

**DETERMINACIÓN POR HS-SPME/CG-ECD, DE LOS COMPONENTES  
CARBONÍLICOS Y CARBOXÍLICOS VOLÁTILES PRESENTES EN EL SUDOR  
HUMANO.**

**MARTHA CERVANTES DÍAZ**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER,  
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA**

**Bucaramanga**

**2006**

**DETERMINACIÓN POR HS-SPME/CG-ECD, DE LOS COMPONENTES  
CARBONÍLICOS Y CARBOXÍLICOS VOLÁTILES PRESENTES EN EL SUDOR  
HUMANO.**

**MARTHA CERVANTES DÍAZ**

**Trabajo de investigación presentado como  
requisito parcial para optar al título de  
*Magíster en Química***

**Directora: Elena E. Stashenko,  
Química, Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER,  
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA**

**Bucaramanga**

**2006**

## DEDICATORIA

A mis tesoros Daniel David y Karen Elena  
A Luis Earles  
A Gabriela y Felipe  
A Yamile  
A Mis sobrinos especialmente a Angélica



## AGRADECIMIENTOS

Expreso mi infinito y profundo agradecimiento a la doctora Elena Stashenko, por su amistad, apoyo, colaboración y por animarme siempre a regresar y culminar esta etapa.

Jairo Rene, por su gran ayuda y aportes que fueron valiosos en la realización de este trabajo.

Al Laboratorio de Cromatografía – CIBIMOL- CENIVAM de la UIS.

A Luis Earles, mi mami y a mi hermana, por su colaboración, y apoyo incondicional.

A mi gran amiga Amanda Lucia, por todo lo que significa una gran amistad.

A Camilo, Víctor, Ciro, Emerson, Fabio, y José David por facilitarme sus pies ☺...

A Amner, Mónica, Albertico, José L. Ortiz, Jenny, Giovanna, Elkin, Adriana, Hans, Deyanira, William Salgar, y a todos los integrantes del Laboratorio de Cromatografía por su valiosa colaboración y porque con ellos es fácil reírse de la vida.

A mi amiga de siempre Yustina, una incondicional amistad.

A todos los buenos amigos que siempre están cuando más los necesitas sin importar el tiempo y la distancia: Pili, Alix, Sandrita, Elena, Germán, Fabiola, Elizabeth, Jesús, Martha Janeth, Edilberto.



## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1. MARCO TEÓRICO	6
1.1 SUDOR: GENERALIDADES	6
1.2 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	14
1.3 DERIVACIÓN QUÍMICA	21
1.4 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS	24
1.5 ALDEHÍDOS VOLÁTILES	28
2. PARTE EXPERIMENTAL	31
2.1 Determinación de los ácidos carboxílicos de cadena corta, en muestras de sudor humano, mediante su derivatización y posterior análisis por SPME/GC-ECD.	31
2.1.1 Preparación de los reactivos:	31
2.1.2 Obtención de los ésteres de pentafluorobencilo (derivados de los ácidos carboxílicos) en medio orgánico.	32
2.1.3 Selección del recubrimiento de las fibras de SPME.	33
2.1.4 Evaluación de las condiciones de reacción para la obtención de los derivados de los ácidos carboxílicos en medio acuoso.	34
2.1.5 Evaluación de las condiciones de extracción para la determinación de los derivados de los ácidos carboxílicos.	35
2.1.6 Obtención de las muestras de sudor humano (pies).	36
2.1.7 Aplicación de la metodología para la determinación de los ácidos carboxílicos en muestras de sudor humano (pies).	38
2.2 DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS DE BAJO PESO MOLECULAR PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE SUDOR	40
2.2.1 Preparación de la solución de pentafluorofenilhidracina	40
2.2.2 Preparación de solución de aldehídos.	40
2.2.3 Derivación <i>in situ</i> con PFPH de los aldehídos sobre la fibra de SPME.	40
2.2.4. Monitoreo de aldehídos volátiles en muestras de sudor originado en los	41

pies.	
2.2.5 Determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular y aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor después de emplear talco para pies.	<b>43</b>
2.2.6 Determinación de ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles presentes en muestras de sudor humano originado en las axilas.	<b>43</b>
2.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.	<b>44</b>
2.3.1 Análisis por GC-ECD de los derivados de ácidos carboxílicos.	<b>44</b>
2.3.2 Análisis por GC-ECD de los derivados de aldehídos volátiles.	<b>46</b>
3. ANÁLISIS DE RESULTADOS.	<b>48</b>
3.1 Determinación de los ácidos carboxílicos mediante la derivación química en fase orgánica.	<b>48</b>
3.2 Determinación de los ácidos carboxílicos mediante la derivación química en fase acuosa.	<b>50</b>
3.2.1 Evaluación de las condiciones de reacción.	<b>51</b>
3.2.1.1 Efecto del pH.	<b>51</b>
3.2.1.2 Tiempo de reacción.	<b>53</b>
3.2.1.3 Temperatura de reacción.	<b>58</b>
3.2.1.4 Cantidad de agente derivante	<b>61</b>
3.2.2 Parámetros de extracción.	<b>67</b>
3.2.2.1 pH de extracción.	<b>67</b>
3.2.2.2 Tiempo de extracción.	<b>70</b>
3.2.2.3 Efecto salino.	<b>74</b>
3.2.2.4 Efecto de la temperatura de extracción.	<b>77</b>
3.3 Determinación de ácidos carboxílicos presentes en muestras de sudor.	<b>81</b>
3.4. Determinación de compuestos carbonílicos, C <sub>2</sub> -C <sub>10</sub> , presentes en las muestras de sudor.	<b>90</b>
3.4.1 Selección de La fibra de SPME.	<b>91</b>
3.4.2 Evaluación del tiempo de exposición de la fibra al agente derivatizante	<b>92</b>
3.5 Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en las	<b>97</b>

muestras de sudor después de emplear talco para pies.	
3.5.1 Ácidos carboxílicos.	<b>98</b>
3.5.2 Aldehídos Volátiles.	<b>102</b>
3.6 Determinación de aldehídos volátiles en sudor proveniente de las axilas.	<b>105</b>
4. CONCLUSIONES	<b>109</b>
5. RECOMENDACIONES	<b>111</b>
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	<b>112</b>
ANEXO 1	<b>117</b>
ANEXO 2	<b>119</b>
ANEXO 3	<b>126</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Identificación de sospechosos mediante “ <i>human scent line-ups</i> ” empleando perros especialmente entrenados.	<b>2</b>
<b>Figura 2</b>	Corte transversal de la dermis de la piel.	<b>7</b>
<b>Figura 3</b>	Estructura del ácido 3-metil-2-hexenoico considerado uno de los responsables del mal olor originado en el cuerpo humano.	<b>9</b>
<b>Figura 4</b>	Estructura del 5 $\alpha$ –androst-16-en-3-ona.	<b>10</b>
<b>Figura 5</b>	Dispositivo para microextracción en Fase Sólida (SPME).	<b>15</b>
<b>Figura 6</b>	Procedimiento de extracción (I) y desorción (II) de la SPME.	<b>16</b>
<b>Figura 7</b>	Diferentes modos de extracción por la técnica SPME	<b>17</b>
<b>Figura 8</b>	Estructura química de los diferentes recubrimientos poliméricos para las fibras de SPME.	<b>18</b>
<b>Figura 9</b>	Fibras empleadas en la microextracción en fase sólida. A. Poli(acrilato) (PA). B. Poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS-DVB). C. Poli(dimetilsiloxano) (PDMS). Obtenidas de <i>Supelco Inc.</i> (Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.).	<b>19</b>
<b>Figura 10</b>	Diferentes modos de derivación química combinados con SPME.	<b>23</b>
<b>Figura 11</b>	Reacción de derivación de los ácidos carboxílicos con bromuro de pentafluorobencilo (PFBBBr).	<b>27</b>
<b>Figura 12</b>	Reacción de derivación de los aldehídos con pentafluorofenilhidracina (PFPH).	<b>28</b>
<b>Figura 13</b>	Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME), para muestreo manual, con fibras con recubrimientos poliméricos de poli(dimetil)siloxano (PDMS), poli(acrilato) (PA) y poli(dimetil)siloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB), obtenidos de <i>Supelco Inc.</i> (Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.).	<b>33</b>
<b>Figura 14</b>	Material entregado a los participantes en el monitoreo de los	<b>37</b>

	componentes volátiles presentes en el sudor de los pies.	
<b>Figura 15</b>	Procedimiento analítico para la derivación de los ácidos carboxílicos recolectados en plantillas de algodón.	<b>39</b>
<b>Figura 16</b>	Procedimiento analítico para la derivación <i>in situ</i> con PFPH de los aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor.	<b>42</b>
<b>Figura 17</b>	Material entregado a los participantes en el monitoreo de los componentes volátiles presentes en el sudor de las axilas.	<b>44</b>
<b>Figura 18</b>	Desorción térmica de la fibra en el puerto de inyección (split 1:10, 250°C) del cromatógrafo de gases equipado con ECD y columna DB-5 (30 m).	<b>46</b>
<b>Figura 19</b>	Corriente iónica total reconstruida de los derivados de ácidos carboxílicos C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> (ésteres de pentafluorobencilo), obtenida en una columna HP-5 (60m x 0.25mm x 0.25µm). 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.	<b>49</b>
<b>Figura 20</b>	Perfiles cromatográficos obtenidos durante la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos con PFBBr a valores de pH 3 y 6. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.	<b>52</b>
<b>Figura 21</b>	Efecto del pH sobre el rendimiento de ésteres de ácidos carboxílicos obtenidos mediante derivación con PFBBr en medio acuoso.	<b>54</b>
<b>Figura 22</b>	Perfiles cromatográficos de los derivados de los ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función del tiempo de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.	<b>55</b>
<b>Figura 23</b>	Efecto del tiempo de reacción sobre el rendimiento de los	<b>58</b>

ésteres de ácidos carboxílicos, obtenidos por su derivación con PFBBr en medio acuoso. Los ensayos se realizaron por duplicado.

- Figura 24** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la temperatura de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico. **59**
- Figura 25** Efecto de la temperatura de reacción (60, 70 y 80 °C) sobre el rendimiento de los ésteres de ácidos carboxílicos, obtenidos por su derivación con PFBBr en medio acuoso. Los ensayos se realizaron por duplicado. **61**
- Figura 26** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la cantidad de PFBBr usada. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico. **62**
- Figura 27** Efecto de la cantidad de agente derivatizante PFBBr, sobre el rendimiento de los ésteres de pentafluorobencilo obtenidos en medio acuoso. Los ensayos se realizaron por duplicado. **65**
- Figura 28** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del pH de extracción. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico. **68**
- Figura 29** Efecto del pH sobre la eficiencia de extracción de los ésteres de pentafluorobencilo, empleando *HS-SPME*. Las extracciones se realizaron por duplicado. **70**
- Figura 30** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos **71**

carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del tiempo de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

- Figura 31** Cantidad de los derivados de ácidos carboxílicos extraídos por *HS-SPME*, en función del tiempo de exposición de la fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. Los ensayos se realizaron por duplicado. **74**
- Figura 32** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función de la cantidad de sal agregada a la matriz de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico. **75**
- Figura 33** Efecto de la adición de sal, NaCl (% p/v) sobre la eficiencia de extracción por *HS-SPME* de los derivados de los ácidos carboxílicos. Los ensayos se realizaron por duplicado. **77**
- Figura 34** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función de la temperatura de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico. **78**
- Figura 35** Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción de los analitos, productos de la derivatización de los ácidos carboxílicos con PFBBR. **80**
- Figura 36** Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la **82**

	muestra fresca de sudor de los cinco voluntarios obtenidos por <i>HS-SPME</i> . Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85 $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.	
<b>Figura 37</b>	Distribución de los ácidos carboxílicos volátiles presentes en el sudor de los pies de 5 voluntarios masculinos, analizado después de una jornada laboral de 8 hrs.	<b>86</b>
<b>Figura 38.</b>	Distribución de los ácidos carboxílicos presentes en las muestras de sudor de 4 voluntarios almacenadas durante 6 días.	<b>89</b>
<b>Figura 39.</b>	Cantidad de PFPH retenida por cada uno de los recubrimientos de la fibra de SPME. Concentración de PFPH en la solución; 2.4 mM, tiempo de extracción: 3 min, temperatura: 28 °C.	<b>91</b>
<b>Figura 40</b>	Cantidad de PFPH retenida por la fibra de SPME, (PDMS-DVB, 65 $\mu$ m) en función del tiempo de su exposición. Concentración de PFPH en solución: 2.4 mM, temperatura: 28 °C	<b>92</b>
<b>Figura 41</b>	Perfiles cromatográficos típicos de los aldehídos volátiles, presentes en las muestras frescas de sudor de los 4 voluntarios obtenidos por <i>HS-SPME</i> , usando derivación <i>in situ</i> sobre la fibra (PDMS/DVB de 65 $\mu$ m). Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 $\mu$ m), GC-ECD. 1. Etanal 2. Propanal 3. Butanal 4. Valeraldehído 5. Hexanal 6. Octanal. 7. Nonanal 8. Decanal.	<b>93</b>
<b>Figura 42</b>	Aldehídos volátiles, presentes en las muestras frescas de sudor de los pies de cuatro voluntarios, obtenidos por <i>HS-SPME</i> , usando derivación <i>in situ</i> sobre la fibra de PDMS-DVB, 65 $\mu$ m. GC-ECD.	<b>95</b>
<b>Figura 43</b>	Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en	<b>98</b>

forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la muestra de sudor de dos voluntarios después de 8 hrs de uso de talco para los pies. *HS-SPME*. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

- Figura 44** Ácidos carboxílicos volátiles, obtenidos por HS-SPME de sus ésteres derivados de PFBBr, presentes en las muestras de sudor de pies de dos voluntarios después de emplear talco. **100**
- Figura 45** Ácidos carboxílicos presentes en las muestras de sudor de pies de dos voluntarios, obtenidas sin uso de talco y después de su aplicación. A. Voluntario 1 B. Voluntario 2. **101**
- Figura 46** Aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de pies del voluntario 1, antes y después del uso de talco medicinal. **103**
- Figura 47** Aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de pies del voluntario 2, antes y después del uso de talco medicinal. **104**
- Figura 48** Aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor axilar obtenidos mediante HS-SPME con derivación *in situ* sobre la fibra (PDMS-DVB, 65 $\mu\text{m}$ ). **106**
- Figura 49** Compuestos carbonílicos presentes en las muestras de sudor de las axilas y pies de dos voluntarios, aislados por HS-SPME, con derivación *in situ* sobre la fibra de PDMS-DVB (65  $\mu\text{m}$ ). **107**

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Algunos compuestos comunes presentes en el olor de la piel humana	<b>13</b>
<b>Tabla 2</b>	Variables de reacción de derivación de ácidos carboxílicos con PFBBr en medio acuoso.	<b>34</b>
<b>Tabla 3</b>	Ésteres de los ácidos carboxílicos, obtenidos por su derivación con PFBBr	<b>50</b>
<b>Tabla 4</b>	Composición de los ácidos carboxílicos volátiles C <sub>2</sub> – C <sub>6</sub> , y del ácido benzoico presentes en las muestras frescas de sudor de los pies de 5 voluntarios.	<b>85</b>
<b>Tabla 5</b>	Composición de los ácidos carboxílicos volátiles, C <sub>2</sub> – C <sub>6</sub> , y del ácido benzoico presentes en las muestras de sudor de los pies, almacenadas por 6 días.	<b>88</b>
<b>Tabla 6</b>	Cantidad (ppm) de los aldehídos volátiles, obtenidos mediante HS-SPME con derivación <i>in situ</i> sobre la fibra (PDMS/DVB de 65 μm), presentes de sudor de los pies de 4 voluntarios.	<b>96</b>
<b>Tabla 7</b>	Cantidad de aldehídos volátiles (ppm), obtenidos mediante HS-SPME con derivación <i>in situ</i> sobre la fibra (PDMS/DVB, 65μm), presentes en el sudor de los pies de dos voluntarios con y sin aplicación de talco.	<b>102</b>
<b>Tabla 8</b>	Cantidad (ppm) de los aldehídos volátiles presentes en el sudor de la región axilar, determinada HS-SPME con derivación <i>in situ</i> sobre la fibra de PDMS/DVB de 65μm de espesor.	<b>108</b>

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos
CIBIMO	Centro de Investigación en Biomoléculas
CW - DVB	<i>Carbowax – Divinylbencene</i> (Carbowax – Divinilbenceno)
DVB	<i>Divinylbencene</i> (Divinilbenceno)
ECD	<i>Electron Capture Detector</i> (Detector de captura de electrones)
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases, Cromatógrafo de gases)
GC-ECD	<i>Gas Chromatography-Electron Capture Detector</i> (Cromatografía de gases - detector de captura de electrones).
GC-FID-MS	<i>Gas Chromatography – Flame Ionization Detector - Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases con detector de ionización en llama - espectrometría de masas)
GC-MS	<i>Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i> (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta eficiencia)
HS-SPME	<i>Headspace – Solid - Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida en modo headspace)
HRGC	<i>High Resolution Gas Chromatography</i> (Cromatografía de gases de alta resolución)
HRGC/MSD	<i>High Resolution Gas Chromatography/ Mass Selective Detector</i> (Cromatografía de gases de alta resolución acoplada al detector selectivo de masas)

HS	<i>Headspace</i> (Espacio de cabeza)
LLE	<i>Liquid - Liquid Extraction</i> (Extracción líquido - líquido)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometría de masas)
MSD	<i>Mass Selective Detector</i> (Detector selectivo de masas)
PA	<i>Poly(acrilate)</i> [Poli(acrilato)]
PDAM	1-Pirenildiazometano
PDMS	<i>Poly(dimethylsiloxane)</i> [Poli(dimetilsiloxano)]
PDMS - CAR	<i>Poly(dimethylsiloxane)-Carboxen-</i> Poli(dimetilsiloxano)- Carboxeno]
PDMS - CAR - DVB	<i>Poly(dimethylsiloxane)-Carboxen- Divinylbencene</i> [Poli(dimetilsiloxano)-Carboxeno- Divinilbenceno]
PDMS - DVB	<i>Poly(dimethylsiloxane)- Divinylbencene</i> [Poli(dimetilsiloxano)- Divinilbenceno]
PFBBr	<i>Pentafluorobenzyl bromide</i> (Bromuro de pentafluorobencilo)
PFBHA	<i>o</i> -(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine <i>o</i> -(2,3,4,5,6-(pentafluorobencil) hidroxilamina.
PFPH	<i>2, 3, 4, 5, 6-Pentafluorophenylhydrazine</i> (2, 3, 4, 5, 6-Pentafluorofenilhidracina)
ppm	Partes por millón
ppb	Partes por billón
ppt	Partes por trillón
SPAD	<i>Solid-Phase Analytical Derivatization</i> (Derivación analítica en fase sólida)

SPME	<i>Solid-Phase Microextraction</i> (Microextracción en fase sólida)
SPME - GC - MS	<i>Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> (Microextracción en fase sólida- cromatografía de gases acoplada a Espectrometría de masas).
SPME-MS	<i>Solid-Phase Microextraction-Mass Spectrometry</i> (Microextracción en fase sólida – espectrometría de masas)
UIS	Universidad Industrial de Santander
VOCs	<i>Volatile Organic Compounds</i> (Compuestos orgánicos volátiles)

## GLOSARIO

***Phylum***: En biología, *Phylum* o filo es el rango de clasificación que está entre reino y clase.

Los niveles de clasificación son:

Reino

[Subreino]

[Infrarreino]

[Superfino]

Filo

[Subfilo]

[Intrafilo]

[Superclase]

Clase



**TITULO\*: DETERMINACIÓN POR HS-SPME/CG-ECD, DE LOS COMPONENTES CARBONÍlicos Y CARBOXÍlicos VOLÁTILES PRESENTES EN EL SUDOR HUMANO.**

**AUTOR: MARTHA CERVANTES DÍAZ\*\***

**Palabras Claves: Microextracción en fase sólida, cromatografía de gases – detector de captura de electrones, derivación química, ácidos carboxílicos (C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>, benzóico), aldehídos volátiles (C<sub>2</sub> – C<sub>10</sub>), sudor humano.**

En el presente trabajo, se aplicó la derivación química combinada con la microextracción en fase sólida en el modo *headspace* (HS-SPME) y posterior análisis cromatográfico, para la determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en muestras de sudor humano.

Las muestras de sudor fueron colectadas en una plantilla elaborada en algodón prensado y gasa aséptica comercial. Para la determinación de los ácidos carboxílicos, el vendaje fue sometido a desorción líquida, los compuestos así extraídos fueron sometidos a derivación química con bromuro de pentafluorobencilo (PFBB<sub>r</sub>). En la etapa de extracción se empleó HS-SPME, con una fibra de SPME con recubrimiento de poli(acrilato) de 85µm y soporte para inyección manual (Supelco, Bellefonte, PA). En el monitoreo de los aldehídos volátiles presentes en muestras de sudor, se empleó la derivación *in situ* sobre una fibra de PDMS/DVB, 85 µm, (Supelco, Bellefonte, EE.UU), empleando como agente derivante la pentafluorofenilhidrazina (PFPH), para obtener las hidrazonas respectivas. El análisis de los compuestos derivados de ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo, HP-5890A *Series II* (Hewlett-Packard, PA, CA, EE.UU.) equipado con un detector de captura de electrones (GC-ECD), inyector *split/splitless* y sistemas de datos Asterix, Para la separación de los analitos de interés se utilizó una columna DB-5 (J&W, *Scientific*) de 30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e), 5%-fenilpoli(dimetilsiloxano).

La aplicación de metodologías de derivación química en combinación con la HS-SPME, permitieron identificar los aldehídos pentanal, nonanal y decanal, como compuestos mayoritarios. La fracción minoritaria fueron el etanal, propanal y butanal. Los compuestos de naturaleza carboxílica identificados en las muestras de sudor de todos los voluntarios, presentándose en mayor proporción el ácido acético, propiónico y el benzóico. Las metodologías implementadas para estas muestras, constituyen una herramienta útil en los campos forense, biomédico y la industria cosmética.

---

\* Trabajo de Investigación

\*\* Facultad de Ciencias, Maestría en Química, Directora: Dra. Elena E. Stashenko, Ph. en Química.

**TITLE\*: HS-SPME/GC-ECD DETERMINATION OF VOLATILE CARBONYLS AND CARBOXYLIC ACIDS IN HUMAN SWEAT**

**AUTHOR: MARTHA CERVANTES DÍAZ\*\***

**Palabras Claves: Solid phase microextraction, gas chromatographic – electron-capture detector, derivatization, carboxylic acids (C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>, benzoic), volatile aldehydes (C<sub>2</sub> – C<sub>10</sub>), human sweat.**

Volatile aldehydes (C<sub>2</sub> – C<sub>10</sub>), and low-molecular mass carboxylic acids (C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>, benzoic), were determined in human sweat by means of derivatisation to fluorinated analogs and their determination with gas chromatography with electron-capture detection (GC-ECD).

Derivatisation methods that introduced a pentafluorophenyl or a pentafluorobenzyl moiety into the analyte's molecular structure were employed in combination with SPME and GC-ECD quantification, to obtain highly sensitive analytical methodologies for carbonyl compounds and carboxylic acids. Volatile carbonyl compounds were determined using an SPME fiber previously saturated with pentafluorophenylhydrazine (PFPH) to accomplish their *in situ* derivatisation to hydrazones. Carboxylic acids were trapped in slightly basic aqueous solution and treated with pentafluorobenzyl bromide. The resulting esters were sampled from headspace with a poly(acrylate)-coated (85 µm) SPME fiber. The quantification of the hydrazones and the esters was carried out by thermal desorption from the SPME fiber into the injection port of a gas chromatograph HP-5890A Series II (Hewlett-Packard, PA, CA, EE.UU), equipped with either <sup>63</sup>Ni-ECD, split/splitless injector, and HP ChemStation A. 06.03 data system.

Acetic, propionic and benzoic acids were the most abundant carboxylic acids in the volunteers' foot sweat. Volunteers presented concentration profiles which differed mainly in the concentrations of acetic and propionic acids, which varied by factors of up to three-fold. Pentanal, nonanal and decanal were the most abundant aldehydes found in human sweat. Ethanal, butanal, hexanal and octanal were the minor fraction of aldehydes in human sweat. The methodologies implemented for these samples, constitute a useful tool in the fields forensic, biomedical and the cosmetic industry.

---

\* Trabajo de Investigación

\*\* Facultad de Ciencias, Maestría en Química, Directora: Dra. Elena E. Stashenko, Ph. en Química.

## INTRODUCCIÓN

Sudar es una respuesta fisiológica al calor. Esta función se encuentra regulada por el metabolismo y por la existencia en el organismo de mecanismos termorreguladores que se ajustan a las variaciones de frío y calor. También, participan los sistemas nervioso y endocrino, el aparato cardiovascular y la sudoración desempeña un papel fundamental [1-4].

El sudor es producido por la estimulación de las glándulas sudoríparas, que se encuentran en la dermis (capa interna de la piel). Estas glándulas se clasifican en **ecrinas** (localizadas en todo el cuerpo), **apocrinas** (ubicadas en la zona genital y anal) y las **sebáceas** (cuero cabelludo y rostro) [2-4]. El sudor es una mezcla de sustancias inodoras e incoloras, está constituido en un 98% por agua, y el resto lo conforman sales minerales y algunos compuestos orgánicos. Está estrechamente relacionado con el olor del cuerpo humano, debido a la acción de la población bacteriana que se reside en la piel sobre la fracción orgánica del mismo [5].

La mayor parte de los trabajos de investigación sobre el sudor tienen una orientación comercial, puesto que se basan en el diseño de productos con propiedades antitranspirantes (controlar la formación del sudor), perfumes y lociones (para enmascarar el olor del cuerpo) [5-7].

En el aspecto clínico, el sudor y el olor humano han servido en ocasiones como elementos de diagnóstico de enfermedades. Trastornos en la sudoración y algunos olores característicos son el indicio de alguna enfermedad como la *diabetes* (olor a acetona), *fiebre amarilla* (sangre o carnicería) o *infección bacteriana* (olor putrefacto) [8].

Por otro lado, el sudor y el olor tienen aplicaciones en el campo forense, en la determinación de drogas de abuso (alucinógenos y/o drogas de control) por parte de un individuo; monitoreo de rastros de explosivos, búsqueda de personas extraviadas o reconocimiento de sospechosos, ya que el olor humano se considera es como una huella digital odorífera, determinada por la genética, el medio ambiente y la alimentación de cada individuo [18, 19].

Actualmente, los expertos forenses emplean perros certificados, los cuales han sido entrenados especialmente para realizar “*human scent line-ups*”. Esta técnica consiste en alinear a los sospechosos de tal manera que el perro realice una identificación guiándose por su olfato, previa inspección de la escena del crimen (**Figura 1**). Sin embargo, para lograr una identificación positiva y con un alto grado de confiabilidad, es necesario repetir este procedimiento varias veces en diferentes sitios, de tal manera que no haya influencia del ambiente sobre el olfato del canino [18].



**Figura 1. Identificación de sospechosos mediante “*human scent line-ups*” empleando perros especialmente entrenados.**

En países como Holanda, los resultados obtenidos mediante la aplicación de esta metodología, son aceptables y en su mayoría se usan como parte de la evidencia durante un proceso penal. En otros países, como Estados Unidos, este tipo de pruebas no se consideran admisibles durante un juicio legal [18-19]. Ante esto, los investigadores de las áreas de química forense y química analítica, encaminan sus esfuerzos a la búsqueda de metodologías apropiadas y confiables para la identificación de individuos con base en su olor, que puedan ser utilizadas sin ninguna duda durante un juicio.

Las técnicas tradicionales empleadas para el análisis de matrices biológicas, se caracterizan por tiempos largos de muestreo y el uso de grandes volúmenes de solventes, lo que implica un mayor costo en los análisis, además, del impacto ambiental ocasionado por la generación de desechos [27]. En la mayoría de los casos, estas metodologías requieren de equipos sofisticados y costosos.

La microextracción en fase sólida (SPME), es un método de preparación de muestras, que sobresale por su fácil manejo y eficacia en la extracción de los analitos de interés sin necesidad de emplear solventes, lo cual la hace ambientalmente amigable, reduciendo también el tiempo de análisis y el costo del mismo [27]. La combinación de la SPME con la cromatografía de gases y la espectrometría de masas, la ha convertido en una técnica muy versátil de análisis y su campo de aplicación se ha extendido desde la química ambiental, hasta el análisis de aromas y productos alimenticios [27].

Es bueno resaltar que mediante el empleo de la SPME, los análisis pueden llevarse a cabo, en un medio ambientalmente favorable, tanto para el individuo bajo estudio en el caso de investigaciones *in vivo*, como para el analista, ya que se descarta el uso de solventes para la obtención de la muestra. Es una técnica no invasiva (por lo que no requiere la aplicación de medicamentos para la estimulación del sudor), la muestra es obtenida tal y como se genera

por el organismo humano. El dispositivo de muestreo, puede ser transportado fácilmente de un lugar a otro, lo que permite realizar el análisis en el sitio de la escena de un crimen, para la identificación de un sospechoso empleando su perfil odorífero.

El objetivo fundamental de este trabajo de investigación, consistió en proponer una metodología analítica útil en la identificación de compuestos de naturaleza química carbonílica y carboxílica, presentes en la sudoración humana, originado específicamente en los pies. Se propuso la implementación de la derivación química combinada con la microextracción en fase sólida (SPME) para el aislamiento de estos compuestos. Para la determinación de los ácidos carboxílicos, se empleó la derivación directa sobre la matriz, el agente derivante utilizado fue el bromuro de pentafluorobencilo (PFBBBr), obteniéndose como derivados los ésteres de pentafluorobencilo mediante una reacción de alquilación. En el caso de los aldehídos volátiles, el modo de derivación fue *in situ* sobre la fibra de SPME, empleando como agente derivante la pentafluorofenilhidracina, obteniéndose las respectivas hidrazonas. Los compuestos derivados fueron extraídos empleando la microextracción en fase sólida en el modo headspace (HS-SPME) y fueron analizados por cromatografía de gases acoplada con detector selectivo de captura de electrones (GC-ECD).

Para la determinación de los compuestos carboxílicos, fue necesario previamente realizar la calibración, con el fin establecer las mejores condiciones tanto de reacción, como para extracción de estos analitos. Se obtuvieron los respectivos perfiles cromatográficos de las muestras de sudor originado en los pies, suministradas por cinco (5) voluntarios, en los cuales se aprecian diferencias cualitativas en la composición de los compuestos de interés (ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles). Se detectó la presencia de los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico, hexanoico y benzoico. También se encontraron los respectivos aldehídos volátiles (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>).

Se evaluó también, el efecto del talco medicinal sobre la composición de los ácidos carboxílicos y los aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de los voluntarios., encontrándose una disminución significativa de los compuestos de interés.

Los resultados obtenidos podrían suministrar información útil sobre el perfil químico del sudor de un individuo, constituyendo de esta manera una huella odorífera de identificación que podría ser utilizada como herramienta legal o en el diagnóstico de algunas enfermedades. A su vez, también serviría de referencia para la industria cosmética en el desarrollo de nuevos productos.

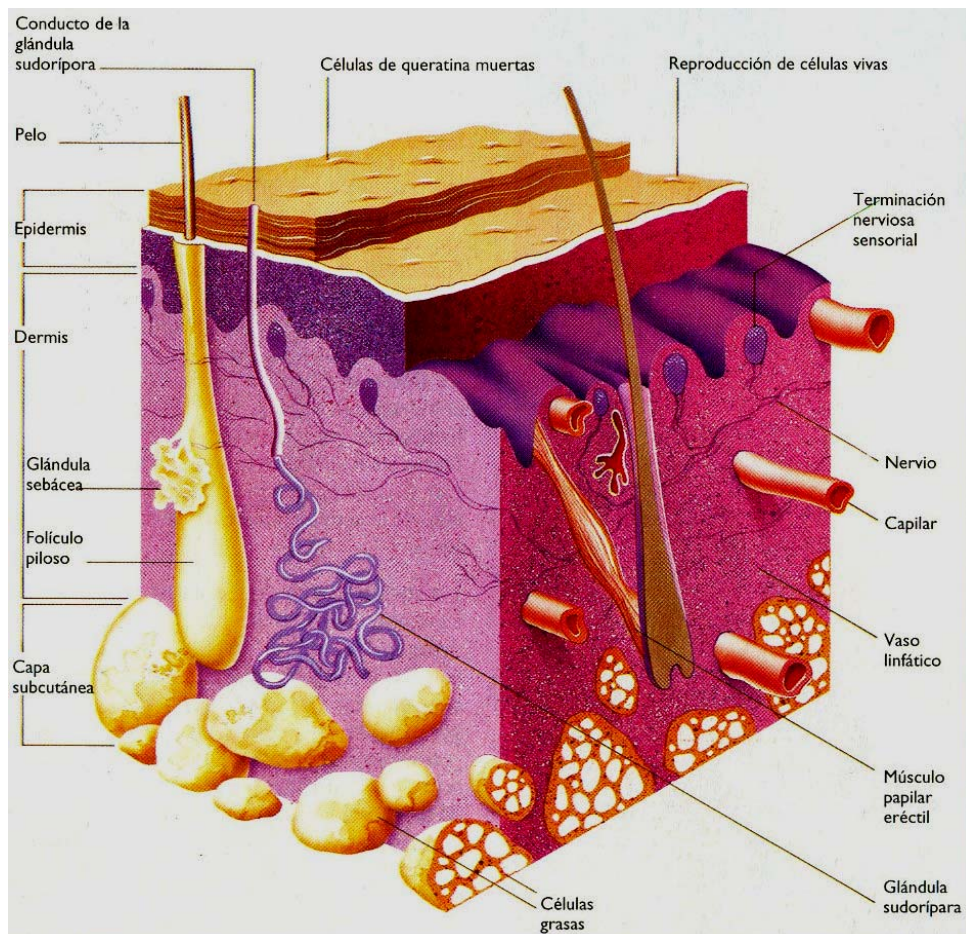
## **1. MARCO TEÓRICO**

### **1.1 SUDOR: GENERALIDADES**

En el *Phylum* animal los compuestos volátiles conocidos como feromonas están asociados con el olor del cuerpo; juegan un papel fundamental en la regulación de la vida social, principalmente, en la comunicación sexual y las relaciones. El olor de la piel es función de la parte del cuerpo, donde se produce, y tiene una incuestionable influencia sobre el comportamiento humano. La cantidad de oxígeno disponible, como también el agua y las secreciones glandulares, determinan el tipo y número de flora cutánea que está presente sobre las diferentes partes del cuerpo [1].

La función del sudor es regular la temperatura corporal, ya que cuando se evapora de la superficie de la piel se reduce el exceso de calor. También interviene en la eliminación de sustancias nocivas para la salud. En condiciones de reposo, se produce algo más de 1 L/día, que se aumenta hasta 1 L/h cuando se realiza ejercicio físico. Los niños y ancianos sudan menos que los adultos, debido a que el grado de madurez de las fibras del sistema nervioso simpático que regula las funciones automáticas, como la sudoración, el pulso, la respiración y la salivación, no están lo suficientemente desarrolladas en la infancia y van perdiendo su actividad a medida que la persona envejece. Las glándulas sudoríparas producen una secreción acuosa importante en la termorregulación del cuerpo. La producción del sudor es continua, pero la velocidad de producción es altamente variable entre individuos, depende de estímulos ambientales, como la temperatura, el ejercicio o el estrés emocional. La sudoración emocional puede ser producida por ansiedad, embarazo, miedo, ira, excitación o estrés mental [2-7].

Hay tres tipos de glándulas sudoríparas presentes en la piel: las ecrinas, las apocrinas y las apoecrinas. (Figura 2). Las glándulas **ecrinas**, participan en la termorregulación del cuerpo, se encuentran distribuidas en toda la piel, excepto en la zona genital (labios menores, clítoris, glándulas del pene y la parte interna del prepucio), conducto auditivo externo y boca. Las zonas de mayor profusión de sudor son el dorso de las manos y las yemas de los dedos, donde se puede llegar a tener hasta 700 glándulas/cm<sup>2</sup>. Las glándulas **apocrinas** segregan un fluido denso y se localizan en axilas, pezones, periné, alrededor del ano y el conducto auditivo externo. Son las responsables del olor corporal de cada persona. En tanto que las glándulas **apoecrinas** tienen características intermedias respecto a las anteriores, se encuentran fundamentalmente en las axilas [2-8].



**Figura 2. Corte transversal de la dermis de la piel [2].**

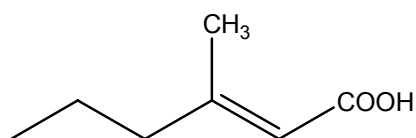
El cuerpo humano contiene entre 2 y 4 millones de glándulas sudoríparas, que además de producir sudor, también secretan las feromonas, compuestos químicos alelopáticos relacionados con el olor del cuerpo [8]. El olor humano resulta de la acción combinada de las glándulas de la piel y los compuestos orgánicos cuya regulación está sujeta al control hormonal por parte del cuerpo humano, como también por la población bacteriana localizada sobre la superficie de la piel, que metaboliza y transforma los compuestos orgánicos que absorbe del medio exterior [1]. Alguna alteración de este equilibrio induce cambios en la naturaleza y cantidad de compuestos volátiles dando origen al olor humano. La importancia de los olores relacionados con la salud humana fue entendida por la medicina antigua, en especial, en China, donde comúnmente se diagnosticaban enfermedades del cuerpo, analizando su olor. La medicina occidental ha reconocido algunas patologías que producen olores desagradables característicos como, por ejemplo, la diabetes y algunas enfermedades hepáticas [1].

La flora aeróbica residente sobre la piel consiste en las bacterias *gram-positiva cocci* de *Staphylococcus* y *Micrococcus* y la *gram-positiva rods*, en su mayoría *Corynebacterium*. La mayor población aeróbica residente es la propionibacteria, la cual está localizada en los folículos de las glándulas sebáceas de los adultos [1,9]. La flora microbiana usualmente localizada sobre la piel, aparentemente cumple funciones de defensa contra bacterias patógenas e infecciones micóticas. En adultos, los microorganismos que viven en la piel pueden ser observados en diferentes concentraciones en los siguientes sitios: el vestíbulo nasal, cavidad auditiva externa, la axila, la ingle, el rostro y los labios. El número de microorganismos varía con la edad, el sexo y la raza [8,9].

La región axilar de los humanos contiene una densa población de glándulas sudoríparas y de sustancias volátiles, la evaporación de estos compuestos hace una contribución importante al olor del cuerpo. Varios estudios indican, que estas glándulas pueden emitir señales químicas capaces de alterar el ciclo menstrual y que posiblemente estén

involucradas en la regulación de la función reproductiva [9]. Shelley *et al.* (1953) [10], desarrolló un trabajo que permitió determinar que el sudor producido por las glándulas apocrinas localizadas en las axilas es inoloro, y que sólo por la acción de las bacterias de la piel se generan los principales compuestos odoríferos. El papel principal de las bacterias en la formación del olor parece ser el de promover la ruptura del precursor odorífero y de los enlaces covalentes que mantienen unidas las moléculas de ácido con sus precursores.

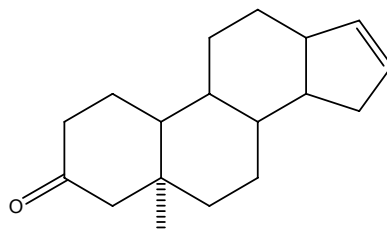
En un estudio detallado de la composición química del olor axilar humano realizado por Zeng y sus colaboradores en 1991 [11], se mostró que éste está conformado por compuestos lineales, ramificados, con cadenas alifáticas, ácidos, alcoholes, y compuestos carbonílicos. El componente mayoritario identificado fue el ácido (E)-3-metil-2-hexenoico (**Figura 3**). De igual manera, tres series homólogas de componentes minoritarios con terminaciones de ácidos insaturados, también contribuyen de manera importante al olor como son los ácidos 2-metil-C<sub>6</sub> a C<sub>10</sub> y los ácidos 4-etil-C<sub>5</sub> a C<sub>11</sub>.



**Figura 3. Estructura del ácido 3-metil-2-hexenoico, considerado uno de los responsables del mal olor originado en el cuerpo humano.**

También se determinó que uno de los principales componentes presentes en las secreciones de las axilas humanas correspondía al 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona, (**Figura 4**) que proviene del metabolismo de la bacteria *Coryneform*, que es activa en las axilas de los hombres, mientras que en otros mamíferos actúa como feromona (cerdos, jabalíes) y está relacionado con el esteroide odorífero 5 $\alpha$ -androst-16-en-3 $\alpha$ -ol [1]. Adicionalmente, los diferentes

niveles del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona que fueron encontrados, parecen ser significativamente más altos en los hombres que en las mujeres.



**Figura 4. Estructura del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona [1].**

Las emanaciones del cuerpo humano han sido consideradas como un método válido e inofensivo de vigilancia de los mosquitos ya que éstos ubican a los humanos y el ganado siguiendo las emanaciones de su piel [1].

En 1990, Kanda, F. y colaboradores [12], emplearon la extracción Soxhlet, con éter etílico, para aislar los componentes del sudor originado en los pies. El extracto obtenido se analizó por GC-MS, identificándose varios ácidos grasos de cadena corta, responsables por el fuerte olor del sudor en los pies, entre los cuales se destacó el ácido isovalérico.

En 1992 y 1995, el grupo de investigación dirigido por Reynolds K. [13,14], estudió el efecto de un antitranspirante con y sin emolientes sobre la acumulación del sudor de los pies, puesto que se sabe, que la sudoración excesiva en los pies, es causante de la formación de ampollas, algo muy común en deportistas o en personas que participan en operaciones militares.

U. Bernier y colaboradores (2000) [15], identificaron los compuestos atrayentes para el *Aedes aegypti*, mosquito transmisor de enfermedades tales como la fiebre amarilla y el

dengue hemorrágico. Las muestras fueron recolectadas usando un dispositivo de vidrio especialmente diseñado para atrapar las sustancias odoríferas originadas en la piel humana, seguido de un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Los investigadores encontraron, que los compuestos de la piel eran similares para todos los sujetos estudiados, pero que las cantidades relativas de muchos compuestos diferían de persona a persona. Los autores detectaron al menos 346 compuestos, de una variada clase de grupos funcionales, a saber: aldehídos, ácidos carboxílicos, alcoholes, hidrocarburos alifáticos y aromáticos, amidas, aminas, ésteres, compuestos heterocíclicos, cetonas, sulfuros, entre otros. De estos compuestos, 43 no fueron identificados, en tanto que 277 se relacionaron con los posibles responsables de la atracción del mosquito *Aedes aegypti*.

C. Di Natale *et al.*, [1] reportaron el uso de una nariz electrónica en el análisis de olor de la piel humana y su potencial uso en el campo de la medicina. Evaluaron la sensibilidad del sensor a la presencia del 5 $\alpha$ -androst-16-en-3-ona, logrando un nivel similar al sistema olfativo humano. Propusieron este sistema como una técnica no invasiva, como un método de análisis de las emisiones del cuerpo y su posible uso para diagnosticar enfermedades.

En el año 2002, Ostrovskaya, A. y sus colaboradores [16], reportaron el uso de la SPME combinada con GC-MS, para la identificación de los componentes volátiles responsables del olor del cuerpo humano. Los analitos extraídos mediante SPME en el modo *headspace*, incluyeron hidrocarburos de cadenas cortas y largas, tales como el tetradecano, el pentadecano y el hexadecano; aldehídos de cadenas cortas y cetonas ramificadas. El 88% de las personas monitoreadas, mostraron la presencia de aldehídos, tales como el octanal, nonanal y decanal.

Natsch y colaboradores (2004) [9], reportaron la identificación de compuestos odoríferos tipo sulfanilalcanoles: 3-sulfanilhexan-1-ol, 2-metil-3-sulfanilbutan-1-ol, 3-sulfanil-pentan-1-ol y 3-metil-3-sulfanilhexan-1-ol, detectados en el olor axilar humano en cantidades traza (1-10 pg/L), formados por la acción de la *Corynebacteria* sp. Estos compuestos presentan un olor a acre (sudor/cocina) que recuerda el olor a cebollas.

Curran A, *et al.* (2005) [17,18], emplearon la microextracción en fase sólida en el modo *headspace* combinada con cromatografía de gases - espectrometría de masas (HS-SPME /GC-MS), aprovechando las ventajas que ofrece esta técnica para extraer, separar, y analizar los componentes volátiles presentes en el olor humano. Los autores proponen esta metodología como una herramienta analítica de confirmación en el ámbito legal, en casos donde la identificación de sospechosos ha sido realizada empleando perros especialmente entrenados (*human scent line-ups*). Se sabe, que el olor humano es una combinación de varios compuestos en diferentes proporciones y, que difiere de una persona a otra, siendo único para ciertos individuos. Este estudio preliminar indicó que los patrones de olor producidos por una persona son reproducibles con el tiempo, aunque se presenta cierta variación en la misma persona, sin embargo, se pueden apreciar diferencias significativas de una persona a otra, lo que hace pensar en una “huella digital odorífera” [1].

Z - M. Zhang y sus colaboradores (2005) [19], realizaron un estudio para identificar las emanaciones humanas de la piel provenientes de los brazos, empleando un método no invasivo consistente en un dispositivo de muestreo acoplado a la SPME y posterior análisis por GC-MS. Identificaron alrededor de 35 compuestos, entre alcanos, alquenos, alcoholes, aldehídos y ésteres.

En la **Tabla 1**, se detallan algunos de los compuestos más comunes identificados por los autores anteriormente mencionados.

**Tabla 1. Algunos compuestos comunes presentes en el olor de la piel humana [1, 15].**

Ácidos	Compuestos carbonílicos	Alcoholes	Esteroides
Acético	$\gamma$ -C8-lactona	Fenol	Colesterol
2 –Propenoico	$\gamma$ -C9-lactona	Tetradecanol	Escualeno
Propanoico	$\gamma$ -C10-lactona	<i>n</i> -Hexadecanol	5 $\alpha$ -Androst-16-en-3-ona
2-Butenoico	Propanal		5 $\alpha$ -Androst-16-en-3 $\alpha$ -ol
<i>n</i> -Hexanoico	2-Metilpropanal		5 $\alpha$ -Androst-16-en-3 $\beta$ -ol
2-Metilhexanoico	Heptanal		
3-Metilhexanoico	Nonanal		
( <i>Z</i> )-3-Metil-2-hexanoico	Decanal		
2-Etilhexanoico			
<i>n</i> -Octanoico			
<i>n</i> -Nonanoico			

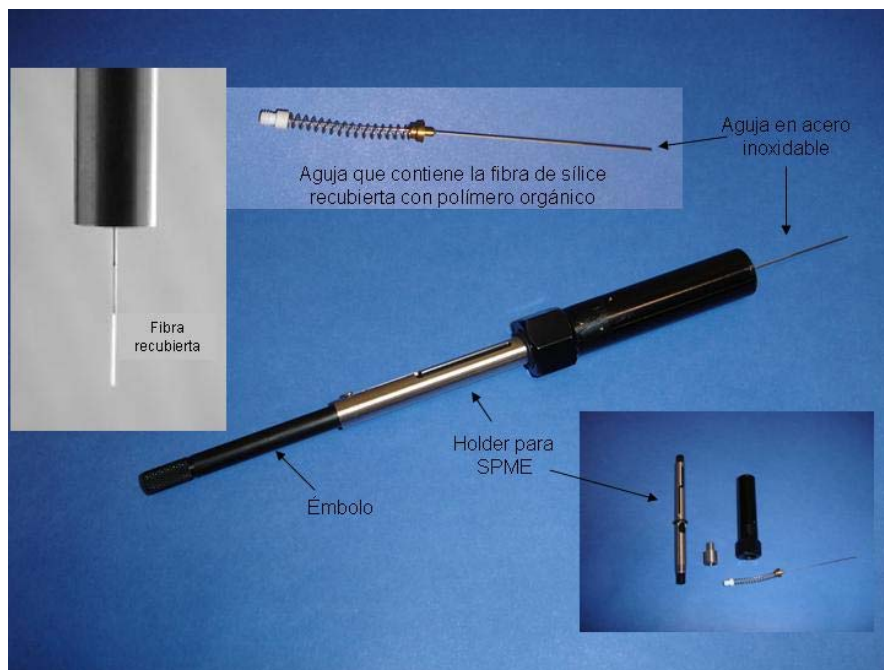
## 1.2 MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Un procedimiento analítico comprende varias etapas, a saber: muestreo, preparación de muestras, concentración de analitos, análisis cualitativo y cuantitativo, evaluación de datos y toma de decisiones. Cada paso es igual de importante para asegurar resultados correctos y consecuentemente la toma de decisión correcta.

Los métodos tradicionales de preparación de muestras en su gran mayoría requieren tiempos de análisis largos, emplean procedimientos, que involucran varias etapas, lo que conlleva el riesgo de la pérdida de los analitos de interés, también el uso de excesivas cantidades de solventes orgánicos, generando problemas de salud y contaminación ambiental, por la dificultad en la eliminación de los desechos.

Ello ha generado la necesidad de proponer técnicas de análisis sin solventes; es así como en la actualidad se dispone de algunos métodos que pueden ser clasificados, considerando la naturaleza de la fase de extracción, -gas, membrana o sorbente-, otros dependiendo del consumo de solventes, tales como la extracción por goteo y un método sin solvente como es la microextracción en fase sólida (SPME).

La SPME fue descrita por primera vez en 1990 por Pawliszyn y sus colaboradores [20-22]. La invención de la SPME parece ser un desarrollo lógico fundamentado en las columnas capilares usadas en cromatografía de gases. El diseño del dispositivo está basado en una jeringa modificada, la cual contiene un microtubo en acero inoxidable (aguja) donde se encuentra una de fibra de sílice fundida de una longitud de 1 cm, que está recubierta con un polímero orgánico (**Figura 5**). Dicha fibra puede ser movida entre dos posiciones: dentro y fuera de la aguja (microtubo), con un émbolo como en el caso de una jeringa normal [22, 23].

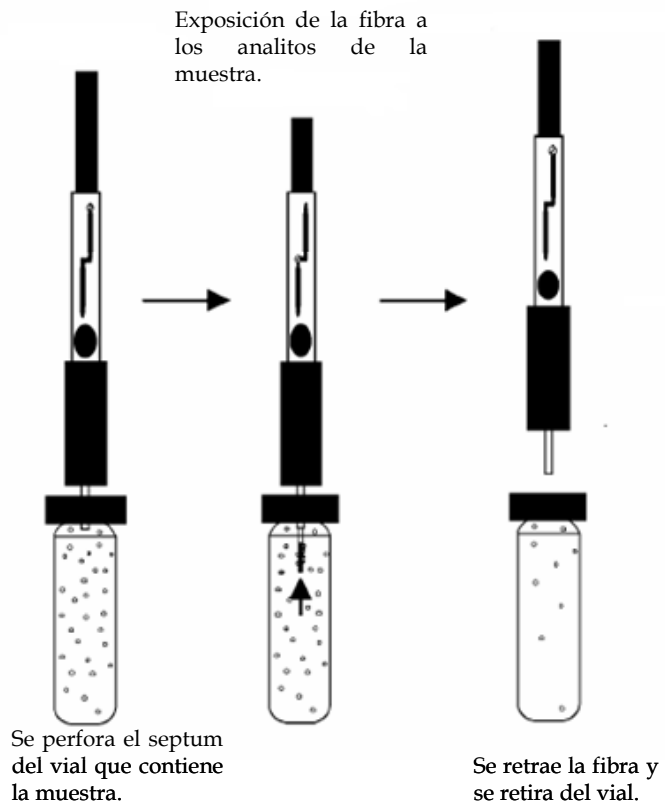


**Figura 5. Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME).**

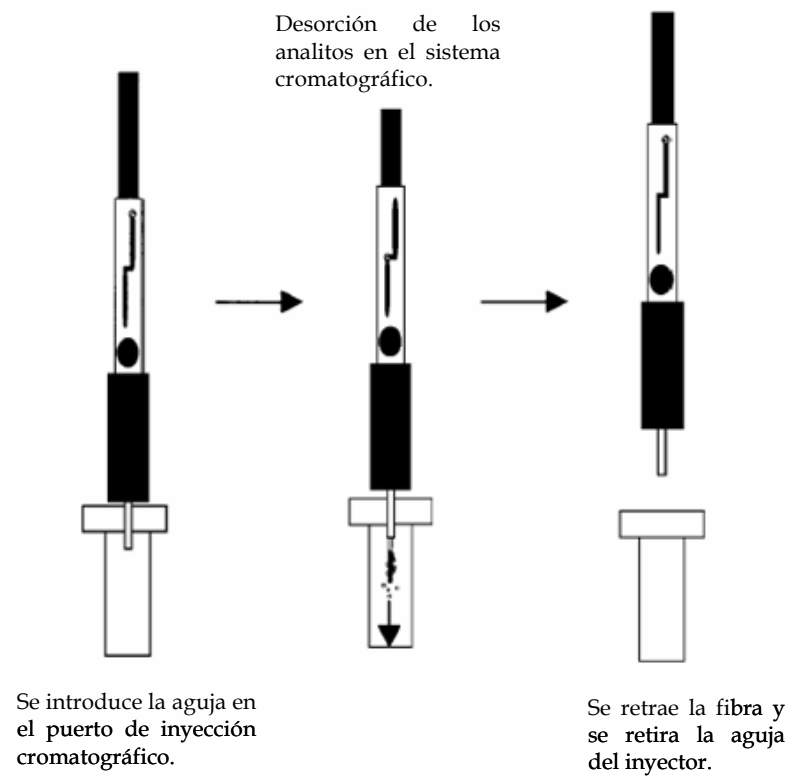
Mediante este sencillo equipo, varios pasos de la preparación de muestras, a saber: extracción, concentración, derivación y transferencia al equipo cromatográfico están integrados en un solo paso y en un solo dispositivo.

La microextracción en fase sólida tiene dos etapas: en la primera (I), la fibra recubierta es expuesta a la muestra o a su *headspace* donde ocurre la repartición de los analitos de interés entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. En la segunda fase (II), los analitos concentrados sobre el recubrimiento polimérico son transferidos al equipo instrumental donde son desorbidos, separados y cuantificados. El procedimiento de extracción y desorción puede observarse en la **Figura 6**.

## Procedimiento de Extracción (I)

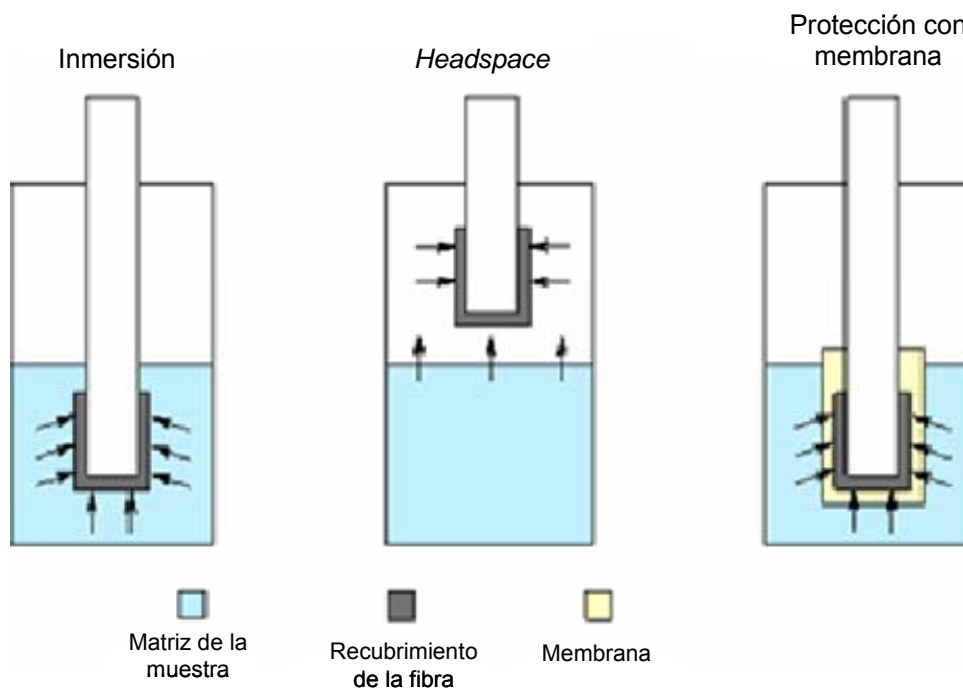


## Procedimiento de Desorción (II)



**Figura 6. Procedimiento de extracción (I) y desorción (II) de la SPME.**

Existen tres modos de operación de SPME, a saber: extracción directa o por inmersión, extracción en el modo *headspace* y extracción con la fibra protegida por una membrana. En la extracción directa, la fibra es sumergida en la muestra y los analitos son transportados de la matriz de la muestra al recubrimiento polimérico de la fibra (**Figura 7**). En el modo *headspace*, los analitos son transferidos a la fibra a través del espacio de cabeza de la muestra, este caso es recomendado cuando se quiere proteger la fibra de daños originados por interferencias con compuestos de altos pesos moleculares (proteínas o ácidos húmicos). La microextracción protegida con membrana, es empleada para la extracción de analitos presentes en muestras muy contaminadas con el propósito de proteger el recubrimiento de la fibra [24].



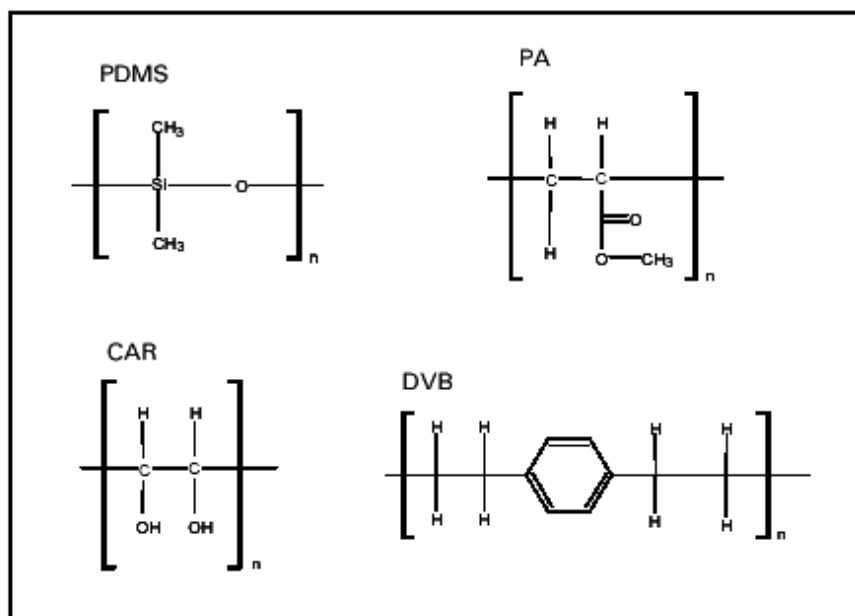
**Figura 7. Diferentes modos de extracción por la técnica SPME.**

Los aspectos termodinámicos de la SPME han sido estudiados ampliamente y muestran que la cantidad de analito extraído por el recubrimiento de la fibra es directamente proporcional a la concentración del analito en la muestra y es independiente del modo de introducción de la fibra: *headspace* o por inmersión, esto se cumple, siempre y cuando el recubrimiento, el

espacio de cabeza y el volumen de la muestra se mantengan constantes. Es importante estudiar la influencia de la temperatura, el efecto salino, la polaridad de la matriz de la muestra y el material del recubrimiento para establecer las condiciones de extracción óptimas con un número reducido de experimentos. La mayoría de los métodos desarrollados hasta el momento, son usados en combinación con la cromatografía de gases con un sistema de detección adecuado para los compuestos que se analizan [22-24]

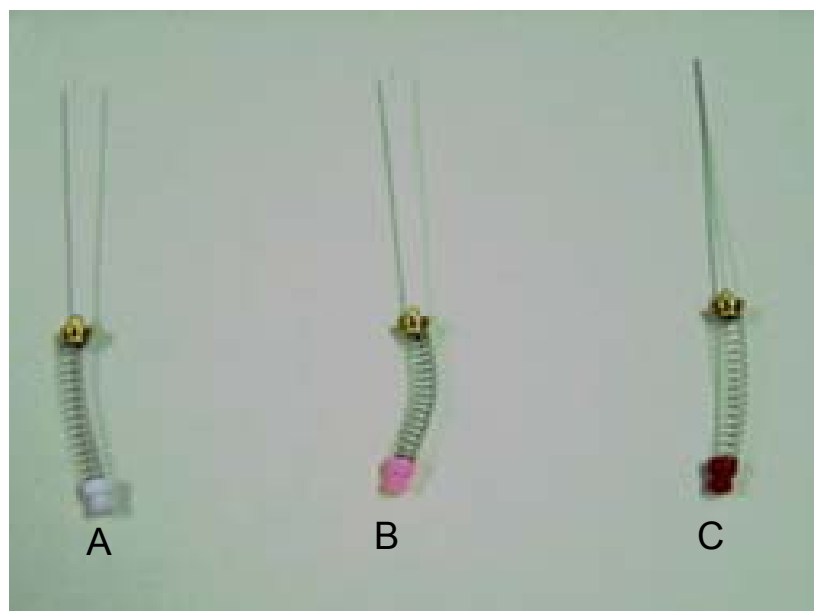
### Recubrimientos de la fibra

Actualmente, se encuentran disponibles tres tipos de recubrimientos poliméricos para las fibras de SPME (**Figura 8**). Películas de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) de diferentes espesores (7, 30 y 100  $\mu\text{m}$ ), poli(acrilato) (PA) de 85  $\mu\text{m}$ , y la mezcla de fases de 65  $\mu\text{m}$  poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS-DVB), Carboxen – PDMS de 75  $\mu\text{m}$ , Carbowax (CW)-DVB de 65  $\mu\text{m}$ .



**Figura 8.** Estructura química de los diferentes recubrimientos poliméricos para las fibras de SPME.

Las fibras de PDMS y PA, fueron las primeras usadas en la microextracción en fase sólida. PDMS es de naturaleza apolar y presenta una gran afinidad hacia compuestos no polares como los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), compuestos orgánicos volátiles (VOC's) y algunos pesticidas. La fibra de PA, posee un recubrimiento más polar y facilita la extracción de compuestos polares como los fenoles y sus derivados y algunos pesticidas. Las fibras con recubrimientos mixtos de PDMS-DVB, PDMS-CARBOXEN y CW-DVB son más recientes, son más polares que la fibra de PA, por lo tanto, se recomiendan para la extracción de compuestos más polares como alcoholes y éteres [23-27]. Algunas fibras empleadas para la SPME y disponibles comercialmente se pueden apreciar en la **Figura 9**.



**Figura 9. Fibras empleadas en la microextracción en fase sólida. A. Poli(acrilato) (PA). B. Poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS-DVB). C. Poli(dimetilsiloxano) (PDMS). Obtenidas de Supelco Inc. (Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.).**

El procedimiento de extracción, descrito anteriormente, consiste en la exposición de la fibra a un pequeño volumen de una muestra acuosa o a su espacio de cabeza (*headspace*) por un

cierto período de tiempo. Las condiciones de extracción se ven afectadas por variables como: agitación de la muestra, ya que permite lograr el equilibrio más rápidamente, pues permite la difusión de los analitos hacia la fibra. Los compuestos con coeficientes de difusión muy bajos tienen tiempos de equilibrio más largos. En este caso, para disminuir el tiempo de análisis es necesario construir una curva que relacione la dependencia del tiempo de la extracción con la concentración del analito. El tiempo más corto, es escogido de acuerdo con el límite de detección del compuesto de interés; de igual manera, se hace necesario controlar el tiempo de exposición con el fin de obtener una buena reproducibilidad. La temperatura de extracción, también debe ser considerada ya que puede tener dos efectos contrarios sobre la SPME. Un aumento de la temperatura favorece la difusión de los analitos hacia la fibra, además, en el modo *headspace*, la temperatura ayuda a promover la transferencia de analitos a la fase vapor de la muestra. Por otro lado, se considera que la adsorción es un proceso exotérmico por lo que un incremento de la temperatura reduce la constante de distribución del analito. El pH de la muestra es importante en el análisis de compuestos de naturaleza ácida o básica (fenoles y aminas), puesto que se requiere que se mantengan en su forma no disociada. El efecto salino o *salting out* se logra mediante la adición de sal, por ejemplo, cloruro de sodio (NaCl) o sulfato de sodio (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), con la finalidad de aumentar la fuerza iónica de la solución. Esto hace, que los compuestos orgánicos sean menos solubles, incrementando los coeficientes de partición [24].

Algunas de las variables que pueden afectar la SPME son:

- *Condiciones de agitación;*
- *Tiempo de muestreo ( si no se logran condiciones de equilibrio);*
- *Temperatura;*
- *Volumen de la muestra;*
- *Volumen headspace;*
- *Tamaño del vial;*

- *Tipo de fibra;*
- *Componentes de la matriz de la muestra (sales, materia orgánica, humedad, etc.);*
- *Tiempo que transcurre entre la extracción y el análisis;*
- *Pérdida de analitos (adsorción en la paredes del vial, permeación a través del teflón, absorción por el septum);*
- *Modo de inyección al equipo cromatográfico.*

La SPME, fue propuesta inicialmente como un método de extracción para su aplicación en el análisis ambiental, y es así como se encuentran numerosos reportes de trabajos de investigación en esta área, que incluyen análisis de aire, aguas superficiales y subterráneas, agua de mar, aguas de desecho y suelos [23,24]. Actualmente, el campo de aplicación de la SPME ha sido ampliado a otros campos, una muestra de ello, lo constituyen las numerosas publicaciones que se pueden encontrar: artículos con información general sobre la técnica (5%), aplicaciones ambientales (40%), análisis de alimentos y aplicaciones botánicas (20%), aplicaciones clínicas y forenses (20%), y reportes de desarrollos fundamentales de la técnica (15%) [24]. La mayor parte de estos trabajos reportan la combinación de la SPME con cromatografía de gases (GC) usando detectores específicos, como herramienta analítica, sólo un pequeño porcentaje (5%) emplea la cromatografía líquida de alta eficiencia como procedimiento analítico.

### **1.3 DERIVACIÓN QUÍMICA**

Generalmente, uno de los mayores desafíos al realizar un análisis orgánico, lo constituye el análisis de compuestos volátiles polares, ya que no sólo son difíciles de aislar de las muestras ambientales o de matrices biológicas, sino que su separación en la columna cromatográfica también constituye un problema analítico. La derivación química se presenta como una alternativa analítica por las siguientes razones [20, 22, 25, 28]:

- ❖ Mejora la resolución y reduce el efecto de *tailing* (coleo) de los compuestos polares, que contienen -OH, -NH<sub>2</sub>, -SH y otros grupos funcionales polares o su combinación.

- ❖ Permite el análisis de compuestos relativamente no-volátiles, aumentando la volatilidad de los derivados.
- ❖ Mejora la eficiencia analítica e incrementa la detectabilidad de los compuestos, como también, mejora su estabilidad.

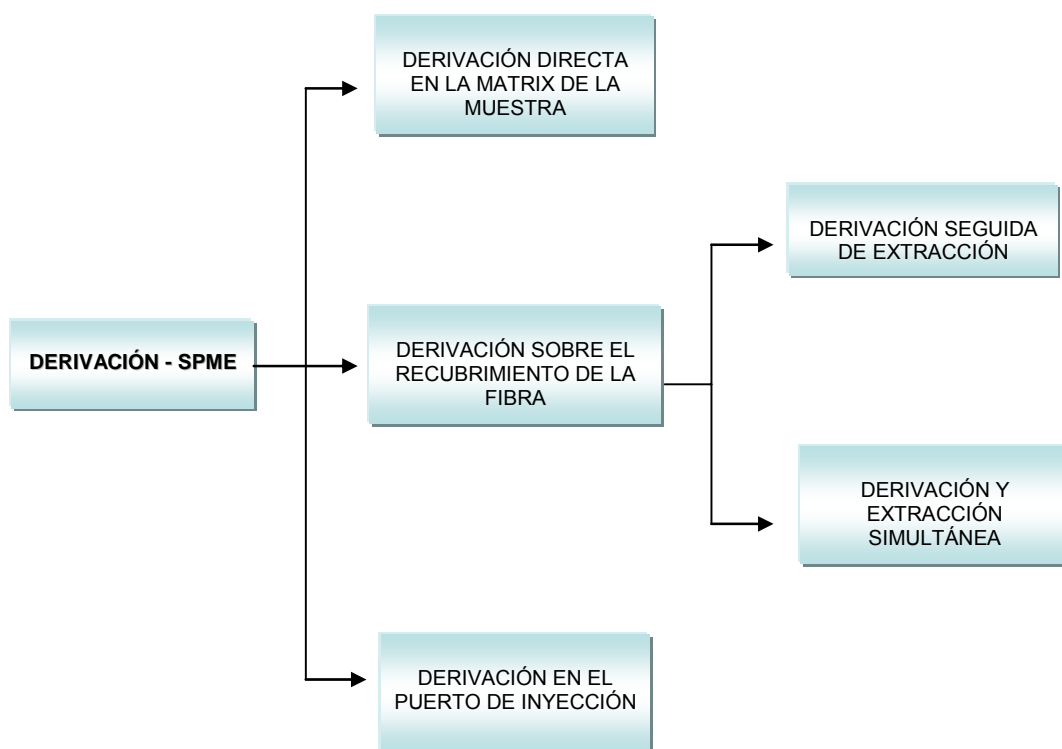
En general, la derivatización puede ser usada para mejorar la detectabilidad de muestras por parte del detector de captura de electrones. Los sustituyentes halogenados incrementan la afinidad electrónica en el siguiente orden  $I > Br > Cl > F$  [29]. La estructura química y las propiedades de la molécula influyen la escogencia del agente derivante, que debe cumplir además con las siguientes condiciones [28-30]:

- ❖ La reacción de derivación se completa en un 95-100%;
- ❖ No causa reordenamientos o alteraciones estructurales durante la formación del derivado;
- ❖ No contribuye a pérdidas de la muestra durante la reacción;
- ❖ Produce derivados que no interactúan con la columna analítica (GC o HPLC);
- ❖ Los derivados obtenidos son estables con respecto al tiempo.

Varias técnicas de derivación pueden ser implementadas en combinación con la microextracción en fase sólida, a saber: derivación directa la matriz de la muestra, saturación de la fibra con el agente derivatizante, derivación *in situ*, directamente sobre la fibra generalmente en el headspace de la muestra; y derivación en el puerto de inyección cromatográfico (**Figura 10.**) [23-28]. De estas tres modalidades, el más interesante y con mayor potencial de aplicación es el de la derivación *in situ* sobre la fibra, por su alta eficiencia y su facilidad para el monitoreo en campo. Sin embargo, este procedimiento es limitado por la baja volatilidad de algunos agentes derivatizantes. Se ha reportado un gran número de aplicaciones de esta metodología, en especial, en la determinación de aldehídos presentes en diferentes matrices, tales como, aire, agua (determinación de formaldehído),

bebidas (cerveza, vinos), aceites vegetales, e.g. medición de los compuestos carbonílicos formados por degradación térmica, entre otros [31].

Es importante resaltar, que la mayoría de las publicaciones consultadas para la realización de este trabajo, reportan que los ácidos carboxílicos de cadena corta ( $C_2-C_6$ ) o ácidos grasos volátiles, son los compuestos orgánicos que, junto con otras especies orgánicas, como los aldehídos y compuestos azufrados, contribuyen al origen del mal olor, no sólo el originado en el cuerpo humano, sino también a nivel ambiental en sitios de aguas estancadas, lugares de crías de cerdo, depósitos de basuras, entre otros casos.



**Figura 10. Diferentes modos de derivación química combinados con SPME [21].**

## 1.4 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

La amplia diversidad estructural de los ácidos grasos de cadena corta y larga y sus derivados están incorporados a una gran cantidad de biomoléculas como componentes de antibióticos, feromonas de insectos y lípidos de reserva en plantas [32].

La determinación de ácidos carboxílicos es un requerimiento en numerosas investigaciones científicas como también por sus aplicaciones ambientales regulatorias. Matrices biológicas (plasma, orina, tejidos homogéneos) contienen un gran número de analitos con grupos funcionales carboxilo, lo que exige una alta resolución por lo que la cromatografía de gases es el método de análisis más adecuado. Estudios en fisiología, farmacología y toxicología ambiental, requieren de la determinación de ácidos carboxílicos en varios tipos de matrices como aguas naturales, sangre, plasma y orina. En el caso del olor humano, los ácidos grasos libres son metabolitos que se forman en las glándulas sebáceas, y en cantidades más altas resultan de la actividad bacterial a través de la hidrólisis de los triglicéridos a ácidos grasos libres sobre la piel [16].

Las técnicas analíticas empleadas para medir los ácidos carboxílicos incluyen cromatografía de intercambio iónico o de exclusión iónica, cromatografías líquida y de gases, pero generalmente presentan una resolución bastante baja, además que su empleo es costoso, y se requiere el uso de patrones para la identificación de los compuestos de interés. Debido a la gran volatilidad de los ácidos grasos de cadena corta, se dificulta su análisis por cromatografía de gases capilar, mientras que los ácidos de cadena larga son compuestos poco volátiles, por lo que requieren altas temperaturas para eluir, con la posibilidad de su degradación en la columna. Por lo tanto, se hace necesario incluir la derivación química como una etapa obligatoria en la determinación de ácidos carboxílicos.

Van den Bogaard y sus colaboradores [33], emplearon el análisis cromatográfico para la identificación de ácidos grasos volátiles producidos por la acción de bacterias anaerobias durante un proceso infeccioso. Para este estudio, realizaron una curva de calibración de ácidos carboxílicos (C<sub>1</sub> – C<sub>7</sub>) con la finalidad de realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de estos compuestos, presentes en un medio de cultivo donde se diagnosticó una posible infección por acción de bacterias anaerobias. Compararon tres (3) tipos de fases estacionarias recomendadas para el análisis de ácidos grasos en medios acuosos (Carbowax, Chromosorb 101 y SP 1200) y utilizaron cuatro (4) métodos de preparación de muestras (destilación al vacío, tamices moleculares, análisis *headspace* y extracción con éter) y posterior análisis cromatográfico. Concluyeron que la columna cromatográfica que mostró un mejor desempeño fue la Carbowax. En cuanto a los métodos de preparación de muestras, el aislamiento de los ácidos mediante un tamiz molecular (columnas con Dowex –resina de intercambio catiónico) presentó una buena opción para el análisis cuantitativo de estos compuestos.

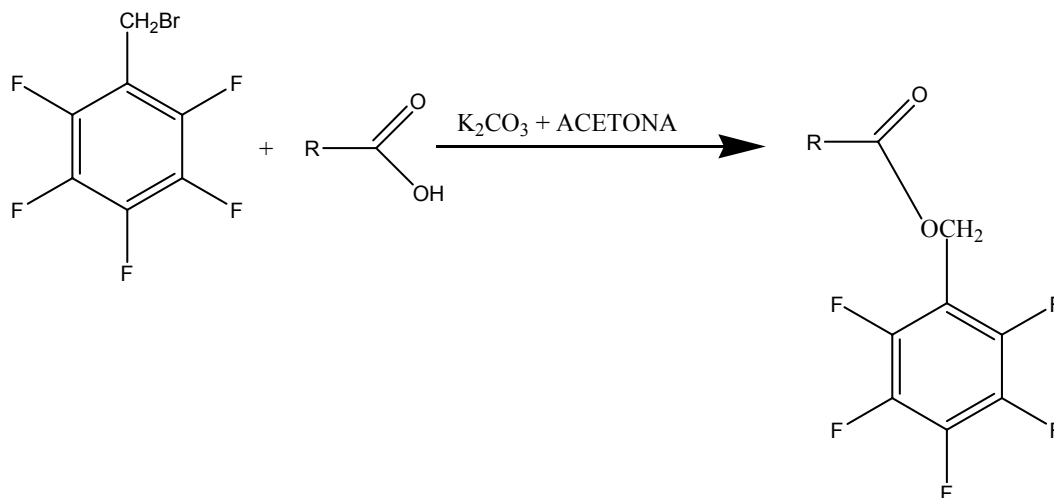
Pan y Pawliszyn [34] usaron el diazometano como un reactivo para la derivación analítica, basada en técnicas de fase sólida conocidas como SPAD (*Solid-Phase Analytical Derivatization*), los investigadores combinaron este método de derivación con la SPME en el modo *headspace*. El método propuesto consta de tres etapas: los ácidos carboxílicos fueron adsorbidos sobre el recubrimiento polimérico de la fibra. La fibra enriquecida con los ácidos carboxílicos fue expuesta al diazometano para llevar a cabo la derivación. Finalmente, la fibra fue llevada hasta el puerto de inyección del equipo cromatográfico para realizar la desorción térmica de los derivados obtenidos. Otros métodos de derivación aplicados, involucran la formación de ésteres empleando reactivos específicos como el 1-pirenildiazometano (PDAM) [34].

Abalos M *et al* [35] desarrollaron un procedimiento basado en la HS-SPME acoplado a GC-FID-MS en el modo de ionización química negativa para la determinación de ácidos

carboxílicos (C<sub>2</sub>–C<sub>7</sub>) en muestras acuosas. Evaluaron cinco (5) recubrimientos para fibras de SPME (PA, CW-DVB, PDMS-DVB, PDMS-CAR, PDMS-CAR-DVB). La fibra que presentó una alta sensibilidad y precisión fue la de PDMS –CAR, con límites de detección del rango de µg/L.

Otro método de derivación química adecuado para el análisis los ácidos carboxílicos es la alquilación, la cual permite reducir la polaridad de los compuestos mediante el reemplazo de hidrógenos activos con un grupo alquilo. Estos reactivos se usan para modificar compuestos con hidrógenos ácidos presentes en los ácidos carboxílicos y fenoles, obteniéndose ésteres, éteres, alquil aminas y alquil amidas [30].

Un ejemplo, de este tipo de reacciones es el que se lleva a cabo con el bromuro de pentafluorobencilo (PFBBr). Los ésteres de pentafluorobencilo poseen excelentes propiedades para el análisis cromatográfico y pueden ser detectados aun en muy bajas concentraciones empleando detectores específicos como el de captura de electrones [35]. El bromuro de pentafluorobencilo, se conoce también como  $\alpha$ -bromo-2,3,4,5,6-pentafluorotolueno. Este es un fuerte lacrimógeno y debe ser manejado con precaución. La reacción de derivatización de los ácidos carboxílicos con PFBBr, se presenta en la **Figura 11**.



**Figura 11. Reacción de derivación de los ácidos carboxílicos con bromuro de pentafluorobencilo (PFBBr) [36].**

Chien, *et al.* [37] en 1998, describen el desarrollo de un método para determinar ácidos carboxílicos en aire empleando el PFBBr como agente derivatizante seguido del análisis GC-MS con trampa iónica. Los derivados obtenidos son estables y fácilmente separados empleando la GC y la detección con MS mejora la sensibilidad y selectividad del método. Otros trabajos reportan el análisis de derivados de PFBBr usando GC-MS con impacto de electrones o ionización química con iones negativos. Los espectros de masas de estos derivados muestran el ion fragmento característico con relación  $m/z$  181, pero no proveen una adecuada información sobre la estructura química o su peso molecular [38].

## 1.5 ALDEHÍDOS VOLÁTILES

La presencia de aldehídos es considerada como una evidencia de que reacciones radicalicas se están llevando a cabo. Altos niveles de aldehídos son considerados también como potenciales indicadores del estrés oxidativo y han sido propuestos para diagnosticar algunos estados de cáncer. La determinación de los compuestos carbonílicos tiene casi siempre un gran impacto en las áreas de investigación farmacológica, fisiológica y toxicológica. Estos compuestos carbonílicos, pueden ser moléculas tan sencillas como el formaldehído o tan complejas como la prostanglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). También se encuentran presentes en matrices complejas de analizar como el aire, el agua, el plasma sanguíneo y la orina. Debido a su alta volatilidad y reactividad, se hace necesario implementar técnicas de derivación para los aldehídos, previo su análisis cromatográfico [39].

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas fue aplicada para el análisis de aldehídos en aliento humano. Sin embargo, debido a su gran volatilidad, solubilidad y reactividad, la determinación de aldehídos en aliento y sangre presenta muchas dificultades, por lo cual, la aplicación de la derivación química es necesaria. El ácido 2-tiobarbitúrico fue usado para derivar malonaldehído en un condensado de aliento, seguido del análisis por cromatografía líquida con detector de fluorescencia [39].

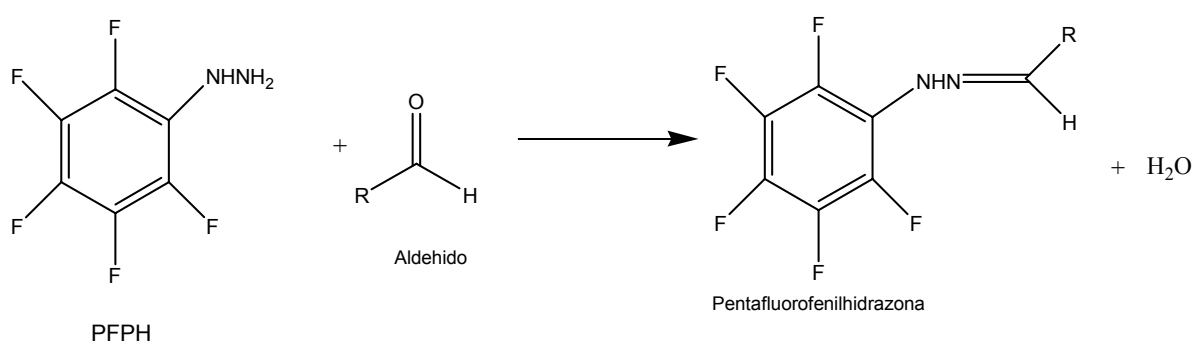
La derivatización de compuestos carbonílicos con PFBHA puede ser lograda bajo condiciones suaves de reacción (temperatura ambiente y en medios acuosos). La reacción es muy rápida y las oximas correspondientes se forman en minutos. La derivación con PFBHA combinada con la GC-MS ha sido empleada para la determinación de aldehídos en agua, aire y en fluidos corporales, sin embargo, el método de extracción de las oximas es algo tedioso [39].

Pawliszyn *et al.* [20, 21] introdujo la SPME como un método de extracción sencillo, sensible y sin solventes. La SPME con derivatización, seguida por GC-MS, fue aplicada al análisis de aldehídos en agua [35]. Martos y Pawliszyn [40], reportaron la cuantificación

de formaldehído en aire, empleando una fibra de PDMS-DVB, previamente saturada con el agente derivatizante, PFBHA.

Deng y Zhang [39] emplearon la SPME/GC-MS para la determinación de aldehídos en sangre. Los aldehídos fueron extraídos con HS-SPME y posteriormente derivados sobre la fibra, previamente saturada con PFBHA. Emplearon una fibra de PDMS-DVB de 65  $\mu\text{m}$ . Con esta metodología lograron determinar altas concentraciones de hexanal y heptanal en muestras de sangre de pacientes diagnosticados con cáncer del pulmón, lo que sugiere que estos compuestos pueden constituirse en elementos biomarcadores en este tipo de enfermedades.

Stashenko *et al.* [41], emplearon como agente derivatizante la pentafluorofenilhidracina (PFPH), para la derivación de compuestos carbonílicos sobre la fibra de SPME en el modo *headspace*, obteniendo de este modo, las respectivas hidrazonas (**Figura 12**), las cuales fueron analizadas por GC-ECD. Inicialmente, esta metodología fue aplicada a la determinación de los compuestos carbonílicos que se forman durante la peroxidación lipídica térmicamente inducida, luego, fue extendida a la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales usando como marcador la presencia de hexanal en un sistema lipídico modelo para medir el efecto protector contra la oxidación [41].



**Figura 12. Reacción de derivación de los aldehídos con pentafluorofenilhidracina (PFPH).**

El objetivo fundamental de este trabajo de investigación, consistió en proponer una metodología analítica útil en la identificación de compuestos de naturaleza química carbonílica y carboxílica, presentes en la sudoración humana. Para la determinación de los ácidos carboxílicos (C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub> y el ácido benzoico), se empleó la derivación directa sobre la matriz, con bromuro de pentafluorobencilo (PFBB<sub>r</sub>), obteniéndose los ésteres de pentafluorobencilo mediante una reacción de alquilación en medio acuoso. En el caso de los aldehídos volátiles (C<sub>2</sub>- C<sub>10</sub>), el modo de derivación fue *in situ* sobre la fibra de SPME, empleando la pentafluorofenilhidracina (PFPH), obteniéndose las respectivas hidrazonas. Los compuestos derivados fueron extraídos empleando la microextracción en fase sólida en el modo headspace (HS-SPME) y analizados por cromatografía de gases acoplada con detector selectivo de captura de electrones (GC-ECD).

Adicionalmente, se estudió el efecto del uso del talco para los pies, sobre la composición de los ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles, siguiendo la misma metodología de análisis. Se comparó además la composición química del sudor de los pies con el sudor axilar, para tener una idea de la dependencia de la composición química del sudor con la parte del cuerpo que lo produce.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental para la determinación de los compuestos carboxílicos y carbonílicos presentes en las muestras de sudor humano, se realizó en varias etapas, las cuales se describen a continuación:

### 2.1 Determinación de los ácidos carboxílicos de cadena corta, en muestras de sudor humano, mediante su derivatización y posterior análisis por SPME/GC-ECD.

Para la determinación de los ácidos carboxílicos, fue necesario aplicar la derivación directa en la matriz de la muestra y, posteriormente, se realizó la microextracción de fase sólida en el modo *headspace*. La reacción se llevó a cabo en medio acuoso y como agente derivatizante se utilizó el PFBBr. Esta metodología fue implementada en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS, para el Proyecto de Doctorado “*Monitoreo de compuestos orgánicos volátiles en aire, empleando SPME*”, desarrollado por la química Amanda Lucía Mora Martínez.

Este procedimiento conllevó la ejecución de las siguientes etapas:

#### 2.1.1 Preparación de los reactivos:

##### Agente derivatizante PFBBr

Se preparó una solución de agente derivatizante de bromuro de pentafluorobencilo, PFBBr (99%, *Aldrich*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) de concentración 437 mM, para lo cual se tomó un volumen de 660  $\mu$ L del reactivo puro y se aforó a un volumen de 10 mL con acetona (99,8%, *Mallinckrodt AR*, Xalostoc, Estado de México, México).

## **Preparación de solución de ácidos**

Se preparó una solución *stock* (10 mM) de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, para lo cual se emplearon los siguientes ácidos: ácido acético glacial (99,9%, *Mallinckrodt AR*, Xalostoc, Estado de México, México), ácidos propiónico, butírico, valérico, hexanoico y benzoico (99%, *Merck-Schuchardt*, Hohenbrunn, Alemania). El solvente utilizado en la preparación de esta solución fue acetona (99,8%, *Mallinckrodt AR*, Xalostoc, Estado de México, México).

### **2.1.2 Obtención de los ésteres de pentafluorobencilo (derivados de los ácidos carboxílicos) en medio orgánico.**

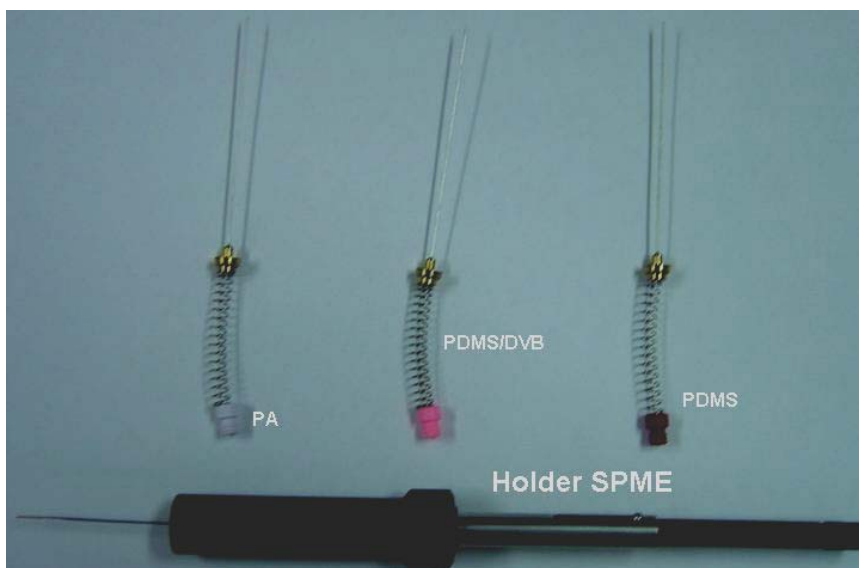
Se preparó una solución de ácidos (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, y benzoico) en acetona (concentración 8 ppm), a la cual se añadieron 31,25 mg de PFBBr y 12.5 mg de carbonato de potasio, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (99%, *Merck-Schuchardt*, Hohenbrunn, Germany), y se sometió a reflujo durante 3 hrs. Una vez cumplido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente. El producto de la reacción se trató con una mezcla de éter etílico (99,9%, *J. T. Baker, Phillipsburg*, New Jersey, EE.UU.) y acetato de etilo acetato de etilo (99,9%, *Mallinckrodt AR*, Xalostoc, Estado de México, México), en relación de la mezcla 1:25. El extracto obtenido se lavó con una pequeña cantidad de agua y luego se secó con NaSO<sub>4</sub> anhidro. El extracto se disolvió en *n*-hexano grado reactivo (96%, *Merck KGaA*, Darmstadt, Alemania).

La derivatización de los ácidos carboxílicos se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kawahara [42]. Por medio de esta reacción se obtuvieron los ésteres de pentafluorobencilo, los cuales facilitaron el análisis de los ácidos carboxílicos empleando un cromatógrafo de gases modelo HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un sistema de inyección *split/splitless* y un detector ECD.

Adicionalmente, se obtuvieron los espectros de masas para estos derivados, en un cromatógrafo de gases modelo HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas (*Hewlett-Packard 5972A*), con sistema de datos *HP ChemStation* y bibliotecas de espectros NBS75K y Wiley 138K.

### 2.1.3 Selección del recubrimiento de la fibras de SPME

Teniendo en cuenta a la naturaleza química de los compuestos de interés (aldehídos y ácidos carboxílicos), presentes en las muestras de sudor, se seleccionó el tipo de fibra adecuada. Para tal fin se evaluaron los recubrimientos de poli(acrilato) (PA, 85 $\mu$ m), poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100  $\mu$ m), poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno (PDMS/DVB, 85  $\mu$ m), obtenidos de *Supelco Inc.*, Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.) (Ver **Figura 13**).



**Figura 13.** Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME), para muestreo manual, con fibras con recubrimientos poliméricos de poli(dimetil)siloxano (PDMS), poli(acrilato) (PA) y poli(dimetil)siloxano-divinilbenceno (PDMS/DVB), obtenidos de *Supelco Inc.* (Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.).

#### 2.1.4 Evaluación de las condiciones de reacción para la obtención de los derivados de los ácidos carboxílicos en medio acuoso.

La derivación de los ácidos carboxílicos con PFBBr se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Kawahara [42], quien obtuvo los derivados de los ácidos con PFBBr en medio orgánico (acetona) (procedimiento descrito en el **Numeral 2.1.2**). En el desarrollo de la Tesis de Doctorado “*Monitoreo de compuestos orgánicos volátiles en aire, empleando SPME*” de la estudiante Amanda Lucia Mora M., se propuso la derivación de los ácidos carboxílicos con PFBBr, pero en medio acuoso, por lo que se hizo necesario estudiar las condiciones de reacción adecuadas para este medio. Las variables estudiadas y los valores medidos se listan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2. Variables de reacción de derivación de ácidos carboxílicos con PFBBr en medio acuoso.**

pH	Tiempo, hrs	Temperatura, °C	Concentración de PFBBr, mM
3	1	60	1.08
6	2	70	1.40
7	3	80	1.72
8	4		2.15
	5		3.23

El procedimiento general de derivatización de los ácidos carboxílicos se describe a continuación:

De la solución *stock* de ácidos carboxílicos (10 mM c/u), se tomaron volúmenes específicos para preparar soluciones de 25 mL y concentración 40 mM. De estas nuevas soluciones, se tomaron 9 mL y se transfirieron a los viales ámbar de rosca (*Supelco*, Bellefonte, Palo Alto,

EE.UU.), de 12 mL; seguidamente, se agregó 1 mL de solución de  $K_2CO_3$  (500 ppm) y, al final, el agente derivatizante.

Posteriormente, los viales de reacción, se sellaron (con tapas y *septa* de PTFE virgen blancos, *Agilent Technologies*), se colocaron en un baño de agua, con temperaturas 40 – 80°C, durante un tiempo de reacción comprendido entre 1 y 5 hrs. Para asegurar que la temperatura se mantuviera estable durante todo el tiempo de reacción, se empleó un equipo evaporador *TurboVap LV* (*Zymark Corporation*, Hopkinton, Massachussets, EE.UU.), dotado con sistemas de control de temperatura y presión automáticos. Una vez concluido el tiempo de reacción, se retiraron los viales del sistema de calentamiento y se depositaron en un baño de agua con hielo, con la finalidad de detener la reacción de derivación. Se prepararon blancos y duplicados de las muestras, posteriormente, se procedió a realizar la extracción con SPME en el modo *headspace*.

#### **2.1.5 Evaluación de las condiciones de extracción para la determinación de los derivados de los ácidos carboxílicos.**

Se tomaron 2 mL de la muestra de reacción y se transfirieron a un vial para *SPME* (viales ámbar de rosca, *Supelco*, Bellefonte, Palo Alto, EE.UU.), de 5 mL, y se evaluaron los siguientes parámetros de extracción de los derivados de los ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo):

- 1 Tiempo de extracción (20, 30, 40 y 80 min);
- 2 Efecto salino (10, 20 y 30 % p/v de NaCl);
- 3 Temperatura de extracción (20, 30 y 40 °C);
- 4 pH de extracción (3, 7, 9).

Para la extracción, se empleó una fibra de SPME con recubrimiento de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m y soporte para inyección manual obtenidos de *Supelco* (Bellefonte, Palo Alto, EE.UU.).

Se utilizó además una barra de agitación magnética de 10 x 3 mm, recubiertas con PTFE blanco y la velocidad de agitación fue de 800 rpm. Para estos ensayos, la concentración de ácidos fue de 40 mM, y el agente derivatizante de 430 mM.

### **2.1.6 Obtención de las muestras de sudor humano (pies).**

Para el desarrollo de este trabajo, se contó con la colaboración de 5 voluntarios de sexo masculino, con edades comprendidas entre los 23 y 28 años y en buen estado físico. A estas personas se les hizo entrega del material necesario con las indicaciones adecuadas para realizar el muestreo de una manera estándar. Los elementos suministrados a los participantes de este estudio aparecen en la **Figura 14** y consistieron en:

- Gasa aséptica, *Hansaplast* (Beiersdorf S.A, Acopi – Yumbo, Colombia, Registro Invima No. 2003V-0001871);
- Algodón prensado y precortado (100% algodón), *Hansaplast* (importado por *Beiersdorf S.A*, Registro Invima No. V-004323);
- Papel de vinilo, marca comercial;
- Calzado deportivo en tela, *North Star* (Compañía Manufacturera Manisol S.A., Manizales- Colombia. Referencias 809-5011, 809-9011 y 809-6011)
- Medias deportivas en hilo *Athlon* (Medellín – Colombia)

Al momento del muestreo, se colocaron la plantilla de algodón, así como se observa en la **Figura 14**. Este vendaje fue utilizado por los participantes en el estudio, durante una jornada laboral normal (8 hrs), al final de la cual se retiró, para su posterior análisis.



Material utilizado en el monitoreo de los componentes volátiles carbonílicos y carboxílicos del sudor humano.



El lavado de los pies se hizo sólo con agua, no utilizaron jabón, ni talcos o productos antitranspirantes, por lo menos dos días antes del muestreo.



Plantilla de algodón empleada para atrapar el sudor.

**Figura 14. Material entregado a los participantes en el monitoreo de los componentes volátiles presentes en el sudor de los pies.**

### **2.1.7 Aplicación de la metodología para la determinación de los ácidos carboxílicos en muestras de sudor humano (pies).**

Los participantes en este estudio, utilizaron la plantilla de algodón durante 8 hrs, al término de las cuales, se retiró el vendaje y se procedió a su respectivo análisis. Se recortaron y pesaron aproximadamente 2 g de la plantilla de algodón usada, que se colocaron en un frasco tapa azul, de 25 mL de volumen; luego, se le agregó agua HPLC (*Mallinckrodt Baker S.A*, México), con el fin de solubilizar la fracción de ácidos carboxílicos presentes en el vendaje (desorción líquida de los analitos) (Ver **Figura 14**). El trozo de plantilla, se dejó sumergido por una (1) hora; al cabo de ésta, se retiró el vendaje y el extracto obtenido de esta manera, se transfirió a los viales de reacción y se continuó con el procedimiento de derivatización anteriormente descrito en el Numeral **2.1.4** de la Parte Experimental.

Una vez obtenidos los derivados de los ácidos carboxílicos, aislados del vendaje, se procedió a la etapa de SPME en el modo *headspace*, teniendo en cuenta las mejores condiciones encontradas en pruebas preliminares (temperatura de extracción: 30 °C, tiempo de extracción: 40 min, concentración de NaCl 20 % p/v). Luego, se procedió al análisis cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos presentes en la muestra de sudor.



Desorción en medio acuoso de los ácidos carboxílicos retenidos en la plantilla de algodón.



Adición del agente derivatizante PFBBr a la solución de ácidos carboxílicos.



Reacción de alquilación



Calentamiento en baño María: 60°C  
Tiempo de reacción: 4 hrs.

Solución de reacción: ácidos carboxílicos en fase acuosa + PFBBr +  $K_2CO_3$

**Figura 15. Procedimiento analítico para la derivación de los ácidos carboxílicos recolectados en plantillas de algodón.**

## **2.2 DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS DE BAJO PESO MOLECULAR PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE SUDOR**

### **2.2.1 Preparación de la solución de pentafluorofenilhidracina**

Se preparó una solución de pentafluorofenilhidracina (99%, *Aldrich*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU), de concentración 2.4 mM, para ello se pesaron 118,85 mg del reactivo, se disolvieron en un volumen de 250 mL de agua grado HPLC (*Mallinckrodt ChromAR*, Xalostoc, Estado de México, México).

### **2.2.2 Preparación de solución de aldehídos.**

Se preparó una solución *stock* (20 mM) de aldehídos volátiles, para lo cual se emplearon patrones de los compuestos carbonílicos, a saber: etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal, octanal, nonanal, decanal (99%, *Aldrich*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.).

### **2.2.3 Derivación *in situ* con PFPH de los aldehídos sobre la fibra de SPME.**

Para la determinación de los aldehídos (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>), se seleccionó la fibra de PDMS/DVB (65 μm), teniendo en cuenta su más alta capacidad para retener el agente derivatizante PFPH, en comparación con otras fibras (PDMS y PA). El modo de derivación empleado en este caso, fue *in situ*, o sea directamente sobre la fibra de SPME. Esta metodología ha sido implementada en varios trabajos de investigación [31,41], desarrollados en el Laboratorio de Cromatografía de la UIS.

#### **2.2.4. Monitoreo de aldehídos volátiles en muestras de sudor originado en los pies.**

En la etapa de muestreo de los aldehídos volátiles presentes en los vendajes de sudor recolectado, se procedió inicialmente a exponer la fibra de PDMS/DVB, (85 $\mu$ m) a los vapores de la solución del agente derivatizante (PFPH, 2.4 mM), durante un tiempo de 10 min, con el fin de saturar la fibra con este compuesto (**Figura 16**).

Una vez realizado el procedimiento de saturar la fibra con el agente derivatizante, se tomó una fracción del vendaje (aproximadamente, 2 g) y se introdujo en un vial estándar para *headspace* de 12 mL, se selló y se llevó a un baño María durante 10 min a una temperatura de 40°C. Este procedimiento se realizó para lograr una etapa de pre-equilibrio de la muestra antes de exponer la fibra de SPME a los analitos de interés.

Una vez concluida la etapa de pre-equilibrio de la muestra, se procedió a exponer la fibra (previamente saturada con PFPH) a los volátiles presentes en la muestra de sudor, por un período de 20 min, al cabo de los cuales, la fibra se retiró del vial, que contenía la muestra y se llevó al puerto de inyección del equipo cromatográfico, para realizar el respectivo análisis y cuantificación de los derivados.



Saturación de la fibra de PDMS/DVB con la solución de PFPH (2.4 mM), 10 min, 27 °C.



Vial *headspace* de 12 mL con 2 g de gasa impregnada de sudor.



Calentamiento de la muestra en baño María a 40 °C, 20 min de exposición a la fibra de SPME.



Extracción – derivación simultánea de aldehídos volátiles sobre la fibra de PDMS/DVB (65µm), saturada previamente con PFPH.

**Figura 16. Procedimiento analítico para la derivación *in situ* con PFPH de los aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor.**

### **2.2.5 Determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular y aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor después de emplear talco para pies.**

En esta etapa del estudio, a los participantes se les solicitó continuar con el muestreo de sudor, empleando esta vez Talco Medicinal para los pies.

Para la recolección de la muestra, los voluntarios utilizaron el mismo material entregado al inicio del estudio y se les hizo entrega del talco para los pies: Talco Medicinal Yodora con *Triclosan* (Tecnofar TQ S.A., Villa Rica, Colombia, Registro Invima M-012797).

El procedimiento de uso de la plantilla de algodón fue el mismo (jornada laboral de 8 hrs). Una vez concluido este tiempo, se recibió la muestra y se procedió a su respectivo análisis, para determinar ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles, siguiendo el procedimiento ya establecido.

### **2.2.6 Determinación de ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles presentes en muestras de sudor humano originado en las axilas.**

Este ensayo se llevó a cabo con la participación de 3 voluntarios a quienes se les suministró el siguiente material (**Figura 17**).

- Gasa aséptica, *Hansaplast* (Beiersdorf S.A, Acopi – Yumbo, Colombia, Registro Invima No. 2003V-0001871);
- Algodón prensado y precortado (100% algodón), *Hansaplast* (importado por *Beiersdorf S.A*, Registro Invima No. V-004323);
- Camiseta blanca, elaborada en algodón.

Se elaboró una plantilla con algodón prensado y gasa antiséptica, de forma similar a la empleada para la recolección de las muestras de sudor originado en los pies. Esta plantilla

fue colocada sobre las axilas de los voluntarios seleccionados y sujetado con papel de vinilo y esparadrapo. El tiempo promedio de uso de este vendaje fue de 6 hrs. De la misma manera, que con el muestreo en los pies, se les solicitó a los participantes no aplicar jabones ni lociones sobre las axilas por lo menos dos (2) días antes del muestreo. Una vez recibida la muestra, se siguió el procedimiento ya establecido (Ver Numerales 2.1.7 y 2.2.4) para el análisis de estas muestras.



**FIGURA 17. Material entregado a los participantes en el monitoreo de los componentes volátiles presentes en el sudor de las axilas.**

## **2.3 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

### **2.3.1 Análisis por GC-ECD de los derivados de ácidos carboxílicos.**

El análisis de los derivados de los ésteres de pentafluorobencilo, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases modelo, HP-5890A *Series II* (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, EE.UU.), equipado con  $^{63}\text{Ni}$ -ECD, inyector *split/splitless* y sistema de datos HP ChemStation A. 06.03, operado bajo las siguientes condiciones:

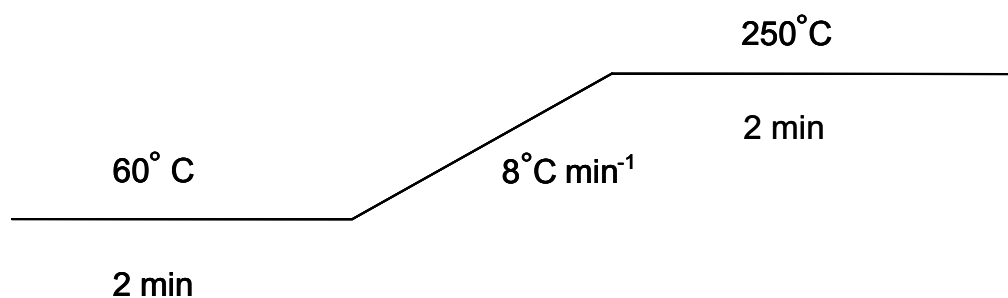
Inyector *split/splitless*, temperatura 250°C, relación *split* 1:30.

Detector de captura de electrones: 280 °C

Para la separación de los analitos de interés se utilizó una columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria entrecruzada e inmovilizada sobre la pared de la columna:

Columna DB-5 (*J&W, Scientific*, Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (f.e), con fase estacionaria 5%-fenilpoli(dimetilsiloxano).

La temperatura del horno se programó de la siguiente manera: 60°C (2 min)@ 8°C min<sup>-1</sup>, hasta 250°C (2 min).



Los flujos de gases empleados para el ECD y la columna fueron: argón: metano (9:1, 60 L/min), He (1 mL/min). La presión de entrada del gas de arrastre a la cabeza de columna: 90 kPa.

Para cada análisis, el dispositivo para SPME se inyectó de manera manual, reteniéndolo por 10 min en el puerto de inyección, con el fin de asegurar la desorción completa de los analitos hacia la columna cromatográfica.

En la **Figura 18**, se puede observar el proceso de inyección y desorción de la fibra de SPME en el equipo cromatográfico.

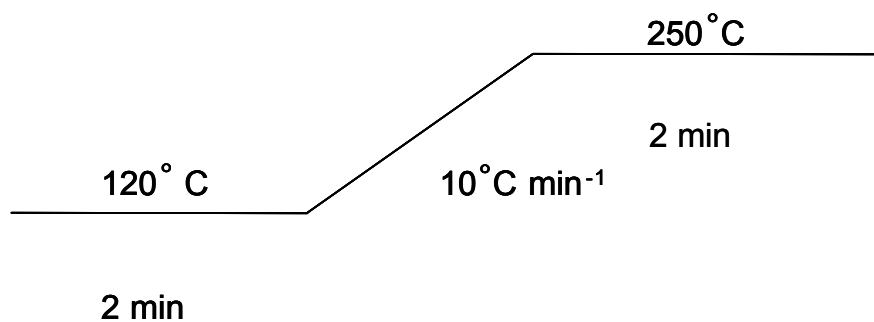


**Figura 18. Desorción térmica de la fibra en el puerto de inyección (split 1:10, 250°C) del cromatógrafo de gases equipado con ECD y columna DB-5 (30 m).**

### 2.3.2 Análisis por GC-ECD de los derivados de aldehídos volátiles.

El análisis de los derivados de aldehídos, pentafluorofenilhidrazonas, se realizó en un cromatógrafo de gases modelo HP-5890A *Series II* (Hewlett-Packard, PA, California, EE.UU.), equipado con un sistema de inyección *split/splitless* y un  $^{63}\text{Ni}$ -ECD, columna cromatografía DB-5 (J&W Scientific, Folsom, CA, EE.UU.) de 30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25  $\mu\text{m}$  ( $d_f$ ), con fase estacionaria 5% fenil poli(dimetil)siloxano, relación *split* 1:30. En el análisis de los datos cromatográficos se empleó el software HP ChemStation A.06.03.

La temperatura del horno se programó, así como aparece a continuación:



Para la desorción de la fibra de SPME cargada con derivados de aldehídos volátiles, la temperatura del puerto de inyección se mantuvo a 250 °C. El tiempo de desorción de las hidrazonas fue de 10 min.

### 3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente trabajo se desarrolló una metodología analítica que permitiera determinar e identificar compuestos carbonílicos (aldehídos volátiles, C<sub>2</sub> – C<sub>10</sub>) y carboxílicos de bajo peso molecular (C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>) más el ácido benzoico) presentes en sudor humano de pies. Para tal efecto, se empleó la derivación química de estos compuestos, combinada con la HS-SPME, para la extracción y concentración de los analitos de interés. El análisis de los derivados obtenidos se realizó por GC-ECD. El método empleado permitió obtener una alta sensibilidad y selectividad en el análisis de estos compuestos, además de reducir algunas etapas en la preparación de muestras como la extracción con solventes y posterior concentración de las muestras.

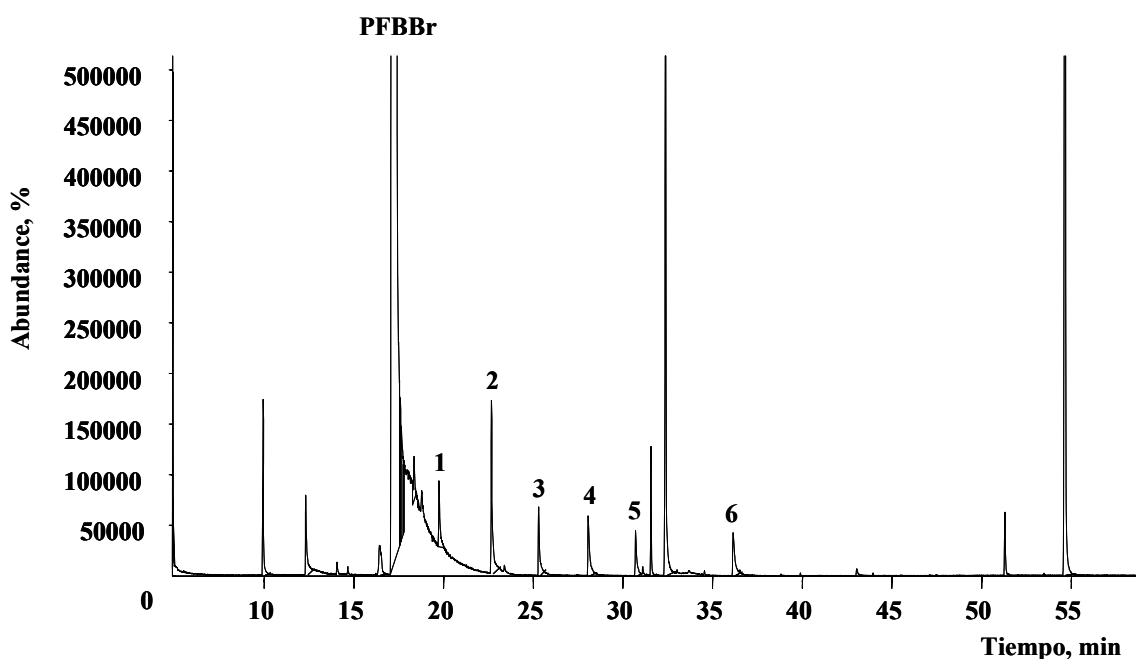
Las muestras de sudor fueron suministradas por 5 voluntarios de sexo masculino, en buen estado físico y salud. En el caso del análisis de los ácidos carboxílicos, las muestras fueron sometidas a desorción líquida y posterior derivación directamente en la matriz de la muestra, empleando el bromuro de pentafluorobencilo - PFBBr. Para los aldehídos, se empleó una porción de la plantilla y se llevó a cabo la derivación *in situ* sobre la fibra con pentafluorofenilhidracina - PFPH.

#### **3.1 Determinación de los ácidos carboxílicos mediante la derivación química en fase orgánica.**

Uno de los objetivos propuestos en este trabajo de investigación era determinar la presencia de ácidos carboxílicos en muestras de sudor humano, para cumplir con este propósito, se aplicó la metodología propuesta por Kawahara [42] en 1968, consistente en la derivatización de ácidos carboxílicos con bromuro de pentafluorobencilo; la reacción se llevó a cabo en medio orgánico empleando como solvente la acetona, y como catalizador el

$K_2CO_3$ , obteniéndose los respectivos ésteres de pentafluorobencilo para los ácidos acético, propiónico, butírico, valérico y el benzoico.

Los derivados obtenidos en la fase orgánica fueron analizados por GC-ECD e identificados mediante GC-MS obteniendo los respectivos espectros de masas. En la **Figura 19**, puede apreciarse el cromatograma correspondiente a las corrientes iónicas totales reconstruidas de los ésteres derivados de PFB.



**Figura 19.** Corriente iónica total reconstruida de los derivados de ácidos carboxílicos  $C_2-C_6$  (ésteres de pentafluorobencilo), obtenida en una columna HP-5 (60m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m). 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico

Los iones moleculares de los derivados presentan abundancias relativamente bajas (1-32%). El pico de base en los espectros de masas de los ácidos  $C_2-C_6$  y benzoico fue  $m/z$  181 (100%), y corresponde al ion  $[C_6F_5CH_2]^+$ .

Esta etapa del trabajo fue necesaria para tener patrones de referencia que permitieran la identificación de los derivados de ácidos obtenidos en fase acuosa. En la **Tabla 3**, se

presentan los ésteres de los ácidos carboxílicos obtenidos mediante la reacción de alquilación.

**Tabla 3. Ésteres de los ácidos carboxílicos, obtenidos por su derivación con PFBBr.**

No PICO	ÁCIDO CARBOXÍLICO	ÉSTERES DE PFBBr	PESO MOLECULAR
1	Acético, C <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	240
2	Propiónico, C <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	254
3	Butírico, C <sub>4</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	268
4	Valérico, C <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	282
5	Hexanoico, C <sub>6</sub>	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	296
6	Benzoico	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> C(O)OCH <sub>2</sub> C <sub>6</sub> F <sub>5</sub>	304

### 3.2 Determinación de los ácidos carboxílicos mediante la derivación química en fase acuosa.

La derivación de los ácidos carboxílicos con PFBBr, según una metodología propuesta por Kawahara [42], se realiza en fase orgánica (acetona). En el presente trabajo, el medio de reacción fue acuoso, por lo que se hizo necesario establecer las condiciones de reacción adecuadas para realizar este proceso, a saber: pH, tiempo y temperatura de reacción, y cantidad del agente derivatizante. Esta metodología fue también implementada en el Proyecto de Doctorado “*Monitoreo de compuestos orgánicos volátiles en aire, empleando SPME*”, desarrollado por la química Amanda Lucía Mora Martínez.

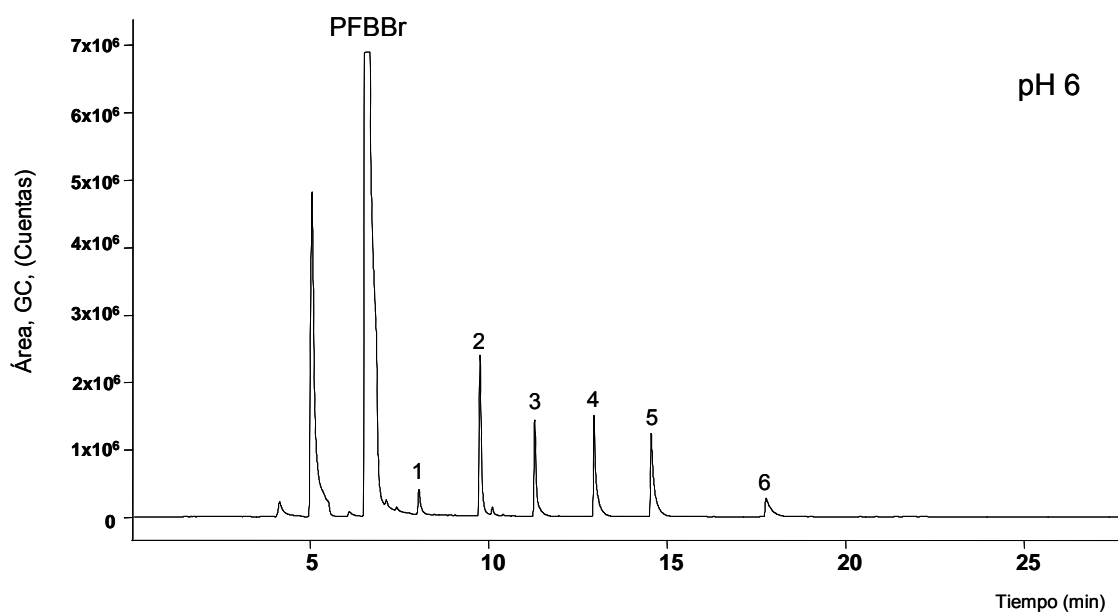
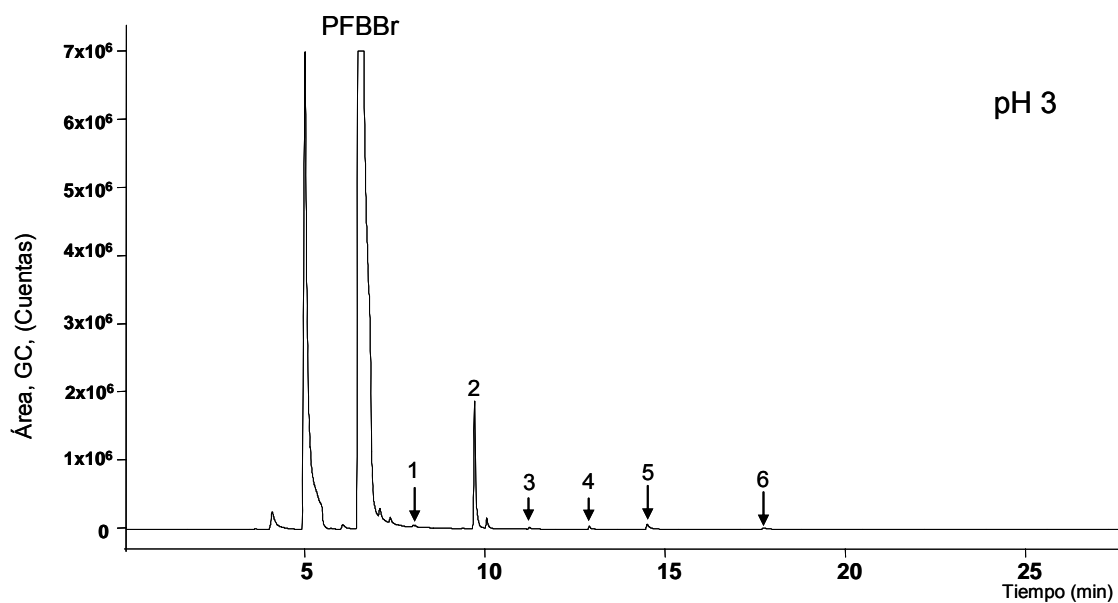
### **3.2.1 Evaluación de las condiciones de reacción**

Con el fin de determinar las condiciones adecuadas para llevar a cabo la reacción de derivatización de los ácidos carboxílicos con PFBBr, fue necesario estudiar los siguientes parámetros de reacción: efecto del pH, tiempo y temperatura de reacción y concentración de agente derivatizante. Las áreas cromatográficas obtenidas en cada ensayo se presentan en el **Anexo 1**.

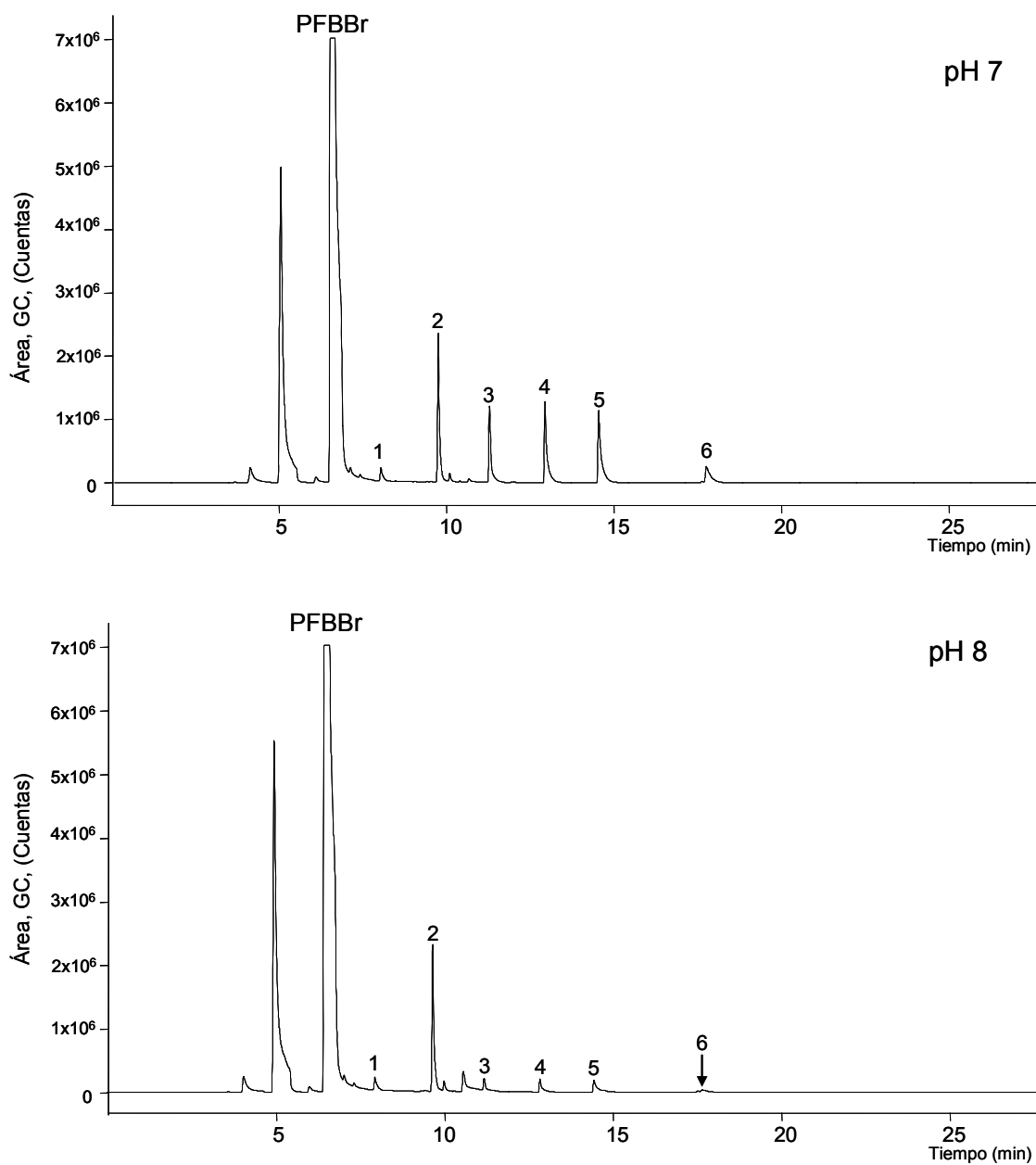
#### **3.2.1.1 Efecto del pH**

Para establecer el efecto del pH sobre la reacción de derivatización de los ácidos carboxílicos (C<sub>2</sub> –C<sub>6</sub>) y el benzoico con el PFBBr, se evaluaron los siguientes valores de pH: 3, 6, 7 y 8. La temperatura de reacción se mantuvo a 60 °C, el tiempo de reacción 4 hrs y la concentración de PFBBr fue 1.72 mM.

Los perfiles cromatográficos (**Figura 20**), obtenidos durante la evaluación del pH, muestran que un pH ácido (3) o básico (8) no favorecen a la reacción de derivatización. En tanto que a valores de pH 6 y 7, la derivatización se lleva a cabo de manera satisfactoria, siendo 6 el pH donde se obtiene el mayor rendimiento del derivado.

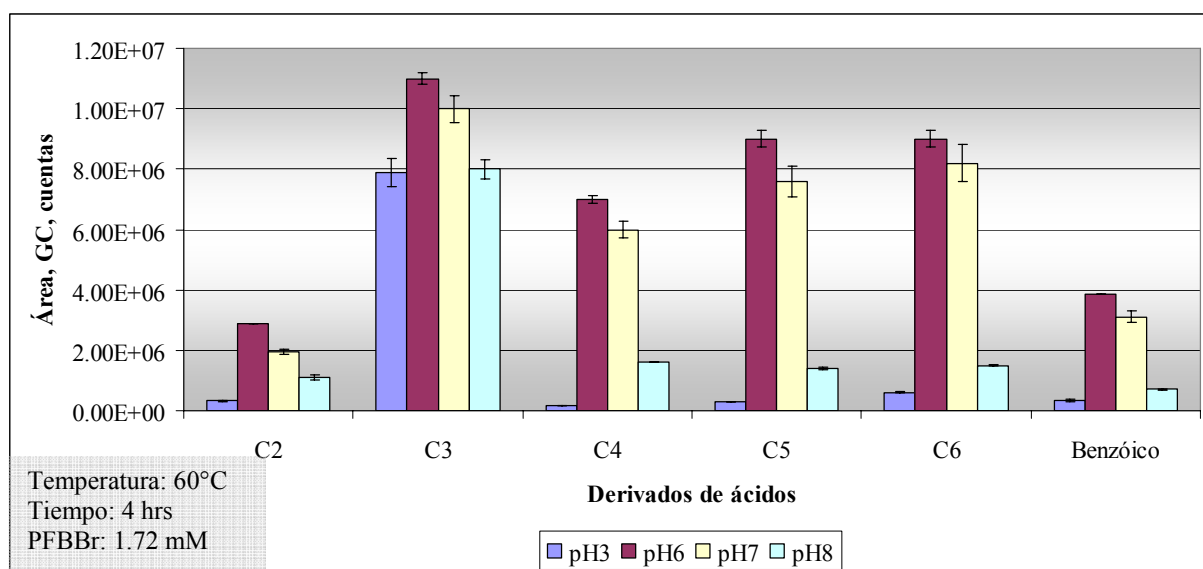


**Figura 20. Perfiles cromatográficos obtenidos durante la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos con PFBBr a valores de pH 3 y 6. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**



**Figura 20. Perfiles cromatográficos obtenidos durante la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos con PFBBr a valores de pH 7 y 8. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**

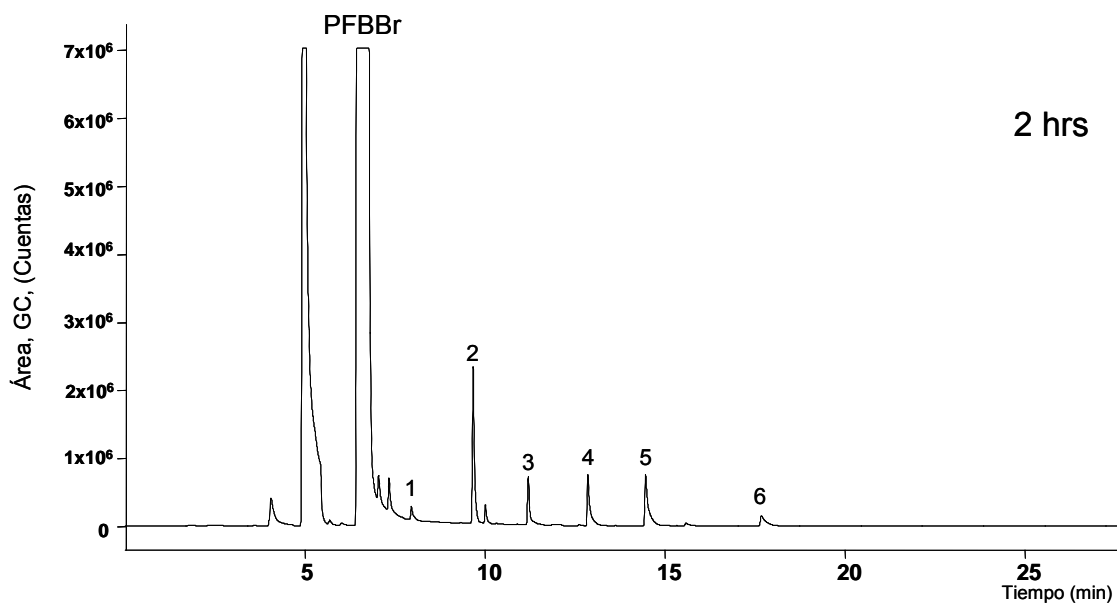
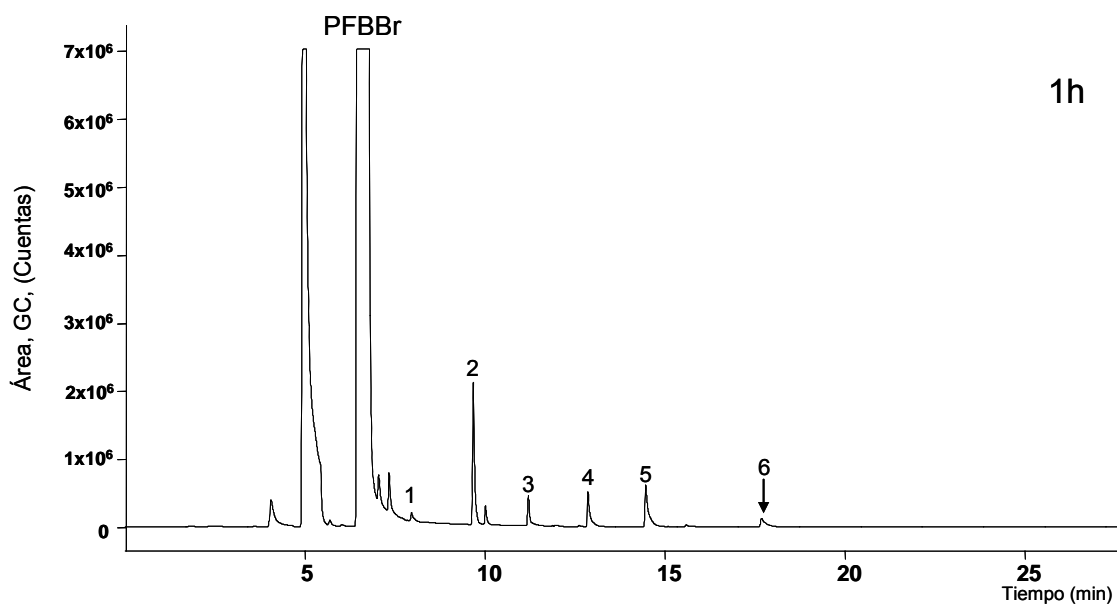
La **Figura 21** muestra las cantidades relativas de los ésteres de pentafluorobencilo obtenidos mediante la variación de los valores de pH de reacción (3, 6, 7 y 8). Se puede apreciar que la cantidad de derivados formados es muy poca a pH ácido. En tanto que a pH 6 y 7 se favorece la formación de los productos de reacción. Siendo el pH 6, cuando se obtienen los mayores rendimientos de los derivados, por lo tanto se seleccionó como parámetro de reacción. Los ensayos se realizaron por duplicado.



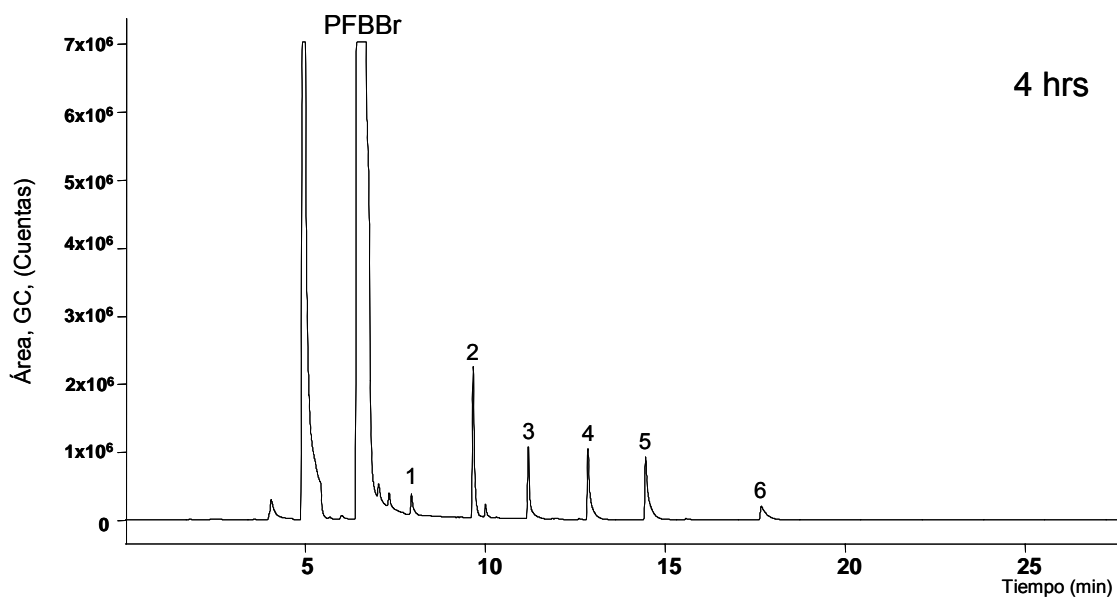
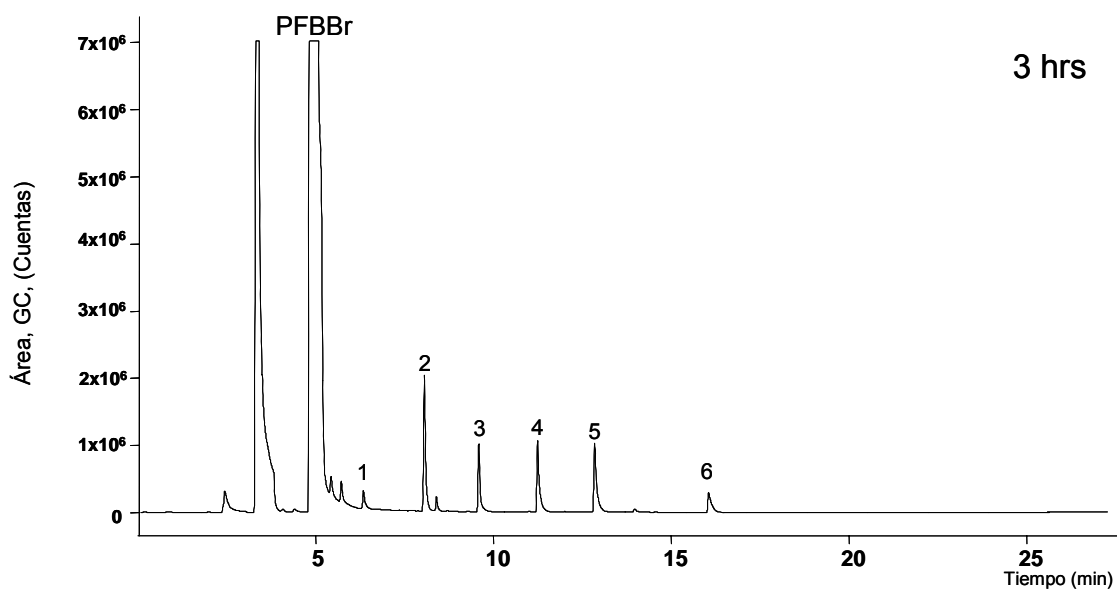
**Figura 21.** Efecto del pH sobre el rendimiento de ésteres de ácidos carboxílicos obtenidos mediante derivación con PFBBR en medio acuoso.

### 3.2.1.2 Tiempo de reacción

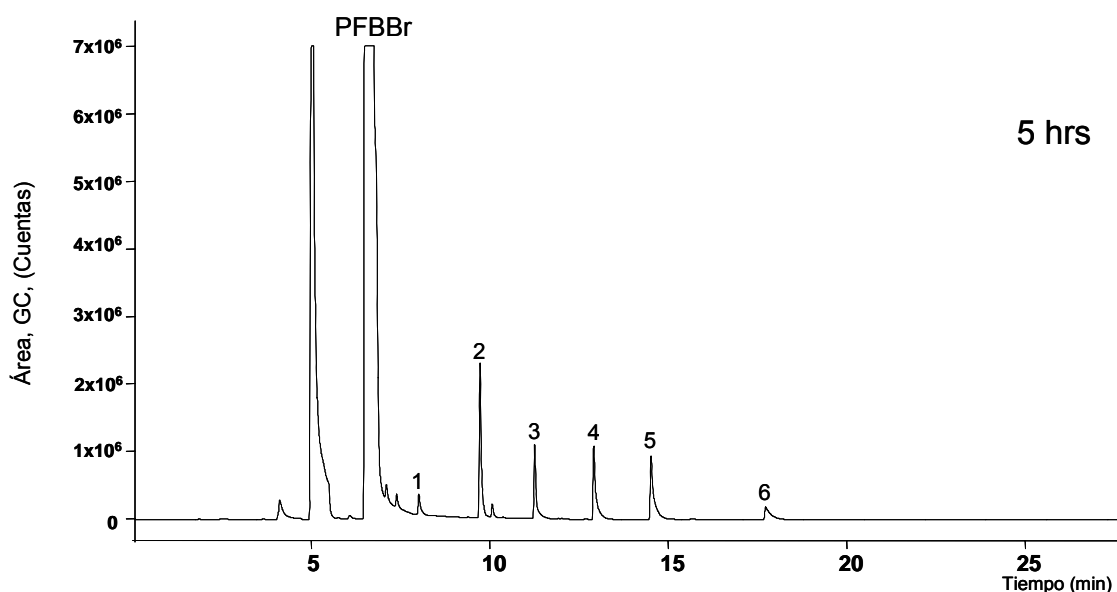
Se estudió el efecto del tiempo (1 - 5 hrs) sobre el rendimiento de la reacción de derivatización de los ácidos carboxílicos. En la **Figura 22**, se muestran los perfiles cromatográficos de los ésteres de PFBBR, obtenidos durante esta etapa.



**Figura 22.** Perfiles cromatográficos de los derivados de los ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función del tiempo de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

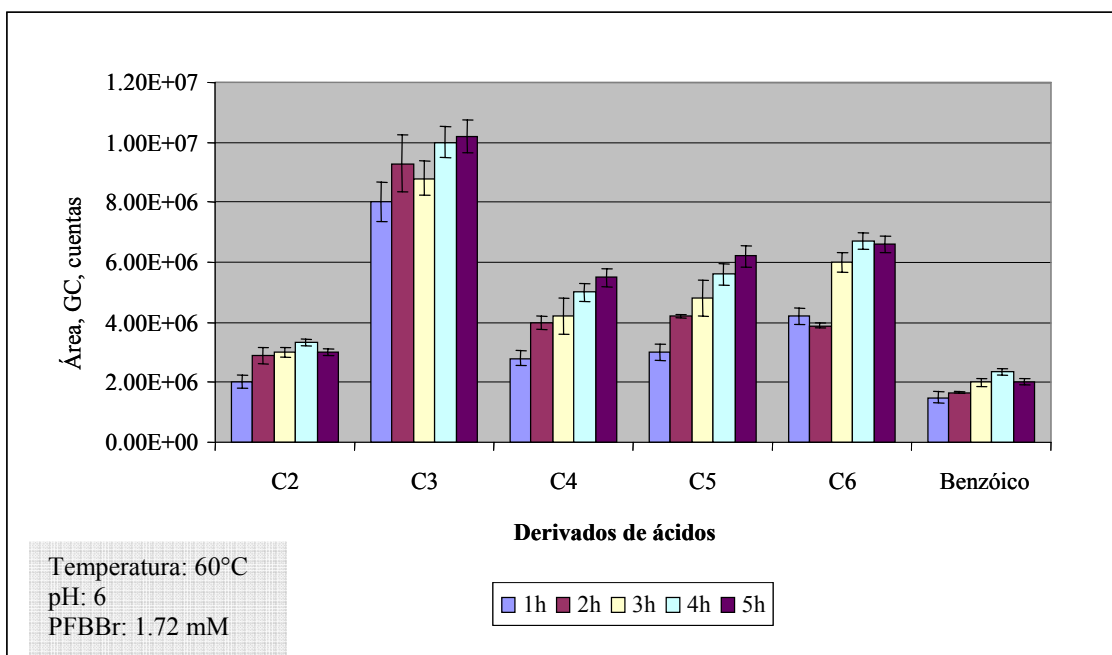


**Figura 22. Perfiles cromatográficos de los derivados de los ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función del tiempo de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**



**Figura 22. Perfiles cromatográficos de los derivados de los ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función del tiempo de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**

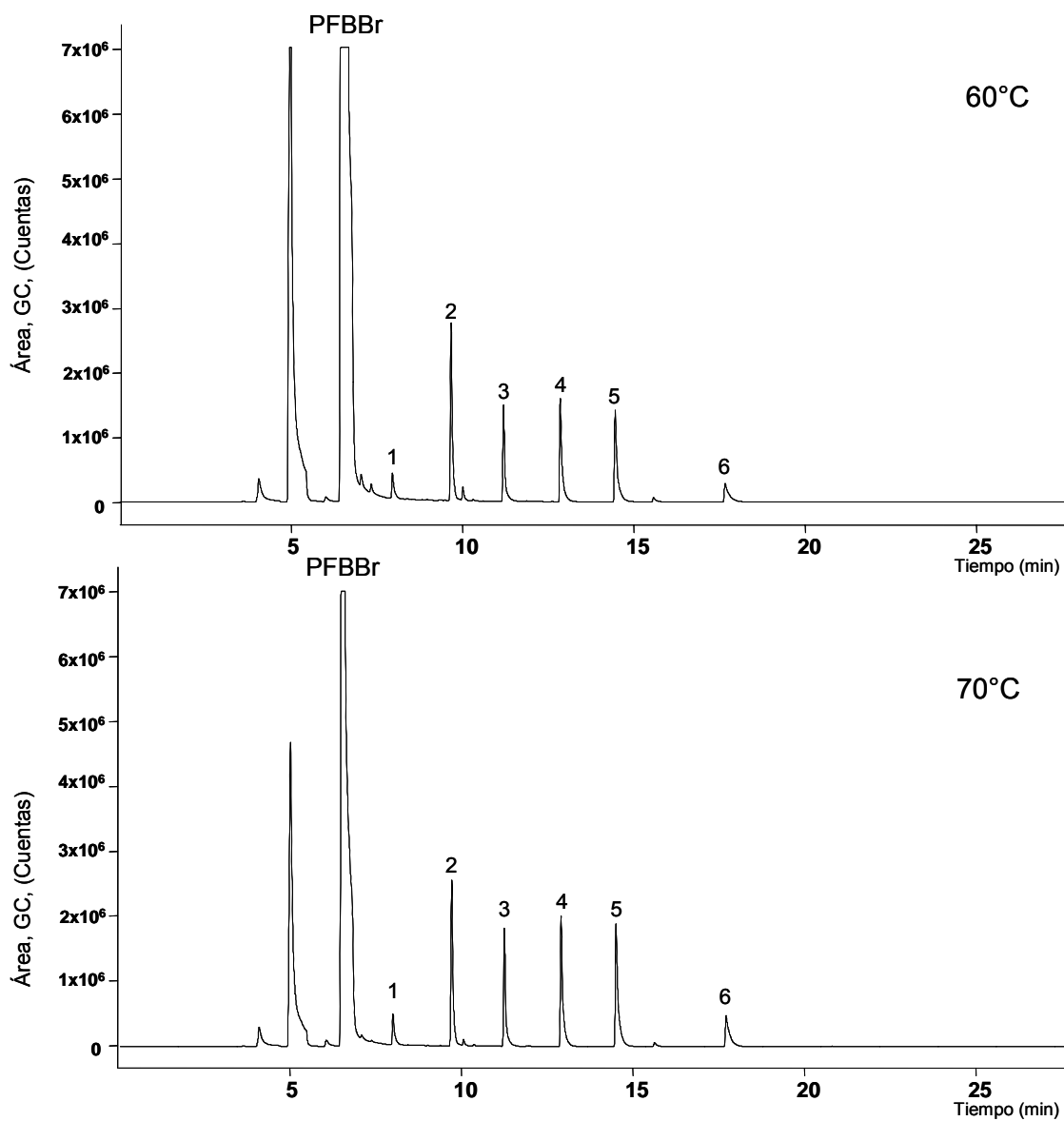
En la **Figura 23**, se puede apreciar el efecto del tiempo sobre el rendimiento de la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos. A medida que se avanza en el tiempo la reacción, se observa un aumento en la cantidad de los derivados formados. Al monitorear la reacción por 5 hrs, se nota una leve disminución en la concentración del derivado del ácido acético y del benzoico, por lo que se determinó que el tiempo de reacción más conveniente es 4 hrs. Los ensayos para estudiar esta variable se llevaron a cabo por duplicado.



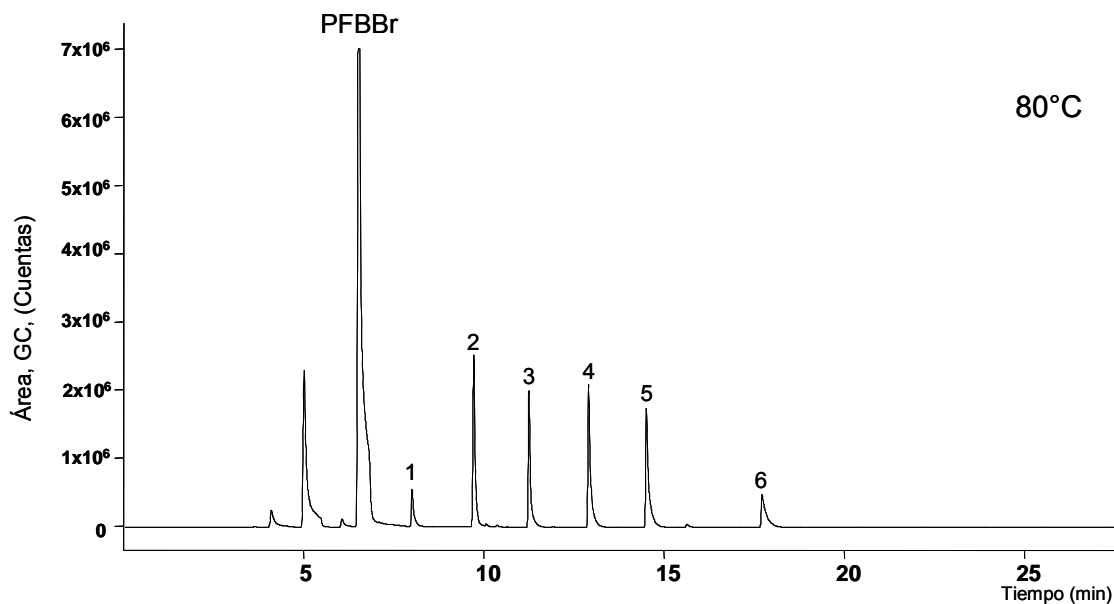
**Figura 23.** Efecto del tiempo de reacción sobre el rendimiento de los ésteres de ácidos carboxílicos, obtenidos por su derivación con PFBBr en medio acuoso. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### 3.2.1.3 Temperatura de reacción

La temperatura constituye una variable de gran importancia en las reacciones orgánicas. La velocidad de la reacción puede ser favorecida cuando se incrementa la temperatura de los reactantes. En el presente trabajo, se estudió la incidencia de la temperatura en el rendimiento de la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos en presencia del PFBBr, en medio acuoso. Se evaluaron valores de temperaturas de 60, 70 y 80 °C. El tiempo de reacción fue de 4 hrs, el valor de pH fue 6 y la concentración de agente derivatizante 1.72 mM. Los perfiles cromatográficos obtenidos se muestran en la **Figura 24**, las áreas cromatográficas se presentan en el **Anexo 2**. Los ensayos fueron realizados por duplicado.



**Figura 24.** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la temperatura de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

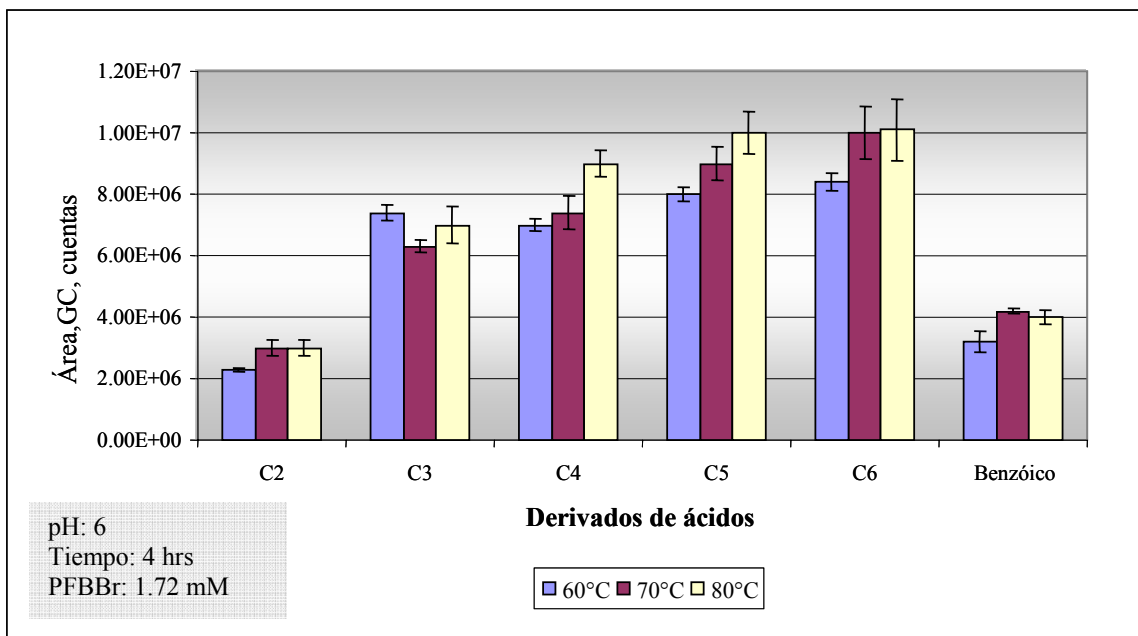


**Figura 24. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la temperatura de reacción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**

Los picos cromatográficos de derivados (**Figura 24**), obtenidos en función de la variación de la temperatura de reacción, no se diferencian a simple vista, y aparentemente no indican cambios drásticos en el rendimiento de los ésteres de pentafluorobencilo obtenidos. Sin embargo, al observar el pico correspondiente al PFBBr, si se aprecia su notoria disminución que puede atribuirse no sólo al consumo del reactivo durante la reacción sino a posibles problemas de su volatilización. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

En la **Figura 25**, puede apreciarse mejor, como la temperatura incide sobre el rendimiento de la reacción, un incremento de la temperatura favorece un aumento en las áreas cromatográficas de los derivados de PFBBr obtenidos. Sin embargo, para el ácido propiónico se observa un cambio en la tendencia, pues a 70°C, se presenta una disminución en el rendimiento de la reacción, esto puede deberse a problemas de volatilización de los

reactantes. La reacción de derivatización de los ácidos carboxílicos en medio orgánico (acetona) según la propuso Kawahara [42], se realiza a 60°C y considerando los corredores de error que se presentan a temperaturas más altas, se estimó que la temperatura más adecuada es 60 °C.

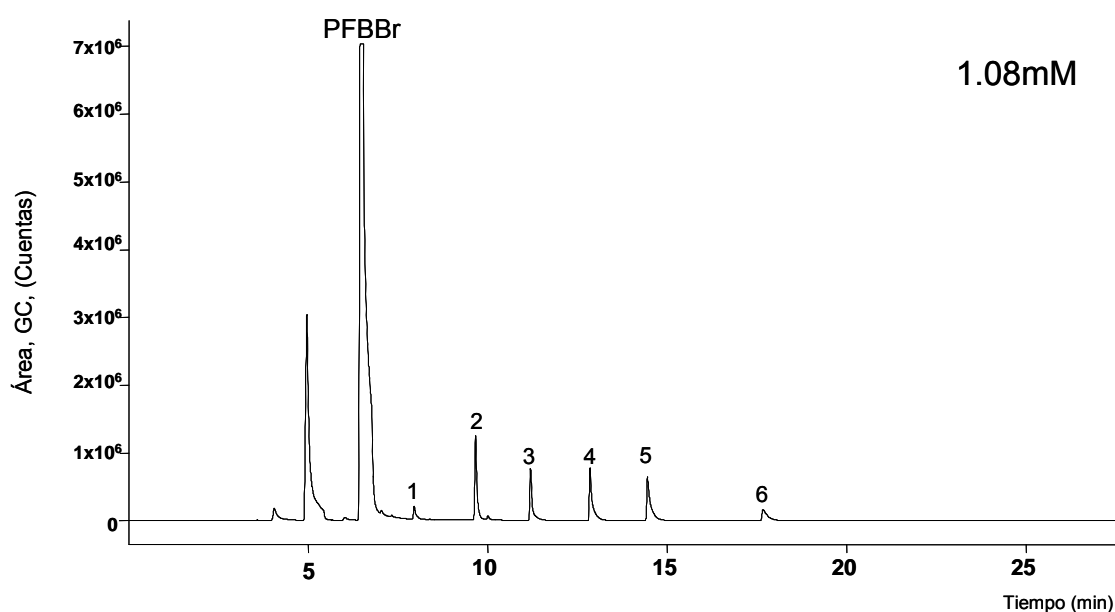


**Figura 25.** Efecto de la temperatura de reacción (60, 70 y 80 °C) sobre el rendimiento de los ésteres de ácidos carboxílicos, obtenidos por su derivación con PFBBR en medio acuoso. Los ensayos se realizaron por duplicado.

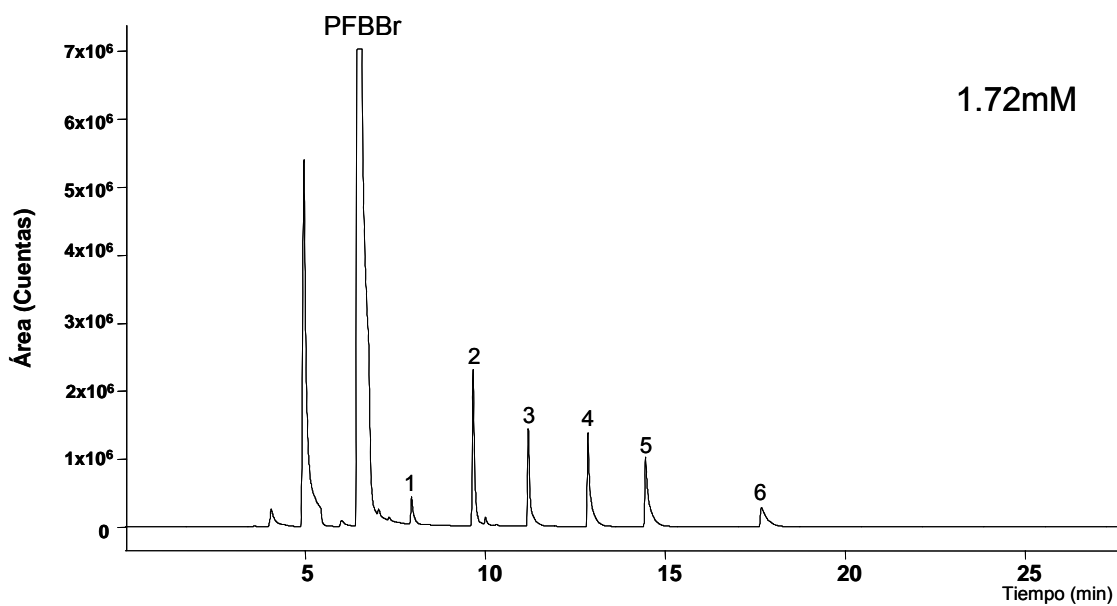
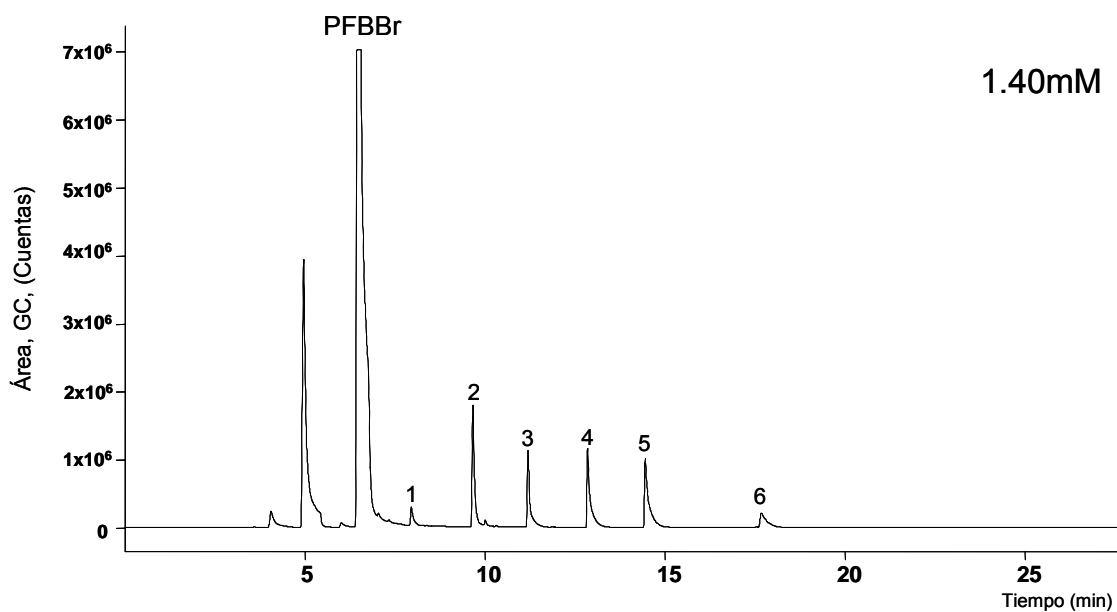
### 3.2.1.4 Cantidad de agente derivante

Se estudió el efecto de la cantidad del PFBBR (agente derivatizante) sobre el rendimiento de la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos, para obtener los ésteres de pentafluorobencilo. Los parámetros fijos fueron el pH (6), la temperatura (60°C) y el tiempo de reacción (4 hrs), los cuales fueron evaluados y establecidos previamente.

Durante el procedimiento de derivatización de los ácidos carboxílicos con el PFBBr en acetona (reacción en medio orgánico), se utilizó un exceso estequiométrico del agente derivante en presencia del  $K_2CO_3$ , el cual cumple aquí la función de catalizador de la reacción. Teniendo en cuenta esto, al proponer la reacción de alquilación en medio acuoso, es necesario evaluar el efecto de la concentración del agente derivatizante sobre el rendimiento de la reacción de derivación. Las cantidades empleadas de PFBBr fueron: 1.08, 1.40, 1.72, 2.15 y 3.23 mM. Los perfiles obtenidos durante estos ensayos pueden observarse en la **Figura 26**.



**Figura 26.** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la cantidad de PFBBr usada. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.



**Figura 26. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la cantidad de PFBBr usada. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**

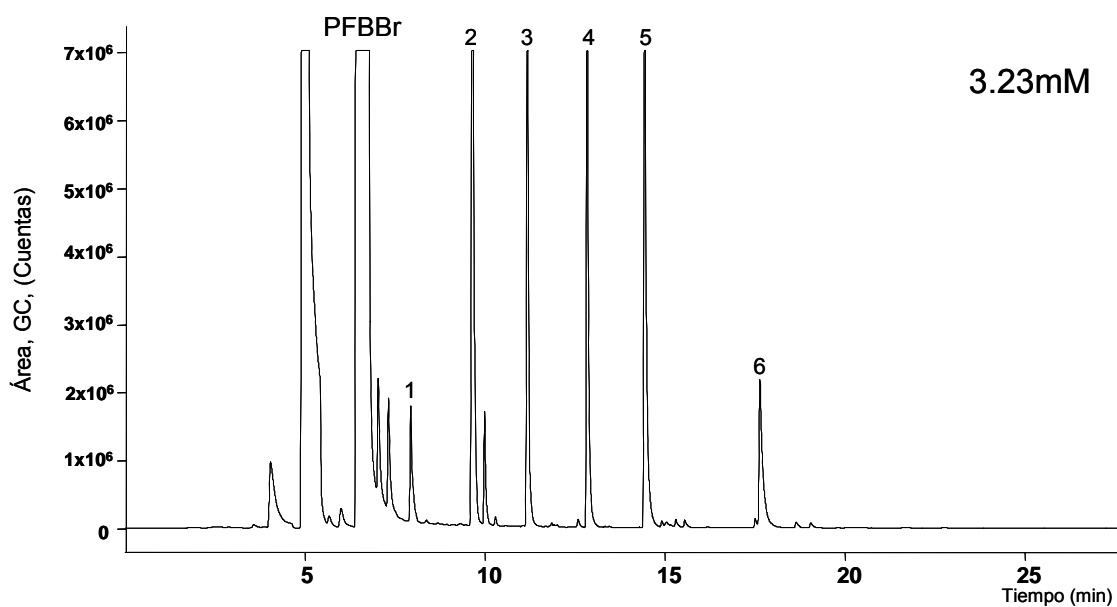
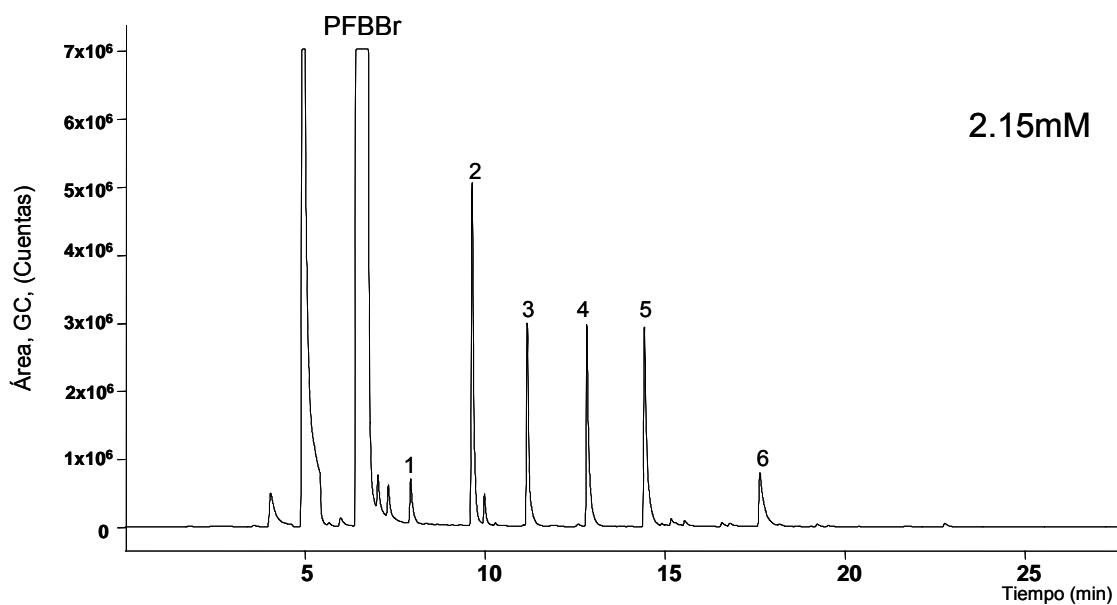
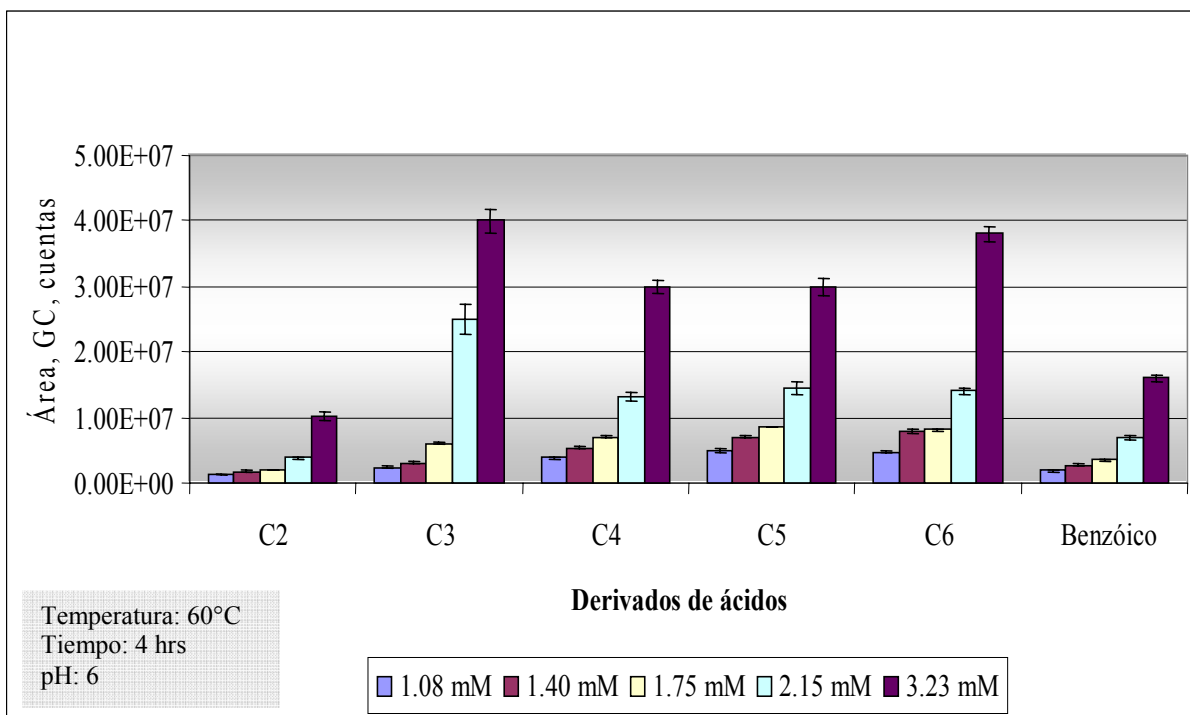


Figura 26. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos en función de la cantidad de PFBBr usada. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

Como se puede observar en la **Figura 26**, con el aumento de la cantidad de PFBBr (agente derivatizante), se incrementa, a su vez, el rendimiento de los derivados obtenidos, pero también se observa el aumento del ruido en el cromatograma debido a la presencia de picos artefacto o impurezas provenientes, probablemente, del agente derivatizante, durante la reacción de alquilación.

En la **Figura 27** se puede apreciar el efecto de la cantidad de PFBBr sobre el rendimiento de la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos, en medio acuoso. La relación molar de los reactantes PFBBr / ácidos se encuentra en un rango entre 4 y 13.



**Figura 27. Efecto de la cantidad de agente derivatizante PFBBr, sobre el rendimiento de los ésteres de pentafluorobencilo obtenidos en medio acuoso. Los ensayos se realizaron por duplicado.**

Como se aprecia en la **Figura 27**, al adicionar mayor cantidad de PFBBr en el medio de reacción, el área cromatográfica asociada con cada uno de los derivados se incrementa lo cual es más notorio cuando el exceso de reactivo es de 9 y de 13; de igual manera, el nivel de ruido aumenta, como se observa en los perfiles cromatográficos (**Figura 26**) correspondientes a la cantidades de 2.15 y 3.23 mM. Por otra parte, el reactivo de derivación (PFBBr), posee trazas de los ésteres de PFB, derivados de los ácidos acético y propiónico, que afectan el análisis cuantitativo de los respectivos derivados, cuando se utiliza un exceso de PFBBr  $\geq 13$ . Considerando la presencia del ruido en los cromatogramas cuando las cantidades de PFBBr son altas, se seleccionó el valor de 2.15 mM de PFBBr (relación estequiométrica PFBBr/ácidos carboxílicos de 9); esta cantidad del reactivo permite tener un rendimiento de los derivados suficientemente alto, con un ruido mínimo en la señal cromatográfica.

Finalmente, las siguientes fueron las condiciones de reacción escogidas para la derivación de los ácidos carboxílicos, empleando PFBBr:

Concentración de PFBBr:	2.15 mM
Tiempo de reacción:	4 hrs
Temperatura de reacción;	60 °C
pH del medio de la reacción:	6

### 3.2.2 Parámetros de extracción

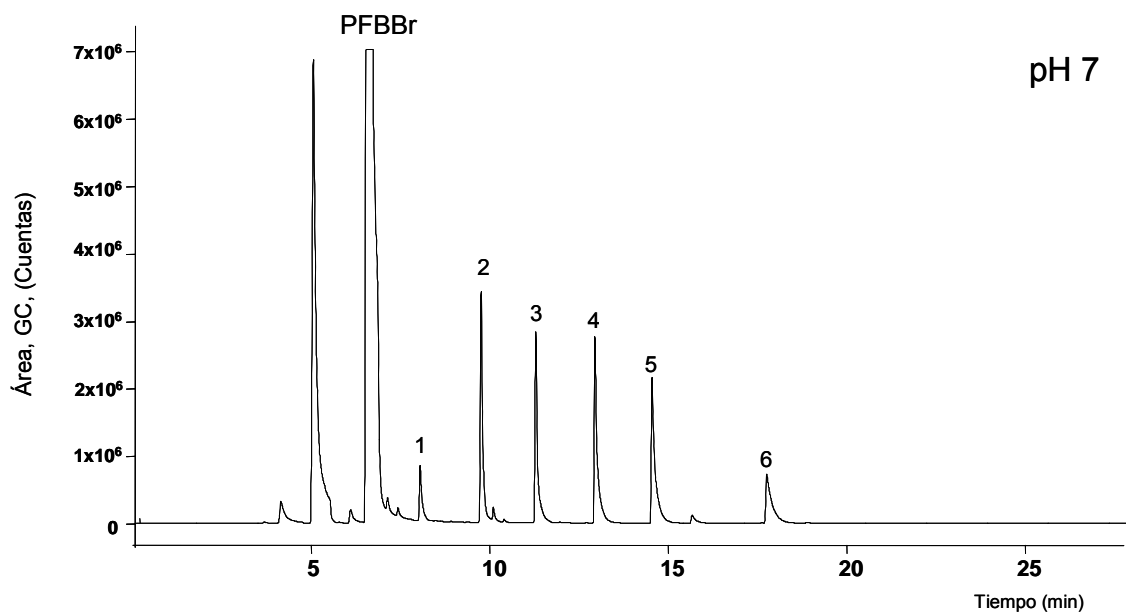
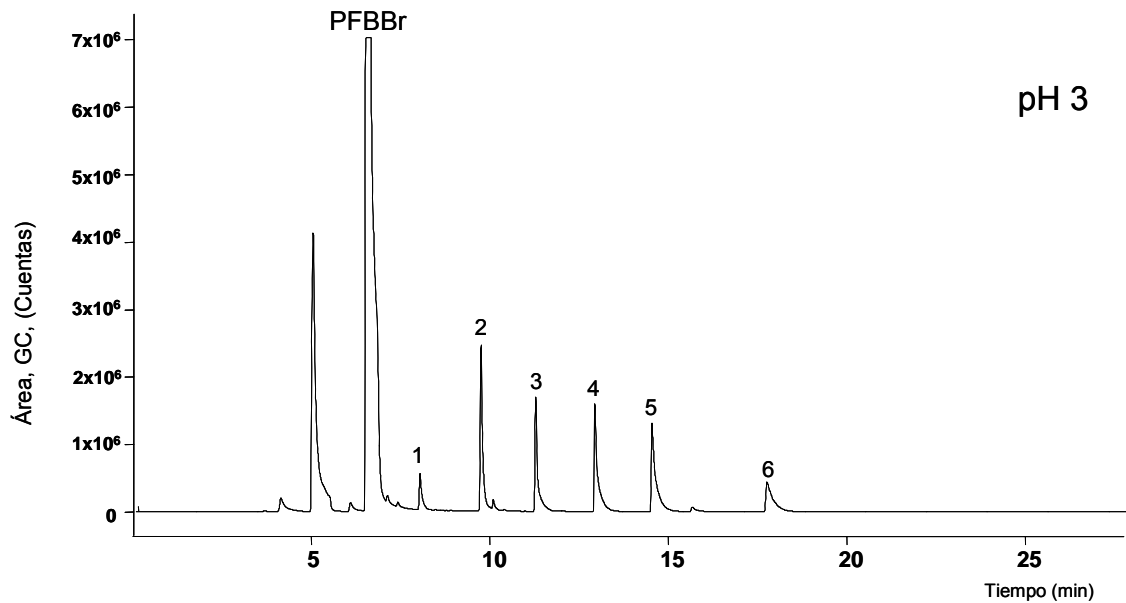
Una vez seleccionadas las variables más apropiadas para llevar a cabo la reacción de derivación en medio acuoso de los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular  $C_2 - C_6$ , y del ácido benzoico, empleando el PFBBr, se procedió a establecer las mejores condiciones para la extracción eficiente de los derivados –ésteres de pentafluorobencilo- empleando la microextracción en fase sólida en el modo *headspace*.

Debido a la naturaleza polar de los compuestos bajo estudio (ácidos carboxílicos), se recomienda emplear una fibra cuyo recubrimiento sea también de naturaleza polar, pues los analitos presentarían mayor afinidad por dicha fase polar, este es el caso de la fibra de poli(acrilato). Además, durante la revisión bibliográfica, se encontró que algunos autores [34] emplearon esta fibra en el estudio de compuestos similares como en el caso nuestro, los ácidos carboxílicos. Con base en estos hechos, se procedió a seleccionar una fibra para SPME con recubrimiento de poli(acrilato) de  $85\mu\text{m}$ .

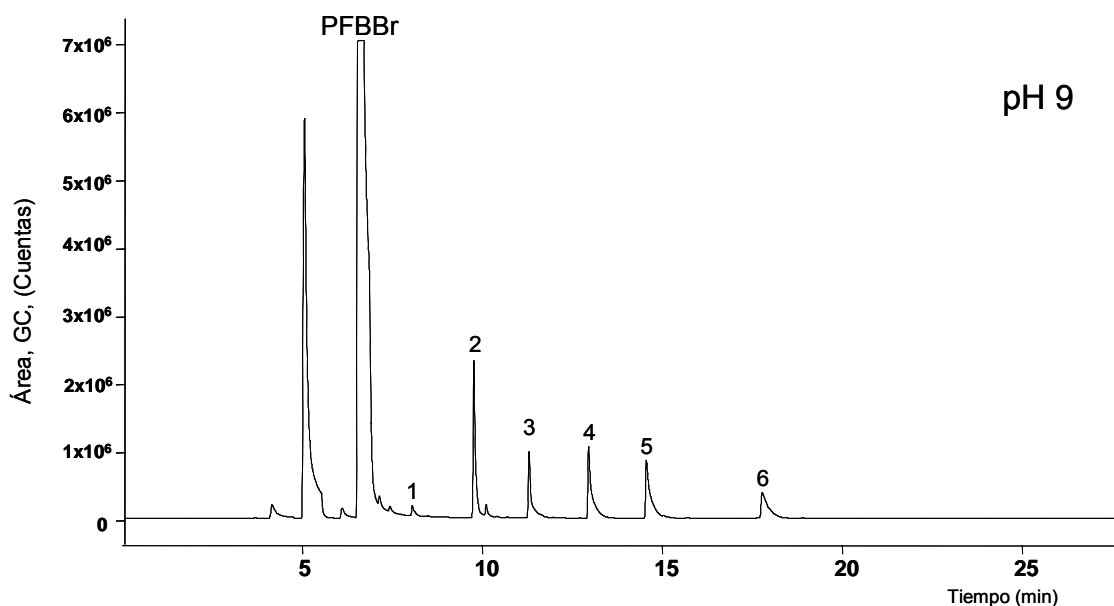
Para encontrar, las condiciones más adecuadas para realizar el estudio de los derivados de PFBBr obtenidos mediante la reacción de alquilación en medio acuoso, y empleando la HS-SPME, fue necesario estudiar los siguientes parámetros de extracción: el pH del medio de extracción, el efecto salino (% de NaCl agregado), temperatura y tiempo de extracción. La agitación de la solución fue de 800 rpm.

#### 3.2.2.1 pH de extracción

Se evaluaron los siguientes valores de pH del medio de extracción, a saber: 3, 7 y 9. En la **Figura 28**, se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos en función de la variación del pH de extracción empleando la SPME en el modo *headspace*. Para la evaluación de este parámetro, las demás condiciones de extracción se fijaron en los siguientes valores, a saber: temperatura de extracción:  $30\text{ }^\circ\text{C}$ , el tiempo de extracción fue de 30 min, la agitación magnética fue de 800 rpm y no se agregó sal (NaCl) al sistema bajo estudio.

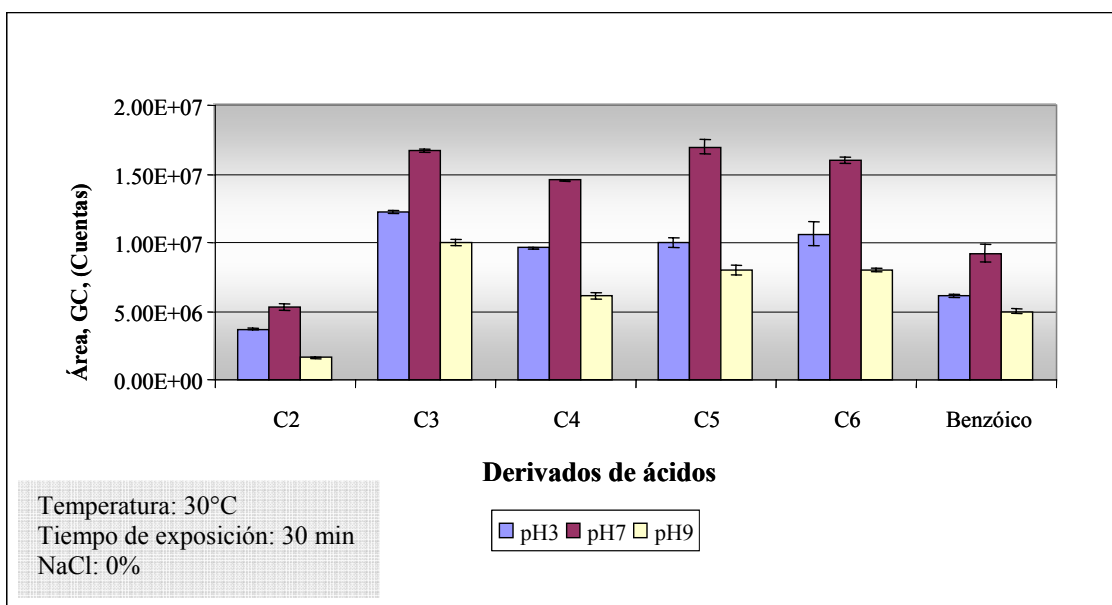


**Figura 28. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del pH de extracción. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**



**Figura 28.** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del pH de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

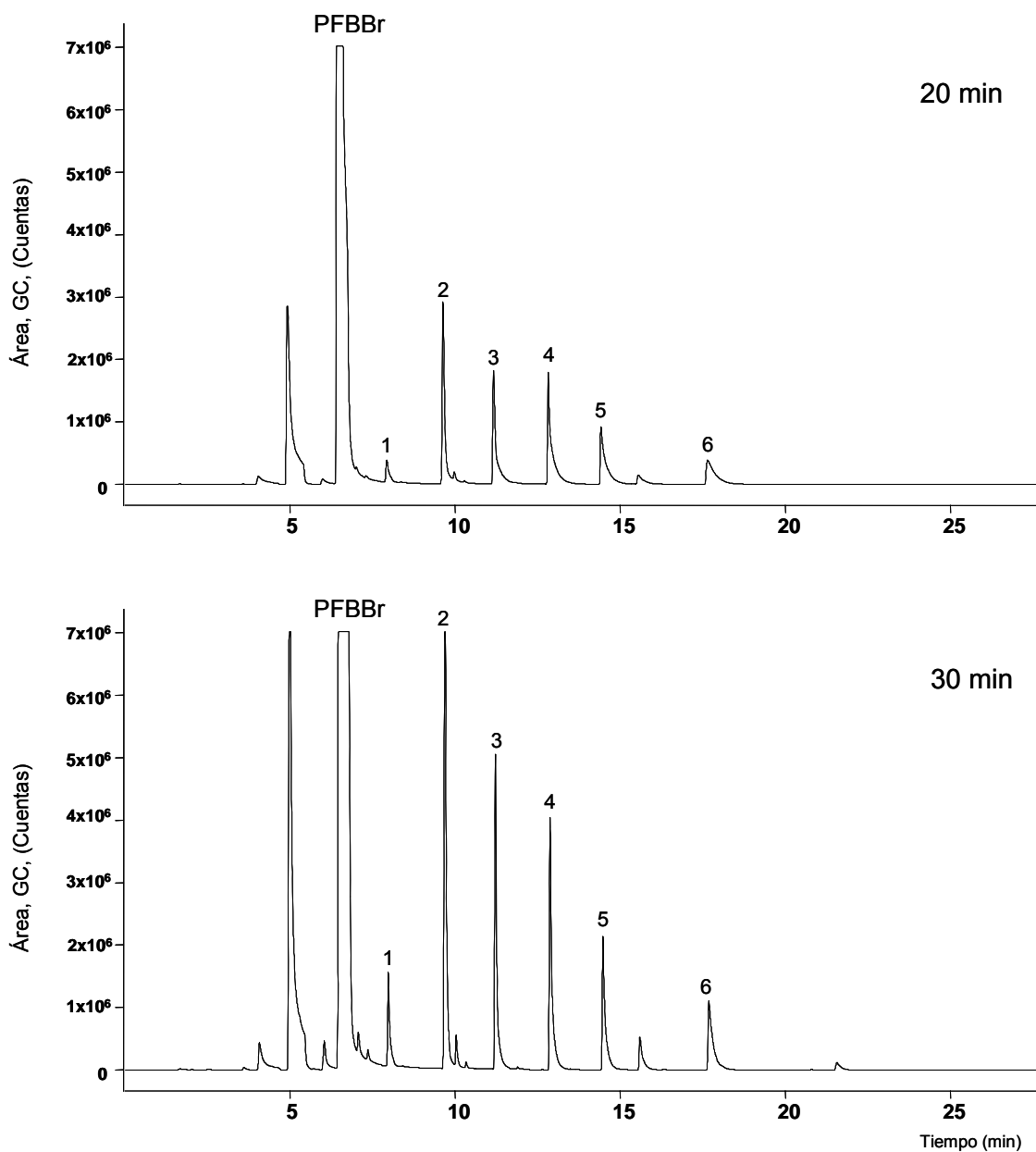
En la **Figura 29**, se observa que se presenta una notable disminución en la distribución de los derivados cuando el pH del medio de extracción se fijó en 9. Esto concuerda con que los ésteres, siendo moléculas neutras, pueden sufrir hidrólisis ácida (pH bajo, 3) o básica (pH alto, 9). Teniendo en cuenta esta tendencia, se determinó que el pH neutro (7) es el más adecuado para la extracción de los ésteres de pentafluorobencilo empleando la SPME en el modo *headspace*.



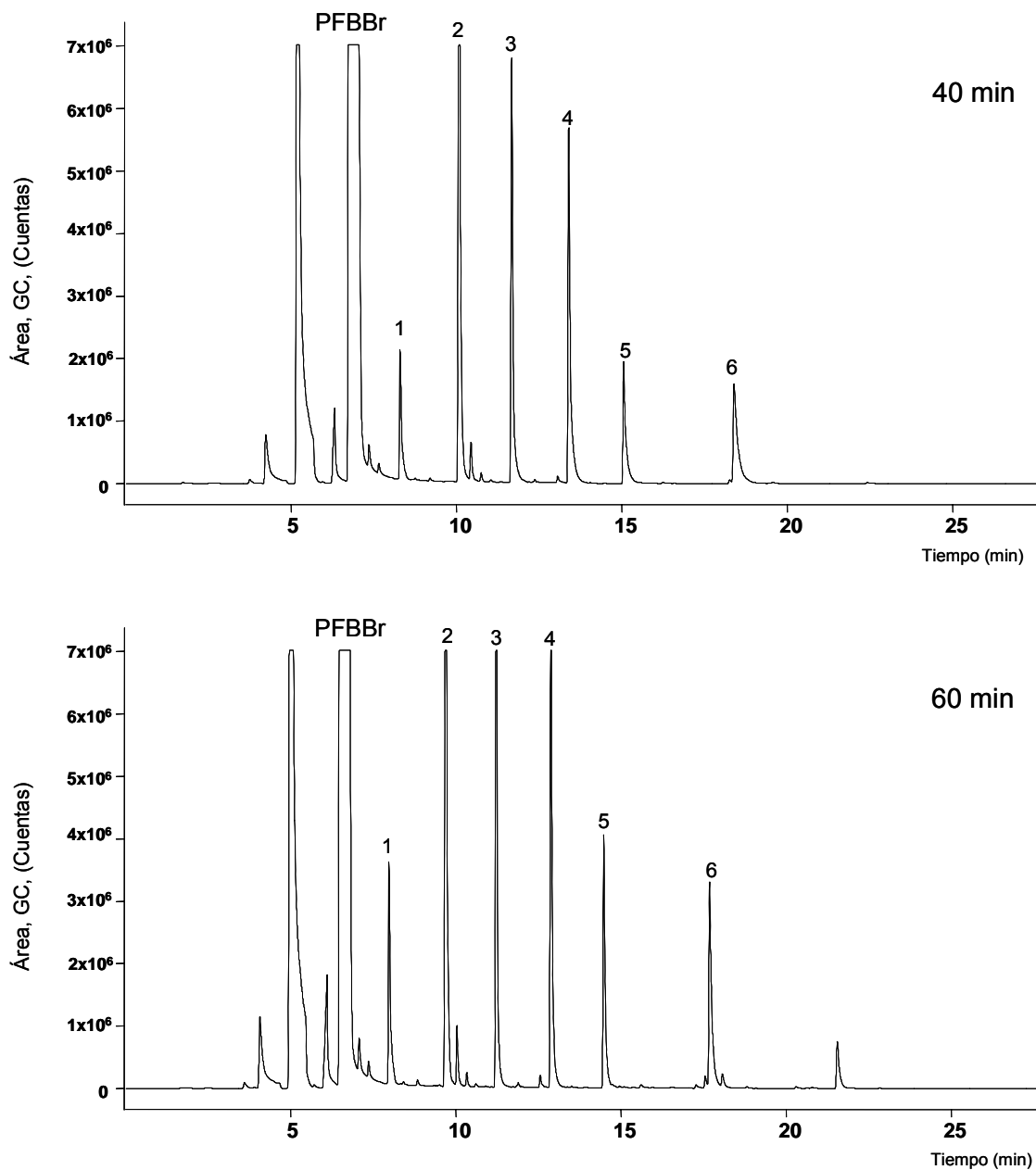
**Figura 29.** Efecto del pH sobre la eficiencia de extracción de los ésteres de pentafluorobencilo, empleando *HS-SPME*. Las extracciones se realizaron por duplicado.

### 3.2.2.2 Tiempo de extracción

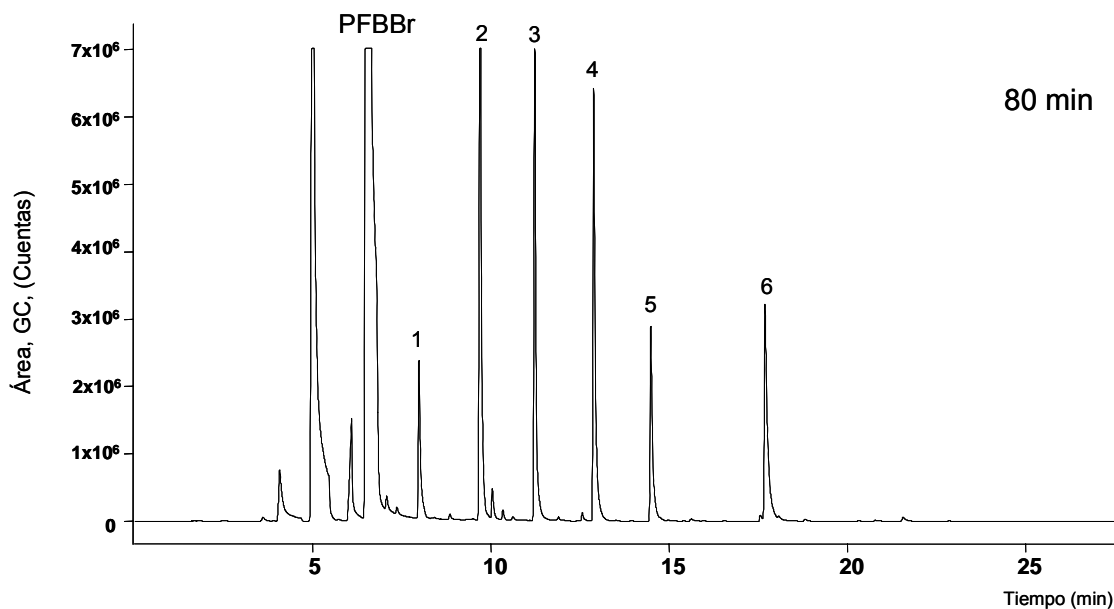
Se estudió también el efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de la extracción de los compuestos de interés, los derivados de los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>, y del ácido benzoico. En la **Figura 30**, se observan los perfiles cromatográficos obtenidos para los tiempos de exposición de la fibra de 20, 30, 40, 60 y 80 min. Como es de esperarse, a medida que se aumenta el tiempo de exposición, aumenta la cantidad de derivados extraídos.



**Figura 30.** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del tiempo de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.



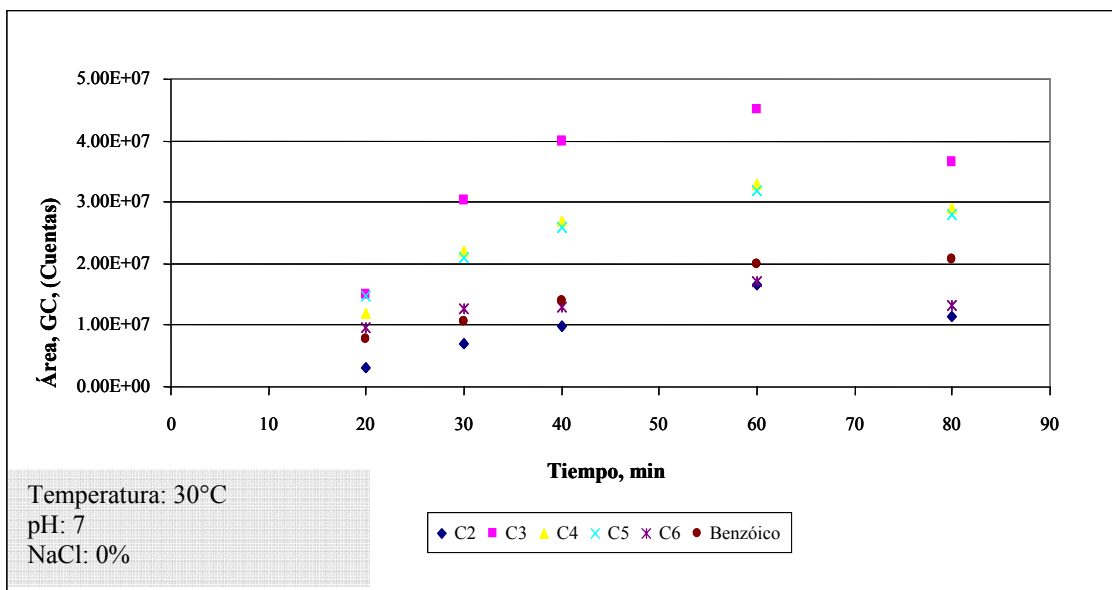
**Figura 30.** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del tiempo de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.



**Figura 30. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función del tiempo de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**

En la **Figura 31**, se observa el comportamiento de la extracción de los derivados en función del tiempo. A medida que se aumenta el tiempo de exposición de la fibra a los analitos de interés, aumenta, a su vez, la cantidad de los derivados aislados. El punto máximo se presenta a los 60 min de extracción. A los 80 min, empieza a decrecer la cantidad de derivados extraídos. Sin embargo, un tiempo de extracción de 60 min, es un tiempo de análisis de las muestras muy largo, por lo que fijaron 40 min para la extracción y se analizó el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la extracción.

Los siguientes fueron los valores de los parámetros fijos: pH de extracción: 7, temperatura de extracción: 30 °C, no se agregó NaCl al sistema de extracción.

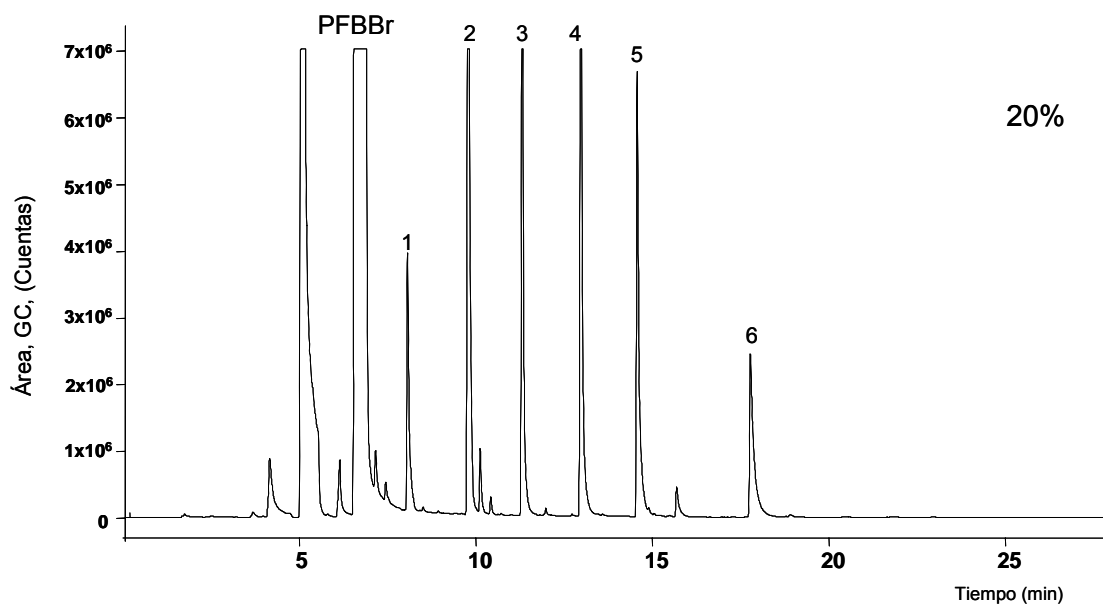
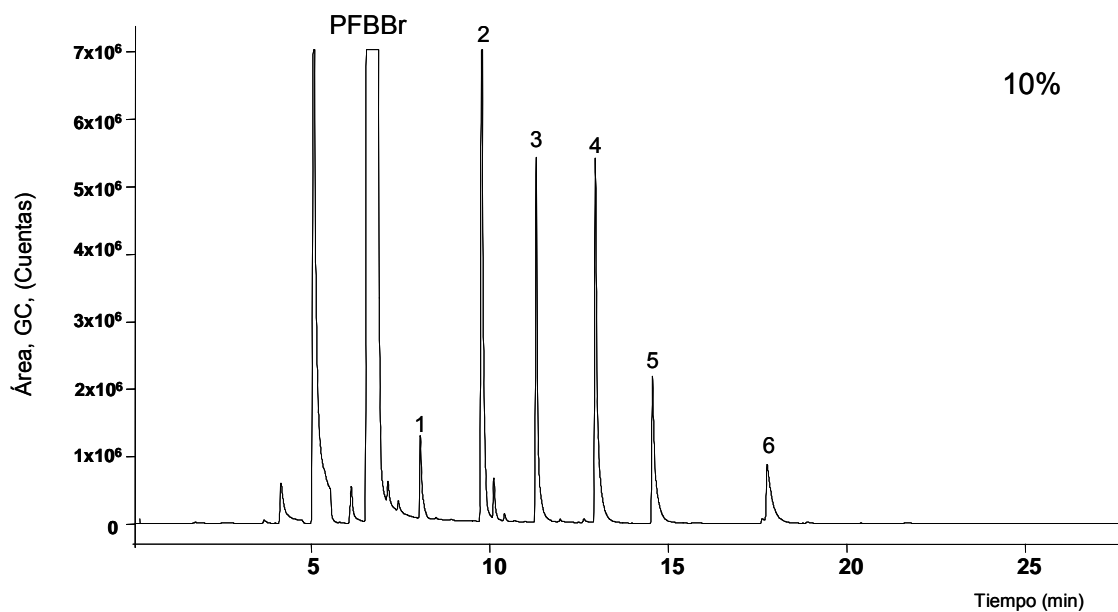


**Figura 31.** Cantidad de los derivados de ácidos carboxílicos extraídos por HS-SPME, en función del tiempo de exposición de la fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . Los ensayos se realizaron por duplicado.

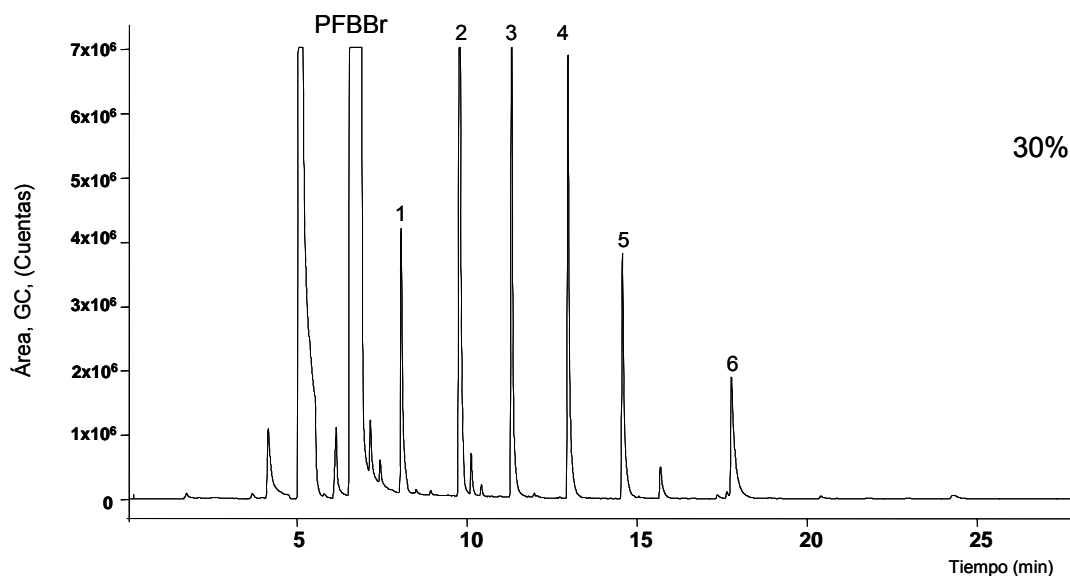
### 3.2.2.3 Efecto salino

La adición de sal, conocida en la literatura también como efecto *salting out*, permite aumentar la fuerza iónica de la solución, con la finalidad de establecer competencia de solubilidades entre la sal y los analitos estudiados que pueden pasar más fácilmente a la fase vapor, aumentando así la eficiencia de la extracción de analitos por HS-SPME.

En el presente trabajo, se evaluó la influencia de la adición de sal (10, 20 y 30 % p/v) sobre la eficiencia de la extracción de los derivados de ácidos carboxílicos, obtenidos mediante su derivación con PFBBr. El pH de la solución fue de 7, el tiempo de extracción 40 min, la temperatura fue de 30°C. La velocidad de agitación 800 rpm. Los perfiles cromatográficos obtenidos en función de este parámetro se presentan en la **Figura 32**.

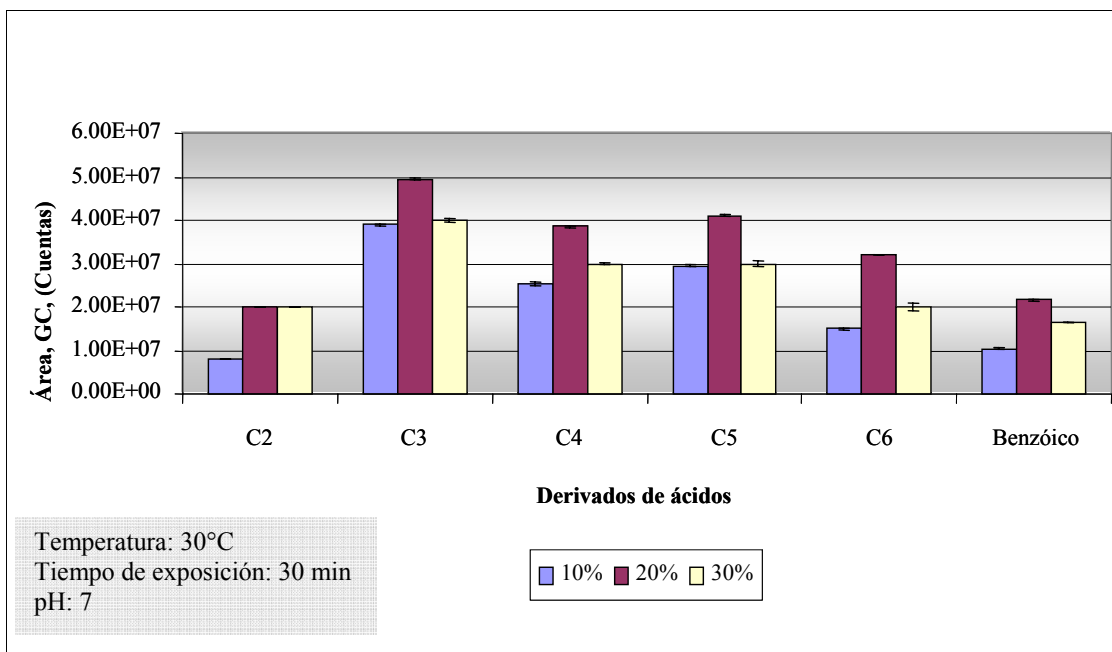


**Figura 32. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función de la cantidad de sal agregada a la matriz de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**



**Figura 32. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función de la cantidad de sal agregada a la matriz de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**

En la **Figura 33**, se puede observar el comportamiento de los ésteres derivados de los ácidos carboxílicos. Se esperaría observar que a medida que se aumenta la concentración de la sal, la cantidad de analitos extraídos fuera mayor. La máxima cantidad de sal que favorece la extracción es del 20 % (p/v) de NaCl. A un valor más alto (30%), se observa una disminución de la cantidad (áreas GC relativas) de los derivados. Por ende, se seleccionó el valor de 20% p/v de NaCl añadido.



**Figura 33.** Efecto de la adición de sal, NaCl (% p/v) sobre la eficiencia de extracción por HS-SPME de los derivados de los ácidos carboxílicos. Los ensayos se realizaron por duplicado.

### 3.2.2.4 Efecto de la temperatura de extracción

Se evaluó la temperatura de extracción de los ésteres de pentafluorobencilo, con tres valores de esta variable, a saber: 30, 40 y 60°C. El aumento de la temperatura promueve la salida de los analitos de la solución a la fase vapor de la muestra (*headspace*), lo cual favorece, en algunos casos, la eficiencia de extracción de los mismos.

Si bien es cierto, que el aumento de la temperatura favorece una mayor cantidad de derivados extraídos, las interferencias (impurezas, artefactos) también se hacen presentes con la temperatura incrementada. Esto se hace evidente al observar los perfiles cromatográficos de este ensayo (**Figura 34**). Por ello, se decidió realizar la extracción a 30 °C, pero aumentar el tiempo de extracción de 30 a 40 min, lo que también tiene efecto sobre el incremento de la cantidad de analitos aislados.

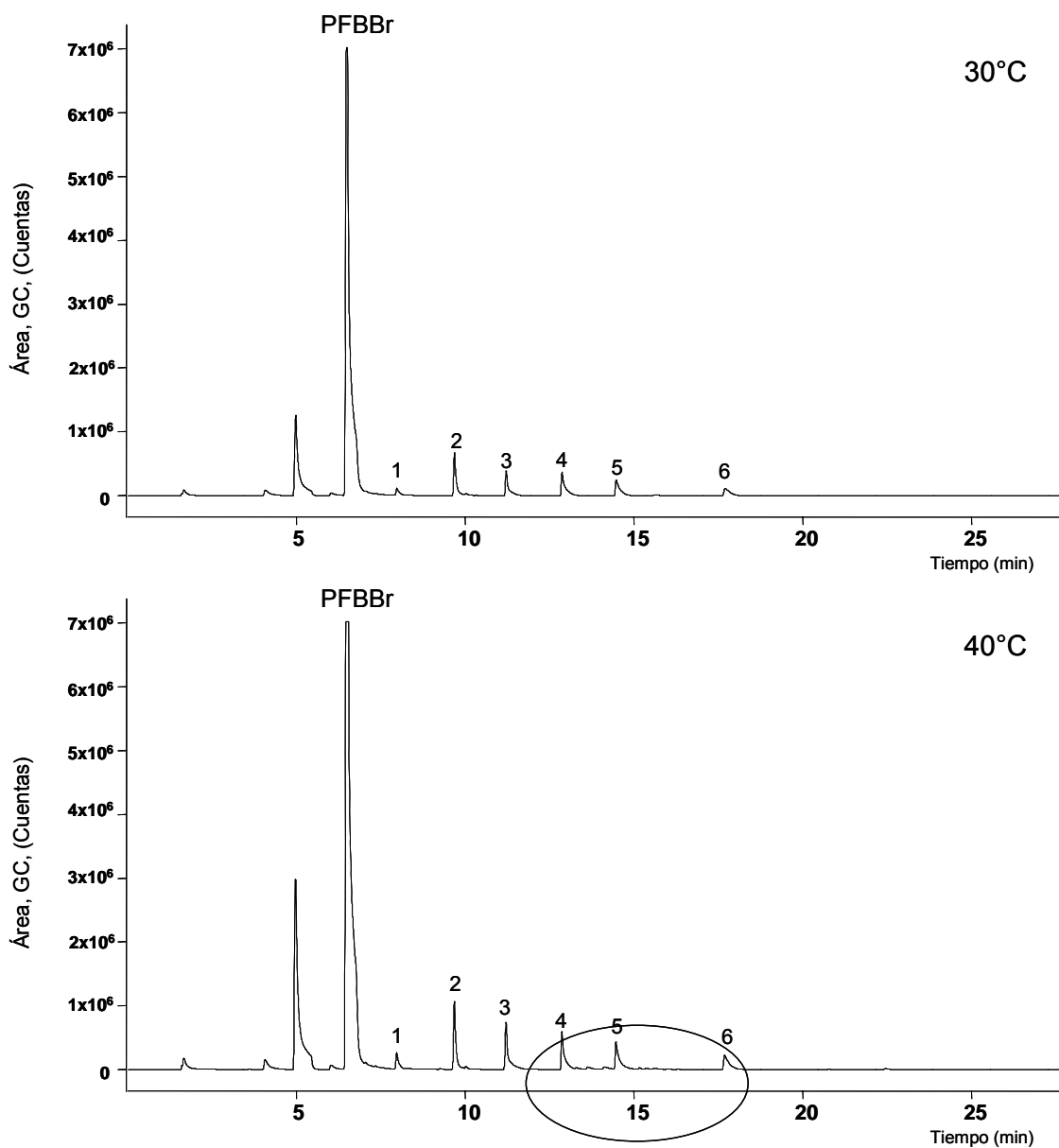
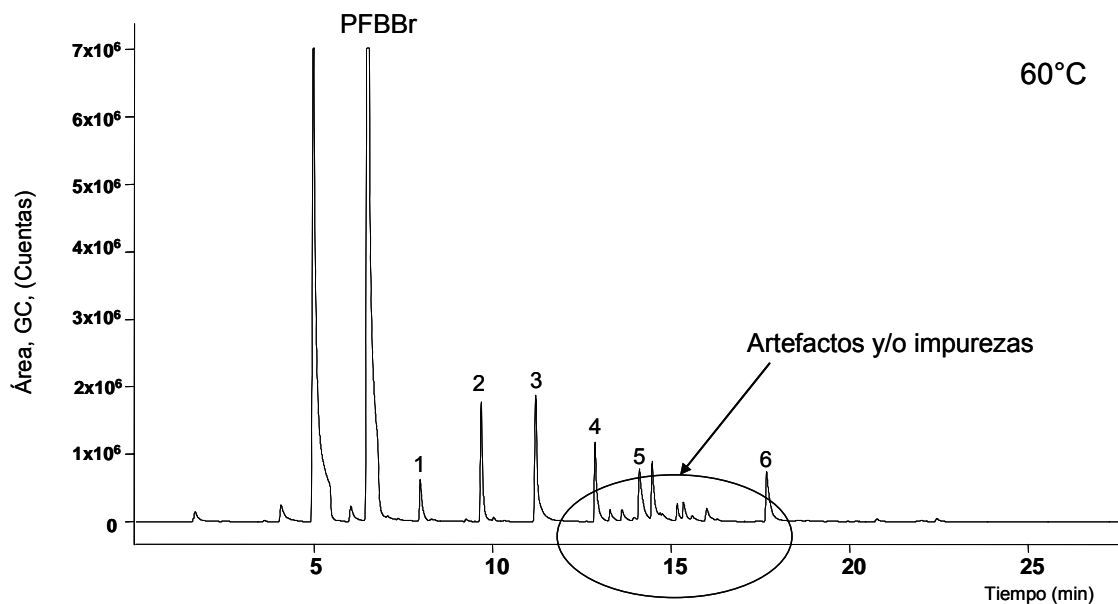
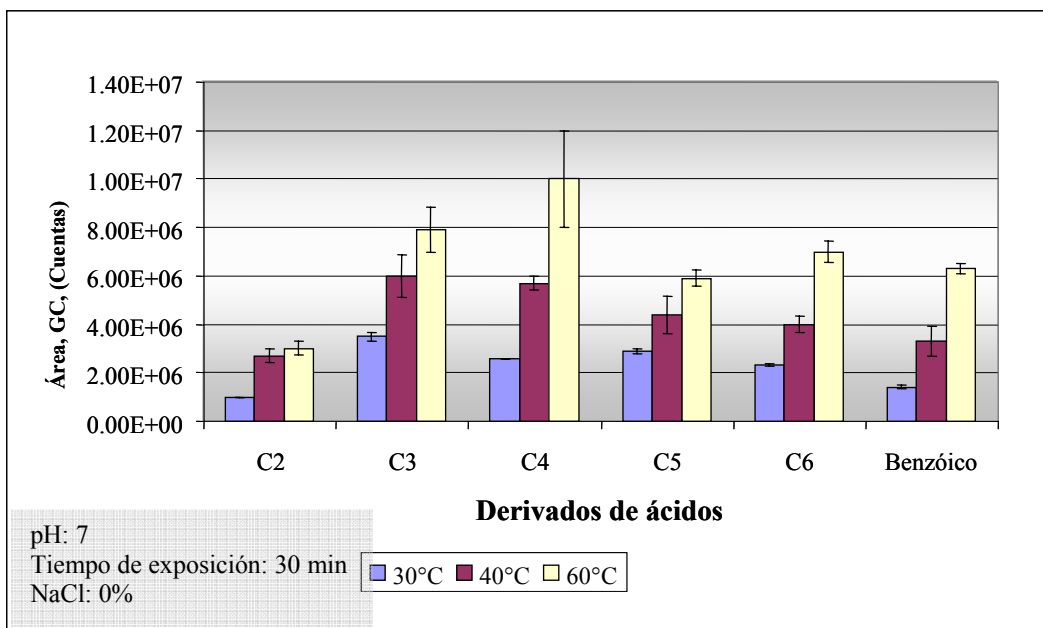


Figura 34. Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función de la temperatura de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.



**Figura 34.** Perfiles cromatográficos de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentafluorobencilo), obtenidos por *HS-SPME* en función de la temperatura de extracción. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

En la **Figura 35**, se puede apreciar la influencia de la temperatura sobre la eficiencia de extracción de los ésteres de PFB.



**Figura 35. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción de los analitos, productos de la derivatización de los ácidos carboxílicos con PFBBr.**

No se llevaron a cabo experimentos adicionales para estudiar otras variables, *i.e.* volumen de solución, modo (con y sin agitación) y velocidad de agitación. Para ésto, se tuvo en cuenta la experiencia adquirida en otros trabajos desarrollados en el laboratorio [41].

Finalmente, las siguientes variables fueron establecidas para la extracción de los derivados de los ácidos carboxílicos empleando la microextracción en fase sólida en el modo *headspace*:

Fibra empleada para SPME: PA, 85µm  
Tiempo de extracción: 40 min  
Temperatura de extracción: 30 °C  
Concentración de sal (NaCl) : 20% p/v  
pH del medio de extracción: 7

El volumen de la solución empleada para la extracción de los ésteres de pentafluorobencilo fue de 2 mL, la solución fue agitada magnéticamente a 800 rpm.

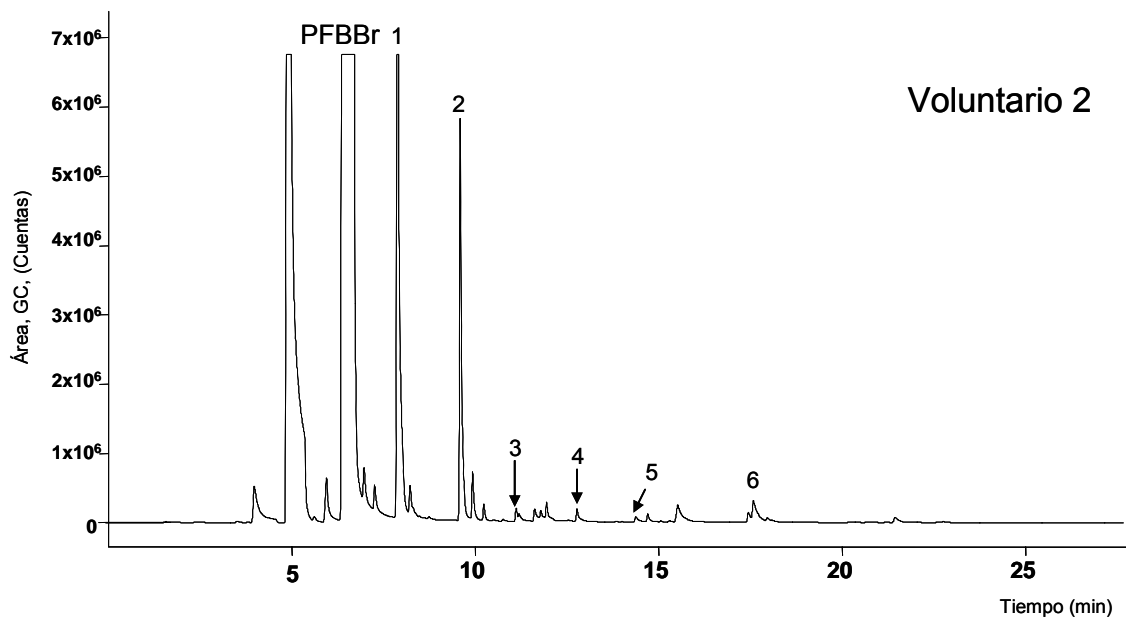
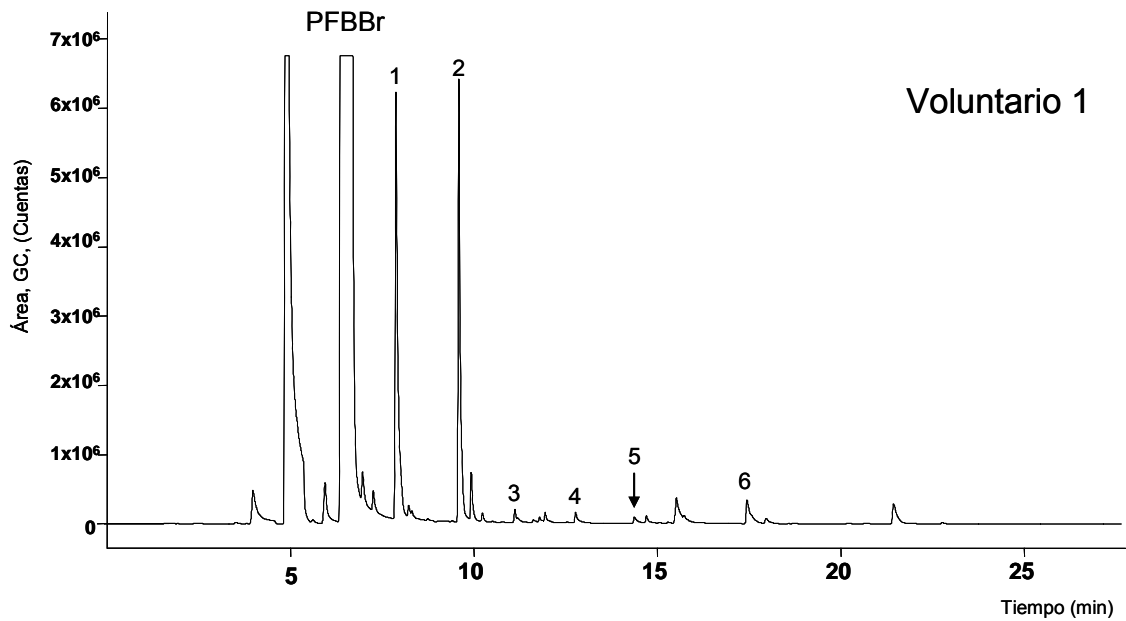
### **3.3 Determinación de ácidos carboxílicos presentes en muestras de sudor**

Una vez estandarizadas las condiciones para la reacción de derivación de los ácidos carboxílicos con PFBB<sub>r</sub>, y extracción de los derivados obtenidos, empleando la HS-SPME, se procedió a aplicar esta metodología a la determinación de los ácidos carboxílicos presentes en las muestras de sudor humano.

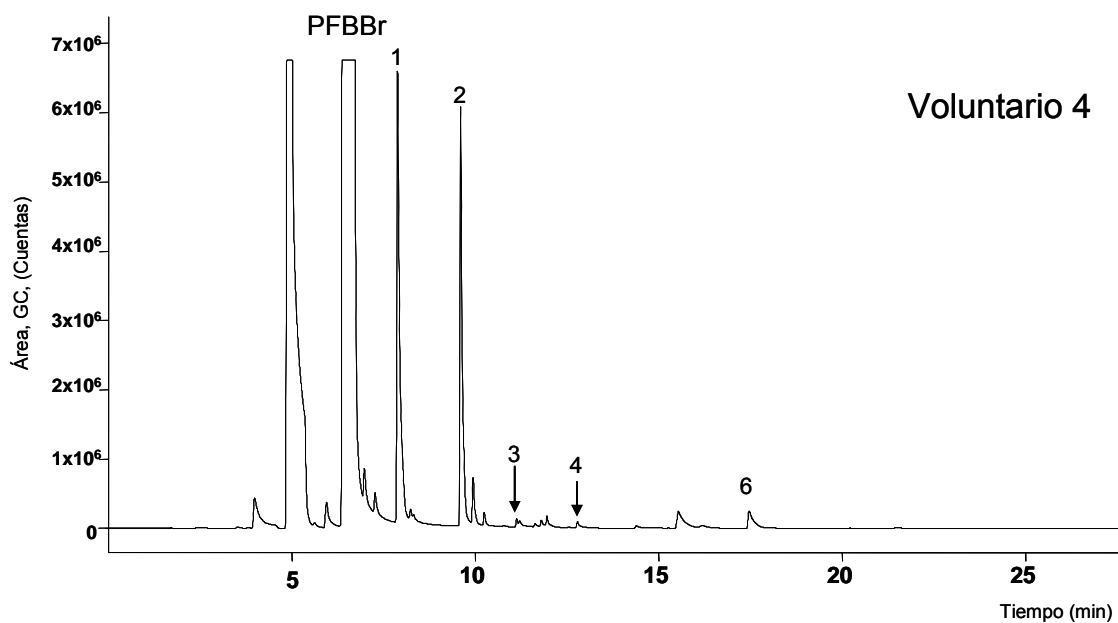
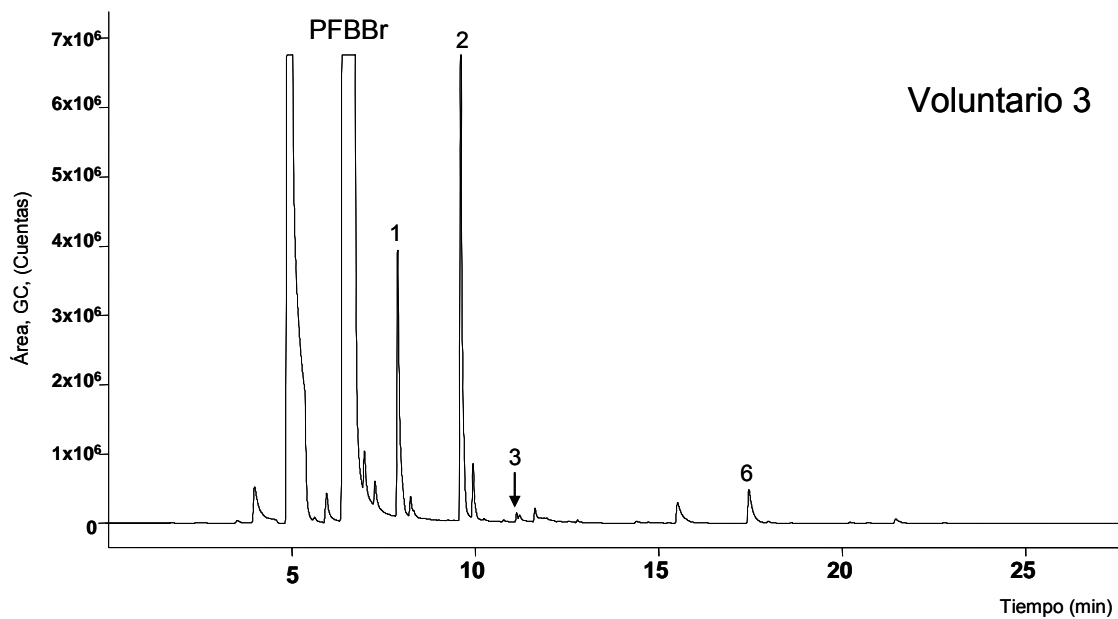
Las muestras de sudor fueron suministradas por 5 voluntarios masculinos, entre 23 y 28 años, quienes se encontraban en buen estado físico y de salud. El sudor fue recolectado de los pies de los voluntarios, por lo que se diseñó una plantilla de algodón y gasa esterilizados, que utilizaron durante una jornada laboral de 8 hrs, suponiendo que en este período la persona tiene mayor movimiento y, por tanto, mayor producción de sudor. Se les solicitó a los participantes realizar el lavado de los pies sólo con agua, y por lo menos 2 días antes de realizar el muestreo no aplicar productos antitranspirantes, así como durante los días del experimento.

El procedimiento de uso de la plantilla y de manejo de la muestra de sudor fue descrito en el **Numeral 2.1.7** del procedimiento experimental.

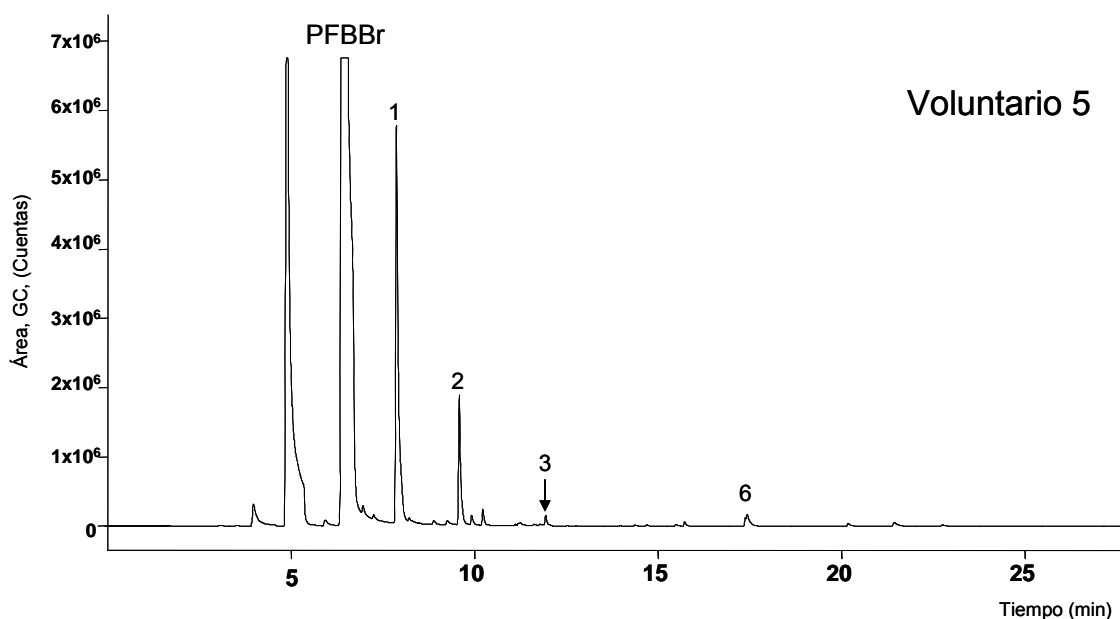
A continuación, en la **Figura 36** se presentan algunos perfiles cromatográficos de las muestras de sudor originado en los pies.



**Figura 36. Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la muestra fresca de sudor de los cinco voluntarios obtenidos por *HS-SPME*. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.**



**Figura 36.** Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la muestra fresca de sudor de los cinco voluntarios obtenidos por *HS-SPME*. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.



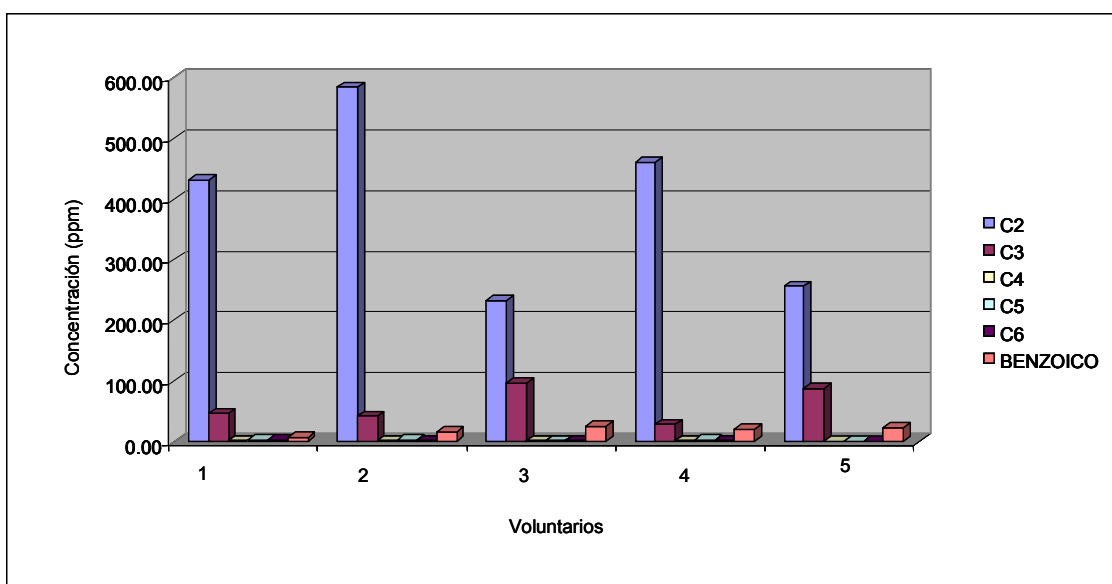
**Figura 36.** Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la muestra fresca de sudor de los cinco voluntarios obtenidos por *HS-SPME*. Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu$ m), GC-ECD. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu$ m. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

En la **Tabla 4**, se reportan los derivados de los ácidos carboxílicos presentes en las muestras de sudor de los pies de los 5 voluntarios. Las muestras fueron analizadas en estado fresco, es decir, se procedió a analizar una vez recibida la muestra. Los compuestos fueron cuantificados usando los resultados de la curva de calibración de los respectivos ésteres. (Véase **Anexo 1**). Se puede apreciar que los compuestos mayoritarios corresponden a los ácidos acético, propiónico y benzoico.

**Tabla 4. Composición de los ácidos carboxílicos volátiles C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>, y del ácido benzoico presentes en las muestras frescas de sudor de los pies de 5 voluntarios.**

Voluntario	Ácidos carboxílicos/Concentración, ppm					
	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>	C <sub>6</sub>	Benzoico
V1	430 ± 14	50 ± 3.85	1.6 ± 0.24	2.5 ± 0.43	2.6 ± 0.52	7.4 ± 0.28
V2	590 ± 5.67	40 ± 7.01	1.17 ± 0.007	2.0 ± 0.12	1.34 ± 0.03	15.3 ± 0.74
V3	230 ± 18.6	100 ± 12.7	1.1 ± 0.12	1.30 ± 0.32	0.94 ± 0.08	24 ± 3.83
V4	460 ± 5.63	28 ± 1.76	1.05 ± 0.12	2.04 ± 0.07	1.22 ± 0.04	20 ± 2.43
V5	260 ± 7.47	90 ± 1.20	0.12 ± 0.001	N.D	0.33 ± 0.03	20 ± 1.93

En la **Figura 37**, se observa la distribución de los compuestos derivados de los ácidos carboxílicos. Se puede apreciar, que en todas las muestras se detectaron los mismos ácidos carboxílicos, sin embargo, su relación varía de un voluntario a otro. Lo que parece confirmar una vez más, que el olor es una característica individual para cada persona [19].



**Figura 37. Distribución de los ácidos carboxílicos volátiles presentes en el sudor de los pies de 5 voluntarios masculinos, analizado después de una jornada laboral de 8 hrs.**

Los compuestos detectados se encuentran también reportados en literatura [12, 19]; en estos trabajos, se han empleado la microextracción en fase sólida, como método de aislamiento de los componentes volátiles, presentes en el sudor humano, y GC-MS como método de análisis e identificación. Dentro de la revisión bibliográfica realizada para este trabajo, no se encontró ningún reporte que indique la presencia de los ácidos C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> en las muestras de sudor humano, que se hallaron en concentraciones bajas (**Figura 37**).

La metodología de análisis empleada por Zhang [12] y Curran [19], fue la HS- SPME-GC-MS sin la derivación química de los ácidos carboxílicos. En nuestro estudio, al emplear su

derivación química con el PFBBr, se aumentó considerablemente la sensibilidad del método de análisis, lo que permitió detectar ácidos C<sub>4</sub> y C<sub>5</sub> a nivel de trazas.

Respecto al ácido benzoico, se sabe, que este compuesto posee actividad fungicida, y por ende, inicialmente podría descartarse como un metabolito propio del sudor humano, sin embargo, este ácido también fue reportado por Zeng y sus colaboradores en 1991 [11]. Bernier (2000) [16], lo identificó entre los 346 compuestos aislados de las emanaciones de la piel, entre los cuales figuran también sustancias atrayentes del mosquito *Aedes aegypti*.

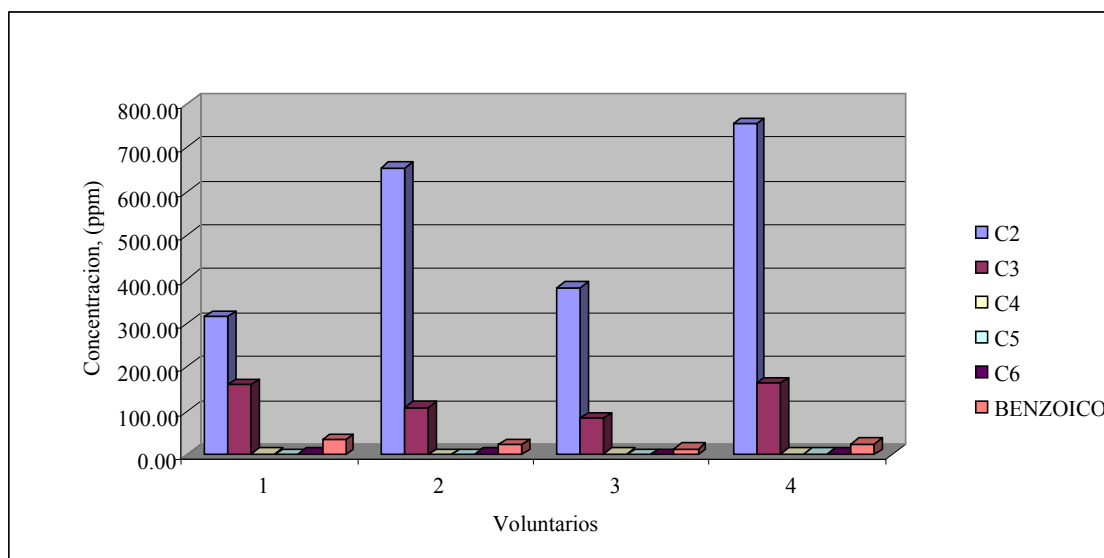
Se monitoreó también la incidencia del almacenamiento de las muestras sobre la composición de los ácidos carboxílicos presentes en la muestras de sudor humano. En este ensayo se seleccionaron 4 voluntarios, quienes siguieron el mismo procedimiento de uso de la plantilla de algodón para recolectar la muestra de sudor. Las muestras fueron recolectadas, preservadas con papel aluminio y guardadas en la nevera durante 6 días, al cabo de los cuales se procedió a realizar el respectivo análisis.

En la **Tabla 5**, se presenta la composición de los derivados de los ácidos, presentes en este ensayo.

**Tabla 5. Composición de los ácidos carboxílicos volátiles, C<sub>2</sub> – C<sub>6</sub>, y del benzoico presentes en las muestras de sudor de los pies, almacenadas por 6 días.**

<b>Voluntario</b>	<b>Ácidos carboxílicos/Concentración, ppm</b>					
	<b>C2</b>	<b>C3</b>	<b>C4</b>	<b>C5</b>	<b>C6</b>	<b>Benzoico</b>
<b>V1</b>	300 ± 17	200 ± 36.3	1.7 ± 0.36	0.3 ± 0.11	2.1 ± 0.28	30 ± 2.15
<b>V2</b>	700 ± 52.5	110 ± 7.01	0.08 ± 0.004	0.18 ± 0.05	0.55 ± 0.07	20 ± 3.3
<b>V3</b>	400 ± 38.7	80 ± 2.26	0.8 ± 0.15	0.09 ± 0.12	0.47 ± 0.07	13.45 ± 0.05
<b>V4</b>	530 ± 5.64	200 ± 35.8	0.80 ± 0.02	0.32 ± 0.02	1.10 ± 0.07	11.3 ± 0.71

La **Figura 38**, muestra la distribución de los ácidos carboxílicos volátiles (en forma de sus ésteres de PFB), presentes en las muestras de sudor de 4 voluntarios. Las muestras fueron almacenadas por 6 días. No se notan cambios considerables en la composición cualitativa de las muestras, se puede confirmar, que se conserva el mismo perfil para cada uno de los voluntarios (**Figura 37**). Los derivados de los ácidos C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub> y benzoico siguen siendo los componentes mayoritarios presentes en las muestras. Para los voluntarios 1 y 3, se observa una disminución en la concentración del ácido C<sub>2</sub>, en tanto, que el derivado del ácido propiónico se aumenta. El efecto contrario se presenta para los voluntarios 2 y 4 para quienes la cantidad de C<sub>2</sub> y C<sub>3</sub> aumenta de modo apreciable. Los demás compuestos C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> y C<sub>6</sub> siguen presentes a nivel de trazas. Esto indica, que el análisis de las muestras puede ser realizado en 0 - -6 días, después de su recolección; sin que afecte mucho la composición de la muestra, siempre y cuando esté guardado a temperatura baja y en oscuridad.



**Figura 38. Distribución de los ácidos carboxílicos presentes en las muestras de sudor de 4 voluntarios almacenadas durante 6 días.**

### **3.4. Determinación de compuestos carbonílicos, C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>, presentes en las muestras de sudor.**

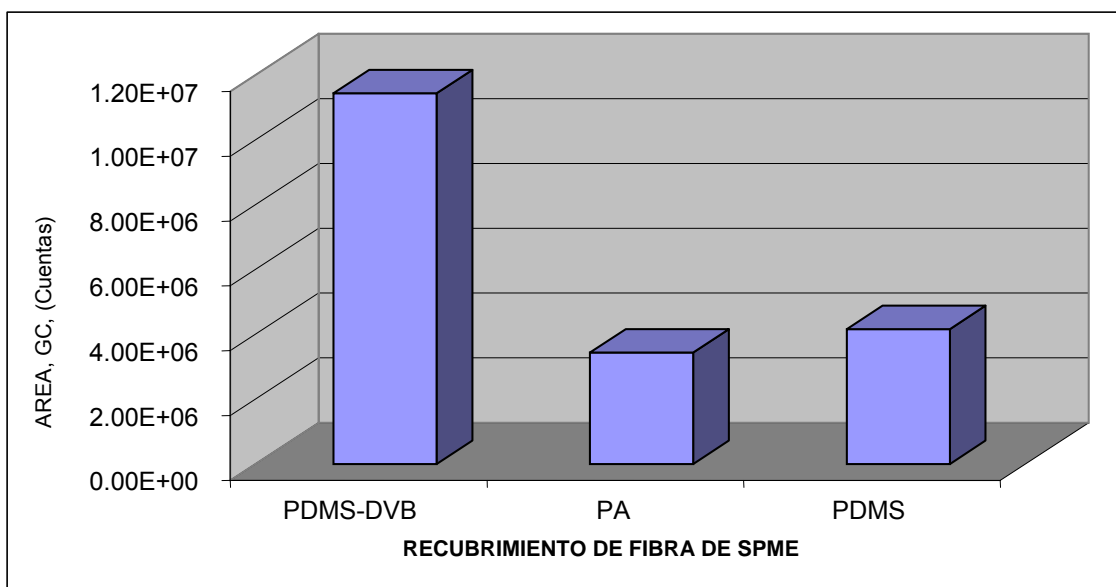
Para la determinación de los aldehídos volátiles C<sub>2</sub>- C<sub>10</sub>), se empleó la metodología de derivación química *in situ* sobre la fibra de SPME. El agente derivante utilizado fue la pentafluorofenilhidracina (PFPH), obteniéndose las respectivas hidrazonas. La determinación e identificación de estos compuestos se realizó por GC-ECD.

#### **3.4.1 Selección de La fibra de SPME**

Se procedió a seleccionar la fibra adecuada para la determinación de aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor humano (pies). Se evaluaron 3 recubrimientos poliméricos, a saber: poli(dimetilsiloxano), PDMS, 100µm, poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno, PDMS/DVB, 65µm, poli(acrilato), PA, 85µm.

Se empleó una solución de PFPH 2.4 mM, y el tiempo de exposición de la fibra a esta solución fue de 3 min. Este procedimiento se repitió para cada uno de los recubrimientos. El criterio de selección se basó en la cantidad de PFPH retenida por la fibra [41].

En la Figura 39 se observa, que la mayor cantidad de PFPH fue retenida por el recubrimiento polimérico de PDMS/DVB, por lo cual, esta fibra fue seleccionada para realizar la determinación de los aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor humano.

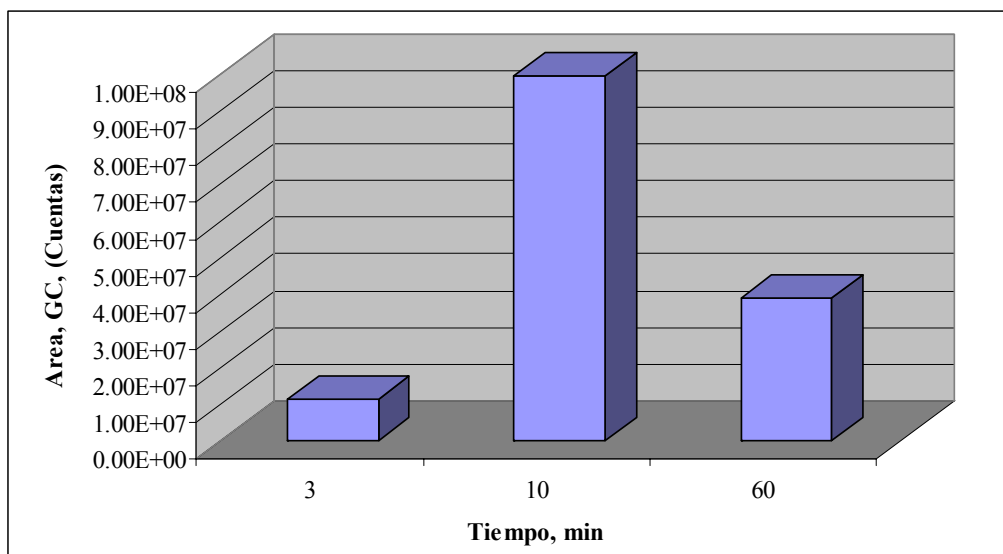


**Figura 39.** Cantidad de PFPH retenida por cada uno de los recubrimientos de la fibra de SPME. Concentración de PFPH en la solución; 2.4 mM, tiempo de extracción: 3 min, temperatura: 28 °C.

Para la determinación de estos compuestos en las muestras de sudor humano, se siguió el procedimiento descrito en la Parte Experimental (**Numeral 2.3**). Se analizaron las muestras suministradas por cuatro (4) voluntarios, empleando la SPME en el modo *headspace* combinada con la derivación química *in situ* sobre la fibra de PDMS –DVB.

### 3.4.2 Evaluación del tiempo de exposición de la fibra al agente derivatizante

Una vez seleccionada la fibra de PDMS-DVB, como el recubrimiento a utilizar para la microextracción de las hidrazonas de los aldehídos volátiles, fue necesario evaluar el tiempo de su exposición al agente derivatizante, PFPH, para lo cual se emplearon tiempos de 3, 10 y 60 min (Ver **Figura 40**).

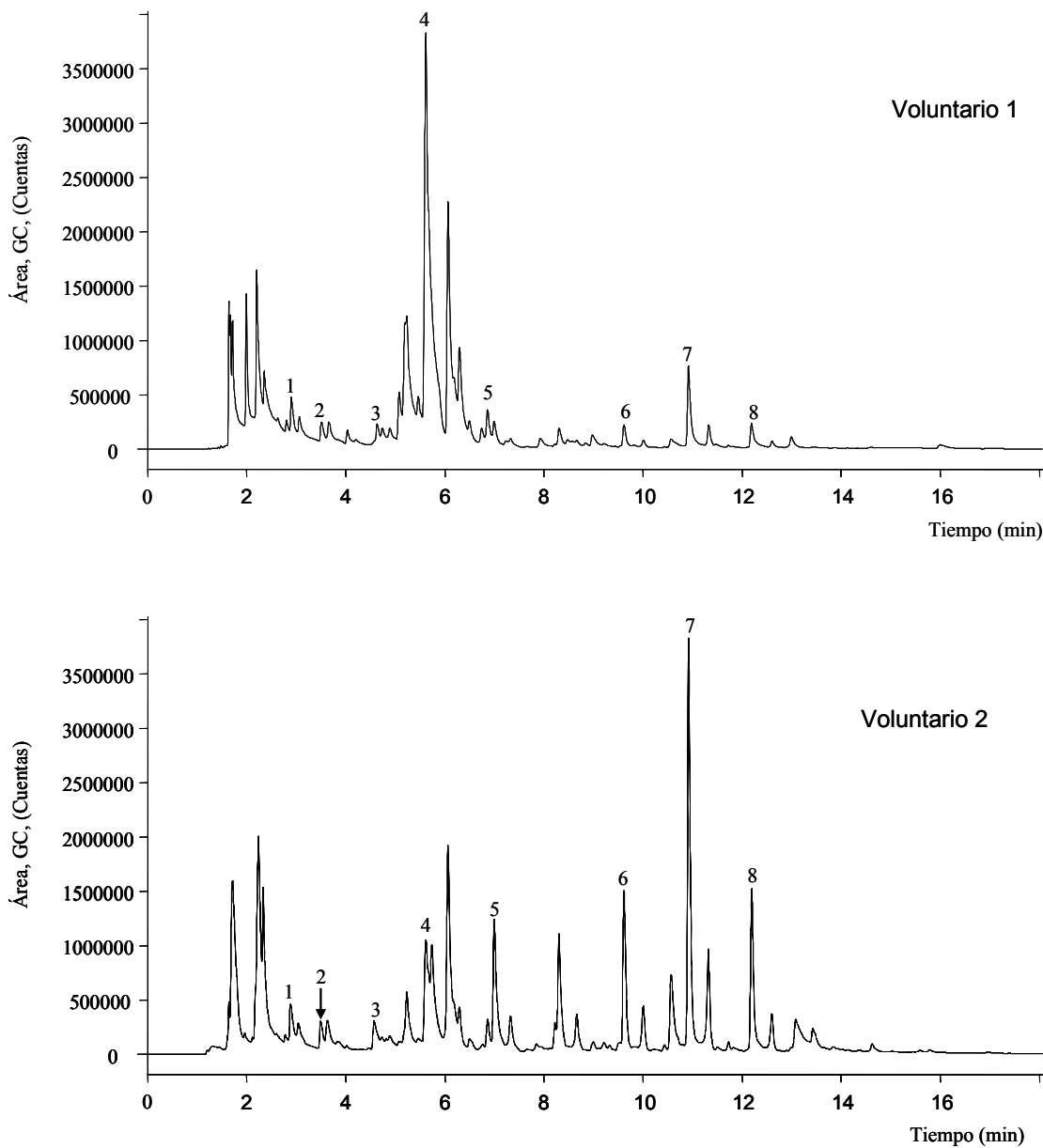


**Figura 40.** Cantidad de PFPH retenida por la fibra de SPME, (PDMS-DVB, 65µm) en función del tiempo de su exposición. Concentración de PFPH en solución: 2.4 mM, temperatura: 28 °C.

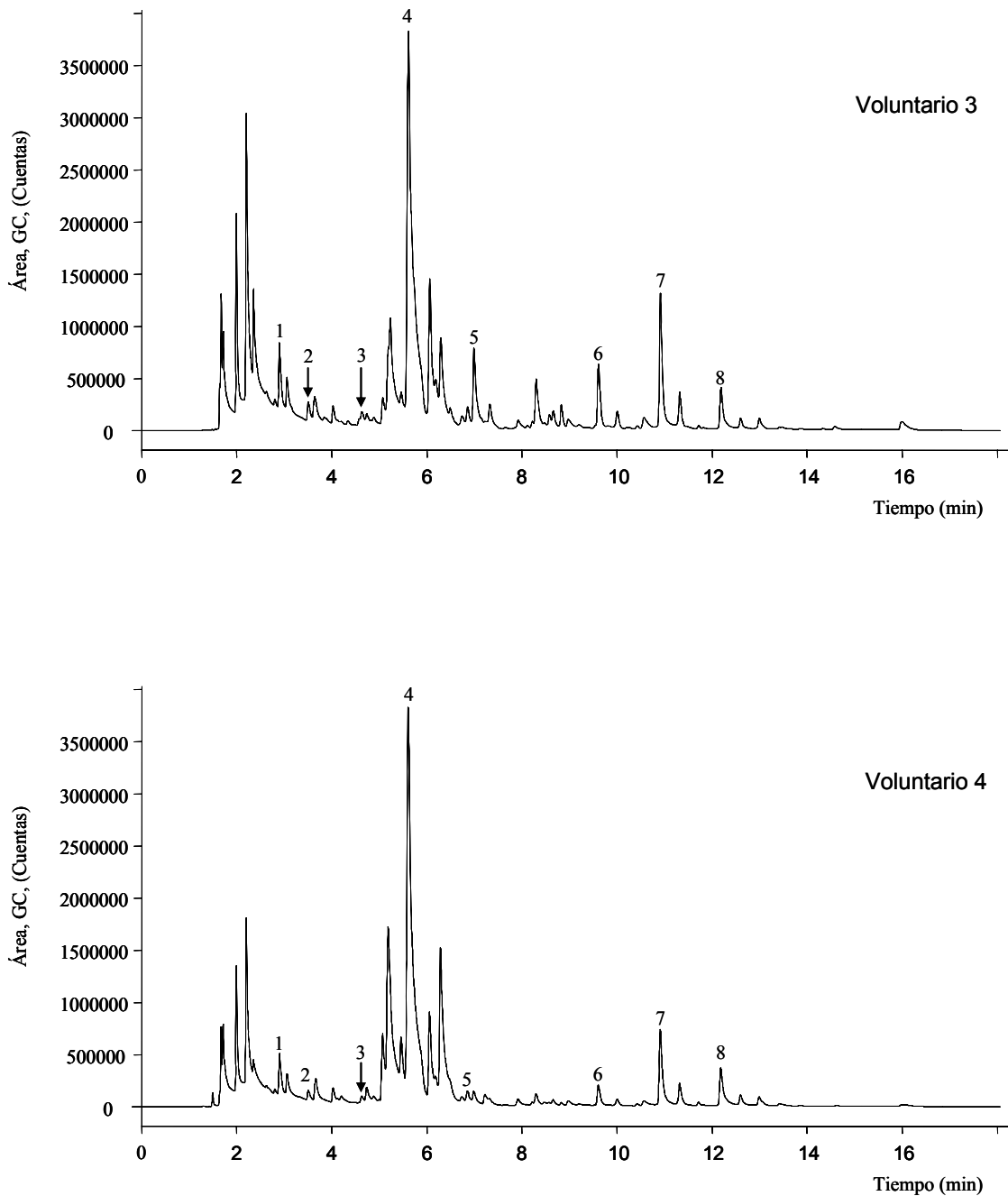
Como se puede observar en la **Figura 40**, la mayor cantidad retenida de agente derivatizante sobre la fibra de PDMS-DVB, se presenta a los 10 min. Se esperaría que a 30 y 60 min, los valores obtenidos fueran mayores, sin embargo, a tiempos de exposición más prolongados ya se observa el efecto contrario de desorción de analitos. Por lo tanto, el tiempo de exposición de la fibra fue fijado en 10 min.

Para la determinación de la composición de los aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de 4 voluntarios, se analizó una fracción de la plantilla de algodón (aprox. 2 g de muestra) sobre la cual se recolectó la muestra de sudor originado en los pies. El procedimiento se describe en el **Numeral 2.3**, de la Parte Experimental.

Los derivados hidrazónicos de los aldehídos volátiles fueron obtenidos mediante *HS-SPME*, usando derivación *in situ* sobre la fibra de PDMS-DVB, 65µm. Los perfiles cromatográficos obtenidos para los 4 voluntarios se presentan en la **Figura 41**.

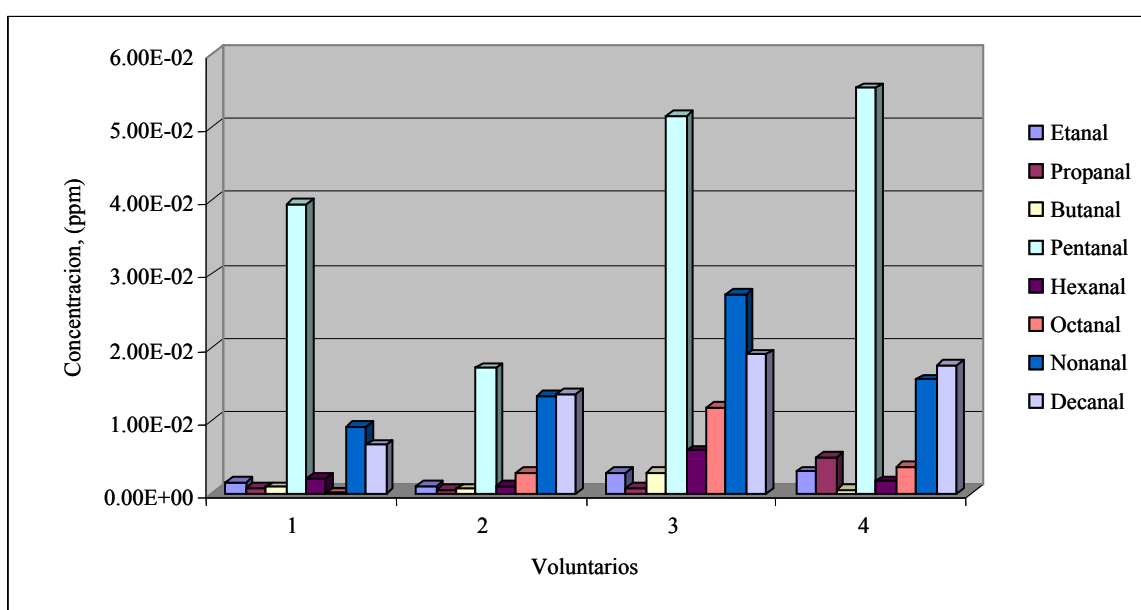


**Figura 41.** Perfiles cromatográficos típicos de los aldehídos volátiles, presentes en las muestras frescas de sudor de los 4 voluntarios obtenidos por *HS-SPME*, usando derivación *in situ* sobre la fibra (PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$ ). Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. 1. Etanal 2. Propanal 3. Butanal 4. Valeraldehído 5. Hexanal 6. Octanal. 7. Nonanal 8. Decanal.



**Figura 41.** Perfiles cromatográficos típicos de los aldehídos volátiles, presentes en las muestras frescas de sudor de los 4 voluntarios obtenidos por *HS-SPME*, usando derivación *in situ* sobre la fibra (PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$ ). Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. 1. Etanal 2. Propanal 3. Butanal 4. Valeraldehído 5. Hexanal 6. Octanal. 7. Nonanal 8. Decanal.

En la **Figura 42**, se observa la composición de los aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de los pies de cuatro (4) voluntarios, obtenidos por HS-SPME, usando derivación química *in situ* sobre la fibra de PDMS-DVB y la respectiva curva de calibración de patrones. Como puede apreciarse, aldehídos volátiles C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub> fueron detectados, en todas las muestras de sudor de los 4 voluntarios. Los componentes mayoritarios para todos los voluntarios correspondieron al pentanal, nonanal y decanal. La fracción minoritaria está constituida por el etanal, propanal, butanal, hexanal y octanal.



**Figura 42.** Aldehídos volátiles, presentes en las muestras frescas de sudor de los pies de cuatro voluntarios, obtenidos por HS-SPME, usando derivación *in situ* sobre la fibra de PDMS-DVB, 65  $\mu\text{m}$ . GC-ECD.

En la **Tabla 6** se presenta la composición de los derivados hidrazónicos de los aldehídos volátiles identificados en las muestras de sudor de los pies de 4 voluntarios masculinos.

**Tabla 6. Cantidad (ppm) de los aldehídos volátiles, obtenidos mediante HS-SPME con derivación *in situ* sobre la fibra (PDMS/DVB de 65  $\mu\text{m}$ ), presentes de sudor de los pies de 4 voluntarios.**

Voluntario	Cantidad de aldehídos (ppm)							
	Etanal	Propanal	Butanal	Pentanal	Hexanal	Octanal	Nonanal	Decanal
V1	1.6E-03	7.4E-04	9.8E-04	3.9E-02	2.1E-03	1.5E-04	9.2E-03	6.7E-03
V2	10.0E-04	4.9E-04	6.6E-04	1.7E-02	1.1E-03	2.9E-03	1.3E-02	1.4E-02
V3	2.9E-03	8.4E-04	2.9E-03	5.2E-02	5.9E-03	1.2E-02	2.7E-02	1.9E-02
V4	3.0E-03	4.9E-03	5.2E-04	5.5E-02	1.8E-03	3.6E-03	1.6E-02	1.8E-02

Los componentes identificados mediante la metodología de HS-SPME combinada con la derivación química y posterior análisis GC-ECD, han sido reportados por otros autores [1, 19], como constituyentes de la fracción volátil de las emanaciones humanas. La derivación química de aldehídos, directamente sobre la fibra, permite aumentar la sensibilidad y la selectividad del método analítico.

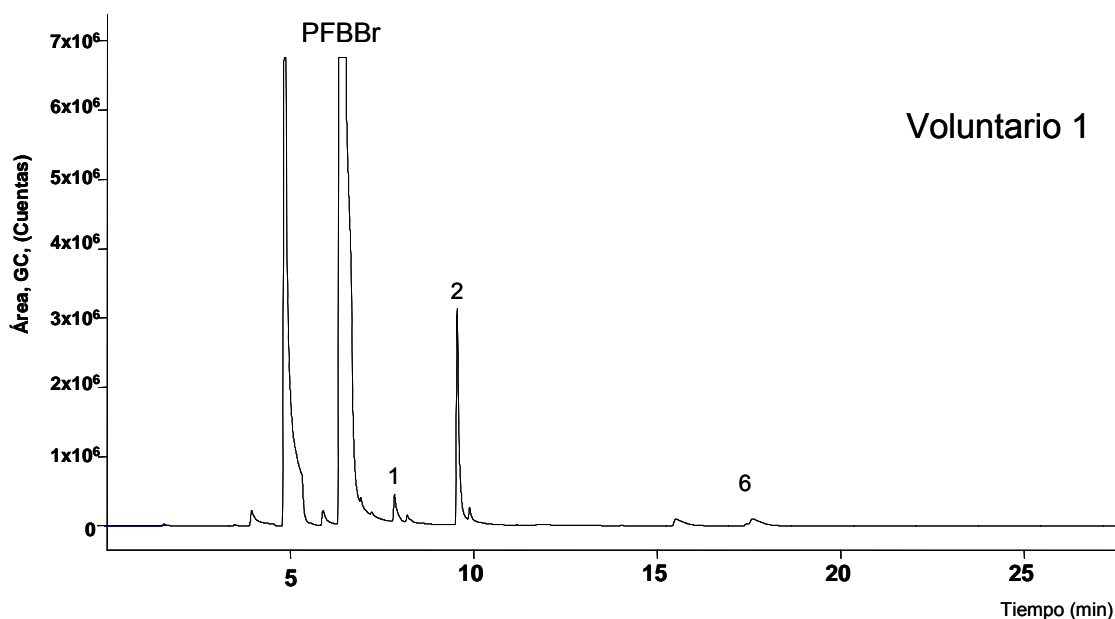
### **3.5 Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en las muestras de sudor después de emplear talco para pies.**

Adicionalmente, se realizaron experimentos de control, con la participación de sólo dos voluntarios, que suministraron muestras de sudor. Se les solicitó, utilizar el mismo material de recolección de muestra (plantilla de algodón), pero, en esta ocasión, los participantes deberían usar talco para los pies de marca comercial, *e.g.* “Yodora medicinal con Triclosan”; luego, se siguió el mismo procedimiento de extracción y derivación para la determinación de ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles, tal como se efectuó en la primera etapa del trabajo. Los voluntarios usaron la plantilla de algodón con el talco para pies, durante una jornada de 8 hrs, una vez cumplido este tiempo, retiraron el vendaje y éste fue entregado para el respectivo análisis.

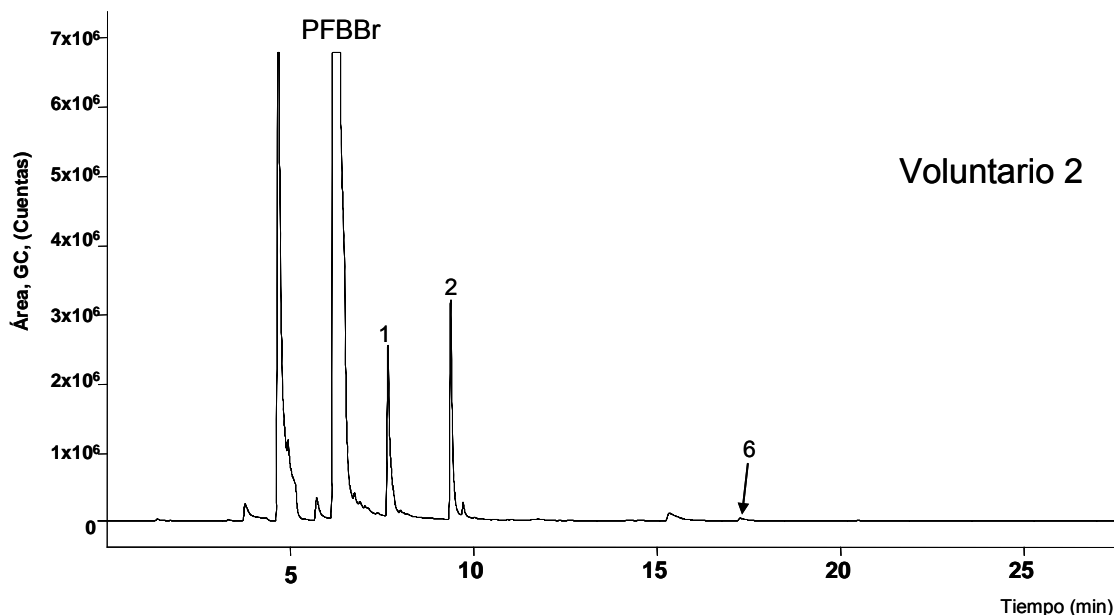
### 3.5.1 Ácidos carboxílicos

Una vez recibido el vendaje de algodón y gasa, se tomó una fracción del mismo y se sometió a desorción líquida con el fin de extraer la fracción correspondiente a los ácidos carboxílicos impregnados en la plantilla de algodón. Posteriormente, se siguió el procedimiento establecido para la derivación química en la matriz de la muestra con PFBBr y, luego, la extracción de los derivados empleando *HS-SPME*.

En la **Figura 43**, aparecen los perfiles cromatográficos de los ácidos carboxílicos presentes en muestras de sudor de dos voluntarios masculinos, obtenidas inmediatamente después de transcurrir 8 hrs de aplicación de talco medicinal para los pies.



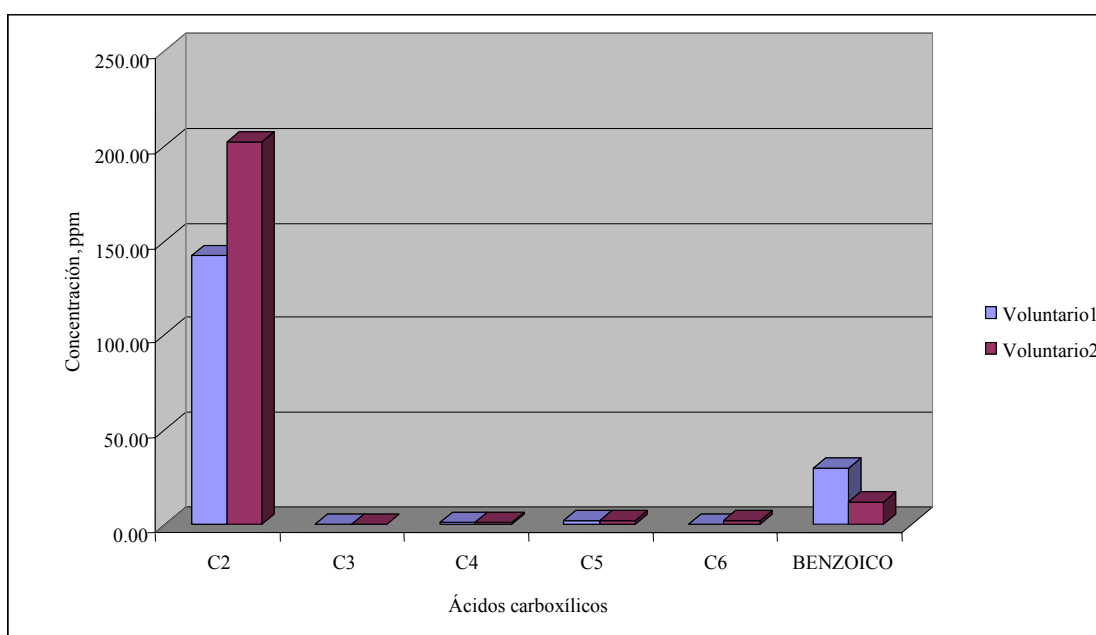
**Figura 43.** Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la muestra de sudor de dos voluntarios después de 8 hrs de uso de talco para los pies. *HS-SPME*. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.



**Figura 43.** Perfiles cromatográficos típicos de los ácidos carboxílicos (en forma de sus ésteres de pentafluorobencilo), presentes en la muestra de sudor de dos voluntarios después de 8 hrs de uso de talco para los pies. *HS-SPME*. Fibra de poli(acrilato) de 85  $\mu\text{m}$ . Columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25  $\mu\text{m}$ ), GC-ECD. 1. Acético 2. Propiónico 3. Butírico 4. Valérico 5. Hexanoico 6. Benzoico.

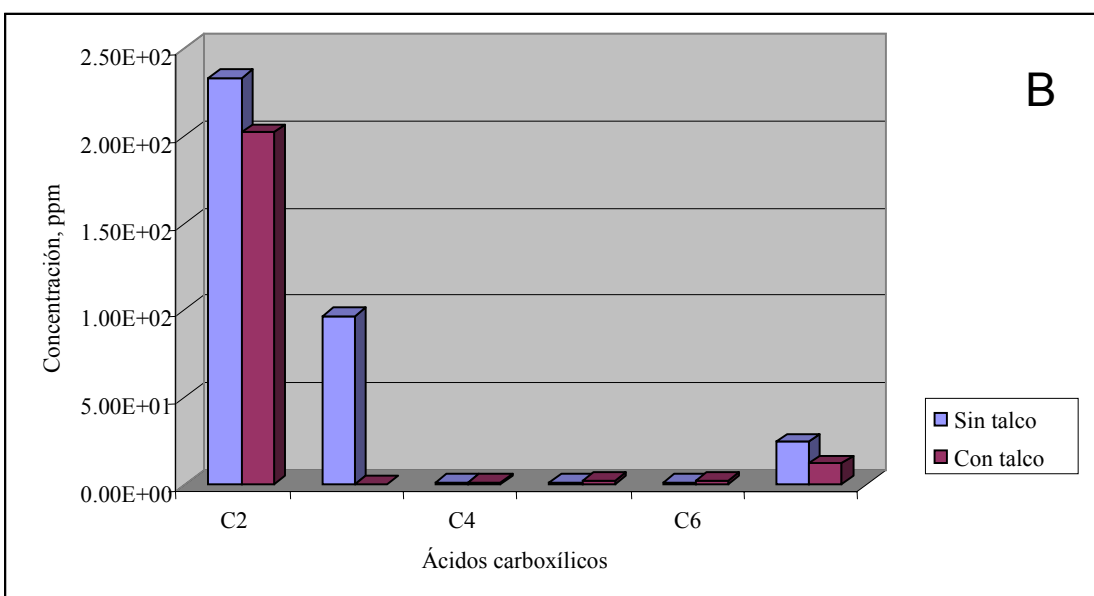
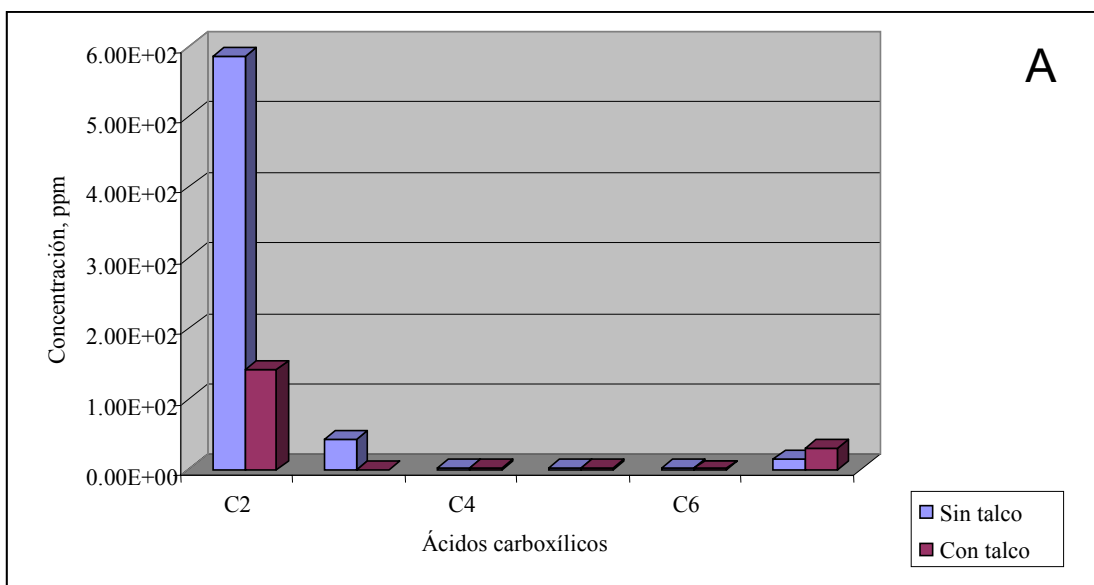
Se puede apreciar, que con el uso del talco medicinal, se reduce la presencia de los ácidos carboxílicos en las muestras de sudor (**Figura 44**), los compuestos mayoritarios presentes en estas muestras son los ácidos acético y benzoico, los demás derivados de ácidos no fueron detectados.

En el cromatograma de las muestras (**Figura 43**) aparece el pico del ácido propiónico, pero éste fue descartado después de sustraer la señal de la línea base del agente derivatizante (C3-PFBBr, contaminante del reactivo).



**Figura 44. Ácidos carboxílicos volátiles, obtenidos por HS-SPME de sus ésteres derivados de PFBBr, presentes en las muestras de sudor de pies de dos voluntarios después de emplear talco.**

Se realizó la comparación de los compuestos carboxílicos en las muestras suministradas por los 2 voluntarios, con y sin el uso de talco para los pies (**Figura 45**). Como característica común observada para los dos voluntarios, se aprecia que cuando se aplica el talco, la cantidad del ácido acético disminuye en un 75.7% para el voluntario 1 y 13.3% para el voluntario 2, en tanto que, el ácido propiónico desaparece.



**Figura 45. Ácidos carboxílicos presentes en las muestras de sudor de pies de dos voluntarios, obtenidas sin uso de talco y después de su aplicación. A. Voluntario 1 B. Voluntario 2.**

### 3.5.2 Aldehídos volátiles

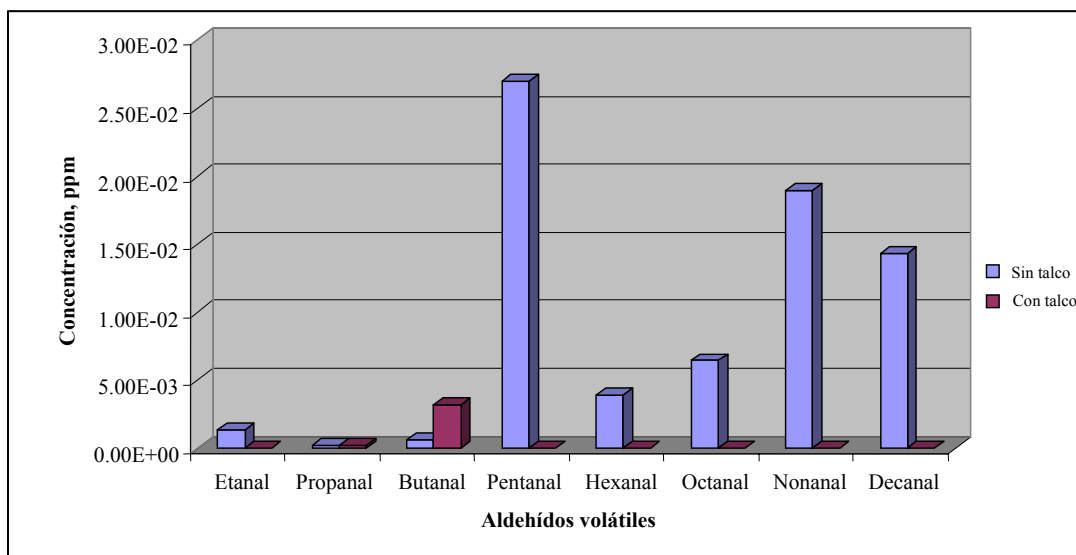
Se realizó el ensayo para la determinación de los aldehídos volátiles en sudor de los pies después de emplear talco medicinal. Se obtuvieron las muestras de sudor después de una jornada de uso de 8 hrs y se siguió el procedimiento, ya anteriormente descrito, para el análisis de aldehídos en las plantillas de algodón.

En la **Tabla 7**, se presenta la cantidad de los aldehídos volátiles (medidos como sus derivados hidrazónicos), obtenidos de las muestras de sudor de pies de dos voluntarios quienes en un experimento no usaron talco y, y luego si lo aplicaron por un período de 8 hrs. La cuantificación se basó en las curvas de calibración de los respectivos patrones (Véase **Anexo 2**).

**Tabla 7. Cantidad de aldehídos volátiles (ppm), obtenidos mediante HS-SPME con derivación *in situ* sobre la fibra (PDMS/DVB, 65µm), presentes en el sudor de los pies de dos voluntarios con y sin aplicación de talco.**

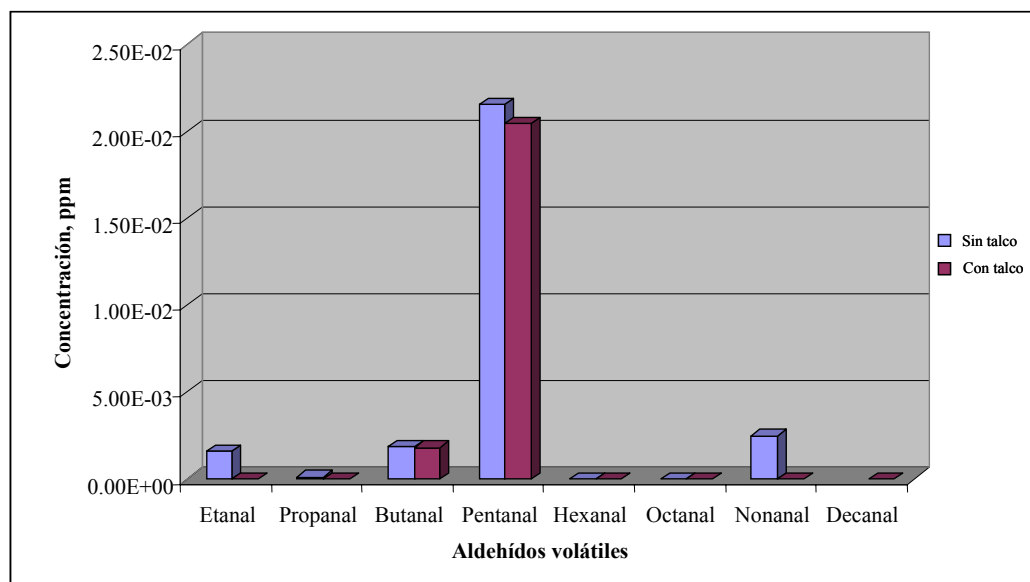
Compuesto	Voluntario 1		Voluntario 2	
	Sin talco	Con talco	Sin talco	Con talco
Etanal	1.4E-03	N.D	1.6E-03	N.D
Propanal	2.7E-04	2.5E-04	1.3E-04	N.D
Butanal	6.6E-04	3.2E-03	1.8E-03	1.8E-03
Pentanal	2.7E-02	N.D	2.2E-02	2.0E-02
Hexanal	3.9E-03	N.D	N.D	N.D
Octanal	6.5E-03	N.D	N.D	N.D
Nonanal	1.9E-02	N.D	2.5E-03	N.D
Decanal	1.4E-02	N.D		N.D

Los compuestos mayoritarios en la muestra de sudor de pies sin usar el talco fueron el pentanal, hexanal, octanal, nonanal y decanal. Cuando se aplicó el talco los compuestos mayoritarios correspondieron al propanal y al butanal (**Figura 46**).



**Figura 46. Aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de pies del voluntario 1, antes y después del uso de talco medicinal.**

Para el segundo voluntario, los compuestos mayoritarios cuando no se usó el talco, fueron el etanal, propanal, butanal, pentanal y el nonanal. Después de aplicarlo sólo se detectaron el butanal y pentanal (**Figura 47**).



**Figura 47. Aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor de pies del voluntario 2, antes y después del uso de talco medicinal.**

Para validar la metodología, desarrollada en el presente trabajo, adicionalmente, se realizaron ensayos para la determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en el sudor originado en la zona axilar. Se aplicó la microextracción en fase sólida en el modo *headspace*, combinada con derivación química y posterior análisis cromatográfico con detector de captura de electrones (HS-SPME-GC-ECD).

Para la recolección de la muestra, se empleó una plantilla hecha con gasa y algodón esterilizados, la cual fue colocada en la región axilar de los voluntarios seleccionados para los ensayos de control. El tiempo de uso de este vendaje fue de 6 hrs en promedio. Se les solicitó a los participantes realizar el lavado de la zona sólo con agua y suspender el uso de desodorantes y perfumes, por lo menos, durante dos días antes del muestreo.

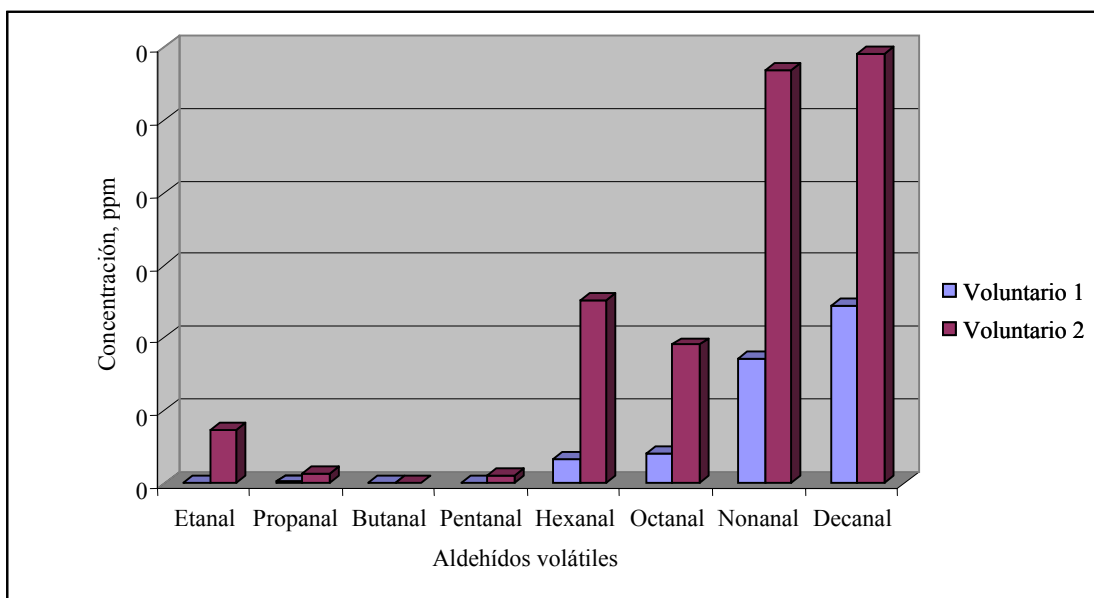
### 3.6 Determinación de aldehídos volátiles en sudor de las axilas.

Una vez obtenidas las muestras de sudor de la región axilar, se procedió a realizar la determinación de los compuestos carbonílicos presentes. Empleando la derivación química *in situ* con PFPH, así como está descrito en el Procedimiento Experimental (**Numeral 2.2.6**). En la **Tabla 8**, aparece la cantidad de los aldehídos volátiles presentes en sudor de las axilas de los dos voluntarios.

**Tabla 8. Cantidad (ppm) de los aldehídos volátiles presentes en el sudor de la región axilar, determinada HS-SPME con derivación *in situ* sobre la fibra de PDMS/DVB de 65µm de espesor.**

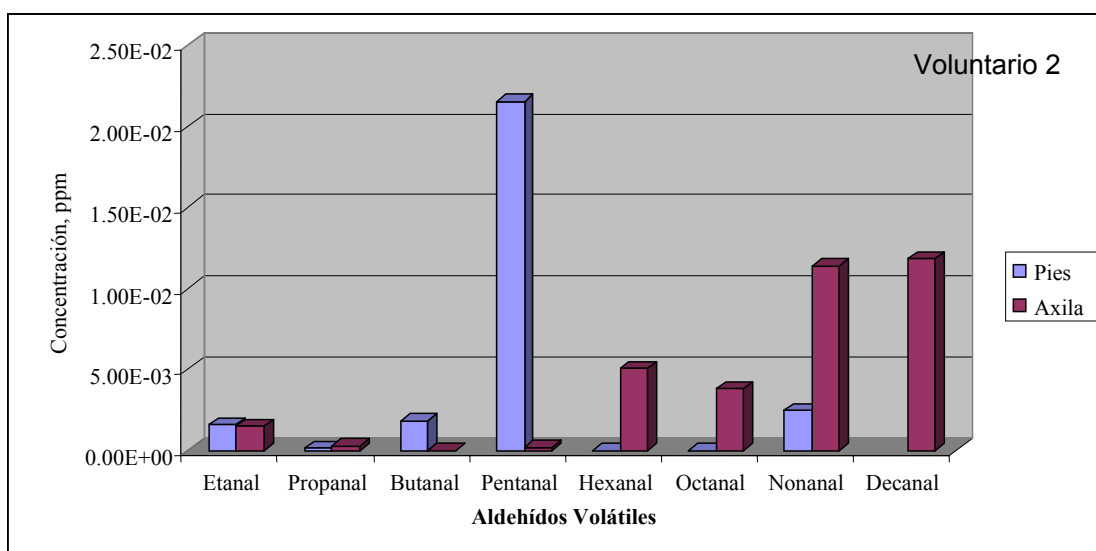
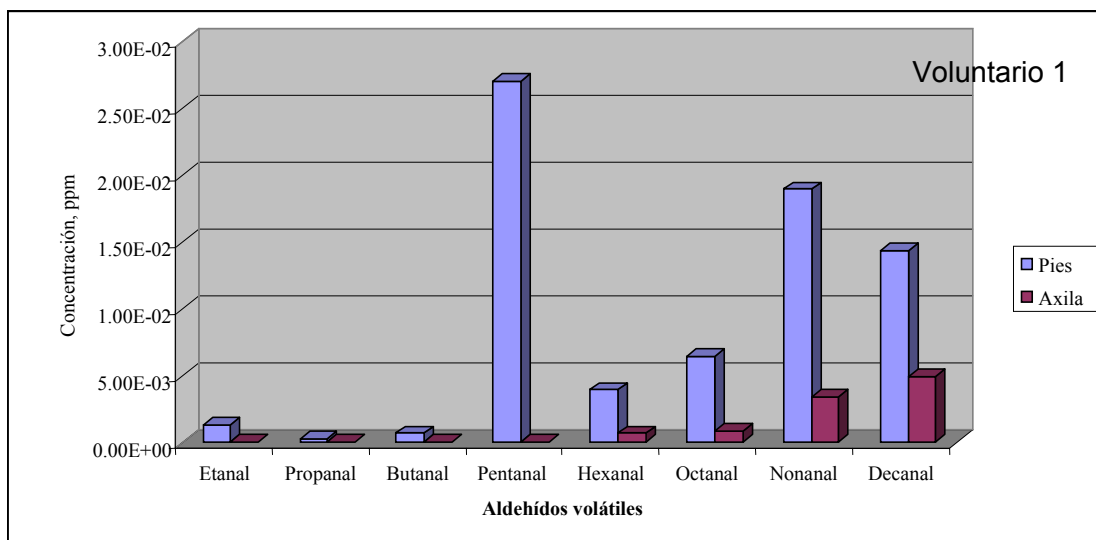
Compuesto	Concentración (ppm)	
	Voluntario 1	Voluntario 2
Etanal	N.D	1.5E-03
Propanal	3.6E-05	2.6E-04
Butanal	N.D	N.D
Pentanal	N.D	2.0E-04
Hexanal	6.9E-04	5.0E-03
Octanal	8.2E-04	3.8E-03
Nonanal	3.4E-03	1.1E-02
Decanal	4.9E-03	1.2E-02

Los compuestos mayoritarios detectados fueron el etanal, hexanal, octanal, nonanal y decanal (**Figura 48**). Se aprecia una gran diferencia en la distribución de estos compuestos para los dos voluntarios.



**Figura 48.** Aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor axilar obtenidos mediante HS-SPME con derivación *in situ* sobre la fibra (PDMS-DVB, 65 $\mu$ m).

También resulta interesante, que el pentanal se encuentra en menor cantidad en las muestras obtenidas de la región axilar, en tanto, que para las muestras de sudor en los pies, es uno de los compuestos mayoritarios, como se puede apreciar en la **Figura 49**.



**Figura 49. Compuestos carbonílicos presentes en las muestras de sudor de las axilas y pies de dos voluntarios, aislados por HS-SPME, con derivación *in situ* sobre la fibra de PDMS-DVB (65  $\mu$ m).**

Los perfiles de los aldehídos volátiles aislados de diferentes partes del cuerpo, *i.e* axilas y pies de dos voluntarios, muestran diferencias significativas (**Figura 49**), lo que confirma que el olor humano es muy individual, y, además, su composición depende de la parte del cuerpo que lo origina, lo cual está asociado, a su vez, a la población bacteriana que se encuentra en la zona, que puede ser mermada por la acción de talcos, también por la cantidad de oxígeno disponible en la zona de sudoración. Las axilas son una zona bastante aireada, mientras, que el uso de calzado disminuye la cantidad de oxígeno disponible en los pies.

La metodología analítica aplicada es sensible y selectiva, presenta reproducibilidad y puede ser recomendada para este tipo de análisis, útiles en el campo de la medicina, toxicología y ciencias forenses, entre otros.

#### 4. CONCLUSIONES

- ❖ Para la determinación de los compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en muestras de sudor humano, se implementó una metodología analítica basada en la microextracción en fase sólida en el modo *headspace*, combinada con la derivación química y análisis cromatográfico con detector de captura de electrones (HS-SPME-GC-ECD). La derivación química permite aumentar la sensibilidad del método de análisis y detectar estos compuestos a nivel de trazas.
- ❖ Para la determinación de los ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles presentes en las muestras de sudor se implementó la derivación química. Para los ácidos carboxílicos, se empleó la derivación en la matriz de la muestra con bromuro de pentafluorobencilo, obteniéndose los respectivos ésteres de pentafluorobencilo, en tanto que, para los aldehídos volátiles, se realizó derivación *in situ*, directamente sobre la fibra de SPME, previamente saturada con el agente derivatizante, pentafluorofenilhidracina.
- ❖ Se detectaron compuestos carboxílicos en sudor humano originado en los pies de cinco voluntarios; siendo los componentes mayoritarios los ácidos acético, propiónico y benzoico. Los aldehídos volátiles presentes en mayor concentración en las muestras de sudor de pies evaluadas fueron el pentanal, octanal, nonanal y decanal.
- ❖ En dos voluntarios se estudió la composición de los ácidos carboxílicos y aldehídos volátiles presentes en sudor de los pies, sin y con el uso de talco medicinal. Se encontró, que los ácidos acético y benzoico fueron los constituyentes mayoritarios presentes después del empleo del talco para los dos voluntarios. En el caso de los aldehídos volátiles, el pentanal fue el compuesto mayoritario común para los dos voluntarios. La composición de los demás componentes difiere enormemente en el sudor de los participantes de este ensayo.

- ❖ Se determinaron que los compuestos carbonílicos mayoritarios presentes en el sudor axilar de los dos voluntarios, fueron el hexanal, octanal, nonanal y decanal. La cantidad de estos compuestos varía significativamente entre los voluntarios.
- ❖ Los compuestos carbonílicos y carboxílicos encontrados durante la realización del presente trabajo, han sido, a su vez, reportados por otros autores [1, 12,16, 19]. Sin embargo, la metodología relativamente fácil y no invasiva, propuesta en este trabajo, permitió detectar estos componentes selectivamente a nivel de trazas, debido a la combinación de la derivación química con la HS-SPME y el análisis con un sistema de detección como el de captura de electrones.
- ❖ La diferencia en la distribución de los compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en las muestras de sudor de los voluntarios participantes en este estudio, indicaría que el sudor y olor humano constituyen una huella digital odorífera que podría ser empleada con propósitos de identificación de personas.

## **5. RECOMENDACIONES**

- ❖ Las características de esta metodología analítica, no invasiva y altamente sensible, podrían tener una aplicación en el área clínica para la determinación de los aldehídos volátiles que son considerados como biomarcadores de enfermedades como el cáncer.
- ❖ Es necesario realizar más ensayos con diferentes personas que realicen distintas actividades, con el fin de determinar de manera más efectiva la incidencia del medio ambiente sobre la composición del olor humano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **DI NATALE, C., MACAGNANO, A., PAOLESSE, R., TARIZZO, E., MANTINI, A., and D'AMICO, A.** Human skin odor analysis by means of an electronic nose, *Sensors and Actuators. B.*, **65**, 2000, p.p. 216-219.
2. La piel. Enciclopedia Temática Guinness. Ed. Printer Latinoamericana, Santafé de Bogotá, 1995, p.216.
3. **WALTERS, K. A. and ROBERTS, M. S.** The structure and function of skin. In: **WALTERS, K.** Dermatological and transdermal formulations. Marcel Dekker Incorporated, New York, 2002. Disponible en internet: <http://site.ebrary.com/lib/consorciocolombia/Doc?id=10050773&page=17>. Fecha de consulta: 2004/10/28.
4. Hipersudoración, exceso de sudor que traumatiza, Disponible en Internet: <http://revista.consumer.es/web/es/20040701/salud/>, **79**, 2004, p.4. Fecha de consulta: 2004/08/19
5. **BURRY, J. S., EVANS, R. L., RAWLINGS, A. V. and SHIU J.** Effect of antiperspirants on whole body sweat rate and thermoregulation. *Int. J. Cosmetic. Sci.*, **25**(4), 2003, p.p.192-194.
6. **SCHREIBER J.** Antiperspirants. In: **BAREL, A. O.** (Editor), Handbook of cosmetic science and technology. Marcel Dekker Incorporated, New York, 2001. p.p. 689 - 701. Disponible en internet: <http://site.ebrary.com/lib/consorciocolombia/Doc?id=10051199&page=689>, Fecha de consulta 2004/10/28.
- 7 **SCHREIBER J.**, Deodorants. In: **BAREL, A. O.** (Editor), Handbook of cosmetic science and technology. Marcel Dekker Incorporated, New York, 2001. p.p. 703 - 713. Disponible en internet: <http://site.ebrary.com/lib/consorciocolombia/Doc?id=10051199&page=706>, Fecha de consulta 2004/10/28.

- 8 **KREYDEN, O. P.** and **SCHEIDEGGER, E. P.** Anatomy of sweat glands, pharmacology of botulinum toxin and distinctive syndromes associated with hyperhidrosis. *Clin. Dermatol*, **22**, 2004, p.p. 40-44.
- 9 **NATSCH, A., SCHMID, J.,** and **FLACHSMANN, F.**, Identification of odoriferous sulfanylalkanols in human axilla secretions and their formation through cleavage of cysteine precursors by a C-S lyase isolated from axilla bacteria, *Chemistry & Biodiversity*, **1**, 2004, p.p. 1058-1072.
- 10 **SHELLEY, W.B., HURLEY, H.J., NICHOLS A.C.**, Auxillary odor: Experimental study of the role of bacteria apocrine sweat and deodorants. *Arch. Derm. Syphilol*, **68**, 1953, 430p.
- 11 **ZENG, X. N., LEYDEN, J.J., LAWLEY, H.J., SAWANO, K., NOHORA, I., PRETI, G.**, Analysis of characteristic odor from human male axillae. *J. Chem. Ecol.*, **17**(7), 1991, p.p. 1469-1492.
- 12 **KANDA, F., YAGUI, E., FUKUDA, M., NAKAJIMA, K., OTHA, T.,** and **NAKATA, O.** Elucidation of chemical compounds responsible for foot malodor. *Br. J. Dermatology*, **122**(6), 1990, p.p. 771-776.
- 13 **DARRINGRAND, A., REYNOLDS, K., JACKSON, R., HAMLET, M.,** and **ROBERTS, D.** Efficacy of antiperspirants on feet. *Mil Med*, **157**(5), 1992, p.p. 256-259.
- 14 **REYNOLDS, K., DARRIGRAND, A., ROBERTS, D., KNAPIK, J., POLLARD, J.,** and **DUPLANTI, J. B.** Effects of an antiperspirant with emollients on foot-sweat accumulation and blister formation while walking in the heat. *J. Am. Acad. Dermatology*. **33**(4), 1995, p.p. 626-630.
- 15 **BERNIER, U. R., KLINE, D. L., BARNARD, D. R., SCHRECK, C. E.,** and **YOST, R. A.** Analysis of human skin emanations by gas chromatography/ mass spectrometry. 2. Identification of volatile compounds that are candidate attractants for the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Anal. Chem.*, **72**(4), 1999, p.p. 747-756.

- 16 **OSTROVSKAYA, A., LANDA, P. A., SOKOLINSKY, M., ROSALIA, A. D.,** and **MAES, D.** Study and identification of volatile compounds from human skin. *J. Cosmet. Sci.*, **53**(2), 2002, p.p. 147-148.
- 17 **CURRAN, A. M., RABIN, S.I., FURTON, K. G.,** Analysis of the uniqueness and persistence of human scent. *Forens. Sci. Comm.*, **7**(2), 2005, p. 20. Disponible en internet: [http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/current/research/2005\\_04\\_research02.htm](http://www.fbi.gov/hq/lab/fsc/current/research/2005_04_research02.htm), Fecha de consulta 2005/06/23.
- 18 **CURRAN, A. M.** and **FURTON, K.G.** Optimization of collection and storage methods for scent evidence and the identification of the volatile components comprising an individual human odor signature. Presented at the American Academy of Forensic Sciences, Dallas, Texas, april, 2004.
- 19 **ZHANG, Z-M., CAI, J-J., RUAN, G-H.,** and **LI, G-K.,** The study of fingerprint characteristics of the emanations from human arm skin using the original sampling system by SPME-GC/MS, *J. Chromatog. B.*, **822**, 2005, p.p. 244-252.
- 20 **PAWLISZYN, J., PAWLISZYN, B.** and **PAWLISZYN M.,** Solid-phase microextraction (SPME). *The Chemical Educator*, **2**(4), 1997, p 7.
- 21 **LORD, H** and **PAWLISZYN, J.** Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, **885**, 2000, p.p. 153-193.
- 22 **PAWLISZYN, J.** Solid phase microextraction: theory and practice. Ed. John Wiley and Son's, Inc. New York, 1997, 241p.
- 23 **ULRICH, S.** Solid phase microextraction in biomedical analysis, *J. of Chromatogr. A*, **902**, 2000, p.p. 167-194.
- 24 **ALPENDURADA, M.F.** Solid phase microextraction. A promising technique for sample preparation an environmental analysis, *J. Chromatogr. A*, **889**, 2000, p.p. 3-14.
- 25 **PROSEN, H.** and **ZUPANCIC-KRALJ, L.** Solid-phase microextraction. *TrAC*, **18**(4), 1999, p.p. 272-282.
- 26 **MANI, V.,** Properties of commercial SPME coatings. In: PAWLISZYN, J. (Editor). Applications of Solid-Phase Microextraction. Cambridge. The Royal Society of Chemistry, 1999. 654p.

- 27 **VAS, G.,** and **VÉKEY K.** Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *J. Mass Spectrom.*, **39**, 2004, p.p. 233-254.
- 28 Solid-Phase Microextraction: Theory and Optimization of Conditions. *Bulletin 923*, Supelco, 1998, 7p.
- 29 GC Derivatization. Disponible en internet:  
[http:// www.registech.com/gc/gcderrev.pdf](http://www.registech.com/gc/gcderrev.pdf) , fecha de consulta: 2004/08/20
- 30 Guide to derivatization. reagents for GC., Bulletin 909A, Supelco, 1997, p. 12.  
Disponible en internet:  
[http:// www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objets/4600/4537.pdf.](http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objets/4600/4537.pdf), Fecha de consulta: 2004/08/20
- 31 **STASHENKO, E.** and **MARTÍNEZ, J.R.**, Derivatization and solid-phase microextraction. *TrAC*. **23**(8), 2004, p.p. 553-561.
- 32 **VAN DER HOEVEN, R.S.** and **STEFFENS, J.C.** Biosynthesis and elongation of short-and medium-chain-length fatty acids, *Plant Physiology*, 122 2000, p.p. 275-282.
- 33 **VAN DEN BOGAARD, A.E., HAZEN, M.J.** and **VAN BOVEN, C.P.** Cuantitative gas chromatography analysis of volatile fatty acids in spent culture media and body fluids. *J. Clin. Microbiol.*, **23**(3), 1986, p.p. 523-530.
- 34 **PAN, L.,** and **PAWLISZYN, J.**, Derivatization solid –phase microextraction: New approach to polar analytes, *Anal. Chem.*, **69**, 1997, p.p. 196-205.
- 35 **ABALOS, M., BAYONA J.M., PAWLISZYN, J.**, Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acid in waste waters, *J. Chromatogr. A.*, **873**, 2000, p.p. 107-115.
- 36 Pentafluorobenzyl Bromide, Hexaoxacyclooctadecane, Product Specification, Supelco, Sigma-Aldrich, 1997, p.p 2.
- 37 **CHIEN, C. J., CHARLES, M. J., SEXTON, K. G.,** and **JEFFRIES, H. E.,** Analysis of airborne carboxylic acids and phenols as their pentafluorobenzyl derivatives: Gas chromatography/ion trap mass spectrometry with a novel chemical ionization reagent, PFBOH, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 1998, p.p. 299-309.

- 38 **BRILL, J.H., NARAYANAN, B.A., and McCORMICK, J.P.**, Selective determination of pentafluorobenzyl ester. Derivatives of carboxylic acids by GC using microwave plasma and mass selective detection, *Appl. Spectroscopy*, **45**(10), 1991, p.p. 1617-1991.
- 39 **DENG, C., and ZHANG, X.**, A simple, rapid and sensitive method for determination of aldehydes in human blood by gas chromatography/mass spectrometry and solid-phase microextraction with on fiber derivatization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 2004, p.p. 1715-1720.
- 40 **MARTOS P.A., and PAWLISZYN, J.**, Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on fiber derivatization, *Anal. Chem.*, **70**(11), 1998, p.p. 2311-2320.
- 41 **STASHENKO E. E., PUERTAS, M. A., SALGAR, W., DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R.**, Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *J. Chromatogr. A*, **886** (1-2), 2000, p.p. 175-181.
- 42 **F. K. KAWAHARA**. Microdetermination of pentafluorobenzyl ester derivatives of organic acids by means of electron capture gas chromatography. *Anal. Chem.*, **40**(13), 1968, p.p. 2073-2075.

## **ANEXO 1.**

**PARÁMETROS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN MATRICES LÍQUIDAS. GC/ECD. COLUMNA DB-5 (30 M).**

**TABLA 1. PARÁMETROS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN MATRICES LÍQUIDAS. GC/ECD. COLUMNA DB-5 (30 M).**

<b>Éster de PFB derivado de</b>	<b>NMD, nmoles/L</b>	<b>NMC, nmoles/L</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Recuperación, %</b>
Ácido etanoico	28	55	0.999	97.0 ± 0.48
Ácido propanoico	13.	25	0.996	95.0 ± 0.71
Ácido butanoico	24	48	0.999	98 ± 1.95
Ácido pentanoico	30	59	0.997	99 ± 1.21
Ácido hexanoico	76	152	0.997	96.0 ± 0.86
Ácido benzoico	185	370	0.997	92.0 ± 0.13

## **ANEXO 2.**

**Tablas de calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos de la serie de aldehídos (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>).**

## ANEXO 2.1

**Tabla 1. Tabla de calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos de la serie de aldehídos (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>). Nivel de concentración baja soluciones metanólicas, utilizada para la cuantificación de los aldehídos presentes en el sudor humano.**

PHPH-Hidrazona	t <sub>R</sub> (min)	Nivel de concentración µg/L	Área (cuentas)	R <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>	Ecuación lineal
Etanal	2,99	20	5,01E+05	3,99E-05	1.00	30384.04987(X)+0
		40	1,17E+06	3,41E-05		
		60	2,08E+06	2,89E-05		
		80	2,29E+06	3,50E-05		
Propanal	3,69	10	2,80E+05	3,58E-05	1.00	26322.55450(X)+0
		20	5,16E+05	3,88E-05		
		40	9,84E+05	4,06E-05		
		60	1,66E+06	3,61E-05		
		100	2,61E+06	3,83E-05		
Butanal	4,91	10	2,89E+05	3,46E-05	1.00	31214.99354(X)+0
		20	6,34E+05	3,15E-05		
		40	1,18E+06	3,39E-05		
		60	2,01E+06	2,98E-05		
		100	3,06E+06	3,26E-05		

**Anexo 2.1 , continuación**

<b>PHPH- Hidrazona</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Nivel de concentración µg/L</b>	<b>Área (cuentas)</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Ecuación lineal</b>
Pentanal	5,84	10	2,41E+05	4,15E-05	1.00	29166.86880(X)+0
		20	5,71E+05	3,50E-05		
		40	1,07E+06	3,72E-05		
		60	1,88E+06	3,19E-05		
		100	2,88E+06	3,47E-05		
Hexanal	7,11	10	2,06E+05	4,86E-05	1.00	29667.36945(X)+0
		20	5,15E+05	3,88E-05		
		40	1,01E+06	3,95E-05		
		60	1,89E+06	3,17E-05		
		100	2,99E+06	3,34E-05		

Anexo 2.1, continuación.

PHPH-Hidrazona	t <sub>R</sub> (min)	Nivel de concentración µg/L	Área (cuentas)	R <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>	Ecuación lineal
Octanal	9,73	10	8,23E+04	1,22E-04	0.98	20497.02416(X)+0
		20	2,18E+05	9,17E-05		
		40	5,08E+05	7,88E-05		
		60	1,39E+06	4,31E-05		
		80	1,55E+06	5,18E-05		
Nonanal	11,04	10	1,59E+05	1,25E-04	0.99	
		20	3,54E+05	1,13E-04		
		40	1,46E+06	4,12E-05		
		60	1,62E+06	4,93E-05		
		80	2,23E+06	4,48E-05		
Decanal	12,30	20	7,33E+04	2,73E-04	0.96	20804.57892(X)+0
		40	9,47E+04	4,22E-04		
		60	4,12E+05	1,46E-04		
		80	4,71E+05	1,70E-04		
		100	8,93E+05	1,12E-04		

## ANEXO 2.2

**Tabla 2. Tabla de calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos de la serie de aldehídos (C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>). Nivel de concentración alta. Soluciones metanólicas.**

PHPH-Hidrazona	t <sub>R</sub> (min)	Nivel de concentración mmoles/L	Área (cuentas)	R <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>	Ecuación lineal
Etanal	2,99	0.2	4,68E+06	4,27E-05	1,00	17086.01851(X)+0
		0.4	8,54E+06	4,68E-05		
		0.6	1,16E+07	5,18E-05		
		0.8	1,39E+07	5,77E-05		
		1.0	1,85E+07	5,41E-05		
		1.5	2,34E+07	6,40E-05		
Propanal	3,69	0.2	5,76E+06	3,47E-05	1,00	21738.0793(X)+0
		0.4	1,00E+07	3,98E-05		
		0.6	1,30E+07	4,63E-05		
		0.8	1,79E+07	4,46E-05		
		1.0	2,26E+07	4,42E-05		
		1.5	3,12E+07	4,81E-05		
Butanal	4,91	0.2	3,77E+06	5,30E-05	1,00	13101.007(X)+0
		0.4	6,30E+06	6,35E-05		
		0.6	8,04E+06	7,46E-05		
		0.8	1,07E+07	7,49E-05		
		1.0	1,33E+07	7,50E-05		
		1.5	1,89E+07	7,94E-05		

**Anexo 2.2, continuación**

<b>PHPH- Hidrazona</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Nivel de concentración mmoles/L</b>	<b>Área (cuentas)</b>	<b>R<sub>f</sub></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Ecuación lineal</b>
Pentanal	5,84	0.2	7,92E+06	2,52E-05	1,00	29966.0557(X)+0
		0.4	1,40E+07	2,85E-05		
		0.6	1,79E+07	3,36E-05		
		0.8	2,50E+07	3,20E-05		
		1.0	3,12E+07	3,21E-05		
		1.5	4,28E+07	3,50E-05		
Hexanal	7,11	0.2	8,66E+06	2,31E-05	1,00	34638.0543(X)+0
		0.4	1,59E+07	2,51E-05		
		0.6	2,04E+07	2,93E-05		
		0.8	2,90E+07	2,76E-05		
		1.0	3,64E+07	2,75E-05		
		1.5	4,95E+07	3,03E-05		

**Anexo 2.2, continuación.**

PHPH-Hidrazona	t <sub>R</sub> (min)	Nivel de concentración mmoles/L	Área (cuentas)	R <sub>f</sub>	R <sup>2</sup>	Ecuación lineal
Octanal	9,73	0.2	6,94E+06	2,88E-05	1,00	27439.681(X)+0
		0.4	1,29E+07	3,09E-05		
		0.6	1,65E+07	3,64E-05		
		0.8	2,31E+07	3,47E-05		
		1.0	2,86E+07	3,50E-05		
		1.5	3,91E+07	3,84E-05		
Nonanal	11,04	0.2	7,05E+06	2,84E-05	1,00	29126.691(X)+0
		0.4	1,35E+07	2,97E-05		
		0.6	1,72E+07	3,48E-05		
		0.8	2,46E+07	3,25E-05		
		1.0	3,09E+07	3,24E-05		
		1.5	4,13E+07	3,63E-05		
Decanal	12,30	0.2	2,71E+06	7,38204	1,00	14181.9103(X)+0
		0.4	5,45E+06	7,34E-05		
		0.6	7,30E+06	8,22E-05		
		0.8	1,12E+07	7,14E-05		
		1.0	1,49E+07	6,72E-05		
		1.5	2,14E+07	7,00E-05		

## **ANEXO 3.**

**CONDICIONES DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE LOS  
ÁCIDOS CARBOXÍLICOS CON PFBBr**

### ANEXO 3

**TABLA1. DE CALIBRACIÓN PARA LOS ÉSTERES DE PFB DE LOS ÁCIDOS (C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, BENZÓICO)**

Ésteres de PFB	t <sub>R</sub> (min)	Nivel de concentración $\mu$ moles/L	Área (cuentas)			Rf	Ecuación lineal
			Promedio	$\sigma$	CV, %		
Acético	7.88	10.80	2,55E+06	1,14E+05	4,46	4,24E-06	237465.3 x + 0
		21.60	4,38E+06	2,40E+05	5,47	4,93E-06	
		43.20	9,64E+06	1,97E+05	2,05	4,48E-06	
		86.40	1,77E+07	2,53E+05	1,43	4,89E-06	
		179,16	3,83E+07	1,16E+06	3,03	4,68E-06	
Propanóico	9.59	10.80	3,24E+06	6,69E+04	2,07	3,33E-06	361065.0 x + 0
		21.60	5,67E+06	1,83E+05	3,23	3,77E-06	
		43.20	1,16E+07	3,52E+05	3,04	1,18E+07	
		86.40	2,41E+07	1,57E+05	0,65	3,57E-06	
		179,16	4,90E+07	1,36E+06	2,78	3,59E-06	
Butanóico	11.19	5.40	1,90E+06	4,81E+04	2,58	2,91E-06	411510.8 x + 0
		10.80	4,90E+06	3,11E+05	6,40	2,24E-06	
		21.60	9,00E+06	3,80E+05	4,12	2,35E-06	
		32.00	1,40E+07	5,70E+05	4,09	2,29E-06	
		43.20	1,62E+07	5,02E+05	3,11	2,67E-06	
		86.40	3,60E+07	6,77E+05	1,88	2,40E-06	

**Anexo 3, continuación**

Ésteres de PFB	t <sub>R</sub> (min)	Nivel de concentración μmoles/L	Área (cuentas)			Rf	Ecuación lineal
			Promedio	σ	CV, %		
Pentanóico	7.88	2.70	3,60E+07	6,77E+05	1,88	2,40E-06	393308.4 x + 0
		5.40	9,00E+05	6,59E+04	7,65	3,13E-06	
		10.80	2,20E+06	1,08E+04	0,49	2,46E-06	
		21.60	4,72E+06	4,97E+04	1,05	2,29E-06	
		32.00	9,28E+06	4,04E+04	0,43	2,33E-06	
		43.20	1,46E+07	2,10E+05	1,44	2,20E-06	
		86.40	1,37E+07	2,18E+05	1,59	3,15E-06	
Hexanóico	9.59	2.70	6,10E+05	5,50E+04	9,08	4,46E-06	294953.5 x + 0
		5.40	1,92E+06	2,51E+04	1,31	2,81E-06	
		10.80	4,14E+06	2,33E+05	5,64	2,61E-06	
		21.60	8,45E+06	9,65E+04	1,14	2,55E-06	
		32.00	1,04E+07	3,65E+05	3,53	3,15E-06	
		43.20	1,03E+07	4,76E+05	4,61	4,07E-06	
		86.40	2,60E+08	2,20E+06	8,56	3,37E-06	
Benzóico	11.19	2.70	1,00E+05	1,42E+04	14,28	7,67E-06	234144.7 x + 0
		5.40	7,19E+05	7,91E+03	1,10	7,50E-06	
		10.80	2,13E+06	9,18E+04	4,32	5,13E-06	
		21.60	4,80E+06	1,09E+05	2,30	4,60E-06	
		32.00	8,45E+06	9,65E+04	1,14	3,78E-06	
		43.20	8,60E+06	7,34E+05	8,55	5,03E-06	
		86.40	2,10E+07	7,53E+05	3,63	4,15E-06	