



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

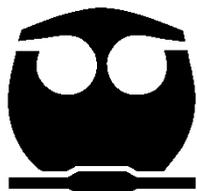
**ANÁLISIS DE RESINA DE COPAL POR CROMATOGRFÍA DE  
GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y  
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. APLICACIÓN EN EL  
ANÁLISIS DE MUESTRAS ARQUEOLÓGICAS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA**

**PRESENTA**

**ANDREA DÍAZ GONZÁLEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 Francisco Rojo Callejas**

**VOCAL: Profesora Araceli Patricia Peña Álvarez**

**SECRETARIO: Profesora Silvia Citlalli Gama González**

**1er. SUPLENTE: Profesora Patricia Díaz Arista**

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

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 102, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA**

---

**ASESOR DEL TEMA: M. EN C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS**

---

**SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. ELBA ROJAS ESCUDERO**

---

**SUSTENTANTE (S): ANDREA DÍAZ GONZÁLEZ**



---

---

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. RESUMEN .....	2
3. ANTECEDENTES .....	3
3.1 Copal .....	3
3.1.1 Usos del copal.....	3
3.1.2 Extracción de la resina .....	5
3.2 Composición química del copal .....	6
3.2.1 Terpenos y terpenoides.....	7
3.3 Estudios previos en muestras arqueológicas.....	10
3.4 Análisis de la composición química del copal .....	11
3.4.1 Clasificación de Cromatografía .....	11
3.4.2 Cromatografía de Gases .....	12
3.4.3 Detectores en Cromatografía de Gases.....	14
3.4.4 Espectrómetro de Masas .....	15
3.5 Microextracción en fase sólida (MEFS) - Headspace (HS).....	16
3.5.1 Principio de la microextracción en fase sólida.....	16
3.5.2 Procedimiento de extracción .....	17
3.5.3 Análisis de muestras por MEFS-HS .....	18
3.5.4 Fibras para microextracción en fase sólida .....	19
3.5.5 Ventajas y desventajas de las técnicas de extracción.....	20
3.6 Extracción sólido- líquido ("Soxhlet") .....	21
3.6.1 Proceso de extracción.....	21

---

---



---

---

4.	OBJETIVOS .....	23
4.1	Objetivo general.....	23
4.2	Objetivos Particulares .....	23
5.	DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	24
5.1	Equipo y materiales .....	24
5.2	Disolventes .....	24
5.3	Resina estándar.....	24
5.4	Muestras arqueológicas.....	24
5.5	Preparación de la muestra .....	25
5.6	Análisis por CG/EM.....	26
5.7	Extracción de los compuestos volátiles por MEFS .....	27
5.8	Identificación de los compuestos presentes en la resina de copal. ....	28
6.	RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	29
6.1	Selección del programa de temperatura para el sistema acoplado CG/EM.....	29
6.2	Comparación y análisis de las resinas de referencia .....	35
6.3	Extracción de los compuestos volátiles por MEFS en la disolución de copal .....	43
6.4	Optimización de la Microextracción en Fase Solida (MEFS) .....	47
6.5	Muestras arqueológicas.....	49
6.5.1	VHXXX I-10: Análisis por CG/EM.....	50
6.5.2	VHXXX I-10: Análisis por MEFS-HS seguido de CG/EM .....	52
6.5.3	VH31 D8 O-65: Análisis por CG/EM.....	54

---

---



---

---

6.5.4 VH31 D8 O-65: Análisis por MEFS-HS seguido de CG/EM .....	54
6.5.5 VH31 M3 O-60: Análisis por CG/EM .....	56
6.5.6 VH31 M3 O-60: Análisis por MEFS-HS seguido de CG/EM.....	56
7. CONCLUSIONES .....	58
8. REFERENCIAS.....	60
9. ANEXO I.....	64
9.1 Blancos .....	64

---

---



---

---

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Extracción de Copal .....	5
Figura 2. Esqueleto de labdano.....	7
Figura 3. Ejemplos de diterpenos.....	9
Figura 4. Estructuras principales de los triterpenos.....	10
Figura 5. Esquema de un equipo de Cromatografía de Gases .....	13
Figura 6. Fases del vial en modo “Headspace” .....	19
Figura 7. Sistema de análisis de una muestra por Microextracción en Fase Sólida -“Headspace” (MEFS-HS). .....	19
Figura 8 Esquema del equipo “Soxhlet” y el proceso de extracción.....	22
Figura 9. Diferentes técnicas de extracción Preparación de la resina de copal ....	25
Figura 10. Diferentes técnicas de extracción de la muestra arqueológica. ....	26
Figura 11. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 1... 29	
Figura 12. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 2... 29	
Figura 13. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 3... 30	
Figura 14. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 4... 30	
Figura 15. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 5... 31	
Figura 16. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 6... 31	
Figura 17. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 7... 32	
Figura 18. Programa de temperatura para el análisis de la resina de copal .....	34
Figura 19. Comparación de los copales en metanol. ....	36
Figura 20. Evaluación del comportamiento de los copales en disolución a seis meses de su extracción con metanol. ....	36
Figura 21. Comparación de la extracción con metanol/cloroformo (1:2 % v/v) para los copales provenientes de Querétaro y Distrito Federal.....	38
Figura 22. Evaluación del comportamiento de los copales en disolución a seis meses de su extracción con metanol/cloroformo (1:2 % v/v). ....	39

---

---



---

---

Figura 23. Comparación a diferentes temperaturas de análisis por MEFS de terpenos durante 30 min. ....	43
Figura 24. Análisis por MEFS a 60°C durante 30 min. ....	44
Figura 25. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el 1R- $\alpha$ -Pino (pico 1) .....	45
Figura 26. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el Junipeno (pico 2).....	45
Figura 27. Extracción de terpenos durante 60 min. a 80°C.....	46
Figura 28. Comparación de la temperatura de análisis por MEFS de la resina de copal durante 30 min. ....	47
Figura 29. Comparación a diferentes tiempos de análisis por MEFS a 60°C.....	48
Figura 30. Contenido de la vasija (muestra VHXXX I-10). ....	50
Figura 31. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el Mono-2-etilhexiladipato (pico 1). ....	50
Figura 32. Estructura química del Mono-2-etilhexiladipato.....	50
Figura 33. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el Ácido adípico, bis(2-etilhexil)éter (pico 2).....	51
Figura 34. Estructura del Ácido adípico, bis(2-etilhexil)éter .....	51
Figura 35. Contenido de la vasija (muestra VHXXX I-10) .....	52
Figura 36. Cerámico 1 (muestra VH31 D8 O-65). ....	55
Figura 37. Cerámico 2 (muestra VH31 M3 O-60).....	56
Figura 38. Blanco de columna.....	64
Figura 39. Blanco de disolvente (Metanol). ....	65
Figura 40. Blanco de disolvente (Cloroformo). ....	65

---

---



---

---

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Programas de temperatura para la separación de los compuestos presentes en la resina de copal por CG .....	27
Tabla 2. Parámetros experimentales para MEFS.....	28
Tabla 3. Número de compuestos identificados y tiempo de análisis en las diferentes pruebas de temperatura por CG .....	32
Tabla 4. Compuestos identificados en el copal (programa 7) .....	34
Tabla 5. Compuestos encontrados en los diferentes tipos de copal (disolución en metanol) .....	37
Tabla 6. Compuestos encontrados en los diferentes tipos de copal (disolución en metanol/cloroformo (1:2 % v/v)) .....	39
Tabla 7. Comparación del número de compuestos extraídos con metanol y metanol/cloroformo.....	40
Tabla 8. Compuestos extraídos a 60°C durante 30 min. de la resina de copal por la técnica de MEFS. ....	49
Tabla 9. Compuestos extraídos de la muestra VHXXX I-10 por la técnica de MEFS .....	53
Tabla 10. Comparación de los compuestos extraídos de la muestra VHXXX I-10 y el copal .....	53
Tabla 11. Comparación de los compuestos extraídos de la muestra VH31 D8 O-65 y el copal .....	55
Tabla 12. Comparación de los compuestos extraídos de la muestra VH31 M3 O-60 y el copal .....	57

---

---



---

---

## 1. INTRODUCCIÓN

La solución a numerosos problemas que se presentan en los campos de la Química depende en gran medida del aislamiento e identificación de ciertas especies orgánicas e inorgánicas existentes en una mezcla. Los procedimientos clásicos de separación (destilación, cristalización, etc.) han sido desplazados por los distintos tipos de cromatografía, técnicas de separación clasificadas como rápidas, simples y de mayor capacidad de separación.<sup>1</sup>

La Cromatografía de Gases (CG) permite realizar análisis cualitativos y en algunos casos cuantitativos. Este sistema acoplado a Espectrometría de Masas (EM) nos brinda un medio analítico versátil en la separación de los compuestos orgánicos presentes en mezclas y su determinación estructural. En estas dos técnicas se conjunta rapidez, sensibilidad y poder resolutivo. Por esta razón, en este trabajo se utilizó esta técnica (CG/EM) para llevar a cabo la caracterización de los compuestos presentes en distintos tipos de resinas aromáticas como el copal con el fin de dar a conocer la composición química de las mismas.

El análisis químico de muestras arqueológicas permite crear programas de conservación y restauración así como el conocimiento histórico de las culturas antiguas, con esta gran finalidad se presentan los resultados obtenidos en el estudio del perfil químico de una muestra arqueológica de la zona norte del estado de Veracruz.



---

---

## 2. RESUMEN

En este proyecto de tesis se utilizaron las técnicas de Microextracción en Fase Sólida en modo "Headspace" (MEFS-HS) y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM) con la finalidad de crear una metodología capaz de extraer y caracterizar los compuestos presentes en la resina de copal de una forma más fácil y sencilla. La extracción por "Soxhlet" fue otra técnica utilizada para el tratamiento de la muestra arqueológica.

Se estudiaron dos tipos de copales: el copal blanco y el copal de lágrima proveniente de Querétaro y el D.F con la finalidad de tener un criterio de la composición de la resina y observar la influencia de la región de la que provienen así como la modalidad en la que se presenta la resina.

En los resultados se encontró que el copal está compuesto mayoritariamente de terpenos tales como el 1R- $\alpha$ -pineno, careno, canfeno, junipeno, verbenol, linalool, entre otros; también se observó que la composición está en función de la procedencia de la resina.

La metodología se aplicó en el tratamiento y análisis de una vasija arqueológica proveniente de la zona norte del estado de Veracruz la cual se cree era de carácter ceremonial y por ende podría existir copal en los residuos del material encontrado dentro de la vasija. Para esto se realizó una comparación de los resultados obtenidos en disolución y por MEFS-HS de la muestra arqueológica y de la resina de copal obteniendo como resultado la presencia de  $\alpha$ -Pineno y de Junipeno en la muestra arqueológica lo que indica la posible existencia del copal; también se encontró la presencia de adipatos, que de acuerdo a lo reportado en la literatura, provienen de la degradación de ácidos grasos lo que podría indicar el uso culinario, donde los adipatos provendrían de los ácidos grasos presentes en los alimentos, o algún producto de contaminación vegetal o animal durante el largo periodo de conservación en la tumba original.



---

---

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Copal

La palabra copal proviene del vocablo náhuatl “copalli” que significa “con la ayuda de este camino” o “gracias a este camino”, en referencia a la quema de resinas como una forma de mantener contacto con los dioses o con el mundo supra-terrenal, por esta razón en México junto con algunos países de Centroamérica al copal se le conoce como una resina aromática empleada comúnmente como incienso, el termino también se le da a un amplio grupo de resinas caracterizadas por su dureza y alto punto de fusión.

Los copales mexicanos a menudo se obtienen de árboles o arbustos, también llamados copales, clasificados por los botánicos dentro del género *Bursera* que pertenece a la familia Burseraceae, este género es la fuente antigua y actual de copal, en México existen poco más de 100 especies diferentes de *Bursera*, los estados con mayor cantidad son: Guerrero (48 especies), Michoacán (37 especies), Oaxaca (37 especies), Morelos, Puebla, Veracruz, Tabasco, Chiapas y Yucatán.<sup>2-7</sup>

La familia Burseraceae incluye más de 20 géneros y más de 600 especies de árboles y matorrales de las regiones tropicales y subtropicales de Asia, África y América, tan solo entre 90 y 100 especies crecen entre el suroeste de los Estados Unidos y el norte de Brasil.<sup>5,8</sup>

##### 3.1.1 Usos del copal

Los inciensos son mezclas o a veces ingredientes puros que al quemarse desprenden un olor fragante y que desde hace miles de años se utilizan en muchas partes del mundo con fines rituales y religiosos, en el México antiguo no solo tenía una relevancia religiosa-ceremonial sino también social y económica.

2,3,7



---

---

El copal era un material muypreciado por sus numerosos usos por ejemplo, la especie *Protium Burm. f.* es particularmente importante por las oleorresinas que segrega las cuales se han empleado como barnices, para impermeabilizar o calafatear botes, tintes, como combustible para iluminar casas y repeler insectos.

Se llegaba a utilizar como pegamento para las incrustaciones en las máscaras y unir los mosaicos de piedra, concha y otros materiales. Mezclado con pigmentos se usaba para elaborar pinturas, en el ámbito religioso para limpiar los templos durante los funerales y en las ceremonias para pedir por las cosechas así como ofrenda para los dioses.<sup>3</sup>

Existen reportes desde el periodo colonial sobre el empleo de las resinas como inciensos para sus rituales religiosos y para uso medicinal. En la medicina tradicional han sido ampliamente usadas para curar heridas, tratar huesos rotos, dolores reumáticos, dolor de muelas, dolor de cabeza, úlceras, como emoliente, rubefaciente, antiséptico, tónico y estimulante; el humo es inhalado como analgésico; la raíz de la corteza es astringente y se dice que favorece la función renal y también presenta propiedades antisifilíticas.<sup>6</sup>

Pruebas farmacológicas y químicas llevadas a cabo en los extractos de las especies de *Protium Burm. f.* han demostrado sus propiedades acaricidas, cercaricidas, anticancerígenas, antimaláricas, antiinflamatorias, hepatoprotectoras, gastroprotectoras, analgésicas y sedativas que resaltan su potencial para ser utilizados en múltiples aplicaciones como productos dérmicos (vendas, cosméticos) o materiales odontológicos; en afecciones de la piel; en el desarrollo de material general de empaque en la industria farmacéutica y de alimentos, para mejorar la vida útil de los productos, tomando en cuenta sus propiedades de disminuir la permeabilidad al agua y de protegerlos contra procesos oxidativos.<sup>9</sup>

Las resinas de burseráceas son utilizadas para la elaboración de aceites esenciales y como inciensos, muy requeridos en aromaterapia y para rituales esotéricos en general. <sup>9</sup>



---

---

### 3.1.2 Extracción de la resina

Para extraer la resina se aprovechan los árboles maduros que serán los que tengan un grosor de tronco entre 10 y 30 cm. de circunferencia (medido a 1.3 cm. por encima del suelo).

El método de extracción consiste en hacer una serie de cortes o incisiones en la corteza del tronco y en las ramas gruesas. Los cortes se hacen en forma de “v” y de forma precisa para evitar dañar al árbol, para lograr esto se utiliza un machete filoso o una herramienta llamada “quixala” o “quichala” posteriormente se amarra un recipiente o bien una penca de maguey debajo de la incisión para que reciba la resina que saldrá de los cortes. (Figura 1) <sup>2,6</sup>

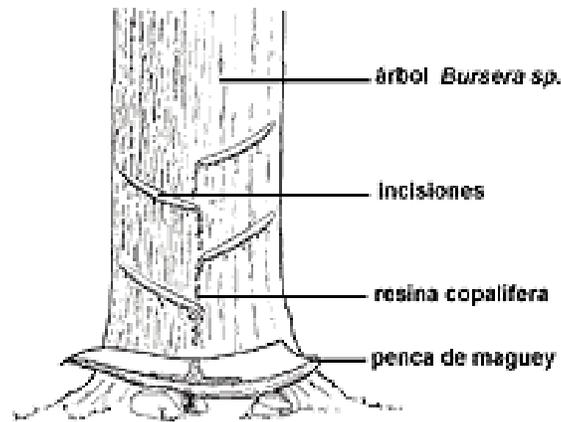


Figura 1. Extracción de Copal.

La extracción de la resina se lleva a cabo solamente en temporadas de lluvia y para que los arboles continúen manando se hacen cortes en cada lugar de extracción cada tercer día con una separación de más o menos 0.5 cm.

### 3.1.3 Tipos de copales

En México existe una gran variedad de copales con distintos aromas y diferentes colores, dependiendo de la especie que lo produce y de la forma en que se extrae. <sup>3,6,7</sup>



- 
- 
- Copal blanco o santo: Son barras completas, grandes y de preferencia con zapatito que es una represa pequeña que se coloca en la base de la penca para prevenir que la resina se desborde. Este tipo de copal contienen poca basura y en ocasiones puede llegar a ser un poco verdoso. Se obtiene por la ruptura de las ramas.
  - Copal lágrima: Es la gota de resina que solidifica antes de chorrear totalmente, y va aumentando su tamaño por el escurrimiento.
  - Copal amarillo o copal oro: es de color amarillo o ambarino y se forma en estalactitas, las cuales son recolectadas con la ayuda de un machete, también se obtiene del exudado después de remover la corteza del árbol. Este copal tiene un olor característico que no se percibe durante su recolección.
  - Copal negro o goma: se produce cuando la resina brota por la picadura o raspadura de algún insecto. Es la resina que se acumula formando pequeñas bolas en el tronco; se recolecta directamente de los árboles.
  - Mirra: se compone de secciones de la corteza embebidas de la resina. Se recolectan al final de la temporada.
  - Copal de piedra o tecopal: es recolectado por un grupo de insectos (avispa) y es cimentado con los granos de arenita con que edifican sus nidos.
  - Ámbar: El copal se convierte en ámbar cuando pierde sus aceites esenciales y se endurece por la polimerización y la oxidación.

### **3.2 Composición química del copal**

Los aceites esenciales de burseráceas son fuente de numerosos compuestos químicos volátiles, entre los que destacan terpenos y terpenoides.<sup>7</sup>

El copal consiste en una mezcla compleja de componentes orgánicos insolubles en agua, principalmente terpenos. También se conoce como una mezcla oleo-gomo-resina donde la fracción oleosa se compone de mono- y sesquiterpenoides, la fracción goma está compuesta por polisacáridos y la fracción de resina por triterpenoides; en general en la parte terpenica del copal predominan los



---

---

esqueletos de labdano (Figura 2) con fracciones menores de mono y sesquiterpenos.<sup>6,10</sup>

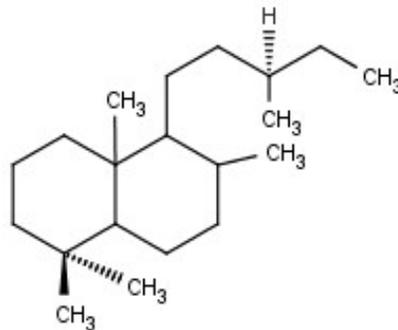


Figura 2. Esqueleto de labdano.

### 3.2.1 Terpenos y terpenoides

Los terpenos son metabolitos secundarios muchos de ellos conocidos por realizar funciones biológicas específicas en plantas y animales. Este grupo de compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza desde las hojas, flores, semillas y tallos de las plantas hasta organismos como algas, líquenes, insectos y mamíferos.<sup>10,11</sup>

El término es comúnmente utilizado para los hidrocarburos formados a partir de unidades isoprenicas, cuando se trata de compuestos oxigenados como alcoholes, aldehídos, cetonas, etc., es más frecuente que se le denomine terpenoides.<sup>11</sup>

Las moléculas de isopreno se unen de acuerdo a la “regla biogenética del isopreno” mediante uniones cabeza-cola, esta regla es válida en la mayoría de los casos.<sup>11</sup>

Los terpenos se dividen de acuerdo al número de unidades de isopreno que lo conforman: <sup>11,12</sup>

- Hemiterpenos (5 carbonos una unidad de isopreno)
- Monoterpenos (10 carbonos dos unidades de isopreno)
- Sesquiterpenos (15 carbonos)



- 
- 
- Diterpenos (20 carbonos)
  - Sesterpenos (25 carbonos)
  - Triterpenos (30 carbonos)

### **3.2.1.1 Monoterpenos**

El punto de ebullición de la mayoría de los monoterpenos es de aproximadamente 140 a 180°C por lo que pueden considerarse como compuestos de alta volatilidad permitiendo que dejen rápidamente la muestra sólida.<sup>11,13</sup>

Los monoterpenos pueden dividirse en tres grupos: acíclicos, monocíclicos y bicíclicos, pueden ser hidrocarburos saturados o no saturados. Pueden presentar grupos funcionales, los más comunes son hidroxilos, cetonas y aldehídos.<sup>11</sup>

### **3.2.1.2 Sesquiterpenos**

El punto de ebullición de los sesquiterpenos está por arriba de los 200°C formando la fracción de punto de ebullición más alto de los aceites esenciales.

Los compuestos pueden presentar hidrocarburos insaturados con estructuras tan diversas como son: acíclicos, monocíclicos, bicíclicos y tricíclicos. Al igual que los monoterpenos sus estructuras químicas llegan a contener algunos grupos funcionales.

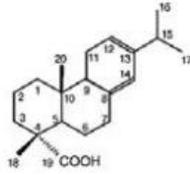
### **3.2.1.3 Diterpenos**

Los diterpenos son compuestos de baja volatilidad, por lo que necesitan altas temperaturas y tiempos largos de extracción.

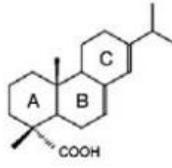
La mayoría de los diterpenos tiene una estructura tricíclica; se clasifican principalmente en tres grupos: abietanos (tres anillos), pimaranos (tres anillos) y labdanos (dos anillos) (Figura 3). Existen los derivados del tunbergeno los cuales contienen un solo anillo estructural.<sup>14,15</sup>



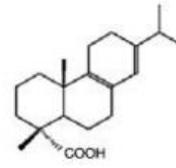
### Abietanos



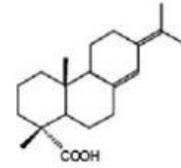
ácido levopimárico



ácido abiético

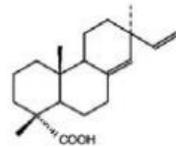


ácido palústrico

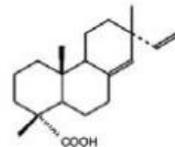


ácido neoabiético

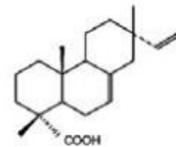
### Pimaranos



ácido pimárico

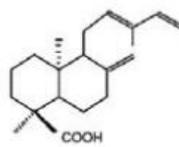


ácido sandaracopimárico

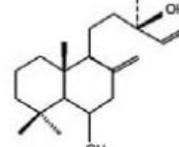


ácido isopimárico

### Labdanos



ácido comúnico



larixol

Figura 3. Ejemplos de diterpenos.

#### 3.2.1.4 Triterpenos

Químicamente son sustancias sintetizadas por ciertas plantas a partir del Escualeno analito que presenta un esqueleto hidrocarbonado de 30 átomos de carbono, normalmente de tipo tetracíclico o pentacíclico.

Los compuestos tetracíclicos se basan ya sea en el esqueleto dammarano o el esqueleto eufano, y en el caso de los triterpenoides tienen un grupo cetónico o hidroxilo en la posición 3, con posibles grupos funcionales adicionales y / o dobles enlaces en la cadena lateral. Los compuestos eufano también tienen un doble enlace adicional en el anillo en la posición 7 u 8. Los principales compuestos pentacíclicos tienen los esqueletos de ursano o de oleanano que se diferencian



sólo en la posición de un grupo metilo, y también hay compuestos menos comunes con esqueletos lupano y hopano.<sup>14,15</sup>

Las principales estructuras descritas se presentan en la Figura 4.

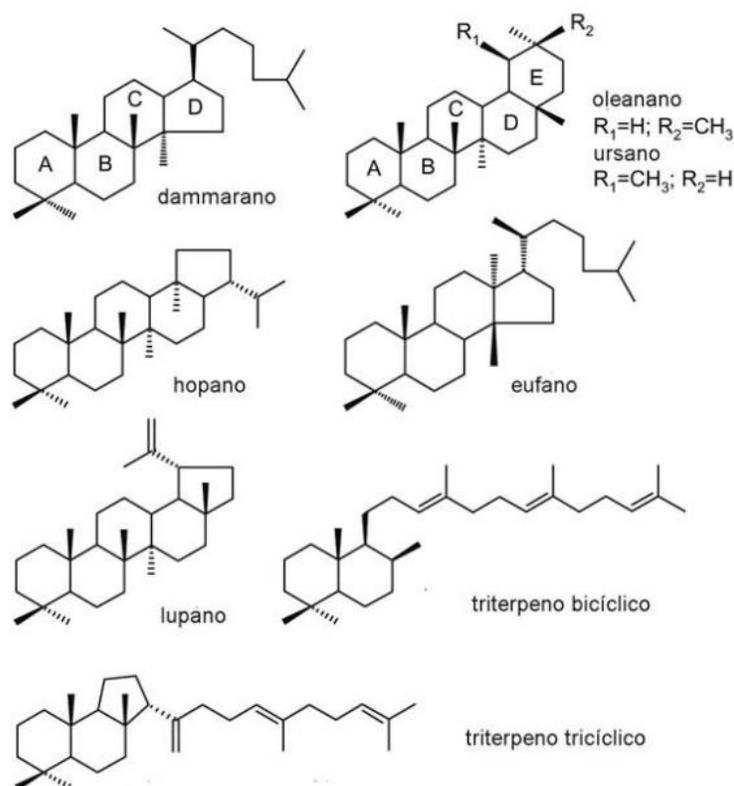


Figura 4. Estructuras principales de los triterpenos.

### 3.3 Estudios previos en muestras arqueológicas

El estudio de copal arqueológico es un campo ampliamente desarrollado y la técnica más utilizada para estos análisis ha sido la Cromatografía de Gases/ Espectrometría de Masas, tal es el caso del análisis de muestras encontradas en las excavaciones en el templo mayor en el año 2009 donde se compararon los resultados de esta muestra con resinas de diferentes arboles de la especie



---

---

*brusera*. El proyecto se llevó a cabo con la finalidad de realizar los trabajos de restauración.<sup>5</sup>

Otros estudios de copal son, en resinas provenientes de dos objetos arqueológicos del sitio del "Templo Mayor". Una del material adhesivo de la base de un cuchillo ceremonial y otra del cuerpo de un figurín ambas muestras se compararon con resinas frescas (muestras comerciales y muestras de origen botánico certificado de siete especies: *B. bipinnata*, *B. excelsa*, *B. laxiflora*, *B. stenophylla*, *B. grandifloia*, *B. penicillata* y *B. copallifera*). También se ha llevado a cabo el análisis comparativo entre muestras de mosaicos de origen azteca donde la resina fue utilizada como adhesivo, y las resinas *de referencia* provenientes de las especies *pinus*, *brusera* y *protium*.<sup>10,14</sup>

Como se puede observar el estudio del copal en muestras arqueológicas no es un tema innovador, y a razón de que en los dos últimos años se han encontrado cerámicos pertenecientes a civilizaciones antiguas ubicadas en las costas del norte de Veracruz; que por su calidad decorativa se asume que el uso que se les dio fue de carácter religioso, en este trabajo, mediante la técnica analítica MEFS-HS/CG-EM se pretende buscar la presencia de copal en estas piezas.

### **3.4 Análisis de la composición química del copal**

#### **3.4.1 Clasificación de Cromatografía <sup>1</sup>**

Las clasificaciones de la cromatografía de acuerdo al tipo de interacción de la fase móvil con la fase estacionaria son:

- a) Adsorción: Cuando la fase estacionaria es un adsorbente. Los adsorbentes más utilizados son sílice, alúmina, carbón.
- b) Intercambio iónico: La fase estacionaria es un sólido reticulado que posee iones en sus nodos, que se intercambian con los componentes de la mezcla con más o menos facilidad.



- 
- 
- c) Filtración sobre geles porosos: La fase estacionaria es un sólido reticulado con espacios de cierto tamaño que por medio de la permeación o exclusión de las moléculas, se lleva a cabo la separación.
- d) Reparto: La fase estacionaria es un líquido. Existen tres formas de desarrollar el proceso; elución, análisis frontal y desplazamiento.
- En la Cromatografía de Gases se utiliza este tipo de interacción.

### **3.4.2 Cromatografía de Gases**

El cromatógrafo de gases fue introducido por James y Martin en 1952. El principio básico de operación de este instrumento involucra la volatilización de la muestra en un inyector, la separación de sus componentes en una columna cromatográfica y su determinación por medio de un detector.

Los cromatógrafos de gases contienen esencialmente:<sup>1</sup>

- 1) Una fuente de gas comprimido. Nos proporciona la fase móvil (gas portador)
- 2) Un regulador de presión o flujo del gas portador
- 3) Inyector. Dispositivo que permite la introducción de la muestra.
- 4) Columna cromatográfica. Es un tubo de vidrio o metal de longitud que oscila entre 1 y 200 m, su diámetro interior puede ser de 0.1 a 50 mm y recubriendo las paredes se encuentra la fase estacionaria que puede ser de 0.1 a 5  $\mu\text{m}$  de espesor de película y de diferentes polaridades.
- 5) Horno. Es el lugar donde se sitúa la columna y donde la temperatura es regulada.
- 6) El detector. Es un dispositivo que permite medir de una manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de concentraciones pequeñas de la sustancia a analizar.
- 7) Registro de la señal. Sistema electrónico de ampliación y medida de la señal eléctrica por el detector, da por resultado una representación gráfica.

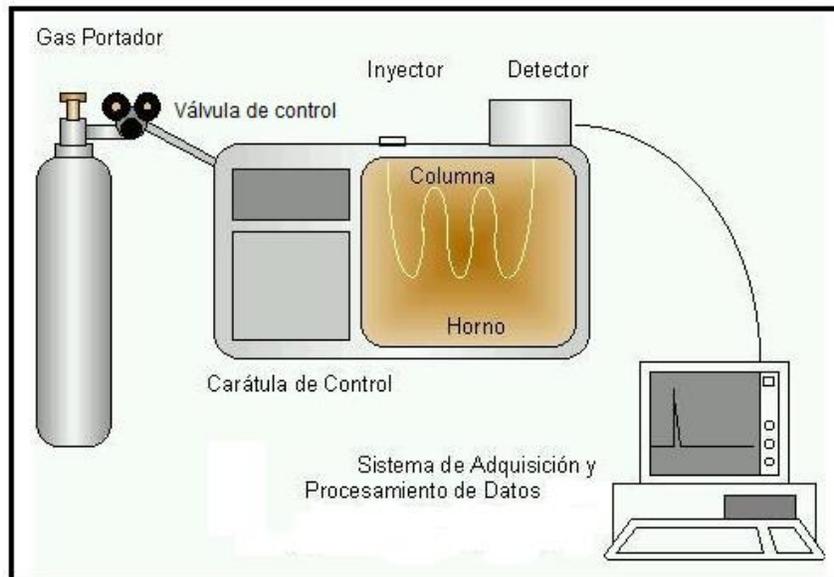


Figura 5. Esquema de un equipo de Cromatografía de Gases.

Al igual que los otros tipos de cromatografía la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, siendo su única función la de transportarlo a través de la columna.

En esta técnica analítica se produce la elución de los analitos por el flujo de un gas acarreador, como hidrógeno o helio, (fase móvil) a través de la fase estacionaria contenida en la columna. La separación de los compuestos presentes en la muestra es determinada por la distribución de cada componente entre ambas fases. Los tiempos de retención de los analitos están en función de los equilibrios de distribución que presentan en las dos fases, estacionaria y móvil; y que son característicos de cada compuesto. A pesar de ello, el tiempo de retención no es una prueba irrefutable para la identificación de un compuesto, ya que el tiempo es característico pero no exclusivo para un compuesto, por lo que es necesario utilizar su estándar para su identificación total. En la actualidad existe otra técnica analítica muy poderosa acoplada a Cromatografía de Gases, la Espectrometría de Masas (CG-EM), con ella se confirma la identidad del pico cromatográfico eluido por comparación entre su espectro de masas y el de la base de datos de la biblioteca integrada en el "software".<sup>11</sup>



---

---

La Cromatografía de Gases tiene dos importantes campos de aplicación: el primero su capacidad para separar mezclas orgánicas complejas, y el segundo como método de determinación cualitativo y cuantitativo de los componentes de la muestra. <sup>15,16</sup>

### **3.4.2.1 Introducción de la muestra**

Existen muchos tipos de sistemas de introducción de la muestra o inyectores, como son los "on-column", "Split-Splitless", válvulas de muestreo de gas y desorción térmica. Para fines de este proyecto se explicaran los inyectores tipo "Split-Splitless".

Inyector "Split": En este modo de inyección una porción de la muestra y del disolvente son introducidos directamente a la columna cromatografica; el resto de la muestra es desechada. Se utiliza cuando la concentración de un analito en una muestra es elevada o bien cuando se tiene una muestra de concentración desconocida.

Inyector "Splitless": En este tipo de inyección el flujo no es dividido por lo que toda la muestra es introducida a la columna. Después de un tiempo específico llamado el tiempo de activación de purga, el divisor de flujo se abre para purgar disolvente proveniente del inyector y algunos componentes de bajo punto de ebullición que no son adsorbidos por la columna. El modo "Splitless" es usado para análisis de trazas y no es recomendado para muestras cuyos compuestos tengan un amplio intervalo de puntos de ebullición. <sup>16</sup>

### **3.4.3 Detectores en Cromatografía de Gases**

#### **3.4.3.1 Características generales de un detector**

El detector debe ser un transductor de concentración en fase vapor. Debe poseer alta sensibilidad y bajo nivel de ruido, la respuesta del detector debe ser rápida y con un amplio margen de linealidad.



---

---

### 3.4.3.2 Tipos de detectores: <sup>1</sup>

- a) Integrales: Ofrecen una señal proporcional a la cantidad total de sustancia detectada en función del tiempo. La señal se mantiene en el valor total y cuando aparece la segunda respuesta se suma a la anterior; en este tipo de detectores se obtiene un registro en el cual a cada sustancia le corresponde un peldaño.
- b) Diferenciales: Presentan la información en forma de una curva gaussiana.
- c) Universales: Se consideran detectores universales a aquellos capaces de detectar cualquier sustancia.
- d) Específicos: Dan una respuesta aceptable para un grupo de sustancias con propiedades química similares. Estos detectores pueden darnos información cualitativa sobre la naturaleza de la sustancia.
- e) Destructivos: esta clasificación se utiliza cuando la muestra queda alterada y no puede volver a ser utilizada.
- f) No destructivos: Son capaces de detectar el compuesto sin modificarlo químicamente.

El espectrómetro de masas es considerado un detector específico, cuando la salida de la columna de un cromatógrafo de gases es conectada al espectrómetro da como resultado una técnica de alta resolución y sensibilidad que nos brinda el panorama general de la composición molecular de la muestra.

### 3.4.4 Espectrómetro de Masas <sup>15,17</sup>

Un espectrómetro de masas es un instrumento que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de iones en fase gaseosa y provee una medida de la abundancia de cada una de las especies iónicas. Todos los espectrómetros de masas se basan en la interacción de campos magnéticos o eléctricos sobre partículas cargadas logrando la separación de los iones.

Permite analizar con gran precisión la composición de diferentes sustancias químicas e isótopos atómicos a su vez se pueden estudiar compuestos de



---

---

naturaleza diversa: orgánica, inorgánica o biológica, y obtener información cualitativa (masa molecular del compuesto analizado así como información estructural del mismo) y cuantitativa.

El espectrómetro de masas consta de cinco regiones:

- 1) El sistema de introducción de la muestra
- 2) La fuente de iones
- 3) El sistema de aceleración y extracción de iones
- 4) El analizador de masas
- 5) El sistema de colección, amplificación y registro de los iones

### **3.5 Microextracción en fase sólida (MEFS)- Headspace (HS)**

La microextracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra desarrollada alrededor de 1990 por J. Pawliszyn y colaboradores; la técnica consiste en una fibra de sílice fundida recubierta por una fase estacionaria (existen comercialmente de diferentes polaridades) que se utiliza en el análisis de rutina de una gran diversidad de muestras en conjunto con equipos de Cromatografía de Gases o de Líquidos.<sup>11</sup>

“Headspace” es una técnica analítica usada para la concentración de compuestos orgánicos volátiles y su posterior análisis por Cromatografía de Gases. Esta técnica es relativamente simple, moderna, rápida y puede proporcionar una sensibilidad específica para el analito a extraer; a su vez, reduce el costo y el tiempo de extracción y preparación de la muestra.<sup>1,18</sup>

#### **3.5.1 Principio de la microextracción en fase sólida**

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 comienza en el momento en el 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. No es una técnica de extracción



---

---

exhaustiva por lo que el equilibrio completo no es necesario para el análisis cuantitativo.<sup>11</sup>

### **3.5.2 Procedimiento de extracción**

Los parámetros a considerar durante la extracción por MEFS son los siguientes:<sup>20</sup>

- 1) Tiempo de extracción: Es importante establecer un equilibrio entre la muestra y la fase estacionaria de la fibra. Las extracciones usualmente toman de 15 a 20 minutos pero pueden ser muy cortas durando hasta 30 segundos. El tiempo de extracción depende de la naturaleza química de los compuestos a extraer, del recubrimiento de la fibra, del tipo de extracción y de la concentración de la muestra.
- 2) Temperatura: Se puede utilizar una temperatura constante para realizar todas las extracciones si se quiere obtener una buena precisión. Usar calor durante las extracciones por "headspace" ayuda a que los analitos se liberen de la muestra, aumenta la sensibilidad y se tienen tiempos de extracción cortos; este modo de extracción no requiere temperaturas altas. Al utilizar temperaturas muy altas en MEFS se puede inducir a que los analitos se liberen de la fibra reduciendo considerablemente la sensibilidad de la técnica. Esto sucede particularmente cuando se utilizan fibras de fase líquida como la PDMS (polidimetilsiloxano).
- 3) Agitación: La agitación de las muestras es importante ya que reduce el tiempo de equilibrio y aumenta la precisión. También se puede obtener buenos resultados si se mantiene una agitación constante entre cada extracción. Los métodos utilizados son: agitador mecánico, ultrasonido y por vibración.
- 4) Ajuste de pH o adición de sal: Se utiliza para aumentar la eficiencia de la extracción dado que se cambia la solubilidad de los analitos en la muestra.



---

---

Se puede agregar una solución reguladora de pH a la muestra para disminuir la solubilidad, aumentar la volatilidad de ácidos y bases así como mantener un pH fijo durante la extracción.

La adición de 25 a 30% de cloruro de sodio incrementa la fuerza iónica reduciendo la solubilidad del analito; esta adición es de gran ayuda con muestras que contienen analitos en muestras acuosas.

### **3.5.3 Análisis de muestras por MEFS-HS**

En este tipo de extracción la sensibilidad de la técnica es mejor cuando el volumen del “headspace” es pequeño, entre el 30 y 50%, ya que la fibra extrae más muestra, la extracción es más rápida y se tiene una mejor eficiencia. En caso de tener una muestra concentrada se puede diluir la muestra o utilizar volúmenes grandes del “headspace”.<sup>20</sup>

Una muestra para ser analizada por “headspace” se coloca en un vial perfectamente sellado, con disolvente de dilución, en ocasiones con un modificador de la matriz (por ejemplo, para regular el pH o la fuerza iónica) (Figura 6). Los componentes volátiles de las mezclas de muestras complejas son extraídos y aislados en la porción del espacio de vapor, los componentes adsorbidos por la fibra del sistema MEFS se introducen a un sistema de GC para la separación de todos los componentes volátiles (Figura 7).<sup>18</sup>

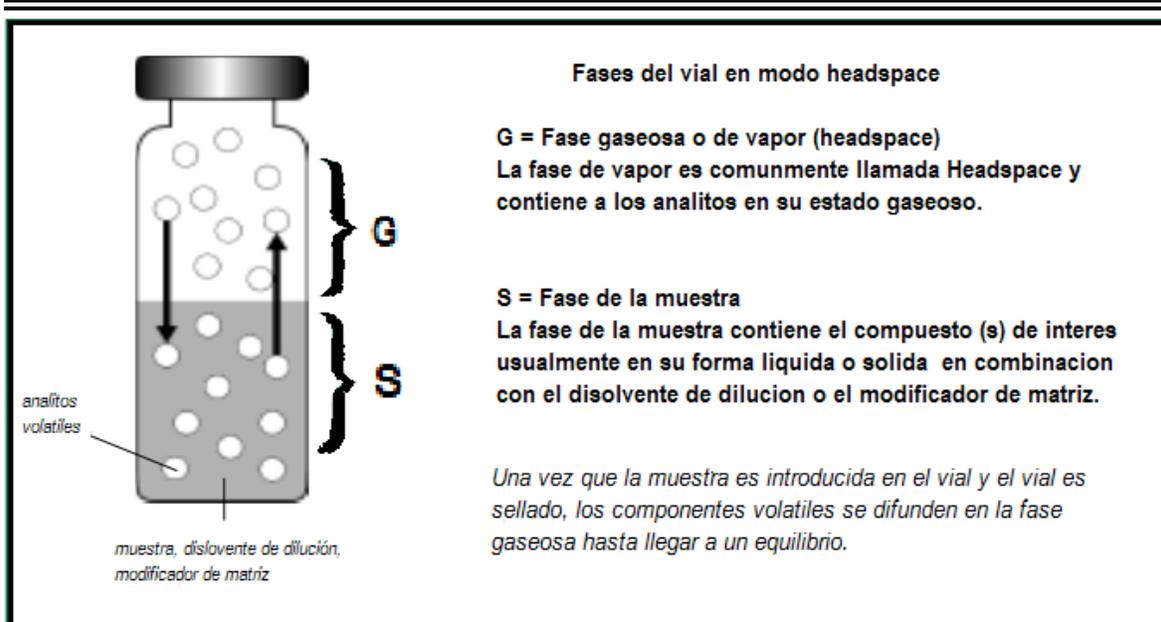


Figura 6. Fases del vial en modo “Headspace”.



Figura 7. Sistema de análisis de una muestra por Microextracción en Fase Sólida-“Headspace” (MEFS-HS).

### 3.5.4 Fibras para microextracción en fase sólida

Entre las diferentes polaridades de las fibras que se encuentran comercialmente están: Polidimetilsiloxano (PDMS) con diferentes espesores (7, 30 y 100  $\mu\text{m}$ ), Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS/DVB) con espesor de 65  $\mu\text{m}$  para CG, Poliacrilato (PA) de 85  $\mu\text{m}$ , Polietilenglicol (Carbowax)-Divinilbenceno (CW/DVB)



---

---

espesores de 65 y 70  $\mu\text{m}$ , Carboxen (Carbón activado)-Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS) espesores 75 y 85  $\mu\text{m}$ , Carbowax-Resina templada (CW/TPR) de 50  $\mu\text{m}$ , y Divinilbenceno- Carboxen- Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) de 30 y 50  $\mu\text{m}$ .<sup>11</sup>

Las pequeñas diferencias en la polaridad de la fase estacionaria usada en Cromatografía de gases no produce una apreciable selectividad de los analitos, en cambio, la MEFS proporciona un material adsorbente con una gran variedad en polaridades que incrementa el área superficial y la extracción de moléculas polares pequeñas.<sup>21</sup>

El espesor del revestimiento de la fibra influye en la extracción, por ejemplo, con un recubrimiento grueso se pueden extraer compuestos volátiles y transferirlos al inyector del cromatógrafo de gases sin pérdida de los analitos, en cambio un recubrimiento delgado se utiliza para asegurar la liberación y difusión rápida durante la desorción térmica. Con espesores gruesos se eliminan eficazmente compuestos de alto punto de ebullición pero se prolongará el tiempo de desorción y los analitos podrían retenerse y acumularse con los de la siguiente extracción.<sup>21</sup>

### **3.5.5 Ventajas y desventajas de las técnicas de extracción** <sup>11,13,22,23</sup>

Al utilizar estas técnicas se presentan una gran cantidad de ventajas:

- Se trata de un método no destructivo y no invasivo
- Se concentran los compuestos volátiles lo que permite su detección incluso a nivel de trazas
- La técnica no requiere grandes cantidades de muestra.
- La extracción se puede realizar sobre muestras líquidas, sólidas o gaseosas
- Se puede aplicar a diversas matrices
- Puede utilizarse como una técnica libre de disolventes
- El límite de detección es del orden de ng/mL



---

---

Algunas desventajas en esta técnica son las siguientes:

- Los límites de detección difieren entre cada compuesto, también dependen de las constantes de distribución y la polaridad de los analitos.
- El uso de la fibra a altas temperaturas de extracción y de desorción puede provocar que el recubrimiento se dañe reduciendo su capacidad de extracción.
- Puede tener baja reproducibilidad si existe variabilidad entre los parámetros de extracción.
- La técnica es poco efectiva cuando se busca extraer moléculas de alto peso molecular.

### **3.6 Extracción sólido - líquido ("Soxhlet")<sup>23,24</sup>**

La extracción se define como la acción de separar un líquido de una fracción específica de una muestra, dejando el resto lo más integro posible. Se puede realizar con los tres estados de la materia: líquido-líquido; gas-líquido y sólido-líquido siendo esta última la más utilizada.

Para realizar un sinnúmero de extracciones de manera automática utilizando el mismo disolvente se creó un instrumento conocido como el extractor "Soxhlet"; este instrumento es una pieza de laboratorio inventada en 1879 por Franz von Soxhlet y se utiliza cuando el compuesto deseado tiene una limitada solubilidad en un disolvente y la impureza es insoluble en el mismo.

#### **3.6.1 Proceso de extracción**

Primeramente la muestra debe ser fragmentada, posteriormente se coloca en un cartucho, este consiste en un recipiente cilíndrico con base semiesférica. Los materiales más utilizados son el algodón prensado y la porcelana porosa. El cartucho se llena hasta la mitad o un poco más evitando comprimirla ya que de lo contrario la difusión podría verse impedida. Posteriormente se lleva a cabo la extracción, la cual se fundamenta en las siguientes etapas:



- 1) *Colocación del disolvente en un matraz.* La cantidad de disolvente debe ser la necesaria para que el balón no quede seco ya que la muestra se puede quemar.
- 2) *Ebullición del disolvente que se evapora hasta un condensador a reflujo.* Se realiza con la ayuda de parrillas de calentamiento y un sistema de condensación o refrigerante.
- 3) *El condensado cae sobre el cartucho con la muestra.* El disolvente cae poco a poco sobre la muestra lo que provoca que sea un proceso lento y la extracción se vea favorecida.
- 4) *Sifonada del disolvente.* Se produce cuando el nivel del disolvente cubre el cartucho hasta un punto en que se produce el reflujo, en esta sifonada se devuelve al matraz el disolvente con el material extraído.
- 5) Se vuelve a producir este proceso la cantidad de veces necesarias para que la muestra quede agotada. Lo extraído se va concentrando en el disolvente contenido en el matraz.

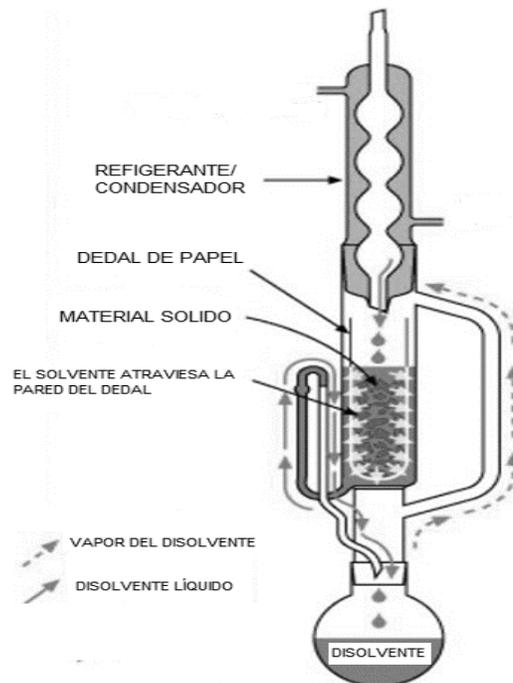


Figura 8 Esquema del equipo "Soxhlet" y el proceso de extracción.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

- Establecer una técnica de extracción y análisis de los compuestos presentes en la resina de copal utilizando Microextracción en Fase Sólida y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas para contribuir al estudio de resinas aromáticas y muestras arqueológicas.

### **4.2 Objetivos Particulares**

- Desarrollar y optimizar un procedimiento para la extracción, separación e identificación de terpenos en copal por Microextracción en Fase Sólida y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.
- Observar la influencia del lugar de origen y especie botánica sobre la composición de la resina.
- Identificar los terpenos presentes en las muestras de copal provenientes de la ciudad de México y del estado de Querétaro mediante la comparación de los espectros de masas experimentales con una base de datos.
- Implementar la metodología diseñada para poder identificar la presencia de copal en tres muestras arqueológicas, dos provenientes de una vasija y una de los residuos encontrados dentro de la misma, la identificación se realizará a través del análisis de los resultados obtenidos y las semejanzas con el copal utilizado como referencia.



---

---

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 Equipo y materiales

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard, modelo 5890 series II plus.
- Detector selectivo de masas Agilent 5973 Network
- Balanza analítica Ohaus, Analytical Plus, AP210, 0.00001g, (Estados Unidos).
- Jeringa Halmiton de 10  $\mu$ L, (Estados Unidos).
- Parrilla con agitador magnético super-nuova, Barnstead Thermolyne, SP-133835, (Estados Unidos).
- Viales de reacción de 1 y 5 mL, Supelco, (Estados Unidos).
- Agitador magnético para vial de reacción, Spinvane, Aldrich (Estados Unidos).
- Fibra para MEFS: Polidimetilsiloxano-Divinilbenceno (PDMS/DVB 65  $\mu$ m) Supelco, (Estados Unidos).
- Soporte de la fibra para inyección manual, Supelco, (Estados Unidos).

### 5.2 Disolventes

- Metanol grado HPLC (99.93%). Aldrich (Estados Unidos).
- Cloroformo grado HPLC. Baxter (Estados Unidos).

### 5.3 Resina estándar

La resina que se utilizó como referencia fue un copal comercial; se obtuvo en dos modalidades de presentación: copal blanco y copal de lagrima.

Cabe mencionar que la resina proviene de dos estados de la República Mexicana, siendo estos el estado de Querétaro (copal lágrima y copal blanco) y el Distrito Federal (2 muestras de copal lágrima).

### 5.4 Muestras arqueológicas

Las muestras arqueológicas provienen de la ofrenda hallada en una tumba en una ciudad antigua ubicada en la costa norte de Veracruz; consisten en un cerámico y



el contenido del mismo. Las muestras fueron proporcionadas por la Dra. Claude Stresser Péan.

Debido a la calidad en la decoración del cerámico se considera la posibilidad de un uso de carácter ritual o ceremonial, por ende el contenido de este cerámico podría tratarse de copal.

Las muestras fueron nombradas con las siguientes claves:

- **VHXXX I-10:** Contenido del cerámico
- **VH 31 D8 O-65:** Cerámico 1
- **VH 31 M3 O-60:** Cerámico 2

## 5.5 Preparación de la muestra

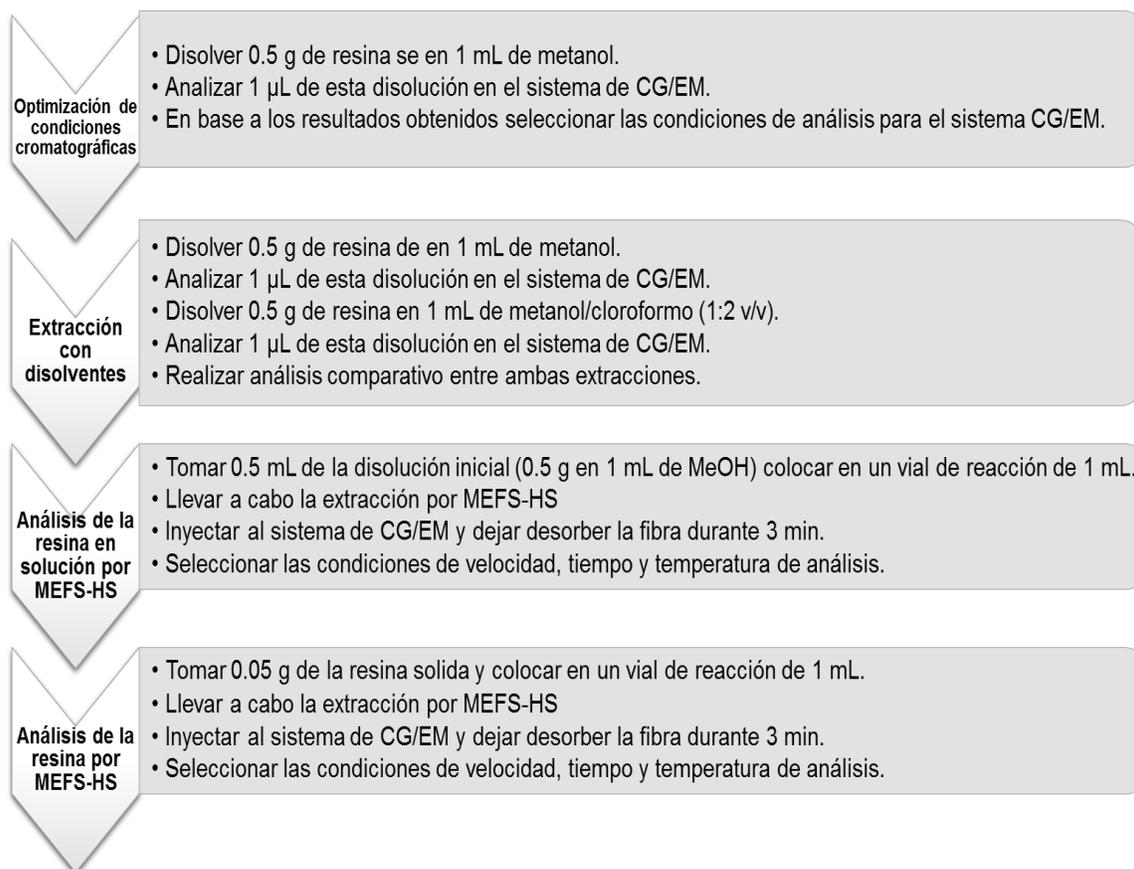


Figura 9. Diferentes técnicas de extracción Preparación de la resina de copal.

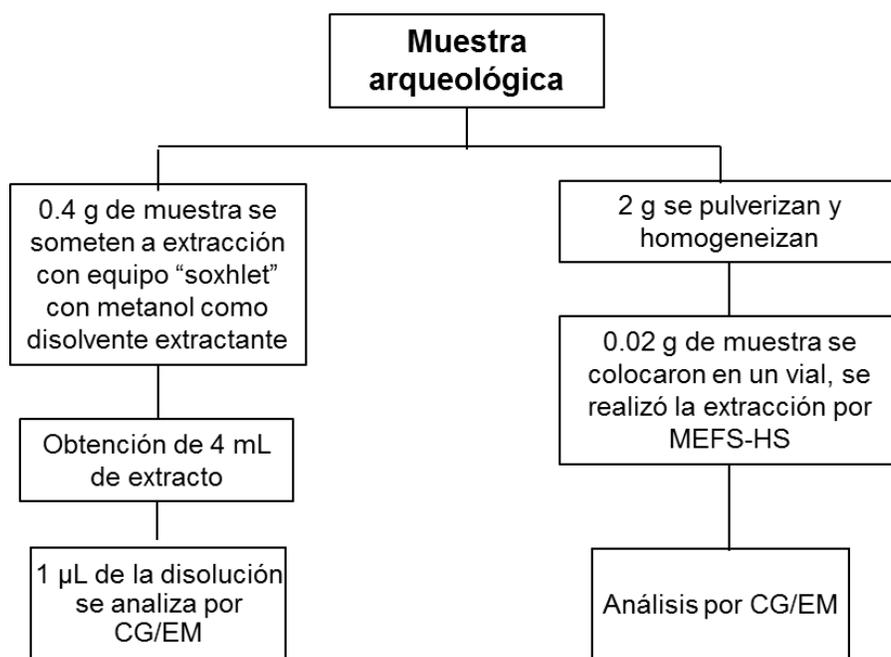


Figura 10. Diferentes técnicas de extracción de la muestra arqueológica.

### 5.6 Análisis por CG/EM

Se utilizó un Cromatógrafo de gases (HP 5890 series II plus) acoplado a un Detector selectivo de masas (Agilent 5973 Network) equipado con inyector Split/Splitless, una columna capilar (TR-5MS 20 m x 0.18 mm D.I. x 0.18 µm de espesor de película). Se utilizó Helio como gas acarreador, con flujo de 0.500 mL/min. La línea de transferencia entre el cromatógrafo y el espectrómetro de masas se mantuvo a 300°C.

Para la selección del programa de temperatura se consideró un programa inicial reportado en la literatura posteriormente se realizaron las modificaciones establecidas en la Tabla 1 para lograr una mejor separación de los analitos presentes en la muestra. Para realizar las pruebas cromatográficas se inyectó 1 µL de la resina en metanol en modo "Splitless" con un tiempo de activación de purga de 1 min.



**Tabla 1. Programas de temperatura para la separación de los compuestos presentes en la resina de copal por CG**

Prueba	Temp. Inicial (°C)	Tiempo 1 (min)	Velocidad 1 (°C/min)	Temp. Final 1 (°C)	Tiempo 2 (min)	Velocidad 2 (°C/min)	Temp. Final 2 (°C)	Tiempo final (min)
1	40	2	10	320	5	-	-	-
2	40	2	5	90	5	20	320	5
3	40	2	2	110	5	10	320	3
4	40	2	5	90	5	20	250	5
5	40	2	5	90	2	10	250	2
6	50	2	5	250	2	-	-	-
7	50	2	5	90	2	10	250	2

Todos los análisis se realizaron por triplicado. La temperatura del inyector se modificó de acuerdo al programa de temperatura utilizado en la columna.

Las condiciones para el espectrómetro de masas fueron:

Modo “scan”; intervalo de detección de 50 a 400 m/z; la temperatura del espectrómetro fue de 230°C; con un solvent delay de 3 min.

### **5.7 Extracción de los compuestos volátiles por MEFS**

En el análisis de los analitos volátiles de la resina sólida y la disolución de copal se llevó a cabo la extracción por MEFS en modo “headspace”.

El análisis de la muestra arqueológica se realizó de la misma forma que el utilizado con la resina de referencia.

La Microextracción en Fase Sólida (MEFS) requiere que algunos de sus parámetros sean optimizados, por ejemplo: temperatura, tiempo y velocidad de agitación en la extracción; y tiempo de desorción para la fibra (Tabla 2).



**Tabla 2. Parámetros experimentales para MEFS**

Parámetro	Variable
Temperatura de extracción (°C)	40
	60
	80
Tiempo de extracción (min)	15
	30
Velocidad de extracción (rpm)	500
Tiempo de desorción (min)	3

Se realizaron varios experimentos y de acuerdo a los resultados observados se determinó como óptimos para la velocidad de extracción 500 rpm debido a que si se aumentaba este valor la agitación comenzaba a ser inestable y la disolución salpicaba las paredes, caso contrario, si se disminuía la velocidad, la agitación no era la suficiente para mantener la disolución homogénea. Con respecto al tiempo de desorción de los analitos extraídos de la fibra 3 min fueron suficientes, más de este tiempo la fibra en el inyector podría sufrir daños incluso el desprendimiento del recubrimiento o de la fibra. Para verificar que no existieran analitos retenidos en la fibra después de cada experimento de extracción de las muestras se realizó una elución con la fibra bajo las mismas condiciones de análisis de CG/EM. Al no existir analitos retenidos, los parámetros se fijaron en estos valores.

### **5.8 Identificación de los compuestos presentes en la resina de copal.**

Para la identificación de los componentes extraídos de la resina se compararon los espectros de masas obtenidos con los establecidos en la base de datos de la biblioteca de espectros de masas del NIST (The NIST Mass Spectral Search Program for the NIST/EPA/NHI Mass Spectra Library versión 2.0) que se encuentran en el “software” del Detector selectivo de masas.



## 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 6.1 Selección del programa de temperatura para el sistema acoplado CG/EM

La selección del programa de temperatura para CG/EM se hizo con la resina de referencia.

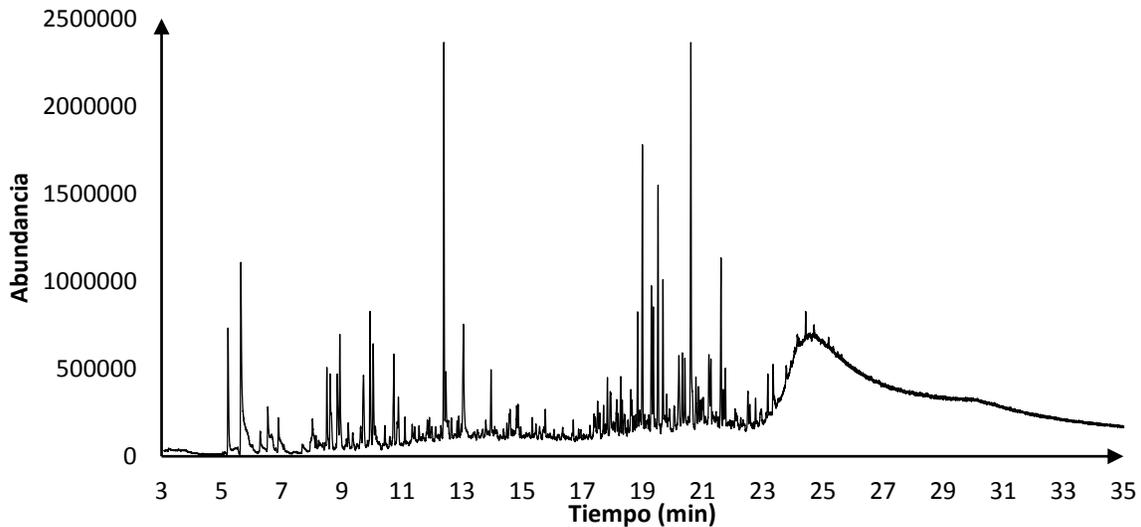


Figura 11. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 1.  
40°C/2' → 10°C/min → 320°C/5'

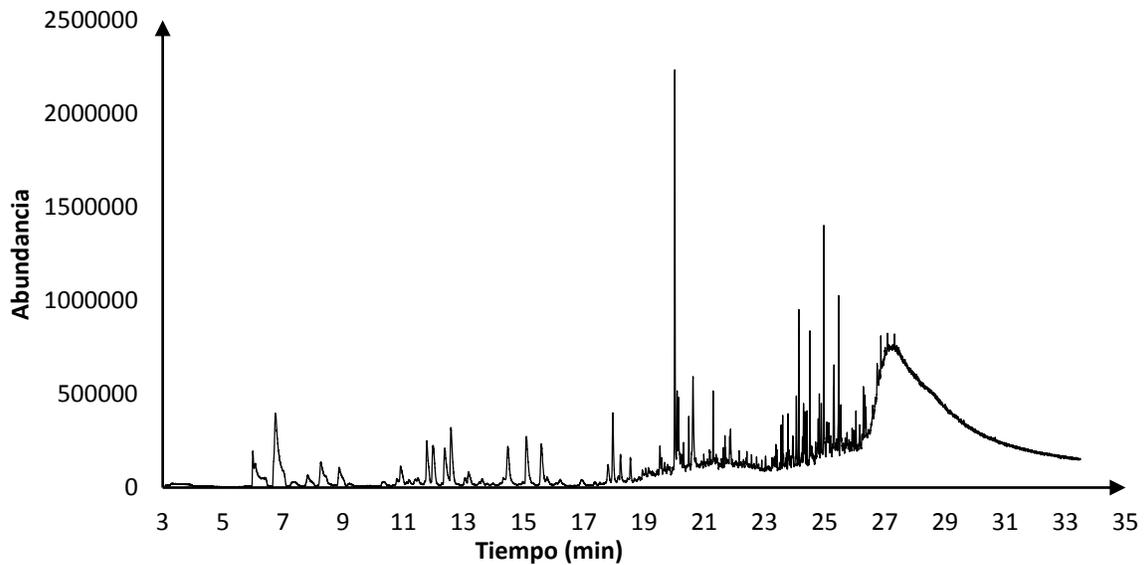


Figura 12. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 2.  
40°C/2' → 5°C/min → 90°C/5' → 20°C/min → 320°C/5'

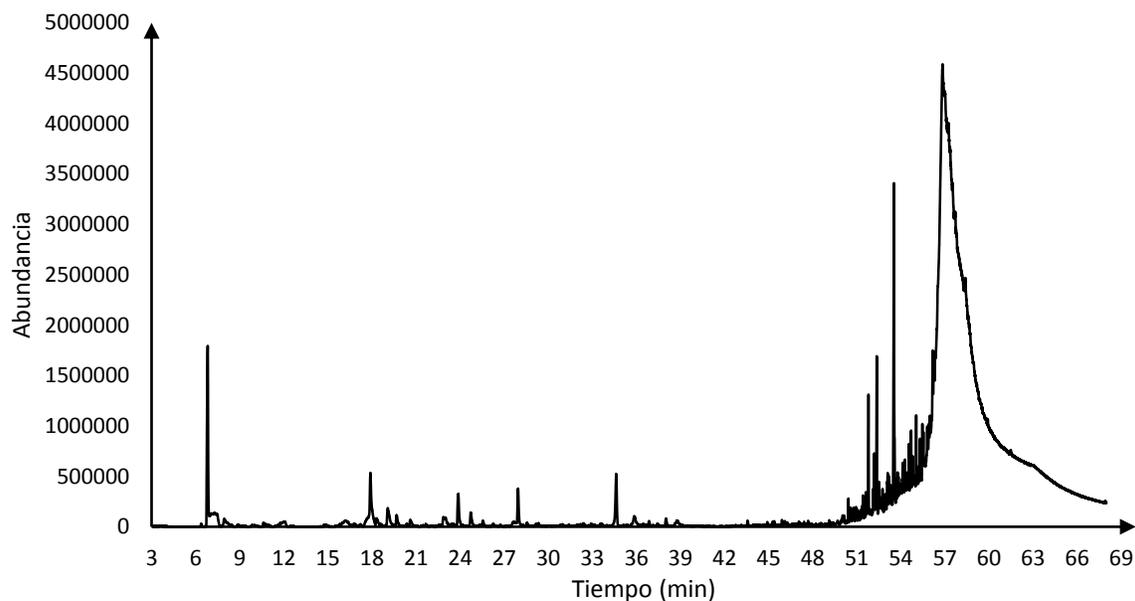


Figura 13. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 3.  $40^{\circ}\text{C}/2' \rightarrow 2^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 110^{\circ}\text{C}/5' \rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 320^{\circ}\text{C}/3'$

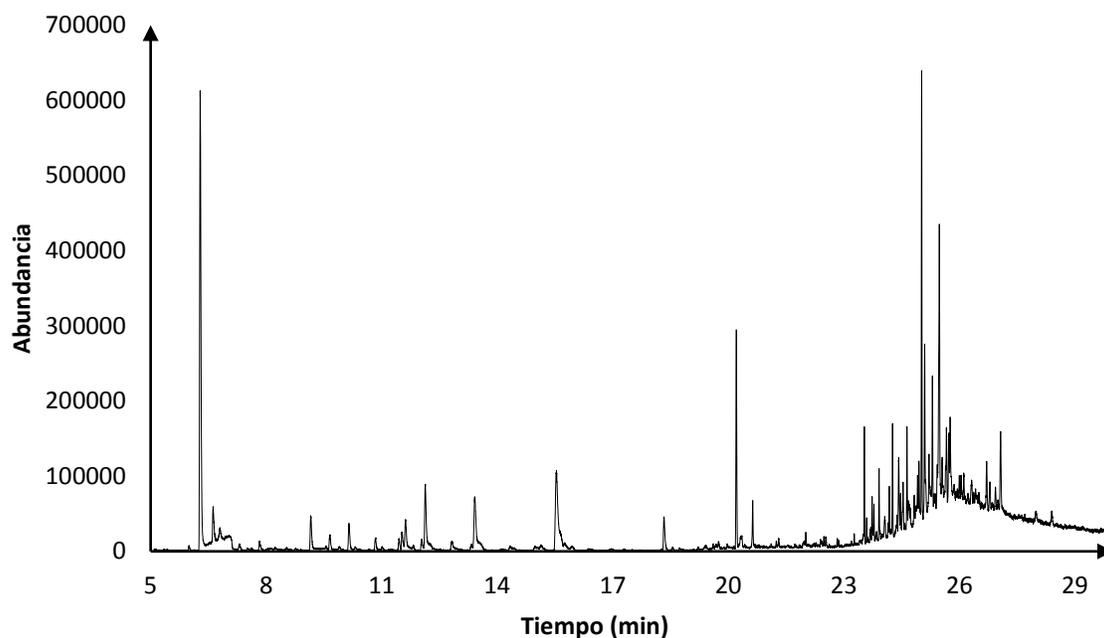


Figura 14. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 4.  $40^{\circ}\text{C}/2' \rightarrow 5^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 90^{\circ}\text{C}/5' \rightarrow 20^{\circ}\text{C}/\text{min} \rightarrow 250^{\circ}\text{C}/5'$

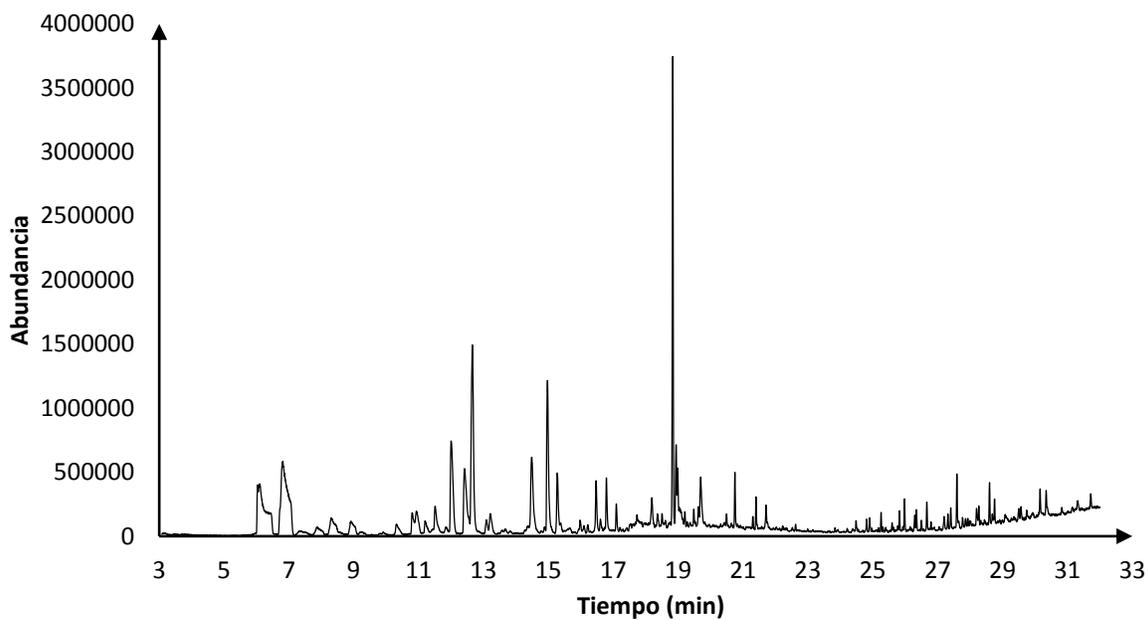


Figura 15. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 5.  
40°C/2' → 5°C/min → 90°C/2' → 10°C/min → 250°C/2'

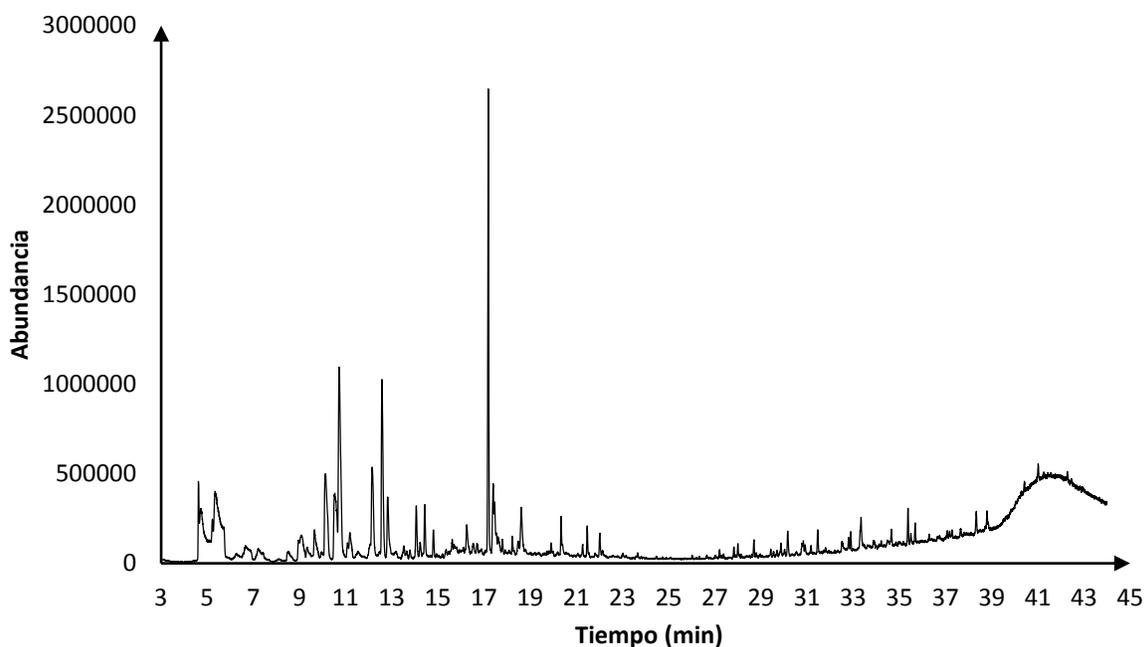


Figura 16. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 6.  
50°C/2' → 5°C/min → 250°C/2'

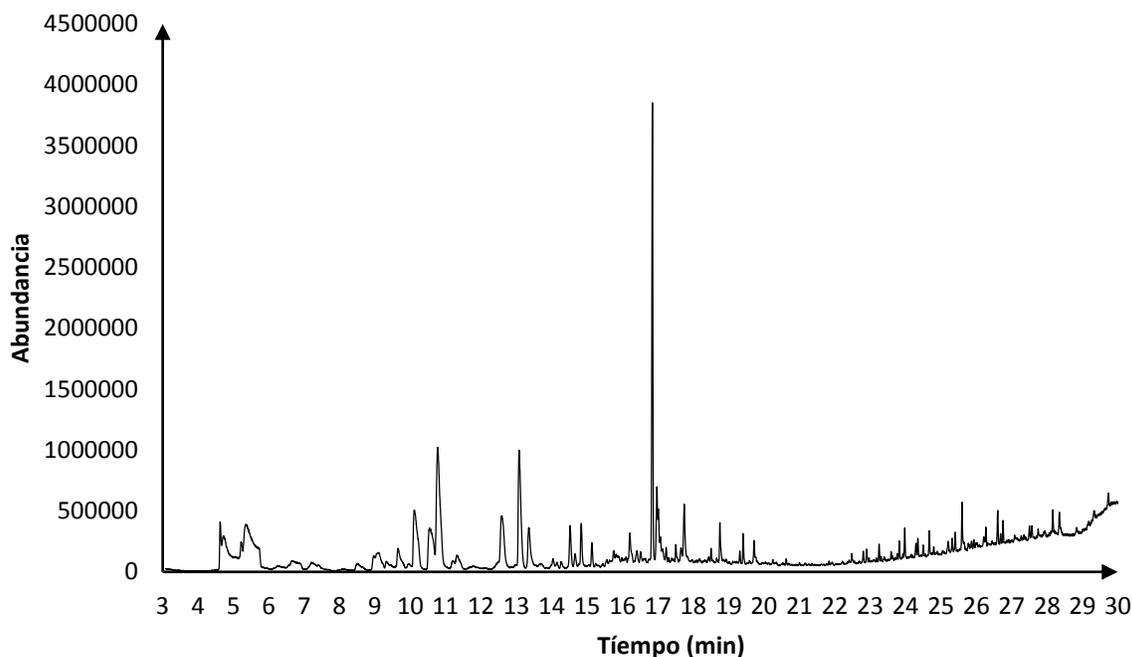


Figura 17. Cromatograma de copal bajo el programa de temperatura prueba 7.  $50^{\circ}\text{C}/2'$   $\rightarrow$   $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $\rightarrow$   $90^{\circ}\text{C}/2'$   $\rightarrow$   $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$   $\rightarrow$   $250^{\circ}\text{C}/2'$

**Tabla 3. Número de compuestos identificados y tiempo de análisis en las diferentes pruebas de temperatura por CG**

Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4	Prueba 5	Prueba 6	Prueba 7
17	17	11	19	21	22	16
35 min	34 min	66 min	30 min	32 min	44 min	30 min

La prueba 1 se realizó con el fin de tener un panorama general de la composición del copal y del tiempo de retención de los analitos; posteriormente se crearon otros dos programas de temperatura (pruebas 2 y 3) en los que se buscó optimizar la separación de los compuestos. La prueba 3 (Figura 13) fue favorable para la resolución de los picos cromatográficos sin embargo, el área de los picos disminuyó incluso se perdieron algunos de los compuestos obtenidos en las pruebas anteriores. El tiempo de análisis de esta prueba era mayor que el tiempo



---

---

empleado en los programas 1 y 2, por las razones anteriores el programa 3 fue descartado (Tabla 3).

Para los programas de temperatura de las pruebas 1 y 2 (Figuras 11 y 12) se observa un aumento considerable en la línea base debido a la velocidad con la que se aumentó la temperatura de la columna (20°C/min). En los cromatogramas de estas pruebas los compuestos presentes en el copal eluyen a tiempos de retención por debajo de los 23 min para la prueba 1 y 25 min para la prueba 2, a estos tiempos la columna presenta una temperatura de 250°C por lo que se utilizó en la prueba 4. En esta cuarta prueba (Figura 14) se observaron resultados favorables para el análisis y separación de los componentes de la resina, sin embargo, en este programa se buscó optimizar aún más, de ahí el hecho de que se realizaran otros tres programas.

En el programa 5 se redujo el tiempo isotérmico al llegar a 90°C y al llegar a 250° ya que se observó que durante este tiempo la determinación de compuestos no se veía afectado y tampoco la resolución de los picos cromatográficos.

El primer compuesto eluido e identificado como el 1R- $\alpha$ -Pino tiene un tiempo de retención de 6 min. que le corresponde una temperatura de 60°C en la prueba 5 (Figura 15), por ende las siguientes pruebas se iniciaron a 50°C.

La prueba 6 (Figura 16) se realizó con la finalidad de tener una sola rampa de temperatura pero la resolución de los picos no se vio favorecida como lo presentaban los resultados de las pruebas 5 (Figura 15) y 7 (Figura 17). En la Tabla 3 se puede observar que se logran identificar una mayor cantidad de compuestos en la prueba 5 pero para los fines de este trabajo se consideraran como compuestos de interés los que presenten mayor carácter terpénico; es decir todos aquellos con un tiempo de retención menor a 22 min ya que los compuestos con tiempos de retención mayores eran identificados con nombres químicos diferentes a la familia de los terpenos.



Con lo expuesto anteriormente y considerando el tiempo de análisis, se eligieron las siguientes condiciones experimentales como adecuadas para la separación de los analitos, el programa de temperatura en la columna (Figura 18), temperatura del inyector “Splitless” a 250°C y la línea de transferencia a 300°C.

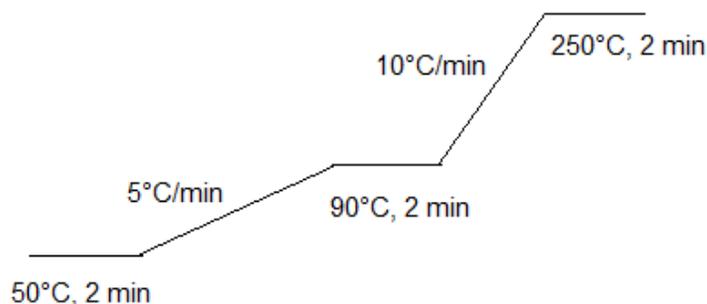


Figura 18. Programa de temperatura para el análisis de la resina de copal (Programa 7).

Los primeros 16 compuestos que se presentan en la Tabla 4 son los compuestos identificados bajo las condiciones de análisis seleccionadas (Figura 18), los 4 restantes pertenecen a los encontrados bajo los otros programas de temperatura que se consideraron para hacer el análisis cromatográfico (Tabla 1).

En la Tabla 4 también se observa que la resolución para algunos picos cromatográficos no se ve favorecida, siendo esta menor a 1, sin embargo, se puede apreciar donde inicia y donde termina el pico (véase Figura 17) lo que permite la identificación por medio de la comparación entre los espectros de masas obtenidos y los de la biblioteca NIST.

<b>Tabla 4. Compuestos identificados en el copal (programa 7)</b>			
<b># Pico</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Resolución <math>tr_n - tr_{n-1}</math></b>
1	4.698	1R- $\alpha$ -Pino	
2	5.402	2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-2-eno	0.704
3	6.690	E,E-2,6-dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	1.288



4	9.057	Trans-2-careen-4-ol	2.367
5	9.687	Cis-Verbenol	0.630
6	10.168	$\alpha$ - Camfolenal	0.481
7	10.596	Pinocarveol	0.428
8	12.637	Mirtenol	2.048
9	13.140	Verbenona	2.041
10	13.341	Cis-Carveol	0.503
11	15.148	1,5,5-trimetil-6-metilen ciclohexano	0.201
12	16.848	Jupieno	1.807
13	16.992	Trans-3(10)-careen-2-ol	1.700
14	19.420	Oxido cariofileno	0.144
15	19.733	Longiborneol	2.428
16	25.610	Ácido pimárico	0.313
17	26.878	Acetato de retinol	5.877
18	27.602	Androst-5,16-dieno-3 $\beta$ -ol	-
19	28.202	Heptatriacotanol	-
20	35.697	Metil dehidroabietato	-

## 6.2 Comparación y análisis de las resinas de referencia

A continuación se muestran la comparación de los cromatogramas de las diferentes resinas (blanco y de lágrima) provenientes de Querétaro y del Distrito Federal, estos resultados fueron obtenidos al realizar el análisis por CG/EM con las disoluciones en metanol y en metanol/cloroformo (Figuras 19 y 21).

El análisis de estas resinas se realizó aproximadamente seis meses después considerando la hipótesis de que el tiempo afecta la concentración de los analitos y la composición química de la resina para esto, se utilizaron las mismas disoluciones de los estudios anteriores. Los resultados se presentan en las Figuras 20 y 22.

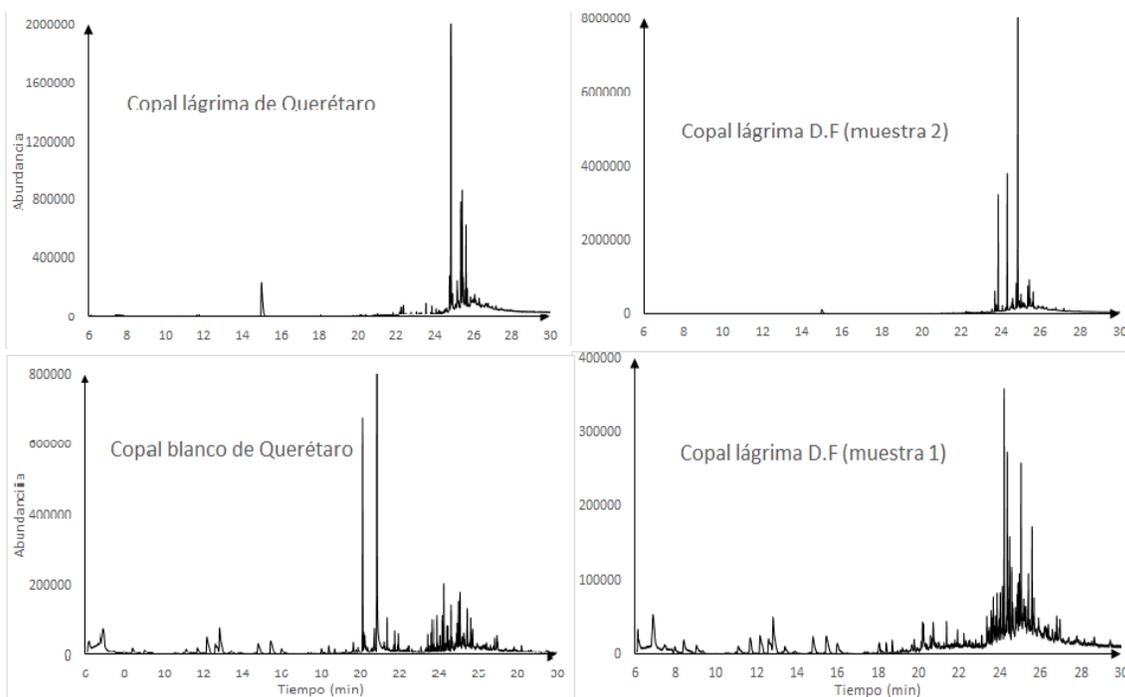


Figura 19. Comparación de los copales en metanol.

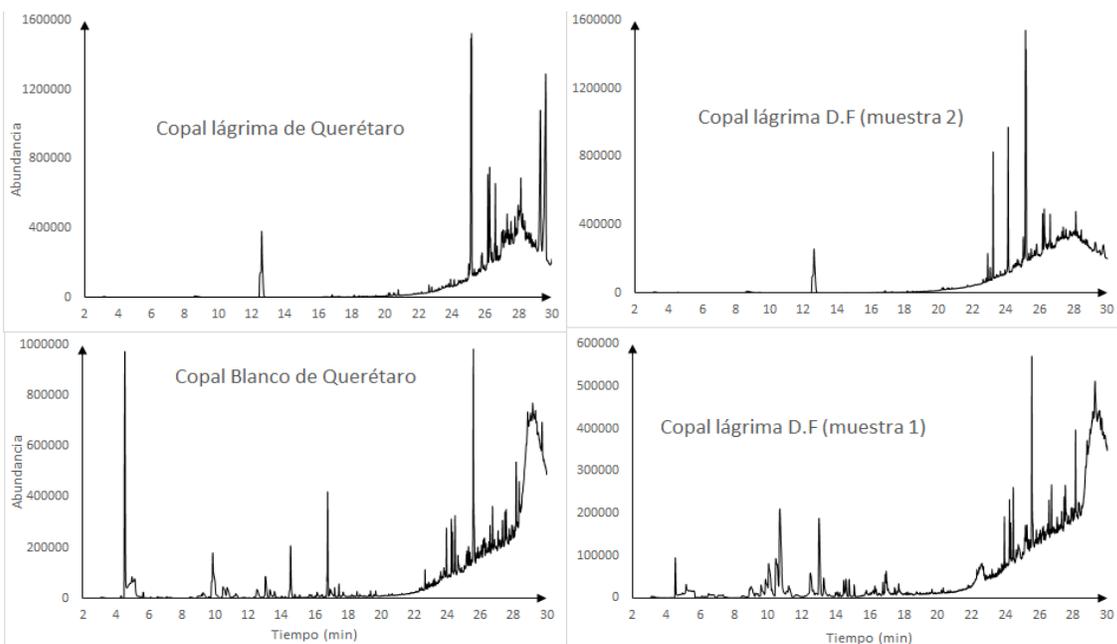


Figura 20. Evaluación del comportamiento de los copales en disolución a seis meses de su extracción con metanol.



**Tabla 5. Compuestos encontrados en los diferentes tipos de copal (disolución en metanol)**

Muestra		CBQ		CLQ		CL <sub>1</sub> DF		CL <sub>2</sub> DF	
tr (min)	Compuesto	t <sub>inicial</sub>	t <sub>6</sub>						
4.546	α-Pineno	-	+	-	-	-	+	-	-
	1R-α-Pineno	+	+	-	-	+	+	-	-
5.217	α-Felandreno	+	-	-	-	-	-	-	-
5.662	β-Pineno	-	+	-	-	-	-	-	-
9.864	1-Metilverbenol	-	+	-	-	-	+	-	-
10.094	α-Camfolenal	+	-	-	-	+	+	-	-
10.497	L-Pinocarveol	+	+	-	-	+	+	-	-
10.720	Cis-Verbenol	+	+	-	-	+	+	-	-
	Verbenol	+	+	-	-	+	+	-	-
11.251	Pinocarvona	-	+	-	-	-	-	-	-
12.563	Mirtenol	+	+	-	-	+	+	-	-
12.613	Octilacetato	-	-	+	+	-	-	-	+
13.041	Cis-Verbenona	+	+	-	-	+	+	-	-
13.341	Cis-Carveol	+	+	-	-	-	+	-	-
13.596	6-Camfenol	-	+	-	-	-	-	-	-
16.786	Junipeno	+	+	-	-	-	-	-	-
22.922	Thunbergeno	-	-	-	-	-	-	+	+
23.239	Verticiol	-	-	-	-	-	-	+	+
23.951	Ácido pimárico	-	+	-	-	+	+	-	-
24.132	Heptatriacotanol	-	-	+	+	-	-	+	+
24.317	Metil6-dehidrodehidroabietato	-	+	-	-	-	-	-	-
24.832	Ácido fórmico	-	-	+	+	-	-	-	+
26.729	Metildehidroabietato	-	+	-	-	+	-	-	-



CBQ: Copal blanco de Querétaro, CLQ: Copal lágrima de Querétaro, CL<sub>1</sub>DF: Copal lágrima del Distrito Federal (muestra 1), CL<sub>2</sub>DF: Copal lágrima del Distrito Federal (muestra 2); t<sub>inicial</sub>: primer análisis realizado a las muestras, t<sub>6</sub>: análisis realizado 6 meses después; + El compuesto está presente, - El compuesto no está presente

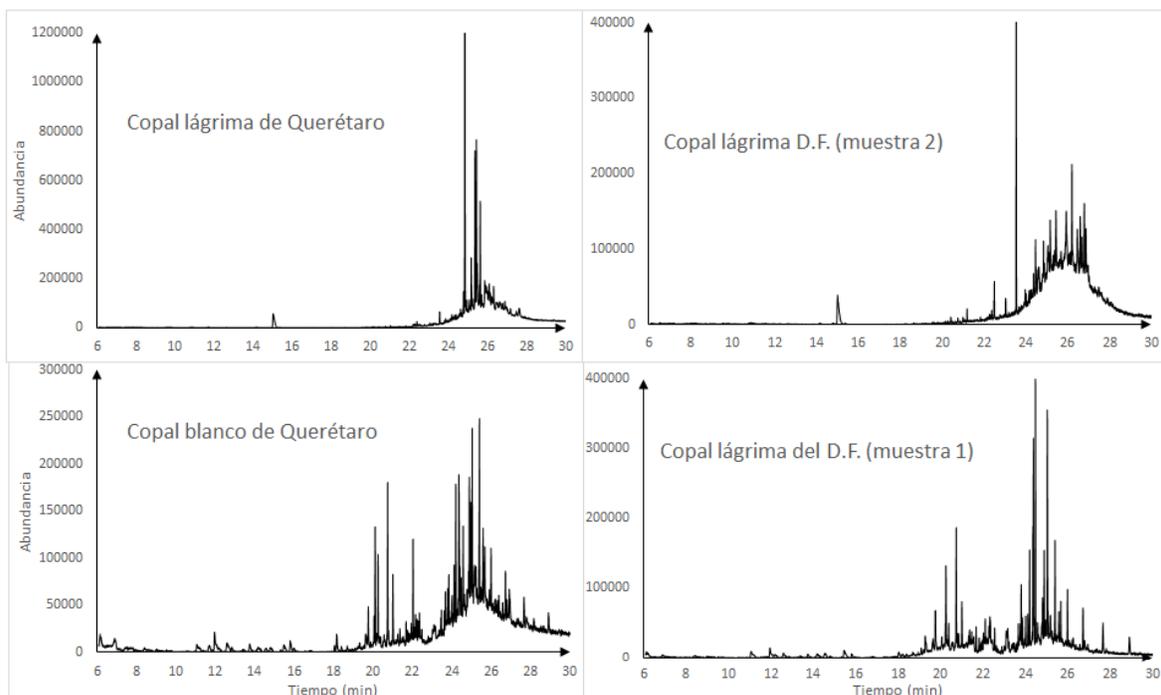


Figura 21. Comparación de la extracción con metanol/cloroformo (1:2 % v/v) para los copales provenientes de Querétaro y Distrito Federal

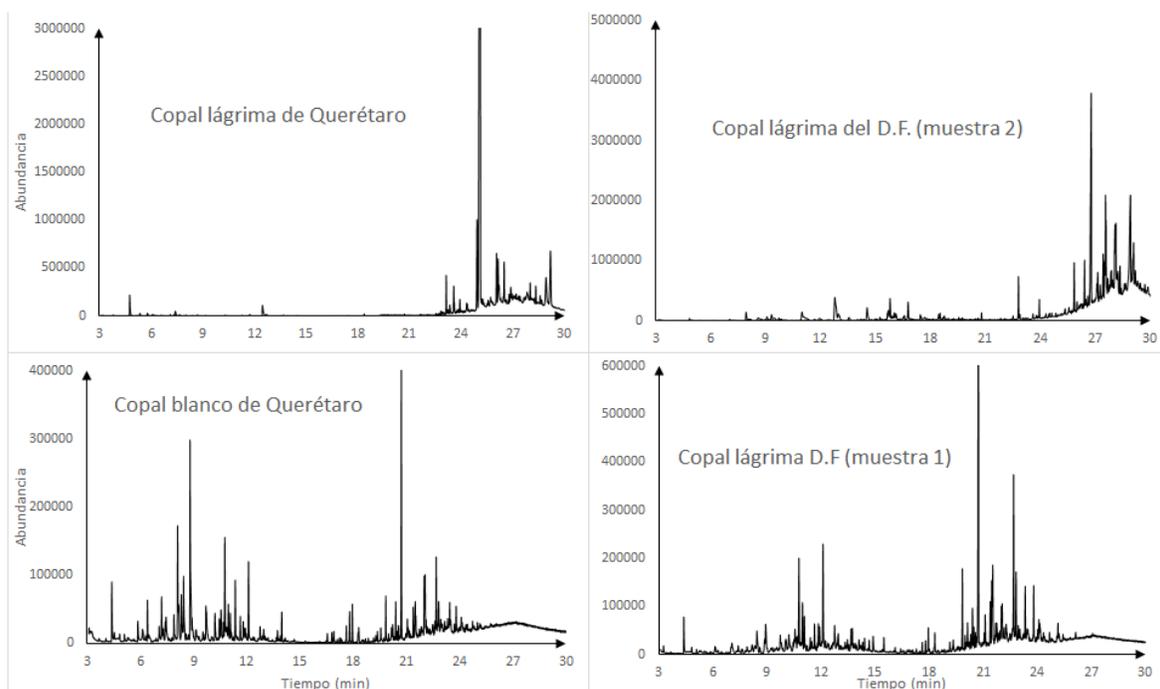


Figura 22. Evaluación del comportamiento de los copales en disolución a seis meses de su extracción con metanol/cloroformo (1:2 % v/v).

**Tabla 6. Compuestos encontrados en los diferentes tipos de copal (disolución en metanol/cloroformo (1:2 % v/v))**

tr (min)	Muestra	CBQ		CLQ		CL <sub>1</sub> DF		CL <sub>2</sub> DF	
		t <sub>inicial</sub>	t <sub>6</sub>						
4.546	1R- $\alpha$ -Pino	+	-	-	-	-	-	-	-
5.859	Limoneno	-	+	-	-	-	-	-	-
5.217	$\alpha$ -Felandreno	+	-	-	-	-	-	-	-
6.398	$\alpha$ -Fenchil-metiléter	-	+	-	-	-	-	-	+
8.797	$\alpha$ -Terpinil acetato	-	+	-	-	-	-	-	-
10.094	$\alpha$ -Camfolenal	-	-	-	-	+	-	-	-
11.995	$\alpha$ -Farenseno	+	-	-	-	-	-	-	-
12.613	Octilacetato	-	-	+	+	-	-	+	-
13.041	Verbenona	-	+	-	-	+	-	-	-



11.349	Junipeno	+	+	-	-	-	-	-	+
13.966	Longifoleno clorado	+	+	-	-	-	-	-	-
15.786	Androst-5-en-4-nona	+	-	-	-	-	-	-	-
16.136	Ácido pimárico	+	-	-	-	+	-	-	-
16.885	Criptopinona	+	-	-	-	-	-	-	-
16.973	Androst- 5,16-dieno-3βol	+	-	-	-	-	-	-	-
19.839	Metilisdextropimarato	-	+	-	-	-	+	-	+
20.712	Metildehidroabietato	-	+	-	-	-	+	-	+
21.395	Metil6-dehidrodehidroabietato	-	-	-	-	+	+	-	+
22.058	Androst-5,7-dien-3-ol-17-ona	-	+	-	-	-	-	-	+
22.683	Acido7-oxodehidroabietico	-	+	-	-	-	+	-	+
22.811	Ácido palmítico	-	-	-	-	-	-	+	+
24.132	Heptatriacotanol	-	-	+	+	-	-	+	-
24.832	Ácido fórmico	-	-	+	-	-	-	+	-

**Tabla 7. Comparación del número de compuestos extraídos con metanol y metanol/cloroformo**

<b>Análisis en metanol</b>				
	<b>CBQ</b>	<b>CLQ</b>	<b>CL<sub>1</sub>DF</b>	<b>CL<sub>2</sub>DF</b>
<b>Inicio</b>	9	3	9	3
<b>6 meses después</b>	14	3	10	5
<b>Análisis en metanol/cloroformo</b>				
	<b>CBQ</b>	<b>CLQ</b>	<b>CL<sub>1</sub>DF</b>	<b>CL<sub>2</sub>DF</b>
<b>Inicio</b>	9	3	4	4
<b>6 meses después</b>	10	2	4	8



---

---

Los cromatogramas (Figuras 20-22) muestran visualmente las diferencias existentes entre los copales tanto para las extracciones con metanol como para los copales extraídos con la mezcla metanol/cloroformo.

En el análisis con metanol (Tabla 5) se puede observar que la composición del copal blanco y la primera muestra del Distrito Federal es similar entre si, lo que podría suponer que provienen de la misma especie de copal sin embargo la muestra del Distrito Federal no se disolvió completamente al igual que los demás copales de lágrima; la baja concentración de los analitos en estos copales se puede deber a esta razón o bien a la forma de extracción de las mismas ya que para obtener esta modalidad la resina gotea del árbol por lo que se expone a condiciones ambientales haciendo que los compuestos volátiles como los terpenos se liberen de la resina y solo queden los compuestos de mayor peso molecular. En cuanto al análisis con metanol/cloroformo (Tabla 6), se observa una mayor diferencia entre la composición de un copal y otro sin embargo, entre el copal blanco y el de lágrima del Distrito Federal existe similitud para algunos compuestos.

Otra observación dentro de los compuestos identificados es que algunos presentan isomería o bien estructuras similares lo que provoca que el tiempo de retención sea muy similar y en ocasiones la resolución de los picos cromatográficos sea menor a la óptima ( $R \geq 1.5$ ) haciendo que un pico corresponda a más de un compuesto como es el caso del 1R- $\alpha$ -Pinieno y el Cis-Verbenol de forma que la caracterización del mismo se ve interferida. Para dar solución a esto se consideran 2 parámetros (1) la simetría del pico y (2) la similitud del espectro de masas experimental con el reportado en la biblioteca. En la Tabla 5 se reportan los isómeros de estos dos compuestos encontrados en el copal blanco donde la similitud entre el espectro experimental y el espectro de masas reportado por la biblioteca es del 95.9% para el 1R-  $\alpha$ -Pinieno y 94.8% para el  $\alpha$ -Pinieno, para el Cis-Verbenol es de 92.4% y 90.4% para su isómero. Se sabe que



---

---

son estos terpenos pero la seguridad del isómero se podría tener con un detector masas-masas o con una comparación frente a estándares.

El número de compuestos encontrados en cada resina es diferente de acuerdo al disolvente que se utilizó, para la extracción con metanol los compuestos identificados son mayoritariamente terpenos, con la mezcla metanol/cloroformo se extraen pocos terpenos, algunos alcoholes, compuestos clorados y compuestos con grupos carboxilo; esta diferencia en la composición entre un análisis y otro se deben a que los analitos extraídos presentan diferente solubilidad frente a los disolventes utilizados. De acuerdo a la Tabla 7 el copal blanco y la primera muestra del copal de lágrima del Distrito Federal son las resinas que contienen una mayor cantidad de compuestos en la extracción con metanol mientras que para la extracción con metanol/cloroformo fueron el copal blanco y la segunda muestra del copal del Distrito Federal. Analizando la Tabla 5 se puede observar que utilizando metanol como disolvente se extrae una mayor cantidad de compuestos de carácter terpénico tales como el 1R- $\alpha$ -Pineno, L-Pinocarveol, etc. En conclusión, el análisis de la muestra de copal, se ve favorecido al utilizar metanol como disolvente de extracción.

La hipótesis de que el tiempo afecta la composición de la resina se hace evidente para el caso del copal blanco, es probable que el aumento en el número de compuestos observados en los análisis cromatográficos de la resina en metanol se deba a la concentración de la muestra por evaporación del disolvente. Sin embargo, para los análisis en metanol/cloroformo esta hipótesis queda descartada ya que los compuestos identificados en tiempo inicial y a los 6 meses de la preparación de la disolución son diferentes (véase Tabla 6).



### 6.3 Extracción de los compuestos volátiles por MEFS en la disolución de copal

A continuación se muestran los cromatogramas obtenidos bajo las condiciones de análisis establecidas en la Tabla 2 (página 28).

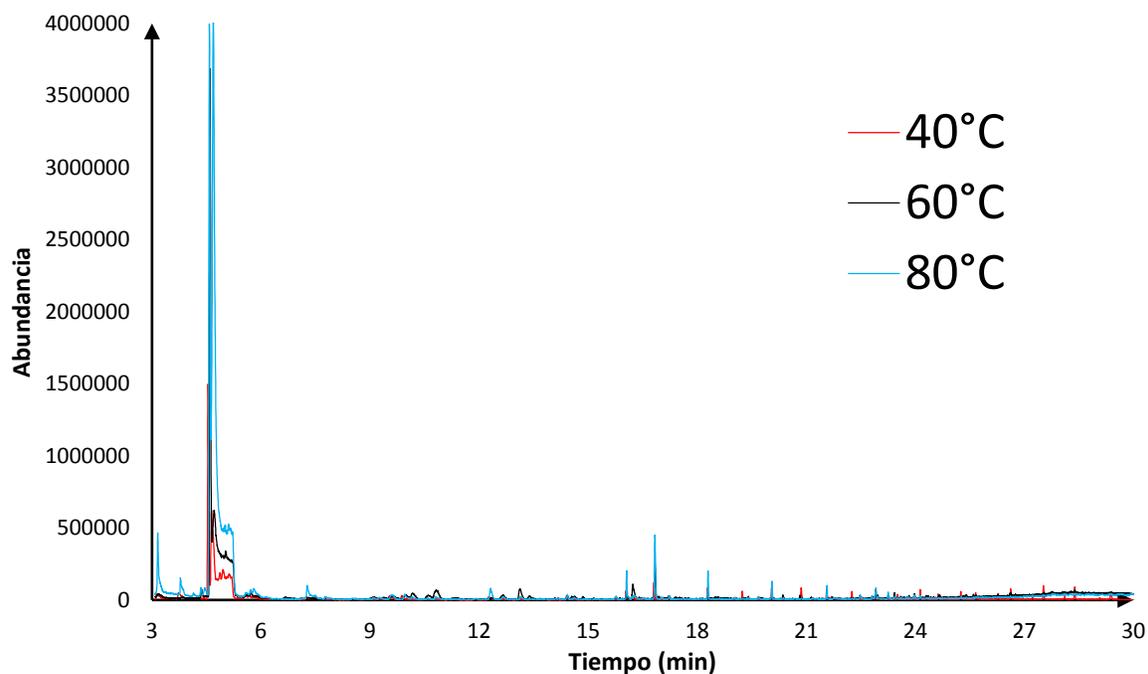


Figura 23. Comparación a diferentes temperaturas de análisis por MEFS de terpenos durante 30 min.

En el cromatograma a 80°C se observa un pico con tiempo de retención de 3.159 min. que corresponde al Ribitol, la similitud con la base de datos es del 57.1%; este compuesto puede provenir del copal, sin embargo no se encuentra reportado en la literatura por lo que su procedencia se consideró como desconocida.

Como se puede observar en la Figura 23 el área de los picos cromatográficos aumenta en proporción al aumento en la temperatura, favoreciendo la extracción de los analitos. Sin embargo, esta respuesta conlleva a una interferencia debido que a temperaturas altas (80°C) los picos se “dobletean” como es el caso del 1R-



$\alpha$ -Pino el cual presenta dos tiempos de retención (4.583 y 4.690 min.), los picos correspondientes a este compuesto presentan una abundancia similar al igual que en la comparación en sus espectros de masas experimentales y con los reportados en las bibliotecas; también se observa el mismo comportamiento en la prueba a 80°C durante 60 min. (Figura 27). Para evitar el “dobleteo” en los picos cromatograficos se consideró una temperatura óptima de 60°C.

Con la MEFS se logró extraer 2 terpenos, el 1R- $\alpha$ -pino y el Junipeno; esto puede deberse a que el resto de los terpenos comunes como el Felandreno, el Pinocarveol, el Mirtenol entre otros son más afines al metanol y en cuanto a los compuestos como el Ácido Pimárico presentan baja volatilidad lo que provoca que su concentración en la fase de vapor sea muy pequeña que no se logran determinar en el análisis. Si se realizará una extracción por inmersión de la fibra o una concentración mayor de la disolución se podría aumentar la respuesta para los pequeños picos que se observan en el intervalo de tiempo de retención de 6 a 16 min. Estas dos propuestas no se realizaron, la primera para evitar el desprendimiento de la fibra y la segunda debido a que en el proceso de concentración de la muestra por evaporación del disolvente podrían perderse analitos dada la volatilidad de los mismos (Figura 24-Figura 26).

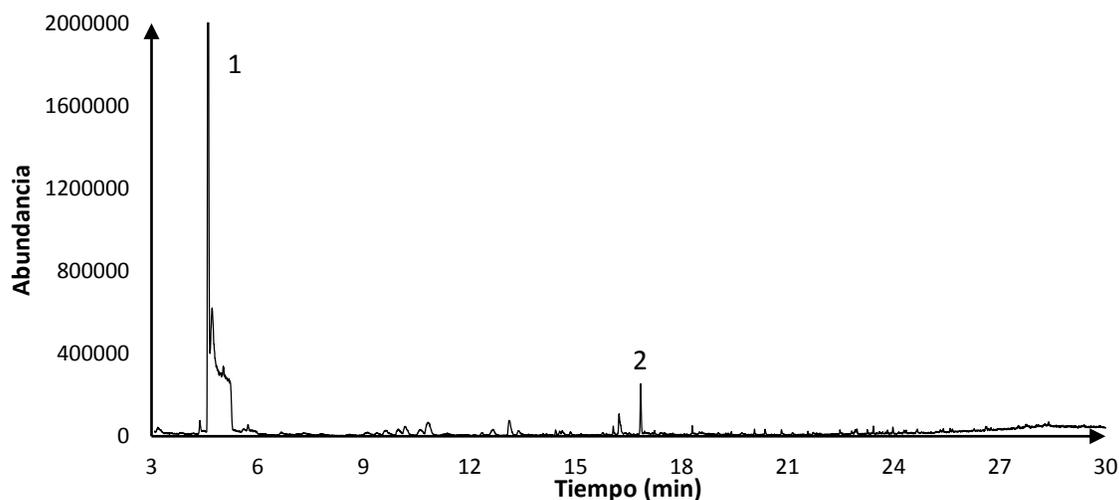


Figura 24. Análisis por MEFS a 60°C durante 30 min.

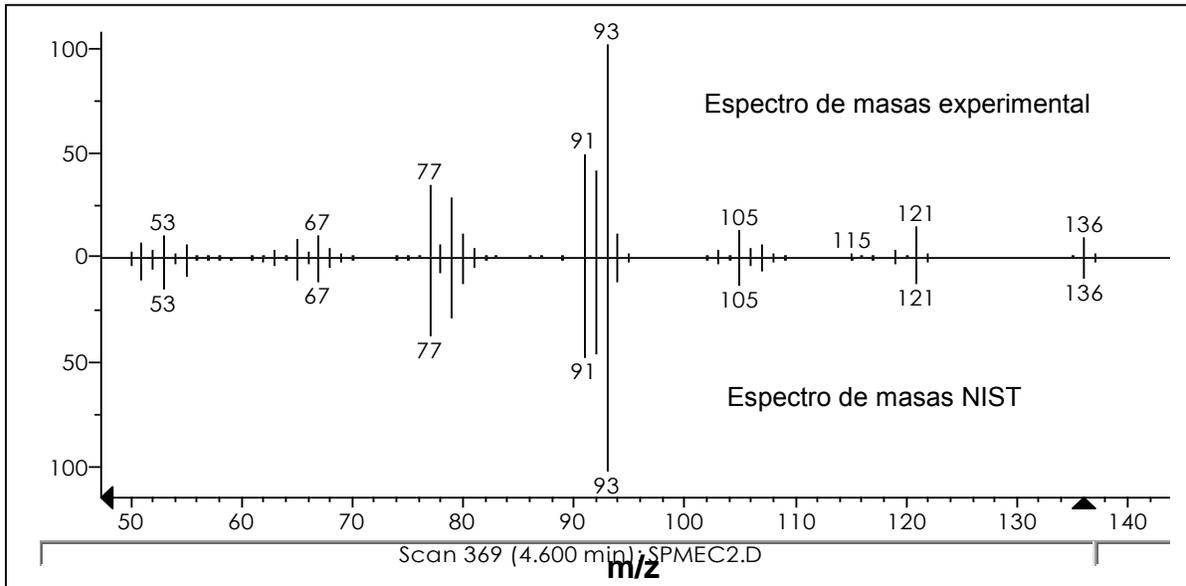


Figura 25. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el 1R- $\alpha$ -Pineno (Pico 1, Figura 24)

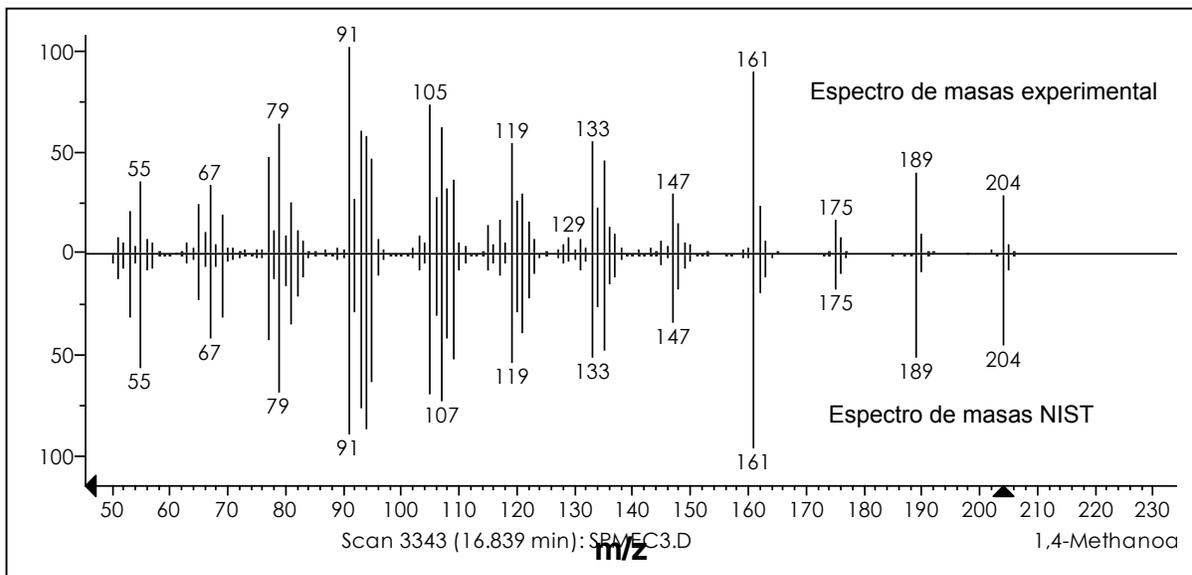


Figura 26. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el Junipeno (Pico 2, Figura 24)



Las pruebas iniciales para establecer el tiempo óptimo de extracción (MEFS) fueron a los 15 y 30 min. los resultados obtenidos no fueron favorables en la identificación completa de los compuestos presentes en la disolución de la resina de copal por lo que se realizó otro estudio durante 60 min y a 80°C, a la mayor temperatura utilizada durante los experimentos, obteniéndose los siguientes resultados (Figura 27):

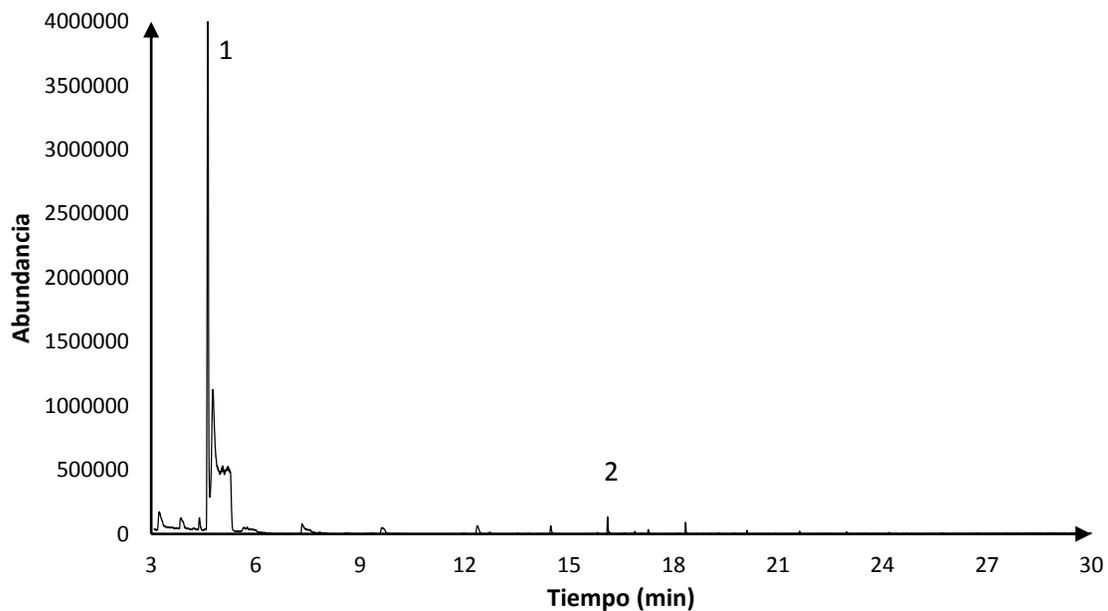


Figura 27. Extracción de terpenos a 80°C durante 60 min.

Como se puede observar la cantidad de compuestos extraídos no aumenta por lo que realizar estudios a tiempos y temperaturas mayores solo requeriría una mayor inversión de energía y tiempo de análisis; de esta forma se deduce que las condiciones óptimas para el experimento de MEFS son: 60°C durante 30 min, 500 rpm y 5 min. de desorción de la fibra en el inyector del cromatógrafo.

Con el análisis anterior se deduce que la MEFS no es una técnica apropiada para el tratamiento de la muestra en disolución, sin embargo, se puede utilizar en una disolución en la que los analitos no sean muy afines al metanol o bien realizar un



---

---

análisis por inmersión de la fibra. En consecuencia a esto se realizaron experimentos con la resina sólida.

#### 6.4 Optimización de la Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

Para estos experimentos solo se utilizó el copal blanco ya que de acuerdo a los resultados en la inyección en modo “Splitless” de las resinas fue uno de los copales más ricos en compuestos terpénicos además, se contaba con una gran cantidad de esta resina.

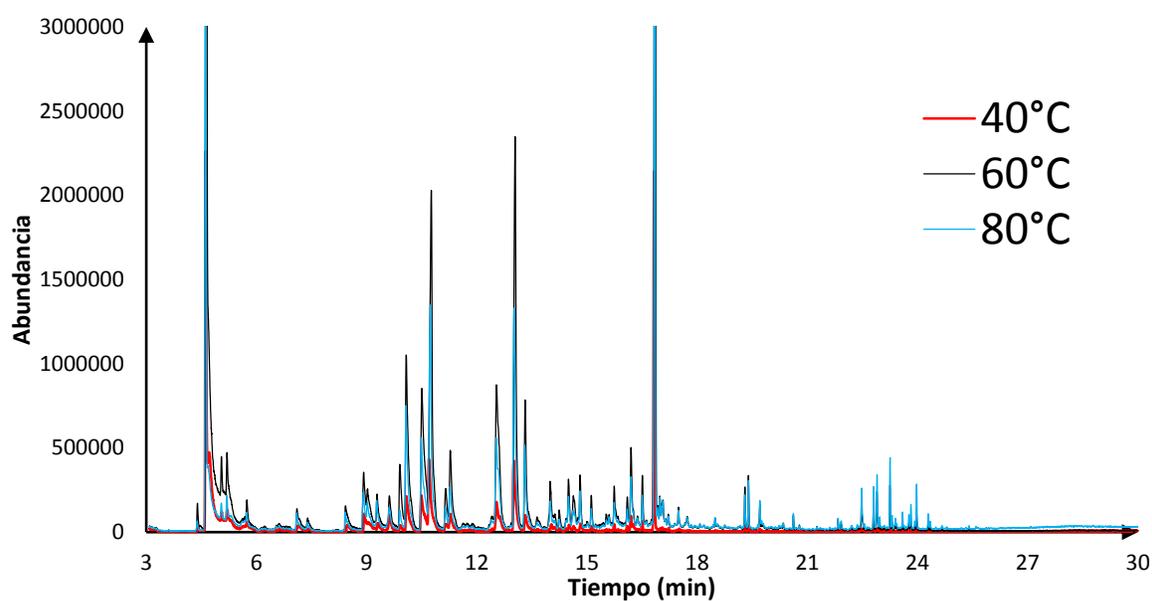


Figura 28. Comparación de la temperatura de análisis por MEFS de la resina de copal durante 30 min.

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos (Figura 28) se puede observar que el número de compuestos extraídos no se ve afectado por el cambio en la temperatura de extracción en cuanto al área de los picos cromatográficos, se esperaba que a mayor temperatura los compuestos volátiles se concentraran más en la fase de vapor, sin embargo, una temperatura de 80°C puede provocar fugas en los sellos del vial haciendo que la concentración de los compuestos en la fase vapor disminuya. A altas temperaturas los analitos pueden empezar a desorberse



de la fibra haciendo que la concentración en la misma disminuya, pese a que 80°C no se puede considerar como una temperatura alta si puede provocar este fenómeno debido a que los compuestos a analizar son muy volátiles, esta sería otra razón por la que a 80°C el área de los picos es menor al área de los picos a 60°C.

De acuerdo al análisis anterior se eligió como temperatura óptima 60°C.

Para la selección del tiempo de extracción se partió de las condiciones iniciales de análisis (Tabla 2, página 28) y de la temperatura seleccionada. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

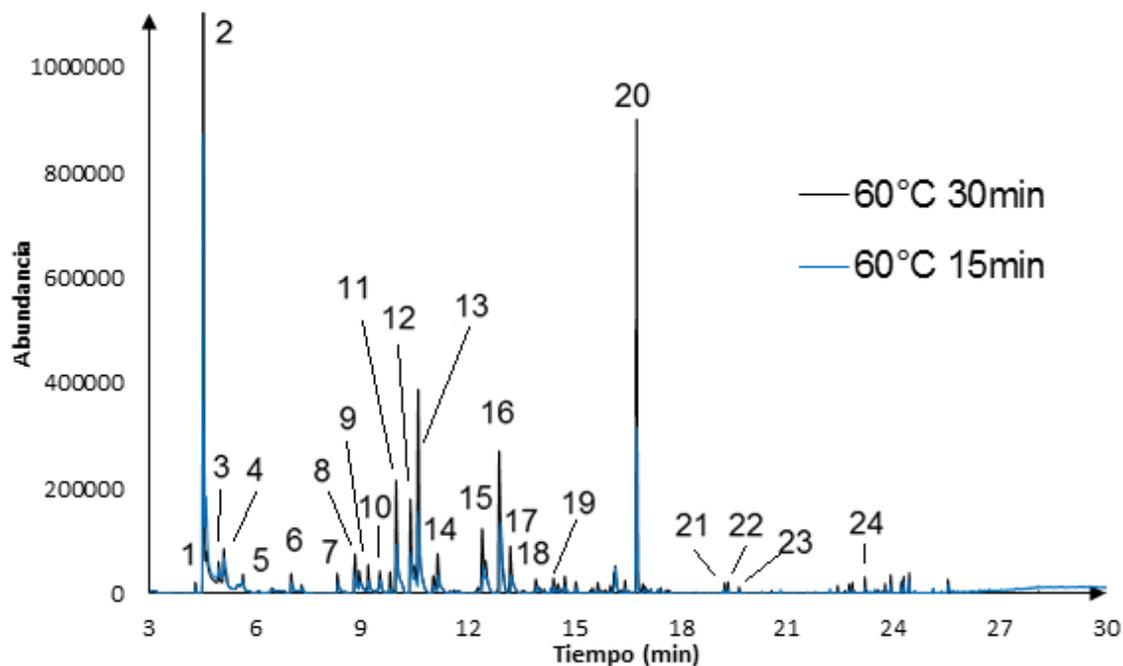


Figura 29. Comparación a diferentes tiempos de análisis por MEFS a 60°C.

De acuerdo al cromatograma anterior se puede observar que el área de los picos cromatográficos se ve más favorecida a mayor tiempo de extracción permitiendo realizar una identificación más certera del compuesto correspondiente a cada pico.



**Tabla 8. Compuestos extraídos a 60°C durante 30 min. de la resina de copal por la técnica de MEFS (Figura 29).**

Pico #	Tiempo de retención (min)	Compuesto	Pico #	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	4.398	Triciclono	13	11.151	Biciclo [3.1.1] hexan-3-ona-2,6,6-trimetil
2	4.641	1R- $\alpha$ -Pinoeno	14	11.296	Pinocarvona
3	5.052	Camfeno	15	12.551	Mirtenal
4	5.196	$\alpha$ -Felandreno	16	13.049	Cis-Verbenona
5	5.748	(-)- $\beta$ -Pinoeno	17	13.325	Cis-Carveol
6	7.131	Trans-3-careno-2-ol	18	14.012	(+)- Carvona
7	8.925	Cis- verbenol	19	14.246	2,3-Pinadediol
8	9.291	Linalool	20	16.856	Junipeno
9	9.629	Trans-2-careno-4-ol	21	19.304	(+)- longicanfenilona
10	9.913	1-Metilverbenol	22	19.403	Oxido cariofileno
11	10.077	$\alpha$ -Canfolenol	23	19.708	Longiborneol
12	10.518	L-pinocarveol	24	23.251	Biformeno

Con los resultados del análisis anterior se puede decir que la MEF-HS es una técnica apropiada para el estudio de la resina de copal, ya que proporciona resultados eficientes tanto en la extracción de los compuestos como para las condiciones de análisis.

### 6.5 Muestras arqueológicas

El estudio del copal se realizó con la finalidad de realizar un análisis en muestras arqueológicas provenientes de la zona norte de Veracruz; a continuación se presentan los resultados de los análisis realizados.



### 6.5.1 VHXXX I-10: Análisis por CG/EM

Los resultados obtenidos para la inyección del extracto obtenido por la técnica de "soxhlet" fueron los siguientes:

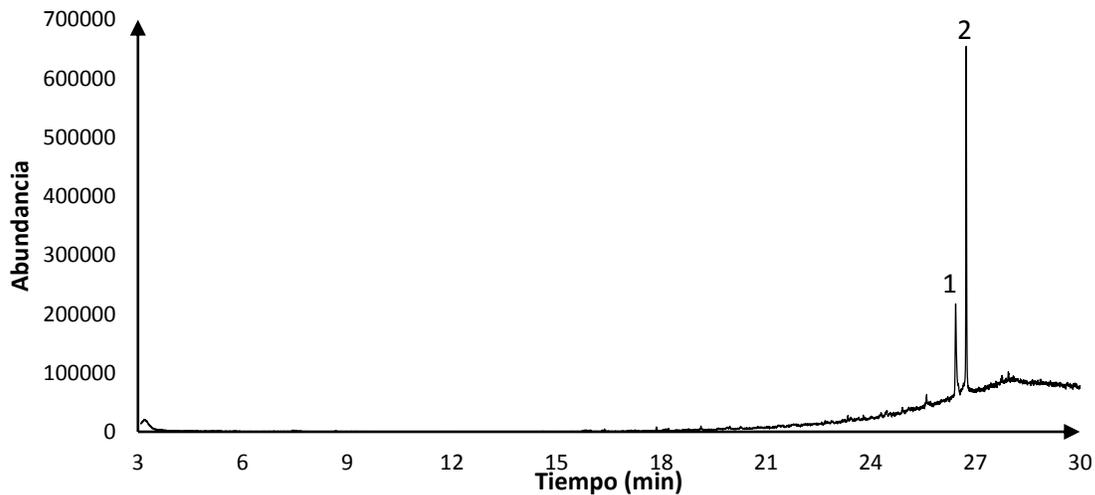


Figura 30. Contenido de la vasija (muestra VHXXX I-10).

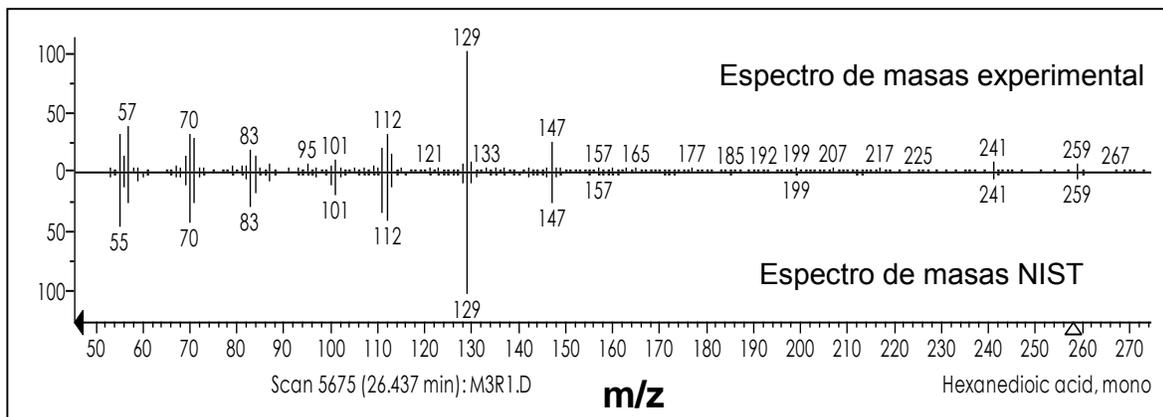


Figura 31. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el Mono-2-etilhexiladipato (pico 1).

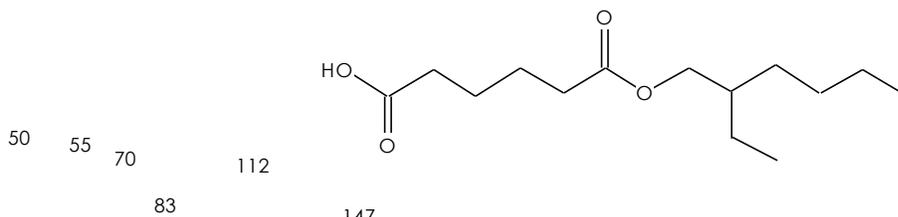


Figura 32. Estructura química del Mono-2-etilhexiladipato.

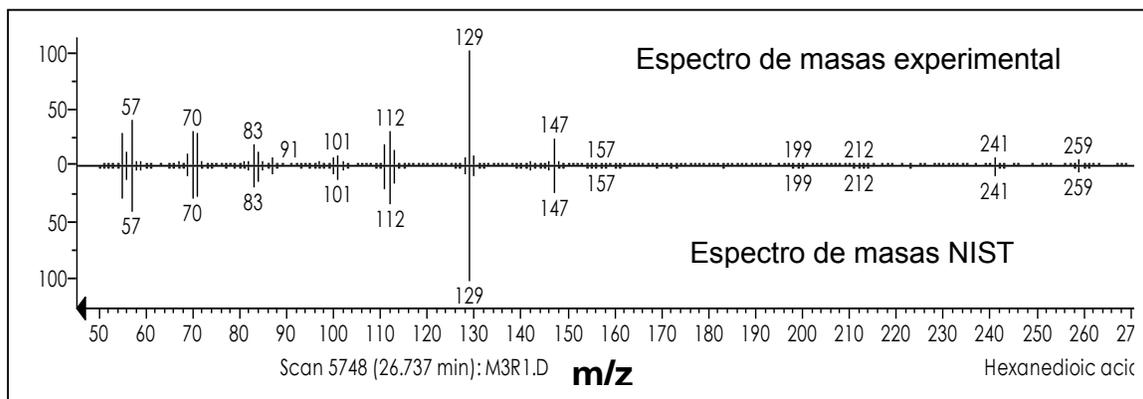


Figura 33. Comparación de los espectros de masas entre el experimental y el reportado en la biblioteca para el Ácido adípico, bis(2-etilhexil)éter (pico 2).

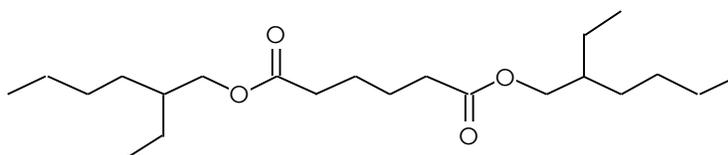


Figura 34 .Estructura del Ácido adípico, bis(2-etilhexil)éter

Como se puede observar no hay presencia de terpenos en el extracto de la muestra, en su lugar se encuentran derivados del ácido adípico; este ácido no es constituyente de grasas naturales, pero sí se encuentra como producto de la degradación oxidativa de aceites por lo que podría suponerse que la muestra contenía algún alimento el cual proporcionaría la fuente de aceites los cuales a través del tiempo se convirtieron en los compuestos identificados en la muestra.<sup>25,26</sup>

Los espectros de masas son muy similares entre sí; en el caso del pico 1 (Figura 31) se observa una mayor cantidad de picos en el espectro experimental respecto al espectro de la biblioteca, sin embargo coinciden en los picos de mayor abundancia: 57, 70, 85, 112, 129 (pico base), 147 y 259 (ion molecular). Con estas coincidencias se reporta una similitud del 37.3% con el espectro del mono- 2-etilhexiladipato.



El segundo espectro (Figura 33) se observa una similitud del 54.6% entre el espectro de la base de datos y el experimental, dando la probabilidad de que el compuesto identificado sea el ácido adípico, bis(2-etilhexil)éter. Los iones con mayor abundancia corresponden a los mismos que el primer espectro, esto se debe que la estructura de ambos compuestos son semejantes.

### 6.5.2 VHXXX I-10: Análisis por MEFS-HS seguido de CG/EM

Los resultados obtenidos en el análisis de la muestra por la técnica de MEFS-HS utilizando las condiciones optimizadas fueron los siguientes:

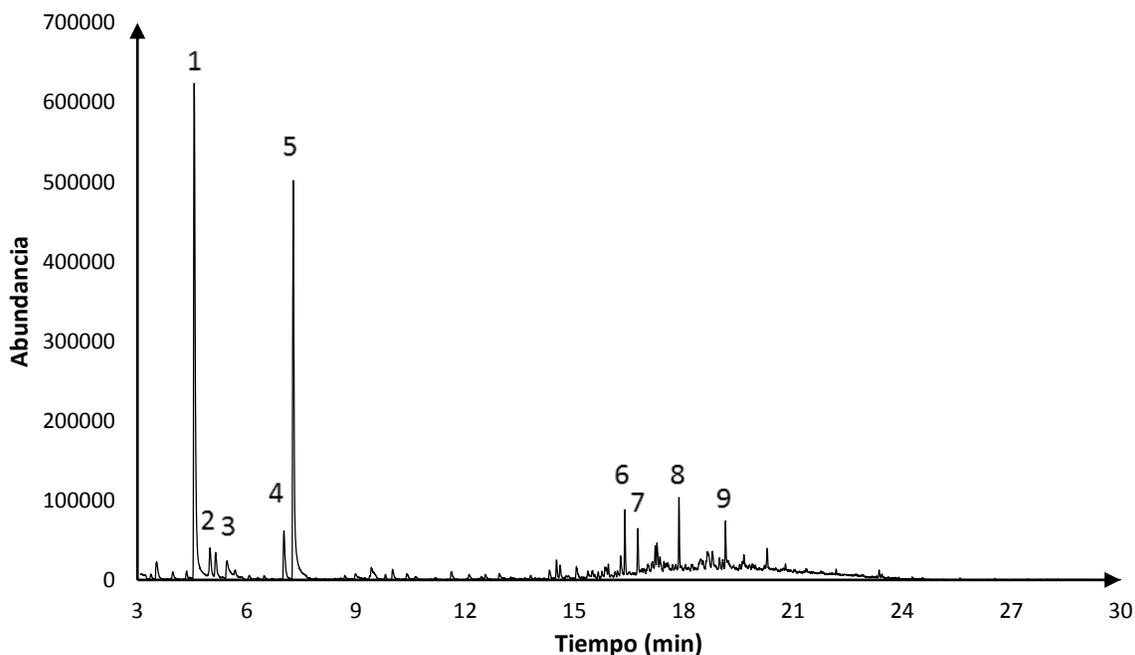


Figura 35. Contenido de la vasija (muestra VHXXX I-10).



**Tabla 9. Compuestos extraídos de la muestra VHXXX I-10 por la técnica de MEFS-HS**

Pico #	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	4.543	1R- $\alpha$ -Pino
2	4.999	Canfeno
3	5.150	Biciclo [4.2.0] Oct-1-en, 7-exo-etenil-
4	7.028	$\beta$ -Terpinil acetato
5	7.283	Etilhexanol
6	16.399	Tetradecano
7	16.745	Junipeno
8	17.872	Nonadecano
9	19.152	Nonadecano

**Tabla 10. Comparación de los compuestos extraídos de la muestra VHXXX I-10 y el copal**

Compuesto	Tiempo de retención (min)	
	Copal	Muestra arqueológica
1R- $\alpha$ -Pino	4.641	4.543
Canfeno	5.052	4.999
Terpinil acetato	8.797	7.028
Junipeno	16.856	16.745

Como se puede observar en la Tabla 9 cuatro de los compuestos identificados son terpenos (1R- $\alpha$ -Pino, Canfeno,  $\beta$ -Terpinil acetato y Junipeno) y en la Tabla 10 se puede apreciar que los tiempos de retención son muy parecidos a los compuestos encontrados en la resina de referencia.

El 1R- $\alpha$ -Pino y el Junipeno son los dos terpenos de mayor concentración en el copal por esta razón y teniendo una hipótesis de que al utilizar la resina la liberación de sus componentes no es exhaustiva, estos dos compuestos quedaron



---

---

“atrapados” dentro de los residuos y al someterse nuevamente a una temperatura elevada, fueron “liberados” permitiendo su extracción y su posterior análisis.

El resto de los compuestos identificados se puede atribuir al hecho de que la muestra se haya encontrado expuesta durante mucho tiempo a los factores ambientales tales como cambios de temperatura, contacto con aguas provenientes de lluvias, entre otros haciendo posible la contaminación de la muestra.

En los análisis por CG/EM y por MEFS-HS de la disolución de la muestra VHXXX I-10 se obtienen resultados diferentes, esto se debe a que a pesar de que los terpenos son solubles en metanol se encuentran en una concentración baja lo que da por resultado que queden diluidos y no puedan ser determinados, caso contrario presentan los adipatos, analitos que se encuentran en una concentración favorable para su análisis por disolución, sin embargo no son volátiles como los terpenos lo que hace que no sean extraídos por MEFS-HS.

### **6.5.3 VH31 D8 O-65: Análisis por CG/EM**

No se observó ningún compuesto presente en la muestra; esto se puede deber a que la muestra contiene una concentración baja de los analitos pese a que proviene del barro que es considerado un material poroso. Esta baja concentración de los analitos provoca que queden lo suficientemente diluidos y por ende no lograron ser determinados.

### **6.5.4 VH31 D8 O-65: Análisis por MEFS-HS seguido de CG/EM**

Los resultados obtenidos en el análisis de la muestra por la técnica de MEFS utilizando las condiciones optimizadas fueron los siguientes:

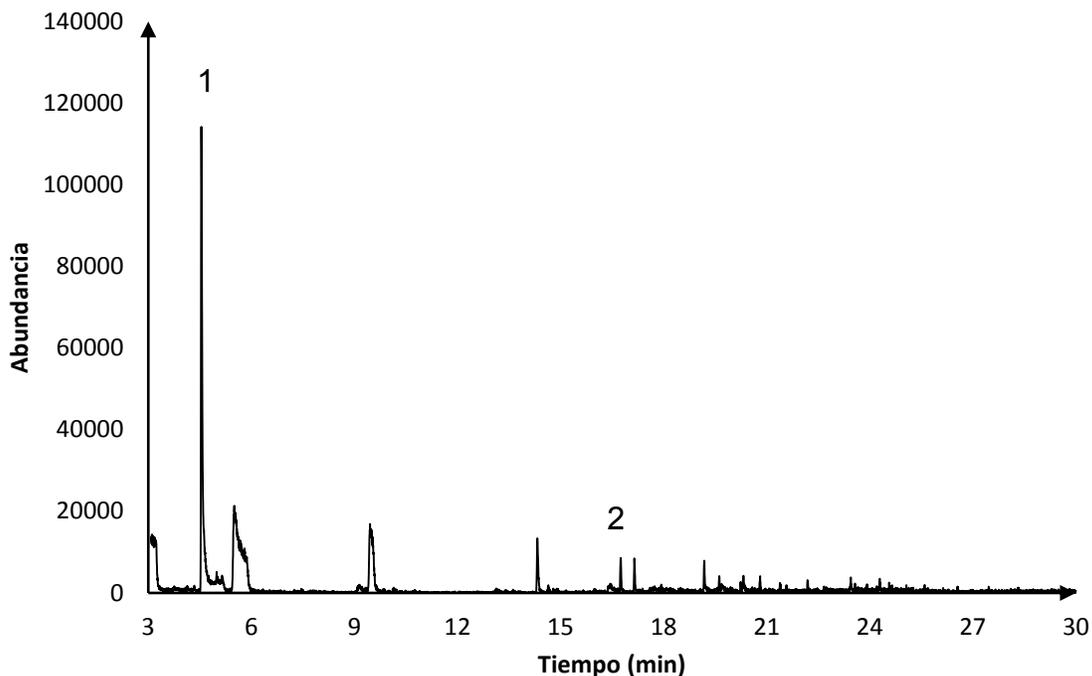


Figura 36. Cerámico 1 (muestra VH31 D8 O-65).

**Tabla 11. Comparación de los compuestos extraídos de la muestra VH31 D8 O-65 y el copal**

Pico #	Compuesto	Tiempo de retención (min)	
		Copal	Muestra arqueológica
1	1R- $\alpha$ -Pino	4.546	4.571
2	Junipeno	16.856	16.757

Para el pico del Junipeno se encontraron otros dos compuestos el Valenceno y el Patchouleno, con similitudes del 15.8% y 11.5% respectivamente, y para el Junipeno la similitud fue del 10.3% de lo reportado en la base de datos. A pesar que el espectro de masas experimental del pico cromatográfico a los 16.757 min. tiene una similitud mayor con los espectros del Valenceno y el Patchouleno de la base de datos, se consideró al Junipeno como responsable de la aparición de este pico ya que de acuerdo a los estudios realizados en el presente trabajo el Junipeno forma parte de la composición química del copal.



---

---

En este análisis sí se logró identificar 2 compuestos terpénicos a comparación de la inyección en modo “Splitless”, en la que se determinan adipatos. El barro es un material poroso lo que permitió que los terpenos se impregnaran en él y de esta forma al someterse a un análisis directo, es decir sin pasar por la disolución, se lograron extraer, también hay que considerar que la MEFS es un técnica de preconcentración de la muestra lo que ayudo a la detección de estos analitos.

### **6.5.5 VH31 M3 O-60: Análisis por CG/EM**

Al igual que el otro cerámico analizado no se observaron picos cromatográficos pertenecientes a algún compuesto característico de la resina de copal; las razones son las mismas que se plantearon para la muestra VH31 D8-65.

### **6.5.6 VH31 M3 O-60: Análisis por MEFS-HS seguido de CG/EM**

Los resultados obtenidos en el análisis de la muestra por la técnica de MEFS-HS utilizando las condiciones optimizadas fueron los siguientes:

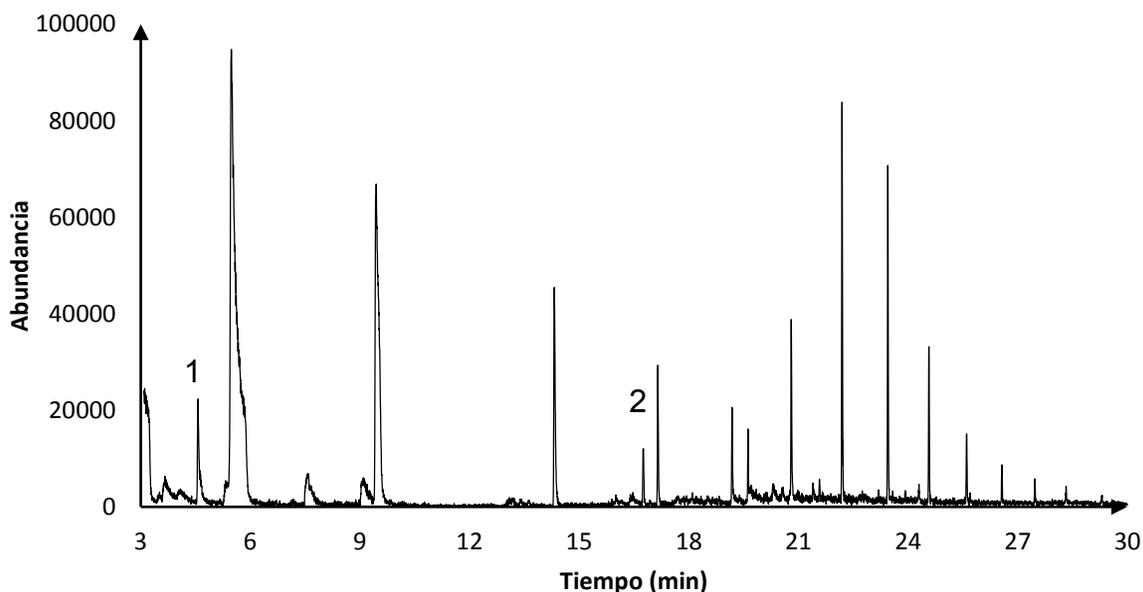


Figura 37. Cerámico 2 (muestra VH31 M3 O-60).



**Tabla 12. Comparación de los compuestos extraídos de la muestra VH31 M3 O-60 y el copal**

Pico #	Compuesto	Tiempo de retención (min)	
		Copal	Muestra arqueológica
1	1R- $\alpha$ -Pineno	4.641	4.571
2	Junipeno	16.856	16.757

Como se observa en la Tabla 12 se encontraron dos compuestos nuevamente se trata de los más abundantes en el copal, sin embargo, por ser el cerámico donde estaba contenida la resina las concentraciones del pineno y del junipeno obtenidas son bajas, esto se observa en el cromatograma (Figura 37) donde la abundancia de los picos cromatográficos se encuentra en el orden de  $10^4$  unidades de respuesta; gracias a los blancos (Anexo I) realizados se sabe que el resto de los picos que se observan en el cromatograma provienen de la fibra.

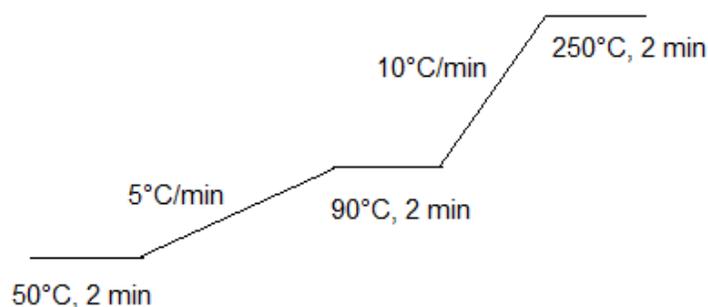


---

---

## 7. CONCLUSIONES

El programa óptimo para separar los compuestos encontrados en la resina de copal fue:



Los resultados obtenidos para los diferentes análisis realizados para la resina de copal bajo este programa de elución fueron los siguientes: 16 compuestos identificados en la utilización de metanol como disolvente de extracción y 10 utilizando la mezcla metanol/cloroformo. Al aplicar la técnica de MEFS-HS los resultados no se vieron favorecidos para la disolución con metanol ya que solo se lograron identificar 2 compuestos pero en el caso de la resina sólida, este programa de elución permitió separar 24 compuestos.

El tratamiento de extracción de la resina con disolventes se vio favorecido al utilizar metanol, permitiendo una mayor extracción de compuestos terpénicos. Dentro de estos análisis se encontró que la composición de las resinas puede verse influenciada por la forma de obtención así como de la especie botánica del copal y del origen regional del mismo. A su vez se observó que el tiempo no afecta la composición de la resina si esta se mantiene en disolución, pero si la muestra se concentra (por evaporación del disolvente), existe la posibilidad de identificar una mayor cantidad de compuestos.

En base a los resultados obtenidos en disolución se determinó que las resinas más ricas en terpenos son el copal blanco y el copal 1 de lágrima del D.F; siendo el copal blanco el más viable para los análisis posteriores.



---

---

Para la extracción con MEFS se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas tanto para los análisis en disolución como para los de la resina sólida. Temperatura de extracción: 60°C, Tiempo de extracción: 30 min., Desorción de la fibra: 3 min.

En base a los resultados se dedujo que la MEFS no es una técnica apropiada para el tratamiento de la muestra en disolución ya que bajo estas condiciones solo se lograron identificar 2 compuestos mientras que en el sólido se encontraron 24.

De acuerdo a lo estipulado anteriormente se puede concluir que las dos técnicas más óptimas para determinar compuestos en el copal por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas son el análisis directo de una disolución en metanol y el análisis de la resina solidificada por MEFS-HS.

Para el análisis de las muestras arqueológicas en disolución no se logró identificar ningún compuesto a excepción de la muestra VHXXX I-10 en la que se encontraron restos de adipatos, lo que supondría presencia de aceites o grasas; sin embargo, al realizar el análisis en MEFS-HS se encontraron 2 de los principales componentes del copal, el 1R- $\alpha$ -Pino y el Junipeno no solo en la muestra perteneciente al contenido del recipiente sino también a las muestras propias de la vasija lo que permite dar un argumento para decir que la hipótesis del uso ceremonial es válida, aunque para afirmar esta hipótesis deberían realizarse más estudios y contar con mayor información de la muestra arqueológica.



---

---

## 8. REFERENCIAS

1. Banuls, D. et. al. *Cromatografía de Gases I*. Alhambra. Madrid, 1979.
2. Linares, E. y Bye, R. *El copal en México*. *Biodiversitas*. **78**, 8-11(2008).  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/Biodiversitas/Articulos/biodiv78art2.pdf>.  
(consultada el 8 de Julio del 2015).
3. Purata, S. *Uso y manejo de los copales aromáticos: resinas y aceites*. CONABIO, 2008.  
<http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/copales/Manual%20de%20copales.pdf>  
(consultada el 8 de Julio del 2015).
4. Stacey, R.J., Cartwright, C.R. and Mcewan, C. *Chemical characterization of ancient mesoamerican “ copal ” resins : preliminary results*. *Archaeometry* **48**, 323-340 (2006).
5. Gómez, L. et al. *Analysis of Mexican reference standards for *Bursera spp.* resins by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and application to archaeological objects*. *Journal of Archaeological Science*. **41**, 679-690 (2014).
6. Amaro, M. *Copal: microestructura , composición y algunas propiedades relevantes*. Tesis de licenciatura. Instituto Politécnico Nacional, 1993.  
<http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/handle/123456789/7090>. (consultada el 8 de Julio del 2015).
7. Case, R., Tucker, A., Marciarello, M. and Wheeler, K. *Chemistry and Ethnobotany of Commercial Incense Copals, Copal Blanco, Copal Oro, and Copal Negro, of North America*. *Economic Botany*. **57**, 189-202 (2003).



- 
- 
8. Rzedowski, J. Medina, R. y Calderón, G. *Inventario del conocimiento taxonómico , así como de la diversidad y del endemismo regionales de las especies mexicanas de bursera ( burseraceae )*. Acta Botanica Mexicana **70**, 85-111 (2005).
  9. Fuentes, A. *Identidad taxonómica y aspectos sobre la historia natural y usos del “ copal de los yungas ” en Bolivia*. Kempffiana. **5**, 3-19 (2009).
  10. Gomez, L. y Vieillescaze, C. *Cromatografía y Arqueobotánica. Estudio de copal arqueológico como material adhesivo y material de moldeado en objetos aztecas*.  
[http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/delia\\_paola\\_lucero\\_gomez.pdf](http://www.mufm.fr/sites/mufm.univ-toulouse.fr/files/evenement/symposium/ponencias/delia_paola_lucero_gomez.pdf) (consultada el 8 de Julio del 2015).
  11. Santos, J. *Identificación y cuantificación de terpenos en agave mezcalero por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectroscopía de masas*. Tesis de Maestría; Universidad Nacional Autónoma de México, 2008.
  12. Olvera, F. *Determinación de compuestos volátiles y semivolátiles en cerveza por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas y su relación con el perfil sensorial*. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de México, 2013.
  13. Hamm S, Bleton J, Connan J, Tchaplal A. *A chemical investigation by headspace SPME and GC-MS of volatile and semi-volatile terpenes in various olibanum samples*. Phytochemistry. **66**, 1499-1514 (2005).
  14. Mills J, White R. *Natural resins of art and archaeology their sources, chemistry, and identification*. Studies in Conservation. **22**, 12-31 (1977).



- 
- 
15. Romero, J. *Biodeterioro fúngico y bacteriano de las resinas terpénicas utilizadas en pintura y otras artes plásticas*. Tesis de doctorado. Universidad de Granada, 2007.
  16. Kitson, F. Larsen, B. and McEwen, C. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Academic Press. 2002.
  17. Banuls, D. et. al. *Cromatografía de Gases II*. Alhambra. Madrid, 1973.
  18. Pellati F, Prencipe F. and Benvenuti S. *Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry characterization of propolis volatile compounds*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. **84**, 103-111 (2013).
  19. Restek. *A Technical Guide for Static Headspace Analysis Using GC*. <http://www.restek.com/pdfs/59895B.pdf> (consultada el 8 de Julio del 2015).
  20. Sigma Aldrich, Supelco. *Bulletin 928A: Solid Phase Microextraction Troubleshooting Guide*. [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General\\_Information/1/t101928.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/General_Information/1/t101928.pdf) (consultada el 8 de Julio del 2015)
  21. Sigma Aldrich, Supelco. *Bulletin 923: Solid Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions*. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf> (consultada el 8 de Julio del 2015).
  22. Sigma Aldrich, Supelco. *Application. Note 6: Solid Microextraction of semivolatiles Compounds*.



- 
- 
- [https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Application\\_Notes/4554.pdf](https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/Application_Notes/4554.pdf) (consultada el 8 de Julio del 2015).
23. Sigma Aldrich, Supelco. *SPME Resolves Difficulte Matrix Problems*. The Reporter **18**, (4) (2000).  
<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme/spme-resolves.html> (consultada el 8 de Julio del 2015)
24. Luque, M. García, L. *Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future*. Analytica Chimica Acta **369**, 1-10, (1998).
25. Nuñez, C. *Extracciones con equipo Soxhlet*. 2008.  
<http://www.cenunez.com.ar/archivos/39-ExtraccinconequipoSoxhlet.pdf>. (consultada el 8 de Julio del 2015).
26. *Bio Carta*.  
<http://www.biocarta.com/pathfiles/omegaoxidationPathway.asp>. (consultada el 1 de Junio del 2015).
27. *Dicarboxylic acids*. <http://www.cyberlipid.org/fa/acid0004.htm>. (consultada el 1 de Junio del 2015).



---

---

## 9. ANEXO I

### 9.1 Blancos

Se realizaron blancos de las diferentes fuentes de interferencia en los cromatogramas con la finalidad de discriminar aquellos picos que no pertenecen a la muestra y son propios de estas interferencias.

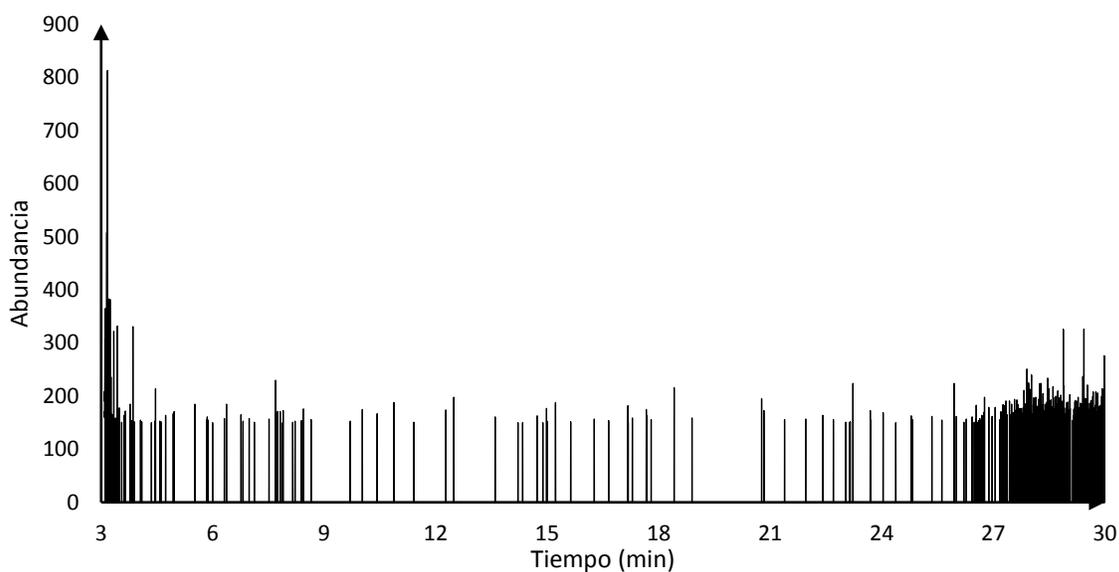


Figura 38. Blanco de columna.

Aunque no se encuentran picos diferentes a los de la columna se pueden observar espacios en blanco, el hecho de que no exista una corriente de iones puede dar lugar a que no se obtenga respuesta del equipo o bien la respuesta es tan pequeña (por arriba de cero) que no se percibe en el gráfico de respuesta.

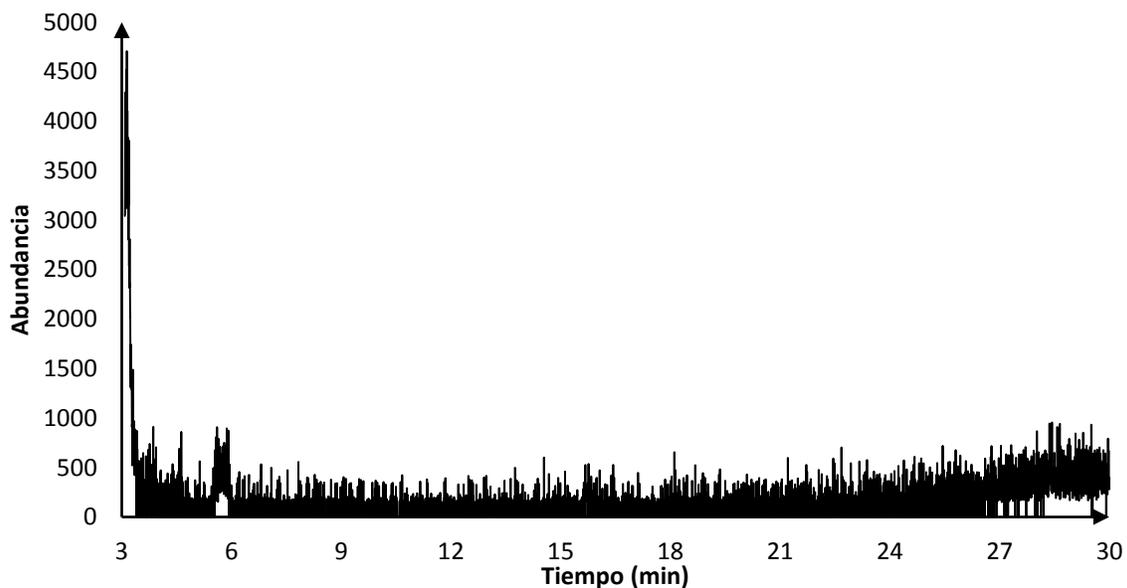


Figura 39. Blanco de disolvente (Metanol).

Como se puede observar en la Figura 39 el metanol no proporciona ninguna fuente de interferencia para los análisis, corroborando que los picos obtenidos en los análisis en disolución corresponden a la muestra.

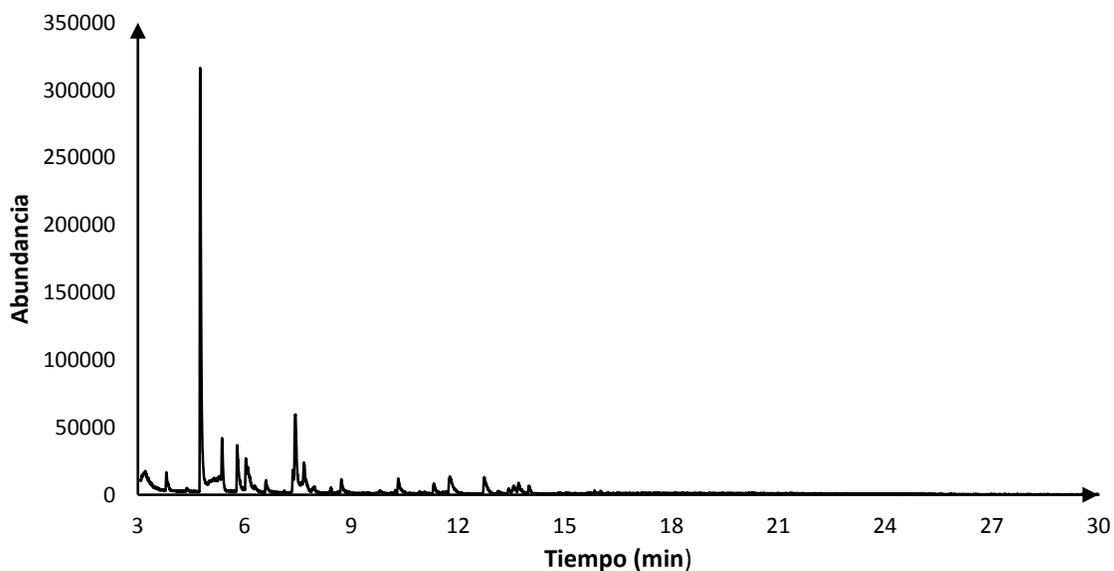


Figura 40. Blanco de disolvente (Cloroformo).



---

---

El cloroformo tiene algunos compuestos como el tetracloroetano, el 1,1,3-Trichloroacetona, el 2-Cloro-2-nitropropano, el propil cloroacetato y el 2,3-dicloro-2-metil-butano que se pueden observar durante los análisis, una vez conocidos se pueden descartar del cromatograma de la muestra.

El recubrimiento de la fibra de sílice se puede ir desgastando en cada extracción haciendo que ciertos componentes de la misma sean introducidos al sistema cromatográfico proporcionando una fuente de interferencia al momento de identificar los compuestos pertenecientes a la muestra, por esta razón se proporciona un blanco de la fibra (Figura 41).

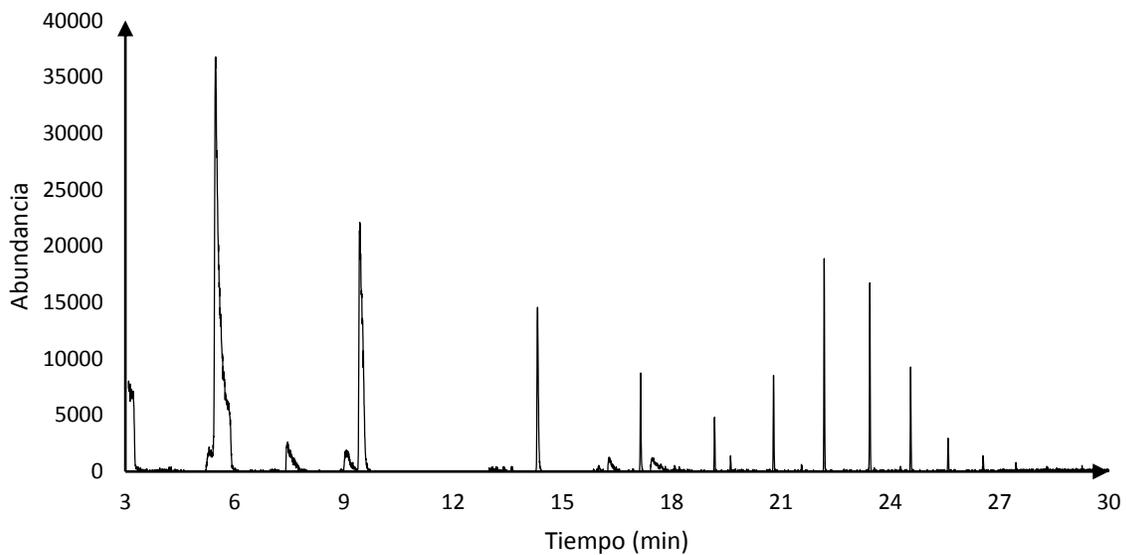


Figura 41. Blanco de la fibra de polidimetisiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB).