

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**



**Facultad de Química**

**Análisis de ácidos grasos en muestras arqueológicas por  
Microextracción en Fase Sólida y Cromatografía de Gases  
acoplada a Espectrometría de Masas**

**TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA**

**PRESENTA  
Denise Monroy Fernández de Lara**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 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:**                   **Profesor: ELBA ROJAS ESCUDERO.**

**SECRETARIO:**           **Profesor: GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI.**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: LILIA DEL CARMEN LOPEZ SERRANO.**

**2° SUPLENTE:**           **Profesor: SUSANA IVETTE MARTINEZ SAMANO.**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 102 DE LA UNIDAD DE POSGRADO DE LA FACULTAD DE QUÍMICA.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**FRANCISCO ROJO CALLEJAS.**

**SUSTENTANTE:**

**DENISE MONROY FERNÁNDEZ DE LARA**

## Contenido

<b>1. INTRODUCCIÓN.</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>2</b>
2.1 Objetivo general. ....	2
2.2 Objetivos particulares. ....	2
<b>3. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
3.1 Ácidos grasos.....	3
3.2 Muestras arqueológicas. ....	6
3.3 Conservación de los ácidos grasos en muestras arqueológicas. ....	8
3.4 Extracción por Soxhlet.....	11
3.5 Microextracción en fase sólida (“SPME”). ....	12
3.5.1 Fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS).....	17
3.5.2 Parámetros que influyen en el proceso de extracción.....	18
3.6 Formación de derivados. ....	20
3.7 Cromatografía de gases.....	23
3.8 Espectrometría de masas.....	27
3.9 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas. ....	29
<b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.</b> .....	<b>30</b>
4.1 Equipo y material.....	30
4.2 Reactivos.....	30
4.3 Muestras.....	31
4.4 Preparación de disoluciones estándar. ....	31
4.5 Preparación de la muestra. ....	31

4.6 Equipo y condiciones cromatograficas. ....	32
4.7 Optimización de la formación de los derivados. ....	33
4.8 Extracción y optimización de la técnica por SPME.....	33
4.9 Extracción de las muestras arqueológicas por la técnica SPME.....	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>35</b>
5.1 Análisis cromatográfico e identificación de los compuestos. ....	35
5.2 Optimización de la formación de los derivados. ....	37
5.3 Extracción por SPME. ....	39
5.4 Optimización de los parámetros para la extracción con SPME. ....	40
5.4.1 Optimización de la temperatura de la extracción. ....	40
5.4.2 Optimización del pH en la extracción por SPME.....	42
5.4.3 Optimización de la fuerza iónica. ....	43
5.4.4 Optimización del tiempo de la extracción. ....	44
5.4.5 Optimización de la cantidad de reactivo sililante.....	46
5.4.6 Optimización del tiempo de la formación del derivado. ....	47
5.5 Muestras arqueológicas. ....	49
5.5.1 Extracto por la técnica de Soxhlet.....	49
5.5.2 Extracción con los parámetros optimizados en SPME.....	51
<b>6. CONCLUSIONES. ....</b>	<b>57</b>
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>59</b>
<b>ANEXO 1.....</b>	<b>65</b>
<b>ANEXO 2.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO 3.....</b>	<b>78</b>

## Lista de abreviaturas.

**Analito-TMS:** Analito trimetilsililado.

**BSTFA:** N, O-Bis(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (por sus siglas en Inglés).

**GC:** Cromatografía de gases (por sus siglas en Inglés).

**GLC:** Cromatografía Gas-Líquida.

**HDMS:** Hexametildisilazano (por sus siglas en Inglés).

**HPLC:** Cromatografía de Líquidos de Alta Presión (por sus siglas en Inglés).

**Headspace:** Técnica del vapor sobrenadante.

**LOD:** Limit of detection

**M<sup>+</sup>** Ion molecular.

**MS:** Espectrometría de masas (por sus siglas en Inglés).

**MSTFA:** N-Trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (por sus siglas en Inglés).

**MTBSTFA:** N-metil-N-terbutil-dimetilsililtrifluoroacetamida (por sus siglas en Inglés).

**NIST:** Instituto Nacional de Estándares Tecnología de los USA (por sus siglas en Inglés).

**PA:** Poliacrilato (por sus siglas en Inglés).

**PB:** Pico base.

**PDMS:** Polidimetilsiloxano (por sus siglas en Inglés).

**rpm:** Revoluciones por minuto.

**TMSC:** Trimetilclorosilano (por sus siglas en Inglés).

**tr:** Tiempo de retención.

**SIM:** Monitoreo Selectivo de iones (por sus siglas en Inglés).

**SPME:** Microextracción en Fase Sólida (por sus siglas en Inglés).

## 1. INTRODUCCIÓN.

En el presente trabajo se analizaron muestras y residuos provenientes de una vasija encontrada en una exploración arqueológica del Estado de Veracruz.

Debido a que la vasija tiene una gran decoración, se planteó la hipótesis de que se utilizó con fines ceremoniales. Sin embargo, los principales usos de estas vasijas eran para la alimentación. Como esta opción no se podía descartar a priori, este trabajo se enfoca en la búsqueda de componentes característicos de alguna fuente de alimento.

Entre estas fuentes se encuentran, la cera de las abejas, las bebidas alcohólicas fermentadas, el cacao, las resinas y los alquitranes. Sin embargo, las grasas animales de diferentes orígenes son, por mucho, las sustancias más frecuentemente encontradas en recipientes de cerámicas arqueológicas. Los ácidos grasos más comúnmente encontrados en los fragmentos cerámicos son el ácido mirístico, el palmítico, el esteárico, el araquídico, el palmitoleico, el oleico y sus formas dicarboxílicas como los adipatos.

Debido a una amplia distribución en el registro arqueológico y al valor significativo para comprender las sociedades del pasado, estas sustancias claves han sido centro de numerosas investigaciones analíticas realizadas durante los últimos años.

La técnica más ampliamente utilizada para el análisis de ácidos grasos en matrices arqueológicas ha sido la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En este trabajo se planteó además utilizar la técnica de Microextracción en Fase Sólida para la concentración de la muestra y optimizar los diferentes parámetros que influyen en la eficiencia de la extracción.

Con estos análisis se busca determinar el posible uso del recipiente. Junto con estos datos, los arqueólogos podrán tener una aproximación a la dieta de la antigua comunidad.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general.

Optimizar los parámetros que influyen en la extracción de los ácidos grasos para el análisis por Microextracción en Fase Sólida (SPME).

### 2.2 Objetivos particulares.

- Establecer las condiciones optimas de análisis de los ácidos grasos por Cromatografía de Gases
- Determinar las condiciones de reacción de formación del derivado apropiadas para obtener el mayor rendimiento.
- Aplicación de un tratamiento de muestra para la recuperación de los ácidos grasos de residuos arqueológicos. Uso de Extracción Soxhlet y saponificación.
- Aplicación de la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) para la pre-concentración de la muestra arqueológica.
- De acuerdo a la los ácidos grasos extraídos en el análisis cualitativo por Espectrometría de Masas y valorar así el contenido del recipiente para discernir su uso por medio de la identificación de ácidos grasos.

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1 Ácidos grasos.

Los ácidos grasos son muy importantes porque los lípidos son uno de los tres principales componentes de los alimentos. Las principales fuentes de lípidos en la dieta son los aceites vegetales y los diferentes productos alimenticios de origen animal. <sup>1</sup>

Los ácidos grasos son los constituyentes principales de grasas y aceites y se producen en la naturaleza como triglicéridos, que consisten en tres ácidos grasos unidos a una molécula de glicerol por enlaces éster. <sup>2</sup>

Los triglicéridos se clasifican en simples y mixtos dependiendo de su composición; los primeros poseen los tres ácidos grasos idénticos mientras que en los segundos la glicerina se encuentra esterificada por ácidos grasos diferentes. La mayoría de los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza son mixtos. <sup>3</sup>

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la estructura de un triglicérido. <sup>4</sup>

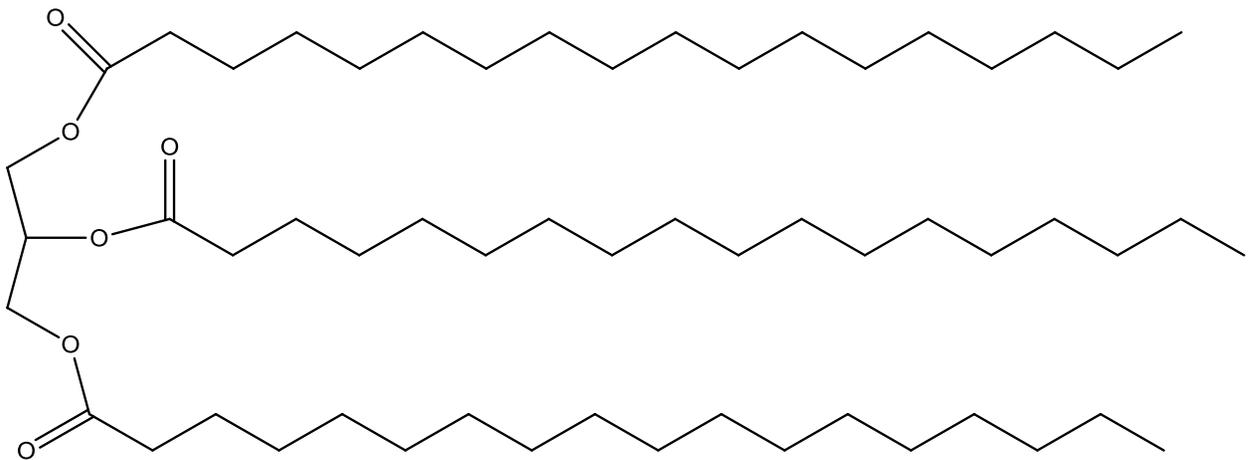


Figura 1. Ejemplo de un triglicérido y sus componentes.

En función del número de átomos de carbono que contienen, los ácidos grasos suelen clasificarse en: ácidos grasos de cadena corta (menos de seis átomos de carbono); ácidos grasos de cadena media (de seis a diez átomos de carbono); y ácidos grasos de cadena larga (de doce o más átomos de carbono). También pueden clasificarse en función del número de dobles enlaces que contienen: ácidos grasos saturados (que no contienen ningún doble enlace); ácidos grasos

monoinsaturados (que contienen un doble enlace); y ácidos grasos poliinsaturados (que contienen dos o más dobles enlaces).<sup>4</sup>

Los ácidos grasos saturados no presentan dobles enlaces en su molécula y en consecuencia son muy poco reactivos, su fórmula empírica queda expresada por  $C_nH_{2n}O_2$ , abundan en las grasas animales. El punto de fusión de éstos se incrementa con el tamaño de la cadena hidrocarbonada. La solubilidad disminuye a medida que aumenta la longitud de la cadena.<sup>3</sup> Algunos ácidos grasos saturados comunes en la dieta son el butírico (presente en la mantequilla), el láurico (presente en la leche materna, el aceite de coco y el aceite de palma), el mirístico (que se encuentra en la leche y los productos lácteos), el palmítico (presente en el aceite de palma y en la carne) y el esteárico (abundante en la carne y en la grasa de cacao).<sup>4</sup>

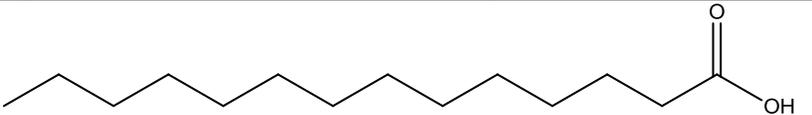
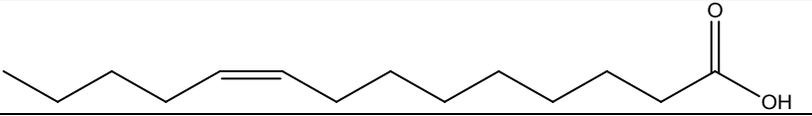
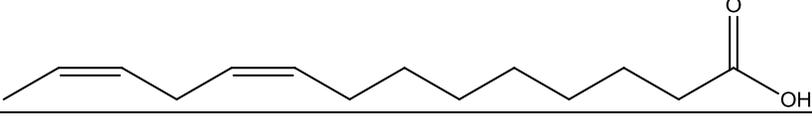
Los ácidos grasos no saturados poseen mayor reactividad química que los saturados debido a la presencia de dobles enlaces covalentes en su molécula; así por ejemplo, la sensibilidad a las reacciones de oxidación es directamente proporcional al grado de insaturación. En lo referente al punto de fusión, este disminuye con el aumento del número de dobles enlaces presentes en la molécula.<sup>3</sup> Pueden diferenciarse dos tipos:

Ácidos grasos monoinsaturados, abundan en algunos aceites vegetales. El más importante en la dieta es el ácido oleico, muy abundante en el aceite de oliva.

Ácidos grasos poliinsaturados, son ácidos grasos que contienen en su molécula de dos a seis dobles enlaces, habitualmente separados entre sí por un grupo metileno ( $-CH_2-$ ) y en la configuración cis.

En la Tabla 1 se muestran los tipos de ácidos grasos según el número de dobles enlaces.

Tabla 1. Tipos de ácidos grasos según el número de dobles enlaces.

TIPOS DE ÁCIDOS GRASOS (según el número de dobles enlaces)	
Saturados (sin dobles enlaces)	
Monoinsaturados (con un doble enlace)	
Poliinsaturados (con más de un doble enlace)	

La dieta contiene pequeñas cantidades de otros lípidos como los isoprenoides, también llamados terpenoides que son lípidos formados por repeticiones de unidades de cinco átomos de carbono o unidades de isoprenos. En la mayoría, son de origen vegetal, fúngico o bacteriano.<sup>4</sup>

Es importante destacar que los ácidos grasos insaturados se encuentran en gran abundancia en peces y plantas, mientras que las grasas de mamíferos contienen altos niveles de ácidos grasos saturados.<sup>6</sup>

La distinción entre grasas y aceites se basa en el estado físico de los lípidos a la temperatura ambiente. Las grasas a temperatura ambiente son sólidas, debido a que en su estructura predominan los ácidos grasos saturados. Sin embargo, los aceites al tener una mayor proporción de ácidos grasos insaturados, son líquidos a temperatura ambiente.<sup>5</sup>

Las características del aceite quedan determinadas por los ácidos grasos que lo constituyen, es decir que sus propiedades finales dependen del grado de saturación, de los radicales sustituyentes y de la isomería. Los ácidos grasos son de naturaleza mono carboxílica y en general contienen un número par de átomos de carbono; sin embargo, también existen ácidos grasos con número impar de átomos de carbono, los que derivan de la metilación de un ácido graso de cadena par.<sup>3,7</sup>

En la Tabla 2 se muestra la composición de ácidos grasos en algunos aceites y grasas.<sup>8</sup>

Tabla 2. Composición de ácidos grasos en algunas grasas y aceites.

Grasa↓→	Butírico	Caproico	Caprílico	Cáprico	Láurico	Mirístico	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico
Cadena→	4	6	8	10	12	14	16	18	18:1	18:2	18:3
Algodón							21	2	28	44	
Cacao							25	35	32	3	
Cacahuate							11	3	52	30	
Cánola							6	2	57	20	9
Cártamo							6	2	12	76	
Coco			6	4	47	19	8	3	6	2	
Girasol							7	5	22	61	
Maíz							6	2	35	52	
Manteca de cerdo							26	14	44	9	
Mantequilla	4	2	1	3	3	14	37	12	13	2	
Palma						3	52	5	18	12	2
Palmiste					48	16	8	3	16		
Oliva							13	3	75	7	
Soya							10	2	19	62	3

### 3.2 Muestras arqueológicas.

Los análisis químicos aplicados a la arqueología se han utilizado desde hace mucho tiempo. Los primeros análisis estudiaban solo la materia inorgánica. El objeto de estudio eran los elementos arqueológicos en sí, cerámicos, utensilios de piedra, metálicos, etc. El fin era conocer tanto el origen como su composición.<sup>10</sup>

Posteriormente se empieza a realizar el estudio de indicadores químicos y bioquímicos presentes en los residuos de dichos materiales.<sup>9,10</sup> Un biomarcador se define como aquella sustancia que se produce en los residuos orgánicos y proporciona información relativa a actividades humanas en el pasado.<sup>11</sup>

En un gran número de estudios de materiales arqueológicos se han identificado ácidos grasos como: adhesivos orgánicos, residuos de suelos en hogares, pinturas rupestres, botellas de vidrio, lámparas de aceite, restos de pigmento y cueros.<sup>6</sup>

Uno de los indicadores químicos más estudiados son los lípidos, cuya presencia habitual en diversos alimentos los hacen idóneos para la determinación del contenido. Dentro de este grupo se encuentran compuestos de interés como:

- A) Ácidos grasos: Los más comúnmente encontrados en fragmentos arqueológicos son ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido palmitoleico y ácido oleico.
- B) Aglicerolos: Son componentes abundantes en grasas y aceites tanto de origen vegetal como animal, y se forman por una reacción de esterificación entre el glicerol y los ácidos grasos.
- C) Esteroles: Son alcoholes de alto peso molecular. El colesterol es el más abundante en los animales, y el campesterol y sitosterol en las plantas.

Otros indicadores de diferente tipo de contenido son el oxalato de calcio como indicio de la cerveza y el ácido tartárico como compuesto característico del vino.

12-15

Los residuos orgánicos conservados en los residuos arqueológicos son explotados por los arqueólogos como fuente de evidencia de las actividades humanas a través del tiempo. Estos estudios son de vital importancia, no solo para entender la producción y la función de los objetos relacionados, sino también para obtener información sobre la explotación, el conocimiento técnico y el comercio de los recursos naturales.<sup>16,17</sup>

También sirven para la comprensión y la reconstrucción del comportamiento social y cultural de las sociedades antiguas. Ampliar nuestra comprensión de las prácticas de cocina, estrategias de la dieta y de subsistencia en general.<sup>2,12</sup>

Los objetos de cerámica, como las vasijas, son los artefactos más comúnmente encontrados en sitios arqueológicos.<sup>18</sup>

La función de una vasija tiene que ver con el propósito para el cual fue confeccionada, dividiéndose genéricamente en tres categorías: almacenamiento, procesamiento y transporte. En cambio el uso, está vinculado a la forma específica en que se utiliza una vasija para un determinado proceso.<sup>19</sup>

La materia orgánica se puede encontrar adherida a la superficie o estar atrapada en la matriz porosa del cerámico, lo que permite la extracción de los lípidos con disolventes orgánicos.<sup>20</sup>

Los residuos orgánicos se pueden encontrar en tres formas principales:<sup>11,21</sup>

- a) Contenido real *"in situ"*, lo cual es muy raro.

- b) Residuos superficiales que aparecen visibles en el exterior o en el interior, deposiciones de hollín y residuos carbonizados.
- c) Residuos absorbidos, que se mantienen conservados. Son los más comunes.

Las técnicas tales como Resonancia Magnética Nuclear, Cromatografía en capa fina en conjunto con la Espectroscopia de Infrarrojo o Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución son útiles para proporcionar “huellas digitales” de los residuos orgánicos. Sin embargo, la Cromatografía de Gases en combinación con Espectrometría de Masas es la técnica más útil para el análisis de lípidos, ya que permite la identificación estructural de los compuestos individuales, proporcionando mejores oportunidades para la caracterización del residuo orgánico.<sup>18</sup>

Si la determinación se realiza en su forma libre, la sensibilidad y reproducibilidad son muy pobres. Para los ácidos de cadena corta se debe a que son muy polares y solubles en agua y posiblemente adsorbidos en la columna, especialmente a bajas concentraciones (<1mmol/L). Para ácidos de cadena larga se debe a sus bajas volatilidades e incompatibilidad con fases estacionarias que no permiten una adecuada separación.<sup>22,23</sup>

Para estos estudios es necesaria una detección muy sensible, debido a la escasez general de los residuos arqueológicos y a la baja concentración de los triglicéridos.<sup>16</sup>

### **3.3 Conservación de los ácidos grasos en muestras arqueológicas.**

El grado de conservación de los lípidos puede depender de las condiciones de enterramiento, del material cerámico y de la carbonización.<sup>13,14</sup>

La influencia de la degradación de los lípidos durante el uso del vaso y el entierro es una de las principales consideraciones en los estudios de residuos orgánicos en cerámicos arqueológicos. Todos los lípidos pueden ser degradados por microorganismos dependiendo de: la naturaleza bioquímica del residuo, los modos de uso y la forma de su entierro.<sup>11,21</sup>

La conservación se favorece cuando se tienen condiciones homogéneas a lo largo del enterramiento. También los residuos pueden ser protegidos por una barrera carbonizada que se forma cuando los tejidos orgánicos se carbonizan a baja temperatura. Finalmente, debido a las características de la matriz arcillosa de las cerámicas, los lípidos pueden quedar atrapados en ella, permaneciendo protegidos de agresiones degradativas externas.<sup>13,14</sup>

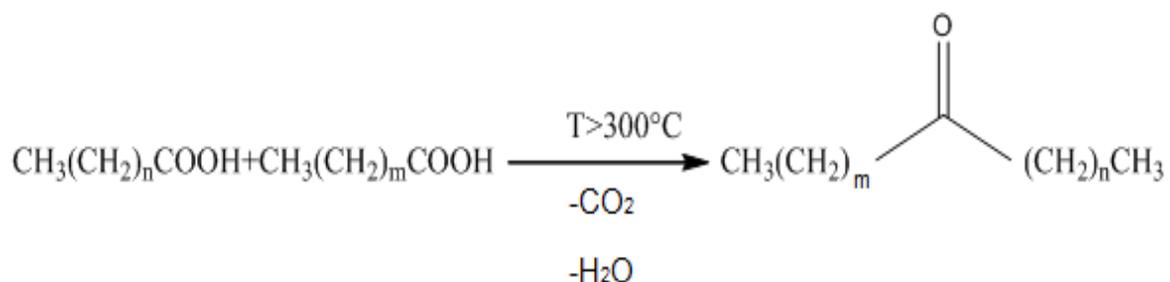
Los lípidos pueden sufrir procesos degradativos y/o de contaminación, como son:<sup>13,14</sup>

- Hidrólisis: proceso provocado por la humedad, temperatura, enzimas y diversos microorganismos. Produce la ruptura del enlace éster, dando lugar a la liberación de los ácidos grasos que forman parte de los agliceroles.
- Oxidación: ciertos grupos funcionales presentes en los lípidos son particularmente sensibles a la oxidación. Entre ellos se encuentran los dobles enlaces, y en consecuencia, los ácidos grasos insaturados sufrirán en mayor medida este proceso.
- Degradación microbiológica: la materia orgánica enterrada puede sufrir procesos degradativos por microorganismos activos en la matriz.
- Otros procesos que pueden ocurrir son los de contaminación post-excavación con ftalatos debido al almacenamiento de las muestras en plásticos. También pueden encontrarse simultáneamente los compuestos exclusivos de cierto tipo de especie, animal o vegetal, esto podría indicar la reutilización del recipiente.<sup>13,14</sup>

Son menos propicias para la preservación las condiciones ambientales relativamente cálidas y húmedas. Otra razón para la ausencia de moléculas conservadas es que en algún momento de su historia el cerámico fue expuesto a altas temperaturas provocando la degradación de los compuestos.<sup>12</sup>

Se han identificado una gama de compuestos que son productos de la transformación térmica de los lípidos, formados durante el uso del recipiente.

Las cetonas son componentes que provienen de plantas, sin embargo no se han visto en la naturaleza cetonas de cadena larga. Estas pueden formarse al calentar las grasas a altas temperaturas. En el Esquema 1 se muestra la reacción que se lleva a cabo para la formación de estas cetonas.<sup>11,21</sup>

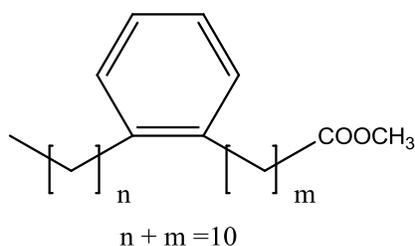


Esquema 1. Reacción de ácidos grasos a altas temperaturas.

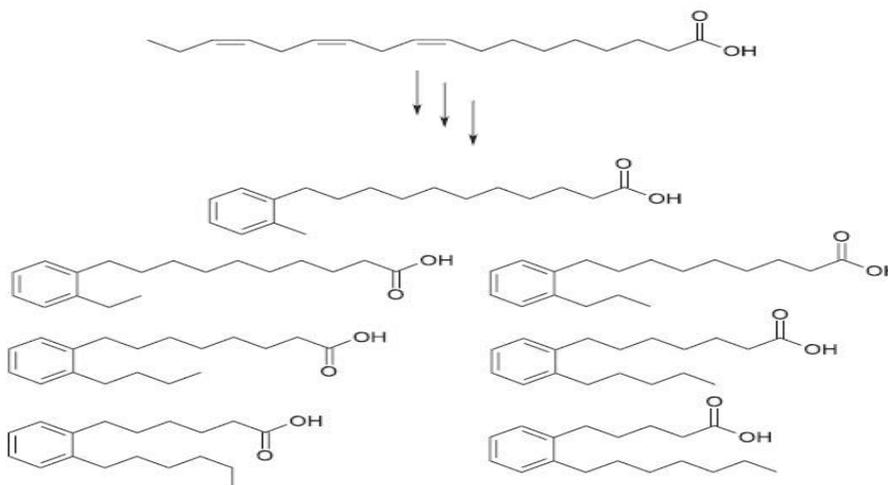
Tabla 3. Posibles combinaciones de las cadenas hidrocarbonadas.

n = 12, m = 15	n = 12, m = 13
n = 13, m = 14	n = 13, m = 16
n = 14, m = 14	n = 14, m = 15
n = 14, m = 16	n = 15, m = 16
n = 16, m = 16	

Otros compuestos observados son los ácidos alcanoicos o-(o-alkilfenilo) con dieciséis a veinte átomos de carbono. Estos compuestos se forman cuando los ácidos grasos mono, di y tri-saturados son calentados a 270°C en una vasija. Estos residuos pueden servir como indicadores de un alto contenido de aceites marinos los cuales presentan abundante concentración de ácidos grasos insaturados. En el Esquema 2 se muestra la estructura general del compuesto formado por la reacción de ácidos grasos saturados a alta temperatura, y en el Esquema 3 diferentes productos formados a partir del ácido- $\alpha$ -linoleico. <sup>11,21</sup>



Esquema 2. Estructura de los ácidos alcanoicos o-(o-alkilfenilo).



Esquema 3. Ejemplo de ciclación y aromatización de ácidos grasos insaturados debido a altas temperaturas.

### 3.4 Extracción por Soxhlet.

Es un método de extracción continuo que se utiliza para materiales sólidos. El sólido que se va a extraer, previamente molido y pesado, se coloca en un cartucho de celulosa que se introduce en la cámara de extracción conectada por una parte a un matraz bola y por otra a un refrigerante. El disolvente contenido en el balón de destilación se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante, cayendo dentro del cartucho que contiene el sólido. El disolvente caliente empieza a llenar el cartucho y extrae el compuesto deseado.

Una vez que el cartucho se llena con el disolvente, el brazo de la derecha que se muestra en la Figura 2 actúa como sifón, y el disolvente se regresa al matraz de bola. El ciclo de vaporización-condensación-extracción-evacuación por el sifón, se repite varias veces, y el producto deseado se concentra en el matraz de bola.<sup>24,25</sup>

Las ventajas más importantes son el contacto continuo de la muestra con una porción fresca de disolvente, la simplicidad, bajo costo de adquisición y la posibilidad de procesar grandes cantidades de muestra.<sup>26</sup>

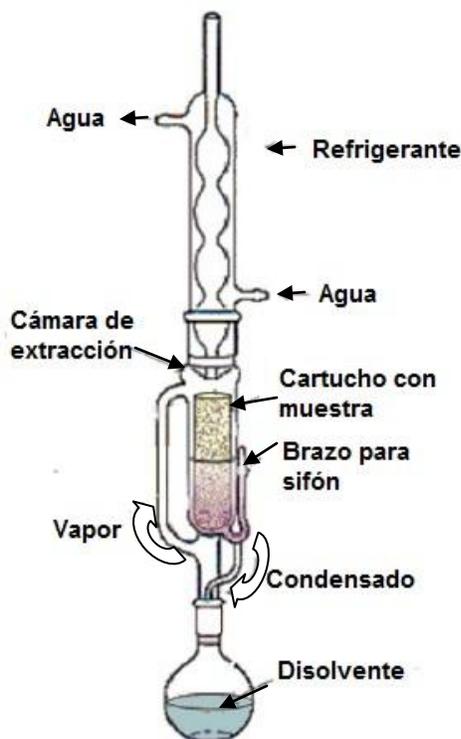


Figura 2. Componentes de un extractor por Soxhlet.<sup>27</sup>

### 3.5 Microextracción en fase sólida (“SPME”).

La Microextracción en Fase Sólida (SPME-Solid Phase Microextraction) es una técnica rápida, simple y sensible, que no requiere el uso de disolventes.

La técnica de SPME consiste en una fibra recubierta con un líquido (polimérico), un sólido (adsorbente) o una combinación de ambos. La fibra recubierta remueve los analitos de una muestra por absorción en caso de recubrimientos líquidos o adsorción en el caso de recubrimientos sólidos. Es un método de preparación de muestra para remover de una matriz una porción de los analitos de interés.

La partición de analitos los entre la muestra y el revestimiento tiende hacia el equilibrio. Mediante el uso de una jeringa modificada, la fibra puede ser manipulada ya sea para la extracción como la desorción de los analitos.<sup>28-30</sup> En la Figura 3 se muestra el dispositivo de una fibra de SPME.

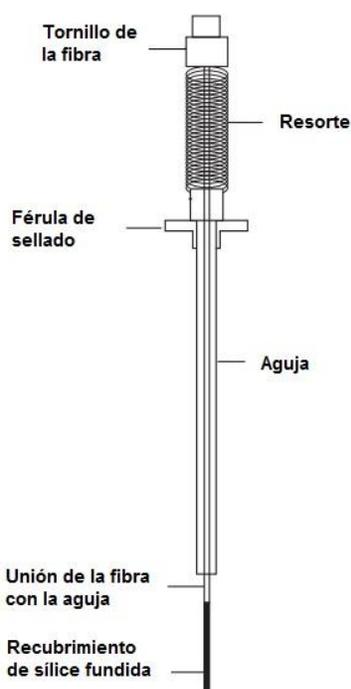


Figura 3. Dispositivo para SPME.

La fibra es colocada en un soporte para poder manipularla. Este se muestra en la Figura 4.<sup>30</sup>

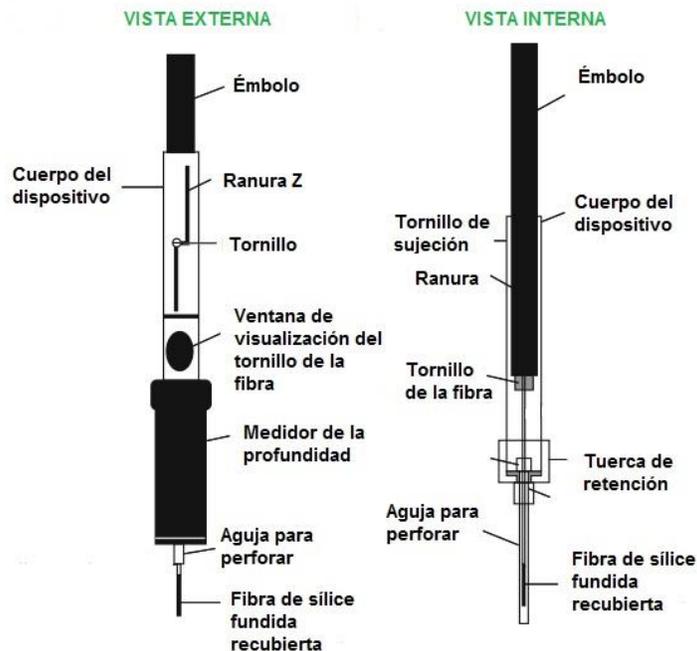


Figura 4. Soporte para fibra de SPME. Del lado izquierdo la fibra se encuentra expuesta y en el lado derecho la fibra se encuentra retraída en la aguja.

Los revestimientos se dividen en dos categorías: recubrimientos líquidos de alta viscosidad y recubrimientos sólidos. Para recubrimientos líquidos, la extracción de los analitos se obtiene mediante la absorción. Para recubrimientos sólidos, la extracción de los analitos se basa en la adsorción, en el que los analitos solo podrán permanecer en la superficie del recubrimiento.<sup>31</sup>

En la Figura 5 se muestra la estructura de algunos polímeros que recubren la fibra.  
30

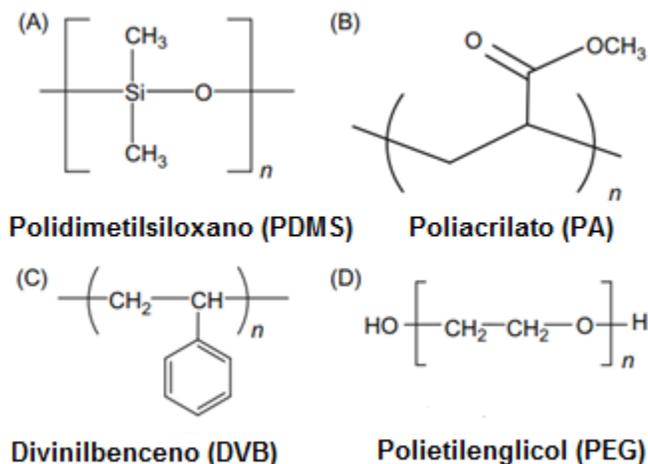


Figura 5. Estructura de los polímeros utilizados en SPME.

En la Tabla 4 se muestran algunas características de las diversas fibras que se encuentran disponibles comercialmente.

Tabla 4. Características de diferentes fibras para SPME.<sup>30</sup>

Tipo de recubrimiento y grosor de la película	Mecanismo de extracción	Polaridad	Temperatura máxima de trabajo (°C)	Temperatura de trabajo establecido en la literatura (°C)	Intervalo de pH de trabajo establecido en la literatura.
PDMS de 7µm	Absorción	No polar	320	200-320	2-11
PDMS de 30µm	Absorción	No polar	300	200-300	2-11
PDMS de 100µm	Absorción	No polar	300	200-300	2-10
PA de 85µm	Absorción	Polar	320	220-320	2-11
PEG de 60µm	Absorción	Polar	250	200-240	2-9
PDMS-DVB de 65µm	Adsorción	Bipolar	270	200-270	2-11
DVB/Carboxen-PDMS de 55µm	Adsorción	Bipolar	270	230-270	2-11
Carboxen-PDMS de 85µm	Adsorción	Bipolar	320	250-320	2-11

En el proceso de SPME se pueden diferenciar dos etapas. En la primera, la fibra se pone en contacto con la muestra durante un tiempo a una temperatura y agitación determinada, hasta llegar al equilibrio, situación en que la extracción se considera completa. A esta etapa la sigue otra de desorción de los analitos retenidos en la fibra para sus análisis por CG (Figura 6).<sup>32,33</sup>



Figura 6. Proceso de Microextracción en fase sólida (SPME).

Existen tres modos de extracción con SPME: <sup>32,34</sup>

- A) Inmersión: La fibra es colocada dentro de la muestra líquida. Este modo de extracción es usado con analitos polares
- B) Vapor Sobrenadante (Head-space): la muestra se coloca en un vial cerrado herméticamente con un sello de silicon (septa), dejando un espacio suficiente de aire entre la superficie de la misma y el septa, proceso llamado "Head-space". Esta técnica es usada para compuestos volátiles.
- C) Con protección de membrana: se lleva a cabo colocando una membrana semipermeable alrededor de la fibra, impidiendo que compuestos con elevado peso molecular lleguen a la fibra y puedan dañarla. Este modo de extracción es menos común.

En la Figura 7 se muestran los tres modos de extracción. <sup>34</sup>

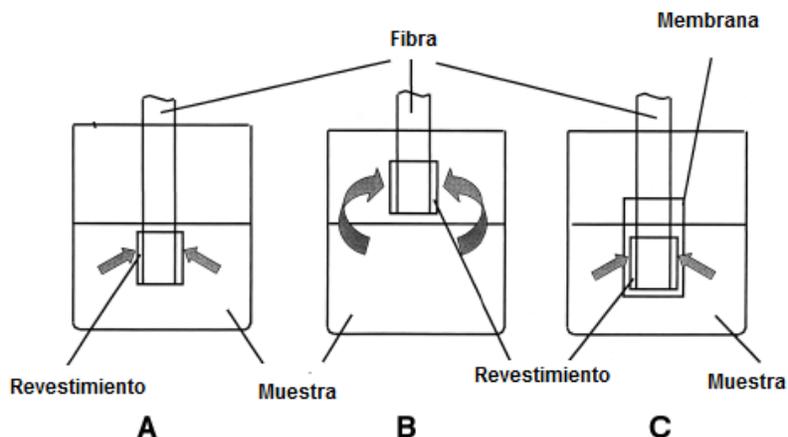


Figura 7. Modos de extracción. A) Inmersión, B) Head-space C) Con protección de membrana.<sup>34</sup>

Cuando la fibra es expuesta a la matriz de la muestra, la concentración del analito en el polímero cambia con el tiempo como se muestra en la Figura 8. En la región lineal el analito extraído es directamente proporcional a su concentración en la muestra.<sup>35</sup>

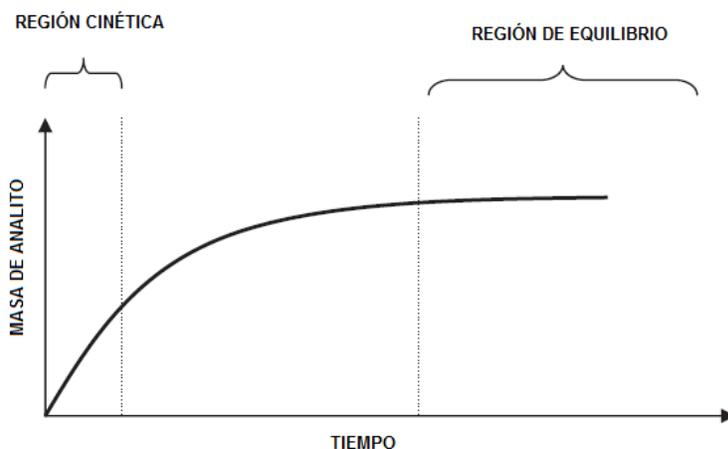


Figura 8. Masa del analito extraída en función del tiempo.<sup>35</sup>

Para la elección del recubrimiento hay cuatro criterios principales:<sup>30</sup>

- Peso molecular y tamaño del analito.
- Polaridad del analito.
- Nivel e intervalo de concentración.
- Complejidad de la muestra.

De acuerdo a las propiedades del analito, como volatilidad y polaridad, puede elegirse cierto recubrimiento, como se muestra en la Figura 9.

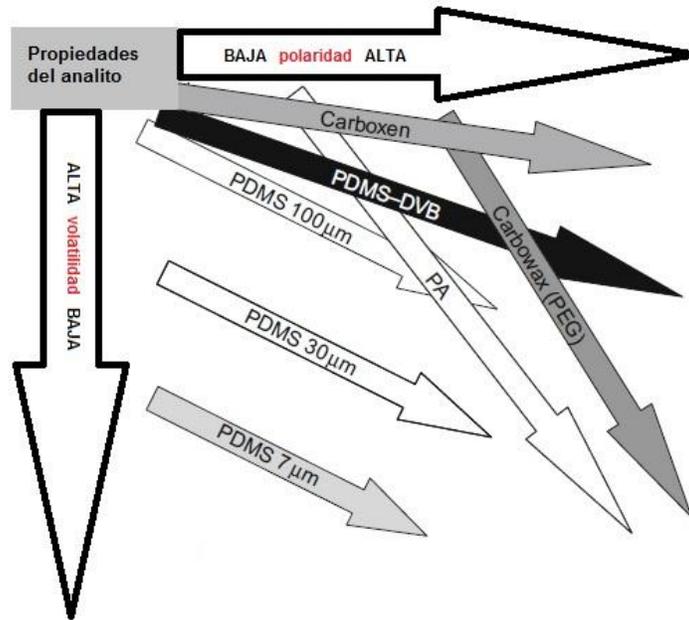


Figura 9. Tipos de recubrimientos de acuerdo a las propiedades del analito.<sup>30</sup>

### 3.5.1 Fibra de Polidimetilsiloxano (PDMS).

La primera aplicación notable del recubrimiento de PDMS en química analítica fue como fase estacionaria en Cromatografía Gas-Líquida (GLC-Gas Liquid Chromatography).

El PDMS consiste en una columna vertebral flexible de (Si-O) y una repetición de unidades de (Si(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>O). Es un polímero no tóxico, altamente hidrofóbico y translúcido. A pesar de que el PDMS no es reactivo a muchos productos químicos, tiende a hincharse cuando se expone a disolventes hidrófobos.<sup>35</sup>

En el caso del PDMS, dos parámetros que se utilizan a menudo para describir las propiedades de adsorción y absorción del polímero son: solubilidad y coeficiente de reparto. Estos dos parámetros son propiedades termodinámicas y definen la concentración relativa de un analito en el equilibrio entre PDMS y la matriz que se encuentra en contacto con el polímero. Los analitos son absorbidos por esta fase.<sup>35</sup>

En la Figura 10 se muestra el dispositivo de SPME, que consiste en la fibra de sílice fundida recubierta con una fase de extracción tal como el PDMS.

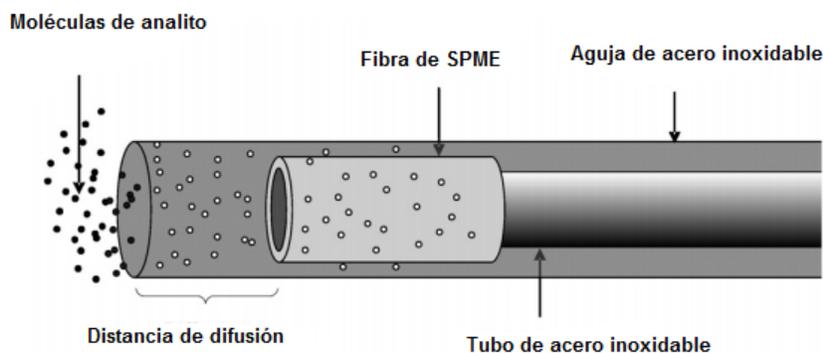


Figura 10. Dispositivo de SPME. <sup>35</sup>

La sección recubierta es típicamente de 1 cm de largo y se encuentra dentro de una aguja de acero inoxidable. Las fibras de PDMS están disponibles comercialmente en tres espesores diferentes: 7, 30 y 100  $\mu\text{m}$ . <sup>35</sup>

El actual interés de esta técnica de extracción se encuentra centrado en reducir los costos de análisis y minimizar o eliminar los disolventes orgánicos tóxicos ayudando así, de gran manera el cuidado del medio ambiente. Por lo tanto, los métodos de microextracción son alternativas modernas para los procedimientos de extracción y preparación de las muestras. En esta técnica, los analitos se extraen y se concentran en un solo paso. Algunas desventajas incluyen que las fibras pueden romperse, los revestimientos pueden desprenderse, las agujas pueden doblarse y su alto costo. <sup>36</sup>

### 3.5.2 Parámetros que influyen en el proceso de extracción.

La eficiencia del proceso de extracción por SPME se ve afectada por una serie de variables experimentales. Estas variables deben de ser optimizadas para cada aplicación concreta. Entre los parámetros se encuentran: <sup>32</sup>

**Tiempo de extracción:** Es el tiempo necesario para llegar al equilibrio con el revestimiento de la fibra. Generalmente se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio debido a que en algunos casos este tiempo es demasiado elevado. El tiempo de extracción dependerá del tamaño molecular de los analitos y de su concentración, el recubrimiento de la fibra y del tipo de extracción seleccionado.

Los tiempos de extracción son más cortos cuando:

- Se analizan compuestos pequeños (<150 MW).
- Se utilizan revestimientos de fibra más fina, de tipo absorbente.
- Se utiliza la técnica de "Head-space".

- Se trabaja con muestras de concentración suficientemente elevada (desde  $\mu\text{g/L}$  hasta  $\text{mg/L}$ ).<sup>37</sup>

Temperatura de extracción: El uso de calor durante las extracciones por “Head-space” ayudará a liberar el analito de la muestra, mejorar la sensibilidad, y acortar el tiempo de extracción. Por lo que es crítica una temperatura constante para todas las extracciones y así obtener una buena precisión. Y en cambio, si la temperatura es demasiado alta, los analitos pueden ser expulsados de la fibra, reduciendo la sensibilidad.

Cuando se utilizan fibras con fase líquida, en general, no es necesario calentar la muestra cuando se realiza por inmersión. Sin embargo, para algunas aplicaciones con componentes no volátiles o semivolátiles, una pequeña cantidad de calor aplicado puede acortar el tiempo de equilibrio.<sup>37</sup>

Agitación: La agitación de la muestra es importante para reducir el tiempo de equilibrio. Mediante la agitación se facilita la difusión de los analitos hacia el revestimiento de la fibra. Mantener una agitación constante entre todas las extracciones genera resultados precisos.

El parámetro de la agitación puede llevarse a cabo utilizando una barra magnética, ultrasonido o por vibración son métodos adecuados para agitar la muestra. También puede utilizarse la agitación con las extracciones de “Head-space”.<sup>37</sup>

Ajuste de fuerza iónica y de pH: Pueden mejorar la eficiencia de la extracción cambiando la solubilidad de los analitos en la muestra. Esto puede obtenerse por la adición de un 25-30% de una sal inorgánica (peso/volumen) lo que aumentará la fuerza iónica de la muestra, y lo que reduce la solubilidad del analito. La adición de una sal inorgánica es especialmente útil cuando se analizan compuestos polares en muestras acuosas. Con respecto a utilizar disoluciones reguladoras de pH en la muestra ayuda también para disminuir la solubilidad del analito.<sup>37</sup>

### 3.6 Formación de derivados.

Algunos compuestos altamente polares requieren formación de un derivado con el fin de poder ser analizados en la columna cromatográfica. Cuando los analitos de la muestra presentan grupos funcionales polares (R-OH, R-COOH, R-CO-R, R-NH<sub>2</sub>, R-CONH-R) y no son volátiles deben previamente a su análisis por CG formar un derivado mediante una reacción química. Hay compuestos menos polares que pueden ser determinados por cromatografía de gases sin formar derivados, sin embargo, están sujetos a la absorción de los sitios activos la columna. Los picos cromatográfico representados por estos compuestos pueden presentar una fuerte adsorción al inicio o al final del mismo (cabeceo o coleo respectivamente). La formación de un derivado elimina estos problemas.<sup>38</sup>

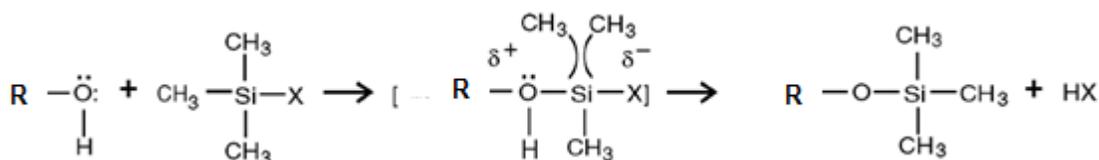
También mejoran los límites de detección (LOD-Limit of detection).<sup>39</sup>

En el análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases con fases estacionarias no polares produce picos anchos y no simétricos, límites de detección pobres y reproducibilidad insatisfactoria. Debido a estos problemas, los ácidos carboxílicos requieren el uso de la formación de derivados menos polares sin átomos de hidrógeno activos. Los métodos de formación de un derivado más usados son:<sup>36,40</sup>

**Esterificación:** la conversión de ácidos grasos a ésteres, especialmente ésteres metílicos que producen mejores resultados. El hidrógeno activo de los ácidos carboxílicos se sustituye por un grupo alquilo, de modo que la polaridad de los derivados producidos se reduce y aumenta su estabilidad térmica

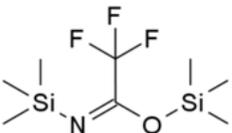
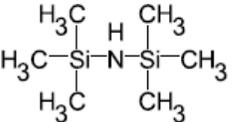
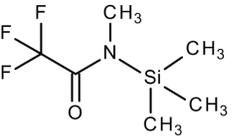
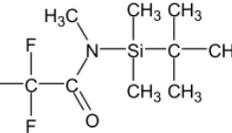
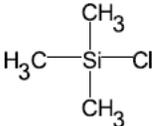
**Sililación:** Es otra reacción de formación de un derivado en el que el grupo carboxilo puede reaccionar con reactivos de sililación suaves. Los derivados sililados son más volátiles y más estables. La principal desventaja de esta reacción es la sensibilidad a la humedad, tanto de los reactivos como de los derivados.<sup>36,40</sup>

La sililación es la introducción de un grupo trimetilsilicio (tms) en una molécula, por lo general en sustitución de un hidrogeno activo, reduciendo la polaridad del compuesto. En el Esquema se muestra la reacción general para la formación de un producto sililado (Esquema 4).<sup>39</sup>



Esquema 4. Reacción general en la formación de un derivado sililado.

Tabla 5. Ejemplos de reactivos sililantes más usados. <sup>41</sup>

Nombre químico.	Abreviatura.	Estructura.
N,O- Bis(trimetilsil)trifluoroacetamida	BSTFA	
Hexametildisilazano	HMDS	
N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamina	MSTFA	
N-metil-N-terbutil- dimetilsililtrifluoroacetamida	MTBSTFA	
Trimetilclorosilano	TMSC	

La formación de un derivado, junto con la microextracción en fase sólida, no solo ha permitido mejoras en la recuperación, sino también en la separación, selectividad y/o sensibilidad de los métodos analíticos. <sup>42</sup>

Usando la técnica de SPME la reacción entre el analito y el reactivo sililante puede llevar a cabo en tres modos diferentes: <sup>42</sup>

- 1) Formación de un derivado en la matriz de la muestra: Su objetivo es obtener derivados más volátiles de analitos polares presentes en una disolución. La formación del derivado se realiza en la matriz que contiene el analito, y posteriormente el derivado es extraído de la muestra por la fibra (Figura 11). <sup>42</sup>

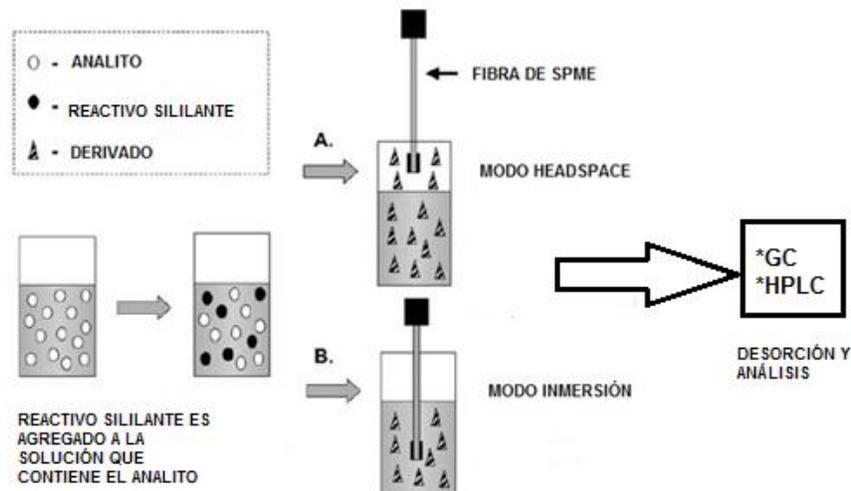


Figura 11. Formación de un derivado en la matriz de la muestra. A) Muestreo por el modo “Head-space” B) muestreo por inmersión.

- 2) Sobre la fibra: Pueden realizarse dos modos de formación de un derivado dependiendo de la volatilidad de los analitos. El primero consiste en la extracción del analito y después, en otro vial la fibra es expuesta a una disolución que contiene el reactivo para formar el derivado y así, formarlo sobre la fibra (Figura 12).<sup>42</sup>

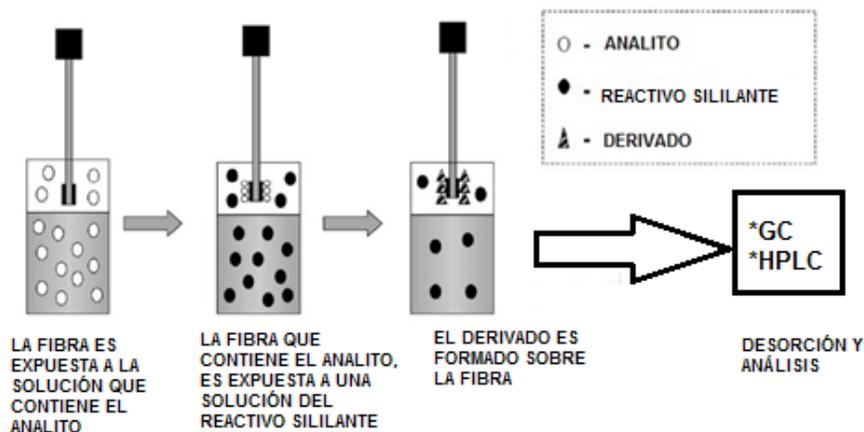


Figura 12. Formación de un derivado sobre la fibra después de realizar la extracción del analito. Generalmente, las moléculas del analito son menos volátiles que las del reactivo para formar el derivado.

En el segundo, la fibra es expuesta al reactivo para formar el derivado y posteriormente a la solución que contiene el analito y así poder realizar la reacción (Figura 13).

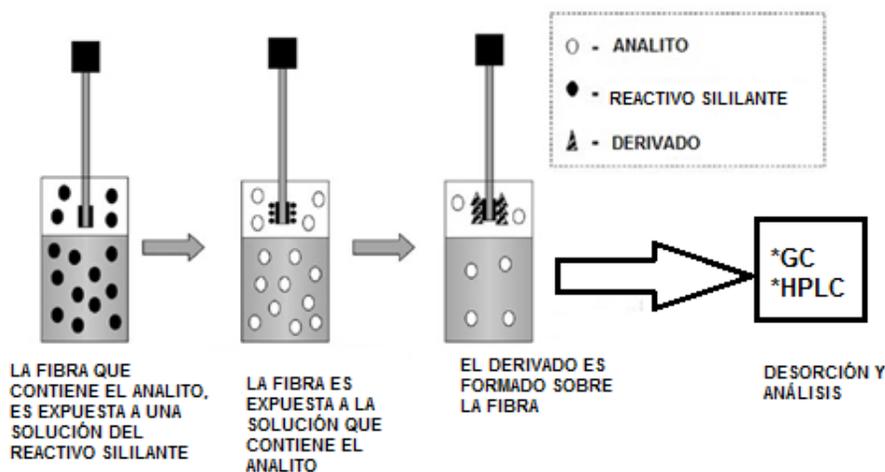


Figura 13. Muestreo simultáneo y formación de un derivado sobre la fibra. Generalmente las moléculas de analito son más volátiles que las del reactivo para formar el derivado.<sup>42</sup>

- 3) En el puerto de inyección: cuando el analito está siendo desorbido en el inyector del Cromatógrafo de gases se lleva a cabo la reacción.<sup>42</sup>

### 3.7 Cromatografía de gases.

La cromatografía es una técnica de separación por interacción de los componentes de una mezcla con dos fases (móvil y estacionaria) con el propósito de obtener información sobre su composición.

Un gas inerte, como el helio, nombrado fase móvil fluye continuamente de un cilindro de gas a través del puerto de inyección, la columna y el detector. Se inyecta la muestra con una microjeringa en el puerto de inyección caliente, donde se vaporiza y se lleva a la columna, típicamente columnas de 15 a 30m de largo y recubiertas en su interior con una delgada película líquida o sólida llamada fase estacionaria.<sup>43</sup>

La muestra se distribuye en la fase estacionaria, se separan en sus componentes individuales con base en la afinidad relativa con la fase y sus presiones de vapor relativos. Después de la columna, la muestra pasa a través de un detector. Este dispositivo mide la cantidad de la muestra, y se genera una señal eléctrica. Esta señal va a un sistema de datos que genera un cromatograma.<sup>43</sup>

La Cromatografía de gases nos proporciona información tanto cualitativa y cuantitativa sobre los componentes individuales de una muestra, utilizando estándares de referencia.

El analito debe de ser volátil a temperaturas inferiores de 350-400 °C. El compuesto tiene que estar en estado gaseoso o de vapor a temperaturas inferiores de 350-400 °C. Otra característica es que el compuesto debe de ser capaz de soportar altas temperaturas y ser transformado rápidamente en vapor sin degradación o reacción con otro compuesto.<sup>44</sup>

En la Figura 14 se muestra el esquema básico de los componentes de un Cromatógrafo de Gases.

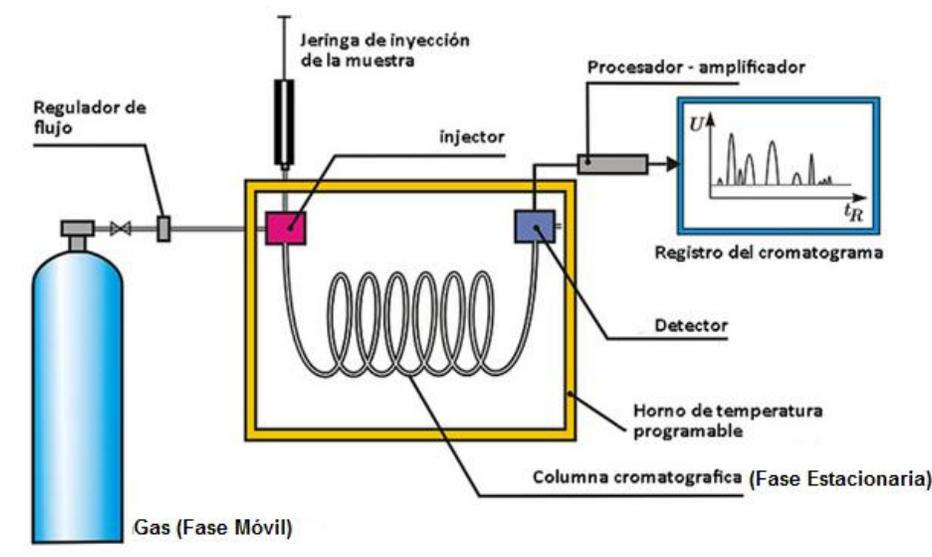


Figura 14. Cromatógrafo de Gases.

Las principales características de cada uno de estos componentes se describirán a continuación:

Fase Móvil: Puede utilizarse como gas acarreador Hidrogeno, Nitrógeno o Helio. Este debe de ser inerte y no puede ser adsorbido por la fase estacionaria.<sup>45</sup>

El propósito principal del gas portador es transportar la muestra a través de la columna. La tasa de flujo del gas es cuidadosamente controlado para asegurar tiempos de retención reproducibles.<sup>43</sup>

Introducción de muestra: Es un dispositivo que permite la introducción de la muestra en la corriente del gas portador. Existen diferentes tipos de sistemas de introducción de muestra según el tipo de muestra que se trata de analizar. Estos

incluyen el on column, el inyector de temperatura programada, "Split" y "Splitless"; estos últimos son los más utilizados.<sup>45,46</sup>

Inyección Split (con divisor de flujo): Este tipo de inyección es adecuado para muestras con altas analitos en altas concentraciones.

Inyección Splitless (sin divisor de flujo): Este inyector ayuda a concentrar la muestra en la parte superior de la columna por lo tanto es usado en análisis a nivel de trazas.<sup>45</sup>

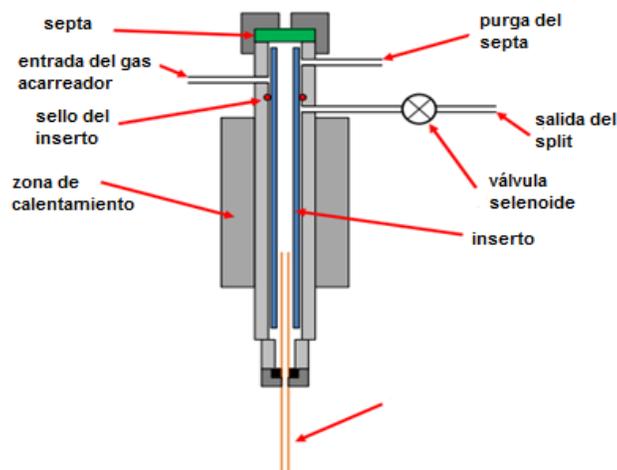


Figura 15. Inyector Split/Splitless.<sup>47</sup>

La muestra es inyectada en un tubo que está fabricado de vidrio o cuarzo llamado inserto. Se utiliza desactivado con un agente químico para prevenir la degradación o la adsorción de los analitos, a su paso por este.

Para sellar la entrada del inyector y facilitar la introducción de la aguja se cuenta con un septa el cual está hecho de diferentes polímeros de silicona. Que soportan diferentes temperaturas de trabajo.<sup>47</sup>

Columna: Parte donde ocurre el proceso de separación. La columna se encuentra en un horno cuya temperatura es controlada con precisión. Las paredes interiores de la columna están recubiertas con una película delgada de material polimérico llamado fase estacionaria.<sup>44</sup> Las columnas más utilizadas hoy en día son las capilares. En la Figura 16 se pueden observar los tres tipos de columnas.<sup>48</sup>

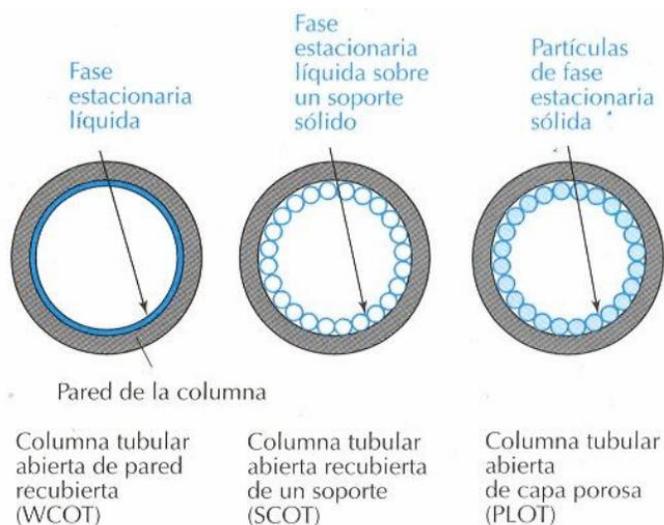


Figura 16. Tipos de columnas capilares. <sup>49</sup>

**Fase estacionaria:** es la encargada de realizar la separación de los componentes de la mezcla y esto depende de los respectivos coeficientes de reparto, o bien, de los coeficientes de actividad de dicha fase. <sup>46</sup>

Existen diferentes tipos de fase estacionaria, ya sean polares, no polares y de mediana polaridad. Una de las fases estacionarias más utilizadas son las del polímero dimetilsiloxano.

Polidimetilsiloxano es relativamente apolar, pero la polaridad y selectividad pueden ser manipuladas, dentro de los límites, por sustitución de los metilos con otros grupos funcionales (por ejemplo fenil, vinil, cianopropil o trifluoropropil).

La fase estacionaria con 5% difenil-95% polimetilsiloxano ha perdurado por muchos años como una de las fases estacionarias más usadas. (Figura 17). <sup>50,51</sup>

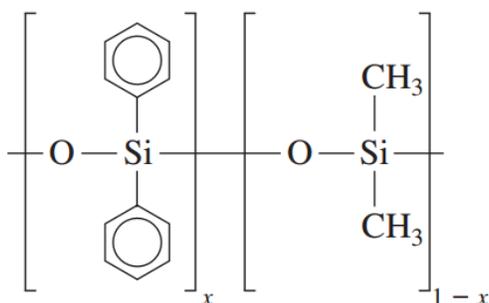


Figura 17. Estructura química de la fase estacionaria de difenil-polimetilsiloxano.

Sistema de detección: Los detectores empleados en cromatografía de gases miden la variación de la concentración de las sustancias que eluyen de la columna, y la mayoría de ellos ofrecen una señal eléctrica proporcional, fácil de medir y de registrar en función del tiempo.

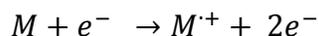
Hay dispositivos que permiten medir de una manera continua una propiedad física del gas portador, que se modifica ampliamente con la presencia de una muy pequeña concentración de la sustancia a analizar (por ejemplo detectores de conductividad térmica, corriente de ionización, afinidad electrónica, etc.).<sup>46</sup> Existen detectores universales y específicos. Los universales son aquellos capaces de responder a la mayoría de los analitos que eluyen de la columna. Los específicos sirven para detectar un grupo limitado de analitos que eluyen de la columna.<sup>46</sup>

### 3.8 Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se puede utilizar selectivamente para detectar y caracterizar un compuesto. También se utiliza para determinar la composición elemental y algunos aspectos de la estructura molecular de un analito. Esto se lleva a cabo de la medición experimental de la masa/carga de los iones producidos a partir de las moléculas de un analito en fase gaseosa.<sup>52</sup>

El principio básico de la espectrometría de masas es generar iones a partir de los analitos mediante cualquier método adecuado de ionización, para separar estos iones por su relación masa/carga ( $m/z$ ).<sup>53</sup>

El proceso de ionización más común para el análisis en fase gaseosa es la ionización por impacto electrónico. Un filamento incandescente produce electrones, que son acelerados con una energía de 70 eV. La muestra se vaporiza en el vacío donde las moléculas en fase gaseosa son bombardeadas con los electrones.<sup>54</sup> Este proceso produce un ion molecular con una carga positiva y un número impar de electrones, que se representa como  $M^+$  llamado ion molecular.<sup>55</sup>



Este ion puede tener considerable energía que se puede disipar a través de la fragmentación de determinados enlaces químicos, esto conduce a la producción de iones fragmento.<sup>52</sup>

Cada ion producto primario derivado del ion molecular puede, a su vez, someterse a la fragmentación, y así sucesivamente. Todos estos iones se separan en el espectrómetro de masas en función de su relación masa/carga, y se detectan en proporción a su abundancia.

El pico más intenso se llama pico base y se le asigna arbitrariamente la abundancia relativa de 100%.<sup>56</sup>

El tipo de masa determinada por espectrometría de masas depende en gran medida de la resolución y la precisión del analizador.<sup>56</sup>

Un espectrómetro de masas se compone de una fuente de iones, un analizador de masas, y un detector que se operan en condiciones de alto vacío.<sup>53</sup>

La separación de los iones se lleva a cabo en el cuadrupolo (analizador másico) haciendo pasar el haz de iones a través del centro de cuatro varillas paralelas a las que se aplica un voltaje (Figura 18).<sup>57</sup>

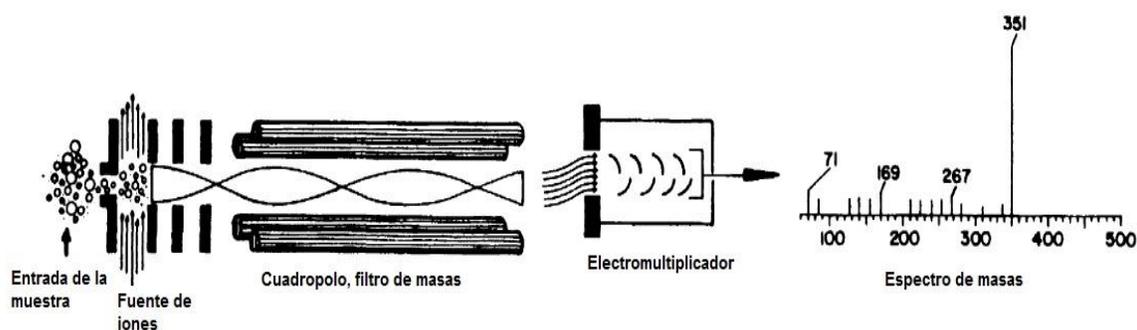


Figura 18. Cuadrupolo.<sup>57</sup>

En el cuadrupolo, los campos eléctricos se utilizan para separar los iones de acuerdo a la masa. Dependiendo de la intensidad del campo, se puede arreglar que solo los iones de una masa seleccionada puedan pasar a través del conjunto de varillas mientras que todos los demás son desviados golpeando las varillas. Al cambiar los puntos fuertes y las frecuencias de los campos eléctricos, diferentes masas pueden ser filtradas a través del sistema para producir un espectro. La trayectoria de los iones a través de las barras sigue una trayectoria oscilante.<sup>57</sup>

Existen dos modos de barrido.

Modo SCAN: Se representa en un gráfico la corriente total de iones. Barrido de iones en un intervalo de masas dado.

Monitoreo selectivo de iones (SIM): es una técnica donde se controla la corriente de iones para un número reducido de iones durante un ciclo de adquisición de espectros en lugar de la supervisión de la corriente de iones para todos los valores de  $m/z$  dentro de un intervalo dado. SIM permite más tiempo para medir la corriente de los iones seleccionados durante un ciclo de adquisición de datos que permite una señal mayor intensidad.<sup>58</sup>

### 3.9 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

Conectando la salida de un cromatógrafo de gases a la cámara de ionización de un espectrómetro de masas se puede obtener información estructural (espectro de masas) para cada uno de los componentes de la mezcla original, previamente inyectada en el cromatógrafo, a medida que estos son eluidos en serie de la columna cromatográfica. De esta forma las limitaciones inherentes de la cromatografía de gases quedan considerablemente reducidas en el análisis cualitativo. Dichas limitaciones surgen del hecho de que mientras la cromatografía de gases puede separar los componentes individuales de una mezcla con un alto grado de poder de resolución, no puede dar, en sentido riguroso, más que información preliminar sobre su estructura. Hay que señalar como esencial que cualquier columna cromatográfica no es un instrumento analítico, sino tan solo un medio de separación física. Los detectores cromatográficos solamente responden a la cantidad de muestra eluida de la columna. Por ello la utilización de los datos basados en el tiempo de retención absoluto o relativo puede resultar un método adecuado para la identificación tentativa de ciertos compuestos o mezclas relativamente simples o para los cuales se dispone de los correspondientes patrones. Sin embargo, cuando esta metodología se intenta llevar a extremos, como el análisis de mezclas de productos naturales de extrema complejidad, los resultados así obtenidos carecen, por fuerza, de la necesaria precisión cualitativa, sobre todo en los casos en que se requiere una programación de la temperatura del cromatógrafo de gases y se carece de compuestos patrón. A este respecto, una de las áreas más activas de la combinación cromatografía de gases-espectrometría de masas es en conclusión la identificación de compuestos nuevos o no sospechados previamente.<sup>59</sup>

## 4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 4.1 Equipo y material.

- ❖ Cromatógrafo de gases 5890 Series II Plus Hewlett-Packard con detector selectivo de masas Agilent 5973.
- ❖ Parrilla con agitación Barnstead Thermolyne modelo Super-Nuova.
- ❖ Micropipeta Eppendorf. Lote: 430164<sup>a</sup> (Alemania).
- ❖ Puntas para micropipeta Eppendorf de 0.1 mL Lote: B147243J, 1.0 mL Lote: B146440G, 10 mL Lote: A145513R (USA).
- ❖ Viales para micro reacción de 5.0 mL SUPELCO. Lote: P386561 (USA).
- ❖ Fibra para SPME con recubrimiento de Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100  $\mu\text{m}$  SUPELCO. Lote: KFUO1A (USA).
- ❖ Fibra para SPME con recubrimiento de Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) de 65  $\mu\text{m}$  SUPELCO. Lote: 57326-U (USA).
- ❖ Fibra para SPME con recubrimiento de Poliacrilato (PA) de 85  $\mu\text{m}$  SUPELCO. Lote: 59822 (USA).
- ❖ Soporte manual para SPME SUPELCO. Lote: P396006 (USA).
- ❖ Mininert Valvulas de 13 mm SUPELCO (USA).
- ❖ Balanza analítica OHAUS 0.01mg (México).
- ❖ Jeringa de 10  $\mu\text{L}$  HAMILTON. Lote: 399122 (USA).
- ❖ Barras de agitación magnética triangulares Spinvane (USA).
- ❖ Cartuchos de celulosa para extracción Soxhlet.
- ❖ Sistema de extracción Soxhlet de 5mL.
- ❖ Tiras de pH Crisa intervalalo de pH de 0-14 (México).
- ❖ Potenciómetro Cole Parmer (Singapur).

### 4.2 Reactivos.

- ❖ Hexametildisilazano (HDMS) 99.0% FLUKA. Lote: BCBC6379V (USA).
- ❖ Trimetilclorosilano (TMSC) Alltech. Lote: 12004.
- ❖ N-Metil-N-(trimetilsil)trifluoroacetamida (MSTFA) Sigma-Aldrich. Lote: BCBF1988V
- ❖ Bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) 99.4% Supelco. Lote: LB50659. (USA).
- ❖ Acetonitrilo pureza 99.9% TEDIA. Lote: 1105297 (USA).
- ❖ Hexano grado pesticida pureza 98.5% tsq tecsiquim. Lote: TEC-074-BB (México).
- ❖ Metanol 99.94% J.T. Baker. Lote: 9070-03 (Trinidad y Tobago).
- ❖ Agua desionizada J.T.Baker. Lote: T33275 (USA).
- ❖ Tolueno pureza 99.90% J.T.Baker. Lote: J28C62 (USA).
- ❖ Nitrógeno cromatográfico INFRA (México).
- ❖ Ácido cáprico (C10). Grado técnico.

- ❖ Ácido mirístico (C14). Grado técnico.
- ❖ Ácido palmítico (C16). Fluka AG. (Suiza)
- ❖ Ácido esteárico (C18). Grado técnico.
- ❖ Ácido araquídico (C20). Fluka AG. (Suiza)
- ❖ Ácido behénico (C22). Grado técnico.
- ❖ Colesterol libre de ceniza grado reactivo SIGMA. Lote: 0808867 (México).
- ❖ Ácido cítrico Grado técnico.
- ❖ Citrato de sodio Grado técnico.
- ❖ Cloruro de sodio Grado técnico.
- ❖ Sulfato de sodio anhidro Grado reactivo. Productos químicos Monterrey. Lote: 48097<sup>a</sup> (México).
- ❖ Ácido clorhídrico al 37%.
- ❖ Hidróxido de potasio 85%. Merck México. Lote: 50170312.

### 4.3 Muestras.

Se tienen tres muestras correspondientes a los residuos de una vasija encontrada en el Norte de Veracruz y fueron etiquetadas con los siguientes nombres:

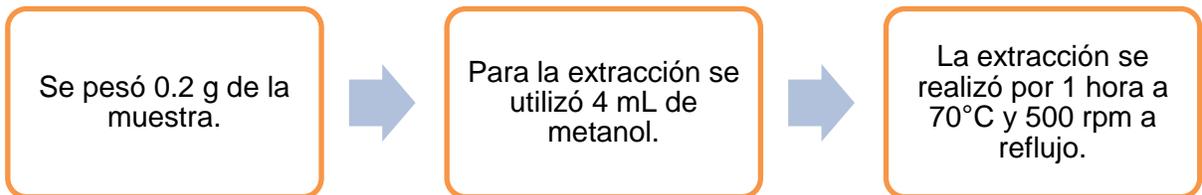
- 1) VHXXX-I10 (contenido del cerámico)
- 2) VH31 M3 0-60 (vasija 1)
- 3) VH3 D8 0-65 (vasija 2)

### 4.4 Preparación de disoluciones estándar.

Se prepararon disoluciones que contenían los 6 estándares de los ácidos grasos (C10, C14, C16, C18, C20, C22) y colesterol. Las concentraciones que se prepararon fueron 100 ppm (solución "stock") pesando aproximadamente 1mg de cada uno para un volumen de 10 mL. A partir de la solución stock se prepararon las disoluciones de 10 y 1 ppm. Todas las disoluciones se prepararon en tolueno.

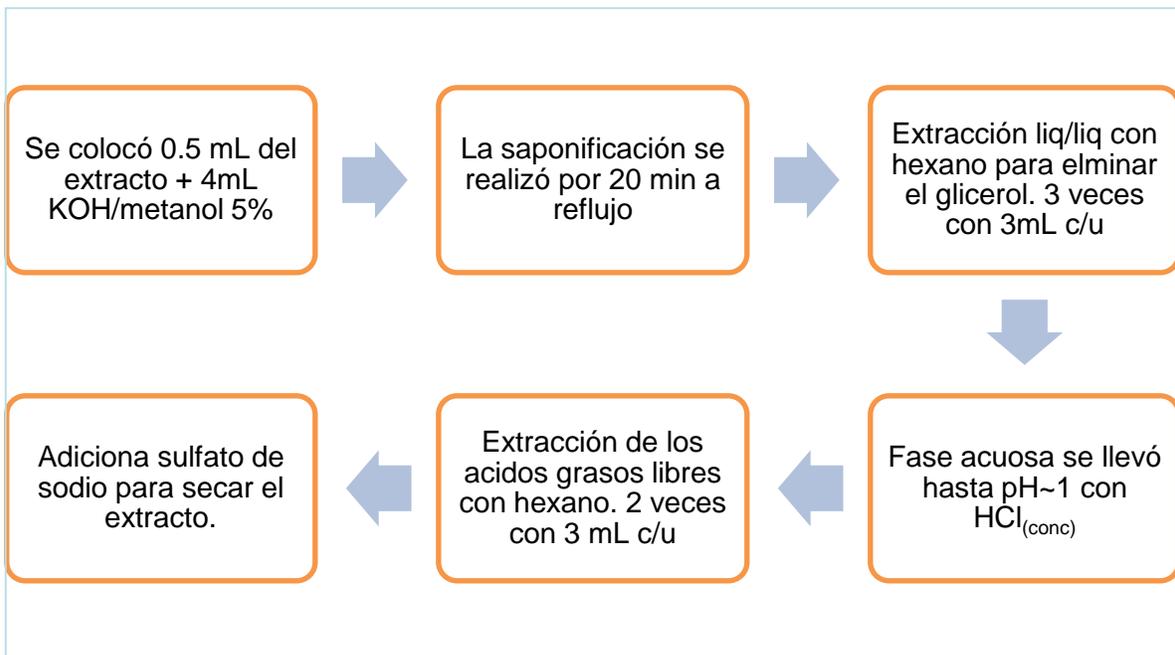
### 4.5 Preparación de la muestra.

Para la extracción de los compuestos solubles en disolventes orgánicos se realizó una extracción por Soxhlet. Los pasos que se realizaron se muestran en el Esquema 4. Cada una de las muestras se homogenizó.



Esquema 4. Diagrama de flujo del proceso de extracción por Soxhlet.

Posteriormente se realizó la saponificación de los posibles triglicéridos que se encontraran en la muestra. Los pasos que se realizaron se muestran en el Esquema 5.



Esquema 5. Diagrama de flujo del procedimiento de saponificación.

#### 4.6 Equipo y condiciones cromatográficas.

El análisis se realizó en un Cromatógrafo de Gases 5890 Serie II Plus Hewlett Packard con un inyector Split/Splitless, una columna Thermo Scientific TR-5MS 20m x 0.18 mm DI x 0.18  $\mu\text{m}$  de espesor de película con una fase estacionaria de

5% fenil -95% polidimetilsiloxano. Acoplado a un espectrómetro de masas cuadropolar Agilent 5973.

Las condiciones de operación en el Cromatógrafo fueron: temperatura en el inyector 300°C para el análisis por inyección con jeringa y 240°C para SPME. Temperatura de la línea de transferencia, en ambos casos, fue 300°C. Flujo del gas portador, helio, fue de 0.500 mL/min.

Programa de temperatura: temperatura inicial de 50°C por 2 minutos, con un gradiente de 15°C/min hasta 305°C por 3 minutos.

Condiciones de operación en el espectrómetro de masas: la temperatura de la fuente de ionización a 230°C y la del cuadropolo 150°C. Se utilizó el modo de ionización electrónica a 70 eV.

Para el barrido por SCAN se trabajó en un intervalo de masas de 50 a 500 uma.

#### **4.7 Optimización de la formación de los derivados.**

La reacción se realizó adicionando a un vial 100 µL de la mezcla de ácidos grasos en tolueno con una concentración de 10ppm, posteriormente se llevó a sequedad con nitrógeno. Se adicionaron 200 µL de acetonitrilo y por último se agregaron 50 µL del reactivo sililante. La reacción se llevó a cabo a 50°C, 800rpm durante 30 minutos. Al finalizar la reacción se procedió a inyectar 1 µL en el sistema acoplado GC-MS en el modo "Splitless".

#### **4.8 Extracción y optimización de la técnica por SPME.**

Se realizó la optimización de los parámetros que influyen en la extracción de los analitos. Los parámetros fueron: temperatura, pH, fuerza iónica, tiempo de extracción, cantidad de reactivo para formar el derivado sililado y tiempo de formación del derivado. En la Tabla 6 se muestran los parámetros a optimizar.

Para la optimización se colocaron en un vial de reacción de 5mL, 100 µL de la disolución de 1ppm de los ácidos grasos y se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno. Se adicionaron 50 µL de acetonitrilo y 5.0 mL de agua desionizada. El vial se agitó en vortex por 30 segundos. Posteriormente se introdujo la fibra y se realizó la extracción en un baño de agua con una velocidad de agitación de 800 rpm. Se prosiguió a secar la fibra con corriente de nitrógeno e inmediatamente se introdujo en otro vial que contenía el HMDS, la agitación fue de 500 rpm. Por último, la desorción se realizó en el inyector del GC a una temperatura de 240°C por 5 minutos en el modo "splitless".

Tabla 6. Parámetros a optimizar

Parámetro a optimizar.	Pruebas
Temperatura de extracción.	30 °C, 40°C, 50°C y 60°C
pH.	3, 5, 6 y 7
Fuerza iónica.	0%, 20%, 40% y 60%
Tiempo de extracción.	10 min, 20 min, 30 min y 60 min.
Cantidad de reactivo sililante.	20 µL, 30 µL y 50 µL.
Tiempo de reacción.	3 min, 5 min y 8 min.

#### 4.9 Extracción de las muestras arqueológicas por la técnica SPME.

- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS EXTRAÍDAS POR SOXHLET.

Se colocó en un vial 100 µL del extracto y se llevó a sequedad con nitrógeno. Se adicionaron 50 µL de acetonitrilo y 5.0 mL de agua desionizada a pH 5. Se introdujo la fibra y la extracción se llevó a cabo por 30 minutos, una velocidad de agitación de 800 rpm y una temperatura de 50°C. Posteriormente la fibra se secó con nitrógeno e inmediatamente se colocó en otro vial que contenía 20 µL de HDMS por 5 minutos a temperatura ambiente y 500 rpm. Por último la desorción de los analitos se realizó en el puerto de inyección el cual se encontraba a una temperatura de 240°C por un tiempo de 5 minutos en el modo “splitless”.

- ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS SAPONIFICADAS.

Se colocó en un vial 100 µL del extracto saponificado y se llevó a sequedad con nitrógeno. Se adicionaron 50 µL de acetonitrilo y 5.0 mL de agua desionizada a pH 5. Se introdujo la fibra y la extracción se llevó a cabo por 30 minutos, una velocidad de agitación de 800 rpm y una temperatura de 50°C. Posteriormente la fibra se secó con nitrógeno e inmediatamente se colocó en otro vial que contenía 20 µL de HDMS por 5 minutos a temperatura ambiente y 500 rpm. Por último la desorción de los analitos se realizó en el puerto de inyección el cual se encontraba a una temperatura de 240°C por un tiempo de 5 minutos en el modo “splitless”.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1 Análisis cromatográfico e identificación de los compuestos.

Se estableció el análisis cromatográfico para el programa de temperatura. Se realizó por el método de inyección con jeringa de la mezcla de ácidos grasos con una concentración de 100 ppm para cada compuesto en el modo Split, el programa fue: temperatura inicial 50°C por 2 minutos y aumentara con una velocidad de 10°C/min hasta 300°C y se quedara 3min. Los resultados se presentan en la Tabla 7.

En la Figura 19 se observa la separación a resolución mayor a 1.5 de la mezcla de los ácidos grasos.

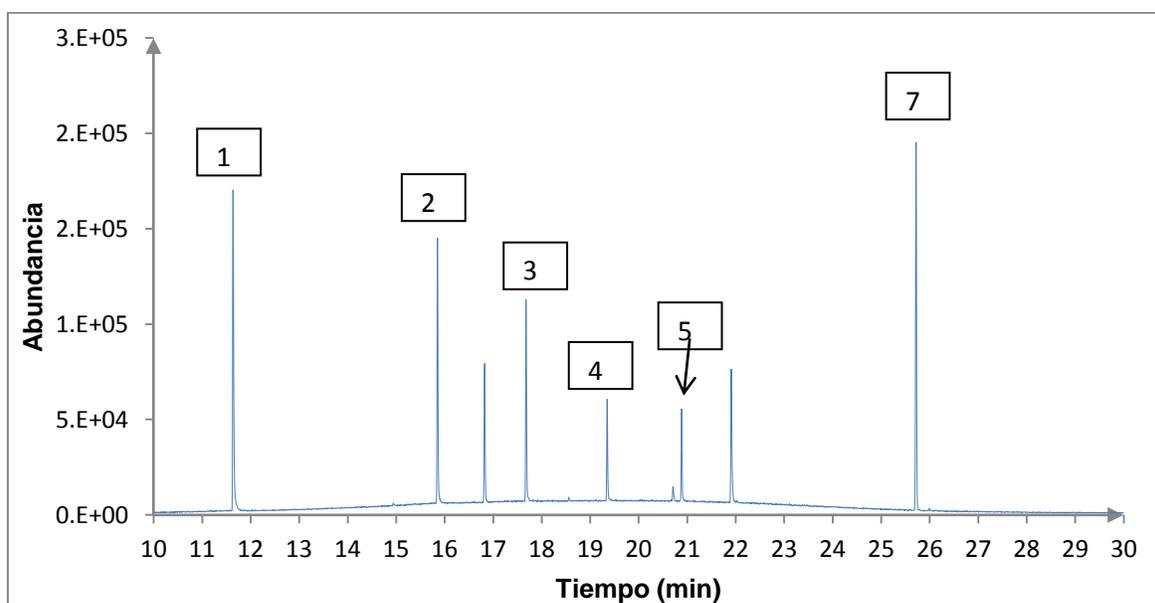


Figura 19. Cromatograma obtenido con el primer programa de temperatura.

Tabla 7. Resultados que se obtuvieron con el programa de temperatura 1.

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Formula condensada
1	Ácido cáprico	11.638	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
2	Ácido mirístico	15.854	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
3	Ácido palmítico	17.680	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
4	Ácido esteárico	19.353	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
5	Ácido araquídico	20.888	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
6	Ácido behénico	ND	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
7	Colesterol	25.723	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O

ND- No detectado.

Debido a que el análisis es un poco tardado y la separación entre los picos es bastante buena. Se busca disminuir el tiempo de análisis sin afectar la resolución entre los picos. La prueba se realizó con el método de inyección con jeringa de la mezcla de los ácidos grasos con una concentración de 100 ppm en el modo Split.

El segundo programa de temperatura fue: temperatura inicial de 50°C por 2 minutos y aumentará con una velocidad de 15°C/min hasta 305°C y se mantendrá 3 minutos.

En la Figura 20 se muestra el cromatograma que se obtuvo. Se observa que la separación aún es satisfactoria y se logró disminuir el tiempo de análisis. Por lo que eligió dicho programa para realizar los análisis. En la Tabla 8 se muestran los resultados que se obtuvieron el programa de temperatura 2.

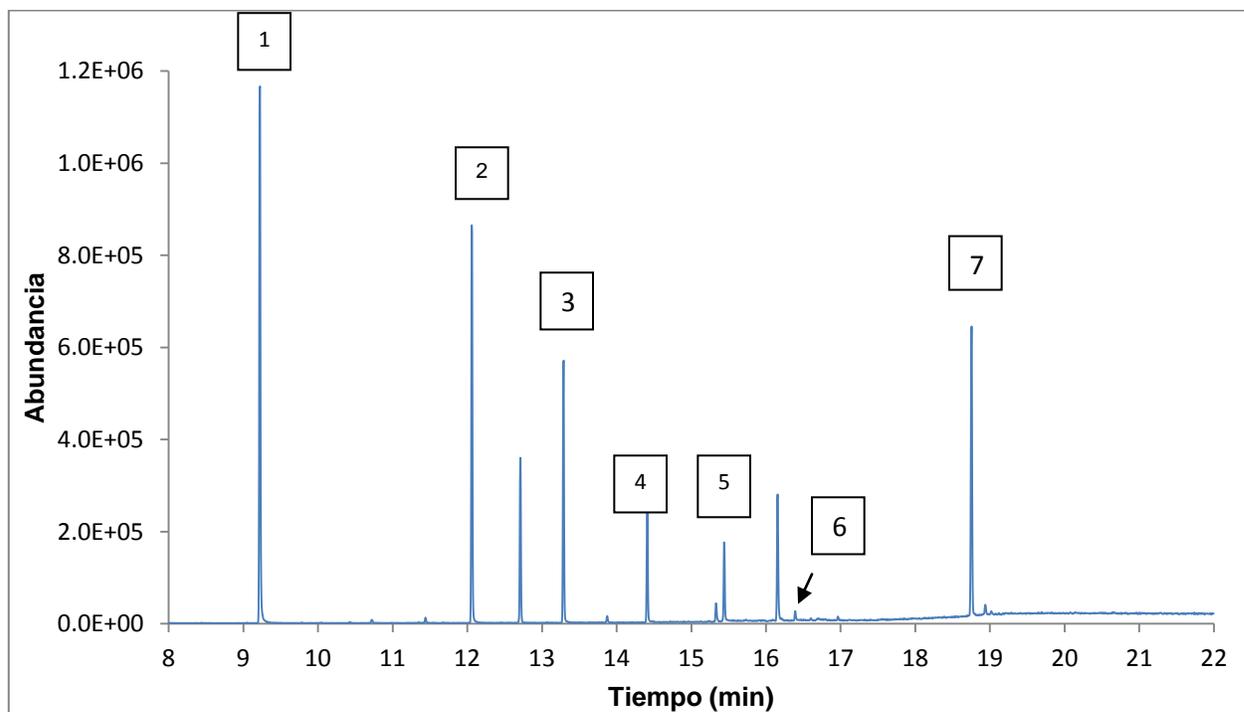


Figura 20. Cromatograma obtenido con el segundo programa de temperatura.

Tabla 8. Resultados que se obtuvieron con el programa de temperatura 2.

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Formula condensada
1	Ácido cáprico	9.222	C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>
2	Ácido mirístico	12.063	C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>
3	Ácido palmítico	13.290	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>
4	Ácido esteárico	14.413	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
5	Ácido araquídico	15.443	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>
6	Ácido behénico	16.392	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>
7	Colesterol	18.756	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O

### 5.2 Optimización de la formación de los derivados.

Se realizó la prueba con diferentes reactivos sililantes para elegir el mejor, con el que se obtuviera mayor y mejor respuesta.

En la tabla 9 y 10 se muestra la comparación de los resultados obtenidos para cada una de las reacciones. Y en la Figura 21 se muestra el cromatograma comparativo de las reacciones.

Tabla 9. Comparación de las áreas obtenidas para los diferentes reactivos sililantes.

Área Analito	BSTFA	BSTFA+ 1%TMCS	MSTFA	HMDS
C10	3'710,157	3'345,489	2'519,202	4'131,505
C14	3'630,537	3'355,287	2'339,222	3'593,432
C16	4'505,884	4'276,016	2'921,002	4'222,994
C18	4'425,538	4'242,432	3'016,146	4'056,079
C20	4'263,865	4'034,346	2'934,739	4'113,775
C22	1'841,019	1'748,045	'365,303	1'956,838
Colesterol	3'541,791	3'740,867	3'180,694	3'626,336

Tabla 10. Resultados de área total de los compuesto de interés.

Reactivo sililante	Área total	Posición
<b>BSTFA</b>	25,918,790	1
<b>BSTFA + 1% TMCS</b>	24,742,481	3
<b>MSTFA</b>	18,276,307	4
<b>HDMS</b>	25,700,957	2

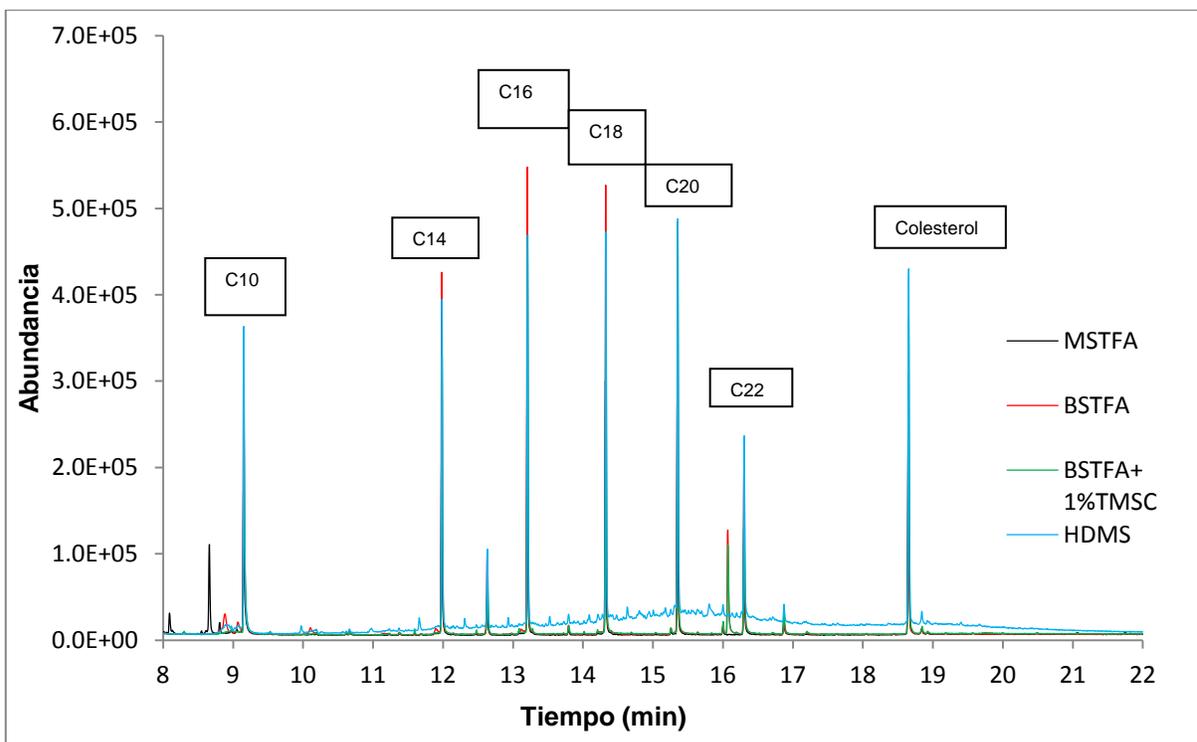


Figura 21. Comparación de los resultados obtenidos con los diferentes reactivos sililantes.

Como se puede observar, con el BSTFA se obtiene la mayor área para 4 de los 7 analitos, logrando picos simétricos (sin coleo). También al calcular el área total, se obtiene la mayor área con este reactivo. Por lo que se decidió usar. Sin embargo al realizar los experimentos con la fibra de SPME se observó que este reactivo sililante la dañaba y provocaba que se desprendiera del soporte por lo que se decidió probar otro reactivo sililante, HDMS, que fue el segundo con mejores resultados. Al realizar los experimentos no se observaron daños a la fibra por lo que finalmente se trabajó con este último reactivo.

### 5.3 Extracción por SPME.

Primero se realizó el blanco de los reactivos (metanol, agua, acetonitrilo, tolueno y el reactivo sililante), de la reacción y blanco de fibra para descartar picos adicionales.

En el anexo 3 se muestran los cromatogramas correspondientes a estas pruebas. Se observa que el reactivo sililante es el que se encuentran más picos.

El método comenzó con la conversión de los ácidos grasos en sus derivados sililados y posteriormente se realizó la extracción de los analitos sililados con la fibra de PDMS/DBV por el modo "Head-space". Lo que se observó fue que la presencia del disolvente afectaba/dañaba el recubrimiento de la fibra y provocando que está se desprendiera del soporte de sílice.

Se decidió entonces cambiar el método, realizando primero la extracción de los ácidos grasos en agua y posteriormente llevar a cabo la formación de un derivado en la fibra para poder obtener una mejor extracción. También se decidió cambiar el tipo de recubrimiento, probando las fibras de PDMS y PA, que son más afines para la extracción de los ácidos grasos libres

Posteriormente se probaron dos tipos de recubrimientos, poliacrilato (PA) y poldimetilsiloxano (PDMS).

Se colocaron en un vial de reacción 100  $\mu$ L de la mezcla de ácidos grasos de concentración 10ppm se llevó a sequedad con nitrógeno y se agregaron 50  $\mu$ L de acetonitrilo y se agito con vortex por 30 segundos. Después se adicionaron 5.0 mL de agua desionizada a pH 4 y se agitó con vortex por 30 segundos. Se realizó la extracción de los analitos por inmersión. El tiempo de extracción fueron 20 minutos, 700 rpm a temperatura ambiente.

Posteriormente se retiro la fibra y se secó con nitrógeno durante 1 minuto. Después se introdujo la fibra en otro vial que contenía 30  $\mu$ L de HDMS. La reacción se realizó a temperatura ambiente, 200rpm durante 3 minutos.

Por último la desorción de los analitos se realizó en el puerto de inyección durante 5 minutos a una temperatura de 250°C para la fibra de PA y 240°C para la fibra de PDMS. Los cromatogramas se muestran en las Figura 22.

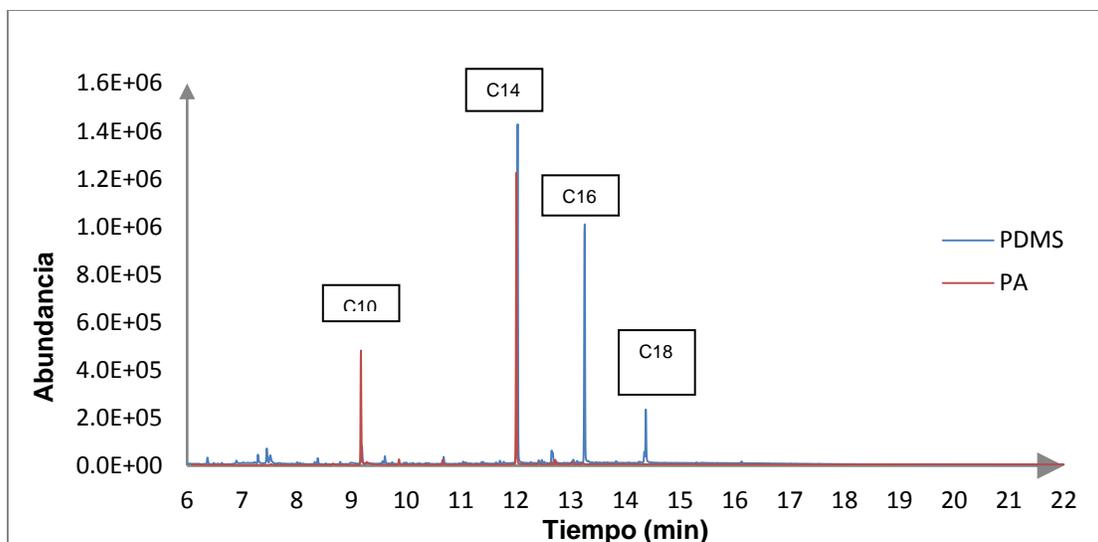


Figura 22. Cromatograma con los analitos extraídos con dos fibras por SPME.

Se puede observar que en el caso de la fibra de PDMS se logran resultados con mayor sensibilidad y selectividad de los analitos de interés en comparación con la fibra de PA.

Los analitos extraídos con PDMS fueron: ácido cáprico C10, ácido mirístico C14, ácido palmítico C16 y ácido esteárico C18. Para el caso de la extracción con PA solo lograron ser extraídos: ácido cáprico C10 y ácido mirístico C14.

Se observa que la fibra de PA extrae mejor los analitos más polares debido a que este tipo de fibra es de mayor polaridad en comparación con la de PDMS. Al aumentar la cadena de carbonos en los analitos, la polaridad disminuye y por ende su extracción se verá afectada negativamente para este tipo de recubrimiento. En cambio para la fibra de PDMS, que es menos polar, se logran extraer los compuestos de mayor peso. Debido a que la mayoría de los analitos que se van a estudiar tienen un número elevado de carbonos, se decidió utilizar el recubrimiento en la fibra de PDMS.

## 5.4 Optimización de los parámetros para la extracción con SPME.

### 5.4.1 Optimización de la temperatura de la extracción.

Se realizó el estudio del efecto de la temperatura en la eficiencia de la extracción. Se escogieron cuatro temperaturas; 30°C, 40°C, 50°C y 60°C haciendo duplicados de cada uno de los experimentos. La extracción se realizó durante 20 minutos a la temperatura de prueba con una velocidad de agitación de 800 rpm, pH 4 y sin adición de sal. Posteriormente se secó la fibra con nitrógeno por un minuto. Y la

reacción se llevo a cabo por 3 minutos con 20  $\mu$ L de HDMS y una velocidad de agitación de 500 rpm.

En la Figura 23 se observa el comportamiento de los analitos con respecto a las temperaturas de prueba.

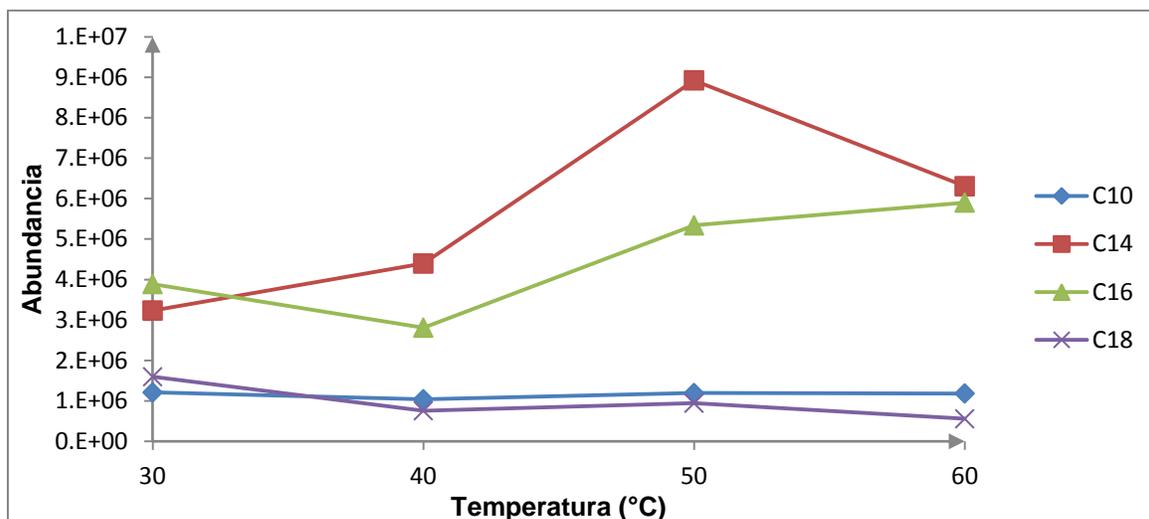


Figura 23. Optimización de la temperatura de extracción.

Se calculó el área total de los analitos y se observó que la temperatura a la cual se obtuvo mayor extracción fue 50°C. En la Figura 24 se observa la comparación de área de los analitos a cada temperatura probada.

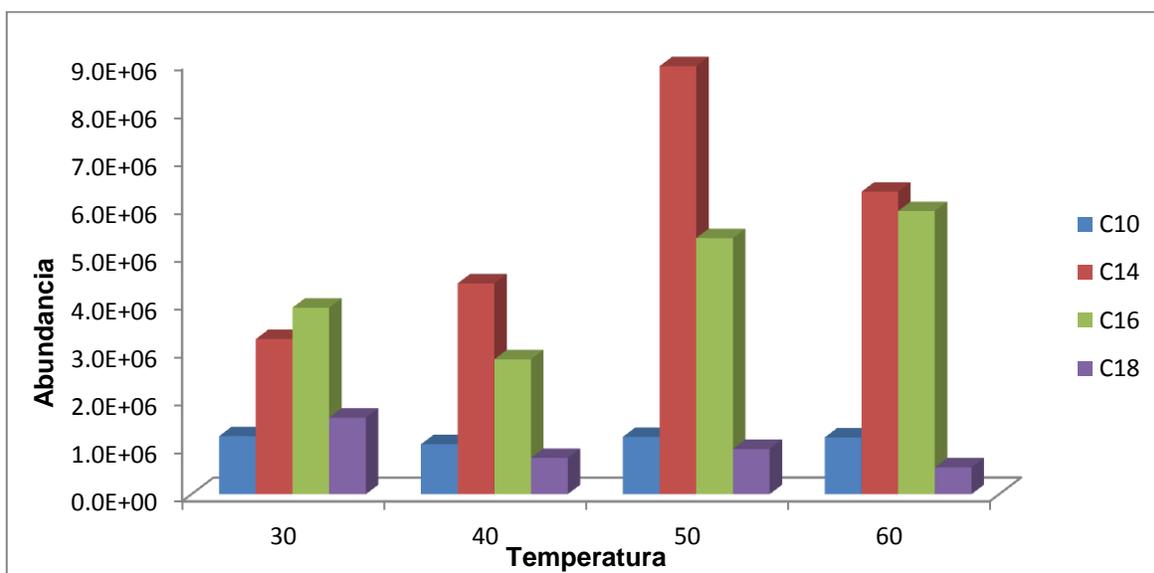


Figura 24. Comparación de áreas de los diferentes analitos a las temperaturas de prueba.

### 5.4.2 Optimización del pH en la extracción por SPME.

De acuerdo a los valores correspondientes de pka de los ácidos grasos, el pH puede favorecer su extracción. Si se encuentran a un pH de extracción menor al valor de pka las especies se encontraran en forma de ácido y podrán ser extraídos por la fibra; sin embargo, si el valor de pH de la extracción se encuentra muy por encima del valor de pka de las especies, estas se encontrarán en forma de iones por lo que la extracción se verá desfavorecida. Los ácidos grasos que se estudian son ácidos débiles y los valores de pH que favorecen la extracción son 5 y 6 (Figura 25). La extracción se realizó durante 20 minutos, 50°C, una velocidad de agitación de 800 rpm, al pH de prueba y sin adición de sal. La reacción de silylación se llevó a cabo con 20  $\mu$ L de HDMS a temperatura ambiente por 3 minutos.

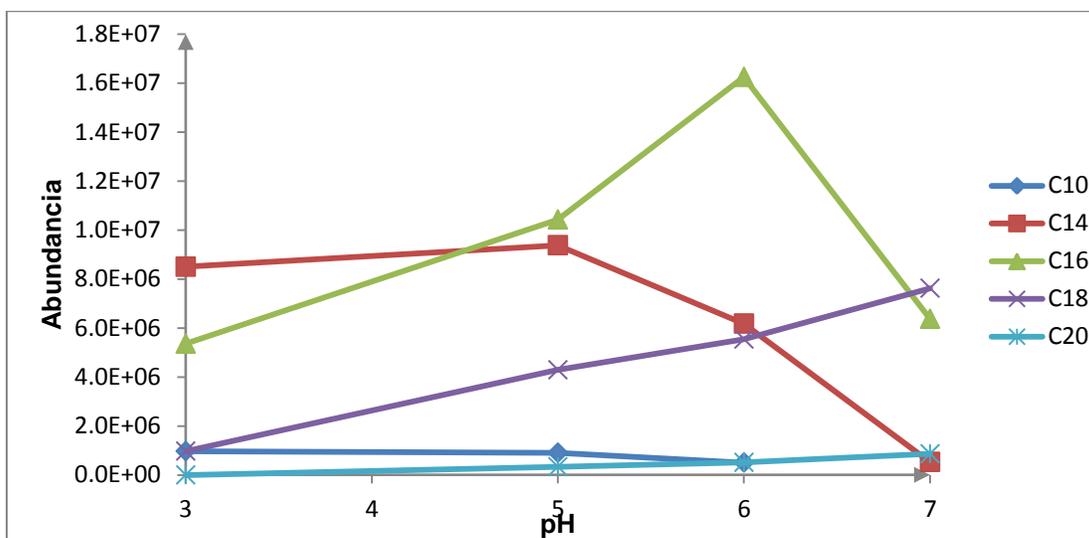


Figura 25. Optimización del pH de extracción.

Como se observa a pH 5 se realiza una mejor extracción, a excepción de los compuestos C16 y C18 los cuales logran extraerse en mayor cantidad a pH 6. También se observa que a pH 5 se logra extraer el compuesto C22 lo cual no se logra a pH 6. Con estos resultados, se selecciona pH 5 para realizar las extracciones.

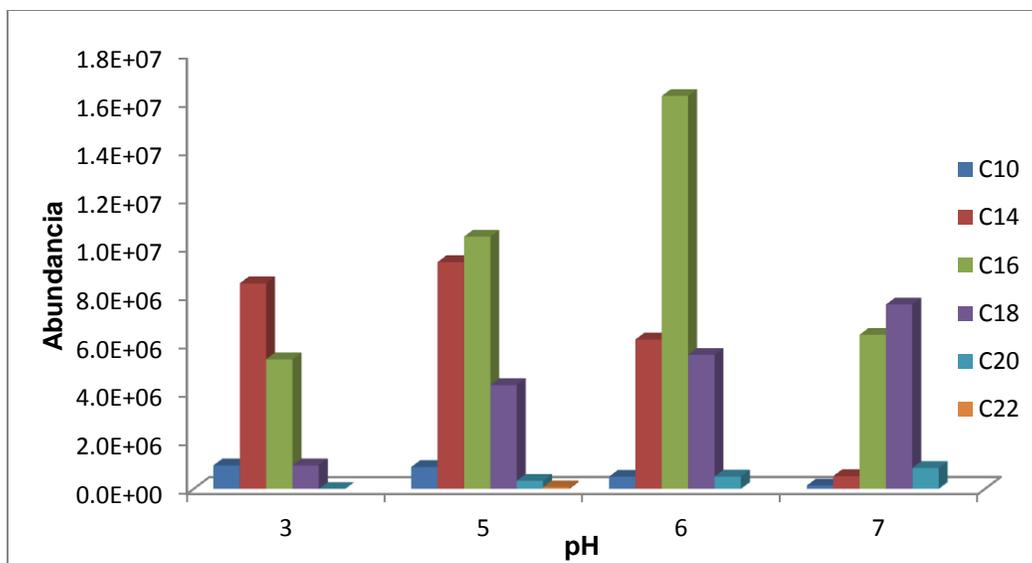


Figura 26. Comparación de las áreas de los diferentes analitos a los diferentes valores de pH.

### 5.4.3 Optimización de la fuerza iónica.

La adición de una sal inorgánica ayuda a disminuir la solubilidad de los analitos en la disolución, por ende favoreciendo la extracción/difusión de los analitos hacia la fibra. Los porcentajes de la sal que se probaron fueron 0, 20 y 40%. En la Figura 27 y 28 se observa la disminución de la abundancia de los analitos. Al aumentar el porcentaje de la sal, la disolución se torna más densa dificultando la distribución de los analitos hacia la fibra. Solo se ve favorecido el ácido cáprico C10 el cual es relativamente más soluble en agua en comparación con los demás ácidos grasos y con la adición de la sal disminuye la cantidad soluble en el agua. La extracción se realizó durante 20 minutos, 50°C, pH 5 y el contenido de sal a probar. La reacción de silylación se llevó a cabo con 20 µL de HDMS durante 3 minutos a temperatura ambiente.

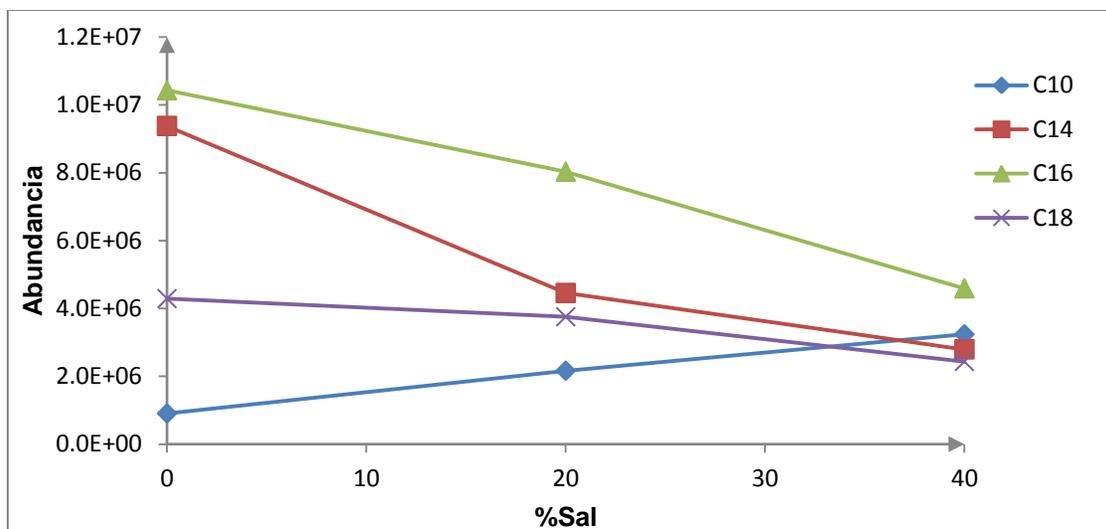


Figura 27. Optimización de la fuerza iónica.

En este caso se ve claramente que ajustar la fuerza iónica por la adición de sal no favorece la extracción de los analitos, por lo que se eligió no adicionar la sal.

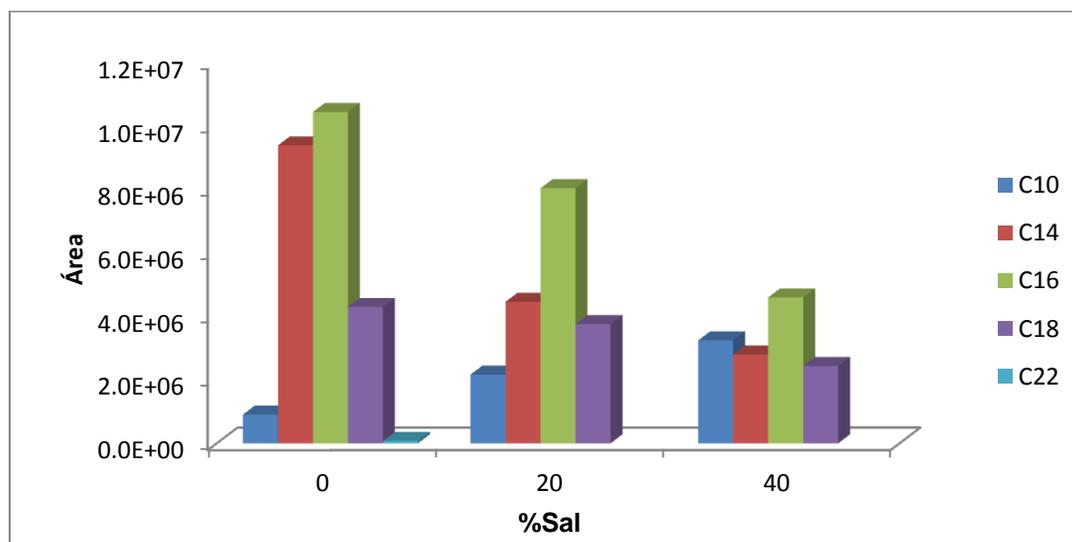


Figura 28. Comparación de las áreas obtenidas de los diferentes analitos a las correspondientes concentraciones de sal.

#### 5.4.4 Optimización del tiempo de la extracción.

El tiempo influye en el equilibrio y la transferencia de los analitos hacia la fibra, es decir en la cantidad de analito que se extrae. Se probaron cuatro diferentes tiempos; 10, 20, 30 y 60 minutos para conocer el comportamiento de los analitos.

En la Figura 29 se observa que al aumentar el tiempo aumenta la cantidad de analito extraída, sin embargo, no se observa que se llegue al tiempo de equilibrio,

cuando la cantidad de analito extraído prácticamente es contante en función del tiempo.

La extracción se llevó a cabo durante el tiempo de prueba, una temperatura de 50°C, pH 5, y sin adición de sal. La reacción se realizó con 20 µL de HDMS durante 3 minutos a temperatura ambiente.

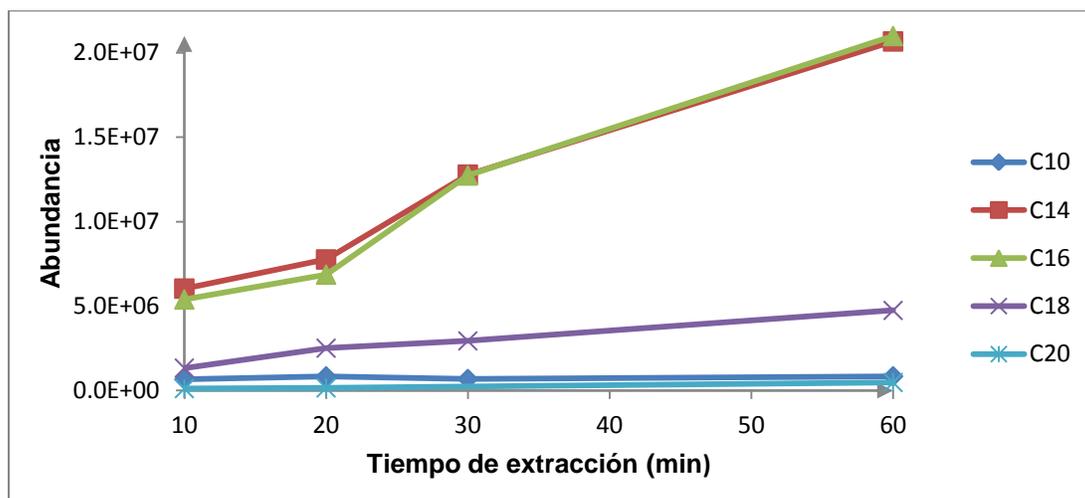


Figura 29. Optimización del tiempo de extracción.

Se observa la tendencia que siguen normalmente los analitos, en este tipo de extracciones, en función del tiempo (Figura 30). Se opto por trabajar en un tiempo fuera del equilibrio, ya que no se desea alargar los análisis durante un lapso prolongado. El tiempo que se eligió fueron 30 minutos.

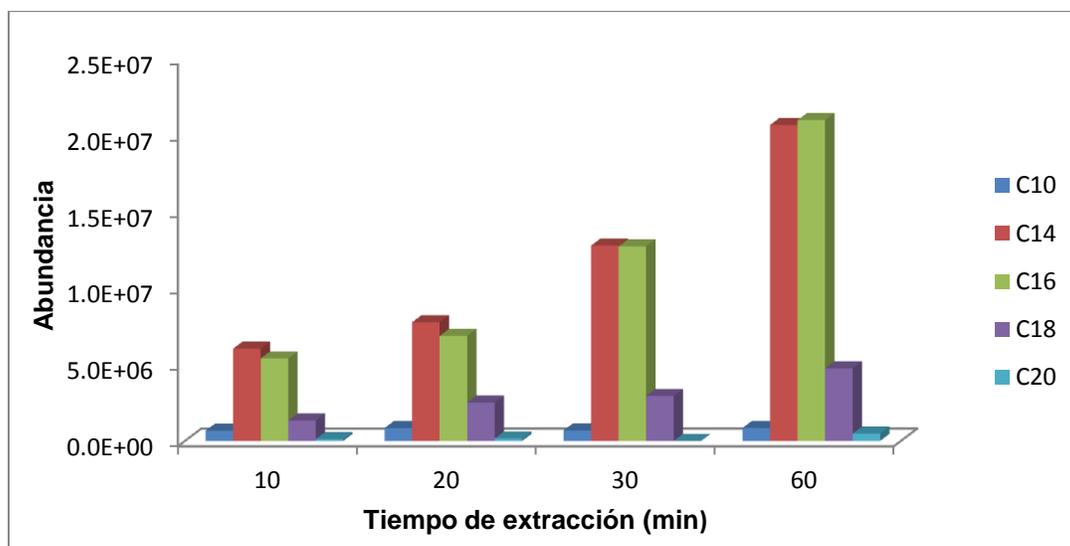


Figura 30. Comparación de las áreas obtenidas de los diferentes analitos a los diferentes tiempos de extracción.

### 5.4.5 Optimización de la cantidad de reactivo sililante.

La cantidad de reactivo sililante se optimizó para conocer si era suficiente para realizar la reacción.

La extracción se realizó durante 30 minutos, una temperatura de 50°C, pH 5 y sin adición de sal. Y la reacción de sililación se llevó a cabo durante 3 minutos y un volumen mayor de reactivo para formar el derivado.

Lo que se observa es que con un poco más de reactivo sililante, aumentando de 20  $\mu\text{L}$  a 30  $\mu\text{L}$ , es un aumento del área de la mayoría de los analitos excepto para C18 (Figura 31). Sin embargo al aumentar más la cantidad de reactivo sililante, a 50  $\mu\text{L}$ , se observa una disminución de la cantidad de analito extraído. Esto podría deberse a que hay una competencia de afinidad hacia la fibra entre los analitos y el reactivo sililante. Ocurre un fenómeno de desplazamiento del analito por el reactivo sililante debido a que este último se encuentra en gran cantidad.

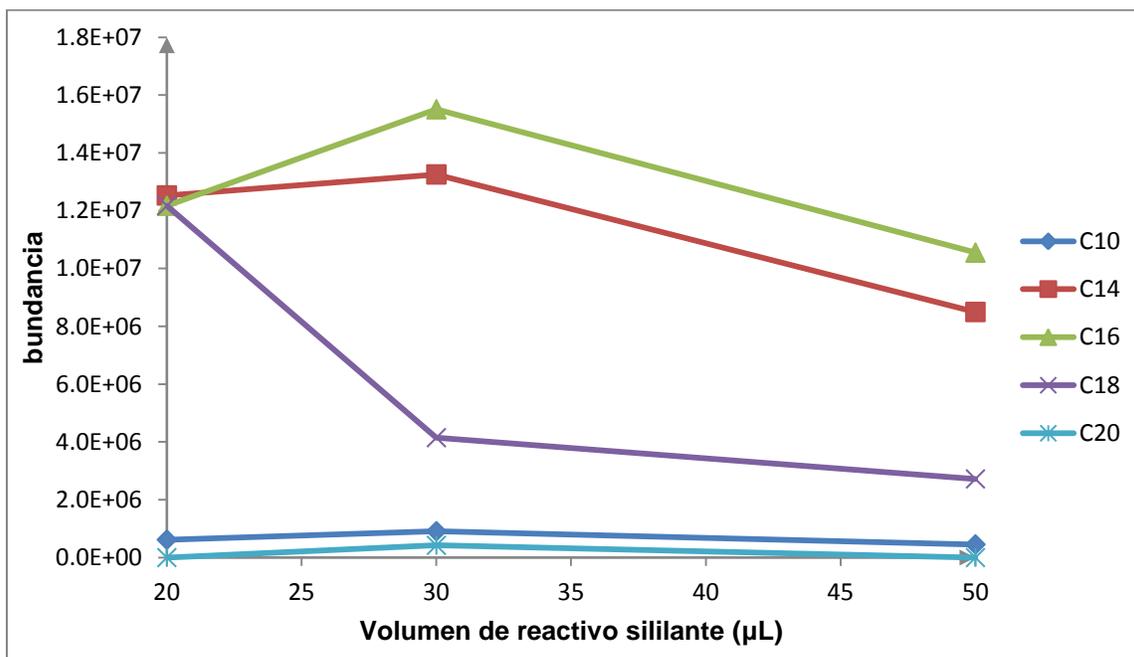


Figura 31. Optimización del volumen de reactivo sililante.

Se decidió utilizar 20  $\mu\text{L}$ , ya que se observó que el aumento de respuesta de los demás analitos no fue tan significativo y ocurrió una disminución importante en la abundancia del C18 al utilizar 30  $\mu\text{L}$  (Figura 32).

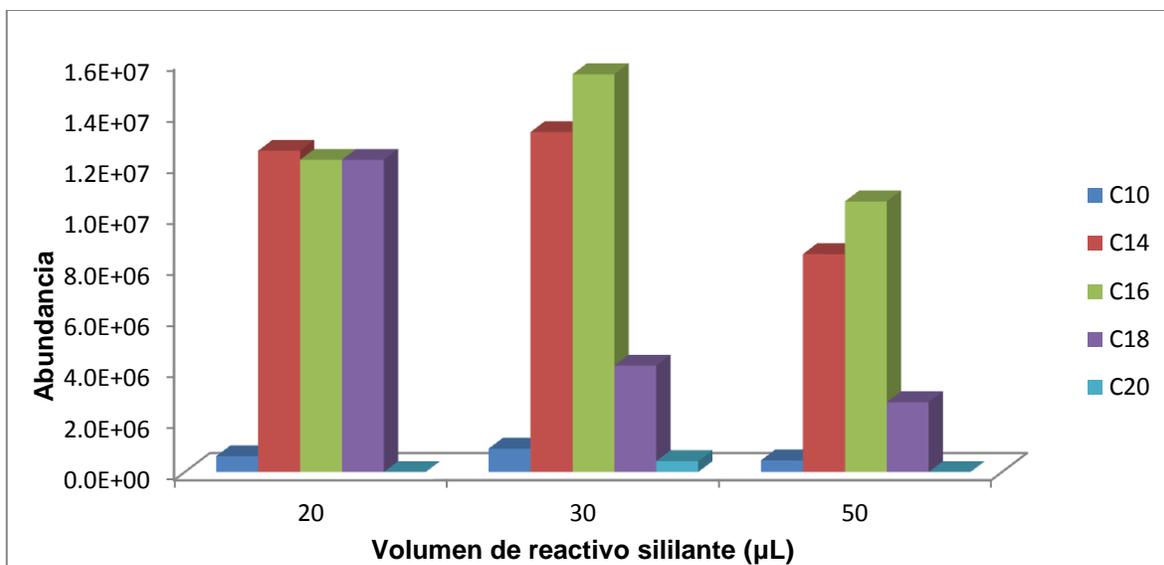


Figura 32. Comparación de las áreas obtenidas de los analitos a los diferentes volúmenes de reactivo sililante.

#### 5.4.6 Optimización del tiempo de la formación del derivado.

El tiempo de formación del derivado se optimizó para conocer si era el suficiente para terminar de realizar la reacción.

La extracción se realizó durante 30 minutos, una temperatura de 50°C, pH 5 y sin adición de sal. La reacción se llevo a cabo durante el tiempo a optimizar, temperatura ambiente y 20 µL de HDMS.

Lo que se observa es que con un incremento a 5 minutos en el tiempo de la reacción, se logra un aumento del área de los picos. Sin embargo al elevar más el tiempo de reacción a 8 minutos, se observa una disminución de la cantidad de analito extraído (Figura 33). Esto podría deberse a que hay una competencia de afinidad hacia la fibra entre los analitos y el reactivo sililante. Ocurre un fenómeno de desplazamiento del analito por el reactivo sililante, provocando que el equilibrio se desplace hacia el reactivo sililante, que se encuentra también en gran cantidad.

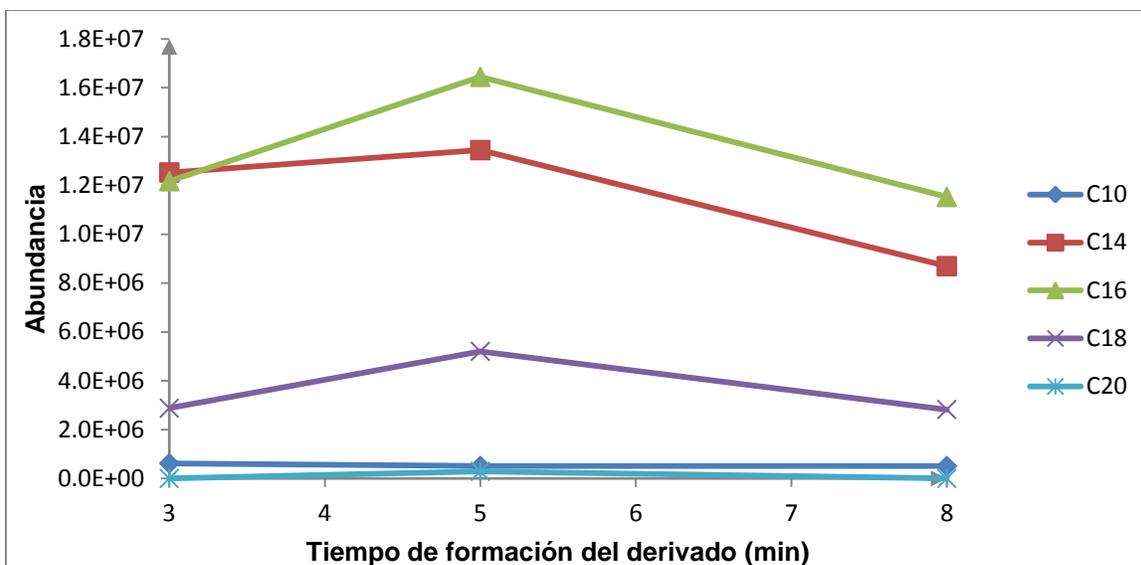


Figura 33. Optimización del tiempo de formación del derivado.

Se logró un aumento en la abundancia de los analitos al incrementar el tiempo de reacción, por lo que se seleccionó un tiempo de 5 minutos para realizar las extracciones (Figura 34).

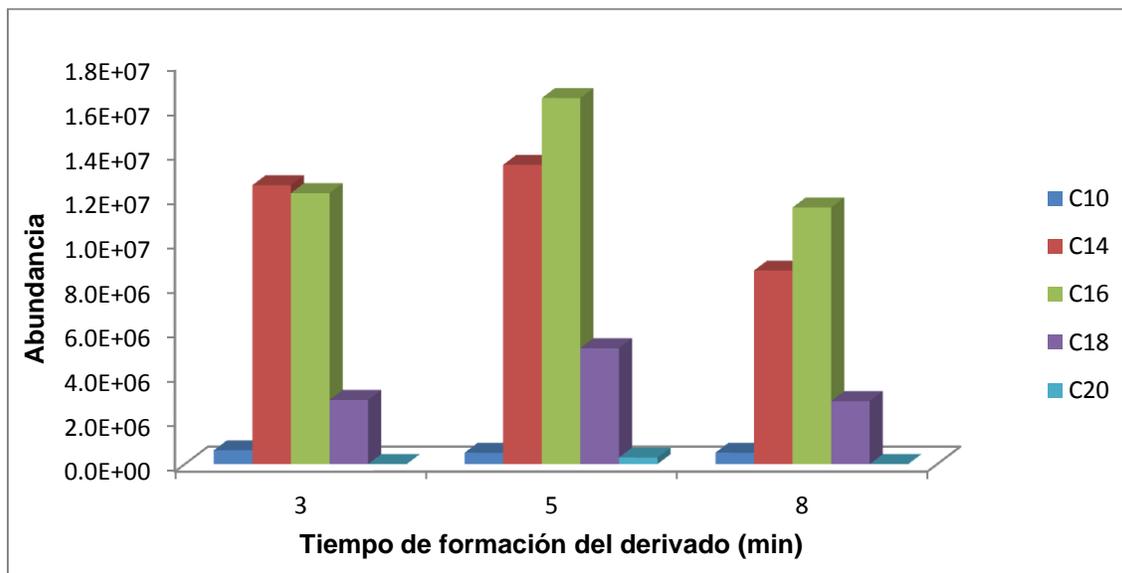


Figura 34. Comparación de las áreas obtenidas de los analitos a los diferentes tiempos de formación del derivado.

El tiempo de desorción no se decidió optimizar, lo que se hizo fue probar un tiempo con base en la literatura y se comprobó que el tiempo era suficiente para la desorción completa de los analitos realizando blancos.

En resumen los parámetros optimizados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados en la optimización de los parámetros en la extracción por SPME.

Parámetro a optimizar.	Pruebas	Optimo
Temperatura de extracción.	30 °C, 40°C, 50°C y 60°C	50°C
pH.	3, 5, 6 y 7	5
Fuerza iónica.	0%, 20%, 40% y 60%	0%.
Tiempo de extracción.	10 min, 20 min, 30 min y 60 min.	30 minutos
Cantidad de reactivo sililante.	20 µL, 30 µL y 50 µL.	20 µL
Tiempo de reacción.	3 min, 5 min y 8 min.	5 minutos

## 5.5 Muestras arqueológicas.

### 5.5.1 Extracto por la técnica de Soxhlet.

Se realizó la inyección del extracto en metanol, realizando la reacción con el HMDS, para observar los compuestos que lograban detectarse y solo se observó el bis(2-etilhexilo) éster del ácido adípico (Figura 35) que es un producto de la degradación oxidativa de aceites. La estructura y el espectro de masas del compuesto se muestran en la Figura 36 y 37. Se marca con una flecha el pico que corresponde al compuesto encontrado. Los demás picos es sangrado de la columna o picos que no lograron ser identificados satisfactoriamente.

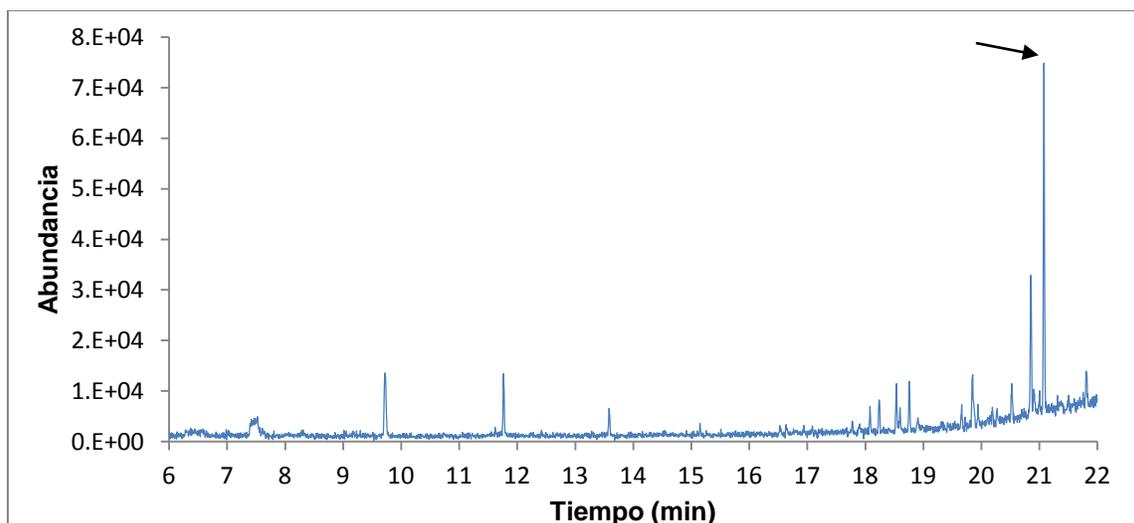


Figura 35. Cromatograma del extracto obtenido por Soxhlet.

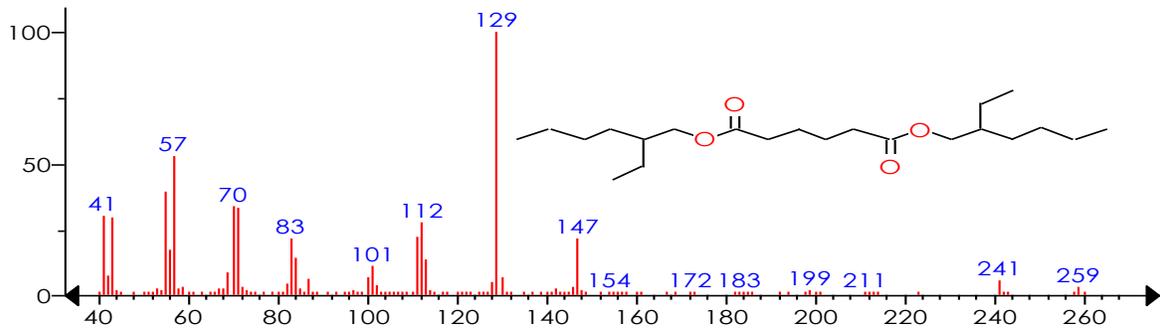


Figura 36. Espectro de masas del bis(2-etilhexilo) éster del ácido adípico de tiempo de retención 21.078 min.

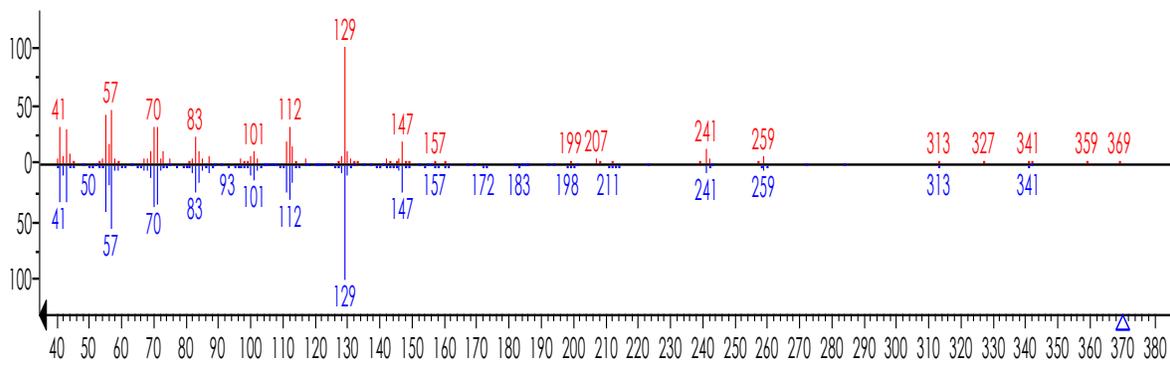


Figura 37. Comparación de los espectros de masas experimental del compuesto bis(2-etilhexilo) éster del ácido adípico (rojo) contra el de la base de datos de la NIST (azul).

## 5.5.2 Extracción con los parámetros optimizados en SPME.

Los resultados de los espectros de masas se presentan en el anexo 2.

- Extracto de la muestra VHXXX-I10.

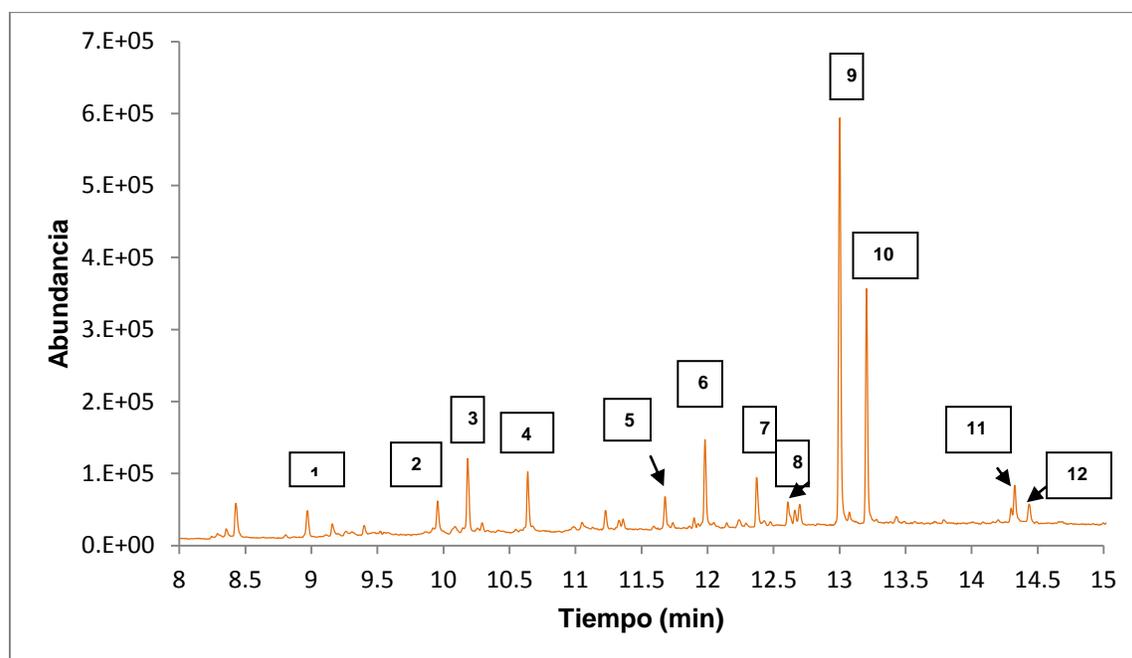


Figura 38. Cromatograma de la extracción con SPME de la muestra VH XXX- I10.

Tabla 12. Resultados de la extracción con SPME de la muestra VH XXX-I10

#	Tiempo de retención (min)	Compuesto	#	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	8.966	Clicsiloxano	8	12.609	Acido n-pentanoico -TMS
2	9.961	Dodecanol-TMS	9	13.003	Dibutil ftalato
3	10.184	Ciclosiloxano	10	13.205	Ácido palmítico-TMS
4	10.640	Ácido láurico-TMS	11	14.330	Ácido esteárico-TMS
5	11.677	Ácido isocitríco-TMS	12	14.434	Metil- podocarpa
6	11.982	Ácido mirístico-TMS			
7	12.376	Acido ftálico diisobutiléster			

- Extracto saponificado de la muestra VHXXX-I10.

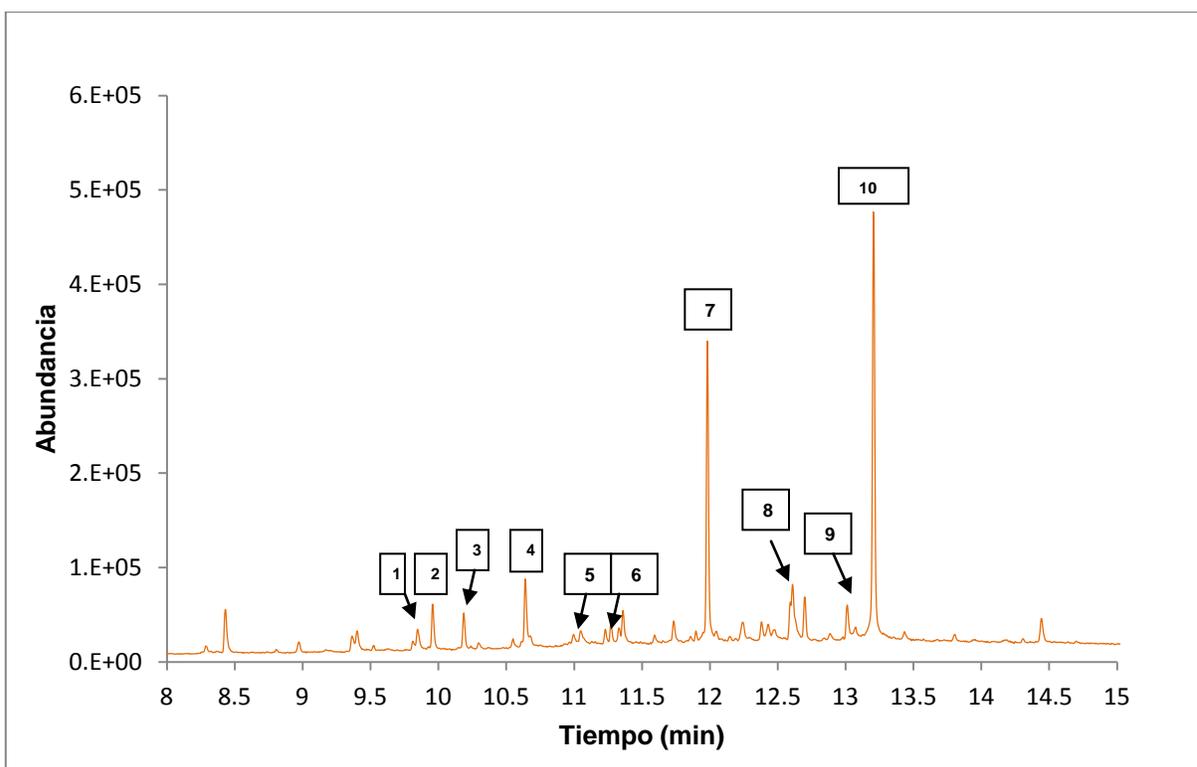


Figura 39. Cromatograma de la extracción con SPME de la muestra VH XXX- I10 saponificada.

Tabla 13. Resultados de la extracción con SPME de la muestra VH XXX-I10 después de la saponificación.

#	Tiempo de retención (min)	Compuesto	#	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	9.847	2,4-di-terbutil fenol	7	11.928	Ácido mirístico-TMS
2	9.961	Dodecanol-TMS	8	12.609	Ácido n-pentanoico-TMS
3	10.184	Ciclosiloxano	9	13.076	Ácido palmítico-TMS
4	10.645	Ácido láurico-TMS	10	13.211	Ácido palmítico-TMS
5	11.272	Metil tetradecanoato			
6	11.329	Ácido n-tridecanoico-TMS			

- Extracto de la muestra VH31 M3 0-60.

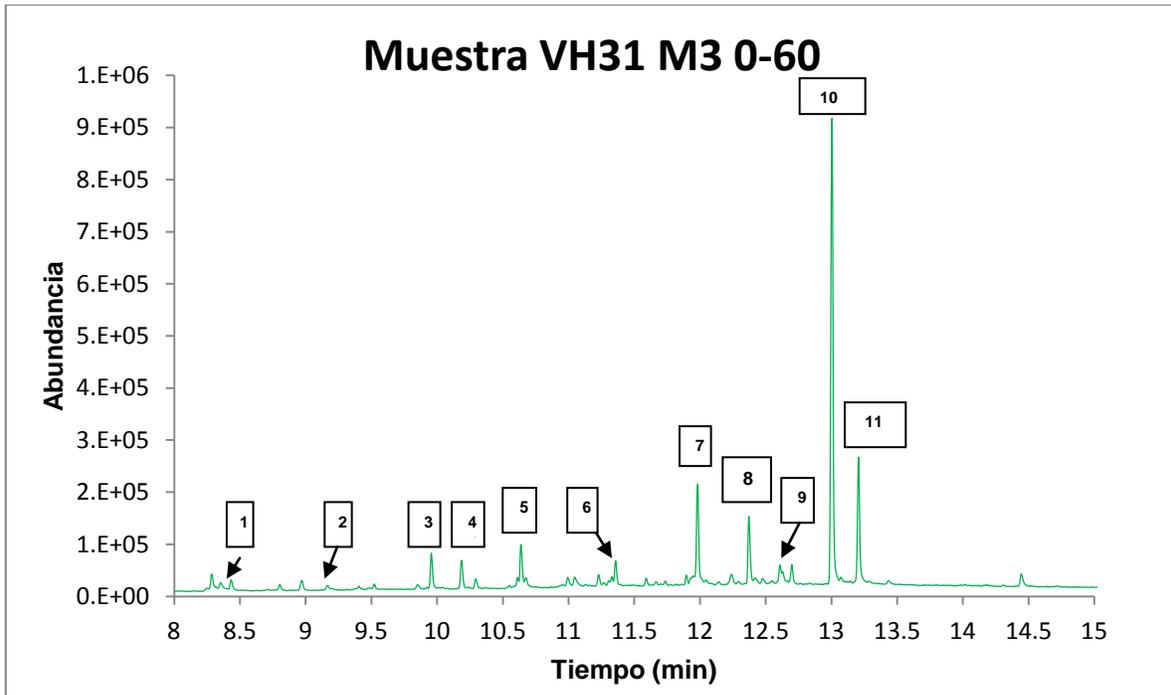


Figura 40. Cromatograma de la extracción con SPME de la muestra VH31 M3 0-60.

Tabla 14. Resultados de la extracción con SPME de la muestra VH31 M3 0-60.

#	Tiempo de retención (min)	Compuesto	#	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	8.350	Ácido nonaico-TMS	7	11.983	Ácido mirístico-TMS
2	9.169	Ácido cáprico-TMS	8	12.371	Acido ftálico diisobutiléster
3	9.956	Dodecanol-TMS	9	12.610	Ácido n-pentadecanoico-TMS
4	10.184	Ciclosiloxano	10	12.998	Dibutil ftalalto
5	10.640	Ácido láurico-TMS	11	13.206	Ácido palmítico-TMS
6	11.356	Tetradecanol-TMS			

- Extracto saponificado de la muestra VH31 M3 0-60.

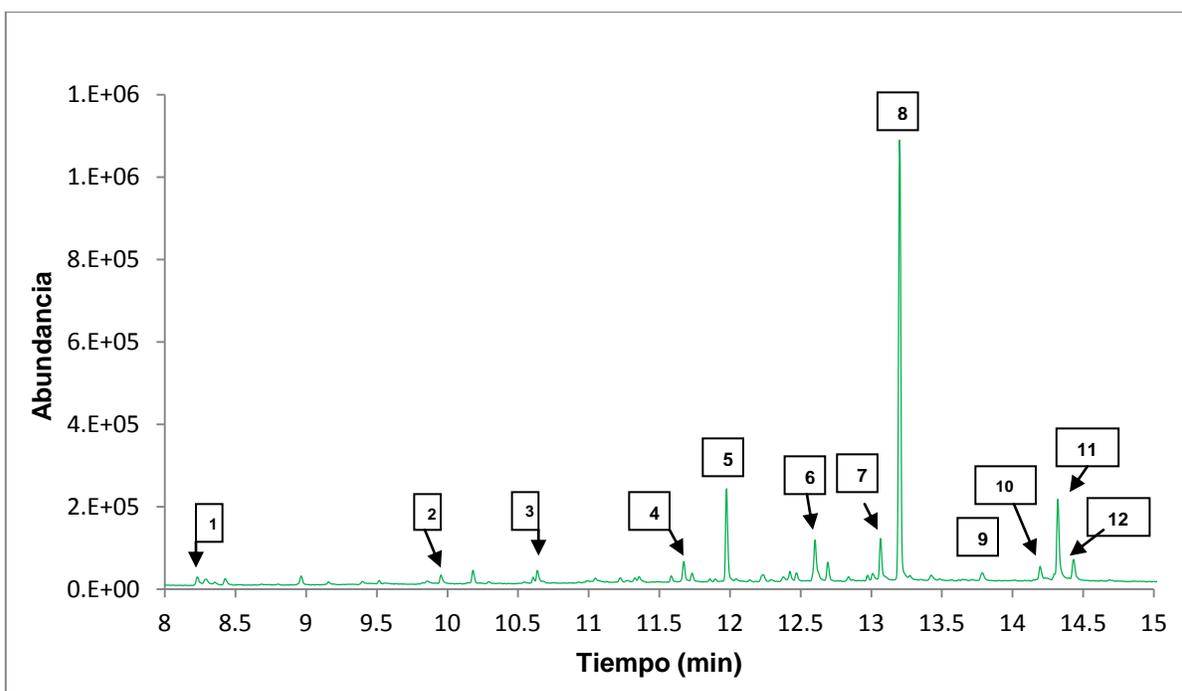


Figura 41. Cromatograma de la muestra VH31 M3 0-60 después de la saponificación.

Tabla 15. Resultados de la extracción con SPME de la muestra VH31 M3 0-60 después de la saponificación.

#	Tiempo de retención (min)	Compuesto	#	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	8.236	Ácido itacónico-TMS	8	13.200	Ácido palmítico-TMS
2	9.956	Dodecanol-TMS	9	13.786	Ácido heptadecanoico-TMS
3	10.635	Ácido láurico-TMS	10	14.195	Ácido trans 9-octadecanoico-TMS
4	11.672	Ácido isocítrico-TMS	11	14.320	Ácido esteárico-TMS
5	11.977	Ácido mirístico-TMS	12	14.434	Metil podocarpa
6	12.604	Ácido n-pentadecanoico-TMS			
7	13.066	Ácido palmitoleico-TMS			

- Extracto de la muestra VH3 D8 0-65.

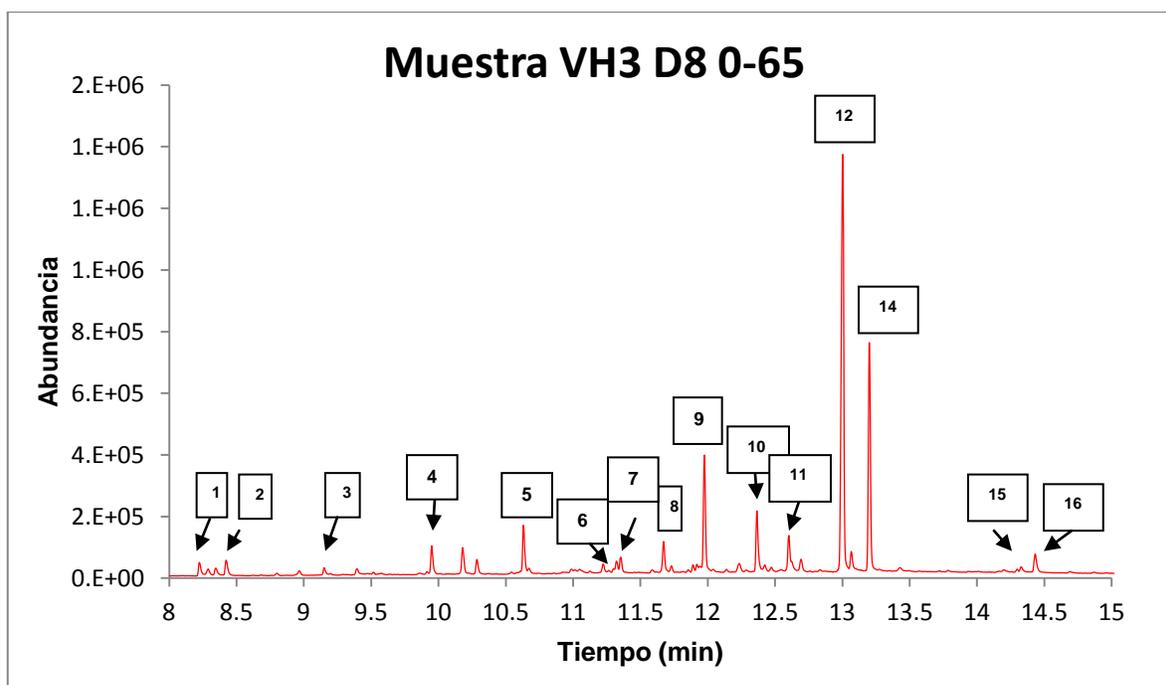


Figura 42. Cromatograma de la muestra VH3 D8 0-65.

Tabla 16. Resultados de la extracción con SPME de la muestra VH3 D8 0-65.

#	Tiempo de retención (min)	Compuesto	#	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	8.220	Ácido itacónico	9	11.978	Ácido mirístico-TMS
2	8.345	Ácido nonaico-TMS	10	12.366	Acido ftálico diisobutiléster
3	9.153	Ácido cáprico-TMS	11	12.604	Acid n-pentanoico-TMS
4	9.956	Dodecanol-TMS	12	13.003	Dibutil ftalato
5	10.635	Ácido láurico-TMS	13	13.066	Ácido palmitoleico-TMS
6	11.319	Acido n-tridecanoico-TMS	14	13.200	Ácido palmítico-TMS
7	11.356	Tridecanoato de metilo	15	14.330	Ácido esteárico-TMS
8	11.734	Ácido isocitríco-TMS	16	14.434	Metil podocarpa

- Extracto saponificado de la muestra VH3 D8 0-65.

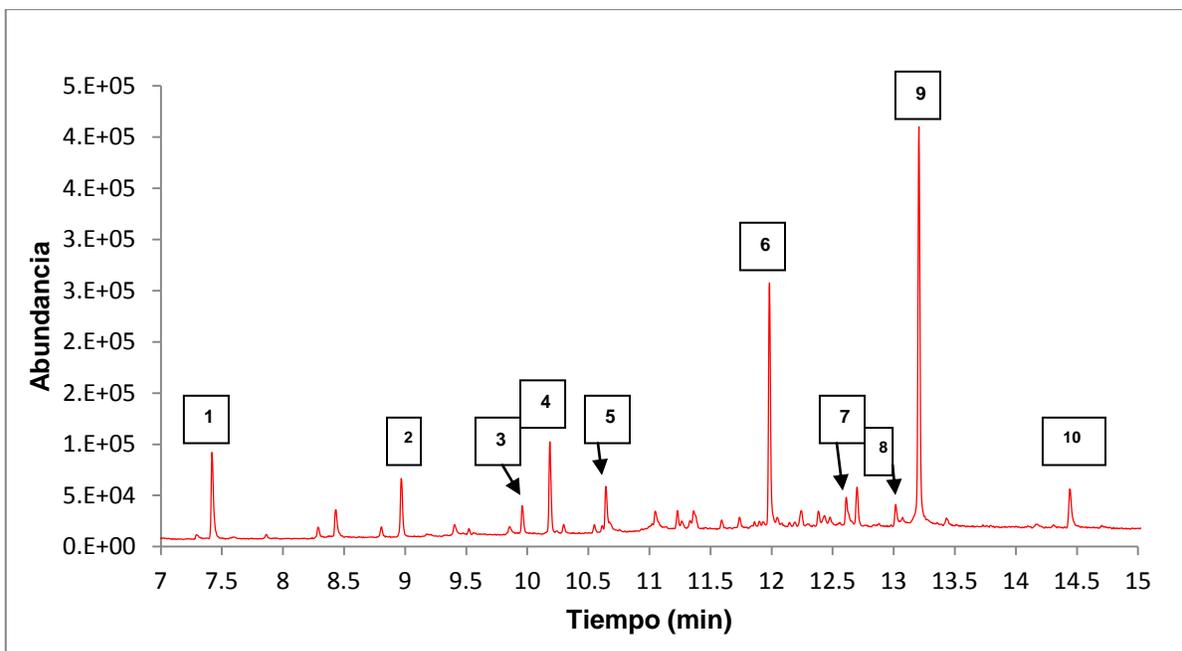


Figura 43. Cromatograma de la extracción con SPME de la muestra VH3 D8 0-65 saponificada.

Tabla 17. Resultados de la extracción con SPME de la muestra VH3 D8 0-65 después de la saponificación.

#	Tiempo de retención (min)	Compuesto	#	Tiempo de retención (min)	Compuesto
1	7.417	Glicerol-TMS	6	11.982	Ácido mirístico-TMS
2	8.966	Ciclosiloxano	7	12.615	Ácido n-pentadecanoico-TMS
3	9.961	Dodecanol-TMS	8	13.071	Ácido palmitoleico-TMS
4	10.184	Ciclosiloxano	9	13.211	Ácido palmítico-TMS
5	10.640	Ácido láurico-TMS	10	14.444	Metil podocarpa

## 6. CONCLUSIONES.

Se seleccionó un programa de temperatura con el cual se logró la separación y detección de todos los analitos en estudio por Cromatografía de Gases.

Se seleccionó el reactivo sililante adecuado para realizar el análisis, el HMDS, con el que se consiguió una buena reacción química para los analitos.

Se lograron optimizar los 4 parámetros que influyen en la extracción de los ácidos grasos al utilizar la técnica de Microextracción en Fase Sólida estos fueron la temperatura de extracción, el pH, la fuerza iónica por una adición de una sal inorgánica y el tiempo de extracción. Y los 2 parámetros que influyen en la reacción de formación del derivado como fueron el volumen de reactivo sililante y el tiempo de reacción.

Se observó la importancia de la aplicación de la técnica de SPME para la extracción de los ácidos grasos, proporcionando selectividad y especificidad. Así como la disminución del uso de disolventes orgánicos y una introducción de muestra más limpia; disminuyendo la contaminación de analitos en el sistema cromatográfico. También se logró la pre-concentración de los analitos ya que se contaba con cantidades pequeñas de muestra.

Al realizar la optimización de la temperatura, se decidió no aumentarla más ya que los analitos pueden entrar en un proceso de absorción-desorción con la fibra provocando la expulsión de los analitos. Este fenómeno se observó en algunos compuestos como C14 y C18 donde a una temperatura de 60°C se percibe una disminución en el área de los picos. También se podrían tener problemas con el agua a temperaturas mayores.

Con el sistema acoplado Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas se separaron y caracterizaron los residuos orgánicos presentes en las vasijas arqueológicas.

De acuerdo a los resultados se puede concluir que las vasijas sí pudieron contener un aceite vegetal como el aceite de palma o de coco debido al alto contenido de ácido palmítico. También pudo contener una grasa de origen animal debido a la presencia de ácidos grasos insaturados con número impar de átomos de carbono.

La presencia de ftalatos puede deberse a la contaminación de las muestras con residuos debido al almacenamiento de estas en recipientes de plástico.

Se observó que los ácidos grasos que se determinaron estaban en forma libre esto puede deberse a las condiciones climáticas, las cuales provocaron la hidrólisis de los triglicéridos.

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que las vasijas si pudieron ser utilizadas para contener algún tipo de alimento.

## 7. REFERENCIAS.

1. Petrović, M., Kezić, N., Bolanča, V. (2010). Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. *Food Chemistry*, **122**(1), 285-291.
2. Malainey, M.E., Przybylski, R., Sherriff, B.L. (1999). The Fatty Acid Composition of Native Food Plants and Animals of Western Canada. *J Archaeol Sci*, **26**(1), 83-94.
3. Giudice, C.A. y Preyra, A.M. Protección de materiales 1. Pinturas y recubrimientos. 1-80. <http://www.frlp.utn.edu.ar/materias/protecmat/pinturas.pdf> (Consultada el 20 de julio del 2015)
4. Palou, A., Pico, C., Bonet, M.L. El Libro Blanco de Las Grasas En La Alimentación Funcional 1-136. <http://www.institutoflora.com/pdf/Grasas-en-la-Alimentacion-Funcional-Libro-Blanco-Instituto-Flora.pdf> (Consultada el 18 julio del 2015)
5. Ortega, R.M., Perez, F., Bultó, L., Quesada, E. Perjuicios y verdades sobre las grasas y otros alimentos, 20-27. [http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/prejuicios\\_y\\_verdades\\_sobre\\_grasas.pdf](http://www.nutricion.org/publicaciones/pdf/prejuicios_y_verdades_sobre_grasas.pdf). (Consultada el 18 julio del 2015)
6. Kanthilatha, N., Boyd, W., Dowell, A. (2014). Identification of preserved fatty acids in archaeological floor sediments from prehistoric sites at Ban Non Wat and Nong Hua Raet in northeast Thailand using gas chromatography. *J Archaeol Sci*, **46**, 353-362. doi:10.1016/j.jas.2014.03.033.
7. Fennema, O., (2000), *Introducción a la química de los alimentos*, Acribia
8. Dergal S.B., (2006), *Química de Los Alimentos*, Edo. de México, México, Editorial Pearson.
9. Hernández M., Sastre A, (1999), *Tratado de Nutrición*. Madrid, España, Editorial Díaz de santos.
10. Lozano, J.M., Simó, R., Grimalt, J.O., Estévez, J. (1995). Indicadores Químicos de combustión en un hogar del yacimiento de Mediona I. *Trabajos de prehistoria*, **52**, 145-155.
11. Evershed, R.P. (2008). Organic residue analysis in archaeology: The archaeological biomarker revolution. *Archaeometry*, **50**(6), 895-924. doi:10.1111/j.1475-4754.2008.00446.x.

12. Goldenberg, L., Neumann, R., Weiner, S. (2014). Microscale distribution and concentration of preserved organic molecules with carbon-carbon double bonds in archaeological ceramics: Relevance to the field of residue analysis. *J Archaeol Sci*, **42** (1), 509-518. doi:10.1016/j.jas.2013.11.025.
13. Luisa, M., Guerrero, C., Vizcaíno, A.S. Análisis de indicadores bioquímicos en un ataífor almohade. [http://www.ujaen.es/revista/arqytm/PDF/R3/R3\\_13\\_Ataifor.pdf](http://www.ujaen.es/revista/arqytm/PDF/R3/R3_13_Ataifor.pdf) (Consultado el 10 de julio de 2015).
14. Cañabate, L. M., Sanchez, A. (1995). Analisis de indicadores Bioquímicos del contenido de recipientes arqeológicos. *Complutum*, **6**, 281-291.
15. Craig, O.E. (2001). The Development of Dairying in Europe: potential evidence from food residues on ceramics. *Documenta Praehistorica*, **29**, 97-107. <http://eprints.whiterose.ac.uk/54355/>.
16. Saliu, F., Degano, I., Colombini, M.P. (2014). Identification of triacylglycerols in archaeological organic residues by core-shell reversed phase liquid chromatography coupled to electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, **1346**, 78-87. doi:10.1016/j.chroma.2014.04.049.
17. Gómez, L. Vieillescazes, C.(2008). Cromatografía y arqueobotánica. Estudio de copal arqueológico como adhesivo y material de moldeado en objetos aztecas, 1-4. [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 6 de agosto de 2015).
18. Mottram, H.R., Dudd, S.N., Lawrence, G.J., Stott, A. W., Evershed, R.P. (1999). New chromatographic, mass spectrometric and stable isotope approaches to the classification of degraded animal fats preserved in archaeological pottery. *J Chromatogr A*, **833**(2), 209-221. doi:10.1016/S0021-9673(98)01041-3.
19. Malán, M., Vallve, E., Malvar, A., Campos, S. (2013). Sobre vasijas y sus decoraciones: un acercamiento a sus funciones y usos. *Cuad del Inst Antropol y Pensam Latinoam Ser Spec*, **1**(2), 61-71.
20. Regert, M., Garnier, N., Decavallas, O., Cren-Oliv, C., Rolando, C. (2003). Structural characterization of lipid constituents from natural substances preserved in archaeological environments. *Meas Sci Technol*, **14**(9), 1620-1630. doi:10.1088/0957-0233/14/9/313.

21. Evershed, R.P. (2008). Experimental approaches to the interpretation of absorbed organic residues in archaeological ceramics. *World Archaeol*, **40**(1), 26-47. doi:10.1080/00438240801889373.
22. Pan, L. and Pawliszyn, J. (1997). Derivatization / Solid-Phase Microextraction : New Approach to Polar Analytes, **69**(2), 196-205.
23. Pusvaskiene, E., Januskevici, B., Prichodko, A., Vickackaite, V. (2008). Simultaneous Derivatization and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Fatty Acid GC Determination in Water. *Chromatographia*, **69**(3-4), 271-276. doi:10.1365/s10337-008-0885-y.
24. Lamarque A., Zygadlo J, Labuckas D, López L, Torres M. (2008), *Fundamentos Teórico-Prácticos de Química Orgánica*. Córdoba, Argentina, Editorial Brujas.
25. Ocampo R, Rios L, BentanL, Ocampo D., (2008), *Curso Práctico de Química Orgánica. Enfocado a Biología Y Alimentos*. Medellín, Colombia, Editorial Universidad de Caldas.
26. Pitarch Arquimbau, E. (2001). *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. (Tesis doctoral). Departamento de ciencias experimentales. Universidad Jaime I.
27. Guarnizo A, Martinez P. (2009), *Experimentos de Química Orgánica. Con Enfoque En Ciencias de La Vida*, Armenia, Colombia, Editorial Elizcom.
28. Buchholz, K.D., Pawllszyn, J. (1994). Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols. *Anal Chem*, **66**(1), 160-167. doi:10.1021/ac00073a027.
29. Sigma Aldrich, Supelco. *A Practical Guide to Quantitation with Solid Phase Microextraction*. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/11143.pdf> (Consultada el 18 de agosto de 2015)
30. Shirey, R.E. (2012). *SPME Commercial Devices and Fibre Coatings*. Elsevier Inc, Handbook of Solid Phase Microextraction, 99-133. doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00004-8.
31. Jiang, G., Huang, M., Cai, Y., Lv, J., and Zhao, Z. (2006). Progress of solid-phase microextraction coatings and coating techniques. *J Chromatogr Sci*, **44**(6), 324-332.

32. Carmen C, Perez C. (2012), *Análisis Químico de Trazas*. Madrid, España, Editorial Sintesis.
33. Zhang, M., Zeng, J., Wang, Y., and Chen, X. (2013). Developments and trends of molecularly imprinted solid-phase microextraction. *J Chromatogr Sci*, **51**(7), 577-586. <http://dx.doi.org/10.1093/chromsci/bms260>.
34. Pawliszyn, J. (2000). Theory of Solid-Phase Microextraction. *J Chromatogr Sci*, **38**, 270-278. doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00002-4.
35. Seethapathy, S., Górecki, T. (2012). Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A review. *Anal Chim Acta*, **750**, 48-62. doi:10.1016/j.aca.2012.05.004.
36. Farajzadeh, M.A., Nouri, N., Khorram, P. (2014). Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *TrAC - Trends Anal Chem*, **55**, 14-23. doi:10.1016/j.trac.2013.11.006.
37. Sigma Aldrich, Supelco. Solid Phase Microextraction troubleshooting guide. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Supelco/General Information/1/t101928.pdf> (Consultado el 18 de agosto de 2015).
38. Sparkman, O.D., Penton, Z., Kitson, F. (2011). Derivatization in GC/MS. Gas Chromatogr Mass Spectrom. *Academic Press*, 435-458. doi:10.1016/B978-0-12-373628-4.00043-5.
39. Orata F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. *InTechOpe*, 83-108. doi: 10.5772/33098
40. Rosenfeld, J (2002). Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Anal Chim Acta*, **465**(1-2), 93-100. doi:10.1016/S0003-2670(02)00467-1.
41. Supelco Analytical, Fluka Analytical. Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf> (Consultada el 2 de agosto de 2015).
42. Stashenko, E.E., Martínez, J.R. (2004). Derivatization and solid-phase microextraction. *TrAC - Trends Anal Chem*, **23**(8), 553-561. doi:10.1016/j.trac.2004.06.002.

43. McNair H, Miller J, (2009), *Basic Gas Chromatography*, New Jersey, USA, Editorial Wiley
44. Rood D, (2007), *The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers*, Weinheim, Alemania, Editorial Wiley-VCH.
45. Kitson F, Larsen B, and McEwen C, (1996), *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, California, USA, Editorial Academic Press.
46. Dabrio M.V. (1971), *Cromatografía de Gases. Vol. I*, Madrid, España, Editorial Alhambra.
47. Reading, F. (2012). *Gas Chromatography*. Elsevier Inc, 435-439. doi:10.1016/0021-9673(93)80493-R.
48. Baugh, P.J, (1993), *Gas Chromatography. A Practical Approach*, Gran Bretaña, Reino Unido, Editorial Oxford.
49. Harris D.C. ,(2001), *Análisis Químico Cuantitativo*, Barcelona, España, Editorial Reverte.
50. Jennings W, Mittlefehldt E, Stremple P, (1997), *Analytical Gas Chromatography*, California, USA, Editorial Academic Press.
51. Harris D.C., (2010), *Quantitative chemical analysis*, New York, USA, Editorial W.H. Freeman and company.
52. Throck J, Sparkman O, (2007) *Introduction to Mass Spectrometry. Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation*, Gran Bretaña, Reino Unido, Editorial Wiley.
53. Gross J.H., (2011), *Mass Spectrometry*, Berlin, Alemania, Editorial Springer.
54. Wanner K, Hofner G., (2007), *Mass Spectrometry in Medicinal Chemistry*, Weinheim, Alemania, Editorial Wiley-VCH.
55. Mallet A.I., Down S, . (2009), *Dictionary of Mass Spectrometry*, Gran Bretaña, Reino Unido, Editorial Wiley.
56. Hoffman E, and Stroobant V, *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, Gran Bretaña, Reino Unido, Editorial Wiley.
57. Karasek F.W., Clement R.E., (1988), *Basic Gas Chromatography- Mass Spectrometry*. Amsterdam, Holanda, Editorial Elsevier.

58. Yu L, Conrads TP, Veenstra TD. (2011). Mass Spectrometry Instrumentation. *Academic Press*, 89-148. 2005. doi:10.1016/B978-0-12-373628-4.00004-6.
59. Dabrio M.V, (1973), Cromatografía de Gases. Vol. II, Madrid, España, Editorial Alhambra.

## Anexo 1.

Se muestra la comparación de cromatogramas para los diferentes parámetros que se probaron durante la optimización del método de extracción.

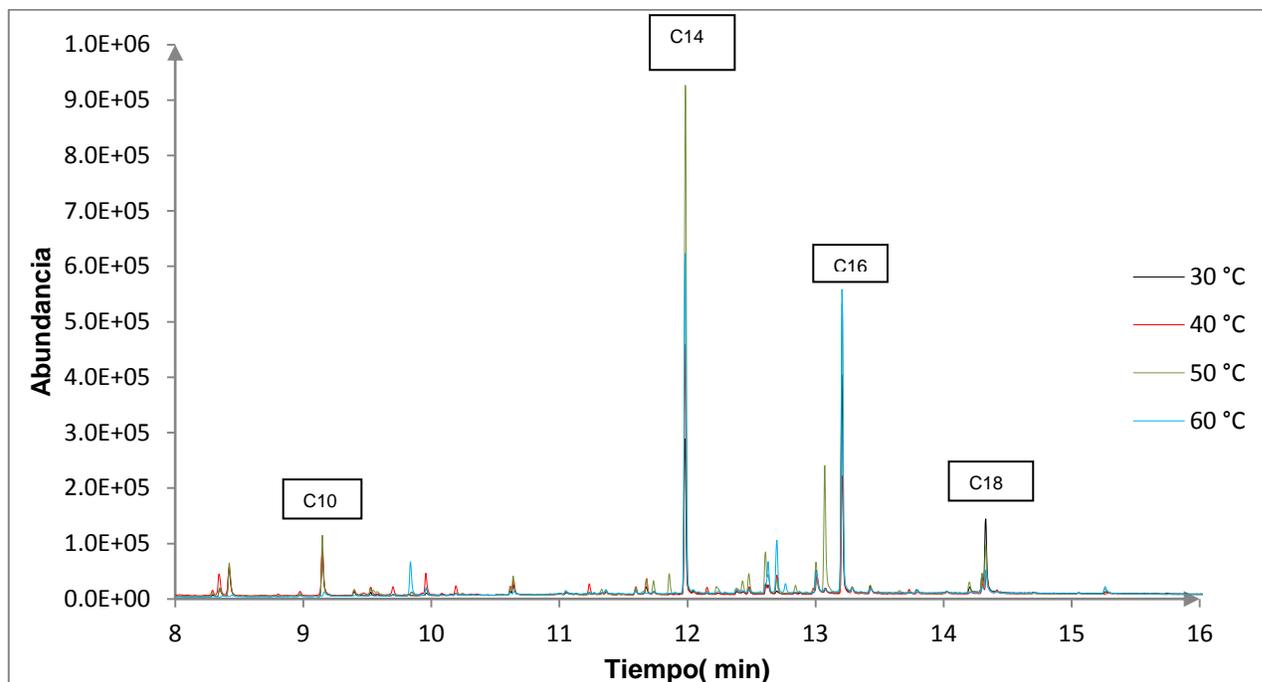


Figura 44. Comparación de los cuatro cromatogramas a los diferentes valores de temperatura.

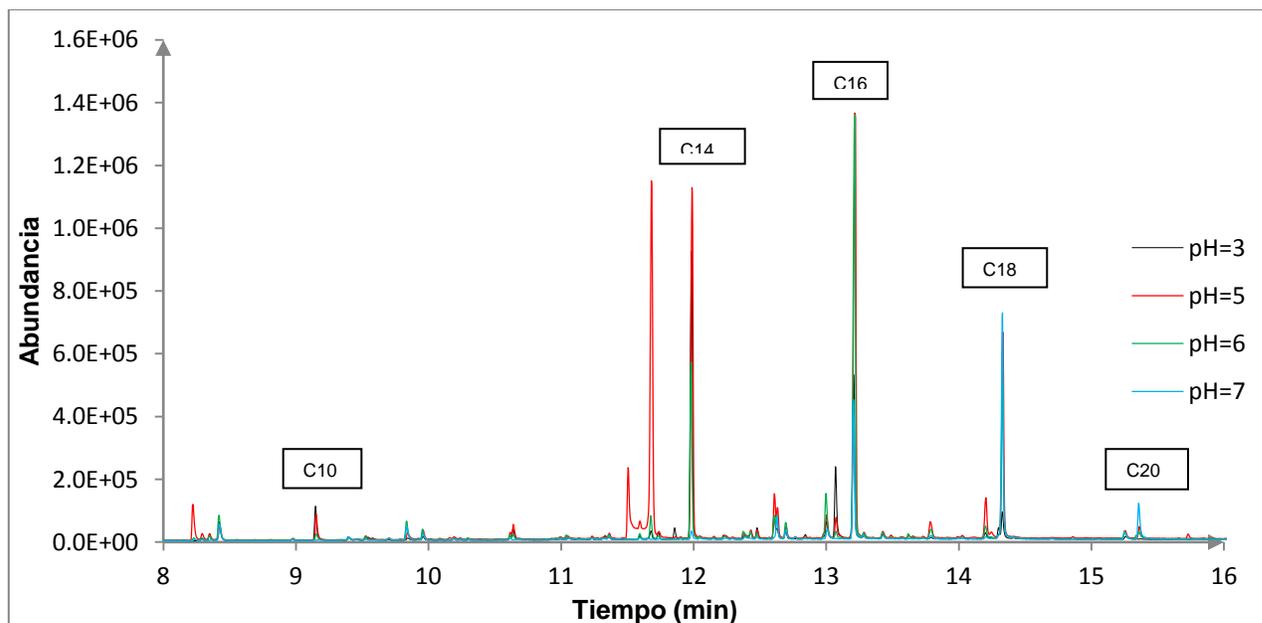


Figura 45. Comparación de los cuatro cromatogramas a los diferentes valores de pH.

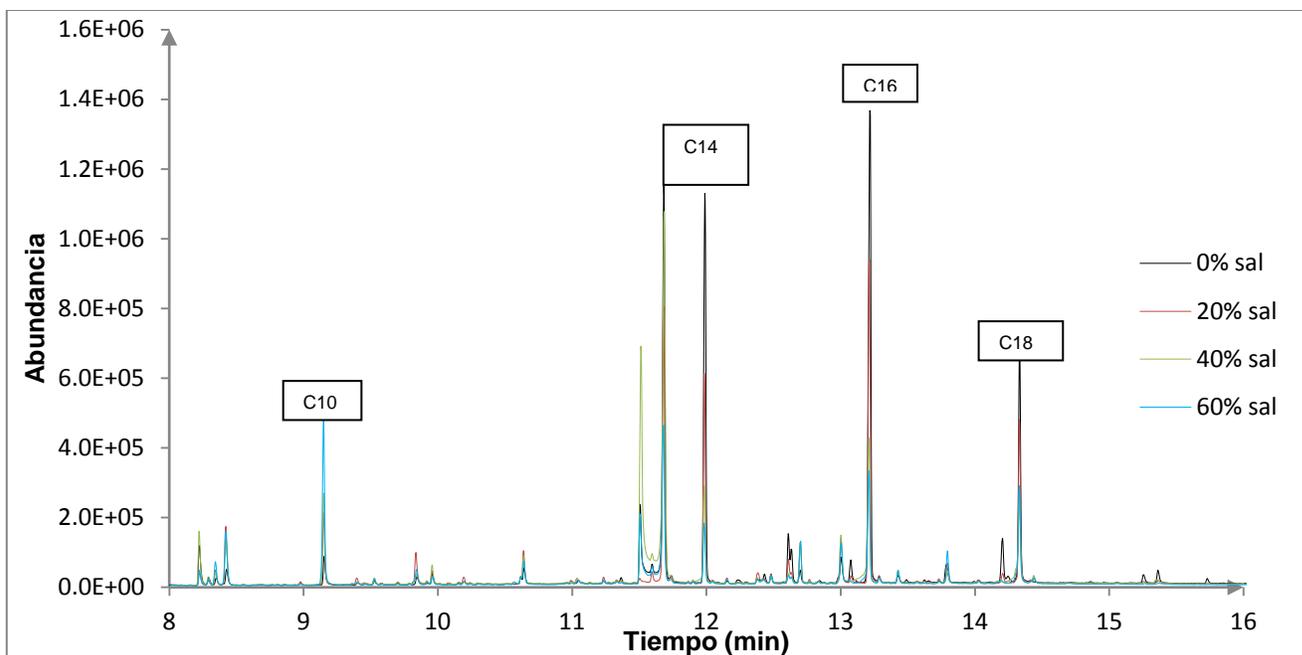


Figura 46. Comparación de cromatogramas a los diferentes valores de fuerza iónica.

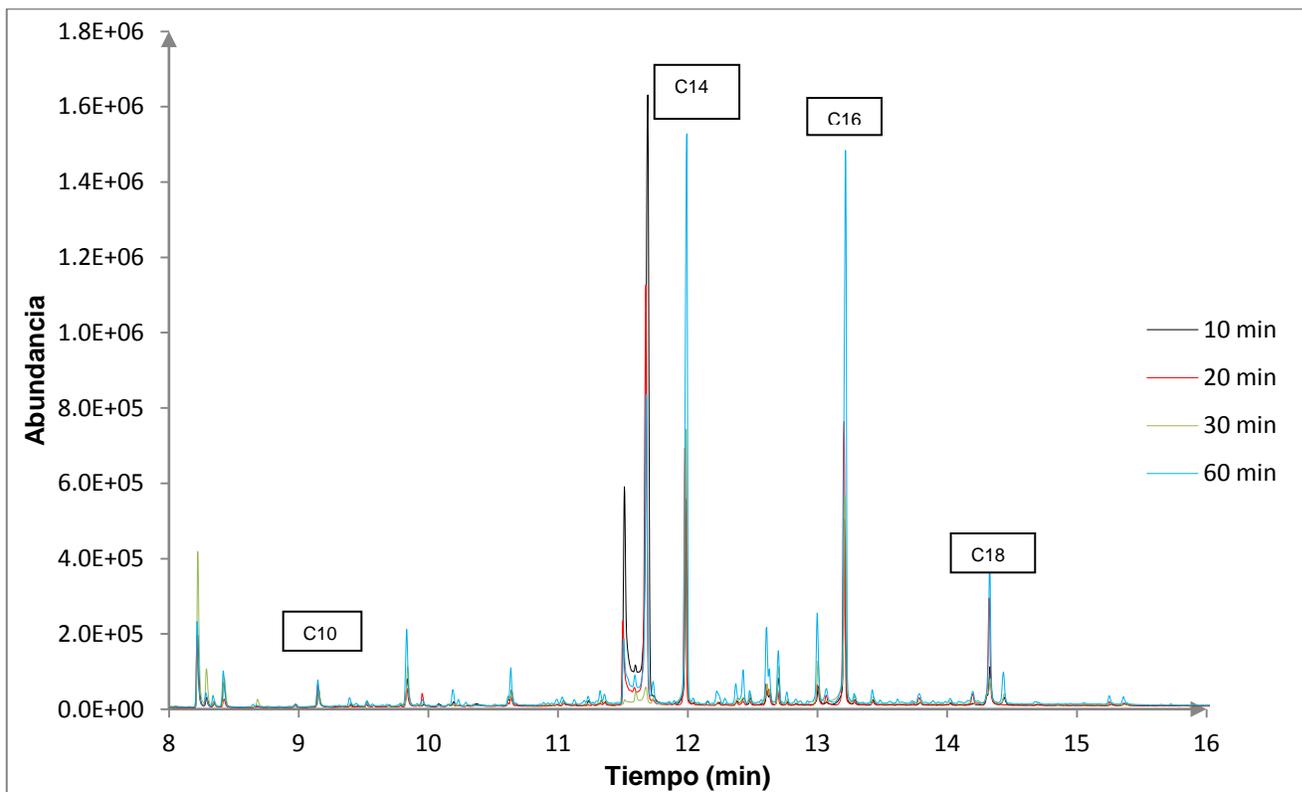


Figura 47. Comparación de los cromatogramas a los diferentes tiempos de extracción.

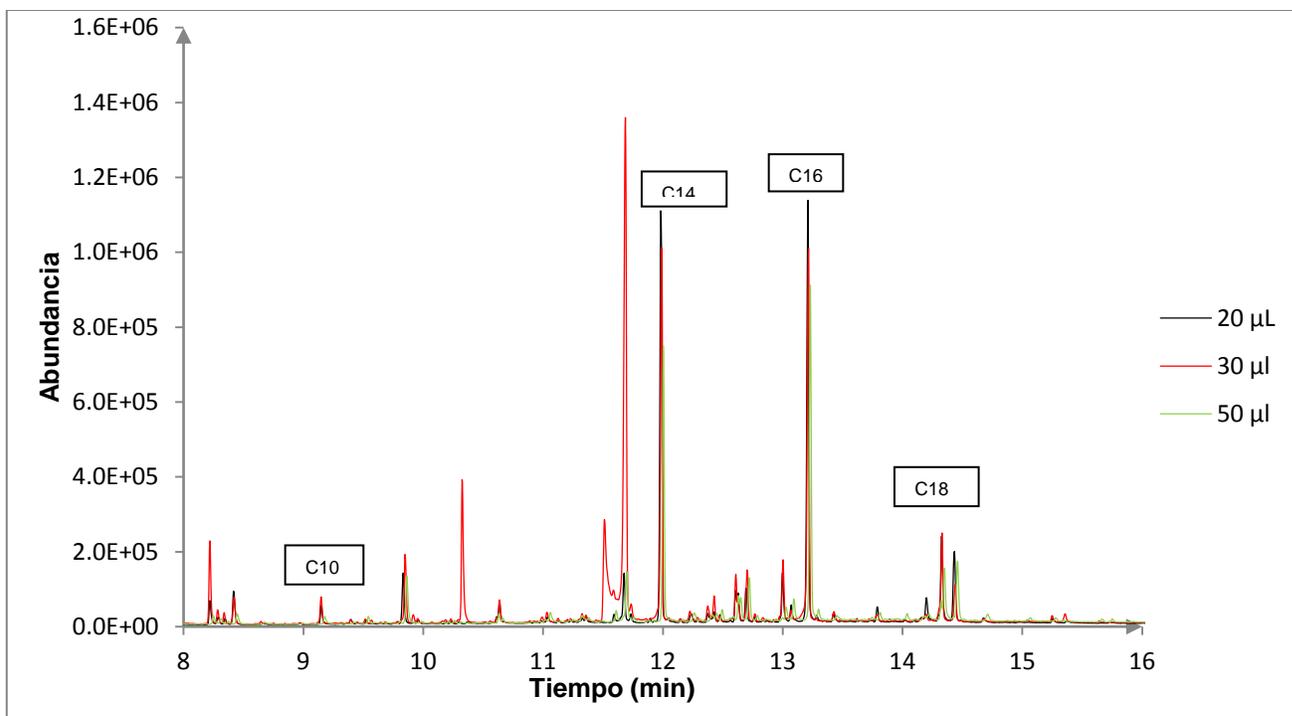


Figura 48. Comparación de los cromatogramas a los diferentes volúmenes de reactivo sililante.

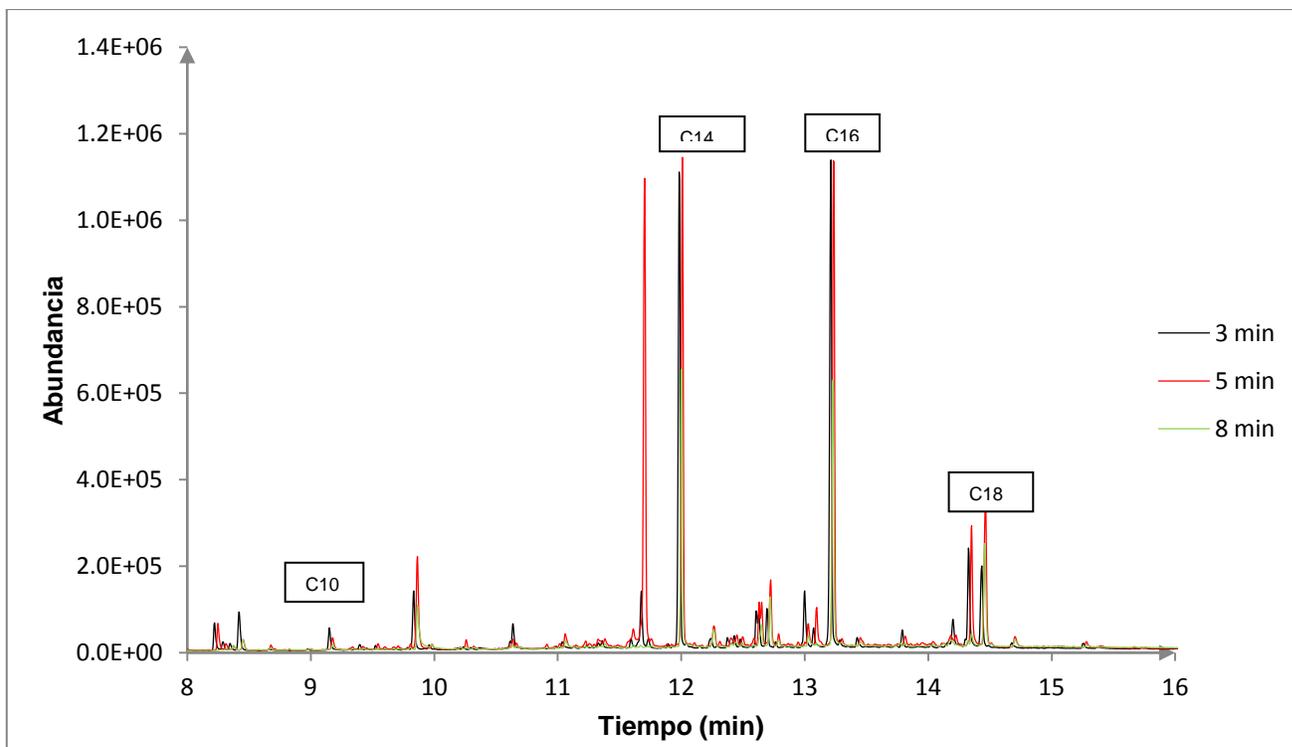


Figura 49. Comparación de los cromatogramas a los diferentes tiempos de formación del derivado.

## Anexo 2.

Espectro de masas de los estándares de los ácidos grasos.

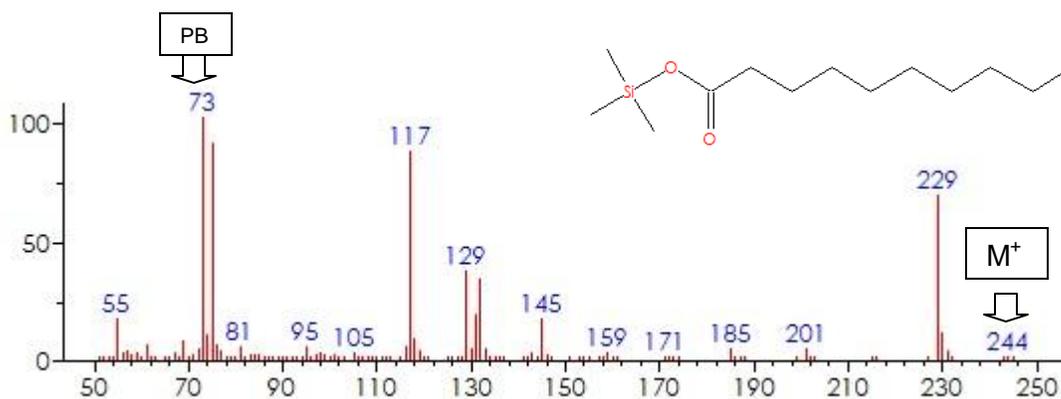


Figura 50. Ácido cáprico-TMS (tr= 9.222 min). Peso molecular: 244 uma.

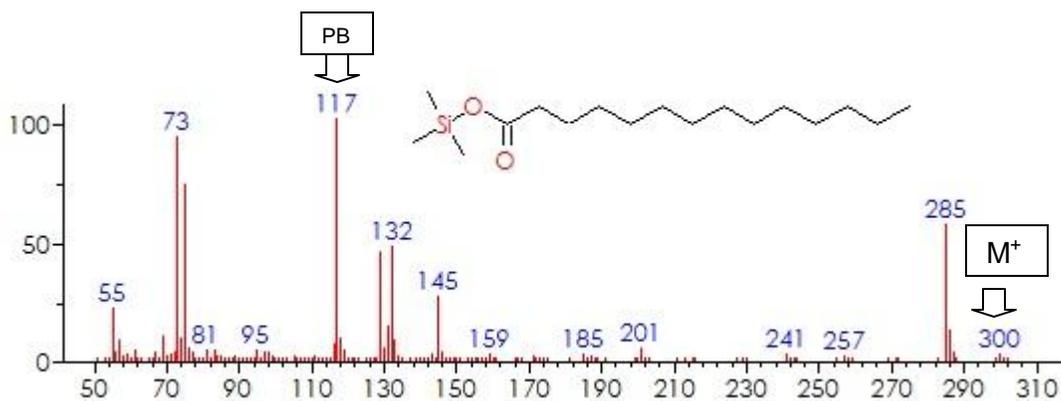


Figura 51. Ácido mirístico-TMS (tr=12.063 min). Peso molecular: 300 uma.

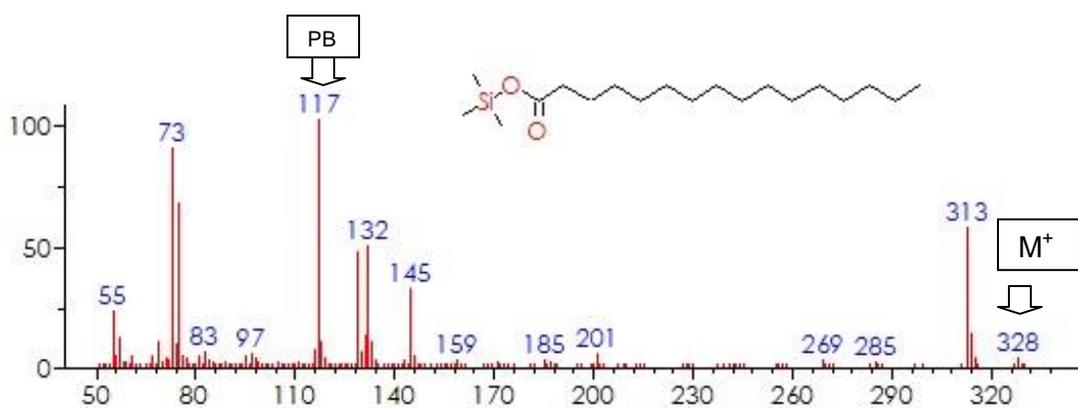


Figura 52. Ácido palmítico-TMS (tr= 13.290 min). Peso molecular: 328 uma

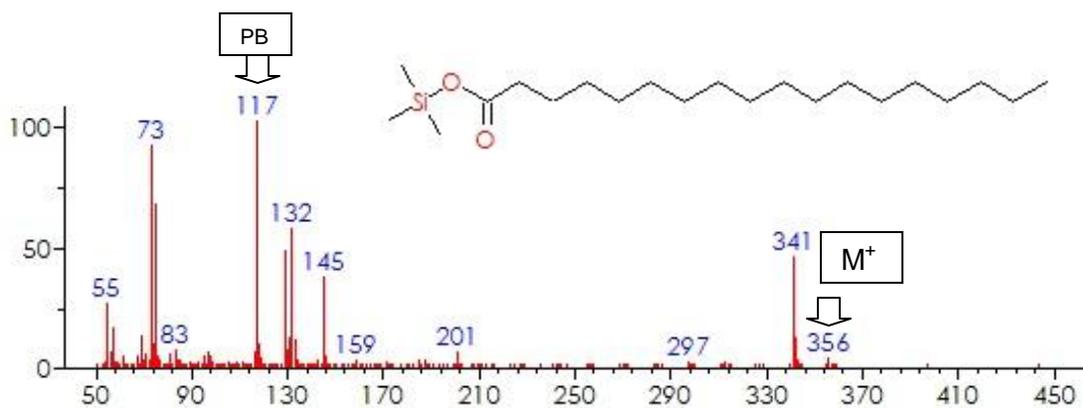


Figura 53. Acido estearico-TMS (tr= 14.413 min).Peso molecular: 356 uma.

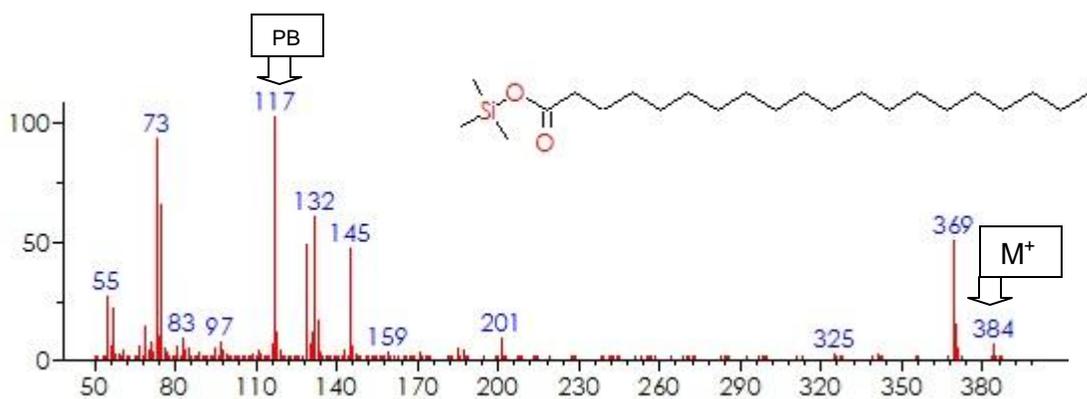


Figura 54. Acido araquídico-TMS (tr= 15.443 min). Peso molecular: 384 uma.

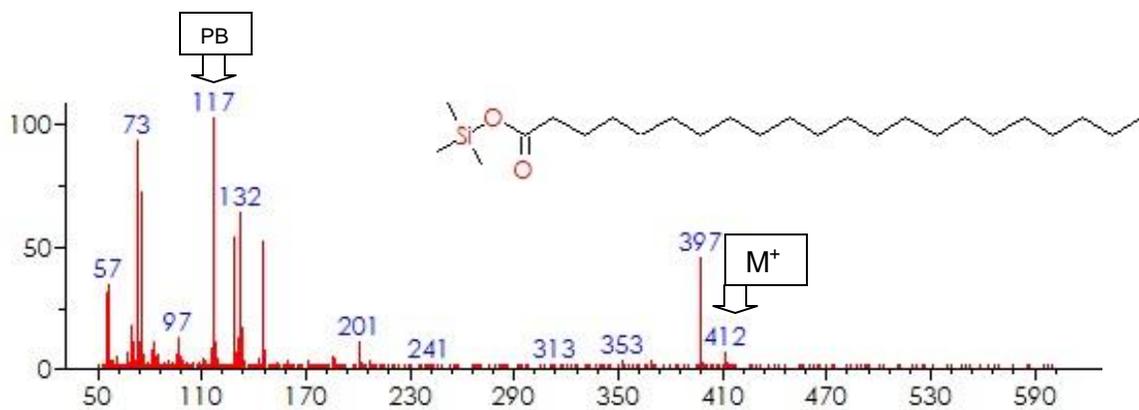


Figura 55. Acido behénico-TMS (tr= 16.392 min). Peso molecular: 412 uma.

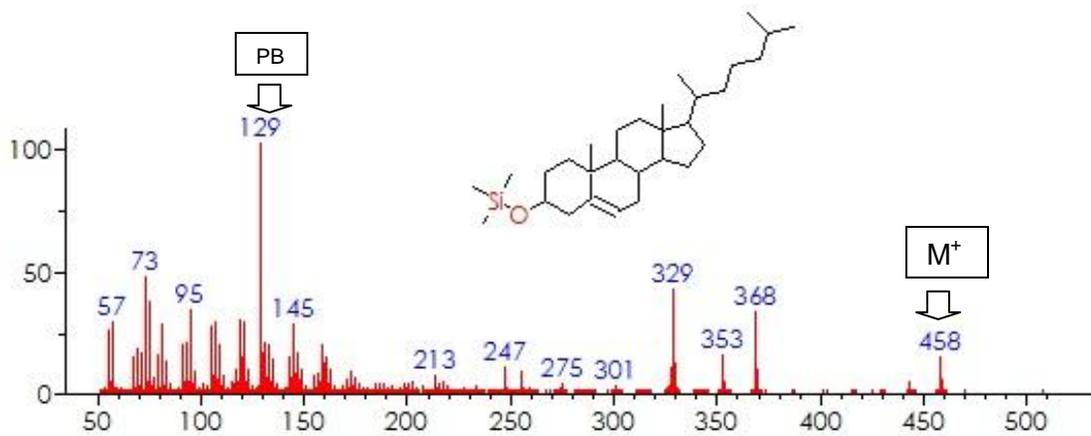


Figura 56. Colesterol-TMS (tr= 18.756 min). Peso molecular: 458 uma.

Espectro de masas de los analitos encontrados en las muestras.

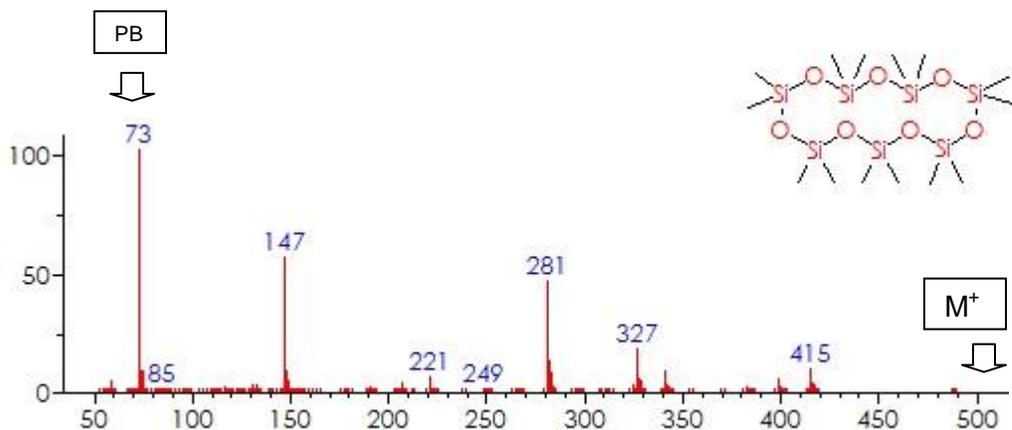


Figura 57. Espectro de Masas del pico Ciclosiloxano (tr= 8.966 min). Peso molecular: 518 uma.

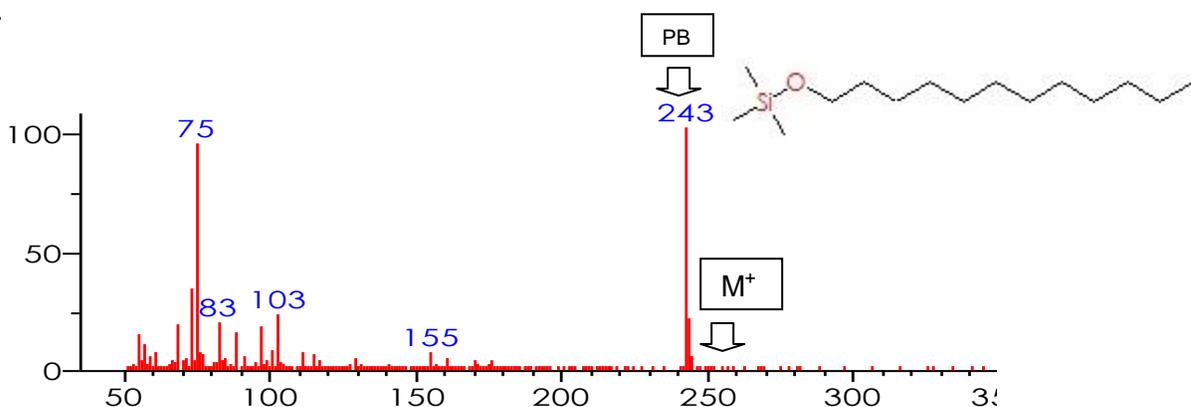


Figura 58. Espectro de Masas del pico Dodecanol-TMS (tr= 9.961 min). Peso molecular: 258 uma.

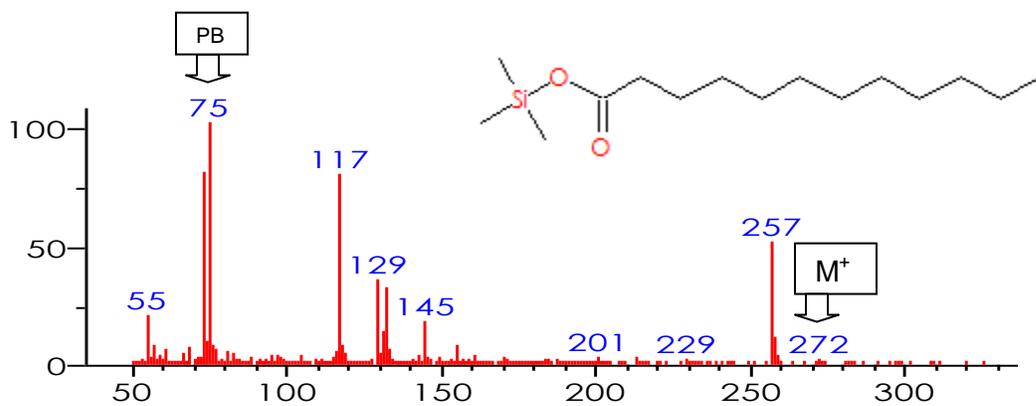


Figura 59. Espectro de Masas del pico Ácido láurico-TMS (tr= 10.640 min). Peso molecular: 272 uma.

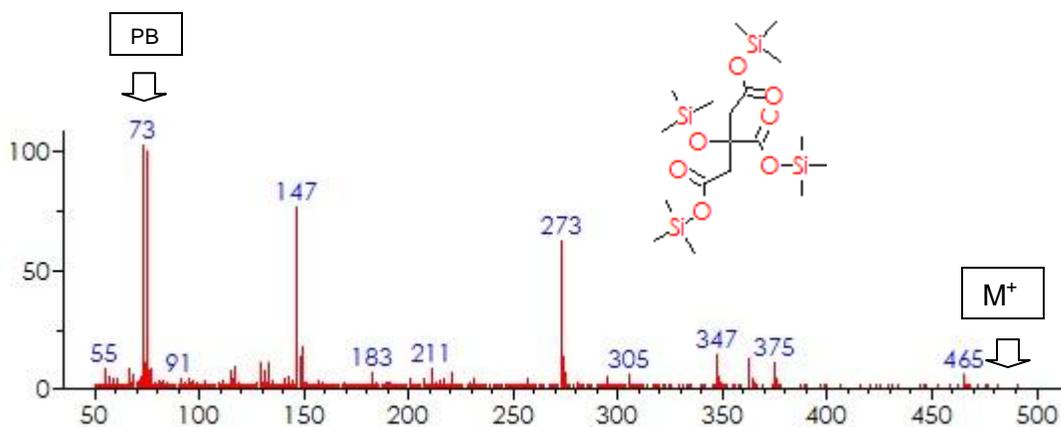


Figura 60. Espectro de Masas del pico Acido isocitrico-TMS (tr= 11.677 min).Peso molecular: 480 uma.

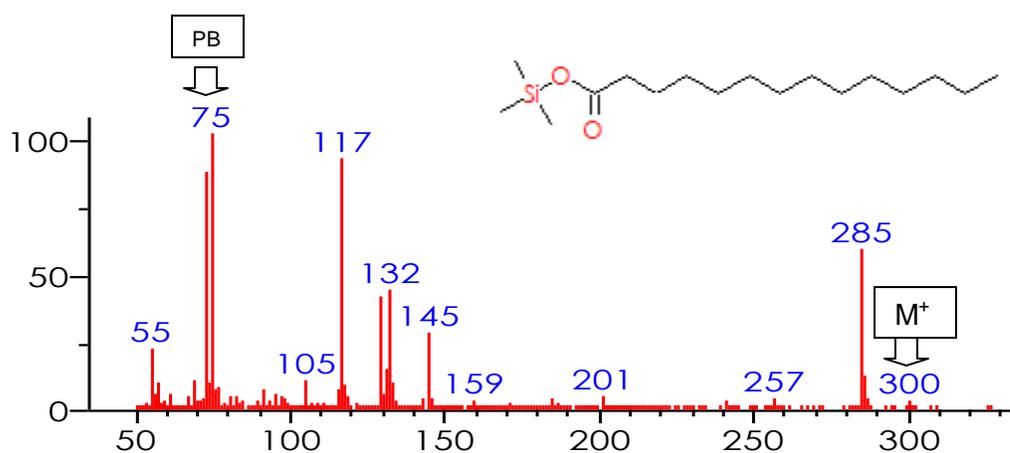


Figura 61. Espectro de Masas del pico Ácido mirístico-TMS (tr= 11.982 min).Peso molecular: 300 uma.

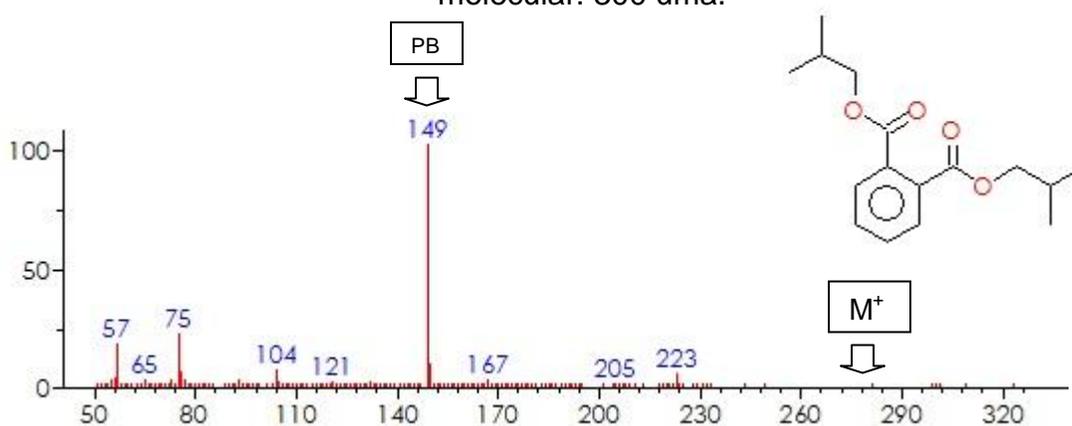


Figura 62. Espectro de Masas del pico Ácido Diisobutil ftalato (tr= 12.371 min).Peso molecular: 278 uma.

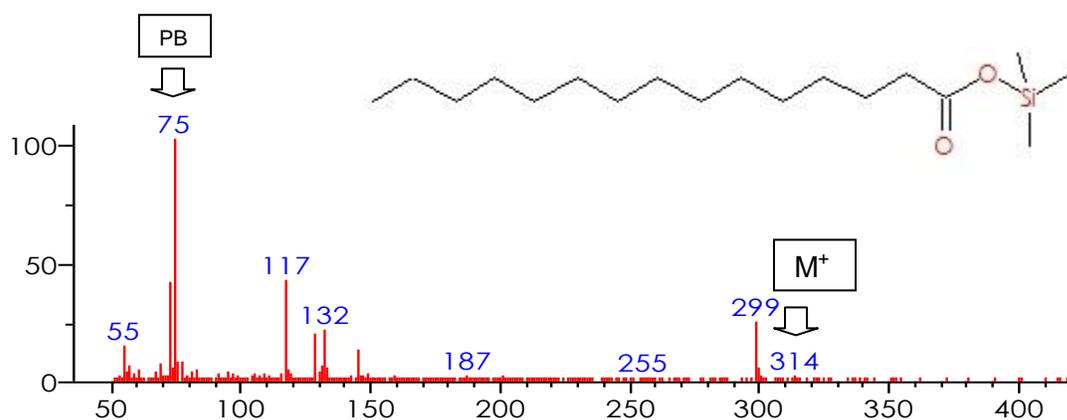


Figura 63. Espectro de Masas del pico Acido n- pentanoico-TMS (tr= 12.609 min).Peso molecular: 314 uma.

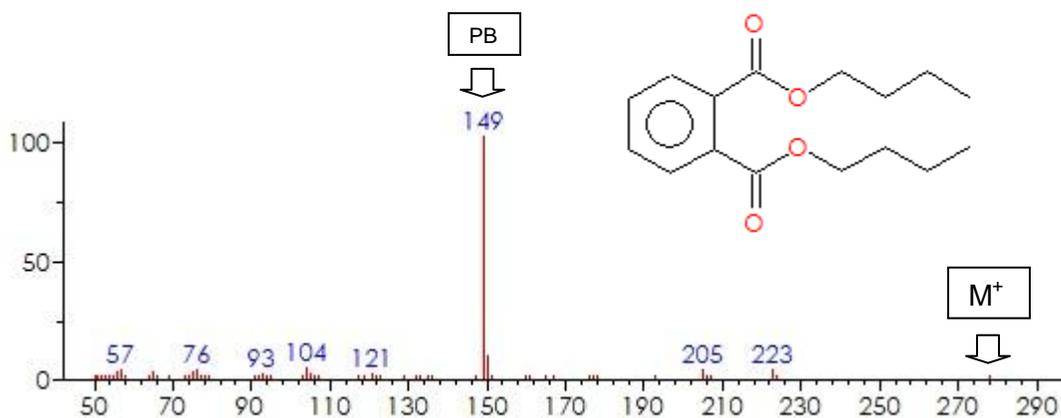


Figura 64. Espectro de Masas del pico Dibutil ftalato (tr= 13.003 min). Peso molecular: 278 uma.

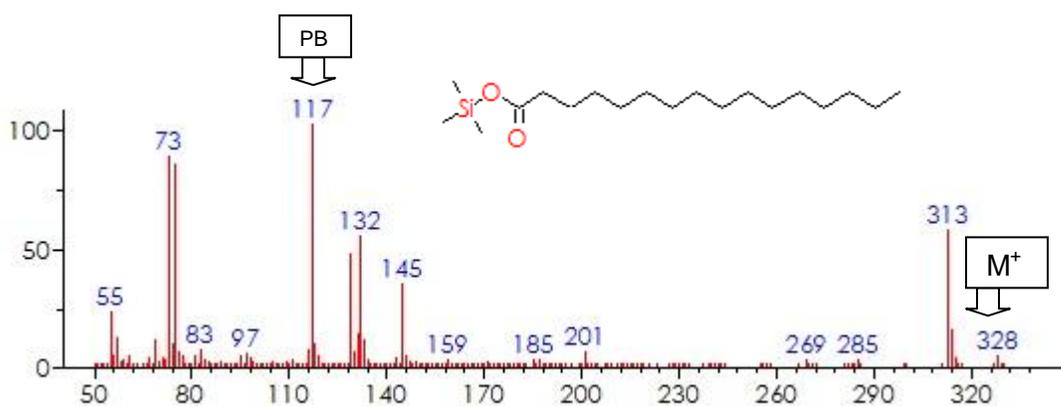


Figura 65. Espectro de Masas del pico Ácido palmítico-TMS (tr= 13.205 min).Peso molecular: 328 uma.

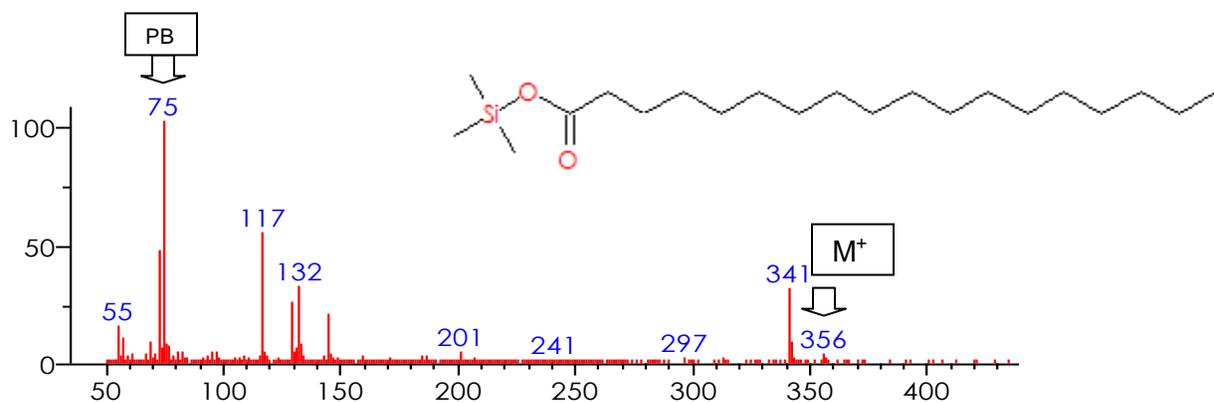


Figura 66. Espectro de Masas del pico Ácido esteárico-TMS (tr= 14.330 min). Peso molecular: 356 uma. Tiempo de retención:

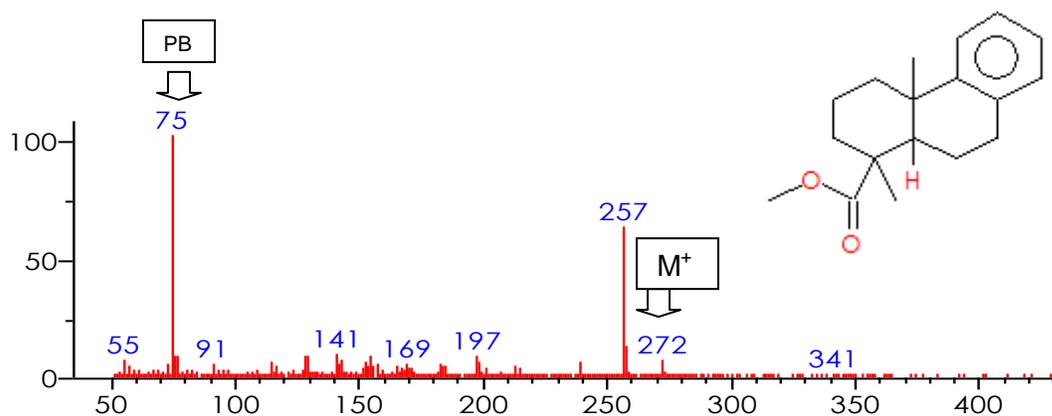


Figura 67. Espectro de Masas del pico Metil podocarpa (tr= 14.434 min). Peso molecular: 272 uma. Tiempo de retención:

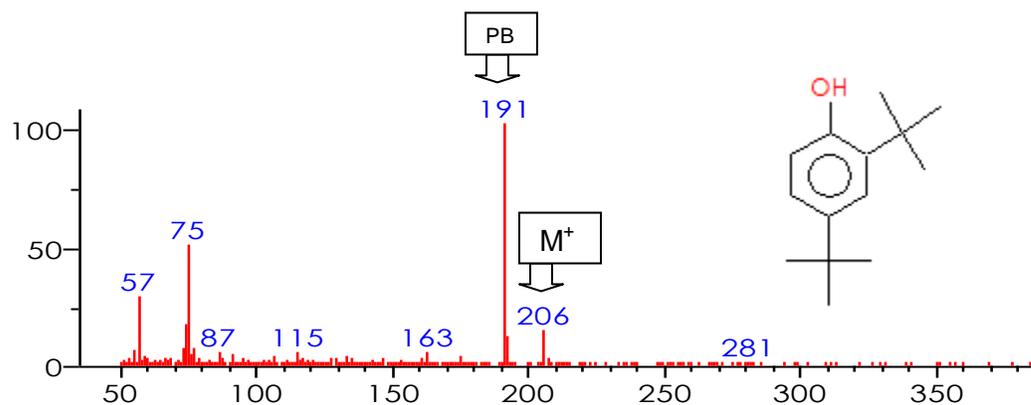


Figura 68. Espectro de Masas del pico 2,4-diterbutil fenol (tr= 9.847 min). Peso molecular: 206 uma. Tiempo de retención:

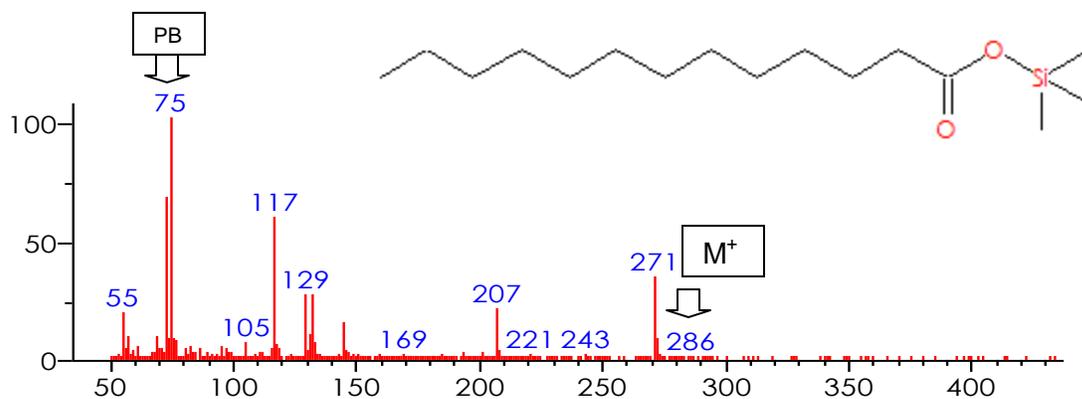


Figura 69. Espectro de Masas del pico Acido n-tridecanoico-TMS (tr= 11.319 min).Peso molecular: 286 uma.

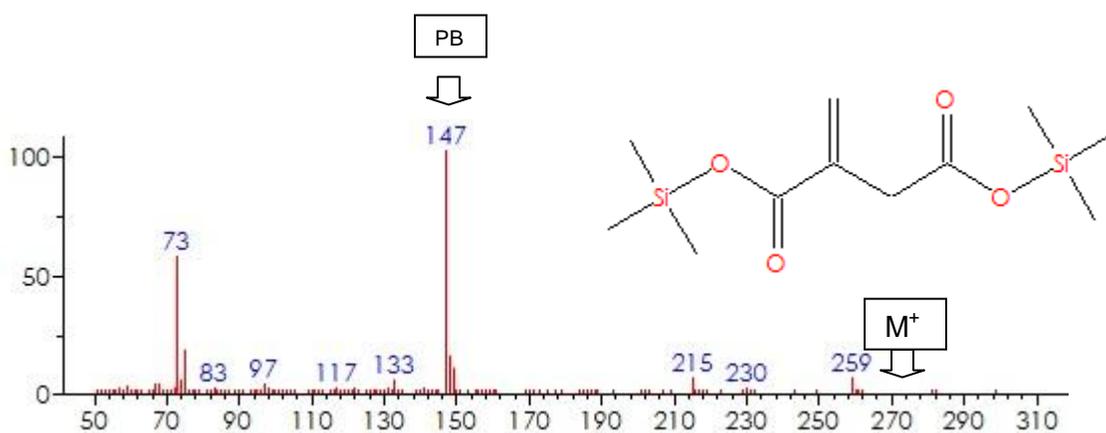


Figura 70. Espectro de Masas del pico Ácido itacónico-TMS (tr= 8.220 min) Peso molecular: 274uma.

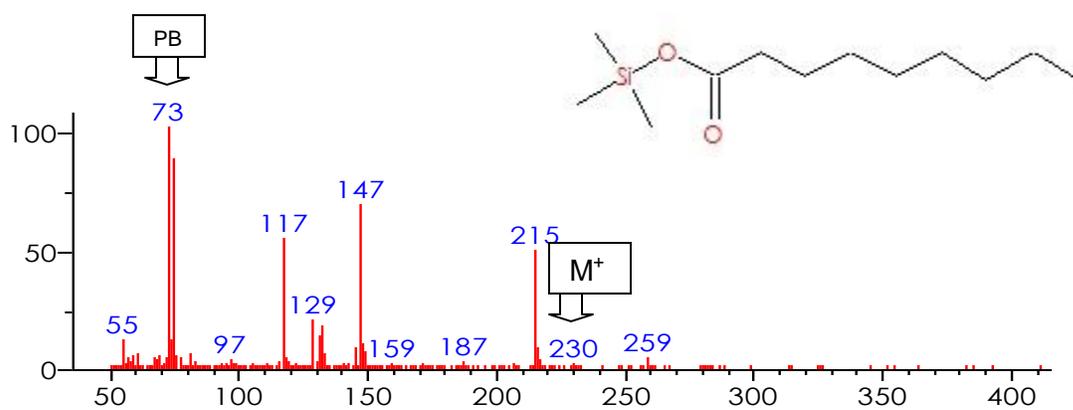


Figura 71. Espectro de Masas del pico Ácido nonanoico-TMS (tr= 8.345 min). Peso molecular: 230 uma.

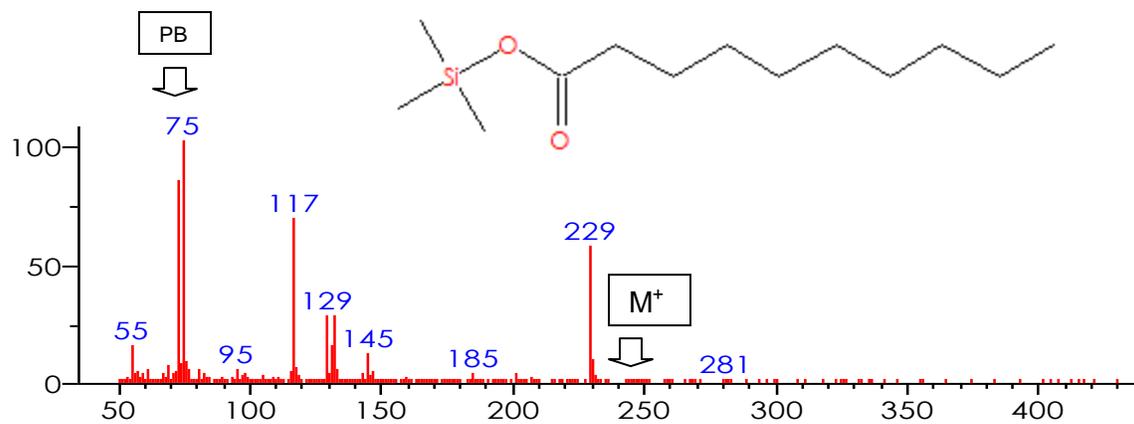


Figura 72. Espectro de Masas del pico Ácido cáprico-TMS (tr= 9.153 min). Peso molecular 244 uma.

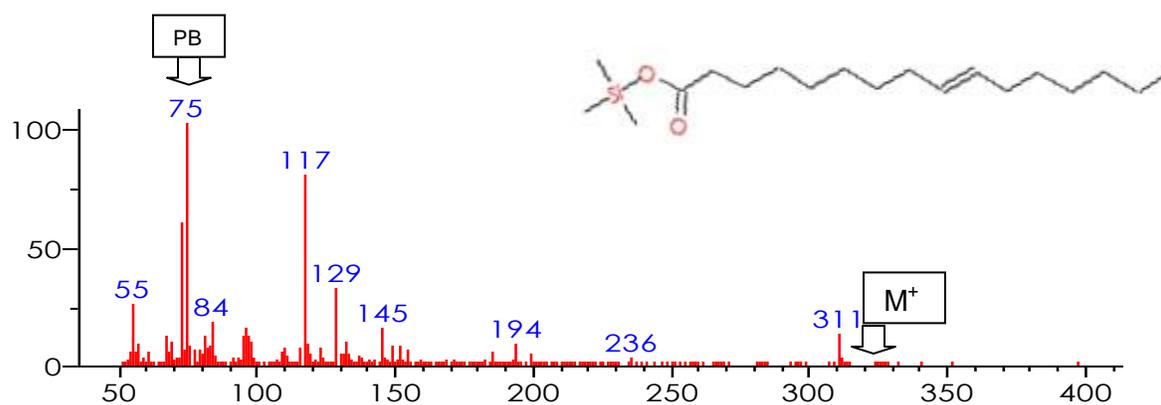


Figura 73. Espectro de Masas del pico Ácido palmitoleico-TMS (tr= 13.066 min). Peso molecular 326 uma.

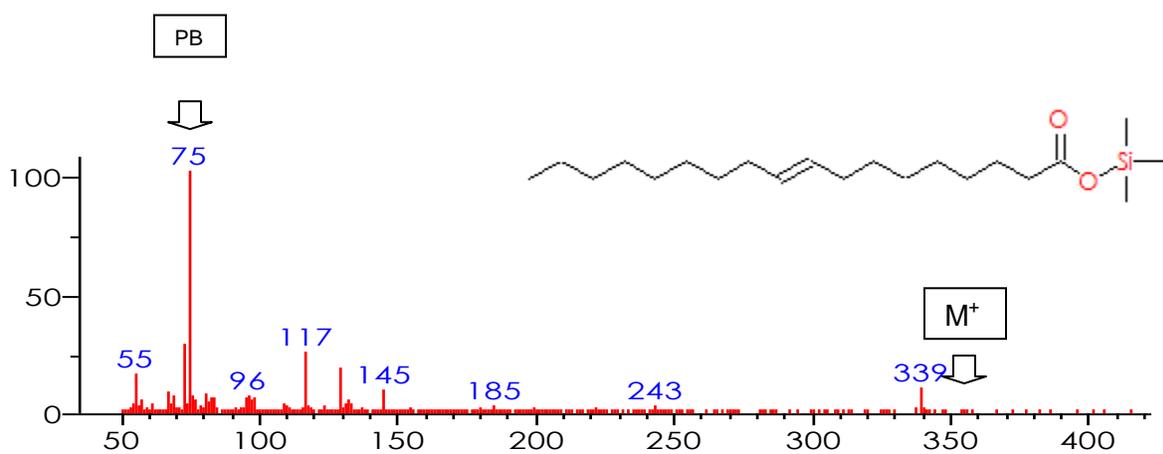


Figura 74. Espectro de Masas del pico Ácido trans-9 octadecanoico-TMS (tr= 14.195 min). Peso molecular: 354 uma.

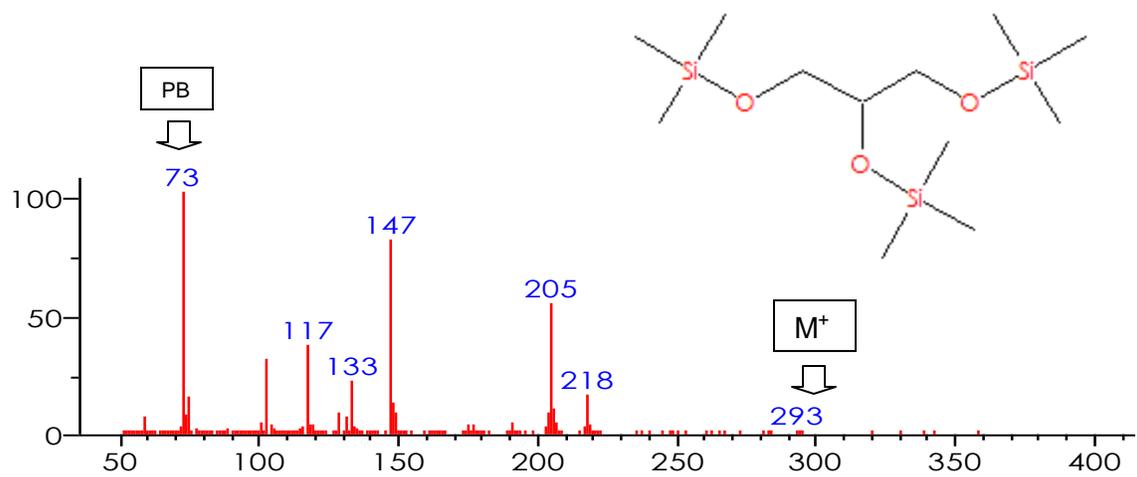


Figura 75. Espectro de Masas del pico Glicerol-TMS (tr= 7.417 min).Peso molecular: 308 uma.

### Anexo 3.

Se realizó el blanco del agua. Se inyectó 1  $\mu\text{L}$  de agua.

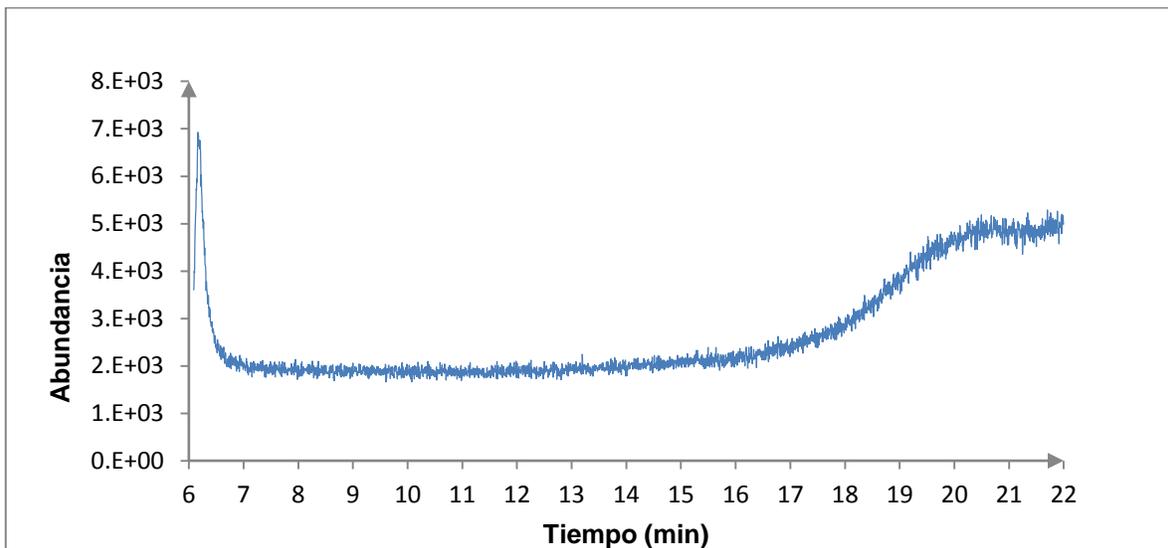


Figura 76. Cromatograma del blanco del agua.

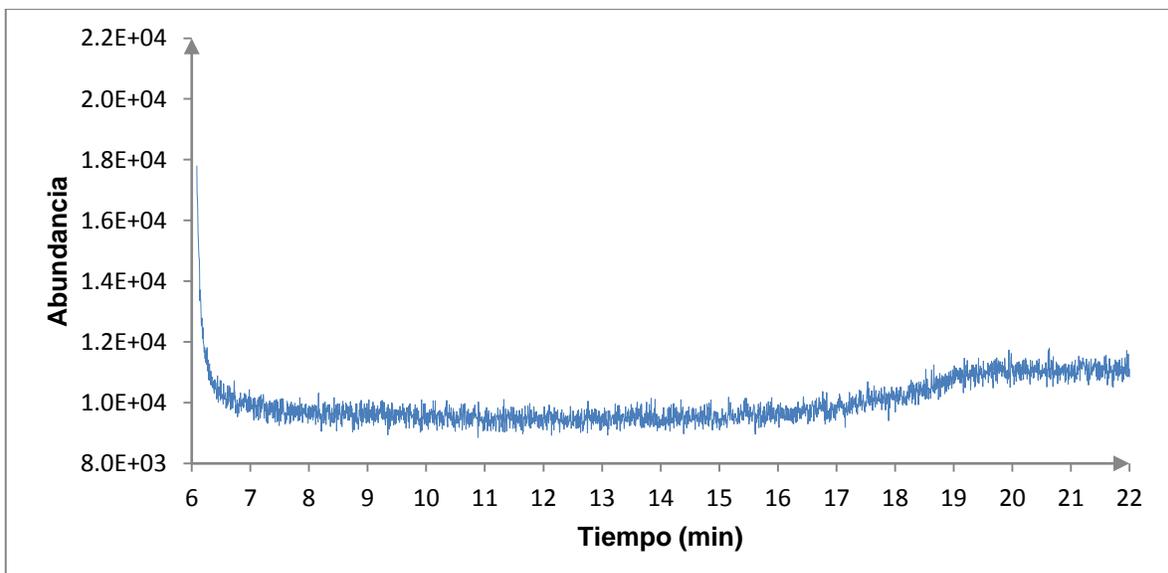


Figura 77. Cromatograma del blanco de tolueno

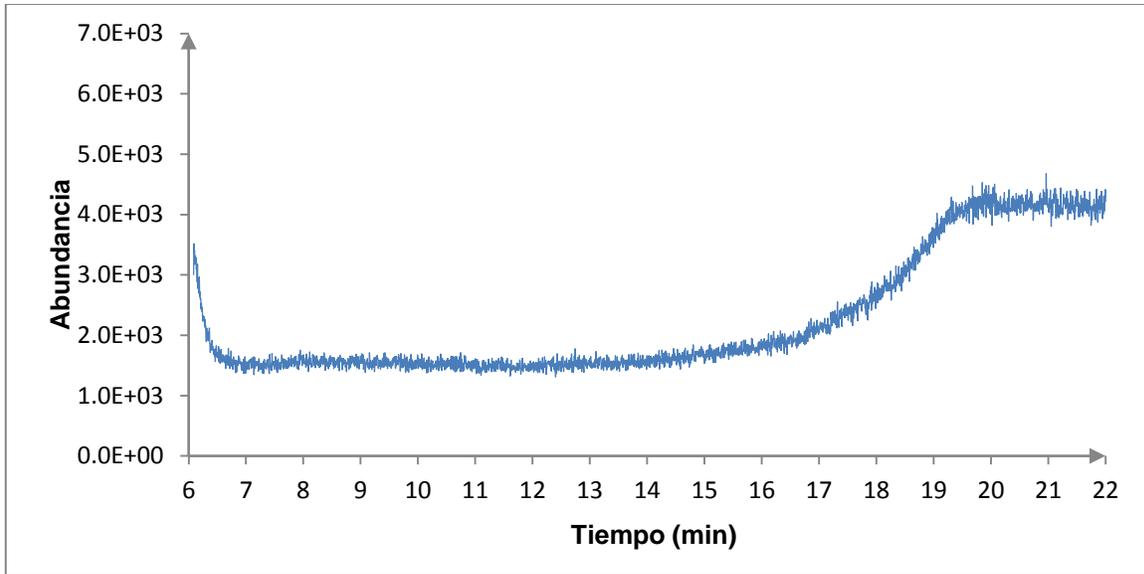


Figura 78. Cromatograma del blanco de hexano

Se realizo el blanco del reactivo para formar el derivado sililado, 1  $\mu$ L de HDMS.

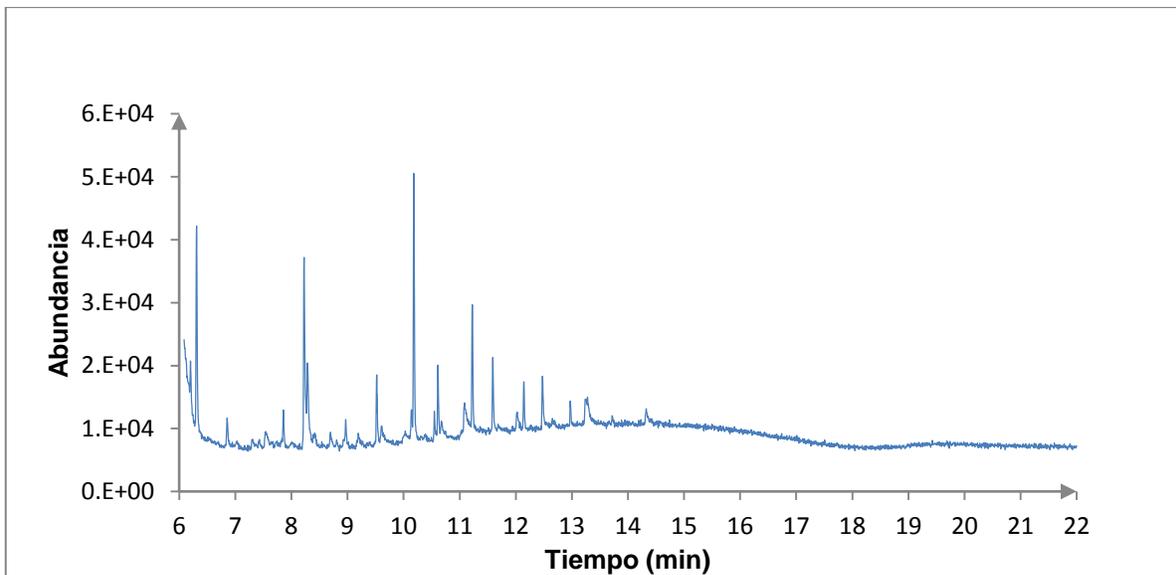


Figura 79. Cromatograma del blanco del reactivo sililante.

Se realizo el blanco del metanol inyectando 1  $\mu$ L.

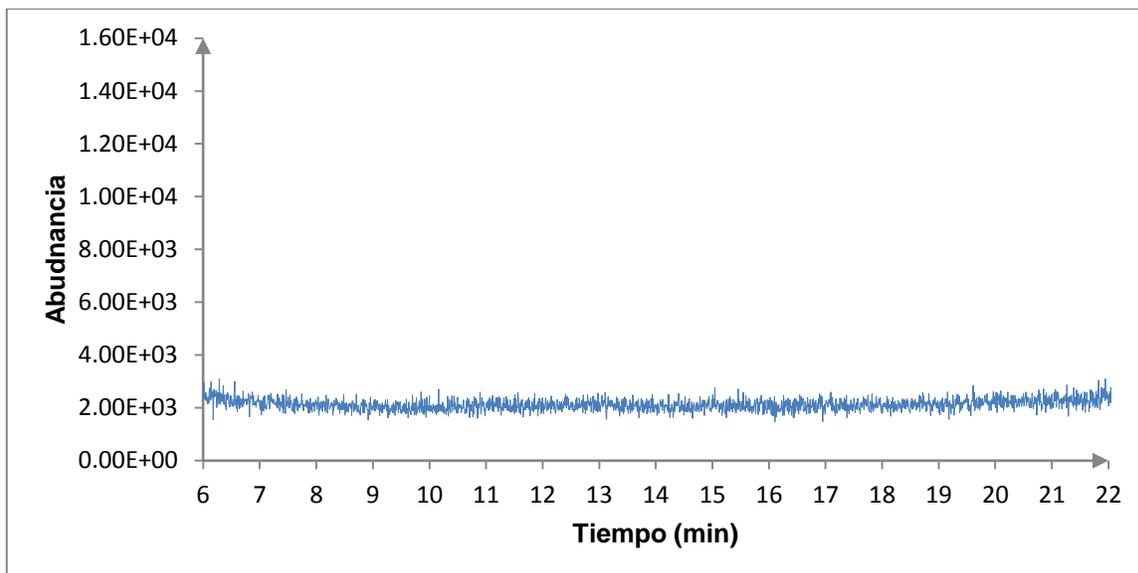


Figura 80. Cromatograma del blanco de metanol.

Se realizo el blanco del acetonitrilo inyectando 1  $\mu$ L.

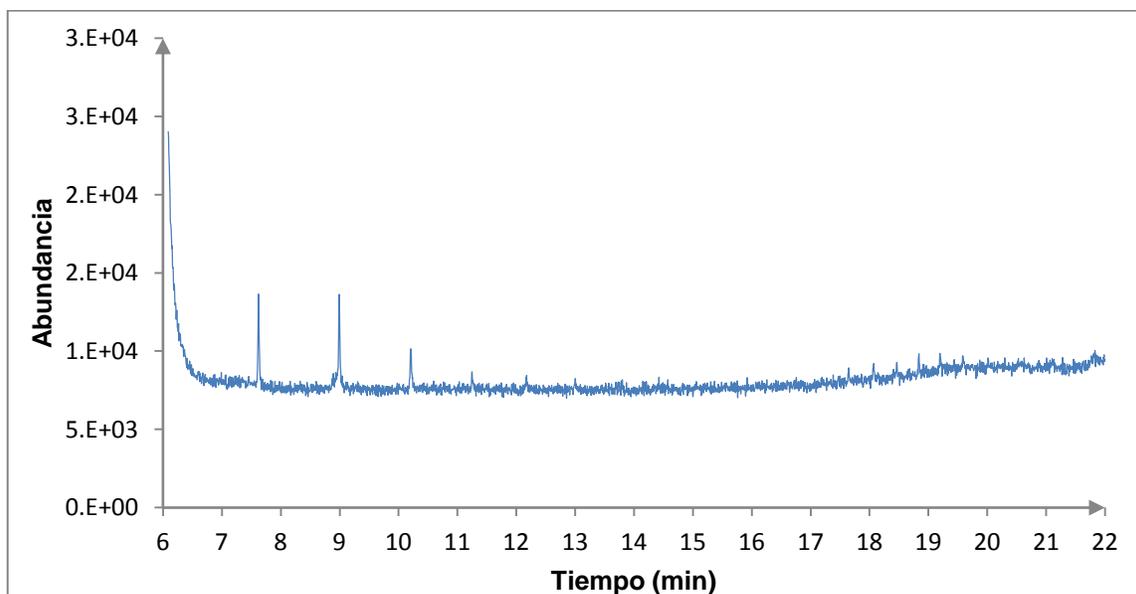


Figura 81. Cromatograma del blanco de acetonitrilo.

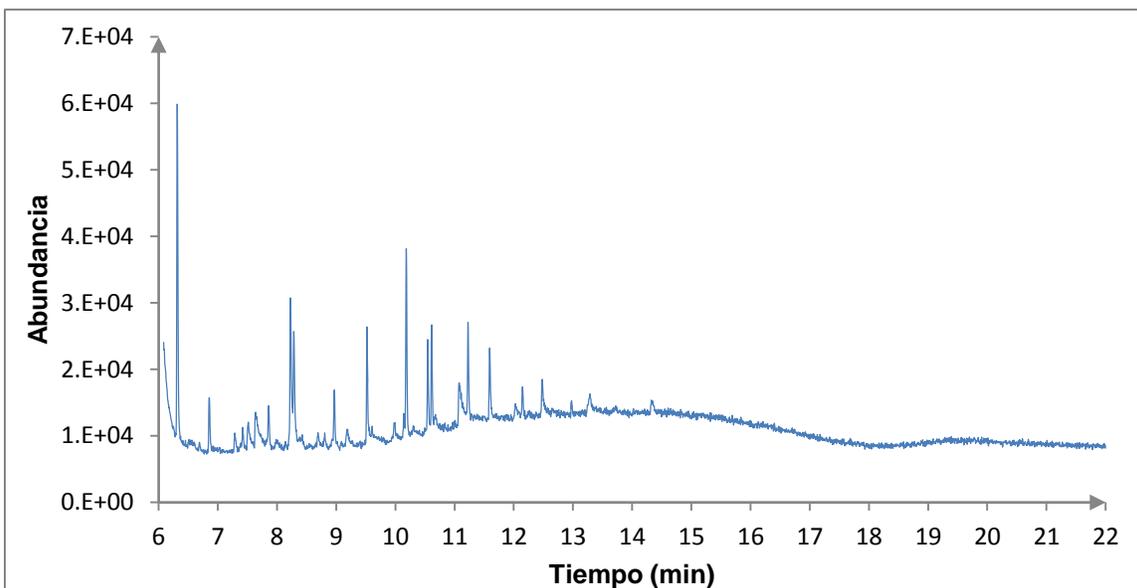


Figura 82. Cromatograma del blanco de reacción

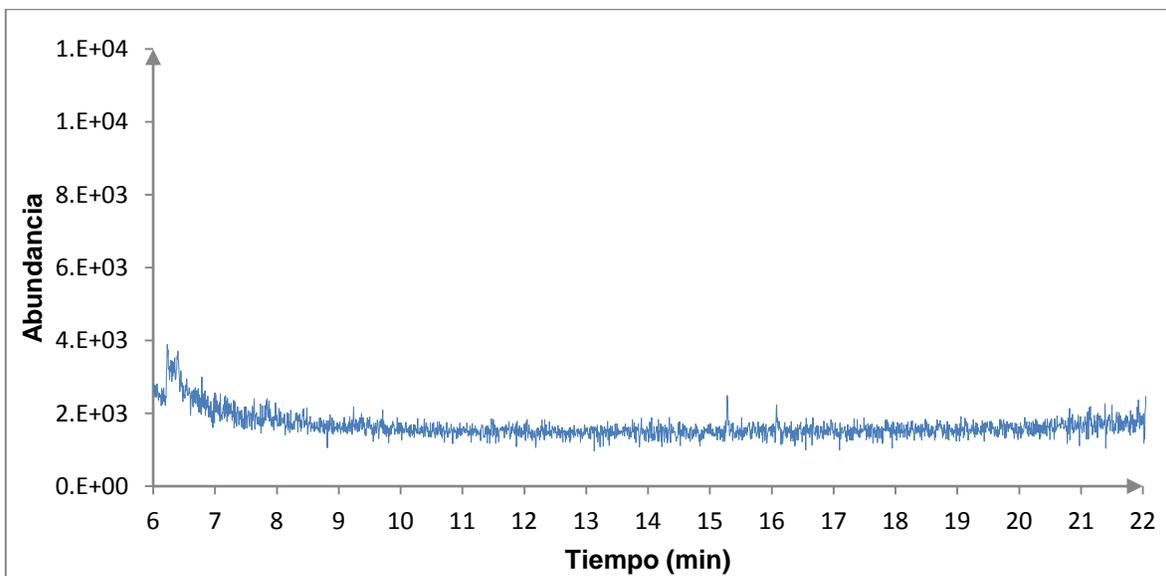


Figura 83. Cromatograma correspondiente al blanco de la reacción.

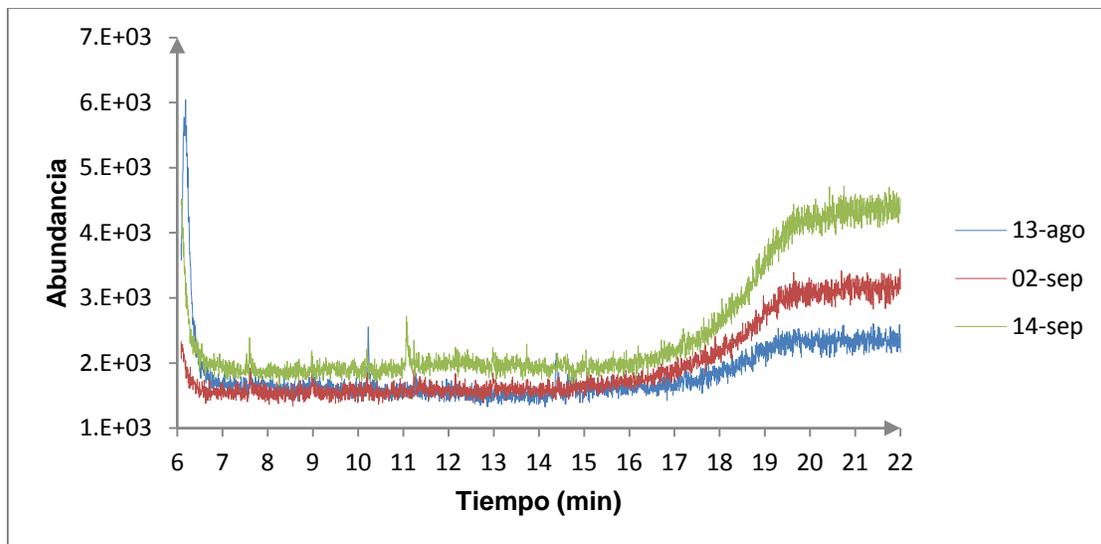


Figura 84. Cromatograma correspondiente al blanco de fibra a diferentes tiempos de uso.