UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

“Determinación de componentes volátiles de aceite de Eucalipto (*Eucalyptus globulus)*”

Trabajo de Titulación para optar al Título de Técnico Universitario en QUIMICA
MENCIÓN QUIMICA ANALITICA

Alumno: Felipe González Wlack

Profesor guía: Jaime Carmi Karmy

Año: 2021

Resumen

En la química analítica, podemos encontrar una amplia gama de técnicas y metodologías dedicadas al análisis de muestras. Las técnicas analíticas de separación cromatográficas, poseen la facultad de detectar moléculas y átomos en muestras de baja concentración, y presentar parámetros capaces de ser controlados permitiendo la facilidad de eliminar interferencias. Estas técnicas permiten cuantificar e identificar, con una alta precisión, los analitos de interés provenientes de la matriz, para finalmente realizar la toma de decisiones más apropiada. Cabe destacar que estas técnicas de separación pueden llevarse a cabo en conjunto a procedimientos previos relacionados al tratamiento de muestra, como la extracción y preconcentración del analito.

Se realizó una investigación y proposición metodológica para el análisis del aceite esencial de Eucalipto (*Eucaliptus globulus*), que permita la construcción del perfil de los componentes proveniente de la fracción volátil de la matriz. Dicha proposición contempla las técnicas de tratamiento de muestra Microextraccion por fase sólida (Headspace) y técnicas de separación por Cromatografía de Gases-Masa. Eventualmente, la documentación y literatura recopilada, proporcionó información que describe la potencialidad terapéutica para los monoterpenos α-pineno, b-pineno, b-eudesmol, γ-eudesmol, α-felandreno y p-cimeno, componentes con mayores porcentajes de abundancia, haciendo mención al impacto productivo que posee este tipo de árbol dentro de la industria chilena y el desarrollo futuro de nuevos fármacos.

KEYWORDS: Cromatografía, Microextracción, Headspace, Aceite esencial, Eucalipto, Monoterpenos.

ÍNDICE

Contenido

Resumen 2

ÍNDICE 3

Objetivos 7

Objetivo general: 7

Objetivos específicos: 7

1. Antecedentes. 9

1.1. Eucalyptus globulus. 9

1.2. Aceite esencial. 10

1.3. Composición química aceite esencial *Eucaliptus globulus.* 12

1.4. Técnicas Analíticas. 15

1.4.1 Cromatografía. 15

1.4.1.1. Cromatograma. 16

1.4.1.2. Cromatografía de Gases. 18

1.4.2. Espectrometría. 24

1.4.2.1. Espectrómetro de Masas. 25

1.4.3. Cromatografía de gases/masa (GC-MS). 36

1.4.4. Micro extracción en fase sólida (SPME). 37

1.4.4.1. Generalidades. 37

1.4.4.2. Tipos SPME. 38

1.4.4.3. Fundamentos técnica SPME. 40

1.4.4.4. Instrumentación SPME. 43

1.4.4.5. Procedimiento SPME. 44

1.4.4.6. Fibras SPME. 45

1.4.4.7. Selección de la Fibra. 48

1.4.4.8. Otras variables en proceso de microextracción. 49

1.4.5. Proceso de desorción SPME en Cromatógrafo de Gases. 51

2. Metodología. 55

2.1. Fundamento del método. 55

2.3. Procedimiento. 56

A) Preparación de la muestra: 56

B) Extracción: 56

C) Inyección en el cromatógrafo: 57

2.4. Condiciones cromatográficas 58

3. Resultados 61

3.1. Resultados cromatográficos en determinación aceite esencial de eucalipto, catálogo RESTEK, columna Rtx-Wax. GC con detector FID. [21] 61

3.2. Resultados cromatográficos en determinación de aceite esencial de eucalipto, "Chemical Evaluation of Volatile Oils in Eucalyptus Species". Cromatografía GLC y GC/MS. [10] 63

3.3. Resultados cromatográficos en determinación de aceite esencial de eucalipto, "Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistillated extract of Eucalyptus globulus fruits". Cromatografía GC/MS. [18] 65

3.4. Resultados cromatográficos en determinación de aceite esencial de eucalipto, "A Comparative Study of the Chemical Composition of the Essential oil from Eucalyptus globulus Growing in Dehradun (india) and Around the World". Cromatografía GC/MS. [2] 67

Discusión 71

Conclusiones 73

Bibliografía 74

SIGLAS

SPME	Microextracción en fase sólida
GC	Cromatografía de gases
LC	Cromatografía líquida
CGL	Cromatografía gas-líquido
CGS	Cromatografía gas-sólido
GC-MS	Cromatografía de gases/espectrómetro masas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
SCE	Sistema endocannabinoide endógeno
DI	Inmersión directa
HS	Head-Space
FID	Detector de ionización de llama
TCD	Detector de conductividad térmica
EI	Impacto electrónico
CI	Ionización química
IDT	Analizador de Trampa de Iones
TDV	Analizador de masas de tiempo de vuelo
PTV	Inyector de temperatura programada
PDMS	Polidimetilsiloxano
CW	Carbowax
A.E.T.P	Altura equivalente a plato teórico

SÍMBOLOS

cm:	Centímetros
eV:	Electronvoltio
ºC:	Grados Celsius
g:	Gramos
m:	Metro
µm:	Micrones
ml:	Mililitro
min:	Minutos
nm:	Nanómetro
log:	Logaritmo
ppb:	Partes por billón
ppm:	Partes por millón
T:	Temperatura
V:	Voltio
ω:	Frecuencia

INTRODUCCIÓN

El análisis de muestras complejas requiere de la ejecución de etapas previas para el proceso de muestreo y preparación, que permitan efectuar un trabajo analítico completo en la obtención de resultados, evaluación y toma de decisiones. Es por esto que la selección de la metodología marcará la calidad de los resultados finales. Una preparación óptima de la muestra es necesaria para minimizar la fuente de errores causados por el tiempo de trabajo y manipulación de la matriz.

Para esto la microextraccion de fase sólida, es una técnica versátil en la preparación y preconcentracion de muestras, capaz de realizar extracción de analitos volátiles, semi volátiles y no volátiles presentes en la matriz de la muestra. Esta técnica fue desarrollada en 1990 por Pawliszyn y comercializada en 1993 por Supelco. En la actualidad, es ampliamente utilizada debido a la serie de ventajas que posee, su bajo costo económico, la capacidad de ser automatizada y su capacidad para realizar trabajos de campo, como ser acoplada a instrumentos de separación (HPLC, CG, CG/MS, etc.). Su desarrollo continúa, abarcando trabajos ambientales, clínicos, forenses, alimentos, etc. A su vez, las técnicas cromatográficas permiten la separación, identificación, cuantificación y determinación de compuestos químicos presentes en muestras complejas.

Los aceites esenciales son considerados matrices de alta complejidad, debido a la gran cantidad de moléculas que la componen. Pese a existir un avance progresivo de los medicamentos sintéticos, junto al desarrollo de nuevos y potentes fármacos, la búsqueda en plantas medicinales y productos derivados ha estado presente como opción para el tratamiento y prevención de los principales afecciones que aquejan a la humanidad. La relevancia de las plantas aromáticas y en especial de los aceites esenciales, adquieren hoy protagonismo entre las terapias destinadas al tratamiento o atenuación de enfermedades.

Para el caso particular, se estudiará y analizará el aceite esencial del eucalipto, de la especie *Eucaliptus globulus*, identificando potencial relevancia medicinal.

Cabe mencionar, que el trabajo a continuación carece de una parte práctica/presencial de propia autoridad debido a las condiciones y restricciones sanitarias impuestas por las autoridades a causa de la pandemia actual por el virus COVID-19. La propuesta

metodológica y los resultados han sido seleccionados apuntando a esclarecer los objetivos principales y específicos iniciales de este trabajo.

Objetivos

Objetivo general:

- Establecer metodología que permita construir un perfil de los componentes volátiles del aceite esencial de eucalipto (*Eucaliptus globulus*) contrastando con literatura.

Objetivos específicos:

- Presentar y recopilar técnicas de microextraccion y cromatografía aplicables a la determinación de volátiles en aceite de eucalipto.

- Diseñar metodología adecuada para SPME-Headspace y cromatografía de gases/masa, para el tratamiento y análisis de la muestra.

- Obtener información de la literatura sobre análisis y composición de volátiles en aceite de eucalipto.

- Evaluar y desglosar posible aplicación y relevancia terapéutica.

CAPITULO I: ANTECEDENTES GENERALES

1. Antecedentes.

1.1. Eucalyptus globulus.

El *Eucalyptus globulus* es una especie arbórea forestal que está muy extendida en los bosques subcosteros de Australia y Tasmania. Es notable por las plántulas muy visibles, los arbustos y los retoños jóvenes con tallos cuadrados y hojas juveniles sésiles grandes, glaucas, oblongas a ovadas. Los troncos son en su mayoría lisos y las hojas adultas son grandes, de color verde brillante y generalmente falcadas. [26]

"Estos árboles pueden alcanzar hasta 60 metros de altura, y tienen corteza blanquecina que se desprende fácilmente en tiras en los ejemplares adultos. Sus frutos son como una cápsula campaniforme de color blanco, cubierta de un polvo blanquecino de 1,4 a 2,4 cm de diámetro." [35]

Figura 1-1: Eucalipto (Eucaliptus globulus) y sus frutos.

La gran mayoría de las plantaciones de Eucaliptos en Chile (90%) son de *Eucalipto globulus*, especie australiana que crece muy bien en algunas zonas. Las mejores plantaciones se encuentran en el área de Concepción, situada en la zona Centro-Sur. [11]

Según un estudio realizado por la Universidad de Chile, “las plantaciones de *Eucalyptus globulus* a diciembre del año 2008 alcanzaban en Chile a 471.743 ha (INFOR, 2011) representando un 20,5 % de la superficie total cubierta de especies exóticas. Las regiones que concentran las mayores extensiones eran la Octava y Novena las cuales sumaban a esa fecha el 65 % del total nacional plantado. La Quinta, Sexta y Séptima Regiones representan el 24 % y el resto se extiende hasta la Primera y Décima entre sus extremos geográficos. Las principales causas del incremento en la superficie plantada con Eucaliptos son las altas tasas de crecimiento y la exitosa adaptación de las especies al país y a la creciente demanda de trozos para la producción de pulpa química y de astillas sin corteza, que al año 2007 representaban el 61,5 % y 38 % del consumo de trozas industriales del género en el país, respectivamente” [40]. Es por esto que este tipo de monocultivo forestal es de gran relevancia industrial y que posee un alto impacto en la economía nacional, pese a las consecuencias ecológicas actualmente conocidas.

1.2. Aceite esencial.

Se denominan así a los constituyentes odoríferos producto de metabolitos secundarios de una planta, con composición altamente volátiles, otorgando el aroma característico de algunas flores y semillas. Éste se puede encontrar en distintas partes de la planta, como: en la rosa, sólo en el pétalo; en la lima, en los frutos; y en las coníferas (como es el caso), en todo el tejido [30].

Los aceites esenciales son obtenidos de materia prima fresca utilizando principalmente el clásico procedimiento de destilación por arrastre de vapor, el cual una vez extraído es secado posteriormente con sulfato de sodio anhidro [30].

El eucalipto al predominar parte de la industria forestal chilena, presenta gran interés en la obtención y uso de su aceite extraído para la elaboración de múltiples productos y fármacos. La obtención del aceite se centra mayoritariamente en la molécula de 1,8-cineol quien constituye al menos el 60% del aceite. El otro 40% de compuestos provenientes del aceite de eucalipto presentan moléculas de composición similar al 1,8-cineol, como monoterpenos cíclicos, tales como el limoneno y los alfa/beta pinenos [23].

En los últimos años, se ha visto una masificación y aceptación de la medicina alternativa, principalmente de origen herbario/natural, por parte de los equipos de salud y los mismos pacientes como parte importante de sus tratamientos. Esto se debe al uso desmedido de medicamentos sintéticos, ocasionando un aumento progresivo a la resistencia por parte de algunos agentes patógenos.

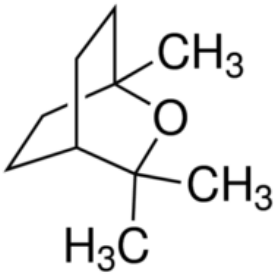
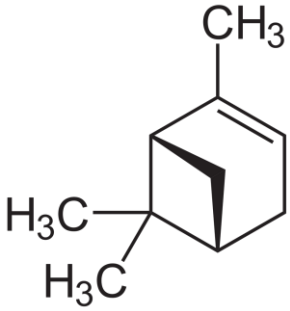
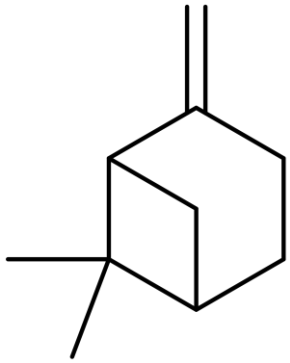
Actualmente, la infusión de las hojas adultas de esta planta se emplea en afecciones respiratorias de diversa índole: bronquitis, asma, faringitis, amigdalitis, gripes y resfriados; también para el control de la diabetes, cistitis y vaginitis (en forma oral o duchas locales), y dermatitis de cualquier origen. En los casos de males respiratorios es común utilizar esta planta en forma de “vahos” (vaporizaciones). [20]

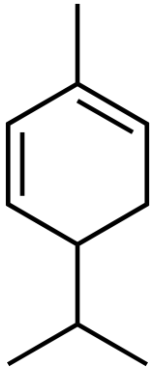
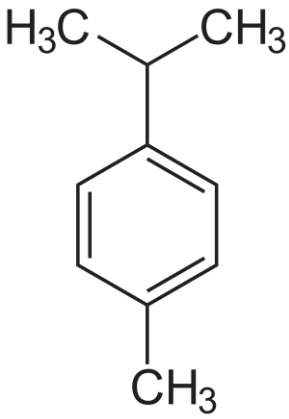
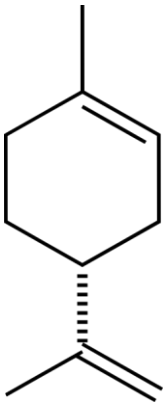
Es sabido gracias a la cantidad de estudios, que sus propiedades también ayudan en tratamientos para combatir otras afecciones. A su vez, también ha demostrado tener un carácter relevante en el tratamiento para neumonía viral con acción antiinflamatoria [1].
Cabe destacar que, desde 1991, el aceite de Eucaliptol ha sido catalogado y aprobado por la FDA (Food and Drugs Administration) como una “droga con efectividad descongestionante nasal” [27].

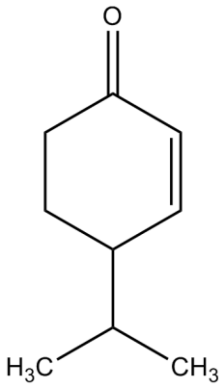
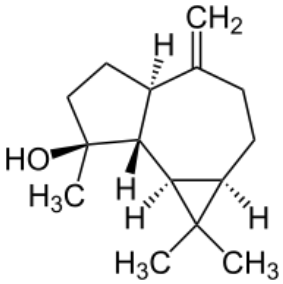
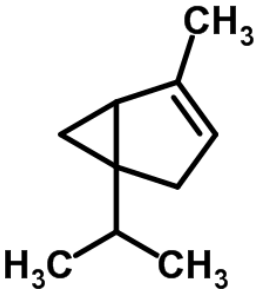
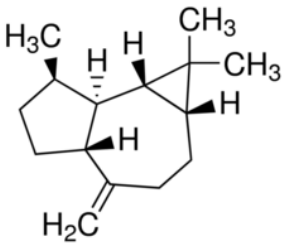
1.3. Composición química aceite esencial *Eucaliptus globulus.*

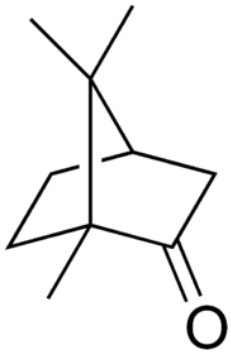
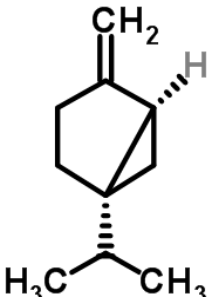
La composición química del Eucaliptus globulus varía dependiendo de la madurez del árbol y origen de recolección de sus partes [9] [23]. El aceite esencial posee un punto de ebullición de 200 °C y una densidad de 0,866 g/mL (25°C) [22]. Sus principales componentes se describen en la tabla 1-1.

Tabla 1-1: Composición química Eucaliptus globulus

Molécula	**Formula**	**Estructura**	**Predominancia**	**Concentración**
1,8-Cineol	C10H18O		Hojas, frutos, brotes y ramas	< 56.96 %
α-pineno	C10H16		Hojas	0.05 - 17.85 %
b-pineno	C10H16		Hojas	< 1.5 %

α-felandreno	C10H16		Hojas	< 1.5 %
p-cimeno	C10H14		Ramas	< 27.22 %
d-limoneno	C10H16		Hojas y frutos	trazas - 12 %

Criptona	C9H14O		Hojas	0.00 - 17.80 %
Espatulenol	C15H24O		Hojas	0.12 - 17.00 %
α-thujene	C10H16		Brote	< 11.95 %
Aromadendrene	C15H24		Fruto	< 23.33 %

Alcanfor	C10H16O		Hojas, frutos, brotes y ramas	< 0.1 %
Sabinena	C10H16		Hojas	< 0.3 %

1.4. Técnicas Analíticas.

1.4.1 Cromatografía.

La cromatografía corresponde a un método analítico de amplio espectro, útil en la separación, identificación, cuantificación y determinación de compuestos químicos presentes en el analito. Esto permite analizar mezclas que presenten alta complejidad.

El principio de esta metodología se basa en la velocidad en que se mueven los componentes de la muestra determinada y por los tiempos relativos de retención proporcionados por su afinidad entre las fases móvil y estacionaria en función a sus coeficientes de reparto respectivos.

Los resultados cromatográficos obtenidos proporcionan gráficos con valores de alturas y áreas de picos cromatográficas en función del tiempo, que permiten la identificación de compuestos y relación con la concentración.

Existen cromatografías planas (en papel y capa fina) de carácter más cualitativo y cromatografías en columna, de carácter más cuantitativo. De estas últimas, se pueden dividir en dos tipos:

A) **Cromatografía Liquida (LC):** Separación que comprende técnicas como la exclusión por tamaño molecular, el intercambio iónico, procesos de adsorción y reparto entre fases.

B) **Cromatografía de Gases (GC):** Separación que comprende técnicas de procesos de adsorción y reparto entre fases.

1.4.1.1. Cromatograma.

Un cromatograma es la señal recogida por el detector del cromatógrafo definida como un registro gráfico bidimensional. Comprende la respuesta ante la relación proporcional entre la función de concentración del soluto analito o volumen de elución y el tiempo de retención, formando patrones de picos y valles que permiten la visibilizar la separación física, garantizando la identificación, clasificación y cuantificación de los componentes de la mezcla.

Los cromatogramas se pueden segmentar en diversos valores que permiten el análisis gráfico (ver Figura 1-2), estos son:

- **Tiempo muerto (t0)**: tiempo necesario para que la sustancia llegue al detector.

- **Volumen muerto (v0):** volumen de la fase móvil necesario para eluir una especie no retenida.

- **Tiempo de retención (tR):** tiempo transcurrido entre la inyección y la llegada al detector.
- **Volumen de retención (vR):** volumen necesario para eluir determinado soluto.

- **Tiempo/volumen de retención corregido (t'R/v'R):** diferencia entre tiempo/volumen muerto y tiempo/volumen retención.
- **Ancho de base (w):** definida como 4σ (cuatro veces la desviación estándar).

- **Altura (h):** máxima intensidad registrada por el detector.

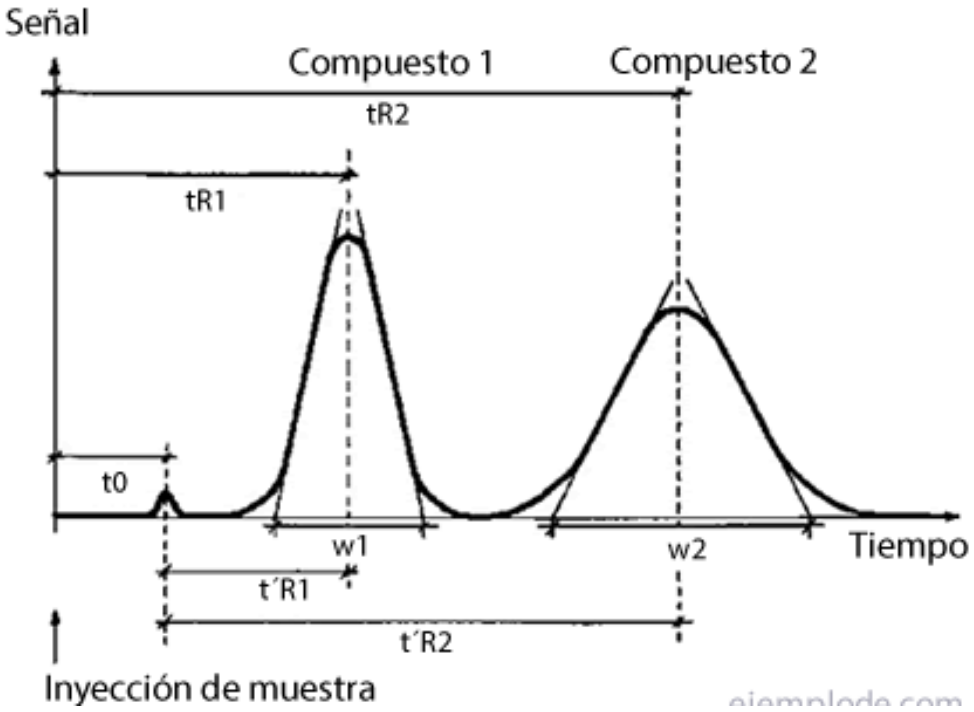


Figura 1-2: Cromatograma mezcla con dos compuestos.

Una buena cromatografía requiere que la constante de distribución (K) dada por las dos fases (móvil y estacionaria) y su coeficiente de reparto proporcionen picos de distribución normal o gaussiana, cuya simetría sea proporcional a la línea base. Bajo ciertas condiciones proporcionadas por la interacción del analito y la fase estacionaria, se pueden presentar asimetrías de carácter positivo (desplazado a la derecha) o de carácter negativo (desplazado a la izquierda).

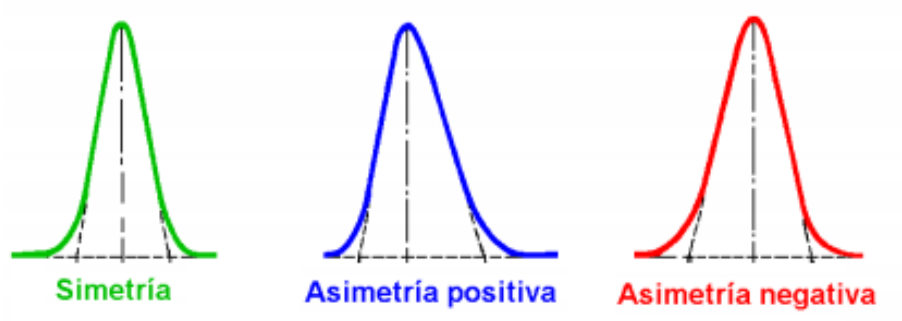


Figura 1-3: Simetría y Asimetría de Picos Cromatográficos.

1.4.1.2. Cromatografía de Gases.

La cromatografía de gases es un método físico de separación que permite la caracterización e identificación de mezclas complejas.

Su principio se basa en la separación de componentes en función de la afinidad entre el analito vaporizado y las 2 fases inmiscibles, una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida dispuesta en la columna. La velocidad de migración estará dada por la afinidad con la fase estacionaria y su capacidad de retención, es decir, a mayor afinidad del compuesto a la fase estacionaria, mayor será el tiempo de retención del analito. El mecanismo de separación se produce mediante partición de moléculas de la muestra entre la fase estacionaria y la fase móvil. La muestra debe ser termoestable, presentar una baja volatilidad a la temperatura en la cual se realiza el análisis y ser químicamente inerte en relación a los componentes de la muestra. [16]

Esta es una técnica de análisis que ofrece excelentes resoluciones con sensibilidad del orden de los miligramos a picogramos. Sus resultados son cuantitativos y se obtienen en un espacio de tiempo relativamente corto. Los componentes de las muestras deben de ser estables a la temperatura de operación y las muestras tienen que ser volátiles. La fase móvil proporciona un equilibrio entre las fases con mayor eficiencia.

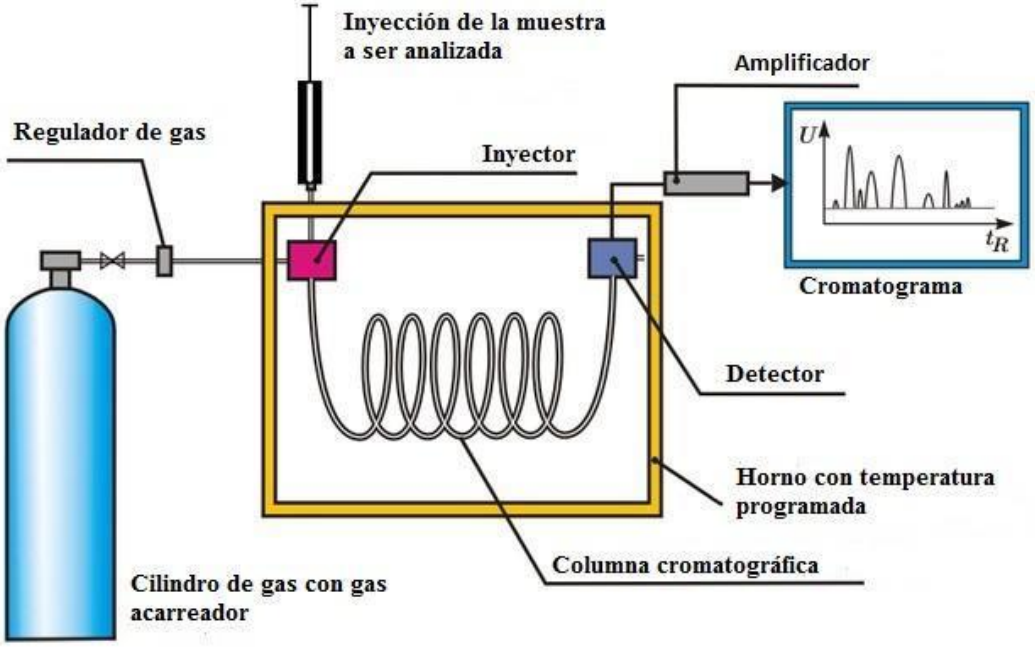


Figura 1-4: Esquema general Cromatógrafo de gases.

1.4.1.3. Componentes del equipo de cromatografía de gases.

A) Cilindro Gas Portador:

Estos deben no deben interactuar con la fase estacionaria ni con la muestra. Debe poseer alta pureza, un bajo costo y presentar compatibilidad con el detector. Se requiere de reguladores y medidores de presión, calibración y flujo, que permitan controlar la velocidad del gas portador.

Los gases utilizados son: nitrógeno, helio, hidrógeno y argón.

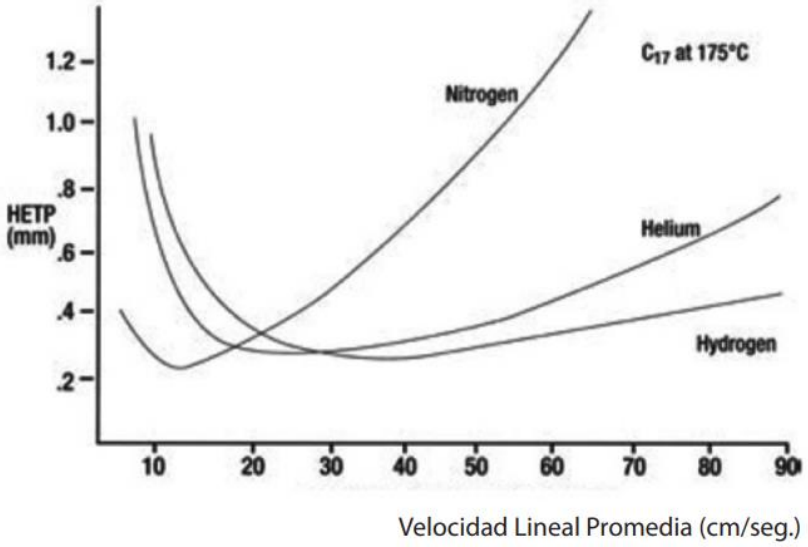


Figura 1-5: Trazado Van Deemter para Columnas Capilares (HETP-altura equivalente a placa teórica).

B) Columna:

La columna constituye un tubo largo la cual contiene la fase estacionaria, con una alta resistencia térmica, que optimiza el grado de separación de las muestras.

Generalmente estos están compuestos por cobre, acero, aluminio, vidrio y teflón. De estas, se desprenden dos tipos de columnas, las capilares o abiertas; tubos finos de

gran longitud cuya película interior poseen una fase de polímeros de silicona que ronda los 0.1 y 5µm de espesor; y las empaquetadas o de relleno; tubos con fase estacionaria con forma de esferas de carácter inerte hecha generalmente de sílice.

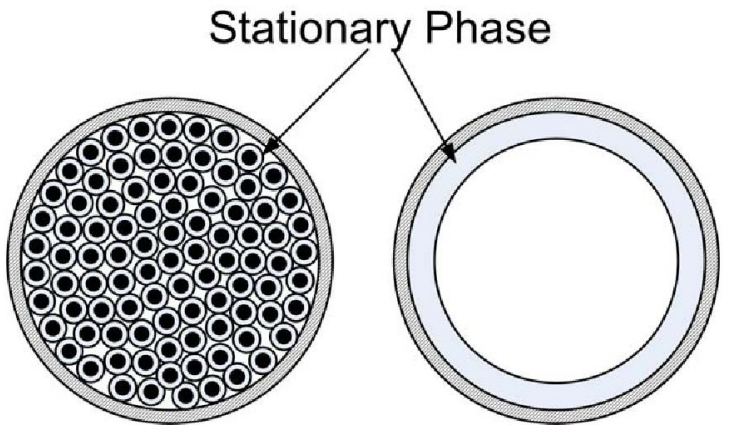


Figura 1-6: Columna empaquetada (izquierda) y Columna capilar abierta (derecha).

C) Inyector:

El sistema de inyección se efectúa por medio del uso de micro jeringas que contienen la muestra, cuyo volumen de inyección no debe superar la capacidad proporcionada por la columna, donde al realizar una inyección a menor volumen, mejora su eficiencia y reproducibilidad de análisis. El inyector posee la capacidad de calentarse, permitiendo aplicar una temperatura adecuada que garantice la volatilización y atomización de la muestra.

Modalidades de inyección:

i. Modo Split

Modalidad en que la muestra vaporizada ya inyectada se mezcla con el gas portador y ésta se divide en dos partes: una fracción minoritaria que se

transfiere a la columna y una fracción mayoritaria expulsada por la válvula de Split o purga.

Esta modalidad evita la sobrecarga de analito en la columna en muestras muy concentradas, evitando posibles efectos negativos en los resultados del cromatograma y es posible ajustar en función a la razón de Split (R).

$$Razon\ de\ Split\ (R) = \frac{Flujo\ de\ Split}{Flujo\ Columna} \qquad (1)$$

ii. <u>Modo Splitless</u>

Modalidad en que la muestra inyectada no presenta división. La muestra vaporizada es mezclada con el gas portador y este ingresa a la columna casi en su totalidad.

Esta modalidad es ideal en muestras muy diluidas y de baja concentración.

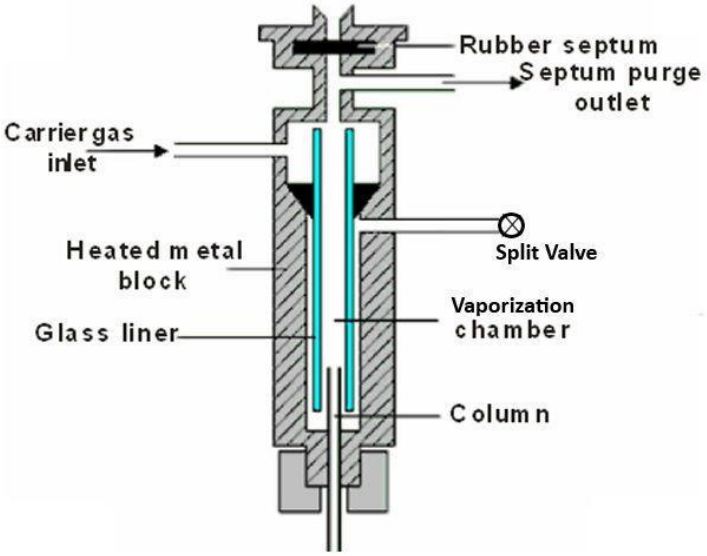


Figura 1-7: Inyector con modalidades Split/Splitless.

D) Detector:

Una vez la muestra pasa a través de la columna, donde es separada, llega al sistema de detección. Cumple el rol de transformar la fracción de analito en una señal eléctrica. En consideración, sus parámetros más relevantes son la sensibilidad, linealidad y mínima cantidad detectable. Entre los detectores de mayor relevancia son:

i) **Detector de ionización de llama (FID):** Por medio de la quema del efluente de la columna con una llama alimentada por la mezcla de hidrogeno/aire se producen iones y electrones que producen una diferencia de potencial recogida por un electrodo en la parte inferior del quemador. Dicho diferencial causa una corriente eléctrica de baja intensidad la cual es amplificada. [42]

ii) **Detector de conductividad térmica (TCD):** Está basado en la diferencia de conductividad térmica del gas portador cuando circula con el analito. Estos cambios son producidos por una resistencia calentada eléctricamente (hilo fino de platino, oro o tungsteno) cuyo potencial eléctrico es constante y posee una temperatura que depende del gas circundante. [42]

iii) **Detector de captura de electrones (ECD):** Gracias a un emisor radiactivo como el Níquel-63 o Tritio absorbidos en una placa de platino o titanio, emite partículas β (electrones). Causan la ionización del gas portador generando una ráfaga de electrones el cual, bajo un campo eléctrico constante proporcionado por un par de electrodos, se verá interrumpido por el flujo de los compuestos proveniente del gas efluente. Esto permite la selectividad ante compuestos y moléculas de carácter electronegativo. [42]

iv) **Detector de espectrómetro de masas (MS):** Esta técnica se rige bajo la obtención de iones a partir de moléculas previamente atomizadas, quienes son sometidas a un campo eléctrico inducido que causa variación en la trayectoria

hacia el detector, evidenciando la separación entre átomos y moléculas de acuerdo a su carga y masa. [42]

1.4.2. Espectrometría.

La espectrometría se define como una técnica espectroscópica que permite medir la cantidad de especies presentes o concentraciones determinadas. Esto, en función a la relación entre las interacciones de la radiación electromagnética y la materia, ante procesos de absorción y emisión de energía. Es por esto que el tipo de espectrometría está dada por la naturaleza del proceso de excitación e interacción de la materia y la cantidad física relacionada a medir.

Es posible identificar las espectrometrías según su metodología: [38]

- **Electromagnética:** Interacciones materia-radiación electromagnética como el intercambio de fotones.
- **De electrones:** Interacciones con haces de electrones y la energía cinética del electrón como variable.
- **De masa:** Interacciones de especies cargadas o ionizadas con campos magnéticos y/o eléctricos, cuya masa (m) actúa como variable de la energía cinética de la partícula.
- **Acústica:** Frecuencias de sonido.
- **Dieléctrica:** Frecuencias de un campo eléctrico externo.
- **Mecánica:** Frecuencias de un estrés mecánico externo, por ejemplo, una torsión aplicada a un trozo de material.

Como también su proceso de medición:

- **De absorción:** Por medio de rangos del espectro electromagnético y el proceso de absorción de energía. (Espectrometría de absorción atómica, espectrometría infrarroja, resonancia magnética nuclear entre otras).

- **De emisión:** Proceso posterior al de absorción de energía, quien puede provenir de diversas fuentes, en el cual una sustancia irradia o libera energía dentro del rango de espectros electromagnéticos. (Técnicas de luminiscencia como la espectrofluorometría).
- **De dispersión:** A diferencia de los procesos anteriores de absorción/emisión, la rapidez de este efecto es considerablemente mayor, donde se mide la cantidad de luz dispersa, valorizando ciertas longitudes de onda, ángulos de incidencia y ángulos de polarización, donde el desplazamiento en energía da información sobre los modos vibracionales en el sistema. (Técnicas como la espectrometría Raman).

1.4.2.1. Espectrómetro de Masas.

La espectrometría de masas corresponde a una metodología de análisis, cuya función es la determinación de masas de especies atómicas o moleculares de forma individual. Por medio de la separación de iones provenientes de los componentes del analito, quienes se desplazan rápidamente bajo un campo magnético inducido que permite su separación en función a su relación masa-carga (m/z), se logra recopilar información sobre la naturaleza, composición y estructura de la especie. La capacidad de diferenciar dos masas está determinada con el poder de resolución (R), definida como la masa nominal (m) dividida entre la diferencia de dos masas que se pueden separar. [16]

$$R = \frac{m}{\Delta m} \qquad (2)$$

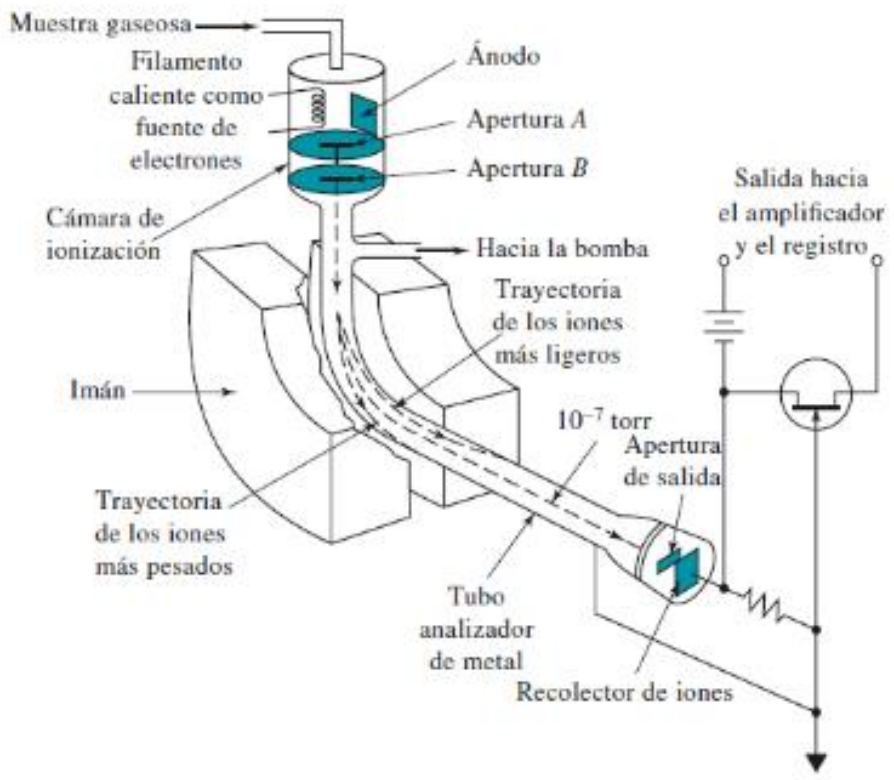


Figura 1-8: Esquema espectrómetro de masas.

1.4.2.2. Componentes del espectrómetro de masas:

A) Sistema de entrada de la muestra

Sistema que permite el ingreso de una cantidad reducida de analito, en el orden de los microgramos, a la fuente ionizante proveniente del efluente cromatográfica posterior a su separación. [38]

B) Fuente de Ionización

El analito una vez pasa el sistema de entrada, viaja a la fuente de ionización, donde las moléculas o átomos neutros ingresadas son bombardeados e impactados

electrónicamente por un cañón de electrones de alta energía cercano a los 70 eV, generados con un filamento de tungsteno. El electrón generado posee la capacidad de impartir suficiente energía permitiendo remover un electrón de la molécula (M), logrando que la molécula o ion precursora (M^+) se encuentre con una carga sencilla.

$$M + e^- \rightarrow M^+ + 2e^- \qquad (3)$$

Esta acción genera que los iones precursores presenten reacciones de fragmentación obteniendo segmentos de menor masa. Los distintos estados de energía y energía interna (rotacional, vibracional y electrónica) se ven disipados en dicho proceso.

Este método es mayormente utilizado y se le denomina Impacto electrónico (EI), pero existen otras variables como la ionización química (CI), Electropulverizador (Electrospray, ESI) y Desorción de la matriz asistida por láser (MALDI). Estos pueden ser observados en la siguiente tabla: [38]

Tabla 1-2: Comparativa métodos de ionización

Método de ionización	**Analitos típicos**	**Introducción de la muestra**	**Intervalo de masa**	**Características del método**
Impacto electrónico (EI)	Relativamente pequeños, volátiles.	GC o sonda líquido-sólido	Hasta 1.000 Dáltones.	Método vigoroso, versátil proporciona información sobre la estructura.

Ionización Química (CI)	Relativamente pequeños, volátiles.	GC o sonda líquido-sólido	Hasta 1.000 Dáltones.	Método suave. Pico de ion molecular $[M + H]^+$.
Electropulverizador (Electrospray, ESI)	Péptidos, proteínas, no volátiles.	LC o jeringa	Hasta 200.000 Dáltones.	Método suave. Con frecuencia los iones tienen cargas múltiples.
Desorción de la matriz asistida por láser (MALDI)	Péptidos, proteínas, nucleótidos.	Muestra mezclada en matriz sólida.	Hasta 500.000 Dáltones.	Método suave. Masas muy altas.

C) Analizador de masas

El analizador de masas corresponde al método de dispersión y separación de las moléculas ionizadas según su relación de velocidad y masa/carga, producto de una deflexión generada por un campo magnético al interior de un tubo curvo, que permite medir diferentes iones con una alta resolución. [38]

i) **Filtro de masas cuadrupolar:** Analizador de masas que permite el paso de iones específicos. Consiste en 4 varillas metálicas paralelas, donde un par de polos opuestos se cargan positivamente y los otros dos restantes se cargan negativamente, cuyas polaridades se ven intercambiadas durante el proceso del experimento. Esto se debe a la aplicación de corriente hacia las varillas, con un voltaje de corriente directa (U) y un voltaje oscilante de radiofrecuencia (V cos ωt, donde w es la frecuencia y t el tiempo), determinando la trayectoria de los iones, en la trayectoria de vuelo entre los cuatro polos. Cuando los iones procedentes de la fuente de ionización entran al campo de radiofrecuencia a lo largo del eje z de los electrodos,

oscilan con respecto a ese eje. Sólo los que tienen determinada relación de carga-masa resuenan a lo largo del campo y tendrán una trayectoria estable hacia el detector. Otros, los que no resuenan, son deflectados (trayectoria inestable), y colisionan con los electrodos y se perderán (se filtran y eliminan). [38]

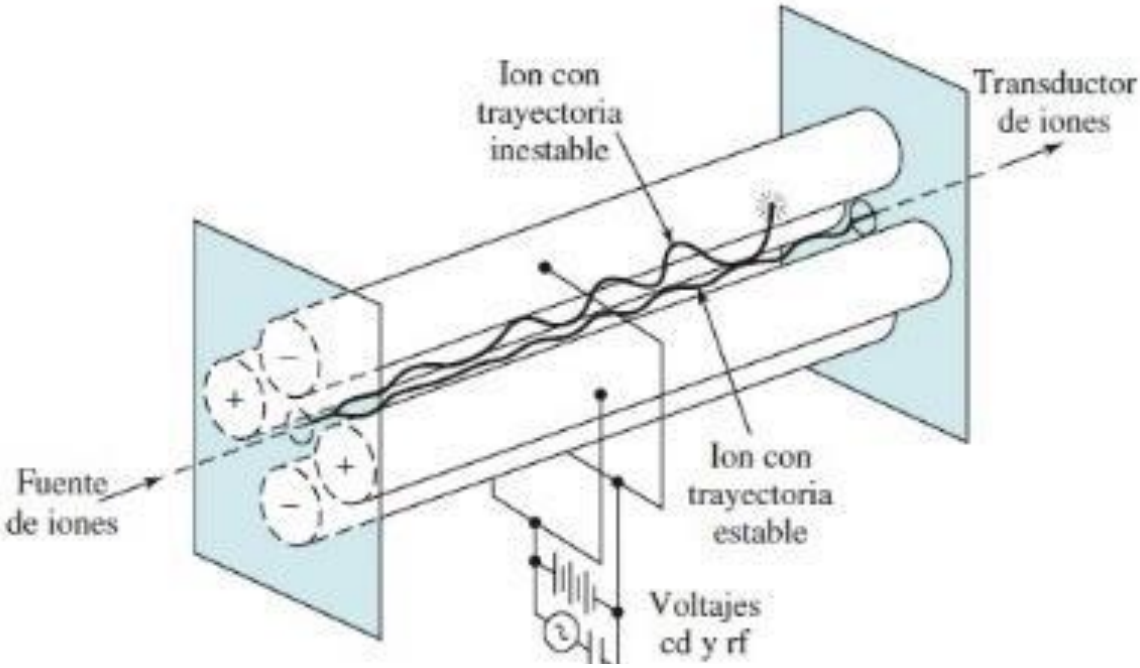


Figura 1-9: Diagrama cuadropolo.

ii) **Analizador de masa de tiempo de vuelo (TDV):** En un analizador TDV, un paquete de iones con casi las mismas energías cinéticas se muestrea rápidamente, y los iones entran a una región de libre de campo. Dado que la energía cinética (EC) es igual a mv^2, la velocidad iónica v varía de manera inversa con la masa, como se muestra en la ecuación:

$$v = \sqrt{\frac{2EC}{m}} \qquad (4)$$

El tiempo requerido para que los iones recorran una distancia fija hacia el detector está, por lo tanto, inversamente relacionado con la masa del ion. En otras palabras, los iones con una relación m/z pequeña llegan al detector más rápido que aquellos con una relación m/z más grande. Cada valor de m/z es detectado en secuencia. Los tiempos de vuelo son bastante breves, lo que lleva a tiempos de análisis que generalmente están en el orden de los microsegundos.

Los instrumentos de tiempo de vuelo son relativamente simples y resistentes, y tienen un intervalo de masas casi ilimitado. Los analizadores TDV tienen una resolución y una sensibilidad limitada. Como resultado, los analizadores TDV se utilizan menos que los analizadores de sector magnético y que los cuadrupolo. [15]

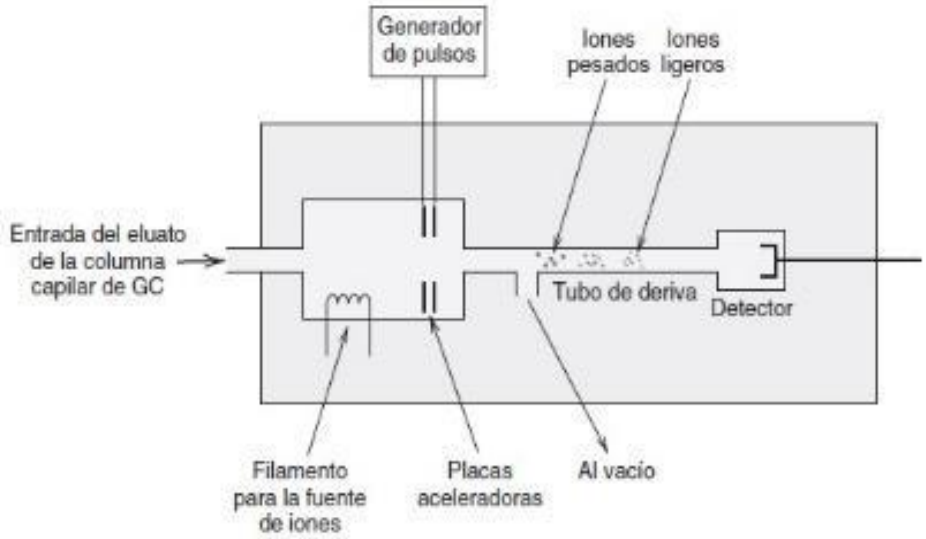


Figura 1-10: Diagrama TDV

iii) **Analizador de trampa de iones (IDT):** Corresponde a un dispositivo en el que los cationes o aniones gaseosos pueden ser formados y confinados durante largos periodos de tiempo por la acción de campos eléctricos y/o magnéticos, generalmente cuadrupolos que permiten la manipulación de iones y permitir hacer masas/masas. Su mecanismo consiste en un electrodo anular y un par de electrodos colectores. Se aplica al electrodo anular un potencial de radiofrecuencia variable mientras que los dos electrodos colectores están conectados con tierra. Los iones con un valor apropiado de m/z circulan en una órbita estable dentro de la cavidad que está rodeada por el anillo. Cuando el potencial de radiofrecuencia aumenta, las órbitas de los iones más pesados llegan a estabilizarse, mientras que las de los iones más ligeros se desestabiliza, lo que causa colisiones con la pared del electrodo anular. Cuando este dispositivo funciona como un espectrómetro de masas los iones quedan atrapados en el interior de la trampa mediante la aplicación de voltajes y radiofrecuencias adecuados, pudiéndose de esta forma hacer experimentos con estos. Los espectrómetros de trampa de iones son robustos, compactos y más económicos que los instrumentos de cuadrupolo. Sin embargo, sufre de limitaciones en cuanto a su capacidad de resolución y otras relacionadas con la alta probabilidad de que puedan producirse interacciones ion molécula durante el prolongado tiempo de residencia de los iones en la cavidad. [38]

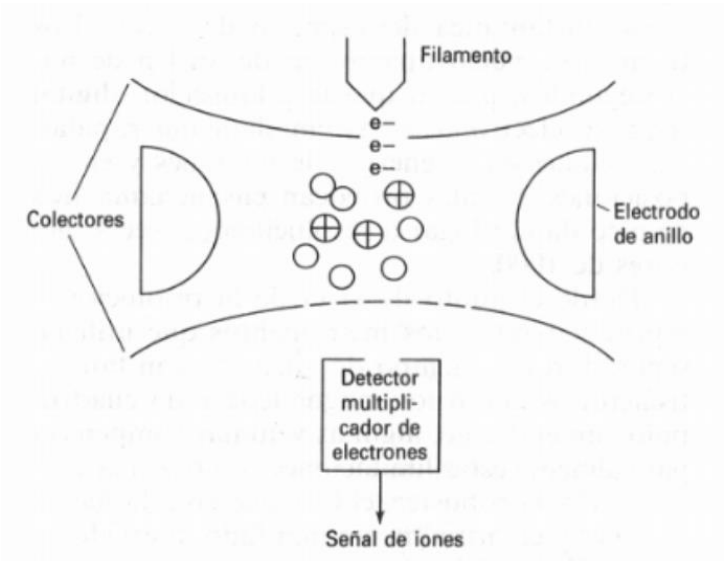


Figura 1-11: Analizador de masas de trampa de iones.

D) Sistemas de vacío

Para garantizar el éxito del funcionamiento del espectrómetro de masas es necesario contar con un ambiente de alto vacío. Este permite un medio libre a las moléculas y los iones, en ausencia de colisiones, y presentar un camino consistente con la longitud de la trayectoria que deben recorrer en su viaje hasta el detector. Existen varios tipos de bombas de vacío; las bombas difusoras, las turbomoleculares y las mecánicas o rotatorias. [38]

E) Detector de Iones

Estos cumplen el rol de identificar entre átomos y moléculas basado en un espectro característico que permite la diferenciación, caracterización y cuantificación (concentración en el orden de los ppm o ppb) de las sustancias con una alta sensibilidad. Al igual que los filtros de masas, existen varios tipos de detectores:

i) Detector de copa de Faraday

Constituido por un electrodo simple, generalmente con forma de copa o caja, capaz de recibir el impacto de los iones a detectar. Los iones al impactar se neutralizan por transferencia de electrones, cuya señal se mide como una corriente analógica igual o superior a la corriente iónica original acorde a la forma del electrodo. Se utiliza principalmente en sistemas para análisis de gases permanentes, en muestras ambientales, reactores, gases residuales, etc., normalmente combinado con un SEM (Multiplicador de Electrones Secundarios), usándose uno u otro según la sensibilidad requerida y el vacío disponible. [38]

ii) Multiplicador de electrones secundarios

Uno de los detectores que han sido más utilizados en espectrometría de masas, es el multiplicador de electrones de dínodos. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de Cu/Be de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía.

El ión a detectar choca con el primer dínodo, provocando la emisión de un elevado número de electrones, que van a incidir sobre el segundo dínodo. El proceso de multiplicación se repite sucesivamente en los demás dínodos, obteniéndose al final del sistema una amplificación de señal del orden de 10^6 a 10^8. [38]

iii) Detector "Channeltron"

Corresponde al detector más utilizado en espectrometría de masas. Similar al multiplicador de electrones clásico, con la diferencia de que no tiene múltiples dinodos discretos, sino que está formado por un tubo de vidrio en forma de corneta. Su terminación posee forma de espiral o caracol,

donde su interior está recubierto por un óxido de plomo semiconductor de composición y características especiales.

Para la detección de iones positivos, es necesario aplicar un potencial negativo en la boquilla del detector permitiendo que los iones procedentes del espectrómetro de masas sean desviados de su trayectoria por una placa repulsora con potencial positivo. De esta manera los iones positivos son atraídos a su interior, chocando con la cara interna del detector generando la emisión de un cierto número de electrones.

Finalizando el recorrido del tubo multiplicador, se sitúa a un potencial cercano a tierra, con lo que existirá un gradiente continuo de potencial desde la boca al fondo del detector, donde de igual manera, se encuentra un cono colector con la electrónica de preamplificación y amplificación asociada. Debido a esto, los electrones arrancados en el impacto inicial del ion volarán en la dirección de los potenciales menos negativos, hacia potencial cero, produciéndose una gran cantidad de impactos en el camino, en cada uno de los cuales se multiplicará el número de electrones, con lo que se puede conseguir un efecto multiplicador del orden de 10^8.

Si se desean detectar iones negativos, en principio basta con cambiar el signo de los potenciales aplicados a la placa repulsora y a la boca del Channeltron. Por tanto, este detector es susceptible de ser empleado tanto para detectar iones positivos como negativos. El hecho de situar el detector fuera del "eje óptico" del espectrómetro, produce una ventaja importante, además de permitir la detección selectiva de iones positivos o negativos, como es la de evitar que alcancen el detector partículas o radiaciones no deseadas, tales como fragmentos neutros o fotones procedentes del filamento de la fuente, que podrían incrementar el ruido de fondo y originar señales parásitas. [38]

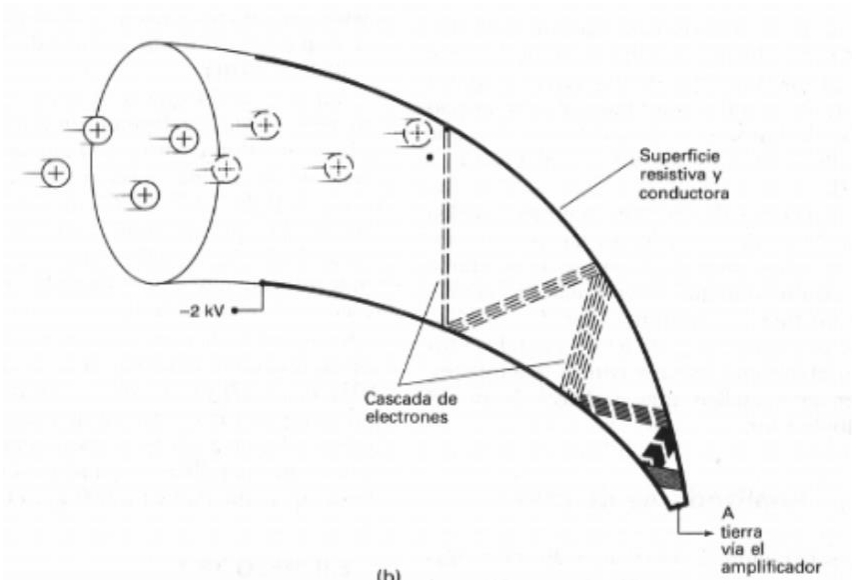


Figura 1-12: Esquema detector Channeltron.

iv) Detector de conversión fotónica (Daly o centello)

Corresponde a uno de los detectores más eficientes, sensibles y de más larga vida disponibles para detección puntual. En este tipo de detector los iones procedentes del tubo de vuelo del espectrómetro de masas son desviados de su trayectoria mediante un potencial eléctrico cuyo voltaje aplicado es de signo contrario a la carga de los iones que se quieran detectar, provocando su atracción y choque sobre el dínodo inicial. Este choque produce múltiples electrones que son atraídos, a su vez, por un voltaje más positivo que el del dínodo. Se aplica sobre una pantalla fosforescente, la cual al recibir el impacto de los electrones, emite un gran número de fotones, que se dirigen a un fotomultiplicador convencional sellado a vacío. Esto produce la consiguiente cascada de electrones que multiplica la señal. La señal es detectada al final de su recorrido por el interior del tubo fotomultiplicador, siendo posteriormente de nuevo amplificada, digitalizada y elaborada mediante circuitos electrónicos, para

su manipulación por el sistema de tratamiento de datos del espectrómetro de masas. [38]

v) Detector multicanal

Este tipo de detectores se basa en la utilización de una o dos capas de baterías de micromultiplicadores, seguidas de un sistema de detección más o menos sofisticado y eficiente, encargado de detectar simultáneamente todas las señales. Este tipo de detectores reúne la ventaja de los antiguos sistemas de fotoplacas, de ser capaces de detectar simultáneamente una amplia zona espectral, lo que aumenta enormemente el tiempo de observación de cada ion, con la mayor sensibilidad, estabilidad, capacidad de amplificación, etc., de los modernos sistemas multiplicadores. Esto conduce a una sensibilidad aumentada en muchos órdenes de magnitud. Existen distintas denominaciones de este tipo de detectores tales como; *Multiple Channel Detector o Multiple Channel Detector/Multiplier Array Detector/Microchannel Multipliers - Multichannel Photo Diode Array*. [38]

1.4.3. Cromatografía de gases/masa (GC-MS).

Como se ha mencionado anteriormente, la cromatografía de gases es un método físico de separación que permite la caracterización e identificación de mezclas complejas y su principio se basa en la separación de componentes en función de la afinidad entre el analito vaporizado y las 2 fases inmiscibles, una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida dispuesta en la columna. Al verse acoplada a un espectrómetro de masas se produce la combinación de capacidad de separación de alta sensibilidad y la capacidad selectiva como una sola técnica, permitiendo el análisis y la cuantificación de compuestos trazas de mezclas complejas con un alto grado de efectividad.

Para esto es necesario contar con conexiones óptimas entre la salida de la columna con el espectrómetro de masas, como las columnas capilares de sílice fusionada, que tiene la capacidad de introducirse directamente a la fuente de iones, permitiendo reducir al mínimo el sangrado de la columna, ya que el espectrómetro de masas es capaz de detectar los materiales de la fase estacionaria, cuyas sensibilidades de detección se encuentran al nivel de nanogramo. [16]

1.4.4. Micro extracción en fase sólida (SPME).

1.4.4.1. Generalidades.

La micro extracción en fase sólida es una técnica preparativa de muestras que permite realizar la extracción de analitos volátiles, semi volátiles y no volátiles, presentes en la matriz de la muestra. Este procedimiento de extracción, se efectúa por medio de la utilización de una fibra de sílice fundida recubierta con una fase polimérica, donde ocurren los fenómenos de absorción y desorción de los analitos para posteriormente transferir dicha fibra a un instrumento de separación (HPLC, CG, CG/MS, etc.).

La técnica de SPME posee una serie de ventajas que garantizan una gran utilidad dentro de los métodos analíticos. Es una técnica simple, de bajo costo económico, capaz de ser automatizada, de diseño ligero y portátil que permite realizar análisis de campo, la funcionalidad de trabajar con pequeños volúmenes de muestra (de diferente naturaleza) y carecer de la necesidad de depender de disolventes orgánicos en los procesos de preconcentracion. Su principal inconveniente es la limitación presentada por la pequeña cantidad de recubrimiento que posee la fibra, obteniendo límites de detección bajo con pobre sensibilidad.

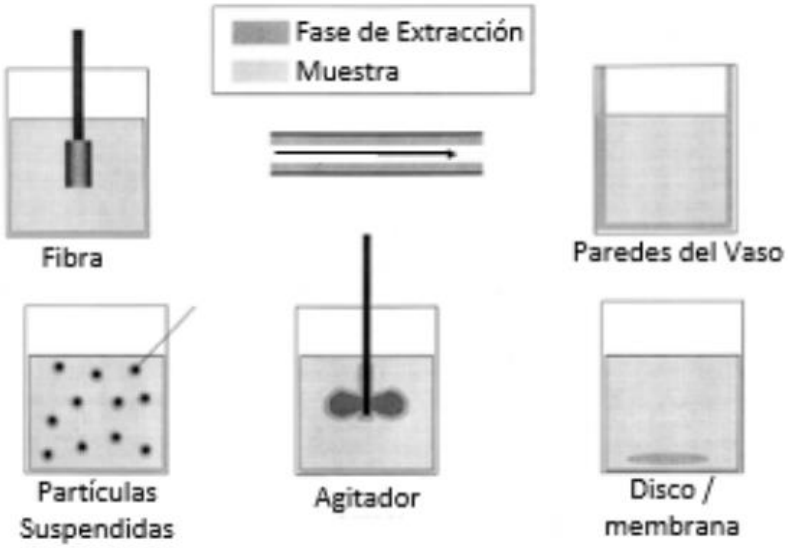


Figura 1-13: Diferentes configuraciones de SPME

1.4.4.2. Tipos SPME.

La microextracción en fase sólida puede llevarse a cabo en tres modalidades distintas; la modalidad espacio de cabeza o "headspace" (HS), por inmersión directa (DI) y por extracción de membrana protegida. [36][37]

A) **Headspace (HS-SPME):** Tipo de SPME sirve para analitos volátiles que se encuentren en equilibrio entre fase gaseosa y la muestra, y puede ser aplicado tanto para matrices sucias, líquidas y sólidas.

   Su fundamento consiste en introducir la muestra (matriz líquida o sólida), en un pequeño recipiente de cristal, sin llenarlo, cerrado por un tapón perforado, que tras un periodo de equilibrio termodinámico entre las fases presentes (de 30 minutos a 1 hora) absorbe un fracción del vapor en equilibrio. En estas condiciones la cantidad de cada compuesto volátil en el volumen de espacio de cabeza es proporcional a su concentración en la matriz. Posteriormente, el calibrado (método del patrón interno o externo) es posible hacer coincidir las

concentraciones reales en la muestra con las de los vapores inyectados en el cromatógrafo. Cabe destacar que la temperatura tiene un efecto significativo en la cinética del proceso, ya que ésta determina la presión de vapor de los analitos.

B) **Inmersión Directa (DI-SPME):** En esta modalidad, la fibra se inserta en la muestra y los analitos se transportan directamente por contacto directo desde la muestra hasta la fase de extracción. En muestras acuosas, un nivel de agitación permite facilitar una extracción rápida, transportando los analitos desde la muestra hasta la fibra con mayor efectividad. En cambio, las muestras gaseosas cuentan con el flujo natural de aire que puede ser suficiente para facilitar un equilibrio rápido en la fibra.

C) **Extracción con membrana protegida:** tipo de SPME donde la fibra se encuentra separada de la muestra por una membrana selectiva que permea la matriz, permitiendo el paso de los analitos y bloquea las interferencias. Este método es ideal para analitos de volatilidad baja.

Con un principio similar a la extracción directa, la fibra se inserta directamente en la muestra, sin embargo, de este modo tiene la misma ventaja que el modo Headspace porque protege la fibra de los compuestos endógenos de alto peso molecular que se encuentran en la matriz de muestras muy sucias. Este proceso de extracción es más lento que la extracción directa porque los analitos deben difundirse a través de la membrana antes de llegar al revestimiento. Es posible reducir el tiempo de extracción utilizando membranas delgadas y aumentando la temperatura de extracción.

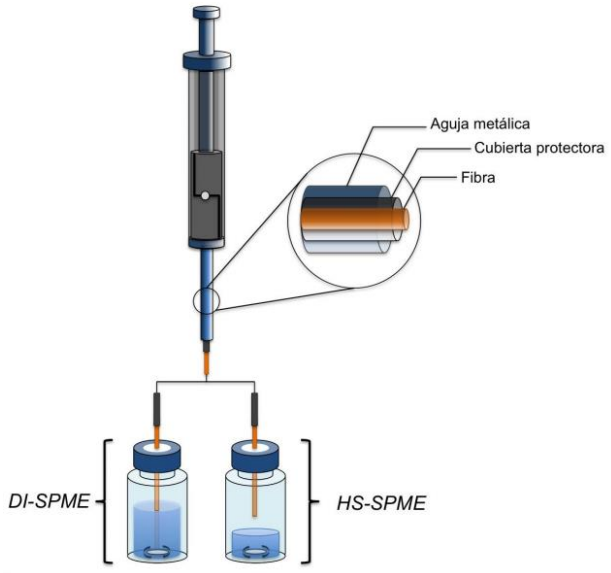


Figura 1-14: SPME modalidad por inmersión directa y headspace.

1.4.4.3. Fundamentos técnica SPME.

El fundamento de la Extracción en Fase Sólida (SPE) se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida. De modo que cuando se hace pasar la muestra a través de la fase sólida, algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasan inalterados, cuyo planteamiento principal consiste en que se produzca un equilibrio entre la matriz de la muestra y la fase de extracción. [31]

Existen dos tipos de mecanismos de extracción en función de los distintos sorbentes de la SPME disponibles comercialmente. El más usado es el de polidimetilsiloxano (PDMS), que es líquido. Las fibras de PDMS y las de poliacrilato (PA) extraen los analitos por absorción, disolviéndose. El resto de sorbentes, incluyendo PDMS-DVB (divinilbenceno), Carbowax-DVB, Carbowax-TPR (plantilla de resina) y Carboxen (Car)- PDMS, son mezclas de capas en las que la fase primaria de extracción es un sólido poroso, y los analitos se extraen por adsorción. Los fundamentos de la adsorción y de la absorción son diferentes. [4]

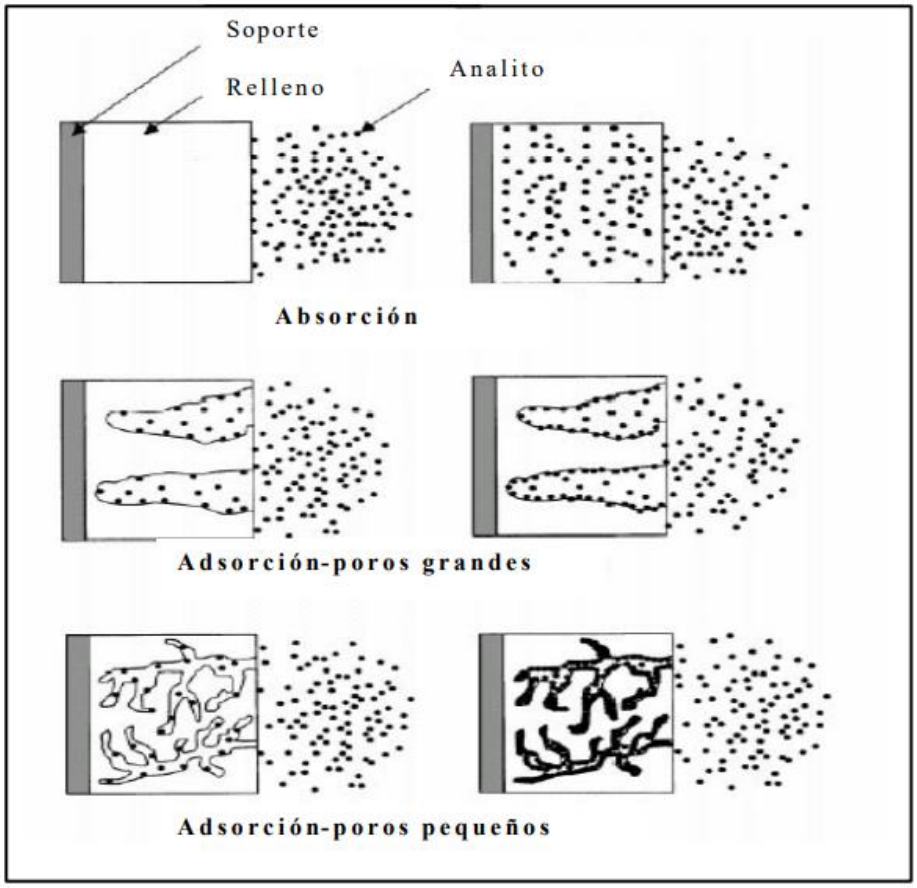


Figura 1-15: Comparación de los mecanismos de extracción por absorción y adsorción.

A) Absorción:

El modelo matemático que explica la dinámica del proceso de absorción cuando la fibra se introduce directamente (inmersión directa) en la muestra, indica que existe una relación lineal entre el número de moles adsorbidos sobre la fibra (n) y la concentración de analito en la fase acuosa (C_0), tal como se recoge en la siguiente ecuación:

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + V_s} \qquad (5)$$

Donde K_{fs} es el coeficiente de partición entre la fibra y la muestra, y V_f y V_s son los volúmenes de fibra y de muestra, respectivamente. Si en la ecuación anterior se asume que generalmente el volumen de la fibra es mucho más pequeño que el de la muestra (Vf<<Vs):

$$n = K_{fs} V_f C_0 \qquad (6)$$

Esta aproximación no es válida en el caso de que los analitos tengan elevada afinidad por la fibra y se utilicen volúmenes de muestra pequeños. [4] Por lo que apunta a la utilidad de la técnica para aplicaciones de campo y también el uso del espacio de cabeza "headspace".

B) Adsorción:

La adsorción es el otro proceso físico-químico de muestreo que se produce al utilizar fibras revestidas con fases sólidas porosas. En este proceso se establece una competencia entre los analitos por los sitios disponibles en la fibra para la adsorción, ya que éstos son limitados. La relación entre la concentración de un analito en la muestra y la cantidad extraída con la fibra no mantiene la linealidad para un intervalo muy amplio de concentraciones, por lo que se aplican las siguientes suposiciones; la molécula se adsorbe en un estado inmóvil; todos los sitios son equivalentes; en cada sitio sólo se une una molécula, y no hay interacciones entre las moléculas adsorbidas en sitios contiguos, es decir, la constante de equilibrio es independiente del número de moléculas adsorbidas.[4]

La ecuación que define el proceso de extracción por adsorción es la siguiente:

$$n = \frac{K_{fs}^{D} V_f V_s C_0 (C_{f\,max} - C_f)}{K_{fs} V_f + V_s (C_{f\,max} - C_f)} \qquad (7)$$

Donde K_{fs}^{D} es el coeficiente de distribución del analito entre la muestra y la superficie de la fibra, C_f es la concentración final de analito en la superficie de la fibra y $C_{f\ max}$ es la concentración máxima de analito en la superficie de la fibra. Los demás parámetros son los mismos que aparecen en la ecuación (6). [4]

1.4.4.4. Instrumentación SPME.

Consiste en una fibra larga de sílice fundida recubierta con un sorbente. La fibra está unida a un pistón de acero inoxidable cubierto por una aguja protectora, adaptada a un cuerpo de jeringuilla, pero en este caso el émbolo no aspira la muestra, sino que solo se encarga de hacer salir la fibra al exterior o de introducirla en el interior del dispositivo. [31]

El portamuestras está equipado con un pistón de profundidad ajustable, que permite controlar la distancia de penetración de la aguja en el recipiente de la muestra o en el inyector. El movimiento del pistón está limitado por un pequeño tornillo que se mueve en la ranura en forma de Z del dispositivo. [17]

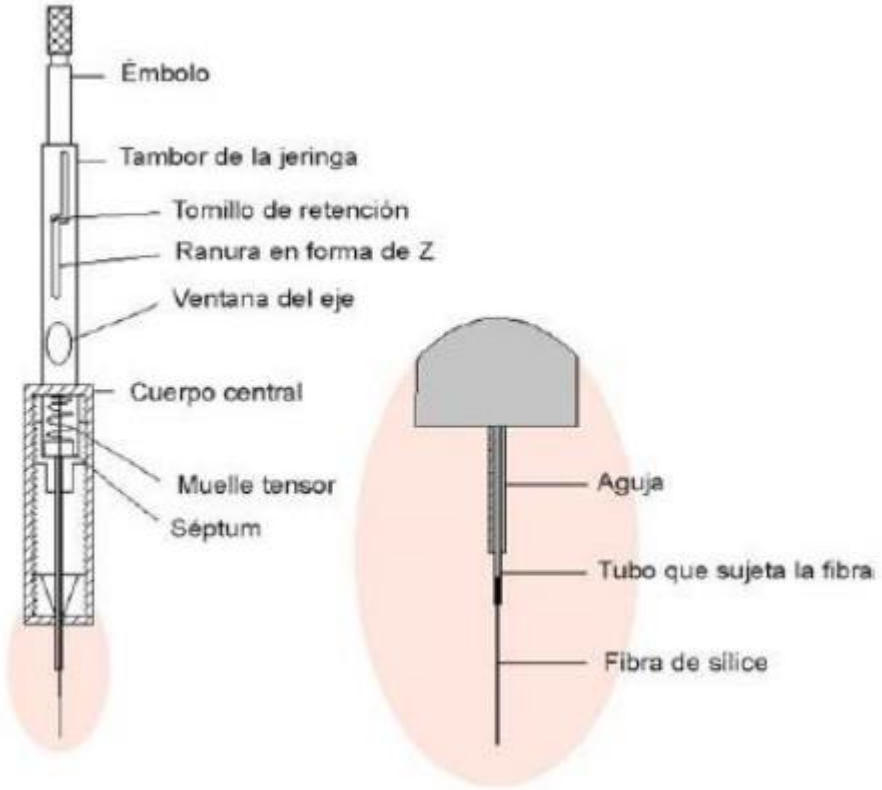


Figura 1-16: Dispositivo comercial de la SPME.

1.4.4.5. Procedimiento SPME.

El procedimiento de la SPME se puede dividir en dos etapas:

- **Proceso de Extracción:** La fibra recubierta por un solvente, se encuentra inicialmente dentro del a aguja de la jeringa montado en un soporte especial, quien al inyectarse, ésta perfora el septo del frasco de muestra, exponiendo la fibra al espacio de cabeza o matriz del líquido entrando en contacto con la muestra, bajo tiempo y temperatura controlada.

  Dicha exposición, permite la migración de los analitos hacia el recubrimiento polimérico por procesos de absorción o adsorción (dependiendo de la naturaleza del recubrimiento) hasta alcanzar el equilibrio.

- **Proceso de Desorción:** En esta etapa, la aguja es insertada en el puerto de inyección del instrumento analítico, donde se retiran los analitos retenidos en la fibra por acción térmica (para CG) o la adición de un disolvente orgánico (para HPLC) según la técnica analítica de separación posteriormente a utilizar.

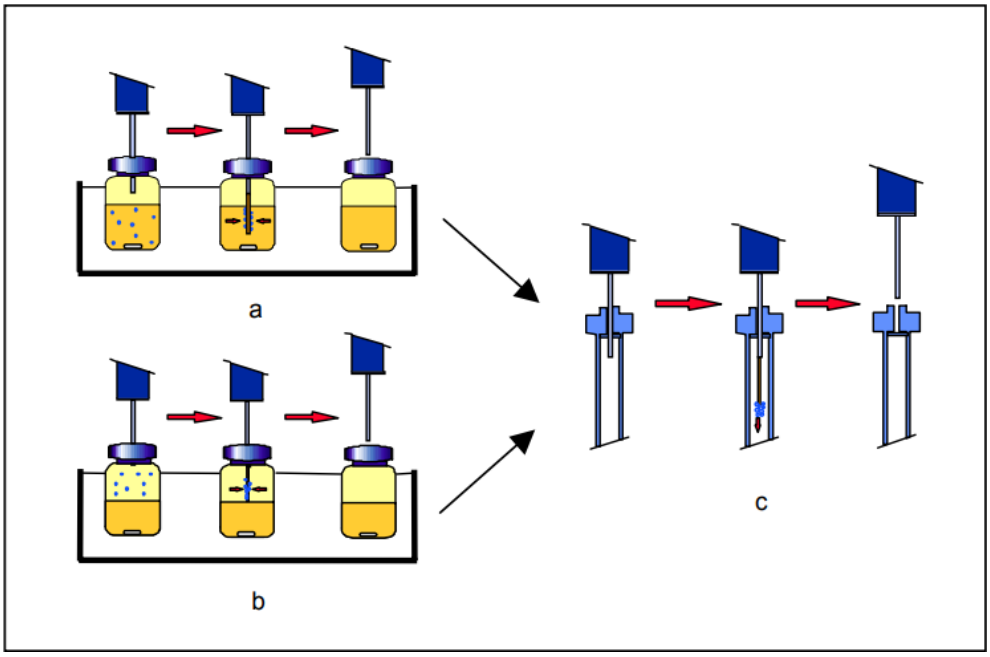


Figura 1-17: Esquema del proceso de SPME-GC: (a) inmersión directa; (b) HS-SPME; (c) desorción térmica en GC.

1.4.4.6. Fibras SPME.

Como se ha descrito con anterioridad, para la SPME se utiliza una fibra de sílice fundida, que se encuentra recubierta de una fase polimérica, resistente a altas temperaturas, de carácter químico inerte y de gran estabilidad. La categorización de las fibras varía dependiendo del tipo de la fase polimérica que la recubre y el proceso de extracción que utilizan.

La fibra PDMS es utilizada comúnmente en extracciones de analitos apolares y éstas pueden combinarse con otros polímeros, permitiendo ampliar la extracción de analitos diferentes. Es por esto que podemos encontrar fibras de polidimetilsiloxano y divinilbenceno (PDMS/DVB) o polidimetilsiloxano y Carboxen (PDMS/CAR). [17]

La fibra PDMS/DVB consiste en una mezcla del PDMS líquido y el DVB poroso sólido, que es principalmente mesoporoso, es decir, que cuenta con algunos macro y microporos en su estructura. Dichos poros de las partículas del polímero permiten retener de forma física los analitos, causando una alta retención de los analitos quienes cuenten con el tamaño adecuado de encaje. Cabe destacar que esta mezcla de polímeros además permite mantener analitos de menor tamaño como analitos de cierta polaridad.

La fibra PDMS/CAR es el resultado de la mezcla entre las partículas porosas sólidas del Carboxen y la fase polimérica líquida de PDMS, cuyo tamaño de poros es de menor diámetro y mayor especificidad ante ciertos compuestos, ideal para el análisis SPME de moléculas que oscilan el rango de 2 a 12 carbonos. Las moléculas que poseen un mayor número de átomos de carbonos (<12), presentan una fuerte retención en la superficie de la partícula porosa de la fibra. Esto aumenta su dificultad al momento de desorbitar, en cambio, los analitos pequeños son desorbidos rápidamente al entrar y salir del poro.

Adicionalmente existen otras fibras, resultantes de la mezcla de los polímeros PDMS, DVB y CAR anteriormente mencionados (PDMS/CAR/DVB). Junto a estos, se añaden otras posibles combinaciones gracias a los polímeros Carbowax (CW) y Templated resin (TPR), proporcionando nuevas cualidades al momento de seleccionar la fibra SPME. Los tipos de fibra más comunes pueden observarse en la siguiente tabla:

Tabla 1-3: Tipos de fibra comercializados para su uso en SPME. [4]

Sorbente de la fibra	Espesor de la capa (μm)	Polaridad	Descripción de la fase	Máxima Temp. de trabajo (ºC)	Técnica	Compuestos a analizar
PDMS	100	No polar	No enlazada	280	CG/HPLC	Volátiles
PDMS	30	No polar	No enlazada	280	CG/HPLC	No polares - semivolátiles
PDMS	7	No polar	Enlazada	340	CG/HPLC	Poco polares - semivolátiles
PDMS-DVB	65	Bipolar	Entrelazada	270	CG	Polares volátiles
PDMS-DVB	60	Bipolar	Entrelazada	270	HPLC	General
PDMS-DVB[a]	65	Bipolar	Entrelazada	270	CG	Polares-volátiles
PA	85	Polar	Entrelazada	320	CG/HPLC	Polares-semivolátiles
Carboxen-PDMS	75	Bipolar	Entrelazada	320	CG	Gases y volátiles

Carboxen-PDMS[a]	85	Bipolar	Entrelazada	320	CG	Gases y volátiles
Carbowax-DVB	65	Polar	Entrelazada	265	CG	Polares
Carbowax-DVB[a]	70	Polar	Entrelazada	265	CG	Polares
Carbowax-TPR	50	Polar	Entrelazada	240	HPLC	Tensioactivos
DVB-PDMS-Carboxen	50/30	Bipolar	Entrelazada	270	CG	Volátiles

1.4.4.7. Selección de la Fibra.

El proceso de microextracción se debe en gran parte a la selectividad del revestimiento polimérico de la fibra que entrará en contacto con el analito. Es por esto que, para garantizar el éxito de los procesos de extracción y desorción del analito en la fibra, es necesario considerar los siguientes factores:

- Peso molecular y tamaño del analito.
- Punto de ebullición y presión de vapor del analito.
- Polaridad del analito y de la fibra.
- Grupos funcionales sobre analitos y fibras.
- Rango de concentración y tipo de detector utilizado.
- Espesor de la película de la fibra.
- Polaridad de la fase polimérica.
- Porosidad de la partícula del polímero.
- Capacidad de muestra de la fibra.
- Tiempos de extracción/desorción.

1.4.4.8. Otras variables en proceso de microextracción.

En la microextracción en fase sólida existen diversos parámetros que permiten la optimización del proceso de extracción del analito. Además del método de extracción (HS o DI) y el volumen de muestra, se deben considerar los factores de temperatura de extracción, tiempo de extracción, fuerza iónica, pH y agitación de la muestra durante la etapa de equilibrio.

- **Temperatura de extracción:** La temperatura durante el proceso de extracción del analito debe permanecer siempre constante, independiente del valor aplicado. Esto puede conllevar a tener efectos negativos y/o positivos en la eficiencia de la transición del equilibrio.

  Para el modo de extracción HS, el aumento de la temperatura conlleva una elevación de la actividad química y su cinética, ocasionando un aumento en el coeficiente de difusión de los analitos. En consecuencia, existe una reducción del tiempo de equilibrio y aumento de velocidad del proceso de extracción, como a su vez, una disminución del coeficiente de distribución entre la fibra y la muestra. Por parte del modo de extracción DI, no es necesaria la aplicación de temperatura a la muestra durante el proceso, a excepción de compuestos semi y no volátiles con un alto punto de ebullición.

- **Tiempo de extracción:** El tiempo es un parámetro importante para el proceso de adsorción/desorción. La interacción analito/fibra posee un tiempo de equilibrio determinado que define la constancia de la cantidad de analito extraído.

  Cabe destacar que el tiempo de equilibrio es inversamente proporcional al coeficiente de difusión. Sin embargo, algunas veces el tiempo de equilibrio puede ser bastante largo, por lo que se opta por trabajar en condiciones de no equilibrio.

En estos casos, el tiempo de extracción se debe controlar de manera estricta, evitando oscilaciones en la medida del tiempo que impliquen variaciones significativas en la cantidad de analito extraído. [13]

- **Fuerza Iónica:** La presencia de elevados contenidos de sales inorgánicas reduce la solubilidad de sustancias hidrófobas en las disoluciones acuosas, proceso conocido como efecto "salting-out". Al ser menos solubles, el proceso de volatilización se ve favorecido, implicando la minimización de la variabilidad de la fuerza iónica de la muestra y el aumento previsible del contenido de los analitos en el proceso de extracción HS, garantizando una mayor reproducibilidad del método.

  En algunas aplicaciones, la adición de la sal puede; disminuir la solubilidad de algunos analitos, reducir la cantidad de analito extraído (analitos altamente polares) y la coextracción de interferencias provenientes de la matriz por sobre los compuestos deseables.

- **pH:** La variabilidad del efecto del pH en la microextracción depende del tipo de compuesto. Como referencia, "los clorofenoles con elevado valor de pKa no presentaron un cambio significativo en la cantidad absorbida cuando se bajó el pH a 2.5. Sin embargo, para compuestos con valores de pKa entre 4.7 y 7, la disminución del pH produjo un aumento considerable de sus respuestas. Por tanto, los analitos deben estar en forma neutra para su extracción." [33]

- **Agitación de la muestra:** Existe una variedad de métodos de agitación, que permiten una serie de ventajas: Homogeneización de la muestra, mayor precisión de extracción, reducción del tiempo de equilibrio y un aumento del coeficiente de difusión de los analitos (ideal para analitos de elevado peso molecular o de coeficiente de difusión demasiado bajo). Los tipos de agitación, junto a sus ventajas y desventajas pueden observarse en la tabla 1-4. [17]

Tabla 1-4: Ventajas y desventajas de diferentes métodos de agitación.

Método de agitación	Ventajas	Desventajas
Agitación magnética	● Sin equipos sofisticados	● La placa de agitación puede causar que el frasco se sobrecaliente. ● La barra agitadora debe insertarse en la muestra.
Vibración de la aguja	● Útil para el análisis de trazas	● Esfuerzo excesivo en La aguja ● Aplicable sólo a volúmenes de muestra relativamente pequeños
Agitación de vórtice	● Útil para el análisis de trazas ● La limitación del volumen de muestras pequeñas no se aplica.	

1.4.5. Proceso de desorción SPME en Cromatógrafo de Gases.

El proceso inicia al realizar la perforación del septum y la entrada de la fibra en la cavidad del inyector del cromatógrafo de gases. Este acople entre SPME y el cromatógrafo de gases, permite la desorción térmica de los analitos, donde el aumento de la temperatura disminuye la afinidad de los compuestos extraídos (que se encuentran alojados en la fibra), permitiendo su liberación e introducción en la columna analítica gracias al flujo del gas portador. Su principio está definido bajo la siguiente ecuación (8), donde se puede observar la disminución lineal de los coeficientes de partición al presenciar un aumento de la temperatura:

$$logK_{fs} = a\left(\frac{1}{T}\right) + b \qquad (8)$$

Donde K_{fs} es el coeficiente de partición entre la fibra y la muestra, “a” y “b” son constantes y T es la temperatura.

El diámetro del inserto del inyector (liner) es un factor considerable al momento de seleccionar la fibra, puesto que la similitud en el diámetro nos otorga una superficie de contacto homogénea. Esto permite asegurar una rápida transferencia de los analitos. Los inyectores con modalidad Split/Splitless e Inyectores de temperatura programada (PTV), poseen una válvula de división de flujo (Split valve) que durante el transcurso de la desorción térmica debe permanecer cerrada con tal de garantizar que la totalidad de los analitos sean introducidos en la columna cromatográfica. [32]

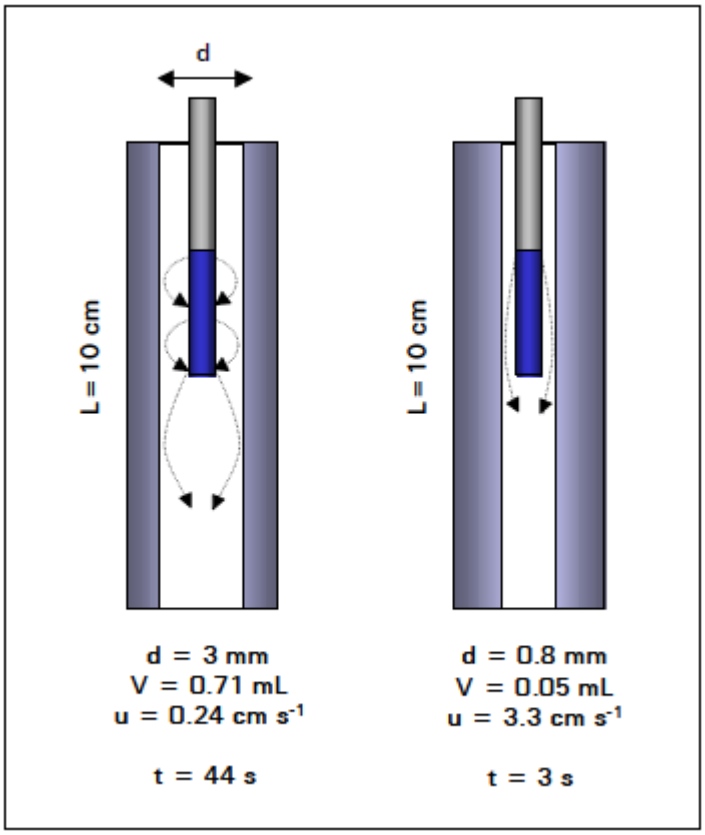


Figura 1-18: Efecto del volumen de inserto en desorción térmica en cromatografía de gases.

Cabe mencionar que la desorción térmica proporcionada por la cromatografía de gases es la modalidad más rápida y sencilla de desorber analitos de la fibra polimérica.

En compuestos térmicamente inestables o de baja volatilidad, se recomienda la desorción por solvente orgánico y la técnica de análisis por HPLC.

CAPÍTULO II: APLICACIÓN METODOLÓGICA

2. Metodología.

2.1. Fundamento del método.

Como ya se ha descrito con anterioridad, la SPME consiste en una técnica de preconcentracion ampliamente utilizada, basada en la interacción y la diferente afinidad del analito entre una fase solida (fibra) y una liquida (muestra). Para el caso particular, se presume trabajar con la modalidad HS, cuya afinidad de la fibra se dará con la fracción gaseosa de la muestra de aceite de eucalipto, permitiendo extraer los analitos volátiles originados de la matriz y posteriormente su desorción en el cromatógrafo GC/MS.

2.2. Materiales y Equipos.

A) Equipos:

- Cromatógrafo: GC-MS modelo Agilent 7890, con detector MS
- Columna cromatográfica capilar RTX-35 SLMS, 30m de longitud, 0.25mm de diámetro interno, de 0.50µm de espesor [12]
- Balanza analítica Sartorius, modelo ED244S
- Agitador magnético con placa calefactora DLAB, modelo MS-H-Pro+

B) Materiales

- Jeringa de micro extracción de fase sólida, SUPELCO
- Fibra SPME, SUPELCO: PDMS (100 µm espesor)
- Vial de vidrio de 10 mL
- Termómetro
- Pipeta aforada de 5mL
- Sellador de frascos, Fermpress H207 PE
- Sellos de aluminio

- Septum de goma
- Cronometro
- Parafina

2.3. Procedimiento.

A) Preparación de la muestra:

- Pesar en balanza analítica un volumen aproximado de 1 gramo de muestra en un frasco de vidrio.
- Cubrir el frasco con sello y septum de goma.
- Sellar y añadir parafina para garantizar que esté herméticamente cerrado.

B) Extracción:

- Calentar vial en un baño maría con agua caliente a 40°C durante 20 minutos, sobre placa calefactora y soportes correspondientes.
- Perforar el septum e insertar suavemente la jeringa.
- Empujar el pistón y dejar la fibra en contacto con la fracción volátil durante 10 minutos adicionales.
- Posteriormente, retraer aguja y retirar cuidadosamente la jeringa del frasco.

El aumento de la temperatura conlleva una elevación de la actividad y cinética química, ocasionando un aumento en el coeficiente de difusión de los analitos. Considerando que el vial permanece cerrado y que la mayoría de los componentes que constituyen el aceite de Eucalipto son moléculas de 10 a 15 carbonos, al aplicar una temperatura constante (40°C durante 20min), la presión de vapor del líquido aumenta y la volatilidad de la muestra es mayor. Como el tiempo de equilibrio es inversamente proporcional al coeficiente de difusión del analito/fibra y el aceite de eucalipto posee una baja densidad (0,866 g/mL), se estima que el

tiempo y la temperatura designada garantizarían alcanzar el equilibrio. Sin embargo el tiempo aun así deberá ser controlado, evitando oscilaciones en la medida del tiempo que impliquen variaciones significativas en la cantidad de analito extraído y la replicación del método.

La fibra polimérica PDMS es idónea para este tipo de microextraccion basándonos en la tabla N° X (tipos de fibra), ya que cumple con las condiciones de trabajar de forma efectiva con componentes volátiles de masa entre 60-275 uma y de carácter no polar.

C) Inyección en el cromatógrafo:

- Insertar la jeringa en la cámara de inyección del cromatógrafo GC-MS.
- Empujar el pistón permitiendo el contacto entre la fibra y el flujo del gas portador al interior del equipo. Proceso de desorción de 5 minutos en modalidad Splitless.

El inyector atomiza instantáneamente la muestra introducida. El tiempo de desorción designado de 5 minutos se debe a que, la alta temperatura presente en el inyector permite una disminución de los coeficientes de partición presentes entre el analito y la fibra (ver ecuación 8). Esto garantizaría el arrastre completo del analito extraído por parte del gas portador hacia el interior de la columna.

2.4. Condiciones cromatográficas

Tabla 2-5: Condiciones cromatográficas estimativas.

Inyector	Temperatura	220 °C
	Modo SPLITLESS	5 min
	Septum purge flow	1 mL/min
Horno	Temperatura inicial	40 °C
	Velocidad de calentamiento	5°C/min
	Temperatura final	230 °C
	Tiempo programa	30min.
	Columna capilar	RTX-35 SLMS (30m; 0.25mm; 0.5µm)
	He flujo	1mL/min
	Fase estacionaria	Crossbond diphenyl dimethyl polysiloxane
Detector MS	Temperatura línea transferencia	200 °C
	Temperatura de la fuente	230 °C
	Rango de masas	50-550 uma
	Temperatura cuadrupolo	150 °C
	Biblioteca	Nist 2011

Al tratarse de una muestra liquida oleosa, la técnica SPME-HS pretende la preconcentración de la fase volátil de la muestra. Por consecuencia, la cantidad de los analitos obtenidos será baja en comparación a una muestra por inmersión directa. Es por esto, que la modalidad Splitless es acorde al proceso de análisis de la muestra capturada por la fibra, ya que permite introducir cerca del 95% del analito en la columna cromatográfica para su posterior separación.

Se ha seleccionado la columna RTX-35 SLMS (RESTEK), cuya descripción del fabricante, es ideal para propósitos generales, pesticidas organoclorados, PCB, herbicidas, farmacéuticos y esteroles, además de presentar una fase estacionaria de polaridad media. Donde además se garantiza que su mayor contenido de fenilo

provoca cambios útiles en el orden de elución y el tiempo de retención, permitiendo mejores lecturas en el cromatograma. Las temperaturas iniciales y finales del horno son acorde al rango de trabajo de la columna.

El detector MS acoplado cromatógrafo GC/MS, utilizado en el laboratorio de química de la Universidad Federico Santa María, sede Viña del Mar, cuenta con software apropiado que incluye la biblioteca Nist del año 2011. Esto permite la identificación y caracterización de compuestos, por medio de espectros de masa referenciales.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y ANÁLISIS

3. Resultados

Debido a la dificultad en realizar la parte práctica del trabajo debido a la pandemia mundial, se instó a buscar más información relevante que complemente los resultados esperados en el proceso de detección de la muestra problema de aceite esencial de eucalipto. Para esto se utilizarán cromatogramas encontrados en catálogos (en este caso, bibliografía proporcionada por RESTEK) y otros trabajos investigativos sin perjuicio de existir más estudios, sólo citando aquellos que se consideren más pertinentes o relevantes para la investigación.

3.1. Resultados cromatográficos en determinación aceite esencial de eucalipto, catálogo RESTEK, columna Rtx-Wax. GC con detector FID. [21]

Column	Rtx-Wax, 30 m, 0.32 mm ID, 0.25 µm (cat.# 12424)
Sample	Eucalyptus oil
Diluent:	Acetone
Conc.:	5%
Injection	
Inj. Vol.:	1 µL split (split ratio 100:1)
Liner:	Topaz 4.0 mm ID Precision inlet liner w/wool (cat.# 23305)
Inj. Temp.:	230 °C
Oven	
Oven Temp.:	100 °C (hold 0.5 min) to 250 °C at 16 °C/min (hold 10 min)
Carrier Gas	H_2, constant flow
Flow Rate:	2 mL/min
Detector	FID @ 250 °C
Constant Column + Constant Make-up:	52 mL/min
Make-up Gas Type:	N_2
Hydrogen flow:	40 mL/min
Air flow:	400 mL/min
Data Rate:	50 Hz
Instrument	Agilent 7890A GC
Notes	All peaks were identified using the NIST MS EI spectra library (2005).

Figura 3-19: Condiciones cromatográficas, catalogo RESTEK, columna Rtx-Wax [21]

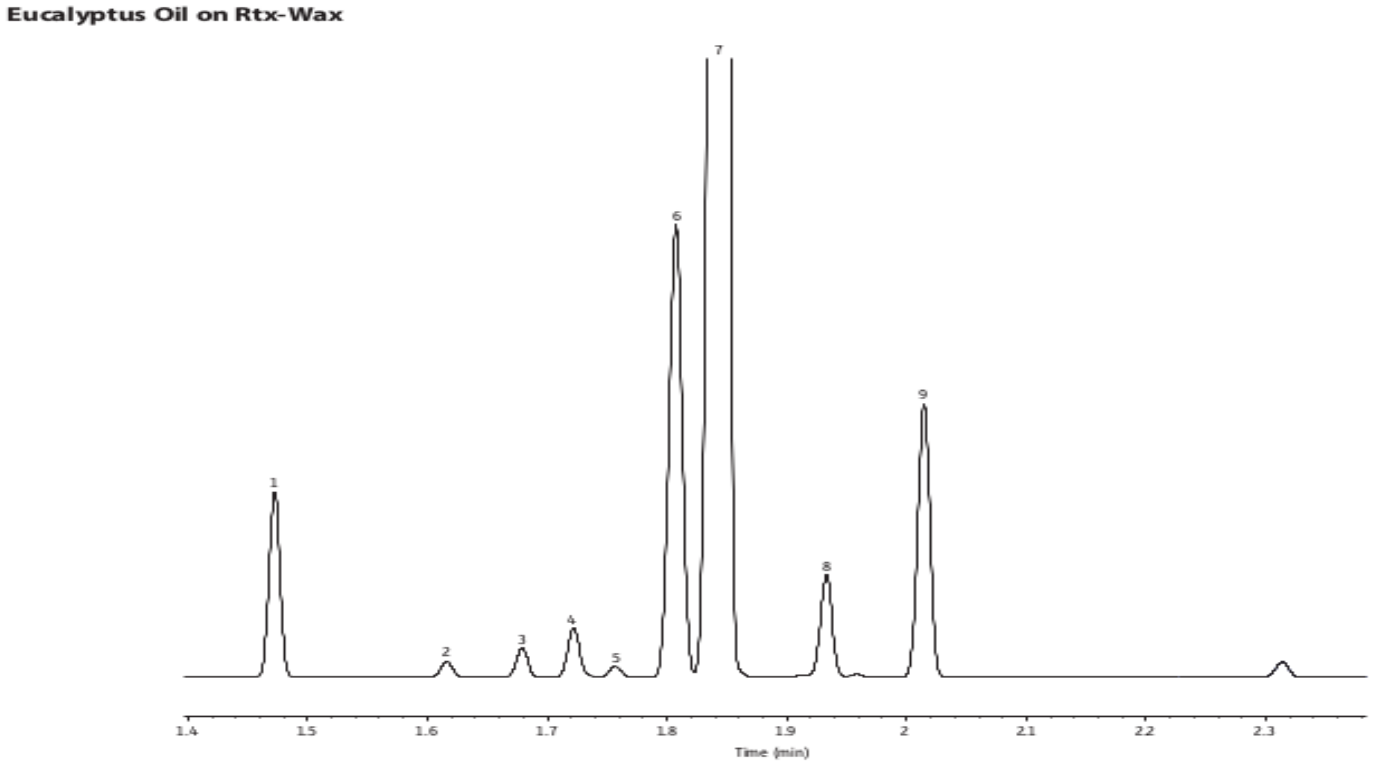


Figura 3-20: Cromatograma aceite de eucalipto en columna Rtx-Wax, proporcionado por catálogo RESTEK. [21]

Peaks	t_R (min)
1. α-Pinene	1.472
2. β-Pinene	1.616
3. β-Myrcene	1.679
4. α-Phellandrene	1.722
5. Terpinolene	1.757
6. D-Limonene	1.807
7. Eucalyptol	1.846
8. γ-Terpinene	1.933
9. *o*-Cymene	2.014

Figura 3-21: Identificación de compuestos proporcionados por biblioteca NIST MS 2005, picos y tiempos de retención. [21]

3.2. Resultados cromatográficos en determinación de aceite esencial de eucalipto, "Chemical Evaluation of Volatile Oils in Eucalyptus Species". Cromatografía GLC y GC/MS. [10]

"Se utilizó un cromatógrafo GC/MS modelo Hewlett-Packard 5986 equipado con una columna capilar WCOT OV-101 0.31 mm(i.d.) x 25m, directamente acoplado a la fuente de iones del MS. Las condiciones iónicas del MS fueron de 200 °C a 35eV. La identificación de compuestos fue basada en espectros publicados, comparándolos con compuestos de referencias y su interpretación del MS por patrones fragmentados". [10]

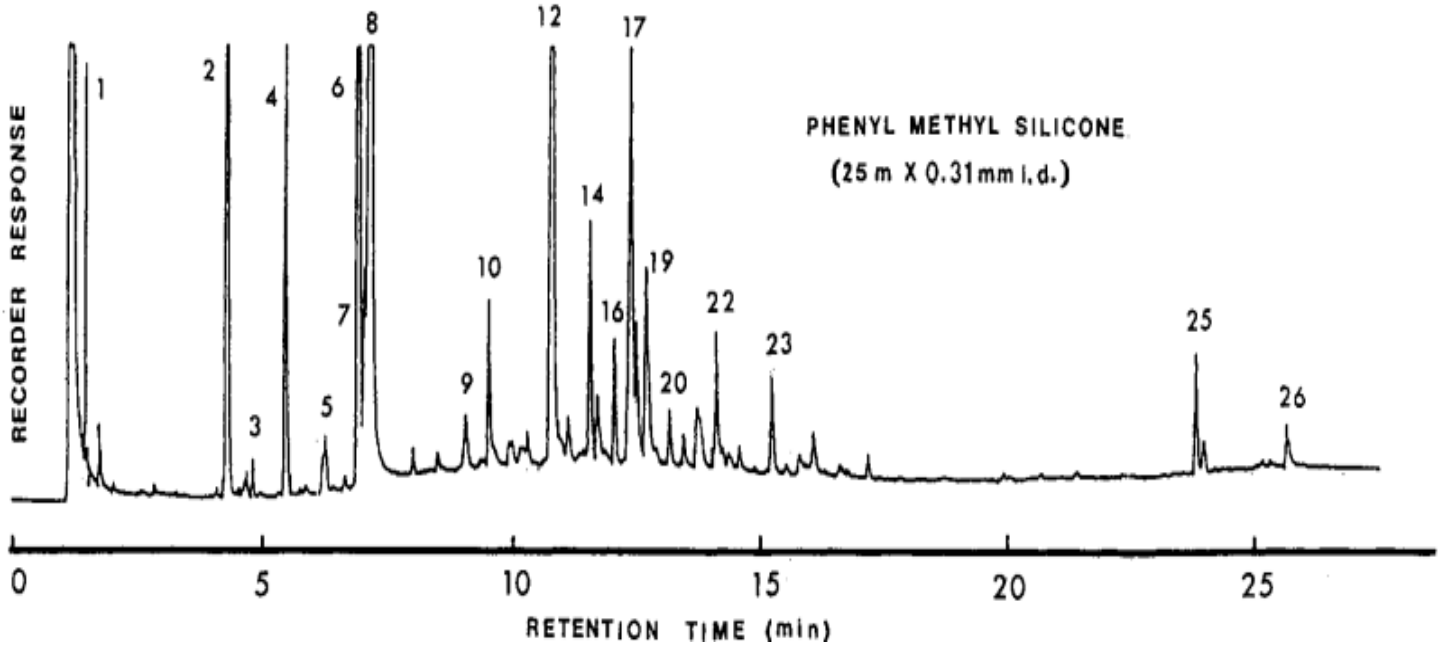


Figura 3-22: Cromatograma GLC aceite hoja de eucalipto (Eucalyptus globulus), [10]

peak	compound
1	3-methylbutanal[a,c]
2	α-thujene[a,b]
3	α-pinene[a–c]
4	camphene[a,b]
5	β-pinene[a,b]
6	β-myrcene[a]
7	α-phellandrene[a]
8	α-terpinene[a]
9	*d*-limonene[a,b]
10	1,8-cineole[a–d]
11	γ-terpinene
12	octan-1-ol[e]
14	linalool[a]
15	fenchol[a]
19	*trans*-pinocarveol[e]
21	borneol[a]
22	terpin-4-ol[e]
23	isomenthol[e]
24	β-terpineol[a,b]
29	*trans*-caryophyllene[a,c]
30	δ-gurjunene[e]
31	aromadendrene[a–d]
32	alloaromadendrene[e]
35	eremophilene[e]
39	globulol[a–c]

Figura 3-23: Identificación de compuestos, basado en compuestos de referencia. [10]

3.3. Resultados cromatográficos en determinación de aceite esencial de eucalipto, "Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistillated extract of Eucalyptus globulus fruits". Cromatografía GC/MS. [18]

"Se utilizó un Cromatógrafo de gases TRACE Ultra acoplado a un espectrometro de masas ISQ (ThermoScientific, Austin, Texas, EE. UU.), conectado a una computadora que ejecuta el software Xcalibur 2.0 (ThermoScientific, Austin, Texas, EE. UU.). El instrumento de GC equipado con una columna capilar DB – 5 ms (60 m × 0,25 mm de d.i., 0,25 m de espesor de película, Agilent J & W, Santa Clara, CA, EE. UU.). El análisis se realizó utilizando helio (pureza> 99,99% vol.) como gas portador a 1,2 mL/min. La temperatura del horno de GC se mantuvo a 40 ° C durante 2 min, luego se incrementó a 250 ° C a 5 ° C/min y a 300 ° C a 30 ° C/min y se mantuvo a esta temperatura durante 10 min. Se inyectó 1 µL de muestra diluida (en Acetona 1: 100, v / v) a una temperatura constante de 250 ° C mediante un inyector Split (1:20 durante 1 min). El rango de exploración estaba entre 40 y 650 uma. Los picos en los perfiles de cromatogramas de iones totales se identificaron tentativamente al hacer coincidir sus datos de espectros de masas con la biblioteca de espectros de masas de NIST / EPA / NIH y se confirmaron mediante comparación con el índice de Kovat en la columna DB-5 ms. La concentración de los compuestos identificados, expresada como porcentaje, se calculó directamente a partir de las áreas de los picos sin corrección del factor de respuesta FID". [18]

Tabla 3-6: Composición química de extractos de aceites esenciales de frutos de E. globulus. [18]

Compounds	KI	Composition (%)
Monoterpenes (M)		
α-pinene	920	3.8
β-pinene	1122	0.1
β-myrcene	990	0.2
α-phellandrene	1024	1.9
α-terpinene	1015	0.2
O-cymene	1026	0.5
γ-Terpinene	1065	0.2
Limonene	1035	0.3
Total (M)		**7.3**
Oxygenatedmonoterpenes (OM)		
Eucalyptol (1,8-cineole)	**1033**	**19.8**
Isovaleraldehyde	660	2.4
2-pentanone-4-hydroxy-4- methyl	837	0.9
4-terpineol	1181	0.4
α-Terpineol	1196	0.2
Cis-Sabinol	1043	0.1
Carvenone	1250	0.1
Total (OM)		**23.7**
TOTAL (M + OM)		**31.2**
Sesquiterpenes (S)		
β-gurjunene	1430	0.4
β-humulene	1440	0.2
α-gurjunene	1409	1.4
Aromadendrene	**1462**	**19.7**
Allo-Aromadendrene	1440	2.5
γ-gurjunene	1473	0.5
Ledene	1031	3.1
β-Selinene	1480	0.2
δ-cadinene	1510	0.7
Total (S)		**28.9**
Oxygenated Sesquiterpenes (OS)		
Epiglobulol	1561	6.4
Globulol	**1589**	**23.6**
Eudesmol	1626	2.1
δ-cadinol	1640	0.2
Total (OS)		**32.3**
Total (S + OS)		**61.2**
TOTAL		**92.3**

*KI: los compuestos se identificaron tentativamente por comparación con los datos de los espectros de masas (MS) obtenido de la biblioteca NIST / EPA / NIH y confirmado por comparación con Kovat índice en la columna DB-5MS.

3.4. Resultados cromatográficos en determinación de aceite esencial de eucalipto, "A Comparative Study of the Chemical Composition of the Essential oil from Eucalyptus globulus Growing in Dehradun (india) and Around the World". Cromatografía GC/MS. [2]

"El aceite esencial de hojas de Eucalyptus globulus se analizó en GC-MS QP-2010 Plus (Shimadzu Company) usando una columna HP-5 MS (30 mx 0,25 mm de diámetro interno x 0,25 ìm de espesor de película) que fue recubierta con 5% de fenilo 95% metil polisiloxano estacionario. La jeringa se lavó con 8 µl de cloroformo y se inyectaron 2 µl de solución de aceite esencial en cloroformo a través de un muestreador automático y se analizaron con una columna HP5 MS. La temperatura de la columna se programó de la siguiente manera: 50 a 120 ° C a 20, 120 a 150 ° C a 4 ° C/min, 150 a 250 ° C a 20 °C/min (10 min de tiempo de espera) y 3,5 min de retraso del disolvente. La temperatura del inyector se fijó en 260 ° C y el detector (FID) en 270 ° C. El gas portador fue helio (1 ml/min) con 69,8 kPa y una relación de Split de 100: 1. La temperatura de la interfaz fue de 280 ° C. Los espectros de masas se registraron en modo de ionización electrónica a 70 eV con barrido de 40 a 600 m/z a 0,5 sy la temperatura de la fuente de iones se fijó en 230 ° C. El porcentaje de cada constituyente en el aceite se determinó en base a las áreas de los picos de GC. Los constituyentes del aceite esencial se identificaron por su índice de retención, buscado en la biblioteca MS (bibliotecas NIST 08 y WILEY 8) y por comparación con los datos de espectros e índices de retención en la literatura."[2]

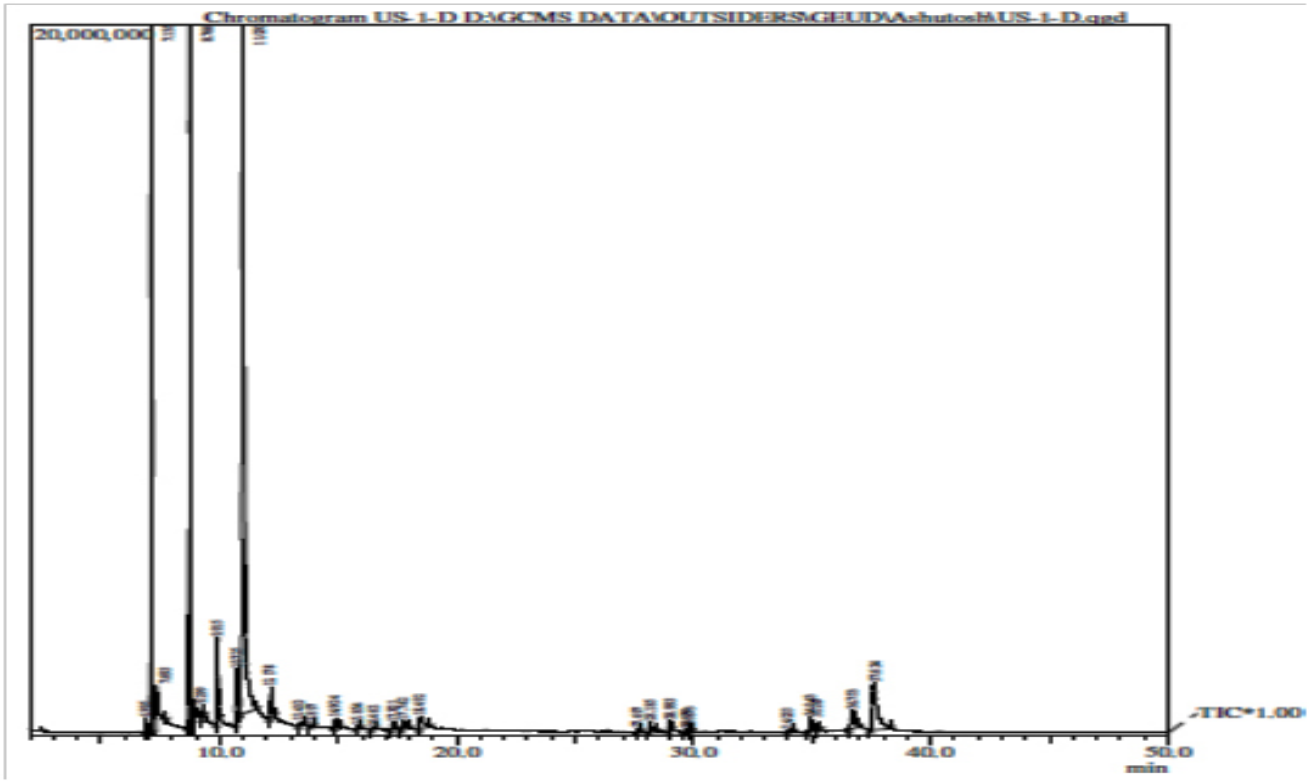
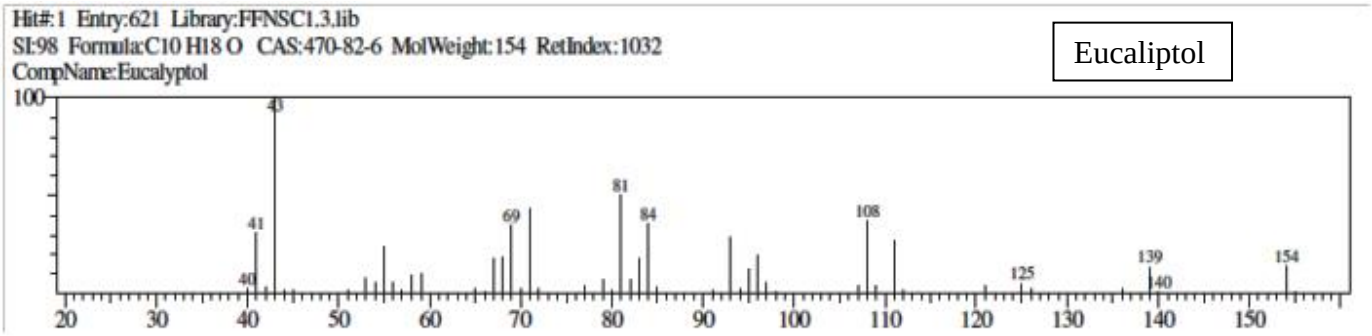
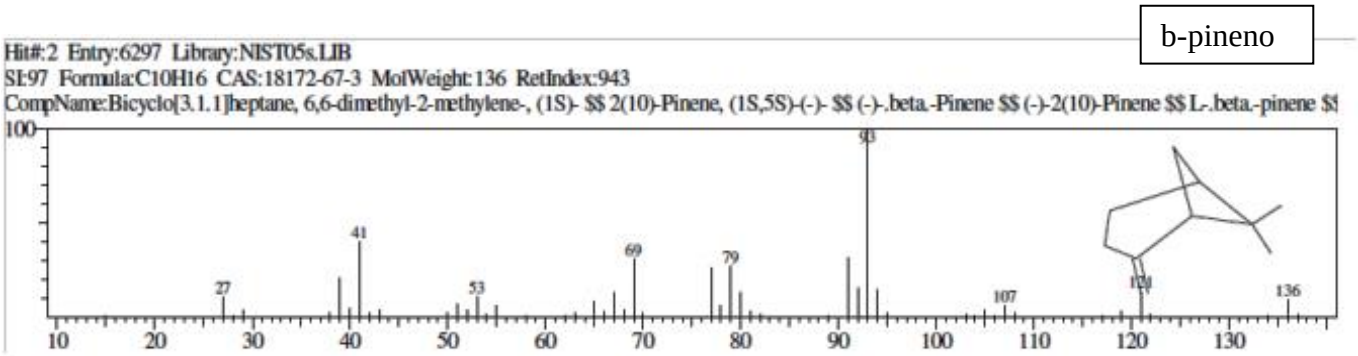


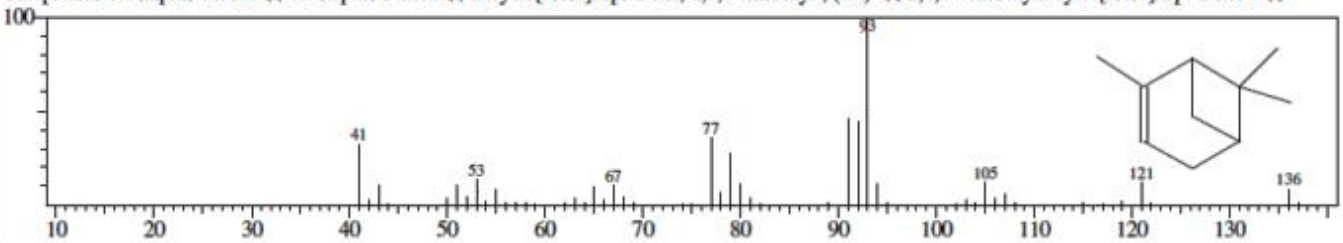
Figura 3-24: cromatograma GC-MS de aceite esencial Eucalyptus globulus.





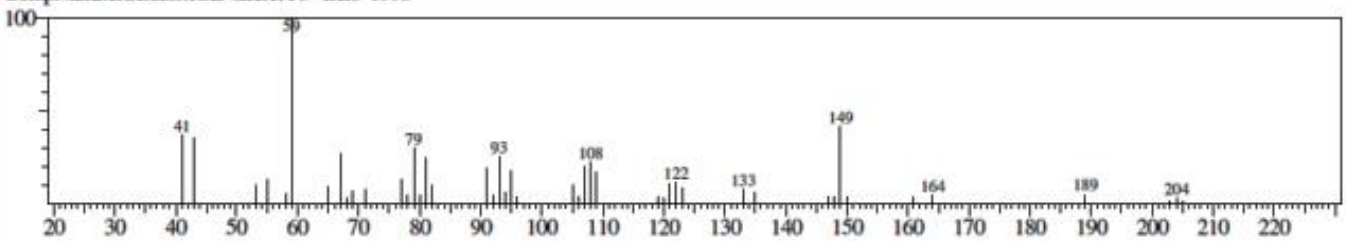
α-pineno

Hit#:23 Entry:6317 Library:NIST05s.LIB
SI:88 Formula:C10H16 CAS:7785-70-8 MolWeight:136 RetIndex:948
CompName:1R-.alpha.-Pinene $$ 1R-.alpha.-Pinene $$ Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-, (1R)- $$ 2,6,6-Trimethylbicyclo[3.1.1]hept-2-ene # $$



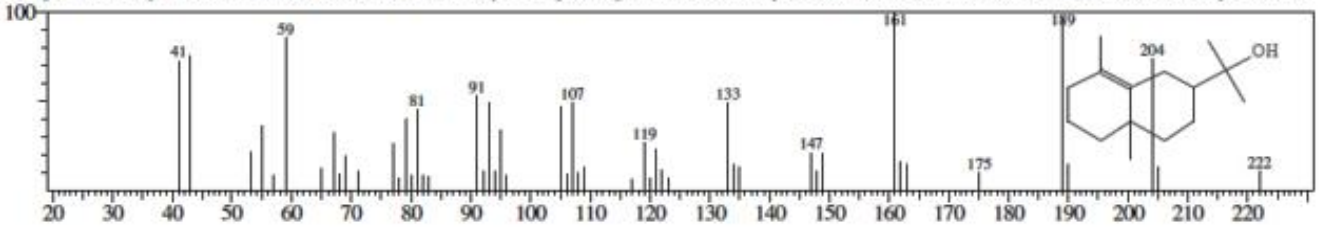
b-eudesmol

Hit#:2 Entry:71 Library:SZTERP.LIB
SI:91 Formula:C15 H26 O CAS:0-00-0 MolWeight:222 RetIndex:0
CompName:EUDESMOL <BETA-> DB5-1993



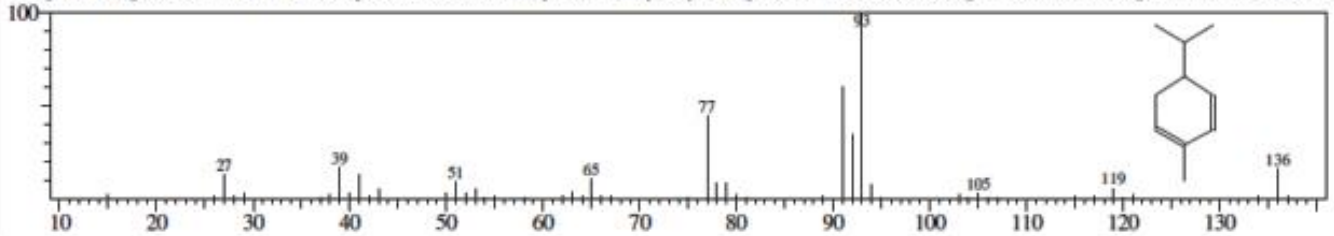
γ-eudesmol

Hit#:2 Entry:18679 Library:NIST05s.LIB
SI:95 Formula:C15H26O CAS:1209-71-8 MolWeight:222 RetIndex:1626
CompName:2-Naphthalenemethanol, 1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydro-.alpha.,.alpha.,4a,8-tetramethyl-, (2R-cis)- $$ .gamma.-Eudesmol $$ 2-(4a,8-Dimethyl-1,2,3,4,4



α-felandreno

Hit#:3 Entry:6312 Library:NIST05s.LIB
SI:95 Formula:C10H16 CAS:99-83-2 MolWeight:136 RetIndex:969
CompName:.alpha.-Phellandrene $$ 1,3-Cyclohexadiene, 2-methyl-5-(1-methylethyl)- $$ p-Menthadiene ((-)-) $$ .alpha.-Fellandrene $$ p-Mentha-1,5-diene $$



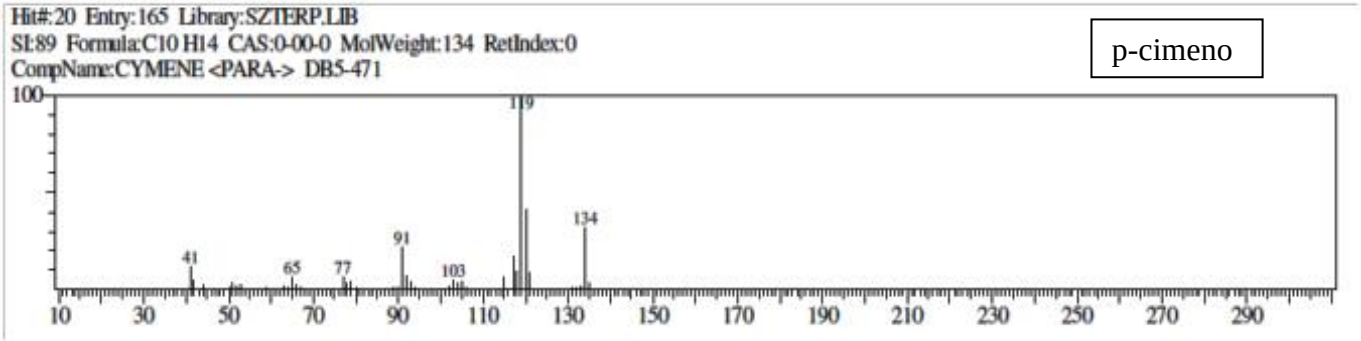


Figura 3-25: Espectros de masas (m/z) de los principales componentes presentes en aceite esencial de Eucaliptus globulus.[2]

Discusión

La microextracción en fase solida es una técnica ampliamente respaldada por la literatura y abalada en diversos trabajos de distinta índole asociada a cromatografía. Se sabe que es una técnica que funciona perfectamente para la extracción de compuestos de forma eficiente, pero pese a su sencillez en su ejecución, requiere de un control exhaustivo de sus diversos parámetros para garantizar su reproducibilidad. Esto, aplica esencialmente al trabajar con SPME-HS.

En contraste a los resultados seleccionados, estos carecen en su metodología la aplicación de la SPME-HS para la preconcentración de la muestra. En su defecto, éstos fueron seleccionados debido a que la técnica de análisis principal se basa en la cromatografía GC acoplado a un detector de masas. Sin embargo, existen diferencias entre un resultado y otro en la configuración del inyector (principalmente trabajadas en modalidad Split), tipo de columna y configuración del horno.

La predominancia en los componentes proveniente de diversas fuentes de aceite de eucalipto (en su mayoría del *Eucalyptus globulus*) se rectifica que gran parte corresponden a monoterpenos y monoterpenos oxigenados de peso molecular similar. Es destacable que, el 1,8-cineol o Eucaliptol, es quien posee mayor concentración en la matriz oleosa, observable en los picos de mayor altura y los porcentajes de abundancia, seguido por otros monoterpenos como el α-pineno, b-pineno, b-eudesmol, γ-eudesmol, α-felandreno y p-cimeno. Se estima que de haber realizado un proceso de preconcentracion de la muestra por medio de la técnica de SPME-HS en uso de la fibra polimérica PDMS seleccionada, se obtendrían resultados cromatográficos más eficientes.

En la búsqueda de clarificar los monoterpenos que presentaron una concentración relevante, se indagó sobre material con finalidad terapéutica.

El α-pineno presenta usos como broncodilatador a bajos niveles de exposición, además de poseer capacidades antiinflamatorias, ser un antibiótico de amplio espectro y mostrar actividad como inhibidor de la colinesterasa [5][44].

El b-pineno ha demostrado tener eficacia similar al α-pineno como antibiótico y estar presente activamente en la farmacogénesis de canabinoides [8], como también haber reportes de actividades anticoagulantes, antitumorales, antimicrobiales, antioxidantes y antiinflamatorias [7][44].

Para el b-eudesmol se ha informado que es hepatoprotector contra la citotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono y galactosoamina en hepatocitos de rata en cultivo, posee la capacidad en ratones para estimular el vaciamiento gástrico y la motilidad intestinal mediante la inhibición de los receptores de dopamina D2 y serotonina 5-HT2 de una manera dependiente de la dosis, y varios informes adicionales documentan la eficacia en el cáncer, donde el β-eudesmol produjo apoptosis en cultivos de células de leucemia humana HL60, produciendo apoptosis a través de efectos sobre la señalización de JNK en las mitocondrias [8].

En un estudio del 2013, se estudiaron los isómeros del eudesmol, entre ellos el γ-eudesmol, concluyendo su son capacidad de reducir la proliferación celular e inducir la muerte de las células tumorales por vías de apoptosis mediadas por caspasa en células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano [24].

El α-felandreno no posee documentación que esclarezca su utilidad terapéutica, pero existen estudios que sugieren su potencialidad en actividades antimicrobianas, antidepresivas y anticancerígenas [8][34].

Finalmente para el p-cimeno, existen estudios asociados a la marihuana que informan propiedades antiinflamatorias y analgésicas [12], retraso en la sensación del dolor [25] y la capacidad de reducir significativamente el dolor y la inflamación al modular el sistema opioide [43].

Conclusiones

La cromatografía de gases es una herramienta poderosa en la identificación y caracterización de compuestos. Su eficiencia en el análisis de muestras, aumenta considerablemente con técnicas de tratamiento de previos más el detector a utilizar, permitiendo obtener mayor información con una alta precisión y en cortos plazos de tiempo.

La microextracción en fase sólida demuestra con evidencia, ser una técnica útil y versátil como método de separación selectiva en la preconcentración de analitos. Es eficaz si se tiene presente las características del analito, el tipo de fibra a escoger y los parámetros de medición. Posee ventajas como su fácil acople a equipos cromatográficos y la automatización. Con el transcurso del tiempo, se elaboran nuevas fibras que permiten abarcar mayor variedad de analitos, inclusive muestras biológicas.

Tanto para la cromatografía de gases con detector de masas y la microextracción en fase sólida, se presenta evidencia de contrapeso como metodologías completas en la caracterización de muestras complejas que, al trabajar de forma complementaria, entregan mejores resultados para la toma de decisiones del analista.

En razón a esta recopilación, es destacable la potencialidad que posee el aceite esencial de eucalipto gracias a los componentes que constituyen su matriz. Pese a que el enfoque de la industria chilena que trabaja con este tipo de árbol prioriza la materia prima y su pulpa, se sugiere dar énfasis en investigar en profundidad la capacidad terapéutica de sus compuestos y la elaboración de nuevos fármacos.

Bibliografía

1. "1,8-Cineol Protect Against Influenza-Virus-Induced Pneumonia in Mice" (Yun Li, Yanni Lai,Yao Wang, Ni Liu, Fengxue Zhang, and Peiping Xu) 2016.
2. "A Comparative Study of the Chemical Composition of the Essential oil from *Eucalyptus globulus* Growing in Dehradun (india) and Around the World"; archana joshi, ashutosh sharma, r.k.bachheti and D.P. Pandey. (2016)
3. "Aceite escencial" Wikipedia, the free encyclopedia. Internet: https://es.wikipedia.org/wiki/Aceite_esencial
4. "Acoplamiento microextracción en fasesólida-cromatografía", Universitat de Valencia, Departamento de Quimica Analitica, Consuelo Cháfer Pericas (2006). Internet: https://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/14940/chafer.pdf?sequence=1&isAllowed=y
5. "a-pineno" Wikipedia, the free encyclopedia. Internet: https://es.wikipedia.org/wiki/Alfa-pineno
6. "Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental", Universitat Rovira i Virgili, departament de química analítica i química orgànica, Alejandra m. Peñalver Hernando (2002). Internet: https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8988/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
7. "b-pineno" Wikipedia, the free encyclopedia. Internet: https://es.wikipedia.org/wiki/Beta-pineno
8. "Chapter Three - Cannabis Pharmacology: The Usual Suspects and a Few Promising Leads"; Ethan B.Russo, JahanMarcu, 2017. Internet: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1054358917300273
9. "Chemical Composition of Eucalyptus globulus Oils from the Montenegro Coast and East Coast of Spain"; J. C. Chalchat,J. L. Chabard,M. S. Gorunovic,V. Djermanovic &V. Bulatovic (1995).
10. "Chemical Evaluation of Volatile Oils in Eucalyptus Species", Allan F. M. Barton, Juhana Tjandra, and Peter G. Nicholas, 1989.

11. “Chile Forestal”, Corporación Nacional de la Madera, Informe Universidad Austral de Chile. Internet:https://www.uach.cl/externos/epicforce/pdf/otros_documentos/chile_forestal.pdf
12. “Cymene” Potbotics. Internet: https://www.potbotics.com/learn/terpenes/cymene
13. D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, Journal of Chromatography A 992 (2001) 243.
14. D. A. Skoog. Fundamentos de Química Analítica 9na ed. Mexico: Cengage Learning, 2014. pp. 599. ISBN: 978-0-495-55828-6
15. D. A. Skoog. Fundamentos de Química Analítica 9na ed. Mexico: Cengage Learning, 2014. pp. 802-809. ISBN: 978-0-495-55828-6
16. D. Christian, Gary. Química Analítica 6ta ed. México: McGraw-Hill, 2009. pp. 593-599. ISBN 978-970-10-7234-9
17. “Determinación de terpenos en plantas de cannabis por microextracción en fase solida (SPME-HS)”, Informe de práctica, Amélie Gelineau, Université de Lille/UTFSM, 2019.
18. “Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities ofhydrodistillated extract of Eucalyptus globulus fruits”, Zakia Bey-Ould Si Saida, Hayate Haddadi-Guemghara, 2016.
19. “Eucalyptol (1,8 cineole) from eucaliptus essential oil a potential inhibitor of COVID 19 corona virus infection by Molecular docking studies”(Arun Dev Sharma, Inderjeet Kaur), 2020.
20. “*Eucalyptus globulus”,* Farmacopea, MINSAL, Gobierno de Chile. Internet: https://www.minsal.cl/portal/url/item/7d98ad06d32f83d5e04001011f016dbb.pdf
21. “Eucalyptus Oil on Rtx-Wax”, Restek Searchable Chromatogram Library. Internet: https://www.restek.com/chromatogram/view/GC_FF1298/5989-27-5

22. *"Eucalyptus oil",* Productos MERCK. Internet: *https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w523402?lang=es&region=CL*
23. "Eucalyptusoil", Eucalyptus Oil Composition. Internet:http://www.eucalyptusoil.com/technical-information?id=54:what-is-eucalyptus-oil&catid=6
24. "Eudesmol isomers induce caspase-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells"; Diogo S Bomfim, Rosana P C Ferraz, 2013. Internet: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23786320/
25. "Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive properties of p-cymene in mice" Leonardo R Bonjardim 1 , Edisleide S Cunha, Adriana G Guimarães, Michele F Santana (2012). Internet: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22486037/
26. Euclid, Eucalypts of Australia, "*Eucalyptus globulus."* Internet:https://apps.lucidcentral.org/euclid/text/entities/eucalyptus_globulus_subsp._pseudoglobulus.htm?zoom_highlight=eucalyptus+globulus
27. Food and Drug Administration, department of health and human services, subchapter-d "drugs for human use" Title 21, Volume 5 (2019) Internet: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=310.545&SearchTerm=mercury
28. "GC-MS and HS-SPME-GC × GC-TOFMS Determination of the Volatile Composition of Essential Oils and Hydrosols (By-Products) from Four Eucalyptus Species Cultivated in Tuscany" (Francesca Ieri, Lorenzo Cecchi, Elena Giannini, Clarissa Clemente and Annalisa Romani) 2019.
29. "Limonene" Wikipedia, the free encyclopedia. Internet: https://en.wikipedia.org/wiki/Limonene
30. Lock, O. 1994. Investigación Fitoquímica, Métodos en el Estudio de ProductosNaturales. 2da Edición. Perú. 24-33, 300 P.

31. “Microextracción en fase solida : aplicaciones de interés farmacéutico”, Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, Marta Salamero Gil (2017). Internet:https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/64943/Microextracción%20en%20fase%20sólida..pdf?sequence=1

32. Microextracción en fase sólida, teoría y práctica, Pawliszyn, J. (1997).

33. M. N. Sarrión, F. J. santos, M. T. Galceran, Journal of Chromatography A 947 (2002) 155.
34. “Phellandrene” Wikipedia, the free encyclopedia. Internet: https://en.wikipedia.org/wiki/Phellandrene
35. Pacific Forest, Forest Comercializer, “*Eucalyptus globulus*”. Internet: http://woodexportchile.com/es/especies-madera/eucalyptus-globulus/
36. Pawliszyn, J. (2002). Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory (1.a ed.). Elsevier Science B. V.
37. Pawliszyn, J., Bayona, J. M., Dugo, P., Le, C. X., Lee, H. K., Li, X., & Lord, H. (2012). Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists (Vol. 1). Academic Press.
38. PÈREZ, Guillermo. “Espectrometria”. Internet: https://www.espectrometria.com

39. Restek – pure cromatography, RTX35 columns, catalog nro 10438. Internet: https://www.restek.com/catalog/view/1293

40. “Tablas de rendimiento en biomasa aérea en pie para plantaciones de *Eucalyptus globulus* en Chile”, Facultad de ciencias forestales, Universidad de Chile. Internet:http://www.gep.uchile.cl/Publicaciones/Tabla%20de%20rendimiento%20en%20biomasa%20aérea%20en%20pie%20para%20plantaciones%20de%20Eucalyptus%20globulus%20en%20Chile.pdf
41. “Taming THC: potential cannabis synergy and phytocannabinoid-terpenoid entourage effects” Ethan B Russo, 2011. Internet: https://bpspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1476-5381.2011.01238.x

42. Tema 5, Espectrometría de masas. (s.f.), Internet: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf

43. “The anti-hyperalgesic and anti-inflammatory profiles of p-cymene: Evidence for the involvement of opioid system and cytokines” Michele Fraga de Santana, Adriana Gibara Guimarães, Danielle Oliveira Chaves (2015). Internet: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25856703/

44. “Therapeutic Potential of α- and β-Pinene: A Miracle Gift of Nature”, PMC (US National Library of Medicine National Institutes of Health); Bahare Salehi, Shashi Upadhyay, Ilkay Erdogan Orhan, 2019. Internet: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6920849/