



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Implementación de un Método por Cromatografía de Gases para la
Determinación de Ácidos Grasos Volátiles en Fluido Ruminal de Ganado
Bovino

TESIS

que para obtener el título de:

LICENCIADO EN QUÍMICA.

presenta:

OSCAR MARIO MORENO BERNAL

ASESORA:

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

COASESOR:

M. en C. Pablo Hernández Matamoros

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2024.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARIA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



**PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y
HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL**

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:
Implementación de un Método por Cromatografía de Gases para la
Determinación de Ácidos Grasos Volátiles en Fluido Ruminal de Ganado Bovino

_____, que presenté para obtener el
título/grado de: Licenciado en Química, es original,
de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica,
citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas
para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones
reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código
de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del
proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Oscar Mario Moreno Bernal 313304633

Nombre y número de cuenta del egresado(a)



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN LAYDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis y Examen Profesional.**

Implementación de un Método por Cromatografía de Gases para la Determinación de Ácidos Grasos Volátiles en Fluido Ruminal de Ganado Bovino

Que presenta el pasante: **Oscar Mario Moreno Bernal**
Con número de cuenta: **313304633** para obtener el título de: **Químico**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de Marzo de 2024.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez	
VOCAL	Dra. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
SECRETARIO	M. C. Gabriel Israel Nava Nabté	
1er. SUPLENTE	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
2do. SUPLENTE	M. C. Elizabeth Cruz Ruiz	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.
En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento.

MCVB/cga*

Agradecimientos.

Primero quiero agradecer a mi padre Oscar y a mi madre Consuelo, por todo el apoyo incondicional, los consejos que me brindaron, el cariño y afecto que me dieron durante toda mi etapa académica, y la oportunidad de estudiar una carrera universitaria.

A mis hermanas Diana y Anabel, por siempre estar ahí cuando más lo necesitaba.

A mis tíos Mario, Carolina, Jesús, Teresa y a mi abuela Maria que siempre creyeron en mí y a pesar de que hoy ya no se encuentran con nosotros en este mundo terrenal, les comparto este logro con todo mi corazón y cariño desde el lugar donde se encuentren.

A mis dos mejores amigas Jaqueline y Mariana, que siempre estuvieron en mis etapas más difíciles escuchándome, apoyándome y sobre todo nunca juzgarme, por todo eso y más les agradezco con todo mi corazón que me acompañaran en estas etapas de mi vida.

A Luis y Diego (mis hermanos adoptivos) por ser una parte importante en mi vida universitaria, por todas esas veces que me ayudaron, por todas esas anécdotas que tuvimos viviendo juntos en Izcalli, por escucharme, por apoyarme, por aconsejarme, por ser mi nueva familia por un tiempo y sobre todo por hacer que esta etapa de mi vida fuera más fácil de afrontar.

A mis amigos de la universidad, Alan Hidalgo, Alan Guerrero, Arturo, Dacia, Daniela, Emmanuel, Karen, Karina, Juan, Fernanda, Miguel y Osvaldo, por todas esas experiencias vividas, por las risas, por los consejos, por todos esos trabajos en grupo que sacamos adelante, por todo ese estrés que compartimos en semas de evaluaciones, por hacer que las clases y los días en la universidad fueran amenos.

A mis amigos de la prepa Jesús, Enrique, Luis, Diocelina, Aranza, por su gran apoyo en mi etapa universitaria, por todos esos consejos, la ayuda incondicional que me brindaron y por motivarme a estudiar Química.

A Fernanda Ramírez (Ferchis), nuevamente te agradezco por tu gran amistad dentro y fuera de la escuela, por la gran ayuda que me brindaste durante todo este proceso de titulación.

A mis asesores Dra. Alma Revilla y M en C. Pablo Hernandez, por brindarme la oportunidad de elaborar mi tesis, por ayudarme en todo momento en el desarrollo de esta, por todos los conocimientos que me compartieron, por su paciencia y sobre todo por su confianza.

A la UNAM DGAPA por el apoyo al proyecto PAPIIT TA200323 Efecto de la suplementación de selenio a través de bolos intraruminales sobre la respuesta antioxidante, enzimática, histológica, parámetros productivos y calidad de la canal en ovinos y caprinos y al proyecto PAPIME PE210824.

A la FESC UNAM por el apoyo a la cátedra CI2244 Implementación de Métodos de Separación y/o espectroscópicos para la Cuantificación de Analitos en muestras de interés.

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	OBJETIVOS.....	2
2.1.	Objetivo General	2
2.2.	Objetivos Específicos.....	2
3.	MARCO TEÓRICO	3
3.1.	Rumiantes.....	3
3.1.1	Rumen.....	3
3.1.2.	Fermentación microbiana.....	4
3.2.	Ácidos Grasos Volátiles.....	5
3.3.	Cromatografía.....	5
3.3.1.	Cromatografía de gases.....	6
3.3.2.	Partes de un cromatógrafo de gases.....	6
3.3.2.	Parámetros cromatográficos.....	13
3.4	Normalización Interna.....	15
3.5	Ácido crotónico.....	16
4.	DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	18
4.1.	Preparación de soluciones	19
4.2.	Selección de las condiciones de trabajo (equipo Buck).	20
4.3.	Selección de las condiciones de trabajo (SHIMADZU).....	21
4.4.	Preparación de sistemas para las curvas de calibración.	21
4.5.	Tratamiento de la muestra.....	22
4.7.	Fortificación de la muestra	23
4.8.	Prueba de recobro.	23
5.	RESULTADOS.....	24
5.1.	Condiciones cromatográficas.....	24
5.2.	Selección de las Condiciones Cromatográficas (Equipo 1).	25
5.3.	Selección de las condiciones cromatográficas (SHIMADZU).	27
5.4.	Identificación de los ácidos grasos volátiles de cadena corta en líquido ruminal.	28
5.5.	Fortificación de la muestra de líquido ruminal.	32
5.6.	Curvas de calibración.....	34
5.7.	Tratamiento de la muestra.....	36
5.8.	Prueba de recobro.	37

5.9.	Cuantificación de ácidos grasos volátiles en muestras de líquido ruminal.	39
6.	CONCLUSIONES.....	43
7.	REFERENCIAS.	44
8.	ANEXOS.....	47

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Partes del estómago de un rumiante.

Figura 2. Vías de producción de ácidos grasos volátiles C₂-C₄ a partir del piruvato.

Figura 3. Esquema general de los componentes de un cromatógrafo de gases.

Figura 4. Esquema de un inyector de “split” (con división).

Figura 5. Esquema de un inyector “on-column”.

Figura 6. Columnas empaquetadas para cromatografía de gases.

Figura 7. Esquema de un detector de ionización de flama.

Figura 8. Cromatograma ideal gaussiana.

Figura 9. Estructuras químicas de [1] ácido acético, [2] ácido propiónico, [3] ácido butírico, [4] ácido isobutírico y [5] ácido crotonico.

Figura 10. Pasos para el tratamiento de la muestra.

Figura 11. Comparación de cromatogramas equipo Buck (izquierda) y equipo Shimadzu (derecha).

Figura 12. Líquido ruminal en mezcla con éter etílico (izquierda) y acetona (derecha).

Figura 13. Cromatograma para la mezcla de estándares de ácidos grasos volátiles: (C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico y (C4i) ácido isobutírico. Columna PE-WAX 60 m, 0.25 mm, 0.25 µm, inyección de 1 µL. FM: N₂, Gradiente: 80°C-230° a 10°/min.

Figura 14. Cromatograma de la muestra de líquido ruminal sin centrifugar: (C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico y (C4i) ácido isobutírico. Columna PE-WAX 60 m, 0.25 mm, 0.25 µm, inyección de 1 µL. FM: N₂, Gradiente: 80°C-230° a 10°/min.

Figura 15. Cromatograma de la muestra de líquido ruminal centrifugada: (C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico y (C4i) ácido isobutírico.

Figura 16. Cromatogramas muestras de líquido ruminal fortificado.

Figura 17. Cromatogramas muestras de líquido ruminal y fortificado.

Figura 18. Curva de calibración indirecta para la determinación de ácido acético.

Figura 19. Curva de calibración indirecta para la determinación de ácido propiónico.

Figura 20. Curva de calibración indirecta para la determinación de ácido isobutírico.

Figura 21. Curva de calibración indirecta para la determinación de ácido butírico.

Figura 22. Cromatograma muestra de líquido ruminal centrifugado sin HPO₃.

Figura 23. Cromatograma muestra de líquido ruminal centrifugado con HPO₃.

Figura 24. Análisis de recobro para el ácido acético (izquierdo) y ácido propiónico (derecho).

Figura 25. Análisis de recobro para el ácido isobutírico (izquierdo) y ácido butírico (derecho).

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Resumen de la digestión ruminal.

Tabla 2. Propiedades de los estándares utilizados.

Tabla 3. Preparación de los sistemas para la Curva de Calibración.

Tabla 4. Condiciones de trabajo, equipo BUCK.

Tabla 5. Condiciones de trabajo, equipo SHIMADZU.

Tabla 6. Selectividad y Resolución de los estándares Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Tabla 7. Coeficiente de Variación (%) para el tiempo de retención y los cocientes de las aéreas de los analitos con respecto al EI. Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Tabla 8. Selectividad y Resolución de los estándares Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Tabla 9. Coeficiente de Variación (%) para el tiempo de retención y los cocientes de las aéreas de los analitos con respecto al EI. Gradiente 50°C-220°C a 15°/min.

Tabla 10. Coeficiente de Variación (%) para el tiempo de retención y los cocientes de las aéreas de los analitos con respecto al EI 80°C-230°C a 10°/min.

Tabla 11. Áreas obtenidas para los analitos en la misma muestra con dos tratamientos.

Tabla 12. Áreas obtenidas para los analitos en la muestra original y fortificada.

Tabla 13. Parámetros de linealidad de las curvas de calibración.

Tabla 14. Comparación de áreas de una muestra acidificada vs una muestra sin acidificar.

Tabla 15. Concentraciones adicionadas (mg/L) para los sistemas de la muestra. (n=3).

Tabla 16. Recobro en porcentaje para los tres niveles de concentración.

Tabla 17. Concentración [mg/L] de ácidos grasos en liquido ruminal Vaca 1 (Holstein).

Tabla 18. Concentración [mg/L] de ácidos grasos en liquido ruminal Vaca 2 (Holstein).

Tabla 19. Concentración [mg/L] de ácidos grasos en liquido ruminal Vaca 3 (Angus).

Tabla 20. Contenido de AGV reportados.

Tabla 21. Comparación del contenido de AGV (mmol/L) considerando el reajuste del recobro y sin considerar.

Tabla 22. Resultados para ácido acético en diferentes disolventes Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Tabla 23. Resultados para ácido propiónico en diferentes disolventes Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Tabla 24. Resultados para ácido butírico en diferentes disolventes Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Tabla 25. Resultados para ácido acético en diferentes disolventes Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Tabla 26. Resultados para ácido propiónico en diferentes disolventes Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Tabla 27. Resultados para ácido butírico en diferentes disolventes Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Tabla 28. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido acético.

Tabla 29. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido propiónico.

Tabla 30. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido isobutírico.

Tabla 31. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido butírico.

Tabla 32. Resultados de las pendientes y ordenadas de las curvas de calibración de los estándares de AGV contemplando el intervalo de confianza.

Tabla 33. Resultados de las áreas en muestras de líquido ruminal para los AGV Vaca 1 (Holstein).

Tabla 34. Resultados de las áreas en muestras de líquido ruminal para los AGV Vaca 2 (Holstein).

Tabla 35. Resultados de las áreas en muestras de líquido ruminal para los AGV Vaca 3 (Angus).

Abreviaturas empeladas.

C2: Ácido Acético.

C3: Ácido Propiónico.

C4i: Ácido Iso-butírico.

C4: Ácido Butírico.

EI: Estándar Interno.

AGV: Ácidos Grasos Volátiles.

FID: Detector de ionización de flama.

$\bar{X}$: Promedio

t_r : Tiempo de retención.

$W_{1/2}$: Ancho a la mitad de altura.

R_s : Resolución.

α : Factor de selectividad.

CV : Coeficiente de variación.

CG : cromatografía de gases

S : desviación estándar

FR : Factor respuesta

1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos volátiles de cadena corta [C₂-C₄], son compuestos de alto valor nutricional para la dieta de los rumiantes, ya que estos contienen la mayor parte de la energía contenida originalmente de los carbohidratos, por ello es necesario que los niveles de dichos ácidos sean supervisados para así evitar problemas de salud en los rumiantes.

Ya que los ácidos grasos volátiles (AGV) de cadena corta tienen puntos de ebullición menores a las 250°C, una técnica analítica que permite la separación, identificación y cuantificación es la cromatografía de gases con detección de ionización de flama, ya que permite la detección de compuestos orgánicos.

En este trabajo se realizó la implementación de un método por cromatografía de gases con detección de ionización de flama para determinar el contenido de ácidos grasos volátiles de cadena corta (C₂-C₄) en el líquido ruminal de bovino. Este método permitirá llevar a cabo la separación de los ácidos grasos de cadena corta presentes en líquido ruminal del bovino, con el fin de poder modificar la dieta de este o hacer uso de otros elementos para que la producción de dichos ácidos aumente o disminuya según se desee.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

- Implementar una metodología analítica que permita identificar y cuantificar el contenido de AGV mediante la técnica de cromatografía de gases con detección de ionización de flama en líquido ruminal para apoyar en la modificación de la alimentación de ganado bovino.

2.2. Objetivos Específicos

- Evaluar y seleccionar las condiciones cromatográficas experimentales que permitan la adecuada separación de los ácidos grasos volátiles (acético, propiónico y butírico).
- Elaborar las curvas de calibración que permitan la cuantificación de los ácidos grasos volátiles en muestra de líquido ruminal utilizando ácido crotónico como estándar interno.
- Establecer las condiciones experimentales en cuanto al tratamiento del líquido ruminal a fin de asegurar la estabilidad de los ácidos grasos volátiles, previo a la determinación.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Rumiantes.

Existen 250 especies aproximadamente de rumiantes, estos se encuentran tanto en estado domesticado como salvaje, una de las características más que destacada de los rumiantes es su proceso de digestión el cual consta de dos etapas, la primera donde se consume su alimento, la segunda es la rumia que es un proceso donde se regurgita el alimento que ya se encontraba en el preestómago para nuevamente mascar el alimento con el fin de llevar a cabo una mejor absorción y metabolización del alimento.^{1,2}

Una de las subfamilias que se encuentran entre los rumiantes son los bovinos, del cual el género *Bos Taurus* es una especie domestica que se ha adaptado en varias partes del mundo, y tiene un gran valor ya que las razas europeas se consideran un ganado lechero, mientras que las razas americanas un ganado de carne.³

3.1.1 Rumen.

El rumen es el compartimiento más grande del estómago como se puede observar en la Figura 1, al ser un saco anóxico, tener un intervalo de temperatura de 30 – 40 °C y un pH de 5.5 a 7, los microorganismos presentes tales como son las bacterias, hongos y protozoarios, están en condiciones ideales para llevar a cabo el proceso de fermentación microbiana.^{2,4}

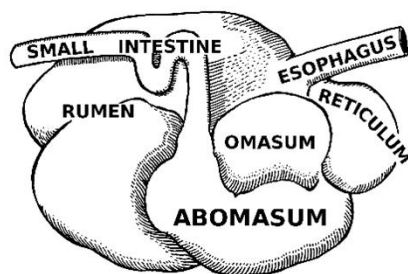


Figura 1. Partes del estómago de un rumiante.⁵

3.1.2. Fermentación microbiana.

La fermentación microbiana es proceso de actividades físicas y microbianas que se lleva a cabo en el proceso de digestión que nos da como resultado final componentes útiles para la dieta de los rumiantes como se observa en la tabla 1.¹

Tabla 1. Resumen de la digestión ruminal. ¹

Componente inmediato del alimento	Constituyente químico (polímero)	Componentes químicos (monómeros)	Productos de la fermentación ruminal
Extracto libre de nitrógeno	Carbohidratos (hexosanas)	Glucosa y otras hexosas	Acetato, propionato y butirato
Fibra Bruta	(pentosana)	Pentosas	Acetato, propionato y butirato
Proteína bruta	No proteico	Aminoácidos	Acetato, propionato, butirato, isobutirato, isovalérico y amoniaco
Grasa bruta	Triglicéridos	Glicerina	Propionato y ácidos grasos saturados
Ceniza bruta	Galactósidos	Ácidos grasos	
	Minerales	Elementos	Elementos reducidos, células microbianas, CO ₂ y CH ₄

El proceso de fermentación ruminal de los carbohidratos tanto estructurales como no estructurales consiste en su degradación mediante enzimas celulasas y hemicelulasas, que hidrolizan los enlaces B-glucosídicos hasta la obtención de hexosas y pentosas, mientras que los azúcares simples y el almidón son hidrolizados por amilasas, maltasas, maltosa fosforilasa y 1,6-glucosidasas hasta la obtención de las hexosas.^{1,6}

Las hexosas y pentosas mediante una fermentación intracelular a través de la ruta de Embde-Meyerhof dan como producto final el piruvato, y a partir de este se forman los ácidos grasos volátiles como se muestra es la Figura 2.^{1,6}

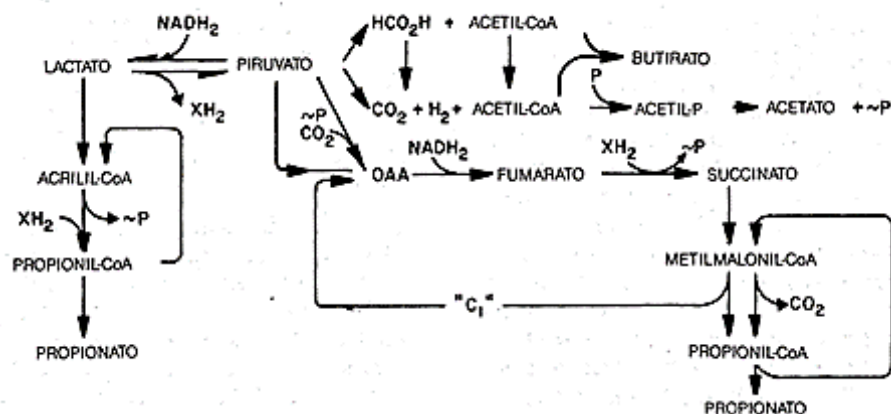


Figura 2. Vías de producción de ácidos grasos volátiles C₂-C₄ a partir del piruvato.¹

3.2. Ácidos Grasos Volátiles.

Los ácidos grasos volátiles están compuestos de cadenas carbonadas de no más de seis carbonos en su estructura, dichos ácidos se pueden encontrar en los procesos de digestión bacteriana, pero también en aromatizantes alimentarios, así como en conservadores.⁷

Estos ácidos son de gran importancia ya que ayudan a la nutrición de los rumiantes, la síntesis de algunas proteínas se realiza a partir del ácido acético, por otra parte, con el ácido isobutírico se realiza la síntesis de otros ácidos grasos de cadena larga.⁸

El ácido acético puede ayudar al aumento en la producción de leche, y el ácido propiónico ayuda en el aumento de proteínas en la leche y disminuye el contenido de grasa, también ayuda a la formación de glucosa y lactosa. Por su parte el ácido butírico ayuda a aumentar el porcentaje de grasa en la leche.^{4,8}

Cabe mencionar que el contenido de ácidos grasos (C₂-C₄) puede variar por diferentes factores como lo son la raza del bovino, la dieta administrada, la carga microbiana que se encuentre en el rumen, entre otros.^{1,2,4}

3.3. Cromatografía.

La IUPAC define a la cromatografía como: un método fisicoquímico de separación en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una que es estacionaria (fase estacionaria) mientras que la otra, (la fase móvil) se mueve en una dirección determinada.⁹

3.3.1. Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica común que se utiliza para separar y cuantificar compuestos volátiles y semivolátiles de una mezcla. La GC es una técnica popular pues combina un potencial de resolución excepcional con la velocidad y la sensibilidad analítica.¹⁰

Para realizar una separación mediante cromatografía de gases, se inyecta una pequeña cantidad de la muestra en una corriente de un gas inerte a elevada temperatura; esta corriente de gas atraviesa una columna cromatográfica que separa los componentes de la mezcla por medio de un mecanismo de partición (cromatografía gas líquido), de adsorción (cromatografía gas sólido) o, en muchos casos, por medio de una mezcla de ambos. Los componentes separados, emergerán de la columna a intervalos discretos y pasarán a través de algún sistema de detección adecuado, o bien serán dirigidos hacia un dispositivo de recogida de muestras.¹¹

3.3.2. Partes de un cromatógrafo de gases.

Un cromatógrafo opera en su mayoría con cinco instrumentos; fuente de gas, inyector, columna (horno), detector y registrador, como se pueda observar en la Figura 3.

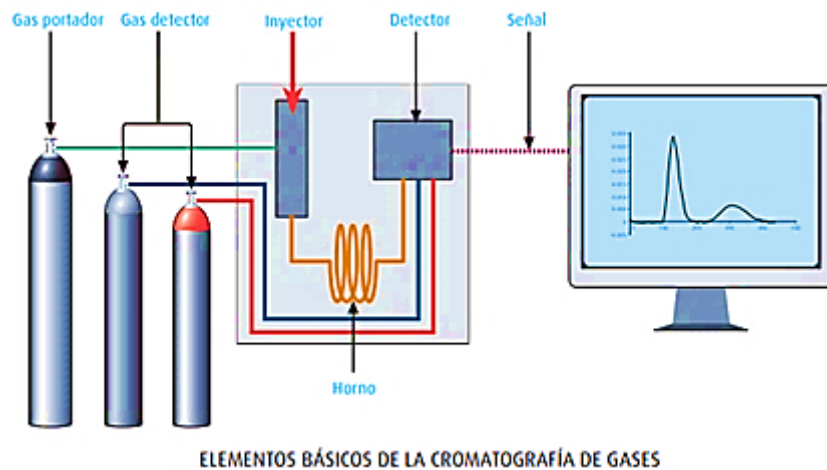


Figura 3. Esquema general de los componentes de un cromatógrafo de gases.¹²

La fase móvil es un gas, llamado gas portador o de arrastre entre los más comunes se tienen al He, N₂, H₂ cuya única función es la de transportar el analito a través de la fase estacionaria, los gases deben ser químicamente inertes, es decir, no debe reaccionar con los analitos a determinar ni con la fase estacionaria de la columna. En CG, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza o

entrada de la columna cromatográfica, mediante un inyector. El horno se encarga de regular la temperatura dentro de la columna ya que esta variable es la de mayor influencia en la separación de los analitos. La columna debe estar lo suficientemente caliente para que los analitos alcancen una presión de vapor adecuada y eluyan a un tiempo razonable. Existen muestras con componentes que presentan un amplio intervalo de temperaturas de ebullición para lo que se recomienda utilizar un programa de temperatura. Cabe destacar que las propiedades de la columna determinarán los parámetros cromatográficos que se explicarán más adelante.

Finalmente, el detector ubicado al término de la columna capta los cambios en los efluentes de la columna y los convierte en señales las cuáles serán recibidas por el registrador que plasmará la información recabada en un cromatograma. Las características de un detector ideal deben ser las siguientes: adecuada sensibilidad, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal, amplio intervalo de temperatura de trabajo, tiempo de respuesta corto entre otras características y dependiendo de la mezcla de analitos que se requieran separar y determinar, dependerá el tipo de elección que se tomará ya que existen una gran variedad de detectores, aunque el más utilizado es detector de ionización de flama (FID, por sus siglas en inglés).¹³

Sistema de inyección.¹¹

Los dispositivos de inyección de muestra para cromatografía de gases tienen la misión de vaporizar la muestra a analizar e incorporarla a la corriente del gas portador que se dirige hacia la columna. La vaporización e introducción de la muestra en el sistema, debe realizarse cumpliendo una serie de requisitos:

- 1.- La vaporización de la muestra debe ser lo más rápida posible.
- 2.- La vaporización debe realizarse sin discriminar ningún componente de la muestra.
- 3.- La muestra debe llegar a la columna como una banda lo más fina posible

Existen dos modalidades de inyección: “Split o splittless” (división o no división de la muestra), lo cual se explica a continuación:

A) Inyección con división de muestra

Este tipo de inyección (más conocida como “split”), es el más sencillo de los que se utilizan en cromatografía capilar. El inyector de “split” (Figura 4), consta básicamente de los mismos elementos que un inyector normal, con la única adición de un sistema de división de flujo a la salida de la cámara de mezcla. Por medio de este tipo de inyector, el flujo de gas portador que pasa a través del inyector (y por lo tanto también la muestra vaporizada), se divide en dos; una parte es introducida en la columna y la otra escapa fuera del sistema a través de una válvula de aguja que permite regular la proporción de gas que es introducido en la columna.¹¹

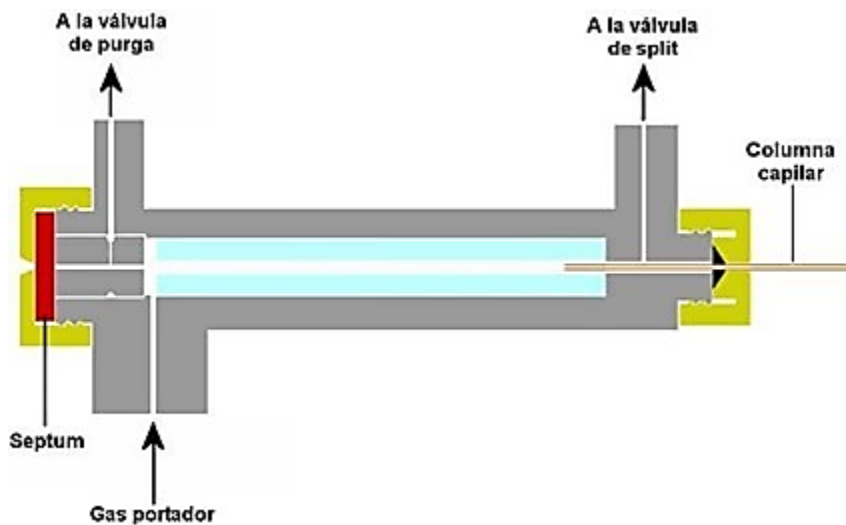


Figura 4. Esquema de un inyector tipo “split” (con división).¹¹

En este tipo de inyectores la mayor parte del caudal del gas portador se dirige hacia la atmósfera, por lo que la válvula de división (Split) dispone de un sistema de apertura y cierre automáticos para que únicamente permita la salida de gas hacia la atmósfera durante el proceso de inyección. El control del flujo de gas portador que pasa a través de la columna se realiza en este tipo de sistemas manteniendo constante la presión en la cámara de inyección, lo que permite que el caudal de gas que pasa a través del inyector pueda variar en función de que la válvula de división esté abierta o cerrada.

Los inyectores de este tipo presentan dos inconvenientes; en primer lugar, la división de la muestra da lugar a que las cantidades de analito que son separadas y llegan al detector sean muy pequeñas,

por lo que los límites de detección aumentan bastante, lo que afecta en gran medida a la hora de realizar análisis de trazas. Por otra parte, estos inyectoros pueden en algunos casos dar lugar a discriminación entre los componentes de la muestra.¹¹

B) Inyección sin división (“splitless”)

En la técnica de inyección sin división, la totalidad de la muestra inyectada es dirigida hacia la columna, que se mantiene durante la inyección a una temperatura inferior al punto de ebullición del componente más volátil de la muestra. La totalidad de la muestra inyectada se condensa en la cabeza de la columna, actuando en este caso el disolvente condensado en la columna a modo de trampa donde se concentran los componentes a analizar (efecto solvente). Transcurrido un tiempo adecuado, se abre en el inyector una válvula de purga con el fin de barrer a la atmósfera el disolvente vaporizado que pudiera quedar en el inyector; al mismo tiempo, se comienza un programa de calentamiento de la columna para realizar el análisis.¹¹

La utilización de la técnica de sin división tiene dos importantes ventajas. En primer lugar, dado que no existe división de muestra, permite un aumento notable de la sensibilidad, por lo que es muy adecuada para el análisis de trazas. Por otra parte, la concentración de la muestra en la cabeza de la columna origina que las pérdidas de eficacia debidas a una inyección inadecuada sean de mucha menor importancia que en otras técnicas de inyección.¹¹

El diseño de un inyector sin división es básicamente el mismo que el del inyector de con división, pudiendo realizar la purga del inyector bien a través de la válvula de división, bien a través de una válvula de purga adicional situada cerca del septum. La mayoría de los inyectoros con división comerciales, están diseñados para poder trabajar también en modo sin división.¹¹

Los sistemas de inyección en columna (normalmente conocidos por su nombre inglés de “*on-column*”), han sido diseñados para posibilitar la introducción de muestras directamente en el interior de columnas capilares. Es evidente que la introducción de una muestra por medio de una jeringa directamente en el interior de una columna capilar (de 0,23 mm de diámetro interno), requiere la utilización de agujas extremadamente finas (suelen utilizarse agujas de sílice fundida de 0,15 mm de diámetro) que, en consecuencia, son incapaces de perforar un septum; la característica básica de un inyector “*on-column*” (Figura 5), es la utilización de un sistema de

válvulas y tubos de guía que permitan la introducción en el sistema de una aguja extremadamente fina.¹¹

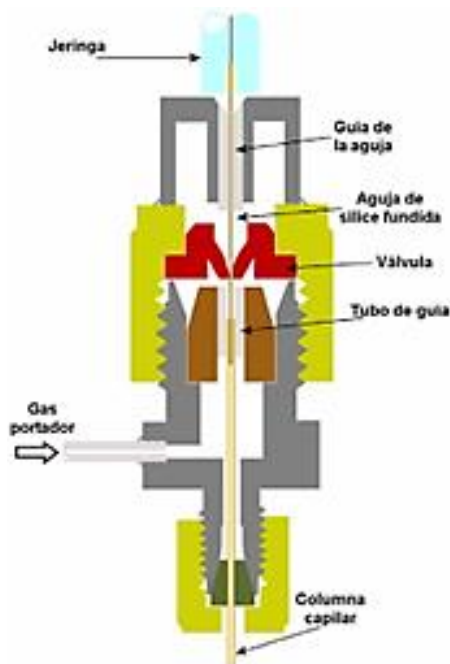


Figura 5. Esquema de un inyector “on-column”.¹¹

Columnas

Al igual que sucede en todas las técnicas cromatográficas, la columna es el corazón del cromatógrafo de gases. Es necesario tener siempre presente que la columna es el auténtico elemento de separación de los componentes de la muestra; así, una mala elección de la columna, una columna deteriorada o unas condiciones de trabajo inadecuadas, nunca permitirán obtener buenos resultados, aunque se disponga del mejor equipo en el resto del cromatógrafo, siendo además, las causas citadas las responsables de la inmensa mayor parte de los problemas que se encuentran a la hora de realizar un análisis por cromatografía de gases.¹¹

Una columna para cromatografía de gases está formada por un tubo, que puede ser de diversos materiales (preferiblemente inertes), dentro del cual se encuentra la fase estacionaria. Esta puede ser un sólido activo (cromatografía gas sólido), o con mayor frecuencia un líquido depositado sobre las partículas de un sólido portador (columnas empaquetadas o de relleno) o sobre las propias paredes del tubo (columnas tubulares abiertas).¹¹

Las columnas tubulares abiertas (conocidas normalmente como columnas capilares) fueron descritas inicialmente por Golay en 1957, y se encuentran entre las más ampliamente utilizadas debido a la gran eficacia de separación que proporcionan.

Básicamente, una columna tubular está formada por un tubo (normalmente de vidrio o sílice fundida) de un diámetro comprendido entre 0,2 y 0,8 mm, en cuya pared interna se dispone la fase estacionaria. Según sea la forma en que se dispone la fase estacionaria sobre la pared del tubo, se distinguen básicamente dos tipos de columnas (Figura 6):¹¹

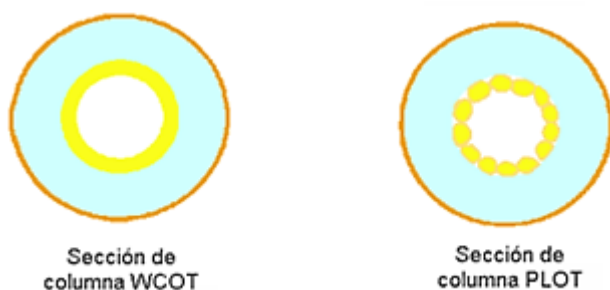


Figura 6. Columnas empacadas para cromatografía de gases. ¹¹

Columna WCOT (Wall Coated Open Tubular). En este tipo de columnas (que son las de uso más frecuente), la fase estacionaria se encuentra depositada formando una película líquida directamente sobre las paredes del tubo.¹¹

Columna PLOT (Porous Layer Open Tubular). En estas columnas la pared interna del tubo está recubierta por una capa de un soporte adsorbente; si a su vez el soporte está impregnado con una fase estacionaria líquida, las columnas son denominadas SCOT (Support Coated Open Tubular).¹¹

Detector.

Una vez que los componentes de la muestra han sido separados por la columna, se hace preciso el disponer a la salida de ésta de un sistema de detección, capaz de señalar la elución de un componente de la muestra y ofrecer, al mismo tiempo, una señal proporcional a la cantidad de substancia que pasa a través de él.¹¹

Tipos de detectores.

Los detectores usados en cromatografía de gases pueden dividirse de forma genérica en detectores universales (Ionización de Flama , Conductividad térmica) y detectores específicos (Captura electrónica, fotométrico de llama, nitrógeno/fosforo); los primeros ofrecen la ventaja de responder prácticamente ante cualquier compuesto que pueda eluir de la columna, no obstante, esta misma propiedad puede convertirse en un serio inconveniente cuando se procede al análisis de mezclas muy complejas; en este último caso, la utilización de detectores específicos resulta muy ventajosa ya que, al responder únicamente frente a un grupo limitado de compuestos, los cromatogramas que ofrecen resultan muy simplificados.¹¹

Detector de ionización de flama.

La detección de ionización de flama (FID) por sus siglas en inglés, es uno de los más usados en cromatografía de gases, ya que tiene una respuesta universal, esto debido a que es selectivo a los compuestos que presentan enlaces C-H, por lo mismo son muy pocos los compuestos que no proporcionan una señal. El funcionamiento de un detector de ionización de llama consiste en que el gas procedente de la columna se mezcle con el hidrogeno y esta mezcla se quema en una cámara con exceso de aire, encima de este se encuentra un colector cilíndrico polarizado el cual se encarga de recoger los iones generados en la combustión, se mide la corriente iónica que está establecida entre la punta del quemador y el electrodo colector (Figura 7). Este detector se polariza siempre con un voltaje de saturación, y presenta una corriente de fondo de $10^{-13} - 10^{-14}$ A, que se incrementa hasta un nivel de $10^{-12} - 10^{-9}$ A en presencia de un vapor orgánico. Por ello este tipo de detectores ofrecen una gran sensibilidad, gran estabilidad y un rango dinámico lineal excepcionalmente elevado.¹¹

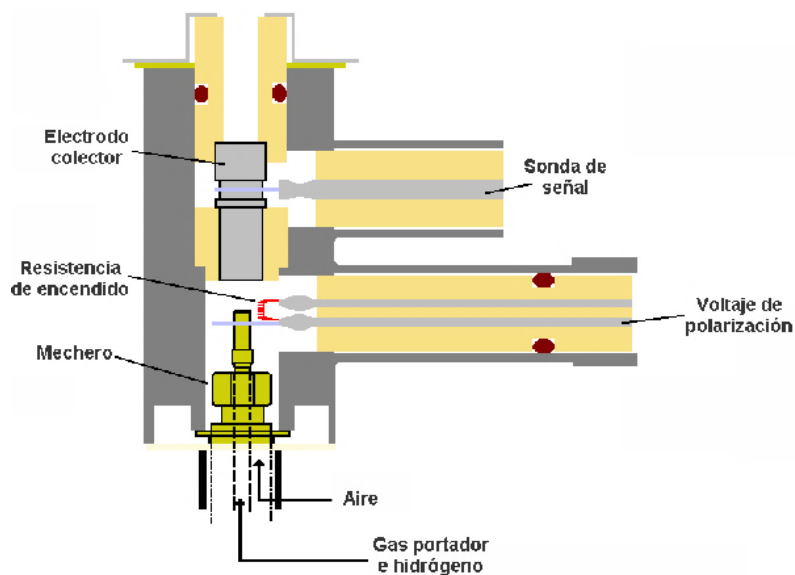


Figura 7. Esquema de un detector de ionización de flama.¹¹

3.3.2. Parámetros cromatográficos.

El termino parámetro se refiere a los diferentes valores que caracterizan un proceso, operación o resultado. Los parámetros cromatográficos permiten tabular y comunicar los datos con una mayor facilidad.¹⁴

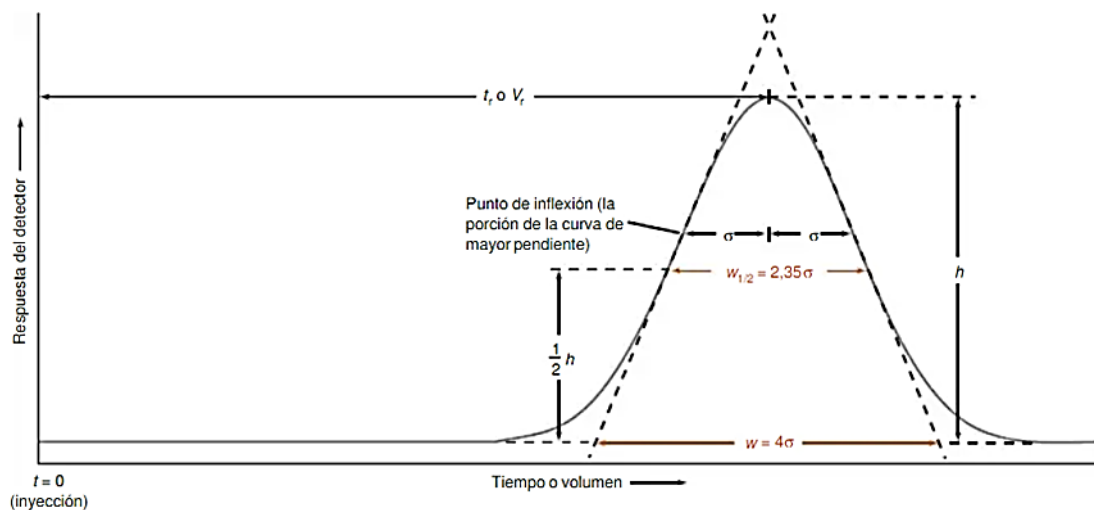


Figura 8. Cromatograma ideal gaussiana.¹³

La Figura 8 ilustra un pico cromatográfico con una distribución Gaussiana en la que la concentración del soluto está relacionada con el tiempo transcurrido desde el punto de inyección del soluto. Por lo tanto, el ancho del pico a la mitad de la altura está dado por:^{13,14}

$$w_{0.5} = 2.354\sigma \quad [1]$$

El tiempo de retención, es el tiempo requerido por el soluto para eluir de la columna y este es igual al tiempo que se mantiene retenido el analito (t'_R) y el tiempo que requiere la fase móvil recorrer toda la columna.

$$t_R = t'_R + t_M \quad [2]$$

La resolución es la medida cuantitativa de la habilidad de la columna de separar dos compuestos, expresa el grado en cual dos picos adyacentes pueden ser separados entre sí, este parámetro depende de los tiempos de retención y de los anchos de los picos continuos.

$$R_S = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{b1} + w_{b2})} \quad [3]$$

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 - 1} \right) \quad [4]$$

En un análisis cuantitativo se busca que la separación sea mayor a un valor aproximado de 1.5 y también se considera el factor de selectividad, factor de retención y numero de platos teóricos.

El factor de selectividad es la diferencia de las interacciones intermoleculares entre los analitos y la fase estacionaria entre más grande sea esta diferencia mayor selectividad; y por definición debe ser mayor a la unidad.

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} \quad [5]$$

Uno de los parámetros fundamentales de retención en cromatografía es el factor de retención k' , este factor se conoce como la relación del tiempo que el soluto permanece retenido en la fase estacionaria con el tiempo que el soluto permanece en la fase móvil.

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad [6]$$

El proceso de ensanchamiento de banda se mide por la eficiencia de la columna o el número de platos teóricos que es igual al cuadrado de la relación del tiempo de retención del pico y la desviación estándar del pico.

$$N = \left(\frac{t_r}{\sigma}\right)^2 \quad [7]$$

Si se considera la definición de la ecuación de la anchura del pico, la relación puede reescribirse de la siguiente manera:

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{0.5}}\right)^2 \quad [8]$$

3.4 Normalización Interna

La normalización interna es un procedimiento usado en la cromatografía de gases, donde se añade un estándar interno, el cual es una sustancia que se adiciona a la mezcla, para cuando estas después de ser inyectadas, se relacionan las áreas de cada uno de los picos de la muestra y del estándar interno.^{15,16}

Es decir, en la mezcla existe una masa, m_x , del soluto y que adicionamos a la mezcla una masa $m_{E.I}$, de la sustancia que actuara como estándar interno. Tras la separación sean A_x y $A_{E.I}$ las áreas de los picos correspondientes al soluto de interés y al estándar interno, respectivamente. Puesto que el sistema de detección empleado debe producir señales de área proporcional a la cantidad de las especies, se cumplirá que:¹⁶

$$\frac{m_x}{m_{E.I}} = FR \frac{A_x}{A_{E.I}} \quad [9]$$

Despejando la ecuación 9

$$FR = \frac{m_x A_{E.I}}{m_{E.I} A_x} \quad [10]$$

Siendo FR el factor de respuesta relativo al estándar interno empleado. Para una muestra que contenga una masa desconocida del soluto de interés m'_x , tendremos que adicionar una cantidad

conocida del estándar interno $m'_{E.I}$, al efectuar la separación y medir las áreas correspondientes de los picos, se deduce que:¹⁶

$$\frac{m'_x}{m'_{E.I}} = FR \frac{A'_x}{A'_{E.I}} \quad [11]$$

Y sustituyendo la ecuación 10 en la ecuación 11 y despejando m'_x tenemos que

$$m'_x = \left(\frac{m_x A_{E.I}}{m_{E.I} A_X} \right) \left(\frac{A'_X m'_{E.I}}{A'_{E.I}} \right) \quad [12]$$

La ecuación 12 puede utilizarse para cualquier número de picos de soluto.

Ahora bien, para que una sustancia pueda ser utilizada con estos fines en una técnica de separación deben cumplirse las siguientes condiciones:^{15,16}

- Su pico debe estar separado del resto de los picos.
- Los tiempos de retención del componente de la muestra que va a determinar y el estándar deben ser parecidos.
- El estándar interno no debe de estar presente en la muestra.
- La estructura del estándar interno debe ser similar a la del problema.
- No debe de reaccionar con ninguno de los componentes de la muestra ni alterarse por la matriz de estas.

3.5 Ácido crotónico

El ácido crotónico es un ácido carboxílico insaturado con la presencia de un doble enlace en su estructura (Figura 9). En 1846 el químico alemán Johann Wockler fue el primero en aislar por primera vez el ácido crotónico a partir de las semillas de *croton tiglium*, con el paso del tiempo se han realizado investigaciones más profundas al ácido crotónico explorando sus propiedades físicas, químicas y como los campos de aplicación para este compuesto, en lo que destacan:¹⁷

- Campo químico: se usa como materia prima en la síntesis orgánica de polímeros, emulsiones, resinas, etc.
- Campo farmacéutico: Se usa como materia prima para la elaboración de medicamentos que tratan enfermedades cardiovasculares y del sistema respiratorio.
- Campo de alimentos: Se usa como aditivo alimentario, en productos cárnicos se utiliza para prevenir el crecimiento y deterioro de bacterias con la finalidad de mejorar la frescura de los productos.
- Campo de la agricultura: Se uso como materia primera para la elaboración de pesticidas y herbicidas.

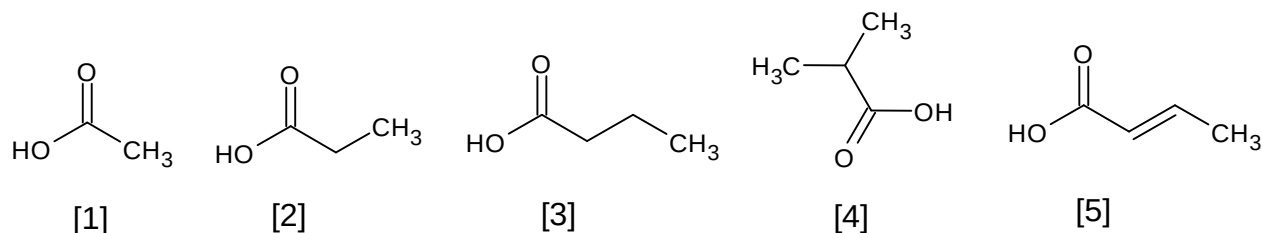


Figura 9. Estructuras químicas de [1] ácido acético, [2] ácido propiónico, [3] ácido butírico, [4] ácido isobutírico y [5] ácido crotonico. Elaboración propia mediante ChemDraw 15.0

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

Equipo.

- Cromatógrafo de gases Buck Scientific modelo 910 equipado con un detector de ionización de flama (FID). Columna DB-WAX con fase estacionaria 100% polietilenglicol (PEG); dimensiones 30 m x 0.53 mm de diámetro interno x 1 μ m de espesor.
- Cromatógrafo de gases SHIMADZU modelo GC-2010 Plus con un detector de ionización de flama (FID). Columna PE-WAX con fase estacionaria 100% polietilenglicol (PEG); dimensiones 60 m x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 μ m de espesor.
- Centrifuga Beckman Coulter Allegra 21.
- Jeringa de 10 μ L.

Reactivos.

- Agua destilada.
- Estándares de los compuestos a determinar (Tabla 2).
- Heptano --- Marca J.T BAKER
- Cloroformo --- Marca MEYER
- Hexano ---- Marca J.T BAKER
- Acetona ---- Marca MEYER
- Éter etílico --- Marca MEYER
- Ácido meta fosfórico ---- Marca J.T BAKER.

Material de laboratorio.

- Vasos de precipitados de 30 mL y 500 mL
- Matraz volumétrico de 5 mL
- Embudo de vidrio
- Tripie
- Espátula
- Micropipeta de 20-100 μ L.
- Pipetas volumétricas de 0.5 mL, 1 mL, 3 mL, 4 mL.

- Manta de cielo
- Tubos de centrifuga
- Propipeta
- Microespatula

Gases para el cromatógrafo.

- Aire grado extraseco --- Marca ProSpec
- Hidrógeno grado prepurificado --- Marca ProSpec
- Nitrógeno comprimido grado ultra alta pureza --- Marca ProSpec

Tabla 2. Propiedades de los estándares utilizados.

Compuesto	Pureza (%)	Peso molecular (g/mol)	Densidad (g/mL)	Punto ebullición (°C)	Marca
Ácido acético	99	60.05	1.04	117.9	Sigma-Aldrich
Acido propiónico	99.5	74.08	0.993	141	
Acido butírico	99	88.11	0.964	162	
Ácido isobutírico	99	88.11	0.948	153	
Ácido crotónico	98	86.09	0.939	184	

4.1. Preparación de soluciones

Solución de la mezcla de los estándares de ácidos grasos volatiles (C2-C4) y estándar interno. de ≈ 1000 mg/L.

En un vaso de precipitado de 30 mL se pesaron 26 mg de ácido crotónico (EI), se disolvió con un volumen considerado de acetona y se transferido a un matraz volumétrico de 25 mL, en el mismo matraz se agregaron 24 μ L de ácido acético, 25 μ L de ácido propiónico, 26 μ L de ácido butírico y 26 μ L de ácido isobutírico y se aforo con acetona.

Solución concentrada de la mezcla de los estándares de ácidos grasos volátiles (C2-C4).
(C2=2613.6 mg/L, C3=1273.6 mg/L, C4=1227.6 mg/L. C4i=435.6 mg/L).

En un vaso de precipitado de 30 mL se pesaron 66 mg de ácido acético, 32 mg de ácido propiónico, 31 mg de ácido butírico y 11 mg de ácido isobutírico se adiciona un volumen considerable de acetona, para luego transferir a un matraz de 25 mL y se aforo con acetona.

Solución concentrada de estándar interno 5194 mg/L.

En un vaso de precipitado de 30 mL se pesaron 132.5 mg de ácido crotonico y se disolvió con un volumen considerable de acetona para luego ser transferido a un matraz volumétrico de 25 mL y se aforo con acetona.

Solución de m-HPO₃ al 20%.

En un vaso de precipitado de 30 mL se pesaron 5 g de ácido meta fosfórico, se disolvió en agua destilada, se transfirió a un matraz volumétrico de 25 mL y se llevó aforo con agua destilada.

4.2. Selección de las condiciones de trabajo (equipo Buck).

Como primera parte de la implementación del método para la determinación de ácidos grasos volátiles de cadena corta (C₂-C₄), se seleccionaron las condiciones que permitieran, la separación con buena resolución, identificación y cuantificación de dichos ácidos.

Para ello se prepararon soluciones estándares de los ácido grasos volátiles (C₂-C₄) a una concentración aproximadamente de 1000 mg/L en diferentes disolventes. (acetona, hexano, agua destilada, cloroformo, heptano y éter etílico).

Se inyectaron por quintuplicado 2 µL de cada una de las soluciones estándares preparadas en diferentes gradientes de temperatura para determinar el coeficiente de variación de los tiempos de retención y los cocientes de las aéreas ($A_{*Cn} / A_{**E. I}$); como la resolución (Rs) de los picos sea mayor a 1.5 y el factor de selectividad (α) de estos sea mayor a 1. Con la finalidad de justificar las condiciones óptimas de trabajo.

*Cn= Ácido acético, Ácido propiónico, Ácido isobutírico y Ácido butírico.

** EI= Estándar Interno

4.3. Selección de las condiciones de trabajo (SHIMADZU)

Se inyectaron por quintuplicado 1 µL de una mezcla de las soluciones estándares a una concentración aproximadamente de 1000 mg/L, con un gradiente de temperatura de 80°C a 230°C con un crecimiento de 10°/min y las condiciones de trabajo de la tabla 5, para determinar el coeficiente de variación de los tiempos de retención y los cocientes de áreas ($A_{Cn} / A_{E.I}$); como la resolución y el factor selectividad (α) de estos sea mayor a 1.

**Nota: Las condiciones de trabajo y gradiente de temperatura descriptas en este punto 4.3 son las misma para los puntos 4.4, 4.6, 4.7, 4.8 y 5.9.*

4.4. Preparación de sistemas para las curvas de calibración.

Para la preparación de los sistemas para cada curva de calibración, se transfirieron en un matraz volumétrico de 5 mL los volúmenes establecidos en la tabla 3 de la solución concentrada de la mezcla de los estándares de ácidos grasos volátiles (C2-C4). (C2=2613.6 mg/L, C3=1273.6 mg/L, C4=1227.6 mg/L. C4i=435.6 mg/L), adicionado 1 mL de la solución concentrada de estándar interno, llevando al aforo con acetona.

Tabla 3. Preparación de los sistemas para la Curva de Calibración.

Sistema	Solución concentrada (C2-C4) (mL)	C2 [mg/L]	C3 [mg/L]	C4 [mg/L]	C4i [mg/L]	Solución Concentrada de EI (mL)	EI [mg/L]
1	0.5	261.36	127.36	122.76	43.56	1	1038.8
2	1	522.72	254.72	245.52	87.12	1	1038.8
3	2	1045.44	509.44	491.04	174.24	1	1038.8
4	3	1568.16	764.16	736.56	261.36	1	1038.8
5	4	2090.88	1018.88	982.08	348.48	1	1038.8

4.5. Tratamiento de la muestra.

Con la investigación previa se planteó que el tratamiento ideal de la muestra consta de los siguientes pasos como se muestra en la Figura 10.

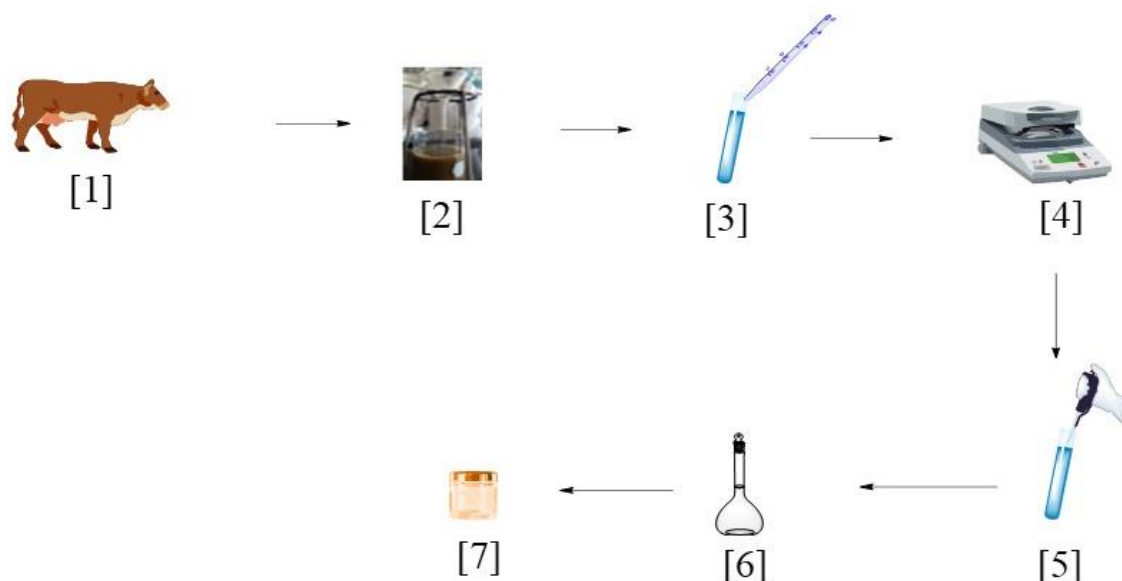


Figura 10. Pasos para el tratamiento de la muestra. [Elaborado con el software ChemDraw 15.0]

1. La muestra es proporcionada por el centro de enseñanzas agropecuarias ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4.
2. Con la manta de cielo filtrar el líquido ruminal, para separar cualquier residuo sólido.
3. Con una pipeta graduada transferir 7 mL del líquido ruminal filtrado a dos tubos de centrifuga. (ajustar al mismo peso los tubos).
4. Insertar los tubos en la centrifuga (uno enfrente del otro), ya con el equipo lleno centrifugar a 14 500 rpm x 12 minutos.
5. Ya con la muestra centrifugada recuperar el sobrenadante.
6. Con una pipeta volumétrica de 4 mL tomar el sobrenadante y verter este en un matraz volumétrico de 5 mL, posteriormente adicionar lentamente la solución de ácido meta fosfórico previamente preparada hasta llegar al volumen de aforo.
7. Homogenizar con movimientos lentos, posteriormente trasferir en un vial color ámbar y dejar el refrigeración y reposo por al menos 24 horas.

4.6. Identificación de los compuestos presentes.

Para la identificación de los compuestos de interés, en un matraz de volumétrico se adicionó 1 mL de la muestra sin centrifugar, 1 mL del EI y aforando con acetona. De igual forma en otro matraz volumétrico de 5 mL se adiciono 1 mL de la muestra centrifugada, 1 mL del EI y se aforo con acetona.

Se inyectó 1 μ L de cada muestra y posteriormente se compararon los tiempos de retención de cada uno de los estándares con los picos obtenidos en los cromatogramas de las muestras de líquido ruminal.

4.7. Fortificación de la muestra

La fortificación se realizó adicionando 500 μ L de la solución concentrada de la mezcla de los estándares de ácidos grasos volátiles (C2-C4) en matraz volumétrico de 5 mL al cual también se le adicionó 1 mL de la muestra de líquido ruminal tratada, 1 mL del EI y llevando a volumen de aforo con acetona.

4.8. Prueba de recobro.

Para verificar que no se presente un cambio significativo en las condiciones experimentales, se hizo una prueba de recobro. Al tratarse de una muestra compleja se optó por usar rumen y adicionar una cantidad conocida de los analitos estándar, variando la contratación (como se observa más adelante en la tabla 15), pero manteniendo constante la cantidad de la muestra y del estándar interno.

En un matraz de volumétrico de 5 mL se adiciono 1 mL del estándar interno concentrado, 1 mL de la solución de líquido ruminal previamente preparada como se indicó en la figura 1 y se agrega una cantidad conocida de los estándares.

5. RESULTADOS

5.1. Condiciones cromatográficas.

Las condiciones de trabajo de los dos cromatógrafos usados BUCK y SHIMADZU (Tabla 4 y 5), se mantuvieron constantes durante todo el desarrollo experimental.

Tabla 4. Condiciones de trabajo, equipo BUCK.

Fase estacionaria	Columna DB-WAX 100% (polietilenglicol)	
Dimensiones columna	30 m x 0.53 mm D.I x 1 µm de film.	
Inyector	On-Column	
Flujo de la fase móvil	7-10 mL/min	
Temperatura detector	250 °C	
Volumen de inyección	1 µL	
Flujo de gases	Aire	400 mL/min
	H ₂	30 mL/min
	N ₂	16 mL/min

Tabla 5. Condiciones de trabajo, equipo SHIMADZU.

Fase estacionaria	Columna PE-WAX 100% (polietilenglicol)	
Dimensiones columna	60 m x 0.25 mm D.I x 0.25 µm de film.	
Inyector	Split/Splitless	
Tipo de inyección	Split	mL/min
	Split ratio	39
Flujo de la fase móvil	2 mL/min	
Temperatura del inyector	250 °C	
Temperatura detector	260 °C	
Volumen de inyección	1 µL	
Flujo de gases	Aire	400 mL/min
	H ₂	40 mL/min
	N ₂	30 mL/min

5.2. Selección de las Condiciones Cromatográficas (Equipo 1).

Se empezó a trabajar con cromatógrafo Buck Scientific modelo 910 y una columna DB-WAX, a las condiciones previamente programadas con un primer gradiente de temperatura (40°-180°C a 10°/min),

La tabla 6 muestra que fue posible la separación de los estándares de ácidos grasos (C2-C4) en los disolventes empleados, esto debido a que el factor de selectividad es mayor a 1 y la resolución mayor a 1.5.

Tabla 6. Selectividad y Resolución para una mezcla de estándares
Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Disolvente	Compuesto	tr (min)	W $\frac{1}{2}$ (s)	α	Rs
Heptano	C2	4.71	24	$\alpha_{C2/C3} = 1.26$	$Rs_{C2/C3} = 3.40$
	C3	5.78	25	$\alpha_{C3/C4} = 1.57$	$Rs_{C3/C4} = 7.33$
	C4	6.86	24	$\alpha_{C2/C4} = 1.98$	
Agua	C2	5.48	18	$\alpha_{C2/C3} = 1.14$	$Rs_{C2/C3} = 2.65$
	C3	6.18	21	$\alpha_{C3/C4} = 1.47$	$Rs_{C3/C4} = 6.96$
	C4	7.05	23	$\alpha_{C2/C4} = 1.68$	
Éter etílico	C2	4.68	26	$\alpha_{C2/C3} = 1.25$	$Rs_{C2/C3} = 3.32$
	C3	5.73	25	$\alpha_{C3/C4} = 1.55$	$Rs_{C3/C4} = 6.81$
	C4	6.76	25	$\alpha_{C2/C4} = 1.95$	
Acetona	C2	4.65	23	$\alpha_{C2/C3} = 1.25$	$Rs_{C2/C3} = 3.43$
	C3	5.66	24	$\alpha_{C3/C4} = 1.58$	$Rs_{C3/C4} = 7.04$
	C4	6.73	25	$\alpha_{C2/C4} = 1.99$	
Cloroformo	C2	3.86	28	$\alpha_{C2/C3} = 1.31$	$Rs_{C2/C3} = 2.88$
	C3	4.93	29	$\alpha_{C3/C4} = 1.68$	$Rs_{C3/C4} = 5.12$
	C4	6.05	34	$\alpha_{C2/C4} = 2.22$	
Hexano	C2	3.96	28	$\alpha_{C2/C3} = 1.3$	$Rs_{C2/C3} = 2.72$
	C3	5.01	30	$\alpha_{C3/C4} = 1.67$	$Rs_{C3/C4} = 5.23$
	C4	6.1	33	$\alpha_{C2/C4} = 2.17$	

Como la separación fue adecuada en todos los disolventes y se cumplen con los parámetros de selectividad y resolución, se evaluaron otros parámetros como el tiempo de retención y los cocientes de las áreas ($A_{Cn} / A_{E.1}$), donde se busca que el coeficiente de variación sea menor al 2%. Como se observa en la tabla 7 solo el éter etílico, de los seis disolventes evaluados cumple con todos los parámetros establecidos, bajo las condiciones cromatográficas evaluadas.

Tabla 7. Coeficiente de Variación (%) para el Tr y cociente de áreas con respecto al EI.
Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Disolvente	t_r				A_{cn}/A_{EI}		
	C2	C3	C4	EI	C2	C3	C4
Heptano	1.22	1.2	1.36	1.06	14.3	2.72	2.96
Acetona	7.62	6.64	5.43	4.47	8.52	6.72	5.31
Éter etílico	0.85	0.72	0.40	0.62	1.71	1.66	1.71
Hexano	3.31	2.44	1.46	0.77	18.9	26.9	15.7
Cloroformo	1.09	1.16	1.07	1.26	8.72	5.94	2.55

Se cambió el gradiente de temperatura a 50°C -220°C a 15°/minuto (Tabla 8 y 9), para buscar si más disolventes cumplen con los parámetros estadísticos establecidos con la finalidad detener al menos dos disolventes.

Tabla 8. Selectividad y Resolución para una mezcla de estándares
Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Disolvente	Compuesto	t_r (min)	$W_{1/2}$ (s)	α	R_s
Heptano	C2	2.63	18	$\alpha_{C2/C3} = 1.30$	$R_{sC2/C3} = 2.56$
	C3	3.28	21	$\alpha_{C3/C4} = 1.72$	$R_{sC3/C4} = 5.16$
	C4	4.01	23	$\alpha_{C2/C4} = 2.24$	
Agua	C2	3.28	90	$\alpha_{C2/C3} = 2.12$	$R_{sC2/C3} = 5.37$
	C3	3.6	25	$\alpha_{C3/C4} = 3.97$	$R_{sC3/C4} = 9.49$
	C4	4.13	23	$\alpha_{C2/C4} = 8.42$	
Éter etílico	C2	2.6	22	$\alpha_{C2/C3} = 1.31$	$R_{sC2/C3} = 2.61$
	C3	3.26	21	$\alpha_{C3/C4} = 1.72$	$R_{sC3/C4} = 5.58$
	C4	3.96	21	$\alpha_{C2/C4} = 2.25$	
Acetona	C2	2.6	17	$\alpha_{C2/C3} = 1.32$	$R_{sC2/C3} = 3.01$
	C3	3.28	19	$\alpha_{C3/C4} = 1.72$	$R_{sC3/C4} = 5.94$
	C4	4	20	$\alpha_{C2/C4} = 2.29$	
Cloroformo	C2	2.55	17	$\alpha_{C2/C3} = 1.33$	$R_{sC2/C3} = 3.03$
	C3	3.21	19	$\alpha_{C3/C4} = 1.72$	$R_{sC3/C4} = 5.5$
	C4	3.88	21	$\alpha_{C2/C4} = 2.31$	
Hexano	C2	2.68	22	$\alpha_{C2/C3} = 1.31$	$R_{sC2/C3} = 2.26$
	C3	3.38	25	$\alpha_{C3/C4} = 1.67$	$R_{sC3/C4} = 4.62$
	C4	4.21	26	$\alpha_{C2/C4} = 2.2$	

Tabla 9. Coeficiente de Variación (%) para el Tr y cocientes de áreas con respecto al EI.
Gradiente 50°C-220°C a 15°/min.

Disolvente	t_r				A_{cn}/A_{EI}		
	C2	C3	C4	EI	C2	C3	C4
Heptano	0.6	0.48	0.41	0.3	10.6	1.03	1.37
Acetona	0.81	0.65	0.41	0.4	1.81	1.66	0.91
Éter etílico	0.82	0.92	0.9	1.17	13.7	16.4	12
Hexano	0.8	1.36	2.37	0.68	5.3	4.16	7.4
Cloroformo	1.41	1.21	2.12	1.98	5.07	3.99	6.18

Como se puede observar de igual forma la selectividad es mayor a 1 y la resolución a 1.5, pero nuevamente solo uno de los disolventes empleados cumple con todos los parámetros establecidos, siendo la acetona bajo este gradiente.

5.3. Selección de las condiciones cromatográficas (SHIMADZU).

Se presento la oportunidad de utilizar otro equipo más moderno y recién instalado, un cromatógrafo SHIMADZU modelo GC-2010 Plus, por lo que se utiliza una fase estacionaria similar (PE-WAX), como previamente en el anterior equipo solo la acetona y el éter etílico cumplieron con los parámetros establecidos pero en gradientes diferentes, se propuso el uso de un nuevo gradiente (80°C – 230°C a 10°C/min), donde se verifica que los parámetros estadísticos del tiempo de retención y del cociente de áreas con respecto al EI se cumplan (tabla 10).

Tabla 10. Coeficiente de Variación (%) para el Tr y cocientes áreas respecto al EI.
Gradiente 80°C-230°C a 10°/min.

Disolvente	t_r				A_{cn}/A_{EI}		
	C2	C3	C4	EI	C2	C3	C4
Acetona	0.055	0.023	0.016	0.007	1.16	0.37	1.18
Éter etílico	0.029	0.026	0.028	0.019	1.89	1.61	1.50

Se observa que para ambos disolventes se cumple con un CV menor al 2%. Por lo que ambos, serán evaluados durante el tratamiento de la muestra.

Por lo anterior se establecen que las condiciones óptimas para trabajar son empleando el Equipo SHIMADZU modelo GC-2010 Plus, una columna con fase estacionaria de polietilenglicol (PE-

WAX), flujo de fase móvil N_2 = 30 mL/min y un flujo de gases para el FID (Aire= 400 mL/min, Hidrogeno= 40 mL/min,), Temperatura del inyector a 250°C, Temperatura del detector a 260°C y un gradiente de temperatura 80°-240°C a 10°/min.

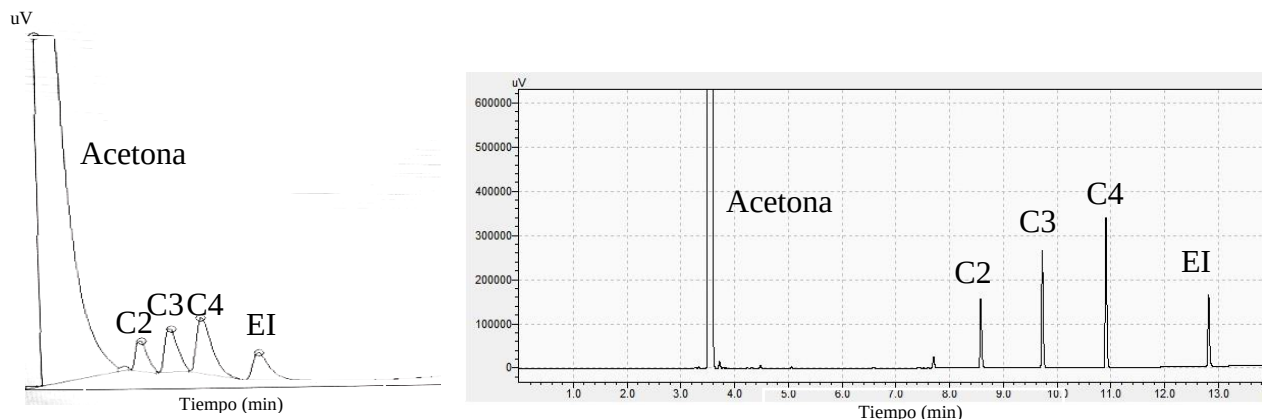


Figura 11. Comparación de los cromatogramas obtenidos con equipo Buck (izquierda) y equipo Shimadzu (derecha).
(C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico, (C4i) ácido isobutírico y (EI) ácido crónico

En la figura 11 se aprecia que con el equipo Shimadzu se presenta una mejor separación de los picos, dado que son más eficientes (angostos) y a su vez las señales obtenidas tienen mejor nitidez.

5.4. Identificación de los ácidos grasos volátiles de cadena corta en líquido ruminal.

Para llevar a cabo la identificación de los compuestos de interés presentes en el líquido ruminal se eligió la acetona como disolvente ideal, por presentar menor porcentaje el coeficiente de variación de los criterios establecidos previamente, y porque como se observa en la figura 12 se presentó la formación de un precipitado al usar éter etílico como disolvente en la muestra, mientras al emplear la acetona no se formó ningún precipitado.

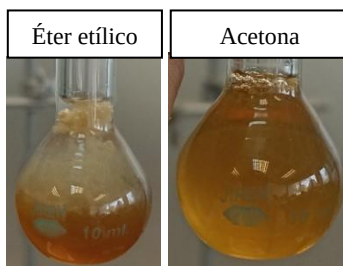


Figura 12. Líquido ruminal en mezcla con éter etílico (izquierda) y acetona (derecha).

Una vez disuelta la muestra en acetona, se realizó el análisis utilizando la muestra sin centrifugar la cual se filtró a través de un acrodisco de 0.45 μm , para llevar a cabo identificación de los AGV en el líquido ruminal se compararon los tiempos de retención de las señales de la muestra con respecto a los tiempos de retención de los estándares de AGV. La figura 13 muestra el cromatograma de los estándares de AGV (C2-C4) señalando los tiempos de retención de cada estándar.

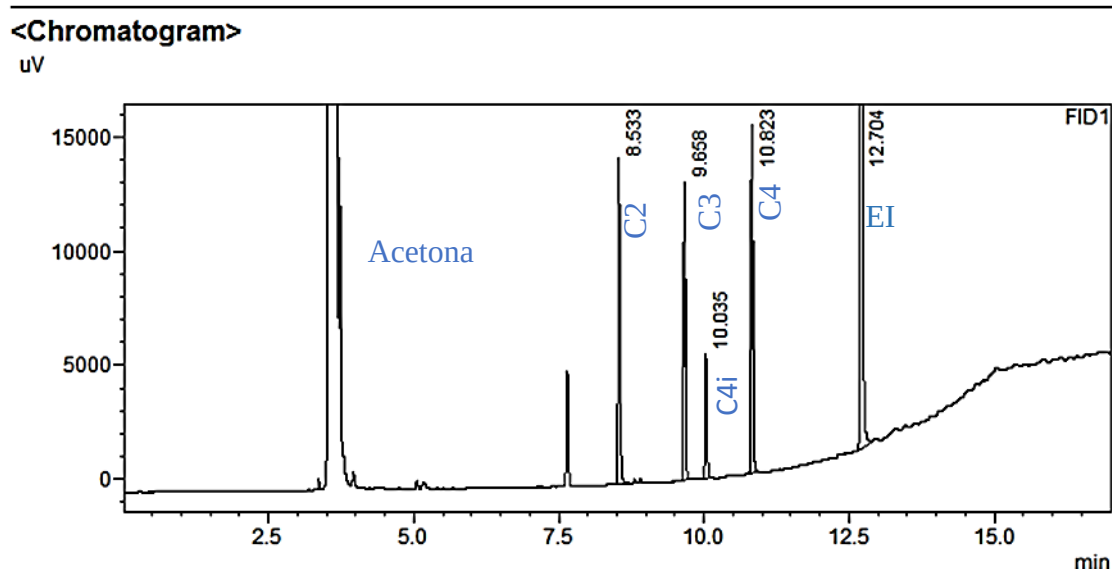


Figura 13. Cromatograma para la mezcla de estándares de ácidos grasos volátiles: (C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico, (C4i) ácido isobutírico y (EI) ácido crónico
Condiciones: Columna PE-WAX 60 m, 0.25 mm, 0.25 μm , inyección de 1 μL . FM: N_2 ,
Gradiente: 80°C-230° a 10°/min.

Por otra parte, la figura 14 muestra el cromatograma de la muestra sin centrifugar donde se puede observar varias señales obtenidas en el líquido ruminal, comparando de los tiempos de retención de los estándares de AGV se presentan cuatro señales que coinciden, estas son las que corresponden al ácido acético, ácido propiónico, ácido butírico y el ácido crónico (EI). Mientras que la señal correspondiente al ácido isobutírico es nula, esto se debe a que existe mucha interferencia, es decir que el tratamiento no es el adecuado.

<Chromatogram>

uV

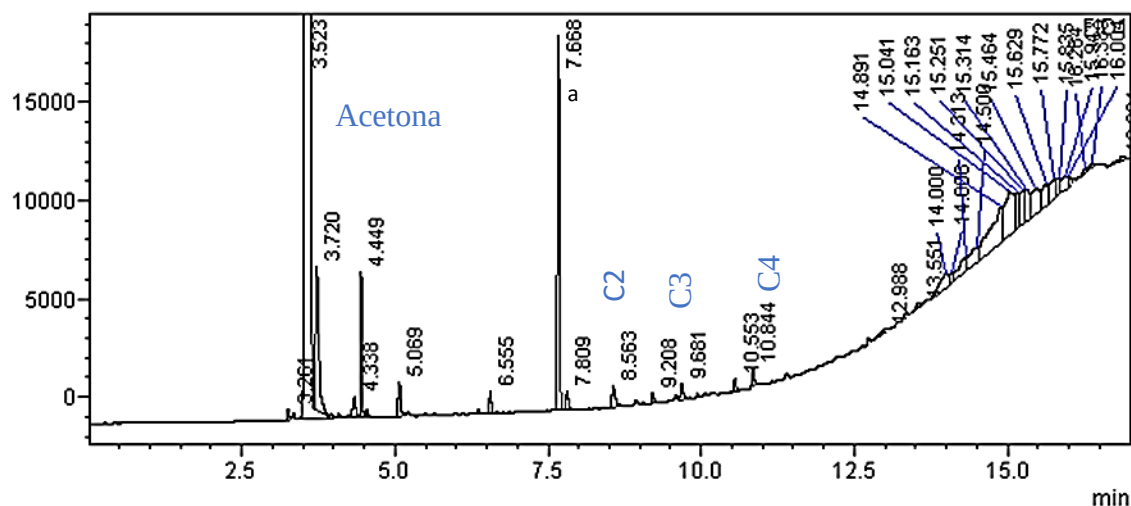


Figura 14. Cromatograma de la muestra de líquido ruminal sin centrifugar: (C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico y (C4i) ácido isobutírico. Columna PE-WAX 60 m, 0.25 mm, 0.25 μ m, inyección de 1 μ L. FM: N₂. Gradiente: 80°C-230° a 10°/min.

A fin de eliminar algunas señales y el ruido generado, se analizó una muestra de líquido ruminal tratada y filtrado por acrodisco de 0.45 μ m (figura 15), en la cual se observa un cromatograma más simple y al comparar los tiempos de retención de las obtenidas señales con respecto a los tiempos de retención de los estándares AGV se obtuvieron las señales correspondientes de analitos de interés.

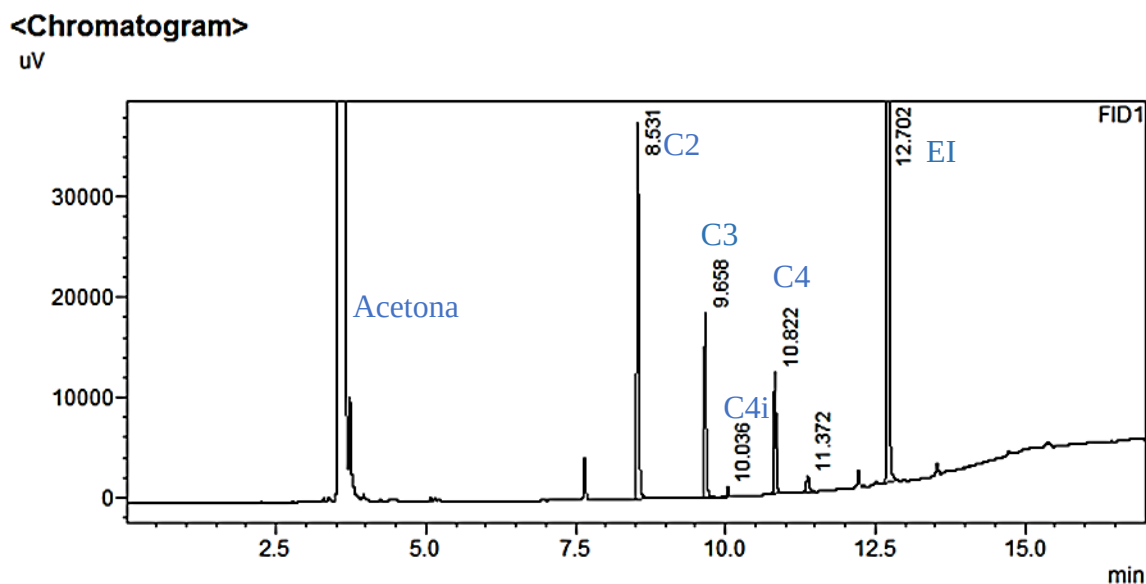


Figura 15. Cromatograma de la muestra de líquido ruminal centrifugada: (C2) ácido acético, (C3) ácido propiónico, (C4) ácido butírico, (C4i) ácido isobutírico y (EI) ácido crónico. Condiciones como se indica en la figura 12.

Para corroborar que hay un cambio notorio de la muestra centrifugada y la muestra sin centrifugar, se compararon las áreas bajo la curva de los picos relacionados a los ácidos grasos volátiles C1-C4 (tabla 11), con la finalidad de observar si existe

Tabla 11. Áreas obtenidas para los analitos en la misma muestra con dos tratamientos.

Muestras	C2	C3	C4i	C4
Sin centrifugar	3972	2215	342	2377
Centrifugada	79817	39999	2014	26820

La tabla 11 muestra el aumento notorio en las áreas de los estándares de ácidos grasos volátiles en la muestra centrifugada con respecto a las áreas de los estándares de la muestra sin centrifugar, a su vez el cromatograma de la muestra centrifugada presenta menos señales, por lo cual se decide que el líquido ruminal debe ser centrifugado y filtrado antes de ser analizado en el cromatógrafo.

5.5. Fortificación de la muestra de líquido ruminal.

Para garantizar que dichas señales correspondan a los tiempos de retención de los estándares de ácidos grasos volátiles, la muestra fue fortificada con una cantidad de 200 mg/L de los mismos estándares (figura 16).

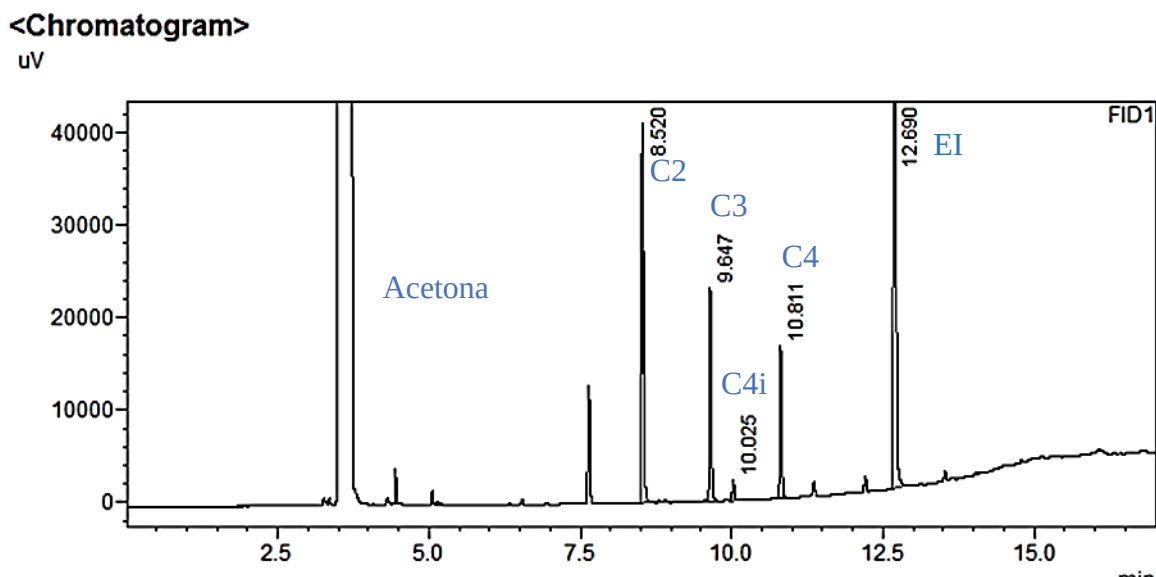


Figura 16. Cromatograma muestra de líquido ruminal fortificado.
Condiciones como se indica en la figura 12.

Se sobrepone el cromatograma de la muestra fortificada contra el cromatograma de la muestra centrifugada, con la finalidad de observar se hay un aumento en la intensidad de las señales (figura 17).

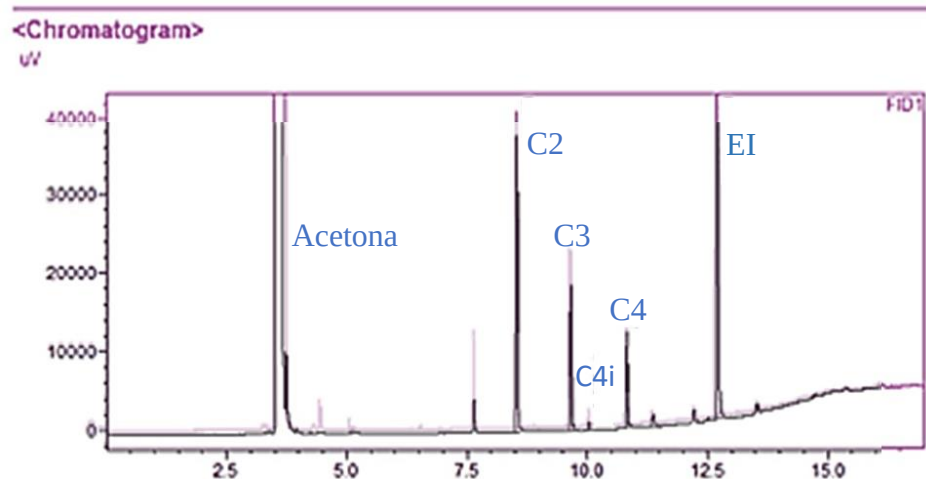


Figura 17. Cromatogramas de la muestra de líquido ruminal (●) y fortificado (●).

Se observa es notorio el aumento en la intensidad de las señales de la muestra con respecto a la muestra fortificada con los estándares de los AGV, esto a su vez nos ratifica que estas señales si corresponden a los AGV, de igual forma se comparan las áreas de los picos como se muestra en la tabla 12. Como era de esperarse hubo un aumento en las áreas de los AGV.

Tabla 12. Áreas obtenidas para los analitos en la misma muestra.

Muestras	C2	C3	C4i	C4
Sin fortificar	79817	39999	2014	26820
Fortificada	100869	58073	8959	48697

5.6. Curvas de calibración.

Una vez que se cuenta con las condiciones óptimas de separación y el tratamiento adecuado para realizar al líquido ruminal, se procede a la preparación y construcción de las curvas de calibración para los cuatro analitos de interés.

Las figuras 18 a la 21 muestran los datos y el análisis de regresión lineal (tabla 12), correspondientes a las curvas de calibración para cada compuesto, medidas por triplicado.

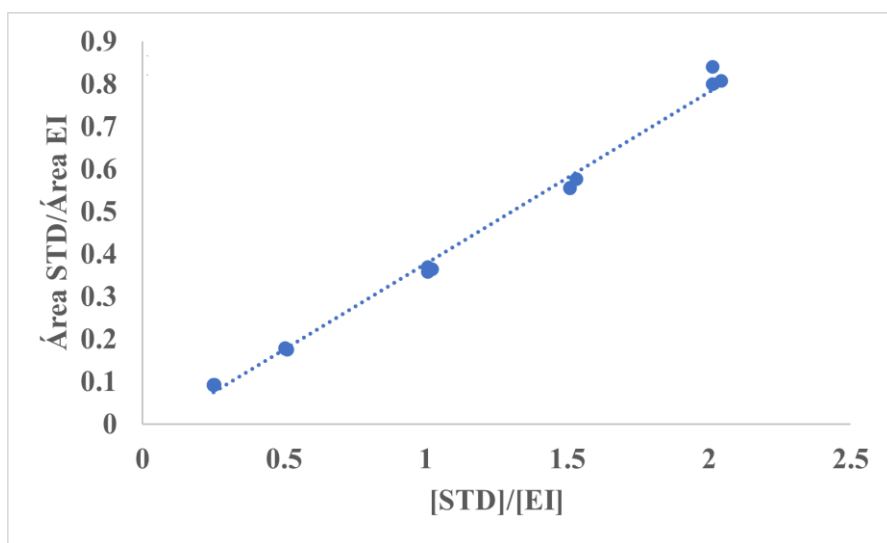


Figura 18. Curva de calibración para la determinación de ácido acético.

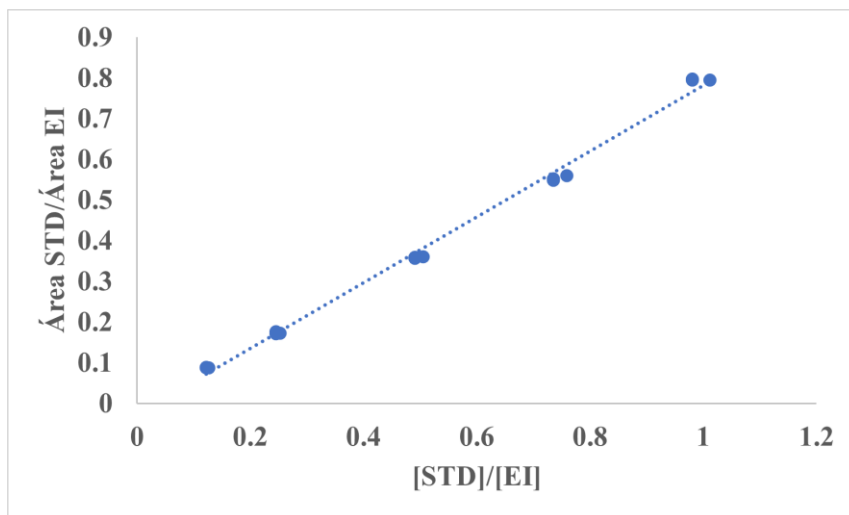


Figura 19. Curva de calibración para la determinación de ácido propiónico.

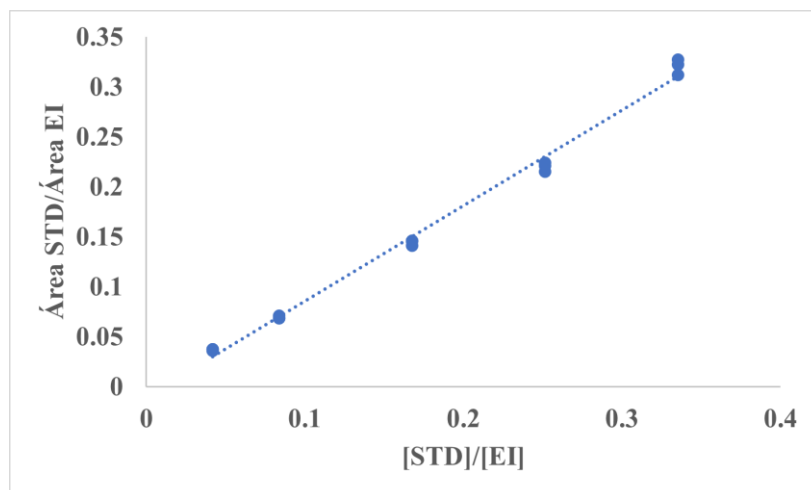


Figura 20. Curva de calibración para la determinación de ácido isobutírico.

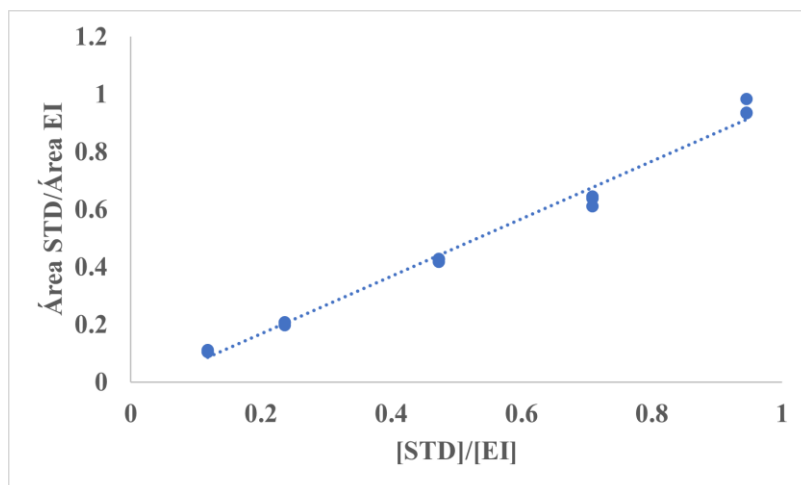


Figura 21. Curva de calibración para la determinación de ácido butírico.

Las curvas de calibración obtenidas presentan una tendencia lineal y la precisión de las tres repeticiones parece adecuada, dado que la dispersión de los datos es no significativa.

En la tabla 13 se observa que los coeficientes de determinación ajustados son mayores a 0.99 a excepción del ácido butírico, y el error crítico para todo es menor al 3%. Con estos resultados se considera que el sistema para cada analito presenta una linealidad adecuada.

Tabla 13. Parámetros de linealidad de las curvas de calibración.

Analito	Pendiente	ordenada	R^2	LD (mg/L)	LC (mg/L)	Error critico de F
C2	0.4044	-0.0271	0.9927	0.1720	0.5735	1.69×10^{-15}
C3	0.8171	-0.0266	0.9956	0.0645	0.2151	6.11×10^{-16}
C4i	0.9559	-0.0099	0.9928	0.0282	0.0942	1.50×10^{-15}
C4	0.9991	-0.0323	0.9882	0.1026	0.3422	1.05×10^{-14}

5.7. Tratamiento de la muestra

Debido a que el pH del sobrenadante del líquido ruminal es 6 y en general los pKa de los ácidos grasos volátiles (C2-C4) tiene un valor de 4.7 a 5, estos nos indica que los ácidos grasos volátiles pueden encontrarse como la base conjugada, por lo cual para favorecer la forma neutra de los ácidos grasos volátiles se ajusta el pH a 4 del sobrenadante del líquido ruminal con un ácido inorgánico de fuerza media como el ácido meta fosfórico (HPO_3) y se procede a realizar el análisis cromatográfico de dichas soluciones.

En las figuras 22 y 23 se presentan los cromatogramas de la muestra centrifugada y filtrada y la de la muestra acidulada con HPO_3 ; se observa un aumento en las señales correspondientes a los ácidos grasos volátiles en la muestra acidulada. La comparación de las señales de los ácidos grasos volátiles C1-C4 se resume en la tabla 14.

<Chromatogram>

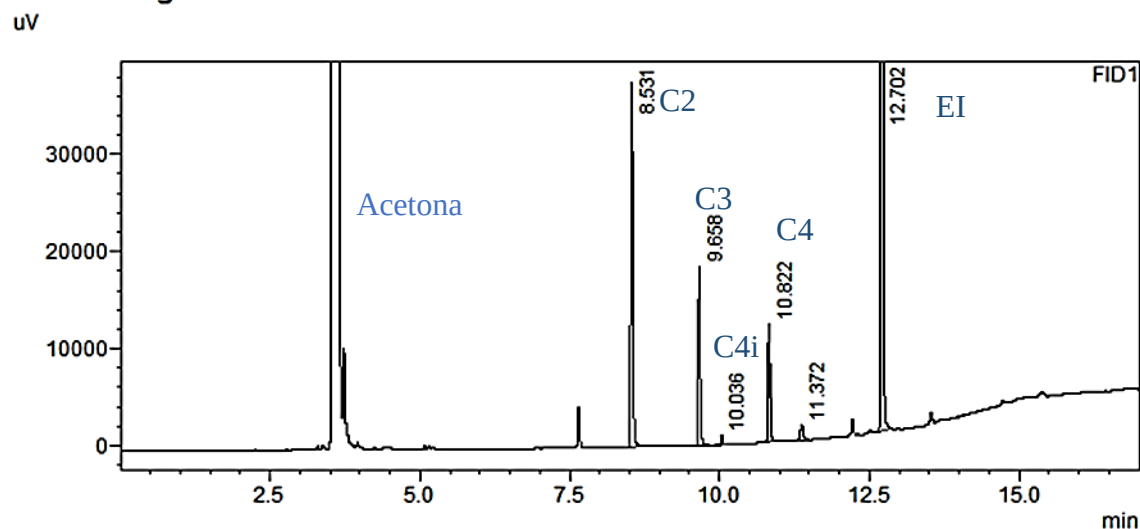


Figura 22. Cromatograma muestra de líquido ruminal centrifugado, sin HPO_3

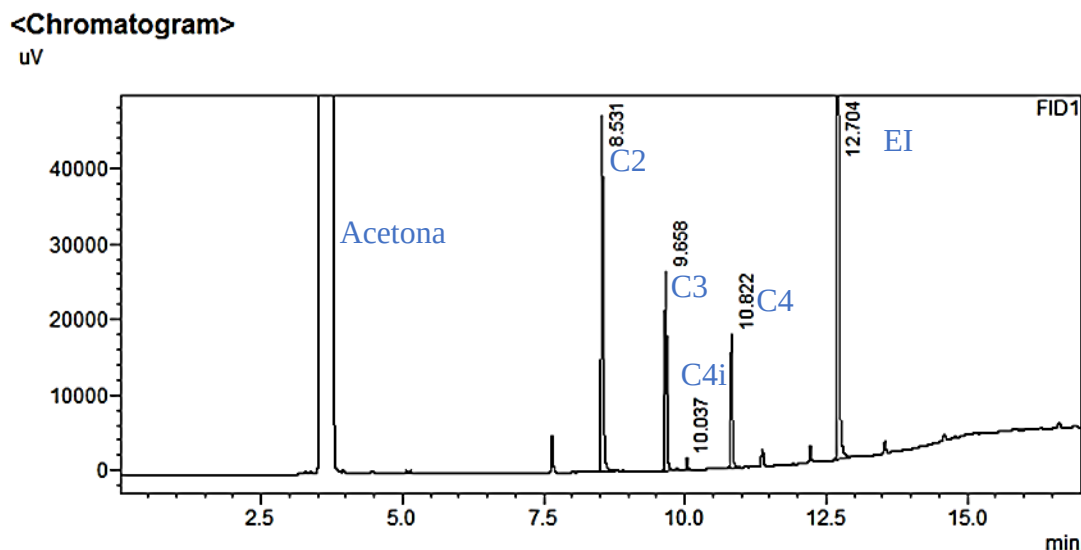


Figura 23. Cromatograma muestra de líquido ruminal centrifugado con HPO_3 .

Tabla14. Comparación de áreas de una muestra acidificada vs una muestra sin acidificar.

Muestras	C2	C3	C4i	C4
Sin HPO_3	79817	399999	2014	26820
Con HPO_3	105560	56464	3387	39632

Los resultados obtenidos indican que la adición de ácido meta fosfórico favorece la existencia de la especie neutra de los ácidos grasos volátiles presentes en el líquido ruminal y por tanto se facilita su determinación por cromatografía de gases, por ello se logra una mayor eficiencia en la cuantificación de los analitos bajo estudio

5.8. Prueba de recobro.

A fin de determinar cuantitativamente el recobro que se tiene de los analitos por el tratamiento planteado a la muestra de líquido ruminal, se procede a realizar estudios de recobro, adicionando una concentración conocida de los analitos antes de realizar el tratamiento a una alícuota de la

muestra previamente analizada. En la tabla 15 se indican las concentraciones adicionadas a los sistemas de la muestra de líquido ruminal.

Tabla 15. Concentraciones adicionadas (mg/L) para los sistemas de la muestra. (n=3)

Analito	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3
C2	52.27	104.54	156.82
C3	25.47	50.94	76.42
C4	8.71	17.42	26.13
C4	26.93	53.86	80.78

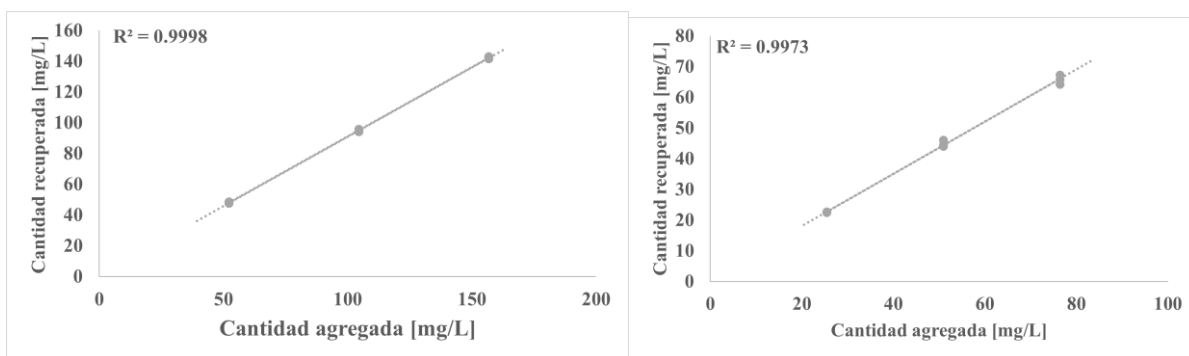


Figura 24. Análisis de recobro para el ácido acético (izquierda) y ácido propiónico (derecha).

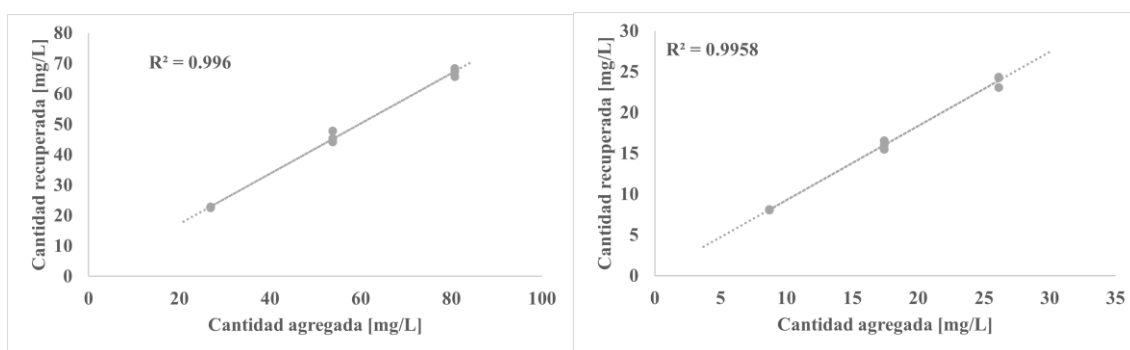


Figura 25. Análisis de recobro para el ácido isobutírico (izquierda) y ácido butírico (derecha)

Como se observa en las Figuras 24 y 25 la dispersión de los puntos en los tres niveles de concentración no es significativa y los coeficientes de determinación son mayores a 0.98 en todos los casos. De igual forma se realizó el análisis estadístico para el porcentaje de recobro en los tres niveles de concentración como se presenta en la tabla 16.

Tabla 16. Recobro en porcentaje para los tres niveles de concentración.

Analito	Porcentaje de Recobro			$\bar{X}$	S	CV%
	Sistema 1	Sistema 2	Sistema 3			
C2	91.67	90.91	90.66	91.08	0.53	0.58
C3	88.16	88.00	86.05	87.40	1.18	1.35
C4i	92.64	92.01	91.42	92.02	0.61	0.66
C4	84.17	84.97	83.02	84.06	0.98	1.17

Al tratarse de una muestra biológica el parámetro sobre el coeficiente de variación que se considera como aceptable será todo aquel menor al 3%, en este caso todos los sistemas fortificados cumplen con dicho parámetro, esto indica que hay una variación aceptable y de acuerdo con el artículo “*Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*”, el porcentaje de recobro está en un rango del 80-110%¹⁸, y como se observa en la tabla 16 todos los analitos están por encima del 80%, por lo cual la pérdida de los analitos de interés durante el tratamiento de la muestra es aceptable.

5.9. Cuantificación de ácidos grasos volátiles en muestras de líquido ruminal.

Para la cuantificación de los ácidos grasos volátiles en líquido ruminal se analizaron tres muestras diferentes provenientes de dos razas distintas de vacas, siendo dos muestras provenientes de la raza Holstein y la otra de raza Angus, donde cada muestra se analizó por triplicado, con las pendientes y ordenadas obtenidas de las curvas de calibración se hace el cálculo para obtener la concentración presente de los ácidos grasos en cada muestra.

Considerando la prueba de recobro, se observó la pérdida de analitos por ello se hace un recalcu lo contemplando el recobro de la siguiente forma:

$$100\% \text{ de la muestra total} = \frac{[\text{mg/L}] \text{ en la muestra determinados}}{[\text{mg/L}] \text{ recuperados}}$$

Despejando [mg/L] totales en la muestra

$$[\text{mg/L}] \text{ totales en la muestra determinados} = \frac{100\% \text{ de la muestra totales}}{[\text{mg/L}] \text{ recuperados}}$$

Tabla 17. Concentración [mmol/L] de ácidos grasos en liquido ruminal Vaca 1 (Holstein).

Muestra	C2	C3	C4i	C4
1	79.307	18.611	1.339	10.420
2	78.522	18.408	1.345	10.315
3	79.983	18.778	1.377	10.498
$\bar{X}$	79.270	18.599	1.425	10.013
S	0.731	0.185	0.021	0.092
%CV	0.922	0.997	1.452	0.919

Tabla 18. Concentración [mmol/L] de ácidos grasos en liquido ruminal Vaca 2 (Holstein).

Muestra	C2	C3	C4i	C4
1	82.1278	17.1493	1.4213	11.4758
2	81.9107	17.1394	1.3974	11.2287
3	77.9091	16.8095	1.4369	11.1966
$\bar{X}$	80.6492	17.0327	1.4935	10.8686
S	2.3755	0.1934	0.0199	0.1528
%CV	2.9455	1.1356	1.3317	1.4057

Tabla 19. Concentración [mmol/L] de ácidos grasos en liquido ruminal Vaca 3 (Angus).

Muestra	C2	C3	C4i	C4
1	38.00	9.2234	1.2379	6.0889
2	39.4518	9.4388	1.2944	5.8680
3	38.7643	9.3435	1.2791	5.9051
$\bar{X}$	38.7390	9.3352	1.3376	5.7265
S	0.7258	0.1079	0.0292	0.1183
%CV	1.8735	1.1564	2.1853	2.0654

Como se observa en las tablas 17 a 19, la concentración de los AGV varia, sin embargo, los CV son menores al 3% para todos los analitos.

Se realizo un comparativo sobre la cantidad de ácidos grasos volátiles contenidos en liquido ruminal de diferentes vacas con los datos reportados (tabla 20).

Tabla 20. Contenido de AGV reportados. ^{1, 19.}

Analito	mmol/L
C2	60-90
C3	15-30
*C4i	10-25
*C4	10-25

***Nota:** La literatura reporta el total de ácidos butírico, es decir contemplando su isómero.

Tabla 21. Comparativo del contenido de AGV considerando el recobro y sin considerar.

Analito	Sin ajuste			Con ajuste		
	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3	Vaca 1	Vaca 2	Vaca 3
C2	72.19	73.45	35.28	78.64	80.01	38.43
C3	16.25	14.88	8.15	18.59	17.03	9.33
*C4i	1.24	1.30	1.16	1.42	1.49	1.33
*C4	8.75	9.49	5.00	10.01	10.86	5.72

Como se observa en la tabla 21 hay un ligero aumento en el contenido de los AGV haciendo el reajuste con el porcentaje de recobro determinados, lo cual para el caso la vaca 1 hace que el ácido butírico ya esté en el rango de lo reportado, mientras que para la vaca 2 pasa los mismo pero con el ácido propiónico, esto nos indica la importación de la prueba de recobro ya que compuestos que estaban por debajo de lo mínimo reportado con el reajuste ahora ya se encuentra en el intervalo de lo reportado. Por otra parte, se observa que el contenido de ácidos grasos volátiles es diferente, sobre todo entre las dos razas. Para las vacas de la raza Holstein la concentración está en general dentro de los límites de contenido de los ácidos grasos y son similares entre ellas.

En general para los cuatro analitos, la cantidad de AGV se encuentra cercanos al mínimo reportado, es decir, cumplen con lo mínimo de contenido de ácidos grasos volátiles. Estos resultados pueden estar relacionado a que este tipo de raza Holstein que destaca por ser buena en la producción de leche, por ello se espera que el porcentaje de ácido acético este por encima de lo mínimo reportado, ya que el ácido acético ayuda al aumento de producción de leche.

Mientras tanto, para la raza Angus las concentraciones de C2-C4 en general tienen un déficit aproximadamente del 45% en el contenido de dichos ácidos, esto puede ser debido a que la dieta de esta raza se encuentra en un déficit de carbohidratos o el contenido de ácidos grasos se encuentra en su forma liposoluble por lo cual son absorbidos rápidamente por difusión a través de la membrana luminal o también está la posibilidad que la carga microbiana este por debajo de lo requerido.

6. CONCLUSIONES.

Se determinaron las condiciones óptimas de trabajo que permiten la separación de los estándares ácidos grasos volátiles (C2-C4), ácido acético, propiónico, isobutírico y butírico y del ácido crónico como estándar interno. Se usó un cromatógrafo de gases SHIMADZU modelo GC-2010 Plus equipado a un detector de ionización de flama (FID), una columna PE-WAX y un gradiente de separación de 80°C-230°C a 10°/min; se utilizó nitrógeno como fase móvil y se inyectó 1 microlitro de muestra. Las curvas de calibración para los compuestos C2-C4 presentaron una tendencia linealidad de acuerdo con el coeficiente de correlación.

Se estableció el tratamiento más adecuado de las muestras de líquido ruminal que permite la determinación óptima del contenido de ácidos grasos en este, con recobros superiores al 85% en general y coeficientes de variación menores al 3%

Fue posible identificar los ácidos grasos volátiles presentes en muestras de líquido ruminal de dos razas de vacas comparando los tiempos de retención de las señales con respecto a los estándares. Además, se logró realizar la cuantificación de los analitos bajo estudio y comparar con los datos reportados en las literaturas, determinándose que las muestras analizadas presentan diferencias de acuerdo con la raza de la vaca.

7. REFERENCIAS.

1. Church, D. C. (1988). *EL RUMIANTE Fisiología digestiva y nutrición*. ACRIBIA.
2. Araujo, F. O., & Vergara, L. J. (2007). El rumen. *Arch. Latinoam. Prod. Anim*, 15(1), 133–140. https://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/manejo_del_alimento/49-rumen.pdf.
3. Alvarez, R. J., & Medellín, R. A. (2005). *Bos taurus Linnaeus*. CONABIO. <http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/exoticas/fichaexoticas/Bostaurus00.pdf>
4. Zavaleta, E., (2007 10). *Los ácidos grasos volátiles, fuente de energía en los rumiantes*. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. <https://www.fmvz.unam.mx/fmvz/cienciavet/revistas/CVvol1/CVv1c09.pdf>.
5. García, C. D. (2016). *Aspectos generales sobre el rumen y su fisiología*. <https://www.ganaderia.com/destacado/Aspectos-generales-sobre-el-rumen-y-su-fisiologia>
6. Cardozo, S. P. (2005). *Efectos de los Extractos de Plantas sobre las Características de Fermentación Ruminal en Sistemas In Vitro e In Vivo*. Universidad Autónoma de Barcelona.
7. ECOVAL. (2022, marzo 1). *¿Qué son los ácidos grasos volátiles?* Interreg sudoe ecoval. <https://ecoval-sudoe.eu/que-son-los-acidos-grasos-volatiles/>
8. Tamez, V. S. (2022). *Importancia de los ácidos grasos volátiles en la alimentación de los bovinos*. Ganaderia. <https://www.ganaderia.com/destacado/importancia-de-los-acidos-grasos-volatiles-en-la-alimentacion-de-los-bovinos>
9. *Compendium of Chemical Terminology Gold Book*. (2014). International Union of Pure and Applied Chemistry; <https://goldbook.iupac.org/files/pdf/goldbook.pdf>
10. *Cromatografía de gases (GC)*. (s/f). MERCK. Recuperado el 10 de septiembre de 2023, de <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/applications/analytical-chemistry/gas-chromatography>
11. *CROMATOGRAFIA DE GASES*. (2010 11). Museo Nacional de Ciencias Naturales. https://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf

12. *Cromatografía de gases*. (2007). Linde. https://www.linde-gas.es/es/images/Cromatograf%C3%ADa%20de%20gases%2019107-01_tcm316-120150.pdf
13. Harris, D. (2007). *Análisis químico cuantitativo* (3ª Edición). REVERTÉ.
14. Rubinson, J., & Rubinson, K. (2000). *Química Analítica Contemporánea*. Pearson Educación.
15. Cela, R., & Lorenzo, R. (2003). *Técnicas de separación en química analítica*. Síntesis
16. Kenkel, J. (1988). *Analytical Chemistry for Technicians*. Lewis Publishers.
17. *Polvo de ácido crotonico CAS 107-93-7*. (s/f). Bloom Tech.
<https://es.bloomtechz.com/synthetic-chemical/organic-intermediates/crotonic-acid-powder-cas-107-93-7.html>
18. Taverniers, I., De Loose, M., & Van Bockstaele, E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535–552.
19. Rodríguez, C., Aguirre, E., & Salvador, F. (2010). Producción de gas, ácidos grasos volátiles y nitrógeno amoniacal in vitro con dietas basadas en pasto seco. *Rev Cuba Cienc Agric*, 44(3), 251–253. <https://www.redalyc.org/pdf/1930/193015664007.pdf>

Bibliografía.

20. Behilg, E., García, S., & Herrera, M. (1996). Medición de ácidos grasos volátiles por cromatografía gaseosa en la digestión anaerobia. *Boletín del centro*, 30(2), 173–185.
21. Faichey, G. J. (1967). Some notes on the separation of the volatile fatty acids in rumen fluid by gas-liquid chromatography. *Journal of chromatography*, 27, 482–484.
22. Hamada, T., Omori, S., & K., K. (1968). Direct Determination of Rumen Volatile Fatty Acids by Gas Chromatography. *J. Dairy*, 51(2), 28–29.
23. Klemm, P., Hintze, U., & G., G. (1973). Quantitative preparation and gas chromatography of short and medium chain fatty acid benzyl esters (C1—C12). *Journal of chromatography*, 75(1), 19–27.
24. Manni, G., & Caron, F. (1995). Calibration and determination of volatile fatty acids in waste leachates by gas chromatography. *Journal of Chroma*, 690(2), 237–242.

25. Philip, R. J. (1980). Determination of Volatile Fatty Acids and Some Related Compounds in Ovine Rumen Fluid, Urine, and Blood Plasma, by Gas- Liquid Chromatography. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 108(2), 374–384.
26. Shantha, N. C., & Napolitano, G. (1992). Gas chromatography of fatty acids. *Journal of chromatography* , 624(2), 37–51.
27. Zirolecki, A., & Kwiatkowska, E. (1973). Gas chromatography of C, to C, fatty acids in rumen fluid and fermentation media. *Journal of chromatography* , 80(2), 250–254.

8. ANEXOS.

Tabla 22. Resultados para ácido acético en diferentes disolventes Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Heptano	Área	Área EI	Tr	Tr (EI)	Area /Area EI
1	14474.837	13425.991	4.716	8.7	1.07812056
2	12187.657	14210.2385	4.583	8.45	0.85766731
3	9587.753	12824.13	4.683	8.6	0.7476338
4	9384.7085	11510.312	4.176	8.633	0.81533051
5	11004.637	11735.4715	4.716	8.616	0.93772432
$\bar{X}$	11327.9185	12741.2286	4.5748	8.5998	0.8872953
S	2094.69558	1135.83288	0.22950534	0.09198478	0.1270034
%CV	18.4914429	8.91462599	5.01672942	1.06961536	14.3135435
Éter etílico	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Area /Area EI
1	17244.733	15478.701	4.683	8.566	1.11409433
2	16644.612	14646.542	4.583	8.533	1.13641923
3	15498.647	14029.355	4.633	8.566	1.10472983
4	14231.836	12722.191	4.666	8.65	1.11866234
5	14235.0855	13124.94	4.666	8.65	1.0845829
$\bar{X}$	15570.9827	14000.3458	4.6462	8.593	1.11169773
S	1372.70605	1118.47666	0.03970768	0.05374942	0.01903397
%CV	8.81579588	7.98892168	0.85462705	0.62550237	1.71215315
Agua	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Área /Área EI
1	8967.554	12315.164	5.483	8.783	0.72817171
2	9144.55	12185.361	5.466	8.783	0.75045376
3	8654.89	11016.014	5.45	8.766	0.7856644
4	8670.296	11784.0045	5.483	8.766	0.73576822
5	9358.2775	11729.064	5.5	8.766	0.79787078
$\bar{X}$	8959.1135	11805.9215	5.4764	8.7728	0.75886609
S	304.03837	508.341309	0.01903418	0.00931128	0.03075447
%CV	3.39362115	4.30581644	0.34756738	0.1061381	4.0526874
Acetona	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Área /Área EI
1	14658.3605	14208.984	4.65	8.566	1.03162622
2	11802.224	10970.6505	5.483	9.416	1.07579984
3	11019.9225	9974.479	5.666	9.6	1.10481184
4	9294.842	8765.957	5.483	9.433	1.06033397
5	9581.463	10878.1525	5.133	9.066	0.88079874
$\bar{X}$	11271.3624	10959.6446	5.283	9.2162	1.03067412
S	2155.17894	2021.61972	0.40307506	0.41217254	0.0878578
%CV	19.120838	18.4460336	7.62966222	4.4722612	8.52430485

Tabla 22. Continuación

Hexano	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Área /Área EI
1	5333.2945	8518.8525	3.966	8.066	0.62605785
2	7172.243	8254.414	4.2	8.116	0.8688979
3	6503.376	10180.8545	3.933	8.05	0.63878489
4	7380.8085	12592.5255	3.916	7.966	0.58612615
5	7971.08	12065.538	3.95	7.933	0.66064853
$\bar{X}$	6872.1604	10322.4369	3.993	8.0262	0.67610307
S	922.13097	1995.27633	0.13246981	0.06236185	0.12793638
%CV	13.4183563	19.3295086	3.31755091	0.77697849	18.9226152
Cloroformo	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Área /Área EI
1	16773.5435	10898.759	3.866	8	1.53903243
2	16975.674	12345.1425	3.766	7.766	1.37508935
3	14603.921	11181.523	3.833	7.866	1.30607619
4	13776.085	10813.348	3.833	7.933	1.27398887
5	12954.577	10182.802	3.866	7.883	1.2722016
$\bar{X}$	15016.7601	11084.3149	3.8328	7.8896	1.35327769
S	1588.52055	708.003844	0.04198809	0.09982443	0.11811285
%CV	10.5783174	6.38743892	1.09549399	1.26526604	8.72790934

Tabla 23. Resultados para ácido propiónico en diferentes disolventes Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Heptano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	25815.746	13425.991	5.783	8.7	1.92281866
2	27786.006	14210.2385	5.6	8.45	1.95535114
3	23624.877	12824.13	5.716	8.6	1.84222064
4	21199.476	11510.312	5.75	8.633	1.84178118
5	21858.6585	11735.4715	5.716	8.616	1.86261442
$\bar{X}$	24056.9527	12741.2286	5.713	8.5998	1.88495721
S	2746.97799	1135.83288	0.06902174	0.09198478	0.05142611
%CV	11.4186448	8.91462599	1.20815221	1.06961536	2.7282374
Éter etílico	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	20643.106	15478.701	5.733	8.566	1.33364589
2	20114.246	14646.542	5.633	8.533	1.37331023
3	18811.712	14029.355	5.7	8.566	1.34088217
4	17130.015	12722.191	5.733	8.65	1.34646737
5	17216.066	13124.94	5.716	8.65	1.31170626
$\bar{X}$	18783.029	14000.3458	5.703	8.593	1.34120238
S	1614.05361	1118.47666	0.04146685	0.05374942	0.02228148
%CV	8.59314867	7.98892168	0.72710598	0.62550237	1.66130667

Tabla 23. Continuación

Agua	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	15003.4855	12315.164	6.183	8.783	1.2182936
2	15191.364	12185.361	6.2	8.783	1.2466897
3	14072.18	11016.014	6.166	8.766	1.27742939
4	14582.816	11784.0045	6.2	8.766	1.23750937
5	15093.287	11729.064	6.2	8.766	1.28682792
$\bar{X}$	14788.6265	11805.9215	6.1898	8.7728	1.25264483
S	462.826494	508.341309	0.01520526	0.00931128	0.02839377
%CV	3.12961108	4.30581644	0.2456503	0.1061381	2.26670533
Acetona	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Área /Área EI
1	22485.591	14208.984	5.666	8.566	1.58249112
2	17864.278	10970.6505	6.516	9.416	1.62836999
3	16345.926	9974.479	6.716	9.6	1.63877492
4	13875.132	8765.957	6.533	9.433	1.58284281
5	15016.686	10878.1525	6.133	9.066	1.38044452
$\bar{X}$	17117.5226	10959.6446	6.3128	9.2162	1.56258467
S	3350.21546	2021.61972	0.41923347	0.41217254	0.10501709
%CV	19.5718477	18.4460336	6.64100664	4.4722612	6.72072943
Hexano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	15453.818	8518.8525	5.016	8.066	1.81407273
2	24720.861	8254.414	5.183	8.116	2.99486566
3	21869.99	10180.8545	4.916	8.05	2.14814876
4	22205.452	12592.5255	4.933	7.966	1.76338352
5	22552.4005	12065.538	4.95	7.933	1.8691583
$\bar{X}$	21360.5043	10322.4369	4.9996	8.0262	2.11792579
S	3949.65392	1995.27633	0.12208467	0.06236185	0.56935418
%CV	18.4904526	19.3295086	2.44188875	0.77697849	26.8826311
Cloroformo	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	23550.316	10898.759	4.933	8	2.16082547
2	25157.129	12345.1425	4.8	7.766	2.03781601
3	21645.494	11181.523	4.866	7.866	1.93582699
4	20558.88	10813.348	4.9	7.933	1.9012502
5	18033.547	10182.802	4.916	7.883	1.77098082
$\bar{X}$	21789.0732	11084.3149	4.883	7.8896	1.96133989
S	2037.46346	708.003844	0.05684702	0.09982443	0.11668422
%CV	9.3508496	6.38743892	1.1641822	1.26526604	5.94920976

Tabla 24. Resultados para ácido butírico en diferentes disolventes Gradiente 40°C -180°C a 10°/min.

Heptano	Área	Área de EI	Tr	Tr de EI	Área /Área EI
1	41202.746	13425.991	6.866	8.7	3.06887931
2	46321.311	14210.2385	6.616	8.45	3.25971383
3	40960.466	12824.13	6.75	8.6	3.19401519
4	35776.312	11510.312	6.8	8.633	3.10819655
5	35591.428	11735.4715	6.783	8.616	3.03280767
$\bar{X}$	39970.4526	12741.2286	6.763	8.5998	3.13272251
S	4460.90652	1135.83288	0.09240671	0.09198478	0.09293014
%CV	11.1605104	8.91462599	1.36635679	1.06961536	2.96643368
Éter etílico	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	27561.074	15478.701	6.766	8.566	1.78058055
2	26596.568	14646.542	6.716	8.533	1.81589402
3	25939.308	14029.355	6.766	8.566	1.8489309
4	23020.018	12722.191	6.783	8.65	1.80943817
5	23240.864	13124.94	6.783	8.65	1.77074059
$\bar{X}$	25271.5664	14000.3458	6.7628	8.593	1.80511685
S	2039.39792	1118.47666	0.02750818	0.05374942	0.0309768
%CV	8.06993081	7.98892168	0.40675727	0.62550237	1.71605531
Agua	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	21274.152	12315.164	7.05	8.783	1.72747614
2	21338.708	12185.361	7.05	8.783	1.75117569
3	19674.158	11016.014	7.05	8.766	1.78595979
4	20597.227	11784.0045	7.033	8.766	1.74789708
5	20938.584	11729.064	7.083	8.766	1.78518797
$\bar{X}$	20764.5658	11805.9215	7.0532	8.7728	1.75882635
S	677.604446	508.341309	0.01821263	0.00931128	0.02544324
%CV	3.26327289	4.30581644	0.25821801	0.1061381	1.44660332
Acetona	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	30095.446	14208.984	6.733	8.566	2.11805756
2	23828.236	10970.6505	7.6	9.416	2.17199846
3	21769.597	9974.479	7.716	9.6	2.18252973
4	18570.386	8765.957	7.583	9.433	2.11846647
5	20746.51	10878.1525	7.233	9.066	1.9071722
$\bar{X}$	23002.035	10959.6446	7.373	9.2162	2.09964489
S	4394.45381	2021.61972	0.40077363	0.41217254	0.1116288
%CV	19.1046306	18.4460336	5.43569276	4.4722612	5.31655601

Tabla 24. Continuación

Hexano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	27205.577	8518.8525	6.1	8.066	3.19357296
2	35810.669	8254.414	6.233	8.116	4.33836599
3	33765.7675	10180.8545	6.133	8.05	3.31659464
4	40953.656	12592.5255	6.016	7.966	3.25221942
5	39267.506	12065.538	6.066	7.933	3.25451762
$\bar{X}$	35400.6351	10322.4369	6.1096	8.0262	3.47105413
S	5689.10554	1995.27633	0.08972736	0.06236185	0.54444162
%CV	16.0706313	19.3295086	1.46862912	0.77697849	15.6851952
Cloroformo	Área	Área de EI	Tr	Tr EI	Área/Área EI
1	35695.104	10898.759	6.05	8	3.27515307
2	40139.461	12345.1425	5.916	7.766	3.25143764
3	35563.019	11181.523	5.933	7.866	3.18051655
4	33456.009	10813.348	6.016	7.933	3.09395471
5	32004.497	10182.802	5.966	7.883	3.14299512
$\bar{X}$	35371.618	11084.3149	5.9762	7.8896	3.18881142
S	2811.21482	708.003844	0.06453617	0.09982443	0.08148362
%CV	7.94765685	6.38743892	1.07988631	1.26526604	2.55529752

Tabla 25. Resultados para ácido acético Gradiente en diferentes disolventes 50°C -220°C a 15°/min.

Cloroformo	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	12219.933	9795.8915	2.55	5.15	1.24745492
2	12697.834	10873.7815	2.583	5.25	1.16774776
3	12226.791	10030.9165	2.616	5.35	1.21891065
4	11099.2445	8427.868	2.633	5.383	1.31696943
5	10505.251	8933.057	2.633	5.35	1.17599731
$\bar{X}$	11749.8107	9612.3029	2.603	5.2966	1.22541601
S	679.03793	1014.52988	0.03675595	0.10530393	0.06224986
%CV	5.77913932	10.5544935	1.41206116	1.98814193	5.07989622
Hexano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	6227.5565	11995.6235	2.683	5.383	0.51915238
2	7128.646	13741.699	2.633	5.333	0.51876016
3	6474.712	11205.151	2.666	5.3	0.57783353
4	5019.2825	9692.595	2.65	5.366	0.51784713
5	5760.6745	9257.232	2.65	5.35	0.62228909
$\bar{X}$	6122.1743	11178.4601	2.6564	5.3464	0.55117646
S	881.678951	1685.59365	0.02143206	0.03675595	0.02962853
%CV	14.4014023	15.0789432	0.80680858	0.68748975	5.375508

Tabla 25. Continuación

Éter etílico	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	10791.35	11689.698	2.6	5.283	0.92315045
2	11681.031	12035.878	2.583	5.266	0.97051756
3	11786.909	9663.31	2.633	5.383	1.21975896
4	11842.227	10180.4755	2.616	5.383	1.16322926
5	14898.691	14838.58	2.6	5.433	1.00405099
$\bar{X}$	12200.0416	11681.5883	2.6064	5.3496	1.05614145
S	493.901716	1149.01766	0.02143206	0.06302579	0.14442783
%CV	4.04836091	9.8361424	0.82228603	1.1781402	13.6750459
Agua	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	9049.653	10496.71	3.283	5.383	0.86214185
2	9202.837	11296.077	3.233	5.333	0.81469319
3	8197.908	9585.203	3.216	5.383	0.85526702
4	7366.49	9195.8365	3.316	5.45	0.80106796
5	7206.704	10009.1415	3.266	5.366	0.7200122
$\bar{X}$	8204.7184	10116.5936	3.2628	5.383	0.81063644
σ	849.278177	942.152268	0.04587665	0.04801649	0.02999733
%CV	10.3510948	9.31293976	1.40605143	0.89200242	3.70046678
Acetona	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	9124.215	12487.668	2.6	5.3	0.73065804
2	8962.429	11975.217	2.616	5.283	0.74841475
3	9342.7935	12285.703	2.633	5.333	0.76046063
4	8605.2095	11706.9895	2.583	5.316	0.73504888
5	8946.9635	11868.91	2.65	5.3	0.75381509
$\bar{X}$	8996.3221	12064.8975	2.6164	5.3064	0.74567948
S	310.863188	343.524826	0.02143206	0.02143206	0.01351629
%CV	3.45544751	2.84730828	0.81914322	0.40389083	1.81261434
Heptano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	6429.894	9952.895	2.633	5.3	0.64603254
2	8804.213	10603.8885	2.6	5.283	0.83028155
3	7255.829	9882.785	2.616	5.3	0.73418869
4	6979.09	9980.598	2.6	5.266	0.69926572
5	7187.624	9790.5625	2.6	5.216	0.734138
$\bar{X}$	7331.33	10042.1458	2.6098	5.273	0.7287813
S	1017.6086	335.102484	0.01575595	0.01627626	0.07755191
%CV	13.8802727	3.33696095	0.60372256	0.30867174	10.6413141

Tabla 26. Resultados para ácido propiónico en diferentes disolventes Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Cloroformo	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	17965.218	9795.8915	3.216	5.15	1.83395437
2	19293.79	10873.7815	3.3	5.25	1.77434042
3	18006.541	10030.9165	3.266	5.35	1.79510427
4	16329.579	8427.868	3.3	5.383	1.93756938
5	15540.427	8933.057	3.316	5.35	1.73965385
$\bar{X}$	17427.111	9612.3029	3.2796	5.2966	1.81612446
S	1214.4232	1014.52988	0.03971146	0.10530393	0.07255479
%CV	6.9685859	10.5544935	1.21086289	1.98814193	3.99503392
Hexano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	22352.447	11995.6235	3.383	5.383	1.86338351
2	24444.014	13741.699	3.3	5.333	1.77882036
3	20442.411	11205.151	3.283	5.3	1.82437622
4	16416.908	9692.595	3.3	5.366	1.69375776
5	14710.375	9257.232	3.283	5.35	1.58906842
$\bar{X}$	19673.231	11178.4601	3.3098	5.3464	1.74988125
S	3414.49661	1685.59365	0.04505182	0.03675595	0.07292551
%CV	17.3560541	15.0789432	1.36116448	0.68748975	4.16745452
Éter etílico	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	11875.658	11689.698	3.266	5.283	1.01590802
2	13230.229	12035.878	3.283	5.266	1.09923256
3	13503.4125	9663.31	3.316	5.383	1.39738997
4	14242.7355	10180.4755	3.333	5.383	1.39902458
5	17571.8255	14838.58	3.3	5.433	1.18419859
$\bar{X}$	14084.7721	11681.5883	3.2996	5.3496	1.21915075
S	988.850357	1149.01766	0.03049044	0.06302579	0.19958823
%CV	7.02070541	9.8361424	0.9240646	1.1781402	16.3710868
Agua	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	21123.323	10496.71	3.6	5.383	2.01237559
2	20340.3975	11296.077	3.633	5.333	1.80066031
3	18434.944	9585.203	3.616	5.383	1.92327111
4	19465.0585	9195.8365	3.65	5.45	2.11672516
5	17137.769	10009.1415	3.65	5.366	1.71221168
$\bar{X}$	19300.2984	10116.5936	3.6298	5.383	1.91304877
S	1156.44219	942.152268	0.02156193	0.04801649	0.13416615
%CV	5.9918358	9.31293976	0.59402519	0.89200242	7.01321121

Tabla 26. Continuación

Acetona	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	14490.5755	12487.668	3.283	5.3	1.16039084
2	14398.98	11975.217	3.316	5.283	1.20239825
3	14733.332	12285.703	3.3	5.333	1.1992258
4	13779.397	11706.9895	3.266	5.316	1.17702309
5	14100.3655	11868.91	3.316	5.3	1.18800846
$\bar{X}$	14300.53	12064.8975	3.2962	5.3064	1.18540929
S	406.074875	343.524826	0.02156193	0.02143206	0.01978285
%CV	2.8395792	2.84730828	0.65414496	0.40389083	1.66886224
Heptano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	16863.273	9952.895	3.283	5.3	1.69430834
2	17675.745	10603.8885	3.266	5.283	1.66691162
3	16387.993	9882.785	3.283	5.3	1.65823632
4	16542.6	9980.598	3.25	5.266	1.65747583
5	16548.156	9790.5625	3.266	5.216	1.69021504
$\bar{X}$	16803.5534	10042.1458	3.2696	5.273	1.67342943
S	574.09778	335.102484	0.01584298	0.01627626	0.0172561
%CV	3.41652605	3.33696095	0.48455406	0.30867174	1.03118207

Tabla 27. Resultados para ácido butírico en diferentes disolventes Gradiente 50°C -220°C a 15°/min.

Cloroformo	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	28696.702	9795.8915	3.883	5.15	2.92946303
2	28816.6805	10873.7815	3.983	5.25	2.65010663
3	28405.573	10030.9165	4.033	5.35	2.83180236
4	25857.565	8427.868	4.083	5.383	3.06810275
5	24365.0515	8933.057	4.083	5.35	2.72751551
$\bar{X}$	27228.3144	9612.3029	4.013	5.2966	2.84139806
S	1401.7123	1014.52988	0.08539126	0.10530393	0.17568213
%CV	5.14799514	10.5544935	2.12786585	1.98814193	6.18294688
Hexano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	46149.997	11995.6235	4.216	5.383	3.8472362
2	46717.613	13741.699	4.033	5.333	3.39969701
3	38431.847	11205.151	4	5.3	3.42983749
4	31583.545	9692.595	4.05	5.366	3.25852313
5	28032.131	9257.232	4.033	5.35	3.02813314
$\bar{X}$	38183.0266	11178.4601	4.0664	5.3464	3.39268539
S	7168.60472	1685.59365	0.09642743	0.03675595	0.25352239
%CV	18.7743229	15.0789432	2.3713219	0.68748975	7.47261708

Tabla 27. Continuación

Éter etílico	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	19358.621	11689.698	3.966	5.283	1.65604116
2	20137.727	12035.878	4.016	5.266	1.6731415
3	19844.3375	9663.31	4.033	5.383	2.05357559
4	20666.886	10180.4755	4.05	5.383	2.03005115
5	25141.733	14838.58	4	5.433	1.69434899
$\bar{X}$	21029.8609	11681.5883	4.013	5.3496	1.82143168
S	547.506215	1149.01766	0.03626178	0.06302579	0.21811264
%CV	2.60347045	9.8361424	0.90360777	1.1781402	11.9747914
Agua	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	29168.511	10496.71	4.133	5.383	2.77882413
2	29135.364	11296.077	4.133	5.333	2.57924623
3	25070.915	9585.203	4.133	5.383	2.61558519
4	25784.686	9195.8365	4.166	5.45	2.8039522
5	23289.4775	10009.1415	4.216	5.366	2.32682069
$\bar{X}$	26489.7907	10116.5936	4.1562	5.383	2.62088569
S	2169.82951	942.152268	0.0165	0.04801649	0.11343322
%CV	8.19119159	9.31293976	0.39699726	0.89200242	4.32804898
Acetona	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Area /Area EI
1	22517.005	12487.668	4	5.3	1.80313931
2	21691.687	11975.217	4	5.283	1.81138154
3	22548.0825	12285.703	4	5.333	1.83531073
4	21046.5545	11706.9895	4.033	5.316	1.79777683
5	21594.9825	11868.91	3.983	5.3	1.81945794
$\bar{X}$	21879.6623	12064.8975	4.0032	5.3064	1.81341327
S	721.603297	343.524826	0.0165	0.02143206	0.01657855
%CV	3.298055	2.84730828	0.41217026	0.40389083	0.91421774
Heptano	Área	Área EI	Tr	Tr EI	Área /Área EI
1	31714.8295	9952.895	4.016	5.3	3.18649292
2	32758.766	10603.8885	3.983	5.283	3.08931634
3	31156.61	9882.785	3.983	5.3	3.15261437
4	31704.058	9980.598	3.983	5.266	3.17656898
5	31580.156	9790.5625	3.95	5.216	3.22557116
$\bar{X}$	31782.8839	10042.1458	3.983	5.273	3.16611275
S	669.610619	335.102484	0.0165	0.01627626	0.04366827
%CV	2.10682775	3.33696095	0.41426061	0.30867174	1.37923937

Tabla 28. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido acético.

Punto 1	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	28785	309693	8.533	12.704	0.09294689
2	29401	319024	8.532	12.704	0.09215921
3	25907	281614	8.532	12.703	0.09199472
$\bar{X}$	28031	303443.667	8.53233333	12.7036667	0.09236694
S	1865.04584	19472.2277	0.00057735	0.00057735	0.00050894
%CV	6.65351163	6.41708159	0.00676662	0.00454475	0.55099788
Punto 2	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	56353	315412	8.531	12.706	0.17866473
2	58437	332484	8.528	12.703	0.17575883
3	50783	286650	8.528	12.702	0.1771603
$\bar{X}$	55191	311515.333	8.529	12.7036667	0.17719462
S	3957.09641	23164.1295	0.00173205	0.00208167	0.00145325
%CV	7.16982191	7.43595164	0.02030778	0.01638634	0.82014483
Punto 3	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	115940	323922	8.524	12.705	0.35792567
2	119681	328547	8.523	12.702	0.3642736
3	119654	323425	8.521	12.7	0.36995903
$\bar{X}$	118425	325298	8.52266667	12.7023333	0.36405277
S	2152.11547	2824.66865	0.00152753	0.00251661	0.00601972
%CV	1.81728138	0.86833262	0.01792309	0.0198122	1.65352901
Punto 4	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	170276	306381	8.52	12.703	0.55576553
2	192140	333356	8.52	12.703	0.57638081
3	170674	307803	8.518	12.699	0.55449102
$\bar{X}$	177696.667	315846.667	8.51933333	12.7016667	0.56221245
S	12509.8765	15180.1873	0.0011547	0.0023094	0.01228669
%CV	7.04001752	4.80618886	0.01355388	0.01818187	2.18541759
Punto 5	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	265582	315777	8.516	12.704	0.84104289
2	256639	317810	8.516	12.703	0.80752336
3	232558	290810	8.516	12.7	0.79969052
$\bar{X}$	251593	308132.333	8.516	12.7023333	0.81608559
S	17080.4781	15035.9801	0	0.00208167	0.02196562
%CV	6.78893215	4.87971512	0	0.01638806	2.69158268

Tabla 29. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido propiónico.

Punto 1	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	27702	309693	9.658	12.704	0.08944987
2	27813	319024	9.658	12.704	0.08718153
3	24674	281614	9.657	12.703	0.08761638
$\bar{X}$	26729.6667	303443.667	9.65766667	12.7036667	0.0880826
S	1781.12446	19472.2277	0.00057735	0.00057735	0.0012039
%CV	6.66347426	6.41708159	0.00597815	0.00454475	1.36678001
Punto 2	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	54266	315412	9.658	12.706	0.17204799
2	57390	332484	9.656	12.703	0.17260981
3	50466	286650	9.654	12.702	0.17605442
$\bar{X}$	54040.6667	311515.333	9.656	12.7036667	0.17357074
S	3467.49554	23164.1295	0.002	0.00208167	0.0021692
%CV	6.41645589	7.43595164	0.02071251	0.01638634	1.24974837
Punto 3	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	115618	323922	9.654	12.705	0.35693161
2	118568	328547	9.652	12.702	0.36088596
3	116306	323425	9.65	12.7	0.35960733
$\bar{X}$	116830.667	325298	9.652	12.7023333	0.35914163
S	1543.39928	2824.66865	0.002	0.00251661	0.00201789
%CV	1.32105664	0.86833262	0.02072109	0.0198122	0.56186498
Punto 4	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	168188	306381	9.651	12.703	0.54895049
2	186640	333356	9.651	12.703	0.55988193
3	170061	307803	9.648	12.699	0.55249949
$\bar{X}$	174963	315846.667	9.65	12.7016667	0.5537773
S	10155.8495	15180.1873	0.00173205	0.0023094	0.00557662
%CV	5.80456982	4.80618886	0.01794871	0.01818187	1.00701493
Punto 5	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	251759	315777	9.649	12.704	0.79726833
2	252717	317810	9.649	12.703	0.79518266
3	231345	290810	9.647	12.7	0.79551941
$\bar{X}$	245273.667	308132.333	9.64833333	12.7023333	0.79599013
S	12072.0859	15035.9801	0.0011547	0.00208167	0.00111968
%CV	4.92188421	4.87971512	0.01196788	0.01638806	0.14066525

Tabla 30. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido isobutírico.

Punto 1	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	11622	309693	0.041933	10.035	0.03752749
2	11563	319024	0.041933	10.035	0.03624492
3	10609	281614	0.041933	10.034	0.03767213
$\bar{X}$	11264.6667	303443.667	0.041933	10.0346667	0.03714818
S	568.589776	19472.2277	0	0.00057735	0.00078558
%CV	5.04755083	6.41708159	0	0.00575356	2.11472286
Punto 2	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	21634	315412	0.083866	10.036	0.06858965
2	22786	332484	0.083866	10.034	0.06853262
3	20416	286650	0.083866	10.032	0.07122275
$\bar{X}$	21612	311515.333	0.083866	10.034	0.06944834
S	1185.15315	23164.1295	0	0.002	0.00153694
%CV	5.48377362	7.43595164	0	0.01993223	2.21307605
Punto 3	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	47217	323922	0.167732	10.034	0.14576657
2	46479	328547	0.167732	10.032	0.14146834
3	47198	323425	0.167732	10.03	0.14593182
$\bar{X}$	46964.6667	325298	0.167732	10.032	0.14438891
S	420.706945	2824.66865	0	0.002	0.00253064
%CV	0.89579459	0.86833262	0	0.0199362	1.75265307
Punto 4	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	65957	306381	0.251598	10.031	0.21527771
2	73788	333356	0.251598	10.032	0.22134895
3	69082	307803	0.251598	10.029	0.22443576
$\bar{X}$	69609	315846.667	0.251598	10.0306667	0.22035414
S	3942.00926	15180.1873	0	0.00152753	0.00465937
%CV	5.66307411	4.80618886	0	0.01522855	2.11449038
Punto 5	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	101826	315777	0.335464	10.031	0.32246174
2	99202	317810	0.335464	10.03	0.31214248
3	95264	290810	0.335464	10.028	0.32758158
$\bar{X}$	98764	308132.333	0.335464	10.0296667	0.3207286
S	3302.85392	15035.9801	0	0.00152753	0.00786412
%CV	3.34418808	4.87971512	0	0.01523007	2.45195381

Tabla 31. Resultados de las áreas para la curva de calibración de ácido butírico.

Punto 1	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	33173	309693	10.823	12.704	0.10711576
2	33602	319024	10.823	12.704	0.1053275
3	31297	281614	10.822	12.703	0.11113439
$\bar{X}$	32690.6667	303443.667	10.8226667	12.7036667	0.10785922
S	1225.8631	19472.2277	0.00057735	0.00057735	0.00297398
%CV	3.74988712	6.41708159	0.00533464	0.00454475	2.75727727
Punto 2	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	62302	315412	10.823	12.706	0.19752578
2	68466	332484	10.821	12.703	0.20592269
3	59510	286650	10.819	12.702	0.20760509
$\bar{X}$	63426	311515.333	10.821	12.7036667	0.20368452
S	4582.57744	23164.1295	0.002	0.00208167	0.00539956
%CV	7.22507716	7.43595164	0.01848258	0.01638634	2.65094134
Punto 3	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	135298	323922	10.82	12.705	0.41768697
2	140079	328547	10.818	12.702	0.42635909
3	138446	323425	10.816	12.7	0.42806215
$\bar{X}$	137941	325298	10.818	12.7023333	0.42403607
S	2430.17674	2824.66865	0.002	0.00251661	0.00556402
%CV	1.76175085	0.86833262	0.01848771	0.0198122	1.31215834
Punto 4	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	195489	306381	10.818	12.703	0.6380585
2	214956	333356	10.818	12.703	0.64482415
3	187905	307803	10.815	12.699	0.61047163
$\bar{X}$	199450	315846.667	10.817	12.7016667	0.63111809
S	13953.7196	15180.1873	0.00173205	0.0023094	0.01819755
%CV	6.99609908	4.80618886	0.0160123	0.01818187	2.88338251
Punto 5	Área STD	Área EI	Tr STD	Tr EI	Área Std/Área EI
1	295474	315777	10.817	12.704	0.93570463
2	297174	317810	10.816	12.703	0.93506812
3	285911	290810	10.814	12.7	0.98315395
$\bar{X}$	292853	308132.333	10.8156667	12.7023333	0.9513089
S	6071.7397	15035.9801	0.00152753	0.00208167	0.02758046
%CV	2.0733063	4.87971512	0.01412326	0.01638806	2.89921163

Tabla 32. Resultados de las pendientes y ordenadas de las curvas de calibración de los estándares de AGV contemplando el intervalo de confianza.

Analito	Pendiente	ordenada
C2	0.4044 ± 0.0199	-0.0271 ± 0.0248
C3	0.8171 ± 0.0312	-0.0266 ± 0.0188
C4i	0.9559 ± 0.0468	-0.0099 ± 0.0096
C4	0.9991± 0.0630	-0.0323 ± 0.0366

Tabla 33. Resultados de las áreas en muestras de líquido ruminal para los AGV Vaca 1 (Holstein).

Analito	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Área	Área STD/Área EI	Área	Área STD/Área EI	Área	Área STD/Área EI
C2	75917	0.24307441	73483	0.24040135	76852	0.24537832
C3	39056	0.12505123	37719	0.12339859	39593	0.12641524
C4i	1900	0.0060835	1881	0.00615374	2049	0.00654219
C4	26703	0.08549885	25771	0.08431043	27055	0.08638305
EI	312320	1	305668	1	313198	1

Tabla 34. Resultados de las áreas en muestras de líquido ruminal para los AGV Vaca 2 (Holstein).

Analito	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
	Área	Área STD/Área EI	Área	Área STD/Área EI	Área	Área STD/Área EI
C2	87287	0.25268573	83339	0.25194615	83926	0.23831375
C3	39083	0.11314075	37398	0.1130597	38869	0.11037125
C4i	2441	0.00706641	2243	0.00678092	2554	0.00725226
C4	33658	0.097436	31306	0.09464268	33202	0.0942794
EI	345437	1	330781	1	352166	1

Tabla 35. Resultados de las áreas en muestras de líquido ruminal para los AGV Vaca 3 (Angus).

	Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3	
Analito	Área	Área STD/Área EI	Área	Área STD/Área EI	Área	Área STD/Área EI
C2	39186	0.10235821	37459	0.10730102	39333	0.10495881
C3	18589	0.04855655	17564	0.05031194	18563	0.04953475
C4i	1867	0.00487681	1938	0.00555139	2012	0.00536896
C4	13987	0.03653561	11883	0.03403876	12913	0.03445791
EI	382832	1	349102	1	374747	1

Cálculos de preparación de disoluciones

Solución de ácidos grasos volátiles (C2-C4) y estándar interno. aproximadamente de 1000 mg/L.

$$26 \text{ mg R.A de EI} \left| \frac{98 \text{ mg RP de EI}}{100 \text{ mg RA de EI}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 1019.2 \text{ mg/L de EI}$$

$$24 \text{ }\mu\text{L de C2} \left| \frac{1.04 \text{ mg R.A de C2}}{1 \mu\text{L}} \right| \left| \frac{99 \text{ mg de R.P de C2}}{100 \text{ mg de R.A de C2}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 988.41 \text{ mg/L de C2}$$

$$25 \text{ }\mu\text{L de C3} \left| \frac{0.993 \text{ mg R.A de C3}}{1 \mu\text{L}} \right| \left| \frac{99.5 \text{ mg de R.P de C3}}{100 \text{ mg de R.A de C3}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| \\ = 988.03 \text{ mg/L de C3}$$

$$26 \text{ }\mu\text{L de C4} \left| \frac{0.964 \text{ mg R.A de C4}}{1 \mu\text{L}} \right| \left| \frac{99 \text{ mg de R.P de C4}}{100 \text{ mg de R.A de C4}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| \\ = 992.53 \text{ mg/L de C4}$$

$$24 \text{ }\mu\text{L de C4i} \left| \frac{0.948 \text{ mg R.A de C4i}}{1 \mu\text{L}} \right| \left| \frac{99 \text{ mg de R.P de C4i}}{100 \text{ mg de R.A de C4i}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| \\ = 988.41 \text{ mg/L de C4i}$$

Solución concentrada con los ácidos grasos volátiles (C2-C4). (C2=2613.6 mg/L, C3=1273.6 mg/L, C4=1227.6 mg/L. C4i=435.6 mg/L).

$$66 \text{ mg de C2} \left| \frac{99 \text{ mg de R.P de C2}}{100 \text{ mg de R.A de C2}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 2613.6 \text{ mg/L de C2}$$

$$32 \text{ mg de C3} \left| \frac{99.5 \text{ mg de R. P de C3}}{100 \text{ mg de R. A de C3}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 1273.6 \text{ mg/L de C3}$$

$$31 \text{ mg de C4} \left| \frac{99 \text{ mg de R. P de C4}}{100 \text{ mg de R. A de C4}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 1227.6 \text{ mg/L de C4}$$

$$11 \text{ mg de C4i} \left| \frac{99 \text{ mg de R. P de C4i}}{100 \text{ mg de R. A de C4i}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 435.6 \text{ mg/L de C4i}$$

Solución concentrada de estándar interno. 1038.8 mg/L.

$$132.5 \text{ mg R. A de EI} \left| \frac{98 \text{ mg R. P de EI}}{100 \text{ mg R. A de EI}} \right| \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| \left| \frac{1000 \text{ mL}}{1 \text{ L}} \right| = 5164 \text{ mg/L de EI}$$

Solución de m-HPO3 al 20%.

$$5 \text{ g R. A de m - HPO}_3 \left| \frac{\boxed{}}{25 \text{ mL}} \right| * 100 = 20\% \text{ p/v}$$

Cuantificación de las muestras.

Sabiendo que:

$$\frac{\text{Área}_{\text{problema}}}{\text{Área}_{\text{EI}}} = Fr \left| \frac{\text{Concentración}_{\text{problema}}}{\text{Concentración}_{\text{EI}}} \right| \pm b$$

Y = m x

Al despejar la concentración del problema nos queda:

$$[\text{Concentración}]_{\text{problema}} = \left[\left(\frac{\text{Área}_{\text{problema}}}{\text{Área}_{\text{EI}}} \right) \pm b \right] \left[\frac{\text{Concentración}_{\text{EI}}}{FR} \right]$$

Haciendo la sustitución para el Ácido acético tenemos que:

$$[\text{Ácido acético}] = \left[\left(\frac{75917}{312320} \right) + 0.0271 \right] \left[\frac{1038.2}{0.4044} \right] = 694 \text{ mg/L de Ácido acético.}$$

La concentración resultante solo es la del sistema, entonces la concentración total queda como:

$$\frac{694 \text{ mg de Ácido acético}}{L} \left| \frac{5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right| \left| \frac{25 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \right| = 4337.55 \text{ mg/L de Ácido acético}$$

Se realiza una conversión de unidades de mg/L a mmol/L para así comparar los resultados obtenidos con los resultados de las literaturas consultadas.

$$\frac{4337.55 \text{ mg de Ácido acético}}{L} \left| \frac{1 \text{ mmol de Ácido acético}}{60.05 \text{ mg de Ácido acético}} \right| = 72.23 \text{ mmol/L de Ácido acético}$$

Haciendo el reajuste considerando el recobro

$$72.23 \text{ mmol/L de ácido acético} \left| \frac{100 \text{ mmol/L}}{91.08 \text{ mmol/L}} \right| = 79.307 \text{ mmol/L ácido acético}$$

Haciendo la sustitución para el Ácido propiónico tenemos que:

$$[\text{Ácido propiónico}] = \left[\left(\frac{39056}{312320} \right) + 0.0266 \right] \left[\frac{1038.2}{0.8171} \right] = 192.80 \text{ mg/L de Ácido propiónico.}$$

La concentración resultante solo es la del sistema, entonces la concentración total queda como:

$$\frac{192.80 \text{ mg de Ácido propiónico}}{L} \left| \frac{5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right| \left| \frac{25 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \right| = 1204.98 \text{ mg/L de Ácido propiónico o}$$

Se realiza una conversión de unidades de mg/L a mmol/L para así comparar los resultados obtenidos con los resultados de las literaturas consultadas.

$$\frac{1204.98 \text{ mg de Ácido propiónico}}{L} \left| \frac{1 \text{ mmol de Ácido propiónico}}{74.08 \text{ mg de Ácido propiónico}} \right| = 16.26 \text{ mmol/L de Ácido propiónico}$$

Haciendo el reajuste considerando el recobro

$$16.26 \text{ mmol/L de ácido propiónico} \left| \frac{100 \text{ mmol/L}}{87.40 \text{ mmol/L}} \right| = 18.60 \text{ mmol/L ácido propiónico}$$

Haciendo la sustitución para el Ácido isobutírico tenemos que:

$$[\text{Ácido isobutírico}] = \left[\left(\frac{1900}{312320} \right) + 0.0099 \right] \left[\frac{1038.2}{0.9559} \right] = 17.36 \text{ mg/L de Ácido isobutírico.}$$

La concentración resultante solo es la del sistema, entonces la concentración total queda como:

$$\frac{17.36 \text{ mg de Ácido isobutírico}}{L} \left| \frac{5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right| \left| \frac{25 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \right| = 108.56 \text{ mg/L de Ácido isobutírico}$$

Se realiza una conversión de unidades de mg/L a mmol/L para así comparar los resultados obtenidos con los resultados de las literaturas consultadas.

$$\frac{108.56 \text{ mg de Ácido butírico}}{L} \left| \frac{1 \text{ mmol de Ácido isobutírico}}{88.11 \text{ mg de Ácido isobutírico}} \right| = 1.23 \text{ mmol/L de Ácido isobutírico}$$

Haciendo el reajuste considerando el recobro

$$1.23 \text{ mmol/L de ácido isobutírico} \left| \frac{100 \text{ mmol/L}}{92.02 \text{ mmol/L}} \right| = 1.33 \text{ mmol/L ácido isobutírico}$$

Haciendo la sustitución para el Ácido butírico tenemos que:

$$[\text{Ácido butírico}] = \left[\left(\frac{26703}{312320} \right) + 0.0323 \right] \left[\frac{1038.2}{0.991} \right] = 123.48 \text{ mg/L de Ácido butírico.}$$

La concentración resultante solo es la del sistema, entonces la concentración total queda como:

$$\frac{123.48 \text{ mg de Ácido butírico}}{L} \left| \frac{5 \text{ mL}}{1 \text{ mL}} \right| \left| \frac{25 \text{ mL}}{20 \text{ mL}} \right| = 771.75 \text{ mg/L de Ácido butírico}$$

Se realiza una conversión de unidades de mg/L a mmol/L para así comparar los resultados obtenidos con los resultados de las literaturas consultadas.

$$\frac{771.75 \text{ mg de Ácido butírico}}{L} \left| \frac{1 \text{ mmol de Ácido butírico}}{88.11 \text{ mg de Ácido butírico}} \right| = 8.75 \text{ mmol/L de Ácido butírico}$$

Haciendo el reajuste considerando el recobro

$$8.75 \text{ mmol/L de ácido butírico} \left| \frac{100 \text{ mmol/L}}{84.06 \text{ mmol/L}} \right| = 10.40 \text{ mmol/L ácido butírico}$$