



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Aplicación de la microextracción en fase sólida
para el análisis de biomarcadores moleculares
presentes en sedimentos de zonas costeras

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
Q U Í M I C A
P R E S E N T A:
ANDREA CAMACHO RICO



MEXICO, D.F.

2 008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Santiago Capella Vizcaíno.**

VOCAL: **Profesor: Ernestina Cervera Flores**

SECRETARIO: **Profesor: María Isabel Gracia Mora**

1er. SUPLENTE: **Profesor: Araceli Patricia Peña Álvarez**

2° SUPLENTE: **Profesor: Elba Rojas Escudero**

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Química Analítica, Laboratorio 101 División de Estudios de
Posgrado Edificio B Facultad de Química, UNAM.

Asesor

M. en C. Santiago Capella Vizcaíno

Sustentante

Andrea Camacho Rico

Dedicatoria

A mis padres Héctor Camacho y Lilia Rico por ser los cimientos en la realización de todos mis sueños, sin ustedes no hubiera sido posible. Papá gracias por ser la persona en la que he basado mis sueños y mamá a ti por siempre estar ahí para ayudarme a cumplirlos.

A mi hermano Fernando Camacho, por conocerme, apoyarme y soportarme a lo largo de mi vida.

A mi tía Alma Rico por su amor a la vida, y toda su fortaleza. Te quiero tía.

A mis abuelos Francisco Rico y Alicia Rodríguez. A ti abuelito por creer siempre en mí.

A la Universidad Autónoma de México por permitirme formar parte de la máxima casa de estudios, por la enseñanza y experiencia.

Al M. en C. Santiago Capella por toda su paciencia, conocimiento y por despertar en mí las ganas de continuar en este camino.

A la Doctora Araceli Peña, por todo su apoyo y dedicación al trabajo.

A la profesora Ernestina Cervera Flores, Elba Rojas, e Isabel Gracia Mora por su valioso tiempo para la corrección de esta tesis.

A ti amiga, sin ti este camino hubiera sido horrible, por todos los momentos difíciles que siempre fueron mejores estando juntas, claro también por todas las experiencias juntas fuera y dentro de la Facultad, por los viajes, fiestas, las desveladas, los exámenes, prácticas, y por todo lo que nos falta. Te quiero mucho.

A Ehecathl hay que decir que eres parte importante de todo esto, por estar ahí, apoyarme, ayudarme a entender lo que no entendía, hacerme reír, claro y por el pay de queso (por ser mi amigo).

Sandy por ser mi amiga, ser tan linda y positiva siempre, es bueno tener un solcito de amiga. Por todos los momentos juntas y por los que nos faltan.

Dany no podemos negar el tiempo que pasamos juntas, muchas gracias.

Iris y Pau, por ser ustedes y por haber compartido tantas horas juntas que finalmente nos llevaron a ser lo que somos; Amigas.

Mago como olvidar las horas de estudio en donde me enseñabas calculo, pero lo más importante gracias por ser mi amigo.

Gaby por ser quien eres una lindísima persona y una gran amiga.

A todas la personas que estuvieron con mígo en la carrera y que formaron parte de esto Peter, Manuel, Rubén, Rudy, Marco, Fresco, Ponchito, María, Aron, Tlatelpa, Nacho, Lilo, Kique.

Esteban por ser mi compañero de laboratorio en orgánica y en todas las clases, pero lo más importante por siempre hacerme reír y ser mi amigo.

Y los que van en medio pero no menos importantes Héctor mi gran amigo, has sido mi amigo por muchos años y a lo largo de estos hemos compartido y aprendido a ser mejores amigos. Pamela por ser una grandísima amiga, por tu apoyo en los momentos difíciles y por todos los buenos momentos juntas en estos años. Miguel que te puedo decir sería repetir lo mismo, pero en fin, por ser un gran gran amigo y todo eso que hemos compartido y divertido juntos. Margaro bueno ya!!!! Eres increíble y un gran amigo que siempre me molesta.

Alberto Portocarrero A mí más extraño, y mitómano amigo que es parte de mi vida desde hace años y que hace que cada día que se comparte contigo sea diferente, por todas esas copas de vino, helados, comidas, cervezas, y postres que le dan sabor a la vida.

Alberto Ayala tengo que decirte muchas muchas gracias por todas esas horas de orgánica que sin ti hubiera sido mil veces más difícil. Por tu paciencia, ayuda y ser esa linda persona.

A todas las personas del laboratorio 101, David hiciste que las cosas siempre fueran divertidas y me ayudaste muchísimo, Erika, Rocío, Ale, Lupita, Jorge Luis, y Miguel por toda tu ayuda y consejos en química.

Y la lista sigue a mis amigos Mario, Pancho, Eduardo, Lugo, por todos los momentos juntos y tengo que decirlo de felices fiestas. José por ponerme en forma. Ulises y Andrés por tu valiosa contribución en la revisión de esta tesis y esas pláticas acerca de todo.

Y finalmente a mi persona especial Anibal por ser quien eres, por tu enorme paciencia, por todo tu amor. Por acompañarme en la realización de esta tesis, y durante la locura llenar mi vida de tranquilidad. Por todos los momentos increíbles. Te amo morita.

ÍNDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
1.1 La importancia del estudio de la química acuática	4
1.2 El agua	4
1.2.1 Propiedades	4
1.2.2 Composición de los diversos tipos de agua	6
1.3 Sistema de carbonatos	6
1.4 Diagénesis	8
1.5 Materia Orgánica	8
1.5.1 Clasificación de la materia orgánica	10
1.6 Biomarcadores Moleculares	10
1.7 Lípidos	11
1.7.1 Ácidos grasos	11
1.8 Métodos utilizados para el análisis de biomarcadores	13
1.9 Microextracción en fase sólida	14
1.9.1 Procedimiento de la MEFS	16
1.9.2 Parámetros de extracción	17
1.9.3 Derivatización de las muestras	18
1.10 Cromatografía de gases- espectrometría de masas (CG-EM)	19
II OBJETIVOS	22
2.1 Objetivos generales	22
2.2 Objetivos particulares	22
III METODOLOGÍA	23

3.1	Muestreo	23
3.2	Conservación de la muestra.	23
3.3	Equipo, materiales y reactivos	24
3.4	Condiciones cromatográficas	25
3.5	Evaluación del dispositivo	26
3.5.1	Descripción del dispositivo a evaluar	26
3.5.2	Evaluación de la influencia del material utilizado como membrana	27
3.5.2.1	Procedimiento para la evaluación de la transferencia de materia a través de las membranas de papel filtro y malla metálica	27
3.5.2.2	Evaluación del efecto de la presencia de los sedimentos	28
3.5.3	Evaluación de la malla de nylon en forma de cono como membrana	28
3.6	Tratamientos químicos de la muestra para la pre extracción de la fracción lipídica en los sedimentos de zonas costeras	29
3.6.1	Extracción de los compuestos presentes en sedimentos con diclorometano	30
3.6.2	Hidrólisis ácida	31
3.6.3	Hidrólisis básica	32
3.7	Estudio de la cinética de extracción	33
3.8	Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos	33
3.8.1	Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos con BF ₃ / MeOH / Tolueno	33
3.8.2	Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos con BF ₃ / MeOH – Tolueno	34
3.8.3	Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos con Metoxido de sodio	34
3.9	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos mediante un tratamiento químico y posterior metilación con BF₃/MeOH	34

3.9.1	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con tolueno y metilación con BF ₃ / MeOH	34
3.9.2	Desorción de los compuestos presentes en los sedimentos con KOH/MeOH y metilación con BF ₃ / MeOH	35
3.9.3	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH sin separación de las fracciones (sólida y líquida) y metilación con BF ₃ /MeOH	35
3.10	Evaluación de la reproducibilidad del método	37
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1	Evaluación del dispositivo	38
4.1.1	Membrana de papel	38
4.1.2	Membrana de malla metálica	41
4.1.3	Malla de nylon	43
4.2	Tratamientos de la muestra para la pre extracción de la fracción lipídica en los sedimentos de zonas costeras	45
4.2.1	Extracción de los compuestos presentes en los sedimentos con diclorometano	46
4.2.2	Hidrólisis acida	47
4.2.3	Hidrólisis básica	48
4.3	Estudio de la cinética de extracción	50
4.4	Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos	51
4.4.1	Desorción y metilación de los compuestos presentes en los sedimentos con BF ₃ /MeOH/Tolueno	52
4.4.2	Desorción y metilación de los compuestos presentes en los sedimentos con BF ₃ /MeOH- Tolueno	52
4.4.3	Desorción y metilación de los compuestos presentes en los sedimentos con metóxido de sodio	54
4.5	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos mediante un tratamiento químico y posterior metilación con BF₃ /MeOH	57

4.5.1	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con tolueno y metilación con BF ₃ / MeOH	58
4.5.2	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH y metilación con BF ₃ / MeOH	59
4.5.3	Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH sin separación de las fracciones (sólida y líquida) y metilación con BF ₃ /MeOH	60
4.6	Correlación de los tiempos de retención de los compuestos eluidos por cromatografía de gases contra los Tr de los compuestos identificados por cromatografía de gases-espectrometría de masas	63
4.7	Evaluación de la reproducibilidad del método	66
4.8	Interpretación del perfil de ácidos grasos en las muestras	69
V	CONCLUSIONES	71
VI	BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1	Composición de los diversos tipos de agua	6
Figura 2	Ciclo de los carbonatos: Imposición del pH marino	7
Figura 3	Esquema de los modos de extracción posibles en la microextracción en fase sólida	14
Figura 4	Dispositivo usado en la microextracción en fase sólida con protección de membrana.	16
Figura 5	Dispositivo usado en la microextracción en fase solida	17
Figura 6	Esquema de las diferentes formas de derivatización usando microextracción en fase sólida	18
Figura 7	Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.	20
Figura 8	Ubicación geográfica de la reserva de la biosfera Ría de Celestun, Yucatán, México	23
Figura 9	Dimensiones del dispositivo	27
Figura 10	Esquema de la MEFS usando una malla en forma de cono	29
Figura 11	Cromatograma de la extracción de los estándares mediante microextracción en fase sólida sin el uso del dispositivo	38
Figura 12	Cromatograma comparativo de la extracción de los analitos mediante microextracción en fase sólida	39
Figura 13	Cromatograma comparativo de las tres extracciones realizadas mediante microextracción en fase solida para evaluar el papel filtro como membrana	40
Figura 14	Cromatograma comparativo de la extracción de los estándares mediante microextracción en fase solida	42
Figura 15	Sobreposición de los cromatogramas obtenidos en las etapas de evaluación	43
Figura 16	Gráfica comparativa de las áreas obtenidas en las extracciones realizadas para evaluar el funcionamiento de papel filtro como membrana, la malla metálica y la malla de nylon	45

Figura 17	Cromatograma de los compuestos desorbidos con diclorometano, extraídos mediante microextracción en fase sólida	47
Figura 18	Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante hidrólisis acida, compuestos extraídos mediante microextracción en fase sólida	48
Figura 19	Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante una hidrólisis básica, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida	49
Figura 20	Cromatograma comparativo de los tres tratamientos para llevar a cabo la desorción de los compuestos los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida	50
Figura 21	Gráfica de las áreas de los compuestos en función del tiempo de extracción	51
Figura 22	Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados mediante $\text{BF}_3/\text{MeOH}/\text{Tolueno}$, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida	52
Figura 23	Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados mediante $\text{BF}_3/\text{MeOH} - \text{Tolueno}$, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida	53
Figura 24	Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados con metoxido de sodio, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida	54
Figura 25	Cromatograma comparativo	56
Figura 26	Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados con metoxido de sodio, los cuales fueron extraídos por microextracción en fase sólida, y analizados por CG-EM	57
Figura 27	Cromatograma de los compuestos desorbidos de los sedimentos mediante su extracción con tolueno y derivatizados con BF_3/MeOH , los compuestos fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por cromatografía de gases	59

Figura 28	Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante la hidrólisis básica y derivatizados con BF_3/MeOH , los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por cromatografía de gases	60
Figura 29	Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante la hidrólisis básica separación de las fracciones (sólida y líquida) y derivatizados con BF_3/MeOH , los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por CG	61
Figura 30	Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante la hidrólisis básica, separación de las fracciones (sólida y líquida) y derivatización con BF_3/MeOH los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por CG-EM	63
Figura 31	Gráfica de correlación de los Tr mostrados en la Tabla 2	65
Figura 32	Gráfica de correlación de los Tr mostrados en la Tabla 2	66
Figura 33	Gráfico del área promedio obtenida para cada compuesto en las nueve extracciones realizadas, así como la barra de error de la desviación estándar al interior	67
Figura 34	Gráfico del área promedio obtenida para cada compuesto en las nueve extracciones realizadas, así como la barra de error de la desviación estándar general	68

RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la factibilidad de desarrollar un procedimiento para el análisis de biomarcadores moleculares en sedimentos de zonas costeras, específicamente para el análisis de la distribución de los ácidos grasos de cadena larga, en el que se aplique la microextracción en fase sólida (MEFS) como medio de transferir los analitos a un cromatógrafo de gases. Se demostró que no es factible extraer directamente hacia la microfibra los compuestos orgánicos presentes en los sedimentos dispersándolos en un medio acuoso simple. Debido a las fuertes interacciones entre los compuestos de interés y los sedimentos fue necesario realizar un tratamiento químico previo a la extracción de los analitos mediante MEFS.

El procedimiento químico con el cual se desorben de los sedimentos una mayor cantidad de compuestos es mediante una hidrólisis básica con potasa-metanol. Con el tratamiento alcalino y utilizando una mezcla agua-metanol como medio de transferencia hacia la fibra, los compuestos desorbidos de los sedimentos con mayor concentración fueron los ácidos grasos. Para llevar a cabo la identificación de los compuestos extraídos se utilizó cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), formando los derivados metílicos de los ácidos grasos, utilizando como derivatizante BF_3/MeOH .

El procedimiento propuesto para el análisis del perfil de ácidos grasos en sedimentos es comparativamente mejor frente a los que se utilizan actualmente, ya que reduce muy significativamente el consumo de disolventes, reactivos y el tiempo de análisis.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la química marina comprende todos los cambios químicos que ocurren en las aguas oceánicas y en sus sedimentos. Los mares son las regiones más bajas hacia donde fluyen todos los escurrimientos, tanto los superficiales como los subterráneos. Son un depósito de grandes cantidades de compuestos orgánicos y minerales que llegan en solución o en suspensión desde tierra adentro, incluyendo los desperdicios generados por el hombre, los que se transportan por la atmósfera y los que se generan en sus propias aguas. En su seno ocurren muy diversos procesos químicos y bioquímicos que conforman un sistema complejo y delicado de transformaciones. Conocer esos procesos, estudiar su evolución, determinar qué factores y en qué grado afectan al sistema es el objeto de la investigación en química acuática.

En los últimos años ha cobrado importancia el análisis de los biomarcadores moleculares en la materia orgánica presente en sedimentos de zonas costeras, ya que ofrece la posibilidad de realizar diagnósticos más finos del estado y evolución del ecosistema. La cromatografía de gases capilar acoplada a espectrometría de masas (CGC-EM) juega un papel fundamental para el análisis de marcadores moleculares, ya que añade a la capacidad de resolución de mezclas complejas de la cromatografía la posibilidad de identificar los compuestos separados con base en sus espectros de masas. Además, tiene la sensibilidad suficiente para analizar compuestos en muy bajas concentraciones con exactitud y precisión adecuadas.

Para el análisis por CGC-EM de los compuestos orgánicos en los sedimentos es necesario separar la fracción lipídica de la matriz inorgánica en la que se encuentra. El procedimiento aceptado y de uso más extendido es la extracción con disolventes y el fraccionamiento del extracto en columnas de sílice utilizando como eluyente una serie de mezclas de disolventes de polaridad creciente. Sus principales desventajas son el consumo de cantidades grandes de reactivos y disolventes y los largos tiempos de procesamiento.

En la última década se incorporó a las herramientas de manejo de muestra para los análisis por cromatografía la microextracción en fase sólida (MEFS). Es una técnica que permite la extracción de los compuestos a analizar a un dispositivo con el que se pueden inyectar directamente al cromatógrafo. Es un procedimiento prácticamente libre de disolventes y por sus dimensiones el consumo de reactivos, si es necesario, es muy bajo. Desde su aparición rápidamente se desarrollaron aplicaciones a una amplia variedad de problemas, que en la mayoría de los casos corresponden a análisis de muestras líquidas acuosas. Las aplicaciones para muestras sólidas se refieren casi exclusivamente al análisis de compuestos muy volátiles y los reportes de su uso para el análisis de compuestos poco volátiles en matrices sólidas son muy escasos.

En este trabajo se exploraron las posibilidades de aplicar la MEFS utilizando agua como disolvente de transferencia de los ácidos grasos de cadena larga desde la muestra sólida hacia la microfibra. Se estudiaron diversos arreglos experimentales y procedimientos, desde la aplicación de la fibra a la muestra suspendida directamente en agua hasta el uso de tratamientos químicos para favorecer la desorción y formar derivados de los compuestos más polares. Se evaluaron las principales variables de operación de cada esquema experimental, como son la temperatura y el tiempo para cada etapa del proceso. Se concluyó con un procedimiento que permite la MEFS y el análisis por CGC-EM de los ácidos de triacilgliceroles de sedimentos y se demostró su aplicabilidad analizando una muestra de la costa de Celestún, en el Estado de Yucatán, México.

I ANTECEDENTES

1.1 La importancia del estudio de la química acuática

Los mares, en donde probablemente surgió por primera vez la vida, son actualmente el hábitat de innumerables organismos. En el océano interactúan procesos biológicos, físicos, geológicos y químicos y en la zona costera se produce un importante intercambio de materia entre la tierra y el mar, por ello al estudio de la química marina se le conoce como biogeoquímica marina y comprende todos los cambios que ocurren en las aguas y sedimentos marinos. Estudiando el océano, la biogeoquímica marina se enfoca en los intercambios de energía entre la corteza terrestre, la atmósfera y el océano. Los intercambios de materia que existen entre la atmósfera, la tierra y el océano controlan la distribución de la vida marina.^{1, 9, 10}. Por lo tanto es importante reconocer que el estudio de la química acuática como disciplina científica nos permite aprender cómo usar y conservar los recursos biológicos y minerales de los océanos.

La mayor parte del agua de la Tierra se encuentra en el océano, una pequeña proporción está presente en la atmósfera y la tierra. Debido a las sus propiedades físicas y químicas tan particulares, el agua ha tenido gran influencia sobre la continua evolución biogeoquímica del planeta, la vida marina y terrestre dependen del agua. Esta transporta sustancias químicas disueltas y suspendidas desde la tierra y su interior hasta el océano, principalmente por medio de las cuencas y ríos, y a lo largo de este proceso ocurren transformaciones químicas. Así, el planeta puede ser visto como una fábrica química gigante.

1.2 El agua

1.2.1 Propiedades

El agua es un compuesto que presenta valores de varias de sus propiedades fisicoquímicas inusuales, por ejemplo la capacidad calorífica y sus puntos de fusión y ebullición. Cabe destacar que muchas de las propiedades del agua se deben al enlace hidrógeno el cual es un enlace intermolecular que tiene un papel relevante en la naturaleza debido a que da origen a las propiedades físicas y químicas del agua, así como también a las propiedades biológicas indispensables en la mayor parte de los procesos biológicos.

Los puentes de hidrogeno dan pie a otra propiedad muy poco común del agua, el comportamiento de la densidad con la temperatura ya que es particularmente anómalo y fundamental para la preservación de la vida acuática en tiempos de frío extremo. La fase líquida es más densa que la fase sólida, si por el contrario el agua sólida fuera más densa que el agua líquida, los lagos, ríos y mares de las regiones en las que la temperatura baja de cero grados se congelarían desde el fondo hacia arriba. Es poco probable que los peces y otros organismos acuáticos pudieran sobrevivir en un entorno así. Debido a que el hielo es menos denso que el agua líquida, a temperaturas bajo cero se forma una capa aislante de hielo sobre la superficie de los lagos, ríos y mares, lo que mantiene en estado líquido el agua que está debajo. La causa de esta peculiar característica del agua es la estructura abierta del hielo que se debe a la red de puentes de hidrogeno. En la molécula de agua cada oxígeno acepta en sus dobletes electrónicos libres dos enlaces hidrógeno procedentes de otra molécula y está unido por un enlace covalente a dos hidrógenos, los cuales a su vez establecen dos enlaces hidrógeno con otras dos moléculas de agua. De esta manera cada oxígeno está próximo a otros cuatro átomos de oxígeno, como la disposición relativa de los enlaces de valencia y de los dobletes electrónicos libres de un mismo oxígeno posee una geometría tetraédrica, los oxígenos tienden a colocarse en la cimas de una red tetraédrica, esto es lo que ocurre en el hielo, la estructura no corresponde al empilamiento más compacto posible de los oxígenos. En realidad estos se encuentran sujetos entre sí por cuatro barras rígidas con una parte dura difícil de romper, el enlace O-H y una parte mucho más flexible, los enlaces hidrógeno que puede eventualmente romperse y cuando esto ocurre los oxígenos se aproximan ligeramente unos a otros lo que tiene como resultado una configuración mucho más densa, es precisamente esta situación la que ocurre cuando se funde el hielo.

Otra característica del agua es su alto calor específico. Esto le permite absorber una gran cantidad de calor mientras que su temperatura sólo aumenta ligeramente. Lo inverso también sucede: es decir, el agua puede proporcionar mucho calor con una disminución muy ligera en su temperatura. Por esta razón, las cantidades inmensas de agua que están presentes en los océanos y los lagos moderan eficazmente la temperatura de las áreas adyacentes absorbiendo el calor en verano y proporcionando calor en invierno, con sólo ligeros cambios en la temperatura del cuerpo del agua.³

1.2.2 Distribución de los diversos tipos de agua

El agua cubre el 71 % de la superficie terrestre. El 97 % del agua sobre la tierra es salada y se encuentra en mares y océanos, el 3 % restante es agua dulce, de la cual el 2.6 % está concentrada en los casquetes polares, los glaciares o es agua profunda inaccesible, por lo que sólo es asequible el 0.4 % del total (Figura 1).^{4, 5}

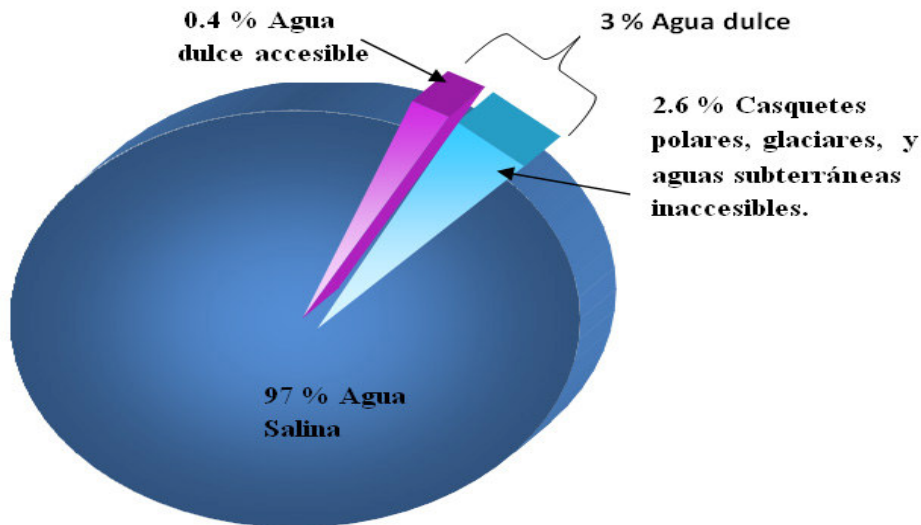
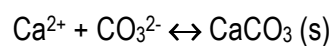
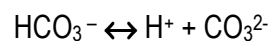
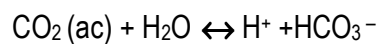


Figura 1. Composición de los diversos tipos de agua.

1.3 Sistema de carbonatos

La mayor parte del carbono en los océanos se produce como parte del sistema de carbonatos; este sistema involucra las transformaciones ocurridas al CO_2 , la cual inicia una vez que el CO_2 gaseoso en disolución forma el CO_2 acuoso, el cual al ser hidratado da la formación de ácido carbónico, esta especie presenta disociaciones protónicas para formar al ión bicarbonato y carbonato.



Este sistema regula el pH del agua de mar y controla la circulación de CO_2 entre la biosfera, litosfera, atmósfera y los océanos.

La mayor parte del carbono presente en el océano se encuentra en forma de bicarbonato producido por la disolución en el agua del CO_2 atmosférico, las plantas asimilan este carbón que es el inicio de la red trófica. Eventualmente, por formación de heces y detritos se convierte en partículas como partículas de carbono orgánico POC o carbonato de calcio, que son transferidas a aguas profundas y sedimentos. Aunque los sedimentos contienen menos del 1 % de materia orgánica (MO) y en los márgenes continentales alcanza hasta el 10 %, la materia orgánica sedimentada es un gran reservorio de carbono que está compuesta principalmente de carbono fijado por el fitoplancton marino.

El CO_2 entra en el océano a través de la interface aire – mar y participa en los equilibrios indicados en la Figura 2, estos procesos están lejos de ser simples ya que las tasas de circulación de CO_2 a través de la interface y de las aguas profundas a la superficie varía con la latitud, el tiempo, temporada, y los procesos biológicos.

Una vez que el CO_2 se introduce en el mar este participa en una serie de equilibrios complejos que son mediados por la interacción con su entorno (Figura 2).

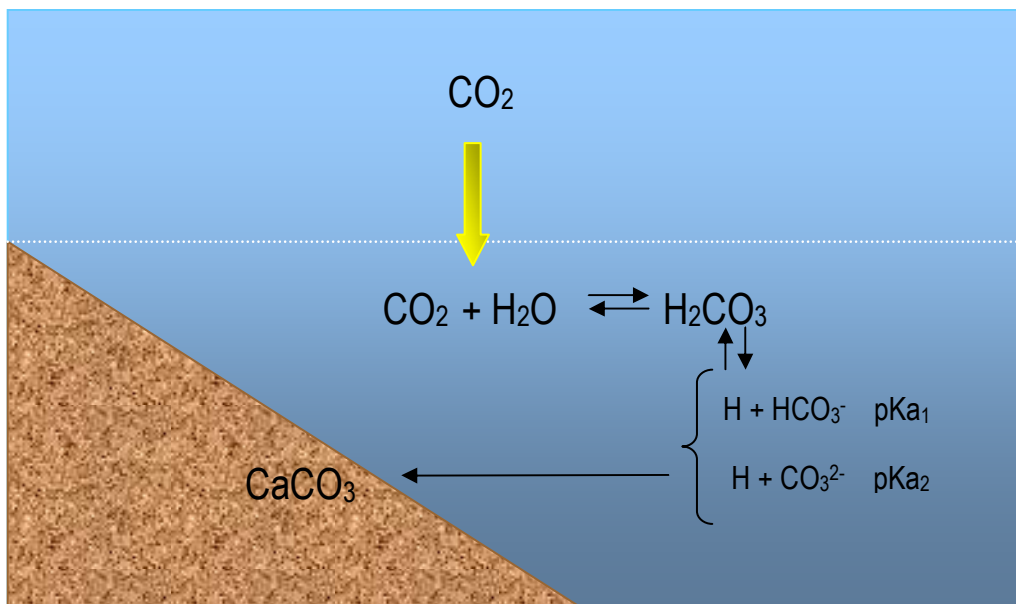


Figura 2. Ciclo de los carbonatos: Imposición del pH marino

1.4 Diagénesis

Por encima del suelo oceánico las partículas de materia orgánica están sujetas a cambios físicos y químicos. La materia orgánica está compuesta por una gran diversidad de cuerpos y sustancias orgánicas como organismos muertos, secreciones animales, entre otros. Su acopio en el piso del mar, su deposición y compactación es en suma lo que colectivamente se conoce como diagénesis. La superficie del suelo oceánico representa también el hábitat de una gran variedad de organismos marinos.

Los cuerpos muertos, desechos y excreciones de organismos marinos se depositan en el fondo oceánico junto con partículas inorgánicas las cuales son sepultadas por capas posteriores. En la materia orgánica depositada se llevan a cabo transformaciones a través del tiempo, la etapa temprana denominada diagénesis, ocurre en sedimentos recientes y se lleva a cabo a temperatura de 50 y 60 °C.⁸ La mayoría de los cambios químicos ocurridos en la diagénesis son resultado de reacciones redox, las cuales involucran oxidaciones de la materia orgánica. Los cambios físicos ocurridos a las partículas que son sepultadas por debajo de los sedimentos o en la interface del suelo marino, incluyen la alteración del tamaño y porosidad de las partículas.

1.5. Materia orgánica

La materia presente en los océanos se compone de una gran variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos los cuales se encuentran disueltos o precipitados, consisten en una mezcla de organismos vivos y muertos tales como el fitoplancton, zooplancton, bacterias, productos de degradación y exudación. En la zona eufótica la mayor porción de partículas de materia orgánica se debe al fitoplancton, la composición química puede variar con las especies así como con la condiciones ambientales, esto conduce a variaciones significativas en la naturaleza de las partículas de materia orgánica.⁹ Los organismos acuáticos tienen gran influencia sobre la distribución de la materia orgánica presente en los océanos, la cual es degradada mediante reacciones metabólicas llevadas a cabo por los organismos.^{1,9} (Ver Tabla 2)

Tabla 1. Productos de la degradación de la materia orgánica.

Compuestos	Descomposición intermedia	Intermediarios y productos
Proteínas	Polipéptidos → RCH(NH ₂)COOH →	$\left\{ \begin{array}{l} \text{RCOOHR} \\ \text{RCH}_2\text{OHCOO} \\ \text{H RCH}_2\text{OH} \\ \text{RCH}_3 \\ \text{RCH}_2\text{NH}_2 \end{array} \right.$ NH ₄ ⁺ , CO ₂ , HS, CH ₄ , HPO ₄ , péptidos, ácidos, fenoles, ácidos grasos.
Polinucleótidos	Nucleótidos → base purínica y pirimidínica.	
Lípidos		
Grasas } Ceras } Aceites } Carbohidratos }	RCH ₂ CH ₂ COOH + CH ₂ OHCHOHCH ₂ OH Ácidos grasos Glicerol	$\left\{ \begin{array}{l} \text{RCH}_2\text{OH} \\ \text{RCOOH} \\ \text{RCH}_3 \\ \text{RH} \end{array} \right.$ CO ₂ , CH ₄ , ácidos alifáticos, acético, láctico, cítrico, palmítico, esteárico, oleico, carbohidratos.
Celulosa } almidón }	C _x (H ₂ O) _y → $\left\{ \begin{array}{l} \text{Monosacáridos} \\ \text{Oligosacáridos} \end{array} \right.$	$\left\{ \begin{array}{l} \text{Hexosas} \\ \text{Pentosas} \end{array} \right.$ HPO ₄ ²⁻ , CO ₂ , glucosa, galactosa, ribosa.
Lignina	(C ₂ H ₂ O) _x → Alcoholes aromáticos insaturados → Ácidos carboxílicos	
Substancias complejas formadas a partir de rupturas de los intermediarios.		
Fenoles + quinonas + amino compuestos	→	Melaninas, melanoidina
Amino compuestos + productos de degradación de carbohidratos	→	Ácidos húmicos, ácidos fúlvicos

La materia orgánica formada durante el proceso de fotosíntesis es parcialmente metabolizada para satisfacer los requerimientos energéticos, otra parte de la materia orgánica va a ser asimilada por niveles tróficos más altos y eventualmente liberada en el agua por la autólisis de las células muertas o excretada activamente por diversos organismos tales como algas bentónicas, copépodos, erizos de mar, así como las especies planctónicas.⁹

La concentración de materia orgánica particulada (MOP) disminuye conforme se incrementa la profundidad, en general decrece en forma exponencial hasta alcanzar una concentración uniformemente baja en la zona profunda. Muchas de las partículas de materia orgánica que se

van hundiendo son descompuestas en la termoclina, debido a esto la contribución relativa de la materia orgánica descompuesta se incrementa con la profundidad. En la descomposición de la materia orgánica los primeros compuestos en ser degradados son los biopolímeros.

1.5.1 Clasificación de la materia orgánica

La materia orgánica a menudo se define en dos fracciones: materia orgánica particulada MOP y materia orgánica disuelta (MOD). Cuando se hace pasar una muestra de agua de mar a través de un filtro de fibra de vidrio con un tamaño de poro determinado, usualmente de 0.4µm, la materia orgánica que se retiene (materia sólida suspendida y coloides) se llama MOP¹, la que pasa el filtro junto con el agua es la MOD.

1.6 Biomarcadores Moleculares

Los biomarcadores moleculares, también conocidos como bioindicadores, son compuestos utilizados como huellas digitales de organismos o de ciertos procesos medio ambientales.^{6, 11} Algunas moléculas son sintetizadas por un sólo tipo de organismo en este caso marino, y pueden utilizarse como biomarcadores debido a que proveen la información necesaria para determinar la presencia inequívoca de un organismo. Se puede conocer la fuente de origen, los cambios bioquímicos, así como también aberraciones en los organismos, como la exposición a químicos o sus efectos resultantes. La distribución específica de los compuestos proporciona información de los procesos biogeoquímicos. La característica principal de los biomarcadores es que su estructura base se mantiene constante, o cambia muy poco con los procesos químicos y biogeoquímicos de su ambiente.^{1, 6, 9}

Muchas familias de compuestos proporcionan información general o específica, dentro de ellas encontramos a los carbohidratos, proteínas, aminoácidos, hidrocarburos, ácidos carboxílicos, lípidos, ésteres, esteroides, cétonas, alcoholes, aldehídos, las cuales son utilizadas como bioindicadores o bien biomarcadores moleculares.

1.7 Lípidos

Los lípidos constituyen un grupo de compuestos químicamente diversos cuya característica principal es su insolubilidad en el agua. En muchos organismos, las grasas son la principal forma de almacenamiento energético, mientras que los fosfolípidos constituyen los principales elementos estructurales de las membranas biológicas. Los lípidos en sedimentos marinos han sido usados como biomarcadores para inferir variaciones pasadas de tipo climático.¹¹

Las clases de lípidos y de ácidos grasos se pueden utilizar para determinar la producción de material biogénico marino de valor para la dieta pelágica y organismos bentónicos.¹⁸ En ecosistemas marinos dos clases de lípidos son de particular interés, los triglicéridos y los fosfolípidos los cuales están bioquímicamente relacionados.¹¹ Ambos poseen un esqueleto o columna vertebral para que 2 ó 3 ácidos grasos sean esterificados y también comparten un precursor común.¹¹

1.7.1 Ácidos grasos

Las plantas superiores contienen ceras correspondientes a ácidos grasos de cadenas largas los cuales son transportados por vía aérea a zonas oceánicas remotas. Estos lípidos preservados en los sedimentos ayudan a reconstruir las variaciones de la cobertura de la vegetación terrestre combinada con los vientos y sus intensidades¹⁶.

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas que pueden ir de cuatro a treinta y seis carbonos (C₄ – C₃₆). La cadena hidrocarbonada puede ser saturada o insaturada, lineal o ramificada; pueden contener anillos de tres carbonos, grupos hidroxilo o grupos metilo en las ramificaciones.¹¹ Los ácidos grasos más abundantes en la naturaleza tienen números pares de átomos de carbono en una cadena sin ramificar de entre doce y veinticuatro carbonos.

Sus propiedades físicas varían conforme a la longitud de la cadena hidrocarbonada y el grado de insaturación, cuanto más larga es la cadena y menor el número de enlaces dobles menor es la solubilidad en el agua. La ligera solubilidad presente en los ácidos grasos de cadenas cortas se debe a que por su escasa longitud la hidrofobicidad de la cadena no anula el efecto hidrofílico del grupo ácido carboxílico que es polar.¹⁹

El punto de fusión en los ácidos grasos insaturados es menor que en los ácidos grasos saturados. El doble enlace provoca un doblamiento en la cadena hidrocarbonada, impidiendo un

empaquetamiento tan fuerte como el presente en los ácidos grasos saturados, dado que se necesita menos energía térmica para desordenar estos conjuntos poco ordenados de ácidos grasos insaturados, esto se ve reflejado en los puntos de fusión.

Aunque los ácidos grasos son los principales componentes de la mayoría de los organismos se ha encontrado que son útiles como biomarcadores debido a la variedad de ácidos grasos en diferentes organismos y por su estabilidad ya que permite que se conserven o persistan a través de los periodos geológicos. La mayoría de los ácidos grasos surgen de la hidrólisis de los triglicéridos durante la degradación de la materia orgánica en descomposición.

Los ácidos grasos saturados de cadenas lineales de número de carbono pares son los que más comúnmente se encuentran en los organismos vivos. El ácido palmítico (16:0) a menudo es el primero o segundo más abundante en los organismos. Sin embargo también están presentes en los organismos pequeñas cantidades de ácidos grasos insaturados de cadenas lineales con números de carbonos impares

Aquellos que presentan una o dos dobles ligaduras con cadenas de números de carbonos pares son otro grupo igualmente importante ya que se encuentra en los organismos y especialmente en los organismos acuáticos. Dentro de este grupo los ácidos con C_{16} y C_{18} son los más comunes encontrados en organismos acuáticos.

Los ácidos en un rango de C_{10} – C_{22} son los que principalmente se encuentran en agua de mar, con predominancia en aquellos ácidos de C_{16} y C_{18} y se atribuye su presencia a fuentes fitoplanctónicas.

El predominio en 16:1/16:0 originalmente se propuso como marcador de diatomeas¹¹ Un incremento en ambos compuestos representa aumento en la proporción de diatomeas. El ácido graso 16:4 puede ser también utilizado para evaluar la presencia de diatomeas, este ácido graso se encuentra comúnmente en las diatomeas y raramente se encuentra en otra fuente de fitoplancton. Además de cantidades elevadas de ácidos grasos compuestos por cadenas de 16 carbonos, las diatomeas producen en gran proporción compuestos de cadenas de 20:5 ω 3

Los dinoflagelados suelen contener una mayor proporción de ácidos grasos con 22:6 ω 3, la combinación de estos dos ácidos grasos 22:6 ω 3, 20:5 ω 3 produce un marcador que refleja el predominio de diatomeas, frente dinoflagelados, no obstante, cabe señalar, que este marcador sólo

se aplica en determinados ambientes donde las diatomeas y los dinoflagelados son los principales productores de 22:6 ω 3, 20:5 ω 3 respectivamente.¹¹

Los ácidos de bajos pesos moleculares también se encuentran presentes en los sedimentos marinos producto de la degradación microbiana de materia orgánica. Varios ácidos grasos, específicamente 15:0 y 17:0 y todos los ácidos grasos ramificados se producen principalmente por bacterias aeróbicas y anaeróbicas, y la suma de los ácidos grasos se ha utilizado para estimar las contribuciones bacterianas.¹⁸

En ambientes marinos siempre hay interés en determinar la contribución de plantas terrestres, los ácidos grasos de cadenas mayores a C₂₄ carbonos a menudo se usan como indicadores de la contribución de plantas terrestres, sin embargo su análisis es problemático, ya que estos ácidos grasos eluyen en la mayoría de las columnas cromatográficas a temperaturas muy altas e incluso rebasan los límites de la temperatura máxima. Por el contrario, los ácidos grasos de cadenas de 18:2 ω 6 y 18:3 ω 3, que se encuentra en cantidades elevadas en la mayoría de plantas terrestres, pueden utilizarse como marcadores de influencia terrestre. Estos marcadores también comprenden casi el 10% del total de ácidos grasos en los sedimentos, lo que sugiere que el material terrestre se preserva en mayor medida que los ácidos grasos marinos en los sedimentos

Mediante el examen de muestras de plantas terrestres, polen, fluviales, y de plancton, se ha asignado un umbral empírico de 2.5 % a este indicador, de esta manera las muestras con valores mayores se pueden considerar que tienen una aportación importante de material terrestre como fuente de materia orgánica.

1.8 Métodos utilizados para el análisis de biomarcadores

El análisis de los biomarcadores moleculares presentes en sedimentos de zonas costeras puede ser difícil debido a la complejidad química, a las interacciones con la matriz y a la forma en que se encuentran incluidos en las partículas del sedimento. Si bien, la capacidad de separación de las técnicas cromatográficas modernas es amplia, todavía resulta insuficiente para muestras que pueden tener varias centenas de compuestos. Los sistemas acoplados con espectrometría de masas permiten resolver parte de las dificultades de analizar muestras tan complejas y el potencial de los sistemas bidimensionales (CGxCG – EM) es prometedor; Sin embargo, existe el problema de

obtener el extracto apropiado para el análisis. Los tratamientos para obtener los extractos de la materia orgánica de las muestras de sedimentos requieren de extracciones tardadas, el uso de grandes cantidades de disolventes y con frecuencia un fraccionamiento por cromatografía en columna.

1.9 Microextracción en fase sólida (MEFS)

Es una técnica que se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico.

El principio en el que se basa la MEFS es la partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza en el momento en que la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción termina cuando la concentración del analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la fibra y la muestra.

Existen básicamente dos modos de extracción posibles en MEFS, introduciendo la fibra directamente en el seno la muestra en el caso de muestras líquidas o bien en el espacio de cabeza o *headspace*. (Ver Figura 3)

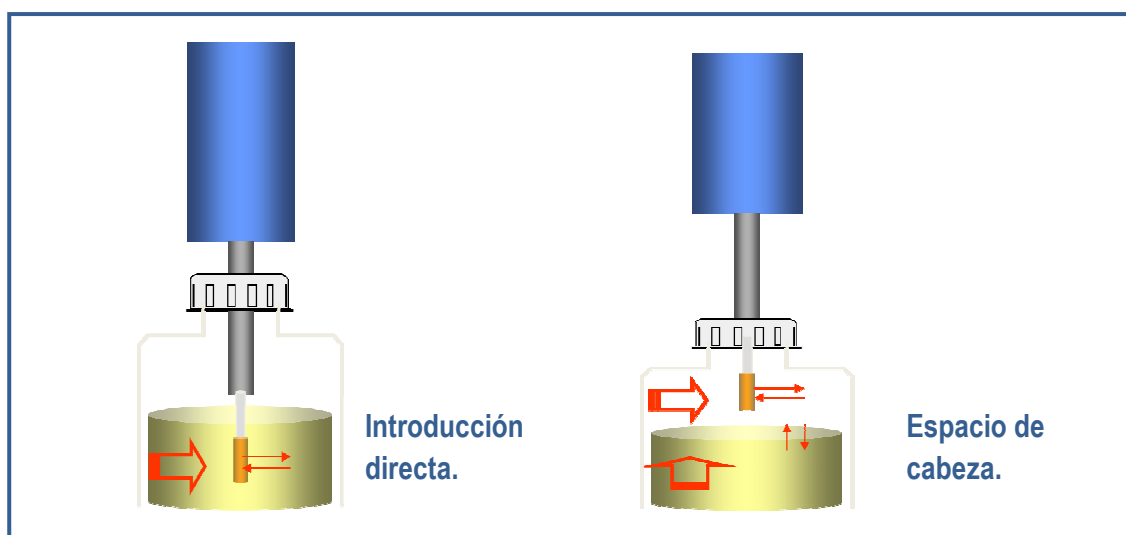


Figura 3. Esquema de los modos de extracción posibles en la microextracción en fase sólida.

El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito absorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. Esta afirmación se muestra reflejada en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + V_s} \quad (1)$$

Donde n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra respectivamente, K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra y C_0 es la concentración inicial de analito en la muestra. En la ecuación (1) se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del espacio de cabeza. El modelo matemático del proceso de MEFS cuando los analitos se extraen del espacio de cabeza fue desarrollado posteriormente y las ecuaciones y conclusiones a las que se llegaron son similares a las de la extracción por inmersión pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa.

En las condiciones de trabajo de la MEFS, generalmente se cumple que $V_s \gg K_{fs} V_f$ ya que en la mayoría de los casos V_f es mucho más pequeño que V_s por lo que la ecuación (1) se transforma en la siguiente:

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad (2)$$

En la ecuación (2) se puede observar que la cantidad de analito extraída (n) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de muestra. Esta aproximación no es válida en el caso en que los analitos a determinar tengan valores de K_{fs} muy elevados (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños. Otro factor que se debe tener en cuenta es el hecho de que no en todos los tipos de fibras existentes actualmente la extracción de los analitos se realiza mediante un proceso de absorción, que es lo que se considera en este modelo matemático.

Una tercera forma que no ha sido muy aplicada hasta la actualidad es la denominada MEFS con protección de membrana Figura 4. En este modo de extracción se coloca una membrana la cual impide el contacto directo de partículas sólidas de la muestra con la fibra, lo que podría dañar la fibra o provocar efectos indeseables durante el análisis.

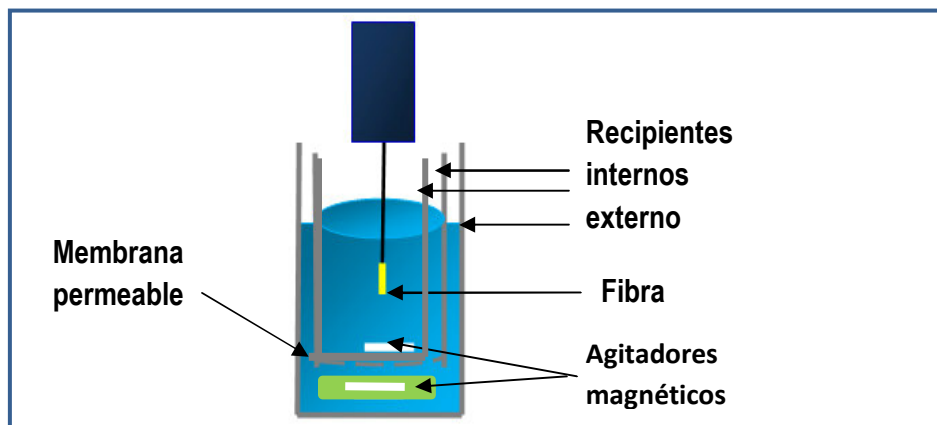


Figura 4. Dispositivo usado en la microextracción en fase sólida con protección de membrana.

1.9.1 Procedimiento de la MEFS

La técnica de MEFS se lleva a cabo básicamente en dos etapas. La primera consiste en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra hacia la fibra recubierta de un polímero con polaridades semejantes a la de los analitos de interés, la fibra se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra.

En la segunda etapa de la MEFS, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra, ésta se lleva a cabo térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, de forma que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas portador.¹³ Por otra parte el tamaño pequeño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa.

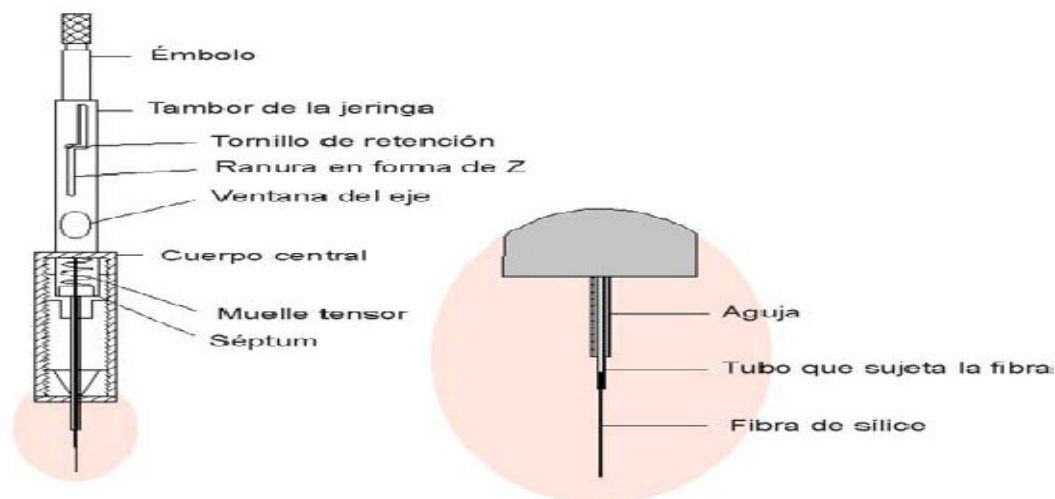


Figura 5. Dispositivo usado en la microextracción en fase sólida.

1.9.2 Parámetros de extracción

Los parámetros que pueden afectar el proceso de absorción/adsorción son los siguientes: el tiempo y la temperatura de extracción, la agitación de la muestra, el volumen de muestra así como las condiciones de la muestra (pH, adición de sales o disolventes orgánicos).

El tiempo de extracción en MEFS es un parámetro muy importante a tener en cuenta. Al desarrollar un método analítico basado en MEFS se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio que es característico de cada analito-fibra e intentar trabajar en esas condiciones. El tiempo de equilibrio es aquél a partir del cual la cantidad de analito extraída se mantiene constante. Sin embargo, para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar a esta situación es muy elevado por lo que generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio y se seleccionan tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis.¹³

La forma más habitual de llevar a cabo la desorción de los analitos es térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, de forma que al aumentar la temperatura la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas portador. En la ecuación (3) se puede observar como disminuyen linealmente los coeficientes de partición al aumentar la temperatura:

$$\log K_{fs} = a (1/T) + b \quad (3)$$

Donde K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra líquida, a y b son dos constantes y T es la temperatura. Los puertos de inyección, generalmente los inyectores *split/splitless* de los cromatógrafos de gases son muy adecuados para llevar a cabo la desorción de los analitos de la fibra.

1.9.3 Derivatización de las muestras

La determinación de compuestos polares presenta un mayor problema en el análisis medio ambiental.¹³ Estos analitos son generalmente muy difíciles de extraer y de separar mediante cromatografía de gases (CG). La derivatización de estos compuestos para formar compuestos menos polares es una alternativa frecuentemente utilizada para intentar resolver este problema, que puede ser combinada con la MEFS de diferentes maneras.^{12, 13.}

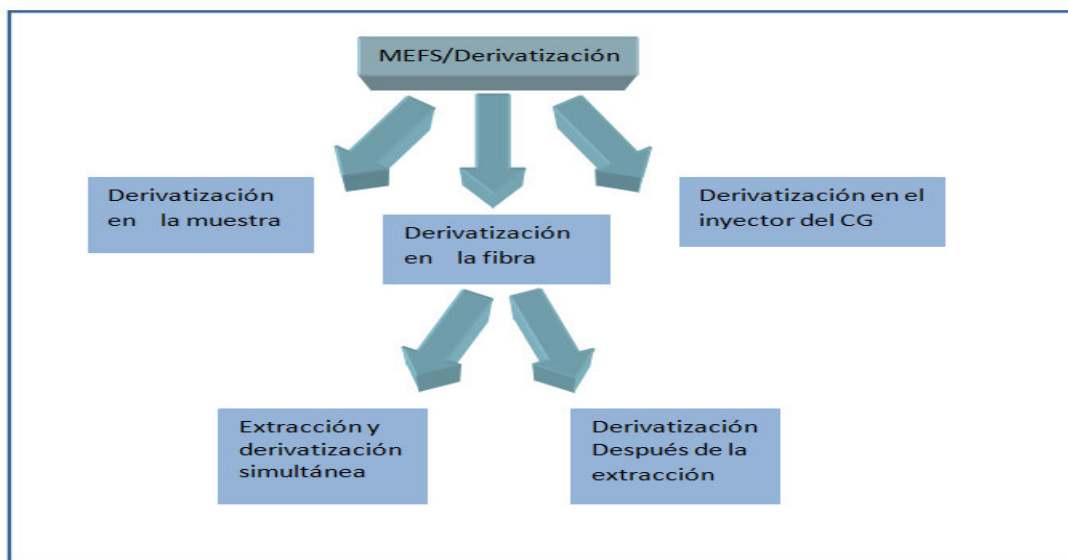


Figura 6. Esquema de las diferentes formas de derivatización usando microextracción en fase sólida.

Para llevar a cabo la derivación de los analitos de interés existen cuatro vías diferentes: (1) Directamente en la muestra; Esta consiste en añadir el reactivo derivatizante al vial que contiene la muestra, posteriormente los compuestos derivados son extraídos por la fibra y desorbidos en el CG. La derivación en fibra se puede llevar a cabo mediante dos rutas, la primera: (2) Una vez que los analitos han sido extraídos mediante MEFS la fibra es introducida en un vial que contenga el derivatizante, la segunda: (3) Consiste en llevar a cabo la MEFS y la derivación simultáneamente,

esta se realiza introduciendo la fibra en el vial que contiene el reactivo derivatizante a una concentración muy elevada de manera que la fibra queda dopada. A continuación se introduce la fibra en el espacio de cabeza del vial que contiene los analitos y se produce la extracción de los mismos y al mismo tiempo su derivación.^{12, 13}

Por último en caso que la reacción de derivatización se deba realizar a elevada temperatura: (4) Esta se lleva a cabo en el inyector del cromatógrafo de gases. Los analitos y el reactivo derivatizante son extraídos simultáneamente o en dos etapas distintas y posteriormente la fibra es introducida en el inyector del CG donde se produce la reacción de derivación al mismo tiempo que se produce la desorción.^{12, 13}

1.10 Cromatografía de gases- Espectrometría de masas

La técnica más ampliamente utilizada para el análisis de biomarcadores moleculares es la cromatografía de gases, esta a menudo se combina con otras técnicas de análisis como la espectrometría de masas (EM), ambos métodos proporcionan herramientas para la identificación de los componentes de mezclas complejas.¹⁷

La técnica de análisis consiste en la separación de los compuestos presentes en los sedimentos mediante CG y la identificación del pico cromatográfico se lleva a cabo principalmente por espectrometría de masas EM, estas dos técnicas en conjunto facilitan el análisis de muestras medioambientales, las ventajas que presentan cada una de ellas por separado y en conjunto hace que sean las técnicas más utilizadas.

La CG se limita a muestras volátiles las cuales deben ser térmicamente estables, esta técnica se basa en la distribución de la muestra entre dos fases. Una fase es el lecho estacionario de extensa superficie empacada apretadamente dentro de una columna, la fase estacionaria puede ser un sólido o una delgada película líquida que recubre al sólido. La otra fase consiste en un gas o líquido que percola sobre la fase estacionaria y alrededor de la misma, esta es la fase móvil.¹⁵

En la cromatografía de gases la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de un gas inerte, la fase móvil

no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. ¹⁷

Las partes básicas de las que se conforma un cromatógrafo de gases se muestran en la Figura (7). El gas portador (1), el sistema de inyección de muestra o puerto de inyección (2), columna capilar (3), el sistema de detección en cual más utilizado es detector de ionización de flama (4) ¹⁷

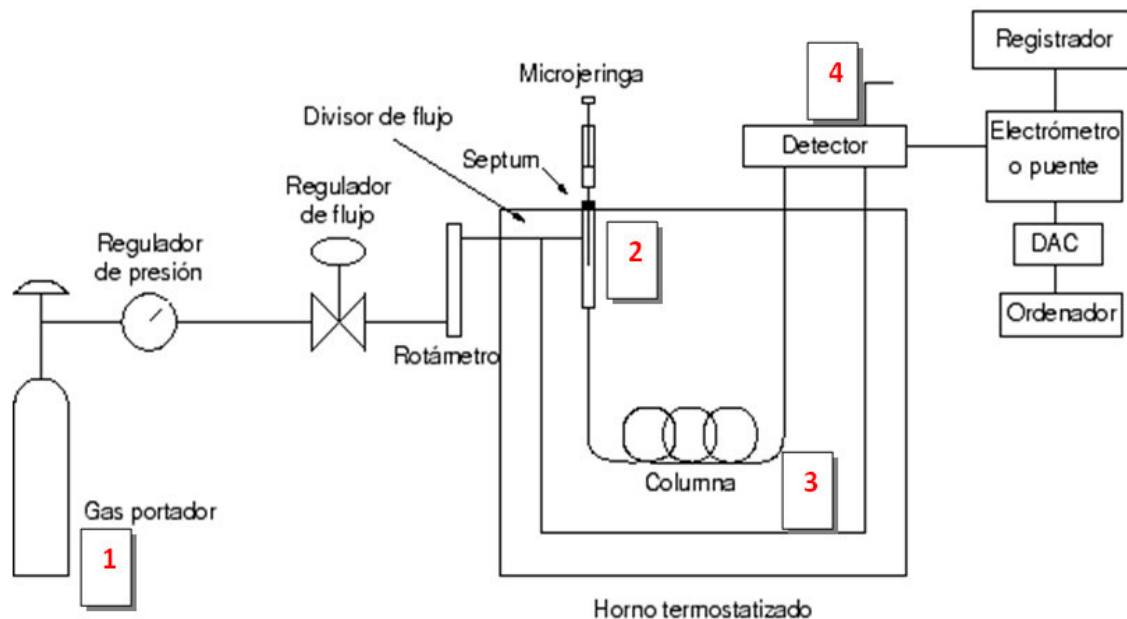


Figura 7. Representación esquemática de un cromatógrafo de gases.

Para llevar a cabo la identificación del pico cromatográfico se utiliza un EM el cual una vez que el efluente de la columna cromatográfica sale, este es ionizado y es fragmentado mediante un bombardeo de electrones en la cámara de ionización. Una vez ionizados los iones son dirigidos a un analizador de masas, el cual los separa selectivamente de acuerdo a una relación masa/carga de esta manera son separados.

El proceso de identificación por EM requiere de una fuente de ionización, un analizador o separador másico, un detector y un registrador.

En conjunto estas dos técnicas son ampliamente utilizadas en el análisis de muestras medio ambientales, debido a la rapidez del análisis, la selectividad, sensibilidad, y provee la información

necesaria para la identificación de los compuestos presentes en mezclas complejas como los son los sedimentos de zonas costeras.

II OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Implementar una metodología que permita efectuar la MEFS de la fracción lipídica en sedimentos, con la cual sea posible el análisis de los ácidos grasos presentes en sedimentos y reduzca significativamente el consumo de reactivos y disolventes.

2.2 Objetivos particulares.

- 2.2.1 Evaluar el efecto sobre la eficiencia de extracción de la disposición y el material de la membrana que separa la fibra del resto del sistema de muestreo.
- 2.2.2 Evaluar el efecto sobre la eficiencia de extracción que tiene la presencia de los sedimentos en el sistema de extracción.
- 2.2.3 Estudiar el efecto de tratamientos químicos ácidos y básicos del sedimento sobre la liberación de los ácidos grasos de la muestra sólida.
- 2.2.4 Establecer las condiciones para formar *in situ* los derivados metílicos de los ácidos grasos de los sedimentos.
- 2.2.5 Estudiar la cinética de la MEFS de los ácidos grasos (o sus derivados metílicos) bajo las condiciones de tratamiento de la muestra seleccionadas.
- 2.2.6 Evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad por submuestreo del procedimiento establecido.
- 2.2.7 Aplicar el procedimiento de MEFS establecido para la caracterización por CGC-EM de los ácidos grasos en una muestra de sedimento.

III METODOLOGIA

3.1 Muestreo

La muestra de sedimentos se tomó de la reserva de la biosfera Ría de Celestún, Yucatán, México. Se localiza en el extremo norte occidental de la Península de Yucatán y tiene una superficie de 85 474.97 ha.

Limita al norte con la reserva estatal de El Palmar y al sur con la reserva de la biosfera Los Petenes en el estado de Campeche.



Figura 8. Ubicación geográfica de la reserva de la biosfera Ría de Celestun, Yucatán, México.

La recolección se realizó superficialmente a una profundidad de 0 a 15 cm de la superficie. Los sedimentos fueron depositados en recipientes de plástico los cuales fueron cerrados y conservados en refrigeración hasta llegar a su destino: Laboratorio 101 de la división de estudios de posgrado, Facultad de Química, UNAM.

3.2 Conservación de la muestra

Una vez que las muestras llegaron al laboratorio en la Ciudad de México, se liofilizaron y se almacenaron en congelación a una temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$.

La liofilización de los sedimentos se realizó tomando pequeñas cantidades de muestra, se congelaron con nitrógeno líquido y se mantuvieron en la liofilizadora durante 8 horas para extraer el

agua en su totalidad. Posteriormente fueron empaquetados en bolsas de plástico y conservados en congelación a -15 °C.

3.3 Equipo, materiales, y reactivos

Equipo:

- Liofilizadora; Heto DRYWINNER, Modelo DW 1,0-110
- Centrifuga; International clinical centrifuge, Modelo CI A 3076k-24
- Ultrasonido; Branson instruments, ing. Modelo D-50
- Cromatógrafo de gases; Hewlett Packard Modelo 5890 A
- Cromatografo de gases; Agilent 6890N, acoplado a un detector selectivo de masas; Agilent, Modelo 5973
- Columna: Crossbond 5% difenil 95% dimetilpolisiloxano; 30m de longitud, 0.32mm de diámetro interno, 0.1 μ m grosor de película
- Columna: ZB-5 5% difenil 95% polidimetilsiloxano; 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno, 0.25 μ m grosor de película

Materiales.

- Agitadores magnéticos de 5 mm x 3 mm y 10 mm x 3 mm
- Fibra de polidimetilsiloxano de 100 μ m (PDMS)
- Soporte de la fibra para inyección (Supelco, Bellafonte, P.A., USA.)
- Cronómetro
- Jeringa de 5 ml
- Pipetas graduadas
- Parrilla eléctrica.
- Pipetas Pasteur
- Tubos de ensayo
- Termómetro
- Viales de vidrio de 10 ml con tapón horadado (Supelco USA)

- Tapas de plástico para tubos
- Dispositivo para llevar a cabo la Microextracción en fase sólida con protección de membrana. Se diseñó en el laboratorio 101, División de estudios de posgrado, Facultad de Química, UNAM. El diagrama se muestra en la (Figura. 4 y 9)
- Papel filtro Whatman No. 4
- Malla metálica No 80: Tamaño de abertura 180 μm . Stándar testing sieve. USA.
- Malla de Nylon No. 120
- Bolsas Ziploc

Reactivos:

- Mezcla de estándares; Éster metílico del ácido decanoico, Éster metílico del ácido decanoico, Éster metílico del ácido undecanoico.
- HCl; J.T. Baker, R.A.
- MeOH; J.T. Baker, R.A.
- Tolueno. J.T. Baker, R.A.
- BF_3/MeOH al 14% Sigma, Aldrich
- Agua destilada
- Nitrógeno líquido
- Soluciones:
 - KOH/MeOH al 5%
 - HCl/ MeOH al 5 %
 - Metóxido de sodio 0.5 N.

3.4 Condiciones cromatográficas

Cromatógrafo de gases equipado con un detector de ionización de flama (FID) por sus siglas en inglés, columna Crossbond descrita en el apartado anterior. Se utilizó hidrógeno como fase móvil y para la alimentación del detector, adicionalmente se usó nitrógeno para la purga de la válvula y aire para el detector.

El modo de inyección fue splitless, manteniendo la válvula cerrada por un minuto.

El detector se mantuvo a una temperatura de 300°C, el inyector a 250°C y la rampa de calentamiento se trabajó con una temperatura inicial 40° C por un minuto; calentando a 10° C por minuto hasta 300° C; manteniendo esta temperatura por 5 minutos.

Para identificar los compuestos se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas EM con inyector split/splitless, y un analizador cuadrupolar, la columna utilizada fue la ZB-5 5% fenil- 95 polidimetilsiloxano ya descrita. Se utilizó helio como gas acarreador. La temperatura del inyector fue de 250°C, la temperatura de la línea de transferencia fue de 230°C. La rampa de calentamiento con la cual se trabajó fue; temperatura inicial 40° C por un minuto; 10° C por minuto hasta 300° C y 300° C por 5 minutos.

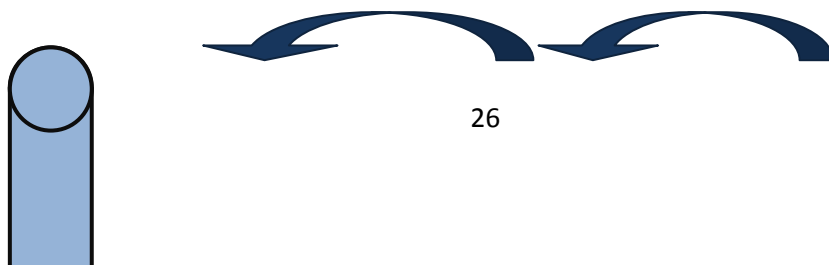
El modo de inyección fue splitless manteniendo la válvula cerrada por un minuto.

3.5 Evaluación del dispositivo

El método utilizado para llevar a cabo la microextracción en fase sólida, fue el de protección de membrana (Figura 4). Se utilizó este método para impedir el paso de los sedimentos (que se encuentran en el fondo del tubo) hacia la fibra, esto con el fin de proteger la fibra de aquellos compuestos que pudieran dañarla

3.5.1 Descripción del dispositivo a evaluar

El dispositivo a evaluar consta de tres tubos de vidrio de diferentes tamaños, en el primer tubo y en el de mayor tamaño se introduce la muestra que se quiere analizar, el disolvente utilizado como medio de transferencia de los analitos hacia la fibra y un agitador magnético. Posteriormente se introduce un segundo tubo de menor tamaño (con orificios en el fondo) que proporciona soporte al material utilizado como filtro o membrana. El último tubo se incorpora dentro del segundo tubo para ajustar perfectamente el filtro o membrana utilizada, se introduce un agitador magnético en el interior de este último tubo con el fin de mejorar la transferencia de materia. En la Figura 9 se muestra un diagrama de cómo está estructurado el dispositivo utilizado.



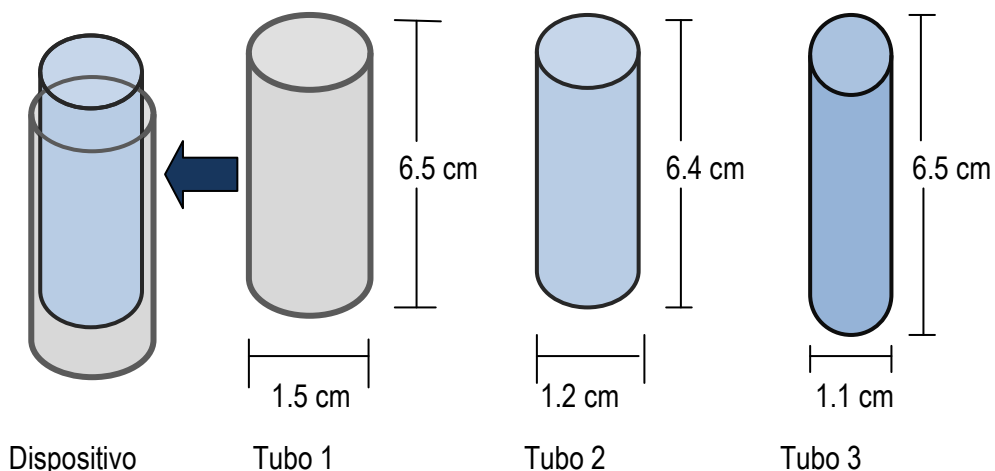


Figura 9. Dimensiones del dispositivo.

3.5.2 Evaluación de la influencia del material utilizado como membrana

Se evaluaron filtros de diferentes materiales: papel filtro, malla metálica y malla de nylon. Se determinó la eficiencia de la transferencia de materia realizando extracciones de la solución de estándares con cada uno de los materiales propuestos como filtros y se estudió el efecto de la presencia de los sedimentos. Se midieron las áreas de tres analitos de la solución estándar extraídos bajo cada una de las condiciones experimentales y se compararon con las obtenidas al realizar la MEFS sin el uso de la membrana.

3.5.2.1 Procedimiento para la evaluación de la transferencia de materia a través de las membranas de papel filtro y malla metálica

Se realizaron las siguientes extracciones:

- 1) 1 μ l de mezcla de estándares en 5ml de agua, la extracción se realiza sin el uso del dispositivo.
- 2) 1 μ l de mezcla de estándares en 5ml de agua, la extracción se realiza con el dispositivo.

En el tubo número uno se pusieron 5 ml de agua, 1 μ l de mezcla de estándares y un agitador magnético, posteriormente en el fondo del tubo dos se colocó el papel filtro. El tubo dos se insertó en el tubo uno. El tubo tres se colocó por encima del tubo dos, el dispositivo se armó como se muestra en el diagrama de la (Figura 9).

Con el dispositivo armado se introdujo la fibra y se realizó la extracción (Figura 9). Las condiciones de extracción fueron 30 minutos de extracción a 60° C, con una agitación de 1,200 revoluciones/minuto. Se desorbió la fibra durante 10 minutos en el cromatógrafo de gases.

3.5.2.2 Evaluación del efecto de la presencia de los sedimentos

Una vez evaluado el efecto de la membrana en la transferencia de materia se realizó el mismo análisis en presencia de 1g de sedimentos con el fin de ver el efecto que tiene sobre la eficiencia de extracción la presencia de la muestra. El procedimiento es igual al descrito, salvo por la adición de la muestra de sedimentos que se hizo antes de añadir el agua en el primer tubo.

3.5.3 Evaluación de la malla de nylon en forma de cono como membrana.

Con el fin de aumentar considerablemente la superficie de transferencia entre los dos compartimentos, se dispuso la malla en forma de cono y se eliminó el uso de los tubos interiores (Figura 10). Con esta disposición se pretendía facilitar la transferencia de la solución externa al compartimento interior y con ello de los analitos hacia la fibra.

Se conservaron los mismos criterios de evaluación: disminución de la transferencia de materia hacia la fibra con el filtro entre la muestra y la fibra y cuando la extracción se lleva a cabo en presencia de la muestra. El procedimiento es equivalente al descrito, excepto por el dispositivo de soporte de la membrana.

En todos los casos descritos se realizaron los blancos correspondientes previos a cada extracción con el fin de esclarecer la señales cromatográficas provenientes de materiales y reactivos.

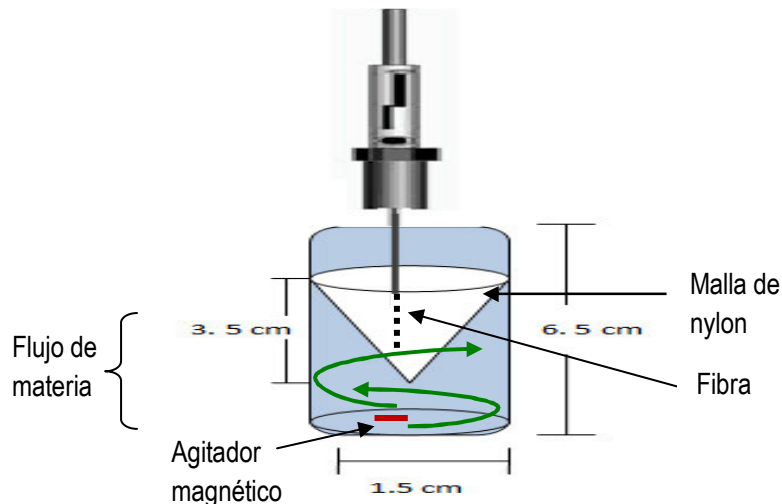


Figura 10. Esquema de la microextracción en fase sólida usando una malla en forma de cono

3.6 Tratamientos químicos de la muestra para la pre extracción de la fracción lipídica en los sedimentos de zonas costeras

La conformación de los sedimentos es compleja y es resultado de diversos procesos y condiciones ambientales. Dependiendo de la historia particular de formación, el contenido de materia orgánica puede ser escaso o abundante. Es de esperar que la mayor parte de la materia orgánica sedimentada forme parte de la estructura interna de las partículas sólidas o esté fuertemente adsorbida en las superficies expuestas al contacto con el agua y sólo una fracción está fácilmente disponible en la superficie. Esta última es a la que se tiene acceso en las condiciones de extracción estudiadas en los experimentos descritos. La fracción de la materia orgánica de interés depende del objetivo particular que se persiga. Para los fines de este trabajo nos interesa hacer disponible la mayor cantidad posible de la materia orgánica presente en los sedimentos con la intención de mejorar la detectabilidad de los diferentes analitos presentes. Así, se evaluaron varios tratamientos químicos y el uso de disolventes. A continuación se describen los procesos estudiados.

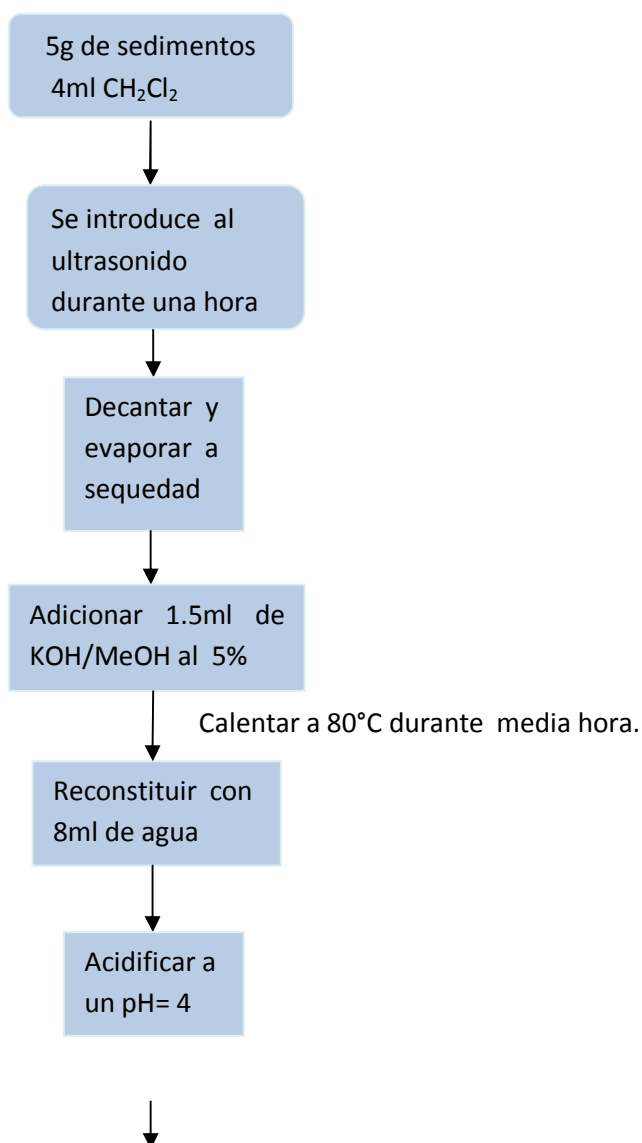
En la evaluación de los tratamientos químicos llevados a cabo y que se describen a continuación, no se hizo uso del dispositivo, los sedimentos fueron separados de la solución sobrenadante mediante centrifugación y decantación previa a efectuar la MEFS de los analitos de interés.

3.6.1 Extracción de los compuestos presentes en los sedimentos con diclorometano

Es común llevar a cabo la extracción de los compuestos presentes en suelos o sedimentos mediante extracciones con disolventes, por ello se llevó a cabo un tratamiento en el cual se utilizó diclorometano con el fin de desorber los compuestos retenidos en los sedimentos.

Los criterios de evaluación de los tratamientos estudiados fueron el número de compuestos detectados y las áreas cromatográficas de esos compuestos. Se procesó un blanco que contenía todos los reactivos excepto la muestra, de esta manera se compararon los cromatogramas obtenidos de las inyecciones del blanco y la muestra para confirmar que los compuestos que se detectan provienen de la muestra y no de impurezas de los reactivos. El criterio de evaluación se conservó para las todas las metodologías propuestas.

Diagrama de la metodología desorción con diclorometano:



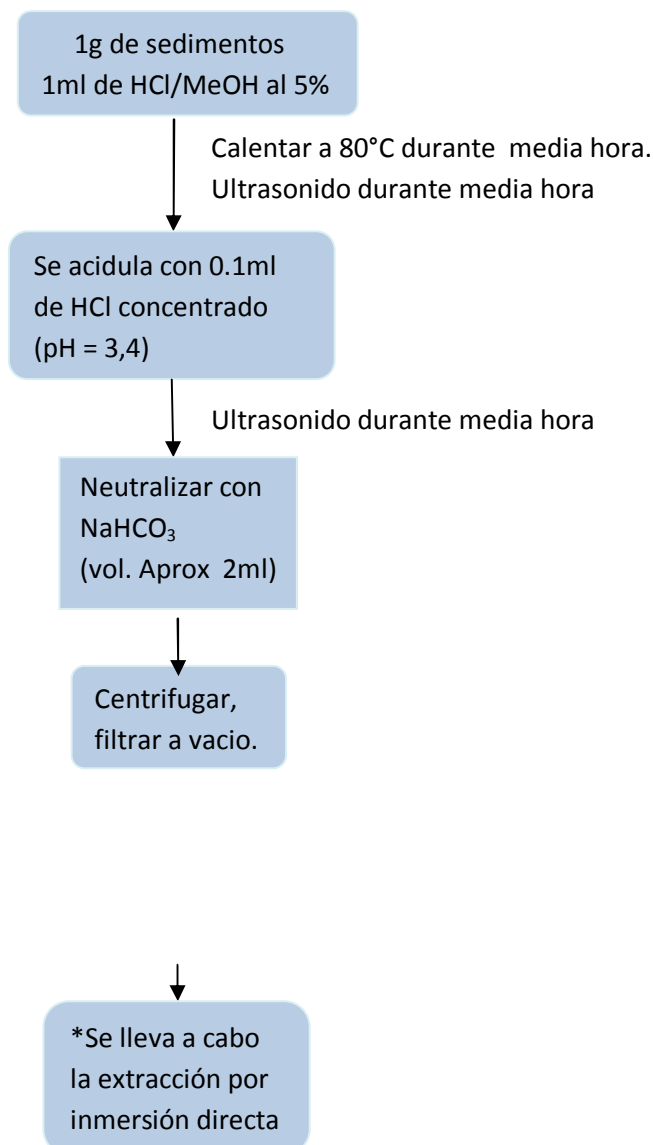
*Se lleva a cabo la extracción por inmersión directa

* Se conservan las condiciones de extracción ya establecidas anteriormente.

3.6.2 Hidrólisis ácida

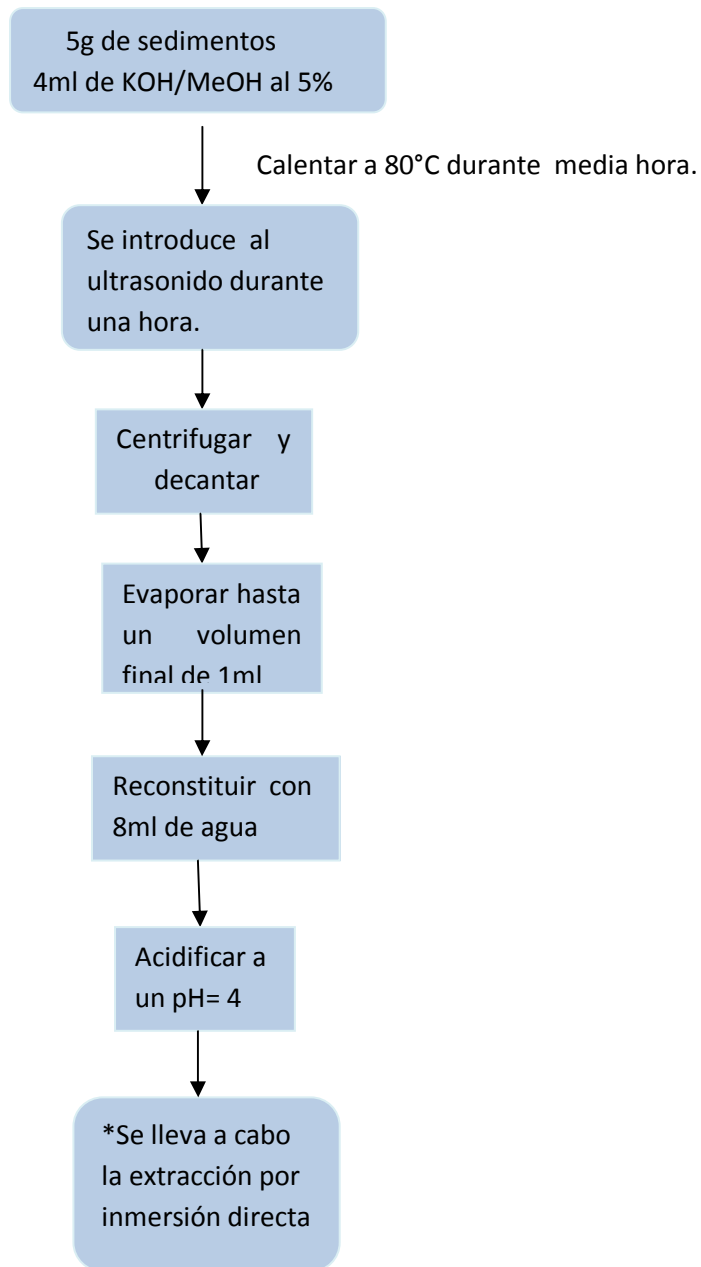
Debido a que los compuestos de interés forman parte de estructuras biológicas complejas que están adsorbidas en la matriz inorgánica de los sedimentos, es necesario desorberlos y transformarlos en formas químicas más simples factibles de analizarse por CG. Tanto la desactivación de los centros de adsorción del sólido como la hidrólisis de los lípidos complejos pueden realizarse por medio de un tratamiento ácido.

Diagrama de la metodología hidrólisis ácida:



* Se conservan las condiciones de extracción ya establecidas anteriormente.

3.6.3 Hidrólisis básica.



* Se conservan las condiciones de extracción ya establecidas anteriormente.

3.7 Estudio de la cinética de extracción

En la MEFS el tiempo de extracción es un parámetro importante que debe estudiarse para seleccionar aquel que nos ofrece un compromiso adecuado entre detectabilidad y tiempo de análisis. En caso de que la extracción no se prolongue hasta alcanzar las condiciones de equilibrio, el control del tiempo de extracción debe ser riguroso pues puede afectar significativamente la repetibilidad de los resultados. Esta serie de experimentos se llevó a cabo sometiendo a una hidrólisis básica los sedimentos con el fin de desorber los compuestos de interés a extraer y a realizando la extracción con los parámetros ya descritos. Los tiempos evaluados fueron: 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, y 8.0 horas y en cada caso se utilizó una submuestra nueva.

3.8 Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos

Debido a que los compuestos orgánicos más abundantes en los sedimentos son ácidos grasos, que presentan al menos un protón ácido, es conveniente formar los derivados metilados. Con ello se sustraen los protones ácidos que se sustituyen por un metilo. Los derivados tienen una mayor volatilidad, estabilidad térmica y mejor simetría de los picos cromatográficos, que influye positivamente en la resolución al ser analizados por cromatografía de gases.

Se probaron diversas alternativas para llevar a cabo la metilación, que se describen a continuación:

3.8.1 Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos con BF₃ / MeOH / Tolueno

El método pretende desorber y metilar en un mismo paso. En un tubo de ensayo se colocan 5g de sedimentos, se adicionan 2ml de BF₃ y 2ml de tolueno, esta mezcla se introduce al ultrasonido durante media hora. Posteriormente se centrifuga, la solución sobrenadante se recupera por decantación y se evapora a sequedad con flujo de nitrógeno. Se reconstituye el volumen con 1ml de MeOH y 8ml de agua, se acidifica a un pH de 4, con el fin de favorecer el equilibrio de extracción de los analitos de interés hacia la fibra. Finalmente se lleva a cabo la MEFS, conservado las condiciones de extracción, 30 minutos de extracción a 60° C, con una agitación de 1200 revoluciones/minuto. Se desorbió la fibra durante 10 minutos en el cromatógrafo de gases.

3.8.2 Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos con BF_3 / MeOH Tolueno

Este método tiene la misma finalidad, desorber y metilar los compuestos que se pretenden analizar en un mismo paso. En tubo de ensayo se colocan 5g de sedimentos, se adicionan 4ml de BF_3 , el tubo que contiene esta mezcla se introduce al ultrasonido durante media hora, posteriormente se adiciona 2ml de tolueno, se centrifuga y se decanta, la solución es evaporada a sequedad. Se reconstituye el volumen con 1ml de tolueno para redissolver el sólido que se formó, se evapora el tolueno y se adicionan 8ml de agua, se acidifica el medio a un pH de 4. Finalmente se lleva a cabo la MEFS, conservando las condiciones de extracción, 30 minutos de extracción a 60°C , con una agitación de 1200 revoluciones/minuto. Se desorbió la fibra durante 10 minutos en el cromatógrafo de gases.

3.8.3 Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos con metóxido de sodio.

Este método también tiene el fin de desorber y metilar en el mismo paso. Se preparó previamente el metóxido de sodio a una concentración de 0.5 Normal. En un tubo de ensayo se colocan 5g de sedimentos y se agregan 2ml de metóxido y 2ml de tolueno, el tubo que contiene la mezcla se calienta a 80°C durante media hora, al finalizar el calentamiento se introduce por media hora en el ultrasonido. Para separar la mezcla de los sedimentos se centrifuga y se decanta. La solución se evapora a sequedad con flujo de nitrógeno. Posteriormente se reconstituye el volumen con 8ml de agua, se acidifica el medio con HCl concentrado hasta un pH de 4. Finalmente se lleva a cabo la extracción por inmersión directa de fibra en la solución en las condiciones de extracción anteriores.

3.9 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos mediante un tratamiento químico y posterior metilación con BF_3 /MeOH

3.9.1 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con tolueno y metilación con BF_3 /MeOH

En este método la finalidad es extraer con tolueno todos los compuestos retenidos en los sedimentos para posteriormente llevar a cabo la derivatización con BF_3 /MeOH. El procedimiento fue el siguiente. En un tubo de ensayo se colocan 5g de sedimentos, se adicionan 4ml de tolueno, el

tubo que contiene la mezcla se introduce en el ultrasonido durante una hora y media. Una vez finalizado el tiempo se centrifuga y se decanta, la solución es evaporada a sequedad con flujo de nitrógeno. El siguiente paso es el de la derivatización, una vez que la mezcla está completamente seca se adiciona 1ml de BF_3/MeOH y se introduce nuevamente en el ultrasonido durante media hora y se calienta a aproximadamente a 50°C . Finalmente se adicionan 8ml de agua y se lleva a cabo la MEFS, conservado las condiciones de extracción.

3.9.2 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH y metilación con BF_3/MeOH

En este método se realiza la desorción de los compuestos ácidos retenidos en los sedimentos mediante una hidrólisis alcalina con KOH/MeOH al 5%, con el fin de formar sales solubles en el medio de reacción, la derivación se realiza posteriormente con BF_3/MeOH .

En un tubo de ensayo se colocan 5g de sedimentos, se adicionan 4ml de KOH/MeOH al 5%, el tubo se calienta a 80°C durante media hora, y posteriormente se introduce al ultrasonido durante una hora. Para separar la mezcla de los sedimentos se centrifuga y se decanta.

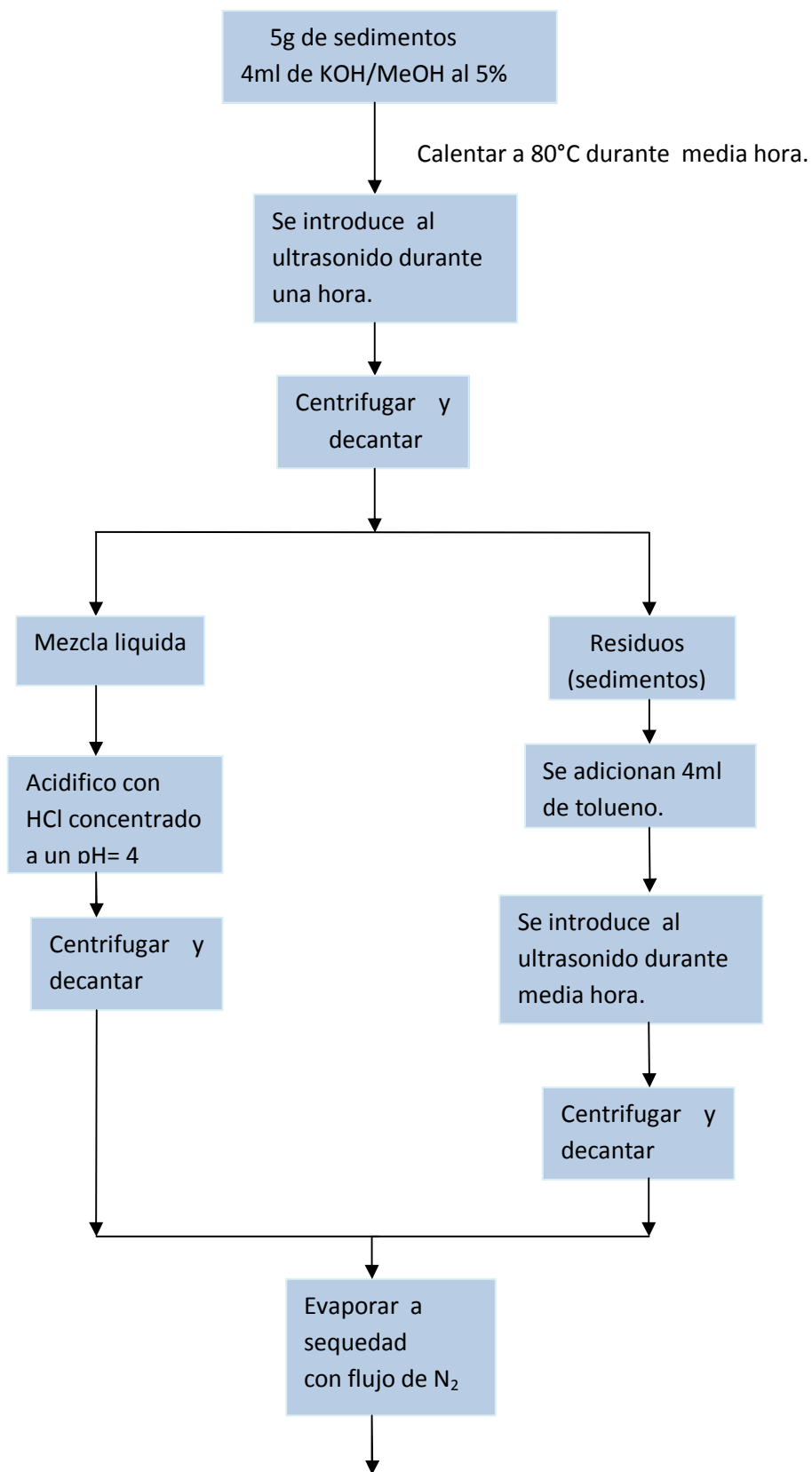
La solución se acidula a un pH de 4, se decanta la solución y se evapora a sequedad, una vez seca se adiciona 1ml de BF_3/MeOH y se introduce nuevamente en el ultrasonido durante media hora y se calienta aproximadamente a 50°C . Finalmente se adicionan 8ml de agua y se lleva a cabo la MEFS, conservado las condiciones de extracción y de análisis inicialmente establecidas.

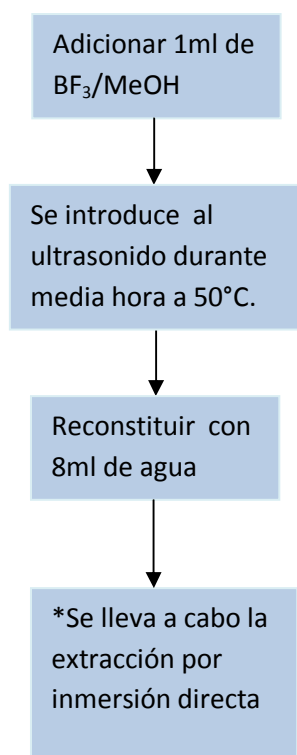
3.9.3 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH sin separación de las fracciones (sólida y líquida) y metilación con BF_3/MeOH

Este método consiste en la desorción de los compuestos presentes en los sedimentos mediante la hidrólisis básica, una vez hidrolizados los compuestos se realizó la derivación de las dos fracciones presentes en la (mezcla principal y los residuos que en este caso son los sedimento).

Para llevar a cabo la derivación de los residuos es necesario realizar una segunda desorción de los compuestos presentes en los sedimentos, esta vez mediante una extracción con tolueno durante media hora. El objetivo es desorber los compuestos que pudieran estar presentes en los sedimentos, no hidrolizables y que son solubles en un disolvente.

Esquema simplificado de la metodología:





* Se conservan las condiciones de extracción ya establecidas anteriormente

3.10 Evaluación de la reproducibilidad del método

Una vez que se estableció que mediante el ataque químico con KOH/MeOH sin separación de las fracciones (sólida y líquida) y posterior metilación con BF_3/MeOH , se obtenía la mayor cantidad de compuestos presentes en los sedimentos y era posible metilarlos, se procedió a evaluar la repetibilidad. Para ello se pesaron 15 g de sedimentos, se homogeneizaron y dividieron en tres cantidades iguales de 5g cada una. Cada porción se analizó siguiendo el procedimiento y las condiciones descritas en el apartado 3.9.3. Este experimento se repitió durante tres días consecutivos. Con los datos de las nueve extracciones se hizo el análisis de varianza (ANOVA de 2 factores con 3 réplicas) con el fin de verificar si la reproducibilidad está limitada por el procedimiento de análisis o por la homogeneidad de la distribución de materia orgánica en la muestra de sedimento.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1 Evaluación del dispositivo

Para evaluar la eficiencia del dispositivo en la transferencia de materia utilizando filtros de diferentes materiales, se compararon las áreas cromatográficas de los compuestos extraídos mediante MEFS de la solución de estándares por inmersión directa, con los obtenidos utilizando el dispositivo utilizando los diferentes materiales propuestos como barrera para los sedimentos hacia la fibra.

4.1.1 Membrana de papel filtro

La Figura 11 corresponde al cromatograma de la extracción de los estándares sin el uso del dispositivo. Se tomaron como referencia para las demás extracciones los compuestos a los cuales se les asignó el número de pico: (3); (7); (9,1) con los siguientes tiempos de retención: (3) 11.6 min, (7) 13.08 min, (9,1) 14.3 minutos. Identificados como: Éster metílico del ácido nonanóico, éster metílico del ácido decanóico y éster metílico del ácido undecanóico, respectivamente.

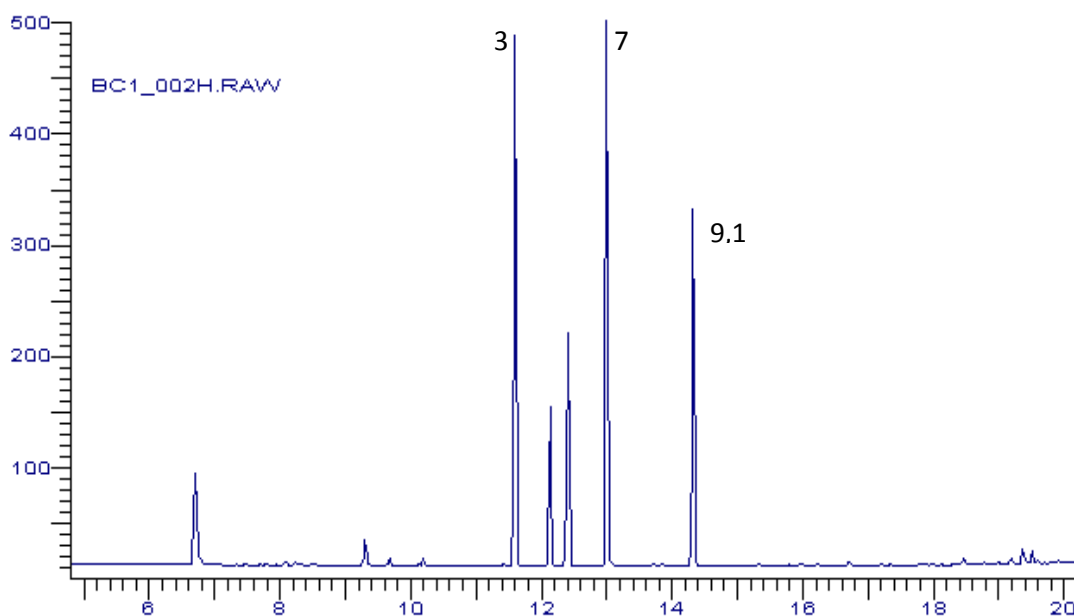


Figura 11. Cromatograma de la extracción de los estándares mediante microextracción en fase sólida sin el uso del dispositivo. Estándares extraídos: Éster metílico del ácido nonanóico (3); éster metílico del ácido decanóico (7); y éster metílico del ácido undecanóico (9,1).

Una vez que se tiene como referencia el cromatograma anterior y conservando las condiciones de extracción se realizó la evaluación del papel filtro como barrera para impedir el paso de los sedimentos, pero permitiendo el paso del medio líquido hacia la fibra.

En el cromatograma de la Figura 12 se presenta la comparación de lo que sucede una vez que se utiliza el dispositivo con papel filtro. En él se observa que hay una disminución de la cantidad de compuestos extraídos por la fibra, e indica que si bien hay transferencia de materia, existe una disminución en la cantidad de los analitos extraídos. Esto puede ser consecuencia de un flujo deficiente de la solución a través de la membrana y/o la retención de los analitos en el papel filtro.

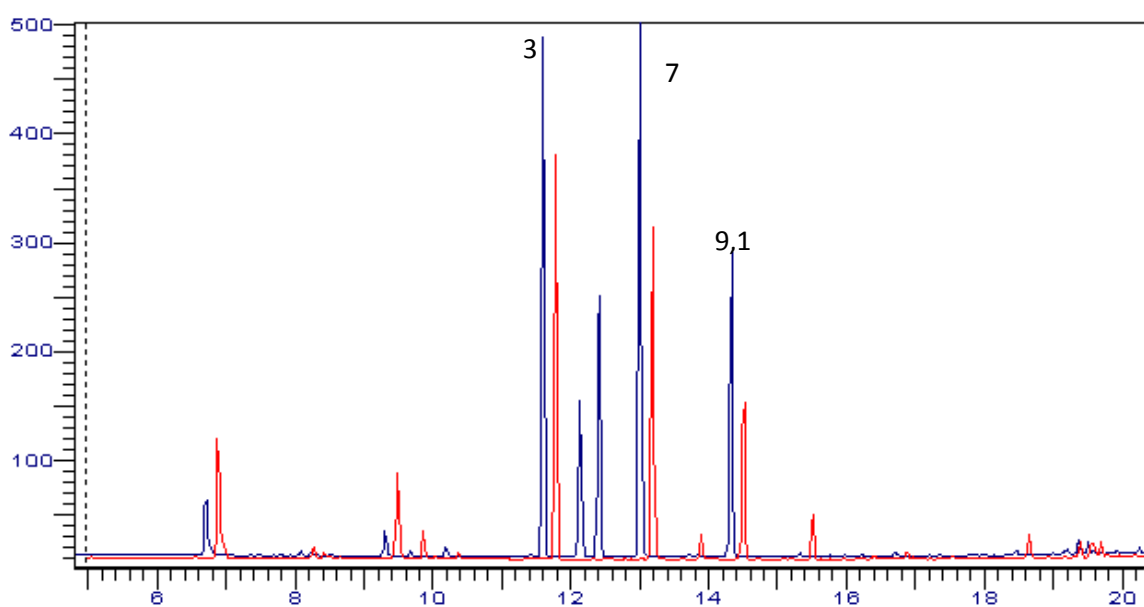


Figura 12. Cromatograma comparativo de la extracción de los analitos mediante microextracción en fase sólida. En azul (cromatograma de la extracción de los estándares sin el uso del dispositivo); En rojo (cromatograma de la extracción de los estándares usando el dispositivo y papel filtro como membrana). El cromatograma mostrado en rojo está recorrido medio minuto con respecto al azul, esto con el fin de facilitar su comparación. Estándares extraídos: Éster metílico del ácido nonanóico (3); éster metílico del ácido decanóico (7); y éster metílico del ácido undecanóico (9,1)

En el siguiente paso se evaluó el efecto de la adición de la muestra (sedimentos) al sistema y la transferencia de materia utilizando los estándares. El resultado se muestra en la Figura 13, se observa que al adicionar la muestra (1g de sedimentos) las áreas de los compuestos extraídos

disminuye, esto indica que los sedimentos adsorben parte de los estándares contenidos en la solución.

Otro factor que debe considerarse, es que la agitación juega un papel fundamental en la transferencia de materia a través de la membrana y hacia la fibra durante todo el proceso se trató que la agitación fuera homogénea, sin embargo la misma agitación eventualmente provoca que pequeñas burbujas de aire se incorporen a la fibra, impidiendo el contacto de la solución con la fibra.

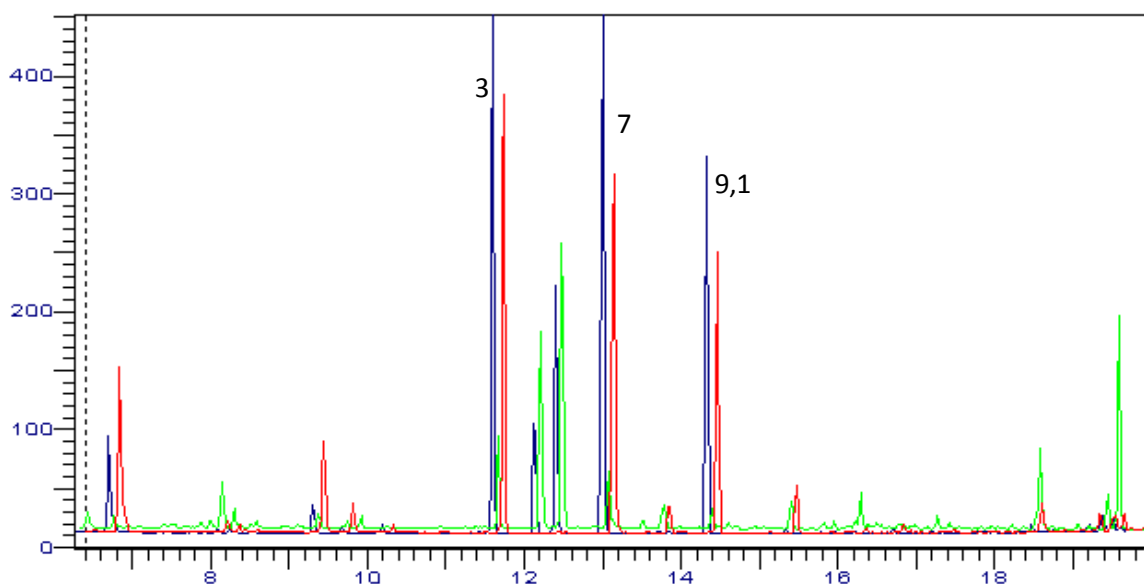


Figura 13. Cromatograma comparativo de las tres extracciones realizadas mediante microextracción en fase solida para evaluar el papel filtro como membrana. En azul (cromatograma de la extracción de los estándares sin el uso del dispositivo); En rojo (cromatograma de la extracción de los estándares usando el dispositivo y papel filtro como membrana); En verde (cromatograma de la extracción de los estándares usando el dispositivo y papel filtro como membrana se adicionó la muestra de sedimentos). Estándares extraídos: Éster metílico del ácido nonanóico (3); éster metílico del ácido decanóico (7); y éster metílico del ácido undecanóico (9,1)

Una comparación más clara se observa en la Figura 16 al graficar las áreas obtenidas en cada una de las extracciones mencionadas en el apartado anterior para llevar a cabo la evaluación del papel filtro como membrana, en la grafica se puede ver como decrecen las áreas una vez que se utiliza una membrana, la cual interfiere con el paso de los analitos de interés hacia la fibra. Una vez que se adicionó la muestra de sedimentos, las áreas de los compuestos evaluados decrecen significativamente en comparación con las áreas obtenidas al llevar a cabo la MEFS sin presencia

del papel filtro como membrana y de la muestra de sedimentos. De esta manera se observa claramente el contraste que existen en las áreas una vez que se incorpora el papel filtro como membrana y posteriormente los sedimentos en comparación con las áreas obtenidas inicialmente. Por tanto podemos decir que el papel filtro impide el paso de los sedimentos a la fibra, pero también impide el paso de los estándares hacia la fibra y que en presencia de los sedimentos es aún más drástica la disminución del área.

4.1.2 Membrana de malla metálica

Los resultados utilizando la malla metálica como membrana en el dispositivo muestran que decrece la transferencia de materia utilizando el dispositivo. De igual forma se evaluó la transferencia mediante la extracción de los estándares una vez que se incorporaron los sedimentos a la solución. En la Figura 14 se muestran los tres cromatogramas obtenidos para cada extracción, de esta manera se observa que hay una disminución significativa en el área de los analitos extraídos debido a la transferencia de materia que se lleva a cabo usando el dispositivo con la malla, los estándares y los sedimentos, corroborando que hay dos factores importantes dentro de la extracción de los analitos de interés, la adsorción de los compuestos por parte de los sedimentos, así como la parte física en donde factores como la agitación y la superficie de contacto por donde se lleva a cabo la transferencia de materia de los sedimentos hacia la fibra. El dispositivo presenta la desventaja que la superficie de contacto para llevar a cabo la transferencia de materia es muy pequeña ya que los analitos llegan hacia la fibra mediante los orificios inferiores del dispositivo reduciendo drásticamente la superficie por la cual hay flujo de materia, así como también la formación de burbujas sobre la fibra debido a la agitación.

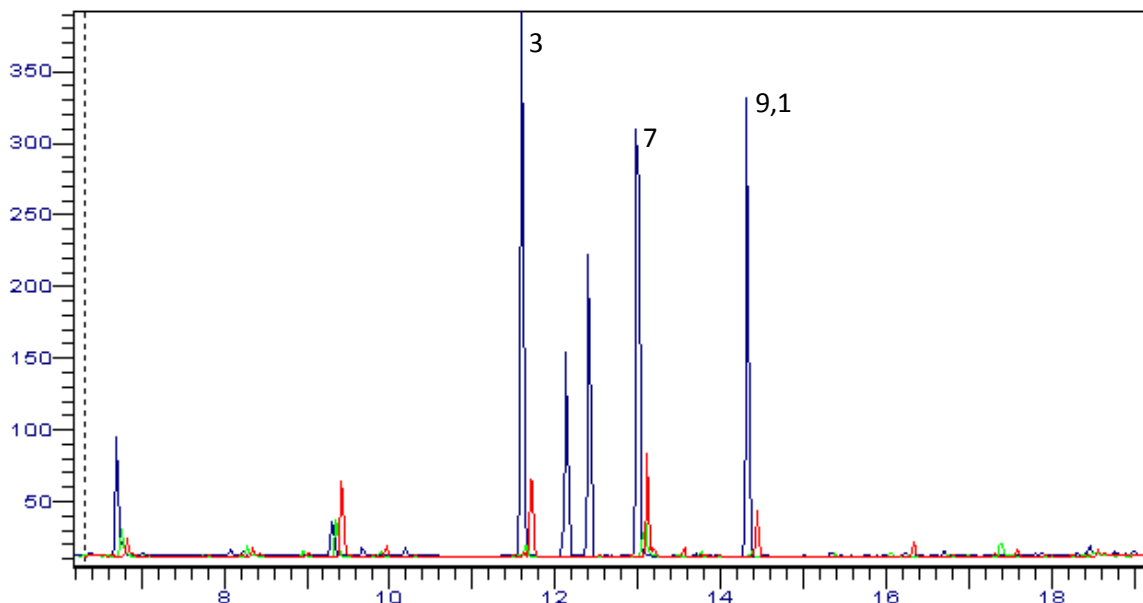


Figura 14. Cromatograma comparativo de la extracción de los estándares mediante microextracción en fase sólida. En azul (cromatograma de la extracción de los estándares sin el uso del dispositivo); En rojo (cromatograma de la extracción de los estándares usando el dispositivo con la malla metálica como membrana); En verde (cromatograma de la extracción de los estándares usando el dispositivo con la malla metálica como membrana, y se adicionó la muestra de sedimentos). Estándares extraídos: Éster metílico del ácido nonanóico (3); éster metílico del ácido decanóico (7); y éster metílico del ácido undecanóico (9,1).

Tomando como referencia los resultados anteriores, es importante implementar un dispositivo que tenga una superficie de contacto mayor o un diseño hidráulico diferente de forma que sea posible tener un mayor flujo de la solución fuera de la membrana hacia el compartimento donde se encuentra la fibra.

En la Figura 16 se muestra la gráfica de las áreas obtenidas en cada una de las extracciones realizadas para llevar a cabo la evaluación de la malla metálica como membrana, en la gráfica se observa que el área de los compuestos cuando se realiza la extracción utilizando el dispositivo y la malla decrece. De igual forma una vez que fueron incorporados los sedimentos a la solución, decrecen aun más las áreas de los estándares extraídos, debido a que estos son absorbidos por los sedimentos.

4.1.3 Malla de nylon

El uso de una malla de nylon permite disponer la barrera en forma de cono (Figura 10), se consideraba que esta alternativa permite un mejor flujo de materia debido a que incrementa la superficie de contacto entre los compartimentos y permite que la agitación sea más homogénea.

Una vez realizadas todas las pruebas, los resultados mostraron que el área de los estándares extraídos disminuyó drásticamente cuando se lleva a cabo la extracción utilizando la malla, y que en presencia de los sedimentos el área de los estándares decreció aun más. (Ver Figura 15)

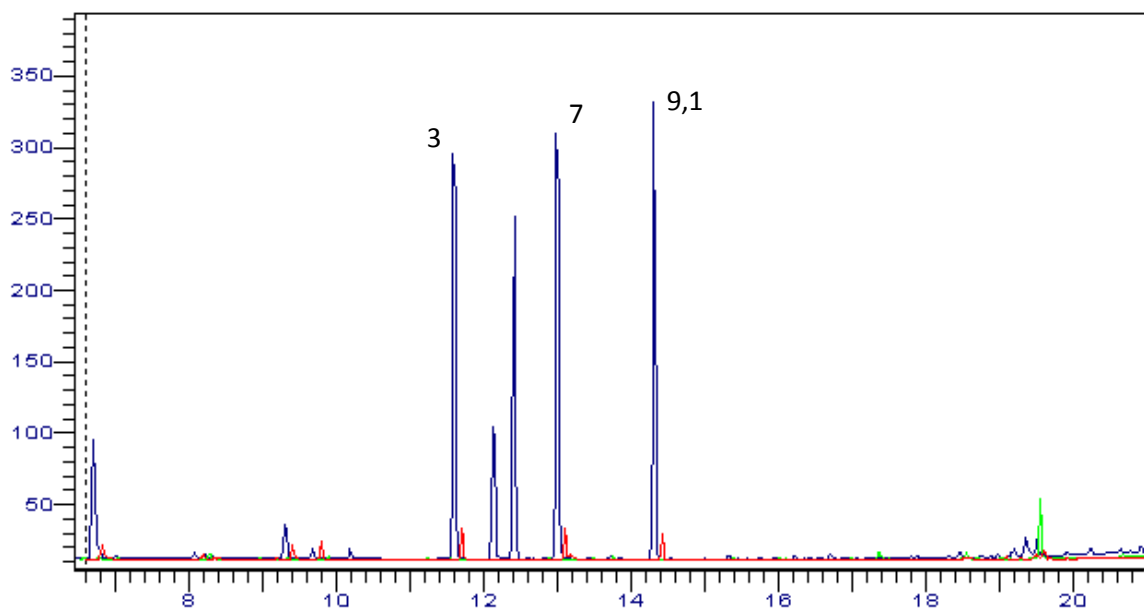


Figura 15. Sobreposición de los cromatogramas obtenidos en las etapas de evaluación. En azul (cromatograma de la extracción de los estándares sin el uso del dispositivo); En rojo (cromatograma de la extracción de los estándares usando la malla de nylon); En verde (cromatograma de la extracción de los estándares usando la malla de nylon y adicionando la muestra de sedimentos). Estándares extraídos: Éster metílico del ácido nonanóico (3); éster metílico del ácido decanóico (7); y éster metílico del ácido undecanóico (9,1).

Si bien es necesario el diseño de un dispositivo que permita la transferencia eficiente de los analitos de interés de la solución hacia la fibra y que al mismo tiempo impida el contacto directo entre la muestra sólida y la fibra, el problema principal en el análisis de los sedimentos radica en la retención que estos ejercen sobre los analitos de interés. Con base en los resultados detectamos que disminuye la transferencia de los analitos hacia la fibra. Como se observa en los cromatogramas

comparativos donde decrece el analito extraído cuando se utiliza alguno de los dispositivos estudiados pero es más drástica la disminución que se observa cuando están presentes los sedimentos, como se muestra en la gráfica de la Figura 16, donde la mayoría de las áreas de los compuestos una vez que se realiza la extracción en presencia de la malla de nylon, es casi nula, y una vez que fueron incorporados los sedimentos a la solución la extracción de los estándares no ocurrió.

Con esto podemos afirmar que la presencia de una membrana en este caso ya sea papel filtro, malla metálica, y malla de nylon, limita la transferencia de materia de la solución hacia la fibra, y una vez que se incorpora la muestra de sedimentos los estándares son retenidos por los sedimentos.

Es importante observar que en los casos donde se realizó la extracción en presencia de la muestra, no se observó aparición de nuevos compuestos afirmando con este hecho que no hubo transferencia hacia la fase acuosa.

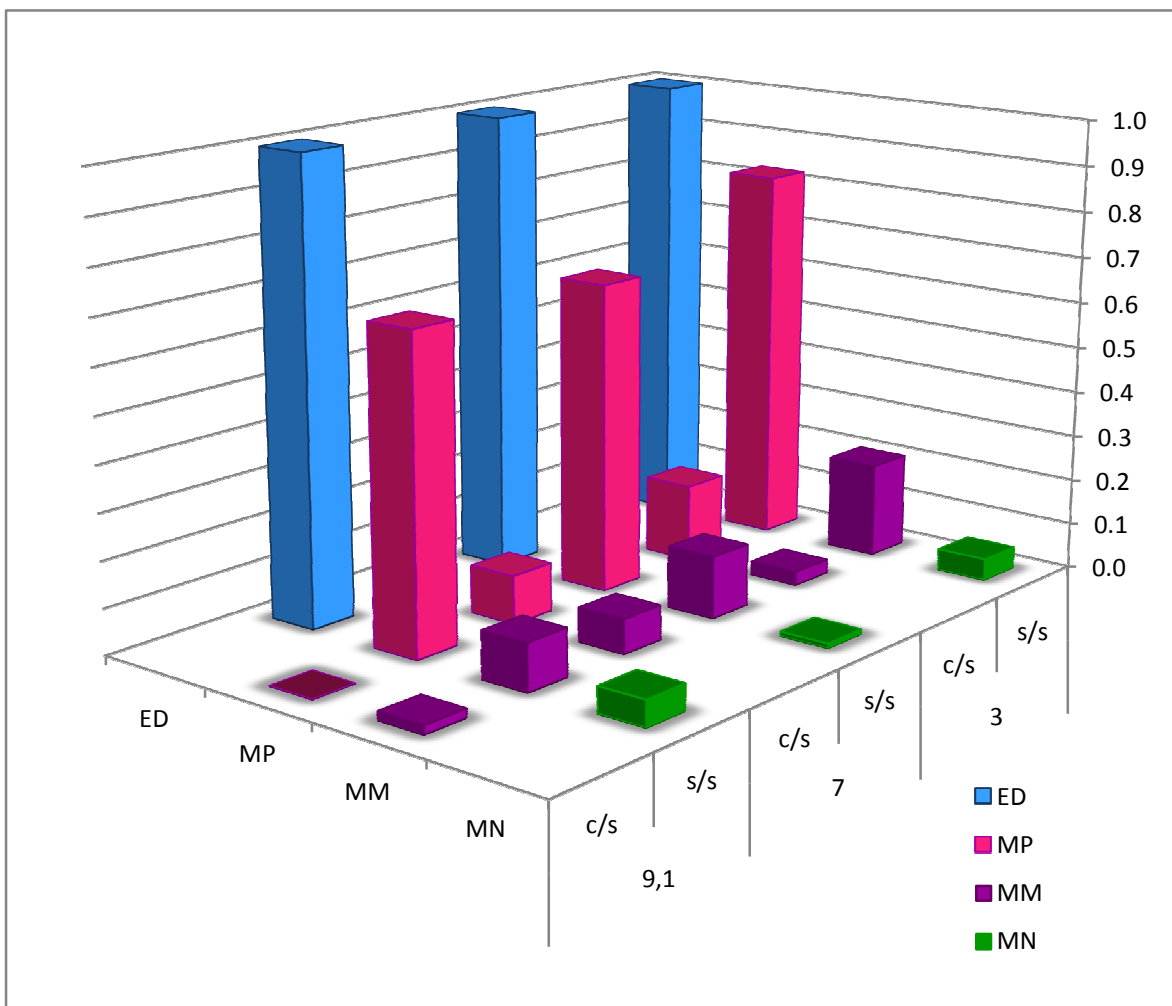


Figura 16. Gráfica comparativa de las áreas obtenidas en las extracciones realizadas para evaluar el funcionamiento de papel filtro como membrana, la malla metálica y la malla de nylon. En color azul se observan los tres compuestos de referencia extraídos por inmersión directa (ED). En color rosa se muestran las áreas obtenidas mediante la extracción utilizando papel filtro como malla (MP). En color morado se muestra las áreas obtenidas mediante la extracción utilizando la malla metálica (MM). En color verde se muestra las áreas obtenidas mediante la extracción utilizando la malla de nylon (MN). Simultáneamente se comparan las áreas de extracción sin muestra de sedimentos (s/s) y con muestra de sedimentos (c/s).

4.2 Tratamientos de la muestra para la preextracción de la fracción lipídica en los sedimentos de zonas costeras

Con base en los resultados de cada uno de los métodos anteriores detectamos que en el rendimiento final de la extracción un factor de mayor importancia es la retención de los compuestos en el sedimento. La forma en la que están incorporados los compuestos orgánicos en las partículas es compleja. Esto se debe a que gran parte de los sedimentos marinos están compuestos por

minerales arcillosos, y en ellos se llevan a cabo reacciones de adsorción y liberación de cationes así como de materia orgánica la cual puede ser, partículas en descomposición que originalmente fueron sintetizadas por organismos marinos, la mayoría son componentes estructurales de conchas o esqueletos, también tejidos o excreciones, el fenómeno de adsorción que presentan estos compuestos se debe a la superficie con carga negativa que presenta la materia arcillosa.

Así parece necesario realizar un tratamiento previo para que los compuestos orgánicos presentes estén disponibles para migrar hacia la fase acuosa. En este trabajo el interés se centró en la fracción compuesta por los ácidos grasos. Se probaron tres diferentes opciones para desorber los compuestos: desorción con diclorometano, hidrólisis ácida, e hidrólisis básica.

4.2.1 Extracción de los compuestos presentes en los sedimentos con diclorometano

Los resultados que se obtuvieron una vez que se realizó la desorción con diclorometano de los compuestos de interés en los sedimentos, se extrajeron mediante MEFS y se inyectaron en el cromatógrafo de gases, se muestra en la Figura 17.

En el cromatograma de la Figura 17 se puede observar que en la zona que va de 15 a 25 minutos existe una mayor cantidad de picos, lo que corresponde a una mayor cantidad de compuestos los cuales fueron desorbidos de los sedimentos. Se ubican de acuerdo a su Tr en el cual eluyeron: (2) 16 min, pico (6) 18.3 min, pico (8) 19.46 min, pico (14) 20.55 min, pico (16) 24.6 minutos. De acuerdo al Tr los compuesto fueron identificados como; Ácido undecanóico, ácido tetradecanóico, ácido pentadecanóico, ácido hexadecanóico, 9-Octadecenamida respectivamente. La identificación de todos los compuestos se realizo mediante la correlación de los Tr como se describe en apartado 4.6 de los resultados.

La baja resolución cromatográfica que se observa entre algunos de los compuestos extraídos se debe a que las condiciones del análisis se ajustaron para un compromiso entre calidad de separación y tiempo de análisis.

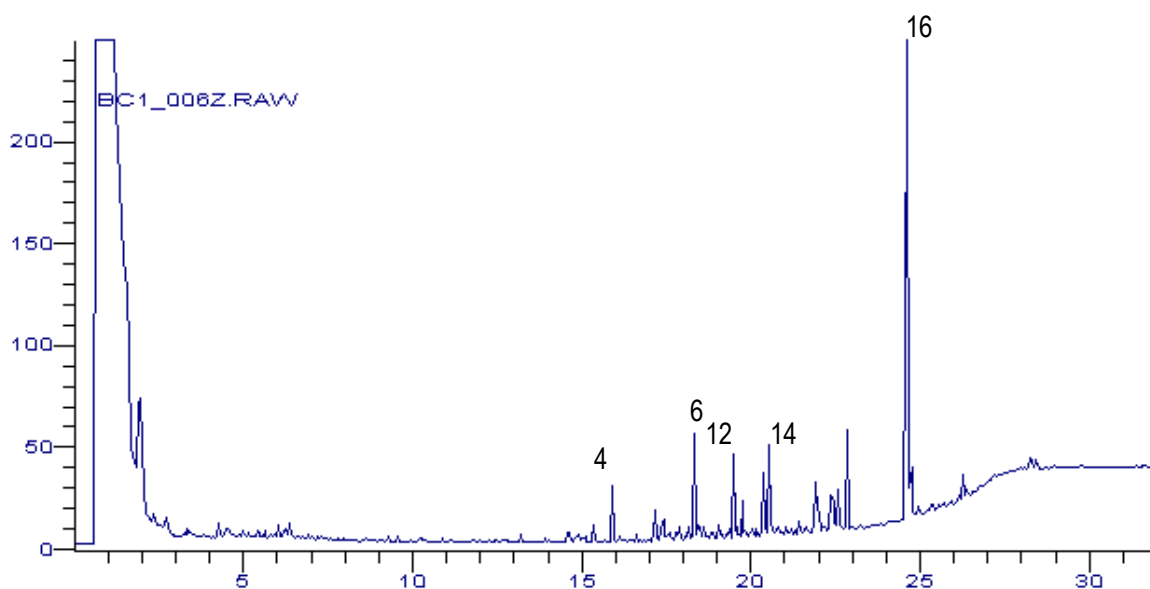


Figura 17. Cromatograma de los compuestos desorbidos con diclorometano, extraídos mediante microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron.; Ácido dodecanóico (4) 16 min; Ácido tetradecanóico (6) 18.3 min; Ácido 9-hexadecenoico (12) 19.46 min; Ácido hexadecanóico (14) 20.55 min, 9 – Octadecenamida. (16) 24.6 min.

4.2.2 Hidrólisis ácida

El tratamiento con HCl/MeOH se hizo con la intención de desactivar los centros de adsorción, hidrolizar los cementantes que mantienen unidas a las partículas más pequeñas para aumentar la superficie de contacto, asegurar que los ácidos grasos extraídos se encuentren en su forma neutra o bien que se formen los ésteres metílicos correspondientes. En la Figura 18 se presenta el cromatograma de la MEFS siguiendo el procedimiento de hidrólisis ácida de la muestra de sedimentos indicado en la sección 3.6.2 del apartado de la metodología. Se puede observar la presencia de algunos compuestos significativos, los cuales tienen tiempos de retención de específicos para cada pico. Pico (12) 19.7 min, pico (14) 20.7 min y pico (16) 24.5 min. Con base en los datos de la Tabla 2, estos compuestos se identificaron respectivamente como: 9- ácido hexadecenoico, ácido hexadecanóico y 9-octadecenamida. Estos resultados muestran que únicamente se logró la extracción de los compuestos más abundantes y posiblemente sólo la fracción presente en la porción más superficial de las partículas.

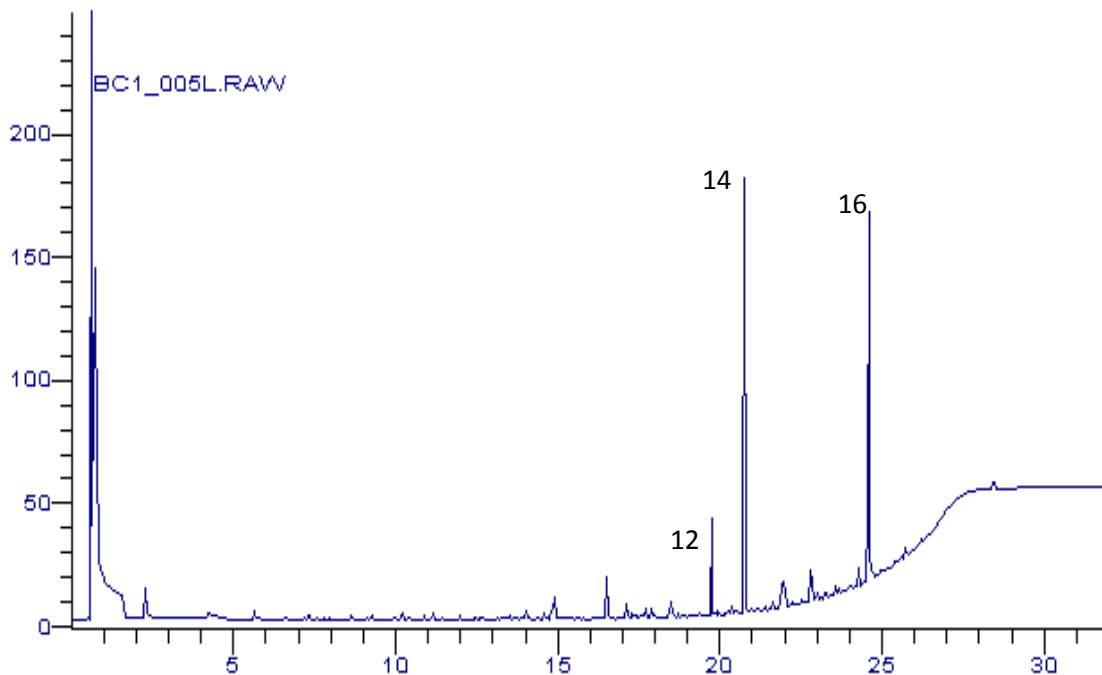


Figura 18. Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante hidrólisis ácida, compuestos extraídos mediante microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: 9-Ácido hexadecenoico (12) 19.7 min; Ácido hexadecanoico (14) 20.7min; 9 – Octadecenamida (16) 24.6 min.

4.2.3 Hidrólisis básica

Los resultados del tratamiento ácido permiten suponer que el principal factor de retención de los compuestos orgánicos en las partículas de los sedimentos proviene de las estructuras lipídicas complejas, ya sea por que forman parte de triglicéridos, fosfolípidos, etcétera, o porque se encuentran “atrapados” en los restos de las estructuras celulares. Se realizó la hidrólisis básica, como se describe en el capítulo de metodología apartado 3.6.3, utilizando una solución de KOH/MeOH con el fin de hidrolizar los ésteres por saponificación y romper los remanentes de estructuras de la pared celular y otras estructuras de las células y desactivar los centros de adsorción de los sólidos inorgánicos. Con el ajuste final del pH a un valor de 4 se asegura que los ácidos grasos estén en su forma neutra. Los resultados de la MEFS de este experimento se muestran en la Figura 19. Se observa un aumento significativo tanto en el número de compuestos detectados como en sus áreas. Los picos principales con Tr de (4)15.9 min, (6)18.3 min, (12)19.7 min, (14) 20.56 min, y (16) 24.59 minutos corresponden respectivamente, a los compuestos

identificados como ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico, 9-ácido hexadecenóico, ácido hexadecanóico y 9-Octadecenamida.

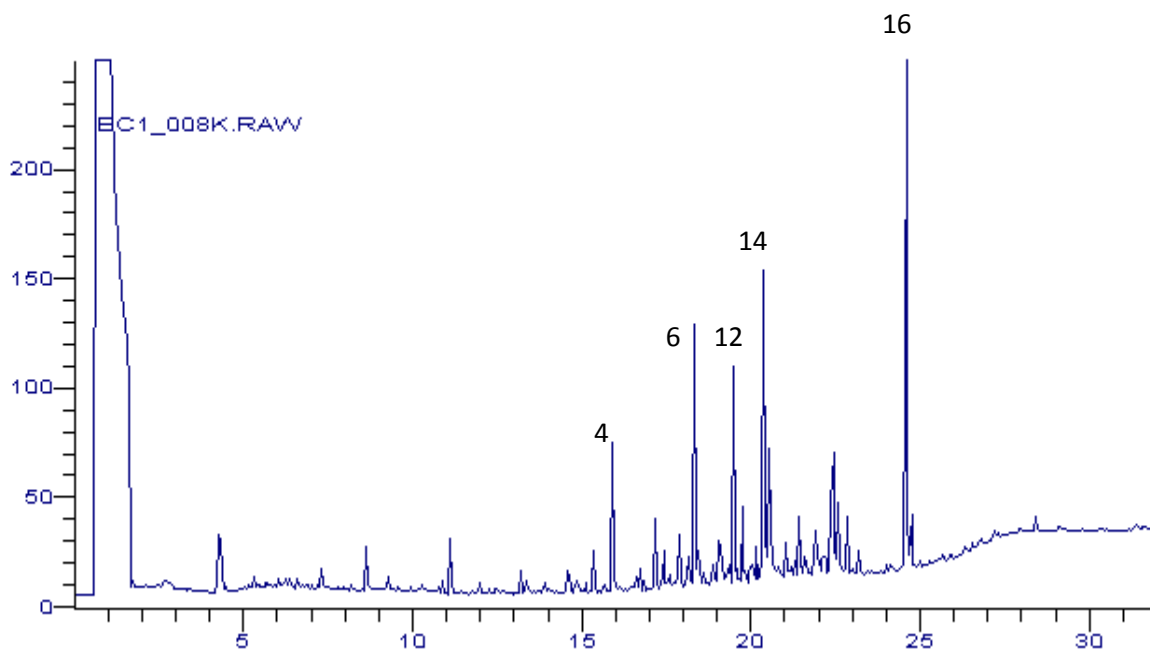


Figura 19. Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante una hidrólisis básica, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: Ácido dodecanóico (4) 15.9 min; Ácido tetradecanóico (6) 18.3 min; 9-ácido hexadecenóico (12) 19.7 min; Ácido hexadecanóico (14) 20.56 min y 9 Octadecenamida (16) 24.59 minutos.

El tratamiento químico de hidrólisis básica es mediante el cual se detectan un mayor número de compuestos y en mayor cantidad. Los compuestos de mayor interés para este trabajo son los ácidos grasos.

La comparación de los resultados que se obtuvieron en los apartados anteriores 4.2.1; 4.2.2; 4.2.3, se muestra en la Figura 20. En ella se observan los cromatogramas obtenidos de cada una de las pruebas realizadas, se puede ver como mediante la hidrólisis básica se obtuvieron mejores resultados en comparación con la hidrólisis ácida y desorción con diclorometano.

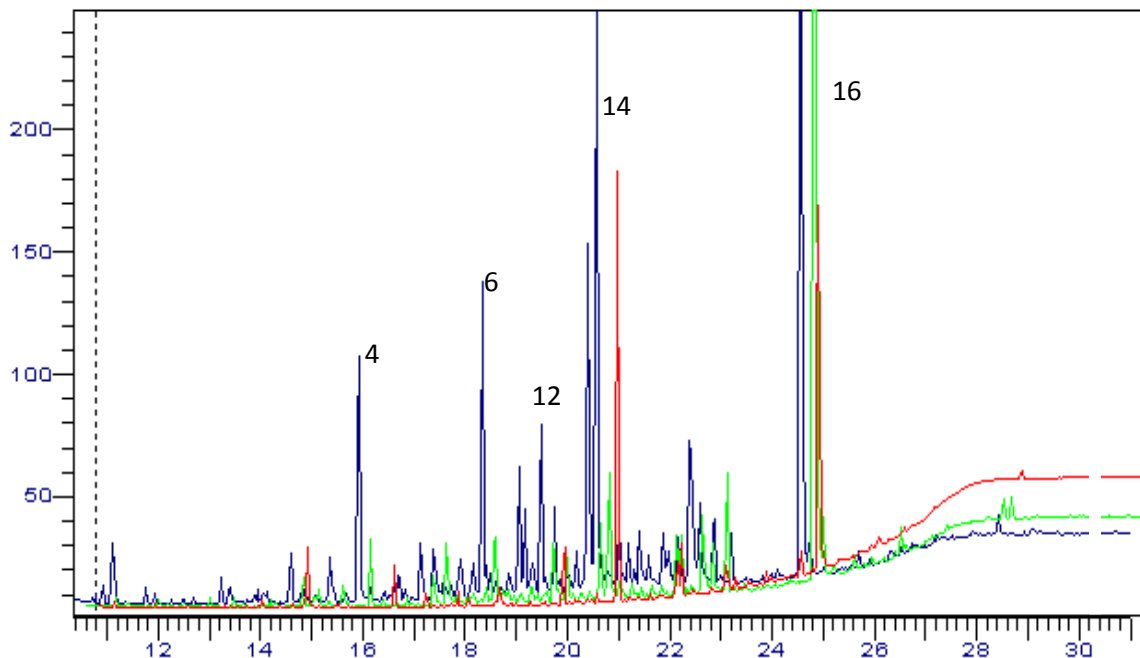


Figura 20. Cromatograma comparativo de los tres tratamientos para llevar a cabo la desorción de los compuestos los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida. (Azul) Hidrólisis básica; (Rojo) Hidrólisis ácida; (Verde) Desorción con diclorometano. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: Ácido dodecanóico (4) 15.9 min; Ácido tetradecanóico (6) 18.3 min; 9-ácido hexadecenóico (12) 19.7 min; Ácido hexadecanóico (14) 20.56 min, y 9-Octadecenamida (16) 24.59 minutos. Los cromatogramas rojo y verde se encuentran desplazados medio minuto con respecto al azul.

4.3 Estudio de la cinética de extracción

Una vez seleccionado el procedimiento basado en la hidrólisis básica, se estudio la cinética de la extracción para seleccionar el tiempo más apropiado para la MEFS, en un compromiso entre la cantidad extraída y el tiempo de análisis. En todos los experimentos de este estudio, el tratamiento de la muestra fue el descrito en la metodología apartado 3.6 para la hidrólisis básica y las condiciones para llevar a cabo la MEFS fueron: 60 °C para la temperatura de extracción y la agitación a 1200 rpm. Se realizaron extracciones a los tiempos de: media hora, una hora, dos horas, cuatro horas y ocho horas

En la Figura 21 se muestran los resultados graficando las áreas de los compuestos seleccionados en función del tiempo de extracción. Se puede observar que en todos los casos el equilibrio se

alcanza alrededor de las cuatro horas de extracción, que es cuando se obtiene la mayor área y que posteriormente la tendencia es constante. Cabe señalar que algunos compuestos sólo son detectados a partir de las dos horas de extracción.

El estudio del tiempo de extracción también se hizo con el fin de ver que tan necesario es extender el tiempo de extracción, considerando que el interés de este trabajo está en los ácidos grasos principales. Casi todos los compuestos que se detectan en un tiempo de ocho horas, también están presentes en el cromatograma correspondiente a media hora de MEFS. Así se determinó que un tiempo de extracción de media hora es suficiente para los fines de este estudio.

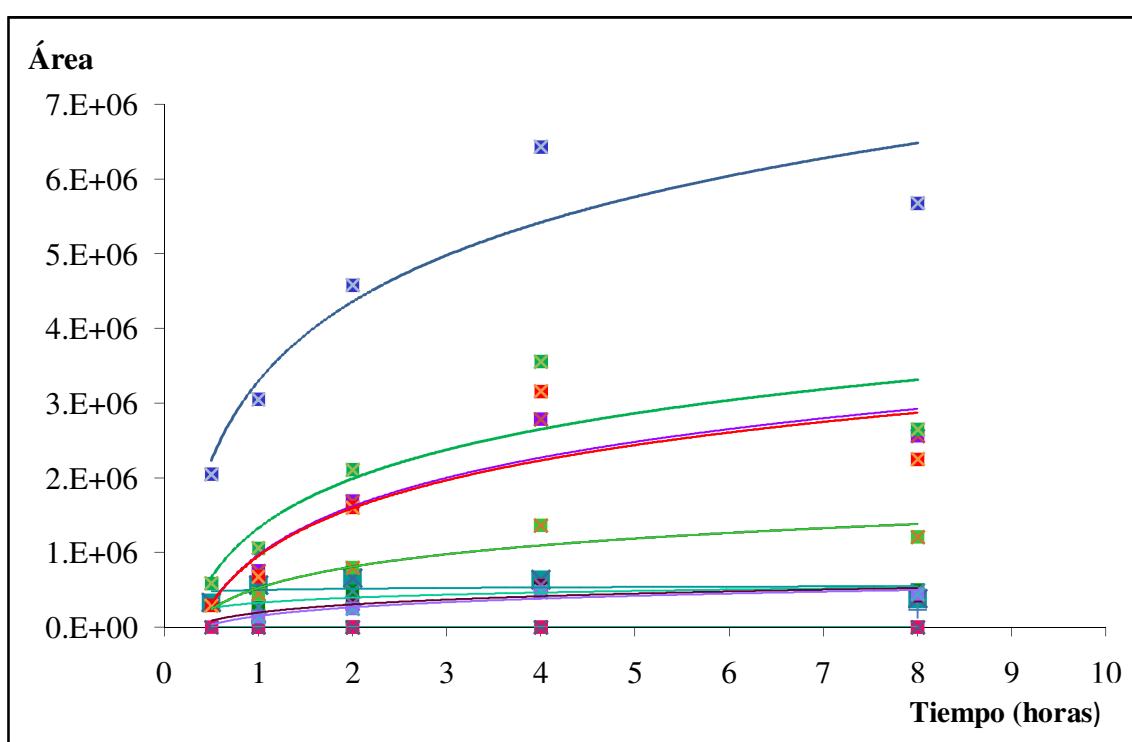


Figura 21. Gráfica de las áreas de los compuestos en función del tiempo de extracción.

4.4 Desorción y metilación de los compuestos presentes en sedimentos

Con base en los resultados anteriores citados en el apartado 4.2 la mejor opción para llevar a cabo la desorción de los compuestos presentes en los sedimentos, es mediante una hidrólisis básica. Considerando que la hidrofobicidad de los ésteres metílicos es mayor que la de los ácidos grasos y con ello las constantes de extracción hacia la fibra apolar de la MEFS también son mayores, lo que aumenta los rendimientos de extracción, se decidió intentar formar los derivados metílicos al mismo tiempo que el ataque químico de los sedimentos. Además, las características cromatográficas de los

ésteres metílicos son mejores que las de los ácidos libres. Al realizar el pretratamiento químico y la formación de los derivados en un mismo pasó se hace más sencilla y practica la metodología para el análisis de los componentes presentes en los sedimentos.

4.4.1 Desorción y metilación de los compuestos presentes en los sedimentos con $\text{BF}_3/\text{MeOH}/\text{Tolueno}$

Los resultados se muestran en el cromatograma de la Figura 22, en el cual se observan tres picos principales, por sus tiempos de retención se identificaron como: Éster metílico del ácido undecenóico (9) 13.2 min; Éster metílico del ácido hexadecanóico (21) 20.6 min y 9-Octadecenamida (16) 24.56 minutos. Una vez que los compuestos son derivatizados se presenta una disminución del tiempo de retención y un aumento en la resolución con los picos contiguos. En este tratamiento no se produce la desorción de suficientes compuestos presentes en los sedimentos.

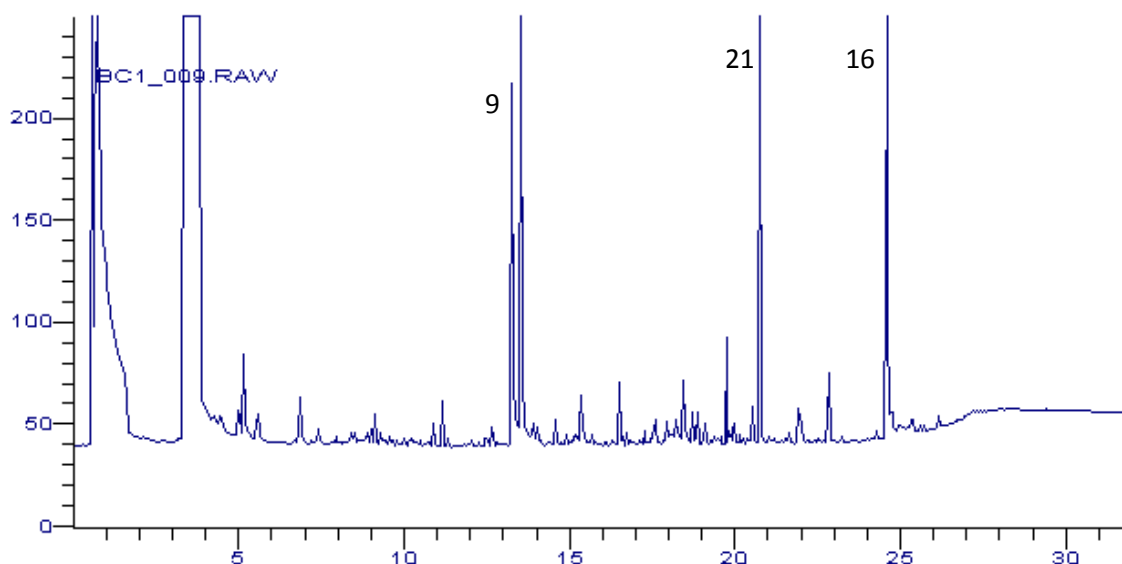


Figura 22. Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados mediante $\text{BF}_3 / \text{MeOH} / \text{Tolueno}$, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: Ester metílico del ácido undecenóico (9) 13.2 min; Ester metílico del ácido hexadecanóico (21) 20.61min; 9-Octadecenamida (16) 24.56min.

4.4.2 Desorción y metilación de los compuestos presentes en los sedimentos con $\text{BF}_3/\text{MeOH}-\text{Tolueno}$

Con el fin de comprobar si la presencia del tolueno en la etapa de ataque del sedimento con el reactivo había inhibido la extracción y derivatización, se probó el tratamiento directamente con el BF_3/MeOH y posteriormente se añadió el tolueno para favorecer la disolución de los ácidos grasos y sus ésteres liberados de los sedimentos. Al añadir el agua y evaporar el exceso de tolueno antes de la MEFS es posible que los compuestos más hidrofóbicos formen una fase polidispersa en el agua, con lo que eventualmente se favorecería su extracción hacia la fibra apolar de la MEFS. El cromatograma obtenido con este procedimiento se muestra en la Figura 23. La ausencia del compuesto con Tr de 13.5 min, prueba que el ataque de los sedimentos en presencia de tolueno es mejor que sin él. Ninguno de los procedimientos anteriores ofrece una opción viable para el pre-tratamiento de la muestra en el análisis de biomarcadores moleculares presentes en sedimentos. Por tanto la limitación más importante proviene de la forma en que los compuestos orgánicos de interés están incorporados en las partículas de sedimentos. Estos resultados y los obtenidos en la hidrólisis básica permiten concluir que es necesario utilizar reactivos más enérgicos y de carácter básico para lograr una extracción satisfactoria.

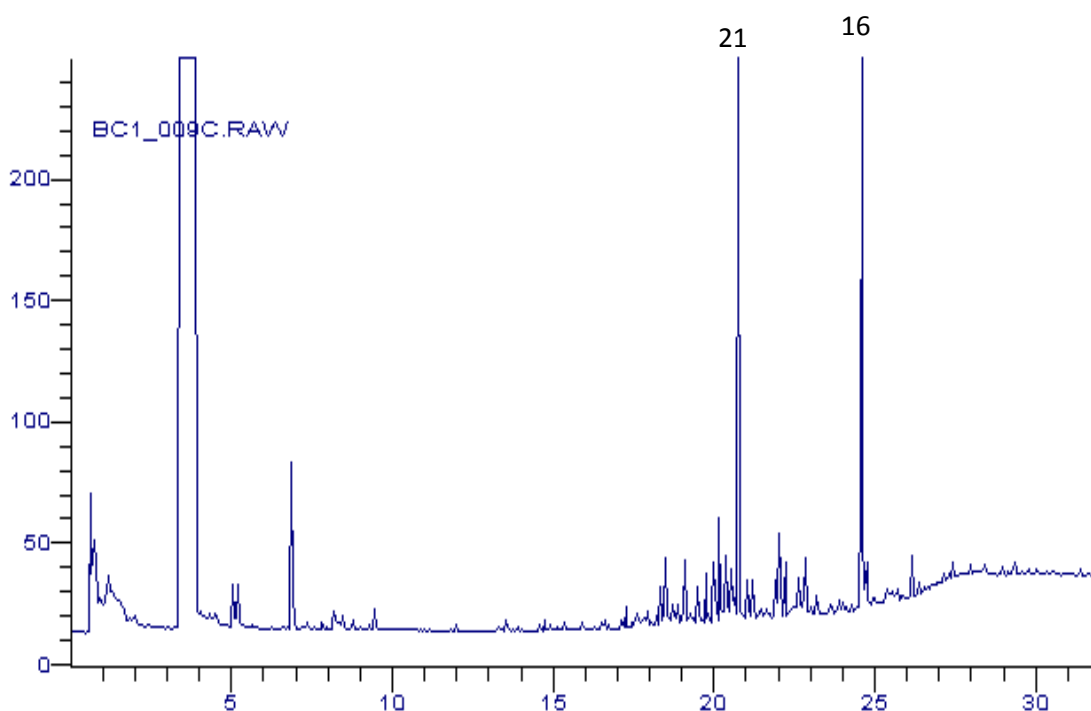


Figura 23. . Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados mediante $\text{BF}_3 / \text{MeOH} - \text{Tolueno}$, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados por medio

de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: Éster metílico del ácido hexadecanóico (21) 20.61min; 9-Octadecenamida (16) 24.56min.

4.4.3 Desorción y metilación de los compuestos presentes en los sedimentos con metóxido de sodio

La selección del metóxido de sodio como reactivo de ataque y derivatización está fundada en su carácter más básico que el del BF_3/MeOH (el cual es un ácido fuerte de Lewis) ya que el metóxido de sodio tiene un pKa de 15.54 ²¹. En la Figura 24 se presenta el cromatograma de los compuestos extraídos mediante MEFS después del tratamiento con metóxido de sodio de la muestra.

Se puede observar que con este tratamiento se obtiene un mayor número de compuestos con áreas cromatográficas mayores que las obtenidas en los experimentos descritos en apartados anteriores. Los picos más significativos corresponden a los compuestos que se identificaron de acuerdo a sus tiempos de retención como: Ácido dodecanóico (4) 15.9 min; Ácido tetradecanóico (6) 18.35 min; Ácido 9- hexadecanóico (12) 19.7 min; Ácido hexadecanóico (14) 20.5 min; 9-Octadecenamida (16) 24.55min.

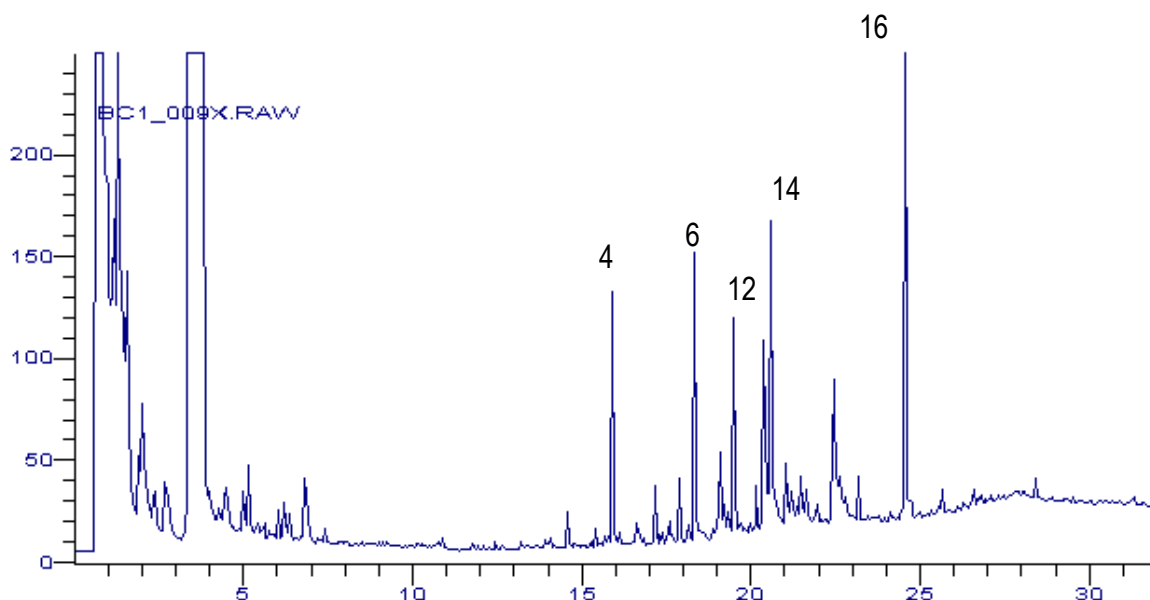


Figura 24. Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados con metóxido de sodio, los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: (4) Acido dodecanóico; (6) Acido tetradecanóico; (12) Acido 9- hexadecanóico; (14) Acido hexadecanóico; (16) 9-Octadecenamida.

Con base en los resultados obtenidos el tratamiento químico con metóxido de sodio es con el que se desorben de los sedimentos un mayor número de compuestos, sin embargo los tiempos de retención de los compuestos extraídos mediante MEFS no son los esperados para los derivados metílicos de los ácidos grasos. Los resultados indicaron que los Tr registrados para el tratamiento químico mediante la hidrólisis con KOH/MeOH, son los mismos que los obtenidos mediante la desorción y derivación de los compuestos presentes en sedimentos con metóxido de sodio, como se muestra en la Figura 25. En donde al sobreponer los cromatogramas obtenidos se puede observar como coinciden los Tr de los compuestos en ambas metodologías.

Para confirmar que la formación de los ésteres metílicos no se llevó a cabo, se analizó la muestra tratada con metóxido de sodio en un sistema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, esto con el fin de identificar los compuestos obtenidos en base a sus espectros de masas.

El cromatograma obtenido por CG-EM de la muestra tratada con metóxido de sodio y extraída por MEFS se muestra en la Figura 26. En este cromatograma se pueden observar ocho picos principales los cuales se identificaron como Ácido undecanóico (2) 14.06min; Ácido dodecanóico (4) 15.3 min; Ácido tetradecanóico (6) 17.56min; Ácido pentadecanóico (8) 18.6min; Éster metílico del ácido hexadecanóico (10) 19.24min; Ácido 9-hexadecenoico (12) 19.44min; Ácido hexadecanóico (14) 19.65min; 9 – Octadecenamida (16) 23.27min. Es claro que los métodos propuestos en los que se pretende desorber y derivar los compuestos presentes en los sedimentos no funciona como lo esperado. Sí son desorbidos los compuestos pero no son esterificados los ácidos grasos.

Debido a que un factor importante en una esterificación es el tamaño de la cadena carbonada, en donde al incrementarse el número de carbonos es necesario hacer más drásticas las condiciones de reacción para lograr la esterificación. Incrementando la temperatura o separando cada uno de los procesos es posible que se lleve a cabo la esterificación por lo cual se propuso realizar la desorción de los compuestos en los sedimentos con un tratamiento químico y posteriormente llevar a cabo la derivación de los compuestos en condiciones favorables para alcanzar su esterificación.

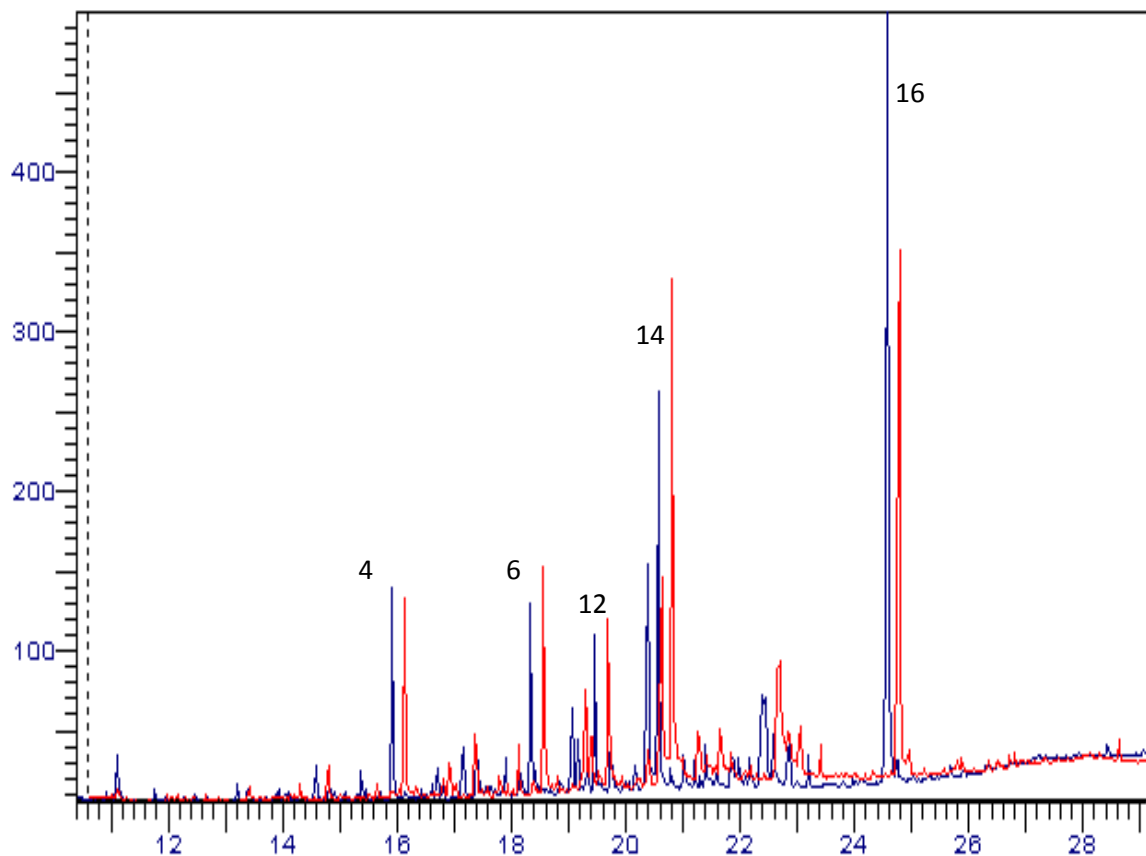


Figura 25. Cromatograma comparativo. En azul se muestra el cromatograma obtenido mediante el tratamiento de hidrólisis básica; En rojo se muestra el cromatograma obtenido mediante el tratamiento con metóxido de sodio. El cromatograma rojo se encuentra desplazado medio minuto del azul con el fin de diferenciarlos mejor. Los compuestos identificados por medio de la correlación de los tiempos de retención en CG-EM fueron: Ácido dodecanóico (4); Ácido tetradecanóico (6); Ácido 9- hexadecanóico (12); Ácido hexadecanóico (14); 9-Octadecenamida (16).

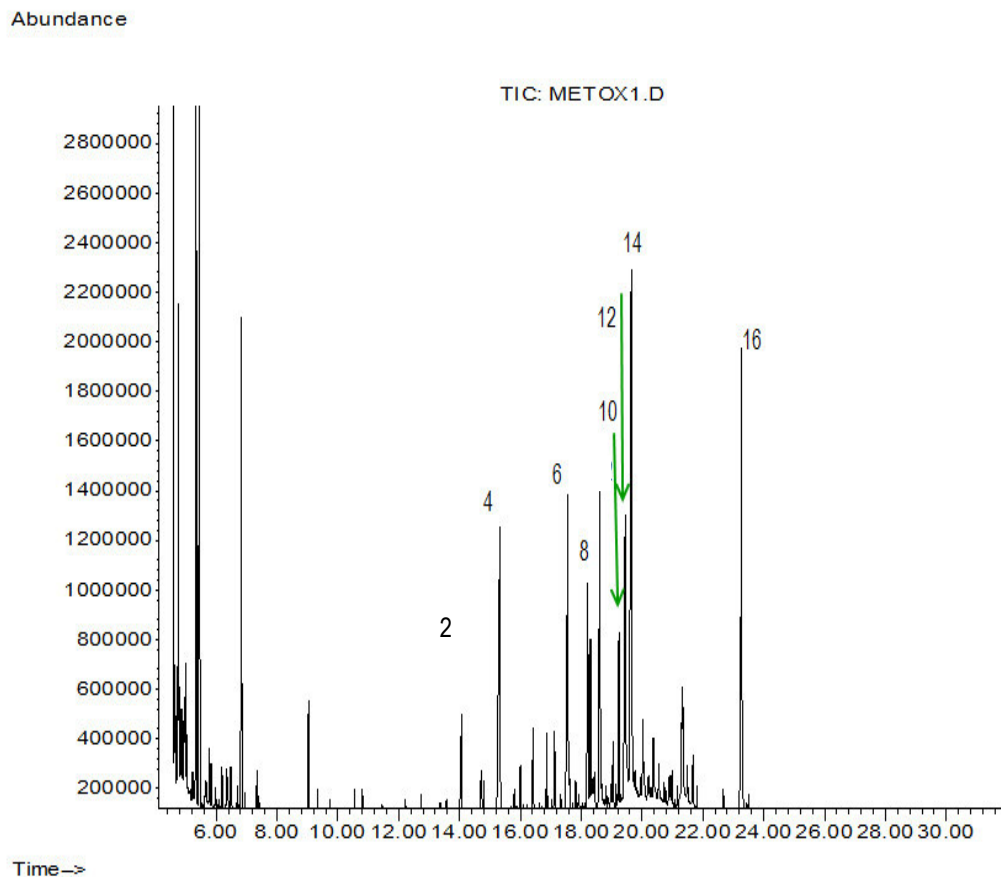


Figura 26. Cromatograma de los compuestos desorbidos y derivatizados con metóxido de sodio, los cuales fueron extraídos por microextracción en fase sólida, y analizados por CG-EM. Compuestos identificados; Ácido undecanóico (2); Ácido dodecanóico (4); Ácido tetradecanóico (6); Ácido pentadecanóico (8); Éster metílico del ácido hexadecanóico (10); Ácido 9-hexadecenoico (12); Ácido hexadecanóico (14); 9 – Octadecenamida (16).

4.5 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos mediante un tratamiento químico y posterior metilación con BF_3/MeOH

Si bien los tratamientos de la muestra descritos permiten extraer, en mayor o menor grado hacia la fase acuosa a los ácidos grasos, con mejores resultados obtenidos al utilizar el metóxido de sodio, en ningún caso se obtuvieron los derivados metilados. Cabe la posibilidad de que el sedimento inhiba la formación de los derivados. Con el fin de evaluar esta hipótesis y lograr la formación de los ésteres metílicos de los ácidos extraídos se diseñaron una serie de experimentos en los que la reacción de metilación se realizó posterior al ataque químico del sedimento, separando la fase líquida resultante de los sólidos del sedimento.

4.5.1 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con tolueno y metilación con BF_3/MeOH

En la metodología apartado 3.9.1 se describe el procedimiento, con el que se pretende extraer los compuestos presentes en los sedimentos con tolueno, para posteriormente llevar a cabo la metilación de estos. Realizando por separado cada uno de los procesos es posible ajustar las condiciones de reacción necesarias para lograr la derivación de los ácidos grasos en ésteres metílicos.

En la Figura 27 se presenta el cromatograma que se obtiene al desorber los compuestos del sedimento mediante su extracción con tolueno y posterior derivación con BF_3/MeOH ; En este caso se lograron separar cuatro compuestos los cuales se identificaron en base a sus Tr: Éster metílico del ácido tridecanóico (13) 17 min; Éster metílico del ácido pentadecanóico (17) 19.06min; Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19) 20.15min; Éster metílico del ácido heptadecanóico (21) 20.61min; 9 – Octadecenamida (16) 24.55min.

Los compuestos fueron desorbidos mediante su extracción con tolueno, y se derivaron a ésteres metílicos una vez que se separaron los procesos. En base a estos resultados quizá sea más exitosa una técnica en la que se separen los procesos en dos partes: Desorber los compuestos mediante un tratamiento químico y posteriormente realizar una derivación de los compuestos ajustando las condiciones necesarias para que se lleve a cabo. Sin embargo en este caso no fue suficiente la cantidad de compuestos desorbidos para decir que la técnica es buena en un análisis de biomarcadores presentes en sedimentos.

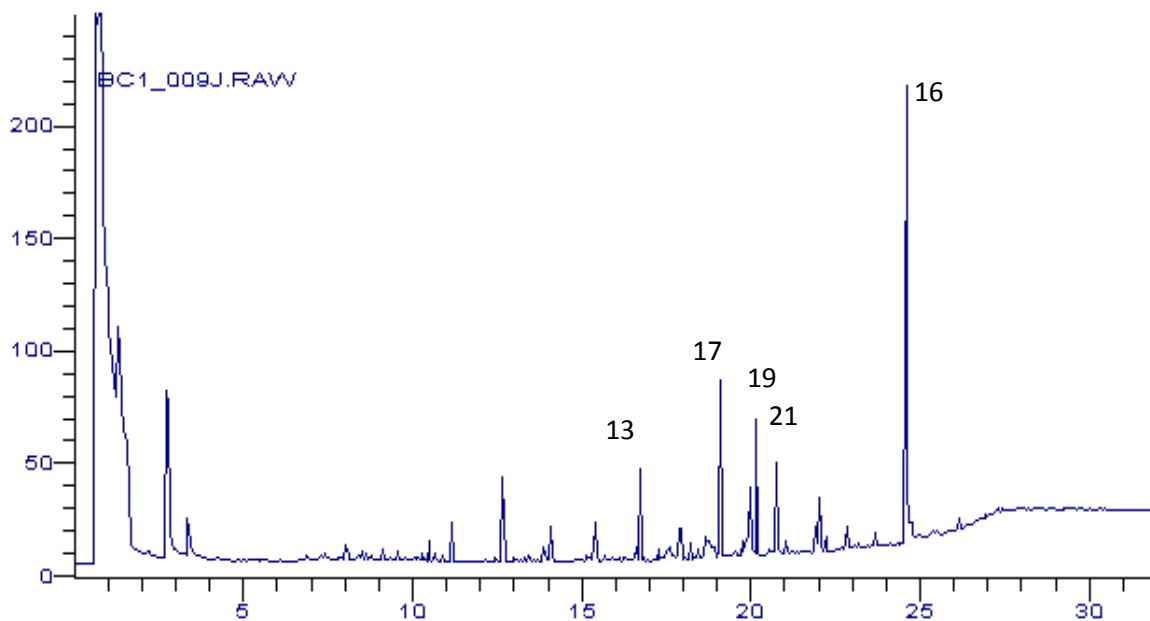


Figura 27. Cromatograma de los compuestos desorbidos de los sedimentos mediante su extracción con tolueno y derivatizados con BF_3/MeOH , los compuestos fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por cromatografía de gases. Los compuestos identificados por medio de la correlación con sus tiempos de retención fueron: Éster metílico del ácido tridecanóico (13); Éster metílico del ácido pentadecanóico (17); Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19); Éster metílico del ácido heptadecanóico (21); 9 – Octadecenamida (16).

4.5.2 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH y metilación con BF_3/MeOH

Tomando en cuenta los resultados de los apartados 4.2.3 y 4.5.1. Se desarrolló una metodología que cumple con desorber los compuestos presentes en los sedimentos y lleva a cabo la metilación de los ácidos grasos con lo cual se establece un método práctico de análisis que arroja información suficiente. De esta manera se llevó a cabo primeramente un tratamiento químico con KOH/MeOH y posteriormente se ajustaron las condiciones necesarias para la esterificación de los ácidos grasos, con estos ajustes se obtuvo el cromatograma de la Figura 28 en donde se ven seis picos principales los cuales se identificaron en base a su Tr como: Éster metílico del ácido undecanóico (9,1) 14.08min; Éster metílico del ácido dodecanóico (11) 15.42min; Éster metílico del ácido tetradecanóico (15)18.1min; Éster metílico del ácido pentadecanóico (17) 19.06min; Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19) 20.15min; 9 – Octadecenamida (16) 24.55min.

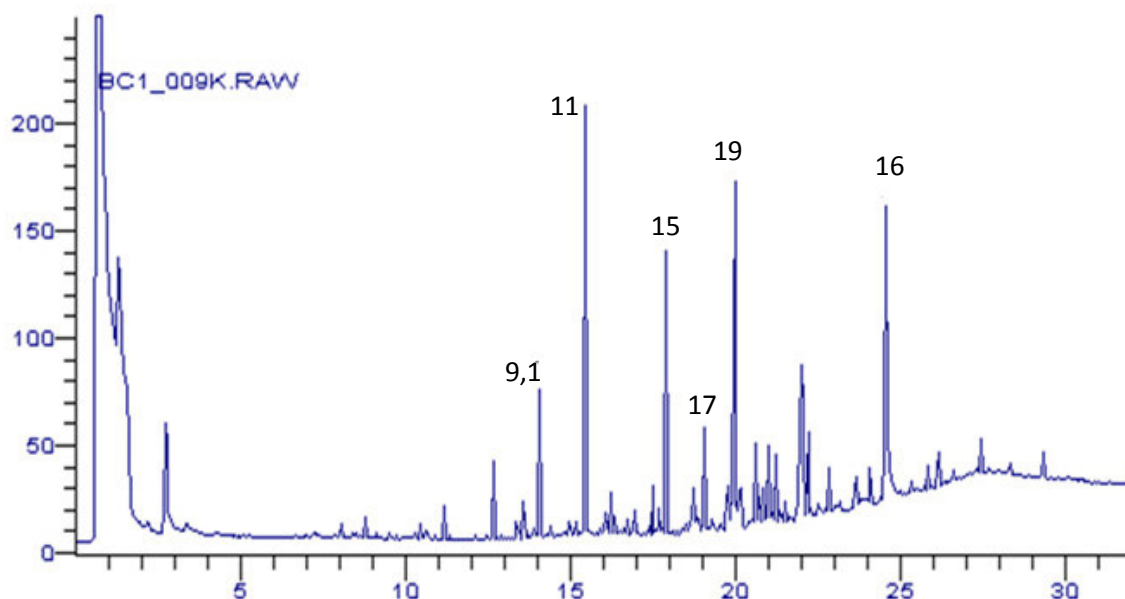


Figura 28. Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante la hidrólisis básica y derivatizados con BF_3/MeOH , los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por cromatografía de gases. Los compuestos identificados por medio de la correlación con sus tiempos de retención fueron: Éster metílico del ácido undecanóico (9,1); Éster metílico del ácido dodecanóico (11); Éster metílico del ácido tetradecanóico (15); Éster metílico del ácido pentadecanóico (17); Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19); 9 – Octadecenamida (16).

Con base en los resultados se observa la desorción de los compuestos presentes en los sedimentos así como su derivación a ésteres metílicos, sin embargo sería bueno tener un método que cumpliera con estas dos condiciones y aún más, que arrojera un mayor número de datos en este caso un mayor número de compuestos esterificados, sin olvidar que queremos un método práctico de análisis.

4.5.3 Desorción de los compuestos presentes en sedimentos con KOH/MeOH sin separación de las fracciones (sólida y líquida) y metilación con BF_3/MeOH

Analizando los dos casos anteriores y observando que en ambos se cumple con lo propuesto, pero en búsqueda de un método que arroje mejores resultados se ideó la forma de conjuntar los métodos descritos en la metodología apartado 3.9.1 con el del apartado 3.9.2 para obtener finalmente el procedimiento que se describe en la metodología apartado 3.9.3. Como resultado de esta metodología se obtuvo una mayor cantidad de compuestos desorbidos presentes en los

sedimentos y es probable que estos hayan sido derivados a ésteres metílicos. En la Figura 29 se muestra el cromatograma obtenido al tratar los sedimentos bajo las condiciones descritas en la metodología apartado 3.9.3. El cromatograma muestra 10 picos los cuales podemos atribuir a los ésteres metílicos de los ácidos grasos correspondientes esto con base a los tiempos de retención que presentan cada uno de ellos, y fueron identificados como: Éster metílico del ácido nonanóico (3) 10.81min; Éster metílico del ácido 2-decenóico (5) 12.65min; Éster metílico del ácido undecanóico (9,1) 13.5min; Éster metílico del ácido dodecanóico (11) 14.82min; Éster metílico del ácido tetradecanóico (15) 17.14min; Éster metílico del ácido pentadecanóico (17) 18.21min; Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19) 19.05min; Éster metílico del ácido heptadecanóico (23) 20.2 min; Éster metílico del ácido 10-octadecenóico (27) 20.99; 9 – Octadecenamida (16) 23.27min.

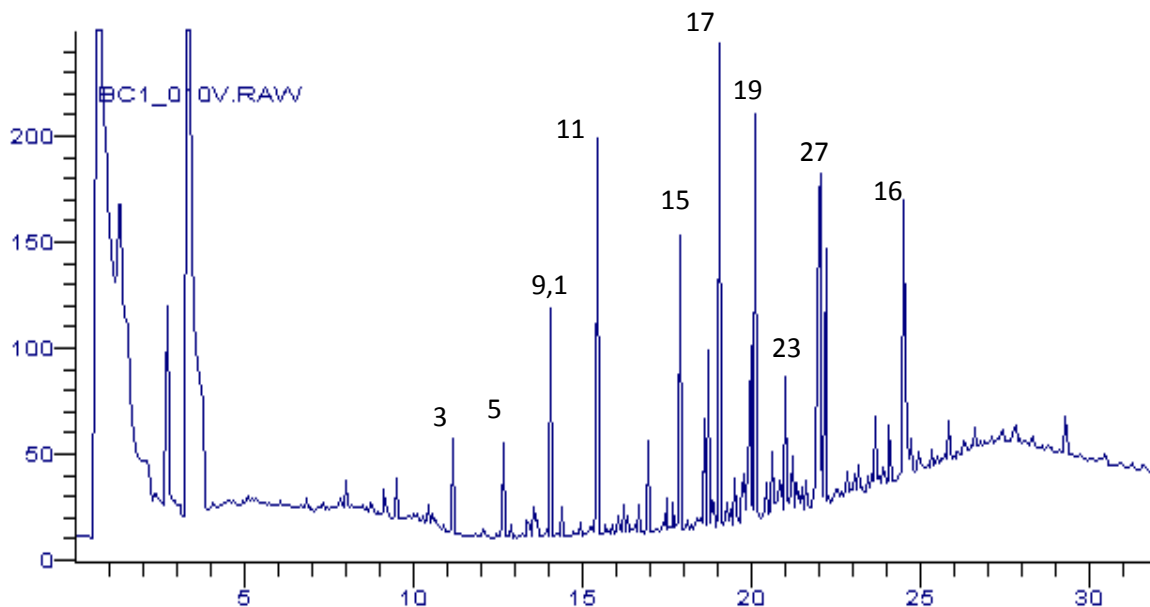


Figura 29. Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante la hidrólisis básica separación de las fracciones (sólida y líquida) y derivatizados con BF_3/MeOH , los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por CG. Los compuestos identificados por medio de la correlación con sus tiempos de retención fueron: Éster metílico del ácido nonanóico (3); Éster metílico del ácido 2-decenóico (5); Éster metílico del ácido undecanóico (9,1); Éster metílico del ácido dodecanóico (11); Éster metílico del ácido tetradecanóico (15); Éster metílico del ácido pentadecanóico (17); Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19); Éster metílico del ácido heptadecanóico (23); Éster metílico del ácido 10-octadecenóico (27); 9 – Octadecenamida (16).

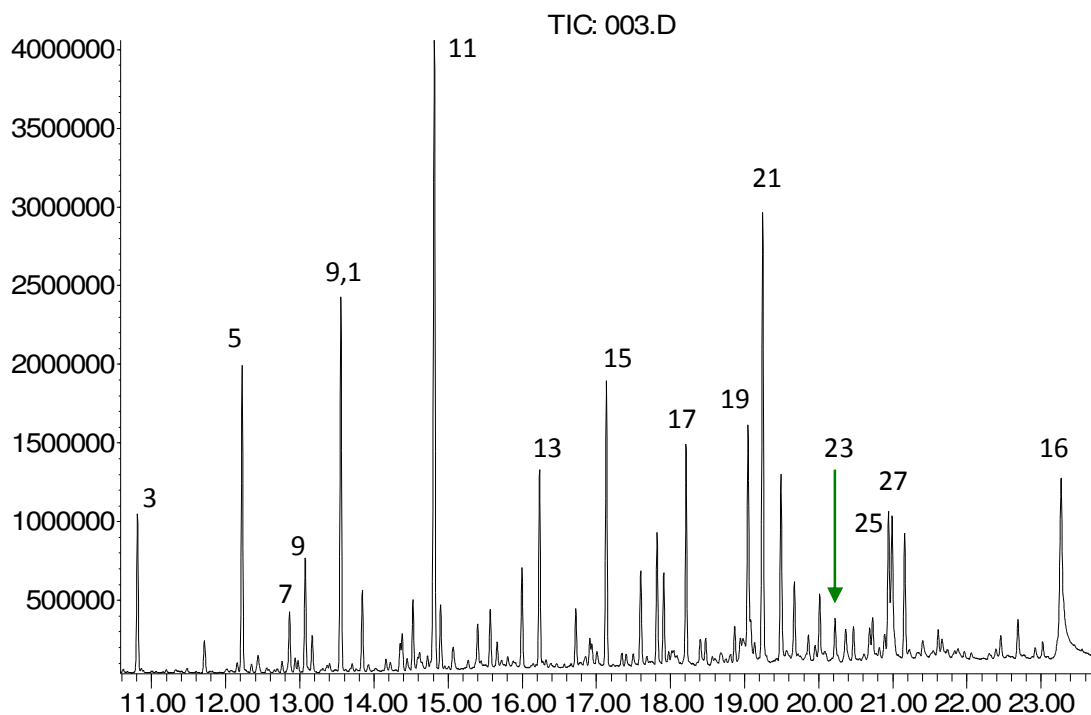
En comparación con los diferentes métodos propuestos en apartados anteriores, es con este con el cual se obtuvieron los mejores resultados. Debido a que en este punto del análisis, no se puede

saber la identidad de cada pico es necesario inyectar la muestra de sedimentos tratada en las condiciones ya descritas en la metodología apartado 3.9.3 en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, esto con el fin de identificar los compuestos presentes en los sedimentos y corroborar que el método funciona como se espera.

El cromatograma obtenido se muestra en la figura 30 donde se pudieron identificar 15 picos los cuales corresponden a los siguientes compuestos: Éster metílico del ácido nonanóico (3) 10.81min; Éster metílico del ácido 2-decenóico (5) 12.22 min; Éster metílico del ácido decanóico (7) 12.86min; Éster metílico del ácido undecenóico (9) 13.08 min; Éster metílico del ácido undecanóico (9,1) 13.5 min; Éster metílico del ácido dodecanóico (11) 14.82 min; Éster metílico del ácido tridecanóico (13) 16.24 min; Éster metílico del ácido tetradecanóico (15) 17.14 min; Éster metílico del ácido pentadecanóico (17) 18.21 min; Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19) 19.05 min; Éster metílico del ácido hexadecanóico (21) 19.24 min; Éster metílico del ácido heptadecanóico (23); Éster metílico del ácido 7-octadecenóico (25) 20.94 min; Éster metílico del ácido 10-octadecenóico (27) 20.99 min; 9 – Octadecenamida (16) 23.27 min.

Con base en los resultados detectamos que los compuestos desorbidos mediante el tratamiento químico propuesto en la metodología apartado 3.9.3, fueron derivados conforme a lo esperado, ya que se obtuvieron los ésteres metílicos de los ácidos correspondientes. En base a los resultados podemos concluir que este método cumple con los objetivos propuestos para el desarrollo de la metodología, ya que se detectan una mayor cantidad de compuestos y que todos los ácidos son derivados a ésteres metílicos sin perder de vista que buscamos una metodología la cual sea práctica y sin el uso de disolventes para llevar a cabo la extracción de los compuestos de interés.

Abundance



Time-->

Figura 30. Cromatograma de los compuestos desorbidos mediante la hidrólisis básica, separación de las fracciones (sólida y líquida) y derivatización con BF_3/MeOH los cuales fueron extraídos mediante microextracción en fase sólida y analizados por CG-EM. Los compuestos identificados fueron: Éster metílico del ácido nonanóico (3); Éster metílico del ácido 2-decenóico (5); Éster metílico del ácido decanóico (7); Éster metílico del ácido undecenóico (9); Éster metílico del ácido undecanóico (9,1); Éster metílico del ácido dodecanóico (11); Éster metílico del ácido tridecanóico (13); Éster metílico del ácido tetradecanóico (15); Éster metílico del ácido pentadecanóico (17); Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19); Éster metílico del ácido hexadecanóico (21); Éster metílico del ácido heptadecanóico (23); Éster metílico del ácido 7-octadecenóico (25); Éster metílico del ácido 10-octadecenóico (27); 9 – Octadecenamida (16).

4.6 Correlación de los tiempos de retención de los compuestos eluidos por cromatografía de gases contra los Tr de los compuestos identificados por cromatografía de gases espectrometría de masas.

En la Tabla 2 se puede observar los compuestos que fueron identificados por CG-EM mediante la inyección de las muestras tratadas como se describió en la metodología apartados 3.8.3 y 3.9.3. En la última columna de la tabla, de izquierda a derecha se muestran los compuestos identificados por CG-EM, en la siguiente columna de izquierda a derecha se observan los Tr registrados en CG-EM y con base a estos valores se correlacionaron los Tr obtenidos por CG, los cuales aparecen en la tercer columna de izquierda a derecha, de esta manera se pudo identificar algunos de los

compuestos presentes que fueron citados en los resultados de los apartados: 4.2.1; 4.2.2; 4.2.3; 4.4.3 para los ácidos y 4.4.1; 4.4.2; 4.5.1; 4.5.2; 4.5.3 para los ésteres metílicos.

Tabla 2. Correlación de los tiempos de retención de los compuestos eluidos por cromatografía de gases e identificados por cromatografía de gases-espectrometría de masas

Pico	Identificación abreviada	Tr CG	Tr CG-EM	Compuesto identificado
1	E8	-----	9.32	Éster metílico del ácido octanóico
3	E9	11.2	10.81	Éster metílico del ácido nonanóico
5	E10:1	12.65	12.22	Éster metílico del ácido 2-decenóico
7	E10	13.5	12.86	Éster metílico del ácido decanóico
9	E11:1	-----	13.08	Éster metílico del ácido undecenóico
9,1	E11	14.08	13.5	Éster metílico del ácido undecanóico
2	A11	-----	14.06	Ácido undecanóico
11	E12	15.42	14.82	Éster metílico del ácido dodecanóico
4	A12	15.9	15.3	Ácido dodecanóico
13	E13	17	16.24	Éster metílico del ácido tridecanóico
15	E14	18.1	17.14	Éster metílico del ácido tetradecanóico
6	A14	18.8	17.56	Ácido tetradecanóico
17	E15	19.06	18.21	Éster metílico del ácido pentadecanóico
8	A15	19.48	18.6	Ácido pentadecanóico
19	E16:1	20.15	19.05	Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico
12	E16:1	19.7	19.44	Ácido 9-hexadecenóico
10	E16	-----	19.24	Éster metílico del ácido hexadecanóico
21	E16	20.61	19.24	Éster metílico del ácido hexadecanóico
14	A16	20.5	19.65	Ácido hexadecanóico
23	E17	21	20.2	Éster metílico del ácido heptadecanóico
25	E18:1,7	21.2	20.94	Éster metílico del ácido 7-octadecenóico
27	E18:1,10	21.99	20.99	Éster metílico del ácido 10-octadecenóico
16	AM:1,9	24.55	23.27	9 – Octadecenamida.

Los compuestos eluyen de acuerdo a su volatilidad, en este caso los más volátiles son aquellos compuestos de cadenas cortas y en una cadena con el mismo número de carbonos aquellos que presentan alguna insaturación. El primer compuesto dentro de la serie de ésteres metílicos identificados es el éster metílico del ácido octanóico y sucesivamente conforme a la cadena carbonada aumenta en número de carbonos van eluyendo los compuestos hasta llegar al último de esta serie que es el éster metílico del ácido octadecanóico. El último compuesto identificado es la 9-octadecenamida la cual se encontrado presente en todas y cada una de las pruebas realizadas.

Mediante una gráfica de dispersión se evaluó que tan buena es la correlación de los picos, trazando la línea de tendencia se obtiene una R^2 de 0.9837 para los ácidos grasos identificados citados en la Tabla 2. El valor de R^2 indica que la correlación de los picos no es tan buena como esperaríamos o quizá se debe a que dos de seis picos se salen de la línea de tendencia como se muestra en la gráfica de la Figura 31, también se puede ser que el número de datos graficados no son suficientes para este tipo de análisis.

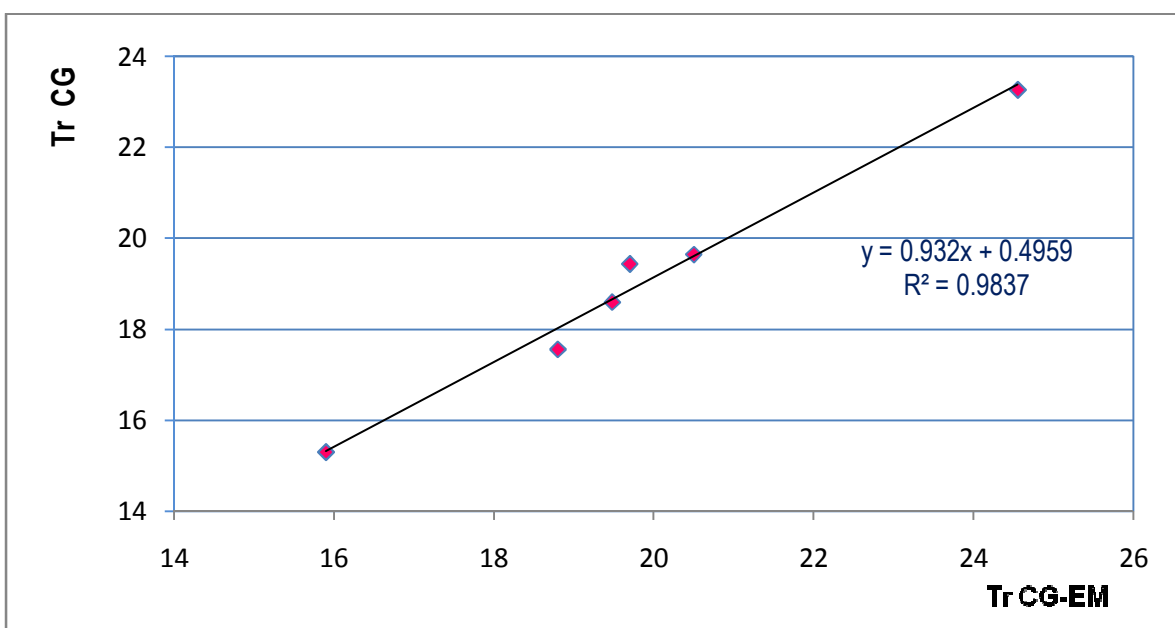


Figura 31. Gráfica de correlación de los Tr mostrados en la Tabla 2 para los compuestos eluidos por cromatografía de gases vs los compuestos eluidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

En la Figura 32 se graficaron los datos correspondientes para los ésteres metílicos citados en la Tabla 2. Se trazó la línea de tendencia correspondiente a los datos y se obtuvo una R^2 de 0.9946, lo

cual indica que la correlación de los picos es buena, ya que únicamente tres puntos de trece se salen de la línea de tendencia.

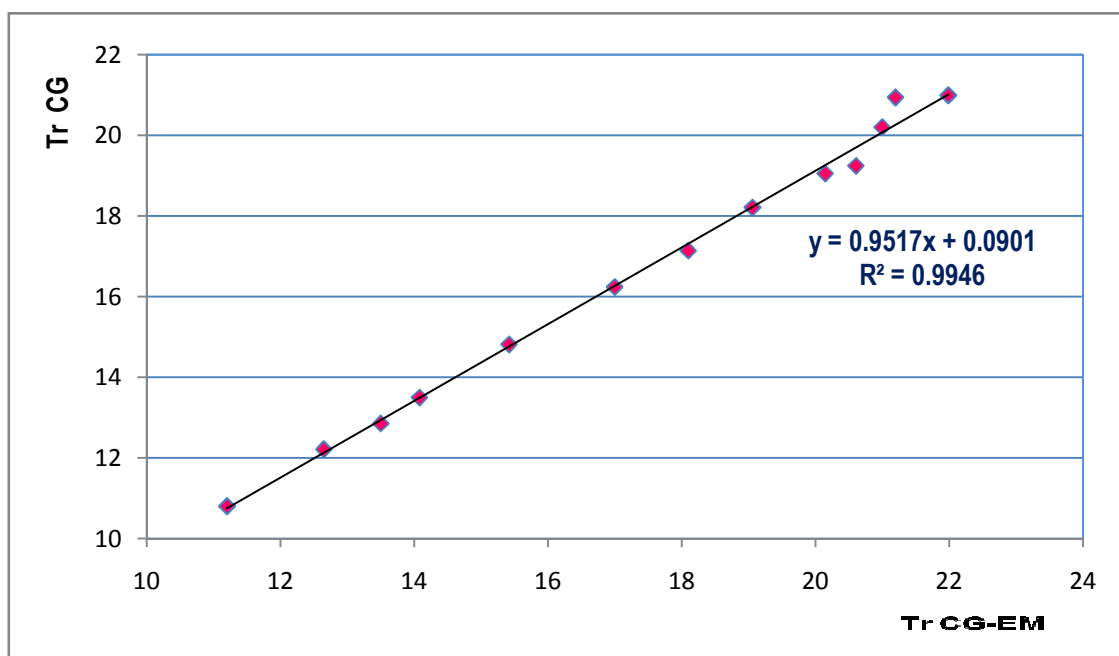


Figura 32: Gráfica de correlación de los Tr mostrados en la Tabla 2 para los compuestos eluidos por cromatografía de gases y los compuestos eluidos por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

4.7 Evaluación de la reproducibilidad del método.

Una vez que se determinó cual es la mejor alternativa para realizar el análisis de los ácidos grasos presentes en sedimentos, se evaluó la reproducibilidad del procedimiento comparando la repetibilidad con la variación de los resultados que proviene de la distribución no homogénea de la materia orgánica en los sedimentos. Como se señaló en el apartado 3.10 de la metodología, se hicieron triplicados del análisis de una submuestra de la muestra de sedimento para evaluar la repetibilidad del método y se replicaron con submuestras diferentes en tres días consecutivos para conocer el aporte por la homogeneidad de la muestra a la reproducibilidad. El procedimiento de análisis es el que se describe en el apartado 3.9.3 de la metodología. El análisis de varianza se hizo con siete compuestos representativos seleccionados con base a su presencia en todas las muestras analizadas y que se encuentran en muy diferentes concentraciones.

En la Tabla 3 se encuentra el resumen del análisis de varianza. La varianza entre los resultados de días diferentes es significativamente mayor que la varianza entre las replicas de una misma submuestra realizadas el mismo día ($F=16.2146$, $P=6 \times 10^{-6}$). Se concluye entonces que la

repetibilidad es menor a las variaciones que provienen de la distribución no homogénea de la materia orgánica en los sedimentos.

Tabla 3. Resumen del análisis de varianza.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Compuestos	1.9575E+12	6	3.2625E+11	27.0152	6.2395E-13	2.3240
Días	3.9163E+11	2	1.9582E+11	16.2146	6.0483E-06	3.2199
Interacción	7.3864E+11	12	6.1553E+10	5.0969	3.6114E-05	1.9910
Dentro del grupo	5.0721E+11	42	1.2076E+10			
Total	3.595E+12	62				

En la Figura 33 se presenta la grafica de las áreas de cada compuesto así como la barra de error de la desviación estándar al interior, y en la Figura 34 se ilustra la gráfica de las áreas de cada compuesto así como la barra de error de la desviación estándar general. Se observa claramente que la desviación estándar general es mayor que al interior.

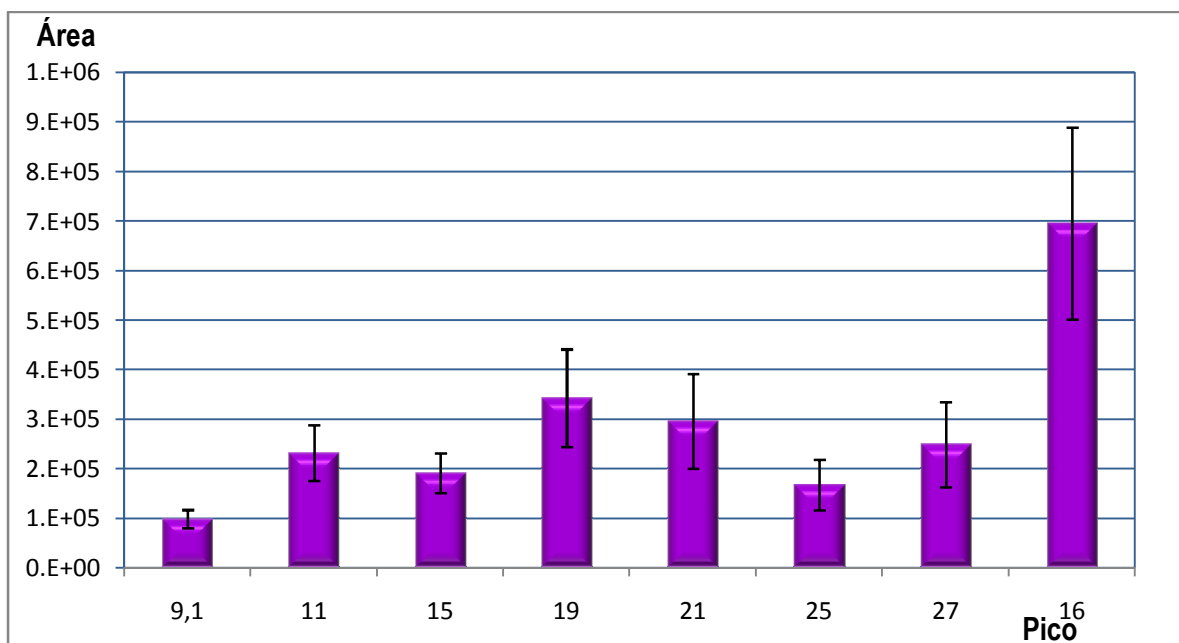


Figura 33. Gráfico del área promedio obtenida para cada compuesto en las nueve extracciones realizadas, así como la barra de error de la desviación estándar al interior. Las áreas graficadas corresponden a los compuestos: Éster metílico del ácido undecanóico (9,1); Éster metílico del ácido dodecanóico (11); Éster metílico del ácido tetradecanóico (15); Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19); Éster metílico del ácido hexadecanóico (21); Éster metílico del ácido 7-octadecenóico (25); Éster metílico del ácido 10-octadecenóico (27); 9 – Octadecenamida (16).

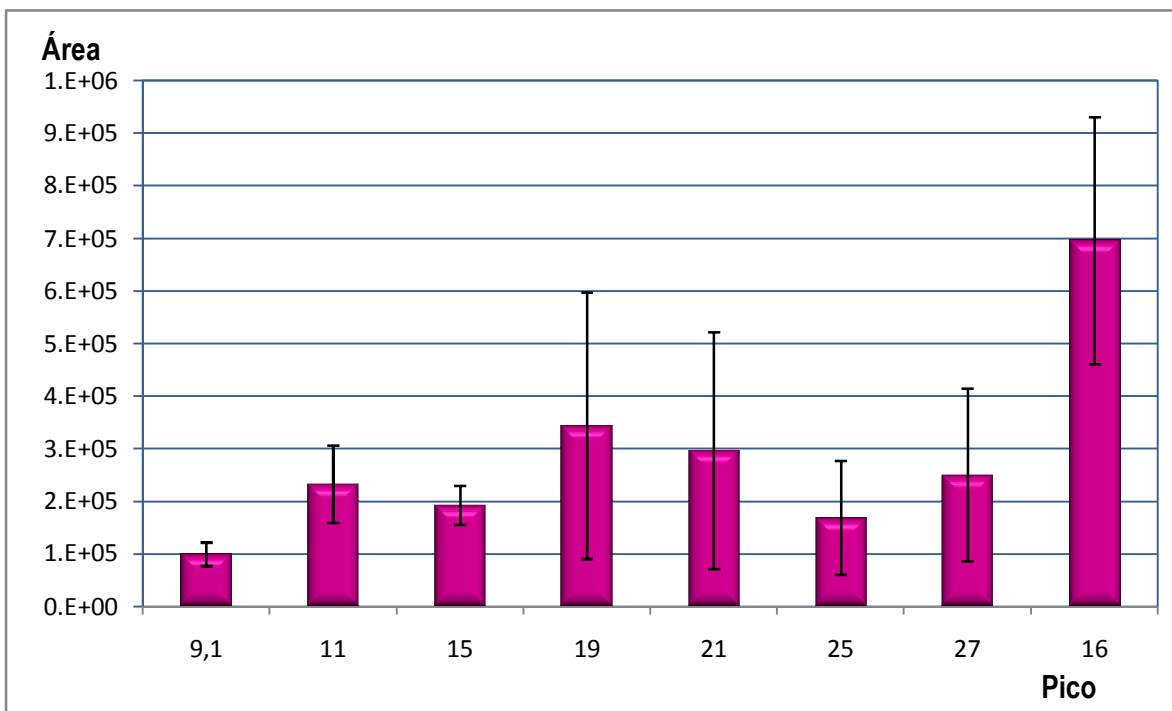


Figura 34. Gráfico del área promedio obtenida para cada compuesto en las nueve extracciones realizadas, así como la barra de error de la desviación estándar general. Las áreas graficadas corresponden a los compuestos: Éster metílico del ácido undecanóico (9,1); Éster metílico del ácido dodecanóico (11); éster metílico del ácido tetradecanóico (15); Éster metílico del ácido 9-hexadecenóico (19); Éster metílico del ácido hexadecanóico (21); Éster metílico del ácido 7-octadecenóico (25); Éster metílico del ácido 10-octadecenóico (27); 9 – Octadecenamida (16).

En la Tabla 4 se muestran los coeficientes de variación promedio de las réplicas da cada día. En promedio el coeficiente de variación es de 26%, algo elevado pero aceptable para este tipo de análisis considerando los resultados del análisis de varianza.

Tabla 4. Coeficientes de variación promedio de cada día para siete compuestos representativos en el análisis por submuestreo.

Tr	Compuesto	^a CV%
14.07	Éster metílico del ácido undecanóico	18
15.42	Éster metílico del ácido dodecanóico	26
17.9	Éster metílico del ácido tetradecanóico	21
20.15	Éster metílico del ácido 9- hexadecenóico	26
20.61	Éster metílico del ácido hexadecanóico	30
21.98	Éster metílico del ácido 10-octadecenoico	34
24.55	9-Octadecemanida	28

^a Valores promedio de los coeficientes de variación de las tres repeticiones de día

4.8 Interpretación del perfil de ácidos grasos en las muestras

Con los resultados obtenidos en los apartados 4.4.3 y 4.5.3 se pudo identificar un total de 23 compuestos de los cuales 8 se encuentran citados en la Tabla 2 como ácidos y los 15 restantes corresponden a ésteres metílicos.

La presencia del compuesto asignado al pico número dieciséis citado en la Tabla 2 es notoria en casi todas y cada una de las pruebas realizadas ya que es un pico que salta a la vista fácilmente al ser el último y más grande en comparación con los demás compuestos, como se puede apreciar si se gráfica su área y se observa en Figura 33 y 34. Su presencia se debe al manejo y conservación que se tuvo con las muestras de sedimentos, una vez que los sedimentos fueron liofilizados para su conservación (metodología apartado 3.2) fueron guardados en bolsas de plástico conocidas comúnmente como Ziploc. Debido a esto, es que se atribuye la presencia de este compuesto en todas las pruebas donde estuvieron presentes los sedimentos, ya que al permanecer guardados al interior de las bolsas, los sedimentos estuvieron en contacto con el compuesto 9-Octadecenamida el cual es usado en este tipo de empaques como película lubricante.

El compuesto asignado al pico número diecinueve citado en la Tabla 2 es el segundo compuesto con mayor área y se ubica en la gráfica de la Figura 33 y 34 corresponde al éster metílico del ácido 9-hexadecenóico, esto se debe a que los ácidos grasos que presentan una o dos dobles ligaduras con cadenas de números de carbonos pares se encuentra presentes especialmente en los organismos acuáticos dentro de este grupo los ácidos con C_{16} y C_{18} son los más comunes.

El compuesto asignado al número veintiuno citado en la Tabla 2 es el tercer compuesto con mayor área como se observa en la gráfica de la figura 33 y 34 y corresponde al éster metílico del ácido hexadecanóico su presencia se atribuye a que este ácido es a menudo el primero o segundo más abundante en los organismos.

Existe una relación entre el ácido con 16:1 y 16:0 lo cual explica la proporción en las áreas obtenidas, el predominio de 16:1 sobre 16:0 es indicador de predominancia en la presencia de diatomeas en el medio. De igual forma, si se toma como referencia el área obtenida en este trabajo para los ácidos grasos 16:1/16:0, y en futuros análisis hubiera un incremento en las áreas obtenidas de estos compuestos, la información que esto nos arroja es que ha incrementado la proporción de diatomeas presentes en el medio.

Como ya se mencionó, los compuestos con una o dos dobles ligaduras y números de carbonos pares se encuentran en abundancia en los organismos y principalmente acuáticos, dentro de los cuales aquellos con C₁₆ y C₁₈ son los más abundantes. Quizá es por eso que el compuesto asignado al número veintisiete citado en la Tabla 2 sea el cuarto compuesto en orden decreciente con mayor área como se observa en las Figuras 33 y 34. La presencia de los compuestos con C₁₆ y C₁₈ se atribuye a fuentes fitoplanctónicas, sin embargo su presencia no indica lo mismo. Los ácidos con C₁₈ comúnmente se asocian y se utiliza como marcador de influencia terrestre. En este estudio se encontraron presentes en los sedimentos dos compuestos con C₁₈: ácido 7- octadecenóico y ácido 10- octadecenóico, si el porcentaje de estos ácidos sobre todos los ácidos presentes en la muestra es mayor a 2.5 se considera que la muestra tiene una importante aportación de material terrestre como fuente de materia orgánica.

Los ácidos pentadecanóico y heptadecanóico los cuales están citados en la Tabla 2 se producen principalmente por bacterias aeróbicas y anaeróbicas, con lo cual se puede estimar la contribución bacteriana.

La aportación de los ácidos restantes el ácido 2- decenóico, ácido undecanóico, ácido dodecanóico, ácido tetradecanóico citados en la Tabla 2, proviene principalmente del plancton, sin embargo no se utilizan como marcadores específicos de fuentes fitoplanctónicas debido a la ubicuidad de estos.

Los principales compuestos con los que se puede estimar el estado del medio estudiado en este trabajo son en orden decreciente el éster metílico del ácido 9-hexadecenóico > éster metílico del ácido hexadecanóico > éster metílico del ácido 10- octadecenóico ≥ éster metílico del ácido dodecanóico > éster metílico del ácido tetradecanóico ≥ éster metílico del ácido 7- octadecenóico. > éster metílico del ácido undecanóico.

V CONCLUSIONES

1. Se estableció una metodología con la cual es posible llevar a cabo el análisis de ácidos grasos como biomarcadores moleculares presentes en sedimentos de zonas costeras.
2. Las pruebas preliminares con respecto al uso de membranas permeables o barreras porosas, demostraron que la fracción lipídica se encuentra adherida al sedimento y no es posible la MEFS, en la fase inicial del proceso.
3. El procedimiento para llevar a cabo la desorción y extracción de la fracción lipídica presente en los sedimentos, hacia un medio polar, fue a través de una reacción de saponificación.
4. Con la metodología desarrollada es posible formar los derivados metílicos de los ácidos grasos que permite realizar una MEFS eficiente y un análisis cromatográfico más adecuado.
5. El procedimiento propuesto hace uso de la MEFS para la extracción de los ésteres metílicos.
6. Con base en las características del medio en el que se encuentran los ésteres metílicos de los ácidos grasos (agua/ metanol) es posible el uso de fibras apolares en la MEFS.
7. Se exploró el uso de la MEFS en el análisis de biomarcadores moleculares en sedimentos de zonas costeras.
8. Se demostró que la principal fuente de variación en los resultados es la distribución no homogénea de la materia orgánica en los sedimentos, por lo que es necesario realizar el tamizado y homogenización cuidadosa de la muestra antes de obtener las submuestras para el análisis. Sin esta etapa de homogenización previa de la muestra los coeficientes de variación son en promedio del 26%.
9. El procedimiento propuesto tiene ventajas sobre otros métodos utilizados en el análisis de sedimentos, en referencia a la cantidad de muestra necesaria, al uso de disolventes y al tiempo requerido para su análisis.
10. A partir del perfil de los ácidos grasos que se encontraron presentes en los sedimentos se concluye que la aportación de materia orgánica proviene principalmente de diatomeas y bacterias con bajo aporte de origen terrestre.
11. El método propuesto representa una alternativa interesante y prometedora en análisis futuros de biomarcadores en sedimentos; Sin embargo es necesario optimizar cada uno de los pasos presentes en el proceso, para buscar la estandarización del método. Acortando

los tiempos de preparación (evitando centrifugar y decantar la muestra), que sea fiable, eficiente, que el costo beneficio sea mejor, que la tecnología usada sea susceptible de poderse aplicar, que cumpla con una alta reproducibilidad y que sea inocuo al entorno.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

1. Libes. S.M. 1992. *An Introduction to Marine Biogeochemistry*. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. 734p.
2. John, R. H. 1988. *Principios de fisicoquímica química orgánica y bioquímica*. Limusa.
3. Raymond Chang. 1987. *Fisicoquímica con aplicación a sistemas biológicas*. Compañía editorial continental. 1063p
4. Bernard J. Nebel, Richard T. Wright. 1999. *Ciencias ambientales ecología y desarrollo sostenible*. Sexta edición. Addison Wesley Longman. 688p
5. Jenkins. 1999. *Química del agua*. Limusa
6. Chávez. R.D. *Uso de la extracción en fase sólida para la preparación de muestra en el análisis de Biomarcadores en sedimentos costeros*. Tesis .UNAM. 2007.
7. Harris E. 2001. *Análisis químico cuantitativo*. 2^{da} edición, Reverte, Barcelona.959p
8. Tellez. M.J. *Separación de familias de compuestos del aceite crudo utilizando extracción en fase sólida*. Tesis. UNAM. 2002
9. Millero F.J. 1996. *Chemical Oceanography*, CRC press, Inc. 531p.
10. Horne R.A. 1996. *Marine Chemistry*, Wiley-Interscience, New York.568p.
11. Parrish C.C. et al. 2000. *The handbook of environmental chemistry*, Vol.5 Part D. Marine Chemistry. 1993:293
12. Janus Pawliszyn. 1997. *Solid phase microextraction. Teory and practice*. Ed. Wiley-VCH. New York.
13. Peñalver. H.A. *Aplicación de la Microextracción en fase sólida al análisis medio ambiental*. Tesis. Universitat Rovira i Virgili.2002
14. Cifuentes, L. J.1987. *El océano y sus recursos*. Volumen 5. *Plancton*. Fondo de cultura económica.
15. Harold, M. M. *Basic gas chromatography*. Techniques in analytical chemistry series. John Wiley and Sons, Inc., Nueva York. 200p

16. Méjanelle L. and Laureillard J. *Lipid biomarker record in surface sediments at three sites of contrasting productivity in the tropical North Eastern Atlantic*. *Marine Chemistry* (2007).
17. Douglas A. Skoog, Timothy A. Nieman. *Principios de Análisis Instrumental*. Quinta edición. Editorial Mc Graw-Hill
18. Peter J. Wangersky. *Marine Chemistry*. The hand book of environmental chemistry. Springer
19. David L. Nelson and Michael M. Cox. 2000. *Principios de bioquímica*. Ediciones Omega. 1140p
20. Riley, J.P. y G. Skirrow, 1996. *Chemical Oceanography*. Academic Press, Inc. 712p.
21. John McMurry. 2000. *Química Orgánica*. Quinta edición. Cornell University. International Thomson Editores. 1278p