

2  
2y.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**CUANTIFICACION DE LOS COMPONENTES  
DEL AROMA PRODUCIDO POR C. FIMBRIATA  
POR CROMATOGRAFIA DE GASES**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P R E S E N T A**

**MAR<sup>A</sup> ESTHER ARANDA HERNANDEZ**

**DIRECTOR:**

**M. en C. LEONORA SANCHEZ GARCIAFIGUEROA**

**MEXICO. D. F.**

**1998**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

ASUNTO: ASIGNACION DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):

ARANDA HERNANDEZ MA. ESTHER

para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: Cuantificación de los componentes del aroma producido por *C. fimbriata* por cromatografía de gases.

Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

PRESIDENTE O.F.B. GUADALUPE MIRANDA JIMENO

VOCAL M. en C. LEONORA SANCHEZ GARCIAFIGUEROA

SECRETARIO Q. MIKI OTANI IMURA

SUPLENTE DR. SERGIO REVAH MOISEV

SUPLENTE M. en C. LOURDES CASTILLO GRANADA

ATENTAMENTE.  
"POR MI RAZA HABLE EL ESPIRITU"  
México, D.F. a, 31 de Marzo de 1998.

M. en C. PATRICIA PARRA CERVANTES  
JEFE DE LA CARRERA

c.c.p. Departamento de Control de Egresados  
c.c.p. Interesado

Este trabajo se realizó en el laboratorio T-166 y en la planta piloto U-4 de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y en el laboratorio L-327 de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Se agradece el financiamiento otorgado a este proyecto por el Instituto Francés para la Investigación Cooperación (ORSTOM); así como a el Doctor Sergio Revah Moisev y especialmente a la Maestra en Ciencias Leonora Sánchez GarciaFiguroa por los conocimientos transmitidos durante el desarrollo de este trabajo.

**A MI PADRE:**

Alberto, donde quiera que te encuentres porque te quiero.

**A MI MADRE:**

María, con mi más sincero agradecimiento, porque su abrigación, cariño, y ejemplo sirvieron para forjar mi vida y mirar siempre hacia adelante sin importar cualquier obstáculo que se presentara.

**A MIS HERMANOS:**

Cristina, Antonio, Jorge, Isabel, Gelos, Mario, Joaquín y especialmente a Guadalupe y Magdalena por su apoyo insistente para la terminación de este trabajo.

**A MI ESPOSO:**

José, por el tiempo, la paciencia y el apoyo que me brindó desde el inicio hasta el final de este camino.

**A MI HIJO:**

José Manuel, porque en los momentos de flaqueza él a sido el motivo para levantarme y seguir adelante.

A todas aquellas personas que de alguna forma han contribuido con su cariño, esfuerzo y dedicación a la forjación de mi carrera, como estudiante y como ser humano, que desea ocupar un lugar en el ambiente profesional, así como en la vida misma.

# CONTENIDO

<b>I.- Introducción</b>	1
<b>II.- Fundamentación del tema</b>	
1. Historia de la cromatografía de gases	4
2. Descripción de la cromatografía de gases	4
3. Instrumentación	5
4. Introducción de la muestra	14
5. Muestras líquidas	15
6. Análisis cualitativo	16
7. Análisis cuantitativo	17
8. Métodos de extracción	21
<b>III.- Planteamiento del problema</b>	22
<b>IV.- Objetivo</b>	23
<b>V.- Hipótesis</b>	23
<b>VI.- Material y métodos</b>	23
<b>VII.- Resultados</b>	33
<b>VIII.- Discusión de resultados</b>	45
<b>IX.- Conclusiones</b>	47
<b>X.- Recomendaciones</b>	48
<b>Bibliografía</b>	49
<b>Anexo I</b>	52
<b>Anexo II</b>	63
<b>Anexo III</b>	69

# CUANTIFICACION DE LOS COMPONENTES DEL AROMA PRODUCIDO POR *C. FIMBRIATA* POR CROMATOGRAFIA DE GASES

## I. INTRODUCCION

Los aromas son de suma importancia para la industria alimentaria, cosmética, química y farmacéutica. Los consumidores seleccionan los alimentos (como el yoghurt, los quesos, las frutas, entre otros) fundamentalmente por sus propiedades organolépticas, por lo tanto los métodos para medir objetivamente el sabor y el aroma, resultan tan importantes como la medición de la composición química de las sustancias nutricionales y tóxicas. Los microorganismos y las enzimas juegan un papel muy importante en la producción de compuestos del aroma en una gran variedad de productos alimenticios. El hombre ha sacado provecho de los microorganismos durante siglos para mejorar la calidad de sus alimentos (Beuchat, 1983).

Los aromas producidos por microorganismos pueden considerarse de origen natural, pertenecen a familias químicas tales como: aldehídos, cetonas, ésteres, alcoholes, etc. Entre los microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) destacan los hongos filamentosos del género *Ceratocystis* por tener la propiedad de producir aromas afrutados a partir de sustancias simples como carbohidratos, sulfato de amonio, urea y sales minerales. (Christen y Raimbault, 1991, Lanza y col. 1996, Christen y col. 1997).

Varios autores han descrito una gran diversidad de aromas que se pueden producir por diferentes especies de hongos: aroma de coco por *Trichoderma viride*; aroma a pino, o rosa y frutales por *Penicillium decumbens*, el característico aroma de hongo, producido por *Aspergillus oryzae* y entre otros el aroma de queso azul por *Penicillium roqueforti*, el cual está relacionado a las metilcetonas (Revah y Lebeaul, 1989; Larroche y col., 1994).

En la actualidad la gran mayoría de aromas son obtenidos por síntesis química, los problemas en estos procesos, son además de las dificultades normales para la síntesis y purificación, la formación de mezclas racémicas (Weinreich y Nitz, 1992) y que algunos consumidores son cada vez más reacios al uso de sustancias químicas sintéticas añadidas a los alimentos, cosméticos y medicamentos (Janssens y col., 1992).

Por todo esto, existen diferentes grupos de trabajo que investigan sobre la obtención de aromas de origen natural a partir de microorganismos, (Kurtzman, 1983; Welsh y col., 1989). Aunque a la fecha, se conoce todavía muy poco al respecto (Berger, 1995). La mayor parte de los microorganismos productores de aromas son hongos, y de éstos, el género *Ceratocystis*, es un buen ejemplo. Existen estudios aislados; en los que se ha probado que el género *Ceratocystis*, produce una gran variedad de aromas, tabla 1.

Dentro de este género, *C. fimbriata* destaca por la rapidez de su desarrollo, la facilidad con que produce esporas (Christen y col. 1992) y la amplia gama de aromas de alta intensidad que produce como se ha corroborado en trabajos recientes (Christen y col., 1994; Christen y col., 1997).

Esto último hace necesario el estudio químico de los compuestos del aroma que produce *C. fimbriata*. El conocimiento de los compuestos volátiles asociados con este hongo, nos da la información necesaria para saber que sustancias son las que producen el aroma de estos microorganismos, de esta forma, será posible realizar estudios para tratar de inducir la sobreproducción de los compuestos con mayor interés en el área de los aromas.

Antes de la cromatografía de gases el análisis químico de sabores y aromas volátiles era una operación difícil y el análisis tenía que conformarse con la concentración total de una familia de compuestos orgánicos por ejemplo ésteres totales, aldehídos totales, etc. sin embargo, la cromatografía de gases ha permitido grandes avances en el campo del análisis de compuestos orgánicos volátiles.

**TABLA 1 Distribución de metabolitos volátiles en algunas especies de *Ceratocystis*.**

Especie	Terpenos	Esteros	Alcoholes	Cetonas	Referencias
<i>C. moniliformis</i>	geraniol, citronelol, nerol, linalol, neral, geranial	acet. de etilo, acet. de isobutilo, acet. de isoamilo, lactonas.	etanol, isobutanol, alcohol isoamílico		Lanza y Palmer, 1976 Collins y Morgan 1962 Sprecher y Hanssen, 1983
<i>C. virescens</i>	linalol, terpineol, acetato de citronelilo, alfaterpineol, acetato de nerilo, citronelol, acetato de geraniol, nerol, geraniol.	Acetato de 6-metil-5-hepten-2-ol.	6-metil-5-hepten-2-ol.	6-metil-5-hepten-2-ona..	Collins, 1972 Collins, 1978 Sprecher y Hanssen, 1983.
<i>C. variopora</i>	linalol, acetato de citronelilo, alfaterpineol, neral, geranial, citronelol, acetato de geraniol, nerol, geraniol, famesol, nerolidol.	Si existen			Collins y Halim, 1970 Schlinder y Bruns, 1980 Collins, 1976
<i>C. coerulea</i>	si existen	acetato de etilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo.	etanol, isobutanol, 6-metil-5-hepten-2-ol, alcohol isoamílico.		Brinkshaw y Morgan, 1950 Collins y Morgan, 1962
<i>C. fimbriata</i>	citronelol, linalol, geraniol.	Acetato de etilo, acetato de propilo, acetato de isobutilo, acetato de isoamilo.	etanol, isobutanol.	alcaloides	Collins y Morgan, 1950 Hanssen y Sprecher. 1962.
<i>C. piceae</i>	6-protoiludene	delta lactonas, ésteres.	Si existen		Sprecher y Hanssen, 1983 Hansen et al 1986; Yada, y col. 1993.

\*Tomada del proyecto de producción de aromas por *C. fimbriata* (Sánchez, 1998).

## **II. FUNDAMENTACION DEL TEMA**

### **1. HISTORIA DE LA CROMATOLOGRAFIA DE GASES**

La cromatografía es la separación física de dos o más compuestos, basada en la diferente distribución de dos fases, una de las cuales es estacionaria y la otra móvil.

La cromatografía tuvo sus comienzos en 1850 con la separación de anilinas por F. F. Runge. En este proceso se utilizó un filtro de papel y un disolvente para lograr la separación de varios colorantes.

En 1906 Tswet presentó la utilización de columnas empacadas con un adsorbente adecuado para separar los pigmentos vegetales. En esta técnica se empleó un líquido móvil para remover (eluir) los compuestos desadsorbidos en el material de empaque. Los compuestos adsorbidos se eluyeron en la corriente del líquido móvil y pudieron colectarse al final de la columna.

Dentro del desarrollo de la cromatografía, el primer instrumento fue descrito por Martín y James en 1952. Empleaba una bureta automática para detectar y determinar los ácidos y bases. El primer cromatógrafo satisfizo solo estos dos grupos funcionales. El verdadero potencial no se pudo alcanzar hasta la publicación de Ray, del primer cromatograma, en 1954. El detector empleado fue de conductividad térmica, que aun se sigue usando. Fue hasta 1955 cuando aparecieron en el mercado los primeros instrumentos comerciales. (Bartle 1993).

### **2. DESCRIPCION DE LA CROMATOLOGRAFIA DE GASES**

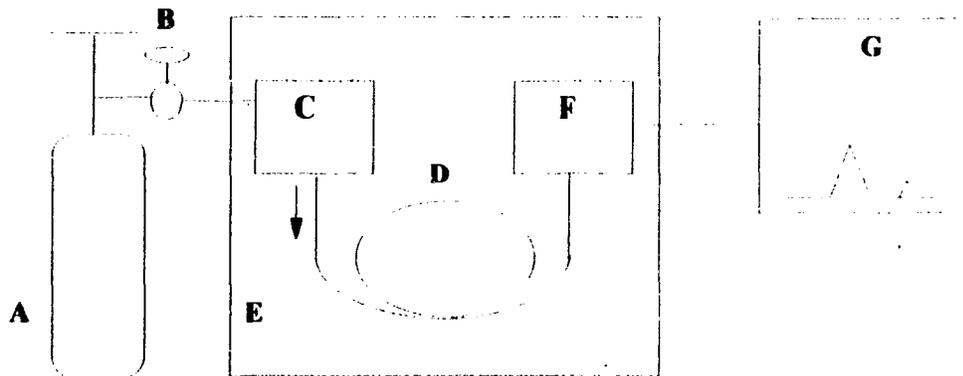
La cromatografía de gases es una técnica analítica que se utiliza para separar, identificar y cuantificar los componentes volátiles de una muestra. La separación de una mezcla, se puede lograr al introducirla a un sistema por donde fluye un gas, el cual pasa a través de una columna empacada con un material de características especiales que permitan esta separación. La cromatografía de gases se basa, en la diferencia de velocidad de migración de los componentes de una mezcla, al ser arrastrados por un gas inerte a través de un tubo relleno de un material adecuado. Los componentes separados se detectan electrónicamente se registran en forma de picos generalmente de forma gaussiana. La aparición de cada componente, referido a su tiempo de elución o retención, es característico de cada componente, y el área bajo el pico es proporcional a su concentración. El tiempo de retención da información cualitativa, y el área bajo la

curva nos indica la cantidad de sustancia que se separó. La interpretación cuantitativa de los resultados dependerá, primeramente del tamaño, forma y separación de los picos, y también de la correcta medición del área del pico (Willard 1991).

### 3. INSTRUMENTACION

A Continuación se presentan las partes de que consta un cromatógrafo de gases (Rowland 1977).

FIGURA 1. PARTES DE UN CROMATOGRAFO



- A. Gas acarreador.**
- B. Medidor y regulador de flujo.**
- C. Puerto de inyección.**
- D. Columna.**
- E. Horno.**
- F. Detector.**
- G. Sistema de integración o procesamiento de datos.**

#### A. El gas acarreador o de arrastre

El propósito del gas acarreador es conducir la muestra a través de la columna hasta el detector. Es muy importante seleccionar el gas acarreador apropiado por que afecta el funcionamiento tanto de la columna como del detector. Los gases acarreadores mas comunes son : helio, hidrogeno, nitrógeno y argón (Willard 1991).

El gas acarreador debe ser : 1. inerte 2. Seco y 3. Puro

## **B. Medidor y regulador de flujo**

El gas acarreador debe estar regulado para proveer una presión y flujo constante. Se sugiere una presión mínima de 40 psi en el manómetro del cilindro (exceptuando las columnas de vidrio).

La forma de lograr esto, es instalando una válvula reguladora a la salida del cilindro y antes de la columna se coloca otro controlador de flujo que generalmente es una válvula de aguja acoplada a un regulador diferencial (Gerhard 1990).

## **C. Puerto de inyección**

El puerto de inyección, provee un medio de introducción de la muestra a la corriente del gas acarreador y por consiguiente a la columna.

La técnica mas utilizada para introducir la muestra es por medio de una jeringa graduada en microlitros a través de una septa de hule. La muestra debe introducirse rápido en la columna en una sola inyección para obtener picos definidos y una separación completa de los compuestos.

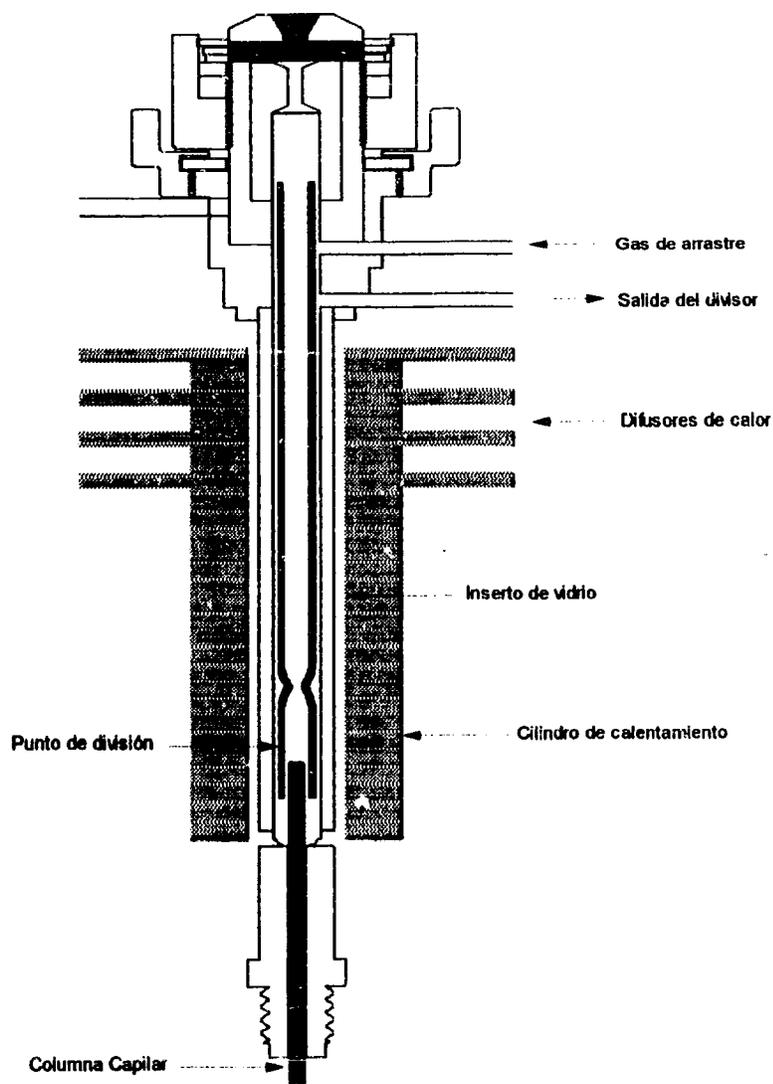
Los inyectores mas comunes son los de acero inoxidable, pero algunas veces este metal caliente puede producir una degradación en la muestra. Para evitar esto se recubre de vidrio. Después de pasar al puerto de inyección, la muestra entra en la columna donde se efectúa el proceso de separación.

El puerto de inyección consiste en un bloque de metal que contiene calentadores y sensores de temperatura, con una porta septa y una conexión para la columna en la parte posterior. La construcción interior varía considerablemente de una manufactura a otra, pero generalmente consiste en un serpentín de tubos capilares para calentar el gas acarreador, una cámara de vaporización en la cual la muestra se convierte en gas para entrar en el flujo acarreador y adaptadores para usar cualquier columna (Tipler 1993).

**Split y Splitless:** El tamaño de muestra usual para las columnas capilares es de 0.01 microlitros o menos. Para esto se tiene que usar un puerto de inyección especial llamado divisor de flujo o split en el cual se inyecta una muestra de tamaño normal. La corriente de gas pasa por una cámara de expansión para asegurar una uniformidad y luego al divisor, que es un tubo concéntrico. Solo una pequeña fracción, de la muestra va hacia la columna y el resto sale a la atmósfera y esto hace a esta técnica de

inyección apropiada para muestras sin diluir o concentradas. Para determinaciones a nivel trazas en muestras líquidas diluidas se usa la inyección splitless, donde el venteo permanece cerrado durante la inyección para que la totalidad de la muestra se transfiera a la columna capilar. El ancho de banda de la muestra que entra a la columna dependerá del tipo de disolvente, tamaño de la inyección, presión del gas acarreador y temperatura del inyector (Bartle 1993).

FIGURA 2. PUERTO DE INYECCIÓN.



Encontramos dos puertos de inyección especiales, el divisor de flujos para columnas capilares, y el puerto de inyección directo a la columna para muestras delicadas. Existen tres áreas con problemas potenciales en todos los puertos de inyección incluyendo los especiales que son: *temperatura, septa y limpieza*.

### **a. Temperatura**

El propósito principal del puerto de inyección es el de convertir una muestra líquida en fase vapor y lo tiene que hacer rápidamente para que la muestra no se extienda en el gas acarreador antes que entre en la columna. Para eso hay que calentar el puerto para que la muestra se vaporice en el momento que se inyecte.

Una regla tradicional para escoger la temperatura del puerto de inyección es de 25° - 40° sobre el punto de ebullición más alto del componente de la muestra. Esto no ayuda mucho por que rara vez se conoce la composición de la muestra. Por lo que se deben tomar en consideración otros factores como la degradación de la muestra y el sangrado de la septa, que depende de la temperatura (Gerhard 1990).

El tiempo requerido para vaporizar la muestra a un flujo dado y una temperatura del puerto ya fijados depende de la volatilidad inherente del material y de la cantidad que se va a vaporizar. Este segundo factor no siempre se toma en cuenta. Si la muestra está ya diluida puede ser vaporizada más rápidamente que una muestra concentrada. Si los materiales sensibles a la temperatura son diluidos en un disolvente volátil, la temperatura de inyección puede disminuirse.

Cuando se usa un programa de temperatura en la columna, la temperatura más baja es muy practica para la inyección. Con la columna a la temperatura inicial, sólo los compuestos con punto de ebullición bajo van a una velocidad apreciable. Los compuestos de punto de ebullición alto dejan el puerto de inyección y quedan atrapados al principio de la columna hasta que la temperatura del horno suba.

### **b. Septa**

La septa es la única barrera que existe entre el proceso cromatográfico y el medio exterior y consiste en un pequeño disco de hule de silicona. Hay muchas clases de septas, la común, la de sangrado escaso, septas con pared de teflón, la de multicapas, las blancas etc. y están sujetas a tres problemas, mecánico, químico y térmico.

Los problemas mecánicos empiezan con la instalación de la septa en su adaptador o tuerca. Si se aprieta demasiado se comprime y será muy difícil la penetración de la aguja y además se expulsará una parte del material hacia el puerto lo cual bloquearía el flujo acarreador. Si el puerto lo permite es mejor colocar la septa a mano para una colocación firme y elástica.

Perforaciones repetidas de la septa destruyen eventualmente su elasticidad mecánica y causan fugas. Esto constituye un problema engañoso ya que los efectos surgen gradualmente; el tiempo de retención es más bajo y la sensibilidad disminuye porque una parte del flujo acarreador y de la muestra inyectada nunca pasa por la columna. La mejor manera de resolver este problema es evitándolo, cambiando la septa regularmente, si es posible al final de un día de trabajo para que el sangrado de la septa y el aire que haya entrado en el sistema durante el cambio pueda arrastrarse durante la noche (Tipler 1993).

Los puertos están generalmente diseñados para aceptar una aguja hipodérmica de 2 pulgadas. Si la aguja no se introduce completamente al hacer la inyección se depositará un poco de material en la septa y este se liberará gradualmente.

### **c. Limpieza**

Cualquier material que se acumule en el puerto de inyección puede atrapar algo de muestra de la misma manera que la septa, o puede descomponer o liberar desechos no deseados en la columna, las muestras biológicas son las principales causantes de esto, los residuos de proteínas y otros componentes no volátiles se pueden adherir a la superficie del puerto de inyección o acumularse al principio de la columna y tapanla. Un tapón de lana de vidrio insertado en la sección vaporizadora atraparé la mayor parte de este material y puede quitarse y desecharse periódicamente. Al final de cada día de trabajo cuando se cambian las columnas se puede quitar la septa y ver si el puerto está sucio (Tipler 1993).

### **D. Columna**

La columna es la parte más importante del cromatógrafo de gases ya que aquí se lleva a cabo la separación de los componentes de la muestra, consta de tres elementos :

- a. Recipiente, que es un tubo de metal o de vidrio. El tubo no interfiere en la separación cromatográfica excepto cuando una muestra puede reaccionar con él. Los materiales que más se usan son: cobre, acero inoxidable y vidrio, el cual se utiliza cuando el metal no satisface las condiciones del análisis.
- b. Soporte sólido, que provee una gran área inerte para detener la fase líquida.
- c. Fase estacionaria. Esta fase la única parte activa de la columna, la separación se efectúa entre el gas acarreador y este material. Este proceso puede verse como una serie de particiones donde la muestra pasa a la solución en la fase estacionaria y subsecuentemente es revaporizada. La afinidad de la muestra con la fase estacionaria determina el tiempo que los compuestos individuales de la muestra permanecen en la columna. Los compuestos con menos afinidad emergen primero y los de mayor afinidad emergen al último.

Hay una amplia variedad de materiales que se pueden usar como fase estacionaria y se clasifican de naturaleza polar y no polar. Cuando se establece una selección de los materiales se considera muy importante la temperatura máxima que se puede usar en la fase estacionaria así como la afinidad de la muestra con ese material

La columna puede ser recta, en espiral o en forma de "U" dependiendo de la longitud y diseño del instrumento (Willard H. 1991).

Las columnas se pueden clasificar según su uso determinado en:

<u>Empacadas</u>	Diámetro interior 1.6 - 9.9 mm. Longitud frecuentemente 3 m.
<u>Capilares</u>	Diámetro interno 1 mm o menor.  Longitud 10-30 m.

Para los fines de este trabajo se usará una columna capilar.

**Columnas capilares.-** Usualmente se construyen con sílice fundida. La gran resistencia a la tensión del tubo de sílice permite la construcción de columnas de pared delgada flexibles.

La superficie interior de la columna capilar de calibre grande (0.53 mm) se encuentra recubierta con la fase líquida estacionaria (Wiedemer R. 1986). Era difícil obtener un recubrimiento uniforme de la superficie hasta que se presentaron las columnas con polímeros. El polímero cubre bien la superficie de la columna de sílice

fundida, lo que da como resultado una película muy uniforme que recubre las paredes de la columna. Diversos grupos funcionales pueden adicionarse a la cadena de polisiloxano para producir fases estacionarias de diferente polaridad o selectividad. Estas fases enlazadas son a la vez termoestables e inextraíbles. Las columnas se pueden lavar con disolventes puros para quitar contaminantes, compuestos no volátiles y productos de pirólisis. Las ventajas de las columnas capilares de alto calibre son: menores tiempos de retención, mayor inatacabilidad, duración prolongada, menor sangrado, mayor eficiencia y mejor reproducibilidad (Willard 1991).

#### **E. Horno**

La columna está situada en el horno. Este cuenta con un controlador de temperatura que permite tener temperaturas desde la ambiente hasta 400°C. El horno está diseñado de tal manera que mantiene la temperatura uniforme mediante un ventilador de aspas (Rowland 1977).

#### **F. Detector**

El detector se localiza en la salida de la columna, reacciona ante la presencia de los componentes individuales conforme abandonan la columna. El volumen de muestra que llega al detector debe ser pequeño para prevenir el remezclado de los componentes separados en la columna ((Tipler 1993).

Los detectores más comunes son:

- a. **Detector de ionización de flama (FID).** Emplea una flama de hidrogeno para la combustión de la muestra y produce iones. Un potencial de corriente continua aplicado entre el colector y las trampas de "jet", genera una corriente que después se convierte en voltaje, se amplifica y aparece en el graficador como un pico. Este detector responde solamente a compuestos orgánicos, es insensible al agua y compuestos inorgánicos. Es el más usado por su alta sensibilidad, buena estabilidad y un rango muy amplio de linealidad de respuesta. Tiene la particularidad de destruir la muestra produciendo iones, bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y agua (H<sub>2</sub>O). Se usan como gases de arrastre el nitrógeno (N<sub>2</sub>), y gases inertes como helio o argón.
  
- b. **Detector de conductividad térmica.** Es un detector universal, porque es sensible a los compuestos orgánicos e inorgánicos. Generalmente se usa para

análisis de compuestos inorgánicos como agua (H<sub>2</sub>O), bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), oxígeno (O<sub>2</sub>), nitrógeno (N<sub>2</sub>), argón (Ar).

**c. Detector de captura de electrones.** Este detector es selectivo para moléculas que contienen átomos electronegativos: nitrógeno, oxígeno, azufre y particularmente los halógenos. Requiere de una técnica limpia para prevenir la contaminación del detector.

**d. Acoplamiento de la cromatografía de gases con la espectrometría de masas.** El espectrómetro de masas es un detector universal para cromatografía de gases, ya que cualquier compuesto que pueda pasar a través de un cromatógrafo de gases se convierte en iones en un espectrómetro de masas. Al mismo tiempo, la naturaleza altamente especificada del espectro de masas hace de él un detector de cromatografía de gases muy específico. La cromatografía de gases es un separador ideal, mientras que la espectrometría de masas es excelente para la identificación. El objeto de un arreglo de acoplamiento es el de operar tanto el cromatógrafo de gases como el espectrómetro de masas sin degradar el funcionamiento de ninguno de los instrumentos. Un problema de incompatibilidad es la diferencia entre las presiones requeridas para operar el cromatógrafo de gases y el espectrómetro de masas. Mientras que el primero opera a presiones altas, el último está diseñado para trabajar al alto vacío. Un problema asociado es la presencia de mucho gas transportador y poca muestra en la descarga del cromatógrafo de gases (Evershed 1993).

La espectrometría de masas, aporta información cualitativa y cuantitativa acerca de la composición atómica y molecular de materiales orgánicos e inorgánicos.

Un espectrómetro de masas es un instrumento que produce partículas cargadas eléctricamente, constituidas por iones completos y iones fragmentados procedentes de una molécula original, capaz de separarlos de acuerdo con su relación de masa a carga. El espectro de masas es un registro de los números relativos de los diferentes tipos de iones que resulta de ser característico para cada tipo de compuesto. La espectrometría de masas de alta resolución aporta información relativa a la composición elemental de iones y sus fragmentos.

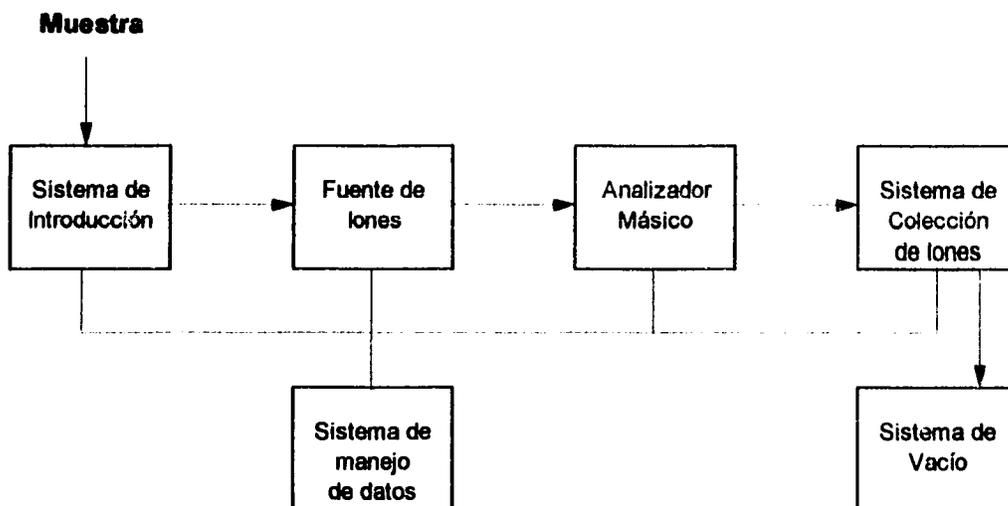
Las principales ventajas de la espectrometría de masas como instrumento analítico se encuentran en su sensibilidad acentuada sobre las de otras técnicas analíticas, y su especificidad para la identificación de compuestos desconocidos. La excelente especificidad de la técnica se debe a los patrones de fragmentación característicos, los cuales aportan información acerca del peso y de la estructura molecular.

Funcionalmente, todos los espectrómetros de masas realizan tres funciones básicas: 1) Producir iones gaseosos a partir de una muestra, 2) Separar esos iones de acuerdo con su masa, 3) Determinar la abundancia relativa de cada ión o fragmento.

Las partes esenciales son: 1) El sistema de introducción de las muestras, 2) La fuente iónica, 3) El sistema de aceleración de iones y el analizador másico, 4) El sistema de colección de iones, 5) El sistema de manejo de datos y 6) El sistema de vacío.

Las muestras volátiles y gaseosas se hacen pasar desde el sistema de introducción hasta la cámara de ionización, a través de un orificio de infiltración. Una vez formados los iones son separados en arreglos discretos de masa - energía, con base en las propiedades: energía, cantidad de movimiento y velocidad. La determinación de dos de estas propiedades permite medir la relación de masa - carga de cada partícula. La forma usual de lograr esa separación fue utilizando las propiedades de energía y cantidad de movimiento: acelerando los iones en un campo eléctrico hasta obtener un valor dado de energía y dispersándolos dentro de un campo magnético. Un detector electrónico acompañado de un procesador de señales y un dispositivo de lectura completan la composición general de un espectrómetro de masas (Willard 1991).

FIGURA 3. COMPONENTES DE UN ESPECTRÓMETRO DE MASAS.



## **G) Sistema de integración o procesamiento de datos**

La salida eléctrica del detector se amplifica y después se envía directamente a un registrador, o se convierte a una señal digital y se envía a un sistema de microcomputadora. Tal sistema puede procesar los datos, almacenarlos y presentar el cromatograma con los resultados en una pantalla de video o en registro impreso. Estos sistemas proporcionan un registro continuo de la masa del soluto eluido o de los perfiles de concentración de las bandas eluidas, esto es un cromatograma de concentración contra de tiempo (Willard 1991).

## **4. INTRODUCCION DE LA MUESTRA**

### **Muestreo automático**

Un muestreador automático reproduce las inyecciones y medidas manuales. Los frascos para las muestras son de vidrio, desechables, con tapones de septum con sellado para vapores. El muestreador enjuaga la jeringa con una muestra nueva para lavar las trazas de la muestra anterior, bombea la muestra nueva para humedecer la jeringa y eliminar por completo cualquier burbuja, toma una cantidad de muestra medida con precisión y la inyecta al cromatógrafo de gases. Los muestreadores automáticos tiene reproducibilidad mecánica y son consistentemente mas precisos que un cromatografista experimentado; también, la operación que no requiere atención personal libera al operador para otras actividades.

### **Muestreo de la cabeza gaseosa (headspace)**

Mas allá del análisis convencional de gases y líquidos de baja viscosidad por cromatografía de gases, algunos casos se manejan mas eficazmente con muestreo de la cabeza gaseosa (vapor sobrenadante, o headspace). Esto es valido cuando solo interesa el vapor sobre la muestra, como en el caso de los perfumes o productos alimenticios; con los constituyentes orgánicos volátiles de muestras, como la orina, la respiración del hombre y muestras ambientales; cuando la muestra es un liquido que normalmente requeriría de algún tratamiento antes de la inyección, como la sangre, aguas residuales o agua potable. Los picos de los disolventes son mucho mas pequeños de lo que serían al inyectar la muestra liquida tal cual. El muestreo por headspace puede efectuarse sobre cualquier muestra, siempre y cuando el coeficiente de reparto permita que exista una cantidad suficiente de la muestra en la fase gaseosa. La muestra del gas que se encuentra en la parte superior de un frasco puede tomarse simplemente en una cantidad adecuada (200 - 500  $\mu$ L) con una jeringa con la cual se introduce la muestra en el inyector, por otra parte, existen equipos especiales para realizar esta operación (Bartle 1993).

### **Muestreo manual**

El método de inyección manual para obtener buenos resultados de análisis depende mucho de la habilidad del operador si no se cuenta con un inyector automático ya sea para muestras sólidas, líquidas o gaseosas.

La cromatografía de gases se hace regularmente con muestras líquidas, que pueden ser mezclas de líquidos o soluciones de varios extractos de materiales sólidos disueltos (Harris, 1991).

## **5. MUESTRAS LIQUIDAS**

Cuando no se tiene un inyector automático, la jeringa de 10 microlitros es la más común para muestras líquidas, son excelentes para inyecciones cualitativas y cuantitativas, pero es difícil reproducir el volumen de la inyección.

Cuando el émbolo de una jeringa de 10 microlitros está completamente presionado hay de 0.6 a 1.0 microlitros de líquido que queda en la aguja. Este puede o no ser inyectado con el volumen deseado de la muestra dependiendo de el tiempo que la aguja permanezca en el puerto de inyección después de que se empuja el émbolo. Cuando la aguja se calienta éste volumen adicional se expande y se vaporiza pero pueden ocurrir fraccionamientos ya que los compuestos de bajo punto de ebullición se vaporizan más rápidamente. Por lo cual el método de inyección que se prefiere es:

1. Cargar el volumen deseado de líquido.
2. Insertar rápidamente la aguja en la septa hasta donde llegue.
3. Presionar el émbolo y sacar inmediatamente la aguja del puerto de inyección.

Una variación a este método es poner una pequeña cantidad de disolvente en la jeringa, luego un poco de aire, luego la muestra y finalmente otro poco de aire. Con este método, ambas partes de la medida de la muestra se pueden ver para determinar el volumen y así el disolvente limpia el puerto de inyección y la aguja. Sin embargo la exactitud de la muestra en el émbolo de la jeringa no es mayor al +5% (Rowland 1977).

## 6. ANALISIS CUALITATIVO

La cromatografía, por sí sola está escasamente preparada para una identificación cualitativa, porque da un solo parámetro, el tiempo de retención, que es característico en cada compuesto particular bajo las mismas condiciones cromatográficas. Cuando se tienen que separar más de tres compuestos y está involucrada una variedad de especies químicas se recurre al índice de retención o índice de Kovats. Este sistema para la estandarización de datos de retención de CG se basa en el tiempo de retención de n-alcenos tomados como estándares con una operación isotérmica de la columna, se grafican los tiempos de retención y el número de carbonos en un papel semilogarítmico.

Los logaritmos de los tiempos de retención de componentes conocidos o desconocidos de mezclas separadas por CG se estandarizan relativamente con los índices calculados de los n-alcenos, los cuales dependen de su número de carbonos y de la fase estacionaria, independientemente de la polaridad.

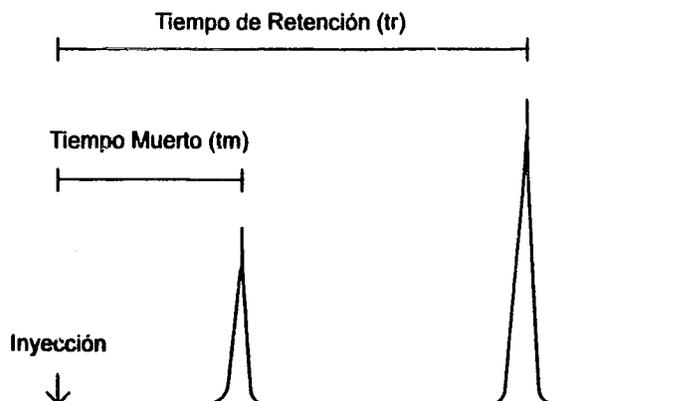
En conjunción con otras técnicas analíticas por ejemplo espectrometría de masas el uso de la CG se convierte en algo muy valioso, de hecho, la combinación de un cromatógrafo de gas y un espectrometro de masas es lo mejor que existe para la identificación cualitativa y cuantitativa de los compuestos orgánicos.

Se dispone solamente de un parámetro característico en la identificación química de un compuesto en una muestra, el tiempo de retención (TR), que es el lapso de tiempo transcurrido desde la inyección hasta la aparición del pico en el registrador.

El lapso de tiempo total se llama usualmente tiempo de retención absoluto, (TRA). Se compone de dos partes, el tiempo requerido por solamente el gas acarreador para desplazarse desde el punto de inyección al detector, y el tiempo adicional debido a lo que lo retiene la fase líquida estacionaria. El primero de estos se designa como tiempo "muerto".

El tiempo "muerto" es una característica del equipo y la columna en uso, es el mismo para todos los componentes. Proviene del volumen interno del inyector, columna y detector.

FIGURA 4.



## 7. ANALISIS CUANTITATIVO

En cromatografía de gases la mayor parte de los análisis se realizan con el fin de determinar la concentración o el peso absoluto del, o los componentes presentes en la muestra. En general el análisis cuantitativo se presenta en las siguientes etapas:

1. Optimización de las condiciones instrumentales (temperatura, flujo.)
2. Determinación del rango lineal en la relación concentración - respuesta de los estándares.
3. Medida de la respuesta del problema.
4. Conversión de esta respuesta a composición o concentración.

Existen muchas formas posibles de cálculo para encontrar la concentración buscada, y la selección de una en particular depende de la exactitud deseada y de la cantidad de trabajo que se quiera realizar.

Se presentan cuatro métodos básicos en orden creciente de complejidad y exactitud:

### a. Normalización de área

El método más simple de todos es el de normalización de áreas. No requiere calibración y, por lo, tanto es usado con frecuencia para una determinación rápida de la composición aproximada.

Las etapas en el cálculo son:

1. Sumar todas las áreas de los picos.
2. Expresar cada área de pico como un porcentaje del total.
3. Establecer que el % de área es el mismo que el % de composición.

Las ventajas son:

1. No requiere calibración.
2. El cálculo es rápido y simple.
3. La cantidad de muestra inyectada no es crítica.

Las desventajas son:

1. Los detectores responden vigorosamente a algunos componentes y pobremente a otros.
2. Todos los componentes deben eluir y sus picos deben ser medidos, aún aquellos que analíticamente no interesan.
3. Si el detector no responde a algún componente, el área total y cada uno de los % de área estará errada.

**b. Normalización con factores de respuesta**

Algunos errores se pueden eliminar determinando los factores de respuesta, los cuales necesitan de la preparación y análisis de mezclas de patrones. Es aconsejable usar al menos dos estándares para verificar la linealidad de todos los picos. Se prepara una mezcla patrón o estándar que contenga todos los componentes similares a los esperados en la muestra. Un par de corridas preliminares comparando las alturas de los picos de una muestra típica y los patrones propuestos determinarán los rangos adecuados.

Este método asume que todos los componentes eluyen y se detectan, pero no confía en la uniformidad de los factores de respuesta. Sus ventajas son cálculo rápido y simple, e insensible a la cantidad exacta de muestra inyectada. Las desventajas son:

1. Todos los picos deben ser calibrados. Si el cromatograma tiene demasiados picos la identidad de muchos de ellos puede ser desconocida. El trabajo de identificarlos, obtener muestras de los componentes puros, y realizar las calibraciones puede hacer impráctico este método.

2. Todos los componentes deben eluir y todos los picos deben ser medidos.
3. Componentes no detectados (por ejemplo agua con el detector de ionización) pueden introducir errores grandes y desconocidos.

#### **c. Estándar externo**

Este método requiere de la preparación de muestras patrón, pero difiere del método anterior en que sólo los picos de interés necesitan ser calibrados.

El patrón o estándar de calibración contiene solamente los materiales que serán analizados, posiblemente diluidos con un disolvente adecuado para alcanzar los niveles de concentración aproximados esperados en las muestras. Debe inyectarse una cantidad de patrón medida exactamente.

Este método reduce el número de factores asumidos (no se tiene que eluir y medir todos los componentes) y simplifica el procedimiento de medida, ya que se puede ignorar todos los picos excepto los que son de interés. Sin embargo, introduce requisitos operacionales bastante estrictos.

1. El tamaño de muestra debe ser controlado muy rígidamente. No se puede determinar un factor de respuesta absoluto exacto, ni se puede convertir los resultados de muestra a términos de concentración, a menos que se conozca la cantidad inyectada.
2. La estabilidad del instrumento es vital. Cualquier cosa que altere la respuesta del detector introducirá errores en la cuantificación. Son factores críticos la limpieza del detector, estabilidad de los flujos de gases, valores de temperatura etc. La calibración debe ser verificada frecuentemente para asegurar que no ha ocurrido ninguna alteración.

#### **d. Estándar interno**

Los problemas operacionales encontrados con el método anterior se deben a que el patrón y la muestra se corren en inyecciones separadas y a tiempos diferentes. Esto se evita con el método del estándar interno, donde se combinan la muestra y el patrón en una sola inyección (Bernd 1994).

Se prepara una mezcla de calibración que contiene cantidades conocidas de cada uno de los componentes a ser analizados, más un componente añadido que no esté presente en las muestras analíticas.

Este procedimiento de calibración está dirigido a obtener factores de respuesta relativos; por consiguiente, para el cálculo se puede usar concentración, o cantidades pesadas en una balanza y luego diluidas con disolvente. El único requisito es que estos números representen las cantidades relativas de los diferentes componentes.

La cantidad inyectada tampoco es crítica. Todo aumenta o disminuye proporcionalmente con la cantidad inyectada, pero los factores de respuesta relativos permanecen constantes.

La gran ventaja de este método se debe al hecho de que tanto el estándar como la muestra desconocida se corren juntas en la misma inyección. Si la sensibilidad del detector se altera, todos los picos se afectan en igual forma; las cantidades relativas no cambian. Si dos operadores inyectan diferentes cantidades de la misma muestra, las alturas de los picos serán diferentes, pero las cantidades relativas permanecen constantes. La clave del procedimiento total es añadir una cantidad conocida del estándar interno a cada muestra.

Otra ventaja de este método de cálculo es, que no se necesitan inyecciones repetitivas, sino que se conserve la relación de áreas.

La dificultad de este método está en buscar un standard interno adecuado que no interfiera con el componente en la muestra.

Los requisitos que debe cumplir un standard interno son:

1. No encontrarse en la muestra problema.
2. Tener alta pureza.
3. Estabilidad bajo condiciones cromatográficas.
4. Inerte a todos los componentes de la muestra y de la columna.
5. Cromatográficamente limpio, dando un pico bien formado y separado de todos los picos de la muestra.
6. Ser soluble en la muestra.

7. Tener un tiempo de retención comparable a los de los componentes de la muestra.

## 8. METODOS DE EXTRACCION

La extracción es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales, puede definirse como la separación de un componente de una mezcla por medio de un disolvente. Los métodos de destilación son métodos de extracción en donde la separación de los componentes se efectúa debido a la diferencia en las presiones de vapor de los componentes. (Pecsok 1983)

Los métodos más usuales para la extracción de compuestos volátiles de un caldo de cultivo son: headspace, purga y trampa, extracción líquido - líquido y extracción por arrastre de vapor y destilación simultánea.

### a. PURGA Y TRAMPA

Los constituyentes orgánicos volátiles de una muestra se pueden purgar o extraer de ella y atrapar en Tenax-GC, porapak, chromosorb, (para cromatografía de gases). Tales materiales son polímeros porosos capaces de adsorber compuestos volátiles. Las muestras atrapadas pueden ser fácilmente almacenadas o analizadas. Se presenta una desorción eficaz con flujo de helio a 300°C. Los volátiles desorbidos se colectan en una precolumna enfriada con hielo seco. La precolumna se conecta después a la columna de CG, se quita el hielo seco y el análisis se inicia a temperatura ambiente. La precolumna contiene la misma fase líquida que la columna normal de CG. (Willard 1991)

### b. EXTRACCION LIQUIDO - LIQUIDO DISCONTINUA

La extracción es el método de separación que involucra la transferencia de una sustancia, de una fase a una segunda fase. Cuando las dos fases son líquidos inmiscibles; el método es conocido como extracción líquido - líquido. Los componentes se reparten entre los dos disolventes. Generalmente el compuesto que se va a extraer es insoluble o solo parcialmente soluble en uno de los disolventes, pero es muy soluble en el otro. Generalmente el agua es usada como uno del par de disolventes, ya que muchos compuestos orgánicos son insolubles en ella y por que disuelve compuestos iónicos muy polares. Los disolventes que son ideales para la extracción de compuestos

orgánicos son : éter etílico, pentano, tetracloruro de carbono, cloruro de metileno, benceno y tolueno (Pecsok R. 1983).

### c. DESTILACION - EXTRACCION SIMULTANEAS

Uno de los principales métodos para la separación de sustancias volátiles en alimentos, bebidas y otros productos agrícolas es la destilación seguida frecuentemente por una extracción con un disolvente orgánico. (Sánchez y col. 1991).

Likens y Nickerson en 1964 publicaron un método para llevar a cabo estas dos operaciones simultáneamente, para lo cual diseñaron un equipo de vidrio. Schultz en 1977, modificó el aparato utilizado por Likens y Nickerson para el aislamiento de volátiles por destilación y extracción simultáneas con un disolvente orgánico.

Con este tipo de extracción se encontró que la mayoría de los compuestos presentan buena estabilidad cuando el sistema se destila en un rango de pH de 5.8-6.6 incluyendo metil ésteres de ácidos alifáticos. Para los fines de este trabajo este es el método que se eligió. Se puede acelerar el proceso de extracción saturando los caldos de cultivo previamente con cloruro de sodio (Yang 1994)

## III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente el 80% de los aromas y fragancias se obtienen por síntesis química, una mínima parte procede de la biotecnología y el resto de extracción de productos naturales. Los métodos de extracción generalmente son caros debido a la poca cantidad que se encuentra en las plantas, a los procesos de purificación, que disminuyen el rendimiento; a la dependencia que existe entre la planta, el clima y riesgo de enfermedad (Schindler, 1982).

La mayor parte de los microorganismos productores de aromas son hongos, destacando los del género *Ceratosystis*. Existen varios estudios, en los que se ha probado que producen una gran variedad de aromas, pero no existen estudios sistemáticos en donde se visualice el panorama completo que nos describa el potencial del microorganismo como productor de compuestos orgánicos volátiles. Por lo cual se hace importante la realización de una investigación química cualitativa y cuantitativa de los metabolitos aromatizantes que produce el género *C fimbriata*.

#### IV. OBJETIVO.

En este trabajo, se tiene como objetivo identificar y cuantificar los compuestos del aroma que produce *Ceratocystis fimbriata*, durante la fermentación en medio estándar líquido y en medio líquido adicionado de leucina. Para lo cual es necesario elegir o diseñar métodos de extracción, concentración, separación, identificación y cuantificación de las sustancias volátiles que producen el aroma, empleando metodologías cromatográficas como cromatografía de gases y cromatografía gases-masas.

#### V. HIPOTESIS.

Los diferentes aromas producidos por *C. fimbriata* se deben a la proporción y estructura de las sustancias presentes en el extracto.

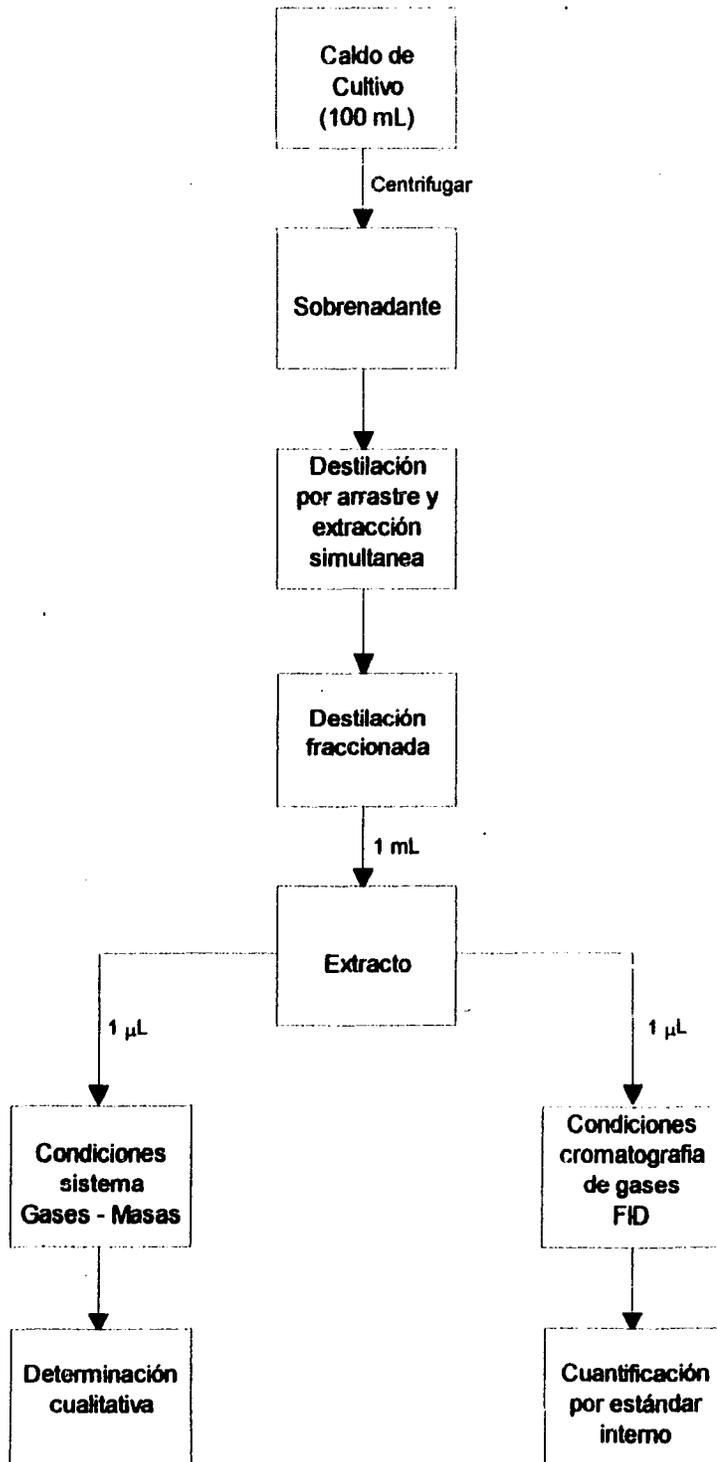
Empleando la destilación - extracción simultáneas, es posible identificar, cuantificar y analizar por cromatografía de gases los componentes volátiles producidos por fermentación de *C. fimbriata*

#### VI. MATERIAL Y METODOS

- ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 acoplado a un espectrómetro de masas
- ◆ Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 con detector de ionización de flama
- ◆ Micropipetas de 50, 100 y 200  $\mu\text{L}$
- ◆ Micro jeringas de 1  $\mu\text{L}$  y 10  $\mu\text{L}$
- ◆ Matraces aforados de 10 ml.
- ◆ Matraces erlenmeyer 250 ml.

Equipo de vidrio para realizar la destilación por arrastre de vapor y extracción simultáneas con refrigerante de alta eficiencia, columna de fraccionamiento, equipo de extracción líquido-líquido, y equipo para destilación a presión reducida (Todo esto diseñado y construido para los fines de este trabajo).

## DIAGRAMA DE FLUJO



## A. DETERMINACION CUALITATIVA

Los caldos de cultivo empleados para este estudio fueron proporcionados por la profesora Leonora Sánchez. La composición de los medios de cultivo (Christen y col. 1994) es la siguiente:

### MEDIO ESTANDAR CON UREA COMO FUENTE DE NITROGENO

Glucosa	50.0	g/L
Urea	1.9	g/L
Sulfato de amonio	4.5	g/L
Fosfato ácido de potasio	1.0	g/L
Sulfato de magnesio	0.7	g/L
Oligoelementos	2.0	mL/L

### MEDIO ESTANDAR ADICIONADO CON LEUCINA

Glucosa	50.0	g/L
Urea	1.9	g/L
Sulfato de amonio	4.5	g/L
Fosfato ácido de potasio	1.0	g/L
Sulfato de magnesio	0.7	g/L
Oligoelementos	2.0	mL/L

Se adicionaron 20 milimoles de leucina a las 45 horas

### COMPOSICIÓN DE OLIGOELEMENTOS

Nitrato de fierro	723	mg/L
Nitrato de zinc	439	mg/L
Nitrato de magnesio	203	mg/L

Ambos medios fueron incubados durante 5 días a 30°C y 150 r.p.m.

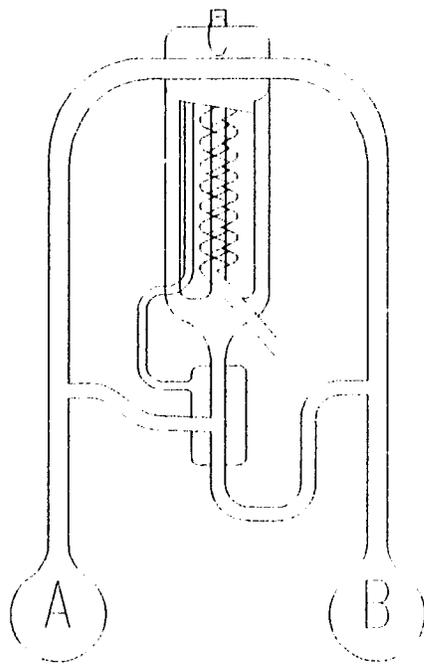
1. **EXTRACCION.** Se hizo la extracción de una muestra con el equipo de arrastre de vapor y destilación simultáneas de la siguiente manera:

En un matraz bola de 250 ml se adicionaron 100 ml de caldo, y 50 ml de una solución saturada de NaCl, se ajustó pH a 6 con HCl concentrado o NaOH 1M según fuera necesario.

En otro matraz bola de 100 ml se colocaron 50 ml de éter absoluto. Ambos matraces se colocaron en el equipo de arrastre de vapor y destilación simultáneas. Se aplicó temperatura a los matraces que contenían el caldo y el éter. La extracción duró dos horas a partir de que los vapores se juntaron en la parte superior del equipo.

Al término del tiempo de extracción, el extracto obtenido se secó con sulfato de sodio. Se filtró y posteriormente se destiló empleando una columna Vigreux, hasta llegar a un volumen aproximado de 1 ml. El extracto se almacenó en un frasco perfectamente tapado y sellado con cinta de teflón a  $-5^{\circ}\text{C}$ . hasta su uso.

**FIGURA 5 APARATO UTILIZADO EN ESTE TRABAJO PARA EL SISTEMA DESTILACIÓN - EXTRACCIÓN SIMULTÁNEAS (SÁNCHEZ Y COL. 1991)**



El matraz A contiene el disolvente, en este caso se usará éter, y el matraz B contiene la muestra en agua. Cada matraz debe tener una canastilla de calentamiento y un reostato para controlar la temperatura (matraz A 35v y matraz B 80v ). Al iniciar el calentamiento los vapores de ambos matraces suben y en C se forma una interfase donde el éter extrae los volátiles contenidos en el agua; después los dos líquidos se condensan y bajan por el espiral regresando el éter al matraz A y el agua al matraz B esta operación se repite sucesivamente.

**2. SEPARACION DE LOS COMPONENTES DEL EXTRACTO.** Para la selección de la temperatura de operación del horno de calentamiento del cromatógrafo de gases se inyectó 1  $\mu$ L del extracto. En diferentes condiciones que se seleccionaron en base a bibliografía y experimentación. Debido a que se escogió éter como disolvente y a que se sabe que los compuestos a separar son volátiles de diferentes puntos de ebullición, se probó trabajar con rampas de temperatura, las temperaturas iniciales que se probaron fueron 45°C, 40°C, 35°C, y 30°C.

A 35°C y 30°C se obtuvieron mas picos, por lo que se selecciono 35° como temperatura inicial.

Como temperaturas finales, se probaron 190°C y 200°C, observándose que a 190°C se obtenía la elución de todos los picos empleando un aumento de 5°C por minuto. También se probaron incrementos de 10°C, 15°C y 20°C por minuto observándose que mientras mas grande era el incremento, menor el numero de picos obtenidos, debido a que los compuestos más volátiles no alcanzan a salir y se juntan con los menos volátiles. Finalmente la idea fue incrementar paulatinamente la temperatura, utilizando una velocidad tal, que sin hacer demasiado largo el análisis, permitiera una resolución aceptable. Las condiciones de temperatura adecuadas fueron 3 min. A 35°C, un aumento de 5°C por min. hasta llegar a 190°C manteniéndose 5 min.

**3. IDENTIFICACIÓN GASES-MASAS.** Al tener las condiciones de separación cromatográficas definidas por cromatografía de gases con detector de ionización de flama fue posible obtener una aproximación para la separación en el sistema gases-masas, en el cual se uso una columna diferente. La identificación cualitativa se realizó inyectando 1 $\mu$ L de extracto al cromatógrafo de gases - masas con las siguientes condiciones: solvent delay de 1 minuto, programa de temperatura de 40°C durante 3 minutos y una rampa de 5°C por minuto, con una temperatura final de 210°C durante 5 minutos, temperatura del inyector: 280°C, Temperatura del detector: 250°C, columna: FFAP 50m x 0.25mm diámetro interno.

**4.** Después de la determinación cualitativa se inyectaron en el cromatógrafo de gases con detector de ionización de flama los estándares de los volátiles identificados por el sistema gases-masas, para conocer así su tiempo de retención en la columna de carbowax con la cual contaba el equipo.

**B. DETERMINACION CUANTITATIVA EN CROMATOGRAFO DE GASES CON DETECTOR DE IONIZACION DE FLAMA.**

1. **ELECCION DEL ESTANDAR INTERNO.** Una vez encontradas las condiciones de temperatura se eligió el 2-octanol como estándar interno por tener un tiempo de retención de 17 minutos que es intermedio entre los dos grupos de compuestos del aroma de *C. fimbriata* que se separaron por cromatografía de gases.

2. **EXTRACCION.** Para la cuantificación se hicieron las extracciones de los caldos de la misma forma que la primer extracción pero esta vez se adicionó 1.2 µL de 2-octanol al matraz con el caldo de cultivo para que sufriera el mismo proceso de extracción y concentración que los compuestos volátiles.

El extracto almacenado en el congelador, se llevó a temperatura ambiente y se aforó a 1mL, se inyectó 1µL al cromatógrafo de gases, usando un split de 1:40 y una temperatura en el detector e inyector de 225°C. El programa de temperatura fue de 35°C durante 3 minutos y un aumento de 5°C por minuto hasta alcanzar una temperatura de 110°C.

Flujo: 1mL/min, relación de split : 1:40, se usó helio como gas acarreador, volumen de inyección : 1 µL, columna : Chrompack Wcot fused silica 30m x 0.25mm, Coating : cp wax 52 CB DF = 0.25Um, Cromatógrafo : Hewlett Packard 5890.

3. **CURVAS ESTANDAR.** Se hicieron curvas estándar para cada uno de los volátiles identificados, inyectando 5 diferentes concentraciones de cada estándar con 1.2 µL de estándar interno, por triplicado.

4. Se calcularon los factores de área y de volumen de la siguiente manera:

$$\text{fac. Area} = \frac{\text{área del estándar}}{\text{área del st. Interno}}$$

$$\text{fac. volumen} = \frac{\text{vol. del estándar}}{\text{vol. del st. Interno}}$$

5. Se graficaron estos factores, en el eje "X" el factor de volumen y en el eje "Y" el factor de área. Se hizo la regresión lineal para encontrar la ecuación de la recta. Y con la ecuación de la recta se encontraron las concentraciones buscadas.

Para calcular la pendiente (m), la ordenada al origen (b) y el coeficiente de correlación (R), se utilizaron las siguientes ecuaciones:

$$m = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n(\sum x^2) - (\sum x)^2} \quad \dots(1)$$

$$b = \frac{\sum y - m(\sum x)}{n} \quad \dots(2)$$

$$R = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]}} \quad \dots(3)$$

## 6. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION A UN TIEMPO

La ecuación de la recta es:  $Y = mx + b$  .....(4)

**Donde :**

Y = factor de área  
 m = pendiente  
 x = factor de volumen  
 b = ordenada al origen

Si despejamos x de 4 tenemos que:

$$x = \frac{Y - b}{m} \quad \dots(5)$$

Se sabe que: factor de volumen =  $\frac{\text{vol. st.}}{\text{vol. st. interno}} = x$

Como la cantidad adicionada de 2-octanol (1.2 µL/ml) fue siempre constante tenemos que:

$$x = \frac{\text{vol. st.}}{1.2}$$

Entonces la ecuación 5 queda :

$$\text{vol st} = \frac{Y - b}{m} \quad (1.2) \quad \dots(6)$$

Para encontrar la concentración del problema se sustituyó en la ecuación 6 los valores de  $m$ ,  $b$  y el factor de área de cada uno de los compuestos a cuantificar.

**Donde :**

$m$  = Pendiente

$b$  = Ordenada al origen

$y$  = Factor de área del problema

1.2= Concentración del estándar interno (cte.)

## 7. DETERMINACION DE LA PRODUCCION ACUMULADA

Sabemos que la concentración es una función que varía con respecto al tiempo con esto podemos encontrar la producción acumulada de la siguiente manera:

$$A = C \int_{t_0}^{t_1} dt$$

Al integrar nos queda:  $A = C|t \Rightarrow C \cdot (t_1 - t_0)$

y como:  $C = \frac{C_0 + C_1}{2}$

entonces :  $A = \left( \frac{C_0 + C_1}{2} \right) \cdot (t_1 - t_0)$

donde:  $A$  es la concentración acumulada desde  $t_0$  hasta  $t_1$

$C$  es el promedio de las concentraciones de los tiempos dados

$T$  es el tiempo

El total de concentración acumulada en todas las muestras analizadas, se realizó como sigue:

$$A_1 = A + \left( \frac{C_1 + C_2}{2} \right) \cdot (t_2 - t_1)$$

$$A_2 = A_1 + \left( \frac{C_2 + C_3}{2} \right) \cdot (t_3 - t_2)$$

$$A_3 = A_2 + \left( \frac{C_3 + C_4}{2} \right) \cdot (t_4 - t_3)$$

$$A_4 = A_3 + \left( \frac{C_4 + C_5}{2} \right) \cdot (t_5 - t_4)$$

$$A_5 = A_4 + \left( \frac{C_5 + C_6}{2} \right) \cdot (t_6 - t_5)$$

## 8. DETERMINACION DEL RENDIMIENTO DE LA EXTRACCION

Para valorar la recuperación de los compuestos después de la extracción, se preparó una mezcla de los estándares de etanol, acetato de isobutilo, propionato de etilo, propanol, isobutanol, alcohol isoamilico, alcohol fenilico y n-octanol (estándar interno). Esta mezcla se sometió al mismo proceso de extracción que los caldos de fermentación y se inyectó bajo las mismas condiciones al cromatógrafo de gases.

Se preparó una mezcla de calibración que contenía cantidades conocidas de los estándares de cada uno de los componentes a ser analizados más el estándar interno (2-octanol), esta mezcla sin extraer, se inyectó al cromatógrafo de gases.

La primer etapa del calculo fue para la mezcla de calibración:

1. Para cada pico; se dividió el área medida entre la cantidad de ese componente obteniendo así el factor de respuesta.

2. Se dividió cada uno de los factores de respuesta entre el factor de respuesta de el estándar interno para obtener factores de respuesta relativos.

La siguiente etapa del calculo fue para la mezcla de estándares que sufrió el proceso de arrastre:

1. Para cada pico, se dividió el área medida entre su factor de respuesta relativa para obtener el área corregida
2. Se dividió cada una de estas áreas corregidas entre el área corregida del estándar interno para obtener la cantidad de cada componente relativa a la del estándar interno.
3. Se multiplicó cada una de las cantidades relativas por la cantidad real del estándar interno para obtener las cantidades reales de cada componente.

**Este método de cálculo se basó en la bibliografía consultada (Rowland, 1977), en pláticas con personas dedicadas a la cromatografía de gases y en la experiencia adquirida durante el desarrollo de este trabajo.**

## VII RESULTADOS

Los compuestos identificados en el sistema acoplado de gases-masas, se muestra en la tabla 2. Estos compuestos se identificaron empleando la biblioteca del instrumento (NBS 75K) o inyectando estándares puros para comparar su tiempo de retención y el espectro obtenido en el sistema gases-masas con el de la muestra problema. Entre los compuestos identificados, se encontraron un aldehído, una cetona, nueve alcoholes, nueve ésteres y un compuesto aromático. Se muestran los picos principales obtenidos por espectrometría de masas.

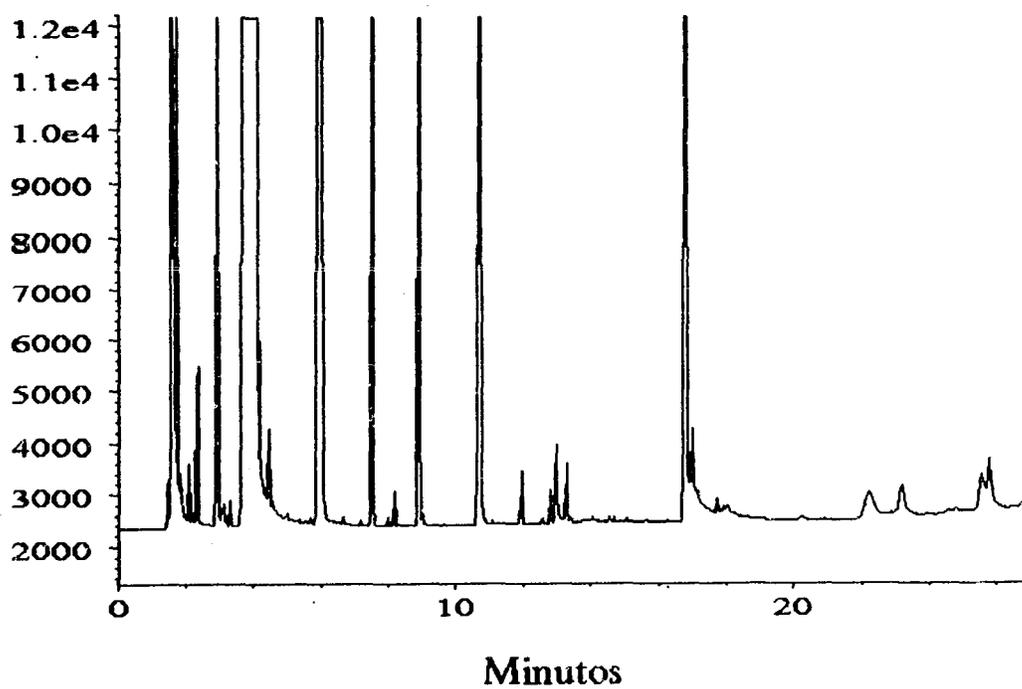
Si se observa la tabla 3, encontramos que los compuestos identificados en el caldo de fermentación de *C. fimbriata*, tienen aromas frutales que se usan en la preparación de sabores en la industria alimentaria con las concentraciones que se emplean en la fabricación de alimentos, tal es el caso de los acetatos de isobutilo y de isoamilo, del butirato de etilo y del propionato de etilo que contribuyen al aroma de plátano.

En la tabla 4, se muestran algunas características físicas de los compuestos identificados por cromatografía de gases-masas y se indica su tiempo de retención en una columna de carbowax 20 M de 30 metros que se uso en el CG-Detector FID. Así mismo en esta tabla se indica la cantidad mínima de algunos de los compuestos que puede ver el detector de ionización de flama, este dato se encontró al elaborar la curva estándar de cada uno de ellos. Puede observarse que el orden de elución de los diferentes compuestos es el mismo que en la columna de FFAP a excepción del 2-metil propanol y butanoato de etilo.

El contenido de la tabla 5 presenta los resultados de la regresión lineal hecha a las curvas de los estándares de los compuestos del aroma producido por *C. fimbriata*. En esta tabla se encuentran datos tan importantes como el coeficiente de correlación lineal (R), que nos indica si el rango de concentración en que se está trabajando da una respuesta lineal; en esta tabla también se encuentran los valores de concentración entre los cuales son validas las curvas estándar.

En la figura 6 se puede observar el tipo de cromatogramas obtenidos empleando la columna de carbowax 20M y el detector de ionización de flama. El cromatograma fue obtenido de un cultivo de 65 horas.

FIGURA 6 CROMATOGRAMA C.G. - FID



**TABLA 2 Lista de los compuestos del aroma producido por *C.fimbriata* en el día máximo de aroma.**

<b>R<sup>n</sup> MASAS</b>	<b>COMPUESTO</b>	<b>MEJORES PICO EN EL ESPECTRO DE MASAS (m/z)</b>	<b>ECENTRADOS POR</b>
4.47	ETER ETILICO	31, 45, 59, 74	BIBLIOTECA Y STD
4.61	ACETALDEHIDO	29, 44, 43, 15, 42, 41, 28, 27, 45	BIBLIOTECA Y STD
7.30	ACETATO DE ETILO	15, 29, 43, 61, 70, 88	BIBLIOTECA Y STD
8.46	ALCOHOL ETILICO	31, 45, 47, 59, 73, 78	BIBLIOTECA Y STD
9.02	PROPIONATO DE ETILO	29, 45, 57, 73, 75, 102	BIBLIOTECA Y STD
9.48	ACETATO DE PROILO	43, 61, 73, 87, 101	BIBLIOTECA
11.19	ALCOHOL PROPILICO	15, 18, 27, 29, 31, 42, 59, 60	BIBLIOTECA Y STD
12.73	ALCOHOL BUTILICO	18, 27, 31, 41, 43, 56, 59, 74	BIBLIOTECA Y STD
12.75	ACETATO DE BUTILO	43, 56, 61, 73, 87, 101	BIBLIOTECA Y STD
13.77	ACETATO DE ISOAMILO	28, 43, 55, 70, 87, 115, 130	BIBLIOTECA Y STD
14.33	ALCOHOL BUTILICO	27, 31, 41, 56, 74	BIBLIOTECA Y STD
16.18	ALCOHOL ISOBUTILICO	27, 31, 39, 41, 55, 57, 70, 83, 87	BIBLIOTECA Y STD
17.46	ALCOHOL PENTILICO	29, 31, 42, 55, 69, 70	BIBLIOTECA
18.93	ACETOINA	45, 43, 27, 29, 18, 28, 88	BIBLIOTECA Y STD
22.84	ALCOHOL ISOAMILICO	27, 31, 39, 41, 55, 57, 70, 83, 87	BIBLIOTECA
33.03	BUTANOATO DE BUTILO	43, 56, 71, 89, 101, 116, 143	BIBLIOTECA Y STD
33.97	HIDROXITOLUENOBUTILADO	57, 91, 104, 145, 177, 205, 219, 220	BIBLIOTECA
34.28	ALCOHOL FENETILICO	51, 65, 91, 93, 103, 119, 122	BIBLIOTECA Y STD

**±:** Tiempo de retención en columna FFAP 60 m.

**STD:** Identificado por comparación del tiempo de retención y espectro de masas del estándar.

**BIBLIOTECA:** Identificado por comparación con los espectros de la biblioteca del equipo.

**TABLA 3 Aroma de alguno de los compuestos volátiles producidos por *C. fimbriata*.**

COMPUESTO	USO EN AROMAS DE:	CONC. $\mu$ L/L	REF.
ACETALDEHIDO	Manzana, plátano, chocolate, durazno,	4-25	Arctander 1982
ALCOHOL BUTILICO	Fruta, mantequilla, crema	35	Arctander 1982
ACETATO DE 2-FENIL ETILO	Mantequilla, durazno, miel, albaricoque, cereza	2-10	Arctander 1982
ACETATO DE ISOBUTILO	Plátano, fresa, tutifruiti, mantequilla, uva,	150-160	Arctander 1982
ACETATO DE BUTILO	Plátano, pera, fresa, durazno, piña	200-240	Arctander 1982
ACETATO DE AMILO	Plátano, manzana, crema, pera, piña, durazno, cereza	200	Arctander 1982
ACETATO DE ETILO	Plátano, piña, durazno, pera, melón, tutifruiti	200	Shiota, 1993
ACETATO DE ISOAMILO	Plátano pera, manzana, piña caramelo,	200	Arctander 1982
ACETOINA	Mantequilla, grasoso	0.5-30	Arctander 1982
ALCOHOL FENETILICO	Mantequilla, fresa, caramelo, miel, melón, frutas.	40	Arctander 1982
ALCOHOL ISOAMILICO	Manzana, plátano, brandy, chocolate, licor	50	Arctander 1982
ALCOHOL ISOBUTILICO	Cola, fruta, mantequilla, licor	30-35	Arctander 1982
BUTILENGLICOL	Perceptible solo en altas concentraciones.	5000	Arctander 1982
BUTIRATO DE BUTILO	Plátano, manzana, durazno, pera, piña,	20	Arctander 1982
BUTIRATO DE ETILO	Plátano, naranja durazno, uva, tutifruiti,	30-100	Arctander 1982
PROPIONATO DE ETILO	Plátano, manzana, pera, piña, tutifruiti,	10-100	Arctander 1982
BUTANOATO DE ETILO	Manzana, Dulce, Naranja		Arctander 1982

**TABLA 4 Propiedades de los compuestos volátiles encontrados en los caldos**

NOMBRE	TR *	FORMULA	PESO M.	DENSIDAD	PUNTO EB.	CSMC. MR. (%)
ALCOHOL BUTILICO	8.90	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74.12	0.810	117.700	0.0040
ACETATO FENIL ETILICO	26.84	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> O	164.21	1.03	229.000	
2-OCTANOL	16.98	C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> O	130.22	0.819	178.5	
ACETOINA	13.08	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88.10	0.992	148.000	
ACETALDEHIDO	1.70	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O	44.05	0.788	21.000	
ACETATO DE AMILO	9.82	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130.18	0.876	142.000	
ACETATO DE BUTILO	6.73	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116.16	1.394	127.000	0.0040
ACETATO DE ETILO	2.93	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	88.10	0.902	77.000	0.0040
ACETATO DE ISOAMILO	8.28	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	130.19	0.876	142.000	
ACETATO ISOBUTILO	5.29	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116.16	0.868	118.000	0.0040
ALCOHOL ETILICO	3.55	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	46.07	0.789	78.500	
ALCOHOL FENILETILICO	29.03	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> O	122.17	1.023	219-221	0.0006
ALCOHOL ISOAMILICO	10.80	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	88.15	0.809	132.000	0.0040
ALCOHOL ISOBUTILICO		C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74.12	0.806	108.000	0.0040
ALCOHOL ISOPROPILICO	3.66	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60.09	0.785	82.000	0.0040
ALCOHOL PROPILICO	5.92	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	60.09	0.805	97.2	0.0005
BUTIRATO DE BUTILO	10.97	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144.21	0.871	164-165	
BUTILENGLICOL	20.40	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	90.17	0.994	181.2	
BUTIRATO DE ETILO	5.76	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>2</sub>	116.16	0.879	120-121	0.0016
ETER ETILICO	1.55	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O	74.12	0.713	34.600	
HEXANOATO ETILO	11.50	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	144.21	0.660	166-167	
PROPIONATO DE ETILO	4.05	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	102.13	0.891	99.000	0.0016
TOLUENO	5.70	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub>	92.13	0.866	106.600	

(\*) Concentración mínima detectada por cromatografía de gases con FID; TR en Carbowax.

**TABLA 5 Regresión Lineal**

Estándar	A (b)	B (m)	R	R <sup>2</sup>	SD	Rango de Aplicación $\mu\text{L/L}$
ACETALDEHIDO	0.09930	0.26845	0.99453	0.9890899209	0.31593	1 - 20
ALCOHOL BUTILICO	-0.13523	0.7128	0.99681	0.9936301761	0.01384	0.006 - 0.5
ACETATO FENIL ETILICO	0.47833	0.76761	0.99915	0.9983007225	0.35499	1 - 20
ACETATO DE ISOBUTILO	0.00496	0.88125	0.99744	0.9948865536	0.00793	0.006 - 0.03
ACETATO DE BUTILO	0.00665	1.10630	0.98901	0.9781407801	0.01268	0.006 - 0.2
ACETATO DE AMILO	-0.51459	0.80939	0.99194	0.9839449636	1.15805	0.1 - 20
ACETATO DE ETILO	-0.31147	0.51377	0.98808	0.9763020864	0.62082	0.5 - 20
ACETATO DE ISOAMILO	-0.46781	0.78472	0.99416	0.9883541056	0.66027	0.5 - 20
ACETOINA	-0.21993	0.28273	0.99373	0.9874993129	0.31668	3 - 24
ALCOHOL ETILICO	-10.78695	0.58555	0.99250	0.9850562500	15.82066	50 - 600
ALCOHOL FENETILICO	0.01986	1.25960	0.98934	0.9787936356	0.02018	0.006 - 0.25
ALCOHOL ISOAMILICO	0.00881	0.99118	0.98704	0.9742479616	0.04909	0.006 - 100
ALCOHOL ISOBUTILICO	-0.00631	0.67441	0.99692	0.9938494864	0.40686	0.5 - 20
ALCOHOL ISOPROPILICO	0.00340	0.67236	0.99715	0.9943081225	0.01010	0.004 - 0.5
ALCOHOL PROPILICO	0.01756	0.57730	0.99978	0.9995600484	0.10409	0.5 - 22
BUTIRATO DE BUTILO	0.08055	0.66066	0.99827	0.9965429929	0.43587	0.1 - 20
BUTILEN GLICOL	0.05987	0.36392	0.99848	0.9969623104	0.15384	0.5 - 20
BUTIRATO DE ETILO	0.01301	0.74448	0.99239	0.9848379121	0.01701	0.006 - 0.5
EXANOATO ETILO	0.07668	0.71911	0.99967	0.9993401089	0.22773	1 - 22
PROPIONATO DE ETILO	0.00987	0.71025	0.99087	0.9816233569	0.01729	0.006 - 0.05
TOLUENO	-0.09647	1.13856	0.99822	0.9964431684	0.84345	

**A(b)** = Ordenada al origen  
**B(m)** = Pendiente  
**R** = Coeficiente de regresión  
**SD** = Desviación estándar

Las concentraciones de los compuestos encontrados en el caldo de fermentación de medio estándar con urea como fuente de nitrógeno se muestran en la tabla 6 mientras que la tabla 7 contiene los resultados del caldo adicionado con leucina.

**TABLA 6 Concentración de volátiles en el medio estándar (urea como fuente de nitrógeno)**

RESULTADOS UREA $\mu\text{L/L}$ CALDO								
TIEMPO HRS	ACETAL DEHIDO	ACETATO DE ETILO	ALCOHOL ISOPROPILICO	ALCOHOL ETILICO	PROPIONATO DE ETILO	ACETATO DE ISOBUTILO	BUTIRATO DE ETILO	ALCOHOL PROPILICO
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.18	113.56	0.00	698.07	5.82	2.94	0.19	31.72
23	14.85	255.58	0.19	3069.58	0.69	0.28	0.29	112.18
44	1.96	318.15	0.00	2766.48	17.05	1.71	0.75	112.37
66	0.06	45.11	0.01	752.389	2.27	0.00	0.02	48.60
96	0.28	146.30	0.20	3281.05	1.81	0.00	0.00	55.69
141	2.91	28.83	0.33	3427.64	1.53	0.00	0.00	84.59

TIEMPO HRS	ACETATO DE BUTILO	ALCOHOL ISOBUTILICO	ALCOHOL BUTILICO	ALCOHOL ISOAMILICO	ACETONA	ACETATO FENETILO	ALCOHOL FENETILICO	TOTALES
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.08	8.08	3.72	7.18	9.64	6.96	0.19	855.13
23	0.98	5.49	18.50	4.44	9.75	6.43	0.13	4351.03
44	0.86	6.15	16.06	7.45	11.50	7.54	0.15	3243.05
66	0.12	1.04	8.28	0.50	9.60	6.21	0.00	809.0863
96	0.00	2.08	9.19	2.64	10.43	6.45	0.76	2842.23
141	0.00	4.79	11.86	5.77	10.07	6.80	0.78	2918.60

**TABLA 7 Concentraciones de volátiles en el medio estándar adicionado de leucina**

<b>RESULTADOS LEUCINA <math>\mu</math>L/L CALDO</b>								
TIEMPO HRS	ACETAL DEHIDO	ACETATO DE ETILO	ALCOHOL ISOPROPILICO	ALCOHOL ETILICO	PROPIONATO DE ETILO	ACETATO DE ISOBUTILO	BUTIRATO DE ETILO	ALCOHOL PROPILICO
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.18	113.56	0.00	698.07	5.82	2.94	0.19	31.72
23	14.85	255.58	0.19	3069.58	0.69	0.28	0.29	112.18
44	1.96	318.15	0.00	2766.48	17.05	1.71	0.75	112.37
65	16.66	250.38	0.19	752.38	12.34	0.16	0.33	223.86
96	1.09	200.53	0.17	4044.23	0.42	0.04	0.14	125.41
141	1.68	18.22	0.07	2644.13	1.46	0.00	0.00	90.37

TIEMPO HRS	ACETATO DE BUTILO	ALCOHOL ISOBUTILICO	ALCOHOL BUTILICO	ALCOHOL ISOAMILICO	ACETONA	ACETATO FENETILO	ALCOHOL FENETILICO	TOTALES
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.08	8.06	3.72	7.18	9.64	6.96	0.19	855.13
23	0.28	5.49	18.50	4.44	9.75	6.43	0.13	4351.03
44	0.86	6.15	16.06	7.45	11.50	7.54	0.15	3243.05
65	0.69	6.18	25.71	7.67	12.51	7.04	1.21	6809.08
96	0.13	6.21	9.28	20.10	9.78	6.69	0.34	4446.19
141	0.00	4.03	8.47	27.23	10.75	6.70	1.46	3037.51

El aroma que produce el hongo *C. Fimbriata* es de plátano en los dos medios de cultivo. La tabla 8 nos indica la intensidad del aroma que presento cada cultivo a diferentes tiempos, la cual se evaluó por un panel de 6 personas no entrenadas.

**Tabla 8 Intensidad del aroma en los cultivos de *C. fimbriata*.**

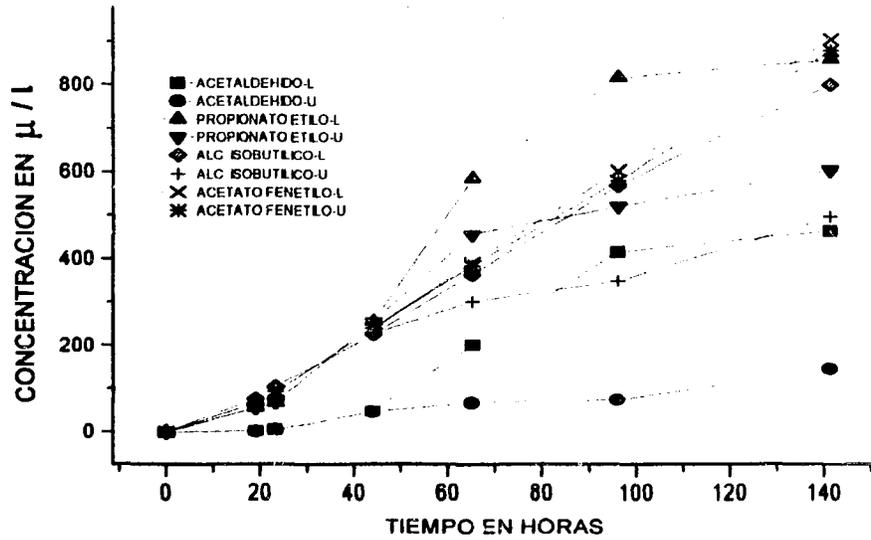
MEDIO	23 HRS.	44 HRS.	65 HRS.	86 HRS.	96 HRS.	141 HRS.
M.S. (UREA)	1	2	3	2	1	0
M.S. + LEUCINA	2	3	4	3	3	2

Aroma de plátano en el medio (MS) y aroma a plátano en el MS+leucina. 0= sin aroma, 1= ligero, 2= medio, 3=intenso, 4= muy intenso.

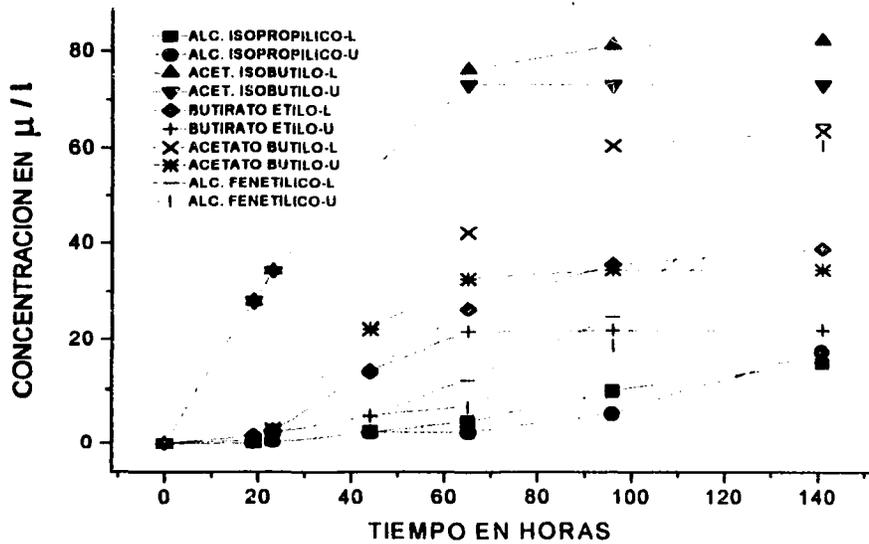
La producción acumulada es el área bajo la curva de la producción registrada durante la fermentación y nos permite evaluar mas fácilmente la cantidad de compuestos producidos, debido a que no se registran los aumentos y disminuciones en la producción de volátiles, que se registran al graficar únicamente la cantidad de volátiles presentes en el medio de cultivo en ese momento.

A continuación en las gráficas, se indica la producción acumulada de volátiles, en ellas se compara la producción del mismo compuesto en diferente medio, es decir: medio estándar (U) y medio estándar adicionado de leucina (L).

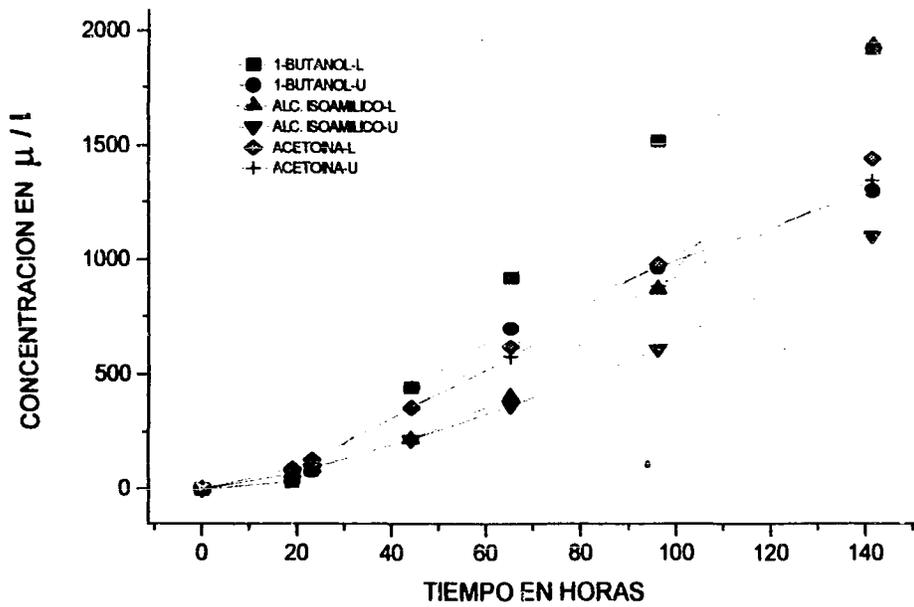
**GRAFICAS DE PRODUCCIÓN ACUMULADA ENCONTRADA EN LOS CALDOS DE FERMENTACION CON MEDIO ESTANDAR CON UREA COMO FUENTE DE NITROGENO Y EN MEDIO ESTANDAR ADICIONADO CON LEUCINA**



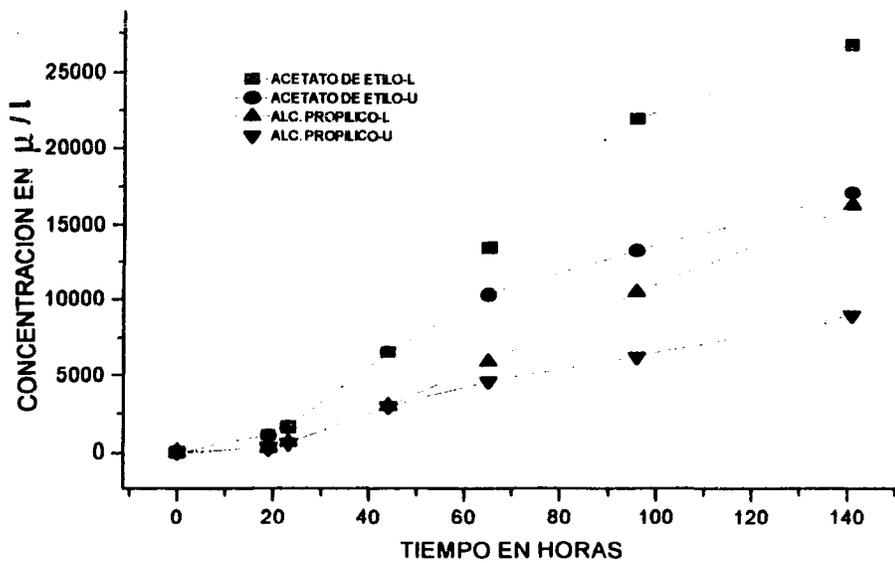
**Figura. 7** Concentración acumulada de Acetaldehido, propionato de etilo, alcohol isobutilico, y acetato de fenetilo.



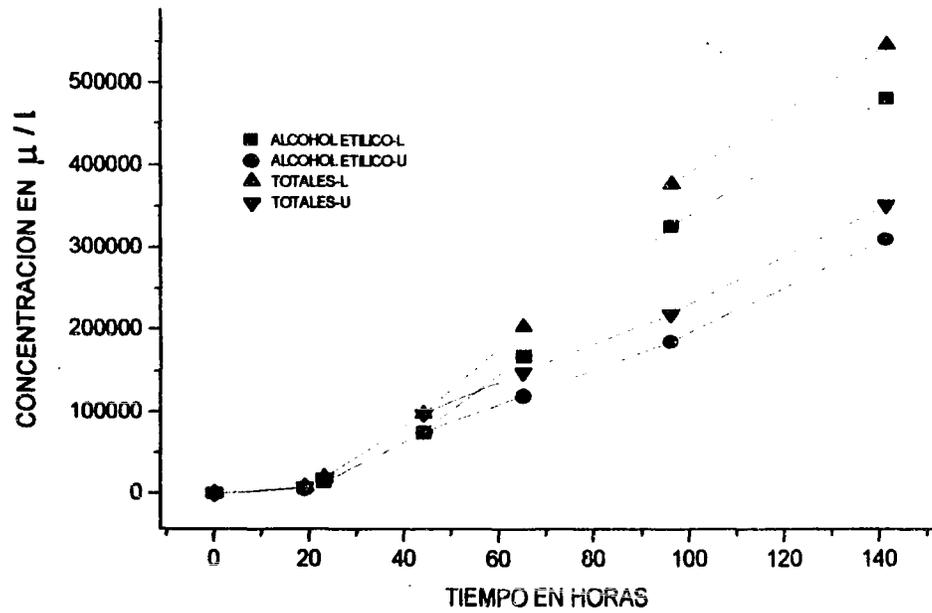
**Figura. 8** Concentración acumulada de alcohol isopropilico, acetato de butilo, butirato de etilo, acetato de butilo y alcohol fenetilico.



**Figura. 9** Concentración acumulada de 1-butanol, alcohol isoamilico, y 3-hidroxi-2-butanona (acetoina).



**Figura 10** Concentración acumulada acetato de etilo y alcohol propilico.



**Figura 11** Concentración acumulada alcohol etílico (etanol) y los totales. La concentración acumulada de los totales se calculo en base al factor  $\zeta$ e respuesta de la curva estándar de etanol.

## VIII DISCUSION DE RESULTADOS

Como primer opción se usó el método de extracción líquido - líquido con éter utilizando embudo de separación, pero se observó en el cromatógrafo de gases/FID, que la cantidad de compuestos extraídos era baja, por lo que se recurrió al método de destilación por arrastre de vapor y extracción simultánea, empleando primero pentano como disolvente y después éter etílico. Cuando se empleo éter etílico, la extracción dio mejores rendimientos, se obtuvieron más picos de mayor tamaño, por lo que se decidió trabajar con el método de destilación - extracción simultaneas, empleando éter como disolvente.

De este extracto se inyectó 1  $\mu\text{L}$  al cromatógrafo de gases para determinar las condiciones a las cuales se obtuviera mejor separación.

Una vez encontradas las condiciones del cromatógrafo y la identidad de los compuestos, el siguiente paso en la etapa de cuantificación fue escoger el estándar interno adecuado, el cual debía ser químicamente semejante a los compuestos de interés, y debía tener tiempo de retención diferente y próximo a ellos. Se probaron acetato de metilo y 2-octanol por ser semejantes químicamente a los compuestos producidos. El acetato de metilo resultó ser demasiado volátil, además de aparecer muy cerca de los compuestos que eluian primero. El 2-octanol fue el más adecuado por salir en una zona intermedia donde no hay picos de los compuestos del aroma producido por *C fimbriata*. Se comprobó que el 2-octanol, que tiene un tiempo de retención de 17 minutos, no interacciona con el resto de los componentes de la muestra.

El detector de ionización de flama da mayor respuesta cuando hay más átomos de carbono, aunque en el caso de los volátiles totales todos los cálculos se hacen como si fuera etanol, pero esto no es exacto, porque todos los compuestos no identificados son de mas de dos carbonos y su respuesta es mayor que la del etanol. Por lo que al dar los valores totales como etanol el valor está subestimado pero es una aproximación que hay que hacer si no conocemos todos los compuestos.

Teniendo ya las condiciones del cromatógrafo y elegido el estándar interno se hicieron las extracciones, pero incluyendo esta vez el estándar interno, cuidando que siempre fuera la misma concentración que se adicionaba al caldo de cultivo (1.2 $\mu\text{L}$  /mL). De esta forma el estándar interno sufrió el mismo tratamiento que todos los volátiles de la muestra.

Es importante que la concentración del estándar interno sea semejante a las concentraciones de los estándares que se espera encontrar en el caldo de fermentación

problema. Ya que si la concentración de estándar interno es muy por arriba o muy por abajo de las concentraciones esperadas los resultados serán erróneos.

Se escogió la técnica cuantitativa del estándar interno, por ser la más recomendada para casos como el tratado en este estudio debido a que los cálculos se trabajan con relaciones en la que se combinan la muestra y el estándar en una sola inyección evitando así errores en el volumen de inyección, y disminuyendo errores de pérdida por evaporación.

La tabla 3 contiene algunas propiedades de los compuestos volátiles que se encontraron en los caldos de fermentación de *C. fimbriata*, así como los tiempos de retención determinados bajo las condiciones en que se realizó este trabajo.

La tabla 4 nos muestra la regresión lineal de las curvas estándar realizadas, en la cual podemos notar que aunque el coeficiente de regresión lineal no es el mismo para todos los estándares se pueden aceptar como buenos si se considera que la volatilidad de todos los estándares es bastante alta, por lo que hubo la necesidad de mantener las jeringas en refrigeración hasta su uso, de esta forma se disminuyó en parte la volatilidad. En esta tabla se encuentra también el rango de concentración en el cual se trabajó. El rango no es el mismo para todas las curvas, ya que se buscó trabajar en un rango adecuado para que los factores de área de los volátiles encontrados en los caldos cayera dentro de esta curva.

En el medio estándar (tabla 6) se observaron los mismos compuestos que en el medio adicionado de leucina (tabla 7), pero con una concentración mas elevada en los siguientes compuestos: Acetaldehido, acetato de etilo, alcohol isopropilico y 1-butanol, así como una disminución en el alcohol isoamilico.

En la tabla 7 puede observarse que en el medio adicionado de leucina el compuesto más abundante es el etanol el cual se produjo en un rango de 700 a 600 ppm, en concentración le sigue el acetato de etilo el cual se presenta en concentraciones que van de 18 a 320 ppm, el propanol de 32 a 224 ppm, y el Acetaldehido de 0.18 a 17 ppm. El resto de los compuestos volátiles están en menor concentración.

La tabla 8 nos muestra la intensidad del aroma a diferentes tiempos tanto en medio estándar con urea como fuente de nitrógeno como en el medio adicionado con leucina. Como podemos notar en esta tabla el aroma más intenso fue a las 65 horas mientras que a las 86 horas las cantidades de algunos de los componentes aumentaron pero el aroma disminuyó, esto se justifica con las tablas 6 y 7 ya que en estas podemos observar que la concentración total de compuestos aumentó.

Las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 nos muestran las gráficas de producción acumulada de los compuestos producidos por *C. fimbriata* tanto en medio estándar como en el medio adicionado con leucina, en estas figuras podemos notar que la adición de leucina aumenta la producción en todos los compuestos a excepción de acetoina que no cambia, sin embargo la diferencia de aumento en algunos compuestos, Acetaldehído, propionato de etilo, acetato de butilo, acetato de etilo y etanol es más pronunciada que en otros. En las gráficas de las figuras 9, 10 y 11 también podemos notar que la fermentación fue cortada antes de terminar, ya que se puede apreciar perfectamente como las líneas tienen tendencia a subir. Con los compuestos de las figuras 7 y 8 pasa lo mismo excepto con el propionato de etilo, acetato de isobutilo, butirato de etilo y el acetato de butilo los cuales se mantienen constantes a partir de las 100 horas aproximadamente.

Con un rechazo de área de 5000 se obtuvieron en promedio 40 picos de los cuales pudieron ser identificados 21 (tabla 4) de los cuales se cuantificaron 15.

## IX. CONCLUSIONES

Los resultados mostraron claramente que la adición de leucina al caldo de fermentación incrementa al doble a los compuestos del aroma, por lo que este experimento da evidencias sobre la relación entre la leucina y los compuestos del aroma.

De acuerdo a los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo, se pudo comprobar que el aroma producido por *C. fimbriata* se debe a la naturaleza de las sustancias presentes en el extracto.

Se pudo comprobar que es necesario tener un buen método de extracción de esta forma es más fácil la identificación así como la cuantificación. Para los fines de este trabajo el método que se encontró más adecuado fue el método de destilación-extracción simultáneas con un disolvente orgánico como lo es el éter etílico absoluto, debido a que con este método se extrae del 70 al 80% de los compuestos del aroma.

Se concluye también que la cromatografía de gases es una excelente técnica de separación y cuantificación para los compuestos del aroma producido por *C. fimbriata*, bajo las condiciones aquí establecidas.

## **X. RECOMENDACIONES**

- 1. Antes de hacer la extracción, es importante ajustar el pH para la estabilidad de los compuestos a extraer ya que a pH menores de 5.8 se hidrolizan y en el rango de 5.8 a 6.5 la estabilidad de los compuestos a extraer es mayor por lo que la destilación es más eficiente (Schults, y col., 1977).**
- 2. Al terminar de montar el equipo de extracción es conveniente sellar con teflón todas las uniones para evitar posibles fugas.**
- 3. Durante la extracción es necesario estar checando que la temperatura del circulador de agua sea siempre menor de 10°C.**
- 4. Al terminar la extracción, conviene dejar que el equipo se enfríe un poco antes de desmontar, de esta manera se evitan perdidas por evaporación.**
- 5. Mantener la jeringa en el refrigerador, de ésta manera estará fría antes de inyectar en el cromatógrafo lo cual evitara posibles perdidas por evaporación, ya que los compuestos que se manejan tienen un punto de ebullición bastante bajo por lo que son demasiado volátiles.**
- 6. Es conveniente que las curvas estándar se trabajen en rangos cercanos a la concentración esperada.**
- 7. Se recomienda también hacer uso de otro estándar interno con tiempo de retención más bajo y correr la muestra con los dos estándares internos a la vez.**

## BIBLIOGRAFIA CITADA

- Arctander, S. (1982). Perfume and flavor chemicals. **Published by the author.** USA.
- Bartle, K.D. (1993)., **Introduction to the teory of Chromatography separations with referente to gas chromatography.**, 1-14. De Baugh, P.J. (1993).
- Baugh, P.J.(1993)., **Gas Chromatography a practical aproach.**, Series editores D. Rickwood and B.D. Hames, 1-70, 359-390.
- Berger, R.G.; (1995). **Aroma biotechnology, Springer – Verlage. Germany.**
- Beuchat, L.R. (1983). Indigenous fermented foods. In **Biotechnology** 5 477-528 Rehm, H.J. y Reed, G. Eds
- Borman, S. A. (1983). New gas chromatography detectors, **Analitical chemistry** ,55,226<sup>a</sup>.
- Collins, E.B. (1972). Biosynthesis of flavour compounds by microorganisms. **J. Dairy Sci.** 55, 1022.
- Collins, R.P. (1978) The production of volatile flavour compounds by filamentous fungi. **Dev. Ind. Microbiol**, 20, 239
- Christen, P. Meza J.C. y Revah S. (1997). Fruity aromas production in solid state fermentation by the fungus *Ceratocystis fimbriata*. **Micological Research** 101, 8, 911-919.
- Christen, P. Villegas E., Revah S. (1994). Growth and aroma production by *Ceratocystis fimbriata* in varius fermentation media. **Bictechnology Letters.** 16,11, 1183-1188.
- Christen, P. y Raimbault M. (1991). Optimization of culture medium for aroma production by *Ceratocystis fimbriata*. **Biotechnology letters**, 13, 7, 521-526.
- Christen, P. Auria, R. Palma I. (1992). Crecimiento de *Ceratocystis fimbriata* sobre diferentes medios líquidos y sólidos para la producción de aromas. **Avances en Ingeniería Química.** 17-21
- Evershed, R.P. (1993)., **Combined Gas Chromatography mass spectrometry.**, 359-390. De Baugh, P.J. (1993).

- Gerhard, S. (1990). Weenheim N. York, **Gas Chromatography a Practical Course**. 85-120
- Hanssen, H.P, Sprecher, E. y Abraham, W.R. (1986) 6-protoilludene, the majos metabolite from *Ceratocystis piceae* liquid cultures. ). **Phytochemistry**. 25, 8, 1979-1980
- Janssens, L.; De Pooter, H.L.; Schamp, N.M. and Vandamme, E.J. (1992) Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry** 27, 195-215.
- Kurtzmann, C.P.; (1983). Fungi sources of food, fuel, and biochemicals, **Micologia**. 75, 374-382
- Lanza, E. y Palmer J.K. (1978). Biosynthesis of monoterpenes by *Ceratosystis moniliformis*, **Phytochemistry** ,16,1555-1560.
- Lanza, E.; Ko, K.w. y Palmer J.K. (1996). Aroma production by cultures of *Ceratocystis moniliformis*. **J. Agric. Food Chem.** 24, 1247
- Larroche, C.; Besson, I. y Gross, J (1994). Behavior of spores of *penicillium roquefortii* during feed batch bioconversion of octanoic acid into 2-Heptanone. **Biotechnology and bioengineering** 6, 801-807.
- McNally, M.E. y Grob, R.L. (1985). Static and dinamic headspace analysis, **Am. Lab.** ,17,106.
- Pecsok, R.; (1983). Edit. Limusa 2a. Ed. México, **Métodos modernos de análisis químicos**.
- Revah, S. y Lebeaul, J.M. (1989). Acelerated production of blue cheese flavors by fermentation on granular curds with lipase addition. **Lait**, 69, 281-289.
- Rowland, F. W. (1977). División de Avondale Hewlett-Packard. **La practica de la cromatografía de gases** 25-42.
- Sánchez, L., Albores-velasco, M. y del Río F. (1991) Volatile compounds of *Sargentia greggi*. **Phytochemistry**, 30, 6, 1915-1916.
- Sánchez, L. **Produccion de aromas por *Ceratosystis fimbriata*. Trabajo por publicar.**
- Schindler, J. (1982). Terpenoids by microbial fermentation, **Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.** 21, 537-539.

- Schultz, T.H., Flath, R.A., Mon, T.R., Egging, S.B. y Teranishi, R. (1977). Isolation of volatile components from a model system. **J. Agric. Food Chem.** 25, 3, 446-449.
- Shiota, H. (1993). New esteric components in the volatiles of banana fruit. (Musa Sapientum, L.), **Journal Agric. Food Chem.** ,41,2056-2062.
- Sprecher, E. y Hanssen, H.P (1983). Distribution and strain dependent formation of volatile metabolites in the genus *Ceratosystis*. **Antonie van Leeuwenhock** 49, 493-499.
- Tipler, A. (1993)., **Gas Chromatography instrumentation operation and experimental considerations**, 15-70. De Baugh, P.J. (1993).
- Weinreich, B. y Nitz, S. (1992). Influences of processing on the enantiomeric distribution of chiral flavour compounds. Part 1. Linalyl acetate and terpene alcohols. **Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm.** 14(3/4) 117-124.
- Welsh, F.W., Murray, W.D., y Williams, R.E.; (1989). Microbiological y Enzimatic production of flavor and fragrance chemicals, **Critical Reviews in Biotechnology.** ,9,2 105-169.
- Wiedemer, R.T., Mickinley, T.W., Rendl, T.W. (1986). Advantages of wide - bore capillary columns, **Am. Lab.** ,18,110.
- Willard, H., Merritt, L., Dean, J., Settle, F., (1991). Grupo Editorial Iberoamericano, **Métodos instrumentales de análisis** ,455-501.
- Yada, H., Sato, H., Kaneko, S. y Ichihara, A. (1993) New aliphatic delta-lactones, metabolites of *Ceratosystis piceae*. **Nat. Prod. Lett.** 2 (3), 221-226.
- Yang, X. y Peppard, T. (1994). Solid - Phase Microextraction for flavor analysis, **Journal Agric. Food Chem.** ,42,1925-1930.

## ANEXO I

### CURVA ESTANDAR DE ACETALDEHIDO

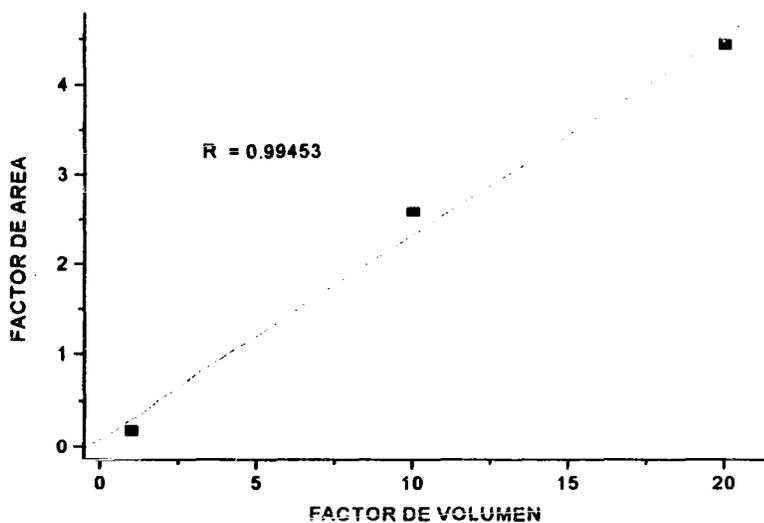


Figura 12. Respuesta del Acetaldehido en el rango de concentración de 1-20  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol

### CURVA ESTANDAR DE ACETATO DE 2-FENIL ETILO

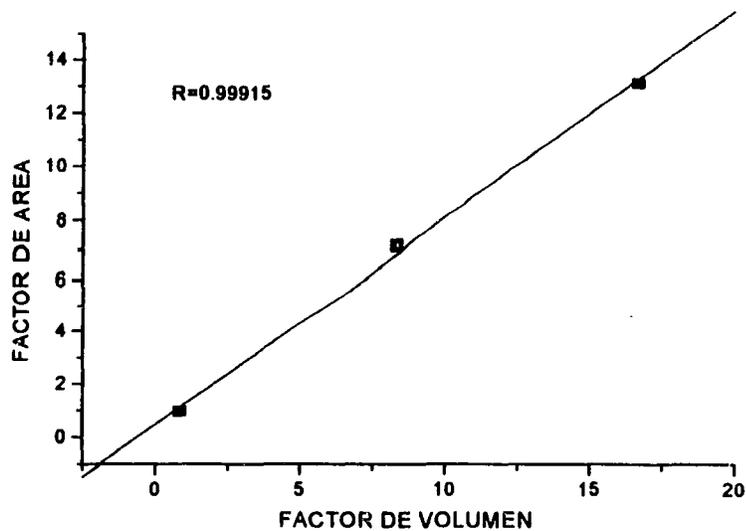


Figura 13. Respuesta del 2-fenil etil acetato en el rango de concentración de 1-20  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

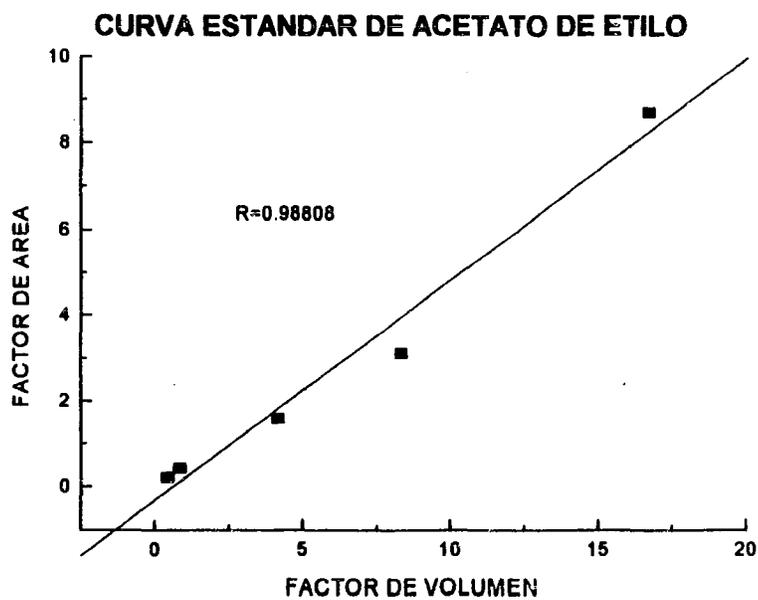


Figura 14. Respuesta del acetato de etilo en el rango de concentración de 0.5-20  $\mu$ L en éter con respecto al 2-octanol.

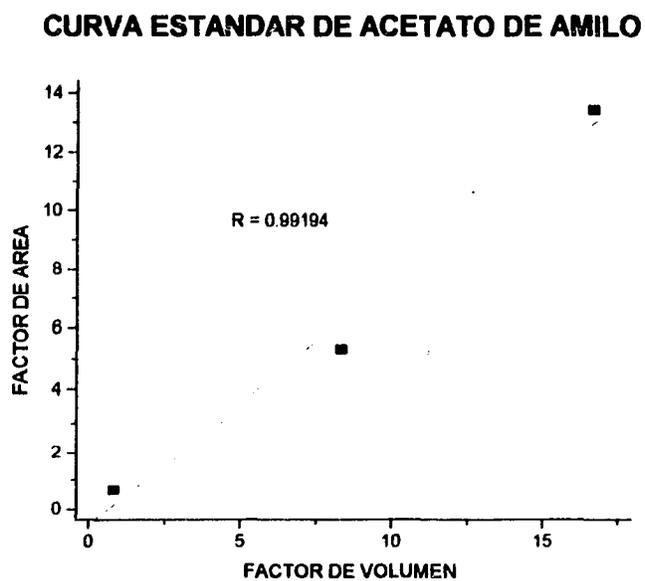


Figura 15. Respuesta del acetato de amilo en el rango de concentración de 0.1-20 en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ACETATO DE ISOAMILO

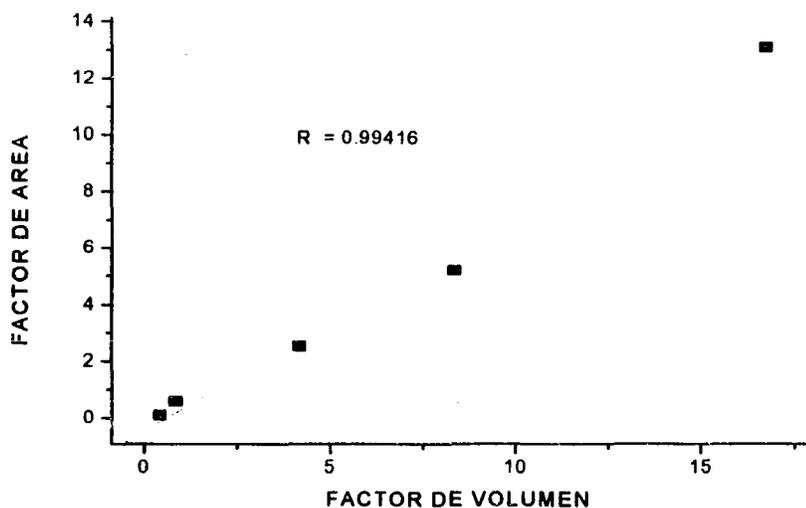


Figura 16. Respuesta del acetato de isoamilo en el rango de concentración de 0.5-20 en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ACETATO DE ISOBUTILO

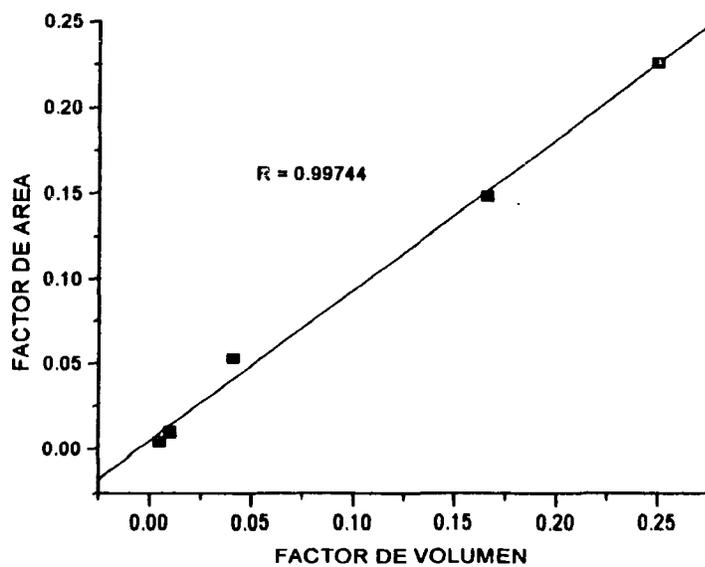


Figura 17. Respuesta del acetato de isobutilo en el rango de concentración de 0.006-0.3  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ACETATO DE BUTILO

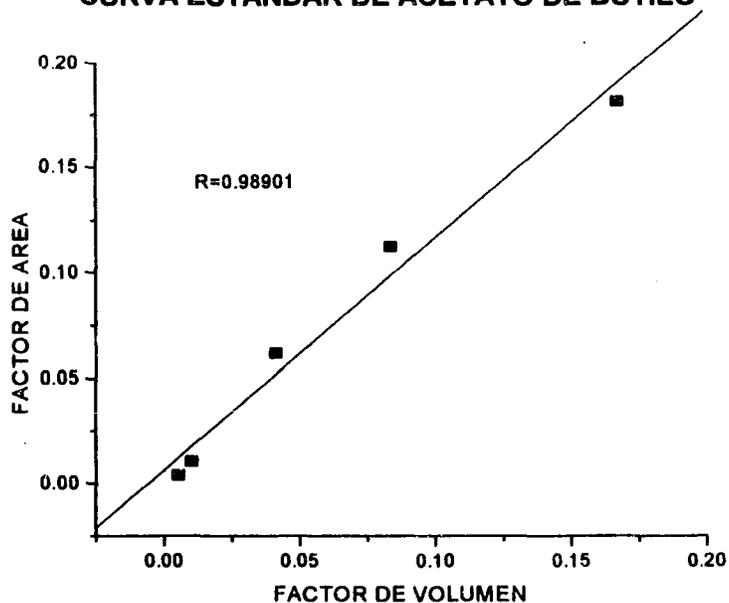


Figura 18. Respuesta del acetato de butilo en el rango de concentración de 0.006-0.2 en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ACETOINA

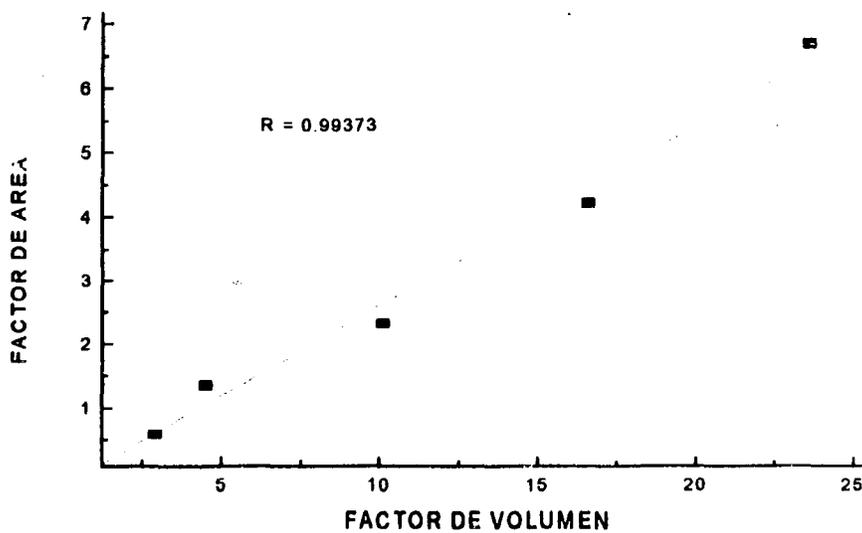


Figura 19. Respuesta de la acetoina en el rango de concentración de 0.006-0.05  $\mu$ L en éter con respecto al 2-octanol.

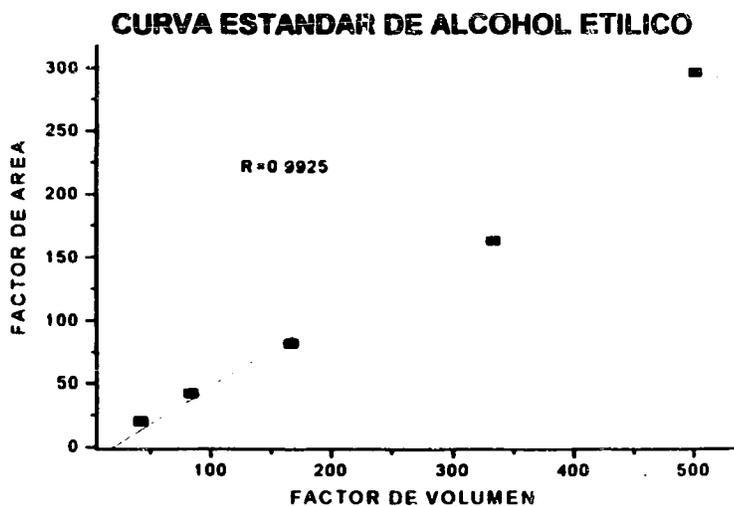


Figura 20. Respuesta del alcohol etílico en el rango de concentración de 50-600  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

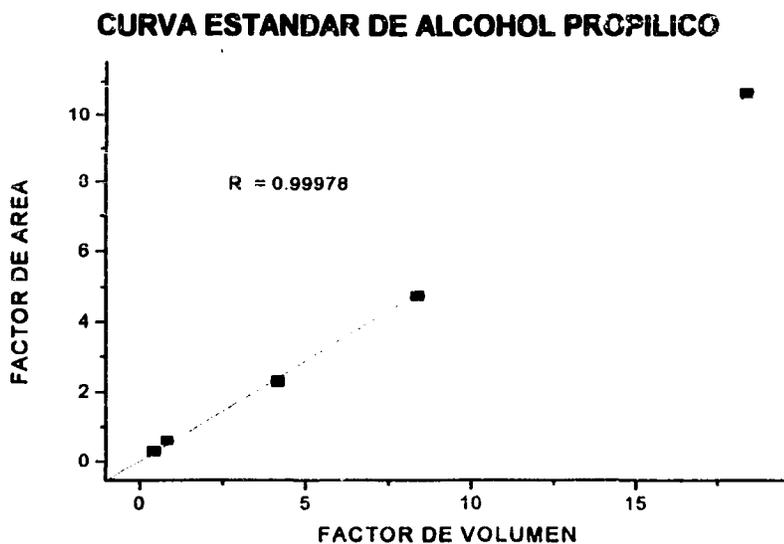


Figura 21. Respuesta del alcohol propilico en el rango de concentración de 0.5-20  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ALCOHOL ISOBUTILICO

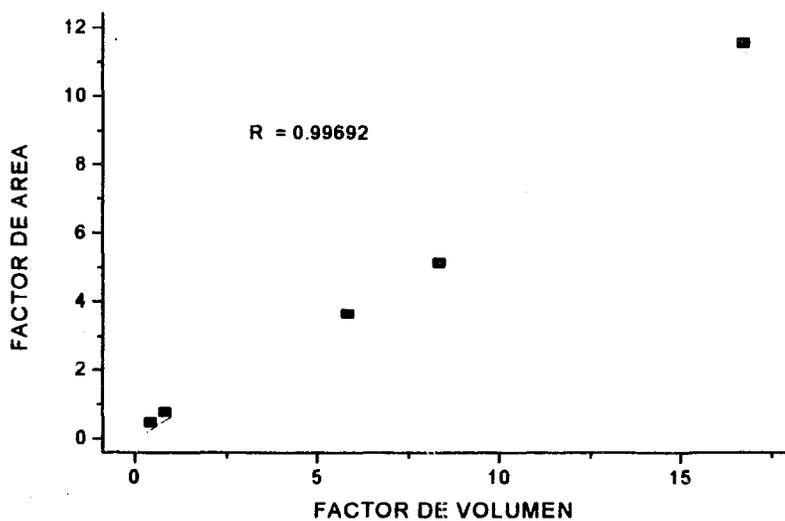


Figura 22. Respuesta del alcohol isobutilico en el rango de concentración de 0.5-20  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ALCOHOL FENETILICO

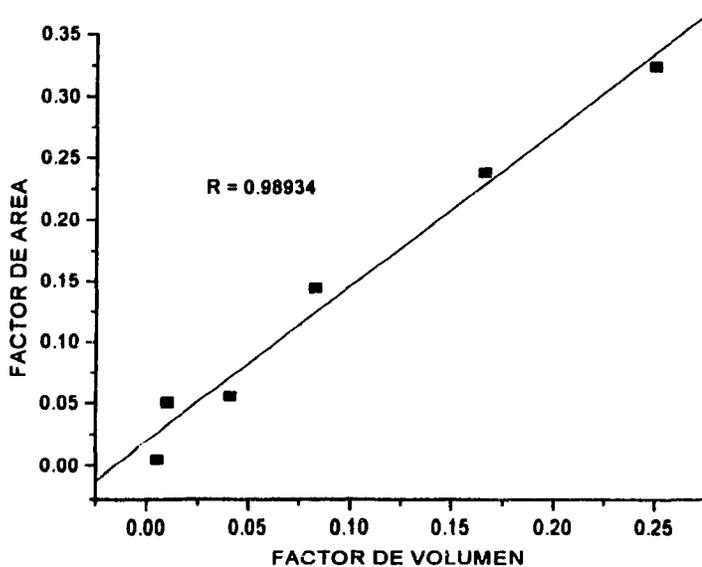


Figura 23. Respuesta del alcohol fenético en el rango de concentración de 0.006-0.2  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ALCOHOL ISOAMILICO

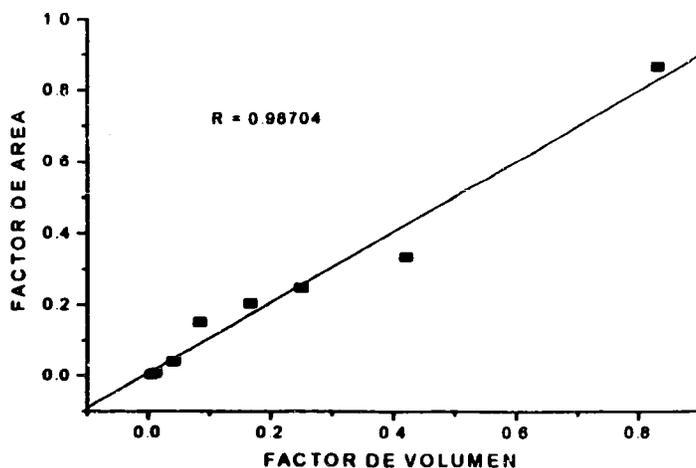


Figura 24. Respuesta del alcohol isoamilico en el rango de concentración de 0.006 -1.0  $\mu$ L en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE ALCOHOL ISOPROPILICO

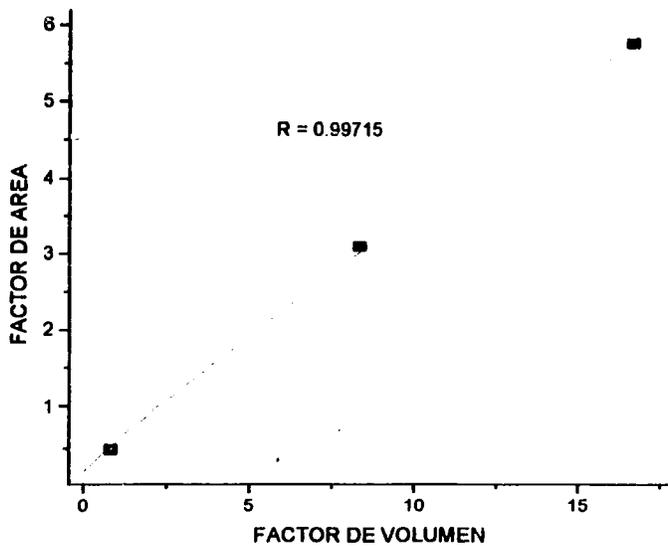


Figura 25. Respuesta del alcohol isopropilico en el rango de concentración de 0.004-0.5  $\mu$ L en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE 1-BUTANOL

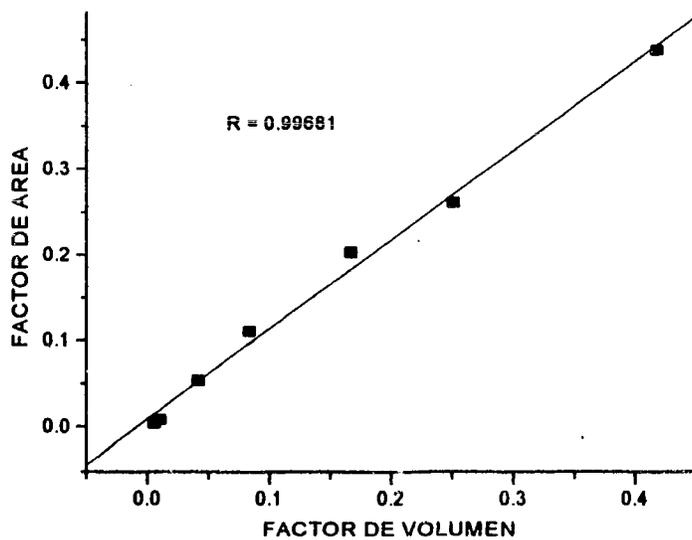


Figura 26. Respuesta del 1-butanol en el rango de concentración de 0.006-0.5  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE BUTILENGLICOL

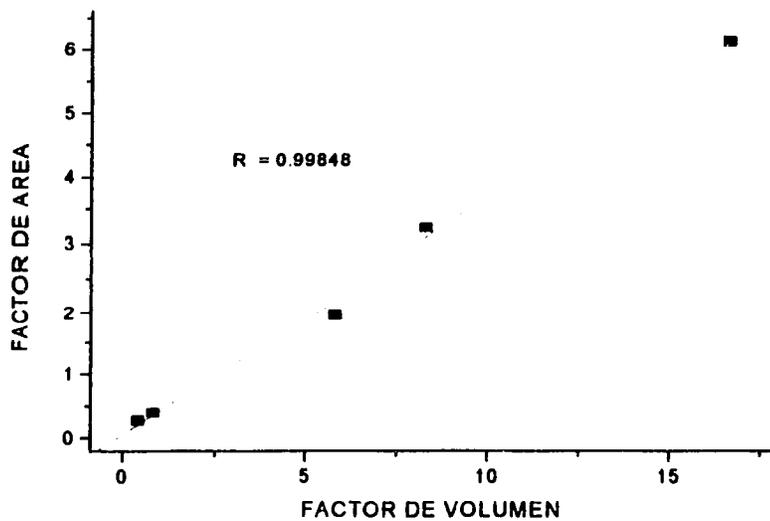


Figura 27. Respuesta del butilenglicol en el rango de concentración de 0.5-20  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE BUTIRATO DE ETILO

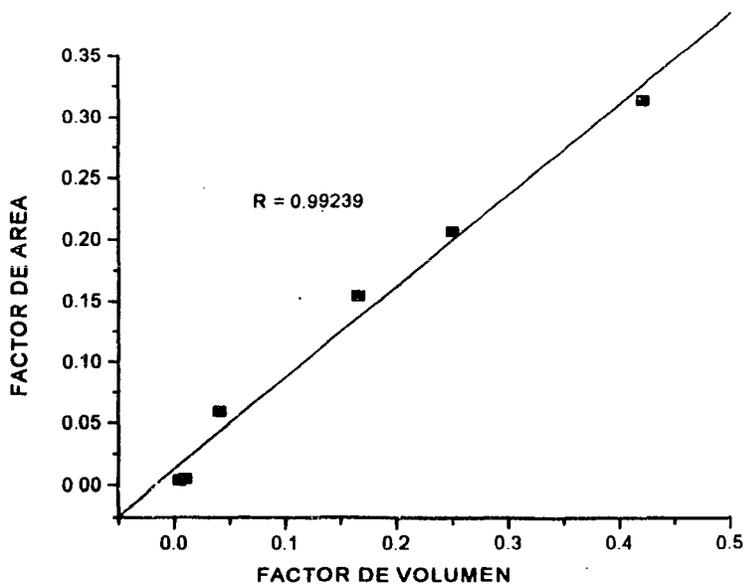


Figura 28. Respuesta del butirato de etilo en el rango de concentración de 0.006-0.5  $\mu$ L en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE BUTIRATO DE BUTILO

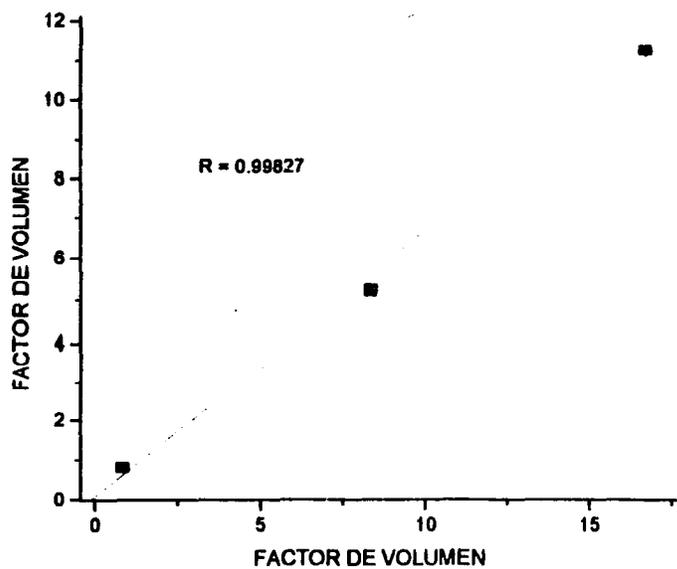


Figura 29. Respuesta del butil butirato en el rango de concentración de 0.1-20  $\mu$ L en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE HEXANOATO DE ETILO

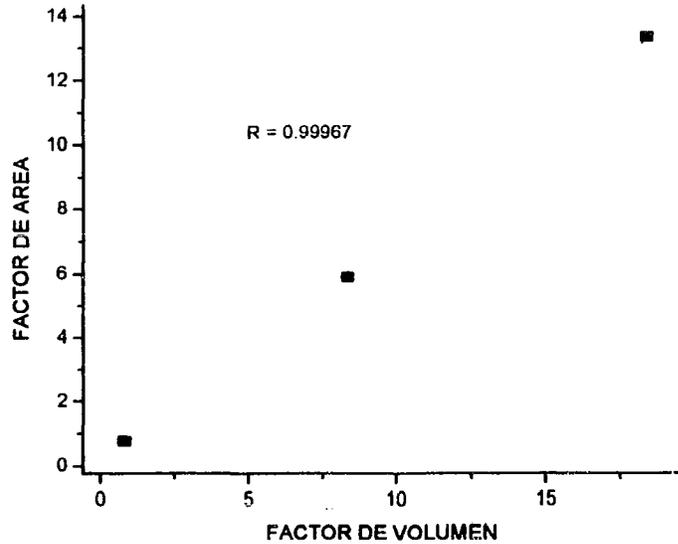


Figura 30. Respuesta del hexanoato de etilo en el rango de concentración de 1-22  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

### CURVA ESTANDAR DE PROPIONATO DE ETILO

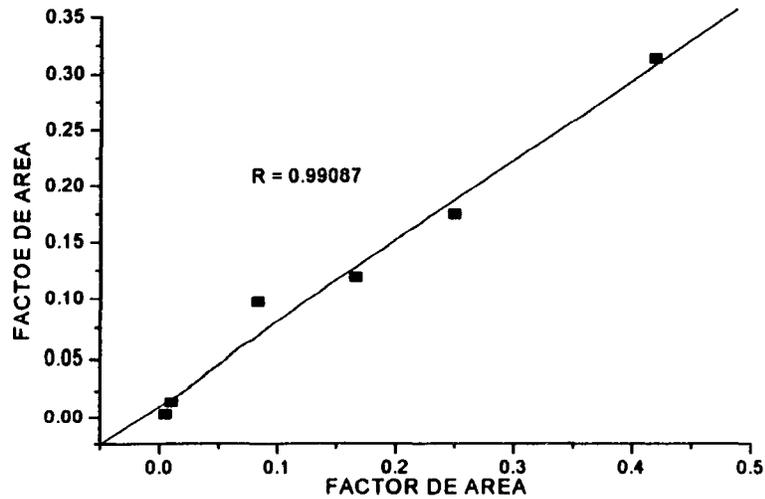


Figura 31. Respuesta del propionato de etilo en el rango de concentración de 0.006-0.05  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

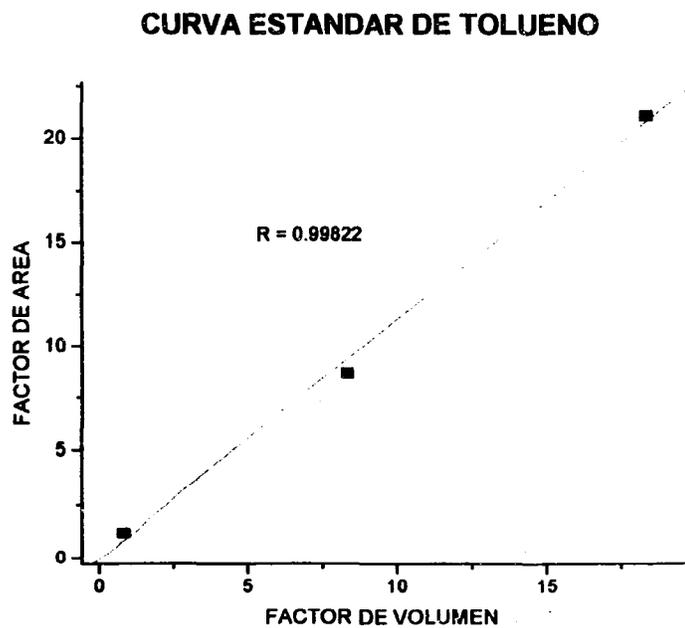


Figura 32. Respuesta del tolueno en el rango de concentración de 1-20  $\mu\text{L}$  en éter con respecto al 2-octanol.

## ANEXO II

**TABLA 9 Areas obtenidas de 2 Experimentos en el medio con urea como fuente de nitrógeno.**

<b>AREAS UREA</b>								
<b>TIEMPO HRS</b>	<b>ACETAL DEHIDO</b>	<b>ACETATO DE ETILO</b>	<b>ALCOHOL ISOPROPILICO</b>	<b>ALCOHOL ETILICO</b>	<b>PROPIONATO DE ETILO</b>	<b>ACETATO DE ISOBUTILO</b>	<b>BUTIRATO DE ETILO</b>	<b>ALCOHOL PROPILICO</b>
19	16754	737845	551	3774207	57467	35797	3985	250297
19	18892	832038	622	4256021	64803	40367	4494	282250
23	48229	2582133	5494	40568100	8374	10167	14200	1665654
23	119262	1765575	4765	37299200	132387	3657	6502	1477208
44	28780	2678564	684	24976903	204918	26189	11984	1090599
44	28566	2470675	631	23055603	189155	24174	11062	1006706
65	55300	890854	2200	20338923	79350	2728	7730	1295557
65	54205	873214	2156	19936172	77778	2674	7577	1269903
96	18457	1040332	2522	26097282	20491	867	2274	471316
96	18091	1019732	2472	25580504	20085	850	2229	461983
141	26427	228153	4139	27171000	15894	0	0	956032
141	23910	74938	2584	16188600	13760	0	0	365494

<b>TIEMPO HRS</b>	<b>ACETATO DE BUTILO</b>	<b>ALCOHOL ISOBUTILICO</b>	<b>1-BUTANOL</b>	<b>ALCOHOL ISOAMILICO</b>	<b>3-HIDROXI- 2-BUTANONA</b>	<b>ACETATO FENETILO</b>	<b>ALCOHOL FENETILICO</b>	<b>2- OCTANOL</b>	<b>TOTALES</b>
19	2325	72394	53891	97573	1162	149750	6427	158874	7993888
19	2621	81636	60771	110029	1310	168867	7247	179156	9014384
23	21279	74386	203112	61435	2202	8793	7131	220161	62767219
23	12012	65212	204746	61481	12807	15927	7453	185196	56789389
44	17304	68222	282390	125581	10249	193139	7225	204942	43655169
44	15973	62974	260668	115921	9460	178282	6669	189178	40297079
65	9899	28753	400737	27372	3376	481384	11007	560854	21879033
65	9703	28183	392802	26830	3310	471851	10789	528182	21445785
96	3657	60764	444184	124643	14171	489861	54847	178242	38267945
96	3585	59561	435389	122175	13890	480161	53761	167859	37510184
141	1536	53033	178679	89726	3221	12109	13136	189102	74888224
141	0	28695	22696	58245	2087	7767	15828	117214	67756012

**TABLA 10 Areas obtenidas de 2 Experimentos en el medio adicionado con leucina.**

<b>AREAS LEUCINA</b>								
TIEMPO HRS	ACETAL DEHIDO	ACETATO DE ETILO	ALCOHOL ISOPROPILICO	ALCOHOL ETILICO	PROPIONATO DE ETILO	ACETATO DE ISOBUTILO	BUTIRATO DE ETILO	ALCOHOL PROPILICO
19	16754	737845	551	3774207	57467	35797	3985	250297
19	18892	832038	622	4256021	64803	40367	4494	282250
23	48229	2582133	5494	40568100	8374	10167	14200	1665654
23	119262	1765575	4765	37299200	132387	3657	6502	1477208
44	28780	2876564	684	24976903	204918	26189	11984	1090599
44	26566	2470675	631	23055603	189155	24174	11062	1006706
65	76784	2882601	2763	52295000	173043	5252	9757	1627132
65	70691	802831	6417	44037500	77373	882	2520	1696096
96	25683	1716759	2685	38706799	7233	1644	4558	1255425
96	24187	1616754	2529	36452034	6811	1548	4292	1182293
141	19491	47910	1178	19146000	14200	0	0	1006245
141	15754	66268	847	7114376	10692	0	0	249239

TIEMPO HRS	ACETATO DE BUTILO	ALCOHOL ISOBUTILICO	1-BUTANOL	ALCOHOL ISOAMILICO	3-HIDROXI- 2-BUTANONA	ACETATO FENETILO	ALCOHOL FENETILICO	2- OCTANOL	TOTALES
19	2325	72394	53891	97573	1182	149750	6427	158874	7893888
19	2621	81636	60771	110029	1310	168867	7247	179156	9014384
23	21279	74386	203112	61435	2202	8793	7131	220161	62767219
23	12012	65212	204746	61481	12807	15927	7453	185196	56789389
44	17304	68222	282390	125581	10249	193139	7225	204942	43655169
44	15973	62974	260668	115921	9460	178282	6669	189178	40297079
65	20574	77619	320759	59724	20421	15067	10733	199204	80061723
65	4797	37000	148533	124552	5985	11133	30423	126516	70998131
96	3950	71131	169159	346338	2176	188096	11451	207482	64486538
96	3720	66987	159305	326163	2050	177138	10784	195396	60711205
141	0	34985	58419	237949	5283	9241	19543	158729	28509929
141	0	19510	12662	151933	1403	9169	12615	104239	24779658

**TABLA 11 Promedio de áreas obtenidas de 2 Experimentos en el medio con urea como fuente de nitrógeno.**

<b>PROMEDIO DE AREAS UREA</b>								
TIEMPO HRS	ACETAL DEHIDO	ACETATO DE ETILO	ALCOHOL ISOPROPILICO	ALCOHOL ETILICO	PROPIONATO DE ETILO	ACETATO DE ISOBUITO	BUTIRATO DE ETILO	ALCOHOL PROPILICO
0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	17823	784941	587	4015114	61135	38082	4240	268274
23	83746	2173854	5130	38933650	70381	6912	10351	1571431
44	27673	2573819	657	24016253	197037	25181	11523	1048652
65	54753	882034	2178	20137548	78564	2701	7653	1282730
96	18274	1030032	2497	25830893	20288	858	2251	466350
141	25168	151548	3362	21679800	14827	0	0	660763

TIEMPO HRS	ACETATO DE BUTILO	ALCOHOL ISOBUITILICO	1-BUTANOL	ALCOHOL ISOAMILICO	3-HIDROXI- 2-BUTANONA	ACETATO FENETILO	ALCOHOL FENETILICO	2- OCTANOL	TOTALES
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	2473	77015	57331	103801	1236	159308	6837	169015	8504136
23	16646	69799	203929	61458	7505	12360	7292	202679	59778304
44	16639	65598	271529	120751	9854	185711	6947	197060	41978124
65	9801	28468	396770	27101	3343	476617	10898	544518	21662409
96	3621	60163	439787	123409	14031	485011	54304	173050	37889054
141	788	40864	100688	73986	2654	9936	14482	153158	71322118

**TABLA 12 Promedio de áreas obtenidas de 2 Experimentos en el medio adicionado con leucina.**

<b>PROMEDIO DE AREAS LEUCINA</b>								
TIEMPO HRS	ACETAL DEHIDO	ACETATO DE ETILO	ALCOHOL ISOPROPILICO	ALCOHOL ETILICO	PROPIONATO DE ETILO	ACETATO DE ISOBUTILO	BUTIRATO DE ETILO	ALCOHOL PROPILICO
0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	17823	784941	587	4015114	61135	38082	4240	266274
23	83746	2173854	5130	38933650	70381	6912	10351	1571431
44	27673	2573819	657	24016253	197037	25181	11523	1048652
65	73738	1842716	4590	48166250	125208	3067	6139	1661614
96	24935	1666757	2607	37579416	7022	1596	4425	1218859
141	17623	57089	1013	13130188	12446	0	0	627742

TIEMPO HRS	ACETATO DE BUTILO	ALCOHOL ISOBUTILICO	1-BUTANOL	ALCOHOL ISOAMILICO	3-HIDROXI- 2-BUTANONA	ACETATO FENETILO	ALCOHOL FENETILICO	2- OCTANOL	TOTALES
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	2473	77015	57331	103801	1236	159306	6837	169015	8504136
23	16646	69799	203929	81458	7505	12360	7292	212979	59778304
44	16639	65598	271529	120751	9854	185711	6947	197060	41978124
65	12686	57310	234846	92138	13203	13100	20578	162860	75529927
96	3835	69059	164232	336250	2113	182617	11118	201439	62588872
141	0	27248	35841	194941	3343	9205	16079	131484	26644793

Las concentraciones de producción acumulada en medio estándar con urea como fuente de nitrógeno y en medio adicionado con leucina se encuentran en las tablas 13 y 14 respectivamente.

**TABLA 13 Producción acumulada en el medio estándar  
(urea como fuente de nitrógeno))**

<b>PRODUCCION ACUMULADA μL/L CALDO EN UREA</b>								
<b>TIEMPO HRS</b>	<b>ACETAL DEHIDO</b>	<b>ACETATO DE ETILO</b>	<b>ALCOHOL ISOPROPILICO</b>	<b>ALCOHOL ETILICO</b>	<b>PROPIONATO DE ETILO</b>	<b>ACETATO DE ISOBUTILO</b>	<b>BUTIRATO DE ETILO</b>	<b>ALCOHOL PROPILICO</b>
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	1.71	1078.79	0.00	6631.68	55.30	27.92	1.77	301.35
23	31.77	1817.07	0.38	14166.99	68.33	34.36	2.73	589.15
44	208.27	7841.28	2.40	75445.61	254.63	55.21	13.71	2946.89
65	229.42	11655.55	2.52	112393.66	457.50	73.12	21.77	4637.07
96	234.65	14622.39	5.73	174911.93	520.82	73.12	22.03	6253.56
141	306.40	18562.83	17.62	325857.46	596.17	73.12	22.03	8409.75

<b>TIEMPO HRS</b>	<b>ACETATO DE BUTILO</b>	<b>ALCOHOL ISOBUTILICO</b>	<b>1-BUTANOL</b>	<b>ALCOHOL ISOAMILICO</b>	<b>3-HIDROXI- 2-BUTANONA</b>	<b>ACETATO DE FENETILO</b>	<b>ALCOHOL FENILICO</b>	<b>TOTALES</b>
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.79	76.54	35.31	68.20	91.57	66.12	1.79	8123.70
23	2.92	103.64	79.74	91.44	130.34	92.90	2.43	18538.00
44	22.25	225.89	442.62	216.33	353.41	239.56	5.41	98273.78
65	32.59	301.39	698.17	299.81	574.89	383.86	7.03	140821.19
96	34.50	349.77	938.94	348.37	885.25	579.97	18.85	198966.61
141	34.50	504.20	1442.52	537.61	1346.55	878.04	53.63	330835.37

**TABLA 14 Producción acumulada en el caldo de fermentación adicionado con leucina,**

<b>PRODUCCION ACUMULADA EN LEUCINA <math>\mu</math>L/L CALDO</b>								
<b>TIEMPO HRS</b>	<b>ACETAL DEHIDO</b>	<b>ACETATO DE ETILO</b>	<b>ALCOHOL ISOPROPILICO</b>	<b>ALCOHOL ETILICO</b>	<b>PROPIONATO DE ETILO</b>	<b>ACETATO DE ISOBUTILO</b>	<b>BUTIRATO DE ETILO</b>	<b>ALCOHOL PROPILICO</b>
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	1.71	1078.79	0.00	6631.68	55.30	27.92	1.77	301.35
23	31.77	1817.07	0.38	14166.99	68.33	34.36	2.73	589.15
44	208.27	7841.28	2.40	75445.61	254.63	55.21	13.71	2946.89
65	403.81	13810.84	4.37	168731.88	563.20	74.80	25.06	6477.29
96	679.08	20799.95	9.90	326245.46	760.99	77.90	32.41	11890.98
141	741.59	25722.02	15.35	476733.72	803.23	78.80	35.66	16746.05

<b>TIEMPO HRS</b>	<b>ACETATO DE BUTILO</b>	<b>ALCOHOL ISOBUTILICO</b>	<b>1-BUTANOL</b>	<b>ALCOHOL ISOAMILICO</b>	<b>3-HIDROXI- 2-BUTANONA</b>	<b>ACETATO DE FENETILO</b>	<b>ALCOHOL FENETILICO</b>	<b>TOTALES</b>
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
19	0.79	76.54	35.31	68.20	91.57	66.12	1.79	8123.70
23	2.92	103.64	79.74	91.44	130.34	92.90	2.43	18536.00
44	22.25	225.89	442.62	216.33	353.41	239.56	5.41	98273.78
65	38.58	355.34	881.19	375.11	605.54	392.59	19.75	203240.17
96	51.41	547.44	1423.50	805.55	951.09	605.45	43.77	376839.19
141	54.44	777.98	1822.85	1870.61	1412.95	906.86	84.11	545222.33

### ANEXO III

La tabla 15 contiene los resultados del rendimiento de la extracción para siete compuestos de los encontrados en el extracto. El porcentaje de recuperación reportado no es el mismo para todos los compuestos debido a que la volatilidad para cada uno es diferente, sin embargo el rendimiento es bueno si se considera que se trabajó con compuestos demasiado volátiles, por lo cual su manipulación fue complicada y se debieron tomar algunas medidas de seguridad como tener los estándares y las pipetas en refrigeración para evitar la volatilidad al tomar la alicuota, usar un refrigerante extra en el extremo del equipo de arrastre y poner teflón en todas las uniones para evitar fugas, cuidar que el recirculador de agua estuviera siempre a 5°C y dejar enfriar el equipo de arrastre antes de desmontar.

**TABLA 15 % de recuperación en la destilación - extracción simultaneas para algunos de los estandares de los compuestos encontrados en los caldos de fermentación**

ALCOHOL ETILICO			ACETATO METILICO			PROPIONATO DE ETILO		
Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento	Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento	Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento
34.86 µL	70 µL	49.81 %	0.86µL	1µL	86.48 %	1.57 µL	2µL	78.62 %
49.36 µL	70 µL	70.52 %	0.87µL	1µL	87.25 %	1.55 µL	2µL	77.61 %
48.93 µL	70 µL	69.89 %	0.94 µL	1µL	93.86 %	1.45 µL	2µL	72.74 %

ALCOHOL METILICO			ALCOHOL ISOPENTILICO			ALCOHOL ISOAMILICO		
Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento	Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento	Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento
15.22 µL	17µL	89.51 %	0.87 µL	1µL	87.42 %	2.56 µL	3µL	85.33 %
13.78 µL	17µL	81.06 %	0.88 µL	1µL	87.81 %	2.68 µL	3µL	89.27 %
12.72 µL	17µL	74.81 %	1.30 µL	1µL	130.18 %	2.69 µL	3µL	89.71 %

ALCOHOL FENILICO		
Cantidad Real (a)	100% (b)	Rendimiento
0.72µL	1.00	72.35 %
0.69 µL	1.00	68.72 %
0.75 µL	1.00	74.66 %

**ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA**

a: Cantidad real, es la cantidad recuperada detectada por cromatografía de gases.

b: 100% es la cantidad inicial del estandar a extraer.