



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE
LOS FRUTOS Y LAS SEMILLAS DE *Prunus serotina*
(CAPULÍN) MEDIANTE LA TÉCNICA DE HS-SPME-GC-
MSTOF.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

PRESENTA

AHIRA MAHALAT TORRES GONZÁLEZ



México D. F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:	Dr. Francisco Rojo Callejas
Vocal:	Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci
Secretario:	Dr. José Fausto Rivero Cruz
1er. suplente:	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
2do. suplente:	M. en C. Abraham Madariaga Mazón

Sitio donde se desarrolló el proyecto:

Laboratorio 111, Edificio E
Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema Dr. José Fausto Rivero Cruz

Supervisor técnico Q. Georgina Artemisa Duarte
Lisci

Sustentante Ahira Mahalat Torres González

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de ser parte de ella y en especial, a la Facultad de Química por ayudarme en mi formación como profesionista y sobre todo, por enseñarme a ser una mejor persona día a día a través de las lecciones brindadas a lo largo de mi carrera.

A mi asesor, el Dr. José Fausto Rivero Cruz, por su dirección durante el proyecto realizado, por su gran apoyo y su constante asesoramiento desde las clases de Licenciatura hasta la presente tesis.

A la Q. Georgina Artemisa Duarte Lisci, por su asesoría técnica durante el desarrollo del trabajo experimental para la microextracción en fase sólida, por permitirme trabajar en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) y por guiarme en la realización de esta tesis. Asimismo, por su gran apoyo a lo largo de mi carrera y por ser como una amiga para mi.

Al Dr. Francisco Rojo Callejas, por la revisión de la presente tesis de licenciatura.

El trabajo experimental de la presente tesis se realizó mediante al apoyo económico otorgado a través de los siguientes proyectos: PAPIIT IN205709-3.



Dedico este presente trabajo a mi familia y amigos, quienes me apoyaron incondicionalmente para poder llegar a mi meta. Especialmente a mis padres que siempre han estado conmigo y me han apoyado en todas las decisiones que he tomado para poder lograr lo que siempre me he planteado, porque son ellos las figuras de perseverancia y fortaleza; y sé que siempre estarán conmigo en mis próximos objetivos a cumplir.

A mis tíos Adolfo y María Luisa, quienes estuvieron conmigo los últimos 2 años y medio de la carrera y que sin ellos no hubiera podido seguir estudiando esta carrera por el tiempo que se necesita para su dedicación.

Gracias a toda mi familia y en especial a mis hermanas por estar siempre brindándome su apoyo incondicional y por alentarme a seguir dando lo mejor de mí.

A mis mejores amigas: Cesia, Ana y Anahí por estar conmigo desde hace más de 10 años. A Mabelle y Valentina, por brindarme todo su apoyo desde la preparatoria hasta este momento. Gracias por estar y soportar conmigo cada momento vivido, las amo y son lo más en mi vida,

A todos mis amigos de la Facultad: Bere, Andrea, Erich, Paty, Grecia, Vinissa, Cruz, Víctor, Erik, Carlos y los que me faltaron nombrar pero que no por ello tienen menor importancia en mi vida. Saben que los quiero mucho y que estoy muy agradecida por estar conmigo en todo momento y por sufrir conmigo durante la carrera y hacérmela más divertida.

Por hacer la estancia en el laboratorio más placentera, gracias a Monse, Fabiola, Carina, Parizad, Jazz, Nizagie, René, Gloria, Ale, Gaby, Víctor y demás.





Lista de Abreviaturas.....	iii
Lista de Tablas.....	iv
Lista de Figuras.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Microextracción en fase sólida.	4
2.1.1 Procedimiento de la microextracción en fase sólida.....	8
a) Etapa de extracción.....	8
b) Etapa de desorción	12
2.1.2 Variables que afectan el proceso de SPME.	14
2.1.2 ^a Etapa de extracción.	15
2.1.2.1 Tipos de fibras utilizadas en la SPME.	19
2.1.2 ^b Etapa de desorción.....	26
2.1.3 Cromatografía de gases	27
2.1.4 Espectrometría de Masas.....	28
2.1.5 Índice de retención de Kovats	29
2.2 Aspectos generales sobre el género <i>Prunus</i>	30
2.2.1 <i>Prunus serotina</i>	33
2.2.1.1 Antecedentes Históricos.....	33
2.2.1.2 Distribución, taxonomía y características morfológicas	34
2.2.1.3 Etnobotánica y Antropología.	46
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	47
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	49





4.1 Procedimientos generales	49
4.1.1 Material vegetal y procedimiento de extracción.....	49
4.1.2 Microextracción en fase sólida	49
4.1.3 Cromatografía de gases - Espectrometría de masas.....	50
4.1.4 Obtención del índice de concentración (F_{ij}).....	51
4.1.6 Identificación de los compuestos volátiles.....	54
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	55
6. RESUMEN Y CONCLUSIONES	78
7. PERSPECTIVAS.....	79
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80



Lista de Abreviaturas

Abreviaturas	Significado
μL	Microlitro
CAR	Carboxen
CW	Carbowax
DB-5	5%-fenil-polimetilsiloxano
DVB	Divinilbenceno
g	Gramo
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HS	Head Space
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Espectrometría de Masas
Na_2SO_4	Sulfato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PFTBA	Perfluoroterbutilamina
PTFE	Politetrafluoroetileno
SFC	Cromatografía de Fluidos Supercríticos
SPE	Extracción en Fase Sólida
SPME	Micro Extracción en Fase Sólida
TLC	Cromatografía de Capa Fina
TOF	Tiempo de Vuelo

Lista de Tablas

Tabla 1. Compatibilidad del dispositivo SPME con los inyectores.	14
Tabla 2. Tipos de fibra comercializados para su uso en SPME.	21
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Prunus serotina</i>	35
Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en <i>P. serotina</i> por otros grupos de trabajo	37
Tabla 5. Condiciones de análisis optimizadas.	52
Tabla 6. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.	53
Tabla 7. Áreas de los compuestos obtenidos de los frutos del capulín para las diferentes fibras.....	55
Tabla 8. Valores del índice de capacidad de concentración F_{ij} de los frutos de <i>Prunus serotina</i> para las fibras empleadas.	59
Tabla 9. Compuestos volátiles detectados en las semillas de <i>Prunus serotina</i>	60
Tabla 10. Compuestos volátiles detectados en los frutos de <i>Prunus serotina</i>	66
Tabla 11. Componentes volátiles de las flores de <i>Prunus serotina</i> (capulín) encontrados por la técnica de microextracción en fase sólida.	71

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema del dispositivo comercial de SPME (Martíet <i>al.</i> , 2003).	4
Figura 2. Vial que se emplea para la técnica de microextracción en headspace ...	5
Figura 3. Etapa de absorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.	11
Figura 4. Etapa de desorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.	12
Figura 5. Efecto del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída.	15
Figura 6. Estructura química de algunos de los recubrimientos comerciales para las fibras de SPME.....	24
Figura 7. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción.	24
Figura 8. Guía de selección de las fibras de SPME en función de las propiedades del analito.....	25
Figura 9. Efecto del volumen del <i>liner</i> en la desorción térmica.....	27
Figura 10. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.....	31
Figura 11. Estructura básica de las antocianidinas.	32
Figura 12. Ácido ursólico.	32
Figura 13. Distribución geográfica de <i>Prunus serotina</i> en la República Mexicana.	35
Figura 14. Izquierda: Árbol, centro arriba: Hojas, centro abajo: frutos, derecha: flores de <i>Prunus serotina</i> Ehrh.....	36
Figura 15. Microextracción en fase sólida por el método de <i>headspace</i>	50
Figura 16. Equipo acoplado CG-EM-TOF utilizado	52
Figura 17. Cromatograma de los frutos de <i>P. serotina</i> con la fibra DVB/CAR/PDMS.....	61
Figura 18. Cromatograma de los frutos de <i>P. serotina</i> con la fibra CAR/PDMS...	62
Figura 19. Cromatograma de los frutos de <i>P. serotina</i> con la fibra PDMS.	63
Figura 20. Cromatograma de las semillas de <i>P. serotina</i>	65

Figura 21. Cromatograma de los frutos de <i>P. serotina</i>	70
Figura 22. Cromatograma de las flores de <i>P. serotina</i>	72
Figura 23. Espectros de masas del benzaldehído	74
Figura 24. Comparación del cromatograma de los estándares empleados	75
Figura 25. Metabolismo de la amigdalina en <i>Prunus serotina</i> durante su crecimiento y la liberación de benzaldehído.	77



1. INTRODUCCIÓN

El consumo de plantas a nivel mundial en las prácticas médicas populares para el tratamiento de desórdenes de diversa etiología, así como en la industria alimenticia como condimentos y/o agentes de sabor además de su uso como ornamentos es un hecho bien documentado.

Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su resolución WHA 42.43 de 1989 recomendó a sus países miembros que realizaran una evaluación detallada de sus recursos terapéuticos de origen vegetal, fundamentalmente aquellos utilizados en las prácticas médicas alternativas y complementarias.

Particularmente en México, el empleo de plantas medicinales tiene sus orígenes desde la época prehispánica. Desafortunadamente, las investigaciones conducentes a validar científicamente el uso de dichas plantas han sido insuficientes.

Capulín (*Prunus serotina* Ehrh.) es el nombre común con el que se conoce al árbol y al fruto que crece en las serranías mexicanas y en otras regiones del continente americano. El capulín corresponde a una especie polimórfica compuesta por un gran número de variedades y subespecies (Ordaz-Galindo, 1999). De manera particular, el fruto tiene un sabor agradable y es consumido fresco o preparado en forma de ponches o mermeladas. Además se emplea, preparado en infusiones, jarabes o licores para tratar la diarrea y la tos. En tanto que la semilla, además de ser empleada en forma de decocción para el tratamiento de la tos, es consumida tostada como botana.

La determinación de los compuestos volátiles es uno de los retos de mayor dificultad en el análisis de plantas. Por su condición volátil, la técnica ideal para la separación e identificación de éstos es la cromatografía de gases. Sin embargo, las distintas técnicas propuestas se distinguen por la preparación de la muestra, la extracción, el aislamiento y la concentración de los analitos, etapas previas a la separación cromatográfica, y que repercuten en la reproducibilidad y precisión.

2. ANTECEDENTES

El principio en el que se basa la extracción en fase sólida (SPE), es similar al de la cromatografía de líquidos, que es la diferente afinidad de los analitos entre una fase sólida, que es el adsorbente, y una líquida, que es la muestra. Existen diferentes tipos de adsorbentes que se comercializan en forma de cartuchos o discos y que se seleccionan en función de los analitos que se quieren determinar.

Se pueden diferenciar básicamente tres tipos, los adsorbentes de sílices enlazadas, los de carbón y los poliméricos. Otros tipos de adsorbentes para SPE y que se han desarrollado más recientemente son los inmunoadsorbentes y los polímeros de huella molecular.

La elución de los analitos retenidos se realiza mediante unos pocos mililitros de un solvente orgánico como por ejemplo metanol, diclorometano, o acetato de etilo cuando la SPE se acopla con la GC o fuera de línea con la HPLC, y con la fase móvil cromatográfica cuando la SPE se acopla en línea con la HPLC (Sánchez, *et al.*, 2005).

Una de las técnicas que apareció a raíz de la investigación en esta línea es la microextracción en fase sólida (SPME) que fue desarrollada a principios de los años 90 por el grupo de investigación de J. Pawliszyn. La SPME es una técnica que ha sido utilizada en combinación con GC y con GC-MS y exitosamente ha sido utilizada para la extracción de una amplia variedad de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de diferentes muestras como en contaminantes medioambientales, muestras de alimentos, entre otras (Rogalewicz *et al.*, 2006).

2.1 Microextracción en fase sólida.

Inicialmente usada para la determinación de compuestos clorados en aguas contaminadas (Arthur y Pawliszyn, 1990), la microextracción en fase sólida (SPME) se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un adsorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico (Werjnerowska y Gaca, 2008). El pequeño tamaño de la fibra y su geometría cilíndrica permiten incorporarla en una jeringa. De esta forma, se facilita su manipulación y al mismo tiempo se protege la fibra cuando no se utiliza, ya que ésta permanece dentro de la aguja de la jeringa como se muestra en la Figura 1.

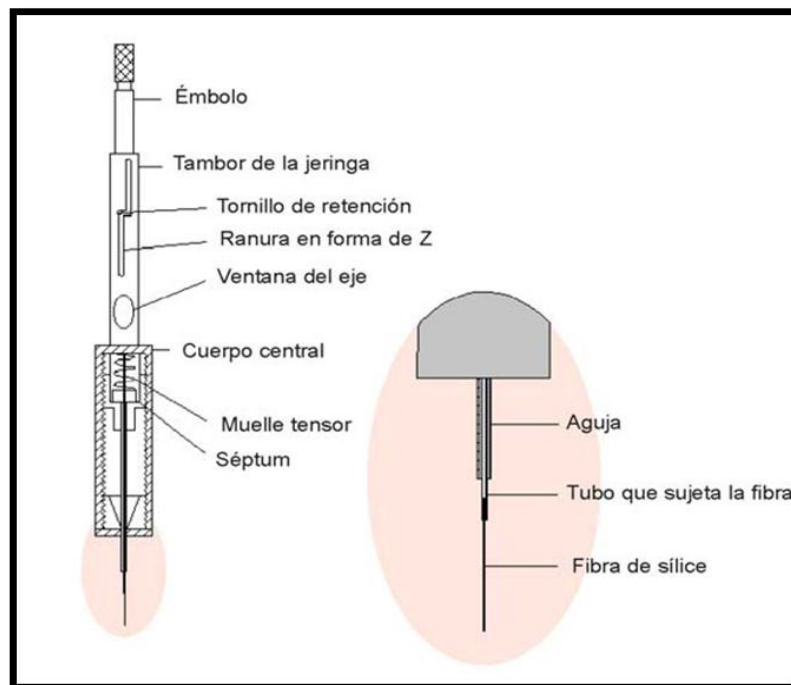


Figura 1. Esquema del dispositivo comercial de SPME (Martíet *al.*, 2003).

Esta técnica presenta una serie de ventajas frente a las técnicas de preconcentración mencionadas anteriormente ya que es muy simple, presenta un bajo coste, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración, a diferencia de la LLE y la SPE. Además, debido a su diseño, es fácilmente transportable por lo que la hace una técnica muy adecuada para realizar análisis de campo (Figura 2). Otra ventaja que presenta es la posibilidad de utilizarse con todos los tipos de muestras, ya sean gaseosas como por ejemplo aire o aliento, líquidas como aguas o bebidas, o sólidas como sedimentos, alimentos, etc.

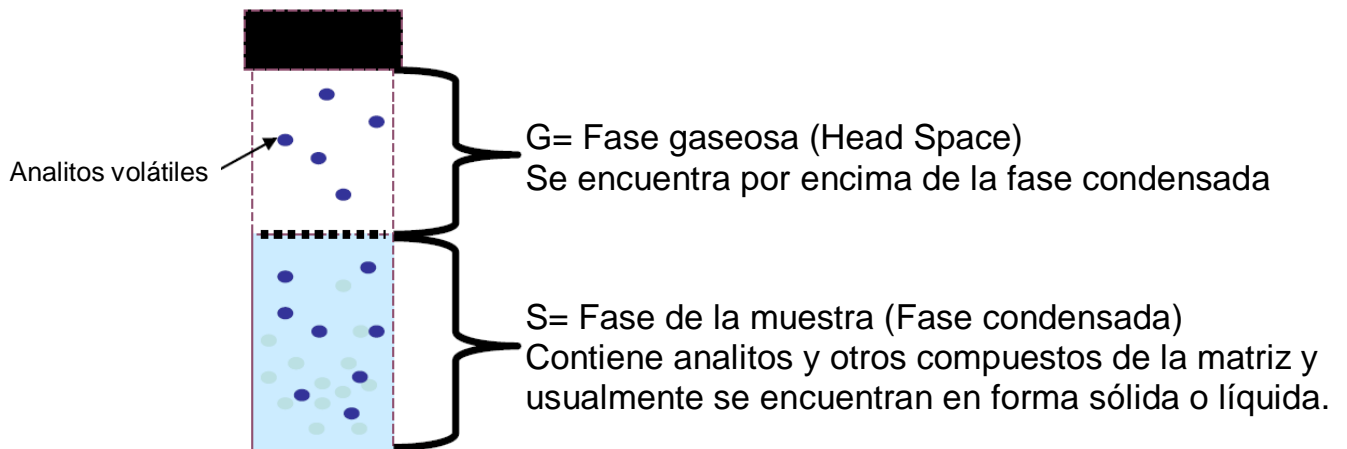


Figura 2. Vial que se emplea para la técnica de microextracción en headspace.

Como inconveniente se puede mencionar que debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen límites de detección bajos, sobre todo si la SPME se utiliza combinada con la cromatografía de líquidos (Fries y Püttmann, 2006). La presencia de materia suspendida en la muestra puede estropear el recubrimiento de la fibra durante la agitación.

Los compuestos de elevado peso molecular pueden adsorberse irreversiblemente en la fibra cambiando sus propiedades (Alpendurada, 2000). La sensibilidad de la técnica de SPME depende de la cantidad de analitos extraídos de la muestra; si el volumen de la muestra es muy elevado, será demasiado superior al producto entre la constante de distribución y el volumen de recubrimiento de la fibra y por tanto, aunque se aumente el volumen de muestra no se consigue aumentar la sensibilidad del procedimiento.

El principio en el que se basa la SPME generalmente es en la separación de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. Así, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra comienza cuando la fibra entra en contacto con la muestra y la extracción se considera completa cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución de la muestra y la fibra.

Existen básicamente dos modos de extracción posibles en SPME, introduciendo la fibra directamente en la muestra o bien, en el espacio de cabeza o *headspace*. El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de adsorción cuando la fibra se introduce directamente en la muestra fue desarrollado por Louch *et al.* y en él se confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito adsorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración de éste en la muestra. A continuación se muestra la ecuación:

(1)

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot C_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + V_s}$$

Donde n son los moles de analito absorbidos por la fibra, V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra respectivamente, K_{fs} es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra, y C_0 es la concentración inicial del analito en la muestra.

En la ecuación señalada con anterioridad se asume que la matriz de la muestra es una única fase homogénea y no se considera el efecto del espacio de cabeza. El modelo matemático del proceso de SPME cuando los analitos se extraen del espacio de cabeza fue desarrollado posteriormente y las ecuaciones y conclusiones a las que se llega son similares a las de la extracción por inmersión pero teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa.

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

(2)

$$n = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_o$$

En esta ecuación se puede observar que la cantidad de analito extraído (n) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independientemente del volumen de muestra. Esta aproximación no es válida en el caso en que los analitos a determinar tengan valores de K_{fs} muy elevados (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños. Así, existen fibras, que se mencionarán posteriormente, en las que la extracción de los analitos se produce mediante un proceso de adsorción por lo que en estos casos el modelo matemático que explica el proceso de extracción es ligeramente diferente (Pawliszyn, 1997). La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

(3)

$$n = \frac{K_{fs}^D V_f C_o V_s (C_{f \max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f \max} - C_f)}$$

Donde K_{fs}^D es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_{f\text{ máx.}}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que los que aparecen en la ecuación (1).

En SPME también se debe tener en cuenta la cinética del proceso ya que los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y de allí hacia la fibra, en el caso de que la extracción se realice mediante extracción del espacio de cabeza de la muestra (HS-SPME). Para aumentar la velocidad de la extracción es necesario utilizar un sistema de agitación de manera que se facilite la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra.

2.1.1 Procedimiento de la microextracción en fase sólida.

En el proceso de SPME se pueden diferenciar principalmente dos etapas. Una primera etapa de extracción en la que la fibra recubierta del adsorbente se pone en contacto con la muestra durante un tiempo y temperatura determinadas, de manera que se produce una migración de los analitos desde la solución a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Después de esta primera etapa, se realiza la desorción de los analitos retenidos por la fibra.

a) Etapa de extracción.

En esta etapa se produce la migración de los analitos desde la muestra a la fibra hasta que se alcanza la situación de equilibrio. Este proceso de extracción se puede producir por adsorción o absorción en función del tipo de fibra utilizado. Para el proceso de extracción con SPME, se coloca un volumen de muestra en un vial herméticamente cerrado con un septum de silicona-teflón. Seguidamente se

perfora el septum y se introduce la jeringa en el vial. Empujando el émbolo se expone la fibra a la muestra el tiempo previamente establecido (b). Una vez finalizado el tiempo de extracción, se devuelve la fibra al interior de la jeringa (c). Hay tres formas de realizar la extracción de SPME (Lord y Pawliszyn, 2000):

- I- Extracción por **inmersión directa** de la fibra dentro de la muestra (DISPME). Presenta la desventaja que disminuye mucho la vida media de la fibra y dificulta la reproducibilidad de la extracción. Es útil en el caso de querer determinar analitos semivolátiles o poco volátiles. Se puede aplicar agitación para incrementar la rapidez de la extracción. En el caso de muestras acuosas, para facilitar la agitación se requiere un flujo rápido de muestra, movimientos rápidos de la fibra o del vial, agitación o ultrasonidos. Todo esto conduce a reducir los efectos de la zona estática que se forma alrededor de la fibra y que disminuye la velocidad de extracción y contrarresta los pequeños coeficientes de difusión de los analitos de las matrices líquidas (*Alpendurada, 2000; Pillonel et al., 2002*). En muestras gaseosas, la natural convección del aire es suficiente para facilitar un rápido equilibrio.

- II- Extracción de **espacio de cabeza** o *headspace* (HS/SPME). En este caso (Figura 3), la fibra se expone a la fase gaseosa que queda por encima de la muestra y los analitos pasarán a la fase gaseosa en función de su presión de vapor. Las principales ventajas de este modo de extracción son que se alarga la vida útil de la fibra, ya que se evitan interferencias con otros componentes de la muestra, sobre todo aquellos de elevado peso molecular. Por ello, es el tipo de extracción más utilizado para los analitos volátiles y semivolátiles. Además, permite modificar la matriz de la muestra sin dañar la fibra, por ejemplo variar el

pH o añadir alguna sal para aumentar el rendimiento de la extracción. El HS/SPME se utiliza tanto en muestras gaseosas, como líquidas y sólidas, siendo útil en estas últimas en el caso de sedimentos, alimentos (Pawliszyn, 1997; Liu, *et al.*, 2001) y muestras biológicas (Ulrich, 2000), dónde la interferencia de la matriz es importante. En términos generales, se puede decir que el volumen del espacio de cabeza tiene que ser lo más pequeño posible, ya que el rendimiento de la extracción disminuye cuando aumenta el volumen del espacio de cabeza por efecto de la dilución (Yang y Peppard, 1994; Pillonel *et al.*, 2002).

Para el análisis simultáneo de gases y analitos poco volátiles, se puede combinar la técnica SPME con el espacio de cabeza dinámico. La fase se encuentra en la pared interior de la aguja con la ventaja que se eliminan los posibles daños en el recubrimiento. A la vez se introduce un volumen de gas en la jeringa. Este sistema se llama SPDE (Solid Phase Dynamic Extraction) y es comercializado por Chromtech (Idstein, Alemania) (Pillonel *et al.*, 2002).

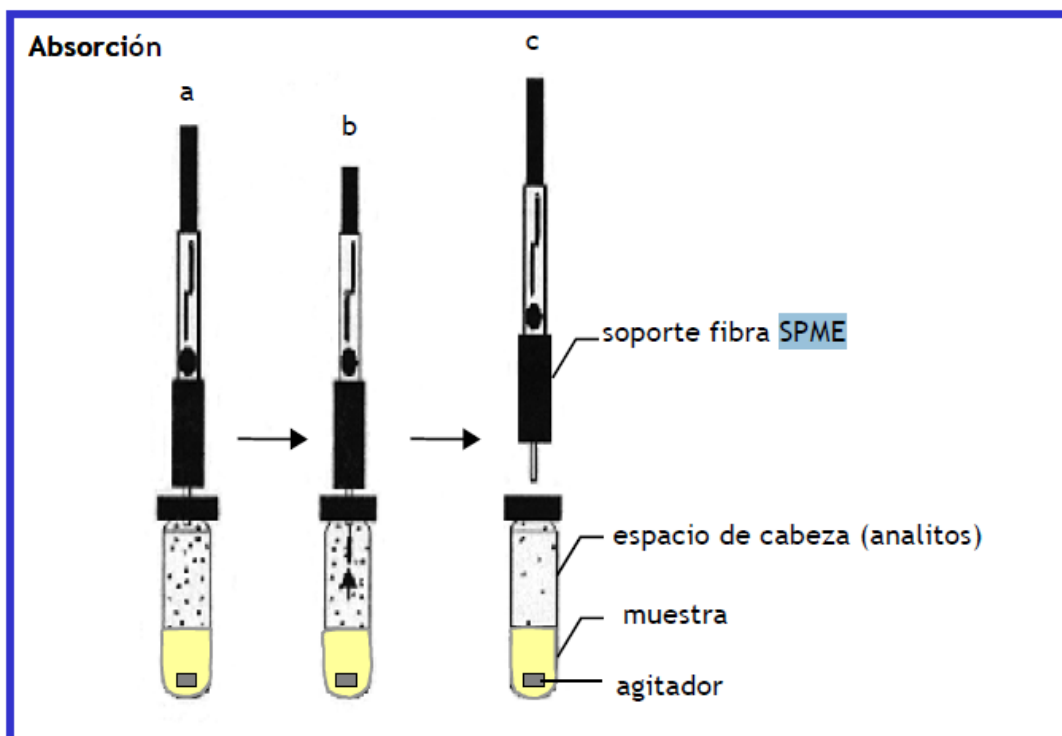


Figura 3. Etapa de absorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.

- III- Extracción con **protección de membrana** (Pawliszyn, 1997; Lord y Pawliszyn, 2000). Se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra protegiéndola de los compuestos de elevado peso molecular. Este método será útil cuando se emplea el espacio de cabeza para extraer compuestos con baja volatilidad. Si la membrana es de un material apropiado puede facilitar la selectividad del proceso de extracción. La cinética es más lenta que en la inmersión directa, ya que los analitos deben difundir a través de la membrana antes de llegar a la fibra. Para disminuir el tiempo de extracción se pueden usar membranas delgadas e incrementar la temperatura del proceso extractivo.

b) Etapa de desorción.

En esta etapa se liberan los analitos retenidos por la fibra. La desorción se puede realizar de dos formas:

I- Por **desorción térmica**. Se lleva a cabo cuando el SPME se acopla a un cromatógrafo de gases (Figura 4). La fibra se inserta en el inyector del cromatógrafo de gases (d) que se encuentra a temperatura suficientemente elevada para que, al bajar de nuevo el émbolo de la jeringa (e), de forma instantánea se desorban los analitos entrando en la columna cromatográfica. Es la forma de desorción más ampliamente utilizada (Constant., 1997; Song *et al.*, 1998; Simplicio *et al.*, 1999; Gorecki, *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 2001).

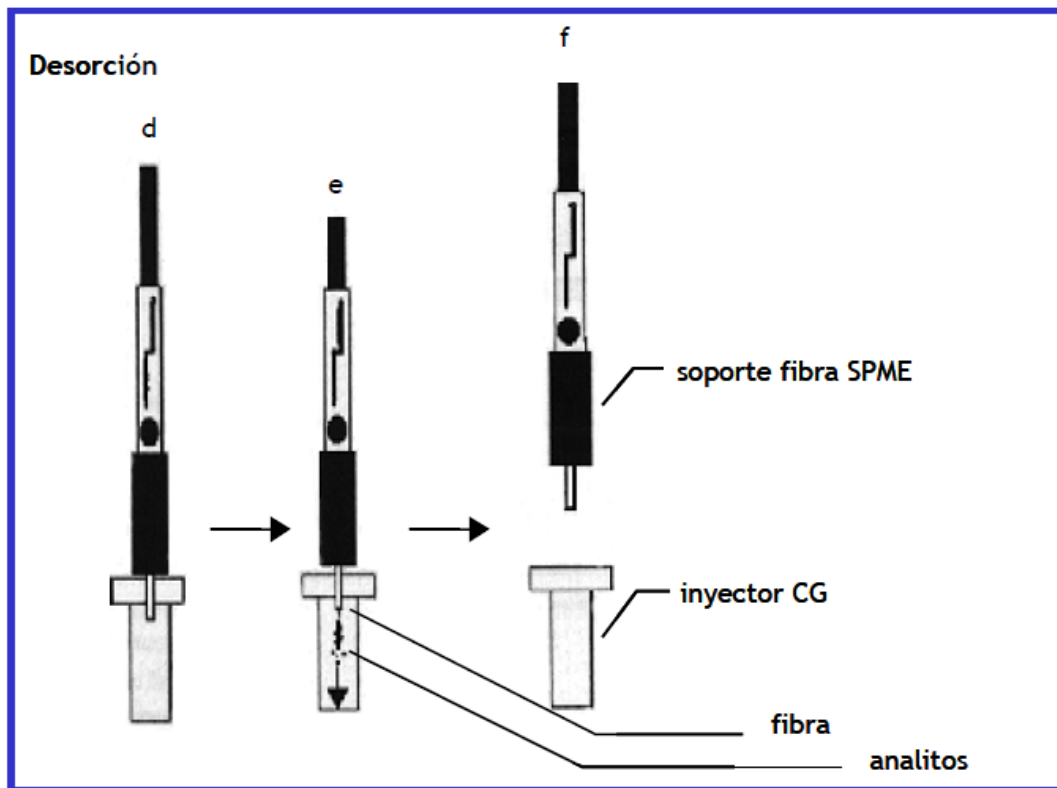


Figura 4. Etapa de desorción de los analitos en la fibra de HS/SPME.

II- Por **adición de un solvente orgánico**. Es un sistema útil para aquellos compuestos que son térmicamente inestables o poco volátiles y, por tanto, no se pueden desorber directamente a las altas temperaturas del inyector del cromatógrafo. En los casos en que se combine la técnica SPME con HPLC, es necesario este tipo de desorción. Habitualmente, se usa una interfase que permite realizar la desorción con la propia fase móvil o bien introduciendo un solvente orgánico adecuado en la cámara de la interfase (Aranda *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; González-Toledo *et al.*, 2002). A la vez, se puede realizar en línea (*on line*) o fuera de línea (*off line*) con el sistema cromatográfico (Negrao, *et al.*, 1998; Pawliszyn, 1999). La desorción de los analitos con disolvente orgánico se ha utilizado para determinar tensioactivos alquilfenoletoxilados (Chen y Pawliszyn, 1995), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Negrao y Alpendurada, 1998), fenoles (Carrión, *et al.*, 2002; Peñalver *et al.*, 2002) y ftalatos como el dietilhexilftalato (Nelly, *et al.*, 1999).

En referencia a los tipos de inyección más utilizados en SPME-GC, en la siguiente tabla se expone la compatibilidad del dispositivo de SPME con los diferentes modelos de inyectores (Peñalver, 2002) (Tabla 1).

Los puertos de inyección *Split* o *Splitless* de los cromatógrafos de gases son muy adecuados para realizar la desorción de los analitos de la fibra (Pawliszyn, 1997). La válvula de división (*Split valve*) debe permanecer cerrada durante la desorción, para que la totalidad de los analitos sean introducidos en la columna cromatográfica. El diámetro de la inserción (*liner*) de los inyectores debe ser lo más similar posible al diámetro de la fibra, para asegurar una transferencia rápida de los analitos desde el inyector a la columna.

Tabla 1. Compatibilidad del dispositivo SPME con los inyectores.

Tipo de inyector	Compatibilidad con SPME	Insertos (<i>liners</i>)	Válvula de división de flujo (<i>Split valve</i>)	Diámetro inserto (<i>liner</i>)
Split/Splitless	Sí	Pequeño volumen	Cerrada durante desorción	Similar al diámetro de la fibra
On-column	Sí con sistema de calentamiento independiente	Mínimo volumen	-	-
PTV (<i>Programmable Temperature Vaporizing</i>)	Sí	Pequeño volumen	Cerrada durante desorción	Similar al diámetro de la fibra

2.1.2 Variables que afectan el proceso de SPME.

El proceso de SPME se puede ver afectado por una serie de variables experimentales que influyen sobre el equilibrio de analito extraído o bien sobre su desorción. Estas variables pueden ser modificadas para incrementar la eficacia del proceso de extracción, pero cualquier modificación de las variables o condiciones experimentales repercute en la cantidad de analito que se determina y, por supuesto, en la repetitividad del análisis.

2.1.2ª Etapa de extracción.

Los parámetros que pueden afectar el proceso de absorción/adsorción son los siguientes:

- *Tiempo de extracción:* Al desarrollar un método analítico basado en la técnica SPME se debe determinar el tiempo necesario para llegar al estado de equilibrio e intentar trabajar en estas condiciones. Se define el *estado de equilibrio* como aquel a partir del cual la cantidad de analito que se extrae se mantiene constante (Pawliszyn, 1997) y es característico de cada pareja analito-fibra. Cuando se analiza la fracción volátil y semivolátil de un alimento, el tipo de compuestos que se extraen con la técnica SPME es muy distinto y se precisan tiempos muy variables para alcanzar el equilibrio. Para algunos compuestos el tiempo necesario para llegar al punto de equilibrio es muy elevado, mientras que para otros es corto. Se suele optar por seleccionar tiempos de extracción inferiores para no alargar el tiempo de análisis, con lo cual para algunos analitos se trabajará en condiciones de no equilibrio (Figura 5).

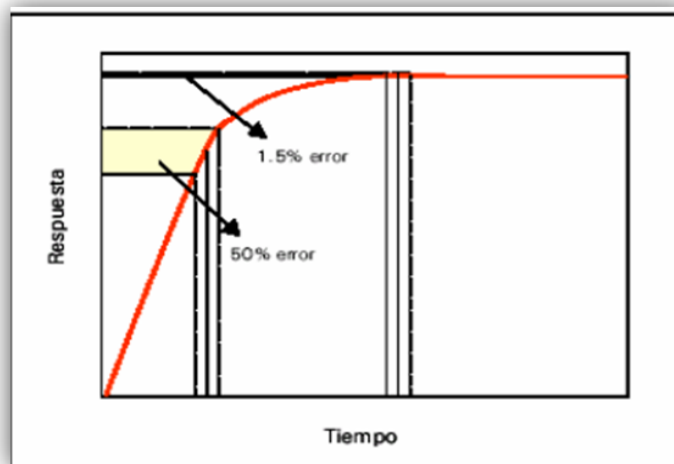


Figura 5. Efecto del tiempo de extracción en la cantidad de analito extraída (Pawliszyn, 1997).

Según Pillonel *et al.* (2002) en determinados casos pueden ser recomendables tiempos de extracción cortos, por ejemplo, cuando un compuesto presente un elevado coeficiente de partición y se encuentre a elevada concentración, ya que un largo tiempo puede inducir fenómenos de competencia y dar lugar a resultados sesgados.

- *Temperatura de extracción:* Este parámetro contribuye de dos formas opuestas en el proceso de SPME (Pawliszyn, 1997):

I- En el modo de inmersión los coeficientes de difusión de los analitos en la muestra aumentan al incrementar la temperatura, por lo que aumenta la cantidad de analito extraída.

II- En el modo de *headspace*, al aumentar la temperatura aumenta la concentración de los analitos en el espacio de cabeza, por lo que la extracción es más rápida, ya que se necesita menos tiempo para alcanzar el equilibrio. Pero, por otra parte, reduce la eficacia de la extracción, ya que un aumento de la temperatura disminuye los coeficientes de partición del analito entre el espacio de cabeza y la fibra y, por tanto, disminuye la cantidad de analito extraída por la fibra en el equilibrio.

Para solucionar este problema Zhang y Pawliszyn (1995) diseñaron un dispositivo de SPME que permite calentar la muestra y simultáneamente enfriar la fibra. Este método se denominó "*Internally cooled SPME*". Este diseño, sin embargo, presenta ciertos problemas de selectividad, ya que al favorecer las condiciones de extracción se facilita también, la extracción de interferencias presentes en la muestra (Zhang y Pawliszyn, 1995).

- *Presencia de sales en la muestra:* Generalmente la presencia de electrólitos en un sistema de adsorción, disminuye la solubilidad de los compuestos hidrofóbicos en la fase acuosa, este efecto se llama *salting out* y se utiliza para incrementar la sensibilidad de un método analítico. Las sales aumentan el coeficiente de distribución de los analitos que están presentes en forma no ionizada, por lo que la cantidad de analito extraída generalmente aumenta. Pero si los analitos se encuentran en forma no ionizada, se observa una disminución de la eficacia de la extracción debido, probablemente, a un aumento del coeficiente de actividad de las especies iónicas al aumentar la fuerza iónica de la solución (Pawliszyn, 1997).

Para la extracción de analitos volátiles y semivolátiles por HS/SPME se utiliza habitualmente NaCl y, a veces, Na₂SO₄.

- *pH de la muestra:* Este factor está relacionado con el apartado anterior, ya que los analitos deberán estar mayoritariamente presentes en su forma neutra para favorecer su extracción.
- *Volumen de la muestra:* El volumen debe seleccionarse en función de los coeficientes de distribución de los analitos, K_{fs} . Asimismo, al aumentar el volumen de la muestra aumenta también la cantidad de analito extraída.

La cantidad de analito extraída (n) es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de la muestra. Lo cual significa que, previo al análisis, no es necesario estudiar el volumen de muestra más adecuado a elegir, ya que la fibra puede ser directamente expuesta al aire o al agua. Esta aproximación no es válida cuando los analitos tienen una gran afinidad por la fibra; y cuando se utilicen volúmenes de muestra muy pequeños.

- *Solventes orgánicos:* En muestras acuosas disminuye la cantidad de analito extraída, ya que aumenta la solubilidad de los analitos en la fase acuosa. En algunos casos puede favorecer el proceso de extracción debido a cambios en las interacciones entre la fibra y los analitos (Krogh, *et al.*, 1997). También se puede ayudar a la difusión de los analitos desde la matriz hasta la fibra cuando se analizan muestras sólidas, debido a la presencia de agua o de un solvente orgánico (Zhang y Pawliszyn, 1995; Llompart, *et al.*, 1999; Doong y Liao, 2001).
- *Agitación de la muestra:* En SPME hay que tener en cuenta la cinética del proceso. Los analitos deben ser transportados desde la matriz de la muestra a la fibra en inmersión o, si la extracción se realiza mediante HS/SPME, desde la matriz de la muestra al espacio de cabeza y, de allí, a la fibra. La efectividad de la agitación determinará el tiempo de equilibrio en muestras acuosas. Por lo general, se considera que el tiempo de equilibrio en compuestos de elevado peso molecular o poco volátiles se reduce mediante agitación, mientras que el efecto será mínimo en compuestos muy volátiles (Pillonel *et al.*, 2002).

Como mencionan Pillonel y los demás autores, para aumentar la velocidad de la extracción o reducir el tiempo es necesario utilizar un sistema de agitación con el fin de facilitar la difusión de los analitos hacia la superficie de la fibra; disminuir el efecto de reducción de la velocidad de extracción causada por la zona estática que se forma alrededor de la fibra y poder compensar los bajos coeficientes de difusión de las matrices líquidas.

La agitación se puede llevar a cabo mediante:

- El uso de barras magnéticas agitadoras: es la más frecuente y se puede emplear en cualquier tipo de SPME; o bien, mediante el movimiento del vial (vortex) o de la fibra.
- Ultrasonidos (Motlagh y Pawliszyn, 1993; Gorecki y Pawliszyn, 1996): es la más efectiva, dando lugar a tiempos de extracción muy cortos, pero presenta el inconveniente que la elevada cantidad de energía suministrada produce un calentamiento que puede provocar la degradación de los analitos (Pawliszyn, 1997).
- Si la muestra es gaseosa la agitación no será necesaria, ya que la propia convección del aire será suficiente para llegar rápidamente al equilibrio.

2.1.2.1 Tipos de fibras utilizadas en la SPME.

Actualmente hay fibras con diferentes recubrimientos de manera que la SPME puede usarse para determinar un amplio grupo de compuestos. Los primeros recubrimientos comercializados fueron los de polidimetilsiloxano (PDMS) y poliacrilato (PA) pero los tipos de recubrimientos han ido aumentando progresivamente y actualmente cubren un amplio conjunto de aplicaciones. En la Tabla 2 se muestran las fibras comercializadas por Supelco.

Además de las fibras comerciales, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como por ejemplo los de carbón, C₈, C₁₈, polipirrol o incluso fibras recubiertas con polímetros de huella molecular (MIPs) (Mangani F. *et al.*, 1995) de manera que se consiguen fibras muy selectivas para un determinado compuesto. También se han desarrollado recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o compuestos inorgánicos (Koster, *et al.*, 2001) que son difícilmente extraídos con las fibras comerciales.

Generalmente, la naturaleza del analito determina la fibra a utilizar en cada caso. En general, se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para analitos polares como fenoles y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares como PAHs o BTEX (benceno, tolueno, xileno y etilbenceno) (Llompart, *et al.*, 1999).

Las fibras de PDMS, que es un polímero líquido, son las más utilizadas ya que fueron las primeras fibras introducidas para SPME. Estas fibras son las más adecuadas para los analitos apolares aunque, en algunos casos, también pueden ser usadas para la determinación de analitos con cierta polaridad. La afinidad de los analitos por el PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en las columnas de PDMS ya que el polímero que compone las fibras de PDMS y estas columnas capilares es básicamente el mismo (Martí, *et al.*, 2003). Las fibras de PDMS se comercializan en diferentes espesores (100µm, 30 µm y 7 µm).

En general, se recomienda utilizar las fibras de mayor espesor, como la de 100µm, para compuestos con coeficientes de partición bajos y de poco espesor para los que presenten coeficientes de partición elevados. La reducción del espesor de la fibra de 100 µm a 7 µm limita su aplicación a un número más reducido de analitos pero permite trabajar a mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas (Martí, *et al.*, 2003).

Tabla 2. Tipos de fibra comercializados para su uso en SPME.

Fase estacionaria / espesor	T ^a máxima de uso	Polaridad ³	Uso recomendado
Polidimetilsiloxano (PDMS)			
100µm, fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
30 µm, fase no enlazada	280 °C	No polar	GC/HPLC
7 µm, fase enlazada	340 °C	No polar	GC/HPLC
Polidimetilsiloxano/divinilbenceno (PDMS/DVB)			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	270 °C	Bipolar	GC
60 µm, fase parcialmente entrecruzada	-	Bipolar	HPLC
65 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
Poliacrilato (PA)			
85 µm, fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Polar	GC/HPLC
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)			
75 µm, fase parcialmente entrecruzada	320 °C	Bipolar	GC
85 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	320 °C	Bipolar	GC
Carbowax/Divinilbenzene (CW/DVB)			
65 µm, fase parcialmente entrecruzada	265 °C	Polar	GC
70 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	265 °C	Polar	GC
Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)			
50 µm, fase parcialmente entrecruzada	-	Polar	HPLC
Divinilbenceno/Carboxen/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)			
50/30 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹)	270 °C	Bipolar	GC
50/30 µm, fase muy entrecruzada (<i>stableflex</i> ¹) ²	270 °C	Bipolar	GC

¹ Fibras *Stableflex*: el recubrimiento está depositado sobre una fibra de sílice fundida flexible.

² Longitud especial de 2 cm.

³ Tomado de la referencia [3].



PDMS (polidimetilsiloxano): Las fibras de PDMS, consisten en un polímero líquido que resiste temperaturas superiores a 300°C en el inyector. Es una fase no polar que favorece la extracción de compuestos no polares, pero que si se optimizan las condiciones de extracción (pH, sal y temperatura) también se puede usar para compuestos polares.

La afinidad de los analitos por el polímero PDMS puede ser estimada a partir de los tiempos de retención de los compuestos en columnas capilares cromatográficas de PDMS (Pawliszyn, 1997). En general, se recomienda utilizar la de 100µm para compuestos con coeficiente de partición bajos y de poco espesor para los compuestos con coeficientes de partición elevados. La reducción de la fibra de 100µm a 7µm limita su aplicación a un número más reducido de analitos, pero permite trabajar a mayores temperaturas, lo que extiende su aplicación a compuestos con temperaturas de ebullición más elevadas.

La extracción de los analitos con la fibra PDMS se debe, principalmente, a un fenómeno de absorción, aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunas sustancias (sobre todo si son muy apolares) puede realizarse vía adsorción, ya que existe cierta competitividad entre los dos efectos (Yang, *et al.*, 1998; Baltussen, *et al.*, 1999; Poerschman, *et al.*, 2000; Vaes, *et al.*, 2000).

PA (poliacrilato): son fibras adecuadas para analitos polares y aunque su recubrimiento es un polímero sólido, su baja densidad hace que los analitos sean absorbidos igual que en las fibras PDMS (Arthur y Pawliszyn, 1990; Gorecki y Pawliszyn, 1999; Pawliszyn, 1999). Sin embargo, los coeficientes de difusión de los analitos en las fibras de PA son menores que los que ofrecen en las fibras de PDMS. Por esta razón, lo más probable es que los tiempos de extracción de los compuestos volátiles sean mayores utilizando la fibra de PA (Arthur y Pawliszyn, 1990).

Fibras en las que se combina más de un polímero: son las más adecuadas para la determinación de un amplio abanico de analitos volátiles. Esto es debido a que a diferencia de las fibras de PDMS y PA, la principal interacción entre la fibra y los analitos es por adsorción, ya que se trata de polímeros sólidos (Pawliszyn, 1997). En general, en este tipo de fibras, los coeficientes de distribución de los analitos son mayores que los que presentan para las fibras PDMS, pero presentan algún inconveniente; como por ejemplo, que el intervalo lineal de concentración es menor que en las fibras de absorción y que se presentan fenómenos de competencia (Pawliszyn, 1997).

- La fibra **Carbowax-Divinilbenceno** (CW/DVB) es la más polar entre las que tienen más de un polímero y está parcialmente indicada para la determinación de alcoholes y compuestos polares (Pillonel et al., 2002).
- El **Carboxen** (CAR) es carbón molecular que contiene macro, meso y microporos y se utiliza combinada con PDMS. Las moléculas grandes no pueden entrar en los microporos, lo que facilita que las combinaciones CAR/PDMS incrementen la extracción de pequeñas moléculas (Pillonel et al., 2002).
- La **Divinilbenceno** (DVB) se combina también con PDMS. El DVB es un polímero sólido con poros más grandes que la CAR, lo que permite extraer moléculas más grandes que la anterior (Pillonel et al., 2002).
- La combinación de **CAR, DVB y PDMS** proporciona una mayor capacidad. En esta fibra, una primera capa de PDMS/CAR se cubre con una segunda capa de PDMS/DVB. Las moléculas pequeñas con mayores coeficientes de difusión llegan a la capa interior más rápido y son adsorbidas por la fibra de Carboxen. Las moléculas más pesadas son retenidas en la capa exterior de DVB. Esta configuración facilita también la desorción (Pillonel et al., 2002).

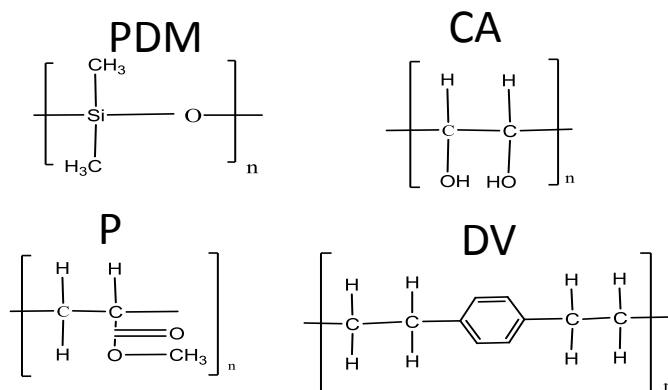


Figura 6. Estructura química de algunos de los recubrimientos comerciales para las fibras de SPME.

La extracción de los analitos de la muestra mediante las fibras de PDMS se debe principalmente a un fenómeno de absorción (Shirey y Mindrup, 2000) aunque algunos autores han indicado que la extracción de algunos analitos (sobre todo si son muy apolares) puede realizarse vía adsorción ya que existe una cierta competitividad entre ambos efectos.

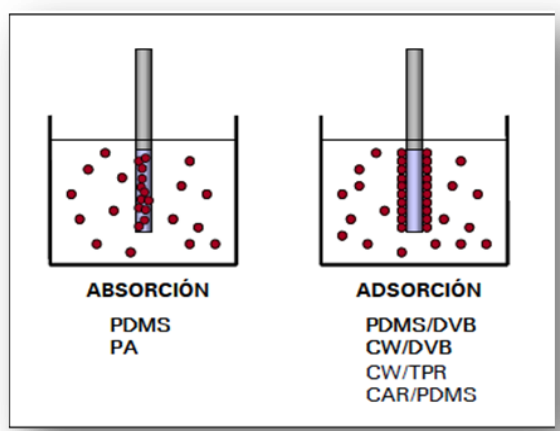


Figura 7. Clasificación de las fibras de SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción.

En la Figura 8 se muestran algunas reglas generales que pueden ser usadas para la selección de la fibra más adecuada para cada aplicación en función de la polaridad y volatilidad de los analitos.

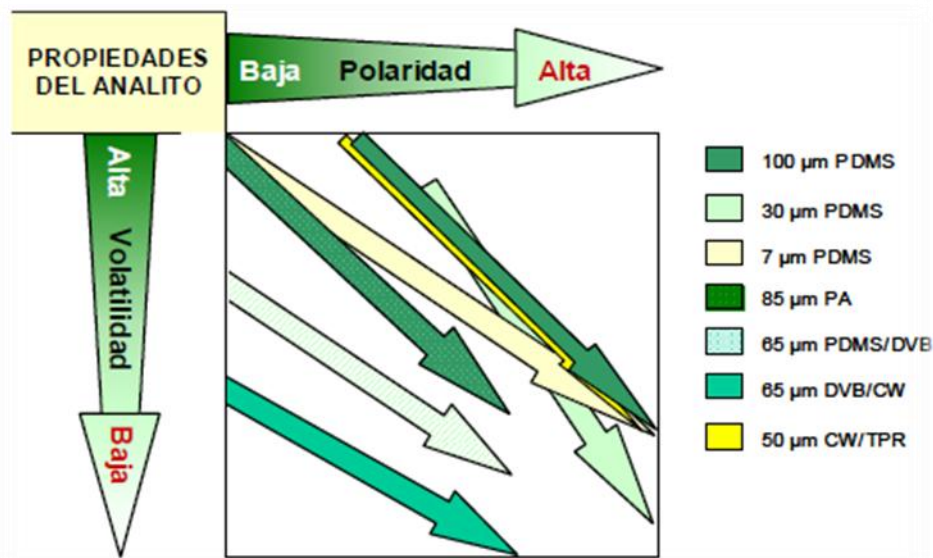


Figura 8. Guía de selección de las fibras de SPME en función de las propiedades del analito (Tomkins y Barnard, 2002).

El efecto de la polaridad de las fibras se ha demostrado en diversos estudios que comparan fibras para la extracción de compuestos polares (Bartak y Cap, 1997; Hall y Brodbelt, 1997; Ferrari *et al.*, 1998). No obstante, la polaridad de la fibra muestra un efecto mínimo en la extracción de moléculas de bajo peso molecular (Shirey, 2000). Parece que, en la extracción de moléculas pequeñas, la porosidad y el espesor de la fibra influyen más que la polaridad (Pillonel *et al.*, 2002).

2.1.2^b Etapa de desorción.

La desorción térmica de los analitos en el inyector de un cromatógrafo de gases depende de la volatilidad de los analitos, de la posición de la fibra en el inyector, del espesor de la fibra, de la temperatura del inyector y del tiempo de exposición. A medida que aumenta la temperatura, los coeficientes de partición fibra/gas portador, disminuyen y, asimismo, disminuye rápidamente la capacidad de la fibra para retener los analitos. El flujo constante de gas portador en el inyector del cromatógrafo de gases facilita la liberación de los analitos. Por tanto, los parámetros a optimizar cuando la desorción se realiza térmicamente en un cromatógrafo de gases son los siguientes:

- *Temperatura de desorción:* Como regla general se recomienda fijar como temperatura aquella que es la máxima recomendada por el fabricante de la fibra. Al aumentar la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra disminuye y los analitos son introducidos y arrastrados por la columna por el flujo del gas portador. Frecuentemente, la temperatura óptima de desorción es aquella que coincide aproximadamente con la del punto de ebullición del analito menos volátil.
- *Tiempo de desorción:* Ésta debe ser el adecuado para que la desorción de los analitos sea completa y no queden restos en la fibra. Esto puede suceder si el tiempo o la temperatura de desorción no son suficientes para la desorción completa de los analitos.
- *Diámetro del inserto (liner):* Debe ser lo más similar posible al diámetro de la fibra para asegurar una transferencia rápida desde el inyector a la columna. Para ello se suelen emplear insertos de volumen reducidos como los que se muestran en la Figura 9.

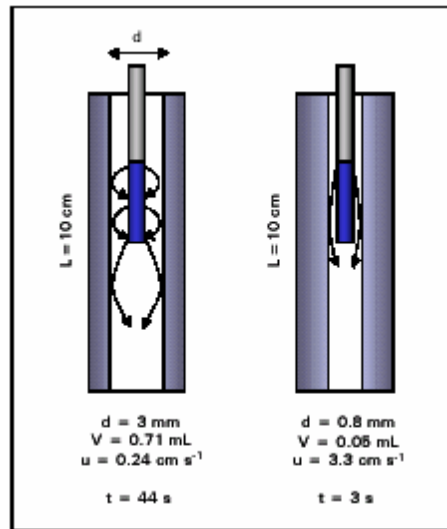


Figura 9. Efecto del volumen del *liner* en la desorción térmica (Peñalver, 2002).

- *Posición de la fibra en el inyector:* La posición debe quedar situada en el centro del inserto durante la desorción, para que se produzca un calentamiento rápido y reproducible (Pawliszyn, 1997).

2.1.3 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportar el analito a través de la columna. La idea de esta técnica se basa en la volatilización de la muestra y su posterior inyección en la cabeza de una columna cromatográfica. Para la elución de la muestra se usa un gas inerte como fase móvil, de esta manera la fase móvil no interacciona con las moléculas del analito, simplemente transporta el analito a través de la columna

(Skoog, *et al.*, 2008). En el desarrollo de métodos automatizados en Química Analítica la SPME fue inicialmente diseñada para su uso con la GC, ya que el acoplamiento SPME-GC es muy sencillo y no es necesario realizar ninguna modificación especial en el cromatógrafo de gases.

2.1.4 Espectrometría de Masas.

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de la relación masa/carga de iones derivados de moléculas. La espectrometría de masas se fundamenta en la separación de partículas moleculares o atómicas de acuerdo a su relación masa/carga.

El proceso de la espectrometría de masas comprende básicamente cuatro etapas:

- *Ionización de la muestra.* En el método de ionización electrónica, la ionización de la muestra se lleva a cabo por bombardeo mediante electrones (e⁻).
- Aceleración de los iones por un campo eléctrico.
- Separación de los iones según su relación masa/carga.
- Detección de los iones y producción de la correspondiente señal eléctrica (Rubinson y Rubinson, 2000).

El analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF) separa los iones que tienen la misma energía cinética pero diferente m/z , porque los iones pesados necesitan más tiempo para recorrer una distancia fija. Si los iones tienen la misma energía cinética, pero diferentes masas, los iones más ligeros circularán a mayor velocidad que los iones más pesados.

En su forma más simple, el espectrómetro de masas con analizador másico de tiempo de vuelo es un tubo largo y recto que trabaja a vacío, con la fuente en un

extremo y el detector en el otro. Los iones que salen despedidos de la fuente se dirigen al detector en orden creciente de masas, porque los ligeros circulan más deprisa (Harris, 2008).

Estos equipos presentan ventajas como la robustez, simplicidad, alta velocidad espectral, fácil acceso a la fuente de iones y el virtualmente ilimitado intervalo de masas, pero tienen no obstante una sensibilidad y una resolución limitadas (Rubinson y Rubinson, 2000).

2.1.5 Índice de retención de Kovats.

El índice de retención de Kovats o simplemente índice de Kovats o índice de retención es un método para determinar tiempos de elución relativa de los diferentes compuestos de la muestra comparándolos con los tiempos de retención de una serie homóloga de hidrocarburos saturados, de tal forma que esto ayuda a la identificación de los componentes de una mezcla (Barquero, 2006).

El método aprovecha la relación lineal entre los valores del logaritmo del tiempo de retención, $\log(t'_r)$, y el número de átomos de carbono en una molécula. El valor del índice de Kovats suele representarse por "I" en las expresiones matemáticas. Su aplicación se limita a los compuestos orgánicos. Para la cromatografía isotérmica, el índice de Kovats viene dado por la ecuación:

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{\log(t'_{r(\text{desconocido})}) - \log(t'_{r(n)})}{\log(t'_{r(N)}) - \log(t'_{r(n)})} \right]$$

donde

I = índice de retención de Kovats n = número de átomos de carbono de los alcanos más pequeños N = número de átomos de carbono de los alcanos más grandes t'_r = tiempo de retención ajustado.

Para una cromatografía de temperatura programada, el índice de Kovats está dado por la ecuación:

$$I = \left[\frac{t_{r(\text{desconocido})} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] * (100 \times z) + (100 \times n)$$

donde

I = índice de retención de Kovats n = número de átomos de carbono de los alcanos más pequeños N = número de átomos de carbono de los alcanos más grandes z = diferencia del número de átomos de carbono entre el alcano más pequeño y el más grande, t_r = tiempo de retención (Barquero, 2006).

2.2 Aspectos generales sobre el género *Prunus*.

El género *Prunus* pertenece a la familia Rosaceae, consiste de 400 especies que crecen en las regiones de clima caliente y templado, mayormente en el Hemisferio Norte (Calderón de Rzedowski, 2001 y Rzedowski, 2005). Se cultivan debido a que su fruto y su semilla pueden ser comestibles, o bien, por su belleza, que es apreciada con fines ornamentales.

Se han aislado e identificado diversos metabolitos secundarios a partir de diferentes especies del género *Prunus*, entre los cuales podemos encontrar a:

1. Flavonoides que incluyen glicósidos de campferol entre sus beneficios incluyen la inhibición de la oxidación del LDL-colesterol, la promoción de la estabilidad de la placa, la mejora de la función endotelial vascular y la disminución de la tendencia a la trombosis. Asimismo, el campferol inhibe las enzimas COX *in vitro*, que modulan el proceso inflamatorio. (Olszewska *et al.*, 2001; Jung *et al.*, 2003)



Es importante destacar que la presencia de otros derivados de la quercetina como la hiperina (glicósido de quercetina) (Wijeratne *et al.*, 2006; Olszewska *et al.*, 2005), son de gran importancia debido a que poseen diferentes propiedades, algunas de las cuales son analgésicas, antiagregantes, vasodilatadoras, antibacteriales, antiinflamatorias, entre otras. Como buen flavonoide, la quercetina es un antioxidante y se ha empleado para el tratamiento de tumores cancerosos en el pecho, piel, ovarios, vesícula y pulmones (Olszewska *et al.*, 2001; Milbury *et al.*, 2006).

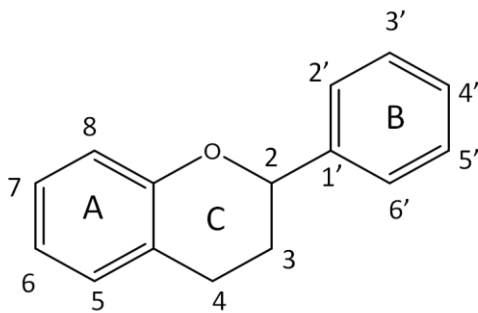


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides y sistema de numeración.

2. Glicósidos de cianidina (antocianidinas) los cuales hacen que la planta muestre un color rojizo; esta coloración puede deberse a un mecanismo de defensa, para proteger a las plantas, sus flores y sus frutas contra la luz ultravioleta (UV) y, por su propiedad antioxidante, evitar la producción de radicales libres (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Deineka *et al.*, 2004; Ruiz *et al.*, 2005); glicósidos cianogénicos: prunasina y amigdalina, los cuales actúan como inhibidores de germinación. (Santamour *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2005).

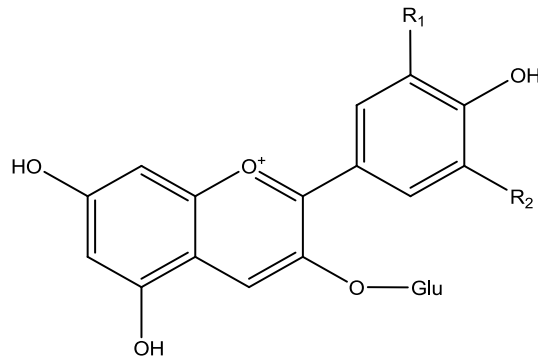


Figura 11. Estructura básica de las antocianidinas.

3. Triterpenos, tales como el ácido ursólico y derivados de éste, el cual tiene diferentes actividades biológicas como por ejemplo actividad antibacteriana, hepatoprotectora, inmunomoduladora, antiproliferativa y antiviral de amplio espectro (Wolbis *et al.*, 2001; Shengmin *et al.*, 2002; Amico *et al.*, 2006).

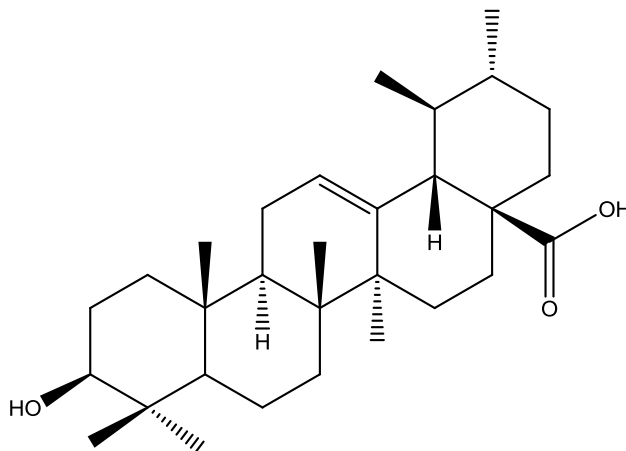


Figura 12. Ácido ursólico.

4. Compuestos aromáticos simples: ácido procatéquico (Shegmin *et al.*, 2002; Kayano *et al.*, 2004; Milbury *et al.*, 2006) y ácido vainillínico (Kayano *et al.*, 2004; Milbury *et al.*, 2006)

5. Fenilpropanoides, como el ácido caféico, el ácido p-coumárico y un glicósido del ácido ferúlico (Kayano *et al.*, 2004).

Por otra parte, se han realizado escasas investigaciones farmacológicas sobre extractos o compuestos purificados a partir de especies del género *Prunus*. Estas investigaciones han demostrado que éstos previenen o disminuyen algunas de las patologías para las cuales son empleadas las plantas en la medicina tradicional.

2.2.1 *Prunus serotina*

2.2.1.1 Antecedentes Históricos.

En el siglo XVI, Martín de la Cruz describe su uso como un antiprurítico y para el tratamiento de la dermatosis y de la dispepsia. El Códice Florentino menciona al capulín para el tratamiento de los ojos irritados. Francisco Hernández, lo indica como “sedante y tónico”, el cocimiento de la corteza cura a los disentéricos, el polvo de la misma disuelve las nubes, aclara la vista, alivia las inflamaciones de los ojos y suaviza la lengua reseca por exceso de calor (Hinshaw, 2003).

A finales del siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural lo describe como antipalúdica. En datos para la Materia Médica Mexicana, refiere su uso para curar la disentería, para las nubes de los ojos y para curar inflamaciones.

En la Farmacopea Mexicana de 1896, se indica la aplicación de la corteza en infusión con una dosis de 4gr en 500mL de agua como antidisentérica, y a una dosis de 2gr en 500mL de agua como antipirética.

En el siglo XX, Alfonso Herrea comentó que el capulín es sedativo y narcótico. Posteriormente Maximino Martínez describe los usos siguientes: antidiarreico, antipalúdico, antidisentérico, antiespasmódico, contra la neumonía, como

refrescante y para las enfermedades del sistema respiratorio, así como para la visión borrosa.

La Sociedad Farmacéutica de México, cita los usos que se mencionan a continuación: antidiarreico, antipalúdico, astringente eupéptico, contra la gastritis atónica, como sedante cardiaco, para favorecer la circulación y como sedante de catarrros bronquiales y laríngeos.

2.2.1.2 Distribución, taxonomía y características morfológicas.

Prunus serotina Ehrenb.spp. *capulí* (Cav.) McVaugh, es originario de América boreal y habita en climas cálido, semicálido, semiseco y templado desde los 1000 y los 3900 metros sobre el nivel del mar. Es una planta silvestre cultivada en huertos familiares, asociada a bosques tropicales, caducifolio y subcaducifolio, matorral xerófilo, bosque espinoso, bosque mesófilo de montaña, bosque de encino, bosque de pino y bosque mixtos de pino-encino (Argueta, 1994). El capulín también crece en zonas de Europa que tienen un clima continental, donde se ha convertido en una especie naturalizada localmente (Olszewska, 2007).

En México se puede encontrar en los estados de Chihuahua, Chiapas, Coahuila, Colima, Durango, Hidalgo, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Puebla, Morelos, Oaxaca, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Nuevo León, Tamaulipas, Veracruz y el Distrito Federal (CONAFOR, 2008). *P. serotina*, conocido como capulín, se cultiva a menudo, en las partes más altas de México, debido principalmente a que sus frutos son comestibles (Rzedowski *et al.*, 1987).

Ehrhart constituye la autoridad botánica que en 1788 le dio a esta especie la denominación de *Prunus serotina* (McVaugh, 1951). *Prunus serotina* es el nombre científico que emplea la Comisión Nacional para el Conocimiento de la Biodiversidad (CONABIO), en el Sistema Integrado de Información Taxonómica

(SIIT) para establecer su clasificación taxonómica (SIIT, CONABIO, 2008), la cual se muestra en el Tabla 3.



Figura 13. Distribución geográfica de *Prunus serotina* en la República Mexicana.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *Prunus serotina*.

Nombre científico	<i>Prunus serotina</i> Ehrh
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Sub-clase	Rosidae
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Prunus
Especie	Serotina
Variedades	<i>P. serotina</i> var. <i>eximia</i> <i>P. serotina</i> var. <i>rufula</i> <i>P. serotina</i> var. <i>serotina</i> <i>P. serotina</i> var. <i>Virens</i>

Prunus serotina es un árbol silvestre que mide de 10 a 15 o más metros de altura (Figura 14). Sus hojas pueden ser ovadas o lanceoladas, de margen aserrado, de olor especial. Sus flores son numerosas, pequeñas y blancas, en racimos axilares

colgantes y largos. Su fruto, de sabor agridulce y algo astringente, es una drupa globosa de 6 a 8 mm de diámetro, sin embargo, en ocasiones puede llegar a tener 1.5 cm de diámetro. La piel del fruto es de color rojizo oscuro y la carne es verde translúcida (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Calderón de Rzedowski y Rzedowski, 2001; Martínez, 1991). El fruto posee una sola semilla con endosperma escaso, de hueso semi-rugoso y dentro del cual hay una almendra comestible.



Figura 14. Izquierda: Árbol, centro arriba: Hojas, centro abajo: frutos, derecha: flores de *Prunus serotina* Ehrh (Fotografía proporcionada por el Dr. José Fausto Rivero Cruz).

En México tiene diferentes nombres comunes como: Capulín, Capulín Blanco (Rep. Mex.); Capulín (Mesa Central); Cerezo (Ario de Rosales, Mich.); Shencua, Shengua, Xengua (l. tarasca, Mich.); Cusabi (l. tarahumara, Chih.); Uasiqui, Jeco (l. guarigía, Chih.); Pakshumk (l. mixe, Oax.); T-nundaya (l. mixteca, Oax.); Tzu'uri (l.

cora, Nay.); Paté, Shimal-ma-lu (l. chontal, Oax.); Capulitaunday (l. zapoteco, Oax.); Xeugua (Mich.); Detze, Ghohto (l. Otomí).

Esta especie es también conocida en otros países donde le dan diferentes nombres comunes: en EUA a *P. serotina* se le conoce como “wild cherry” o “black cherry”; en Guatemala como “cerezo”; en Venezuela como “cerezo criollo”; en Colombia como “cerezo de los andes”; en Francia como “cerisier capulín”, y en Alemania como “Mexican traubenkirsche” (International Plant Genetic Resources Institute, 1999; Ordaz-Galindo *et al.*, 1999; Comisión Nacional Forestal, 2008).

En la Tabla 4 se muestra un resumen de los metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo.

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo

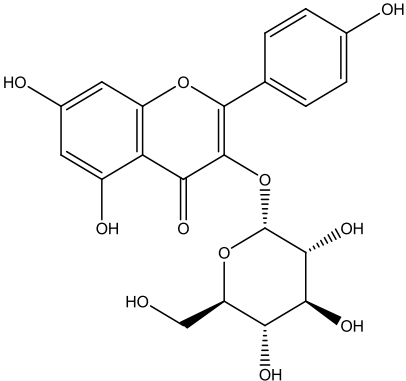
Localización en la planta	Estructura	Nombre	Referencia
Hojas		3-O-β-D-glucopiranosido de campferol (astragalina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

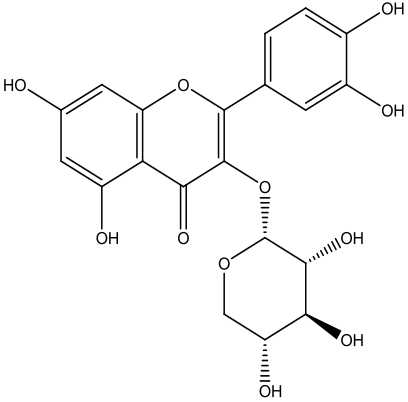
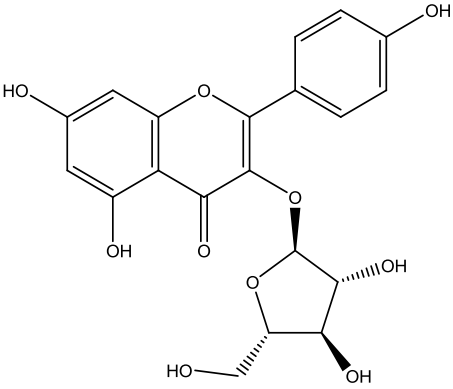
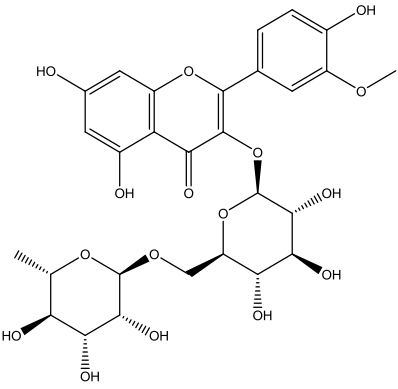
<p>Hojas</p>		<p>3-O-β-D-xilopiranosido de quercetina (reynoutrina)</p>	<p>Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b</p>
<p>Hojas</p>		<p>3-O-α-L-arabino-furanósido de campferol (juglanina)</p>	<p>Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b</p>
<p>Hojas</p>		<p>3-O-(6''-O-α-L-ramnopiranosil)-β-D-glucopiranosido de isorhamnetina (narcissina)</p>	<p>Olszewska, 2005a Olszewska, 2005b</p>

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

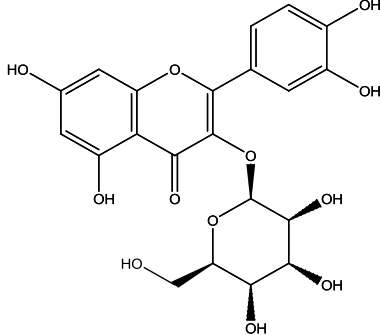
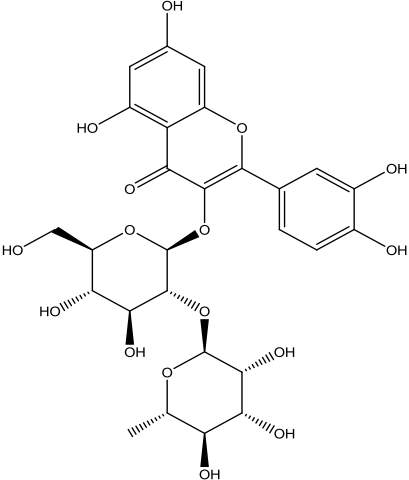
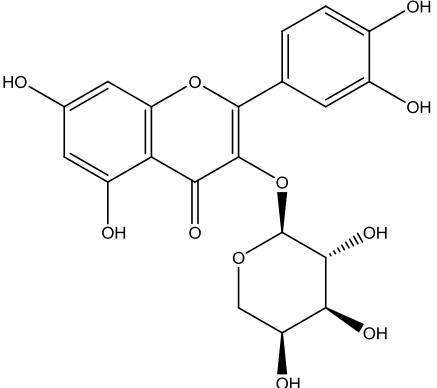
Hojas		3-O-(β -D-galactósido de quercetina (hiperina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-(2''-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranosido de quercetina	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O- α -L-arabino-piranosido de quercetina (juajaverina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

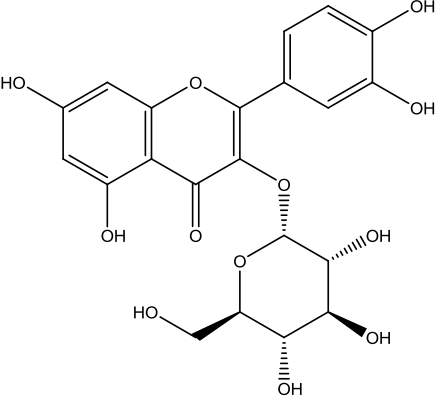
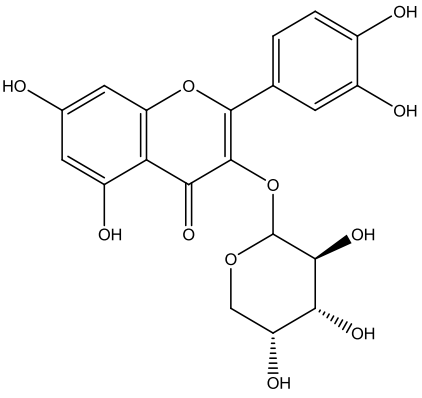
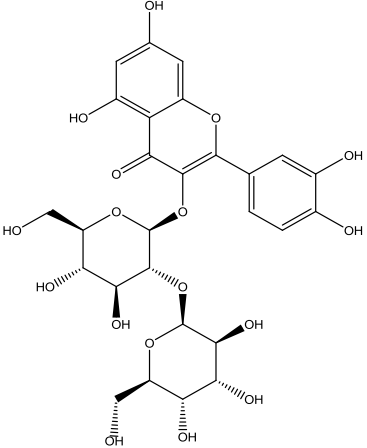
Hojas		3-O- β -D-glucopiranosido de quercetina (isoquercetina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O- α -L-arabinofuranosido de quercetina (avicularina)	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b
Hojas		3-O-(2-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-galactopiranosido de quercetina	Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

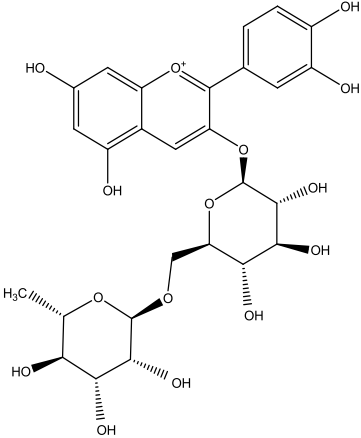
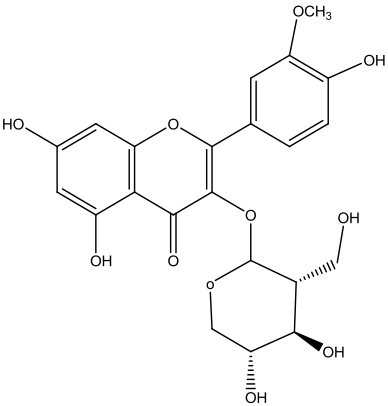
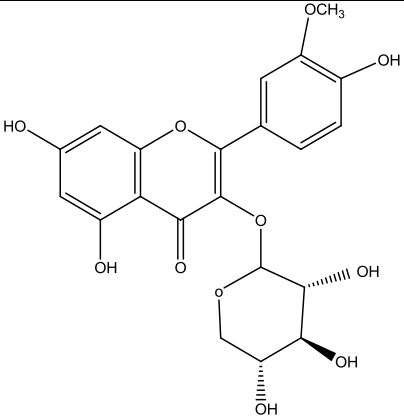
<p>Hojas</p>		<p>3-O-rutinósido de quercetina (rutina)</p>	<p>Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b</p>
<p>Hojas</p>		<p>3-O-α-L-arabino-furanósido de isoramnetina</p>	<p>Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b</p>
<p>Hojas</p>		<p>3-O-β-D-xilopiranosido de isoramnetina</p>	<p>Olszewska, 2005a, Olszewska, 2005b</p>

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

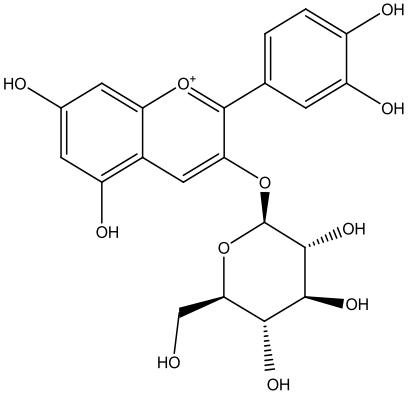
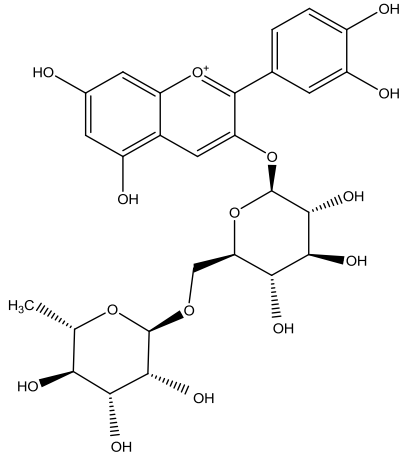
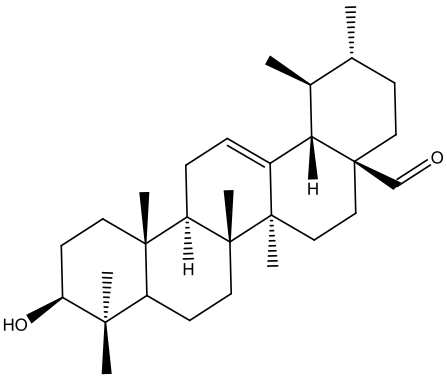
<p>Hojas</p>		<p>3-O-glucósido de cianidina</p>	<p>Ordaz- Galindo <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>Hojas</p>		<p>3-O-rutinósido de cianidina</p>	<p>Ordaz- Galindo, <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>Hojas</p>		<p>aldehído ursólico</p>	<p>Biessels <i>et al.</i>, 1974</p>

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

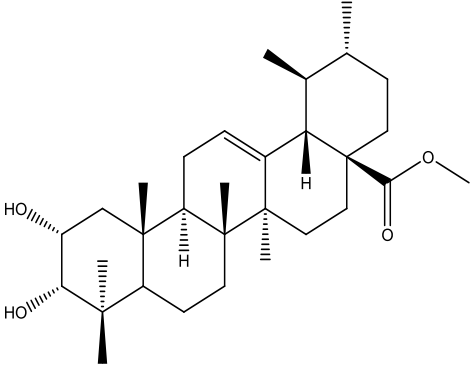
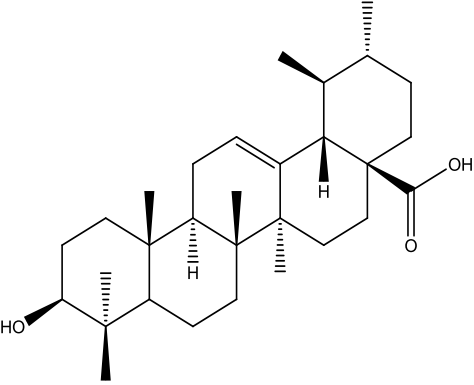
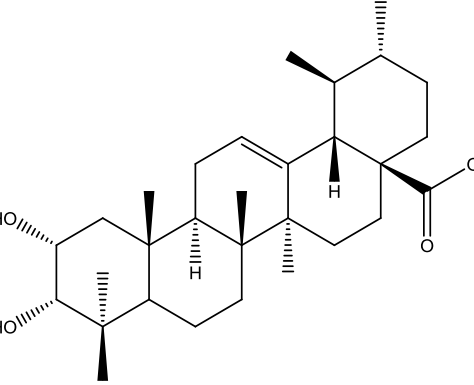
<p>Hojas</p>	 <p>The structure shows a pentacyclic ursane skeleton with a double bond at C-12. It features two hydroxyl groups at C-2 and C-3 (both on dashed bonds), and a methyl ester group at C-28 (on a wedged bond).</p>	<p>2α,3α- dihidroxi-urs- 12-en-28-ato de metilo</p>	<p>Biessels., <i>et al.</i>, 1974</p>
<p>Hojas</p>	 <p>The structure shows a pentacyclic ursane skeleton with a double bond at C-12. It features a hydroxyl group at C-2 (on a wedged bond) and a carboxylic acid group at C-28 (on a wedged bond).</p>	<p>ácido ursólico</p>	<p>Shengming <i>et al.</i>, 2002</p>
<p>Hojas</p>	 <p>The structure shows a pentacyclic ursane skeleton with a double bond at C-12. It features two hydroxyl groups at C-2 and C-3 (both on dashed bonds) and a carboxylic acid group at C-28 (on a wedged bond).</p>	<p>ácido 2α,3β- dihidroxiurs- 12-en-28-oico (ácido 2α- hidroxiursolico, ácido corosólico)</p>	<p>Olszewska, 2008</p>

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

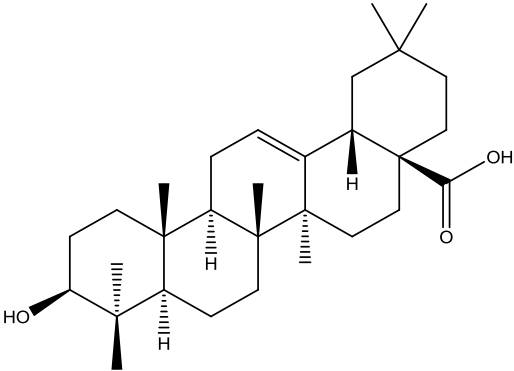
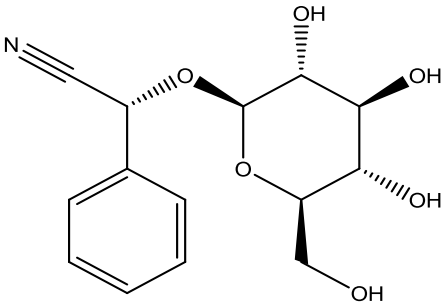
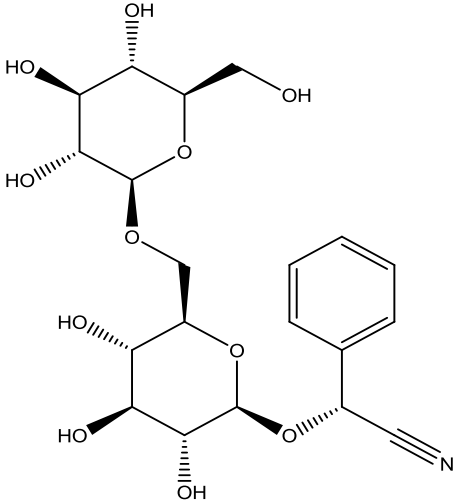
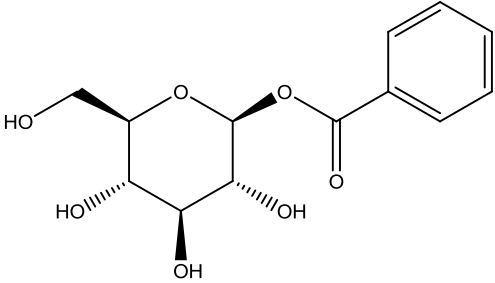
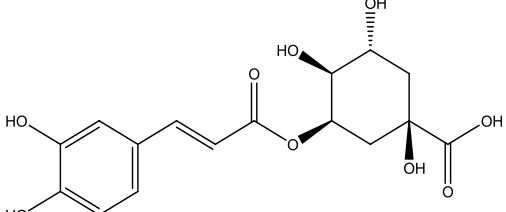
<p>Hojas</p>		<p>ácido oleanóico</p>	<p>Olszewska, 2008</p>
<p>Semillas Corteza</p>		<p>prunasina</p>	<p>Santamour <i>et al.</i>, 1998</p>
<p>Semillas</p>		<p>amigadalina</p>	<p>Santamour <i>et al.</i>, 1998</p>

Tabla 4. Principales metabolitos secundarios aislados e identificados en *P. serotina* por otros grupos de trabajo (continuación)

Hojas	 <p>The structure shows a beta-D-glucopyranose ring with a benzoyl group attached to the C1 position. The hydroxyl groups at C2, C3, and C4 are in the alpha configuration (pointing down), while the hydroxyl group at C6 is in the beta configuration (pointing up).</p>	1-benzoato β -D- glucopiranososa (glucosa 1- benzoato)	Horsley y Meinwald, 1981
Hojas	 <p>The structure shows a chlorogenic acid core (a 1,3,5-trihydroxybenzene ring with a propenoic acid side chain) linked via an ester bond to the C5 position of a glucose ring. The glucose ring has hydroxyl groups at C2, C3, and C4.</p>	ácido-5-O- cafeoilquinico (ácido clorogénico)	Olszewska, 2007

2.2.1.3 Etnobotánica y Antropología.

En Morelos, Hidalgo y en el Estado de México se utilizan las hojas del capulín entre otras cosas, para protegerse del mal y para hacer las limpias.

Asimismo, para la tos que puede ser provocada por catarrros provocados por el frío y que la duración de ésta dependa de la gravedad de la infección, es para lo que más se emplea esta planta (Martínez, 1987). Además de ello, el tratamiento consiste en preparar con el fruto un jarabe que se toma a cucharadas, el cocimiento de las hojas, se ingiere cada cuatro horas; o bien, a través del cocimiento de la corteza tres veces al día. En el Distrito Federal se realiza una infusión con las hojas (Hinshaw, 2003).

En casos de diarrea y de dolor abdominal se cuecen la raíz, la corteza y las hojas del capulín junto con miel de abeja a punto de jarabe y se ingiere cada seis horas, o se hierve a fuego lento el fruto y las hojas, añadiendo azúcar hasta que se obtenga una consistencia espesa y después se deja enfriar, se cuele, se le agrega limón y alcohol y se toma tres veces al día (Argueta, 1994).

En Sonora se ocupa la corteza y las hojas en caso de diarrea, catarro, nubes en los ojos y fiebres periódicas.

En Hidalgo y en el Estado de México; entre los mixes, zapotecas y totonacos, se emplea el capulín para aliviar a los enfermos de “empacho” (Ordaz-Galindo *et al.*, 1999).

3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Desde tiempos remotos las plantas se han empleado como fuentes naturales de alimento, protección y medicamentos.

En México existe una gran tradición en el uso de plantas medicinales. Sin embargo, muchas de estas especies no han sido objeto de estudios científicos.

En este sentido, la OMS ha sugerido a sus países miembros elaborar monografías que compilen la información científica acerca de las plantas medicinales más comúnmente empleadas en cada país.

De esta manera, lo que se quiere plantear en la presente tesis es identificar y determinar los compuestos volátiles que se encuentran presentes en las semillas y los frutos de *Prunus serotina* con la finalidad de ayudar en la información científica que ya se tiene de *P. serotina* (“capulín”), una especie vegetal utilizada con fines alimenticios y medicinales utilizando la técnica de microextracción en fase sólida en la fase gaseosa acoplada a cromatografía de gases con espectrometría de masas en tiempo de vuelo (HS-SPME-GC-MSTOF).

El objetivo general consiste en determinar el contenido de compuestos volátiles presentes en los frutos y las semillas del capulín. Para cumplir con el objetivo principal se plantearon los siguientes *objetivos particulares*:

- Realizar el proceso de extracción mediante HS-SPME de cada una de las muestras obtenidas.
- Establecer las condiciones óptimas para el análisis de las muestras.

- Realizar el análisis de los compuestos volátiles presentes en los extractos mediante espectrometría de masas en tiempo de vuelo.
- Realizar la identificación de los compuestos presentes en las diferentes muestras mediante el análisis de sus espectros de masas y la determinación de sus índices de Kovats.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Procedimientos generales.

4.1.1 Material vegetal y procedimiento de extracción.

Los frutos y las semillas de *Prunus serotina* fueron recolectados manualmente en el mes de julio del 2010 en Santiago Tianguizolco en el estado de Puebla, México.

4.1.2 Microextracción en fase sólida.

La microextracción se realizó empleando fibras de 50/30 μm de Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS), 100 μm de polidimetilsiloxano (PDMS) y 75 μm de carboxen-polidimetilsiloxano (CAR/PDMS); las cuales se activaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Supelco). Para cada extracción se emplearon aproximadamente 5 g de las muestras de los frutos y de las hojas, 5 ml de agua y 20 mg de NaCl, los cuales fueron colocados en un vial de 40 ml con séptum de politetrafluoroetileno (PTFE). Asimismo, el vial fue puesto bajo agitación a una temperatura de 45-50°C y la fibra para la microextracción se expuso en el espacio de la cabeza del vial para la adsorción de los analitos durante 90 minutos (Figura 15). Después de ello, se retiró la fibra del vial para introducirla dentro del inyector del cromatógrafo por 3 minutos para su desorción y análisis.

Asimismo, para evitar cualquier sesgo experimental en el análisis de las muestras, la SPME se hizo por triplicado para cada una de las fibras así como el empleo de diferentes muestras. Por otra parte, para poder obtener un aproximado de la cantidad de compuestos volátiles en cada una de las partes de la planta analizada

se hizo a través de la comparación de las áreas relativas obtenidas de los picos mediante la adsorción y desorción de las muestras.

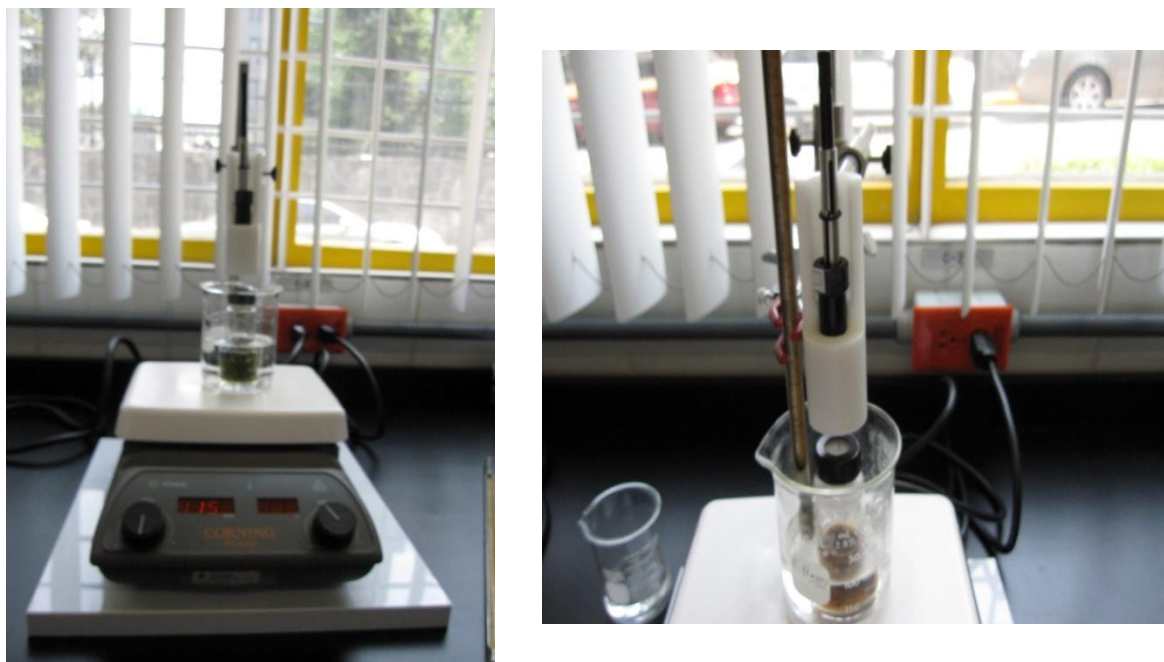


Figura 15. Microextracción en fase sólida por el método de *headspace* (izquierda: hojas del capulín, derecha: frutos del capulín)

4.1.3 Cromatografía de gases-Espectrometría de masas.

Para la realización del análisis se empleó el espectrómetro de masas marca LECO, modelo Pegasus 4D, acoplado a un cromatógrafo de gases Agilent, modelo Agilent 6890N equipado con una columna capilar DB-5 (5%fenil-polimetilsiloxano) con dimensiones de 10 m × 0.18 mm x 0.18µm. La temperatura del inyector se mantuvo a 300°C; utilizando como gas acarreador Helio (Praxair, 5.0) a una velocidad lineal de 1 mL/min (medido a 250°C). La temperatura del horno se programó a 40°C (durante 1 minuto) y se incrementó la temperatura a 20°C/min

hasta los 300°C durante 5 minutos. Las inyecciones fueron realizadas mediante el modo de inyección “split” (1:20).

En el espectrómetro de masas se utilizó ionización electrónica a 70eV, la temperatura de la cámara de ionización fue de 200°C y de la línea de transferencia, 250°C. Se programó una velocidad espectral de 20 espectros/seg. El barrido de masas fue de 33-400 u (unidad de masa atómica)

4.1.4 Obtención del índice de concentración (F_{ij}).

El coeficiente F_{ij} se obtuvo realizando el procedimiento que se menciona anteriormente en las mismas condiciones para cada una de las fibras. Este índice primero fue introducido por Zuba *et al.*, (2002) y después fue modificado por Hamm *et al.* (2003) de la siguiente manera:

$$F_{ij} = \frac{\sum_i H_{ij}}{k \sum_{ij} H_{ij}}$$

Donde F_{ij} es el índice de la capacidad de concentración de la fibra j para los analitos i , k es el número de fibras empleadas y H_{ij} el área o pico del analito i para la fibra j .



Figura 16. Equipo acoplado CG-EM-TOF utilizado (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM)

Tabla 5. Condiciones de análisis optimizadas.

Técnica de preparación de la muestra	Microextracción en fase sólida en la fase gaseosa (HS-SPME)
Microfibra utilizada	2cm 50/30µm DVB/CAR/PDMS Marca Supelco Lote P340030 No. Cat. 573-48-U.
Tiempo de exposición de la fibra	90 minutos para el fruto y 15 minutos para las hojas
Temperatura de la muestra	45-50°C (baño de agua)
Posición de la fibra en la extracción	En fase gaseosa (Headspace)

Tiempo de desorción en el inyector	3 minutos
------------------------------------	-----------

Tabla 6. Condiciones optimizadas para el análisis de las muestras.

Marca y modelo del equipo	LECO Pegasus 4D
Técnica analítica	CG-EM-TOF
Temperatura del inyector	300°C
Cromatógrafo de gases	Agilent 6890N
Columna capilar (fase)	DB5 10m x 0,18mm di x 0,18µm
Programación de la temperatura del horno	40°C (1munuto), 20°C/minuto hasta 300°C (5minutos)
Tipo de inyección	Split (con división de flujo) 1:20
Gas acarreador	Helio, Praxair, grado 5.0 (Ultra Alta Pureza)
Flujo del gas acarreador	1mL/minuto
Temperatura de la línea de transferencia	250°C
Tipo de ionización	Ionización electrónica (IE)
Analizador másico	Tiempo de vuelo (TOF)
Adquisición espectral	20 espectros/segundo
Retraso/encendido del filamento	0 minutos



Intervalo masas	33-400u
Temperatura de la cámara de ionización	200°C
Compuestos de calibración	Perfluoroterbutilamina (PFTBA)

4.1.6 Identificación de los compuestos volátiles.

La identificación de los compuestos volátiles se realizaron por medio de la comparación de sus espectros de masas con los de la bibliotecas electrónicas y en la literatura como Wiley y NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), así como en la comparación de sus índices de retención con los valores de la literatura y las co-inyecciones de hexanal puro, benzaldehído y heptanal que se adquirieron de Sigma Aldrich.



5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La primera parte del estudio consistió en la obtención de las condiciones óptimas para llevar a cabo el análisis de las muestras en la HS-SPME. Para ello, se realizó una investigación bibliográfica en diferentes artículos, así como la realización de varias pruebas en diferentes condiciones de temperatura y tiempo de extracción obteniendo finalmente las condiciones señaladas en el apartado anterior (Parte Experimental).

Asimismo, para la obtención de la fibra óptima para llevar a cabo el análisis de las muestras de las diferentes partes de la planta, se obtuvo el coeficiente F_{ij} , valor que señala la capacidad de obtención de los mayores componentes volátiles. Para ello se realizó con las condiciones finales, la microextracción en fase sólida con las diferentes fibras con las que se trabajó (DVB/CAR/PDMS, CAR/PDMS y PDMS).

A continuación se muestra en la Tabla 7, los componentes volátiles obtenidos para las fibras empleadas así como sus áreas.

Tabla 7. Áreas de los compuestos obtenidos de los frutos del capulín para las diferentes fibras.

Fibra DVB / CAR/PDMS (gris)	
Nombre del compuesto	Área
Ácido 2-oxo- propanoico	24,901,010
Hexanal	8,530,326
Acetato de butilo	1,265,288
2-Hexenal	46,213,717
Cardeno	524,393
2-Etil-furano	19,298

Tabla 7. Áreas de los compuestos obtenidos de los frutos del capulín para las diferentes fibras (continuación)	
Nombre del compuesto	Área
Benzaldehído	90,102,488
Éster 8,8-dimetoxi-oct-2-il del ácido 2-formil-4,6-dimetoxi-benzoico	16,775,486
2-Metil-3-(propioniloxi)propil propionate	18,043,483
6-Metil-5-hepten-2-ona	28,120,424
Metoximetil-benceno	71,808,062
1,2,3-Trimetil-benceno	27,39,266
(<i>E,E</i>)-2,4-Heptadienal	46,162
Octanal	41,20,794
Hemelitól	798,646
<i>m</i> -Cimeno	1,822,259
Eucalipto	1,701,318
2-Propil-1-pentanol	162,660
2-Etil-1,4-dimetil-benceno	319,979
1,2,3,4,5,8-Hexahidronaftaleno	1,002,575
<i>o</i> -Cimeno	3,134,340
Hidroatropaldehído	939,948
1-Etil-2,4-dimetilbenceno	1,342,964
Trans-1-fenil-1-buteno	1,869,034
1,2-Dietilbenceno	73,463
Nonanal	33,838,128
Dureno	390,540
2,4-Dimetil-estireno	196,582
1 <i>H</i> -2,3-dihidro-4-metil-indeno	74,320
Bencil-isopentil éter	30,181,634
Bencil-butil éter	30,466,535



Tabla 7. Áreas de los compuestos obtenidos de los frutos del capulín para las diferentes fibras (continuación)	
Nombre del compuesto	Área
2-Isobutilfenol	20,777,547
2-Propeniliden-ciclobuteno	15,348,029
(2Z)-Nonenal	357,211
Tetrahidronaftaleno	357,211
2-Octen-1-ol	525,842
Etil-benzoato	993,621
Isomentol	232,021
1 <i>H</i> -inden-metileno	314,214
<i>n</i> -Butil hexanoato	2,470,921
<i>n</i> -Hexil iso-butirato	2,583,083
Etil octanoato	336,466
Decanal	7,247,113
α -Ciclocitral	1,699,028
Metil tridecanoato	331,228
Hexil 2-metilbutirato	485,616
Etil benceneacetato	85,711
<i>L</i> (-)-Carvona	219,733
Dihidro-edulano	804,648
3,4-Metilen-dioxi-alilbenceno	1,215,626
Butil benzoate	833,848
Acetato de butil fenilato	732,132
α -Ionona	1,147,818
Metil tridecanoato	958,628
Palmitato de isopropilo	601,852
Fibra CAR / PDMS (azul)	

Tabla 7. Áreas de los compuestos obtenidos de los frutos del capulín para las diferentes fibras (continuación)	
Nombre del compuesto	Área
3-Hexanona	127,531
Hexanal	5,744,582
2-Hexenal	10,734,757
Metil hexanoato	621,342
Benzaldehído	10,776,229
Bencil éter de metilo	8,191,328
Hemelitól	1,326,837
<i>o</i> -Cimeno	161,485
1,2-Diisopropenilciclobutano	126,125
Eucalipto	361,519
Acetofenona	231,947
Metil-benzoato	349,930
Nonanal	83,006
Alcanfor	15,342
Bencil éter	1,620,100
Fibra PDMS (roja)	
Nombre del compuesto	Área
1,3,5-Cicloheptatrieno	187,008
Benzaldehído	86,965
Bencil-metil éter	591,084
<i>o</i> -Cimeno	10,819
<i>D</i> -Limoneno	796,303
Nonanal	252,756
<i>n</i> -Butil hexanoato	113,751
Metil tridecanoato	492,745



Tabla 7. Áreas de los compuestos obtenidos de los frutos del capulín para las diferentes fibras (continuación)

Nombre del compuesto	Área
Ácido <i>n</i> -hexadecanoico	306,087
Ácido octadecanoico	224,594

Para la obtención del índice de capacidad de concentración (F_{ij}) se obtuvo a partir de la siguiente manera:

$$F_{ij} = \frac{\sum_i H_{ij}}{k \sum_{ij} H_{ij}}$$

Donde F_{ij} es el índice de la capacidad de concentración de la fibra j para los analitos i , k es el número de fibras empleadas y H_{ij} el área o pico del analito i para la fibra j . A continuación, se muestran los valores obtenidos del índice F_{ij} para las fibras elegidas (Tabla 8).

Tabla 8. Valores del índice de capacidad de concentración F_{ij} de los frutos de *Prunus serotina* para las fibras empleadas.

Composición (diámetro)	Acrónimo	Color de fibra	F_{ij}
Divinilbencen-carboxen-polidimetilsiloxano	DVB / CAR/PDMS	Gris	2.75
Carboxen-polidimetilsiloxano	CAR / PDMS	Azul	0.23
Polidimetilsiloxano	PDMS	Roja	0.02

Como se puede observar en la tabla anterior (Tabla 8), la fibra de DVB/CAR/PDMS obtuvo el mayor valor para el índice de capacidad de concentración (F_{ij}) con un valor de 2.75, con lo cual se decidió emplear esta fibra



para el análisis de la microextracción en fase sólida. A continuación en las Figuras 17-19, se muestran los cromatogramas obtenidos para los frutos del capulín con las tres fibras empleadas y los compuestos obtenidos en cada una de ellas.

Posteriormente de haber seleccionado la fibra óptima para la realización de la microextracción en fase sólida, se prosiguió a la extracción de los compuestos volátiles presentes en las diferentes partes de la planta (semillas y frutos).

La determinación de los componentes volátiles de las semillas del capulín mediante la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases (Figura 20) acoplada a espectrometría de masas permitió la detección de cinco compuestos. El benzaldehído y el alcohol bencílico representaron los compuestos mayoritarios con el 91.93% y 7.57% del total de compuestos volátiles presentes, respectivamente. En la Tabla 9 se muestran los compuestos volátiles detectados, ordenados de acuerdo a sus tiempos de retención y el valor de los índices de retención de Kovats obtenidos en el análisis de la muestra.

Tabla 9. Compuestos volátiles detectados en las semillas de *Prunus serotina*.

Nombre	Área %	R.T. (s)	^a RI _e	^b RI _t	Similitud	^c Método de identificación
Benzaldehído	91.933	179.597	965	961	878	MS / KI
Alcohol bencílico	7.5706	192.447	1031	1035	892	MS / KI
Metoximetil benceno	0.034557	196.247	985	981	849	MS / KI
Nonanal	0.0272	240.597	1101	1096	927	MS / KI
Éster metílico del ácido acético	0.33348	261.697	531	525	935	MS / KI

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5.

(a): Índice de retención experimental redondeado.

(b): Índice de retención teórico.

(c): MS= Espectrometría de masas y KI= Índice de Kovats.



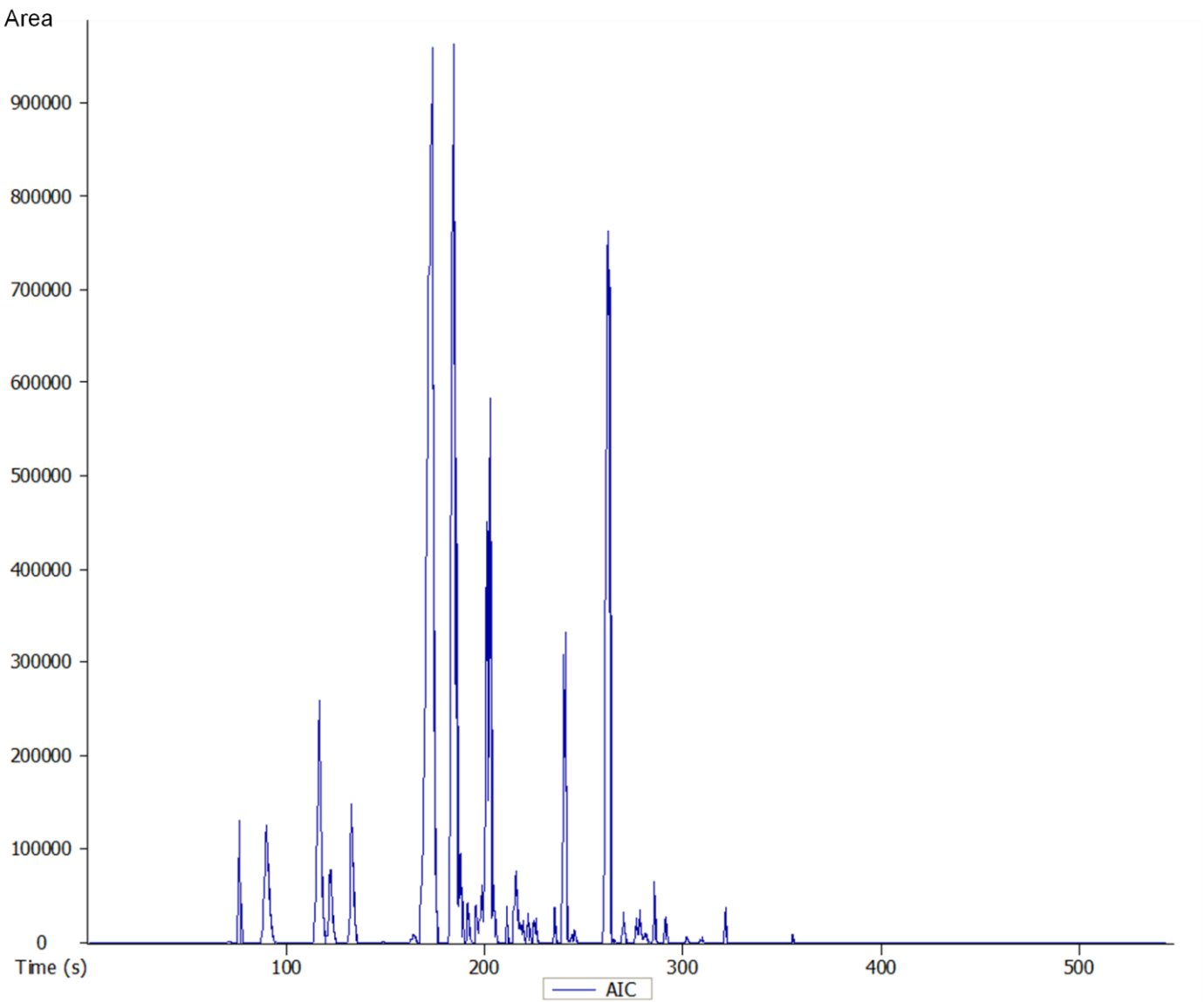


Figura 17. Cromatograma de los frutos de *P. serotina* con la fibra DVB/CAR/PDMS.

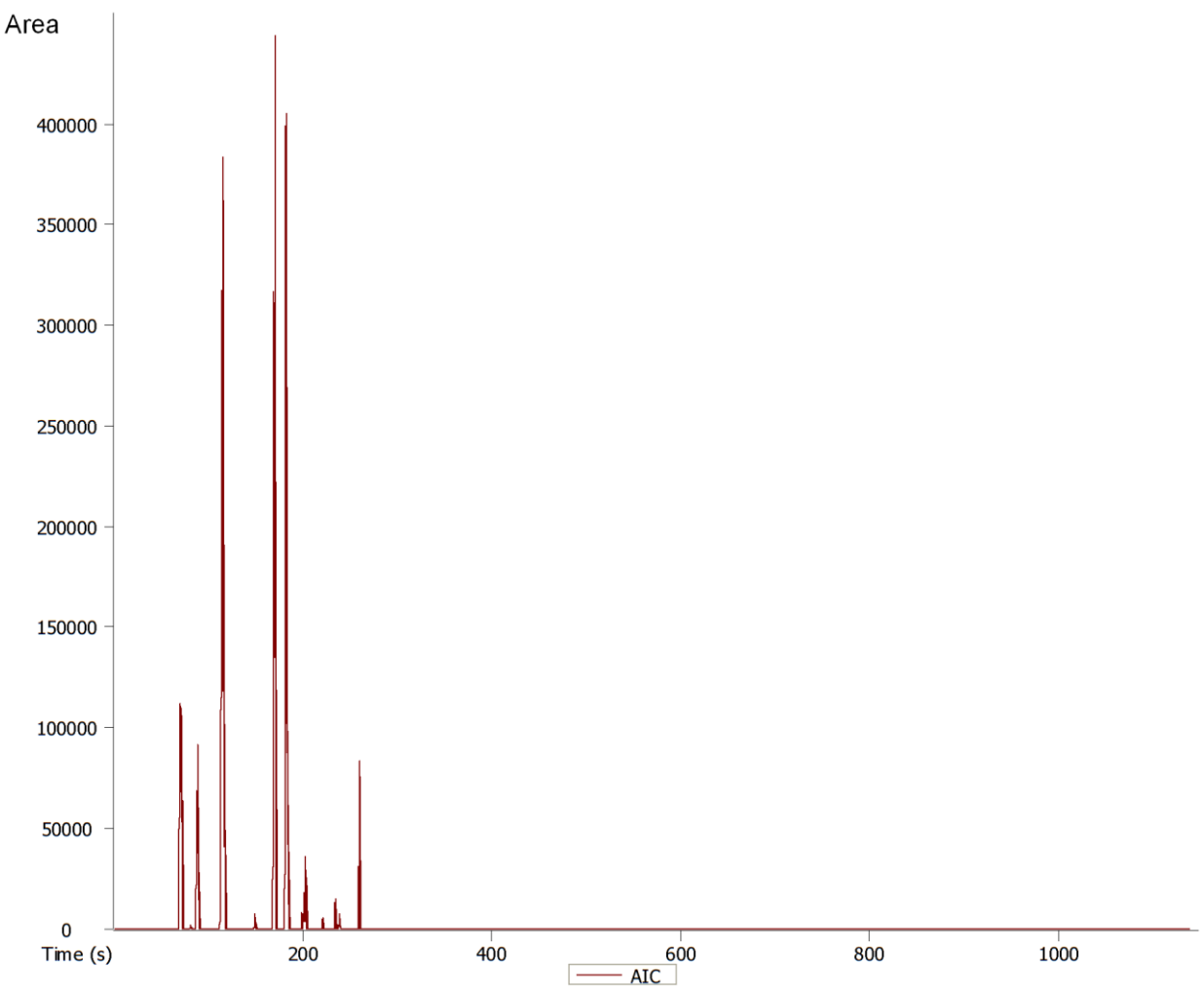


Figura 18. Cromatograma de los frutos de *P. serotina* con la fibra CAR/PDMS.



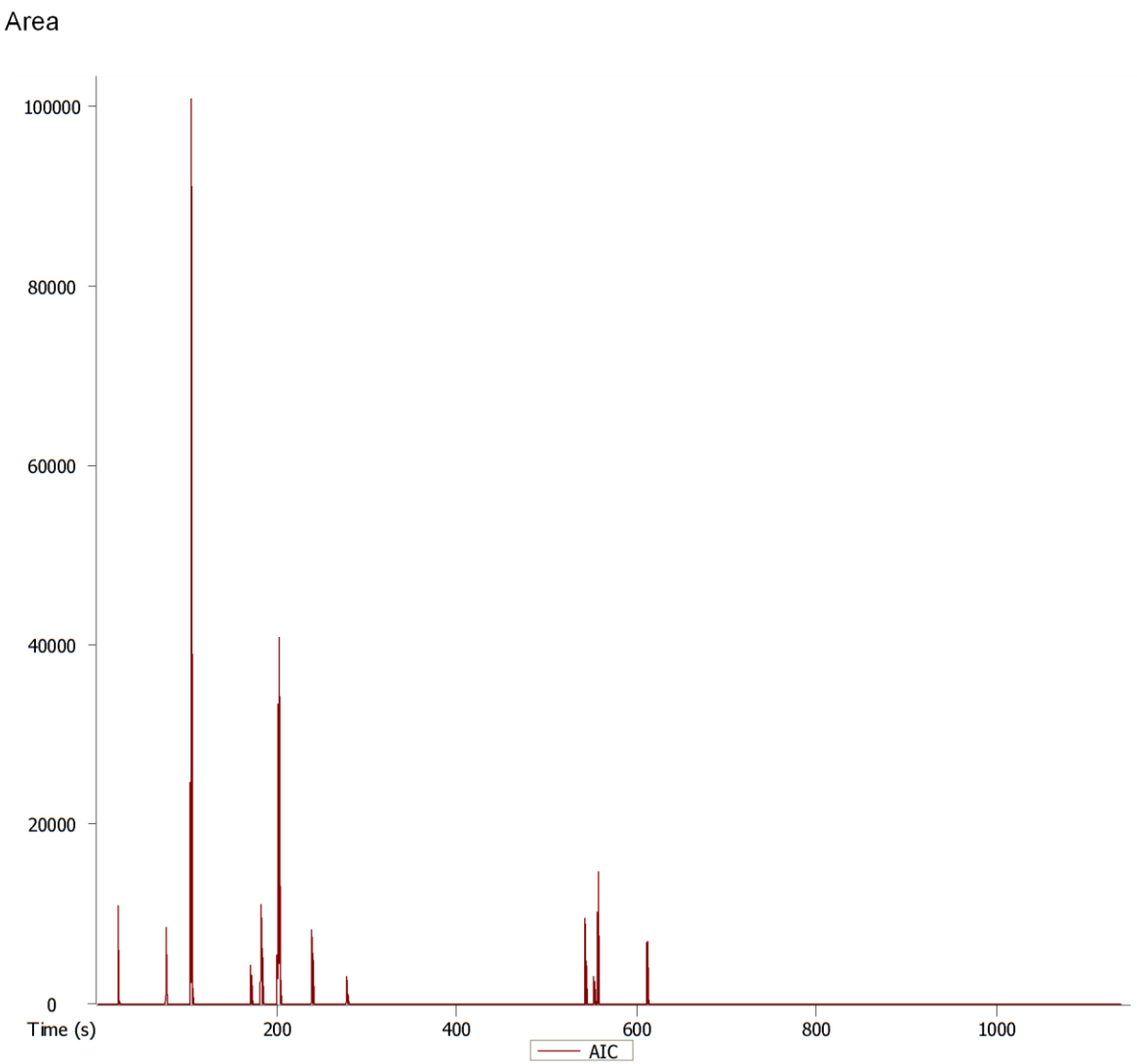


Figura 19. Cromatograma de los frutos de *P. serotina* con la fibra PDMS.



Por otra parte, se detectaron 68 compuestos volátiles presentes en los frutos de *Prunus serotina* mediante la técnica de microextracción en fase sólida y cromatografía de gases (Figura 21) acoplada a espectrometría de masas.

El benzaldehído y el eucalipto resultaron ser los componentes mayoritarios en el fruto con un 20.98% y 7.43% del total de los componentes, respectivamente. En la Tabla 10 se muestran los compuestos volátiles detectados, ordenados de acuerdo a sus tiempos de retención, así como el valor de los índices de retención de Kovats teóricos y experimentales.

Adicionalmente, se realizó la obtención de los componentes volátiles de las flores de *P. serotina* (capulín) empleando la misma técnica para las semilla y los frutos, con la finalidad de obtener una mayor información acerca de este material vegetal debido a que no se tiene mucha información sobre las semillas del capulín. A continuación, en la Tabla 11 se pueden observar los componentes volátiles de las flores del capulín; y en la Figura 22, el cromatograma obtenido de las flores.

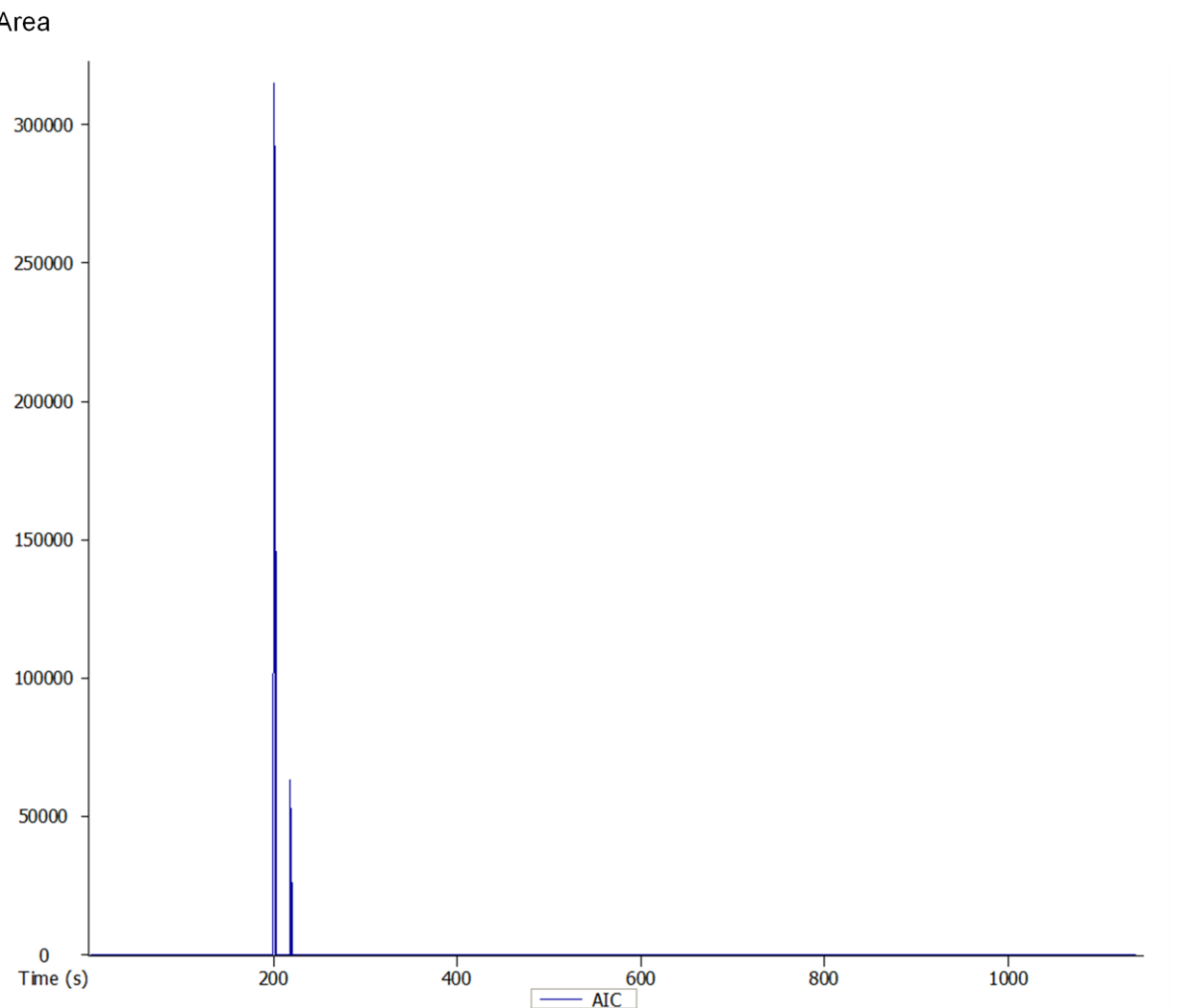


Figura 20. Cromatograma de las semillas de *P. serotina*.

Resultados y Discusión

Tabla 10. Compuestos volátiles detectados en los frutos de *Prunus serotina*.

Nombre	Área %	R.T. (s)	^a R _{I_e}	^b R _{I_t}	Similitud	^c Método de identificación
Hexanal	0.074214	84.325	785	784	877	MS / KI
2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-2-eno	4.7567	148.925	916	939	951	MS / KI
α -Pino	1.47888	153.175	925	939	911	MS / KI
β -Pino	2.2629	172.725	962	980	882	MS / KI
5,6-Dimetil-cicloocteno	2.8793	173.075	963	-	699	MS
Benzaldehído	20.97674	174.825	966	966	859	MS / KI
Butil éster del ácido 4-imidazolacético	0.36927	183.175	982	-	734	MS
1-metil-4-(1-metiletilideno)-ciclohexeno	0.06919	196.125	1008	1088	779	MS / KI
1,4-dicloro-benceno	0.011575	196.625	1009	1015	757	MS / KI
2-propil-furano	0.0018036	197.675	1011	861	659	MS / KI
1-metil-4-(1-metiletil)-benceno	1.6373	201.725	1020	1026	859	MS / KI
Limoneno	6.9545	203.625	1024	1031	767	MS / KI
Eucalipto	7.4287	205.775	1029	1033	867	MS / KI
(α -Pino)- 2,6,6-trimetil-biciclo[3.1.1]hept-2-eno	0.86772	206.275	1030	939	883	MS / KI
α -Felandreno	0.48581	215.575	1049	1005	845	MS / KI
4-etil-1,4-dimetil-2-Ciclohexen-1-ol	0.229822	221.325	1062	-	833	MS
5-etildihidro-2(3H)-furanona	0.12677	222.075	1063	1066	891	MS / KI
3,7-dimetil-1,6-octadien-3-ol	0.071685	238.725	1099	1098	831	MS / KI

Resultados y Discusión

Tabla 10. Compuestos volátiles detectados en los frutos de *Prunus serotina* (continuación)

Nombre	Área %	R.T. (s)	^a RI _e	^b RI _t	Similitud	^c Método de identificación
2-(1,1-dimetil-2-pentenil)-1,1-dimetil-ciclopropanona	1.2783	250.075	1123	-	695	MS
N-(3-Ethylpentyn-3-yl)pyrrolidine	1.4166	250.175	1123	-	743	MS
1,2,6,6-tetrametil-1,3-ciclohexadieno	3.156	250.825	1124	999	897	MS / KI
4-Acetil-1-metilciclohexeno	0.074097	252.825	1128	-	896	MS
5,6-Epoxi-2,2-dimetil-3-heptino	0.17594	252.625	1129	-	717	MS
1,2,6,6-tetrametil-1,3-ciclohexadieno	0.65378	255.825	1135	999	906	MS / KI
4-metil-1-(1-metilet)-3-ciclohexen-1-ol	0.31432	275.275	1176	1177	827	MS / KI
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	0.79194	283.425	1194	1192	925	MS / KI
Acetato de fenchilo	0.14434	290.275	1209	1205	946	MS / KI
4-cloro-3-nitro-ter-butoxicarbonilhidrazon-benzaldehído	0.029794	297.875	1227	-	924	MS
Metil trans-2-(3-ciclopropil-7-norcaranil)acetato	0.071753	307.925	1251	-	784	MS
3,5-Dimetoxitolueno	0.047948	312.575	1262	1264	840	MS / KI
2-Acetil-2-metil-succinonitrilo	0.009011	315.475	1269	-	797	MS
(-)-Trans-acetato de pinocarvilo	0.11287	323.875	1289	1297	875	MS / KI
3-[(<i>Z</i>)-1-Butenil]-4-vinilciclopenteno	0.32216	379.075	1424	-	733	MS
Aromadendreno	5.8838	387.125	1447	1439	902	MS / KI
7,11-dimetil-3-metilen-(<i>E</i>)-1,6,10-dodecatrieno	0.2794	390.525	1457	1458	680	MS / KI
<i>Z,Z,Z</i> -1,5,9,9-tetrametil-1,4,7,-cicloundecatrieno	5.7204	392.425	1462	-	832	MS

Resultados y Discusión

Tabla 10. Compuestos volátiles detectados en los frutos de *Prunus serotina* (continuación)

Nombre	Área %	R.T. (s)	^a RI _e	^b RI _t	Similitud	^c Método de identificación
1-Bromo-ciclopentano	0.46908	415.525	1528	-	639	MS
α-Cariofileno	1.1206	415.725	1529	1491	630	MS / KI
1,5,9,9-tetrametil-(Z,Z,Z)1,4,7,-Cicoundecatrieno	0.51722	416.175	1530	-	660	MS
3,4-dihidro-4,4,6,8-tetrametil-cumarina	0.77832	420.525	1543	-	636	MS
(1S-cis)-1,2,3,5,6,8a-hexahidro-4,7-dimetil-1-(1-metiletil)-naftaleno	0.73968	420.625	1543	1524	876	MS / KI
α-Vatireno	1.4718	421.275	1545	-	685	MS
1,2,3,4,4α,7-hexahidro-1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno	0.40572	422.875	1549	-	912	MS
4,5,9,10-dehidro-isolongifoleno	0.23154	423.325	1551	-	605	MS
cis-α-Bisaboleno	2.2193	423.925	1552	1530	834	MS / KI
α-Calacoreno	0.3578032	425.825	1558	1548	769	MS / KI
7,7-dimetil-2-metilen-biciclo[2.2.1]heptano	0.011878	427.175	1562	953	834	MS / KI
3,7,11-trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	0.53267	429.975	1570	1570	915	MS / KI
1-bromo-4-metil- biciclo[2.2.2]octano	0.14035	431.375	1574	-	679	MS
Epiglobulol	0.14035	431.525	1574	1580	854	MS / KI
11,11-dimetil-espiro[2,9]dodeca-3,7-dieno	0.75445	435.525	1586	-	830	MS
Alcohol cariofilénico	0.041837	436.375	1588	-	783	MS
Z,Z,Z-1,4,6,9-Nonadecatetraeno	0.76616	438.225	1593	-	607	MS
(-)-Globulol	0.59907	439.275	1596	1576	802	MS / KI

Resultados y Discusión

Tabla 10. Compuestos volátiles detectados en los frutos de *Prunus serotina* (continuación)

Nombre	Área %	R.T. (s)	^a RI _e	^b RI _t	Similitud	^c Método de identificación
1,8-Ciclopentadecadino	0.074739	444.525	1611	-	773	MS
2,3,4,4 α ,5,6,7,8-octahidro- α , α ,4,8-tetrametil-[2 <i>R</i> -(2 α ,4 α ,8 α)]- 2-naftalen-metanol	0.0011523	445.625	1615	-	674	MS
Cadala-1(10),3,8-trieno	0.1989	449.075	1624	-	771	MS
[1 <i>R</i> -(1 α ,4 α ,8 α)]- decahidro-1,4-dimetil-7-(1-metil-etiliden)-1-naftalenol	5.28811	449.925	1627	-	833	MS
Oxido de Ledeno (II)	0.76258	452.675	1635	-	792	MS
Cedreno	0.76258	452.875	1635	1410	824	MS / KI
1,2,3,4,5,6,7,8-octahidro- α , α ,3,8-tetrametil-5-azulen-metanol	0.013461	454.075	1639	-	819	MS
4,5,9,10-dehidro-isolongifoleno	0.99617	458.075	1650	-	689	MS
τ -Murolol	0.20352	459.625	1655	1640	890	MS / KI
1,6-dimetil-4-(1-metiletil)-naftaleno	0.017894	468.225	1679	1677	913	MS / KI
α -Bisabolol	0.16862	471.775	1689	1688	792	MS / KI
Longipinocarbono	0.079742	490.675	1744	1747	823	MS / KI

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5.

(a): Índice de retención experimental redondeado.

(b): Índice de retención teórico.

(c): MS= Espectrometría de masas y KI= Índice de Kovats.

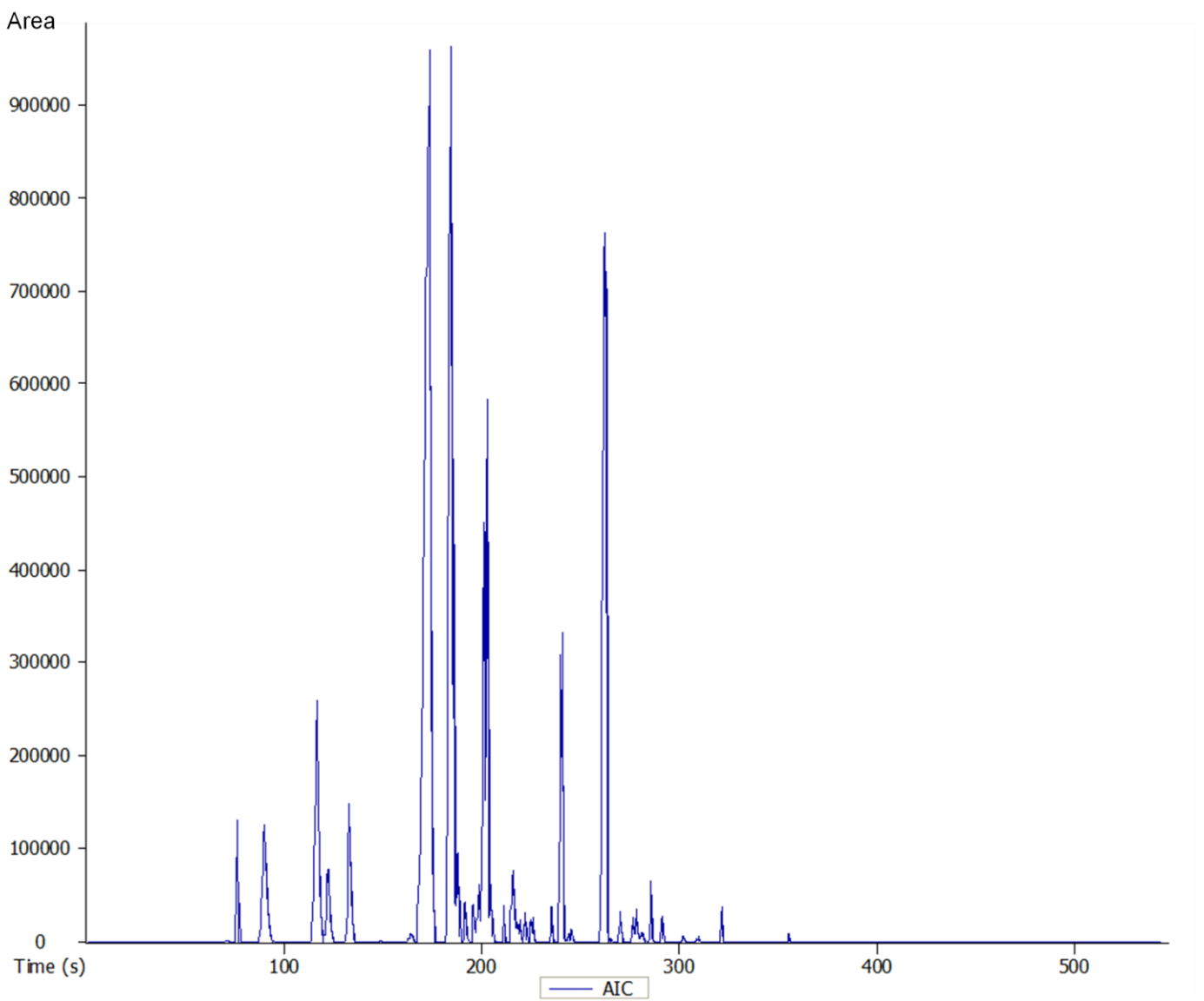


Figura 21. Cromatograma de los frutos de *P. serotina*.



Tabla 11. Componentes volátiles de las flores de *Prunus serotina* (capulín) encontrados por la técnica de microextracción en fase sólida.

Nombre	^a RI _e	^b RI _t	Área %	R.T. (s)	^c Método de identificación
Benzaldehído	982	996	87.217	278.628	MS / KI
Benzoato de metilo	1118	1091	1.4554	358.228	MS / KI
Nonanal	1125	1102	1.4554	362.328	MS / KI
Bencen-etanol	1144	1060	1.8181	372.228	MS / KI
(<i>E,Z</i>)-2,6-Nonadienal	1172	1159	1.6221	387.728	MS / KI
Salicilato de metilo	1510	1518	2.9817	407.228	MS / KI
<i>p</i> -Anisaldehído	1287	1252	1.6233	440.328	MS / KI
2-Metoxi-3-(2-propenil)-fenol	1372	1444	1.8266	477.178	MS / KI

R. T. (s): Tiempo de retención en segundos. Los compuestos volátiles que se encontraron e identificaron fueron a través del uso de la columna capilar DB-5.

(a): Índice de retención experimental redondeado.

(b): Índice de retención teórico.

(c): MS= Espectrometría de masas y KI= Índice de Kovats.

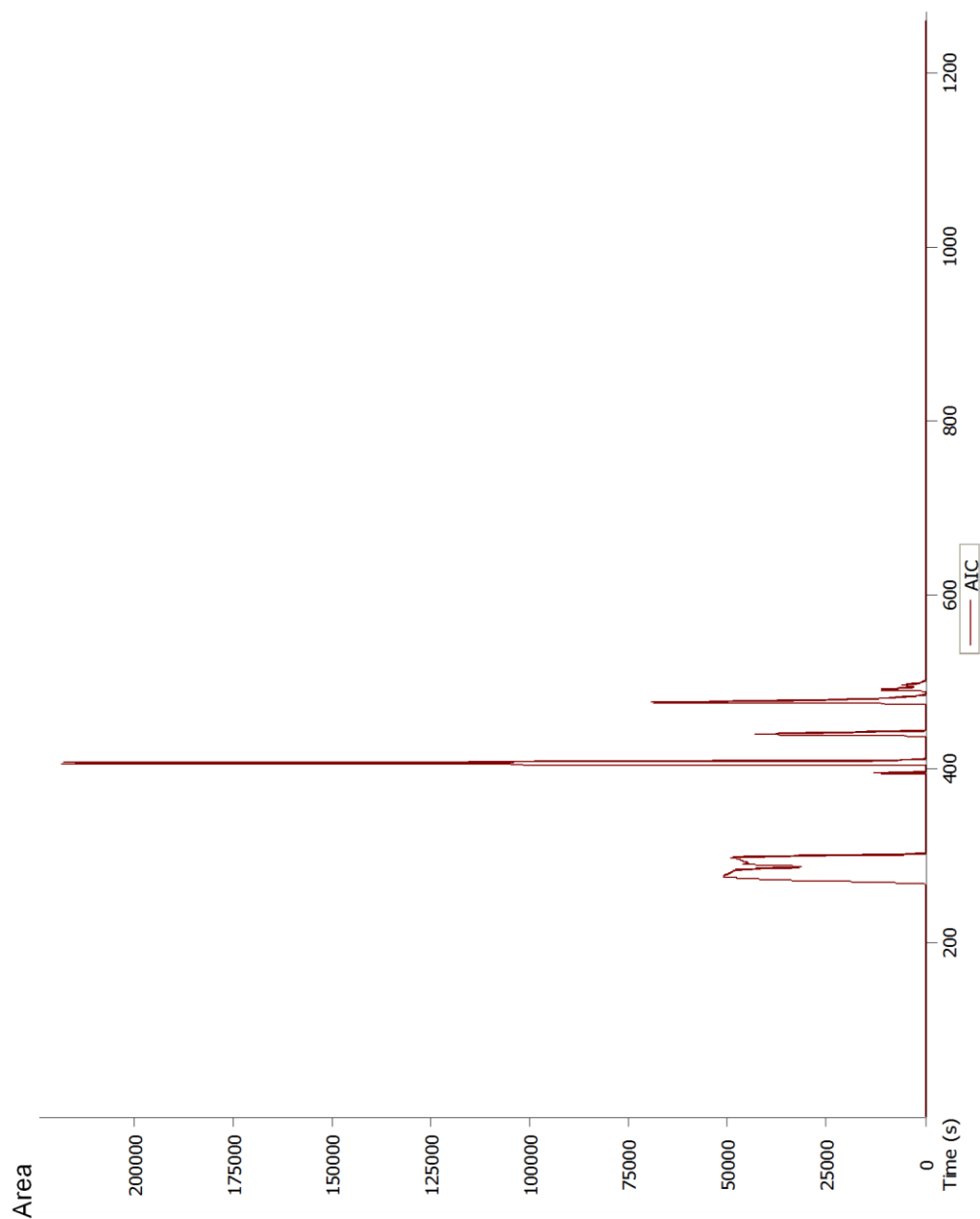


Figura 22. Cromatograma de las flores de *P. serotina*.

Cabe mencionar que para la realización de la identificación de los componentes volátiles de las muestras analizadas, se realiza una comparación de los espectros de masas de los compuestos experimentalmente obtenidos con los compuestos que se encuentran en la base de datos del software empleado; de esta manera se conoce el componente obtenido, y para tener una certeza mayor, lo que se realiza es una nueva comparación de los índices de Kovats a través del uso de las bibliotecas electrónicas y en la literatura como Wiley y NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología).

Como podemos observar en la Figura 23, los espectros de masas para el benzaldehído son muy parecidos, y como se muestra en dicha figura, la similitud que existe entre el espectro experimental del teórico (Adams, 2001) es mayor, con un valor de 930 (93.0%), con lo cual se puede confirmar la presencia de dicho componente.

Para la obtención de los índices de Kovats, lo que se realiza es la inyección de una co-elución de estándares de *n*-alcanos (C₈-C₂₄) y posteriormente, al realizar la inyección de la fibra, lo que se realiza es una separación de los compuestos que se van obteniendo de acuerdo al número de átomos de carbono que contiene cada compuesto y, con el tiempo de retención de cada componente con la fase móvil, el software realiza los cálculos requeridos para obtener el índice de retención de Kovats y, finalmente realizar la comparación de éstos con los que se encuentran en las librerías electrónicas. En la Figura 24, se muestra a manera de ejemplo, la manera en la que se realiza la obtención de los índices de Kovats (En este caso se ejemplifica con los frutos del capulín).

Resultados y Discusión

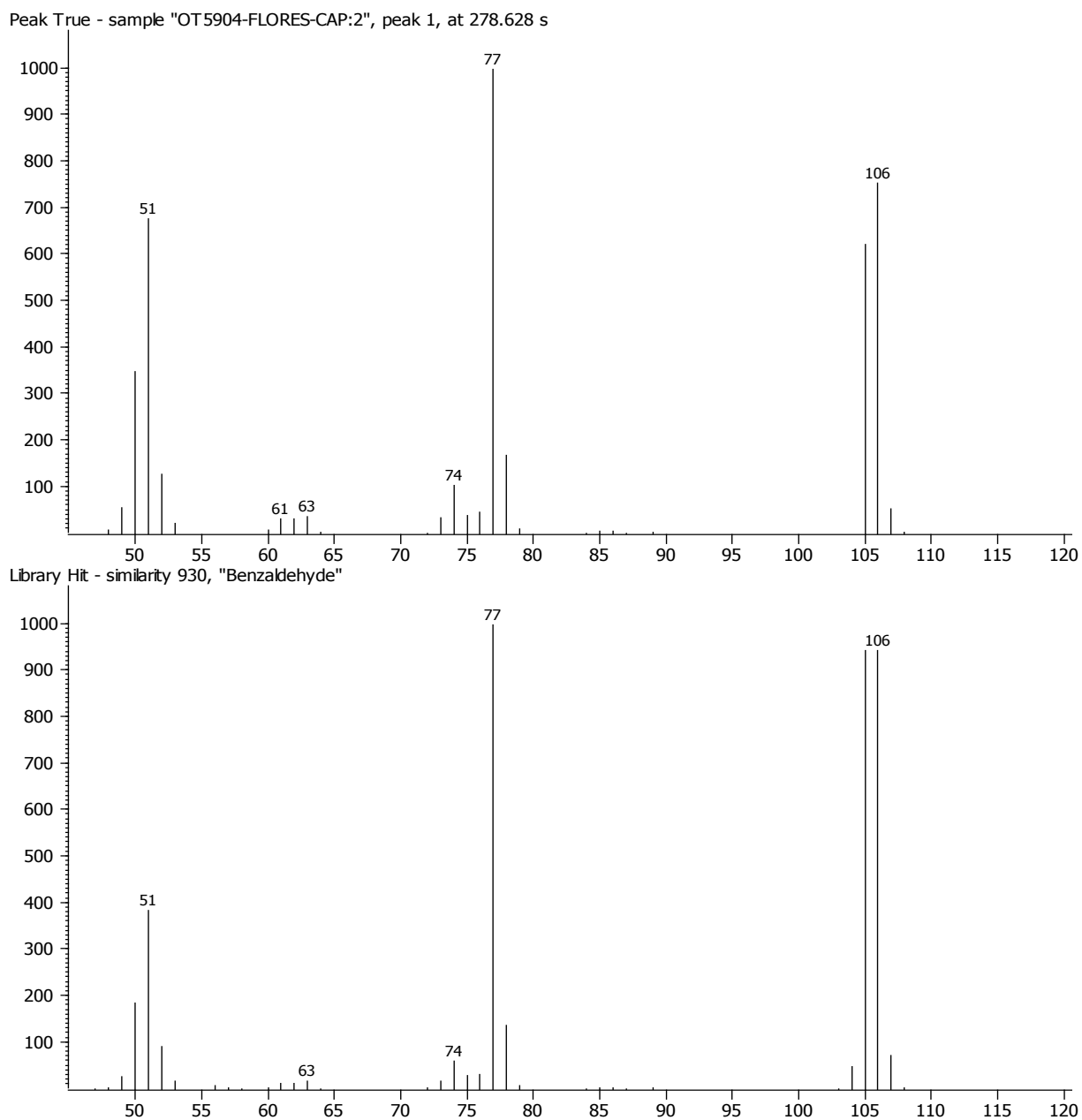


Figura 23. Espectros de masas del benzaldehído (Arriba: Espectro obtenido experimentalmente. En medio: Espectro obtenido de la librería. Abajo: Comparación del teórico y del experimental para su identificación).

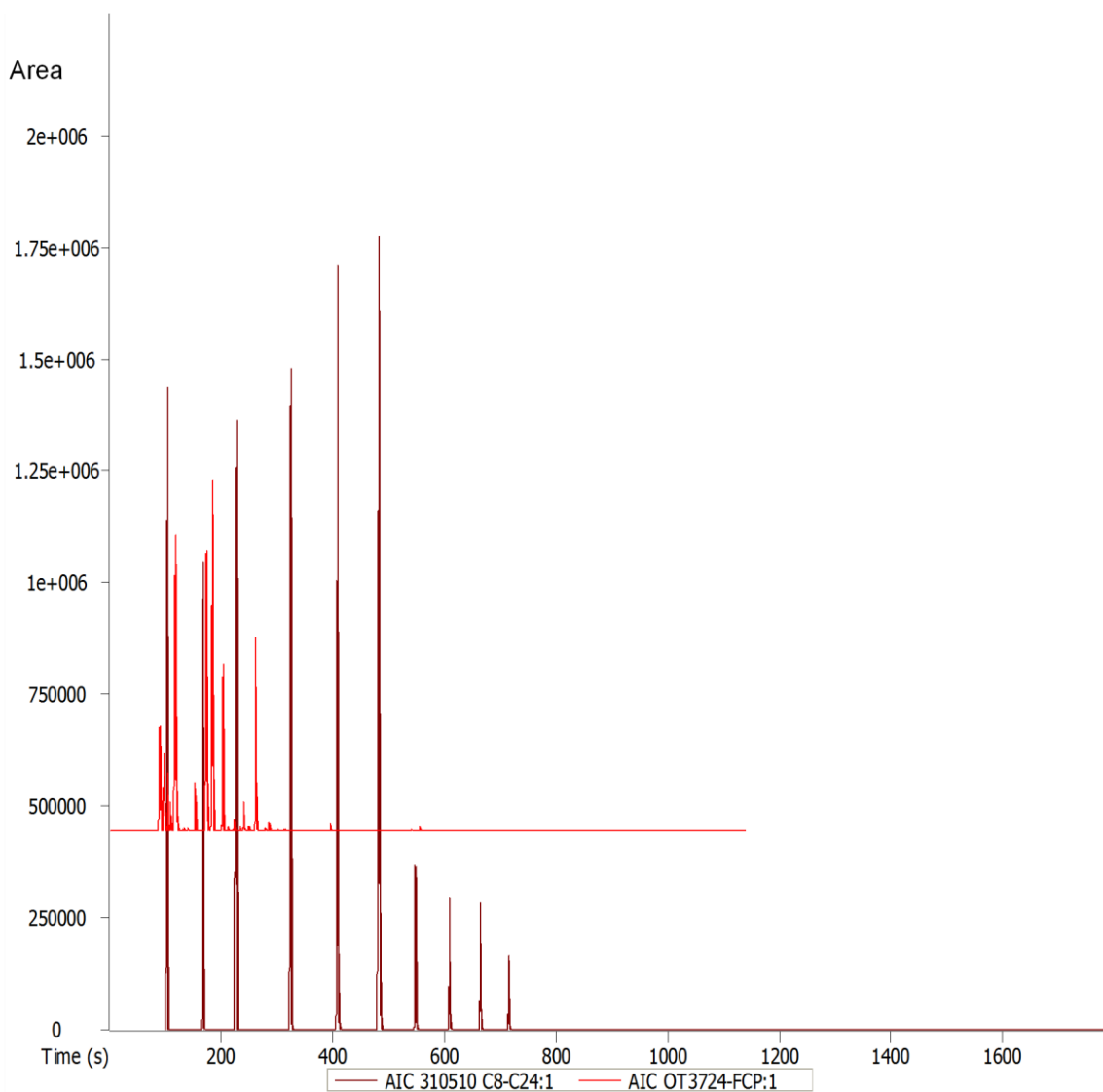


Figura 24. Comparación del cromatograma de los estándares empleados (color negro) con el cromatograma obtenido de los frutos del capulín (color rojo) para la obtención de los índices de Kovats.

El benzaldehído se encuentra en mayor concentración en las diferentes partes de la planta analizada, debido a que este componente es el resultado del metabolismo que sufre la amigdalina, diglucósido cianogénico, que se encuentra en forma natural en varias especies de plantas de la familia Rosaceae incluidas, las del género *Prunus* (Santamour, 1998).

La biotransformación de la amigdalina durante el desarrollo normal de la planta conlleva a la generación del benzaldehído como un producto de degradación (Figura 25). Asimismo, la degradación también se lleva a cabo durante el proceso de la pulverización de las hojas del capulín por acción de las enzimas amigdalina hidrolasa (AH), prunasina hidrolasa (PH) y mandelonitril-liasa (MDL) (Li, 1992; Swain, 1994).

Asimismo, la presencia del benzaldehído como componente volátil mayoritario de la semilla de *P. serotina* resulta importante desde el punto de vista farmacológico, debido a que se ha encontrado que este compuesto tiene un significativo efecto vasodilatador (Ibarra-Alvarado *et al.* 2009), lo cual sugiere que esta semilla posee potenciales efectos benéficos en la terapia de los padecimientos cardiovasculares.

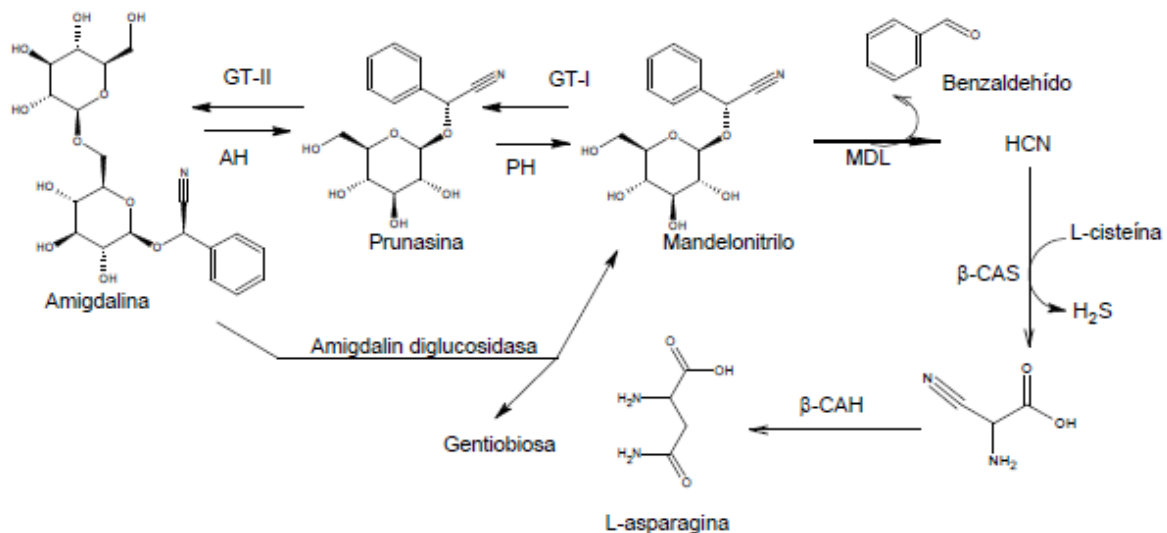


Figura 25. Metabolismo de la amigdalina en *Prunus serotina* durante su crecimiento y la liberación de benzaldehído. GT: glucosiltransferasa, β-CAS: β-cianoalanina sintasa, β-CAH: β-cianoalanina hidrolasa.



6. RESUMEN Y CONCLUSIONES

- ❖ Se desarrolló y optimizó el método analítico para la extracción y concentración de los compuestos volátiles de las muestras de las semillas y los frutos, utilizando la técnica de Microextracción en Fase Sólida en la fase gaseosa (HS-SPME).
- ❖ Se desarrolló y optimizó el método analítico para la separación, detección e identificación de los compuestos extraídos en la fase gaseosa empleando la técnica analítica instrumental GC-MS-TOF.
- ❖ Se realizó la comparación con la biblioteca NIST y se determinaron los índices de retención de Kovats para los compuestos encontrados como un dato adicional para su identificación.
- ❖ Se logró la identificación de los componentes volátiles en las semillas y los frutos de *Prunus serotina*; obteniendo 5 componentes volátiles en las semillas y 98 componentes en los frutos, siendo el benzaldehído el compuesto mayoritario en ambas partes del capulín.
- ❖ Adicionalmente, se obtuvieron los componentes volátiles presentes en las semillas del capulín, con la finalidad de obtener una información suplementaria acerca de la planta estudiada.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar una comparación de la concentración de los componentes volátiles encontrados en *Prunus serotina* mediante otras técnicas instrumentales, por ejemplo, mediante una cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- ✓ Realizar el análisis de la actividad biológica sobre los compuestos mayoritarios en cada parte de la planta.
- ✓ Emplear la técnica utilizada para la determinación de los componentes volátiles de diferentes especies vegetales con el fin de ayudar con la investigación científica de éstas.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. *Identification of essential oils by ion trap mass spectroscopy*. Academic Press. New York, 1989.

ADAMS, R. P. *Identification of essential oils by gas chromatography/quadrupole mass spectrometry*. 3rd edition. Carol Stream, Illinois: allured Publishing Corporation, 2001.

ALPENDURADA, M.F. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A.*, **2000**. 889: 3-14.

ALVES, G.L. y FRANCO, M. R. B. Headspace gas chromatography spectrometry of volatile compounds in murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich). *Journal of Chromatography A*, **2003**. 985: 297-301.

ARANDA, R.; KRUUS, P.; BURK, R.C. Assessment of polycrystalline graphites as sorbents for solid-phase microextraction of nonionic surfactants. *Journal of Chromatography A.*, **2000**. 888: 35-41.

ARGUETA, V. A. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, Instituto Nacional Indigenista, **1994**. 1786: 319-320.

ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry*, **1990**. 62:2145-2148.

BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; JANSSEN, H.-G.; CRAMERS, C. Study into the Equilibrium Mechanism between Water and Poly(dimethylsiloxane) for Very Apolar Solutes: Adsorption or Sorption? *Analytical Chemistry*, **1999**. 71:5213 - 5216.



BARQUERO Quirós, Miriam. Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases. 1ª Edición. Editorial Universidad de Costa Rica. Costa Rica, 2006. Pp. 28-30.

BARTAK, P.; CAP, L. Determination of phenols by solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, **1997**. 767:171-175.

CAI, J.; LUI, B. y SU, Q. Comparison of simultaneous distillation extraction and solid-phase microextraction for the determination of volatile flavor compounds. *Journal of Chromatography A*, **2001**. 930:1-7.

CARRAPISO, AI. VENTANAS, J. S. y GARCÍA, C. Characterization of the most aroma-active components of Iberian ham headspace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50: 1996-2000.

CARRIÓN, M.N.; SANTOS, F.J.; GALCERÁN, M.T. Determination of chlorophenols by solidphase microextraction and liquid chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, **2002**. 947: 155-165.

CEVA-Antunes, Patricia M. N. RIBEIRO Bizzo, Humberto. SILVA, Alberdan S. CARVALHO, C. P. S. y ANTUNES, O. A. C. Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME). *LWT*, **2006**. 39: 436-442.

CHEN, J.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **1995**. 67: 2530-2533.

CONSTANT, M. Headspace gas chromatography profiles of fruit flavored malt beverages using solid-phase microextraction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **1997**. 55: 112-118.



DOONG, R.A.; LIAO, P.L. Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in soil samples using headspace solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A.*, **2001**. 918:177-188.

FERRARI, R.; NILSSON, T.; ARENA, R.; ARLATI, P.; BARTOLUCCI, G.; BASLA, R.; CIONI, F.; DEL CARLO, G.; DELLAVEDOVA, P.; FATTORE, E.; FUNGI, M.; GROTE, C.; GUIDOTTI, M.; MORGILLO, S.; MÜLLER, L.; VOLANTE, M. Interlaboratory validation of solid-phase microextraction for the determination of triazine herbicides and their degradation products at ng/L level in water samples. *Journal of Chromatography A.*, **1998**. 795:371-376.

FLORES Menéndez, J. C. FERNÁNDEZ Sánchez, M. L. FERNÁNDEZ Martínez, E. SÁNCHEZ Uría, J. E. y SANZ-Medel, A. Static headspace versus headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) for the determination of volatile organochlorine compounds in landfill leachates by gas chromatography. *Talanta*, **2004**. 66: 809-814.

FRIES, Eike y PÜTTMANN, Wilhelm. Improvement of HS-SPME for analysis of volatile organic compounds (VOC) in water samples by simultaneous direct fiber cooling and freezing analyte solution. *Anal Bioanal Chem*, **2006**. 386: 1497-1503.

GORECKI, T.; PAWLISZYN, J. Determination of tetraethyllead and inorganic lead in water by solid phase microextraction/Gas chromatography. *Analytical Chemistry*, **1996**. 68: 3008-3014.

HALL, B.; BRODBELT, J. Determination of barbiturates by solid-phase microextraction (SPME) and ion trap gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.*, **1997**. 777: 275-282.

HARRIS, Daniel C. Análisis químico cuantitativo, 3ª Edición. Editorial Reverté. México, 2003. Pp. 517-518, 528-532.



HINSHAW, J. V. Solid-Phase Microextraction. GC Connections. U.K. 2003, Pp. 2-5.

HOLT, R. U. Mechanisms effecting analysis of volatile flavor components by solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A.*, **2001**. 937:107-114.

IBAÑEZ, E.; LÓPEZ-Sebastián, S.; RAMOS, E.; TABERA, J.; REGLERO, G. Analysis of volatile fruits components by headspace solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, **1998**. 63:281-286.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A.*, **2000**. 800:35-62.

KOSTER, E.H.M., CRESCENZI, C., DEN Hoedt, W., ENSING, K. y DE Jong, G.J. Fibers Coated with Molecularly Imprinted Polymers for Solid-Phase Microextraction. *Analytical Chemistry*, **2001**. 73: 3140-3145.

KOVATS, E. Gas chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. In J. C. Giddings & R. A. Keller (Eds)., *Advances in Chromatography I*. New York, 1965. Pp. 229-247.

KROGH, M.; GREFSLIE, K.E.; RASMUSSEN, K.E. Solvent-modified solid-phase microextraction for the determination of diazepam in human plasma samples by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography B.*, **1997**. 689:357-364.

LLOMPART, M., LI, K. y FINGAS, M. Headspace solid phase microextraction (HS/SPME) for the determination of volatile and semivolatile pollutants in soils. *Talanta*. **1999**. 48:451-459.

LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A.*, **2000**. 885: 153-193.

MANGANI, F. y CENCIARINI, R. Solid phase microextraction using fused silica fibers coated with graphitized carbon black. *Chromatographia*, **1995**. 41:678-684.

MARTÍ, M.P., MESTRES, M., SALA, C., BUSTOS, O. y GUASCH, J. Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Olfactometry analysis of successively diluted samples. A new approach of the aroma extract dilution analysis applied to the characterization of wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51: 7861-7865.

MARTÍNEZ, Maximino. Catálogo de nombres vulgares y científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, 1987. Pp. 156-158.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). [En línea] <http://webbook.nist.gov/chemistry/> [Actualización continua].

NEGRAO, R.; ALPENDURADA, M.F. Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction - high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Journal of Chromatography A.*, **1998**. 823: 211-218.

NELLY, M.T.; LARROQUE, M. Trace determination of diethylphthalate in aqueous media by solid-phase microextraction-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A.*, **1999**. 841: 177-185

NEZHADALI, A. y ZARRABI-Shirvan B. Separation, identification and determination of volatile compounds of *Ziziphora persica* Bunge using HS-SPME/GC-MS. *International Journal of Environmental Science and Development*, **2010**. 2: 115-118.



OLSZEWSKA, M. Quantitative HPLC Analysis of Flavonoids and Chlorogenic Acid in the Leaves and Inflorescences of *Prunus serotina* Ehrh. *Acta Chromatographica*, **2007**. 19: 253-269.

ORDAZ-Galindo, Alejandro; WESCHE-Ebeling, Pedro; WROLSTAD, Ronald E. RODRIGUEZ-Saona, Luis; ARGAIZ-Jamet, Alvaro. Purification and identification of Capulin (*Prunus serotina* Ehrh) anthocyanins. *Food Chemistry*, **1999**. 65:201-206.

PAWLISZYN, J. *Applications of solid phase microextraction*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1999.

PAWLISZYN, J. *Solid phase microextraction, theory and practice*, Wiley-VCH, New York, 1997.

PEÑALVER Herrando, A. *Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental*. Tesis de Doctorado. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, 2002.

PEÑALVER, A.M.; POCURULL, E.; BORRULL, F.; MARCÉ, R.M. Solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography to determine phenolic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A.*, **2002**. 953: 79-87.

PERRAUDIN F.; POPOVICI, J.; BERTRAND, C. Analysis of headspace-solid microextracts from flowers of *Maxillaria tenuifolia* Lindl., by GC-MS. *Electronic Journal of Natural Substances I*, **2006**. 1-5.

PILLONEL, L.; BOSSET, J.O.; TABACCHI, R. Rapid preconcentration and enrichment techniques for the analysis of food volatile. A Review. *Lebensm.-Wiss.u.Technol.*, **2002**. 35: 1-14.

POERSCHMANN, J.; GORECKI, T.; KOPINKE, F.D. Sorption of very hydrophobic organic compounds onto poly(dimethylsiloxane) and dissolved humic organic



matter. 1. Adsorption or partitioning of VHOC on PDMS-coated solid-phase microextraction fibers - A never-ending story? *Environmental Sci. Tech.* **2000**. 34:3824-3830.

POPOVICI, J.; BERTRAND, C.; BAGNAROL, E.; FERNANDEZ, M. P.; COMTE, G. Chemical composition of essential oil and headspace-solid microextracts from fruits of *Myrica gale* L., and antifungal activity. *Natural Product Research*, **2008**. 22:1024-1032.

QIAN, M. y REINECCIUS, G. Potent aroma components in Parmigiano Reggiano chesse studied using a dynamic headspace (purge-trap) method. *Flavor Frang J.*, **2003**. 51: 252.

RANDRIANARIVELO, Roger; SARTER, Samira; ORDOUX, Eric; BRAT, Pierre; LEBRUN, Marc; ROMESTAND, Bernard; MENUT, Chantal; SAHONDRA Andrianoelisoa, Hanitriniaina; REHERIMANDIMBY, Marson; DANTHU, Pascal. Composition and antimicrobial activity of essential oils of *Cinnamosma fraganas*. *Food Chemistry*, **2009**. 114:680-684.

ROGALEWICZ, Rafal. VOELKEL, Adam y KOWNACKI, Ireneusz. Application of HS-SPME in the determination of potentially toxic organic compounds emitted from resin-based dental materials. *Journal of Environmental Monitoring*, **2006**. 8: 377-383.

RUBINSON, J.; RUBINSON, N. Análisis instrumental. Editorial Prentice Hall. Madrid, 2000. Pág. 782.

SÁNCHEZ-Palomo, Eva. DÍAZ-Maroto, M. Consuelo y PÉREZ-Coello, M. Soledad. Rapid determination of volatile compounds in grapes by HS-SPME coupled with GC-MS. *Talanta*, **2005**. 66: 1152-1157.

SÁNCHEZ-Venosa, María del Carmen. Estudio Químico de *Prunus serotina* (Cav.). Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. México D. F., 2000.

SHIREY, R.E. y MINDRUP, R.F. *SPME adsorption versus absorption: which fiber is best for your application*, Presentation at Pittcon, New Orleans, 2000.

SIMPLICIO, A.L.; BOAS L.V. Validation of a solid-phase microextraction method for the determination of organophosphorus pesticides in fruits and fruit juice. *Journal of Chromatography A.*, **1999**. 833: 35-42.

SKOOG, Douglas A.; HOLLER, F. James; CROUCH, Stanley R. Principios de análisis instrumental, 6a.Edición. Cengage Learning. México, 2008.pp. 788-800. 806-808.

SONG, J.; FAN, L.; BEAUDRY, R.M. Application of solid-phase microextraction and gaschromatography/time-of-flight mass spectrometry for rapid analysis of flavorvolatiles in tomato and strawberry fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**1998**. 46: 3721-3726.

SWAIN, Elizabeth; PING Li, Chun;POULTON , Jonathan E. Development of thePotential for Cyanogenesis in MaturingBlack Cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) Fruits. *Plant Physiology*,**1992**. 98:1423-1428.

SWAIN, Elizabeth;POULTON , Jonathan E. Immunocytochemical localization of Prunasin Hydrolase and Mandelonitrile lyase in Stems and leaves of *Prunus serotina*.*Plant Physiology*,**1994**. 106:1285-1291.

TOMKINS, B. A.; BARNARD, A. R. Determination of organochlorine pesticides in ground water using solid-phase microextraction followed by dual-column gas chromatography with electron-capture detection.*Journal of Chromatography A.*, **2002**. 964:21-33.

ULRICH, S.; MARTENS, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective method for the assay of



antidepressant drug in human plasma. *Journal of Chromatography B.*, **1997**. 696: 217-234.

VAES, W. H. J.; MAYER, P.; OOMEN, A. G.; HERMENS, J. L. M.; TOLLS, J. Commentson"Adsorption versus Absorption of Polychlorinated Biphenyls onto Solid-PhaseMicroextraction Coatings". *Analytical Chemistry*, **2000**.72:639 - 641.

WEJNEROWSKA, Graznya, y GACA, Jerzy. Application of Headspace Solid-Phase Microextraction for Determination of Chloro-Organic Compounds in Sewage Samples. *Toxicology Mechanisms and Methods*,**2008**. 18: 543-550.

WU, J.; YU, X.; LORD, H.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction of inorganic anions based on polypyrrole film. *Analyst*. **2000**. 125: 391-394.

YANG, X.; PEPPARD, T. Solid phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,**1999**. 42: 1925-1930.

YANG, Chao. LUO, Liping. ZHANG, Haijing. YANG, Xu. LV, Yu. Commons aromatic components of propolis from 23 regions of China. *Wiley Interscience*, **2010**. 1268-1282.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, **1993**. 65:1843-1852.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Quantitative extraction using an internally cooled solidphase microextraction device *Analytical Chemistry*, **1993**. 67: 34-43.