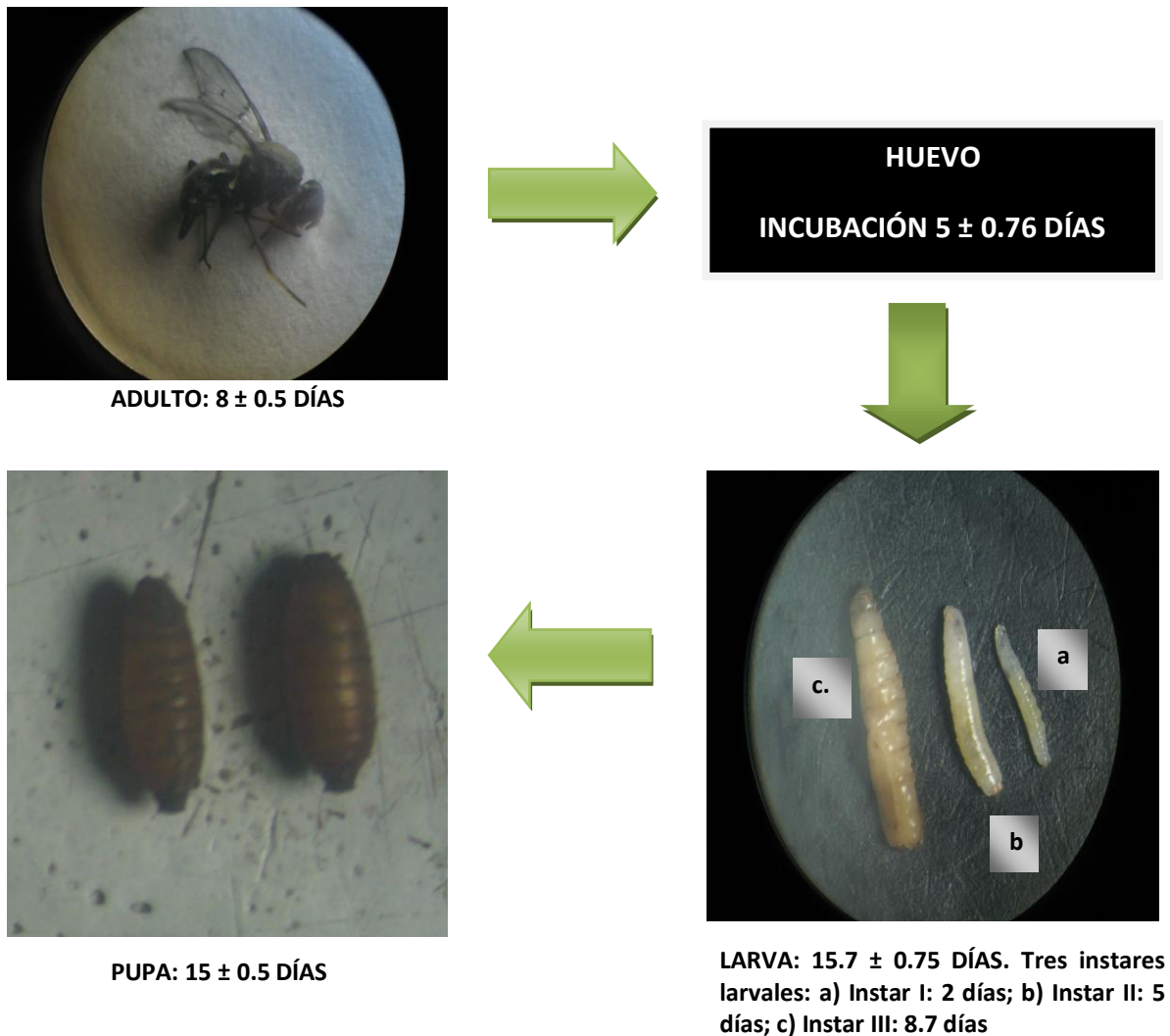
En frutos colectados, Arévalo y Osorio [14], lograron observar coriones de huevos de la mosca en la cámara floral, lo cual, cotejado con los tiempos de emergencia de adultos, más las características del ovopositor del insecto, permite a estos autores inferir que posiblemente, el insecto oviposite en el fruto durante el período de apertura de flores, que ocurre entre los días 506 y 532 del cultivo, aproximadamente. Sin embargo, no se han encontrado larvas de *M. viatrix* en frutos muestreados en el momento del cierre del último anillo floral, pero sí en frutos cosechados un mes después y en épocas posteriores, caso en el cual, se estima que los huevos serían depositados en los intersticios o uniones existentes entre los ojos de la piña [14].

En el mismo sentido, los estudios realizados por el ICA, referentes a la técnica de embolsado como alternativa de control, muestran que frutos embolsados al inicio del período de floración, registran índices del 0% de incidencia de la mosca frente a frutos no embolsados, que presentaron un 63% de daño debido al ataque de *M. viatrix*.

Hasta el momento, no se han encontrado reportes referentes al comportamiento sexual de *M. viatrix*, sus hábitos de cortejo, época, ni sobre el momento del día en el que ocurre la cópula; por lo cual, estas determinaciones correspondieron a la primera fase de desarrollo del trabajo. Tampoco existen reportes sobre cuál de los dos géneros podría ser el posible emisor de la feromona sexual.

**1.2.1.1 Ciclo biológico de *M. viatrix*.** De acuerdo con lo reportado por el Instituto Colombiano Agropecuario, el ciclo biológico de la mosca de la piña varía entre 43 y 48

días. La **Figura 5** representa de forma general, las etapas del desarrollo metamórfico de *M. viatrix*.



**Figura 5.** Ciclo de vida de *M. viatrix*. Fuente: Los autores del presente trabajo.

**1.2.2 Aspectos sexuales de la familia *Richardiidae*.** Como se ha mencionado, no existen datos (hasta donde los autores tienen conocimiento) referentes al comportamiento sexual de *M. viatrix*. Por lo anterior, una forma de acercarse someramente a los comportamientos de cortejo de esta mosca es a través de lo que se conoce sobre otros miembros de esta misma familia.

La familia *Richardiidae* es una de las 64 familias perteneciente a la superfamilia *Tephritoidea* de las moscas de la fruta, conforma uno de los grupos monofiléticos, junto con *Pallopteridae* y *Piophilidae*, y está conformada por alrededor de 30 géneros. Acerca de la sexualidad de las *Tephritoidea*, se conoce el uso abundante de ornamentos, así como de la presencia de estructuras modificadas, especialmente en la cabeza de los machos, que cumplen funciones de atractores de cortejo [15].

La genitalia de los machos en *Tephritoidea* también juega un rol comunicativo, ya que ésta es juzgada por la hembra, que puede escoger con cuál de los machos copula; además, según la familia, el número de espermatecas puede variar de 2 a 4, por lo cual, la hembra puede almacenar esperma de hasta 4 machos, y posteriormente, “decidir” con cual de los espermatozoides fecundará sus huevos.

La simplificación de la genitalia del macho y la reducción del número de espermatecas, en la familia *Richardiidae* (tan solo 2), podrían sugerir una disminución del rol comunicativo de la exhibición de la genitalia masculina, como acto de cortejo y un menor control femenino del esperma [15].

### **1.3 FEROMONAS SEXUALES: UN MÉTODO ALTERNATIVO PARA CONTROLAR INSECTOS PERJUDICIALES.**

Los **semioquímicos** (del griego “*semeon*”, señal) son sustancias involucradas en los procesos de comunicación química entre los diferentes organismos. Básicamente, se destacan dos tipos de semioquímicos: las **feromonas** (del griego *phereum*, llevar; *horman*, excitar o estimular), que son sustancias químicas que transmiten mensajes entre individuos de una misma especie y los **aleloquímicos**, que son sustancias químicas involucradas en la comunicación entre individuos de diferentes especies, y que de acuerdo con su efecto se distinguen entre **kairomonas**, cuando el mensaje químico beneficia al emisor, pero no al receptor; **alomonas** cuando el mensaje beneficia al receptor solamente, y **sinomonas**, cuando tanto el emisor como el receptor se ven beneficiados [16].

Las feromonas son moléculas orgánicas producidas por un individuo, y recibidas por el otro de la misma especie, en este proceso ocurre una reacción de respuesta, por ejemplo, un cambio en el comportamiento o en el proceso de desarrollo. De acuerdo con el tipo de respuesta inducida en el organismo receptor, las feromonas se pueden clasificar como sexuales, de agregación, de alarma, marcadoras de trillo y de diferenciación social [17].

No resultaría posible definir químicamente las feromonas, puesto que desde que se elucidó la estructura molecular de la feromona sexual del gusano de la seda (*Bombix mori*), han sido muchas las feromonas descubiertas en todo tipo de animales, abarcando una gran gama de funciones químicas y estructuras moleculares, por lo tanto, no se pueden definir patrones estructurales para este tipo de compuestos. Sin embargo, todas ellas son moléculas orgánicas de peso molecular relativamente bajo y volatilidad alta, derivadas de los ácidos grasos o terpenos, fundamentalmente.

Algunas feromonas tienen isómeros ópticos, y su actividad biológica está directamente relacionada con este tipo de isomería, puesto que el receptor tiene la capacidad de distinguirlos, y ocasionalmente, un isómero óptico puede inducir un comportamiento completamente adverso al otro, o simplemente, no generar respuesta. De hecho, algunas feromonas no corresponden a sustancias únicas y aisladas, sino a mezclas multicomponente, en proporciones también relacionadas con la efectividad de la transmisión del mensaje químico.

Las feromonas se producen, generalmente, por sistemas glandulares altamente especializados, en cantidades relativamente bajas (ng o pg) y pueden ser biosintetizadas en el momento de la emisión o con anterioridad, almacenadas y posteriormente liberadas. La percepción de estas señales químicas es habitualmente un fenómeno olfatorio de alta sensibilidad y, en algunos casos, gustatorio, especialmente en animales acuáticos, caso en el cual la feromona no necesariamente es una sustancia volátil [18].

Los receptores de feromonas están ubicados en la nariz de los animales superiores y en las antenas de los insectos; en este último caso, el proceso de recepción está mediado por la presencia de proteínas en las antenas, las cuales se unen de forma específica a la

molécula de feromona, ocasionando variaciones de potencial intracelulares que se traducen en impulsos nerviosos [19].

Desde que se hizo posible la elucidación estructural y su posterior síntesis, las feromonas sexuales de insectos han adquirido gran aplicabilidad en el manejo integrado de insectos nocivos en cultivos comerciales y más aún, después de que se han dado a conocer las grandes desventajas del uso indiscriminado de potentes insecticidas sintéticos, mientras el empleo de feromonas ha demostrado ser altamente específico y de menor impacto ambiental, puesto que pequeñas cantidades de feromona pueden cubrir grandes extensiones de cultivo.

En el manejo integrado de insectos perjudiciales, las feromonas sexuales son utilizadas con dos enfoques opuestos: la estimulación y la inhibición del comportamiento. El primer enfoque utiliza la capacidad de las feromonas para inducir la orientación de los insectos hacia una trampa; el segundo, implica la liberación de feromona sexual en altas concentraciones al ambiente, lo cual genera la adaptación de los receptores y del sistema nervioso central a través de la exposición continua a ciertos niveles de feromona; esto inhibe la respuesta a una secreción posterior proveniente del individuo del sexo opuesto, debido a la incapacidad de localizar la fuente emisora [20].

Si bien se puede considerar que el mayor uso de las feromonas se ha dado para el control de insectos perjudiciales en cultivos forestales [21], también existen importantes experiencias en cultivos perennes, tales como el control de *Phthorimaea operculella* en Costa Rica con feromonas sexuales, que logró reducir los daños en cultivos de papa hasta en un 45% [22]. Así mismo, los programas de erradicación del picudo de la bellota del algodónorero, *Anthonomus grandis*, en los cinturones algodónoreros de los Estados Unidos (Mississippi, Louisiana y Texas) que incluyen el control de la reproducción, la evaluación y el monitoreo de trampas cebadas con feromona, esperan haber logrado para el año 2010, la erradicación completa de los picudos de las plantaciones algodónoreras. Esto ha sido posible gracias al empleo de trampas cebadas con *grandlure*, nombre dado a los émulos sintéticos de los cuatro componentes de la feromona sexual que el macho picudo emite a través de sus excrementos, identificada y sintetizada al final de los años 60 y, que demostró funcionar como un gran atrayente para la captura de las hembras [22].

En el valle de Culiacán, México, en 1979, se logró la identificación de la feromona sexual del gusano alfiler del tomate, *Keiferia licopersicella*, que resultó una mezcla 96:4 de acetato de (*E*)-4-tridecenilo y acetato de (*Z*)-4-tridecenilo; se desarrolló una formulación de la feromona de uso comercial, con tal éxito, que para finales de los años 80, casi la totalidad de los productores mexicanos de tomate habían adoptado programas de manejo integrado de plagas, con base en feromonas [22].

En el mismo sentido, los programas norteamericanos de control del gusano rosado de la bellota *Pectinophora gossypiella*, se basan en la disrupción del comportamiento sexual del insecto a través de la aspersión aérea de *gossyplure*, la feromona sexual sintética del gusano rosado de la bellota, compuesta por una mezcla de los isómeros de acetato de (*Z*, *E*)-7,11-hexadecadienilo [23].

**1.3.1 Feromonas en Dípteros.** *Díptera* es el segundo orden más amplio de insectos, con más de 125.000 especies descritas, clasificadas en 188 familias, y hoy en día, se calcula que puede existir alrededor de un millón de especies de dípteros.

La presencia de feromonas en *Dípteros* fue sugerida desde 1915, a partir de los estudios con *Drosophila melanogaster* [24]; en 1964 se demostró la existencia de feromona en mosca doméstica [25], la cual sería plenamente identificada en 1971 como (*Z*)-9-tricoseno [26]. Durante las dos décadas siguientes a este descubrimiento, se logró la elucidación química de un gran número de componentes de feromonas en *Dípteros*, especialmente de aquellos de importancia económica, dejando al descubierto la gran variedad y complejidad de la comunicación en *Dípteros*, así como una gran diversidad de comportamientos y características de estos insectos asociados con la cópula y el cortejo, tales como mecanismos visuales, acústicos y táctiles [27].

Entre los dípteros, las feromonas de las moscas de la fruta (pertenecientes la superfamilia *Tephritoidea*) son los semioquímicos más estudiados, dada la importancia económica de tales especies; hasta 2007, se reportaron las feromonas sexuales de más de 30 especies pertenecientes a esta superfamilia [27]. Igualmente, se ha logrado establecer, que los estímulos químicos, auditivos y visuales también juegan un rol importante en el comportamiento sexual de las moscas de la fruta. El cortejo de la *Tephritoidea*, es un

proceso complejo, que puede involucrar varios tipos de movimiento del cuerpo, las alas o las patas, reflexiones de ultravioleta e incluso la transferencia de un regalo nupcial (trofalaxis) [15].

En *Tephritoidea*, las feromonas sexuales son generalmente emitidas por los machos [27], con excepciones de la mosca del olivo (*Batrocera oleae*) en la cual, las hembras también producen y emiten feromonas sexuales compuestas por 4 sustancias con acción sinérgica, de las cuales 2 son producidos en las glándulas rectales y las otras dos en el cuerpo del insecto; el componente mayoritario, así como el de mayor actividad biológica en esta feromona sexual, es el 1,7-dioxaspiro-5,5-undecano; este compuesto, es emitido por los machos de la misma especie, junto con un característico sonido que también actúa como señal; sin embargo, este compuesto solo atrae machos y la cópula está determinada por la elección de la hembra [27].

Los machos *Tephritoidea*, pueden emitir sus feromonas sexuales por inflación de sus membranas laterales abdominales, por sudación de sus bolsas anales o por medio del venteo de sus alas [27].

Es posible encontrar similitud molecular entre los agentes activos de feromonas de especies con relaciones filogenéticas estrechas, tales como los individuos de un mismo género, tal y como se presenta con algunas moscas del género *Anastrepha* y diversos *Lepidópteros* [15, 27].

La liberación o percepción de las secreciones volátiles en *Dípteros*, suele estar controlada por diversos factores tanto internos como externos, especialmente, la edad del adulto, la disponibilidad de alimento, la presencia del otro sexo, condiciones climáticas y el fotoperíodo [28].

**1.3.2 Técnicas para el estudio de feromonas.** Las feromonas se encuentran en cantidades muy bajas (ng o pg) en el insecto, por lo cual resulta necesario el uso de técnicas de alta resolución y sensibilidad para su determinación [29]. Habitualmente, las metodologías de análisis requieren tres etapas generales: (a) preparación de la muestra,

(b) separación de los analitos y (c) reconocimiento e identificación de los agentes químicos presentes.

**1.3.2.1 Extracción de feromonas.** La selección de la técnica para la extracción de una muestra de la feromona de un insecto, está determinada por la cantidad de información que se tenga sobre la biología y comportamiento del insecto. Así, la implementación de una técnica dada esta íntimamente ligada al conocimiento de factores, tales como: el sitio de producción de la feromona (glándulas especializadas, vellos, cutícula, etc.) y momento de la emisión, ya que la feromona puede estar almacenada o ser biosintetizada en un momento específico del desarrollo del insecto [30].

Las siguientes son las técnicas más empleadas para la recolección de muestras de feromonas de insectos:

a. Extracción con solvente: Se realiza a partir de la homogeneización, ya sea de las glándulas productoras previamente extirpadas, si se conocen, o del cuerpo completo de los insectos; en ambos casos, el procedimiento requiere de la eliminación de los ácidos grasos libres de los extractos obtenidos mediante el empleo de columnas de sílica o de florisil [31].

La naturaleza lipídica de las feromonas posibilita su extracción con hidrocarburos como pentano o hexano; el hexano, el diclorometano y el éter etílico son considerados los solventes más apropiados para la extracción de feromonas de forma directa, ya que dada su alta volatilidad permiten la posterior concentración de la muestra sin exponerla a temperaturas altas [31].

La evaluación de diferentes solventes para la extracción de la feromona sexual de *Plodia interpunctella* (*Lepidoptera*), mostró que en este caso el empleo de metanol, de 95% de pureza, permite obtener extractos menos contaminados con ácidos grasos, que los obtenidos cuando se emplean otros solventes tales como cloroformo, diclorometano, éter etílico, hexano, benceno o acetona [32].

Adicional, a la necesidad de realizar *clean up* (limpieza) postextracción, la extracción con solvente presenta la dificultad de requerir relativamente grandes cantidades de solvente [29] y un gran número de ejemplares del insecto, que en algunos casos puede llegar incluso a los 50.000 individuos [33].

En la **Tabla 3** se relacionan algunos ejemplos del empleo de la extracción con solvente de feromonas en dípteros.

**Tabla 3.** Ejemplos de extracción de feromonas en dípteros con diferentes solventes [31].

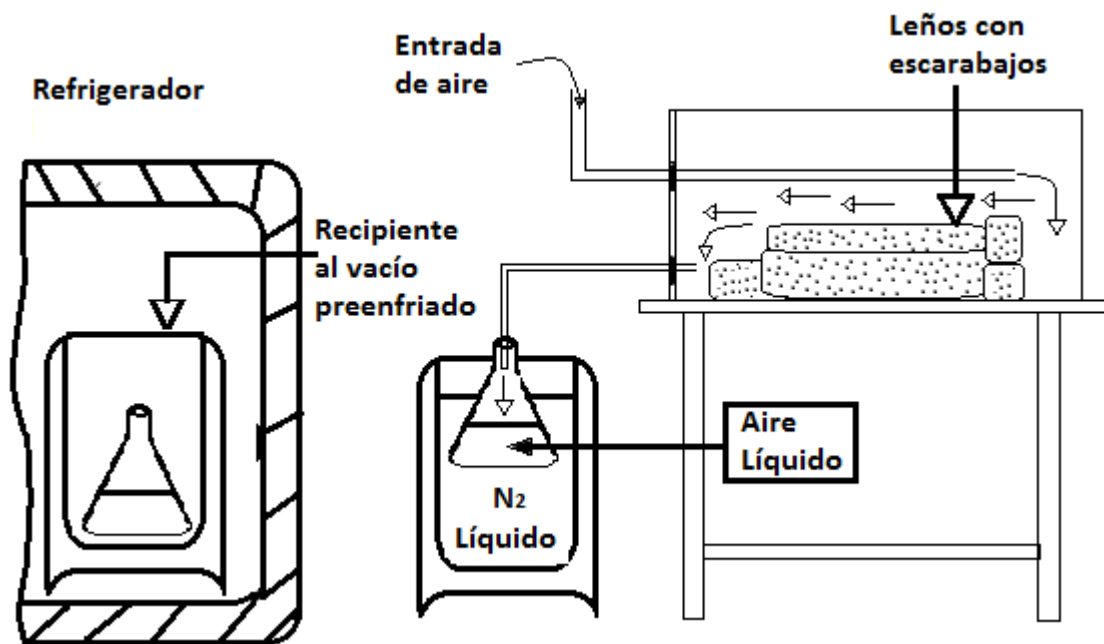
Insecto	Sexo	Parte del insecto	Solvente	Método
<i>Dacus neohumeralis</i>	M	Glándulas productoras	Éter	Glándulas colectadas de machos maduros, colectados en micropipetas con éter.
<i>Dacus oleae</i>	F	Glándulas rectales	Éter	Glándulas disectadas y extraídas con éter durante 24 horas.
<i>Dacus triony</i>	M	Glándulas productoras	Éter	Glándulas colectadas de insectos maduros, colectadas en micropipetas y extraídas con éter.
<i>Glossina morsitans morsitans</i>	F	Todo el insecto	Éter	Insectos inmovilizados a 4°C y lavados con éter.
<i>Lycoriella mali</i>	F	Todo el insecto	Hexano	Cuerpo de insectos homogeneizados en el solvente.
<i>Sarcophaga bullata</i>	M	Todo el insecto	Acetato de etilo	Insectos inmovilizados con CO <sub>2</sub> y homogeneizados en el solvente.

b. Trampeo de volátiles: Agrupa un conjunto de técnicas de recolección de volátiles del entorno del insecto (en el *airborner*, según el término en inglés), empleando trampas criogénicas o materiales adsorbentes. Generalmente, se trabajan dos técnicas: flujo de aire pasivo y flujo de aire dinámico.

**Flujo de aire pasivo:** En 1966, se aisló la feromona sexual de *Choristoneara fumiferana*, a partir del lavado con éter de las bolsas plásticas donde anteriormente habían sido depositadas hembras vírgenes del insecto [34]. Posteriormente, para evitar la contaminación con plastificantes, las bolsas fueron remplazadas por recipientes de vidrio [35]; de esta forma, ha sido posible aislar las feromonas de diversos insectos, a partir de los lavados con solvente de los recipientes en los cuales éstas han sido colectadas durante el período de su emisión [31].

**Flujo de aire dinámico:** La técnica consiste en hacer pasar un flujo de aire a través de los insectos, de modo que arrastre los volátiles presentes, para luego capturarlos mediante el empleo de una trampa. Se han utilizado tres tipos de trampas diferentes: criogénicas, frías y materiales absorbentes [31].

El empleo de trampas criogénicas para la captura de feromonas fue reportado por primera vez en 1974 [35]. La técnica consiste en condensar un flujo de aire proveniente de la cámara donde han sido colectados los insectos previamente, mediante el empleo de nitrógeno líquido (-170 °C) y, posteriormente, la evaporación lenta del aire líquido, quedando la muestra de feromona impregnada en las paredes del recipiente recolector, de donde puede ser recuperada mediante el lavado con un solvente adecuado (**Figura 6**). Esta técnica permitió el aislamiento de la feromona sexual de la mosca del olivo, a partir de la colección del aire circundante de 2000 hembras sexualmente maduras durante 3 horas, en una trampa criogénica; luego de evaporar el aire líquido, la obtención de la feromona se logró por lavado del recipiente colector del aire con éter [37].



**Figura 6.** Montaje de condensación para la recuperación de feromonas volátiles [32].

La feromona sexual de *Trichoplusia ni*, se obtuvo mediante el empleo de una trampa fría de bisulfuro de carbono. Se hizo pasar un flujo de aire (150 mL/min, por 10 min) sobre un lote de hembras vivas y se trapeó el efluente en 3 mL de bisulfuro de carbono contenidos en un tubo de vidrio en U y enfriados a -70 °C, con hielo seco y acetona [38]. Un método similar se reportó para la obtención de la feromona de la polilla gitana, donde el flujo de aire se recolectó en 1 mL de hexano, contenido en un tubo de vidrio en U y enfriado en un baño de hielo seco con acetona [36].

Cuando se usan resinas absorbentes, el flujo de aire, que ha pasado a través de los insectos emisores de feromona, es recolectado en una trampa polimérica absorbente. Posteriormente, la desorción de los analitos de la trampa se realiza con solvente. La mezcla se concentra y finalmente, se analiza por cromatografía [29].

Entre los materiales poliméricos de mayor uso en el trapeo de compuestos volátiles del ambiente figuran el Porapak P, un polímero poroso de estireno y divinilbenceno de *Waters Associates* (Framingham, Massachusetts), el *carbosieve* de Supelco Inc. (Bellefonte, Pensilvania) y el Tenax® GC de *Applied Science Laboratories* (State College, Pensilvania). Entre las resinas más utilizadas se encuentran Porapak Q, un copolímero del etilvinilbenceno – divinilbenceno, Hysep Q y Super Q [31].

Las feromonas son removidas de las fases absorbentes por lavado con solvente o extracción *Soxhelt* [39], o incluso, usando otros instrumentos como *headspace* dinámico (purga y trampa) conectado a un cromatógrafo de gases [40] o un puerto de inyección con temperatura programada [41].

c. Inyección sin solvente: Las técnicas de inyección sin solvente permiten la inserción directa del material biológico al interior del puerto de inyección del sistema cromatográfico (dentro de un *liner*) [29]. El método de inyección sin solvente, consiste en el calentamiento de la muestra en la punta de un capilar de vidrio, el cual es empujado a través del *septum* en el puerto de inyección caliente y operando en modo *splitless* [29].

Esta técnica de muestreo ha sido útil, especialmente, para el análisis de hidrocarburos cuticulares, los cuales resultan de importancia en el caso de insectos que presentan castas a nivel organizacional [29].

Otro enfoque de esta técnica consiste en la ubicación del sitio de producción de feromona, por ejemplo, en la elucidación de la feromona sexual de hembras de *Mamestra brassicae* [42]. Diferentes partes del insecto fueron disectadas, colocadas en el *liner* de un inyector de cromatógrafo de gases.

d. Microextracción en fase sólida (SPME): La SPME es una técnica relativamente nueva, consiste en una fibra de sílica recubierta con un material absorbente o adsorbente, del mismo tipo de las columnas cromatográficas, capaz de extraer compuestos orgánicos volátiles del *headspace* de una muestra líquida o sólida. Los compuestos extraídos son desorbidos por exposición de la fibra en el puerto de inyección del sistema GC. Existen diferentes tipos de recubrimientos de fibras y su escogencia depende de la polaridad de los compuestos a muestrear [43].

En los últimos años la SPME, como técnica de extracción y concentración, libre de solvente, ha resultado de gran utilidad en el estudio y análisis de feromonas de insectos de diversos grupos, ya que permite su estudio *in vivo*, en su habitat natural. El modo de empleo de la técnica más utilizado es el *headspace* (HS-SPME) y generalmente, se usan los recubrimientos bipolares o de baja polaridad [44-47].

La SPME se usó por primera vez para en el muestreo de feromonas en 1995 [29] durante el monitoreo del ritmo de emisión de feromona de *Metamasius hemipterus*. El muestreo se realizó por exposición de una fibra recubierta con poli-(dimetilsiloxano) (PDMS) durante 5 min a una corriente de aire que había pasado previamente sobre 6 machos del insecto; este tiempo de exposición se obtuvo por optimización con una feromona sintética.

Cuando se muestrean mezclas de feromonas u otros volátiles, obtenidos por SPME, su composición porcentual no necesariamente corresponde a la composición porcentual real [29]. Esto se debe principalmente a factores como la afinidad del recubrimiento por los analitos y el tiempo de equilibrio entre la muestra y el recubrimiento.

La SPME también ha sido utilizada en el estudio de precursores de feromona, especialmente para el muestreo de hidrocarburos cuticulares de insectos y mostró resultados comparables con los obtenidos por extracción con solvente o inyección sin solvente [41]; por ejemplo, por exposición de una fibra de PDMS al *headspace* de 3 patas de una reina de *Vespa orientalis* en un vial de 2 ml cerrado, a 170°C por 5 min, fue posible extraer todos los hidrocarburos cuticulares presentes. En este caso, el perfil de hidrocarburos obtenido resultó similar al obtenido con hexano a partir de las otras 3 patas del mismo insecto [47].

**1.3.2.2. Separación cromatográfica de feromonas.** Dado que la mayor parte de las feromonas son moléculas relativamente pequeñas ( $\approx C_{30}$ ) y de baja polaridad, resulta posible el uso de un gran número de fases estacionarias para su separación por GC. En general, las fases no polares de derivados de polisiloxano son las más utilizadas, debido al amplio rango de uso, su estabilidad térmica y su tiempo de vida largo.

El uso de fases polares puede resultar necesario, en algunos casos, para dar mejor separación o para confirmar la identificación tentativa por comparación de los índices de retención en diferentes fases [29]. La **Tabla 4** relaciona algunos ejemplos de columnas empleadas en la separación de feromonas.

**Tabla 4.** Fases estacionarias empleadas para la separación de feromonas [29].

INSECTO	FASE ESTACIONARIA	FEROMONAS
<i>Lucinipola renigera</i>	DB-5 (5%-Fenil-poli(dimetilsiloxano) HP-17 (50%-Fenil-poli(dimetilsiloxano) Carbowax (polietilenglicol)	(9Z)-9-acetato de tetradecenilo (9Z,12E)-acetato de tetradecenilo
<i>Setothosea asigna</i>	DB-5 DB-210 (50%- poli(trifluoropropil)metilsiloxano) D-23 (50% poli(cianopropil)metilsiloxano)	Mezcla de aldehídos C12, mono y diinsaturados
<i>Agromiza frontella</i>	DB-1 (100%-Fenil-poli(dimetilsiloxano) Carbowax	3,7-Dimetilnonadecano

La separación de isómeros geométricos de acetato de tetradecenilo, componentes comunes de feromonas de lepidópteros, ha sido posible mediante el uso de fases estacionarias de cristal líquido; así, empleando una serie de derivados *para*-sustituidos de

cinamato de colesterilo como recubrimiento, se encontró que la habilidad de cada columna para separar los isómeros *E* y *Z* de acetatos de tetradecenilo, está estrechamente relacionada con la posición del doble enlace en la cadena [29].

De la misma forma, el empleo de fases quirales ha permitido determinar la configuración absoluta de algunas feromonas quirales, lo cual resulta de gran importancia, ya que la actividad biológica de una feromona puede estar directamente asociada a uno de los enantiómeros o a una relación específica entre enantiómeros. Mientras la resolución de mezclas de enantiómeros, mediante el empleo de fases convencionales requiere de una derivatización previa, y que está restringida a ciertos grupos funcionales, las fases quirales permiten separar un amplio rango de clases de compuestos ópticos, siendo las más utilizadas aquellas fabricadas a partir de ciclodextrinas modificadas [29].

### **1.3.2.3. Detección y elucidación estructural de feromonas**

a. Detección convencional: El detector de ionización en llama (FID) es el de mayor uso, debido a la universalidad de su respuesta, su sensibilidad y su amplio rango lineal [29]. En algunos casos, dependiendo del conocimiento que se tenga de la química de los compuestos en estudio, es posible usar otros detectores tales como el detector selectivo de nitrógeno-fósforo (NPD), utilizado para cuantificar una feromona pirrolidínica presente en algunas especies de hormigas cortadoras [48]. Otros detectores GC convencionales, tales como de conductividad térmica (TCD) y de captura de electrones (ECD), son rara vez utilizados para el análisis de feromonas debido a la baja sensibilidad del TCD y, a la necesidad de presencia de grupos electronegativos en los compuestos detectados por ECD [29].

b. Detección por espectrometría de masas: La espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases (GC-MS) es una herramienta poderosa para el análisis e identificación de mezclas complejas. El espectrómetro de masas funciona como un detector con una alta sensibilidad, en el rango de los picogramos y, adicionalmente, proporciona una gran cantidad de información estructural. Así, la capacidad de resolución de la cromatografía de gases combinada con la capacidad del espectrómetro de masas para identificar sustancias puras, proporciona una excelente herramienta para el análisis de feromonas, ya que éstas frecuentemente se presentan como mezclas

multicomponente en matrices complejas, tales como un tejido biológico. La GC-MS proporciona espectros que son “huellas digitales” de cada componente, que se pueden comparar con espectros de bases de datos, para facilitar la identificación de sustancias [29].

La GC puede ser acoplada a diferentes tipos de espectrómetros de masas directamente, por medio de una línea de transferencia caliente que conduce la columna capilar a la fuente de iones, donde la ionización de moléculas ocurre por impacto de electrones; o por ionización química, usando la combinación de las dos técnicas. Debido a su bajo costo y su diseño compacto, el cuadrupolo y la trampa de iones son los analizadores de masas más ampliamente utilizados para el análisis de feromonas [29]. Los analizadores de cuadrupolo tienen la ventaja de dar mayor reproducibilidad del espectro, mientras que los analizadores de trampa de iones presentan mayor sensibilidad.

En algunos casos, cuando se requiere alta sensibilidad, se emplea la operación en modo monitoreo de iones seleccionados (SIM, por sus siglas en inglés), que permite registrar iones seleccionados con una relación señal/ruido más alta; este método fue empleado para identificar el componente mayoritario de la feromona sexual de *Acleris gloverana* a partir de extractos de las glándulas feromonales de hembras [29].

La información estructural suministrada por el espectro de masas no siempre resulta suficiente para elucidar algunos detalles estructurales, tales como la posición de los enlaces dobles en compuestos mono y poliinsaturados, y aunque se han descrito métodos complejos que mediante el análisis de la cantidad relativa de algunos iones producidos en el espectro de masas permiten la localización de enlaces dobles en aldehídos monoinsaturados, acetatos y alcoholes, para el análisis de feromonas ha resultado más frecuente el uso de microrreacciones de derivatización (**Tabla 5**), que facilitan la elucidación de detalles estructurales específicos [29].

Una alternativa para localizar enlaces dobles, es la ionización química; por ejemplo, cuando se usa la mezcla de nitrógeno, bisulfuro de carbono y metilvinil éter, como agentes de ionización química de alquenos de cadena larga, se forman dos iones de

ciclobutano, cuya disociación proporciona dos iones de vinil éter formados a partir de la ruptura del doble enlace; así el análisis estructural de éstos puede conducir a la elucidación de la posición del enlace doble [29]. También el acetonitrilo [49], el óxido nítrico [50] y el catión *terc*-butilo [51], han sido utilizados como agentes de ionización química capaces de revelar la posición de los enlaces dobles.

Finalmente, el sistema GC-MS también ha sido utilizado en el estudio de las rutas biosintéticas de feromonas, ya que la espectrometría de masas permite el uso e identificación de derivados marcados isotópicamente [52].

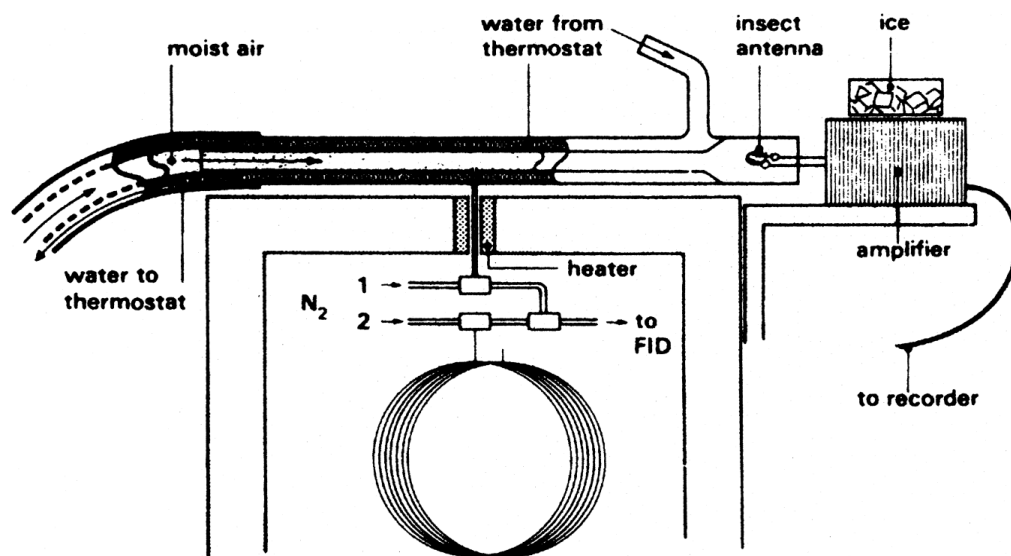
**Tabla 5.** Algunas microrreacciones de uso frecuente para la elucidación estructural de feromonas [29]

REACCIÓN	DESCRIPCIÓN	USO
<b>Reducción</b>	Hidrogenación catalizada con paladio. Reducción con diimida.	Determinación del grado de instauración de una feromona.
<b>Ozonólisis</b>	Burbujeando ozono en la solución de la feromona a bajas temperaturas (-50 a -78°C) y por reducción del ozónido formado con dimetilsulfito o trifenilfosfina, se obtienen dos aldehídos por rompimiento del doble enlace en la molécula inicial.	Determinación de la posición de los enlaces dobles.
<b>Epoxidación</b>	La reacción del compuesto insaturado con ácido <i>m</i> -cloroperoxibenzóico ( <i>m</i> -CPBA) ocasiona la formación de una función epóxido en la posición donde se hallaba el doble enlace	Determinación de la posición de los enlaces dobles.
<b>Derivatización quiral</b>	La reacción de una feromona quiral con un reactivo homoquiral específico produce diastereoisómeros, separables por GC sobre fases aquirales. Se han descrito reacciones de derivatización homoquiral para alcoholes, láctonas e hidroxiácidos.	Determinación de la configuración absoluta de los centros quirales
<b>Derivación de ésteres</b>	La saponificación de feromonas que contienen el grupo éster, produce los correspondientes ácidos y alcoholes, identificables por MS. Saponificación con hidruro de aluminio y litio da una mezcla de alcoholes. Oxidación con trióxido de cromo sobre zeolitas produce las correspondientes cetonas, identificables por MS gracias a su característico reordenamiento de McLafferty.	Localización del grupo acetato a lo largo de la cadena carbonada
<b>Derivación de ácidos carboxílicos</b>	Metilación con la correspondiente formación de ésteres metílicos.	Aumento de la volatilidad de las sustancias para su análisis GC.

c. Detección por espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier: La combinación de la cromatografía de gases con la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (GC-FT-IR) ha sido menos utilizada que la combinación GC-MS para el análisis de feromonas. Esta técnica, también proporciona información estructural valiosa y es particularmente usada en la identificación de configuraciones isoméricas [29]; así, la aplicación más relevante de la GC-FT-IR es la determinación de la isomería geométrica de los alquenos, tal como ilustra la elucidación estructural de la feromona de alarma de *Tortonia sp* [53].

La GC-FT-IR también es de gran importancia, tanto en la determinación de los grupos funcionales presentes, como para confirmar su ausencia, como ocurrió en la determinación de la estructura de la feromona sexual de *Acrolepiopsis ascetella*, cuando la aparición de bandas de absorción únicamente alrededor de los  $2900\text{ cm}^{-1}$ , permitió determinar la naturaleza hidrocarbonada de todos los enlaces presentes.

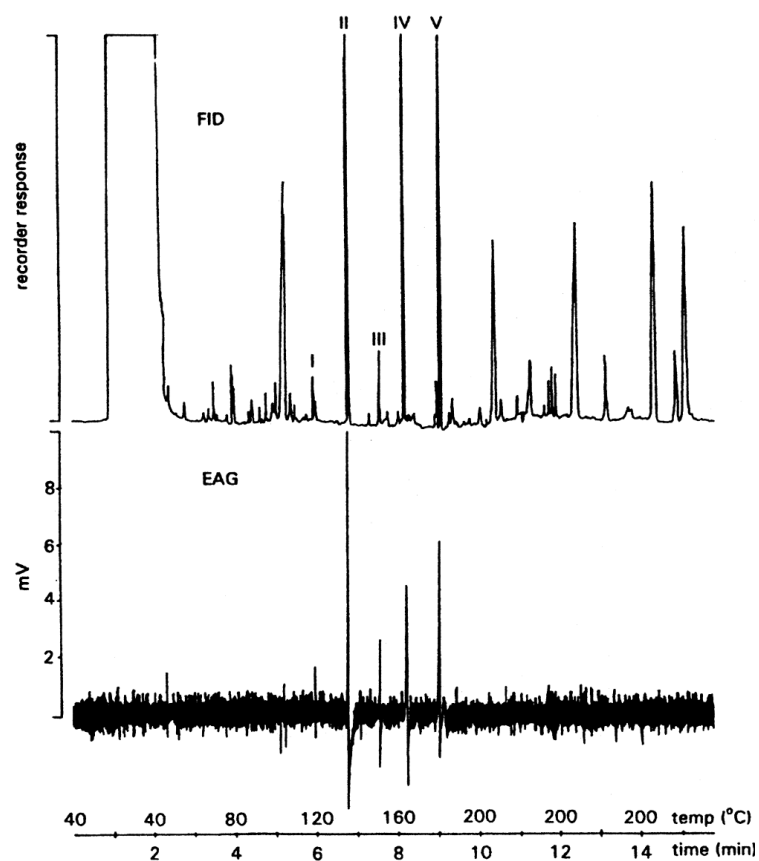
d. Detección por registro electroantenográfico: La electroantenografía (EAG) es una técnica neurofisiológica que permite monitorear la percepción de un semioquímico por un insecto. Una antena del insecto se conecta a un par de electrodos de plata y se expone a una corriente de aire con la feromona, la polarización de la antena genera una diferencia de potencial entre los electrodos, que puede ser registrada y amplificada [54]. En el montaje experimental básico (**Figura 7**), el flujo proveniente de la columna cromatográfica se divide entre los sistemas EAG y FID, proporcionando una detección simultánea, específica (EAG) y una señal total (FID) de los compuestos eluidos.



**Figura 7.** Representación esquemática del sistema para determinación por EAG de feromonas [29]

El sistema GC-EAG-FID ha sido ampliamente utilizado en el estudio de feromonas, ya que permite la identificación de los analitos con actividad biológica en cromatogramas complejos; sin embargo, es de resaltar, que la técnica no indica el tipo de actividad biológica (atrayente sexual, feromona de alarma, etc.) propia del compuesto monitoreado, lo cual requiere de bioensayos de comportamiento.

A modo de ejemplo, la **Figura 8** presenta los registros simultáneos por FID y EAG del *headspace* de machos sexualmente maduros de la mosca mediterránea de la fruta *Ceratitis capitata*; de los compuestos registrados en el cromatograma, sólo cinco mostraron actividad en el EAG y de éstos, uno no atraía a las hembras durante los bioensayos de comportamiento.



**Figura 8.** Registro cromatográfico de volátiles de *C. capitata*, usando simultáneamente detección por FID y EAG con antenas de hembra [40].

Finalmente, el empleo de columnas quirales en el sistema GC-EAG-FID, ha permitido determinar la especificidad de enantiómeros en la recepción de feromonas [40].

e. Detección por registro de una célula única: Aunque la EAG es una herramienta poderosa, es posible obtener conocimiento más detallado de la percepción de un semioquímico por un insecto, monitoreando la respuesta de una célula olfatoria de forma individual, ya que los insectos poseen células especializadas para diferentes feromonas, y diferentes componentes en una mezcla feromonal. De forma tal, que esta técnica acoplada a la cromatografía de gases proporciona una detección específica para asignar actividad neurofisiológica a los componentes de una feromona. El sistema experimental básico es similar al GC-EAG-FID, pero los electrodos de plata son sustituidos por un par de microelectrodos de tungsteno. Uno de los electrodos es normalmente colocado en el

aparato bucal del insecto y el electrodo de registro en la base de un *sensilla* antenal, usando micromanipuladores. Las respuestas celulares son monitoreadas con un osciloscopio, que puede registrar el cambio en el comportamiento de una célula cuando es estimulada por una feromona.

#### **1.4 PERFIL LIPÍDICO: POSIBLES PRECURSORES EN LA BIOSÍNTESIS DE FEROMONAS.**

Tal y como ocurre con otros órdenes de insectos, en *Dípteros* se conoce más sobre la biología y química de las feromonas sexuales que lo que se ha logrado establecer sobre su origen biosintético. Se conocen dos reportes sobre la biosíntesis de feromonas en la mosca doméstica (*Musca domestica*) y en la mosca tse-tse (*Glossina morsitans morsitans*). En estos casos, en ambos insectos, las feromonas sexuales están estrechamente relacionadas con los hidrocarburos componentes de la capa cerosa epicuticular. Schlein y colaboradores [55] reportaron que, en estas dos moscas, las feromonas se producen por una glándula unicelular en las patas de la hembra; sin embargo, posteriormente, se logró determinar que en el caso de la mosca doméstica la biosíntesis ocurría en el integumento abdominal y luego, la feromona se transfería a las patas del insecto [56].

La mayoría de los dípteros carecen de glándulas feromonales especializadas; no obstante, la síntesis de feromonas ocurre a través de una ruta sintética muy similar a la que se lleva a cabo en la producción de los lípidos cuticulares [56].

Varios casos se conocen sobre la relación entre los lípidos cuticulares del insecto y sus feromonas sexuales, e incluso, se ha logrado demostrar dimorfismo sexual, en lo referente a la composición en clase y cantidad de lípidos cuticulares presentes, así como el cambio del perfil lípido cuticular y el alcance de la madurez sexual del insecto [36, 43].

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

Dado el objeto del trabajo, el desarrollo experimental comprendió dos enfoques: (1) identificar químicamente las secreciones volátiles de *M. viatrix* y establecer su relación con la madurez sexual del insecto, determinar un posible portador del mensaje sexual en las moscas de la piña; (2) realizar el estudio de la variación de los componentes volátiles presentes en la piña en función de su proceso de maduración, buscando alguna diferencia en los volátiles presentes para el período reportado como época posible en que se produce el ataque de *M. viatrix*.

### 2.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS DE LABORATORIO

Los solventes y reactivos empleados durante este trabajo, fueron de grado “analítico”. Las casas distribuidoras, así como el grado de pureza de los reactivos, se relacionan en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Casas distribuidoras y grado de pureza de sustancias químicas utilizadas en este proyecto.

REACTIVOS	PUREZA, %	CASA DISTRIBUIDORA
Mezcla certificada de FAME's (GLC 10, GLC 50, GLC 70, GLC 80, GLC 100)	99,8	Matreya, Inc. Pennsylvania, EE.UU.
Complejo de trifluoruro de boro en metanol (BF <sub>3</sub> /CH <sub>3</sub> OH)	14	Merck, Hohenbrunn, Alemania.
<i>n</i> -Hexano	99.9	Mallinckrodt Baker, Inc., Phillipsburg, NJ, USA.
Metanol	99.8	Riedel – de Haën, Seelze, Alemania.

A continuación, se describen los materiales y equipos, empleados en el presente proyecto:

## **Materiales**

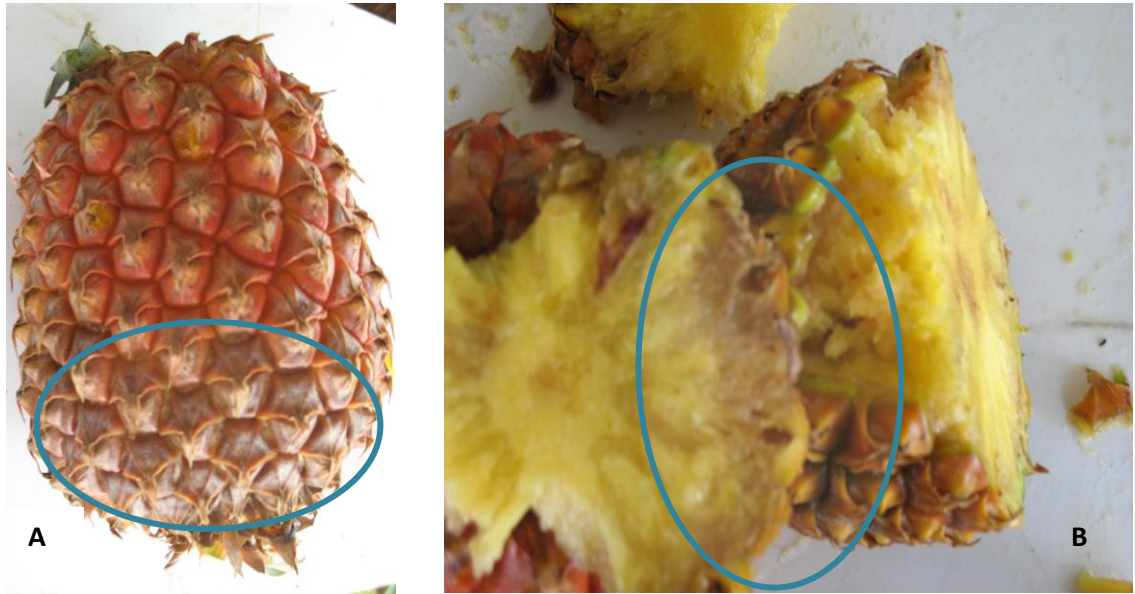
- Tubos cónicos de poli(propileno) de 1,5 mL (BRAND, Postfasch 1155. D 97864 Wherteim, Alemania);
- Viales ámbar estándar de 4 mL para SPME;
- Viales estándar de 20 mL para *headspace*;
- Fibras para SPME con recubrimientos de PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$  (*Supelco Inc.*, Bellefonte, EE.UU.);
- Balón de fondo redondo de 50 mL (BRAND).

## **Equipos**

- Dispositivo para montaje de fibras para SPME con recubrimientos de PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$  (*Supelco Inc.*, Bellefonte, EE.UU.);
- Plancha de calentamiento, con agitación magnética (SCHOTT MR 1065, Schott – Geräte Gmb, D – 65719, Hofheim/ Alemania);
- Rotoevaporador;
- Baño de ultrasonido (Ultrasonic LC – 20H, Elma – Singen/ Alemania);
- Balanza digital (Startius Basic,  $\pm 0,005$  g, Alemania);
- Balanza analítica (AG285 METTLER TOLEDO,  $\pm 0,00001$  g, Suiza).

## **2.2 ANÁLISIS DE LAS EMISIONES VOLÁTILES DE LA MOSCA DE LA PIÑA, *Melanoloma viatrix*.**

**2.2.1 Obtención de ejemplares de la mosca.** Los ejemplares adultos se obtuvieron a partir de larvas encontradas en piñas infestadas por *M. viatrix*. La piña que estaba contaminada con larvas de *M. viatrix*, presentaba coloración marrón y ablandamiento. Al abrir el fruto, se observaba que en los sitios con larvas, se encontraban orificios formando caminos, que se presumía, habían hecho las larvas mientras se alimentaban y desplazaban (**Figura 9**).



**Figura 9.** A. Piña madura infestada de larvas de *M. viatrix*. B. Daños ocasionados por las larvas. Fuente: Los autores del presente proyecto.

Las larvas que se encontraban en el tercer instar de su desarrollo, se reconocían por su tamaño, su color amarillo y la tendencia de agarrarse de los espiráculos con los ganchos mandibulares y soltarse repentinamente, con saltos de hasta 50 cm de altura; se ubicaron en una cámara de empupamiento cargada con arena estéril húmeda, donde se desarrollaba la pupa y, finalmente, surgían las moscas. El sustrato de empupamiento fue arena fina esterilizada (**Figura 10**).



**Figura 10.** Cámaras para empupamiento de larvas *M. viatrix*. Fuente: Los autores del presente proyecto.

Los ejemplares del insecto fueron criados en jaulas de madera y malla de tela tul (**Figura 11**), y fueron alimentados bajo diferentes regímenes dietarios, que incluyeron: piña madura, proteína hidrolizada, leche en polvo, azúcar y agua.



**Figura 11.** Jaulas de cría en el laboratorio de *M. viatrix*. Fuente: Los autores del presente proyecto

**2.2.2 Observaciones preliminares.** Una vez obtenidas las moscas adultas, éstas estuvieron bajo observación durante 25 días después de su emergencia pupal, de 7 a.m. a 5 p.m., con el fin de determinar el momento en que ocurriría la cópula, así como indicios del género emisor de la feromona sexual.

Se hizo seguimiento de las emisiones de volátiles de las moscas, distribuidas en dos grupos: machos y hembras. El muestreo de las emisiones volátiles de dichos insectos, se realizó por SPME *in vivo*, utilizando una fibra con recubrimiento de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65  $\mu\text{m}$  (Supelco, Inc., Bellefonte, PA, EE.UU.), en modo de espacio de cabeza; se tomaron muestras de 8 a.m. a 4 p.m., durante el período de desarrollo fisiológico de las moscas.

Los analitos saturados sobre la fibra se desorbieron en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC) modelo HP 5890 *Series II* (Hewlett-Packard, Palo alto, CA, EE.UU.), a una temperatura de 250 °C por 10 min. La inyección se realizó manualmente, en el modo *splitless*. Para la separación de los analitos de interés, se utilizó una columna capilar de sílice fundida DB-5, de fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25  $\mu\text{m}$  (f.e.)] (Y & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.). La programación de temperatura de la columna fue de 45°C por 5 min, 4°C/min hasta 150°C

(2 min) y a 5°C/min hasta 250°C (5 min). El GC estuvo acoplado a un detector de ionización de llama (FID).

**2.2.3 Monitoreo de volátiles de insectos adultos de *M. viatrix*.** Después de las observaciones preliminares realizadas, se determinó el momento en que copularon los insectos. Posteriormente, se procedió a realizar el monitoreo *in vivo* de los volátiles emitidos por las moscas sexualmente maduras (machos y hembras por separado), por medio de la técnica SPME, utilizando una fibra con recubrimiento de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65 µm; la fibra se expuso en modo de espacio de cabeza por 15 min, al entorno de los insectos (**Figura 12**).



**Figura 12.** Muestreo *in vivo* de insectos de *M. viatrix* por medio de la técnica SPME, utilizando una fibra con recubrimiento de PDMS de 65 µm. Fuente: Los autores del presente proyecto.

La desorción de los analitos de la fibra se realizó en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases (GC) modelo HP 5890 *Series II* (Hewlett-Packard, Palo alto, CA, EE. UU.), a una temperatura de 250 °C por 10 min. La inyección se realizó manualmente, en el modo *splitless*. Para la separación de los analitos de interés, se utilizó una columna capilar de sílice fundida DB-5, de fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) [30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e.)] (Y & W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.). La

programación de temperatura para la columna fue 45°C por 5 min, 4°C/min hasta 150°C (2 min) y a 5°C/min hasta 250°C (5 min). El GC estuvo acoplado a un detector selectivo de masas (*Hewlett-Packard* modelo HP 5972) con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV), temperatura de la cámara de ionización de 180 °C y un analizador másico cuadrupolar, operado en el modo de barrido completo de radiofrecuencia (*full scan*) desde 40 hasta 400 unidades de masa (*m/z*).

El reconocimiento de los compuestos volátiles se realizó con base en sus espectros de masas experimentales y por comparación con espectros de las bases de datos (NIST, Wiley, Adams).

#### **2.2.4 Extracción y cuantificación de ácidos grasos.**

**2.2.4.1 Extracción de grasa:** La extracción de grasa de ejemplares de la mosca *M. viatrix*, se llevó a cabo empleando el método propuesto por Folch y colaboradores [57], como sigue: en un balón (50 mL) de fondo redondo, se colocaron moscas machos muertos (1 g), previamente maceradas y homogeneizadas. Luego, la muestra fue sometida, dos veces, a extracción con solvente asistida por ultrasonido durante 15 min (**Figura 13**). Se utilizó una mezcla (40 mL) de cloroformo: metanol en proporción 2:1; los extractos obtenidos se lavaron con agua (10 mL), luego se concentraron a sequedad, inicialmente, en el roto evaporador y, posteriormente con un flujo de nitrógeno, obteniendo así, el material lipídico de los ejemplares macho de *M. viatrix*.



**Figura 13.** Extracción de ácidos grasos de ejemplares machos de *M. viatrix*. Fuente: Los autores del presente trabajo.

**2.2.4.2 Conversión de los ácidos grasos a sus ésteres metílicos:** El análisis de los FA's, se realizó mediante la obtención de sus ésteres metílicos, de acuerdo con la norma ISO 5509, como sigue:

Los lípidos obtenidos previamente, se colocaron en un tubo de ensayo, al cual se le adicionó trifloruro de boro al 14% en metanol (5 mL), la mezcla con agitación contante, se sometió a calentamiento en un baño de aceite a 85°C durante 45 min. Finalizada la transesterificación, se realizó la extracción de los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME'S, por sus siglas en ingles) lavando la mezcla de reacción tres veces con hexano (1 mL x 3). Del extracto orgánico se tomaron 0.5 mL, la mezcla se aforó a 1 mL con hexano y se inyectó la solución (0.2 µL) al cromatógrafo para su análisis.

Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo HP 5890 *Series II (Hewlett-Packard)*, equipado con un puerto de inyección *split/splitless* (relación de *split* 30:1). Para la separación de los analitos se utilizó una columna capilar de sílice fundida DB-5, de fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) [60 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e.)] (*Hewlett-Packard, Little Falls, PA, EE.UU.*). Se empleó un detector de ionización en llama (FID).

**2.2.4.3 Identificación de los ácidos grasos:** La identificación de los ácidos grasos (FA's, por sus siglas en ingles) en la muestra, se realizó por comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) de sus ésteres metílicos, con los de una mezcla certificada de FAME's (GLC10, GLC50, GLC70, GLC80 y GLC100), adquirida de Matreya, Inc., Pennsylvania, EE.UU. Los patrones se analizaron bajo las mismas condiciones cromatográficas de las muestras.

**2.2.4.4 Cuantificación de ácidos grasos:** La cuantificación de los ácidos grasos, se realizó por normalización simple, mediante la determinación del porcentaje que representa el área de pico de cada éster metílico, con relación al área total resultante de la sumatoria de áreas de todos los picos.

El mismo procedimiento se llevó a cabo para la determinación del perfil de ácidos grasos de moscas hembras.

## **2.3 OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS VOLÁTILES DEL FRUTO DE PIÑA (*Ananas comosus*), EN DIFERENTES ETAPAS DE SU MADURACIÓN**

**2.3.1 Recolección de las muestras.** Los frutos requeridos fueron adquiridos en las veredas Palonegro, el Santero y la Aguada del Municipio de Lebrija, Santander. Se recolectaron muestras (10 kg) de 3 edades de la planta: 520 días (floración), 580 días (post-floración) y 640 días (piña madura)<sup>1</sup>. Las muestras fueron recolectadas en diferentes sembradíos de la zona, de forma aleatoria, dada la irregularidad de crecimiento en los cultivos.

**2.3.2 Microextracción en fase sólida en el modo *headspace*:** Para determinar las mejores condiciones de extracción de los volátiles de la piña, se utilizó como recubrimiento de fibra PDMS-DVB de 65 µm. Las variables evaluadas fueron la temperatura la muestra y el tiempo de exposición de la fibra. Para la determinación del tiempo, se expuso la fibra a los vapores de la muestra durante 5, 15 y 30 min, manteniendo la temperatura constante; las temperaturas usadas fueron: 25, 45, 60 y 80°C. Las fracciones volátiles aisladas por HS–SPME se analizaron por GC-FID.

**2.3.3 Selección del tiempo y temperatura de extracción:** Se picó y se homogeneizó la pulpa y la cáscara de piña madura (1 kg). Haciendo uso de un extractor de jugos, se obtuvo el zumo del fruto, el cual se centrifugó y se filtró para retirar la fibra. Se tomaron 15 g del filtrado en un vial para *headspace* de 20 mL, se adicionó NaCl al 10%, y se selló herméticamente. Las muestras se dejaron en pre-equilibrio por 15 min. Posteriormente, el vial se colocó en un baño de aceite a la temperatura de prueba (27, 45, 60 y 80°C), manteniéndose constante el tiempo para cada temperatura. Luego, a los vapores de la muestra se expuso una fibra para SPME con recubrimiento de poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65µm, en modo de espacio de cabeza, durante el tiempo fijo (5, 15 ó 30 min).

La desorción de los analitos de la fibra, se realizó luego en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, a una temperatura de 250°C, durante 10 min. Se utilizó un

---

<sup>1</sup> Los días se calcularon a partir del día en que se sembraron los colinos.

cromatógrafo de gases *Agilent 7890A (Agilent Technologies, Miami, Florida, EE.UU.)*, con detector de ionización en llama (FID) operado a 250°C y con flujos de aire e hidrógeno de 300 y 30 mL/min, respectivamente. Se utilizó una columna de sílice fundida DB-5, de fase estacionaria 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) [30 m x 250 µm (d.i.) x 0,25 µm(f.e.)]. La programación de temperatura para la columna fue desde 45°C por 5 min, a 4°C/min hasta 150°C (2 min); 5°C/min hasta 250°C (5 min).

**2.3.4 Análisis de los volátiles de la piña (*Ananas comosus*) por GC-MSD:** Con base en las condiciones de temperatura y tiempo de extracción escogidos en el Numeral 2.2.3, se realizó la extracción de los volátiles de las piñas en tres estados (490, 520 y 630 días posterior a la siembra de los colinos), exponiendo la fibra de SPME, con recubrimiento de PDMS-DVB. La muestra se preparó siguiendo el procedimiento mencionado en el numeral anterior.

La desorción de los analitos de la fibra se realizó en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, a una temperatura de 250°C durante 10 minutos. Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo HP 5890 *Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE.UU.)*, la inyección se hizo de forma manual en modo *splitless*. Para la separación de los analitos se utilizó una columna capilar de sílice fundida HP-5, de fase estacionaria de 5%-fenil-poli(dimetilsiloxano) [30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25µm (f.e.)] (*Hewlett-Packard, Little Falls, PA, EE.UU.*). El GC fue acoplado a un detector selectivo de masas *Hewlett-Packard*, modelo HP 5972, con sistema de ionización por impacto de electrones (70 eV), temperatura de la cámara de ionización 180°C y un analizador másico cuadrupolar operado en modo *full scan* desde 40 hasta 400 unidades de masa ( $m/z$ ).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 EMISIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE LA MOSCA DE LA PIÑA *M. viatrix*.

**3.1.1 Obtención de ejemplares.** El período de empupamiento de las larvas de *M. viatrix* varió entre 19 y 24 días. La tasa de natalidad promedio fue del 50%. La proporción promedio de nacimiento entre machos y hembras fue de 2:1. El tiempo de vida máximo de los ejemplares en cautiverio fue de 45 días. La **Tabla 7**, presenta estos resultados en forma detallada. No se observaron diferencias en el color o tamaño de los ejemplares, según su sexo y, en cuanto a evidencias de dimorfismo sexual, sólo se observó la elongación del extremo abdominal presente en las hembras únicamente, correspondiente al oviescapo (**Figura 2**).

**Tabla 7.** Resultados de los ensayos realizados para la obtención de ejemplares adultos de *M. viatrix*.

Lote	Total de larvas sembradas	Total de adultos obtenidos	Tiempo en estado pupal (días)	Número de hembras obtenidas	Número de machos obtenidos	Tiempo máximo de sobrevivencia en estado adulto (días)
1	352	168	20-21	116	62	45
2	136	72	19-21	46	26	3
3	114	56	19-20	37	19	3
4	208	95	19-21	64	31	3
5	120	43	19-21	27	16	4
6	138	55	20-21	37	18	3
7	107	68	20-21	48	20	4
8	73	34	19-20	22	11	23

De 8 intentos de cría realizados para obtener ejemplares de la mosca en cautiverio, sólo en dos ocasiones se logró mantener los insectos vivos hasta su madurez sexual, en los 6 intentos restantes, las moscas no sobrevivieron después de 3 días de haber emergido de la pupa.

Con el fin de determinar las posibles causas de muerte de los insectos se realizaron cambios, en el sitio de crianza, de las jaulas de cría y del régimen alimenticio. Al cambiar el lugar de crianza, no se aumentó el grado de sobrevivencia de los insectos. Con respecto a la variación en la dieta, los dos primeros lotes de insectos fueron alimentados con trozos de piña madura y proteína hidrolizada, en el primer lote, los insectos sobrevivieron y, en el segundo, las moscas murieron después del tercer día de haber emergido de la pupa. El tercer lote fue alimentado sólo con piña, ya que se consideró que la proteína hidrolizada pudiera estar contaminada y ésto fuera la posible causa de las muertes; sin embargo, los insectos continuaron muriendo de forma masiva. Debido a ésto, se pensó que era la piña utilizada en la alimentación la que estaba contaminada con algún insecticida y, dado que *Melanoloma viatrix*, es una mosca perteneciente a la familia de las moscas de la fruta, se intentó alimentar los lotes con trozos de otras frutas, pero no se observó mejora en el grado de sobrevivencia de los insectos.

Como última opción, se decidió cambiar la dieta por una mezcla de leche en polvo y azúcar, tal como lo sugirió el profesor Alfonso Villalobos, codirector del presente trabajo. Pese a ésto, sólo uno de cuatro lotes sometidos a este régimen alimenticio logró sobrevivir más allá de los tres días post-emersión pupal y alcanzar la madurez sexual. Finalmente, no se encontró ninguna relación entre el tipo de alimento suministrado y la sobrevivencia de los insectos y no se logró determinar las causas del deceso masivo de los insectos.

**3.1.2 Observaciones preliminares.** Sobre algunos comportamientos de rutina se observó lo siguiente:

- El horario de alimentación de los insectos fue, preferiblemente, entre las 7 y 9 a.m.
- Hacia las horas de la tarde (alrededor de las 5:00 p.m.), los insectos se agregaban, organizándose en filas para disponerse a dormir.
- Durante el día los insectos tomaban un color tornasolado al exponerse a la luz solar.
- La cópula se presentó entre los 12 y 13 días posteriores a la emersión pupal (**Figura 14**), entre la 1 y 4 p.m. Momentos previos a la cópula, se observó al macho y a la hembra ubicarse uno frente al otro por varios minutos, con un constante balanceo alar, así como

la formación de una burbuja de color amarillo en el aparato bucal tanto en machos como en hembras.

**3.1.3 Monitoreo de compuestos volátiles emitidos por los insectos adultos de *M. viatrix*.** Se empleó como técnica de extracción de analitos la SPME en modo *headspace*. Los insectos fueron muestreados *in vivo*, entre las 8 a.m. y las 4 p.m. No se detectó ningún compuesto que indicara la emisión de alguna sustancia volátil producida por los insectos, en ninguno de los dos géneros antes del día 11.

En los días 11, 12 y 13 después de emerger de la pupa, se detectó una señal proveniente de los ejemplares machos; para las hembras no se observó ningún registro cromatográfico.



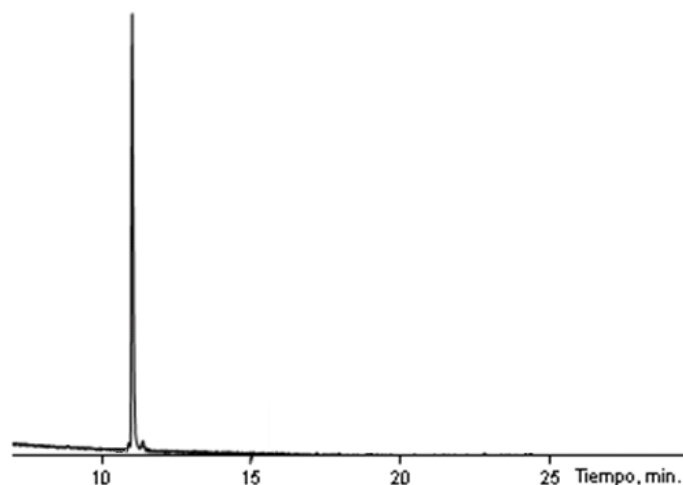
**Figura 14.** Moscas copulando el día 12 después de haber emergido de la pupa. Fecha: 7 de enero de 2009. Fuente: Los autores del presente proyecto.

No fue posible establecer si la sustancia detectada, emitida por los machos durante el período de la cópula, correspondía o no a la feromona sexual de la *M. viatrix*. Sin embargo, la emisión de esta sustancia coincidió con la observación del comportamiento sexual, fue horas previas a la cópula y con los reportes de la literatura que han determinado que lo común en moscas de la fruta es que la feromona sexual sea liberada por los machos [27].

Antes de iniciar los ensayos con los ejemplares de la mosca, se realizaron blancos de la fibra y del vial. En estos ensayos, los cromatogramas obtenidos no presentaron picos que indicaran la presencia de posibles interferencias en el muestreo de volátiles (**Anexo 1**). De igual manera, en el **Anexo 2** se presenta el cromatograma obtenido para el muestreo de los compuestos volátiles emitidos por ejemplares de hembras de *M. viatrix*, donde no se observan picos que indiquen algún compuesto.

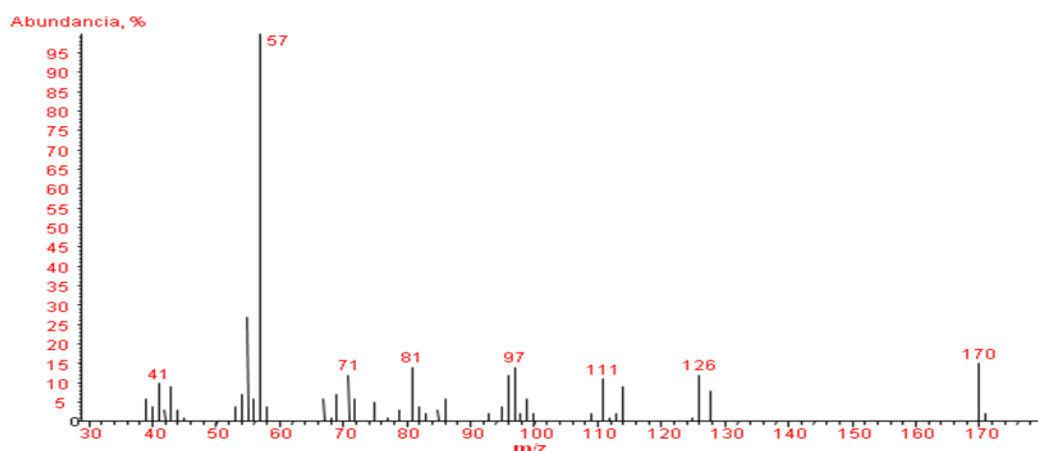
En la **Figura 15** se observa el cromatograma que muestra la señal de una sustancia emitida por los ejemplares machos durante el período previo a la cópula. Al hacer seguimiento al compuesto volátil, se encontró que dicha sustancia era liberada entre las 10 a.m. y las 4 p.m., de forma tal, que el pico cromatográfico presentó su mayor intensidad entre las 11:00 a.m. y 12:00 m.

El índice de retención calculado para este compuesto, utilizando una columna DB-5, fue de 1137, valor que se encuentra entre los asignados a los hidrocarburos saturados lineales undecano y dodecano, cuyos índices de retención son respectivamente 1100 y 1200. Este parámetro ha de servir como criterio para el reconocimiento de la sustancia emitida, por comparación con los índices de retención reportados en las bases de datos (NIST, Adams, Willey), para columnas cromatográficas de las mismas características.



**Figura 15.** Cromatograma del compuesto obtenido por HS-SPME (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ), al muestrear *in vivo* los volátiles emitidos por ejemplares machos de *M. viatrix*. Condiciones cromatográficas: columna DB-5 (30 m). Inyección manual en modo *splitless*. Detector de MS (EI, 70 eV).

Con el fin de determinar la naturaleza química de la sustancia emitida por los ejemplares machos del insecto, se obtuvo su espectro de masas (**Figura 16**).



**Figura 16.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto emitido por los machos de *M. viatrix*, aislado por HS-SPME.

En este espectro de masas, se presume, que el ion molecular ( $M^{++}$ ) es el pico en  $m/z$  170, que estaría acompañado del ion isotópico ( $M+1$ ) en  $m/z$  171. No se aprecian los iones isotópicos  $M+2$  y  $M+4$ , que pueden indicar la presencia de heteroátomos en la molécula, como cloro, bromo, azufre o silicio.

De acuerdo con la regla del nitrógeno, y teniendo en cuenta que el ion  $M^{++}$  tiene masa par, es correcto afirmar que la molécula no posee nitrógeno o puede tener un número par de átomos de nitrógeno.

Para establecer una posible fórmula molecular, se puede empezar determinando la probabilidad isotópica de  $M+1$  con respecto a  $M^{++}$ , de acuerdo con las intensidades de los picos en el espectro de masas, las cuales se presentan en la **Tabla 8**.

**Tabla 8.** Espectro de masas del compuesto emitido por los machos de *M. viatrix* (EI, 70 eV). Se presentan los iones con la intensidad relativa  $I \geq 1\%$ .

$m/z$ (I, %)
39(5), 41(12), 42(4), 43(11), 53(4), 54(11), 55(32), 57(100), 68(7), 71(19), 76(7), 81(18), 82(2), 84(3), 86(6), 92(2), 94(4), 95(12), 96(12), 97(14), 98(6), 108(2), 111(9), 112(2), 114(8), 126(14), 128(9), 170(15), 171(2)

La probabilidad isotópica se calculó como sigue:

$$\frac{I_{M+1}}{I} = (\# \text{ átomos de C})(I, \%)$$

Con base en esta ecuación, se puede estimar el número de átomos de carbono que probablemente se encuentran en la molécula:

$$\frac{2}{15 \times 1.1} * 100 = (\# \text{ átomos C}) \quad \Longrightarrow \quad \frac{2}{15 \times 1.1} * 100 = 12$$

Por lo anterior, se puede concluir que el compuesto posiblemente tenga 12 átomos de carbono, los cuales, contribuyen con una masa de 144 (12 átomos C x 12 u.m.a). Esto deja 26 unidades de masa.

Con base en la información anterior, se puede descartar la presencia de nitrógeno en la molécula, ya que se necesitaría un número par de éstos átomos, lo cual sumaría 28 unidades de masa y sólo se dispone de 26. Adicionalmente, en el espectro de masas obtenido no se presentan iones-fragmento característicos de moléculas nitrogenadas como  $m/z$  30, 44, 58 y 72, ni pérdidas de 16 ó 17 unidades de masa, para el caso de compuestos alifáticos nitrogenados, ni de 26 y 27 unidades para nitritos aromáticos y heterociclos nitrogenados, respectivamente.

Si se descarta la contribución del oxígeno al ion molecular, se puede sugerir que las 26 unidades de masa pueden corresponder a átomos de hidrógeno, con una posible fórmula molecular así:  $C_{12}H_{26}$ .

A continuación, se presenta el cálculo del índice de deficiencia de hidrógeno, que indica, si hay anillos o dobles enlaces en la molécula.

$$\boxed{A + de = X - Y/2 + Z/2 + 1}$$

Donde:

A= N° de Anillos

X= N° de átomos de C

Z= N° átomos de N y P

de = N° de enlaces dobles

Y= N° de átomos de H

$$\boxed{A + de = 12 - 26/2 + 1 = 0}$$

El índice de deficiencia de hidrógeno para el número de átomos de carbono e hidrógeno propuesto es cero, lo cual puede sugerir la ausencia de insaturaciones o anillos en la estructura molecular en cuestión. Sin embargo, no se debe dejar de lado que la presencia de los iones en  $m/z$  41 y 55, correspondientes a los fragmentos alilo y metilalilo, sí pueden insinuar la existencia de insaturaciones.

El espectro de masas exhibe algunos iones-fragmento característicos para los hidrocarburos saturados, que hacen parte de la serie homologa  $C_nH_{2n+1}$  ( $m/z$  43, 57, 71), acompañados de los picos de menor intensidad de las series  $C_nH_{2n-1}$  ( $m/z$  41, 55, 69) y  $C_nH_{2n}$  ( $m/z$  42, 56, 70), que se originan a partir de la eliminación de fragmentos radicalarios por ruptura heterolítica simple, y por la pérdida de moléculas de etileno a partir de cationes alquílicos. Sin embargo, la serie se interrumpe después del ion  $m/z$  71, lo cual no permite concluir que el compuesto sea un hidrocarburo saturado.

En el espectro se observa que la distribución de las intensidades de los picos no ocurre en forma de curva suave, exponencial, similar al caso de los hidrocarburos lineales lo cual es característico para los hidrocarburos saturados ramificados, debido a que la fragmentación tiene lugar preferiblemente en las ramificaciones.

El pico de base en el espectro de masas de la **Figura 16**, para el compuesto registrado, aparece en  $m/z$  57, que puede relacionarse, principalmente, con un carbocatión de alta estabilidad como el catión *ter*-butílico  $[(C_3H_9C^+)]$ , a la vez, que indica la probable presencia de ramificaciones. Sin embargo, ésto no es suficiente para afirmar que se está ante un hidrocarburo ramificado, dado que en el espectro de masas los iones correspondientes a la pérdida de 15 y 29 unidades no aparecen. La ausencia de dichos iones puede estar relacionada con la cantidad tan pequeña de muestra utilizada.

En el espectro de masas del compuesto registrado (**Figura 16**), se observan los iones en  $m/z$  126 y 128 que corresponden a pérdidas de 44 y 42 unidades, que son típicas para compuestos oxigenados, y pueden indicar la eliminación de  $CO_2$  y ceteno  $CH_2=C=O$ , respectivamente. Estas pérdidas son posibles para moléculas que presentan al menos dos átomos de oxígeno en su estructura.

Si se presume que la molécula tiene dos átomos de  $^{16}\text{O}$ , equivalentes a un fragmento  $\text{C}_2\text{H}_8$ , la fórmula molecular del compuesto sería  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ .

Sin embargo, no se puede dejar de lado, que en el espectro de masas no aparecen fragmentos típicos para compuestos oxigenados en  $m/z$  31, 45, 59, 73...., característicos para alcoholes y cetonas, ni pérdidas de 17, 18, 28 ó 29 unidades de masa con respecto al ion molecular, que también puede sugerir la presencia de oxígeno en la molécula.

A continuación, se presenta el cálculo del índice de deficiencia de hidrógeno para la fórmula molecular  $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}_2$ .

$$\mathbf{A + de = X - Y/2 + Z/2 + 1}$$

Donde:

A= N° de Anillos

X= N° de átomos de C

Z= N° átomos de N y P

de = N° de enlaces dobles

Y= N° de átomos de H

$$\mathbf{A + de = 10 - 18/2 + 1 = 2}$$

Según el cálculo efectuado, la molécula puede presentar dos ciclos, un ciclo y un doble enlace o dos dobles enlaces. Los dos ciclos se pueden descartar debido a que los espectros de masas de los compuestos cíclicos, se caracterizan por presentar un ion molecular de alta intensidad, ésto, especialmente debido a que, para obtener fragmentos de una molécula cíclica es necesaria la ruptura de mínimo dos enlaces. Adicionalmente, la fragmentación de los anillos, generalmente, se caracteriza por la pérdida de dos átomos de carbono en forma de  $\text{C}_2\text{H}_4$  (28) y  $\text{C}_2\text{H}_5$  (29), y ésto no se observa en el espectro obtenido. Por lo anterior, se sugiere que esta fórmula molecular correspondería a una molécula que posiblemente ha de poseer un par de enlaces dobles.

Dada la información obtenida del espectro de masas y las limitaciones del mismo, y según las fórmulas moleculares propuestas, se puede hacer una aproximación, de acuerdo con la cual, el espectro de masas podría corresponder a un hidrocarburo saturado ramificado

o a un compuesto oxigenado con dos insaturaciones. Los posibles iones fragmento para cada una de las masas del espectro se relacionan en la **Tabla 9**.

Hay que tener presente, que la espectrometría de masas, aunque es una herramienta muy importante para la identificación de compuestos, en este caso, no es suficiente para proponer una estructura molecular. Es necesario el uso de otras herramientas, por ejemplo, la ionización química para confirmar la masa molecular, la espectroscopía de infrarrojo, para determinar grupos funcionales, o la RMN, para obtener mayor información estructural.

**Tabla 9.** Fragmentos típicos para los valores de  $m/z$  del espectro de masas del compuesto emitido por la mosca *M. viatrix*.

$m/z$	Los iones fragmentos posibles
41	$C_3H_5$ ,
43	$C_3H_7$ , $CH_3C=O$ , $CH_3C=G$ ( $G=R$ , Ar, OR, OH)
55	$C_4H_7$ , $CH_2=CHC=O$
57	$C_4H_9$ , $C_2H_5C=O$ , $C_3H_9O$
71	$C_5H_{11}$ , $C_3H_7C=O$ , $CH_3)_2$ , $C_2H_5$
81	$C_6H_9$ , $C_5H_5O$
97	$C_7H_{13}$ ,
113	$C_6H_{12}$
128	$C_9H_{20}$ , $C_7H_{16}O$ , $C_5H_{12}O_2$

Fuente: Spectrometric identification of organic compounds [58]

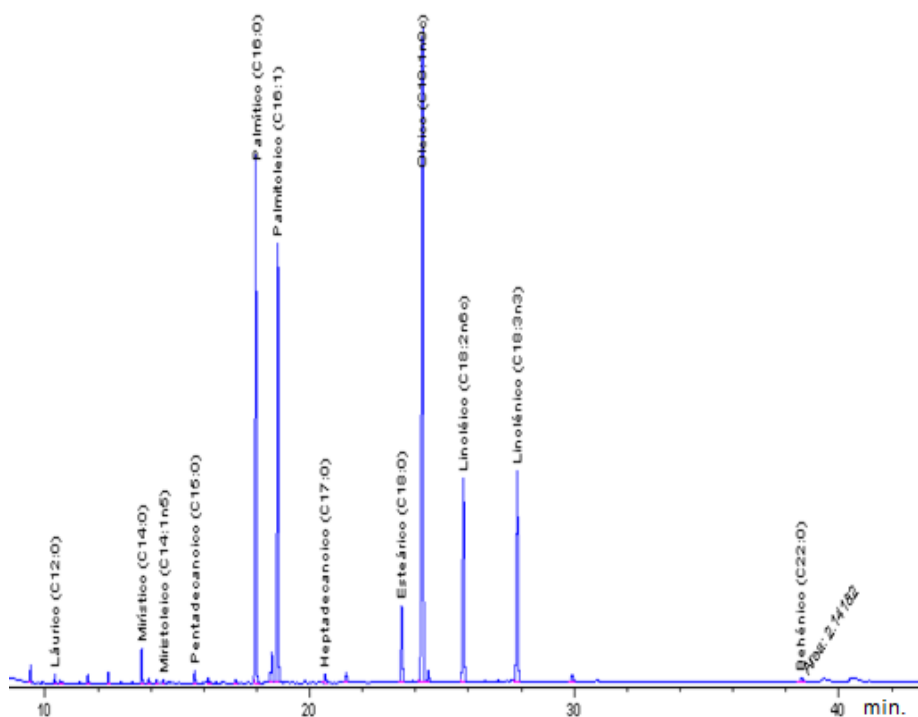
**3.1.4 Perfil de ácidos grasos.** Según se ha establecido, los ácidos grasos están implicados en la biosíntesis de la feromona sexual de diferentes insectos [28]. Por ejemplo, en el caso de la mosca doméstica, la biosíntesis del 9 (*Z*)-tricoseno, principal componente de la feromona sexual, se inicia con la desaturación del ácido esteárico en el carbono 9, para dar lugar a la formación del ácido oléico, que luego, se transforma a un compuesto de 24 átomos de carbono, finalmente se produce un alcano con un átomo de carbono menos.

Así, la existencia de posibles diferencias en la composición de ácidos grasos, entre machos y hembras, podría aportar información sobre cuál género es emisor y cuál es la posible naturaleza química de la feromona.

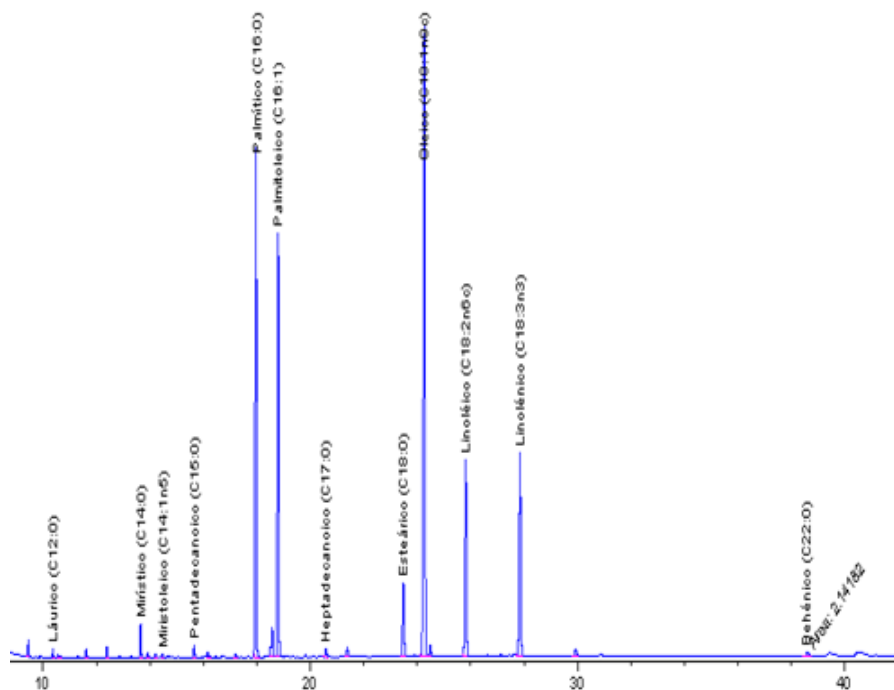
La determinación de los ácidos grasos de moscas *M. viatrix* se llevó a cabo empleando como técnica la extracción con solvente, seguida de derivatización. Esta técnica se describe en el **Numeral 2.2.4**, de la Metodología Experimental.

La identificación de los ácidos grasos, se realizó por comparación de los  $t_R$  de los ésteres metílicos presentes en los extractos aislados de insectos, con los de una mezcla certificada de patrones de ésteres metílicos de ácidos grasos, analizados bajo las mismas condiciones cromatográficas, empleando GC-FID como técnica analítica.

En las **Figuras 17 y 18**, se presentan los perfiles cromatográficos de los ácidos grasos obtenidos de las hembras y los machos de *M. viatrix*, respectivamente.



**Figura 17.** Perfil cromatográfico de los ácidos grasos (en forma de sus ésteres metílicos) aislados de hembras de la mosca *M. viatrix*. Columna DB-264 (30 m). FID.



**Figura 18.** Perfil cromatográfico de ácidos grasos (en forma de sus ésteres metílicos) aislados de machos de la mosca *M. viatrix*. Columna DB-64 (30 m). FID.

En la **Tabla 10**, se reportan los promedios de las cantidades relativas (%) de ácidos grasos presentes en las moscas *M. viatrix*. Como se puede observar, el tipo de ácidos grasos presentes en los insectos no varía con el sexo.

Se puede apreciar, que se presentan en mayor cantidad los ácidos oléico, linoléico, linolénico y palmitoleico, que son ácidos grasos esenciales. La **Figura 19** representa la cantidad relativa (%) y la composición de ácidos grasos, por sexos, para las moscas *M. viatrix*. La cuantificación de los ácidos grasos se llevó a cabo por el método de normalización simple de áreas cromatográficas.

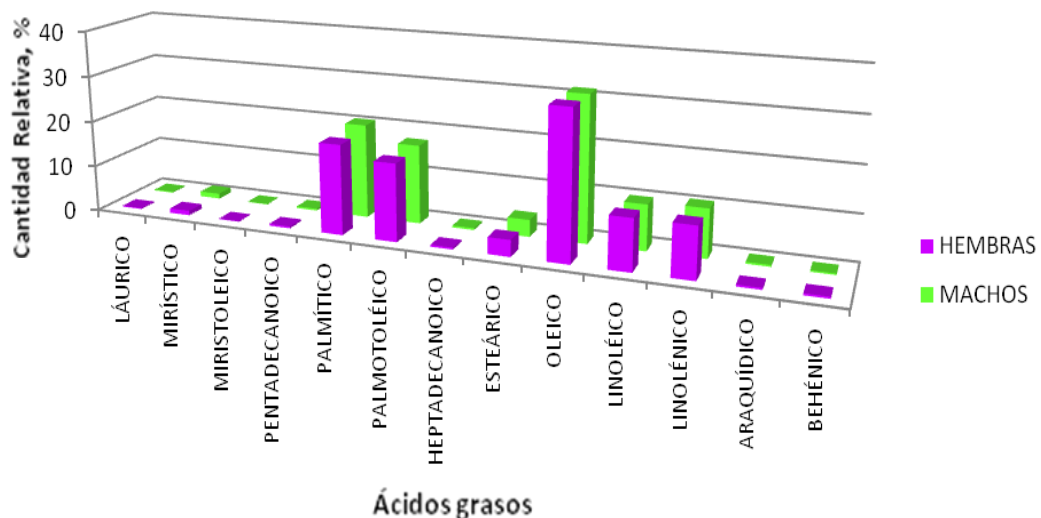
La mayoría de feromonas de insectos son hidrocarburos cuticulares, y su biosíntesis, especialmente, alquenos, a partir de ácidos grasos, se controla por hormonas; por ello, aunque no existan diferencias en cuanto la composición de ácidos grasos entre los géneros, es posible que exista diferencia en la composición de hidrocarburos, ya que tanto machos, como hembras, parecen tener las mismas rutas biosintéticas, que pueden ser modificadas para producir hidrocarburos de la longitud de cadena adecuada, de

acuerdo con su edad y sexo, lo que constituye una posible diferencia entre machos y hembras [27].

**Tabla 10.** Cantidad relativa (%) de ácidos grasos aislados de los insectos de *M. viatrix*. Se reportan datos para ambos sexos.

t <sub>R</sub> , min	Ácidos grasos	Nomenclatura	% Cantidad Relativa,%*	
			HEMBRAS	MACHOS
10,4	LÁURICO	(C12:0)	0,2	0,2
13,7	MIRÍSTICO	(C14:0)	1,0	1,1
14,5	MIRISTOLEICO	(C14:1n5)	0,1	0,1
15,7	PENTADECANOICO	(C15:0)	0,4	0,4
18,0	PALMÍTICO	(C16:0)	19,5	20,5
18,8	PALMOTOLÉICO	(C16:1)	16,8	17,2
20,6	HEPTADECANOICO	(C17:0)	0,4	0,4
23,5	ESTEÁRICO	(C18:0)	3,6	3,7
24,2	OLEICO	(C18:1n9c)	31,8	31,5
25,8	LINOLÉICO	(C18:2n6c)	11,1	9,9
27,8	LINOLÉNICO	(C18:3n3)	11,1	10,5
29,9	ARAQUÍDICO	(C20:0)	0,4	0,4
38,6	BEHÉNICO	(C22:0)	0,4	0,3

\*Valor promedio (n=2)



**Figura 19.** Comparación de la cantidad relativa (%) de ácidos grasos, por sexo, en *M. viatrix*.

### **3.2 VARIACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES PRESENTES EN LOS FRUTOS DE PIÑA (*Ananas comosus*), DURANTE SU MADURACIÓN.**

Según se ha establecido, las moscas de la superfamilia *Tephritoidea* se han caracterizado por ser insectos saprófagos que han evolucionado hacia la fitofagia [15]. Por lo anterior, es probable considerar al menos dos posibles opciones acerca del porqué los insectos ovopositan sobre los frutos de piña: la primera, es que las moscas sean atraídas por el olor de la gallinaza, u otros productos compostados, utilizados para abonar el cultivo; y la segunda, que el fruto emita alguna sustancia que atraiga el insecto.

El presente estudio se centró en la segunda opción, ya que de ser posible determinar las sustancias que inducen la ovoposición, éstas, al igual que la feromona sexual, podrían ser empleadas para el control etológico de dicho insecto en el cultivo de piña.

Tal como se mencionó en el **Apartado 1.2.1**, hasta donde los autores conocen, no se sabe si la ovoposición de *M. viatrix* ocurre durante la etapa de floración o de post-floración de la piña. Igualmente, se desconoce cuáles podrían ser los atrayentes químicos que inducen la ovoposición del insecto. Así, un primer paso para determinar los posibles atrayentes, consiste en estudiar la composición y su variación de la fracción volátil del fruto durante su desarrollo.

#### **3.2.1 Determinación de condiciones de extracción**

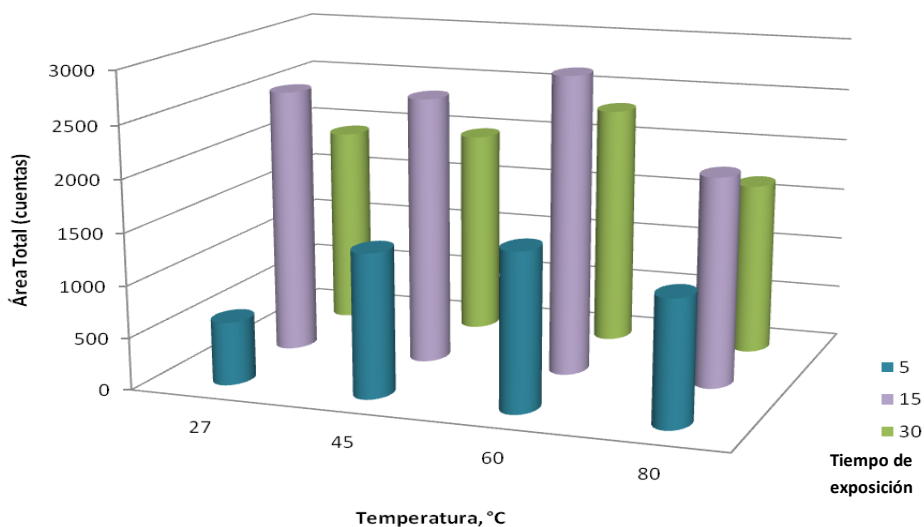
El efecto de la temperatura sobre el proceso de extracción por SPME, usando una fibra PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$ , de los analitos volátiles de los frutos de piña, se evaluó realizando la extracción a diferentes temperaturas, 25, 45, 60 y 80°C.

Con el propósito de obtener los perfiles de los compuestos volátiles extraídos para cada una de las temperaturas, se variaron los tiempos de exposición de la fibra, así: 5, 15 y 30 minutos, en modo *headspace*, de una muestra de 10 g de pulpa y cáscara de piña, finamente homogeneizadas y contenidas en un vial de 15 mL. El tiempo de pre-equilibrio para la muestra fue de 15 min y el tiempo de desorción de la fibra en el puerto de inyección del sistema cromatográfico fue de 10 min, para todos los ensayos.

La **Figura 20** representa los efectos de la temperatura y del tiempo de exposición de la fibra, para cada ensayo, sobre el área total de picos cromatográficos obtenidos. Las mejores condiciones de extracción se escogieron utilizando como criterio el área total (cuentas) de los picos cromatográficos.

Es de observar que el incremento en el tiempo de exposición de la fibra en modo *headspace* hasta 15 minutos, condujo a la extracción de un mayor número de analitos volátiles presentes. Igualmente, para los ensayos realizados en dicho tiempo, el área total de los picos cromatográficos resultó mucho mayor que para los demás experimentos.

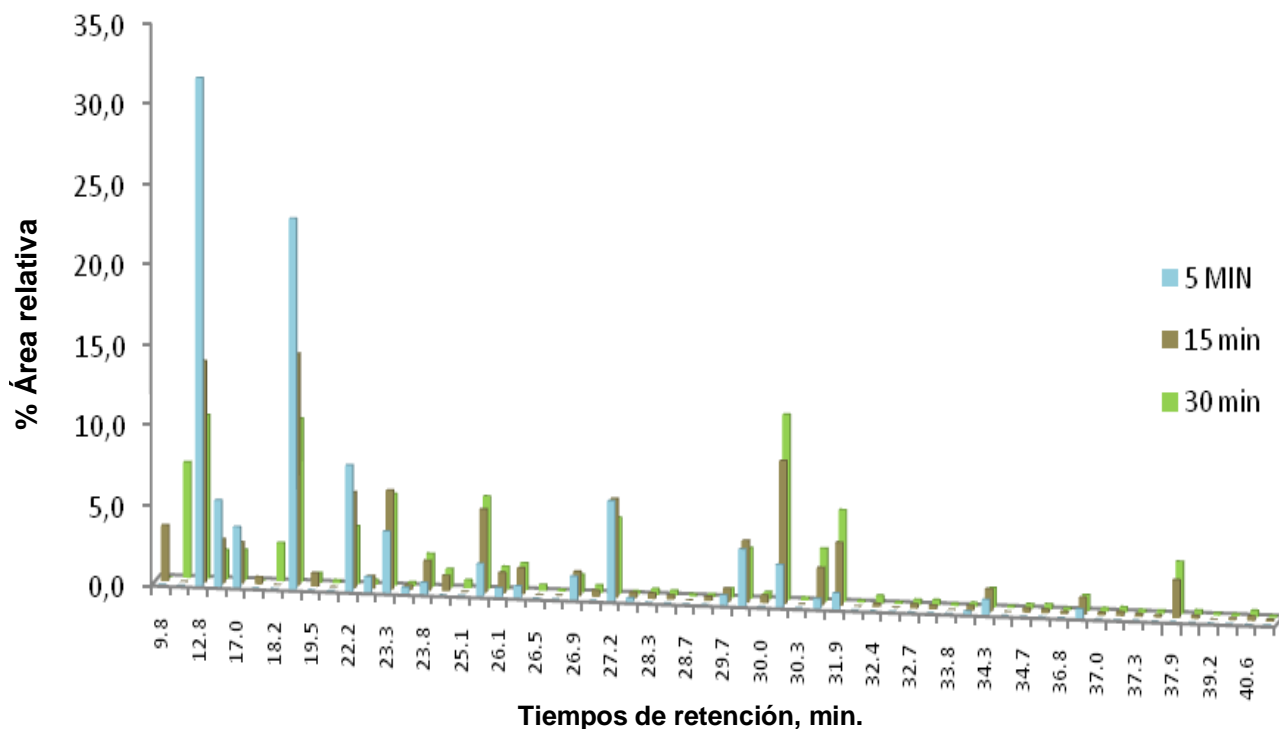
De igual forma, un incremento en la temperatura de extracción aumenta la cantidad de analitos extraídos; sin embargo, a temperaturas mayores de los 60°C, la cantidad de volátiles aislados resulta menor que a las temperaturas inferiores. Esto se debe, a que el equilibrio HS-recubrimiento de la fibra se ve afectado por la temperatura de la muestra durante la extracción, ya que los coeficientes de partición dependen de la temperatura y la extracción de los analitos por la fibra es un proceso exotérmico. Así, el incremento de la temperatura conduce a la superación de barreras energéticas para la liberación de los analitos de la muestra y el incremento de la presión de vapor de los mismos, pero también favorece la desorción de los analitos desde el recubrimiento de la fibra.



**Figura 20.** Efecto de la temperatura y del tiempo exposición de la fibra sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME (PDMS-DVB, 65  $\mu\text{m}$ ) de los compuestos volátiles de la pulpa y cáscara de la piña madura.

Los fenómenos de adsorción en la superficie del recubrimiento, por medio de los cuales se logra la extracción de los analitos con una fibra de PDMS/DVB, son procesos competitivos, que dependen de la temperatura, el tiempo de exposición de la fibra, la afinidad de los analitos por el recubrimiento, el tamaño molecular y su volatilidad.

Ya que la superficie de adsorción del recubrimiento de la fibra es limitada, cabe señalar, tal como lo representa la **Figura 21**, que los analitos más volátiles, aquellos de menor tiempo de retención, son los primeros en ocupar la superficie de adsorción del recubrimiento. Por lo anterior, a tiempos de exposición (5 min) cortos, se extraerán éstos mayoritariamente. Sin embargo, a medida que aumenta el tiempo de exposición, los analitos muy volátiles serán parcialmente desplazados de la superficie por compuestos más pesados y de mayor tiempo de retención ( $t^{\circ}$  eb. más altas).

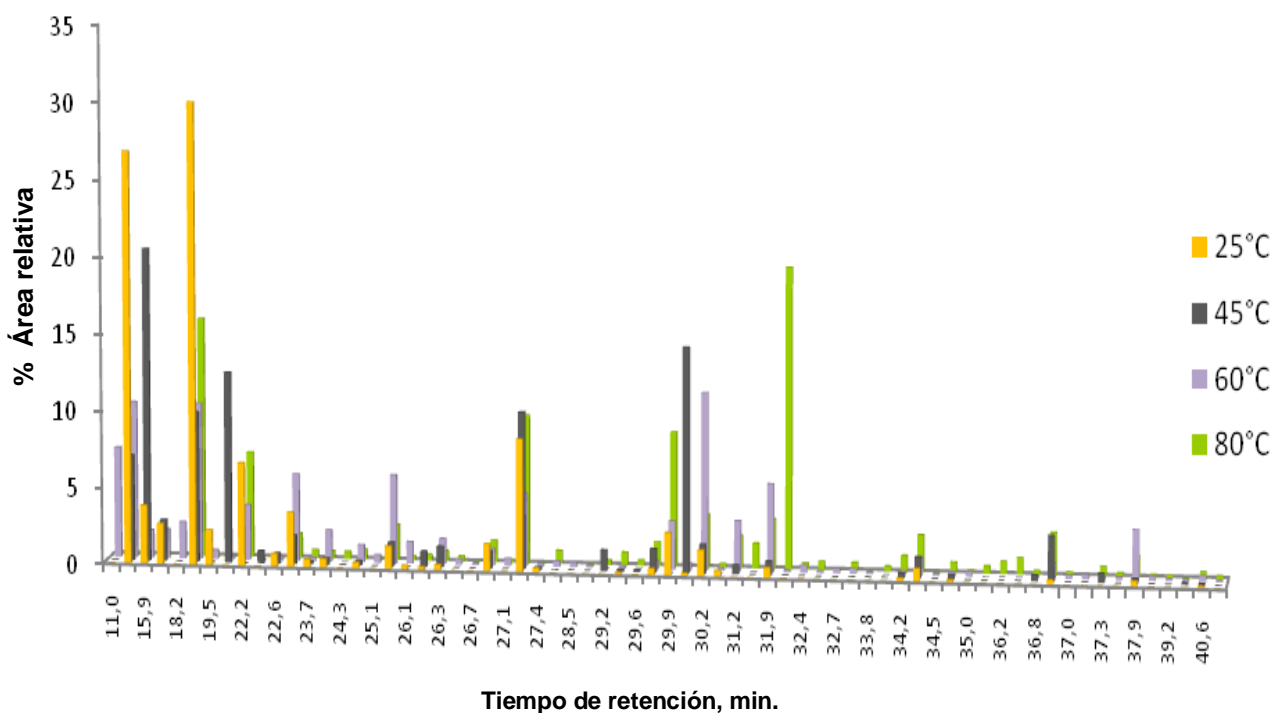


**Figura 21.** Efecto del tiempo (min) sobre la eficiencia de extracción por HS – SPME (PDMS – DVB, 65  $\mu$ m) de la pulpa y cáscara de la piña madura, a 60°C.

De acuerdo con los resultados obtenidos para el efecto de la temperatura en el proceso de extracción (**Figura 22**), se puede observar que a 25°C los centros de adsorción son principalmente copados por los compuestos de mayor volatilidad (menores tiempos de

retención). Sin embargo, al aumentar la temperatura a 60°C, estos analitos se desplazan por compuestos más pesados, observándose su mayor extracción. A 80°C, los analitos más volátiles se adsorben en menor proporción; ésto ocurre debido a su desorción de la fibra o por la saturación del *headspace* con vapor de agua, ya que el porcentaje de humedad cercano al 90% en el *headspace* puede reducir la eficiencia de la extracción en un 10% [59].

Debido a la complejidad de la matriz, el alto número de analitos a extraer, la relación entre la cantidad de analitos extraída por SPME y su concentración en la muestra, no puede considerarse lineal, ya que ésta depende de la afinidad de los analitos por el recubrimiento y del tiempo de exposición de la fibra, por ello, no resulta posible reportar datos cuantitativos de los analitos en la matriz [59].



**Figura 22.** Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción por HS–SPME (PDMS–DVB, 65 µm) de los volátiles de la pulpa y cáscara de la piña madura, durante 15 minutos de exposición del recubrimiento.

Sin embargo, es posible cuantificar los analitos extraídos por el recubrimiento haciendo uso de sus patrones certificados, realizando las curvas de calibración mediante el empleo

de una matriz simulada, enriquecida con patrones de los analitos, en cantidad conocida. De lo contrario, estos datos no necesariamente reproducen la cantidad en que los analitos se encuentran presentes en la matriz.

Dado el carácter exploratorio del presente trabajo, finalmente, se seleccionaron como mejores condiciones de operación, para el monitoreo de los volátiles de la piña por HS-SPME, las siguientes: 15 min de exposición de la fibra a 60°C.

**3.2.2 Análisis de los volátiles de piña de tres edades diferentes.** El análisis por HS-SPME-GC-MS, de muestras de piña, en tres estados diferentes, estableció, bajo las condiciones experimentales empleadas, la presencia de 10 compuestos para la fruta en estado de floración (Figura 23), 10 compuestos en estado de post-floración (Figura 24) y 20 compuestos para la piña madura (Figura 25).

Mediante los criterios cromatográfico (índices de retención) y espectroscópico (espectros de masas), y por comparación de los espectros de masas experimentales con los reportados en la literatura [10-12, 63] o en las bases de datos de Adams, NIST y Wiley, se identificaron 7 compuestos para la piña en estado de floración, el 73% del total de compuestos registrados (Tabla 10); 7 compuestos para la piña en estado de post-floración (Tabla 11) y 18 para la piña madura (Tabla 12), que correspondieron, respectivamente, al 74 y 82% de las sustancias detectadas en los extractos.

Los extractos obtenidos por HS-SPME de la piña en floración y post-floración, estaban constituidos principalmente por aldehídos, 45% y 60%, y alcoholes, 28% y 14%, respectivamente. Para el caso de la piña madura, la composición se distribuyó de tal forma que el 51.9% correspondió a ésteres, el 10.6% a acetoxiésteres, el 6.4% a hidrocarburos y el 1.1% a tioésteres.

Los compuestos encontrados en los extractos de piña en floración y post-floración, *e.g.*, el hexanal, el octen-3-ol y el linalool, han sido reportados como constituyentes de extractos obtenidos por extracción líquido-líquido, de piñas verdes de origen filipino [10]. En piña madura, los constituyentes extraídos en mayor proporción, mediante la técnica HS-SPME, fueron los ésteres metílicos y etílicos de los ácidos octanoico y hexanoico, que

poseen notas olfativas con reminiscencias a la fruta fresca; adicionalmente, otros ésteres encontrados en la fracción volátil, como el butanoato de etilo, 2-metil butanoato de etilo, fueron descritos como compuestos con notas olfativas de piña [60].

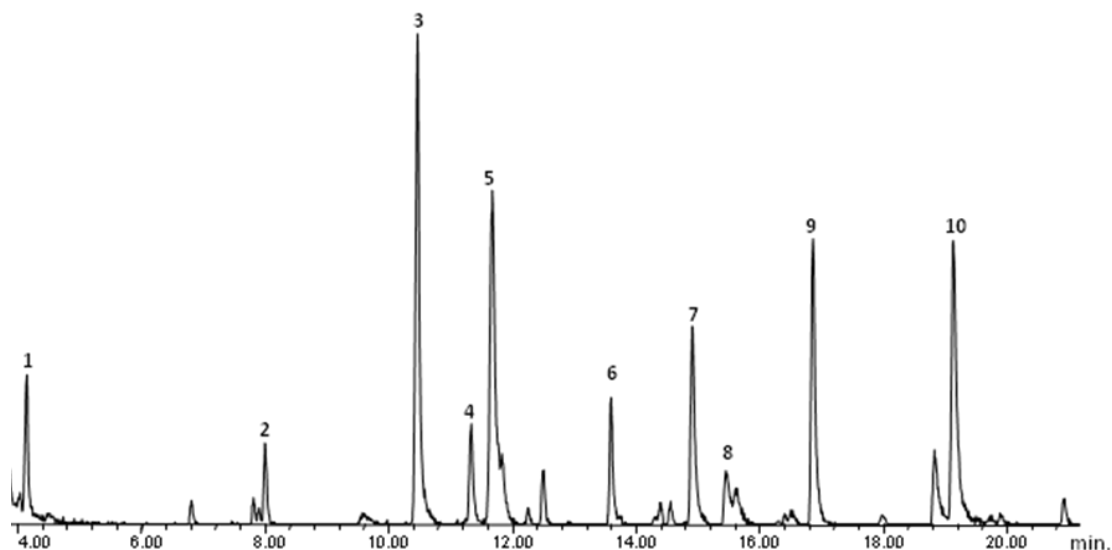
Es de aclarar, que la composición porcentual del extracto de piña obtenido por extracción líquido-líquido, no necesariamente ha de corresponder con la composición porcentual de la fracción volátil, aislada por la técnica HS-SPME, ya que esta última está directamente relacionada con los fenómenos competitivos entre los analitos por la superficie de adsorción del recubrimiento de la fibra de PDMS-DVB, de forma tal, que la composición de la mezcla volátil, extraída con la fibra, no necesariamente reproducirá la composición del extracto.

El número de compuestos detectados fue menor que los registrados en otros estudios [9-12, 61], en los cuales los analitos se obtuvieron por la extracción líquido-líquido. Sin embargo, esta técnica se caracteriza por extraer analitos, semivolátiles y no volátiles y el objeto del presente trabajo se enfocó al estudio de analitos volátiles; además, se buscaba una técnica cuyo impacto ambiental fuera mínimo, ya que la extracción líquido-líquido usa grandes cantidades de solvente y requiere mucho más tiempo y energía.

Es de anotar, que el número de compuestos volátiles detectados resultó menor que el reportado en otros trabajos, en que la SPME se usó como técnica de extracción [61]. La diferencia pudo radicar en la técnica de preparación de muestra y en la sensibilidad de los detectores empleados. De acuerdo con lo reportado [61], es posible extraer por SPME mayor cantidad de analitos en muestras de piña previamente secadas en atmosferas etanólicas modificadas, que en muestras de piña fresca. Esto podría estar asociado con los fenómenos de saturación de la fibra con vapor de agua puesto que, tal como ya se ha mencionado, altos porcentajes de humedad en el headspace, reducen sustancialmente la eficiencia de la extracción.

Durante el desarrollo del presente estudio se observó el registro de un mayor número de analitos con el detector de ionización en llama (FID), que con el detector selectivo de masas (MS). Los dos aspectos, uno, relacionado con la cantidad de muestra inyectada, y el otro, con la sensibilidad del detector, limitaron el reconocimiento estructural de varios

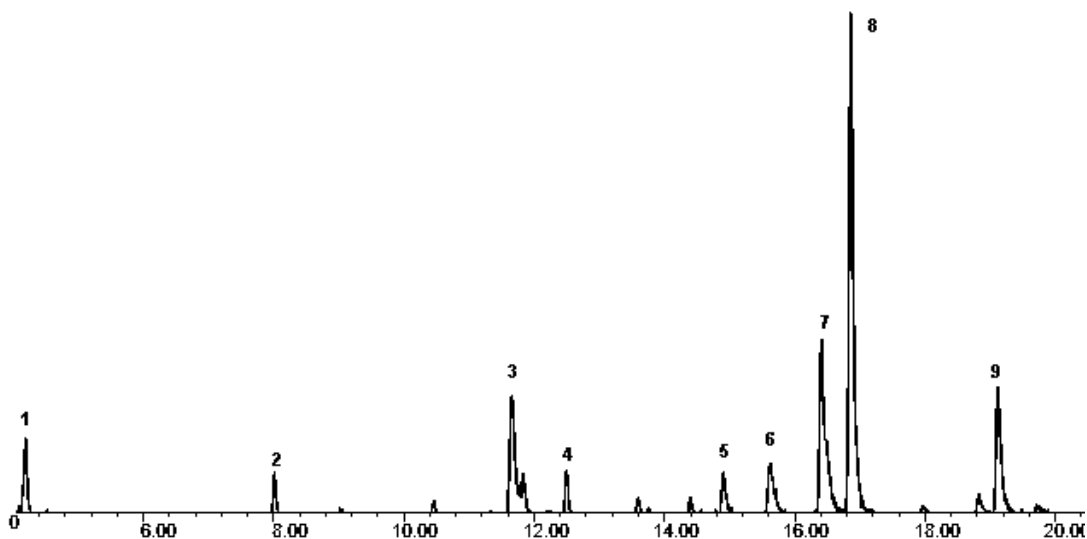
compuestos volátiles con base en sus espectros de masas, ya que, los pocos iones fragmentos registrados en algunos espectros de masas, impidieron la identificación positiva de los compuestos correspondientes.



**Figura 23.** Perfil cromatográfico de los volátiles aislados por HS-SPME (15 min, 60°C, PDMS/DVB, 65  $\mu$ m) de la piña en estado de floración. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 11**.

**Tabla 11.** Composición de la fracción volátil de la piña (*Ananas comosus*) var. perolera en estado de floración. Los analitos fueron extraídos por medio de la técnica HS-SPME.

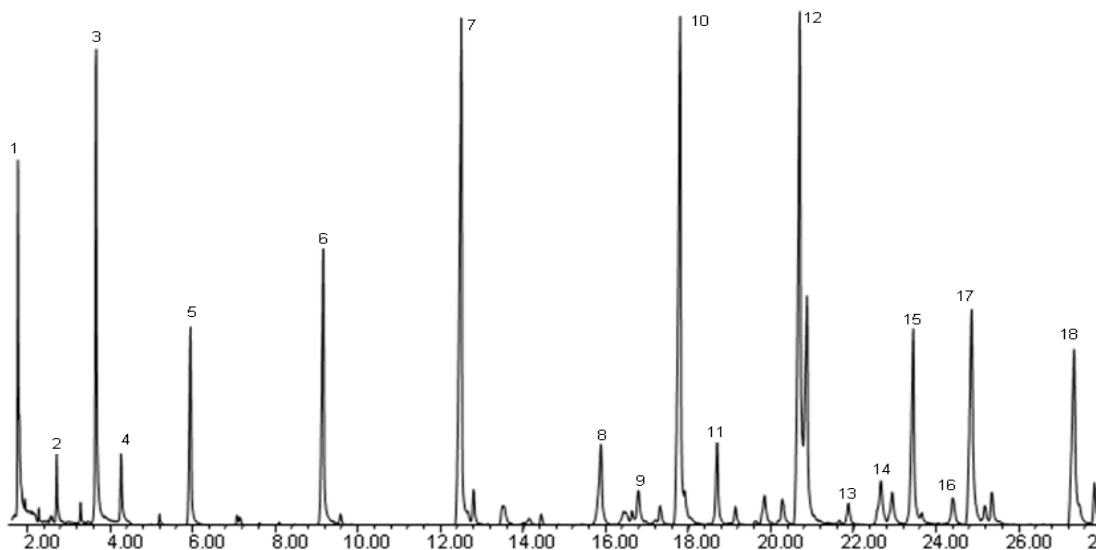
N° Pico, Fig. 23	Compuesto	IR <sub>EXPER.</sub>	IR <sub>TEÓR.</sub>	Área, %	m/z (I, %)
1	Hexanal	807	802	4.4	41 (100), 67 (94), 55 (77), 57 (40), 42 (37), 43 (24), 45 (32), 44 (10), 78 (26), 53 (17), 71(11), 40 (10).
2	Heptanal	911	896	2.3	41 (100), 44 (78), 43 (64), 55 (56), 42 (46), 70 (43), 57 (31), 44 (22).
3	2-Heptenal	932	957	17.7	41 (100), 55 (65), 83 (41), 57 (30), 43 (27), 56 (27), 42 (25), 69 (25), 70 (21), 68 (18), 53 (16), 51 (11), 84 (9), 54 (7), 67 (7), 97 (3).
4	No identificado	949			57(100), 43(37)
5	Octen-3-ol	966	979	16.7	57(100), 43(93), 55(35), 72(18), 71(13), 53(11), 58(11), 69(9), 67(8), 68(8), 99(8), 85(6), 81(5).
6	No identificado	1154			41(100), 58(72)
7	Octen-1-al	1112	1049	7.6	41(100), 55(64), 70(41), 57(30), 42(29), 83(28), 69(24), 53(19), 43(15), 67(15), 82(10), 54(5), 84(3), 56(2), 97(2).
8	No identificado	1122			41(100), 55(48)
9	Decanol	1268	1275	10.9	55(100), 43(99), 56(90), 70(90), 41(78), 69(73), 83(55), 57(46), 84(40), 42(37), 29(36), 68(25), 97(23), 27(21), 112(21), 71(18), 82(17), 98(14), 111(11).
10	2-Decenal	1271	1272	13.4	41(100), 55(59), 43(56), 70(36), 83(27), 42(25), 57(24), 83(23), 53(19), 56(18), 67(16), 81(13), 40(12), 54(12), 68(12), 98(3).



**Figura 24.** Perfil cromatográfico de los volátiles aislados por HS-SPME (15 min, 60°C, PDMS/DVB, 65  $\mu$ m) de la piña en estado de post-floración. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 12**.

**Tabla 12.** Composición de la fracción volátil de la piña (*Ananas comosus*) var. perolera en estado de post-floración. Los analitos fueron extraídos por medio de la técnica HS-SPME.

N° Pico, Fig. 24	Compuesto	IR <sub>EXPER.</sub>	IR <sub>TEÓR.</sub>	Área, %	m/z (I, %)
1	No identificado	--		2.6	44(100), 55(30)
2	Heptanal	914	896	1.6	44(100), 41(72), 43(58), 55(42), 70(46), 57(39), 42(24), 56(13).
3	Octen-3-ol	992	979	10	57(100), 43(60), 41(47), 55(26), 39(23), 42(15), 72(15), 53(12), 68(9), 58(8), 67(8)
4	No identificado	1048		0.7	41(100), 68(22), 83(13)
5	Octen-1-al	1109	1049	2.5	41(100), 55(55), 70(40), 57(24), 42(16), 83(16), 69(6)
6	Linalool	1106	1098	3.7	41(100), 55(63), 43(54), 56(50), 42(43), 39(41), 69(32), 70(22), 57(17), 83(4).
7	4-Decenal	1179	1194	10.82	84(100), 41(85), 55(68), 83(42), 67(40), 54(49), 69(37), 110(31), 81(24), 68(39), 98(32), 97(25), 56(25), 79(23), 70(21), 43(20).
8	Decanal	1211	1203	35.5	41(100), 57(57), 43(51), 55(40), 44(37), 56(33), 42(23), 70(16), 68(13), 54(12), 82(10), 95(10), 71(8), 96(8), 83(5), 58(4).
9	2-Decenal	1270	1264	9.5	41(100), 55(60), 43(54), 70(34), 69(26), 83(25), 57(24), 42(22), 53(18), 56(16), 68(13), 67(11), 81(11), 54(10)



**Figura 25.** Perfil cromatográfico de los volátiles aislados por HS-SPME (15 min, 60°C, PDMS/DVB, 65 µm) de la piña madura. La identificación de los componentes aparece en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Composición de la fracción volátil de la piña madura (*Ananas comosus*) var. perolera, extraídos por medio de la técnica HS-SPME.

N° pico, Fig. 25	Compuesto	IR <sub>EXP</sub>	IR <sub>TEÓR.</sub>	Área, %	m/z (I, %)
1	Acetato de etilo	--	612	4.3	43(100), 45(14), 61(14), 70(12), 42(7), 44(5), 73(4), 88(4), 41(1), 74(100), 43(99), 71(69), 41(42), 59(29), 87(28), 39(24), 42(21), 55(14), 44(12), 45(6), 40(5), 75(4), 69(3).
2	Butanoato de metilo	--	710	0.7	88(100), 57(79), 41(46), 85(24), 101(23), 59(21), 56(18), 5(13), 69(9), 87(7), 89(5), 42(4), 58(4), 43(3), 45(3), 53(3), 73(3), 40(2), 51(2).
3	2-Metilbutanoato de metilo	--	770	5.9	71(100), 43(96), 88(64), 41(40), 60(25), 73(24), 42(23), 45(20), 89(17), 44(16), 70(15), 61(11), 101(11), 55(8), 72(7), 40(5), 57(5), 116(5).
4	Butanoato de etilo	--	799	1.1	57(100), 41(69), 102(52), 85(26), 39(24), 74(24), 56(21), 55(14), 45(13), 87(13), 73(9), 42(7), 43(7), 115(6), 40(4), 53(4), 58(4), 103(4).
5	2-Metilbutanoato de etilo	858	893	3.5	74(100), 43(68), 41(39), 59(37), 87(34), 42(30), 39(28), 55(24), 99(16), 71(10), 101(8), 45(6), 57(6), 40(5), 53(5), 69(5), 70(5), 75(5), 88(5), 56(4), 44(3), 51(2), 50(1), 52(1).
6	Hexanoato de metilo	931	938	5.6	88(100), 43(94), 41(61), 42(53), 99(52), 60(50), 73(39), 55(35), 70(35), 71(33), 101(28), 61(27), 45(26), 69(10), 87(9), 115(9), 53(6), 56(6), 74(6), 89(6), 44(5), 117(5).
7	Hexanoato de etilo	1011	999	11.3	43(100), 88(24), 59(18), 55(16), 83(15), 56(12), 57(9), 39(7), 41(7), 99(6), 131(6), 45(5), 130(5), 42(4), 87(4), 44(3), 53(3), 72(3), 114(3).
8	2-Metil-3-oxobutanoato de metilo	1084	--	2.5	74(100), 61(18), 75(50), 45(47), 47(23), 41(33), 55(30), 46(28), 148(26), 59(24), 43(18), 77(18), 73(20), 103(6), 49(13), 71(10), 48(9), 58(9), 87(9), 39(8), 42(8), 63(8), 60(7), 76(7), 57(6), 119(3%), 120(1%).
9	3-(Metiltio)propanoato de etilo	1101	1098	1.1	88(100), 101(37), 70(24), 127(30), 73(16), 57(22), 60(19), 55(16), 41(14), 43(13), 69(9), 127(9), 115(8), 75(7), 101(7).
10	Octanoato de metilo	1134	1123	11.7	43(100), 83(27), 102(24), 55(16), 56(15), 74(15), 41(9), 45(8), 57(7), 73(6), 42(4), 85(4), 99(4), 144(4), 44(3).
11	2,2-dimetilbutanoato de metilo	1158	--	1.9	88(100), 41(65), 43(64), 55(53), 57(47), 101(37), 60(35), 73(33), 70(29), 42(26), 39(25), 127(25), 61(24), 45(16), 69(14), 129(12), 56(10), 115(10), 83(8), 89(7), 53(6), 84(6), 87(6).
12	Octanoato de etilo	1212	1200	12.1	43(100), 41(17), 42(12), 55(12), 71(11), 68(10), 97(10), 69(9), 103(9), 145(9), 59(7), 74(7), 44(4).
13	3-Acetoxihexanoato de metilo	1228	1206	5.7	

Continuación **Tabla 13**

N° pico, Fig. 25	Compuesto	IR <sub>EXPER.</sub>	IR <sub>TEÓR.</sub>	Área, %	m/z (I, %)
14	3-Acetoxihexanoato de etilo	1256	--	4.9	43(100), 97(19), 71(16), 41(15), 117(13), 42(11), 55(11), 69(10), 68(9), 88(7), 159(6).
15	Tetradecatrieno	1298	1288	6.4	79(100), 41(66), 67(63), 55(36), 93(33), 77(32), 80(28), 53(27), 59(26), 81(24), 108(24), 91(22), 43(20), 54(20), 68(20), 65(17), 74(15), 42(14), 69(13), 66(12), 78(12), 85(11), 150(11), 51(10), 95(8), 94(7), 52(6), 84(6), 96(6), 107(6), 109(6), 82(5), 83(545).
16	Decanoato de metilo	1336	1323	0.7	79(100), 41(66), 67(63), 55(36), 93(33), 77(32), 80(28), 53(27), 59(26), 81(24), 108(24), 91(22), 43(20), 54(20), 68(20), 65(17), 74(15), 42(14), 69(13), 66(12), 78(12), 85(11), 150(11), 51(10), 95(8), 94(7), 52(6), 84(6), 96(6), 107(6), 109(6).
17	4-Deceneoato de etilo	1391	--	5.2	79(100), 41(64), 67(57), 55(40), 108(33), 77(29), 93(29), 81(27), 53(26), 80(26), 43(20), 91(20), 54(19), 68(18), 65(16), 69(16), 107(16), 42(13), 78(13), 66(12), 150(12), 71(11), 51(10), 60(10), 95(10), 83(9), 94(9), 96(7), 109(7), 45(6), 52(6), 88(6), 122(6).
18	Decanoato de etilo	1408	1395	0.9	88(100), 41(92), 43(72), 55(67), 101(41), 73(39), 60(32), 70(27), 42(26), 69(26), 61(20), 45(19), 57(19), 56(16), 71(15), 67(12), 89(11), 157(11), 53(10), 155(10), 68(8), 83(8), 115(8), 97(7), 54(6), 79(6), 84(6), 85(6).

La formación de sustancias volátiles es un proceso típico de la maduración de cualquier fruta. Como resultado de los análisis cromatográficos realizados a las fracciones volátiles, aisladas de la piña, en tres estados de su maduración, se concluye que, los estados de floración y post-floración se caracterizaron por la presencia de dos tipos de compuestos: aldehídos y alcoholes; el extracto de piña madura se destacó por alto contenido de ésteres. No se logró determinar por qué no se observaron ésteres en las etapas de floración y post-floración de la piña, ya que para otras frutas, e.g., el lulo, se observó el aumento de este tipo de compuestos y la disminución de compuestos alcohólicos, por ejemplo el 3-hexenol, a medida que transcurre la maduración [62].

De este estudio, no se pudo concluir, por qué el aroma de la piña cambia durante su maduración; hasta donde los autores son enterados, se desconocen con exactitud todas las reacciones que ocurren con las sustancias volátiles en cada una de las etapas de desarrollo del fruto.

No se presentan diferencias significativas en las fracciones volátiles de la piña aisladas, en los estados de floración y post-floración, por lo cual no existiría ninguna razón para esperar que la ovoposición ocurra durante la post-floración y no durante la floración, como sugieren Arévalo y Osorio [14]. Además, durante el desarrollo del presente trabajo, nunca se encontraron larvas o vestigios de su presencia en la piña en estas etapas de desarrollo. Por el contrario, la composición de la fracción volátil de la piña madura presenta diferencias con respecto a la de los dos estados anteriores, por lo que se puede,

sugerir que estos nuevos compuestos, producto de la maduración del fruto, podrían eventualmente atraer al insecto y conducir a que la mosca ovoposite en éste y no durante las etapas de floración y post-floración.

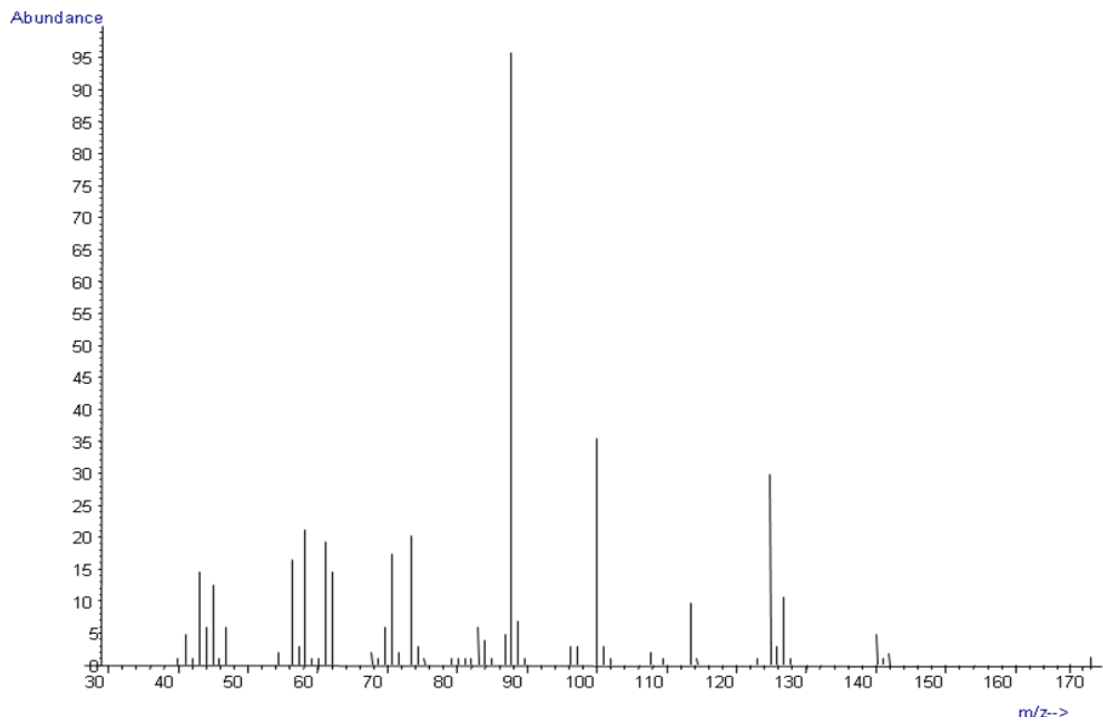
La **Figura 26** presenta el espectro de masas del octanoato de etilo, componente mayoritario de la fracción volátil, obtenida por HS-SPME, de piña madura. La **Figura 28** presenta las posibles rutas de fragmentación de este éster, que involucra trasposiciones de hidrógeno, escisiones del enlace  $\alpha$  al grupo carbonilo, formación de iones acilo.

En el espectro se observa dos fragmentos producto de un doble reordenamiento de McLafferty [60], donde el hidrógeno del átomo de carbono en la posición  $\gamma$  migra a través de un estado de transición hexacíclico, típico para los ésteres. Uno de los fragmentos es el ion pico de base en  $m/z$  88 y el otro  $m/z$  144 el cual presenta menor estabilidad. La escisión del enlace  $\alpha$  al grupo C=O, genera la pérdida del radical  $C_2H_5O\cdot$  y la formación del ion acilo  $C_8H_{15}O^+$   $m/z$  127, el cual es un ión diagnóstico para ésteres. La ruptura del enlace C–C en C-4 y C-5 genera los iones alquilo  $m/z$  43 y 57 (**Figura 26**). Sin embargo, en la escisión simple en el enlace C–C en C-4 la carga puede depositarse en el fragmento más pesado y producir el ión con  $m/z$  115.

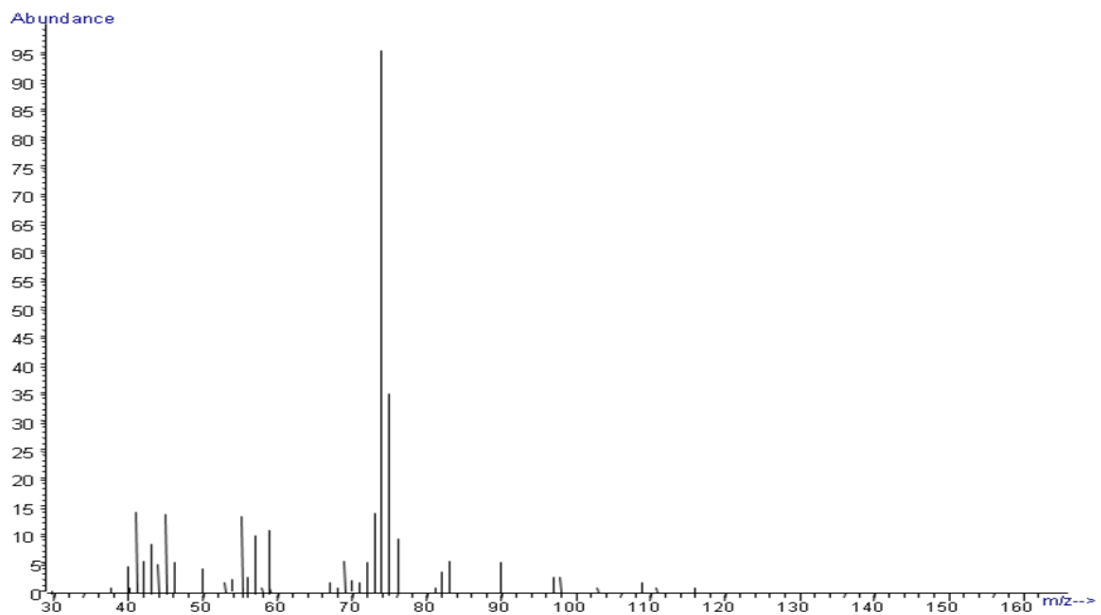
La **Figura 27** presenta el espectro de masas del tioéster 3-metiltiopropanoato de etilo. La fragmentación de tioésteres está dirigida por la presencia de los átomos de oxígeno y el átomo de azufre; así, es común que el espectro de masas presente iones fragmentos característicos tanto para ésteres como para tioésteres. Tal como se puede apreciar en la **Figura 29**, que ejemplifica la formación de algunos iones fragmento para el 3-(metiltio)propanoato de etilo, uno de los tioésteres presentes en la fracción volátil de los frutos de piña madura, es posible observar rupturas típicas para ésteres como la escisión de los enlaces  $\alpha$  y  $\beta$  al grupo carbonilo, así como la formación de iones tionio con respecto al átomo de azufre.

Los tioésteres, al igual que los ésteres, también pueden presentar reordenamiento McLafferty. Sin embargo, en el caso de este compuesto, esta ruptura no tiene lugar,

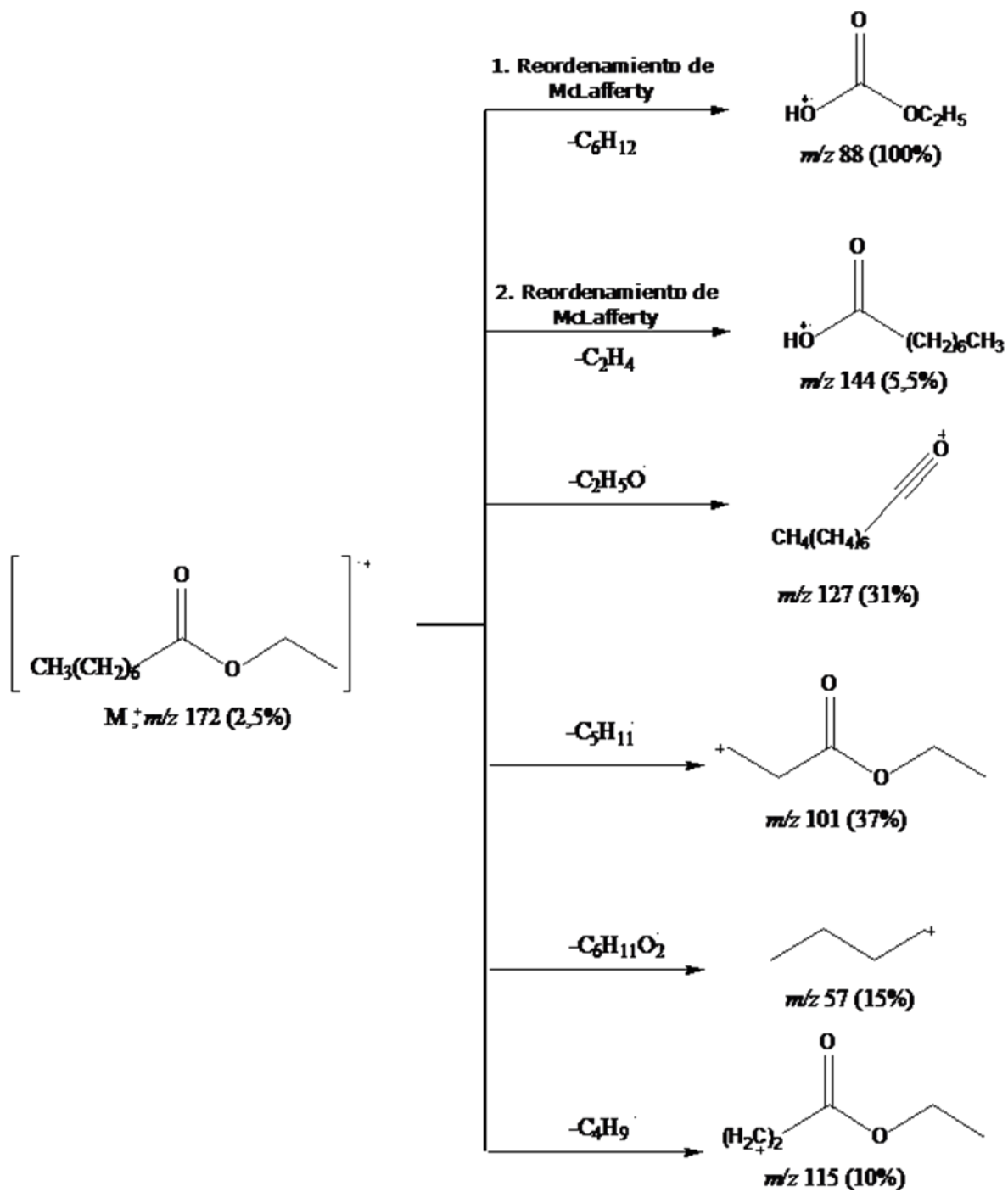
puesto que el átomo en la posición gamma al doble enlace no posee hidrógenos removibles.



**Figura 26.** Espectro de masas (EI, 70 eV) del octanoato de etilo.



**Figura 27.** Espectro de masas (EI, 70eV) del 3-(metilitio) propanoato de etilo.



**Figura 28.** Formación de algunos fragmentos en el espectro de masas (EI, 70 eV) del octanoato de etilo.

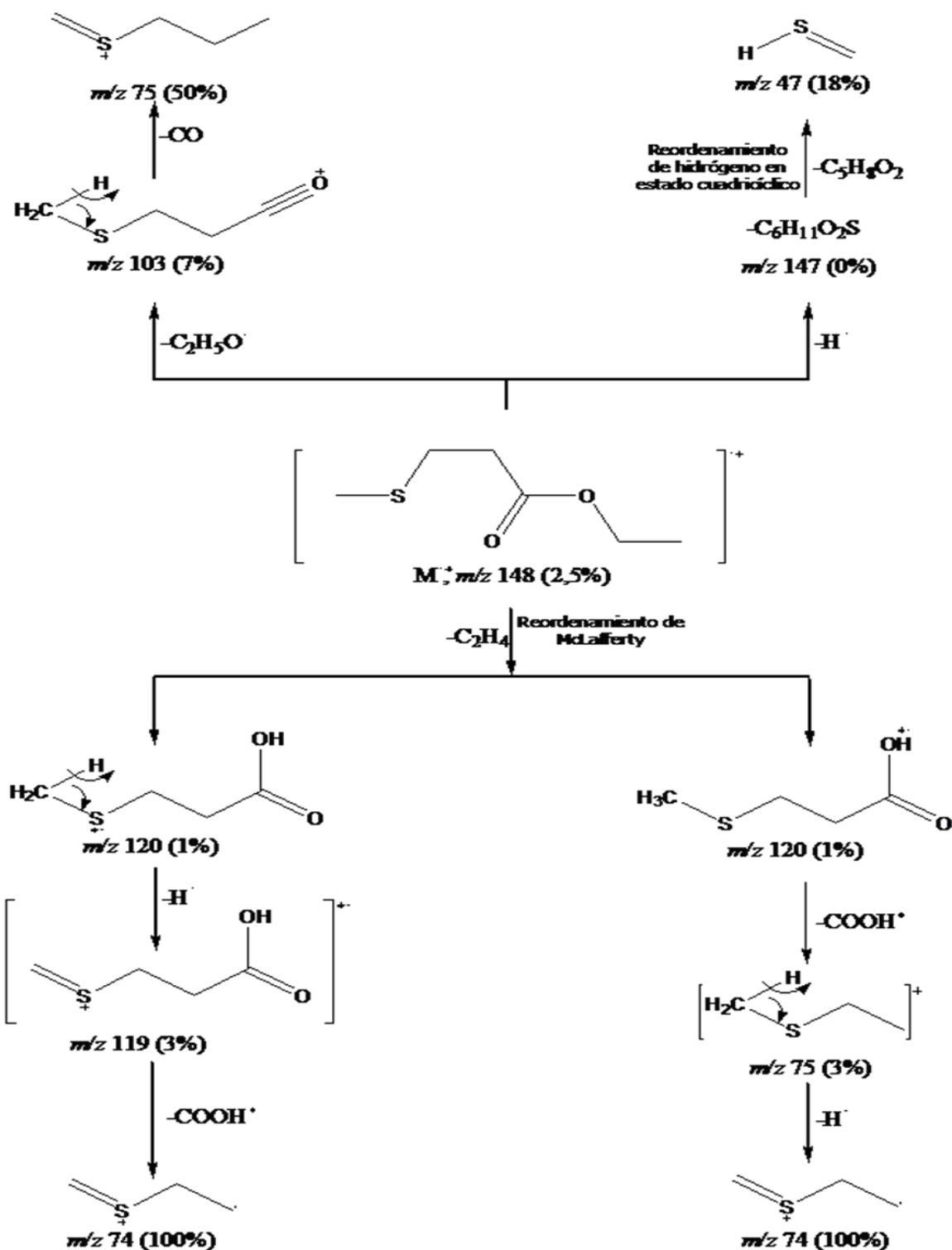


Figura 29. Formación de algunos fragmentos en el espectro de masas del 3-(metiltio) propanoato de etilo (EI, 70 eV).

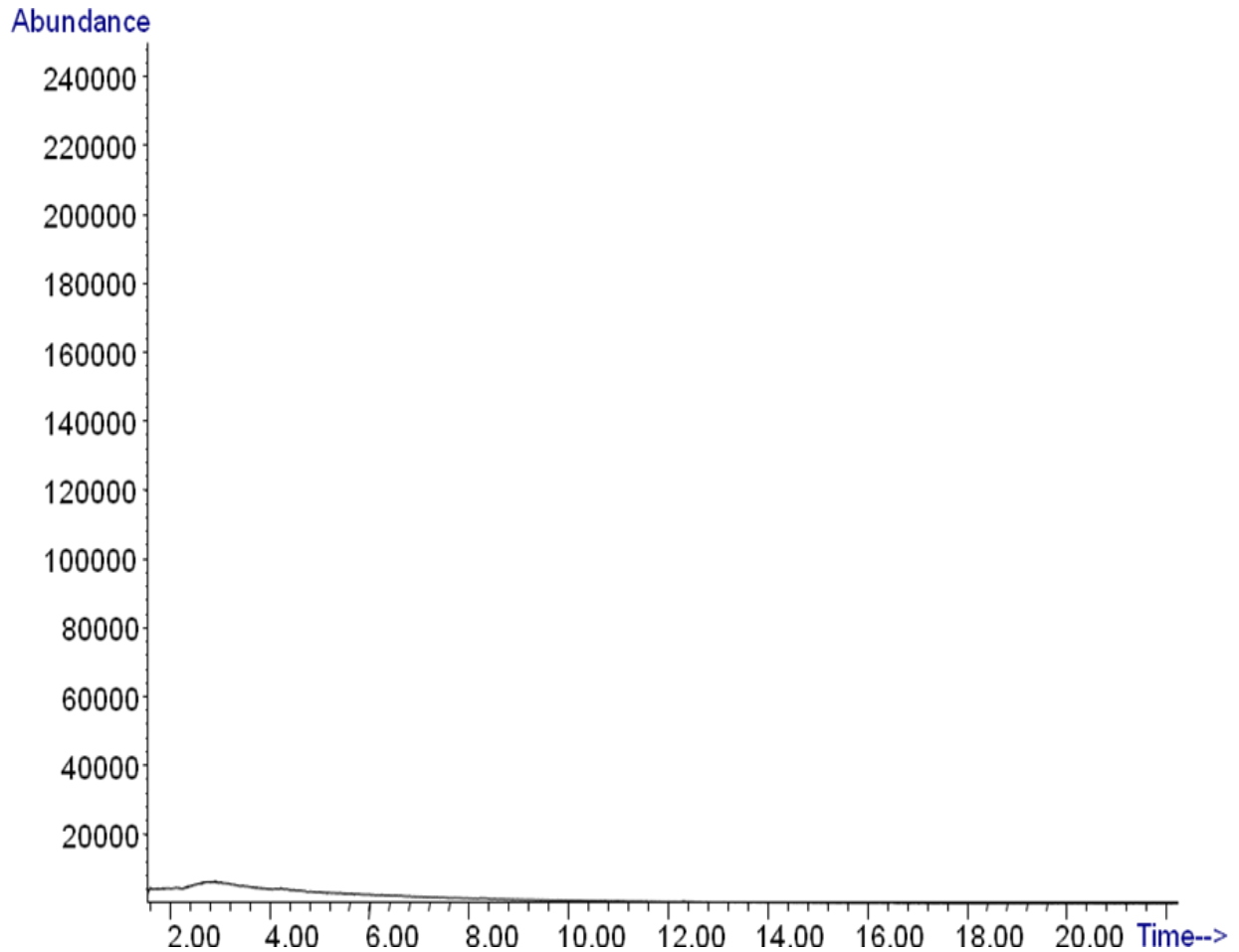
#### 4. CONCLUSIONES

1. Se observó que la cópula de *M. viatrix* ocurría a partir de los 12 días *post* emergencia pupal, entre la 1 p.m. y 4 p.m. y antes de la cópula, los machos de *M. viatrix* emitieron una sustancia que podría ser la responsable del comportamiento sexual, hecho que coincide con lo reportado para la mayoría de las moscas pertenecientes a la superfamilia *Tephritoidea*.
2. Con base en el espectro de masas (EI, 70 eV) del compuesto emitido por los machos de *M. viatrix*, se proponen como posibles las fórmulas moleculares  $C_{12}H_{26}$  y  $C_{10}H_{18}O_2$ .
3. No se observaron diferencias cualitativas en los perfiles lipídicos de machos y hembras de *M. viatrix*; para ambos sexos, se determinó un total de 13 ácidos grasos, entre los cuales se destacan el oleico (31,5 y 31,8%), el palmítico (19,5 y 20,5%), el palmitoleico (16,8 y 17,2%), el linoleico (11,1 y 9,9%), y el linolénico (11,1 y 10,5%), respectivamente.
4. Las fracciones volátiles de la piña en estado de floración y *post*-floración, están constituidas principalmente por aldehídos y alcoholes. Entre los constituyentes aislados de las fracciones volátiles de piña verde, el hexanal, el octen-1-ol y el linalool, también han sido descritos por otros autores como componentes de los extractos de piñas verdes.
5. La fracción volátil de piña madura está constituida principalmente por ésteres, entre los cuales se destacan los 2-metilbutanoato de metilo y etilo, el butanoato de metilo, los hexanoato de metilo y etilo, y el octanoato de metilo, que han sido descritos como posibles responsables de las características organolépticas de este fruto.
6. Se observó que la ovoposición sólo ocurría en los frutos maduros, ya que no se encontraron larvas en las piñas verdes y la composición de las fracciones volátiles cambia notoriamente durante la maduración de la fruta.

## 5. RECOMENDACIONES

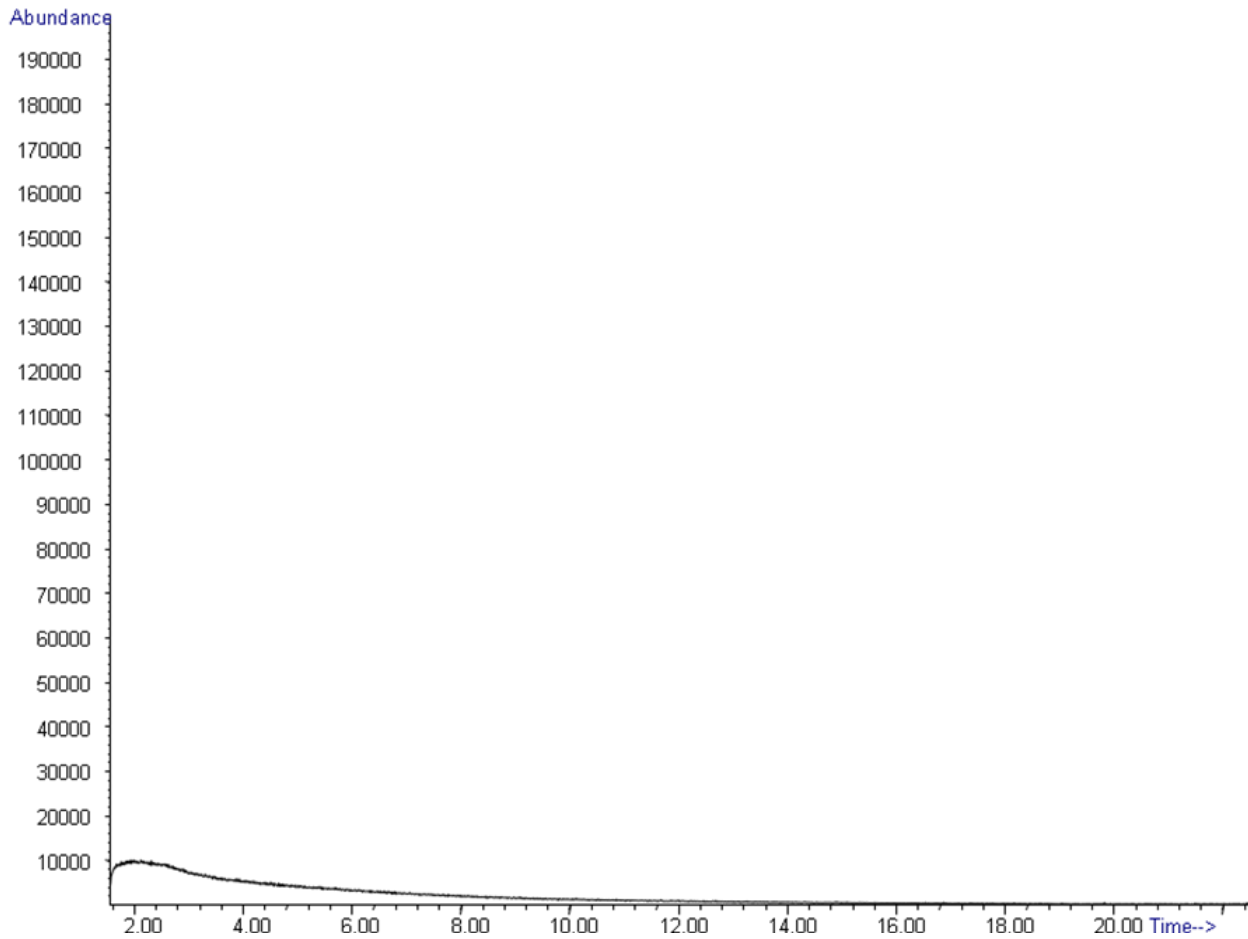
1. Dar continuidad al presente trabajo investigativo, haciendo énfasis en la obtención de muestras aisladas de la feromona sexual de la mosca *M. viatrix*, con el fin de lograr la identificación y confirmación de su estructura molecular; en primer lugar, hacer uso de la ionización química para confirmar el peso molecular de la sustancia y en segundo, emplear otras técnicas instrumentales como lo son MS – MS, espectrometría de masas de alta resolución (TOF) o RMN (aislar la sustancia).
2. Hacer la caracterización de hidrocarburos cuticulares para los dos sexos de la mosca objeto de estudio, con el fin de encontrar diferencias en la composición que permitan identificar el género emisor de la feromona.
3. Evaluar el efecto atrayente de los volátiles identificados en frutos de piña, con el objeto de establecer una relación entre estos compuestos y la señal de ovoposición de la mosca hembra en el fruto.

## ANEXO 1



Perfil cromatográfico del blanco de la fibra expuesta al vial. HS-SPME (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ). Condiciones cromatográficas: columna DB-5 (30 m). Inyección manual en modo *splitless*. Detector MS (EI, 70 eV).

## ANEXO 2



Perfil cromatográfico de las emisiones volátiles de las hembras de *M. viatrix*, obtenidas por HS-SPME (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ). Condiciones cromatográficas: columna DB-5 (30 m). Inyección manual en modo *splitless*. Detector MS (EI, 70 eV).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] [http://www.observatorio.misionrural.net/alianzas/productos/pina/quilichao/pina\\_quilichao\\_resumen.pdf](http://www.observatorio.misionrural.net/alianzas/productos/pina/quilichao/pina_quilichao_resumen.pdf), Fecha de consulta: septiembre 24 de 2009.
- [2] <http://www.agronet.com>, Fecha de consulta: septiembre 24 de 2009.
- [3] Anuario estadístico nacional de frutas y hortalizas y sus calendarios de siembra y cosecha 2003 – 2007. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. **2008**, pp. 126 – 128.
- [4] CORZO, C. SANDOVAL, E. OTERO, H. Estudio de la producción y mercadeo de la piña en Santander. Trabajo de grado Economista. Bucaramanga: Universidad Industrial de Santander. Facultad de Ciencias Humanas. Escuela de Economía, **2001**, p. 56.
- [5] CARDÉ, R. MINKS, A. Control of moths pests by mating disruption: Successes and constraints. *Annual Review of Entomology*, **1995**, 40, pp. 559 – 585.
- [6] MORALES, J. LÓPEZ, J. Estudios básicos para el manejo y control de la mosca de la piña, *Melanoloma viatrix* Hendel. *Boletín de Investigación No 2*. Corpoica. **1994**, 39p.
- [7] [http://www.agronet.gov.co/www/docs\\_si2/Aspectos%20generales%20de%20la%20pina.pdf](http://www.agronet.gov.co/www/docs_si2/Aspectos%20generales%20de%20la%20pina.pdf), Fecha de consulta: agosto 30 de 2009.
- [8] CORONEL A., C. Cinética de inactivación enzimática y de degradación de sabor en función de la temperatura en jugo de piña. Trabajo de grado Licenciada en Ingeniería de alimentos. Puebla, México. Universidad de las Américas Puebla. Escuela de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Alimentos, **2003**, pp. 8, 9.
- [9] TRESSL, R. HEIDLAS, J. ALBRECHT, W. ENGEL, K.H. Biosynthesis of chiral flavor and aroma compounds in plants and microorganisms. En: TERANISHI, R. BUTTERY, R.

SHAHIDI, F. (Editors). Flavor Chemistry, Trends and Developments. *Amer. Chem. Soc. División of Agric. Food Soc.* **1989**, 388, pp. 8 – 22.

[10] UMANO, K. HAGI, Y. NAKAHARA, K. SHOJI, A. SHIBAMOTO, T.J. Volatile constituents of green and ripened pineapple (*Ananas comosus*). *Agric. Food Chem.*, **1992**, 40(4), pp. 599-603.

[11] ELSS, S. PRESTON, C. HERTZIG, C. HECKEL, F. RICHLING, E. SCHREIER, P. Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus*) and pineapple products. *LWT*, **2005**, 38, pp. 263 – 274.

[12] TOKITOMO, Y. STEINHAUS, M. BUTTNER, A. SCHIEBERLE, M. Odor-active constituents in fresh pineapple (*Ananas comosus*) by quantitative and sensory evaluation. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, **2005**, 69 (7), pp. 1323 – 1330.

[13] Nueva Plaga. Noticias entomológicas. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), **1991**, p. 31.

[14] ARÉVALO, E. OSORIO, M. Consideraciones generales sobre *Melanoloma viatrix* Hendel, una nueva plaga de la piña. *Revista Colombiana de Entomología*, **1995**, 21 (1), pp. 1-8.

[15] ALUJA, M. BERLOCHER, S. BUSH, G. LYNN, I. "Fruit flies (*Tephritida*), phylogeny and evolution of behavior". New York: CRC Press, **2001**. 968 p.

[16] BLANCO – METZLER, H. Los Semioquímicos y su papel en el manejo integrado de Plagas. X Congreso Nacional Agronómico. CIPROC – EEFBM, Universidad de Costa Rica, **1996**, pp. 93 – 95.

[17] EISNER, T. MINWALD, J. (Editores). Chemical Ecology: the chemistry of biotic interation. Washington, D.C.: National Academy Press, 1995. 221 p.

- [18] CORK, A. A pheromone manual. United Kingdom Department for International Development (DFID), **2004**, 73 p.
- [19] STERMBRECHT, R.A. Funcional morphology of pheromone – sensitive sensilla. En: PRESTWICH, G. BLONQUIST, G.J. Pheromone biochemistry. 1ª Edición, London: Academic Press, **1987**, pp. 353 - 379.
- [20] SAUNE, F. Las feromonas sexuales, un método alternativo en el manejo de plagas. *Rev. Fac. Agron.*, **1977**, 10(1-4), pp. 71 – 94.
- [21] RODRÍGUEZ, C.L. LÉPIZ, C.S. PÉREZ, D. Efecto de la distancia entre trampas, sobre la captura de palomillas de la papa (Lepidóptera: *Gelechiidae*). *Manejo integrado de plantas*. Costa Rica, **1992**, 20, pp. 47, 48.
- [22] FLINT, H. DOANE, C. Comprensión de los semioquímicos con énfasis en feromonas sexuales de los insectos en programas de manejo integrado de plagas. Disponible en internet: <http://ipmworld.umn.edu/cancelado/spchapters/flintsp.htm>. Fecha de consulta: 24 de agosto de 2008.
- [23] BAKER, T. C., R. T. STATEN, Y H. M. FLINT. Use of pink bollworm pheromone in the southwestern United States. En *Behavior Modifying Chemicals for Insect Management*. Editores: Ridgeway, R. L., R. M. Silverstein, y M. N. Inscoe Marcel Dekker, , Nueva York, NY., **1991**, pp. 417-436.
- [24] STURTEVANT, A. Experiments of sex recognition and the problem of sexual selection in *Drosophila*. *J. Animal Behavior*, **1915**, 5, pp. 351-366.
- [25] ROGOFF, M. BELTZ, A. JOHNSON, J. PLAPP, F. A sex pheromone in the housefly. *Musca domestica*. *J. Insect Physiol.*, **1964**, 10(2), pp. 239 - 246.
- [26] CARLSON, D.A. MAYER, M.S. SILHACEK, D.L. JAMES, J.D. BEROZA, M. BIERL, B.A. Sex attractant pheromone of the housefly: isolation, identification and synthesis. *Science*, **1971**, 201, pp. 750–753.

- [27] WICKER, T. Pheromonal communication involved in courtship behavior in *Diptera*. *J. Insect Physiol.*, **2007**, 53, pp. 1089- 1100.
- [28] BLOMSQUIST, G. DILLWITH, J. ADAMS, T.S. Biosynthesis and endocrine regulation of sex pheromone production in *Diptera*. En: PRESTWICH, G. BLONQUIST, G.J. Pheromone biochemistry. 1ª Edición, London: Academic press, **1987**, pp. 217 - 243.
- [29] JONES, G.R. OLDHAM, N.J. Pheromone analysis using capillary gas chromatographic techniques. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 843(1,2), 199-236.
- [30] PERCY, C. JEAN, E. McDONALD, J.A. Biology and ultrastructure of sex pheromone – producing glands. En: PRESTWICH, G. BLONQUIST, G.J. Pheromone biochemistry. 1ª Edición, London: Academic press, **1987**, pp. 27 - 75.
- [31] GOLUB, M.A. WEATHERSTON, I. HUMMEL, H. E. MILLER, T .A. Techniques for extracting and collecting sex pheromones from live insect and from artificial sources. En: HUMMEL, H.E. MILLER, T. A. (Editores). Techniques in Pheromone Research. New York: Springer - Verlag, **1984**, pp. 223 – 285.
- [32]. BRADY, U.E. SMITHWICK, E.B. Production and release of sex attractant by the female indian meal moth, *Plodia interpunctella*. *Anal. Entomol. Soc. Amer*, **1968**, 61, pp. 445 – 456.
- [33] BERGER, R.S. 2,6 – Dichlorophenol, sex pheromone of the lone star tick. *Science*. **1972**, 177, pp. 704 – 705.
- [34] WEATERSON, J. McCLEIAN, W. The occurrence of (*E*)-11-tetradecan-1-ol, a known sex attractant inhibitor, in the abdominal tips of virgin female Eastern spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*. *Can. Entomol.*, **1974**, 106, pp. 281 – 284.
- [35] BROWNE, L. BIRCH, M. WOOD, D. Novel trapping and delivery system for airborne insect pheromones. *J. Insect Physiol.* **1974**, 20, pp. 183 – 193.

- [36] RICHERSON, J. CAMERON, E. Differences en pheromone release and sexual behavior between laboratory – reared and wild gypsy moth adults. *Envirom. Entomol.* **1974**, 3, pp. 475 – 481.
- [37] HANIOTACKIS, G MAZOMENOS, B. TUMILINSON, J. A sex attractant of the olive fly, *Dacus olene* and its biological acivity under laboratory and field conditions. *Entomol. Exp. Appl.*, **1977**, 22, pp. 81 – 87.
- [38] SOWERL, A. GASTON, R. SHOREY, H. Sex pheromones of noctuid moths. XXVI. Female release rate, male response treshold and comunication distance for *Trichoplasiani*. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **1971**, 64, pp. 1448 – 1456.
- [39] FINNEGAN, D.E. CHAMBERS, J. Identification of the sex pheromone of the guerinsey carpet beetle, *Anthrenus sarnicus*, Mrczkowski (Coleóptera: *Dermetidae*). *J. Chem. Ecol.*, **1993**, 19(5), p. 971.
- [40] COSSÉ, A.A. TODD, J.L. MILLAR, J.G. MARTINEZ, L.A. BACKERT, T.C. Electroantennographic and coupled gas chromatographic – electroantennographic responses of the mediterranean fruit fly, *Ceratitits capitata*, to male – produced volátiles and mango odor. *J. Chem. Ecol.*, **1995**, 21(11), p.1823.
- [41] ELLER, F.J. BARTELT, R.J. SHASHA, B.S. SCHUSTER, P.J. REILEY, D.G. STANSLY, P.A. MUELLER, T.F. SHULER, K.D. JOHNSON, B. DAVIS, J.H. SUTHERLANDS, C.A. Aggregation pheromone for the pepper weevil, *Anthonomus eugenii cano* (Coleóptera: *curculionidae*): identification and field activity. *J. Chem. Ecol.*, **1994**, 20(7), p. 1537.
- [42] ATTYGALLE, A.B. HERRIG, M. VOSTROWSKY, O. BESTMANN, H.J. Technique for injecting intact glands for analysis of sex pheromones of *Lepidoptera* by capillary gas chromatography: Reinvestigation of pheromone complex of *Mamestra brassicae*. *J. Chem. Ecol.*, **1987**, 13(5), p. 1299.

- [43]. MUSTEATA, F.M PAWLISZYN, J. In vivo sampling with solid phase microextraction. Review. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **2007**, 70, pp. 181–193.
- [44]. AUGER, J. ROUSSET, S. THIBOUT, E. JAILLAIS, B. Solid-phase microextraction–gas chromatography–direct deposition infrared spectrometry as a convenient method for the determination of volatile compounds from living organisms. Short communication. *J Chromatogr. A*, **1998**, 819, pp. 45–50.
- [45] AUGUSTO, A.L. PIRES, V. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological simples. *TrAC*, **2002**, 21(6,7), pp. 428-438.
- [46]. ROCHAT, D. RAMÍREZ – LUCAS, P. MALOSSE, C. ALDANA, R. KAKUL, T. Role of solid-phase microextraction in the identification of highly volatile pheromones of two Rhinoceros beetles *Scapanes australis* and *Strategus aloeus* (Coleoptera, Scarabaeidae, Dynastinae). *J. Chromatogr. A.*, **2000**, 885(1,2), pp. 433 - 444.
- [47] MONETI, G. DANI, F. PIERACCINI, G. TURILLAZZI, S. Solid-phase Microextraction of Insect Epicuticular Hydrocarbons for Gas Chromatographic/Mass Spectrometric Analysis. *Rapid Commun. Mass SP*, **1997**, 11, p. 857.
- [48] DO NASCIMENTO, R.R. MORGAN, E.D. MOREIRA, D.D.D. DELLA LUCIA, T.M.C. Trail pheromone of leaf – cutting ant, *Acromyrmex subterranius* (Forel). *J. Chem. Ecol.*, **1994**, 20(7), p. 1719.
- [49] MONETTI, G. PIERACCINI, G. DANI, F. TURILLAZZI, S. FAVRETTO, D. TRALDI, P. Ion – molecule reaction of ionic species from acetonitrile with unsaturated hydrocarbons for the identification of double bond position using an ion trap. *J. Mass Spectrom.*, **1997**, 32(121), pp. 1371 – 1373.
- [50] MALOSSE, C. EINHORN, J. Optimized production of the acylium diagnostic ions in the chemical ionization  $\text{NO}^+$  mass spectra of long chain monoolefins. *Anal. Chem.*, **1990**, 25(1), pp. 49 – 52.

- [51] EINHORN, J. WIRELIZIER, H. GEMAL, A.L. TABET, J.C. Direc determination of double bond position in long chain conjugated dienes by  $t^+ C_4H_9^+$  chemical ionization mass spectromtry. *Tetrahedron Letters*, **1985**, 26(11), pp. 1445 – 1448.
- [52] JURENKA, R.A. HAYNES, K.F. ADLOF, R.O. BENGTTSSON, M. ROELOFS, W.L. Sex pheromone component ratio in the cabbage looper moth altered by a motation affecting the fatty acid chain short – enning reactions in the pheromone biosyntetic pathway. *J. Chem. Ecol.*, **1994**, 16, PP. 2935–2946.
- [53] KUWAHRA, Y. OHSHIMA, M. SATO, M. KUROSA, K. MATSUYAMA, S. SUZUKI, T. Chemical ecology of Astigmatid mites XL. Identification of the alarm pheromone and new C17 hydrocarbons from Tortonia sp., a pest attacking the nest of Osmia cornifrons. *Appl. Entomol. Zool.* **1995**, 30(1), pp. 177 – 189.
- [54] SCHNEIDER, D. VERGL, Z. Electrophysiological investigation on the olfactory specity of sexual attracting substances en diferent species of moths. *J. Insect Physiol.* **1962**, 8(1), pp. 15 – 30.
- [55] SCHLEIN, T. GALON, R. BEN – ELIAHU, M.N. The legs of musca domestica and *Glossina mousitans females* as the site of sex pheromone release. *Expemientia*, **1980**, 36, pp. 1174 – 1175.
- [56] CARLSON, D.A. NELSON, D.R. LANGLEY, P.A. COATES, T.W. DAVIS, T.L. LEEGWATER – VAN DER LINDER. Contact sex pheromone in the tse-tse fly *glossina pallidipes*: Identification and synthesis. *J. Chem. Ecol.*, **1984**, 10, pp. 429 – 450.
- [57] FOLCH, J. LEES, H. SLOANE, G.H. A simple method for the isolaation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **1957**, 226, pp. 497 – 509.
- [58] SILVERSTEIN, R. BASSLER, C. MORRILL, T. Spectrometric identification of organic compounds. New York: John Wiley, **1974**, 340 p.

[59] MARTOS, P.A. PAWLISZYN, J. Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of coating. *Anal. Chem.*, **1997**, 69(2), pp. 206 – 215.

[60] SINUCO, D. MORALES, A. DUQUE, C. Componentes volátiles libres y glicosídicamente enlazados del aroma de la piña (*Ananas comosus*) variedad perolera. *Rev. Colomb. Quim.* **2004**, 33(1), pp. 47-56.

[61] BRAGA, A. M. P. PEDROSO, AUGUSTO, M. P. F. SILVA, M. A. Volatiles Identification in Pineapple Submitted to Drying in an Ethanolic Atmosphere. *Drying Technology*, **2009**, 27, pp. 248–257.

[62] DUQUE, C. MORALES, A. El aroma frutal de Colombia. Bogotá: Editorial Universidad Nacional-Sede Bogotá. ISBN 958-701-538-X. **2005**. 345 p.