Análisis por HS-SPME-GC/MS de compuestos orgánicos volátiles emitidos durante la descomposición de cadáveres de ratones

Alejandra GARCÍA CAICEDO y Juan Diego SANABRIA ÁLVAREZ

Trabajo de Grado para optar al título de Químico

Directora
Elena E. STASHENKO
Química, PhD

Codirector
Jairo René MARTÍNEZ MORALES
Química, PhD

Universidad Industrial de Santander
Facultad de Ciencias
Escuela de Química
Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL
Bucaramanga
2025

Agradecimientos

Alejandra

A mi mamá, Francis, mi mayor inspiración y guía, gracias por su apoyo incondicional y por ser siempre mi compañera en cada paso del camino. Su amor, dedicación y sacrificio han sido el motor que me impulsa a seguir adelante.

A mi papá, Yesid, gracias por su apoyo constante y por ser un pilar fundamental en mi vida. Sus enseñanzas, su ejemplo y su confianza en mí me han dado la fortaleza para superar cada desafío.

A Jonathan, gracias por ser mi compañero en este camino, por su apoyo incondicional, su paciencia y por siempre creer en mí. Su amor y confianza me han dado la motivación para seguir adelante incluso en los momentos más difíciles.

Juan Diego

A Dios, por ser mi guía y fortaleza en todo momento.

A mi madre Claudia Liliana, por su amor incondicional, su apoyo constante, por darlo todo por mí y por siempre creer en mis sueños. Porque a pesar de la distancia sigue siendo mi motor para salir adelante y ser un gran profesional.

A mi padre Juan Carlos, por su respaldo y su apoyo en cada paso que doy, por contribuir en mi crecimiento como persona y por su amor brindado en todo momento.

A mi hermana Juliana, por ser mi compañía incondicional y estar siempre a mi lado, por siempre apoyarme y motivarme a ser un gran científico y, porque a pesar de todo lo vivido, siempre estar para mí.

Alejandra y Juan Diego

Agradecemos al Centro de Investigación en Biomoléculas UIS (CIBIMOL), al laboratorio CROM-MASS y al Centro de Investigación en Biomoléculas y Aromas (CENIVAM), dirigidos por la Dra. Elena E. STASHENKO y el Dr. Jairo René MARTÍNEZ MORALES, así como a la Universidad Industrial de Santander, la Vicerrectoría de Investigación y Extensión, la Facultad de Ciencias y la Escuela de Química, por su invaluable apoyo.

A nuestra directora, la profesora Dra. Elena E. STASHENKO, por sus enseñanzas, apoyo, cariño y por acogernos como parte de la familia CENIVAM durante nuestra estancia.

Al profesor Dr. Jairo R. MARTÍNEZ MORALES, nuestro codirector, por su disposición para ayudar y aportar ideas innovadoras.

Extendemos nuestro agradecimiento a nuestros amigos y compañeros del grupo de investigación: Lady, Zuleima, Edwin, Diego, Daniela, Valeria, Manuel, Javier, Karen, Silvia, Salomón, Sebastián, y a todos los demás que nos acompañaron en los momentos de alegría y adversidad, siempre brindándonos su apoyo y amistad.

A nuestras familias, por su amor incondicional, sus sabios consejos y su constante apoyo, que han sido pilares fundamentales de nuestra vida. Gracias por enseñarnos el valor del esfuerzo, la perseverancia y la importancia de nunca rendirnos. Su confianza y aliento nos han dado la fortaleza para superar los desafíos y alcanzar nuestras metas.

Al Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación, al Ministerio de Educación Nacional, al Ministerio de Industria, Comercio y Turismo, y al ICETEX, a través de la convocatoria Ecosistema Científico - Colombia Científica del Fondo Francisco José de Caldas, Contrato RC-FP44842-212-2018, del programa Bio-Reto XXI-15:50, por el financiamiento parcial de este proyecto.

Tabla de contenido

Pág.

Introducción 15

Justificación 18

Hipótesis 20

1 Objetivos 21

1.1. Objetivo general 21

1.2. Objetivos específicos 21

2 Estado del arte 22

3 Marco teórico 27

3.1 Proceso de descomposición 27

3.2 Compuestos orgánicos volátiles 30

3.3 Intervalo *post-mortem* 33

3.4 Tanatoquímica o bioquímica *post-mortem* 33

3.5 Técnicas de extracción y de análisis instrumental 36

3.5.1 Microextracción en fase sólida 36

3.5.2 Técnicas analíticas 44

3.6 *Mus musculus* 46

4 Metodología 47

4.1 Reactivos 47

4.2 Obtención y análisis físico químico del suelo 48

4.3 Ensayos preliminares 48

4.3.1 Recubrimientos de fibra SPME 48

4.3.2 Tiempo de extracción por HS-SPME 49

4.4 Obtención de ratones y su eutanasia 50

4.5 Extracción de volátiles por HS-SPME 51

4.6 Identificación de los VOC por GC/MS 52

4.7 Obtención de un perfil de volátiles emitidos por cadáveres de ratones en descomposición 53

5 Resultados y discusión 54

5.1 Análisis fisicoquímico del suelo 54

5.2 Selección de recubrimiento de la fibra SPME 55

5.3 Selección del tiempo de exposición 60

5.4 Caracterización química de los volátiles emitidos por ratones en descomposición 69

5.4.1 Análisis de componentes principales del perfil volátil de cadáveres de ratones 84

5.5 Establecimiento del perfil de descomposición para cadáveres de ratones 86

6 Conclusiones 92

7 Consideraciones éticas 94

8 Recomendaciones 97

9 Divulgación de resultados 98

Referencias bibliográficas 99

Apéndices 110

Lista de Tablas

Pág.

Tabla 1. Ejemplos de los VOC reportados en los estudios sobre la descomposición de ratones. 32

Tabla 2. Compuestos orgánicos volátiles identificados en estudios experimentales y revisiones. Tomado y modificado de Paczkowski *et al*. 37

Tabla 3. Tipos de recubrimientos de fibras SPME, mecanismo de extracción y polaridad....40

Tabla 4. Parámetros fisicoquímicos del suelo usado en el estudio 54

Tabla 5. Composición química, por HS-SPME-GC/MS, de la fracción volátil de muslos de pollo, para cuatro tipos de recubrimientos. 57

Tabla 6. Composición química, por HS-SPME-GC/MS, de la fracción volátil aislada de muslos de pollo, para tres tiempos de exposición en los días cero y quinto del desceso. 62

Tabla 7. Caracterización química de la fracción volátil de ratones en descomposición, de 0 a 43 días. 73

Tabla 8. Caracterización química de la fracción volátil de ratones en descomposición, de 59 a 201 días. 76

Tabla 9. Mayores constituyentes de los componentes principales del conjunto de datos filtrado, según la suma de GC áreas relativas. 84

Tabla 10. Mayores constituyentes de los componentes principales del conjunto de datos filtrado, según el número de GC áreas relativas diferentes de cero. 85

Tabla 11. Intervalos *post-mortem* de compuestos marcadores identificados en distintas condiciones de descomposición de ratones.....91

Lista de Figuras

Pág.

Figura 1. Número de publicaciones sobre compuestos orgánicos volátiles (VOC) en el ámbito forense, registradas durante los años 2001-2024. 22

Figura 2. Número de publicaciones sobre estudios post-mortem usando microextracción en fase sólida (SPME), registrado durante los años 2001-2024. 24

Figura 3. Cuerpo de una cortesana en nueve estados de descomposición: 28

Figura 4. Modelo esquemático del ensamblaje para la SPME. 38

Figura 5. Selectividad de extracción de los recubrimientos de fibras SPME, según de las propiedades: la polaridad y la volatilidad. 42

Figura 6. Mecanismo y propiedades del recubrimiento de fibra de SPME, CAR/PDMS. 44

Figura 7. Esquema general de la metodología del presente estudio. 47

Figura 8. Medición de volátiles emitidos por muslo de pollo, usando distintos tipos de recubrimiento de fibra SPME. 49

Figura 9. Medición de volátiles emitidos por muslo de pollo, durante distintos tiempos de extracción. 50

Figura 10. Medición de volátiles emitidos por ratón, **A.** Animal sin enterrar y **B.** Anima enterrado. 52

Figura 11. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS, de volátiles emitidos por muslo de pollo, para cuatro tipos de recubrimientos de fibra SPME. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de cada pico cromatográfico se presenta en la **Tabla 5.** 56

Figura 12. Relación de áreas GC (A_i/A_{istd}) de compuestos identificados en la fracción volátil de pollo fresco. 58

Figura 13. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS, de muslo de pollo, para tres tiempos de exposición. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos cromatográficos se presenta en la **Tabla 6.** 61

Figura 14. Espectro de masas del disulfuro de dimetilo $C_2H_6S_2$, por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de su descomposición: **A.** Relación isotópica del ion $[M^{+\cdot}]$ 94 m/z; **B.** Fragmentos típicos en el espectro de masas; $[M\text{-}CH_3]^+$ 79 m/z; $[M\text{-}C_2H_6]^+$ 64 m/z; $[M\text{-}SCH_3]^+$ 47 m/z; HCS^+ 45 m/z. Véase pico cromatográfico N°14 en la **Tabla 6**.....64

Figura 15. Espectro de masas del trisulfuro de dimetilo $C_2H_6S_3$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de su descomposición: **A.** Relación isotópica del ion $[M^{+\cdot}]$ 126 m/z; **B.** Fragmentos típicos en el espectro de masas; $[M\text{-}CH_3]^+$ 111 m/z; $[M\text{-}SCH_3]^+$ 79 m/z; $[M\text{-}CH_3\text{-}SCH_3]^+$ 64 m/z; SCH_3^+ 47 m/z, HCS^+ 45 m/z. Véase pico cromatográfico N°19 en la **Tabla 6**. 65

Figura 16. Relación de áreas GC (A_i/A_{istd}) de los compuestos identificados en la fracción volátil de muslos de pollo para tres tiempos de extracción, después de cinco días de descomposición. 67

Figura 17. Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC/MS, de las fracciones volátiles de ratones en descomposición, enterrados. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).....71

Figura 18. Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS, de las fracciones volátiles de ratones en descomposición, sin enterrar. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).....72

Figura 19. Espectro de masas de la feniletanona C_8H_8O, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de ratón en descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 120 m/z, $[M\text{-}CH_3]^+$ 105 m/z;

[M-CH_3CO]$^+$ 77 m/z, [M-C_3H_5CO]$^+$ 51 m/z, CH_3CO^+ 43 m/z. Véase pico cromatográfico N°39 en las **Tablas 7** y **8.**.....80

Figura 20. Espectro de masas del ácido butanoico $C_4H_8O_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en la fracción volátil de ratón en descomposición [$M^{+\cdot}$] 88 m/z, [M-CH_3]$^+$ 73 m/z, [M-C_2H_4]$^+$ 60 m/z, [M-CH_5O]$^+$ 55 m/z, $COOH^+$ 45 m/z. Véase pico cromatográfico N°38 en las **Tablas 8** y **9.**.....81

Figura 21. Espectro de masas del ácido 2-metilbutanoico $C_5H_{10}O_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en la fracción volátil de ratón en descomposición [$M^{+\cdot}$] 102 m/z, [M-CH_3]$^+$ 87 m/z, [M-C_2H_4]$^+$ 74 m/z, $C_4H_9^+$ 57 m/z, $COOH^+$ 45 m/z, $C_3H_5^+$ 41 m/z Véase pico cromatográfico N°40 en las **Tablas 7** y **8**.....82

Figura 22. Espectro de masas del ácido 4-metilpentanoico $C_6H_{12}O_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en la fracción volátil de ratón en descomposición [$M^{+\cdot}$] 116 m/z, [M-CH_3]$^+$ 101 m/z, [M-C_3H_7]$^+$ 73 m/z, [M-C_4H_8]$^+$ 60 m/z, $C_4H_9^+$ 57 m/z, $COOH^+$ 45 m/z, $C_3H_7^+$ 43 m/z, $C_3H_5^+$ 41 m/z. Véase pico cromatográfico N°41 en las **Tablas 7** y **8.**.....83

Figura 23. Relación de GC áreas relativas para los compuestos identificados en la fracción volátil de ratones en descomposición enterrados.....89

Figura 24. Relación de GC áreas relativas para los compuestos identificados en la fracción volátil de ratones en descomposición que no fueron enterrados.....90

Lista de Apéndices

Pág.

Apéndice A. Aval para manipular y utilizar especímenes de Mus musculus por parte del Comité de Ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).....110

Apéndice B. Blanco: caracterización química de la fracción volátil del sistema de extracción. 112

Apéndice C. Blanco: perfil cromatográfico obtenido por GC/MS de la fracción volátil de sistema de extracción. 112

Apéndice D. Espectro de masas del fenol C_6H_6O, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 94 m/z; $[M\text{-}CO]^+$ 66 m/z m/z; $C_5H_5^+$ 65 m/z. Véase pico cromatográfico N°21 en la **Tabla 6**. 113

Apéndice E. Espectro de masas del indol C_8H_7N, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 117 m/z; $[M\text{-}HCN]^+$ 90 m/z; $C_7H_5^+$ 89 m/z, $C_5H_3^+$ 63 m/z. Véase pico cromatográfico N°22 en la **Tabla 6.**.....113

Apéndice F. Espectro de masas del alcohol feniletílico $C_8H_{10}O$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de ratón en descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 122 m/z; $C_7H_8^+$ 92 m/z, $[M\text{-}CH_2OH]^+$ 91 m/z; $[M\text{-}C_2H_5OH]^+$ 77 m/z, $C_5H_5^+$ 65 m/z. Véase pico cromatográfico N°44 en las **Tablas 7** y **8.**.....114

Apéndice G. Espectro de masas del tolueno C_7H_8, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de ratón en descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 92 m/z; $C_7H_7^+$ 91 m/z, $[M\text{-}CH_3]^+$ 77 m/z, $C_5H_5^+$ 65 m/z, $C_4H_3^+$ 51 m/z. Véase pico cromatográfico N°17 en las **Tablas 7** y **8.**...114

Apéndice H. Espectro de masas del 2,6-dimetilpirazina $C_6H_8N_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 108 m/z;

[M-CH_3]$^+$ 93 m/z; $C_4H_5N^+$ 67 m/z, $C_2H_4N^+$ 42 m/z. Véase pico cromatográfico N°28 en las **Tablas 7** y **8**.....115

Apéndice I. Comparación de los perfiles VOC de cada ratón, representados por dos conjuntos diferentes de componentes principales. 116

Apéndice J. Certificado de participación en modalidad de póster en los congresos X1 COCOCRO, XIX COLACRO, III SPAE, XXVI EXTECH, XVI LASEAC, WARPA, realizados del 13 al 15 de noviembre del 2024 en Neomundo, Bucaramanga. 118

Apéndice K. Certificado de participación en modalidad de ponencia oral en los congresos X1 COCOCRO, XIX COLACRO, III SPAE, XXVI EXTECH, XVI LASEAC, WARPA, realizados del 13 al 15 de noviembre del 2024 en Neomundo, Bucaramanga. 119

Abreviaturas, siglas y acrónimos

CAR	Carboxen (Carboxeno)
CENIVAM	Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales
CIBIMOL	Centro de Investigación en Biomoléculas
D.I.	Diámetro interno
d_f	Espesor de la fase estacionaria
DVB	*Divinylbenzene* (Divinilbenceno)
EI	*Electron Ionization* (Ionización electrónica)
e.g.	*Exempli gratia* (Por ejemplo)
et al.	*Et alli* (y otros)
GC	*Gas Chromatography* (Cromatografía de gases, cromatógrafo de gases, según el contexto)
HS-SPME	*Headspace Solid-Phase Microextraction* (Microextración en fase sólida)
IRL	Índice(s) de retención lineal(es)
ISTD	*Internal Standard* (Estándar interno)
MS	*Mass Spectrometry* (Espectrometría de masas, espectrómetro de masa o espectro de masas, según el contexto)
m/z	Relación masa/carga
PCA	*Principal Component Analysis* (Análisis de componentes principales)
PDMS	*Poly(dimethylsiloxane)* [Poli(dimetilsioxano)]
PMI	*Post-Mortem* I*nterval* (Intervalo *post-mortem,* después de la muerte)
t_R	Tiempo de retención
VOC	*Volatile Organic Compounds* (Compuestos orgánicos volátiles)

Resumen

Título: Análisis por HS-SPME-GC/MS de compuestos orgánicos volátiles emitidos durante la descomposición de cadáveres de ratón*

Autores: Alejandra GARCÍA CAICEDO; Juan Diego SANABRIA ÁLVAREZ**

Palabras clave: HS-SPME-GC/MS, descomposición de cadáveres, ratones, VOC, PMI.

Descripción:

La caracterización de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos durante la descomposición es crucial en química forense para estimar el intervalo *post-mortem* (PMI). Este proceso está influenciado por factores como temperatura, humedad, fauna, tipo de suelo y si el cadáver está enterrado o no. El objetivo de este estudio fue analizar los VOC liberados por cadáveres de ratones, enterrados y no enterrados, mediante la técnica HS-SPME-GC/MS. Se trabajó con cuatro especímenes de *Mus musculus* (dos enterrados y dos no), colocados en cámaras acrílicas para concentrar los VOC. Se evaluaron cuatro recubrimientos de fibra SPME y tres tiempos de exposición, eligiéndose CAR/PDMS con 1 hora de exposición como las mejores condiciones, determinadas previamente usando tejido de pollo.

El monitoreo se extendió por 201 días. Se identificaron compuestos azufrados como disulfuro y trisulfuro de dimetilo, hidrocarburos (hexano, tolueno), alcoholes (hexanol, 4-metilpentanol) y ácidos carboxílicos (propanóico, butanoico, hexanoico y sus ésteres). Algunos compuestos se identificaron tentativamente como posibles marcadores del PMI. En ratones enterrados, los compuestos azufrados resultaron útiles para estimar un PMI entre 10 y 30 días. En los no enterrados, la descomposición fue influida por insectos, lo que alteró tanto la velocidad como la composición de los VOC. Alcoholes como hexanol y 4-metilpentanol permitieron estimar intervalos específicos, mientras que compuestos nitrogenados y ácidos carboxílicos ofrecieron rangos más amplios.

La aplicación de HS-SPME-GC/MS para caracterizar estos VOC como marcadores del PMI mejora la precisión en la estimación del tiempo de muerte, fortaleciendo su utilidad en el análisis forense.

*Trabajo de Grado

** Facultad de Ciencias. Escuela de Química. Directora: Elena E. Stashenko, Química, PhD. Codirector: Jairo René Martínez Morales, Químico, PhD.

Abstrac

Title: HS-SPME-GC/MS analysis of volatile organic compounds emitted during mouse carcass decomposition*

Authors: Alejandra GARCÍA CAICEDO; Juan Diego SANABRIA ÁLVAREZ**

Keywords: HS-SPME-GC/MS, carcass decomposition, mice, VOC, PMI.

Description:

The characterization of volatile organic compounds (VOCs) released during decomposition is essential in forensic chemistry for estimating the *post-mortem* interval (PMI). This process is influenced by factors such as temperature, humidity, fauna, soil type, and whether the body is buried or not. The aim of this study was to analyze VOCs released from mouse carcasses, both buried and unburied, using the HS-SPME-GC/MS technique. Four *Mus musculus* specimens were used—two buried and two unburied—placed in acrylic chambers to concentrate VOCs. Four SPME fiber coatings and three exposure times were tested. The optimal conditions, determined using chicken tissue, were CAR/PDMS coating with a 1-hour exposure time. VOCs were monitored over a period of 201 days.

Identified compounds included sulfur-containing substances (dimethyl disulfide, dimethyl trisulfide), aliphatic hydrocarbons (hexane, toluene), alcohols (hexanol, 4-methylpentanol), and carboxylic acids (propanoic, butanoic, hexanoic acids and methyl esters). Some were tentatively identified as potential PMI markers. In buried mice, sulfur compounds proved useful for estimating a PMI between 10 and 30 days. In unburied mice, decomposition was affected by insect activity, altering both the rate of decomposition and the VOC profile. Alcohols such as hexanol and 4-methylpentanol were useful for estimating specific timeframes, while nitrogen compounds and carboxylic acids provided broader PMI ranges.

The application of HS-SPME-GC/MS to characterize these VOCs as PMI markers significantly enhances the accuracy of time-of-death estimations, reinforcing its value in forensic investigations.

* Research Work

** Science Faculty. School of Chemistry. Director: Elena E. Stashenko, Chemist, PhD.
Co-director: Jairo René Martínez Morales, Chemist, PhD.

Introducción

El proceso de descomposición de mamíferos ha sido objeto de investigación intensa y su estudio es de grande importancia para la química forense. Esto se debe a que puede, eventual mente, ayudar a establecer un perfil químico de sustancias generadas durante la descomposición en función del tiempo, lo que permite estimar el tiempo transcurrido desde el fallecimiento de un cuerpo a partir de los compuestos volátiles emitidos por el cadáver en un momento determinado. Este perfil de descomposición describe los compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés) que se emiten durante la degradación del cadáver y la intensidad con la que se producen en diferentes momentos. Como el cuerpo interactúa con el suelo, su descomposición se relaciona directamente con la putrefacción, desencadenada por la intervención de microorganismos e insectos presentes el cuerpo y en el medio. La liberación de VOC varía según la etapa de descomposición del cuerpo (Brasseur *et al.*, 2012; Martin & Verheggen, 2018; Statheropoulos *et al..*, 2005, 2007; Stefanuto *et al.*, 2017; von Hoermann *et al.*, 2011).

Resulta interesante analizar la interacción entre un cuerpo en descomposición y el suelo donde es enterrado. Se sabe que cada etapa del proceso de descomposición está afectada por parámetros del suelo, tales como la actividad microbiana, la producción de dióxido de carbono, el pH, la conductividad eléctrica, entre otros (Brasseur *et al.*, 2012; Kücklich *et al.*, 2017; von Hoermann *et al.*, 2011). Se puede obtener una muestra de los compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por los cadáveres sin tener contacto directo con el cuerpo, realizando muestreos en el aire cerca del lugar donde se encuentra (Kücklich *et al.*, 2017). Usando técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) es posible recolectar muestras de VOC liberados por los cadáveres en distintos momentos para establecer el patrón de descomposición (De Martinis & Martin, 2002; Prada Chaparro, 2020). Para el análisis de los VOC recolectados, la herramienta más apropiada es la cromatografía de gases acoplada a

la espectrometría de masas (GC/MS), debido a su resolución, sensibilidad y selectividad alta (Brasseur *et al.*, 2012).

La caracterización de VOC ha sido estudiada predominantemente en cuerpos humanos (Martin & Verheggen, 2018; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007) y cerdos (Brasseur *et al.*, 2012; von Hoermann *et al.*, 2011), pero hay muy pocos estudios realizados en ratones (Kalinová *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012). Por lo general, el muestreo se realiza en la superficie del cuerpo en un entorno de laboratorio y se sabe poco sobre los compuestos volátiles liberados por el sistema "suelo-cadáver" durante la descomposición. En el presente trabajo, se implementarán técnicas *headspace* (espacio de cabeza) para recolectar los compuestos producidos durante la descomposición de ratones enterrados para establecer un perfil de VOC en diferentes momentos de muestreo.

En el campo de la química forense el estudio de cadáveres es de interés, para que, entre muchas variables, lograra determinar el tiempo de muerte que, a su vez, está ligado al estado de descomposición. Se han empleado métodos no invasivos con el cadáver, como el análisis de insectos y otros artrópodos (*e.g.*, Coleoptera) encontrados en lugares donde se hallan cadáveres, los cuales tienen una relación particular con los restos en descomposición (Ashworth & Wall, 1994; Carter *et al.*, 2007) como si tuvieran una atracción específica por el olor de descomposición (Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007). Por lo tanto, dentro de la llamada "química de la muerte" surge la hipótesis de que los VOC emitidos por los cadáveres durante la descomposición son los que atraen a estos insectos, lo que ha incentivado realizar estudios sobre los VOC generados por cadáveres en descomposición (Killam, 1990; Vass *et al.*, 2004, 2008).

El estudio de los VOC de descomposición ha sido abordado de varias maneras considerando distintos ambientes (Brasseur *et al.*, 2012; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2009; Statheropoulos *et al.*, 2006), factores abióticos (*e.g.*, temperatura) (Forbes *et al.*,

2014; Kasper *et al.*, 2012), empleando diversas técnicas muestreo (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012; Killam, 1990; Statheropoulos *et al.*, 2006; Vass *et al.*, 2004, 2008). Además, por razones éticas y psicológicas, se ha preferido experimentar con cerdos y ratones, en lugar de humanos.

Justificación

Colombia enfrenta una grave problemática vinculada con la historia de violencia y conflicto armado en el país, con la dificultad en la identificación de personas no identificadas (NN) y desaparecidas. A lo largo de décadas, Colombia ha sido escenario de un conflicto que ha dejado un alto número de víctimas de desapariciones forzadas y ejecuciones extrajudiciales. Según el Sistema de Información de la Red de Desaparecidos y Cadáveres (SIRDEC), hay 10,756 cadáveres sin identificar, muchos de los cuales podrían corresponder a las cerca de 70,000 desapariciones registradas en el país (Valencia, 2015). Este hecho resalta la magnitud del problema y la urgencia de desarrollar métodos más efectivos para identificar a las víctimas y brindar respuestas a sus familiares. La mayoría de las personas no identificadas pertenecen a un perfil demográfico específico: hombres jóvenes entre los 18 y 35 años, una edad en la que es común que los individuos sean reclutados o forzados a participar en conflictos armados, ya sea por grupos insurgentes, paramilitares o el propio ejército. Este patrón refleja la vulnerabilidad de esta población en contextos de guerra, donde las desapariciones forzadas y las ejecuciones extrajudiciales son comunes (Valencia, 2015).

El desafío de identificar a estas víctimas es enorme debido al avanzado estado de descomposición de muchos de los cuerpos, así como a la falta de datos forenses detallados que permitan su identificación. Además, los cuerpos suelen ser hallados en fosas comunes o lugares remotos, lo que complica aún más su localización y el posterior análisis forense. Las dificultades logísticas y técnicas, junto con el gran volumen de cuerpos no identificados, hacen que los métodos tradicionales de identificación, como la antropología forense y el análisis de ADN, sean insuficientes para abordar la magnitud del problema (Buettner, 2023). Por ello, surge la necesidad de implementar nuevas técnicas forenses, como el análisis de compuestos orgánicos volátiles (VOC) emitidos por los cadáveres en descomposición, que puedan complementar las metodologías actuales y ofrecer un enfoque innovador para la identificación

de NN. Estos métodos no solo permitirían identificar cuerpos de forma más eficiente, sino también proporcionar información valiosa para determinar el intervalo *post-mortem* y otros aspectos relacionados con las circunstancias de la muerte. En las ciencias forenses, uno de los principales desafíos ha sido la determinación del intervalo *post-mortem* (PMI), un parámetro crítico para el análisis forense de cadáveres en descomposición (Luna Maldonado, 2010). Este se relaciona directamente con el estado de descomposición del cuerpo y, a lo largo de los años, se han desarrollado varias técnicas no invasivas para estimarlo. Entre ellas, destaca el análisis de insectos y otros artrópodos (*e.g.*, Coleoptera) que colonizan los cadáveres, atraídos de manera particular por los olores que emanan ellos durante la descomposición. Esta observación ha llevado a la hipótesis de que los compuestos orgánicos volátiles (VOC) liberados por los cuerpos son los responsables de dicha atracción, lo que ha impulsado su estudio en entornos forenses (Ashworth & Wall, 1994; Carter *et al.*, 2007; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007). La investigación de los VOC emitidos por los cadáveres en descomposición ha ganado atención dentro de la "química de la muerte" por su potencial para mejorar las técnicas forenses.

El presente proyecto de grado pretende contribuir de manera significativa al desarrollo de nuevas herramientas forenses para abordar el reto de la identificación de cadáveres en Colombia. La combinación de estas técnicas avanzadas con los métodos tradicionales podría marcar un punto de inflexión en la forma en que se identifican los cuerpos (Hoffman *et al.*, 2009; Oesterhelweg *et al.*, 2008; Vass *et al.*, 2004, 2008), ofreciendo una mayor posibilidad de resolución a las familias de los desaparecidos y contribuyendo a la verdad y la justicia en un país que aún busca curar las heridas de la guerra.

Hipótesis

Si la emisión de compuestos orgánicos volátiles (VOC) está directamente relacionada con el proceso de descomposición y el tiempo cuando sucedió la muerte, entonces será posible caracterizar su perfil de liberación en ratones enterrados, utilizando la técnica de microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a cromatografía de gases y espectrometría de masas. Esto permitirá identificar patrones específicos de VOC asociados con diferentes etapas de descomposición bajo condiciones controladas, y contribuir al desarrollo de métodos no invasivos para estimar el intervalo *post-mortem*.

1 Objetivos

1.1. Objetivo general

Determinar los compuestos orgánicos volátiles producidos durante la descomposición de ratones enterrados y sin enterrar en suelo, usando técnicas de extracción *headspace* y el análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

1.2. Objetivos específicos

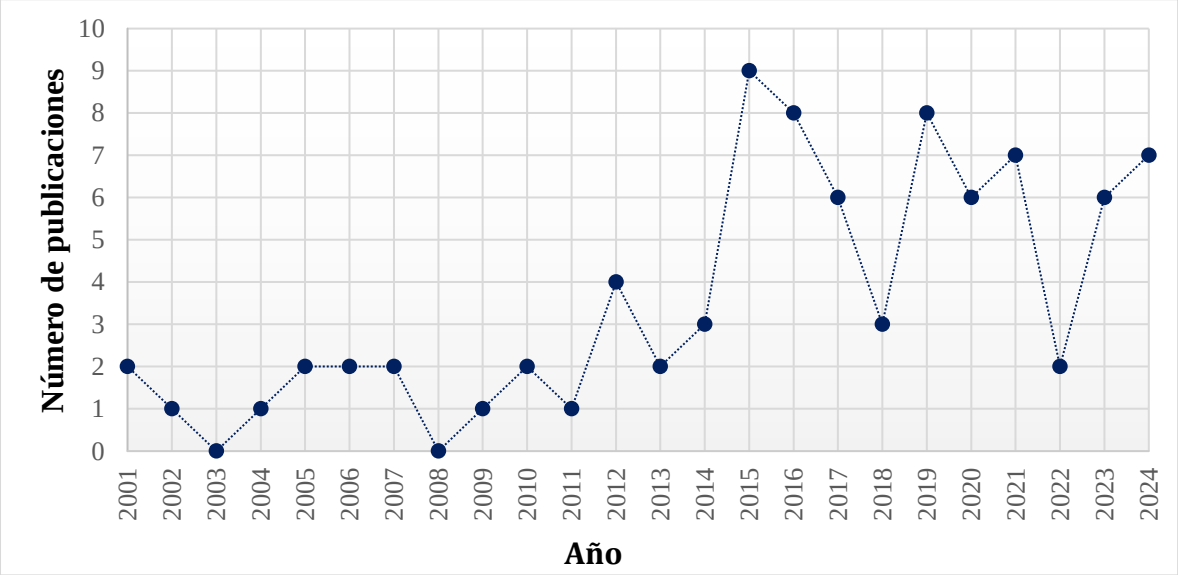
- Implementar la técnica de microextracción de fase sólida (SPME) en modo *headspace* para aislar los VOC producidos durante la descomposición, estudiando las siguientes variables: tipo de adsorbente y tiempo de exposición de la fibra de SPME.
- Caracterizar por GC/MS los VOC emitidos por cadáveres de ratones usando HS-SPME.
- Determinar el perfil composicional de los VOC emitidos por cadáveres de ratones en descomposición en función del tiempo transcurrido desde la muerte, como herramienta útil para estimar este tiempo.

2 Estado del arte

Para estimar el número de investigaciones sobre los VOC de interés en el ámbito forense, se realizó una búsqueda bibliográfica, usando la base de datos *Scopus (Elsevier)*. La búsqueda se realizó utilizando la ecuación TITLE-ABS-KEY "VOC AND forensic", abarcando el periodo de 2001 a 2024. Este análisis bibliográfico permitió detectar ochenta y cinco investigaciones realizadas durante los últimos veinte años (Véase **Figura 1**), sobre el estudio de los VOC emitidos por cadáveres en descomposición, lo que confirma que es un área importante de investigación en el campo de la química forense.

Figura 1.

Número de publicaciones sobre compuestos orgánicos volátiles (VOC) en el ámbito forense, registradas durante los años 2001-2024.



Nota. La ecuación de búsqueda utilizada TITTLE-ABS-KEY ("VOC AND forensic"). Fuente: *Scopus, Elsevier*. Periodo de observación: 2001-2024. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2024.

Los VOC emitidos en el proceso de descomposición de cadáveres se pueden eventualmente usar para determinar el tiempo transcurrido desde la muerte (Ashworth & Wall, 1994; Carter *et al.*, 2007; Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2009; Kalinová *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012; Killam, 1990; Martin & Verheggen, 2018; Statheropoulos *et al.*,

2005, 2006, 2007; Stefanuto *et al.*, 2017; Vass *et al.*, 2004, 2008). A pesar de la importancia de este campo, la investigación es limitada sobre el tema, la mayoría de los estudios se centran en humanos (Hoffman *et al.*, 2009; Killam, 1990; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2006, 2007; Stefanuto *et al.*, 2017; Vass *et al.*, 2008) y cerdos (Armstrong *et al.*, 2016; Brasseur *et al.*, 2012; Dekeirsschieter *et al.*, 2009), sin embargo, se hicieron algunos estudios también en ratones (Kalinová *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012). Se usaron técnicas de muestreo como microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), *headspace* (HS) mediante tubos adsorbentes o con un sistema de purga y trampa (Kalinová et al., 2009).

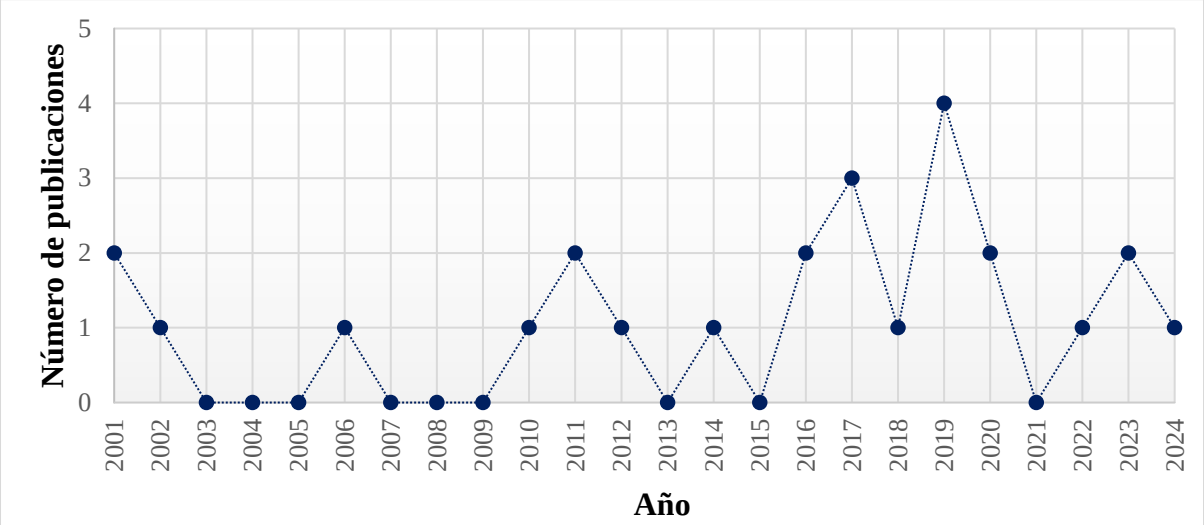
Para el monitoreo de VOC durante la etapa *post-mortem,* frecuentemente se ha utilizado la técnica de microextracción en fase sólida (SPME); por ello, se realizó la búsqueda bibliográfica en la base de datos *Scopus (Elsevier),* usando la ecuación TITLE-ABS-KEY "SPME and *post-mortem*", en el periodo de observación de 2001 al 2024. Se encontraron veinticuatro investigaciones sobre SPME aplicada al estudio *post-mortmem* (Véase **Figura 2**), se observó que aún es limitado el estudio de los VOC producidos durante la descomposición de cadáveres que podrían ser de gran utilidad en la química forense.

Statheropoulos *et al*. (2005) estudiaron los VOC emitidos por dos cadáveres humanos durante cuatro semanas de su descomposición, usando SPME y GC/MS; los autores identificaron 86 compuestos, entre ellos, sulfuros, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, alcoholes, cetonas y aminas, y propusieron rutas metabólicas de su formación a partir de proteínas, carbohidratos, lípidos, *etc*. Posterior a este aporte, los mismos autores (Statheropoulos *et al*., 2007) realizaron otro estudio enfocado en los VOC que se generaban en los primeros días de descomposición; se usó un cadáver con cuatro días en estado de descomposición al cual mediante muestreo con tubos de absorción cada cuatro horas durante un día se recolectaron los volátiles que se analizaron por GC/MS; se identificaron 30 compuestos similares a los mencionados en el anterior estudio (Statheropoulos *et al*., 2005):

11 sustancias fueron las mismas, en cada muestreo, entre ellas figuraban sulfuros, cetonas e hidrocarburos aromáticos, que son útiles como un marcador de detección de cuerpos en descomposición.

Figura 2.

Número de publicaciones sobre estudios post-mortem usando microextracción en fase sólida (SPME), registrado durante los años 2001-2024.



Nota. La ecuación de búsqueda utilizada TITTLE-ABS-KEY (“SPME and *post-mortem*”). Fuente: *Scopus, Elsevier*. Periodo de observación: 2001-2024. Fecha de consulta: 13 de octubre de 2024.

Hoffman *et al*. (2009) diferenciaron 14 muestras de tejido humano en descomposición durante 48 h e identificaron nuevamente VOC usando la técnica SPME/GC/MS, sulfuros, hidrocarburos aromáticos y aldehídos como compuestos más frecuentes en los distintos tejidos tomados. Con la información obtenida (Hoffman *et al*., 2009), los autores llegaron la conclusión, de que hay tejidos en ciertas regiones del cuerpo que guardan semejanza en cuanto a sus compuestos representativos generados durante la descomposición, y que pueden ser usados para entrenar a perros de búsqueda y rescate.

Entre los estudios realizados en cerdos, figuran los de Dekeirsschieter *et al*. (2009). Los autores realizaron la identificación y comparación de los VOC de descomposición emitidos por

los cuerpos puestos en tres ambientes distintos: un cultivo, un bosque y en cemento; se usaron tubos de absorción y análisis por GC/MS, se encontró una cantidad más alta de VOC en el cadáver enterrado en un cultivo. Los compuestos como ésteres, ácidos carboxílicos, sulfuros y compuestos nitrogenados encontrados en los cadáveres de cerdos fueron similares a los de los humanos. Siguiendo la misma idea del cambio de ambiente, Irish *et al.* (2019) estudiaron los VOC de descomposición de restos de cerdo en dos ambientes: al aire libre y sumergidos al agua, usando HS-SPME-GC/MS, los autores encontraron una gran variedad de compuestos como alcoholes, cetonas, aldehídos, aromáticos, nitrogenados, azufrados, y en su mayoría, ácidos carboxílicos; comparando los dos ambientes, en los restos en descomposición al aire libre se identificó una mayor cantidad de VOC de descomposición ya reportados en la literatura (Armstrong *et al*., 2016; Brasseur *et al*., 2012; Dekeirsschieter *et al*., 2009).

En los estudios realizados en ratones por Kalinová *et al*. (2009), se usaron ratones para identificar los VOC de descomposición que atraían a una especie de escarabajo específicamente relacionado con los VOC de descomposición de cadáveres. Los autores usaban la técnica SPME-GC/MS desde el tiempo cero de muerte e identificaron los compuestos azufrados como los primeros emitidos tras la descomposición al tercer día, observaron también una atracción alta de los escarabajos por esos compuestos.

Usando ratones Kasper *et al.* (2012) analizaron el impacto que tienen los factores abióticos como la temperatura y la humedad sobre la emisión de VOC de descomposición por los cuerpos, se usaron los valores abióticos mínimos y máximos. Se identificaron compuestos similares a los encontrados en cerdos y humanos (Armstrong *et al*.., 2016; Brasseur *et al*., 2012; Dekeirsschieter *et al*., 2009; Hoffman *et al*., 2009; Killam, 1990; Statheropoulos *et al*., 2005, 2006, 2007; Stefanuto *et al*., 2017; Vass *et al*., 2008), se detectó una mayor cantidad y diversidad de VOC en el caso de valores máximos, pero se registró una mayor cantidad de sulfuros para el caso contrario (valores mínimos).

Estos estudios tienen aplicaciones prácticas como método no invasivo en las ciencias forenses para determinar intervalos *post-mortem* (Statheropoulos *et al*., 2005), desarrollar un perfil olfativo como herramienta de detección (Vass *et al*., 2004, 2008) y facilitar el entrenamiento de perros de búsqueda y rescate (Hoffman *et al*., 2009; Oesterhelweg *et al*., 2008). Por esta razón, seguir estudiando el proceso de descomposición de cadáveres mediante el análisis de VOC es fundamental para consolidar y fortalecer esta área de investigación.

3 Marco teórico

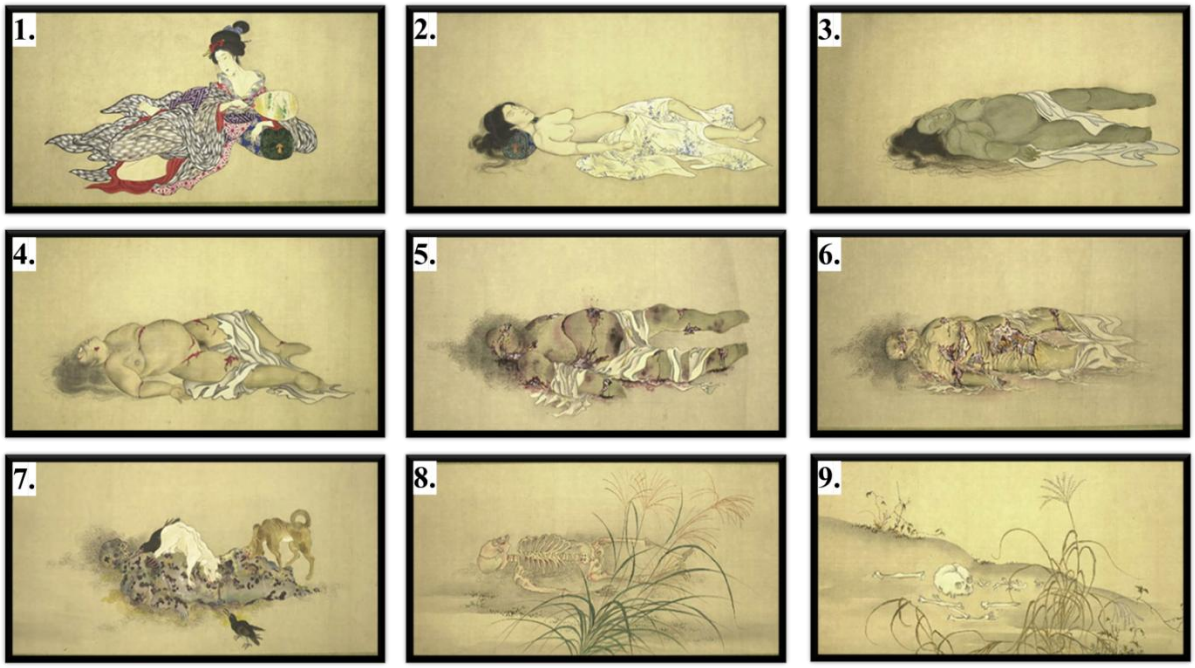
3.1 Proceso de descomposición

La descomposición es el proceso en el que un cuerpo es destruido gradualmente, después de la muerte, por procesos naturales o reacciones cuando una sustancia da como resultado dos o más compuestos distintos. La descomposición involucra la participación de microorganismos como bacterias y hongos, entre estas, algunas levaduras, así como animales carroñeros, insectos y otros. Existen algunos fenómenos cadavéricos que son participes en la muerte, la autólisis es uno de éstos, es el proceso de fermentación producido por enzimas del cuerpo sin la intervención de bacterias, es anaeróbico, y consiste en la degradación de la materia orgánica. A medida que las células experimentan la autólisis, estas enzimas se liberan y comienzan a descomponer las proteínas de la célula y otras biomoléculas orgánicas, lo que provoca la liberación de gases como el amoníaco y el metano. Otro fenómeno es la putrefacción cadavérica, que consiste en la fermentación pútrida de origen bacteriano. Muchas bacterias se encuentran en el exterior, sin embargo, las que tienen un papel fundamental son las que se encuentran dentro del cuerpo, en el sistema digestivo donde abunda la flora bacteriana. Las bacterias aeróbicas (*E. coli*) inician este proceso, se consume el oxígeno y, luego las bacterias anaeróbicas (*Clostridium*) comienzan a intervenir (Peña *et al*., 2019). Estas bacterias pueden "digerir" las proteínas, grasas y carbohidratos, lo que provoca la liberación de más gases, entre ellos, el sulfuro de hidrógeno, con un muy mal olor (Stadler, 2013). Tres fases componen la putrefacción, la fase cromática (Véase **Figura 3**(3)) que consiste en la aparición de manchas en el cuerpo; la fase enfisematosa (Véase **Figura 3**(4)) que consiste en el hinchamiento del cuerpo por presencia de gases; y finalmente, la fase colicuativa o de licuación (Véase **Figura 3**(5)) que consiste en la licuación de los tejidos blandos y su liberación del cuerpo (Peña *et al*., 2019). La antropofagia cadavérica es otro fenómeno que ocurre en la descomposición, esta es

la intervención que tienen animales, como moscas, gusanos, aves, *etc*, en la descomposición de un cuerpo.

Figura 3.

Cuerpo de una cortesana en nueve estados de descomposición:



Nota. (1) Muerte; (2) Estado fresco; (3) Algor mortis e hinchamiento; (4) Fuga de sangre durante la descomposición temprana; (5) Ruptura dérmica y fuga de líquido durante la descomposición temprana; (6) Hundimiento de la cavidad abdominal y exposición de los órganos internos durante la descomposición avanzada; (7) Antropofagia cadavérica; (8) Esqueletización; (9) Descomposición externa. Kobayashi Eitaku, 1870. Obra adaptada por los autores, 2024.

La obra “Cuerpo de una cortesana en nueve estados de descomposición” del pintor japones Eitaku, permite observar gráficamente el proceso de descomposición de un cuerpo, este se basó del Kosuzu, un pensamiento budista que reflexiona la provisionalidad de la materia biológica contemplando los cambios *post-mortem* (Kanda, 2005). Esta obra permite identificar los estados de la descomposición del cadáver, que se dividen en cinco estados principales: (a) el estado fresco; (b) hinchado; (c) descomposición activa; (d) descomposición avanzada y (e) estado seco/restos. El estado fresco de descomposición comienza inmediatamente después de

la muerte (Véase **Figura 3**(2)). Las células del cuerpo continúan funcionando por un corto tiempo y los músculos pueden endurecerse, este proceso se conoce como *rigor mortis*. La temperatura corporal también desciende a la temperatura ambiente y se produce el *livor mortis*, que es la acumulación de sangre en las partes inferiores del cuerpo. Consiguiente a eso, ocurre el estado de hinchazón (Véase **Figura 3**(3)), que generalmente comienza unos días después de la muerte. El cuerpo comienza a descomponerse, y los gases producidos por las enzimas y microorganismos hacen que el cuerpo se hinche. Luego, inicia la descomposición activa, unos pocos días o semanas después de la muerte. Durante esta etapa, los tejidos del cuerpo se descomponen y licuan, produciendo un olor fuerte, característico de compuestos como la cadaverina y la putrescina. Los órganos internos del cuerpo también comienzan a descomponerse y el cuerpo puede colapsar (Véanse **Figuras 3**(4)**, 3**(5) y **3**(6)). Luego comienza la descomposición avanzada que ocurre mucho tiempo después de la muerte. Durante esta etapa, la mayor parte del tejido blando del cuerpo se ha descompuesto, dejando solo huesos, cabello y algo de piel seca (Véase **Figura 3**(7)). Finalmente llega el estado final de descomposición, que es la etapa seca/restos, cuando el cuerpo se descompone por completo, dejando solo huesos secos y otros restos (Véanse **Figuras 3**(8) y **3**(9)). Esta etapa puede tardar varios años en completarse (Kalinová *et al*., 2009; Stadler, 2013).

A medida que la materia orgánica continúa descomponiendo, se produce en el suelo un fenómeno, que se conoce como la isla de descomposición cadavérica, debido a que los cuerpos se descomponen y cambian las condiciones del suelo. En general, el proceso de descomposición es un componente crítico del ciclo natural de vida y muerte, ya que ayuda a reciclar los nutrientes y mantener los ecosistemas estables a lo largo del tiempo. Vale la pena señalar que la tasa de descomposición puede cambiar, según la temperatura, la humedad, la presencia de insectos y las condiciones en las que se dio la muerte (Kalinová *et al*., 2009).

3.2 Compuestos orgánicos volátiles

Los VOC son un grupo de sustancias químicas que se evaporan fácilmente a temperatura ambiente y tienen puntos de ebullición que van desde 50 °C hasta 260 °C (WHO, 1989). Estos compuestos se encuentran comúnmente en productos como pinturas, solventes, agentes de limpieza, productos farmacéuticos y refrigerantes (Forbes *et al*., 2014). Sin embargo, los VOC también se producen en fuentes naturales como plantas, hongos y animales. Los VOC generados en el cuerpo animal son diferentes de los que se derivan de la fabricación de productos químicos sintéticos. En los cuerpos vivos, los VOC se producen a través de diversas rutas metabólicas y se emiten a través del aliento o de la transpiración. Los VOC se generan en los organismos después de su muerte, durante el proceso de su descomposición. Estos VOC pueden proporcionar información valiosa sobre la causa y el momento de la muerte y se pueden recolectar del espacio de cabeza (HS) de las matrices para su respectivo análisis (Hoffman *et al*., 2009). La putrefacción es una de las etapas más importantes de la descomposición después de la muerte y se asocia con la producción de una amplia gama de gases y sustancias muy volátiles; en la fase de hinchazón, la mayoría de éstos son VOC.

La recolección y el análisis de VOC emitidos por cuerpos, después de la muerte, se han utilizado para el desarrollo de tecnologías forenses, como la "nariz electrónica", que puede identificar y clasificar los VOC generados por el cadáver en diferentes etapas de la descomposición (Verheggen et al., 2017). Estas tecnologías pueden ser útiles en la identificación de posibles sospechosos en casos de investigación criminal y sobre la causa de muerte. Sin embargo, las narices electrónicas forenses siguen siendo una tecnología relativamente nueva y aún se están realizando investigaciones para optimizar su precisión y sensibilidad. Además, todavía no se utilizan ampliamente en las investigaciones forenses, y su uso en los tribunales como prueba aún se está evaluando. Por tal motivo, la investigación de

los VOC emitidos durante la descomposición de cuerpos podría ser de gran ayuda para este tipo de tecnologías. Varios estudios han utilizado técnicas *headspace* para determinar un perfil de VOC tras la descomposición de cadáveres, y aunque este perfil no está completamente validado, se sabe que los compuestos azufrados, como el dimetil sulfuro, el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo, en descomposición temprana, algunos ácidos carboxílicos como acético, butanoico, propanoico, en descomposición avanzada, son los VOC típicos, frecuentemente detectados, responsables por el olor fétido de la descomposición (Armstrong *et al*.., 2016; Kasper *et al*., 2012; Verheggen *et al*., 2017). En la **Tabla 1**, se reportan VOC determinados en distintas investigaciones (Kasper *et al*., 2012; Paczkowski & Schütz, 2011).

La composición y la cantidad de VOC emitidos durante la descomposición de un cadáver pueden variar significativamente según diversos factores, como las condiciones ambientales, la temperatura, la humedad, el pH y el tiempo transcurrido desde la muerte. Durante este proceso, algunos de los VOC detectados, más comúnmente, incluyen la putrescina y la cadaverina, que se generan por la descomposición bacteriana de los aminoácidos. Estos compuestos suelen ser los primeros en liberarse tras la muerte y se caracterizan por su olor fuerte y desagradable. En etapas más avanzadas, durante la descomposición anaeróbica de la materia orgánica, las bacterias producen cantidades grandes de metano y dióxido de carbono. Estos gases son indicativos de procesos de descomposición más avanzada y pueden ayudar a establecer un marco temporal en investigaciones forenses. El análisis de los VOC, emitidos durante la descomposición, es una herramienta valiosa en el ámbito forense. Este análisis no solo puede proporcionar información crucial sobre el tiempo transcurrido desde la muerte, sino también sobre su causa e incluso la posible ubicación del cadáver. Además, la identificación de patrones específicos en la liberación de estos compuestos puede mejorar la precisión en la estimación del intervalo *post-mortem*, contribuyendo de manera significativa a la resolución de casos forenses.

Tabla 1.

Ejemplos de los VOC reportados en los estudios sobre la descomposición de ratones.

Familia química	Abreviatura	Compuestos
Ácidos carboxílicos	Aci.	Ácidos acético, propanoico, 2-metilpropanoico, butanoico, 2-metilbutanoico, 3-metilbutanoico, pentanoico, 4-metilpentanoico, hexanoico, heptanoico, nonanoico, decanoico, benzoico.
Alcoholes	Alc.	Etanol, propanol, propan-2-ol, butanol, butan-2-ol, 3-metilbutanol, pentanol, hexan-2-ol, octanol, octen-3-ol, nonanol, fenol.
Aldehídos	Ald.	Hexanal, heptanal, octanal, nonanal, benzaldehído.
Cetonas	Cet.	3-Hidroxibutan-2-ona, butan-2-ona, 3-metilbutan-2-ona, pentan-2-ona, hexan-2-ona, feniletanona, piperidin-2-ona.
Ésteres	Est.	Butanoato de etilo, 2-metilbutirato de etilo, hexanoato de 3-metilbutilo, octanoato de etilo, butanoato de propilo, pentanoato de etilo, butanoato de butilo, 3-metilbutanoato de butilo, hexanoato de etilo.
Hidrocarburos alifáticos	HAl.	Pentano, hexano, hexeno, hepteno, octano, octeno, deceno, tridecano, 1-metil-2-pentilciclopropano.
Hidrocarburos aromáticos	HAr.	Indol, 4-metilindol, furano, 2-etilfurano, 2-pentilfurano.
Compuestos nitrogenados	CN.	3-Etil-2,5-dimetilpirazina, tetrametilpirazina, Benzonitrilo, 2,6-dimetilpirazina, 3-metilpiridina, trietilamina, putrescina, cadaverina.
Compuestos azufrados	CS.	Sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, 3-metiltiofeno.

Nota. Información tomada de Paczkowski & Schütz, 2011; Perrault *et al*., 2014 y Wilson, 2014. Aci, ácidos carboxílicos; Alc, alcoholes; Ald, aldehídos; Cet, cetonas; Est, ésteres; HAl, hidrocarburos alifáticos; HAr, hidrocarburos aromáticos; CN, compuestos nitrogenados; CS, compuestos azufrados.

3.3 Intervalo *post-mortem*

El intervalo *post-mortem* (PMI, según sus siglas en inglés) se refiere al periodo de tiempo que transcurre desde la muerte de un individuo hasta el momento en que su cuerpo es examinado. La determinación precisa del PMI es crucial en investigaciones forenses, especialmente, en casos de homicidio, donde puede proporcionar pistas vitales sobre la cronología de los eventos. También, es relevante en casos de muerte natural para establecer la secuencia temporal de los hechos. A pesar de su importancia, la determinación exacta del momento de la muerte sigue siendo un desafío significativo en la medicina forense (Sampaio-Silva *et al*., 2013). Durante las últimas décadas, se han desarrollado numerosas técnicas y metodologías para estimar el PMI basadas en cambios físicos, químicos y biológicos que ocurren *post-mortem*. Sin embargo, la precisión de estas estimaciones puede verse afectada por múltiples factores, como las condiciones ambientales, la causa de la muerte y las características individuales del fallecido. La continua investigación en este campo busca mejorar la exactitud y la confiabilidad de las técnicas disponibles para la determinación del PMI, reconociendo la complejidad y variabilidad inherentes a este proceso (Fais *et al*., 2018).

3.4 Tanatoquímica o bioquímica *post-mortem*

La tanatoquímica o bioquímica *post-mortem* es una subdisciplina especializada de la química forense que se centra en el análisis de los cambios químicos *post-mortem* en el cuerpo humano. Esta área de estudio se dedica a la investigación de las transformaciones bioquímicas y los procesos de descomposición que ocurren después de la muerte, que son esenciales para la determinación precisa del PMI y para el esclarecimiento de las circunstancias del fallecimiento (Giacento, 2018). La tanatoquímica integra conocimientos avanzados de química, biología y

medicina para proporcionar datos fundamentales en investigaciones forenses, contribuyendo significativamente a las evaluaciones legales y médicas *post-mortem* (Salam *et al*., 2012).

La determinación de la causa de muerte y PMI se realizan aprovechando diversos órganos y restos, como el humor vítreo (Yang *et al*., 2018), el líquido cefalorraquídeo (LCR) (Swain *et al*., 2015), análisis de cabello y uñas (Daniel *et al*., 2004), entre otros. El humor vítreo, un gel que ocupa la cavidad ocular, es valioso en casos de muertes sospechosas debido a su resistencia a cambios *post-mortem* y su capacidad para detectar sustancias como el etanol y drogas, además, ayuda a estimar el tiempo de muerte (Yang *et al*., 2018). El análisis del LCR *post-mortem* proporciona información crucial sobre el estado del sistema nervioso central, útil en el estudio de enfermedades neurodegenerativas (Swain *et al*., 2015). Adicionalmente, el análisis de cabello y uñas permite detectar la exposición a drogas y metales pesados, aunque presenta desafíos como la posible contaminación externa (Daniel *et al*., 2004). Recientemente, el análisis de VOC ha ganado relevancia debido a que su presencia y concentración relativa en función del tiempo, derivadas de las rutas metabólicas de descomposición, pueden ser indicadores precisos para determinar el PMI de un cadáver. Estos métodos, combinados con técnicas avanzadas como la cromatografía y la espectrometría de masas, son fundamentales en la medicina y toxicología forense para reconstruir eventos previos a la muerte y establecer diagnósticos precisos.

En ese estudio por la intervención de los VOC como una alternativa para la determinación del PMI, estudios previos se han encargado de investigar el origen de la procedencia de los compuestos que se liberan en la descomposición, se ha encontrado que los precursores principales son los carbohidratos, proteínas y lípidos los cuales son fuentes clave de nutrientes tanto para microorganismos como para los humanos, su descomposición desempeña un papel fundamental en la putrefacción de vertebrados (Giacento, 2018). Los carbohidratos se degradan a través de rutas

metabólicas como la glucólisis, produciendo piruvato, se fermenta por bacterias y levaduras, como *Clostridiaceae* y *Enterobacteriaceae*, para generar diversos ácidos carboxílicos, entre ellos, acético, propanoico y butanoico, y alcoholes, como el etanol, butanol y pentanol (Boumba *et al*., 2008; Combet *et al*., 2006; Dekeirsschieter *et al*., 2009; Demeyer & Van Nevel, 1979; Dent *et al*., 2004). Esta actividad microbiana, principalmente, en el intestino y el entorno contribuye a la formación de los VOC durante la descomposición, con la participación de bacterias como *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* (Boumba *et al*., 2008). La **Tabla 2** presenta la recopilación de algunos VOC que ya se han estudiado (Paczkowski & Schütz, 2011).

Las proteínas musculares, de membrana y libres durante la degradación proteica mediada por proteasas microbianas producen aminoácidos (Paczkowski & Schütz, 2011), que, mediante distintas rutas metabólicas, se convierten en VOC. Por ejemplo, la *E. coli* está implicada en la formación de compuestos como la cadaverina e histamina, las dos aminas biogénicas características de la descomposición, aunque, no son compuestos lo suficientemente volátiles. La degradación de aminoácidos como valina, leucina e isoleucina, a través de la vía de Ehrlich, produce alcoholes superiores, como propanol, 3-metilbutanol y pentanol (Boumba *et al*., 2008; Combet *et al*., 2006; Demeyer & Van Nevel, 1979; Dent *et al*., 2004; Møller *et al*., 1998), mientras que microorganismos como *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides* descomponen la tirosina y el triptófano en una variedad de compuestos volátiles, entre esos fenol e indol (Smith & Macfarlane, 1996). Los compuestos de azufre, derivados de aminoácidos como la cisteína y la metionina, son críticos en la descomposición, liberan sustancias como disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo, cuya formación influenciada por las condiciones aeróbicas y anaeróbicas (Dent *et al*., 2004).

En cuanto a los lípidos, las células contienen grasa en sus membranas fosfolipídicas, con ácidos grasos como linoleico y araquidónico. La grasa intramuscular y subcutánea, compuesta de triglicéridos, se descompone por enzimas microbianas en glicerol y ácidos grasos (Boumba *et al*., 2008; Dent *et al*., 2004). El glicerol se transforma en piruvato, que a su vez genera varios productos volátiles; se ha reportado que del glicerol también se produce el propilenglicol. La oxidación de ácidos grasos por microorganismos genera VOC como aldehídos, cetonas y alcoholes (Véase **Tabla 2**).

3.5 Técnicas de extracción y de análisis instrumental

3.5.1 *Microextracción en fase sólida*

La microextracción en fase sólida usando espacio de cabeza, HS-SPME (por sus siglas en inglés), una técnica de extracción y el análisis de VOC de una muestra, fue desarrollada por el Prof. Janusz Pawliszyn y colaboradores, en la Universidad de Waterloo, Canadá, a principio de los años noventa (Pawliszyn, 2011). El dispositivo SPME (Véase **Figura 4)** consta de varios componentes clave. En primer lugar, cuenta con un soporte sólido que incluye un resorte tensor, el cual mantiene la fibra en su posición. Este soporte está unido a un *séptum* sellado, que se conecta a la aguja perforadora mediante una férula. Dentro de la aguja perforadora se encuentra la aguja de fijación, que sostiene el recubrimiento de fibra de sílice utilizada para la extracción. En la parte superior del mecanismo se encuentra un conector de rosca, codificado por color, como se muestra en la **Tabla 3** (Pawliszyn, 2011). En esta técnica, al espacio de cabeza de la muestra que contiene los VOC de interés se introduce el mecanismo de fibra SPME, más concretamente el polímero que la recubre, se expone al espacio de cabeza durante un periodo de tiempo específico, durante el cual los VOC se atrapan en ella (Pawliszyn, 2000).

Tabla 2.

Compuestos orgánicos volátiles identificados en estudios experimentales y revisiones.

Compuesto	Familia	Precursores	Referencia
Etanol	Alc.	Carbohidratos, lípidos, aminoácidos	(Boumba *et al*., 2008)
Butanol	Alc.	Carbohidratos, lípidos	
3-Metilbutanol	Alc.	Leucina	(Møller *et al*., 1998)
Pentanol	Alc.	Treonina, leucina, isoleucina, valina	(Boumba *et al*., 2008)
Hexanol	Alc.	Metabolismo fúngico	(Boerjesson *et al*., 1993)
2-Etilhexanol	Alc.	N.R.	
Octen-3-ol	Alc.	Ácido linoléico	(Zhang *et al*., 1992)
Ácido acético	Aci.	Carbohidratos, compuestos indólicos y fenólicos	(Dent *et al*., 2004)
Ácido propanoico	Aci.	Aminoácidos	(Demeyer & Van Nevel, 1979)
Ácido butanoico	Aci.	Carbohidratos, lípidos, aminoácidos	
Ácido pentanoico	Aci.	Aminoácidos	
Ácido hexanoico	Áci.	Compuestos indólicos y fenólicos	(Young & Rivera, 1985)
Trimetilamina	Ami.	Aminoácidos	(Stutz *et al*., 1991)
Acetona	Cet.	Carbohidratos	(Boumba et al., 2008)
Butan-2-ona	Cet.	Alcanos	(Patel *et al*., 1979)
Pentan-2-ona	Cet.	Alcanos	
Feniletanona	Cet.	Fenilalanina	(Rabus & Heider, 1998)
Tolueno	HAr.	Fenilalanina	(Boumba *et al*., 2008)
Fenol	HAr.	Tirosina	(Bone *et al*., 1976)
Estireno	HAr.	Fenilalanina	(Luengo *et al*., 2001)
Indol	CN.	Triptófano	(Smith & Macfarlane, 1996)
Metanotiol	CS.	Metionina	(Kalinová *et al*., 2009)
Disulfuro de dimetilo	CS.	Metanotiol	(Frederick *et al*., 1957)
Trisulfuro de dimetilo	CS.	Metionina	(Wolle et al., 2006)

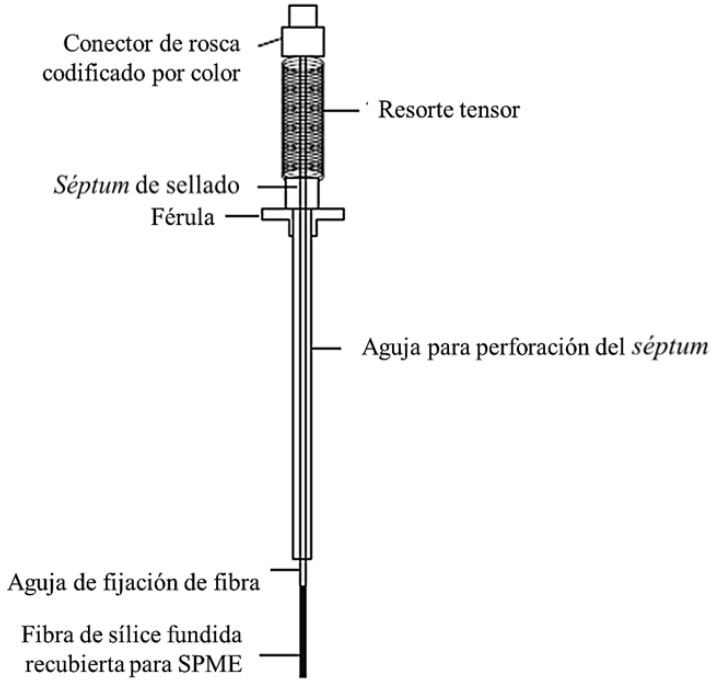
Nota. Tomado y modificado de Paczkowski *et al*.(2011) Aci, ácidos carboxílicos; Alc, alcoholes; Ald, aldehídos; Cet, cetonas; Est, ésteres; HAl, hidrocarburos alifáticos; HAr, hidrocarburos aromáticos; CN, compuestos nitrogenados; CS, compuestos azufrados; N.R, no reportado.

La técnica SPME ofrece varias ventajas sobre otros métodos de extracción, ellas son, la simplicidad, el bajo costo y la capacidad de extraer una amplia gama de VOC acompañados de alta sensibilidad y selectividad (Pawliszyn, 2000; Shirey, 2012).

Existen dos modos que generalmente se utilizan para realizar SPME: (1) la extracción por inmersión directa y (2) la extracción en el espacio de cabeza (*headspace*). La extracción por inmersión directa consiste en sumergir la fibra en la muestra líquida. En la extracción en espacio de cabeza se espera a que se alcance el equilibrio térmico y expone la fibra en el *headspace* de la muestra en un recipiente cerrado para que los VOC sean extraídos. Además de estos modos, existe una tercera variante menos común conocida como SPME con protección de membrana, es menos utilizada, pero de gran interés en la actualidad, porque permite analizar matrices complejas, con muchas interferencias (Pawliszyn, 2011).

Figura 4.

Modelo esquemático del ensamblaje para la SPME.



Nota. Tomado y modificado de Pawliszyn *et al* (2011).

HS-SPME se utiliza para el análisis de VOC de varias fuentes, entre ellas, muestras biológicas, *e.g*, cadáveres. En ciencia forense, HS-SPME se ha usado como un método no invasivo para analizar los VOC emitidos por restos humanos para identificar el tiempo transcurrido desde la muerte eventualmente, la causa de la muerte y otra información relacionada con el intervalo *post-mortem* (Schmidt & Podmore, 2015). Cuando se utiliza HS-SPME para el análisis de VOC de cadáveres, la muestra se coloca normalmente en un recipiente sellado para permitir la acumulación de VOC en el espacio de cabeza. Luego, la fibra SPME se introduce en el contenedor y se expone al espacio de cabeza, durante un período de tiempo específico para extraer los VOC. La fibra se retira luego del recipiente y los VOC se analizan por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

3.5.1.1 *Recubrimientos de la fibra SPME*.

Los recubrimientos de la fibra SPME son responsables de la extracción selectiva de los analitos de interés. Dependiendo del recubrimiento, se pueden extraer diferentes compuestos, ya que la técnica puede aislar analitos tanto volátiles como no volátiles, desde polares hasta no polares (Pawliszyn, 2011). Existen varios recubrimientos de fibras SPME, algunos se muestran en la **Tabla 3**. Entre ellos, se encuentran los polímeros utilizados como fases estacionarias, tales como poli(dimetilsiloxano) (PDMS), poli(acrilato) (PA), poli(etilenglicol) (PEG) y carboxeno (CAR). Además, el divinilbenceno (DVB) y el carboxeno (CAR) se combinan comúnmente con PDMS para ampliar la capacidad extractiva de la fibra SPME (Shirey, 2012). Cuando no se conocen los compuestos para extraer, se emplea una combinación de recubrimientos para aumentar la capacidad y la selectividad de la fibra para distintos analitos, *e.g*, la fibra DVB/CAR/PDMS. La elección del recubrimiento adecuado para una fibra SPME depende de su eficacia en la extracción de diversos tipos de analitos.

Los recubrimientos para fibras SPME pueden clasificarse en adsorbentes o absorbentes, cada uno con un mecanismo de extracción distinto. Los absorbentes retienen los analitos mediante interacciones en volumen, mientras que los adsorbentes los atrapan físicamente en su estructura porosa en la superficie (Pawliszyn, 2011). Para seleccionar el tipo de recubrimiento se debe tener en cuenta la polaridad y volatilidad de los analitos para extraer. El tipo de fase aplicada determina la polaridad del recubrimiento y la selectividad al mejorar la afinidad de la fibra por analitos polares o no polares, según varios tipos de recubrimientos con distinta polaridad disponibles en el mercado (Véase **Tabla 3**).

Tabla 3.

Tipos de recubrimientos de fibras SPME, mecanismo de extracción y polaridad.

Tipo de recubrimiento	**Grosor, µm**	**Mecanismo de extracción**	**Polaridad**	**Código de color**
PDMS	7	Absorbente	Apolar	Verde
	30			Amarillo
	100			Rojo
PA	85	Adsorbente	Polar	Blanco
PEG	60	Adsorbente	Polar	Morado
PDMS/DVB	65	Adsorbente	Bipolar	Rosado
DVB/CAR/PDMS	50/30	Adsorbente	Bipolar	Gris
CAR/PDMS	85	Adsorbente	Bipolar	Celeste

En el caso del poli(dimetilsiloxano) se tiene un recubrimiento de fibra de carácter apolar, sin embargo, si éste se combina con otros recubrimientos de carácter polar, es posible extraer analitos de naturaleza polar. Por esta razón, los recubrimientos mixtos de fibras SPME se consideran bipolares hasta cierto punto, ya que tienen la capacidad de extraer analitos de diferentes

polaridades; sin embargo, son las propiedades específicas del recubrimiento las que definen su eficiencia y selectividad. Otro factor que influye en la capacidad de la fibra para retener los analitos es el grosor del recubrimiento. Los analitos volátiles, por ejemplo, requieren recubrimientos más gruesos para una mayor retención, mientras que los analitos de alto peso molecular o muy poco volátiles se extraen más eficientemente con recubrimientos más delgados (Pawliszyn, 2011). La **Figura 5** ilustra cómo seleccionar el recubrimiento de fibra apropiado dependiendo de la polaridad y la volatilidad del analito, lo cual es fundamental para optimizar el proceso de extracción. Con esta información, se pueden tomar decisiones más informadas sobre la selección de recubrimientos de fibras SPME aptos para aplicaciones específicas, teniendo en cuenta tanto la polaridad del recubrimiento como las propiedades físico-químicas de los analitos de interés.

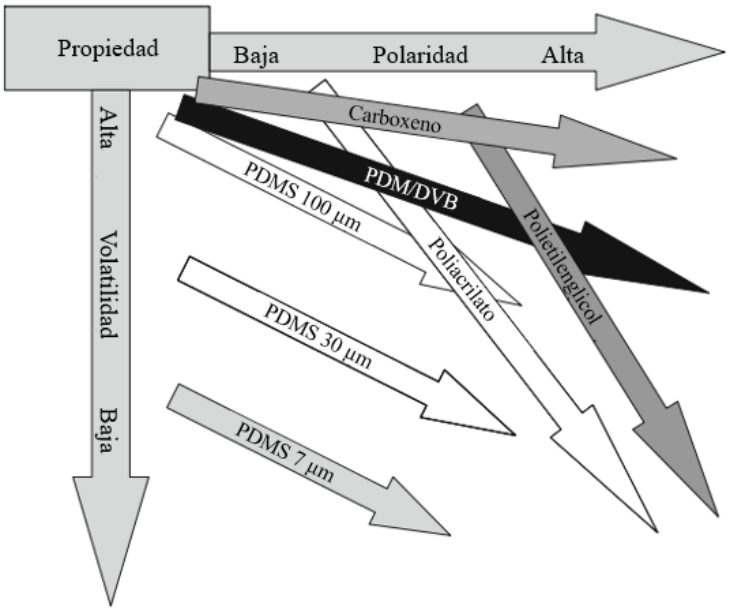
Los primeros recubrimientos de fibras SPME desarrollados estaban recubiertos con fases de tipo absorbente. Los revestimientos de fibras absorbentes están compuestos principalmente de polímeros "similares a los líquidos" (Pawliszyn, 2011). El poli(dimetilsiloxano) (PDMS) es uno de los recubrimientos de tipo absorbente, este polímero líquido se destaca como la fase apolar más extendida en la fabricación de columnas para cromatografía de gases (GC), gracias a su resistencia térmica y amplia gama de aplicaciones. El uso de este polímero como recubrimiento de fibra SPME es muy común (Véase **Tabla 3**) debido a que es un buen material para extracción, aunque no tiene afinidad alta por los analitos polares (Pawliszyn, 2011). La versatilidad en la fabricación de recubrimientos de PDMS permite obtener diferentes espesores, de manera consistente, 100, 30 y 7 μm. Los recubrimientos más gruesos de 100 μm y 30 μm tienen un límite de temperatura máxima más bajo de 300 °C en comparación con el recubrimiento de fibra de PDMS de 7 μm, que se encuentra entrecruzado más altamente y tiene un límite de temperatura máxima de 320 °C

(Pawliszyn, 2011); cada tipo de espesor de recubrimiento tiene ventajas para aplicaciones específicas (Cardona *et al*., 2011; Ilias *et al*., 2006; Kung *et al*., 2015).

Los recubrimientos adsorbentes actúan extrayendo los analitos mediante un proceso de captura física, sobre la superficie o dentro de los poros del material. En las fibras de tipo adsorbente, un material sólido se dispersa dentro de una matriz polimérica líquida que recubre la fibra. La eficacia de un adsorbente para retener analitos depende de varios factores críticos, entre ellos, la superficie total disponible, la porosidad y el tamaño de los poros. La capacidad de retención de los analitos por parte del adsorbente está fuertemente influenciada por el tamaño y la estructura de los analitos, ya que la interacción entre estos y el material adsorbente es inversamente proporcional al tamaño del analito. Es decir, cuanto mayor sea el tamaño del analito, menor será la fuerza de retención del adsorbente.

Figura 5.

Selectividad de extracción de los recubrimientos de fibras SPME, según de las propiedades: la polaridad y la volatilidad.



Nota. Tomado y modificado de Pawliszyn *et al* (2011).

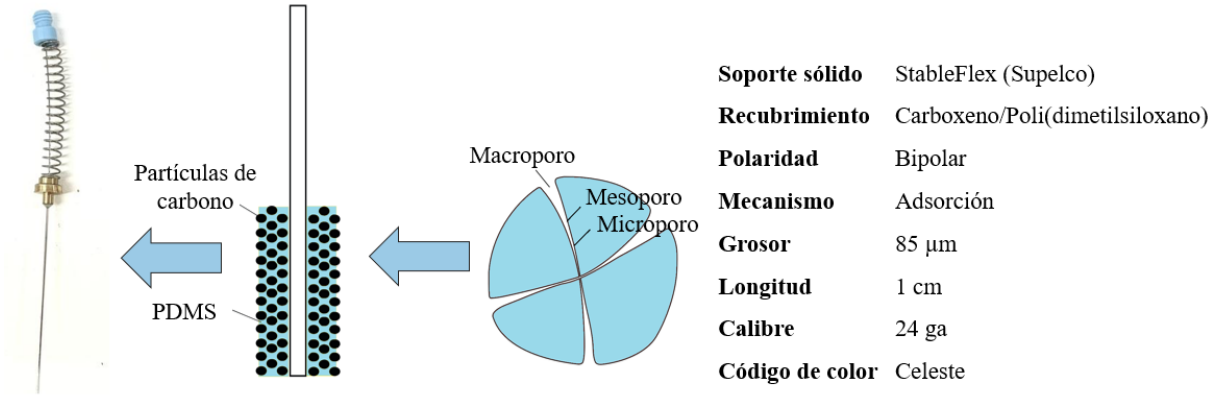
Los poros en los materiales adsorbentes se dividen en tres categorías, según su tamaño: macroporos, mesoporos y microporos. Los macroporos son los poros más grandes y mayoritariamente se encuentran en la superficie, con aberturas de aproximadamente 0.500 Å. Los mesoporos tienen diámetros que varían de 20 a 500 Å, lo que los hace adecuados para atrapar moléculas de tamaño intermedio. Los microporos, con diámetros entre 2 y 20 Å, son ideales para retener analitos de menor tamaño. En el caso de las fibras utilizadas en la microextracción en fase sólida (SPME), los adsorbentes más comunes son el divinilbenceno (DVB), un polímero poroso, y el Carboxen 1006, un tamiz molecular de carbono. Ambos materiales destacan por su capacidad de adsorber diferentes tipos de analitos, según sus propiedades estructurales y el tamaño de sus poros, lo que permite optimizar la eficiencia en la adsorción de compuestos de interés en diversas aplicaciones analíticas (Pawliszyn, 2011).

El recubrimiento de divinilbenceno (DVB) es un polímero poroso de uso común, especialmente, en el monitoreo del aire. Este material tiene un alto grado de mesoporosidad y, debido a esto, se utiliza principalmente para la extracción de analitos volátiles y semivolátiles (Véase **Figura 5**).

El Carboxen 1006, conocido como Carboxeno, es un tipo de tamiz molecular de carbono, y su recubrimiento está suspendido en poli(dimetilsiloxano). Este material puede retener analitos con un peso molecular superior a 35 g/mol. Gracias a la estructura cónica de sus poros (Véase **Figura 6**), también, puede capturar analitos de mayor tamaño. No obstante, existe un límite para el tamaño de los analitos que se pueden extraer y desorber, ya que una molécula plana de gran tamaño puede tener una interacción tan fuerte con la superficie de carbono que su desorción se vuelve demasiado lenta.

Figura 6.

Mecanismo y propiedades del recubrimiento de fibra de SPME, CAR/PDMS.



Para optimizar la extracción de sustancias con un rango más amplio de pesos moleculares y para mejorar la eficiencia de la desorción, se recomienda desorber las fibras de CAR/PDMS entre 280 °C y 320 °C, temperaturas en las que el recubrimiento no sufre daños. La fibra adsorbente de divinilbenceno y Carboxen 1006 suspendida en el polímero de poli(dimetilsiloxano) (DVB/CAR/PDMS) es de uso muy frecuente en HS-SPME; el DVB proporciona estabilidad mecánica al recubrimiento y el CAR aumenta su selectividad. La combinación de estos tres materiales proporciona a la fibra DVB/CAR/PDMS varias ventajas, entre ellas, la estabilidad térmica alta, el sangrado bajo y la capacidad para extraer analitos de una amplia gama de polaridades (Díaz-Maroto *et al*., 2004; Lambropoulou & Albanis, 2002; R. M. Peña *et al*., 2008; Souza & Bragagnolo, 2014).

3.5.2 *Técnicas analíticas*

La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC/MS) es una técnica analítica utilizada para separar e identificar los componentes de una mezcla, se usa en análisis forense, de alimentos, ambiental y una cantidad grande de áreas de investigación (Blake *et al*., 2009; Perez-Hurtado *et al*., 2017; Stashenko & Martínez, 2009, 2010).

3.5.2.1 *Cromatografía de gases*

En cromatografía de gases (GC), una muestra se inyecta en una columna que tiene una fase estacionaria, que puede ser líquida o sólida. A medida que la columna se calienta, los distintos compuestos de la muestra se van separando a lo largo de la columna, según sus propiedades fisicoquímicas y su afinidad por la fase estacionaria (Labows *et al*., 1980). La fase móvil consiste en un gas de arrastre que no interactúa químicamente con los analitos, su finalidad es transportarlos a través de la columna (Stashenko & Martínez, 2009). Los compuestos que se pueden analizar por medio de GC/MS deben ser volátiles o volatilizables, termoestables y tener bajo peso molecular menor de 500 Da. En las columnas polares, la separación se basa en las diferencias de momento dipolar (polaridad) de las moléculas, mientras que en las columnas apolares el orden de salida de los analitos de la columna depende de sus puntos de ebullición (Stashenko & Martínez, 2009, 2010).

3.5.2.2 *Espectrometría de masas en fase gaseosa*

Los componentes separados por la columna GC luego ingresan al detector selectivo de masas (MSD, por sus siglas en inglés), en donde las moléculas se ionizan y los iones moleculares y iones productos (fragmentos) se separan en función de su relación masa-carga (*m/z*). El espectro de masas resultante proporciona una "huella digital" única de cada compuesto, permitiendo su identificación al compararse con una base de datos de espectros o con sustancias patrón (Julák *et al*., 2000). Existen dos tipos principales de analizadores de masas: los de barrido (cuadrupolo) y los de transmisión simultánea de iones (TOF, *Orbitrap*). Estos se diferencian por su resolución, el rango de masas que pueden medir, la velocidad y la eficiencia en la transmisión de iones (Stashenko & Martínez, 2010). Los detectores se diferencian por la sensibilidad, los niveles mínimos de detección y cuantificación (Stashenko & Martínez, 2009). Así, la combinación de GC

con espectrometría de masas ofrece una potente herramienta analítica para separar y caracterizar compuestos complejos con alta precisión y selectividad.

3.6 *Mus musculus*

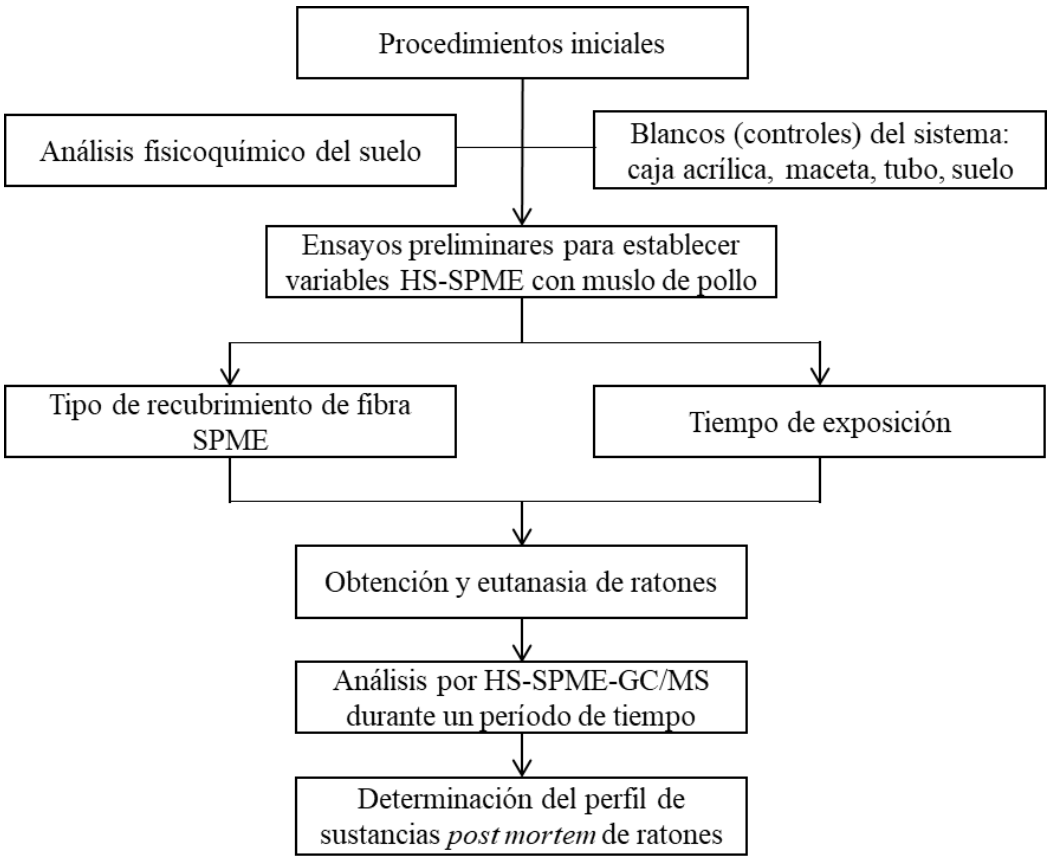
Los ratones, conocidos como *Mus musculus*, son pequeños mamíferos de la familia Muridae. Son animales de investigación más utilizados en biología y medicina, debido a su tamaño pequeño, reproducción rápida y cierta similitud genética, con un 95 % de coincidencia de su genoma con el de los humanos (Rydell-Törmänen & Johnson, 2019). Los ratones se usan ampliamente en estudios científicos porque comparten muchas características genéticas y biológicas, lo que los convierte en un organismo modelo valioso para estudiar diversas enfermedades que afectan a los humanos. Los ratones tienen una vida útil relativamente corta, lo que permite a los investigadores estudiar varias generaciones en un período de tiempo relativamente corto. También, son de tamaño pequeño, fáciles de manejar y se reproducen rápidamente (Bonhomme & Orth, 2017), lo que los convierte en un modelo animal conveniente para muchos tipos de experimentos.

4 Metodología

Teniendo en cuenta los objetivos de este trabajo de grado, se planteó el siguiente esquema general (**Figura 7**) que resume la metodología usada.

Figura 7.

Esquema general de la metodología del presente estudio.



4.1 Reactivos

Para el desarrollo de este proyecto, se empleó undecanoato de metilo (99 %) adquirido de *Sigma-Aldrich* (SA, St. Louis, MO, EE. UU.). La mezcla de *n*-alcanos C_6-C_{25} se obtuvo de *AccuStandard Inc*. (New Haven, CT, EE. UU.). Los gases helio, aire, hidrógeno y nitrógeno (99.995%) se adquirieron en la empresa Messer (Bucaramanga, Colombia).

4.2 Obtención y análisis físico químico del suelo

El suelo usado para enterrar las muestras en descomposición fue suministrado por el Complejo Agroindustrial Piloto del Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, CENIVAM, en el campus principal de la Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Santander, Colombia), este consistió en una mezcla de tierra negra y sustrato orgánico. Este suelo se dejó secar por cinco días y se almacenó en un recipiente plástico a temperatura ambiente. El análisis fisicoquímico se realizó en el Laboratorio Químico de Suelos (LQS) de la Universidad Industrial de Santander, bajo la dirección de la profesora Luz Yolanda VARGAS FIALLO.

4.3 Ensayos preliminares

Se realizó una serie de ensayos preliminares con tejido animal *i.e.*, muslos de pollo, adquiridos en el mercado local. Por razones éticas, para "simular" los cadáveres de ratones, con el fin de definir el tipo de recubrimiento de fibra SPME y el tiempo de extracción para la técnica de HS-SPME. El criterio de selección para cada ensayo se basó en obtener el mayor número y la cantidad de los compuestos de interés, junto con una prueba de t-Student, que permite encontrar diferencias significativas.

4.3.1 *Recubrimientos de fibra SPME*

En el ensayo para la selección del recubrimiento de la fibra SPME se emplearon dos muslos de pollo (202 g) puestos cada uno en frascos de vidrio cerrados con una tapa metálica (aluminio) con un orificio en el centro por el cual se insertó el soporte de la fibra SPME. Se ensayaron los recubrimientos de PDMS, 100 μm; PDMS/DVB, 65 μm; DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm; CAR/PDMS, 85 μm (Supelco, Bellefonte, EE. UU., **Figura 8)**. La fibra se expuso durante 5 s, a

23 °C, al espacio de cabeza de un vial (2 mL) que contenía undecanoato de metilo (3.2 mg) como estándar interno (ISTD). Cada fibra se expuso al espacio de cabeza del recipiente de vidrio durante 30 min a 60 °C. Para cada recubrimiento de fibra, se usaron las mismas condiciones operacionales de temperatura y humedad.

Figura 8.

Medición de volátiles emitidos por muslo de pollo, usando distintos tipos de recubrimiento de fibra SPME.

Nota. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga; fecha: 3 de octubre de 2023. Foto tomada por Juan Diego SANABRIA.

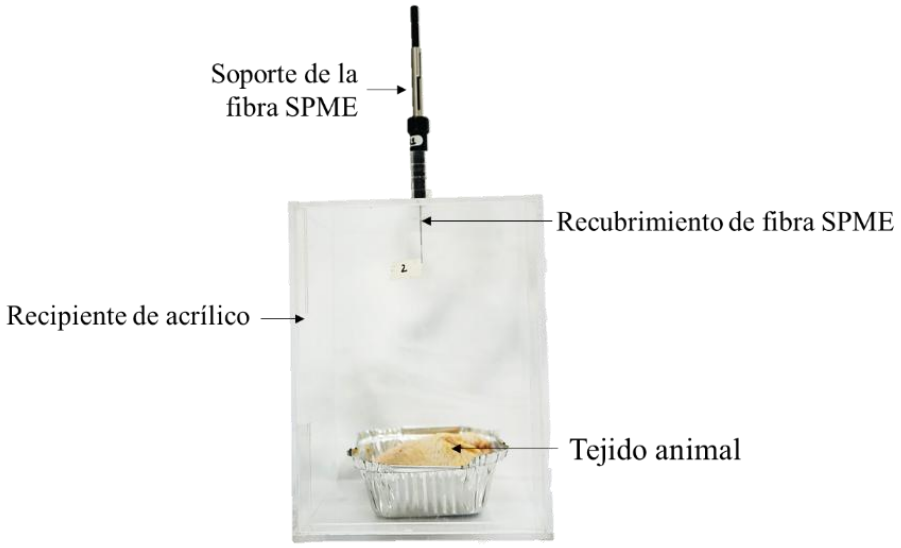
4.3.2 *Tiempo de extracción por HS-SPME*

En este ensayo se emplearon dos muslos de pollo (202 g), depositados sobre recipientes de aluminio cada uno ubicados dentro de recipientes, fabricados en acrílico (tamaño 17 x 17 x 22 cm) (Véase **Figura 9)**. Cada recipiente tenía en su superficie un orificio para insertar el soporte de la fibra de SPME. Para este sistema se realizó una extracción de volátiles, previo al ingreso de la

muestra, para obtener el blanco (control negativo) del sistema. La fibra se expuso durante 5 s, a 23 °C, al estándar interno (undecanoato de metilo, 3.2 mg) y, luego, se introdujo al recipiente de acrílico durante 30 min, 1 h o 2 h. Los volátiles adsorbidos en la fibra se desorbieron, luego, en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, operado en modo *splitless* (Columna DB-WAX, 60 m).

Figura 9.

Medición de volátiles emitidos por muslo de pollo, durante distintos tiempos de extracción.



Nota. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga; fecha: 17 de noviembre de 2023. Foto tomada por Juan Diego SANABRIA.

4.4 Obtención de ratones y su eutanasia

Se obtuvieron de la unidad de experimentación con ratones de la Universidad Industrial de Santander, sede Guatiguará, cuatro ratones de laboratorio (*Mus musculus*) hembra, con 14 semanas de edad (21.9 g), mantenidos bajo las mismas condiciones de crianza. Por razones éticas, se usaron ratones criados para ser sacrificados. Se realizó su sacrificio por asfixia con CO_2, con un flujo constante de gas por 1 min, aproximadamente, 1 psi y se esperó por 5 min para verificar que ya no

hubiera movimiento alguno, según el procedimiento propuesto por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA, 2019). El experimento cumplió con la ley colombiana (N° 84, 1989) para protección de animales utilizados en experimentación científica. El proyecto fue avalado por el Comité de Ética de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI – UIS), Acta N°13 del día 3 de mayo del 2024 (Véanse **Anexo A**).

4.5 Extracción de volátiles por HS-SPME

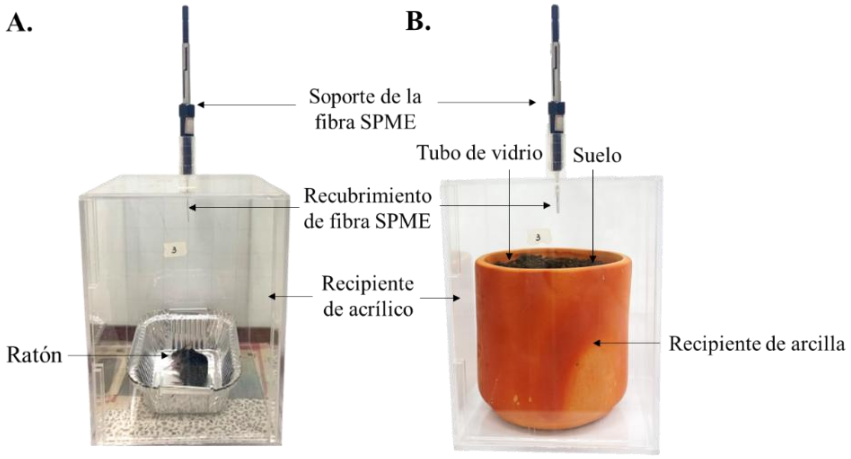
Los ratones se separaron en dos grupos: el primer grupo fueron los ratones enterrados y el segundo grupo, sin enterrar. Los del primer grupo se enterraron en suelo previamente analizado (pH, textura, micronutrientes, *etc*.) usando un recipiente de arcilla (13.5 cm x 12.7 cm) junto con un tubo de vidrio (15 cm x 2.6 cm) con tres aberturas laterales con mallas para impedir la entrada de las partículas de suelo y facilitar la emisión de volátiles, a temperatura ambiente. Se depositó suelo hasta la mitad de la altura del recipiente, luego, se situó el tejido animal y se terminó de cubrir con más suelo hasta completar la altura del recipiente, aproximadamente, 500 g de suelo. Los del segundo grupo se depositaron en bandejas de aluminio y se introdujeron en el recipiente acrílico (Véase **Figura 10).**

Para la extracción de los volátiles por HS-SPME se usó la fibra previamente seleccionada en la **Sección 4.3.1**, que se expuso durante 5 s (23 °C) al estándar interno (ISTD, undecanoato de metilo, 3.2 mg) y, luego, se ubicó en el recipiente de acrílico durante el tiempo de extracción definido en la S**ección 4.3.2.** Los volátiles se midieron durante aproximadamente de seis meses (201 días), con un intervalo de 5 días hasta completar dos meses, luego, cada 15 días hasta los cuatro meses y finalmente cada 30 días hasta seis meses. Los volátiles adsorbidos sobre la fibra se desorbieron durante 20 min en el puerto de inyección del GC/MS (Columna DB-WAX, 60 m).

Previamente, se realizó una extracción de los volátiles del sistema (Blancos de recipiente acrílico, de arcilla, de suelo), al inicio de cada experimento se analizaron los blancos de la fibra

Figura 10.

Medición de volátiles emitidos por ratón, ***A.*** *Animal sin enterrar y* ***B.*** *Animal enterrado.*



Nota. Lugar: CENIVAM-UIS, Bucaramanga; fecha: 22 de enero de 2024. Foto tomada por Juan Diego SANABRIA.

4.6 Identificación de los VOC por GC/MS

La identificación de los compuestos volátiles se basó en criterios cromatográficos (tiempos de retención e índices de retención lineal (IRL)) y espectrométricos (comparación de los espectros de masas con los de bases de datos o con los compuestos patrón, estudio de patrones de fragmentación). Se usó una mezcla de *n*-alcanos C_6-$C_{25,}$ para la determinación de los IRL.

Los datos cromatográficos y espectrométricos se obtuvieron en un cromatógrafo de gases *Agilent Technologies* GC 7890 (AT, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector selectivo de masas MSD 5975C (*Agilent Technologies*, Palo Alto, CA, EE. UU.) usando ionización por electrones (EI, 70 eV) con un inyector *split/splitless* (250 °C) operado en modo *splitless*. Para la separación de compuestos se empleó una columna polar DB-WAX (J&W *Scientific*, Folsom, CA, EE. UU.), con fase estacionaria de poli(etilenglicol) de 60 m x 0.25 mm, D.I. x 0.25 µm, d_f. La

temperatura del hormo GC se programó de 50 °C (5 min) a 150 °C (por 7 min), a 4 °C/min, luego, a 230 °C (por 40 min), a 4 °C/min. Las temperaturas del puerto de inyección, la cámara de ionización y la línea de transferencia se mantuvieron a 250 °C, 230 °C y 285 °C, respectivamente. Los espectros de masas y las corrientes iónicas reconstruidas (cromatogramas), se obtuvieron en el intervalo de masas 35-400 *m/z*, con velocidad de adquisición de 4 *scans*/s. Los datos se procesaron en el *software MSDChemStation* G1701DA (*AT*, Palo Alto, CA, EE. UU.).

4.7 Obtención de un perfil de volátiles emitidos por cadáveres de ratones en descomposición

Los compuestos se identificaron por GC/MS de forma tentativa, es decir, comparando los IRL y espectros de masas con los de las bases de datos NIST (2017) y estudiando los patrones de fragmentación de cada uno. Se estableció el perfil de descomposición asociando la relación de áreas, *i.e.*, área de compuestos/área de estándar interno (A_i/A_{istd}), por familias de compuestos, con su período de tiempo de aparición y permanencia durante la descomposición de los individuos bajo estudio.

5 Resultados y discusión

5.1 Análisis fisicoquímico del suelo

En la **Tabla 4**, se reportan las propiedades y parámetros fisicoquímicos (pH, textura, micronutrientes) del suelo usado como la matriz en donde se analizó la descomposición de tejido animal.

Tabla 4.

Parámetros fisicoquímicos del suelo usado en el estudio.

Parámetros		**Resultados**	**Método analítico**
Potencial de hidrógeno, pH		4.0	Electrométrico: relación 1:1 agua destilada
Porcentaje de carbono, %		1.32	Colorimétrico: *Wakley Black* $K_2Cr_2O_7$•H_2SO_4
Fósforo disponible, ppm		12.6	Colorimétrico: Bray II. HCl 0.1 N – NH_4F 0.03 N
Azufre, ppm		12.8	Turbidímetro: extracción con fosfato monocálcico
Capacidad de intercambio catiónico, meq/100g		12.0	Extracción: acetato de amonio
Conductividad eléctrica, mmhos/cm		0.07	Electrométrico: agua destilada
Cationes intercambiables, meq/100g suelo	Ca	1.06	Absorción atómica Extracción: acetato de amonio
	Mg	0.25	
	Na	0.07	
	K	0.10	
	Al	2.6	-
Micronutrientes, ppm	Fe	103	Absorción atómica Extracción: DPTA
	Mn	1.11	
	Cu	0.35	
	Zn	0.23	
	B	0.09	Colorimétrico: extracción con fosfato monocálcico
Textura, %	Arena	62	Método de Bouyoucous: agua destilada
	Limo	18	
	Arcilla	20	

5.2 Selección de recubrimiento de la fibra SPME

Se ensayaron los siguientes recubrimientos para SPME, a saber: PDMS (100 μm); PDMS/DVB (65 μm), DVB/CAR/PDMS (50/30 μm) y CAR/PDMS (85 μm), los cuales se diferencian en cuanto a su naturaleza de polaridad, mecanismo de sorción, grosor, entre otros parámetros, por lo cual ofrecían una respuesta específica para la extracción de ciertos grupos de compuestos.

Según lo obtenido en los perfiles cromatográficos observados en la **Figura 11** y su caracterización química presentada en la **Tabla 5**, la extracción de menor cantidad de volátiles se obtuvo con el recubrimiento PDMS: se aisló únicamente el estándar interno (undecanoato de metilo), a diferencia del recubrimiento con CAR/PDMS que permitió extraer seis compuestos, algunos de ellos, acetona, hexanal y tolueno, han sido detectados como compuestos de descomposición de tejido animal (Cablk *et al.*, 2012; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007, 2011).

En estudios realizados para la determinación de volátiles de tejido animal/humano en descomposición, usando la técnica de extracción SPME, el recubrimiento de la fibra más usado ha sido PDMS/DVB (Cablk *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2009; Lorenzo *et al.*, 2003). Hoffman y col. (2009) extrajeron los volátiles de 14 muestras de tejidos distintos de humano, encontraron varios ácidos carboxílicos, aldehídos, alcoholes; los autores decidieron usar el recubrimiento PDMS/DVB basados en resultados reportados por Lorenzo y col. (2003) quienes compararon los recubrimientos PDMS, PDMS/DVB y CW/DVB, escogiendo el recubrimiento con DVB, que permitió aislar una cantidad de compuestos más alta, como trimetilamina, ácido butanoico, disulfuro de dimetilo, entre otros, reportados previamente (Armstrong *et al.*, 2016; Brasseur *et al.*, 2012; Hoffman *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012; Killam, 1990; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007).

Figura 11.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS, de volátiles emitidos por muslo de pollo, para cuatro tipos de recubrimientos de fibra SPME. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de cada pico cromatográfico se presenta en la ***Tabla 5.***

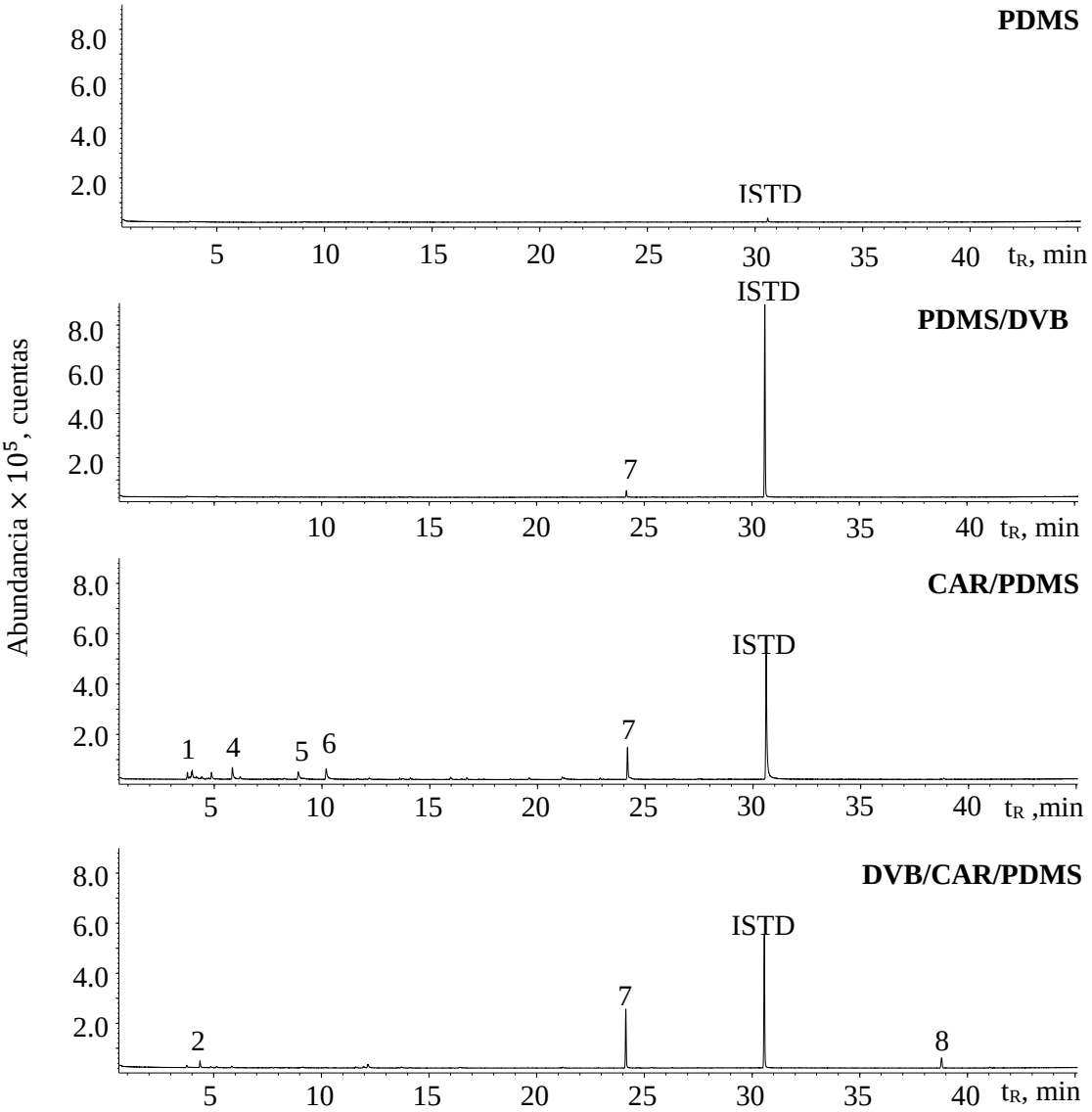


Tabla 5.

Composición química, por HS-SPME-GC/MS, de la fracción volátil de muslos de pollo, para cuatro tipos de recubrimientos.

N° pico, Fig. 11	Compuesto	Índices de retención lineales		A_i/A_{istd}			
		DB-WAX		PDMS	PDMS/DBV	CAR/PDMS	CAR/DVB/ PDMS
		Exp	Lit				
1	Éter etílico[a,b]	625	616[c]	-	-	0.04	-
2	Sulfuro de carbono[a,b]	730	710[c]	-	-	-	0.05
3	Acetona[a,b]	805	814[c]	-	-	0.05	-
4	Butan-2-ona[a,b]	891	899[c]	-	-	0.09	-
5	Tolueno[a,b]	1040	1043[c]	-	-	0.06	-
6	Hexanal[a,b]	1084	1088[c]	-	-	0.10	-
7	2-Etilhexanol[a,b]	1488	1484[c]	-	0.18	0.18	0.12
8	Butilhidroxitolueno[a,b]	1910	1906[c]	-	-	-	0.10

PDMS, poli(dimetilsiloxano); PDMS/DVB, poli(dimetilsiloxano)/divinilbenceno; CAR/PDMS, carboxeno/poli(dimetilsiloxano); DVB/CAR/PDMS, divinilbenceno/carboxeno/poli(dimetilsiloxano).

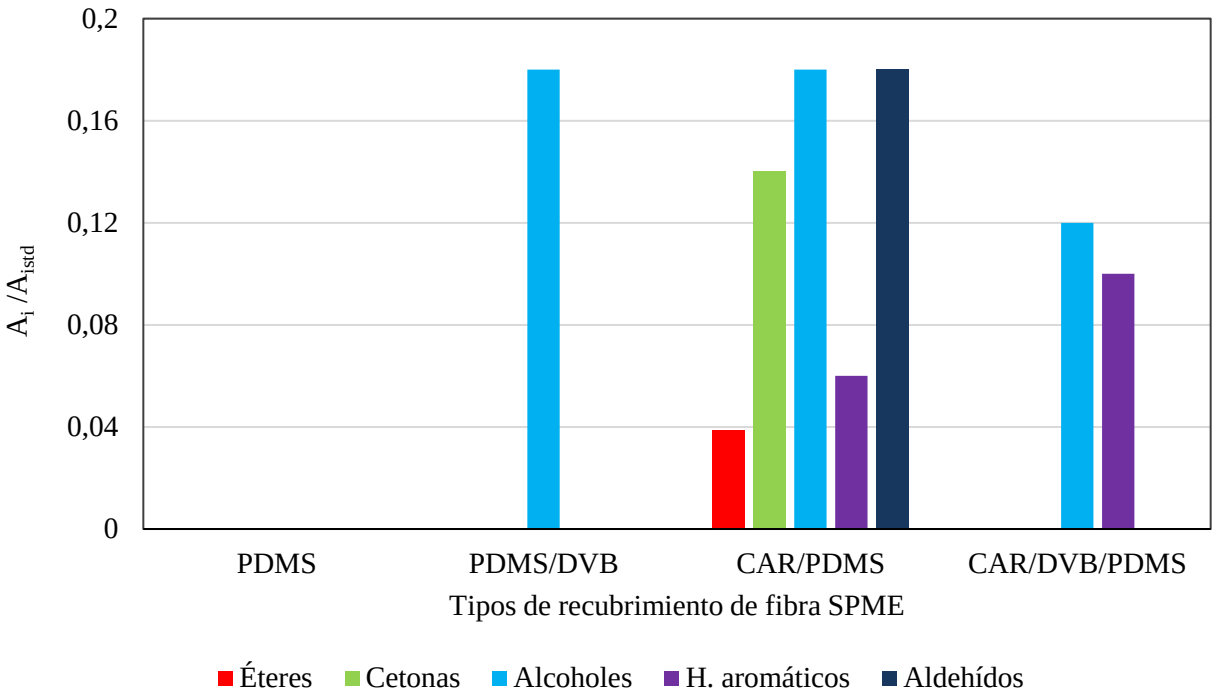
[a] Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90 %);

[b] Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales (IRL) en la columna DB-WAX;

[c] Base de datos NIST (2017)

Figura 12.

Relación de áreas GC (A_i/A_{istd}) de compuestos identificados en la fracción volátil de pollo fresco.



Al compararse el recubrimiento más usado, PDMS/DVB, con el de CAR/PDMS, empleados a las mismas condiciones (23 °C) se observó que el segundo recubrimiento extrajo una cantidad más alta de compuestos (Véase **Figura 12**); empero, la fibra con recubrimiento triple (DVB/CAR/PDMS) obtuvo resultado mejor que con la fibra de PDMS/DVB, debido a una presencia alta de compuestos muy volátiles, fácilmente extraíbles con el recubrimiento CAR, que cuenta con un tamaño de poro menor y una proporción de poros mayor en el recubrimiento de la fibra. Esto permitió que compuestos como butan-2-ona, tolueno, hexanal, entre otros, presentes en la fracción volátil de la muestra se extrajeron más eficientemente con el recubrimiento CAR/PDMS.

Algunos estudios (Hoffman *et al.*, 2009; Irish *et al.*, 2019; Kalinová *et al.*, 2009) sobre compuestos volátiles de descomposición han implementado la técnica SPME con recubrimientos

distintos al PDMS/DVB, por ejemplo, Kalinová y col. (2009) usaron el recubrimiento de CAR/PDMS para extraer y específicamente identificar compuestos azufrados, entre ellos, metanotiol, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo de naturaleza polar, moléculas pequeñas de baja masa molar (48-126 g/mol). El muestreo se hizo durante los primeros cinco días descomposición. En otro estudio, realizado por Irish y col. (2019), se extrajeron e identificaron compuestos como ácidos carboxílicos, alcoholes, compuestos azufrados y nitrogenados, la mayoría también de naturaleza polar y de baja masa molar (46 -150 g/mol), para un período de 123 días. En ningún estudio se mencionó si se realizó alguna prueba comparativa para la selección de recubrimiento de la fibra.

A partir de los resultados mostrados en la **Figura 12**, se escogió el recubrimiento de CAR/PDMS para extraer la variedad y la cantidad de volátiles más alta.

5.3 Selección del tiempo de exposición

La caracterización química de los volátiles extraídos con la fibra CAR/PDMS se hizo usando GC/MS. Se evaluaron los tiempos de extracción de 30 min, 1 h y 2 h, empleando la técnica SPME, durante la descomposición de tejido animal. Los resultados se presentan en la **Tabla 6.** Los perfiles cromatográficos, obtenidos por GC/MS en una columna polar (DB-WAX), se muestran en la **Figura 13**. Se realizó una comparación de los espectros de masas y los índices de retención lineales experimentales calculados para una columna con fase estacionaria polar, con los reportados en la literatura y bases de datos (NIST).

En el día cero de descomposición se identificaron siete compuestos, para los tres tiempos de extracción, entre estos, se detectaron hexano, butan-2-ona y acetona, reportados en la **Tabla 6.** Estos compuestos aparecen en varios estudios de análisis de volátiles, emitidos durante la de descomposición en muestras de cerdos (Dekeirsschieter *et al.*, 2009) y humanos (Brasseur *et al.*, 2012; Perrault *et al.*, 2014; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007, 2011; Vass, 2012). En este trabajo, se observó que la relación de áreas GC A_i/A_{istd} (0.59) para los picos obtenidos para 30 min de exposición de la fibra era menor en comparación con las obtenidas a 1 h (0.93) y 2 h (0.93). En general, las cantidades de volátiles aislados fueron bastante bajas, lo cual ese explica porque solo ha transcurrido un día del proceso de descomposición. Los grupos de compuestos destacados correspondían a cetonas y alcoholes de cadena alifática corta, de alta volatilidad.

Después de cinco días de descomposición, se repitió el procedimiento de extracción de los volátiles para los mismos tres tiempos evaluados; se identificaron alrededor de 20 compuestos entre ellos, figuraban disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo. En los MS de estos compuestos, se observó el patrón isotópico típico para el azufre. Para el disulfuro de dimetilo, se detectó una señal en 94 *m/z* (100 %) para el ion molecular [$M^{+\bullet}$] del isótopo ^{32}S, junto con

señales en 95 *m/z* (4 %) para el ion isotópico $[M+1]^{+\bullet}$ y 96 *m/z* (9 %) para $[M+2]^{+\bullet}$ (Véase F**iguras 14A**).

Figura 13.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS, de muslo de pollo, para tres tiempos de exposición. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de los picos cromatográficos se presenta en la ***Tabla 6.***

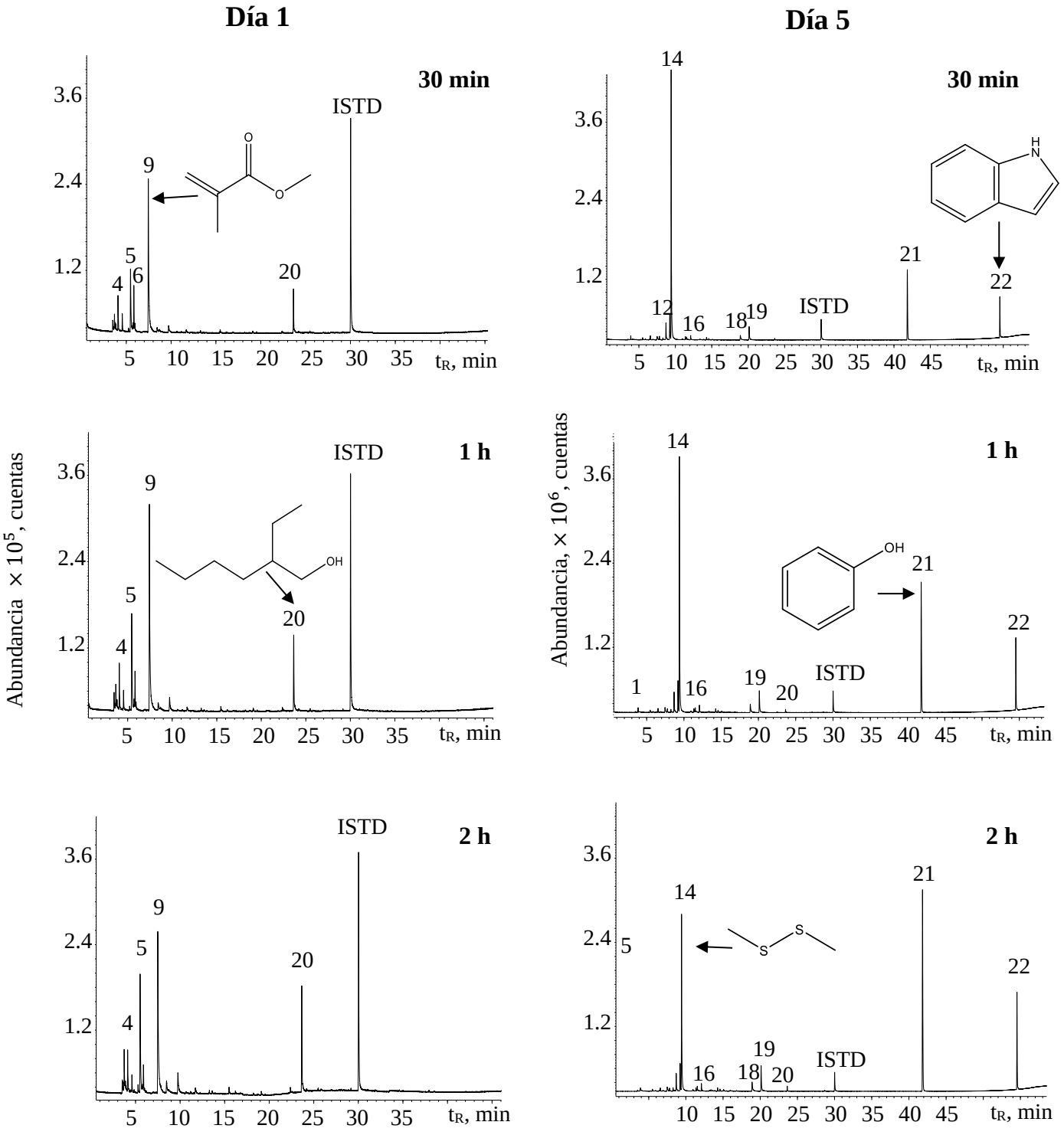


Tabla 6.

Composición química, por HS-SPME-GC/MS, de la fracción volátil aislada de muslos de pollo, para tres tiempos de exposición en los días cero y quinto del desceso.

N° pico Fig. 13	Compuesto	Índices de retención lineales		A_i/A_{istd}					
		DB-WAX		Día 0			Día 5		
		Exp	Lit	30 min	1 h	2 h	30 min	1 h	2 h
1	Hexano[a,b]	614	600[c]	0.03	0.06	0.11			
2	Metanotiol[a,b]	668	679[c]	-	-	-	0.16	0.17	0.13
3	Disulfuro de carbono[a,b]	709	701[c]	0.11	0.15	0.12	-	-	-
4	Acetona[a,b]	805	808[c]	0.07	0.08	0.07	-	-	-
5	Butan-2-ona[a,b]	869	875[c]	0.22	0.29	0.37	0.09	0.09	0.09
6	Diclorometano*[a,b]	895	-	0.11	0.09	0.07	-	-	-
7	Propanoato de etilo[a,b]	933	951[c]	-	-	-	-	0.05	0.04
8	2-Metilpropanoato de etilo[a,b]	944	954[c]	-	-	-	0.18	0.18	0.19
9	Metacrilato de metilo*[a,b]	1005	1008[c]	0.87	1.17	0.98	0.25	0.34	0.30
10	3-Metilbutanoato de metilo[a,b]	1016	1019[c]	-	-	-	0.21	0.22	0.19
11	Butanoato de etilo[a,b]	1032	1036[c]	-	-	-	0.10	0.15	0.18
12	2-Metilbutanoato de etilo[a,b]	1047	1057[c]	-	-	-	0.75	0.87	0.88
13	3-Metilbutanoato de etilo[a,b]	1065	1072[c]	-	-	-	1.51	1.73	1.70
14	Disulfuro de dimetilo[a,b]	1071	1074[c]	-	-	-	9.95	9.34	7.47
15	Tiobutanoato de metilo[a,b]	1132	1198[c]	-	-	-	0.26	0.28	0.26
16	2-Metilbutanoato de propilo[a,b]	1137	1136[c]	-	-	-	0.10	0.16	0.19
17	3-Metilbutanoato de propilo[a,b]	1154	1148[c]	-	-	-	0.31	0.51	0.52
18	3-Metilbutanoato de S-metilo[a,b]	1223	1225[c]	-	-	-	0.14	0.21	0.19
19	Trisulfuro de dimetilo[a,b]	1381	1381[c]	-	-	-	0.60	1.07	0.94
20	2-Etilhexanol[a,b]	1487	1484[c]	0.15	0.26	0.35	0.06	0.12	0.18
21	Fenol[a,b]	2004	2006[c]	-	-	-	2.60	4.85	8.13

Tabla 6. Continuación

22	Indol[a,b]	2444	2441[c]				1.15	3.07	2.09
Hidrocarburos alifáticos				0.03	0.06	0.11	-	-	-
Compuestos azufrados				0.11	0.15	0.12	10.97	11.77	9.21
Cetonas				0.29	0.37	0.44	0.09	0.09	0.09
Ésteres				-	-	-	3.30	4.07	4.08
Alcoholes				0.15	0.26	0.35	2.66	4.97	8.31
Compuestos nitrogenados				-	-	-	1.15	3.07	2.09

[a] Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90 %).

[b] Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en la columna DB-WAX.

[c] Base de datos NIST (2017).

*Compuestos presentes en el dispositivo del sistema de extracción (Véase en **Apéndice B**).

Para el trisulfuro de dimetilo, se observó una señal en 126 *m/z* (100 %) del ion molecular [$M^{+\bullet}$], al igual que las señales de los iones isotópicos [M+1] $^{+\bullet}$ y [M+2] $^{+\bullet}$ en 127 *m/z* (5 %) y 128 *m/z* (13 %), respectivamente (Véase F**igura 15A**).

Tanto para el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo sus patrones isotópicos fueron similares a los calculados a partir de *enviPat web* y *ChemCalc*.

Figura 14.

Espectro de masas del disulfuro de dimetilo $C_2H_6S_2$, por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de su descomposición: ***A.*** *Relación isotópica del ion [$M^{+\cdot}$] 94 m/z;* ***B.*** *Fragmentos típicos en el espectro de masas; [M-CH_3]$^+$ 79 m/z; [M-C_2H_6]$^+$ 64 m/z; [M-SCH_3]$^+$ 47 m/z; HCS^+ 45 m/z. Véase pico cromatográfico N°14 en la* ***Tabla 6****.*

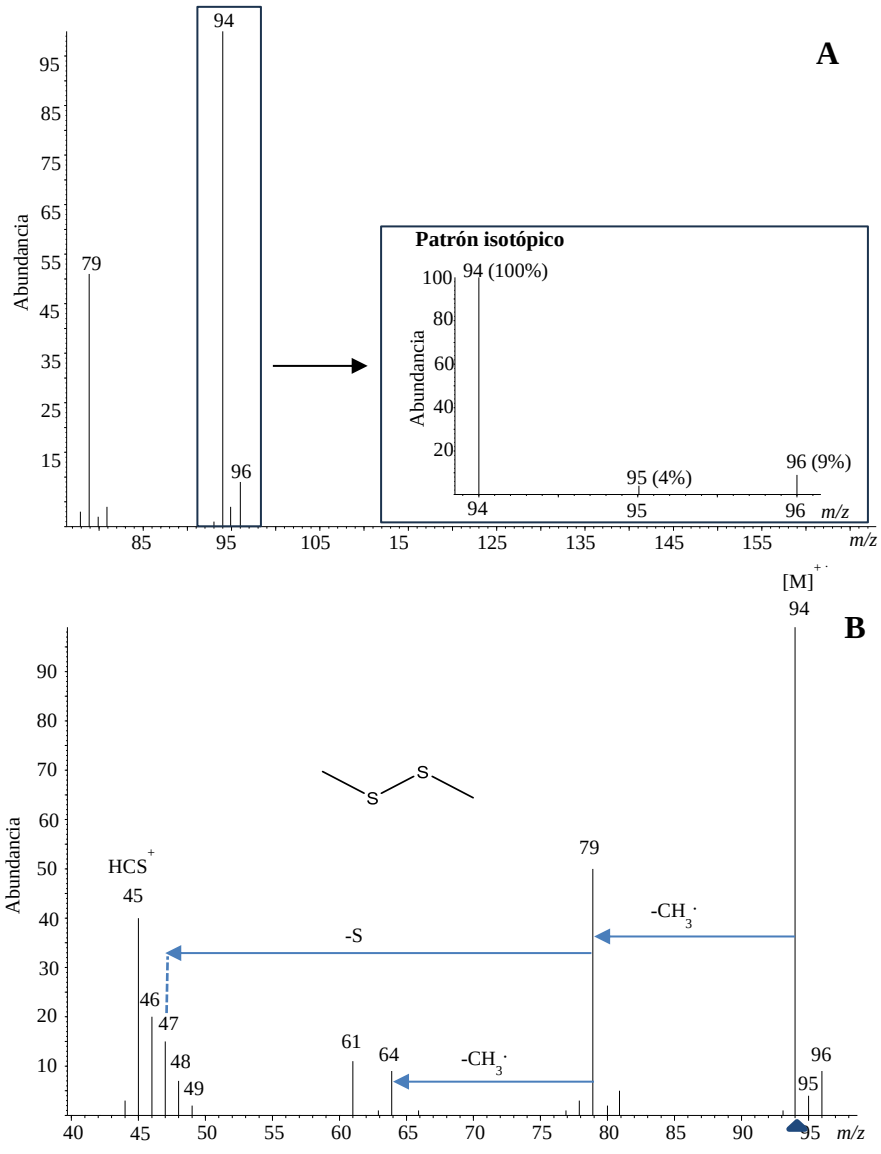
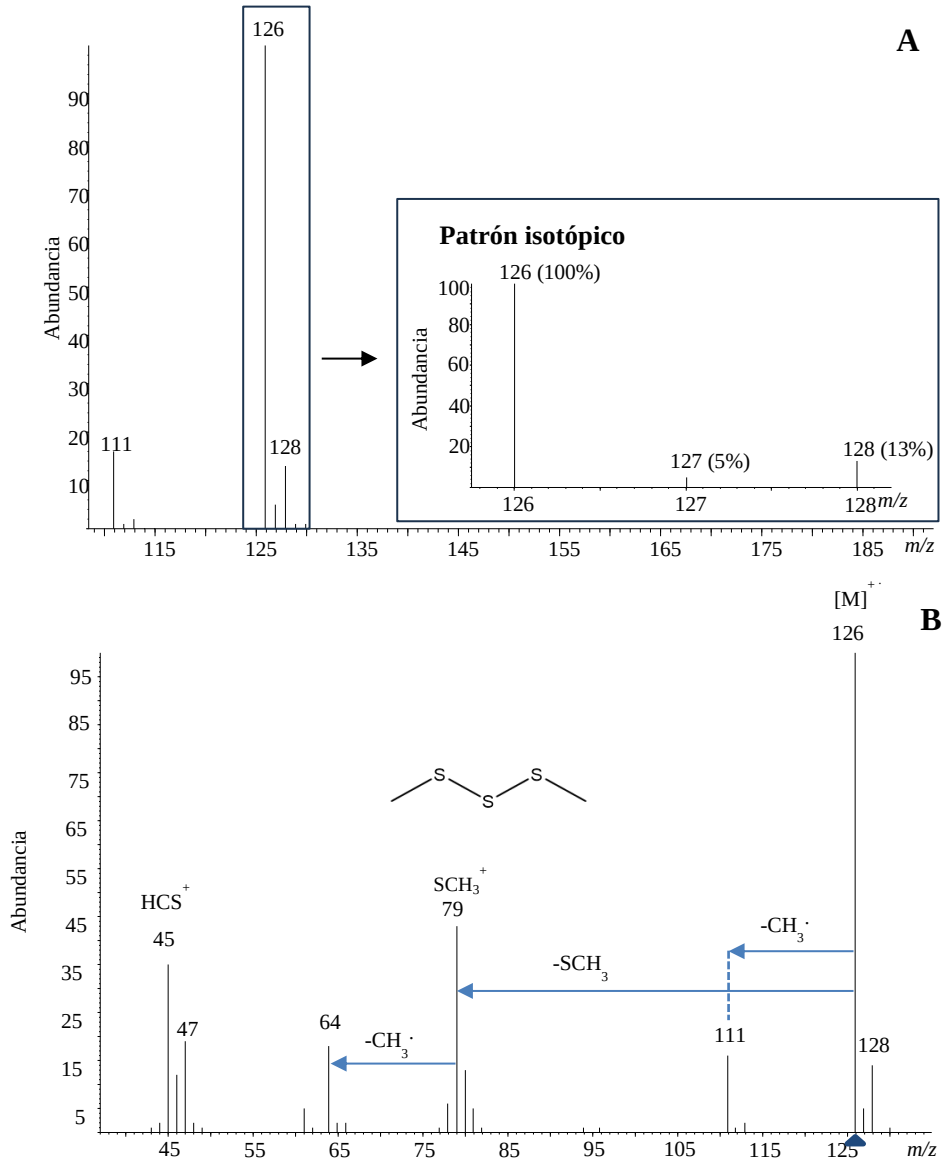


Figura 15.

Espectro de masas del trisulfuro de dimetilo $C_2H_6S_3$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de su descomposición: ***A.*** *Relación isotópica del ion $[M^{+\cdot}]$ 126 m/z;* ***B.*** *Fragmentos típicos en el espectro de masas; $[M\text{-}CH_3]^+$ 111 m/z; $[M\text{-}SCH_3]^+$ 79 m/z; $[M\text{- }CH_3\text{-}SCH_3]^+$ 64 m/z; SCH_3^+ 47 m/z, HCS^+ 45 m/z. Véase pico cromatográfico N°19 en la* ***Tabla 6****.*



Estos dos compuestos difieren en la cantidad de átomos de azufre, por tanto, en la distribución isotópica aquel compuesto que tiene más átomos de azufre presenta más combinaciones posibles de sus isótopos aumentando la relación isotópica, como se observó en

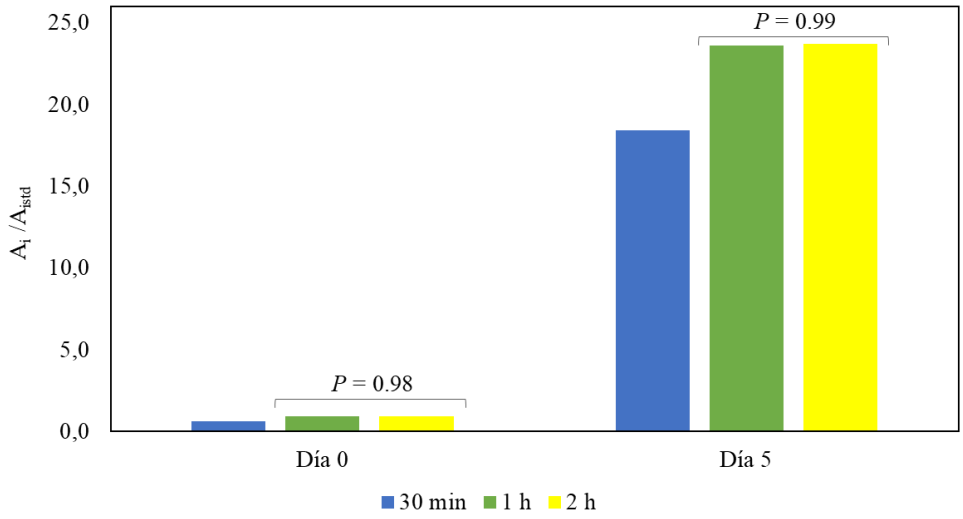
la abundancia de las señales, siendo mayor para el trisulfuro. Para ambos compuestos se observaron pérdidas características de grupos $CH_3^{\cdot}$, $CH_3S^{\cdot}$, S (Véase **Figuras 14B** y **15B**).

También, se identificó fenol, con el ion molecular 94 *m/z* [$M^{+\cdot}$] y la pérdida característica del grupo carbonilo (CO), luego de un reordenamiento del anillo aromático (Fahmey *et al.*, 2001) (Véase **Apéndice D**). El indol se identificó con base en su ion molecular 117 *m/z* [$M^{+\cdot}$] con masa impar, que significa la presencia de un número impar de átomos de nitrógeno en la molécula; con base en el ion $C_7H_5^+$ 89 *m/z*, característico de un fragmento de un anillo bencénico sustituido y también, en el ion $C_5H_3^+$ 63 *m/z*, fragmento de un anillo pirrol estabilizado por resonancia (Véase **Apéndice E**). Estos compuestos se han reportado anteriormente durante el análisis de descomposición de cadáveres (Brasseur *et al.*, 2012; Dekeirsschieter *et al.*, 2009, 2012; Forbes & Perrault, 2014; Kalinová *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012; Perrault *et al.*, 2014; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2007, 2011). En la **Figura 13** se puede observar que, a 30 min de exposición de la fibra, el compuesto mayoritario fue el disulfuro de dimetilo y, en menor proporción, se detectaron fenol e indol. Para 1 h de exposición de la fibra se observó que, aunque el disulfuro de dimetilo seguía siendo el compuesto mayoritario, las señales de los compuestos fenol e indol aumentaron sus áreas cromatográficas GC y, para 2 h de exposición de la fibra, se observó que el compuesto mayoritario fue el fenol seguido del disulfuro de dimetilo y el indol, este último con área mayor en comparación con las áreas obtenidos para los otros tiempos de exposición de la fibra. Estos cambios en las áreas cromatográficas GC se dan debido al mecanismo de adsorción de los compuestos volátiles en el polímero poroso de Carboxeno, en el cual para un tiempo menor de exposición de la fibra se extraen compuestos de tamaño más bajo y de volatilidad más alta, quedando situados en estos poros, pero al extenderse el tiempo de exposición se extraen compuestos de mayor tamaño que desplazan compuestos más pequeños albergados en los poros del polímero (Pawliszyn, 2000).

En cuanto a la relación de áreas cromatográficas (A_i/A_{istd}**),** similar a como se observó en el día cero de descomposición, para 1 h (23.96) y 2 h (23.78) se obtuvieron resultados muy similares, siendo mayores a las relaciones A_i/A_{istd} obtenidas a 30 min (18.17) de exposición de la fibra. Se realizó una prueba t de Student para ambos días de descomposición (Véase **Figura 16)** con el fin de determinar una diferencia estadísticamente significativa entre las medias para 1 h y 2 h, obteniéndose un valor-P mayor de 0.05 para ambos casos estudiados por lo que no había una diferencia significativa para los dos tiempos de exposición, por lo cual se decidió emplear el tiempo más corto entre los dos, teniendo en cuenta que estadísticamente los resultados no presentaron una diferencia significativa que comprometiera el método empleado y sus resultados.

Figura 16.

Relación de áreas GC (A_i/A_{istd}) de los compuestos identificados en la fracción volátil de muslos de pollo para tres tiempos de extracción, después de cinco días de descomposición.



Nota. Para diferencias significativas se utilizó la prueba t de Student (α = 0,05).

Según la literatura (Hoffman *et al.*, 2009; Kalinová *et al.*, 2009), se tienen pocos estudios que comparan los tiempos de exposición de la fibra o extracción para la técnica SPME, pero se destaca el estudio de Hoffman y col. (2009) quienes, usando una fibra de PDMS/DVB (65 µm), compararon los tiempos de 20 min y 40 min en la extracción de volátiles de muestras

de tejido de restos humanos utilizadas para el entrenamiento canino; la relación señal/ruido más alta se logró a los 40 min de exposición de la fibra, aunque se identificaron menos compuestos de interés (azufrados, alcoholes, aromáticos, ácidos) que a los 20 min, razón por la cual los autores decidieron emplear el tiempo de exposición menor. En el experimento realizado en esta investigación ocurrió lo contrario: a menor tiempo, se obtuvieron menos compuestos de interés identificados y en menor cantidad.

Kalinová y col. (2009) emplearon la fibra de CAR/PDMS (85 μm) con un tiempo de exposición de 15 min para la extracción de volátiles en cadáveres de ratones con el fin de identificar los compuestos que se emiten desde el inicio de la descomposición y los que atraen a insectos necrófagos. Se identificaron compuestos azufrados, entre ellos, metil sulfuro, disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo para los cuales se determinó una relación de atracción con los insectos necrófagos, en un período de seis días. Estos compuestos de bajo peso molecular, tamaño pequeño y con alta polaridad se atrapan fácilmente sobre el recubrimiento de esta fibra. Además, para este tiempo (15 min) se observó que la cantidad mayor de compuestos identificados fueron azufrados lo cual se puede explicar porque estos compuestos ocuparon la mayoría de los sitios disponibles en los poros del polímero de Carboxeno, impidiendo que se absorban otros compuestos volátiles de descomposición como alcoholes, cetonas y ácidos carboxílicos. Comparado con el presente experimento, a pesar de ser una muestra de especie distinta como lo fue el pollo, luego de cinco días de descomposición para 30 min de exposición el compuesto mayoritario fue también un compuesto azufrado siendo casi tres veces mayor su área GC que las áreas de los demás compuestos presentes en la fracción volátil de la muestra.

5.4 Caracterización química de los volátiles emitidos por ratones en descomposición

La extracción de los compuestos volátiles generados, durante la descomposición de los dos grupos de ratones (enterrados y sin enterrar), se llevó a cabo mediante la técnica HS-SPME por seis meses (201 días). El análisis de sustancias aisladas se realizó por GC/MS, utilizando una columna polar (DB-WAX, 60 m). En la **Figura 17** se presentan los perfiles cromatográficos correspondientes a las fracciones volátiles producidas por de los ratones enterrados, correspondientes a los días 3, 15, 43, 59, 123 y 201 de descomposición. La **Figura 18** muestra los perfiles cromatográficos de las fracciones volátiles emitidos por los ratones que no fueron enterrados, analizados durante los mismos días. Los perfiles se diferencian entre sí, debido a que los procesos de descomposición ocurrieron de manera distinta, en los ambientes diferentes. En la **Tabla 7** aparecen la identificación de los picos cromatográficos GC y la relación de áreas GC (A_i/A_{istd}) correspondiente a los primeros meses de descomposición (días 3, 15 y 43) para ambos grupos de ratones. En la **Tabla 8** se registran la identificación de los picos GC y las relaciones de áreas cromatográficas GC (A_i/A_{istd}) para el período comprendido entre dos y seis meses de descomposición (días 59, 123 y 201).

Ambos grupos de muestras tuvieron en común la presencia de compuestos azufrados, *e.g.*, disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo, emitidos durante los primeros días de descomposición (de 3 a 15), como se observa en los perfiles cromatográficos de las **Figuras 17** y **18**. Estos compuestos son característicos en la descomposición de cuerpos, según diversos estudios realizados en humanos, cerdos o ratones (Cablk *et al.*, 2012; DeGreeff & Furton, 2011; Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Forbes & Perrault, 2014; Hoffman *et al.*, 2009; Kalinová *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012; Perrault *et al.*, 2014, 2015; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2011; Vass *et al.*, 2008). Dichos estudios incluyen análisis de cuerpos humanos encontrados o donados,

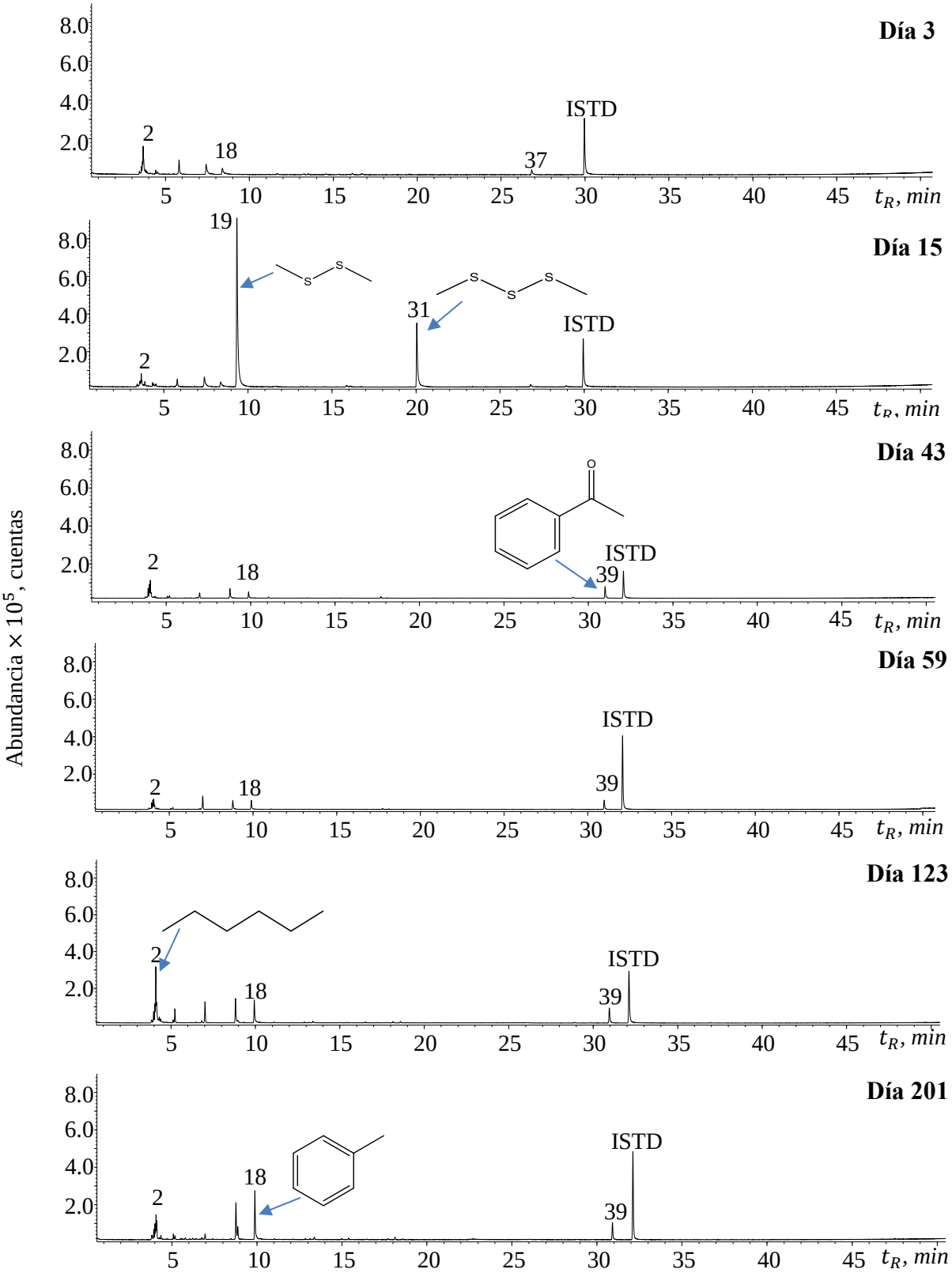
con diferentes tiempos de descomposición, así como de animales empleados específicamente para estos experimentos.

Se realizó un seguimiento detallado de los volátiles extraídos a lo largo del tiempo de descomposición. No hay muchos estudios que han empleado la técnica SPME (DeGreeff & Furton, 2011; Hoffman *et al.*, 2009; Irish *et al.*, 2019; Kalinová *et al.*, 2009; Perrault *et al.*, 2014). En su lugar, se utilizan con mayor frecuencia tubos de desorción térmica o trampas con distintos polímeros, que permiten mejorar la trazabilidad y el rango de analitos absorbidos, aunque presentan limitaciones en el tiempo de extracción, costos y simplicidad operativa. A pesar de estas alternativas, la técnica SPME sigue siendo ventajosa debido a su selectividad, facilidad de acoplamiento directo con el cromatógrafo de gases gracias a las numerosas mejoras que ha experimentado desde su creación en 1989; además, la técnica SPME resulta especialmente útil en casos que requieren ensayos rápidos y eficientes (Pawliszyn, 2011).

Los compuestos azufrados detectados en este estudio también se han reportado en trabajos sobre cuerpos en combinación, analizando muestras de suelo (Brasseur *et al.*, 2012; Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Perrault *et al.*, 2014; Vass *et al.*, 2008). En estos trabajos, los volátiles se extraían de muestras tomadas del suelo sobre en el cual ocurría la descomposición del individuo. Usando la técnica de SPME, por ejemplo, Perrault y col. (2014), registraron una variedad amplia de compuestos, incluyendo sustancias azufradas, aromáticas, aldehídos, cetonas, alcoholes e incluso ácidos carboxílicos, que no habían sido reportados en estudios realizados previamente.

Figura 17.

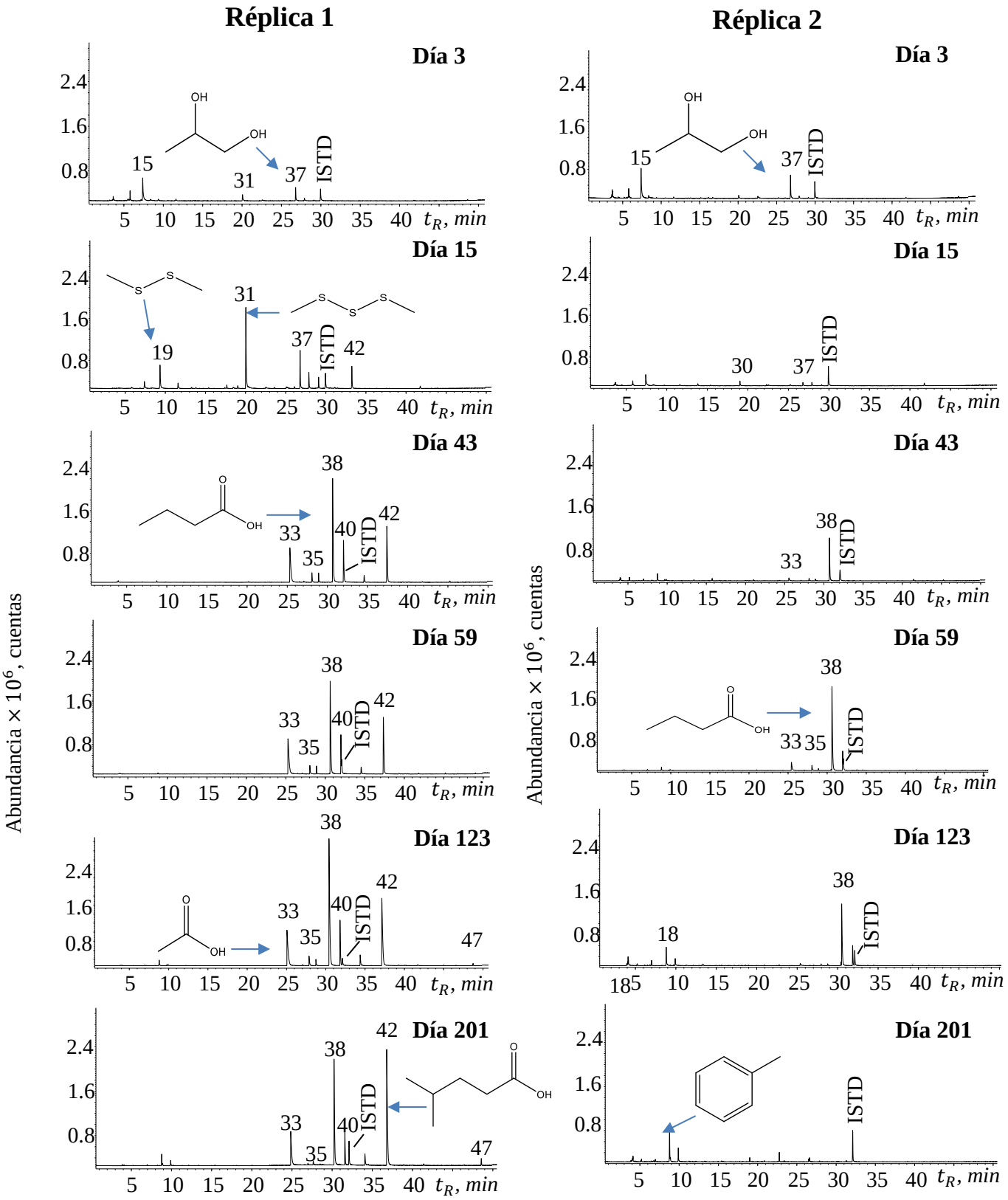
Perfiles cromatográficos, obtenidos por GC/MS, de las fracciones volátiles de ratones en descomposición, enterrados. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).



Nota. La identificación de cada pico cromatográfico se presenta en las **Tablas 7 y 8**

Figura 18.

Perfiles cromatográficos obtenidos por GC/MS, de las fracciones volátiles de ratones en descomposición, sin enterrar. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV).



Nota. La identificación de cada pico cromatográfico se presenta en las **Tablas 7 y 8.**

Tabla 7.

Caracterización química de la fracción volátil de ratones en descomposición, de 0 a 43 días.

N° pico, Figs. 17 y 18	Compuesto	Índices de retención lineales		GC A_i/A_{istd}											
		DB-WAX		Día 3				Día 15				Día 43			
		Exp	Lit	R1*	R2*	R1	R2	R1*	R2*	R1	R2	R1*	R2*	R1	R2
1	Trimetilamina[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.19	0.22
2	Hexano[a, b]	610	600[c]	0.33	0.34	0.26	0.34	0.19	0.05	-	0.12	0.46	0.31	-	0.18
3	Éter etílico[a, b]	618	596[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	Heptano[a, b]	691	700[c]	-	-	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	-
5	Octano[a, b]	776	800[c]	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	-	-
6	Ciclohexeno[a, b]	805	808[c]	0.05	0.02	-	-	0.03	-	-	-	0.04	-	-	-
7	Acetona[a, b]	812	813[c]	-	-	-	-	0.03	-	-	-	0.06	0.04	-	0.24
8	Acetato de etilo[a, b]	866	891[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Butan-2-ona[a, b]	881	894[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Propanoato de metilo[a, b]	881	899[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Diclorometano*[a,b]	916	919[c]	0.24	0.47	0.35	0.39	0.14	0.21	0.04	0.18	0.15	0.43	-	0.16
12	3-Metilbutan-2-ona[a, b]	911	929[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Etanol[a, b]	914	925[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Pentan-2-ona[a, b]	971	975[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.07
15	Metacrilato de metilo*[a,b]	1008	1008[c]	0.25	0.10	2.32	2.31	0.26	0.22	0.61	0.88	0.28	0.26	0.14	0.62
16	Butanoato de etilo[a, b]	1034	1022[c]	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-
17	Propanol[a, b]	1034	1038[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.11
18	Tolueno[a, b]	1038	1039[c]	0.13	0.09	0.10	0.18	0.11	0.09	0.04	0.08	0.18	0.12	-	0.13
19	Disulfuro de dimetilo[a, b]	1073	1065[c]	-	-	-	-	4.83	5.71	1.54	-	0.03	0.03	-	-

Tabla 7. Continuación

20	Hexanal[a, b]	1082	1085[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Butanol[a, b]	1132	1135[c]	-	-	0.08	-	-	-	0.38	0.09	-	-	-	0.10
22	4-Metilpentanoato de etilo[a, b]	1178	-	-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	-
23	3-Metilbutanol[a, b]	1204	1209[c]	-	-	-	-	-	-	0.09	0.14	-	-	-	0.21
24	Pentanol[a, b]	1248	1252[c]	-	-	-	-	-	-	0.05	0.04	-	-	-	-
25	Estireno[a, b]	1260	1255[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	0.05	0.09	-	-
26	1,3,5-Trimetilbenceno[a, b]	1283	1283[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	Tridecano[a, b]	1299	1300[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	4-Metilpentanol[a, b]	1312	1311[c]	-	-	-	-	-	-	0.19	-	-	-	-	-
29	2,6-Dimetilpirazina[a, b]	1334	1327[c]	-	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	0.08	-
30	Hexanol[a, b]	1351	1360[c]	-	-	-	-	-	-	0.15	0.26	-	-	-	0.09
31	Trisulfuro de dimetilo[a, b]	1381	1381[c]	-	-	0.28	0.21	1.67	4.73	5.41	-	-	-	-	-
32	Oct-3-enol[a, b]	1448	1451[c]	-	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-	-	-
33	Ácido acético[a, b]	1456	1461[c]	-	-	0.10	0.12	-	-	0.11	0.06	-	-	8.06	0.37
34	Benzaldehído[a, b]	1543	1555[c]	-	-	-	-			0.13	-	-	-	0.17	
35	Ácido propanoico[a, b]	1577	1564[c]	-	-	-	-	-	-	0.12	0.10	-	-	1.07	0.23
36	Ácido 2-metilpropanoico[a, b]	1603	1587[c]	-	-	-	-	-	-	0.11	-	-	-	0.83	0.14
37	Propano-1,2-diol[a, b]	1609	1600[c]	0.09	0.04	0.97	1.21	-	-	1.96	0.20	0.04	0.02	-	-
38	Ácido butanoico[a, b]	1659	1661[c]	-	-	0.10	0.13	-	-	0.88	0.18	-	-	14.63	4.75
39	Feniletanona[a, b]	1670	1669[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	0.41	0.08	-	-
40	Ácido 2-metilbutanoico[a, b]	1702	1687 [c]	-	-	-	-	-	-	0.64	0.06	-	-	5.10	1.72
41	Ácido pentanoico[a, b]	1770	1762[c]	-	-	-	-	-	-	0.06	-	-	-	0.85	-
42	Ácido 4-metilpentanoico[a, b]	1837	1800[c]	-	-	-	-	-	-	1.39	-	-	-	8.14	-
43	Ácido hexanoico[a, b]	1880	1861[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Alcohol feniletílico[a, b]	1932	1920[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.16

Tabla 7. Continuación

45	Ácido 5-metilhexanoico[a]	1940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Fenol[a, b]	2035	2015[c]	-	-	-	0.06	-	-	0.16	0.16	-	-	0.14	0.10
47	Piperidin-2-ona[a]	2145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Compuestos nitrogenados				-	-	-	-	-	-	0.14	-	-	-	0.27	0.22
Hidrocarburos alifáticos				0.38	0.36	0.26	0.34	0.33	0.05	-	0.12	0.50	0.31	-	0.18
Éteres				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
Cetonas				-	-	-	-	0.03	-	-	-	0.50	0.12	-	0.30
Ésteres				-	-	-	-	-	-	0.08	-	-	-	-	0.11
Alcoholes				0.09	0.05	1.05	1.26	-	-	2.97	0.99	0.04	0.02	0.14	0.34
Hidrocarburos alifáticos				0.13	0.09	0.10	0.18	0.11	0.09	0.04	0.08	0.23	0.21	-	0.13
Compuestos azufrados				-	-	0.28	0.21	6.50	10.45	6.95	-	0.03	0.03	-	-
Aldehídos				-	-	-	-	-	-	0.13	-	-	-	0.17	-
Ácidos carboxílicos				-	-	0.20	0.25	-	0.25	3.31	0.40	-	-	38.68	7.21

R1*, ratón enterrado réplica 1. R2*, ratón enterrado réplica 2. R1, ratón sin enterrar réplica 1. R2, ratón sin enterrar réplica 2.

[a] Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90 %).

[b] Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en la columna DB-WAX.

[c] Base de datos NIST (2017).

*Compuestos presentes en el dispositivo del sistema de extracción (Véase **Anexo B** y **C**).

Tabla 8.

Caracterización química de la fracción volátil de ratones en descomposición, de 59 a 201 días.

N° pico Figs. 17 y 18	Compuesto	Índices de retención lineales		GC A_i/A_{istd}											
		DB-WAX		Día 59				Día 123				Día 201			
		Exp	Lit	R1*	R2*	R1	R2	R1*	R2*	R1	R2	R1*	R2*	R1	R2
1	Trimetilamina[a]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Hexano[a, b]	610	600[c]	0.05	0.10	-	-	1.14	1.08	-	0.96	0.19	0.14	-	0.08
3	Éter etílico[a, b]	618	596[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09
4	Heptano[a, b]	691	700[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Octano[a, b]	776	800[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Ciclohexeno[a, b]	805	808[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Acetona[a, b]	812	813[c]	-	-	-	-	0.17	0.12	-	-	-	-	-	0.07
8	Acetato de etilo[a, b]	866	891[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Butan-2-ona[a, b]	881	894[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Propanoato de metilo[a, b]	881	899[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Diclorometano*[a,b]	916	919[c]	0.15	0.29	-	-	0.29	0.52	-	0.41	-	0.13	-	0.07
12	3-Metilbutan-2-ona[a, b]	911	929[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Etanol[a, b]	914	925[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	Pentan-2-ona[a, b]	971	975[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	Metacrilato de metilo*[a,b]	1008	1008[c]	0.10	0.18	0.05	0.19	0.42	0.28	0.49	1.26	0.37	0.26	0.33	0.98
16	Butanoato de etilo[a, b]	1034	1022[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Propanol[a, b]	1034	1038[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Tolueno[a, b]	1038	1039[c]	0.11	0.16	-	-	0.39	0.34	0.13	0.60	0.53	0.41	0.17	0.42
19	Disulfuro de dimetilo[a, b]	1073	1065[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 8. Continuación

20	Hexanal[a, b]	1082	1085[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
21	Butanol[a, b]	1132	1135[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
22	4-Metilpentanoato de etilo[a, b]	1178	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
23	3-Metilbutanol[a, b]	1204	1209[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
24	Pentanol[a, b]	1248	1252[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
25	Estireno[a, b]	1260	1255[c]	-	0.09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
26	1,3,5-Trimetilbenceno[a, b]	1283	1283[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
27	Tridecano[a, b]	1299	1300[c]	-	-	-	-					-	-	-	0.11	
28	4-Metilpentanol[a, b]	1312	1311[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
29	2,6-Dimetilpirazina[a, b]	1334	1327[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
30	Hexanol[a, b]	1351	1360[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
31	Trisulfuro de dimetilo[a, b]	1381	1381[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32	Oct-3-enol[a, b]	1448	1451[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
33	Ácido acético[a, b]	1456	1461[c]	-	-	5.08	0.88	-	-	7.58	0.27	-	-	2.45	-	
34	Benzaldehído[a, b]	1543	1555[c]	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	
35	Ácido propanoico[a, b]	1577	1564[c]	-	-	0.56	0.34	-	-	1.02	0.18	-	-	0.18	-	
36	Ácido 2-metilpropanoico[a, b]	1603	1587[c]	-	-	0.40	0.11	-	-	0.46	0.13	-	-	-	-	
37	Propano-1,2-diol[a, b]	1609	1600[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
38	Ácido butanoico[a, b]	1659	1661[c]	-	-	7.69	7.47	-	-	17.57	5.24	-	-	4.84	-	
39	Feniletanona[a, b]	1670	1669[c]	0.12	0.06	-	-	0.28	0.20			0.21	0.15	-	-	
40	Ácido 2-metilbutanoico[a, b]	1702	1687 [c]	-	-	3.26	2.03	-	-	4.18	2.37	-	-	1.24	-	
41	Ácido pentanoico[a, b]	1770	1762[c]	-	-	0.51	-	-	-	1.20	-	-	-	0.56	-	
42	Ácido 4-metilpentanoico[a, b]	1837	1800[c]	-	-	5.02	-	-	-	11.24	-	-	-	7.41	-	
43	Ácido hexanoico[a, b]	1880	1861[c]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
44	Alcohol feniletílico[a, b]	1932	1920[c]	-	-	-	0.06	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabla 8. Continuación

45	Ácido 5-metilhexanoico[a]	1940	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	Fenol[a, b]	2035	2015[c]	-	-	0.06	0.04	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Piperidin-2-ona[a]	2145	-	-	-	-	-			0.19		-	-	0.28	-
Compuestos nitrogenados				-	-	-	-	-	-	-	-	0.15	0.11	-	-
Hidrocarburos alifáticos				0.05	0.10	-	-	1.14	1.08	-	0.96	0.19	0.14	-	0.19
Éteres				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.09
Cetonas				0.12	0.06	-	-	0.44	0.32	-	-	0.21	0.15	0.28	0.07
Ésteres				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Alcoholes				-	-	0.06	0.11	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrocarburos alifáticos				0.11	0.24	-	-	0.39	0.34	0.13	-	0.53	0.41	0.17	0.64
Compuestos azufrados				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aldehídos				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácidos carboxílicos				-	-	22.52	10.82	-	-	43.24	8.18	-	-	16.68	-

R1*, ratón enterrado réplica 1. R2*, ratón enterrado réplica 2. R1, ratón sin enterrar réplica 1. R2, ratón sin enterrar réplica.

[a] Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90 %).

[b] Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en la columna DB-WAX.

[c] Base de datos NIST (2017).

*Compuestos presentes en el dispositivo del sistema de extracción (Véase **Apéndice B** y **C**).

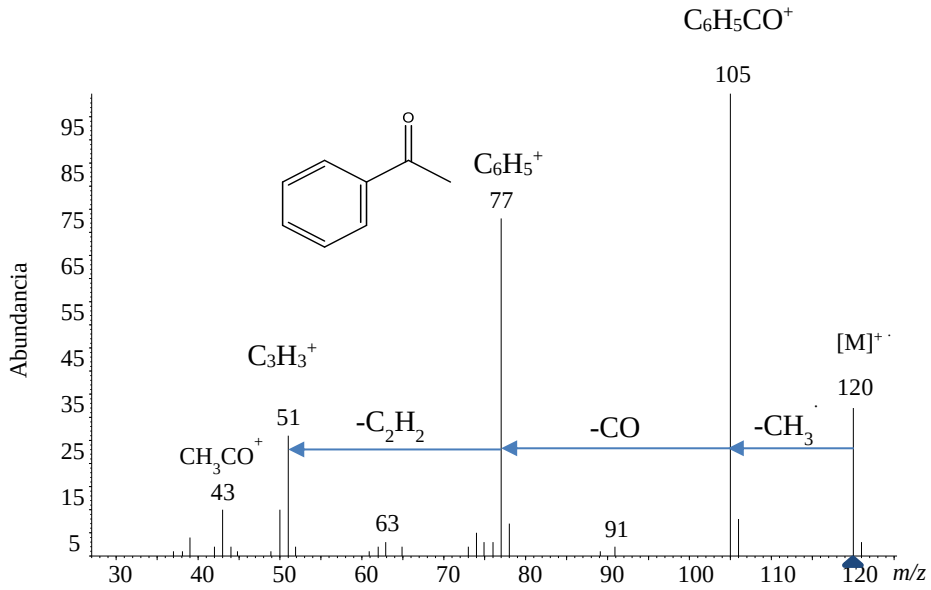
En el presente estudio, la técnica de SPME también se usó para extraer volátiles emitidos durante la descomposición de ratón enterrado en suelo (**Figura 17**), sin embargo, no se detectaron ácidos carboxílicos. En cambio, como se muestra en la **Figura 18,** para el segundo grupo de ratones (sin enterrar), sí se extrajeron ácidos carboxílicos con la fibra de CAR/PDMS (85 µm). Esto sugiere que estos compuestos efectivamente se emiten por el ratón, aunque no fue posible su extracción bajo las condiciones empleadas en la matriz de suelo. El incremento de la temperatura podría usarse para facilitar "la salida" de estos compuestos de la matriz, teniendo en cuenta que Perrault y col. (2014) realizaron la extracción a 40 °C y, en el presente estudio, la temperatura se mantuvo a 23 °C.

También, en este estudio, se detectó la feniletanona, la que se identificó por su ion molecular 120 *m/z* [$M^{+\cdot}$] y las pérdidas de grupos metilo ($CH_3\cdot$) y carbonilo (CO), llevando a la aparición del ion 77 *m/z* ($C_6H_5^+$), característico de un fragmento de anillo bencénico (Véase **Figura 19**); esta sustancia se ha reportado en estudios de descomposición de cuerpos en contacto con el suelo (Brasseur *et al.*, 2012; Forbes & Perrault, 2014; Perrault *et al.*, 2014; Statheropoulos *et al.*, 2011), pero no se conoce de cual(es) compuesto(s) proviene antes del proceso de descomposición de cuerpos.

Para el segundo grupo de ratones, en sus perfiles cromatográficos de compuestos volátiles emitidos, que aparecen en la **Figura 18,** se puede observar la diferencia de los resultados para dos réplicas. El proceso de análisis comenzó de la misma manera para ambas réplicas hasta el quinto día, momento en el que ingresaron involuntariamente moscas en el espacio de cabeza de la **Réplica 1** y depositaron sus huevos sobre el cadáver. De estos huevos surgieron larvas, las cuales se alimentaron de los tejidos del cuerpo, generando una emisión de compuestos volátiles más acelerada en comparación con la **Réplica 2,** en la cual esta contaminación no ocurrió.

Figura 19.

Espectro de masas de la feniletanona C_8H_8O, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de ratón en descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 120 m/z, $[M\text{-}CH_3]^+$ 105 m/z; $[M\text{-}CH_3CO]^+$ 77 m/z, $[M\text{-}C_3H_5CO]^+$ 51 m/z, CH_3CO^+ 43 m/z. Véase pico cromatográfico N°39 en las ***Tablas 7*** *y* ***8.***

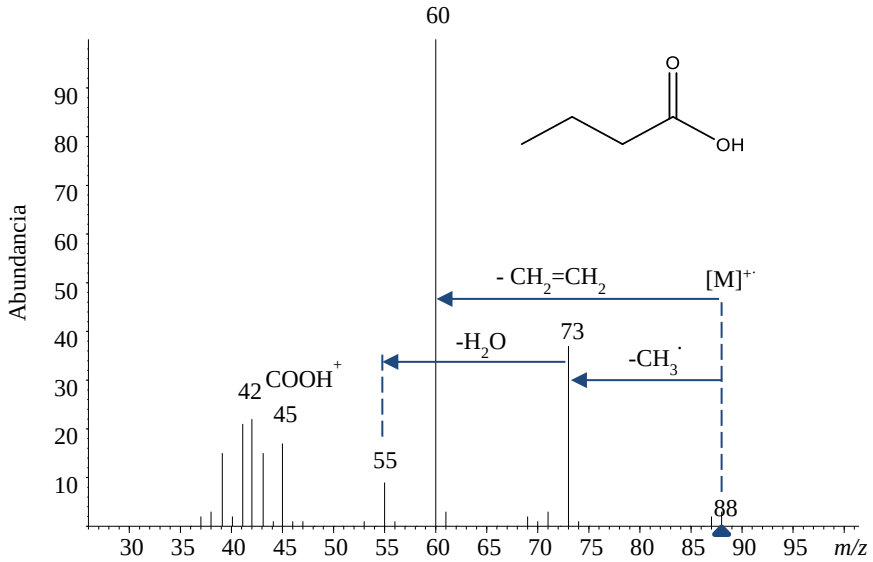


De esta manera, los procesos de descomposición fueron distintos y, por ende, los perfiles cromatográficos (**Figura 18**) y la caracterización química (**Tablas 7** y **8**) fueron diferentes luego de ese suceso. Por ejemplo, los compuestos azufrados, disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo, fueron más abundantes para la **Réplica 1** [A_i/A_{istd}= 1.54 y 5.41] respectivamente, hacia el día 15 (mayor abundancia) que para la **Réplica 2** en la cual solo se observaron durante los primeros cinco días en cantidades muy bajas [A_i/A_{istd}= 0.04 y 0.19], respectivamente (mayor abundancia), pero luego, ya no se detectaron; siendo estos compuestos típicamente abundantes durante los primeros días de descomposición (Dekeirsschieter *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, 2009; Kalinová *et al.*, 2009; Vass *et al.*, 2008).

Una gran de diferencia se observó también para los ácidos carboxílicos, que suelen estar muy presentes en los estudios de este tipo (Armstrong *et al.*, 2016; Dekeirsschieter *et al.*, 2009, 2012; Forbes & Perrault, 2014; Hoffman *et al.*, 2009; Kasper *et al.*, 2012). En la **Réplica 1** se detectó una cantidad alta de estos compuestos durante gran parte del estudio, después un mes

Figura 20.

Espectro de masas del ácido butanoico $C_4H_8O_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en la fracción volátil de ratón en descomposición $[M^{+\cdot}]$ 88 m/z, $[M\text{-}CH_3]^+$ 73 m/z, $[M\text{-}C_2H_4]^+$ 60 m/z, $[M\text{-}CH_5O]^+$ 55 m/z, $COOH^+$ 45 m/z. Véase pico cromatográfico N°38 en las ***Tablas 8*** *y* ***9.***

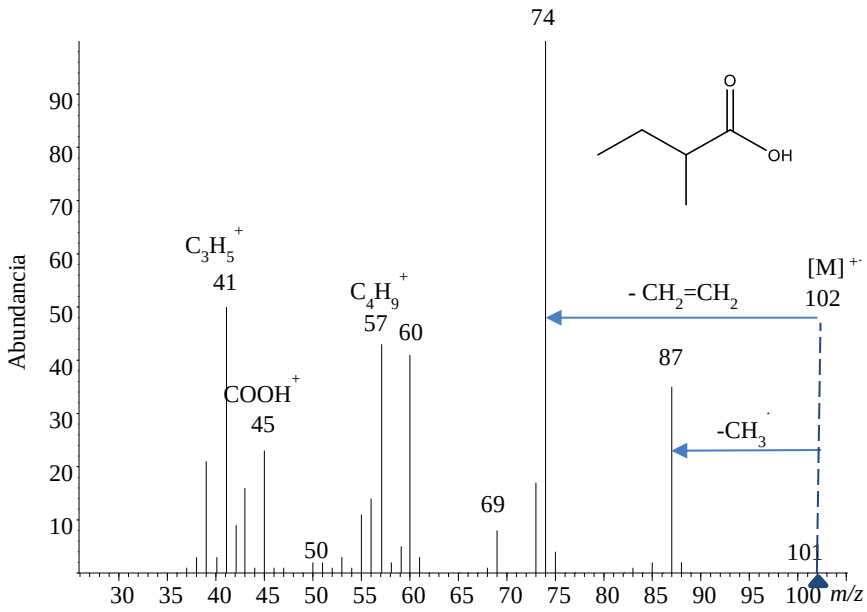


de descomposición hasta su final, llegando a ser la familia de compuestos más abundante durante todo el período de observación siendo los ácidos butanoico, 2-metilbutanoico, 4-metilbutanoico compuestos mayoritarios, con iones moleculares poco estables debido a su rápida fragmentación, que pierden grupos metilo ($CH_3\cdot$) y C_2H_4, molécula de agua, por presencia del grupo -OH, y aparición del ion 45 *m/z*, correspondiente al ion $COOH^+$, característico de los ácidos carboxílicos (Véanse **Figuras 20, 21** y **22**).

Se observó mayor cantidad de ácidos butanoico, 2-metilbutanoico y 4-metilbutanoico hacia el día 43, con 14.64, 5.10, 8.14 (A_i/A_{istd}) respectivamente, luego, hubo disminución hacia el día 59, con 7.70, 3.26, 5.02 (A_i/A_{istd}) y aumentó hasta un máximo de abundancia el día 123, con 17.57, 4.18, 11.24 (A_i/A_{istd}), volviendo a disminuir nuevamente para el final del experimento en el día 201 con 4.84, 1.24, 7.41 (A_i/A_{istd}), siendo el más abundante en la mezcla volátil el 4-metilpentanoico.

Figura 21.

*Espectro de masas del ácido 2-metilbutanoico $C_5H_{10}O_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en la fracción volátil de ratón en descomposición $[M^{+\cdot}]$ 102 m/z, $[M\text{-}CH_3]^+$ 87 m/z, $[M\text{-}C_2H_4]^+$ 74 m/z, $C_4H_9^+$ 57 m/z, $COOH^+$ 45 m/z, $C_3H_5^+$ 41 m/z Véase pico cromatográfico N°40 en las **Tablas 7** y **8**.*

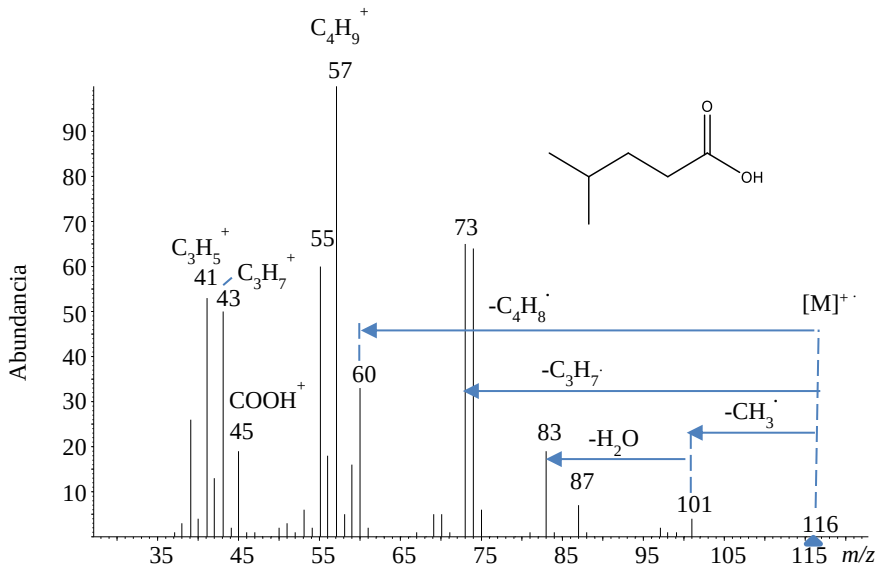


Este proceso de aumento y disminución durante tanto tiempo probablemente se debió a la presencia de las larvas que se alimentaron del cuerpo de la **Réplica 1** y que luego circularon por las paredes del recipiente acrílico dejando los líquidos residuales del cuerpo sobre el recipiente manteniendo constante la presencia de los volátiles por un mayor tiempo y por su emisión más alta que para la **Réplica 2**.

Para esta **Réplica 2** los ácidos butanoico y 2-metilbutanoico fueron los más abundantes, siendo el día 59 el de mayor abundancia con 7.48 y 2.03 (A_i/A_{istd}), respectivamente, siendo casi la mitad de la mayor abundancia detectada para la **Réplica 1**. Después de ese punto máximo, los valores de A_i/A_{istd} de los ácidos carboxílicos disminuyeron tanto que para el último día de análisis no se detectaron en la fracción volátil. Los demás compuestos minoritarios como hexano y tolueno **(**Véase **Apéndice F)** también disminuyeron poco a poco hasta el final del

Figura 22.

Espectro de masas del ácido 4-metilpentanoico $C_6H_{12}O_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV) en la fracción volátil de ratón en descomposición $[M^{+\cdot}]$ 116 m/z, $[M-CH_3]^+$ 101 m/z, $[M-C_3H_7]^+$ 73 m/z, $[M-C_4H_8]^+$ 60 m/z, $C_4H_9^+$ 57 m/z, $COOH^+$ 45 m/z, $C_3H_7^+$ 43 m/z, $C_3H_5^+$ 41 m/z. Véase pico cromatográfico N°41 en las ***Tablas 7*** *y* ***8.***



experimento, siendo esta tendencia un proceso esperado donde se inicia con una cantidad de compuestos baja al inicio de la descomposición luego se llega al punto(s) máximo(s) de emisión de volátiles, y luego, cuando ya no quedan más tejidos por descomponerse, los volátiles finalmente disminuyen.

También, se observaron compuestos específicos en ciertos períodos de tiempo durante el análisis de volátiles además de los compuestos azufrados y ácidos carboxílicos. Entre ellos, se detectaron algunos alcoholes alifáticos como el butanol y alcohol feniletílico junto con compuestos nitrogenados como la 2,6-dimetilpirazina (Véase **Apéndice F-H)**, compuestos reportados en el estudio de volátiles de descomposición (Dekeirsschieter *et al.*, 2012; Forbes & Perrault, 2014; Hoffman *et al.*, 2009; Perrault *et al.*, 2014; Statheropoulos *et al.*, 2005, 2011).

5.4.1 *Análisis de componentes principales del perfil volátil de cadáveres de ratones*

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) de los perfiles volátiles en los cadáveres de ratones. Se utilizaron datos de GC áreas relativas de las sustancias halladas en muestras tomadas por HS-SPME de cuatro ratones. Los datos se organizaron en una tabla en la que las filas representaban las sustancias y las columnas correspondían a las muestras, subclasificadas por el día de recolección y el ratón correspondiente (R1*, R2*, R1 y R2).

Se aplicaron dos criterios de selección que condujeron a dos PCA diferentes debido a la gran cantidad de datos (83 muestras, 49 descriptores) cuyos tres primeros componentes principales representaron solo el 40 % de la información.

El primer criterio fue la selección basada en la suma total de GC áreas relativas de cada compuesto. La tabla se ordenó según el valor decreciente de las GC áreas relativas totales y se seleccionaron los 24 compuestos principales, que representaron el 98.9% de la suma total de áreas. Se excluyeron 23 descriptores (compuestos) con sumas menores de 0.7206. Los tres primeros componentes principales calculados para este conjunto de datos representaron el 59.3% de la información. Los compuestos que más contribuyeron a definir el primer componente fueron los ácidos carboxílicos, el segundo componente estuvo definido por alcoholes y el tercero, por hidrocarburos (Véase **Tabla 10**).

Tabla 9.

Mayores constituyentes de los componentes principales del conjunto de datos filtrado, según la suma de GC áreas relativas.

PC1, 31.88 %		**PC2, 15.07 %**		**PC3, 12.37 %**	
Ácido propanoico	12.4%	Fenol	18.4%	Tolueno	27.7%
Ácido 2-metilbutanoico	12.1%	Hexanol	17.5%	Hexano	26.1%
Ácido 2-metilpropanoico	11.8%	3-Metilbutanol	16.1%		
Ácido butanoico	11.8%				

Para el segundo criterio, se utilizó la selección basada en el número de GC áreas relativas diferentes de cero. Para cada descriptor, se contó el número de muestras en las que su GC área relativa había sido calculada como cero. Se excluyeron aquellos descriptores que

tuvieron GC área relativa nula en al menos 70 de las 83 muestras recolectadas. La **Tabla 11** presenta los compuestos que más aportaron en la definición de los tres primeros componentes principales, que representaron el 59.8% de la información. Al igual que en el análisis anterior, el primer componente principal está definido por ácidos carboxílicos, el segundo componente, por alcoholes, y el tercero por hidrocarburos.

Tabla 10.

Mayores constituyentes de los componentes principales del conjunto de datos filtrado, según el número de GC áreas relativas diferentes de cero.

PC1, 27.6 %		**PC2, 16.3 %**		**PC3, 15.9 %**	
Ácido propanoico	11.3%	Pentanol	16.6%	Heptano	17.3%
Ácido 2-metilbutanoico	11.0%	Hexanol	16.6%	Ciclohexano	16.5%
Ácido 2-metilpropanoico	10.9%	3-Metilbutanol	15.3%	Tolueno	16.1%
Ácido butanoico	10.6%				

En el **Apéndice I** contiene la comparación de la representación de los perfiles de sustancias volátiles de los cuatro ratones, en el espacio definido por los tres componentes principales calculados para cada uno de los dos conjuntos de datos seleccionados. En la columna izquierda están los perfiles correspondientes al primer criterio de selección, basado en la suma de GC áreas relativas. Los números que acompañan cada punto experimental indican el número de días transcurridos desde el fallecimiento del ratón. No se aprecian tendencias claras de modificación progresiva de la composición del perfil volátil en función del tiempo.

5.5 Establecimiento del perfil de descomposición para cadáveres de ratones

Tras el monitoreo del proceso de descomposición en los dos grupos de ratones (enterrados y sin enterrar), se observó una notable diferencia entre ambos. Estas diferencias son esenciales para establecer un perfil de descomposición. La descomposición es un proceso complejo que varía entre individuos y está influido por numerosos factores, como la causa de muerte, las condiciones del entorno, la temperatura, la presencia de animales, si el cuerpo está enterrado o no, y, en caso de estarlo, el tipo de suelo, entre otros. Por ello, las diferencias identificadas en el proceso de descomposición entre ambos grupos constituyen un aspecto clave para el desarrollo de perfiles de descomposición orientados a la determinación del PMI. En este estudio, se consideraron los casos específicos de ratones enterrados y sin enterrar, así como los ratones sin enterrar en presencia y ausencia de insectos.

En el caso de los cadáveres de ratones enterrados, se observa en la **Figura 19** que, durante los primeros días de descomposición, se detectan algunos compuestos alifáticos, como el hexano, y compuestos aromáticos, como el tolueno. Sin embargo, estos compuestos se encuentran en cantidades reducidas y no presentan un intervalo de aparición específico, lo que limita su utilidad como marcadores del PMI a pesar de estar asociados con la descomposición. Por otro lado, a partir del décimo día, se comienzan a registrar compuestos azufrados, como el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo, los cuales se ha reportado que provienen de la descomposición de aminoácidos como la metionina y la cisteína (Frederick *et al.*, 1957; Wolle *et al.*, 2006). Estos compuestos permanecen detectables en el proceso de descomposición hasta el día 30, por lo que pueden considerarse marcadores potenciales para la estimación del PMI. En este contexto, la detección de estos compuestos azufrados mediante la técnica HS-SPME permitiría establecer un rango de muerte de entre 10 y 30 días en futuros análisis de cuerpos de ratón. Posterior al día 30, en ambas réplicas, se mantiene la presencia de compuestos alifáticos y aromáticos, además de compuestos cetónicos, como la acetofenona. Este compuesto se

detecta desde el día 24 y permanece hasta el día 201, lo que sugiere que puede utilizarse como un marcador para establecer un rango de PMI superior a 24 días en futuros análisis de cuerpos de ratón.

En el caso de los cadáveres de ratones no enterrados, como se observa en la **Figura 20,** se identificaron dos procesos de descomposición notablemente diferentes a partir del décimo día, debido a que en el séptimo día una mosca ingresó a la cámara acrílica de la réplica uno y depositó sus larvas. En la **Réplica 1**, la interacción de animales aceleró el proceso de descomposición, mientras que, en la **Réplica 2**, donde no hubo intervención de animales, el proceso fue considerablemente más lento. En ambas réplicas, durante los primeros cinco días se detectaron compuestos alifáticos como el hexano, aromáticos como el tolueno y alcoholes como el propilenglicol. A diferencia de los ratones enterrados, en los ratones no enterrados los compuestos azufrados fueron detectados desde el tercer día. Para la **Réplica 1** compuestos azufrados, como el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo, a diferencia de los ratones enterrados, se registraron a partir del tercer día y permanecieron hasta el día 19 en el caso del disulfuro de dimetilo, y hasta el día 36, en el caso del trisulfuro de dimetilo, siendo aptos estos compuestos como marcadores del PMI para estos dos rangos de tiempo específicos.

En la **Réplica 1**, la presencia de ciertos alcoholes podría servir como marcadores del PMI en casos donde hay interacción con animales, por ejemplo, larvas. Por ejemplo, el butanol, un alcohol derivado de la degradación de azúcares, se registró en un rango de tiempo de entre cuatro y 30 días, siendo este un posible marcador del PMI para dicho intervalo. Otro compuesto relevante fue 4-metilpentanol, un alcohol atribuido a procesos de descomposición por la vía de Ehrlich, que se detectó entre los días 10 y 19, lo que lo posiciona como un marcador potencial del PMI, con un rango de tiempo más corto. De manera similar, el hexanol fue detectado entre los días 10 y 24, por lo que también podría considerarse como otro marcador del PMI para este intervalo específico.

Compuestos nitrogenados como la 2,6-dimetilpirazina, proveniente principalmente de la degradación de aminoácidos y péptidos por actividad microbiana, se podrían emplear también como marcadores del PMI. Se logró detectar la 2,6-dimetilpirazina entre el día 15 y el día 50, siendo otro intervalo que aporta al esclarecimiento del PMI. Este compuesto se genera comúnmente durante la actividad metabólica de bacterias y hongos que actúan en etapas intermedias y tardías de la descomposición (Paczkowski & Schütz, 2011).

Según los resultados de la **Réplica 1**, los ácidos carboxílicos son otros compuestos que pueden utilizarse como marcadores del PMI, pues aparecen después del décimo día, dando información del PMI con la certeza de que un cadáver de ratón con presencia de estos compuestos ya presentaría más de diez días de descomposición.

En la **Réplica 2**, donde no hubo intervención de animales, se detectaron VOC en menor cantidad (relación A_i/A_{istd}), y se observó que el proceso de descomposición fue más lento, al menos con observación visual. En cuanto a los marcadores del PMI para la descomposición de cadáveres de ratón en ausencia de animales, se identificaron algunos alcoholes. Por ejemplo, el butanol, presente en un intervalo de tiempo de entre 4 y 50 días, se perfila como un posible marcador del PMI para este rango. Otro compuesto relevante fue el octen-3-ol, un alcohol asociado con procesos de lipólisis, que se detectó entre los días 15 y 36, posicionándolo como un marcador potencial del PMI. El alcohol feniletílico, derivado de la degradación de aminoácidos aromáticos a través de la vía de Ehrlich, fue detectado entre los días 24 y 88, estableciéndose también como un marcador confiable del PMI. En la **Réplica 2**, al igual que en la **Réplica 1**, se detectaron ácidos carboxílicos a partir del décimo día. La presencia de estos compuestos podría emplearse como indicadores del PMI, proporcionando información de que un cadáver de ratón con estos compuestos ya tendría al menos diez días de muerte.

Figura 23.
Relación de GC áreas relativas para los compuestos identificados en la fracción volátil de ratones en descomposición enterrados.

H. - hidrocarburos

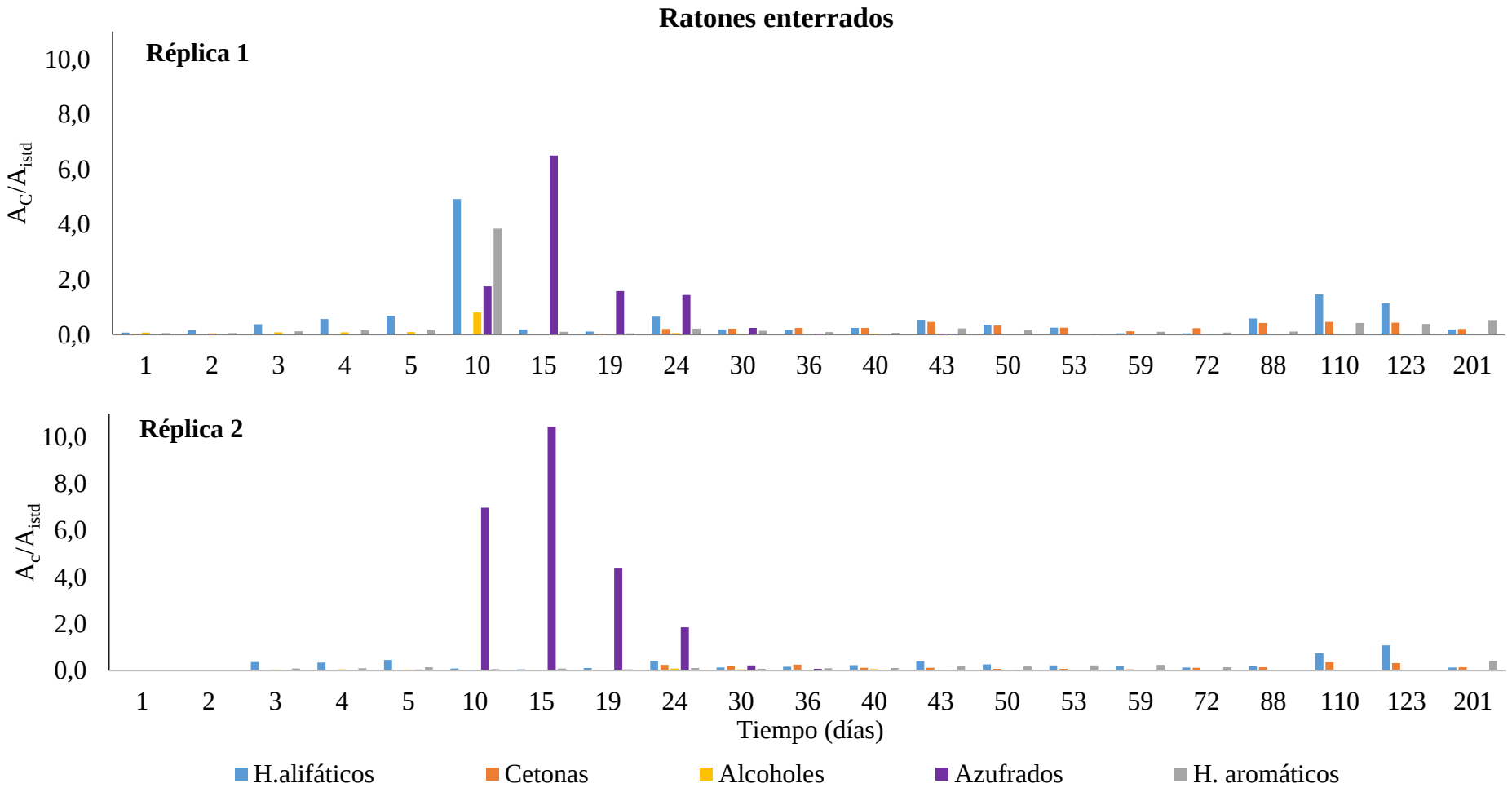
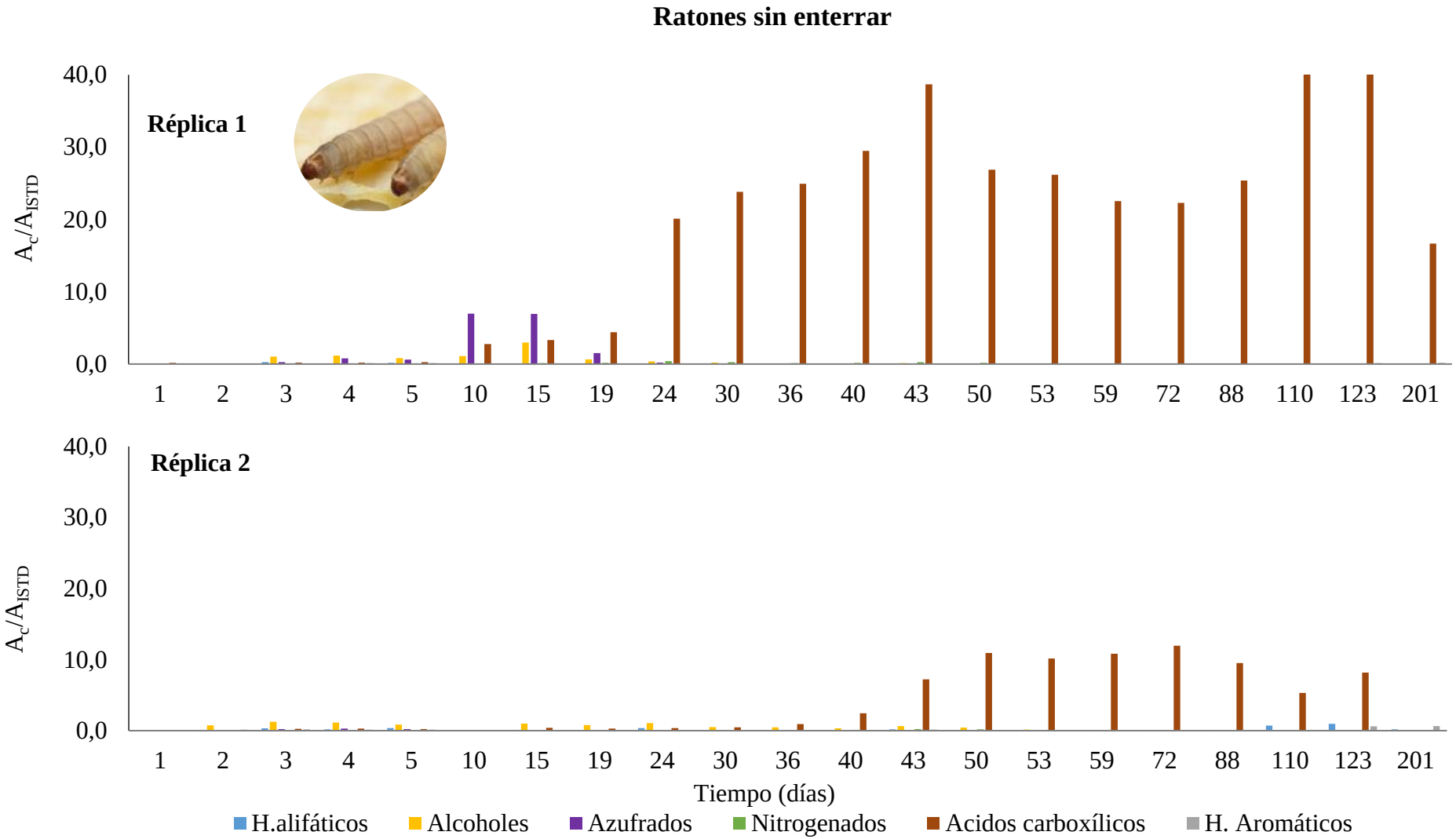


Figura 24.
Relación de GC áreas relativas para los compuestos identificados en la fracción volátil de ratones en descomposición que no fueron enterrados.

H. - hidrocarburos



Los resultados obtenidos permitieron identificar diversos VOC asociados a los procesos de descomposición de cadáveres de ratones en distintas condiciones experimentales, los cuales podrían tener aplicaciones en la química forense como marcadores potenciales para la determinación del PMI. Los compuestos detectados mostraron diferencias en los patrones de descomposición entre ratones enterrados y no enterrados, y variaron significativamente debido a factores externos, como la interacción, o no, con animales carroñeros.

Tabla 11.

Intervalos post-mortem de compuestos marcadores identificados en distintas condiciones de descomposición de ratones.

Condición	Compuesto marcador del PMI	PMI, días
Ratón enterrado	Disulfuro de dimetilo	10-30
	Trisulfuro de dimetilo	10-30
	Acetofenona	> 24
Ratón no enterrado	Disulfuro de dimetilo	3-19
	Trisulfuro de dimetilo	3-36
Ratón no enterrado en presencia de animales (insectos)	Butanol	4-30
	4-Metilpentanol	10-19
	Hexanol	10-24
	2,6-Dimetilpirazina	15-50
	Ácidos carboxílicos	> 10
Ratón no enterrado en ausencia de animales	Butanol	4-50
	Octen-3-ol	15-36
	Alcohol feniletílico	24-88
	Ácidos carboxílicos	> 10

La **Tabla 11** resume los hallazgos obtenidos, destacando los compuestos identificados como posibles marcadores del PMI, junto con los intervalos de tiempo en los que podrían ser útiles para su determinación. Estos resultados contribuyen significativamente a las ciencias forenses al implementar un método rápido y de fácil manejo para estimar el tiempo de muerte a partir de los VOC emitidos durante la descomposición, incluyendo situaciones complejas (por ejemplo, ataque de insectos).

6 Conclusiones

1. La presente investigación permitió determinar que el recubrimiento de fibra SPME más eficiente para la extracción de compuestos volátiles en muestras en descomposición fue el CAR/PDMS, dado que se obtuvo una mayor captura y variedad de compuestos aislados, especialmente, aquellos de bajo peso molecular, con volatilidad alta y naturaleza polar, como disulfuro de dimetilo, trisulfuro de dimetilo, fenol e indol. Esto se debe a las propiedades específicas del polímero Carboxeno, con poros más pequeños y alta densidad, que favorecen la adsorción de compuestos volátiles en diferentes etapas de descomposición. Los tiempos de exposición de la fibra, de 1 h y 2 h presentaron resultados similares en cuanto a la cantidad y la variedad de compuestos identificados. Se estableció el tiempo de exposición de fibra en 1 h, sin comprometer la calidad de los resultados.
2. Para ambos grupos de ratones analizados, se detectaron compuestos azufrados, como disulfuro de dimetilo y trisulfuro de dimetilo, los cuales fueron mayoritarios durante las primeras semanas en ambos casos. De manera específica, en los ratones que fueron enterrados se detectó la presencia de hidrocarburos como hexano y tolueno, así como compuestos cetónicos, entre ellos acetona y acetofenona. En los ratones sometidos a un proceso de descomposición sin enterrar, en ausencia de suelo, se detectaron ácidos carboxílicos, como los ácidos butanoico, 2-metilbutanoico y 4-metilpentanoico, que predominaron durante gran parte del muestreo, además, se registraron alcoholes como hexanol y alcohol feniletílico.
3. Esta investigación contribuye al entendimiento de la selección de recubrimientos y tiempos de extracción apropiados en la técnica SPME para el análisis de compuestos volátiles generados durante la descomposición. Los hallazgos aquí presentados respaldan la selección del recubrimiento CAR/PDMS para estudios de tejidos animales

y potencialmente para aplicaciones en análisis forense de sustancias producidas por cadáveres de ratón en descomposición. Asimismo, se resalta la importancia de evaluar tanto los parámetros físicos de los recubrimientos como las condiciones de operación para garantizar resultados reproducibles y de alta calidad en futuras investigaciones.

4. El presente estudio permitió caracterizar el proceso de descomposición en cadáveres de ratones bajo diferentes condiciones, identificando VOC específicos como posibles marcadores del intervalo *post-mortem* (PMI). En los ratones enterrados, se observó que los compuestos azufrados, como el disulfuro de dimetilo y el trisulfuro de dimetilo, podrían usarse para estimar un PMI entre 10 y 30 días, mientras que compuestos como la feniletanona, para intervalos superiores a 24 días. Por otro lado, en los cadáveres no enterrados, los procesos de descomposición variaron significativamente en presencia y ausencia de insectos, afectando tanto la velocidad del proceso de descomposición como los compuestos que se detectaron. En estos casos, el butanol y otros alcoholes, como el hexanol y el 4-metilpentanol, podrían ser marcadores útiles en intervalos de tiempo específicos, mientras que compuestos nitrogenados y ácidos carboxílicos pueden ofrecer rangos más amplios para la estimación del PMI.
5. Los hallazgos encontrados en este estudio resaltan la importancia de los VOC como vestigios analíticos para la determinación del PMI. Asimismo, se estableció la utilidad de técnicas como HS-SPME para el monitoreo de VOC asociados a la descomposición; esto abre la posibilidad de futuras aplicaciones en escenarios forenses y ambientales. La validación y posterior uso de estos compuestos como marcadores del PMI contribuirá significativamente a la mejora de la precisión en la estimación temporal de la muerte, ampliando las perspectivas de análisis en investigaciones forenses.

7 Consideraciones éticas

Procedimiento para obtención y sacrificio de los ratones

Los ratones (*Mus musculus*) utilizados en el estudio se obtuvieron en la Unidad de Experimentación de la Universidad Industrial de Santander, sede Guatiguará. De allá, se transportaron al Centro de Investigación CENIVAM en jaulas adecuadas para su manejo.

Inmediatamente después de su obtención, se siguió el procedimiento propuesto por la Asociación Americana de Medicina Veterinaria (AVMA, 2019). Se preparó un recipiente lo suficientemente grande para contener a los ratones y se colocó en un área bien ventilada. Posteriormente, se conectó una fuente de dióxido de carbono al puerto del recipiente donde se dispusieron los ratones. El recipiente se cerró asegurándose de que fuera hermético. Se abrió el flujo de dióxido de carbono al recipiente a un caudal ≥30 % del volumen del contenedor por minuto. Durante el procedimiento, se supervisó que los ratones presentaran pérdida de la conciencia mediante la presión suave en la cola para verificar la ausencia de reflejos. Finalmente, los ratones se dejaron en el recipiente durante cinco minutos adicionales para asegurar su muerte.

Medidas de seguridad para el profesional investigador

Se siguieron los lineamientos del Manual de Seguridad en el Laboratorio establecido por el Laboratorio CROM-MASS. Dentro de estos lineamientos, los estudiantes investigadores utilizaron los elementos de protección personal, como bata blanca de algodón, protección ocular, guantes de nitrilo y zapato cerrado. Además, el Laboratorio del Centro de Investigación CENIVAM contaba con dispositivos de protección en sus instalaciones, incluyendo una cabina extractora de gases, una ducha lavaojos de emergencia, una ducha de seguridad y botiquín de primeros auxilios.

Manejo de residuos

Para garantizar un manejo adecuado de los residuos biológicos y químicos generados durante este proyecto de grado, se siguieron los lineamientos establecidos en el Manual de Gestión Integral de Residuos (2010) del Instituto Nacional de Salud, el Manual de Gestión Integral de Residuos (PGIR) de la Universidad Industrial de Santander y el Plan Integral de Gestión de Residuos implementado por el Centro de Cromatografía de Gases y Espectrometría de Masas (CROM-MASS) de la Universidad Industrial de Santander. Los residuos se gestionaron, según los lineamientos establecidos por el Laboratorio CROM-MASS, utilizando el código de colores y las directrices de la Resolución 2184 de 2019.

Cuando los recipientes alcanzaron el 75 % de su capacidad, se procedía rotularlos como residuos químicos peligrosos. Posteriormente, los recipientes se transportaban a la bodega destinada para su almacenamiento temporal, en cumplimiento con los protocolos del Laboratorio CROM-MASS. La disposición final de estos residuos estuvo a cargo de la empresa externa SANDESOL, que cumple con los requisitos establecidos en el Decreto 1609 de 2002 y el Decreto 0351 de 2014 y así como con las certificaciones internacionales ISO 9001:2008, ISO 14001:2004 e ISO 45001:2018, avaladas por Bureau Veritas y la Calificación RUC del Consejo Colombiano de Seguridad.

Disposición de los residuos

Los cadáveres de ratones en descomposición se clasificaron como residuos con riesgo biológico o infeccioso, se recolectaron en bolsas rojas desechables y fueron dispuestos en recipientes del mismo color, fabricados con poli(etileno) de alta densidad (PEHD). Cada recipiente se etiquetó con su respectiva identificación de residuo, la cual, según la normativa estipulada por el Ministerio de Medio Ambiente y adoptada en el Manual de Gestión Integral de Residuos de la Universidad Industrial de Santander, incluyó lo siguiente: el símbolo de

identificación de residuo, la clasificación y subclasificación del tipo de residuo, el nombre del establecimiento generador y el área de procedencia del residuo.

8 Recomendaciones

1. Se recomienda realizar experimentos con un mayor número de réplicas para poder establecer de manera más sólida la reproducibilidad de la técnica HS-SPME. Esto permitirá obtener resultados más consistentes y confiables; además, garantizará la validez de los hallazgos en distintas condiciones experimentales. Se recomienda incluir un número adecuado de réplicas, que proporcionarán una mejor estimación de la variabilidad de los datos, lo que es crucial para una interpretación precisa y generalizable de los resultados.
2. Se recomienda, en futuras investigaciones, implementar la técnica HS-SPME para el análisis de VOC de descomposición en matrices de animales más grandes, como cerdos o incluso en humanos, con el objetivo de identificar compuestos marcadores para la determinación del PMI. Esto permitiría comenzar a generar una base de datos para los laboratorios de ciencias forenses, lo que contribuiría a mejorar la precisión en la estimación del PMI.
3. Se recomienda monitorear la descomposición bajo distintas condiciones (tipo de suelo, temperatura, humedad, entre otras) para ampliar el estudio del perfil de volátiles de descomposición. La descomposición es un proceso que varía dependiendo de múltiples factores, por lo que es necesario considerar otros parámetros para poder establecer de manera más precisa el PMI.
4. Se recomienda realizar el monitoreo de aminas biogénicas por HS-SPME, usando su derivatización, para analizar compuestos de descomposición como la cadaverina y la putrescina, los cuales podrían servir como marcadores muy útiles para determinar el PMI.

9 Divulgación de resultados

Los resultados de este trabajo de grado se presentaron en eventos académicos de gran relevancia para la química analítica, realizados en 2024, entre ellos, figuran el XI Congreso Colombiano de Cromatografía (COCOCRO), el XIX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines (COLACRO), el III Simposio Panamericano de Aceites Esenciales (SPAE), el XXVI *International Symposium on Advances in Extraction Technologies* (EXTECH), el XVI *Latin American Symposium on Environmental Analytical Chemistry* (LASEAC) y el *Workshop* sobre Avances Recientes en la Preparación de Muestras (WARPA). Los resultados se expusieron bajo la modalidad de póster, con el título "*Chemical characterization of the volatile fraction of decomposing chicken using HS-SPME-GC/MS*" (Véanse **Apéndice J**), y en modalidad de ponencia oral, con el título "*Chemical characterization by HS-SPME-GC/MS of the volatile fraction of decomposing mice*" (Véanse **Apéndice K**).

Referencias bibliográficas

Armstrong, P., Nizio, K. D., Perrault, K. A., & Forbes, S. L. (2016). Establishing the volatile profile of pig carcasses as analogues for human decomposition during the early postmortem period. *Heliyon*, *2*(2), e00070.

Ashworth, J. R., & Wall, R. (1994). Responses of the sheep blowflies Lucilia sericata and L. cuprina to odour and the development of semiochemical baits. *Medical and Veterinary Entomology*, *8*(4), 303-309.

AVMA. (2019). *Proposed 2019 Updates to the AVMA guidelines for the euthanasia of animals*. https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/Interim-2019-marked-changes-for-comment-period.pdf

Blake, R. S., Monks, P. S., & Ellis, A. M. (2009). Proton-Transfer Reaction Mass Spectrometry. *Chemical Reviews*, *109*(3), 861-896.

Boerjesson, T. S., Stoellman, U. M., & Schnuerer, J. L. (1993). Off-odorous compounds produced by molds on oatmeal agar: Identification and relation to other growth characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *41*(11), 2104-2111.

Bone, E., Tamm, A., & Hill, M. (1976). The production of urinary phenols by gut bacteria and their possible role in the causation of large bowel cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *29*(12), 1448-1454.

Bonhomme, F., & Orth, A. (2017). Mus musculus. En *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2nd ed., pp. 515-517). Ed. Elsevier.

Boumba, V. A., Ziavrou, K. S., & Vougiouklakis, T. (2008). Biochemical pathways generating post-mortem volatile compounds co-detected during forensic ethanol analyses. *Forensic Science International*, *174*(2), 133-151.

Brasseur, C., Dekeirsschieter, J., Schotsmans, E. M. J., De Koning, S., Wilson, A. S., Haubruge, E., & Focant, J.-F. (2012). Comprehensive two-dimensional gas

chromatography–time-of-flight mass spectrometry for the forensic study of cadaveric volatile organic compounds released in soil by buried decaying pig carcasses. *Journal of Chromatography A*, *1255*, 163-170.

Buettner, F. (2023). Crime and Technology: Challenges and Advancements in Forensic Science. *Social and Crimonology*, *11*, 280.

Cablk, M. E., Szelagowski, E. E., & Sagebiel, J. C. (2012). Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing animal remains, and compared with human remains. *Forensic Science International*, *220*(1-3), 118-125.

Cardona, Y., Chaparro, A. L., Calderón, L. S., Peláez, M. J., & García, C. H. (2011). Estandarización de un método analítico para extracción y cuantificación de cipermetrina en pastos. *Revista Colombiana de Química*, *40*(2), 211-226.

Carter, D. O., Yellowlees, D., & Tibbett, M. (2007). Cadaver decomposition in terrestrial ecosystems. *Die Naturwissenschaften*, *94*(1), 12-24.

Combet, E., Eastwood, D. C., Burton, K. S., Combet, E., Henderson, J., Henderson, J., & Combet, E. (2006). Eight-carbon volatiles in mushrooms and fungi: Properties, analysis, and biosynthesis. *Mycoscience*, *47*(6), 317-326.

Daniel, C. R., Piraccini, B. M., & Tosti, A. (2004). The nail and hair in forensic science. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *50*(2), 258-261.

De Martinis, B. S., & Martin, C. C. S. (2002). Automated headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography analysis of ethanol in postmortem specimens. *Forensic Science International*, *128*(3), 115-119.

DeGreeff, L. E., & Furton, K. G. (2011). Collection and identification of human remains volatiles by non-contact, dynamic airflow sampling and SPME-GC/MS using various sorbent materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(4), 1295-1307.

Dekeirsschieter, J., Stefanuto, P.-H., Brasseur, C., Haubruge, E., & Focant, J.-F. (2012). Enhanced Characterization of the Smell of Death by Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography-Time-of-Flight Mass Spectrometry (GCxGC-TOFMS). *PLoS ONE*, *7*(6), e39005.

Dekeirsschieter, J., Verheggen, F. J., Gohy, M., Hubrecht, F., Bourguignon, L., Lognay, G., & Haubruge, E. (2009). Cadaveric volatile organic compounds released by decaying pig carcasses (Sus domesticus L.) in different biotopes. *Forensic Science International*, *189*(1-3), 46-53.

Demeyer, D., & Van Nevel, C. (1979). Protein fermentation and growth by rumen microbes. *Annales De Recherches Veterinaires. Annals of Veterinary Research*, *10*(2-3), 277-279.

Dent, B. B., Forbes, S. L., & Stuart, B. H. (2004). Review of human decomposition processes in soil. *Environmental Geology*, *45*(4), 576-585.

Díaz-Maroto, M. C., Sánchez-Palomo, E., & Pérez-Coello, M. S. (2004). Fast screening method for volatile compounds of oak wood used for aging wines by headspace SPME-GC-MS (SIM). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(23), 6857-6861.

Fahmey, M. A., Zayed, M. A., & Keshk, Y. H. (2001). Comparative study on the fragmentation of some simple phenolic compounds using mass spectrometry and thermal analyses. *Thermochimica Acta*, *366*(2), 183-188.

Fais, P., Mazzotti, M. C., Teti, G., Boscolo-Berto, R., Pelotti, S., & Falconi, M. (2018). HIF1α protein and mRNA expression as a new marker for post mortem interval estimation in human gingival tissue. *Journal of Anatomy*, *232*(6), 1031-1037.

Forbes, S. L., & Perrault, K. A. (2014). Decomposition Odour Profiling in the Air and Soil Surrounding Vertebrate Carrion. *PLoS ONE*, *9*(4), e95107.

Forbes, S. L., Perrault, K. A., Stefanuto, P.-H., Nizio, K. D., & Focant, J.-F. (2014). Comparison of the decomposition VOC profile during winter and summer in a moist, mid-latitude (Cfb) climate. *PloS One, 9*(11), e113681.

Frederick, L. R., Starkey, R. L., & Segal, W. (1957). Decomposability of Some Organic Sulfur Compounds in Soil. *Soil Science Society of America Journal, 21*(3), 287-292.

Giacento, G. (2018). *Chemical detection of non-volatile and semi-volatile decomposition markers from clandestine gravesites* [Doctoral]. Staffordshire University.

Hoffman, E. M., Curran, A. M., Dulgerian, N., Stockham, R. A., & Eckenrode, B. A. (2009). Characterization of the volatile organic compounds present in the headspace of decomposing human remains. *Forensic Science International, 186*(1-3), 6-13.

Ilias, Y., Bieri, S., Christen, P., & Veuthey, J.-L. (2006). Evaluation of solid-phase microextraction desorption parameters for fast GC analysis of cocaine in coca leaves. *Journal of Chromatographic Science, 44*(7), 394-398.

Irish, L., Rennie, S. R., Parkes, G. M. B., & Williams, A. (2019). Identification of decomposition volatile organic compounds from surface-deposited and submerged porcine remains. *Science & Justice, 59*(5), 503-515.

Julák, J., Stránská, E., Procházková-Francisci, E., & Rosová, V. (2000). Blood cultures evaluation by gas chromatography of volatile fatty acids. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research, 6*(3), 605-610.

Kalinová, B., Podskalská, H., Růžička, J., & Hoskovec, M. (2009). Irresistible bouquet of death—how are burying beetles (Coleoptera: Silphidae: Nicrophorus) attracted by carcasses. *Naturwissenschaften, 96*(8), 889-899.

Kanda, F. (2005). Behind the Sensationalism: Images of a Decaying Corpse in Japanese Buddhist Art. *The Art Bulletin, 87*, 24-49.

Kasper, J., Mumm, R., & Ruther, J. (2012). The composition of carcass volatile profiles in relation to storage time and climate conditions. *Forensic Science International*, *223*(1-3), 64-71.

Killam, E. W. (with Internet Archive). (1990). *The detection of human remains*. Springfield, Ill., U.S.A. : Thomas.

Kücklich, M., Möller, M., Marcillo, A., Einspanier, A., Weiß, B. M., Birkemeyer, C., & Widdig, A. (2017). Different methods for volatile sampling in mammals. *PLOS ONE*, *12*(8), e0183440.

Kung, Y., Huang, K., Fan, Y., & Chiou, P. (2015). Fabrication of 3D high aspect ratio PDMS microfluidic networks with a hybrid stamp. *Lab on a Chip*, *15*, 1861-1868.

Labows, J. N., McGinley, K. J., Webster, G. F., & Leyden, J. J. (1980). Headspace analysis of volatile metabolites of Pseudomonas aeruginosa and related species by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, *12*(4), 521-526.

Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2002). Headspace solid phase microextraction applied to the analysis of organophosphorus insecticides in strawberry and cherry juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12), 3359-3365.

Lorenzo, N., Wan, T., Harper, R. J., Hsu, Y.-L., Chow, M., Rose, S., & Furton, K. G. (2003). Laboratory and field experiments used to identify Canis lupus var. Familiaris active odor signature chemicals from drugs, explosives, and humans. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *376*(8), 1212-1224.

Luengo, J. M., García, J. L., & Olivera, E. R. (2001). The phenylacetyl-CoA catabolon: A complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Molecular Microbiology*, *39*(6), 1434-1442.

Luna Maldonado, A. (2010). La Data de la muerte, un desafío no resuelto. *Revista española de medicina legal: órgano de la Asociación Nacional de Médicos Forenses*, *36*(2), 47-48.

Martin, C., & Verheggen, F. (2018). Odour profile of human corpses: A review. *Forensic Chemistry*, *10*, 27-36.

Møller, J. K., Hinrichsen, L. L., & Andersen, H. J. (1998). Formation of amino acid (L-leucine, L-phenylalanine) derived volatile flavour compounds by Moraxella phenylpyruvica and Staphylococcus xylosus in cured meat model systems. *International Journal of Food Microbiology*, *42*(1-2), 101-117.

Oesterhelweg, L., Kröber, S., Rottmann, K., Willhöft, J., Braun, C., Thies, N., Püschel, K., Silkenath, J., & Gehl, A. (2008). Cadaver dogs—A study on detection of contaminated carpet squares. *Forensic Science International*, *174*(1), 35-39.

Paczkowski, S., & Schütz, S. (2011). Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *91*(4), 917-935.

Patel, R. N., Hou, C. T., Laskin, A. I., Derelanko, P., & Felix, A. (1979). Microbial production of methyl ketones. Purification and properties of a secondary alcohol dehydrogenase from yeast. *European Journal of Biochemistry*, *101*(2), 401-406.

Pawliszyn, J. (2000). Theory of solid-phase microextraction. *Journal of Chromatographic Science*, *38*(7), 270-278.

Pawliszyn, J. (2011). *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Ed. Elsevier. Waterloo, Canada, 99-133.

Peña, J. A., Bustos Saldaña, R., & Verdín G., O. (2019). Fenómenos cadavéricos y el tanatocronodiagnóstico. *Gaceta internacional de ciencias forenses*, *31*, 10-37.

Peña, R. M., Barciela, J., Herrero, C., & García-Martín, S. (2008). Headspace solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry analysis of volatiles in orujo spirits from a defined geographical origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(8), 2788-2794.

Perez-Hurtado, P., Palmer, E., Owen, T., Aldcroft, C., Allen, M. H., Jones, J., Creaser, C. S., Lindley, M. R., Turner, M. A., & Reynolds, J. C. (2017). Direct analysis of volatile organic compounds in foods by headspace extraction atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, *31*(22), 1947-1956.

Perrault, K. A., Stefanuto, P.-H., Stuart, B. H., Rai, T., Focant, J.-F., & Forbes, S. L. (2015). Reducing variation in decomposition odour profiling using comprehensive two-dimensional gas chromatography: Gas Chromatography. *Journal of Separation Science*, *38*(1), 73-80.

Perrault, K. A., Stuart, B. H., & Forbes, S. L. (2014). A Longitudinal Study of Decomposition Odour in Soil Using Sorbent Tubes and Solid Phase Microextraction. *Chromatography*, *1*(3), 120-140.

Prada Chaparro, F. (2020). *Variación en el contenido de alcaloides pirrolizidínicos y compuestos orgánicos volátiles en crotalaria spp. (Fabaceae) inducidos por herbívora con utetheisa ornatrix (lepidóptera)* [Doctoral] Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Rabus, R., & Heider, J. (1998). Initial reactions of anaerobic metabolism of alkylbenzenes in denitrifying and sulfate-reducing bacteria. *Archives of Microbiology*, *170*(5), 377-384.

Rydell-Törmänen, K., & Johnson, J. R. (2019). The Applicability of Mouse Models to the Study of Human Disease. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1940*, 3-22.

Salam, H. A., Shaat, E. A., Aziz, M. H. A., MoneimSheta, A. A., & Hussein, H. A. S. M. (2012). Estimation of postmortem interval using thanatochemistry and postmortem changes. *Alexandria Journal of Medicine*, *48*(4), 335-344.

Sampaio-Silva, F., Magalhães, T., Carvalho, F., Dinis-Oliveira, R. J., & Silvestre, R. (2013). Profiling of RNA Degradation for Estimation of Post Morterm Interval. *PLOS ONE*, *8*(2), e56507.

Schmidt, K., & Podmore, I. (2015). Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers*, *2015*, 981458.

Shirey, R. E. (2012). SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. En J. Pawliszyn (Ed.), *Handbook of Solid Phase Microextraction* (pp. 99-133). Elsevier.

Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1996). Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: Effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *The Journal of Applied Bacteriology*, *81*(3), 288-302.

Souza, H. A. L., & Bragagnolo, N. (2014). New method for the extraction of volatile lipid oxidation products from shrimp by headspace-solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and evaluation of the effect of salting and drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *62*(3), 590-599.

Stadler, S. (2013). *Analysis of the Volatile Organic Compounds Produced by the Decomposition of Pig Carcasses and Human Remains* [Doctoral]. University of Ontario Institute of Technology, Oshawa, Canada.

Stashenko, E., & Martínez, J. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Science Chromatography*, *1*, 29-45.

Stashenko, E., & Martínez, J. (2010). Más de un analizador de masas, ¿para qué? *Science Chromatography*, *4*, 25-48.

Statheropoulos, M., Agapiou, A., Spiliopoulou, C., Pallis, G. C., & Sianos, E. (2007). Environmental aspects of VOCs evolved in the early stages of human decomposition. *Science of The Total Environment*, *385*(1), 221-227.

Statheropoulos, M., Agapiou, A., Zorba, E., Mikedi, K., Karma, S., Pallis, G. C., Eliopoulos, C., & Spiliopoulou, C. (2011). Combined chemical and optical methods for monitoring the early decay stages of surrogate human models. *Forensic Science International*, *210*(1), 154-163.

Statheropoulos, M., Mikedi, K., Agapiou, A., Georgiadou, A., & Karma, S. (2006). Discriminant Analysis of Volatile Organic Compounds data related to a new location method of entrapped people in collapsed buildings of an earthquake. *Analytica Chimica Acta*, *566*(2), 207-216.

Statheropoulos, M., Spiliopoulou, C., & Agapiou, A. (2005). A study of volatile organic compounds evolved from the decaying human body. *Forensic Science International*, *153*(2-3), 147-155.

Stefanuto, P.-H., Rosier, E., Tytgat, J., Focant, J.-F., & Cuypers, E. (2017). Profiling Volatile Organic Compounds of Decomposition. En *Taphonomy of Human Remains: Forensic Analysis of the Dead and the Depositional Environment* (pp. 39-52). John Wiley & Sons, Ltd.

Stutz, H. k., Silverman, G. j., Angelini, P., & Levin, R. e. (1991). Bacteria and Volatile Compounds Associated with Ground Beef Spoilage. *Journal of Food Science*, *56*(5), 1147-1153.

Swain, R., Kumar, A., Sahoo, J., Lakshmy, R., Gupta, S. K., Bhardwaj, D. N., & Pandey, R. M. (2015). Estimation of post-mortem interval: A comparison between cerebrospinal fluid and vitreous humour chemistry. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, *36*, 144-148.

Valencia, D. (2015). NN: Rastros silenciosos del conflicto. *Centro Nacional de Memoria Histórica*. https://centrodememoriahistorica.gov.co/nn-rastros-silenciosos-del-conflicto/

Vass, A. A. (2012). Odor mortis. *Forensic Science International*, *222*(1-3), 234-241.

Vass, A. A., Smith, R. R., Thompson, C. V., Burnett, M. N., Dulgerian, N., & Eckenrode, B. A. (2008). Odor Analysis of Decomposing Buried Human Remains*. *Journal of Forensic Sciences*, *53*(2), 384-391.

Vass, A. A., Smith, R. R., Thompson, C. V., Burnett, M. N., Wolf, D. A., Synstelien, J. A., Dulgerian, N., & Eckenrode, B. A. (2004). Decompositional odor analysis database. *Journal of Forensic Sciences*, *49*(4), 760-769.

Verheggen, F., Perrault, K. A., Megido, R. C., Dubois, L. M., Francis, F., Haubruge, E., Forbes, S. L., Focant, J.-F., & Stefanuto, P.-H. (2017). The Odor of Death: An Overview of Current Knowledge on Characterization and Applications. *BioScience*, *67*(7), 600-613.

Von Hoermann, C., Ruther, J., Reibe, S., Madea, B., & Ayasse, M. (2011). The importance of carcass volatiles as attractants for the hide beetle Dermestes maculatus (De Geer). *Forensic Science International*, *212*(1-3), 173-179.

WHO. (1989). *Indoor Air Quality: Organic Pollutants* (pp. 23-27) [Report on a WHO Meeting, Berlin (West)]. World Health Organization Regional Office for Europe.

Wilson, A. D. (2014). Electronic-nose applications in forensic science and for analysis of volatile biomarkers in the human breath. *Journal of Forensic Science & Criminology*, *1*, 1-21.

Wolle, D. D., Banavara, D. S., & Rankin, S. A. (2006). Short Communication: Empirical and Mechanistic Evidence for the Role of Pyridoxal-5′-Phosphate in the Generation of Methanethiol from Methionine. *Journal of Dairy Science*, *89*(12), 4545-4550.

Yang, M., Li, H., Yang, T., Ding, Z., Wu, S., Qiu, X., & Liu, Q. (2018). A Study on the Estimation of Postmortem Interval Based on Environmental Temperature and Concentrations of Substance in Vitreous Humor. *Journal of Forensic Sciences*, *63*(3), 745-751.

Young, L. Y., & Rivera, M. D. (1985). Methanogenic degradation of four phenolic compounds. *Water Research*, *19*(10), 1325-1332.

Zhang, C., Hirano, T., Suzuki, T., & Shirai, T. (1992). Studies on the Odor of Fishes-II. Enzymatically Generated Specific Volatile Compounds in Ayu Tissues. *Nippon Suisan Gakk*, *58*, 559-565.

Apéndices

Apéndice A.

Aval para manipular y utilizar especímenes de Mus musculus *por parte del Comité de Ética en investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI-UIS).*

4110
Bucaramanga, 8 de mayo de 2024

Profesora
ELENA STASHENKO
Pregrado en Química
Escuela de Química
Facultad de Ciencias

Asunto: Aval Comité de Ética proyecto "Análisis por técnicas headspace de compuestos orgánicos volátiles emitidos durante la descomposición de cadáveres de ratón en suelo.".

Cordial Saludo.
El Comité de Ética en Investigación Científica de la Universidad Industrial de Santander (CEINCI) en reunión celebrada bajo la modalidad presencial el día 03 de mayo de 2024, según consta en el Acta N° 13 evaluó el proyecto del asunto y al respecto conceptúa que, en consideración a que el proyecto cumple con todos los requerimientos del CEINCI-UIS, acuerda por consenso, **APROBAR** la propuesta de acuerdo con la versión presentada.

De igual manera, aplicar según corresponda a la investigación, la normatividad del Sistema de Gestión Integral de la Universidad, que está disponible en el enlace: https://www.uis.edu.co/intranet/calidad/calidad.jsp, especialmente lo relacionado con el Manual de Gestión Integrado.

En caso de presentarse cualquiera de las siguientes circunstancias, solicitamos lo informe al correo comitedetica@uis.edu.co:

- Reporte de mala práctica científica por parte de cualquier miembro del equipo investigador.
- Notificación previa de las modificaciones realizadas al protocolo, las cuales deben ir aprobadas, mediante acta, por su Escuela en Química
- Reporte de cualquier eventualidad que usted considera deba conocer el CEINCI-UIS.
- Informe de avance sobre los aspectos éticos según guía e instructivo anexo. Este informe debe enviarse a la mitad del desarrollo de la investigación y al finalizar la misma según el cronograma establecido en el Formato FIN 65.
- El informe debe ser enviado al correo: ceinci.seguimientos@uis.edu.co

Finalmente, nos permitimos señalar que, durante el proceso de seguimiento que realiza el CEINCI se verificará el cumplimiento de las consideraciones éticas.

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Centro, Carrera 19 - calle 35 - 02, Piso 2.
PBX: (607) 6344000 Ext. 3808, Bucaramanga, Colombia.
E-mail: comitedetica@uis.edu.co http://www.uis.edu.co

4110
En nombre del CEINCI-UIS le ofrecemos el apoyo que usted considere necesario, para la aplicación y salvaguarda de los asuntos éticos durante la investigación.

Atentamente,

DANIEL RAFAEL MIRANDA ESQUIVEL
Presidente

LUZ EUGENIA IBÁÑEZ ALFONSO
Secretaria

Copia: Estudiantes Alejandra García Caicedo y Juan Diego Sanabria, (Estudiantes de Pregrado en Química)
Profesor Jairo René Martínez (Escuela de Química), codirector del proyecto de investigación
Profesor Julio Roberto Pinzón, Director de Escuela de Química
Archivo Comité de Ética en Investigación Científica.

Tabla de trazabilidad de la propuesta de investigación:

R	Ev	C	Ec	R2	Ev2	C2
6/3/24	15/3/24	P	22/3/24	15/4/24	3/5/24	A

Convenciones de la tabla de trazabilidad:

R: Remisión de documentos o respuesta del investigador.
Ev: Evaluación del CEINCI.
C: Concepto del CEINCI.
Ec: Entrega de carta del CEINCI al investigador.
A: Aprobado.

Elaboró: Maritza Jaimes
Revisó y aprobó: Luz Eugenia Ibáñez y Daniel Miranda

VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA
Centro, Carrera 19 - calle 35 - 02, Piso 2.
PBX: (607) 6344000 Ext. 3808, Bucaramanga, Colombia.
E-mail: comitedetica@uis.edu.co http://www.uis.edu.co

Apéndice B.

Blanco: caracterización química de la fracción volátil del sistema de extracción.

N° pico, Fig. A2	Compuesto	Índices de retención lineales DB-WAX		Cantidad relativa GC, %
		Exp	Lit	
1	Hexametilciclotrisiloxano[a]	838	-	11.43
2	Diclorometano[a,b]	919	919[c]	13.84
3	Metil metacrilato[a,b]	1007	1008[c]	57.58
4	Ciclohexanona[a,b]	1294	1285[c]	17.15

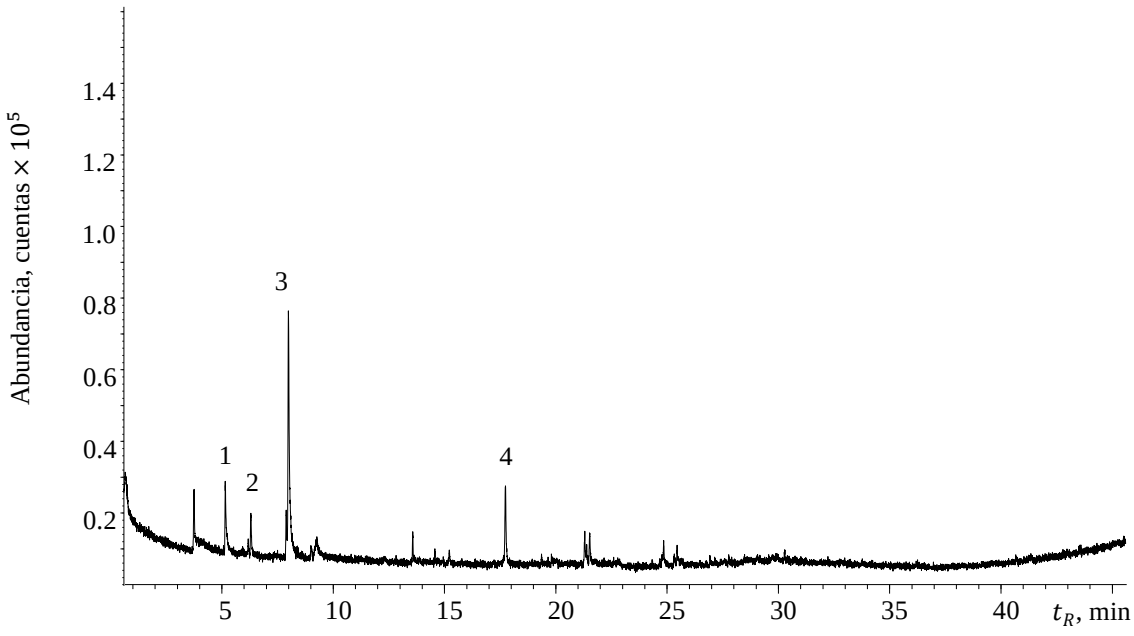
[a] Identificación tentativa basada en los espectros de masas (EI, 70 eV, grado de coincidencia > 90 %);

[b] Identificación tentativa basada en los índices de retención lineales en la columna DB-WAX;

[c] Base de datos NIST (2017)

Apéndice C.

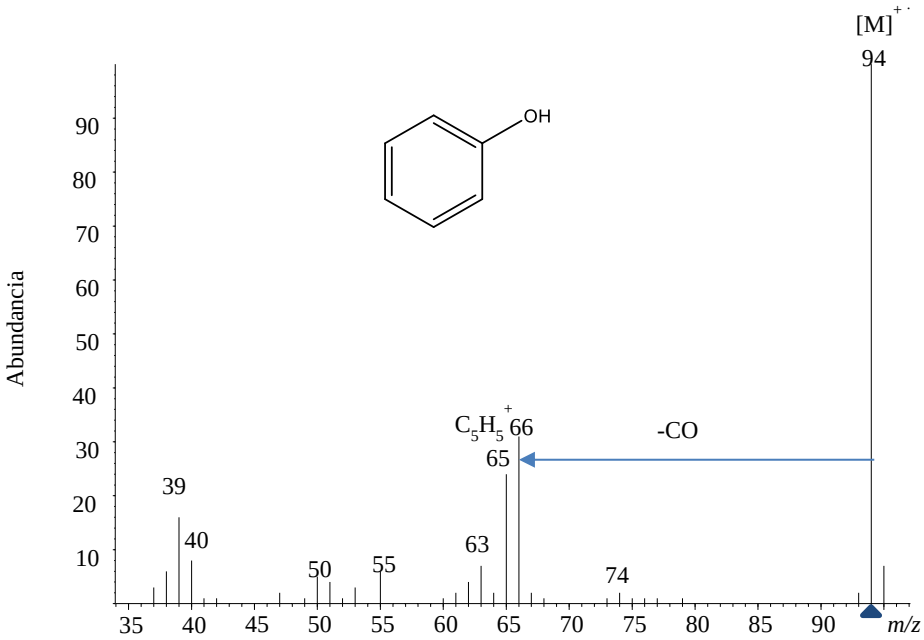
Blanco: perfil cromatográfico obtenido por GC/MS de la fracción volátil de sistema de extracción.



Nota. Columna DB-WAX (60 m). Split 1:30. MSD (EI, 70 eV). La identificación de cada pico cromatográfico se presenta en la **Apéndice B.**

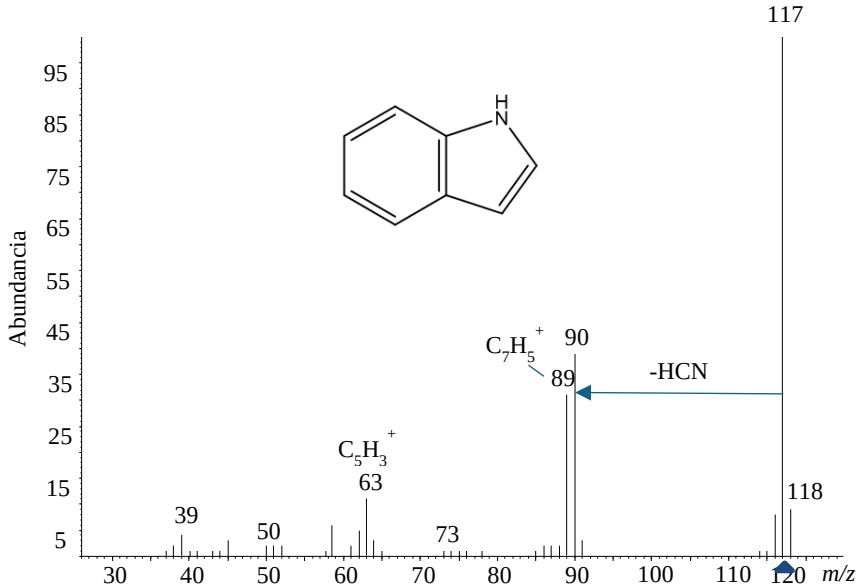
Apéndice D.

Espectro de masas del fenol C_6H_6O, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 94 m/z; $[M\text{-}CO]^+$ 66 m/z m/z; $C_5H_5^+$ 65 m/z. Véase pico cromatográfico N°21 en la ***Tabla 6****.*



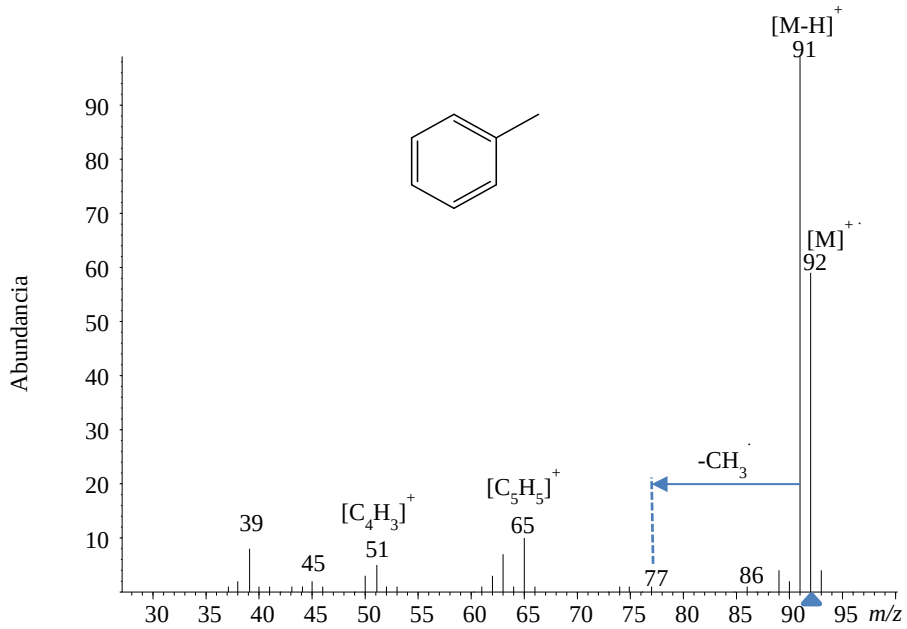
Apéndice E.

Espectro de masas del indol C_8H_7N, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 117 m/z; $[M\text{-}HCN]^+$ 90 m/z; $C_7H_5^+$ 89 m/z, $C_5H_3^+$ 63 m/z. Véase pico cromatográfico N°22 en la ***Tabla 6.***



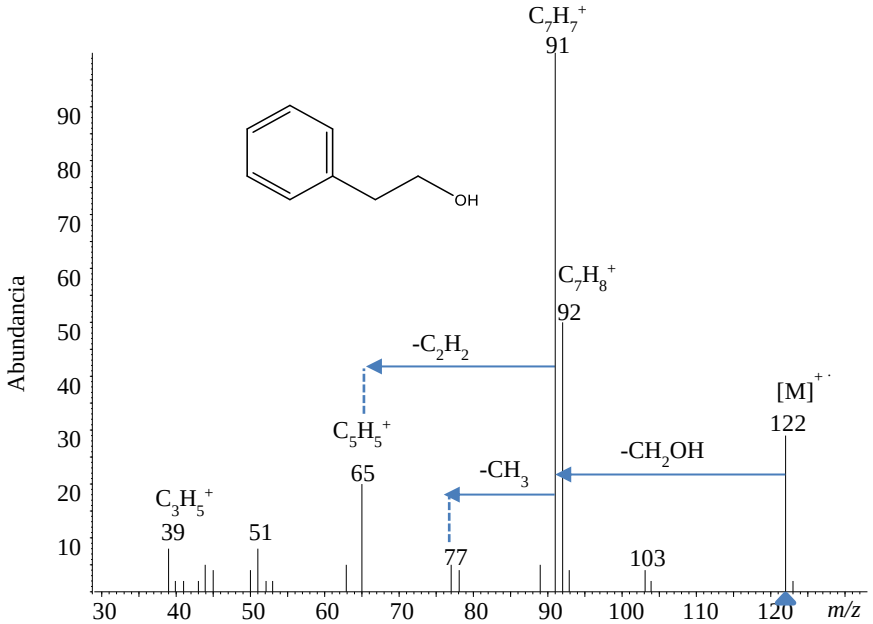
Apéndice F.

Espectro de masas del alcohol feniletílico $C_8H_{10}O$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de ratón en descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 122 m/z; $C_7H_8^+$ 92 m/z, $[M\text{-}CH_2OH]^+$ 91 m/z; $[M\text{-}C_2H_5OH]^+$ 77 m/z, $C_5H_5^+$ 65 m/z. Véase pico cromatográfico N°44 en las ***Tablas 7*** *y* ***8.***



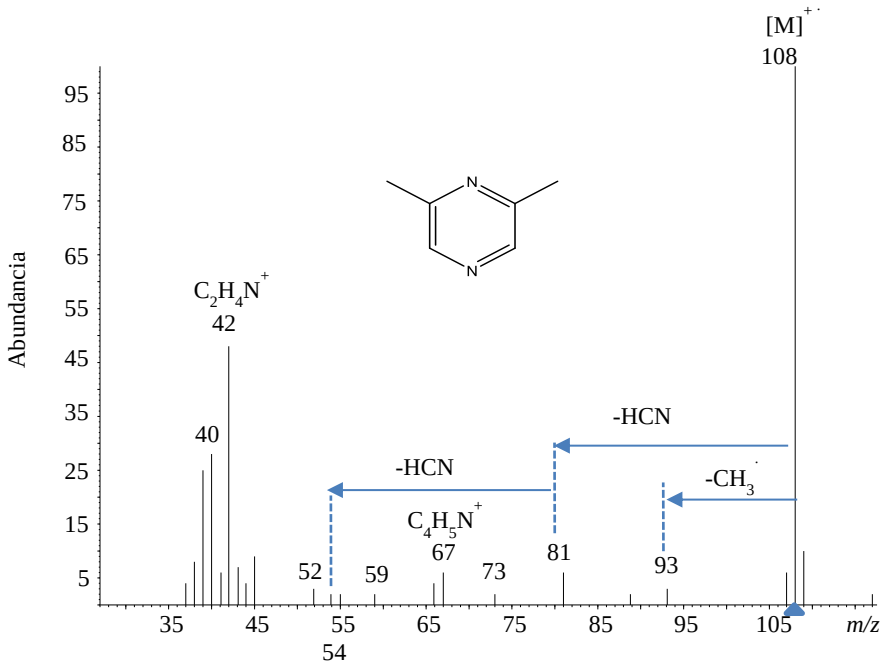
Apéndice G.

Espectro de masas del tolueno C_7H_8, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de ratón en descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 92 m/z; $C_7H_7^+$ 91 m/z, $[M\text{-}CH_3]^+$ 77 m/z, $C_5H_5^+$ 65 m/z, $C_4H_3^+$ 51 m/z. Véase pico cromatográfico N°17 en las ***Tablas 7*** *y* ***8.***

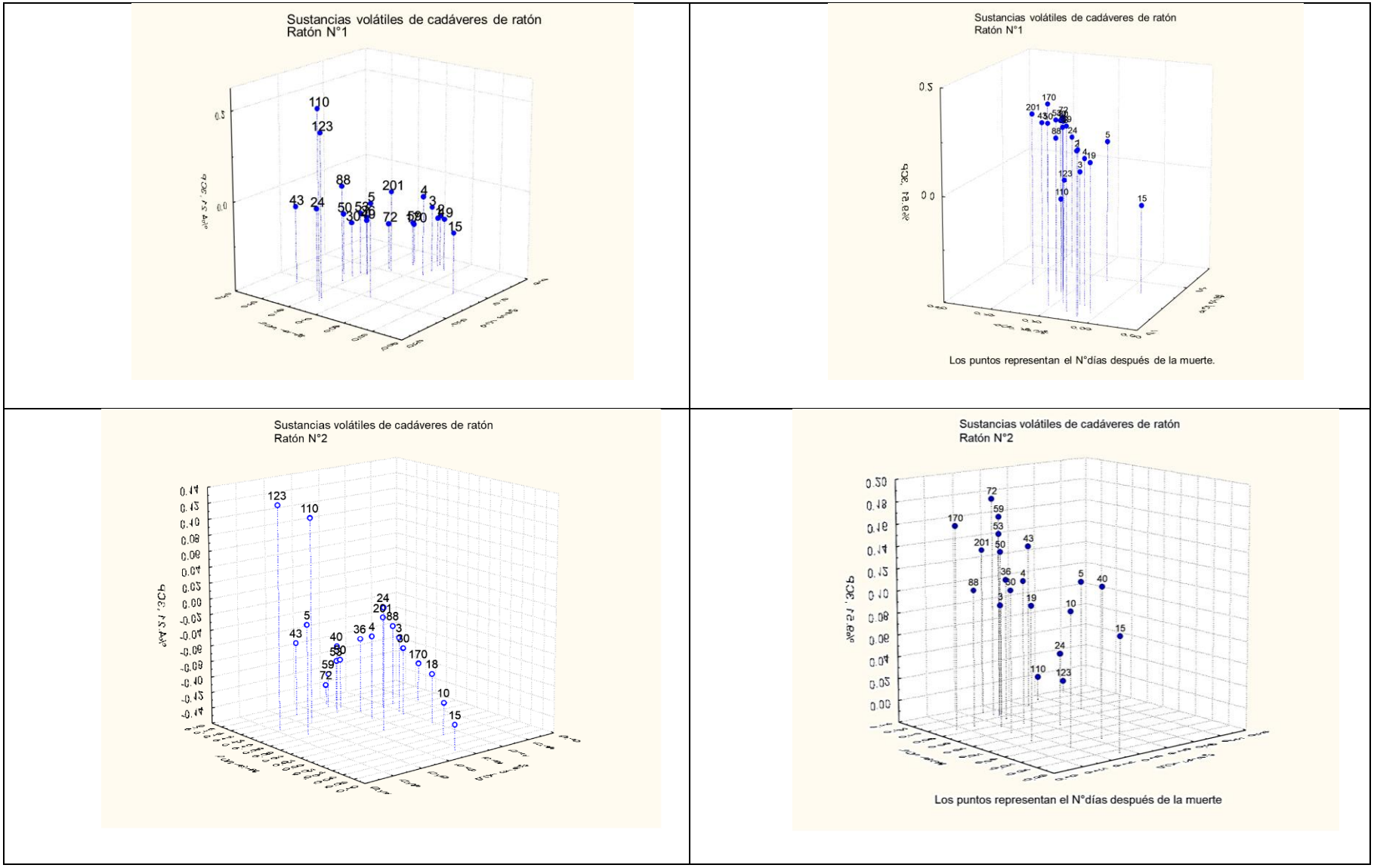


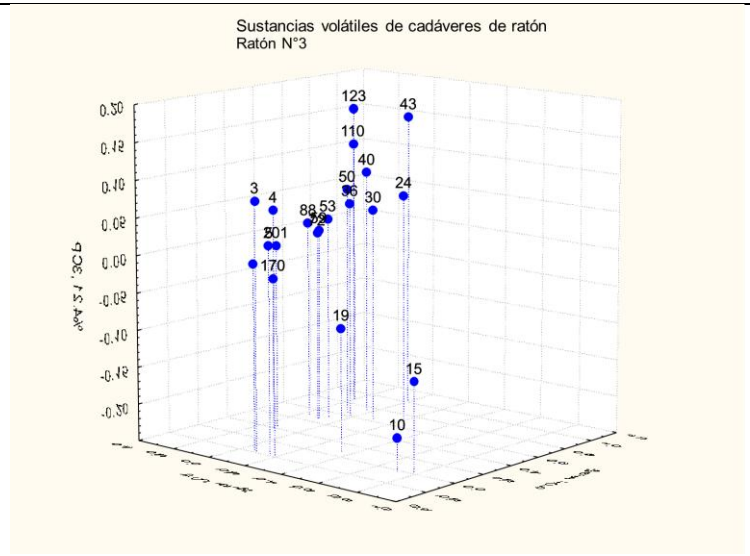
Apéndice H.

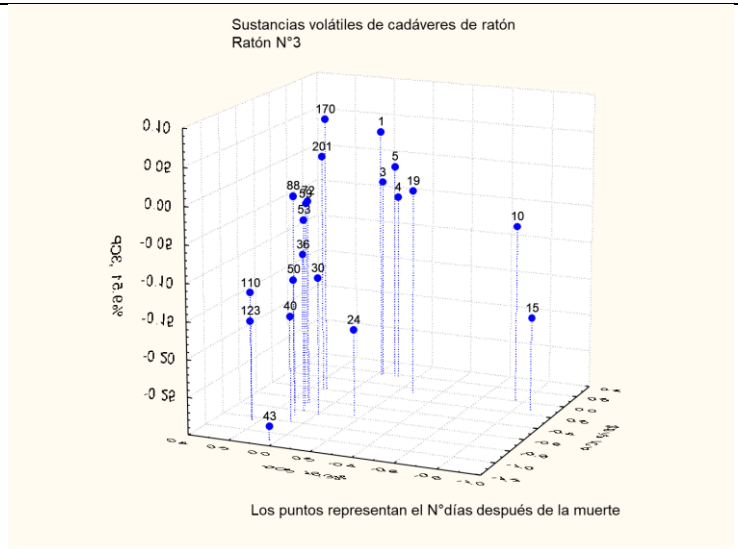
Espectro de masas del 2,6-dimetilpirazina $C_6H_8N_2$, obtenido por GC/MS (EI, 70 eV), presente en la fracción volátil de pollo en el quinto día de descomposición: $[M^{+\cdot}]$ 108 m/z; $[M\text{-}CH_3]^+$ 93 m/z; $C_4H_5N^+$ 67 m/z, $C_2H_4N^+$ 42 m/z. Véase pico cromatográfico N°28 en las ***Tablas 7 y 8***

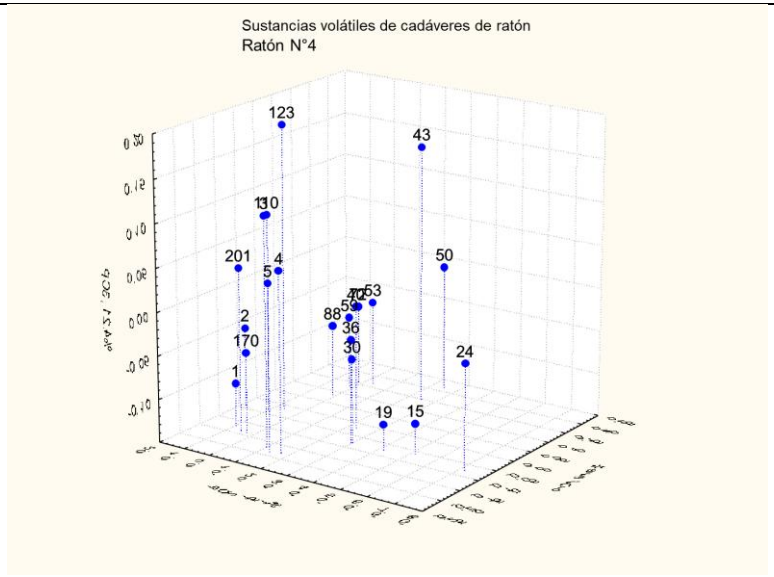


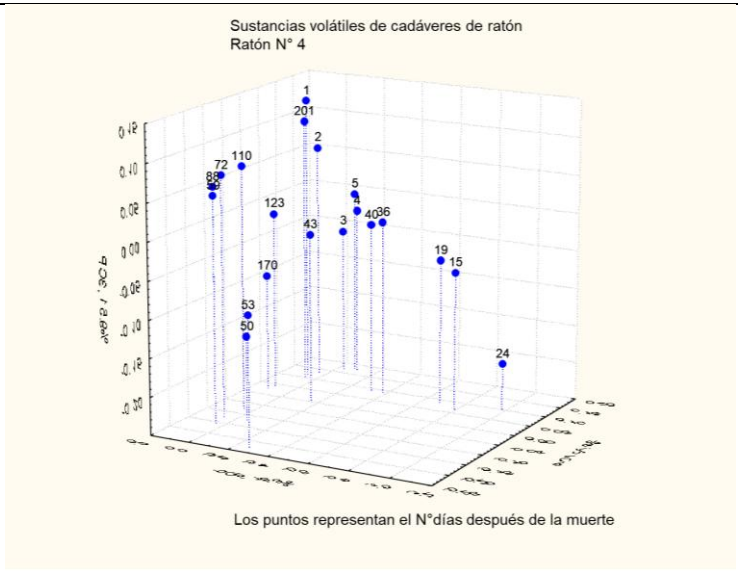
Apéndice I. *Comparación de los perfiles VOC de cada ratón, representados por dos conjuntos diferentes de componentes principales.*




Sustancias volátiles de cadáveres de ratón
Ratón N°3


Sustancias volátiles de cadáveres de ratón
Ratón N°3
Los puntos representan el N°días después de la muerte


Sustancias volátiles de cadáveres de ratón
Ratón N°4


Sustancias volátiles de cadáveres de ratón
Ratón N° 4
Los puntos representan el N°días después de la muerte

Apéndice J.

Certificado de participación en modalidad de póster en los congresos X1 COCOCRO, XIX COLACRO, III SPAE, XXVI EXTECH, XVI LASEAC, WARPA, realizados del 13 al 15 de noviembre del 2024 en Neomundo, Bucaramanga.

XI CONGRESO COLOMBIANO DE CROMATOGRAFÍA BUCARAMANGA 2024 | XIX CONGRESO LATINOAMERICANO DE CROMATOGRAFÍA Y TÉCNICAS AFINES | XXVI EXTECH BUCARAMANGA 2024 | SPAE | WARPA | XVI LASEAC

El comité organizador del XI Congreso Colombiano de Cromatografía, XIX Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines, XXVI Simposio Internacional sobre Avances en Tecnologías de Extracción, III Simposio Panamericano de Aceites Esenciales, XVI Simposio Latinoamericano de Química Analítica y Ambiental y Curso+Taller: SPME+Avances Recientes en Preparación de Muestras WARPA, certifican que el trabajo titulado:

Chemical characterization of the volatile fraction of decomposing chicken using HS-SPME-GC/MS

de autoría de **Alejandra García, Juan D. Sanabria, Lady J. Sierra, Jairo R. Martínez, Elena E. Stashenko,** fue presentado en modalidad poster, en dicho evento realizado en Bucaramanga, Colombia del 13 al 15 de noviembre de 2024.

Se firma el 19 de noviembre de 2024

Dra. Elena Stashenko
Presidente comité científico
XI COCOCRO, XIX COLACRO, XXVI EXTECH, III SPAE

Dr. Milton Rosero
Presidente comité científico
XVI LASEAC, WARPA

Dra. Diana C. Sinuco L.
Presidente comité organizador
EVENTO GENERAL

Apéndice K.

Certificado de participación en modalidad de ponencia oral en los congresos X1 COCOCRO, XIX COLACRO, III SPAE, XXVI EXTECH, XVI LASEAC, WARPA, realizados del 13 al 15 de noviembre del 2024 en Neomundo, Bucaramanga.