

UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO



CAMPUS GUANAJUATO

DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS

POSGRADO EN QUÍMICA

“ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASA EN ACEITES COSMÉTICOS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS CON ENFOQUE EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN: MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Presenta:

Q. MISSAEL ANTONIO ARROYO NEGRETE

Director: Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-director: Dr. Kazimierz Wrobel

Miembro del Comité Tutorial: Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Guanajuato, Gto. 1 de Agosto del 2017

Guanajuato, Gto. 1 de Agosto del 2017

Por medio de la presente se responsabiliza de la autenticidad y originalidad del presente trabajo titulado **“ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASA EN ACEITES COSMÉTICOS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS CON ENFOQUE EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS”**, realizado por el Q. MISSAEL ANTONIO ARROYO NEGRETE, para obtener el título de **MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (M.C)**, en las Instalaciones del Campus Guanajuato en el Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Director:

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Co-Director:

Dr. Kazimierz Wrobel

Miembros del jurado

Miembros del H. Jurado asignados para el examen recepcional que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas presenta el **Q. Missael Antonio Arroyo Negrete**, con el trabajo titulado:

**“ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASA EN ACEITES COSMÉTICOS UTILIZANDO
DIFERENTES TÉCNICAS ANALÍTICAS CON ENFOQUE EN ESPECTROMETRÍA DE
MASAS”**

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Dra. Eunice Yañez Barrientos

Dr. Armando Gómez Ojeda..

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar.

Agradecimientos

A mis asesores Dra. Katarzyna Wrobel y Dr. Kazimierz Wrobel por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y por el grato apoyo mostrado en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Francisco Acevedo por su tutoría en las técnicas realizadas.

A los miembros de la coordinación del posgrado en Química, Carolina, Karina y la Dra. Esthela por su labor que realizan para el posgrado.

A mis compañeros de laboratorio por los momentos compartidos.

Al CONACYT por la beca otorgada.

Dedicatoria

Para Ana, mi familia y amigos.

Índice General

Índice de tablas	VII
Índice de figuras	X
Lista de abreviaturas	XI
Capítulo I MARCO TEÓRICO	1
1.1 Los lípidos y su clasificación.	1
1.1.2 Nomenclatura de ácidos grasos	4
1.2 Lípidos en aceites vegetales	5
1.2.1 Análisis de lípidos de aceites vegetales.....	7
1.3 Espectrometría de masa en el análisis de aceites vegetales	13
1.3.1 Fuentes de ionización	14
1.3.2 Separadores de masa.....	20
1.3.3 Cuadrupolo (Q) como filtro de masas	20
1.3.4 Analizador de tiempo de vuelo (TOF)	22
1.3.5. Ejemplos de análisis de TAGs y de FAMES utilizando ESI-MS y MALDI-TOF-MS	25
1.4 Aceite de ricino.....	27
1.4.1 Caracterización del aceite de ricino por espectrometría de masas.....	31
CAPITULO II OBJETIVOS.....	33
2.0 Objetivo General	33
2.1 Objetivos particulares.....	33
CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1 Materiales y reactivos	34
3.1.2 Muestras reales	34
3.2 Instrumentación.....	35

3.3 Resumen de procedimientos analíticos.	35
3.3.1 Perfil de TAGs por MALDI-TOF (procedimiento adaptado)	35
3.3.2 Determinación de FAMEs por FIA-ESI-QTOF (procedimiento desarrollado en este trabajo).	36
3.3.3 Determinación de FAMEs por GC-FID (procedimiento adaptado).....	40
3.4 Análisis de datos.	42
CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1 Perfil de TAGs por MALDI-TOF-MS.....	43
4.2 Desarrollo de un nuevo procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS para la determinación de FAMEs en aceites vegetales.	49
4.3. Análisis de los FAMEs en aceites de ricino por GC-FID.	60
4.4. Resultados de determinación de los FAMEs en aceites cosméticos por FIA-ESI-QTOFMS y por GC-FID.	61
CAPÍTULO V CONCLUSIONES	72
5.1 Conclusiones.....	72
Bibliografía	74
CAPÍTULO VI ANEXOS	77
Anexo A	77

Índice de tablas

Tabla 1 Categorías y ejemplos de lípidos	1
Tabla 2 Construcción del identificador LIPID MAPS (LM_ID).....	3
Tabla 3 Abreviaturas de algunos FA.	5
Tabla 4 Composición en porcentaje de ácidos grasos en aceites vegetales en diferentes semillas de plantas ⁵	6
Tabla 5 Resumen de técnicas aplicadas en el análisis de aceites vegetales.....	12
Tabla 6 Resumen de distintos métodos de ionización utilizados en espectrometría de masas.....	15
Tabla 7 Matrices de uso común en el análisis MALDI-TOF de lípidos.	18
Tabla 8 Métodos de deposición de muestra/matriz en placa.	19
Tabla 9 Analizadores de masas comunes para la espectrometría de masas.	21
Tabla 10 Algunos ejemplos de aplicaciones de MALDI-TOF y ESI-QTOF en el análisis de lípidos en aceites vegetales.	26
Tabla 11 Aplicaciones de ácidos grasos del aceite de ricino.	29
Tabla 12 Reacciones del Aceite de ricino ³⁷	30
Tabla 13 Muestras de aceite de ricino empleadas.	34
Tabla 14 Condiciones instrumentales utilizadas en el análisis de TAGs mediante MALDI-MS.....	36
Tabla 15 Condiciones instrumentales utilizadas en el análisis de FAMES por FIA-ESI-QTOF-MS.....	38
Tabla 16 Iones monitoreados por FIA-ESI-QTOF	39
Tabla 17 Condiciones instrumentales para el análisis de FAMES por GC-FID.....	41
Tabla 18 Preparación de matrices.....	44
Tabla 19 Asignaciones TAGs en aceite de ricino	48
Tabla 20 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMES insaturados mediante área.	56
Tabla 21 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMES saturados mediante área.	57
Tabla 22 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMES insaturados mediante intensidad.	57

Tabla 23 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMEs saturados mediante intensidad.	58
Tabla 24 Límites de detección y límites de cuantificación evaluados en el proceso de calibración utilizando altura de pico (I) y area del pico (A) de los FAMEs y del IS.	59
Tabla 25 Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-FID.	61
Tabla 26 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Guadalajara. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	63
Tabla 27 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Farmacon. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	64
Tabla 28 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Inodrim. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	65
Tabla 29 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Tecnofarma. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	65
Tabla 30 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Crystal. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba	

<i>t</i> de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	66
Tabla 31 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Pris. (se presentan valores promedio <i>c</i> , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; <i>p</i> – valor obtenido en prueba <i>t</i> de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	66
Tabla 32 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Linat. (se presentan valores promedio <i>c</i> , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; <i>p</i> – valor obtenido en prueba <i>t</i> de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).....	67

Índice de figuras

Figura 1 Ejemplo de las categorías de lípidos y estructuras representativas de cada grupo de clasificación LIPID MAPS	2
Figura 2 Esquema de la reacción de transesterificación del triglicérido del ácido ricinoleico, el cual es el componente mayoritario en el aceite de ricino.	8
Figura 3 Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas.	14
Figura 4 Analizador de masa de cuadrupolo.	20
Figura 5 Esquema de los procesos que ocurren durante el proceso de ionización MALDI-TOF en el espectrómetro de masas.	24
Figura 6 Triglicérido triricinoleína.	27
Figura 7 Estructura del ácido ricinoleico.	28
Figura 8 Esquema de preparación de las soluciones de calibración y concentraciones finales para cada FAME para el sistema FIA-ESI-QTOF.	37
Figura 9 Esquema de preparación de las soluciones de calibración y concentraciones finales para cada FAME para el sistema GC-FID.	40
Figura 10 Espectros MALDI-TOF para a) muestra de aceite de ricino y b) matriz DHB.	45
Figura 11 Espectros de masa obtenido para la matriz DHB utilizada, así como tres diferentes aceites de ricino comerciales por MALDI-TOF.	46
Figura 12 Región m/Z 870-910 de la muestra de aceite de ricino comercial Wetts.	47
Figura 13 Diagramas obtenidos en la calibración de FAMEs para ácidos grasos insaturados (cada estándar inyectado por triplicado).	53
Figura 14 Diagramas obtenidos en la calibración de FAMEs de ácidos grasos saturados.	54
Figura 15 Distribución relativa de FAMEs en aceites de ricino.	70

Lista de abreviaturas

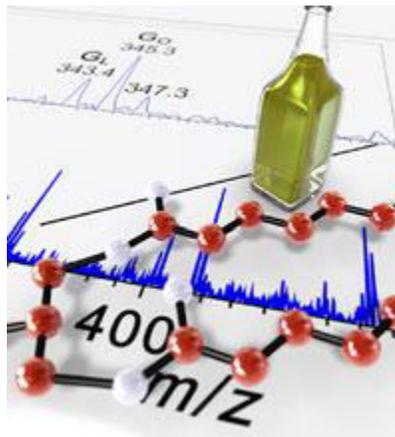
¹ H-NMR	Resonancia magnética nuclear de protón
3DFS	Espectro tridimensional de fluorescencia
9AA	9-aminoacridina
API	Ionización a presión atmosférica
cd	Corriente directa
CI	Ionización química
DAG	Diacilglicerido
DAN	1,5 diaminonaftaleno
DHB	Ácido 2,5 dihidroxibenzoico
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMOX	4,4-Dimetiloxazolina
EI	Ionización por electrones
EIC	Cromatograma de iones extraídos
ELSD	Detector evaporativo de dispersión de luz
ESI	Ionización por electro-nebulización
EVOO	Aceite de olivo extra virgen
FA	Ácidos grasos
FAB	Bombardeo rápido de electrones
FIA	Análisis por inyección en flujo
FID	detector de ionización en llama
FT-IR	Infrarrojo con transformada de Furrier
GC	Cromatografía de gases
GL	Glicerolípidos
GP	Glicerofosfolípidos
HCCA	ácido α ciano 4-hidroxicinámico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IR	Detector de índice de refracción
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LA	Ácido linoleico
m/z	Relación masa/carga
MALDI	Desorción/ionización laser asistida por matriz
MS	Espectrometría de masas
NaOMe	Metóxido de sodio
NIRS	Espectroscopia de infrarrojo cercano
PAN	<i>p</i> -nitroanilina
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PK	Policétido
PS	Fosfatidilserina

PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
Q	Cuadropolo
rf	Radio frecuencia
RM	Microespectroscopia Raman
RP	Fase inversa
RRL	Diricinoleoilinoleoilglicerol
RRO	Diricinoleoiloleoilglicerol
RRP	Palmitoildiricinoleoilglicerol
RRR	Triricinoleina, triricinoleoilglicerol
RRS	Diricinoleoilesteroilglicerol
SL	Sacarolípidos
SP	Esfingolípidos
TAG	Triglicéridos
TIC	Cromatograma de iones totales
TLC	Cromatografía en capa delgada
TOF	Detector tiempo de vuelo



Universidad de Guanajuato

CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO



1.1 Los lípidos y su clasificación.

Los lípidos se definen comúnmente como un conjunto de compuestos orgánicos que son de naturaleza hidrófoba, pero solubles en disolventes orgánicos. Tal definición no es universalmente aceptada ya que es demasiado general y no incluye aquellos lípidos que presentan polaridad suficiente y que difunden con facilidad en la fase acuosa durante el proceso de extracción de lípidos, lo que causa ambigüedad en su clasificación. Una definición más precisa se obtiene cuando los lípidos se consideran desde un punto de vista estructural y una perspectiva biosintética, debido a las diferentes transformaciones que se producen durante su biosíntesis se obtiene una gran diversidad de estructuras para los lípidos. Este nivel de diversidad hace que sea trascendental utilizar un sistema de clasificación, nomenclatura y representación química para dar cabida a la diversidad de lípidos que existen en la naturaleza.¹ El sistema de clasificación más utilizado actualmente fue desarrollado y establecido por la Clasificación Internacional de Lípidos y el Comité de Nomenclatura por iniciativa del consorcio LIPID MAPS, este sistema de clasificación se basa en las propiedades químicas y principios bioquímicos de los lípidos, constituyéndolos en ocho categorías (Tabla 1).^{2, 3}

Tabla 1 Categorías y ejemplos de lípidos

Categoría	Abreviación	Ejemplo
Ácidos grasos	FA	Ácido hexadecanoico
Glicerolípidos	GL	1-hexadecanoil-2-(9 Z-octadecanoil)-sn-glicerol
Glicerofosfolípidos	GP	1-hexadecanoil-2-(9 Z-octadecanoil)-sn-glicero-3-fosfocolina
Esfingolípidos	SP	N-(tetradecanoil)-esfing-4-onina
Esterol lípidos	ST	Coleste-5-en-3 β -ol
Prenol lípidos	PR	2E,6E-farnesol
Sacarolípidos	SL	UDP-3-O-(3R-hidroxi-tetradecanoil)- α D-N-acetilglucosamina
Policétidos	PK	aflatoxin B ₁

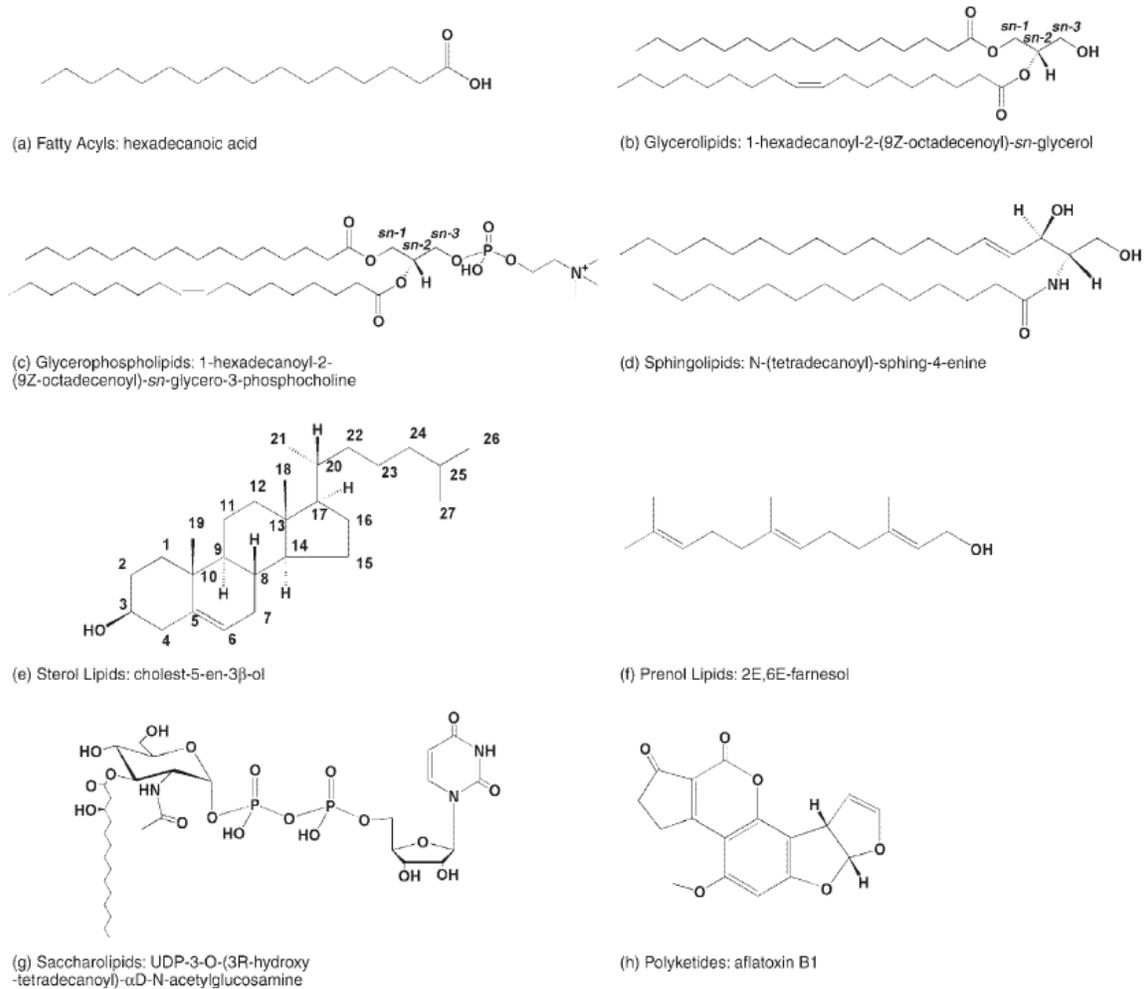


Figura 1 Ejemplo de las categorías de lípidos y estructuras representativas de cada grupo de clasificación LIPID MAPS

Desde el punto de vista estructural, los ácidos grasos (FAs) constituyen la clase más simple de lípidos. Estos compuestos poseen actividades biológicas importantes, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los FAs también son componentes estructurales de los lípidos con un mayor nivel de complejidad estructural, tales como glicerolípidos (GL), es decir, monoacilgliceroles, diacilgliceroles, y triglicéridos (TAGs). Los glicerofosfolípidos (GP) que se definen por la presencia de un grupo fosfato esterificado (o fosfonato) a uno de los grupos hidroxilo del glicerol, son componentes clave de las membranas celulares siendo los más abundantes la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilserina (PS), aunque también se encuentran

involucrados en distintas funciones tales como el metabolismo y la señalización. Otra categoría bien definida son los esfingolípidos (SP); estos se derivan de esfingosina (un aminoalcohol insaturado de 18 carbonos) que a su vez es formada por la condensación de palmitoil-CoA y serina. La clasificación de los "sacarolípidos" (SL) abarca los lípidos en los que los grupos acilo grasos están vinculados directamente a un esqueleto de azúcar. Este grupo SL es distinto del término "glicolípidos" que fue definido por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) como un lípido en el que está presente en un enlace glicosídico a la porción acilo graso de la molécula. La última categoría son los policétidos (PK), que son un grupo diverso de metabolitos formados a partir de fuentes microbianas y de plantas. En la Figura 1 se presentan distintos ejemplos de lípidos utilizando este sistema de clasificación.

Cada categoría se divide aún más en clases, subclases, con lo que a cada lípido se le asigna un único identificador de 12 o 14 caracteres (LIPID MAPS ID o "LM ID") basado en este esquema de clasificación. El formato de la LM ID contiene información de la clasificación, proporciona un medio sistemático para asignar una identificación única a cada molécula de lípido. Los cuatro últimos caracteres del identificador de LM comprenden un único identificador dentro de una subclase particular y son asignados al azar (Tabla 2)⁴.

Tabla 2 Construcción del identificador LIPID MAPS (LM_ID)

Características	Descripción	Ejemplo
1 - 2	Designación fija de base de datos	LM
3 - 4	2-letras de código de categoría	FA
5 - 6	2-dígitos código de clase	03
7 - 8	2-dígitos código de subclase	02
9- 12	Únicos 4 caracteres de identificador con subclase	0016

Las distintas clases de lípidos merecen interés debido a sus propiedades y funciones diversas, por ejemplo:

- Los GP son componentes importantes de las membranas biológicas.

- Son importantes reservorios de energía.
- Importantes en la nutrición debido a la oxidación de los FAs que proveen gran parte de la energía fisiológica necesaria, estos se encuentran en grasas y aceites vegetales.
- Los TAGs en los aceites vegetales son importantes recursos para la producción de biodiesel, la cual alcanza de millones de toneladas al año y son una alternativa a los combustibles fósiles.

1.1.2 Nomenclatura de ácidos grasos

Los ácidos grasos comúnmente reciben nombres triviales relacionados con su procedencia, como el ácido linoleico (LA) u otros incluidos en la Tabla 3. En cuanto al nombre sistemático, existen dos sistemas de nomenclatura: (1) sistema delta en el que se asigna el enlace doble contando átomos de carbono a partir del grupo carboxílico y (2) sistema omega o n , donde los átomos de carbono se cuentan a partir de grupo metilo terminal. En ambos casos, los FAs adoptan el nombre de hidrocarburo parental. Se presenta el número total de carbonos y se marca el número de enlaces dobles asumiendo que, si se presentan más de uno, los sucesivos son separados por un grupo metilo. La geometría del enlace etilénico se muestra como *cis* o *trans*. De esta manera, el nombre sistemático del LA es el ácido *cis*-9, *cis*-12-octadecanoico y su abreviatura $C18:2\Delta^{9c,12c}$ en sistema delta o simplemente $C18:2$ *cis*-9,12. El isómero del ácido linoleico conjugado (CLA) con enlaces *cis* y *trans* se abrevia como $C18: 2\Delta^{9c,11t}$. Por su parte, utilizando la nomenclatura ω o n , los FA se describen en las familias de ω -3, ω -6 y ω -9: en el caso de LA la anotación es $C18: 2\omega$ -6 o $18:2n - 6$.

Tabla 3 Abreviaturas de algunos FA.

Ácido graso	Abreviatura	Ácido graso	Abreviatura
Ácido Caprílico	C8:0	Ácido Elaídico	C18:1, trans-9
Ácido Cáprico	C10:0	Ácido Oleico	C18:1, cis-9
Ácido Láurico	C12:0	Ácido Linoleico	C18:2, cis-9,12
Ácido Tridecanoico	C13:0	Ácido Araquídico	C20:0
Ácido Mirístico	C14:0	Ácido Linolénico	C18:3, cis-9,12,15
Ácido Miristoleico	(C14:1, cis-9)	Ácido cis-11-eicosenoico	C20:1, cis-11
Ácido Pentadecanoico	C15:0	Ácido Behénico	C22:0
Ácido Palmítico	C16:0	Ácido Erúcico	C22:1, cis-13
Ácido Palmitoleico	C16:1, cis-9	Ácido Ricinoleico	12-hidroxi C18:1, cis-9
Ácido Esteárico	C18:0		

En el caso de derivados de FA, la anotación incluye los sustituyentes y su posición; tal es el caso de ácido ricinoleico que presenta el grupo hidroxilo en el carbono 12: 12-hidroxi C18:1, cis-9.

1.2 Lípidos en aceites vegetales

Desde un punto de vista de composición química, los aceites vegetales son mezclas complejas de compuestos, principalmente los TAGs y otros componentes minoritarios representados por varias moléculas como son FAs y DAGs; componentes como son los ésteres, alcanos, esteroides triglicéridos oxidados, tocoferoles, tocotrienoles, compuestos fenólicos y fosfolípidos pueden estar presentes en pequeñas cantidades. La calidad de un aceite vegetal para su aplicación en la elaboración de alimentos o su uso en la industria en la producción de cosméticos, jabones, lubricantes, pinturas, biodiesel, etc., depende en gran medida de su composición y en consecuencia, de sus propiedades fisicoquímicas.

Los aceites vegetales más comunes tienen perfiles de TAG en los que predominan los ácidos grasos insaturados tales como el ácido oleico y ácido

linoleico, presentando también cantidades menores de ácidos grasos saturados como el palmítico y esteárico. Dependiendo del tipo de planta la variedad y la proporción de FAs en aceites puede cambiar de manera importante, ejemplo de esto son el aceite de oliva donde el 70% de sus ácidos grasos corresponden al ácido oleico, mientras que el aceite de soja y el aceite de maíz contiene 50-60% de ácido linoleico. Otro ejemplo relevante en este trabajo de tesis es el aceite de ricino, un aceite que contiene hasta el 90% de ácido ricinoleico (12-hidroxi C18:1, cis-9). En la Tabla 4 se presentan la composición de algunos aceites vegetales obtenidos de diferentes semillas de plantas.

Tabla 4 Composición en porcentaje de ácidos grasos en aceites vegetales en diferentes semillas de plantas⁵.

Aceite vegetal	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C18:4	C20:0	C20:1	C20:2	C22:0	C22:1	C18 OH
Canola	4.37	-	2.0	61.6	20.38	8.47	-	0.66	1.35	-	0.33	0.06	-
Algodón	26.23	-	1.3	13.3	59.13	-	-	-	-	-	-	-	-
Maíz	11.9	-	2.0	24.9	33.65	-	-	-	-	-	-	-	-
Avellana	5.93	0.24	2.86	66.92	21.31	0.22	-	0.29	0.165	-	0.7	0.05	-
Jojoba	1.08	0.21	-	7.22	-	-	-	0.23	37.55	-	0.29	11.15	-
Moringa	6.5	2	6	72.2	1	-	4	2	-	-	-	-	-
Mostaza	4.32	0.21	1.25	9.26	13.79	18.79	-	0.95	5.27	0.7	1.09	40.10	-
Olivo Kernel	5	0.3	1.6	74.7	17.6	0	0,8	-	-	-	-	-	-
Olivo Pormance	12.22	-	-	74.37	9.84	0.59	-	-	-	-	-	-	-
Palma	39.83	0.17	5.33	41.9	11.46	0.15	-	-	-	-	-	-	-
Girasol	7.95	-	1.91	12.59	77.54	-	-	-	-	-	-	-	-
Soja	12.13	0.3	3.49	23.41	54.18	6.5	3	-	-	-	-	-	-
Ajonjolí	11.2	-	5.22	41.91	40.08	-	-	-	-	-	-	-	-
Nuez	7.2	0.2	2.25	16.8	58.35	14.5	-	-	-	-	-	-	-
Amapola	11.19	0.11	3.46	18.67	64.33	0.55	-	-	-	-	-	-	-
Ricino MY*	1.3	-	1.2	5.5	7.3	0.5	-	-	-	-	-	-	84.2
Ricino BT*	0.7	-	0.9	2.8	4.4	0.2	-	-	-	-	-	-	90.2
Ricino IN*	-	1.0	-	4.3	-	-	-	-	-	-	-	-	94.0
Ricino MX*	0.23	-	0.72	2.08	2.38	0.29	-	-	-	-	-	-	94.3

* MY= Malasia, BT= Brasil, IN=India, MX = México

Además del tipo de planta/semilla, existen otros factores que influyen en la composición de los aceites vegetales, entre ellos: el método empleado para su extracción/elaboración, la región geográfica de procedencia, contaminación medioambiental en el lugar de cultivo de planta, parámetros meteorológicos y también factores asociados con almacenamiento. En un reciente estudio, Thays H. Borges et al. analizaron una serie de aceites de olivo extra virgen (EVOO) de semilla Arbequina procedentes de distintas regiones de Brasil y España, donde evaluaron parámetros de calidad, estabilidad oxidativa, pigmentos, color y principalmente el perfil de ácidos grasos buscando posibles correlaciones entre estos parámetros y las condiciones geográficas y climáticas⁶. Los autores sugieren que las diferencias significativas encontradas en el perfil de ácidos grasos se deben a las condiciones geográficas y climáticas. Sin embargo, la variabilidad en la composición de un aceite específico puede deberse a la adulteración del producto con la sustitución de componentes de menor calidad⁷. Por esta razón la caracterización de aceites vegetales es de suma importancia, la cual puede ser abordada por el análisis de TAGs y de FAs utilizando diferentes métodos analíticos.

Este trabajo de tesis se enfoca en el análisis de ácidos grasos en aceites de ricino utilizados como productos cosméticos.

1.2.1 Análisis de lípidos de aceites vegetales

Los componentes mayoritarios de aceites vegetales son triglicéridos de ácidos grasos saturados e insaturados. El punto clave en la caracterización de aceites vegetales, es hallar la composición de ácidos grasos enlazados mediante el grupo acilo a glicerol enfocándose en la longitud de la cadena de carbono, el grado y posición de insaturación, isomería *cis*- y *trans*- y presencia de otros sustituyentes en la cadena alifática (por ejemplo, grupos hidroxilo, amino, etc.). La determinación de ácidos grasos presentes en TAGs tradicionalmente se lleva a cabo mediante la reacción de transesterificación obteniéndose esteres metílicos

de los ácidos grasos (FAMES por sus siglas en Inglés) que posteriormente son analizados por cromatografía de gases con detector de ionización en flama (GC-FID) ⁸. En la determinación de los FAMES no se obtiene la información estructural de los TAGs sino la identidad y cantidad de ácidos grasos que los constituyen. Utilizando el detector FID, la asignación de los compuestos individuales requiere el uso de estándares de los FAMES para fijar los tiempos de retención de compuestos individuales. Estos estándares son también imprescindibles para fines del análisis cuantitativo.

En la transesterificación de aceites vegetales, un triglicérido reacciona con un alcohol en presencia de un ácido fuerte o base fuerte, produciendo una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAMES si el alcohol utilizado es el metanol) y glicerol. El proceso global es una secuencia de tres reacciones consecutivas y reversibles, la reacción estequiométrica requiere 1 mol de triglicérido y 3 moles del alcohol, un exceso de alcohol se utiliza a menudo para aumentar los rendimientos de los ésteres alquílicos y su separación de fases del glicerol formado. De manera de ejemplo, en la figura 2 se presenta el esquema de reacción de transesterificación de TAGs compuesto por tres moléculas de ácido ricinoleico (componente principal del aceite de ricino).

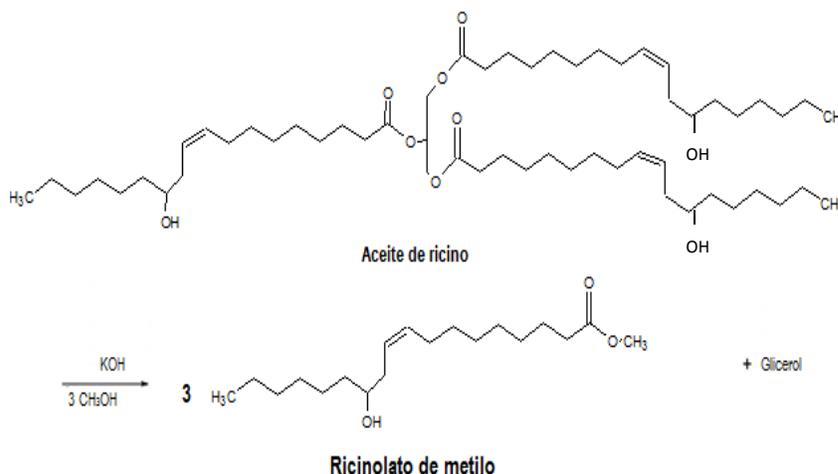


Figura 2 Esquema de la reacción de transesterificación del triglicérido del ácido ricinoleico, el cual es el componente mayoritario en el aceite de ricino.

Para la formación de estos derivados (FAMES) se utilizan distintas técnicas como son;

- La transesterificación catalizada por base, es utilizada para formar FAMES de lípidos saponificables por lo tanto los ácidos grasos libres no son esterificados. El metóxido de sodio (NaOMe) en metanol es el agente más comúnmente utilizado utilizando hidróxido de sodio como catalizador.
- La esterificación y transesterificación catalizada por ácidos es utilizada para el análisis de ácidos grasos libres por medio de una esterificación directa, esta se realiza por calentamiento con un exceso de metanol anhidro en presencia de un catalizador ácido. Algunos agentes usados con frecuencia son el HCl y el H₂SO₄ en solución metanólica. Para el caso de la transesterificación TAGs se utiliza trifluoruro de boro (BF₃) en metanol.

Cabe mencionar que la reacción de transesterificación es utilizada en la producción de biodiesel a partir de aceites vegetales y el análisis de FAMES es muy demandado en el control del proceso de producción⁹.

Los FAMES volátiles o semivolátiles (dependiendo de número de carbonos en la cadena alifática), se someten a la separación por GC. Para realizar dicha separación de manera eficiente y en tiempo razonable, se emplean columnas capilares con fases polares como polietilenglicol o cianopropil ya que éstas permiten la separación de los FAMES de acuerdo con número de carbonos, grado de saturación y configuración *cis-trans*. Para muestras complejas de FAMES, con el objetivo de lograr la separación de algunos isómeros geométricos se utilizan columnas de longitud de 100m, 0.25mm de diámetro y de 0.2um de grosor de película (Agilent HP-88, Varian CP-Sil 88, Supelco SP 2360, SP 2340, SP 2380)¹⁰. En los años recientes, ha aumentado el uso de detectores másicos en el análisis de los FAMES por GC. Las principales ventajas en este caso es un aumento de selectividad, posibilidad de confirmar/identificar compuestos no esperados y el alto poder de detección alcanzable cuando la cuantificación se lleva a cabo mediante el monitoreo de iones selectivos (SIM) o monitoreo de reacciones múltiples (MRM)¹¹.

Otra manera de analizar los lípidos presentes en aceites vegetales es el análisis directo de los TAGs, la ventaja de utilizar el análisis de TAGs en comparación con el perfil FAs es que se conserva la estructura química y distribución estereoespecífica de las cadenas de FAs enlazadas al glicerol. Entre las técnicas utilizadas para el análisis de los TAGs hay que mencionar: la cromatografía en capa delgada (TLC), la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC), la RP-HPLC combinada con la cromatografía de ion plata (Ag-RP-HPLC) utilizando diferentes tipos de detectores, entre ellos espectrometría de masas. La separación de los TAGs típicamente se obtiene por RP-HPLC, ya que esta técnica permite separar compuestos con diferente longitud de cadena y grado de insaturación¹². Sin embargo, la complejidad de la composición de muestra obliga en muchos casos combinar procedimientos de fraccionamiento/separación para aumentar la selectividad. Para las separaciones en fase líquida, los detectores comúnmente usados son el espectrofotométrico de ultravioleta (UV) y del índice de refracción (RI), donde el UV es más sensible y el RI tiene la desventaja de ser compatible únicamente con flujos isocráticos, es decir, no permite el gradiente de elución que es deseable para reducir los tiempos de retención para TAGs saturados de mayor masa molecular y mejorar la resolución cromatográfica. El detector espectrofotométrico permite el uso de gradientes de elución usando disolventes de baja absorción UV, sin embargo, diferencias en absorción tienen que ser consideradas por el coeficiente de correlación de área de pico para solutos con baja y alta absorción, además de presentar problemas con la isomería y conjugación de dobles enlaces. Otra manera para el análisis de TAGs se ha enfocado en la cromatografía líquida de alta resolución con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD) ya que es compatible con todos los disolventes de elución, permitiendo aplicar gradientes de flujo y gradientes de solventes, sin embargo, la cuantificación por ELSD puede presentar un problema, debido al factor de respuesta no lineal a niveles bajos de TAGs¹³.

El uso de espectrometría de masas (MS) es otro enfoque en el análisis de los lípidos vegetales cual se describe brevemente en la sección siguiente. Cabe señalar que la MS se puede utilizar introduciendo la muestra de manera directa o en acoplamiento con separación cromatográfica. De hecho, el análisis directo es de interés debido a que las técnicas de GC y HPLC generalmente son laboriosas, requieren tratamientos de muestra, uso de reactivos y solventes adicionales e imponen largos tiempos de análisis. En este contexto, además de MS, se han aplicado otras técnicas analíticas para el análisis de lípidos como son la espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y la resonancia magnética nuclear (NMR). De manera de ejemplo, en la Tabla 5 se presentan brevemente algunas aplicaciones de técnicas analíticas en el análisis de lípidos en aceites vegetales.

Tabla 5 Resumen de técnicas aplicadas en el análisis de aceites vegetales.

Método	Muestra	Análisis	Información	Ref
GC-MS	Semilla y pulpa de aguacate.	FAMEs	Detección y cuantificación de FAMEs pre concentrados por microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). Se presenta solapamiento de picos, baja relación S/N debido al alto ruido.	14
HPLC-CAD	Mezcla de Aceites comestibles	FAMEs	Detección del porcentaje de aceite de olivo y palma presentes en mezclas comerciales mediante el análisis multivariante de sus FAMEs.	15
GC-FID	Aceites vegetales	FAMEs	Desarrollo de una metodología de transesterificación de TAGs por medio de BF ₃ , para conocer el perfil de ácidos grasos en las muestras.	16
NIRS	Semillas de soja	FA	Análisis de ácidos grasos de semillas para conocer la viabilidad para producir aceite, mediante un análisis rápido y no destructivo.	17
RM*	Aceites vegetales.	FAMEs	Cuantificación de FAMEs de aceites vegetales por medio de un análisis multivariante utilizando la técnica de código de barras espectral.	18
HPLC-UV	Aceites Vegetales.	TAGs, DAGs, FAs, FFA,	Desarrollo de un método para la detección simultanea de TAGs, DAGs, MAGs, FAs libres. Comparación de GC-FID con un método desarrollado para la determinación de FAMEs.	19
HPLC-ELSD	Aceites vegetales.	TAGs	Cuantificación y discriminación del tipo de aceite utilizando el perfil de TAGs.	13
HPLC-ELSD GC-FID	Aceite de ajonjolí	TAGs, FAs	Identificación de adulteración del aceite de ajonjolí con aceite de soja por medio del análisis de FAs y TAGs.	20

*Microscopia Raman

Si bien cada uno de estos métodos tiene sus propias fortalezas y debilidades, los métodos de MS recientemente desarrollados basados en la ionización a presión atmosférica (API), electro-nebulización (ESI) y la espectrometría de masas con desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI-MS) surgen como las técnicas más adecuadas para la caracterización completa de aceites vegetales.

1.3 Espectrometría de masa en el análisis de aceites vegetales

Como se muestra en la Figura 3, un espectrómetro de masas está compuesto por cuatro bloques principales; (i) un sistema de introducción de muestra; (ii) un dispositivo de ionización, (iii) un separador de masas y (iv) un detector. Como ya se ha mencionado antes, la introducción de la muestra puede llevarse a cabo de manera directa o mediante acoplamiento con una técnica de separación; la etapa de ionización comprende conversión del(los) analito(s) en iones con carga positiva o negativa en estado gaseoso. Una vez generados los iones, éstos son introducidos y separados en función de su relación masa/carga (m/z) en el separador de masas que opera en condiciones de alto vacío. Finalmente, los iones son detectados, y la señal eléctrica se procesa generando un espectro de masas, el cual es una presentación grafica de la abundancia de iones para diferentes valores de m/z . Por lo tanto, un espectro de masas proporciona información sobre variedad y cantidad de iones formados a partir de muestra analizada. Hoy en día existen muchos diseños comerciales de espectrómetros de masas que presentan una amplia gama de capacidades en cuanto al intervalo de valores m/z , la resolución, el poder de detección y posibilidad de realizar fragmentación de iones. Esta última opción es importante para la confirmación/identificación de compuestos y también para su cuantificación.

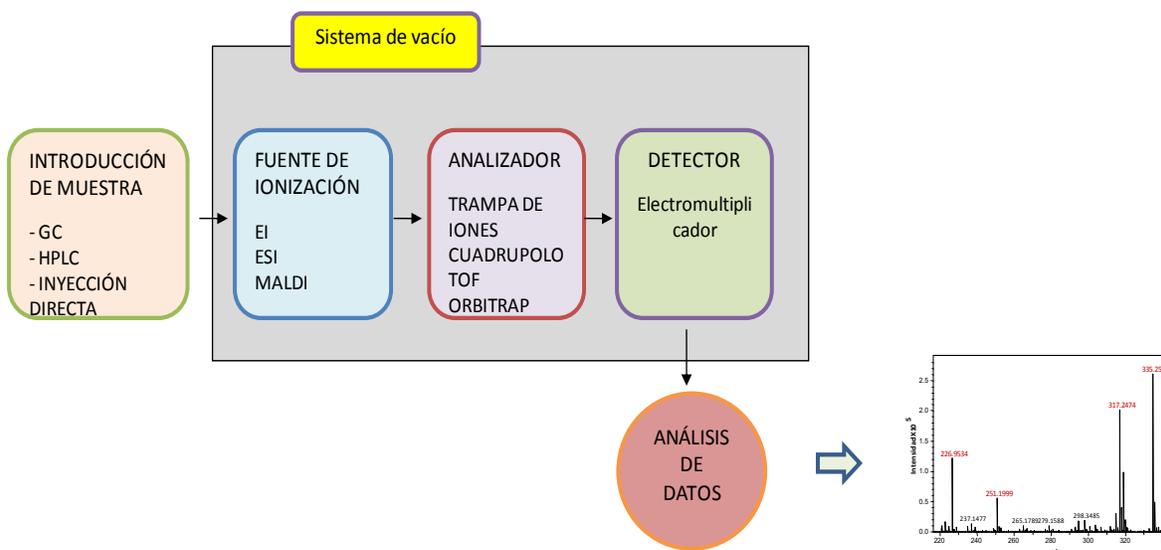


Figura 3 Diagrama de bloques de un espectrómetro de masas.

1.3.1 Fuentes de ionización

En la Tabla 6 se resumen brevemente diferentes fuentes de ionización empleados en el análisis de lípidos por MS. Tradicionalmente se han utilizado las técnicas de ionización por electrones (EI) y por ionización química (CI), lo que permite elucidar la composición/estructura y llevar a cabo la cuantificación de lípidos relativamente volátiles (simples), sin embargo, no todos los lípidos son susceptibles al análisis por EI y CI debido al requerimiento que la molécula debe ser térmicamente estable y tener una presión de vapor suficiente para entrar como un gas en la fuente de ionización. Debido a estas características, la EI y CI se utilizan principalmente en combinación con métodos de separación por GC (GC-MS). Cabe mencionar que la EI es la fuente de ionización dura debido a que proporciona alto grado de fragmentación, mientras que los espectros obtenidos con CI son más simples, con limitada o sin fragmentación. La selección entre ionización dura y suave depende en gran medida del objetivo de análisis y de las propiedades del(los) analito(s) de interés. Hoy en día se cuenta con dispositivos de ionización suave que permiten adquisición de masa exacta de moléculas

ionizadas y éstas pueden ser fragmentadas posteriormente para obtener información estructural y/o cuantitativa.

Las dos principales técnicas de ionización suave ESI y MALDI fueron introducidas en la década de los 80s, por Tanaka et al. y Fenn et al. Se han posicionado como herramientas importantes en el análisis de lípidos en sistemas biológicos así como en el estudio de los componentes en aceites vegetales^{3, 21}. Para el caso de los aceites vegetales el uso de ESI-MS y MALDI-MS se debe a que proporcionan información estructural sobre los TAGs presentes en mezclas complejas.

Tabla 6 Resumen de distintos métodos de ionización utilizados en espectrometría de masas

Técnica de ionización	Naturaleza de compuestos	Introducción de la muestra	Intervalo de masa	Descripción
Ionización por electrones (EI)	Volátil; térmicamente estable	CG o HPLC	< 1000Da	Método ionización dura, principalmente se obtienen fragmentos de iones.
Ionización química (CI)	Volátil; térmicamente estable	CG o HPLC	< 1000Da	Método de ionización suave, se obtiene el ion molecular.
Bombardeo rápido de átomos (FAB)	Compuestos organometálicos	HPLC, inyección directa	< 5000Da rango óptimo 200-2000	Método suave de ionización, requiere de una matriz.
Desorción/ionización laser asistida por matriz (MALDI)	Biomoléculas (proteínas, DNA, lípidos)	La muestra se co-cristaliza con una matriz	amplio, hasta 500kDa	Método de ionización muy suave, iones con una carga, cationización favorecida.
Ionización por electro-nebulización (ESI)	Compuestos orgánicos e inorgánicos polares	Muestra en solución	Amplio rango de masas	Método de ionización muy suave, iones de múltiples cargas.

Como se observa en la Tabla 6 aunque ESI y MALDI pertenecen a fuentes de ionización suave, pero presentan diferencias importantes. Tal vez la más importante es que ESI permite análisis de moléculas polares, mientras que MALDI ha sido utilizada para estudiar moléculas polares o apolares; otra diferencia importante es que ESI acepta muestras líquidas y MALDI sirve para el análisis de muestras sólidas (co-cristalizadas con matriz).

En ESI la muestra se introduce en forma de solución, utilizando solventes polares como son el metanol, isopropanol, acetonitrilo, etc. por lo que el acoplamiento de HPLC con ESI para el análisis de los TAGs es adecuado. Las moléculas que han sido ionizadas por ESI preservan casi intacto el estado de carga que tenían en solución, los lípidos ionizados por ESI son especies con carga única que se forman por medio de protonación (modo positivo) o desprotonación (modo negativo), o bien por la formación de aductos catiónicos (NH_4^+ , K^+) o aductos aniónicos (Cl^-) causados por la inclusión de sales que contengan estos iones. ESI se ha utilizado para el análisis cuantitativo de TAGs en aceites vegetales por medio de sus aductos catiónicos con amonio $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, potasio $[\text{M}+\text{K}]^+$, sodio $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y litio $[\text{M}+\text{Li}]^+$. Por ejemplo, el análisis cuantitativo de isómeros posicionales de TAGs en aceites de girasol y olivo realizado por RPHPLC-ESI-MS mediante el monitoreo de distintos aductos, sugiere que los aductos que ofrecen mejor rendimiento cuantitativo son los de sodio²². Por otro lado, en el caso de moléculas pequeñas con grupos carbonilos en su estructura se ha observado que la cationización con sodio se ve favorecida por la formación de un enlace coordinado en el oxígeno del carbonilo, obteniendo muy buena reproducibilidad facilitando la cuantificación.

En contraste con ESI, utilizando MALDI la muestra se encuentra en estado sólido, co-cristalizada con una matriz química adecuada²³. Dicha co-cristalización ocurre como resultado de evaporación del disolvente; es muy importante obtener el depósito homogéneo y evitar formación de clústeres de iones provenientes de la muestra. La matriz debe absorber la energía del láser y promover desorción/ionización de compuestos; habitualmente es una pequeña molécula

orgánica que presenta una fuerte absorción a una longitud de onda de luz láser. Para el caso de los lípidos, a menudo se utiliza el ácido 2,5-dihydroxibenzoico (DHB) para el análisis de fosfolípidos utilizando irradiación por un láser UV. Otras matrices reportadas en el análisis de lípidos se presentan en la Tabla 7.

La mezcla de muestra/matriz se coloca en una placa porta muestra, la cual se introduce al instrumento donde existen condiciones de alto vacío. Mediante pulsos de luz láser (337 nm para el caso del láser de N₂) que se dirige a la mezcla co-cristalizada, se transfiere energía para ser absorbida por la matriz y provocar su vaporización/ionización junto con la muestra formando una nube en expansión. Para evitar la descomposición térmica de la muestra, la energía del láser debe ser transferida dentro de muy poco tiempo. En MALDI las moléculas TAGs son principalmente detectadas como aductos de sodio $[M+Na]^+$, mientras que aductos con potasio $[M+K]^+$ son detectados con intensidades bajas en comparación con aductos $[M+Na]^+$. Hay que notar que en MALDI prácticamente no se forman moléculas protonadas $[M+H]^+$ con lo que el análisis de TAGs por MALDI se simplifica.

Un punto importante es el modo de deposición de muestra/matriz en la placa, en la Tabla 8 se muestran los métodos más comunes. El criterio de selección siempre es obtener un depósito homogéneo.

Para el desarrollo de esta tesis, la caracterización de los lípidos presentes en distintos aceites vegetales de uso en cosmética se llevará a cabo por las técnicas de ionización MALDI y ESI. El análisis de la composición de TAGs se llevará a cabo mediante MALDI debido a simplicidad en el tratamiento de muestra y por la ventaja en la caracterización de TAGs que representa la formación mayoritaria de aductos de sodio. Por otro lado, se propone el uso de ESI mediante infusión directa en el desarrollo de un método para la cuantificación rápida de los FAMES por medio de sus aductos, esperando una buena respuesta principalmente para los FAMES de FAs insaturados.

Tabla 7 Matrices de uso común en el análisis MALDI-TOF de lípidos.

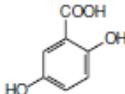
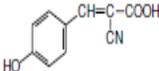
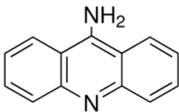
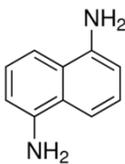
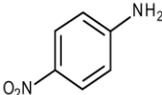
Estructura	Nombre común	Muestras	Observaciones	Ref
	Ácido 2,5 dihidroxibenzoico	Utilizada en lípidos en general. TAGs en aceites vegetales.	Proporciona pocas señales en espectro y de baja abundancia, alta tolerancia a contaminantes, con lo que la interpretación del espectro se simplifica. Puede utilizarse en modo de ionización positivo y negativo.	24
	Ácido α -ciano-hidroxi cinámico	Identificación de TAGs en aceites vegetales.	Apenas soluble en metanol. Fuertes interferencias con señales de interés. Buenos resultados para TAGs que contienen FA insaturados u oxigenados. En conjunto con tributilamina (TBA) forma un líquido iónico que mejora la identificación de TAGs por sus GP.	25, 26
	9-Aminoacridina	GL en extractos de muestras biológicas.	Matriz muy prometedora para la investigación de lípidos. Mayor sensibilidad que DHB, pero los espectros dependen fuertemente de la composición de disolventes utilizados.	27
	1,5-diaminonaftaleno (DAN)	Fosfolípidos en muestras biológicas.	Identificación de GP a concentraciones menores que DHB. Ideal para análisis a bajas masas por ausencia de iones de matriz. Identificación en modo positivo y negativo.	28
	<i>p</i> -Nitroanilina (PNA)	TAGs, PE y PC en extractos biológicos.	Útil en el análisis de mezcla compleja. Proporciona intensas señales de iones negativos de PE y PC.	29

Tabla 8 Métodos de deposición de muestra/matriz en placa.

Método	Procedimiento	Características	Observaciones
Gota seca	0.5 a 1 μ L de una solución que contiene volúmenes iguales de matriz saturada (exceso molar de 100 a 1000 con la muestra) con una solución de la muestra son colocados en una placa para MALDI que se seca a temperatura ambiente.	Regiones ricas en cristales (puntos dulces) así como regiones sin matriz o analito.	Ventaja: Posibilidad de cristalización de contaminantes separados del analito. Gran número de disparos en un punto. Desventaja: Necesidad de búsqueda de puntos dulces. Resolución limitada por cristales grandes.
Capa delgada	La matriz HCCA en acetona se coloca sobre la placa para formar una capa delgada de pequeños cristales por la evaporación rápida de acetona, la muestra es colocada sobre los cristales de matriz.	Moléculas de analito sobre la superficie de matriz.	Ventajas: Tamaño homogéneo de los cristales. Alta resolución. Límite de detección menor que el método de gota seca. Desventajas: Numero de disparos limitados sobre un punto. Solo se aplica con matriz HCCA.
Doble capa	En este método, se aplica el método de capa delgada, y sobre esta se aplica el método de gota seca.	Los cristales pequeños en la capa fina actúan como núcleos de cristalización para la gota seca.	Ventajas: Cristalización homogénea. Mayor número de disparos que la gota seca, pero menor que la capa delgada.

1.3.2 Separadores de masa

Un separador de masas es la parte del instrumento en la que los iones son separados de acuerdo a sus valores m/z , operando como filtros u analizadores de masas. Los típicos filtros de masas incluyen cuadrupolo (Q) y trampa iónica (simple, o con cuadrupolo (QIT), trampa iónica linear (LIT) o trampa orbitante) mientras que analizadores de masa son el de tiempo de vuelo (TOF), los de sectores de campo (magnético y/o electrostático) y el de resonancia de ciclotrón con trasformada de Fourier (FT-ICR). En la Tabla 9 se presenta brevemente información sobre cada uno de ellos.

En este trabajo de tesis se propone utilizar dos espectrómetros de masas; uno modelo maXis impact QTOF-MS con ionización ESI y el segundo, modelo AutoFlex Speed MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics), es por ello que en la siguiente sección se presentan brevemente dos respectivos separadores de masa (Q, TOF).

1.3.3 Cuadrupolo (Q) como filtro de masas

El principio de un separador de masa cuadrupolar fue descrito por primera vez en los años cincuenta por el ganador del Premio Nobel, Paul Wolfgang. El dispositivo se compone de cuatro varillas metálicas o de cerámica paralelas), como se muestra en la Figura 4.

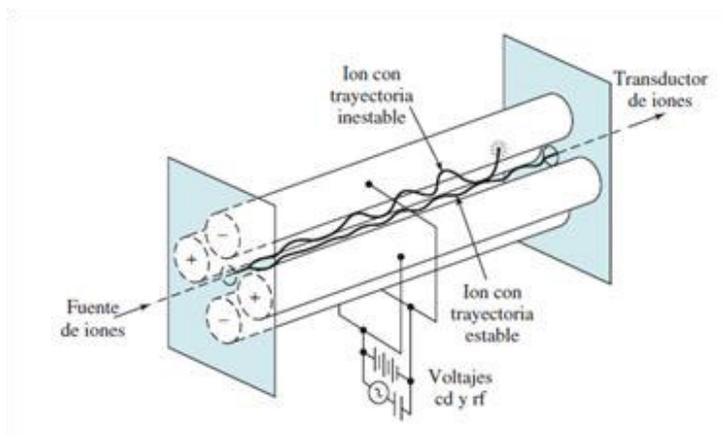


Figura 4 Analizador de masa de cuadrupolo.

Tabla 9 Analizadores de masas comunes para la espectrometría de masas.

Tipo	Filtro/ Analizador	Resolución A, M, B*	Principio de análisis
Sector magnético	Analizador	A	Deflexión de iones en un campo magnético. Las trayectorias de los iones dependen de su valor de m/z .
Doble enfoque	Analizador	A, M, B	Enfocamiento de iones de la misma energía cinética en el campo electrostático y deflexión en el campo magnético en función de los valores de m/z .
Cuadrupolo	Filtro	B	Movimiento de los iones en un espacio entre barras a las que se aplica crecientes valores de potenciales de corriente directa y alterna (radiofrecuencia) permitiendo que con un solo ajuste al detector lleguen iones con un solo valor de m/z .
Trampa de iones	Filtro	B	Almacenamiento de iones en un espacio definido por electrodos. El campo eléctrico y/o magnético (dependiendo de tipo trampa) aplicado expulsa de manera secuencial los iones a medida que se incrementan sus valores de m/z .
Resonancia ion-ciclotron	Analizador	A	Los iones son atrapados en una celda cúbica bajo la influencia de un voltaje de captura y de un campo magnético. La frecuencia de movimiento circular se relaciona de manera inversa con el valor de m/z .
Tiempo de vuelo	Analizador	A	Iones con energía cinética igual entran a un tubo libre del campo y en alto vacío. La velocidad de deriva y, por lo tanto, el tiempo de llegada al detector depende de la masa/ z .

*A=alta, M=media, B=baja.

El movimiento de los iones en campos eléctricos es la base de la separación. A los pares de alambres opuestos (verticales y horizontales) se les aplican voltajes crecientes de corriente directa (cd) y de radiofrecuencia (rf), respectivamente. Los iones, formados en la cámara de ionización, son impulsados a la entrada del cuadrupolo con un potencial en el intervalo 5 -15 V. Con el ajuste de voltajes, se crea una trayectoria estable para que solamente los iones que tienen una cierta relación m/z pasen a través del analizador hacia el transductor mientras que el resto de iones son desviados. El espectro de masas se obtiene barriendo los voltajes aplicados a los alambres. Los filtros de cuadrupolo se caracterizan por baja resolución (aprox. 1uma) y relativamente baja transmisión (sobre todo para altas masas). A menudo se utilizan como guía de iones, para aislar iones seleccionados, como dispositivos de fragmentación y de enfocamiento.

1.3.4 Analizador de tiempo de vuelo (TOF)

El analizador de tiempo de vuelo es caracterizado por extremadamente cortos tiempos de adquisición de espectros, buena transmisión de iones, prácticamente ilimitado intervalo de los valores m/z y alta resolución. Estas propiedades lo hacen especialmente compatible con MALDI, aunque se utiliza también junto con la ionización ESI. En el segundo de los casos TOF es usualmente precedido por un Q con el fin de selección de iones.

Al salir de la cámara de ionización, los iones son acelerados recibiendo la misma energía cinética (3 keV) y después introducidos al tubo de vuelo donde viajan a la deriva sobre una región libre de campo (drift) que es típicamente de 0.50 a 3 m de longitud donde los iones se separan de acuerdo a su relación m/z . Específicamente, los iones de baja masa con la misma carga llegan al detector en un tiempo más corto que los iones de mayor masa, en consecuencia se consigue una separación entre los iones de diferentes valores de m/z , así conociendo el

voltaje de aceleración y la longitud de la región drift es posible determinar el valor de la relación m/z por medida del tiempo de vuelo.

La relación m/z es proporcional al cuadrado del tiempo de vuelo t y viene dada por la siguiente ecuación:

$$\frac{m}{z} = \frac{2eU}{L^2} t^2$$

Los primeros instrumentos TOF no ofrecían alta resolución. Cabe señalar que este parámetro es definido como el cambio de masa m y la diferencia de masa Δm , la cual permite discriminar un ion de masa $m + \Delta m$ de un ion de masa m .

$$R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{m_1}{m_2 - m_1}$$

En la técnica TOF, la resolución se ha logrado afinando la etapa de introducción de iones, utilizando tubos de vuelo más largos e introduciendo un reflector, el cual trabaja como un espejo de iones. La función del reflector se basa en la inversión de la trayectoria mediante aplicación de un campo eléctrico polarizado opuestamente a los iones. Los iones con la misma relación m/z pero con diferente energía cinética se mueven con diferente velocidad, pero los de mayor energía penetran más profundamente en la zona de reflector lo que provoca que todos iones de la misma m/z lleguen al detector simultáneamente obteniéndose señales de anchura reducida (mejor resolución) (Figura 5).

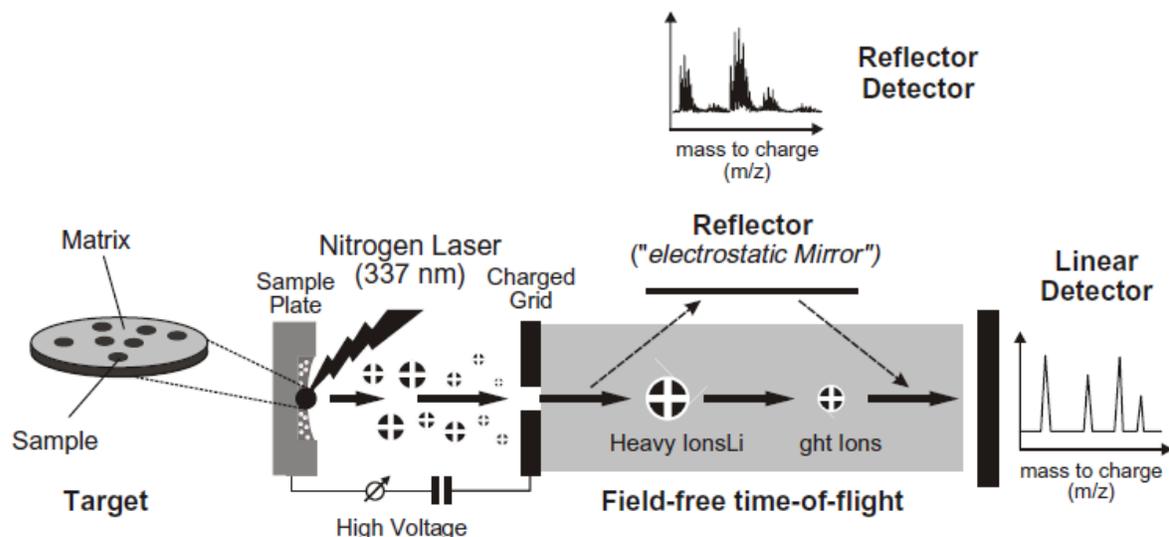


Figura 5 Esquema de los procesos que ocurren durante el proceso de ionización MALDI-TOF en el espectrómetro de masas.

En este trabajo de tesis se utilizará el espectrómetro AutoFlex Speed MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics) para el análisis de TAGs y un maXis impact QTOF-MS con ionización ESI para el caso de los FAMES, debido a sus características de análisis de mezclas complejas con mínima preparación de muestra, escaneo de un amplio rango de masas que ayudará en la caracterización del tipo de aceite analizado, así como la proporcionalidad entre la altura de pico con la cantidad de analito presente en el aceite. Por lo tanto, las ventajas que se obtendrán será una determinación rápida, simple pretratamiento de la muestra, alta resolución, y buena estabilidad.

1.3.5. Ejemplos de análisis de TAGs y de FAMES utilizando ESI-MS y MALDI-TOF-MS

Se realizó una búsqueda bibliográfica enfocada en las aplicaciones de sistemas MALDI-TOF-MS y ESI-QTOF-MS para el análisis de lípidos (TAGs, FAMES) en aceites vegetales y en la Tabla 10 se presentan algunos ejemplos representativos. Ambos sistemas analíticos han sido utilizados para evaluar los perfiles de los TAGs y para llevar a cabo su determinación en muestras de aceites.

En el análisis de TAGs, MALDI tiene distintas ventajas como el hecho de no necesitar derivatización del analito, por lo que ofrece una preparación fácil y rápida de la muestra. Sin embargo, las mediciones en MALDI se ven afectadas por problemas intrínsecos, es decir, las complicaciones que surgen de las interferencias de señales con la matriz en la región de bajas masas, la baja reproducibilidad de las muestras como resultado de la falta de homogeneidad en la co-cristalización de muestra con la matriz. Los problemas de interferencias en la región de bajas masas pueden evitarse al utilizar una matriz con alta masa molecular, mientras la reproducibilidad se puede mejorar por medio de selección/afinación de métodos de colocación de muestra en la placa MALDI³⁰.

El análisis de la composición de TAGs en muestras de aceites vegetales se puede realizar mediante HPLC-MS, las ventajas que presenta esta metodología son que la MS provee información detallada sobre la masa molecular y la composición de FAs de las moléculas de TAGs, sin embargo, como se menciona anteriormente que la cationización de los lípidos se encuentra comprometida con la composición de la fase móvil, una inadecuada fase móvil proporcionaría una mezcla de distintos aductos para la misma molécula, complicando la interpretación del espectro. Una alternativa es el método de infusión directa, que puede ser utilizado sin la necesidad de una derivatización o una extracción con solventes polares. El método de infusión directa en ESI requiere poca o nula preparación de muestra con lo que se obtiene un análisis rápido de la muestra.

Tabla 10 Algunos ejemplos de aplicaciones de MALDI-TOF y ESI-QTOF en el análisis de lípidos en aceites vegetales.

Muestra	Lípidos	Tratamiento	Técnica (matriz)	Observaciones	ref
Aceite de olivo oxidado	TAGs	Extracto hexano/dietileter (9:1) fraccionado en columna de SiO ₂	MALDI-TOF (DHB)	Película de nitrocelulosa en la placa mejoro la reproducibilidad y disminuyó la fragmentación de iones.	31
Aceites vegetales	TAGs	Muestra mezclada con matriz sin solventes	MALDI-TOF (DHB)	Clasificación de aceites en base al análisis PCA.	32
Lípidos en alimentos	TAGs	Aceite mezclado con matriz	MALDI-TOF (DHB)	Extracción de lípidos dependiendo del tipo de alimento.	33
Aceite de jatropa	FAMEs TAGs MAGs DAGs	Muestras después de transesterificación	MALDI-TOF (DHB)	Se estudió eficacia de catalizadores en la producción de biodiesel.	34
Aceites vegetales	TAGs	Extracción/dilución con hexano	HPLC-ESI-QTOF MS y MS-MS	Columna de fase inversa del núcleo sólido, gradiente de metanol/isopropanol.	35

En esta tesis se desarrolló un nuevo método de determinación de los FAMEs por inyección en flujo (FIA) utilizando el sistema ESI-QTOF-MS y con aplicación en el análisis del aceite de ricino y de otros tipos de aceites vegetales. Si bien, se ha reportado previamente el sistema FIA-ESI-QTOF para el análisis de pinturas alquídicas, pero solamente se consideró la identificación de TAGs y de los aditivos de las pinturas³⁶. La idea original de este trabajo fue explorar la factibilidad de ESI-QTOF-MS con infusión directa para la cuantificación de los FAMES, buscando sobre todo acortar los tiempos al evitar la separación cromatográfica. Donde se observó una buena respuesta principalmente para el caso de los FAMES

procedentes de ácidos grasos insaturados por su afinidad a la cationización sódica. Por otro lado, las ventajas relacionadas con el uso de MS de alta resolución, en términos de buena selectividad y sensibilidad.

1.4 Aceite de ricino

El presente trabajo ha sido centrado en el aceite de ricino que es obtenido por extracción de la semilla de la planta *Ricinus Communis* de la familia Euphorbiaceae. Esta planta crece naturalmente en diversas partes del mundo, sus semillas en promedio contienen un porcentaje en peso de aceite del 46-50%. En el aceite de ricino se encuentran presentes los principales ácidos saturados como el ácido palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0), así como los típicos ácidos grasos insaturados ácido oleico (C18:1 cis-9), ácido linoleico (C18:2 cis-9,12) y ácido linolénico (C18:3 cis-9,12,15), sin embargo estos se encuentran en menor cantidad ya que el aceite de ricino contiene una porción de 85-90% del ácido ricinoléico. Este componente es un ácido graso hidroxilado que contiene un enlace doble (ácido R12-Hydroxy-9-cis-octadecenoico, C₁₈H₃₄O₃), se encuentra como triglicérido, donde cerca del 70% corresponde al triglicérido triricinoleina (RRR, triricinoleoilglicerol) se muestra en la figura 6, otros triglicéridos presentes que contienen el ácido ricinoleico son el diricinoleoilesterolglicerol (RRS), el diricinoleoiloleolglicerol (RRO), diricinoleoilinoleoilglicerol (RRL) y palmitoildiricinoleoilglicerol (RRP).

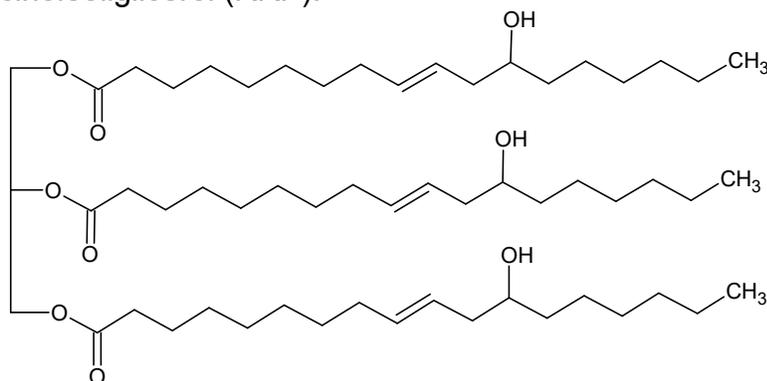


Figura 6 Triglicérido triricinoleina.

Aunque el aceite de ricino no es comestible, debe su importancia a este ácido hidroxilado que le confiere reactividad química; es utilizado en la manufactura de polímeros como el Nylon-66, recubrimientos y pinturas, en la fabricación de lubricantes de alto grado, en el teñido de textiles, en la producir los componentes naturales de saborizantes y fragancias como el 2-nonenal, como materia prima importante en la producción de biodiesel, y su uso en la industria farmacéutica donde es ampliamente utilizado como laxante catártico, y en la industria cosmética, algunos ejemplos de la utilidad que tienen los FA presentes en el aceite de ricino en la industria cosmética se presentan en la Tabla 11.

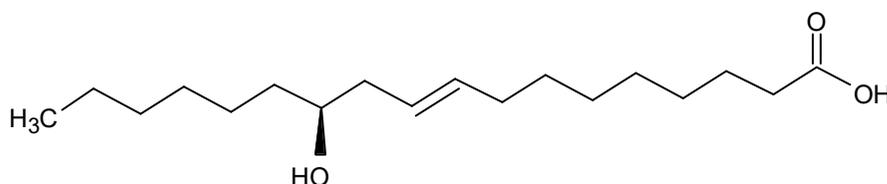


Figura 7 Estructura del ácido ricinoleico.

La presencia del grupo hidroxilo en el ácido ricinoleico (figura 7) cambiadrásticamente las propiedades fisicoquímicas del aceite como son la viscosidad, temperatura de fusión, solubilidad, estructura cristalina y polimorfismo. Por esta razón el aceite de ricino es atractivo para la industria. Las propiedades químicas del aceite de ricino se centran entonces en el ácido ricinoleico, ya que este ácido contiene tres puntos de funcionalidad en la molécula; 1) el grupo carboxilo con el que cual puede llevar a cabo una amplia gama de reacciones de esterificación; 2) el único punto de insaturación el cual puede ser alterado por hidrogenación o epoxidación o vulcanización; 3) el grupo hidroxilo el cual puede ser acetilado o alcoxilado, también se puede eliminar por deshidratación para incrementar la insaturación del compuesto para dar un aceite semisecante. La posición del hidroxilo es tan reactiva que la molécula puede romperse en ese punto por altas temperaturas de pirolisis y por fusión caustica y producir productos de cadena corta, en la Tabla 12 se resumen estas reacciones.

Tabla 11 Aplicaciones de ácidos grasos del aceite de ricino.

Ácido graso	Aplicación
Ricinoleico	Utilizado para la elaboración de jabones, cremas barras labiales por su propiedad hidratante. Presenta acción antimicrobiana por lo que es de gran alcance contra las infecciones de la piel tales como eczema, dermatitis y erupciones en la piel, también se utiliza como precursor de fragancias.
Oleico	El ácido graso insaturado más ampliamente distribuido y abundante de la naturaleza, se utiliza en la comercialmente en la preparación de oleatos, lociones y como un disolvente farmacéutico. El contenido de ácido oleico se relaciona con su potencial hidratante, por lo que se utiliza en cremas y jabones con el fin de aumentar la capacidad de nutrir la piel.
Palmítico	Se utiliza principalmente para la producción de jabones, cosméticos y agentes de liberación. Estas aplicaciones utilizan palmitato de sodio, la hidrogenación del ácido palmítico produce alcohol cetílico, que se utiliza para producir detergentes y cosméticos.
Esteárico	Es el ácido graso saturado más común, es principalmente utilizado en la producción de detergentes, jabones y cosméticos tales como champús y productos de crema de afeitar. Los jabones no se producen directamente a partir del ácido esteárico, pero se producen indirectamente por saponificación de TAGs que consisten en ésteres de ácido esteárico. Ésteres de ácido esteárico con etilenglicol, estearato de glicol y diestearato de glicol son utilizados para producir un efecto nacarado en champús, jabones y otros productos cosméticos. Son añadidos al producto en forma fundida y se deja cristalizar bajo condiciones controladas. Los detergentes se obtienen a partir de amidas y derivados de alquilamonio cuaternarios de ácido esteárico. Surfactantes, cosméticos y productos de higiene personal son derivados del ácido esteárico.
Undecanoico	Monómero del ácido ricinoleico, ácido graso insaturado producido por pirolisis del aceite de ricino, se utiliza en la fabricación de productos farmacéuticos, cosméticos y en perfumería.
Behénico	Ácido graso saturado se utiliza a menudo para como ingrediente de acondicionadores de cabello y cremas hidratantes por sus propiedades suavizantes.

Tabla 12 Reacciones del Aceite de ricino³⁷

	Reacción natural	Reactantes	Productos
Enlace éster	Hidrólisis	Ácido, enzimas o agente Twitchell	Ácidos grasos, glicerol Ésteres
	Esterificación	Glicerol, glicoles	Mono- y diglicéridos
	Saponificación	Álcalis, sales metálicas alcalinas	monoglicoles
	Reducción	Na reductor	Jabón soluble e insoluble
	Amidación	Aquil aminas	Alcoholes Sales de aminas, amidas
Doble enlace	Oxidación, polimerización	Calor, oxígeno, agente crosslink.	Aceites polimerizados
	Hidrogenación	Hidrógeno (presión moderada).	Hidroxiesteratos
	Epoxidación	Peróxido de hidrógeno.	Aceites epoxidados
	Halogenación	Cl ₂ , Br ₂ , I ₂ .	Aceites halogenados
	Reacciones de adición	S, ácido málico.	Aceites polimerizados
	Sulfonación	H ₂ SO ₄ .	Aceites sulfonados
Grupo hidroxilo	Deshidratación, hidrólisis, destilación	Catálisis (calor).	Aceite deshidratado, ácido octadecanoico. Ácido sebácico, alcohol caprílico.
	Fusión caustica	NaOH.	Ácido undecanoico, haptaldehido.
	Pirolisis	Temperatura alta.	Ácido undecanoico, haptaldehido.
	Halogenación	PCl ₅ , POCl ₃ .	Aceites halogenados
	Alcoxilación	Etileno o oxido de propileno	Aceites alcoxilados.
	Esterificación	anhídridos acético, fosfórico, maleico, ftálico.	Aquil y alquilaril éster, ésteres de fosfato.
	Reacción uretano	Isocianatos	Polímeros de uretano
	Sulfonación	H ₂ SO ₄	Aceites sulfonados.

1.4.1 Caracterización del aceite de ricino por espectrometría de masas

El análisis del aceite de ricino se ha realizado por distintas técnicas, como ya se mencionó anteriormente las técnicas de GC-FID y HPLC-UV se emplean para la caracterización de aceites vegetales incluyendo al aceite de ricino³⁸, las desventajas de estas técnicas ya han sido mencionadas.

La cromatografía de gases acoplada a masas (GC-MS) se ha utilizado para identificar isómeros de ácidos grasos. En el caso del aceite de ricino deshidratado se pueden formar dos tipos de ácidos, el ácido linolenico conjugado y no conjugado altamente usados en la industria de superficies de recubrimiento, se ha reportado el uso de GC-MS para la identificación de estos compuestos después de su derivatización pre-columna con DMOX (4,4-Dimetiloxazolina); específicamente, se logró la identificación de la posición del doble enlace tanto en sistemas conjugados como no conjugados³⁹.

La espectrometría de masas con ionización por electro-nebulización y con filtro de masa de trampa iónica se ha utilizado para estudiar los regioisómeros presentes de los triglicéridos menos abundantes en el aceite de ricino mediante la inyección directa de las fracciones obtenidas por HPLC utilizando los aductos de litio de triglicéridos, diglicéridos y los fragmentos de iones de las pérdidas de ácidos grasos; mediante esta metodología es posible la identificación de TAGs⁴⁰,⁴¹.

La técnica de infusión directa en ESI-MS también se ha realizado con el analizador de masas cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF) para el estudio de extractos obtenidos con la mezcla agua-metanol de biodiesel, teniendo la ventaja de una preparación mínima y una rápida identificación del alcohol utilizado para transesterificación, de la variedad de mono-, di- y triglicéridos residuales y de posibles adulteraciones, aunque no se reportó en este trabajo el análisis de los FAMES⁴².

La técnica de MALDI-MS, la cual proporciona información sobre los TAGs presentes en distintos aceites vegetales, ha sido utilizada para el análisis de aceite ricino por Ayorine et al., en este trabajo se identificaron los principales triglicéridos del ácido ricinoleico mediante una preparación de muestra utilizando ácido α -ciano-4-hidroxicinámico como matriz en acetonitrilo/tetrahidrofurano como disolvente²⁶, el mismo autor sugiere el uso de MALDI-TOF para el análisis de FAMES de diversos aceites vegetales incluido el aceite de ricino utilizando una solución dopante de acetato de sodio (10 mg/mL), obteniendo una correlación entre la intensidad de las señales con la cantidad de FAMES presentes por lo que se puede realizar un análisis cuantitativo⁴³.

En esta tesis se realizó el estudio de lípidos de muestras de aceite de ricino comerciales mediante el uso complementario de MALDI-TOF-MS y del ESI-TOF-MS. En particular, el screening de TAGs se abordó por MALDI, mientras que el análisis cuantitativo de los ácidos grasos se realizó a partir del estudio de FAMES por el sistema aquí propuesto FIA-ESI-QTOF-MS.



Universidad de Guanajuato

CAPITULO II OBJETIVOS

2.0 Objetivo General

- Contribuir en el desarrollo metodológico en el área de análisis de ácidos grasos en aceites cosméticos de ricino, utilizando herramientas de espectrometría de masas.

2.1 Objetivos particulares

- Implementar la técnica MALDI-TOF-MS para la obtención de los perfiles lipídicos en aceites de ricino cosméticos identificando los triglicéridos mayoritarios.
- Desarrollar un nuevo procedimiento de determinación de FAMEs en aceites de ricino mediante sistema FIA-ESI-QTOF-MS.
- Determinar ácidos grasos presentes en aceites de ricino comerciales mediante la formación de los FAMEs y su análisis por GC-FID.
- Evaluar comparativamente los resultados obtenidos en aceites comerciales mediante el procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS propuesto y por GC-FID.



Universidad de Guanajuato

CAPITULO III MATERIALES Y MÉTODOS



3.1 Materiales y reactivos

Los disolventes utilizados fueron: iso-octano, metanol, isopropanol, acetonitrilo (grado HPLC/MS; Sigma-Aldrich). El metóxido de sodio (MeONa) y el hidróxido de sodio utilizados para la reacción de transesterificación fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. El agua desionizada se adquirió de un sistema purificador de agua Milli Q Labconco Water PRO PS. Las curvas de calibración fueron preparadas en iso-octano a partir de una mezcla de FAMES de C14-C22 (pureza 99%, Supelco 18917), y ricinolato de metilo (pureza 98%), el éster metílico del ácido tridecanoico (pureza 99%; Sigma-Aldrich) utilizado como estándar interno en el análisis por GC-FID y el formiato de sodio como estándar interno en el caso del análisis por FIA-ESI-QTOF se adquirieron de Sigma-Aldrich.

Como matrices en el análisis por MALDI-TOF se utilizaron el ácido 2,5 dihidroxibenzoico (DHB), 9-aminoacridina (9AA), para-nitroanilina (PAN), 1,5 diaminonaftaleno (DAN), ácido α ciano 4-gidroxicinámico.

3.1.2 Muestras reales

Se utilizaron distintos aceites de ricino adquiridos en el mercado local, la Tabla 13 muestra las marcas utilizadas, cabe resaltar que la mayoría de las muestras presentan la leyenda de contener 100% aceite de ricino, solo la muestra 8 especifica una mezcla de aceite de ricino con aceites vegetales.

Tabla 13 Muestras de aceite de ricino empleadas.

Muestra	Marca comercial	Muestra	Marca comercial
1	Jaloma	6	Tecnofarma
2	Guadalajara	7	Crystal
3	Wetts	8	Pris
4	Farmacom	9	Linat
5	Inodrim		

3.2 Instrumentación

En el análisis de los TAGs presentes en las muestras se utilizó el espectrómetro MALDI-TOF-MS modelo Autoflex Speed (Bruker Daltonics), equipado con un láser de N₂ (337 nm). Para la introducción de muestras se utilizó la placa de acero inoxidable, la calibración externa se realizó utilizando una mezcla de péptidos MIX II Standard Test (Bruker Daltonics).

En el análisis FIA-ESI-QTOF-MS se utilizó la bomba del equipo UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific) en conjunto con una válvula de inyección conectada con el sistema de infusión directa de la fuente ESI del espectrómetro de masa modelo Maxis Impact QTOF-MS (Bruker Daltonics). El loop de inyección fue de 1.2 µL; las conexiones para transportar el disolvente/muestra fueron: 9 cm de tubo PEEK de 1/16", 0,005"/0,13 mm d.i., 5 m No. Part. 5042-6461.

Por último para el análisis cromatográfico de FAMEs se utilizó un cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 equipado con detector de ionización en llama (Perkin-Elmer, USA) y una columna capilar HP-88 (100 m x 0.25 mm, film 0.20 µm, Agilent Technologies, USA).

3.3 Resumen de procedimientos analíticos.

3.3.1 Perfil de TAGs por MALDI-TOF (procedimiento adaptado)

Para el análisis de triglicéridos por MALDI-TOF la preparación de muestra se llevó a cabo por triplicado mediante el método de gota seca, donde 1 µL de soluciones de 10 mg/mL de los distintos aceites de ricino disueltos en isopropanol/acetonitrilo (60:40) se mezclaron con 1 µL de soluciones de distintas matrices, 1 µL de la solución resultante se colocó en una placa de acero pulido, se dejó secar a temperatura ambiente para obtener la co-cristalización de la muestra-matriz, las condiciones instrumentales utilizadas en el análisis se presentan en la Tabla 14.

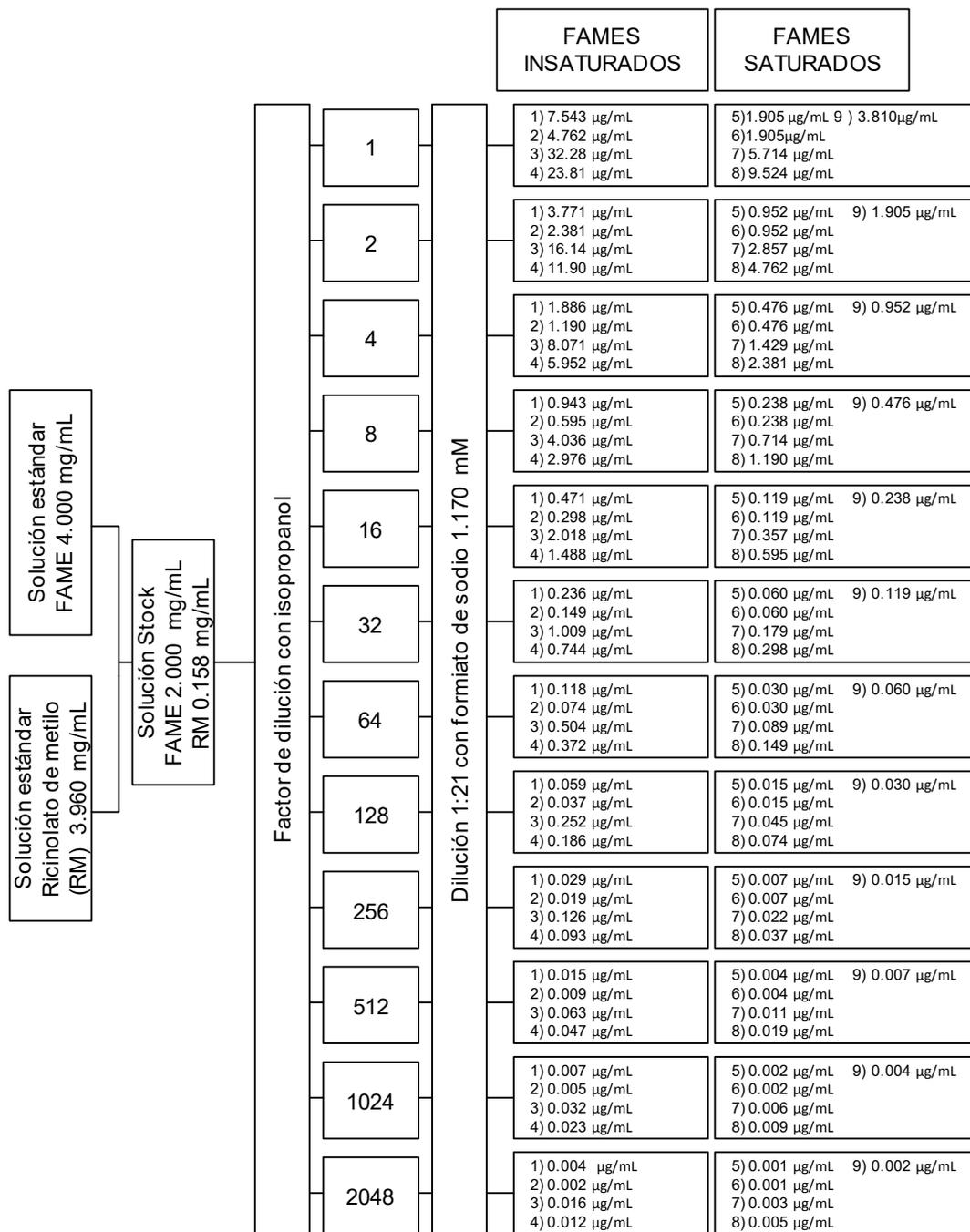
Tabla 14 Condiciones instrumentales utilizadas en el análisis de TAGs mediante MALDI-MS.

Método	RP_500-1500
Intensidad del láser	60%
Frecuencia de disparo	2000 Hz
Intervalo de <i>m/z</i>	500-1500
Ganancia de detector	20x
Smartbeam Parameter Set	3

3.3.2 Determinación de FAMEs por FIA-ESI-QTOF (procedimiento desarrollado en este trabajo).

El procedimiento utilizado en la construcción de la curva de calibración para el análisis de FAMEs por FIA-ESI-QTOF se muestra en la Figura 8, para la obtención de los parámetros analíticos se evaluó como señal analítica el área y altura de pico, obteniendo para ambos las correspondientes curvas de calibración (anexo A) para el rango de calibración lineal para cada FAME.

La transesterificación de los TAGs presentes en los aceites de ricino para la obtención de sus correspondientes FAMEs se llevó a cabo de la siguiente manera; 0.1g de una muestra de aceite se diluyó a 1 mL con una mezcla de isooctano-cloroformo (1:1) (vortex), 40 μ L de esta mezcla se colocaron en un eppendorf de 2 mL agregando 400 μ L del agente derivatizante (KOH 2%-CH₃ONa 0.5% en metanol). La mezcla se agitó por 2 min y se agregaron 500 μ L de isooctano para la extracción de los FAMEs, para la separación de fases se llevó a centrifugación por 5 min a 10000 g, la solución de FAMEs obtenida se utilizara posteriormente en el análisis mediante FIA-ESI-QTOF y GC-FID.



*1)Ricinolato de metilo, 2) linolenato de metilo, 3) linoleato de metilo, 4) oleato de metilo, 5) docosanoato de metilo, 6)eicosanoato de metilo, 7) estearato de metilo, 8) palmitato de metilo, 9)miristato de metilo.

Figura 8 Esquema de preparación de las soluciones de calibración y concentraciones finales para cada FAME para el sistema FIA-ESI-QTOF.

A partir de la solución anterior de FAMEs, se tomaron 50 μL y se agregaron 950 μL de isopropanol. En la segunda etapa de dilución, se tomaron 100 μL de esta solución agregando 300 μL de isopropanol. Finalmente, se tomaron 50 μL de la solución resultante y se agregaron 1000 μL de formiato de sodio 1.16 mM en isopropanol-agua (75:25) como estándar interno. Las muestras se centrifugaron a 10000 g por 5 minutos para evitar la introducción de partículas que puedan causar la obstrucción del sistema de infusión (Dilución 1600 veces respecto a las muestras introducidas al GC-FID). Las condiciones instrumentales se presentan en la Tabla 15.

Tabla 15 Condiciones instrumentales utilizadas en el análisis de FAMEs por FIA-ESI-QTOF-MS.

Solución portadora	75% Isopropanol al 75% en agua. 25% Acetonitrilo
Velocidad de flujo	80 $\mu\text{L}/\text{min}$
Loop de inyección	1.2 $\mu\text{L}/\text{min}$
Fuente de ionización	ESI(+)
Voltaje de desplazamiento en placa	550V
Voltaje en capilar de electro-nebulización	4500V
Presión de gas en nebulizador	0.4 Bar
Gas de sacado (N_2)	4.0 L/min
Temperatura de secado	180°C
Tiempo de transferencia	80 ms
Modo de escaneo	MS
Intervalo de m/z	50 - 1000
Frecuencia de adquisición	0.5 Hz

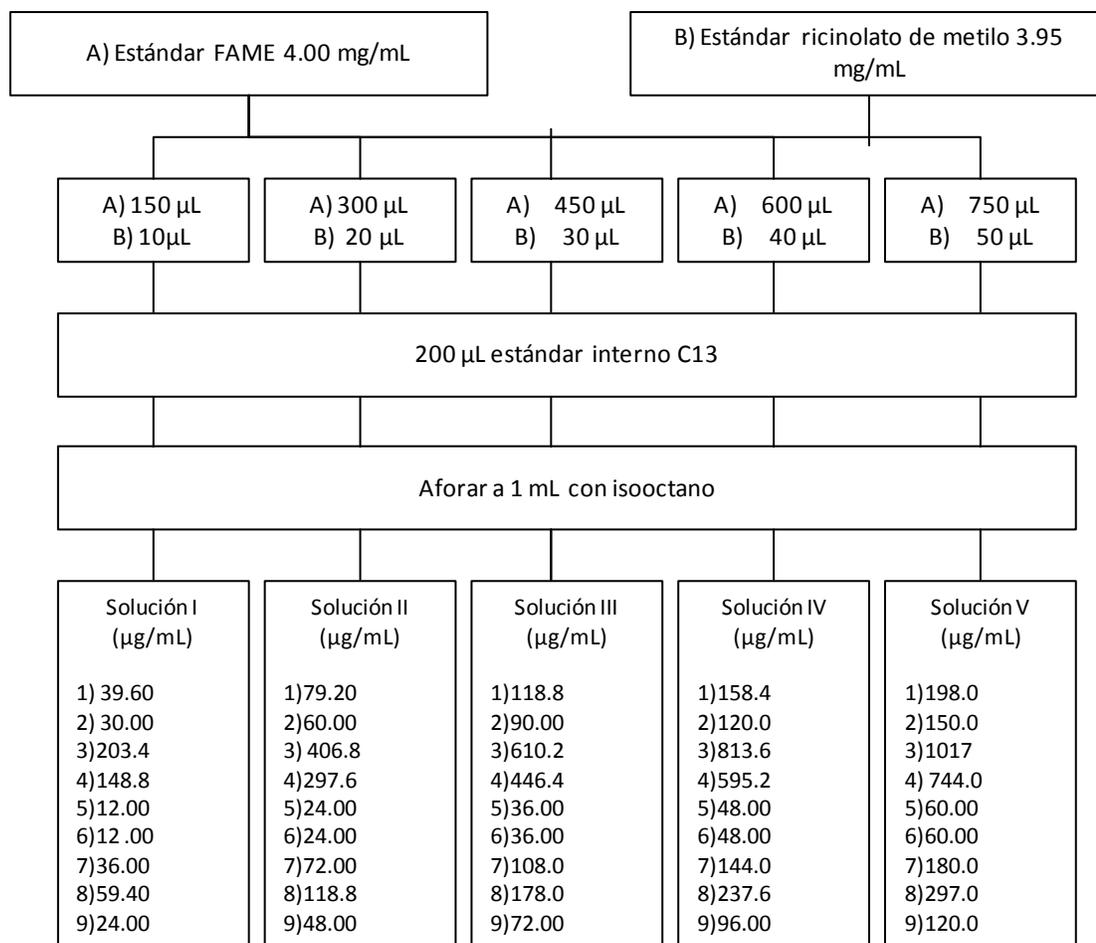
Cada una de las muestras se analizó por triplicado, las inyecciones se hicieron en intervalos de tiempo de 2 min por triplicado, pudiéndose realizar 27 corridas por 70 minutos. En la Tabla 16 se presenta la lista de valores m/z monitoreados para los distintos FAMES.

Tabla 16 Iones monitoreados por FIA-ESI-QTOF

Compuesto	Abreviatura	[M+Na] ⁺
Formiato Na	IS	226.9500
Miristato de metilo	C14:0	265.2138
Palmitato de metilo	C16:0	293.2451
Linolenato de metilo	C18:3, cis-9,12,15	315.2294
Linoleato de metilo	C18:2, cis-9,12	317.2457
Oleato de metilo	C18:1, cis-9	319.2607
Estearato de metilo	C18:0	321.2764
Ricinolato de metilo	C18:1, OH	335.2557
Eicosanoato de metilo	C20:0	349.3077
Docosanoato de metilo	C22:0	377.3390

3.3.3 Determinación de FAMES por GC-FID (procedimiento adaptado)

El procedimiento realizado en la construcción de la curva de calibración para el análisis de FAMES por GC-FID se muestra en la Figura 9.



*1) Ricinolato de metilo, 2) linolenato de metilo, 3) linoleato de metilo, 4) oleato de metilo, 5) docosanoato de metilo, 6) eicosanoato de metilo, 7) estearato de metilo, 8) palmitato de metilo, 9) miristato de metilo.

Figura 9 Esquema de preparación de las soluciones de calibración y concentraciones finales para cada FAME para el sistema GC-FID.

Para el análisis de muestras reales se utilizaron las soluciones FAMES obtenidas de la reacción de transesterificación descrita anteriormente en la sección 3.3.2, a partir de ellas se tomaron 200 µL los cuales fueron transferidos a

un tubo eppendorf y se adicionaron 200 μL de ácido tridecanoico 1 mg/mL en isooctano como estándar interno, las soluciones se llevan a 1 mL con isooctano, 20 mg de sulfato de sodio anhidro son añadidos para eliminar el agua residual, se introduce 1 μL al sistema GC-FID para su análisis, en la Tabla 17 se muestran las condiciones instrumentales utilizadas.

Tabla 17 Condiciones instrumentales para el análisis de FAMES por GC-FID.

Columna	HP88 (100 m x 0.25 mm, film 0.20 μm , Agilent Technologies,USA).			
Gas acarreador	Hidrógeno			
Flujo gas acarreador	2 mL/min			
Inyector	Split 1:10			
Temperatura de inyector	225°C			
Volumen de inyección	1 μL			
Programa de temperatura	Tasa de tiempo	°C/min	Temperatura °C	Permanencia min
	Inicial	0.0	80	1.0
	1	10.0	175	6.0
	2	5.0	210	3.0
	3	20.0	230	6.50
Tiempo total de análisis	34 minutos			
Temperatura del detector	260 °C			
Gas del detector	Hidrógeno 45 mL/min. Aire 450 mL/min			
Atenuación	-5			

3.4 Análisis de datos.

La obtención de datos en el análisis de TAGs por MALDI se utilizó programa FlexControl (versión 3.0 Bruker Daltonics) para controlar el Autoflex Speed, donde se controla la frecuencia de disparo y la intensidad del láser, el método utilizado fue RP_500-1500 el cual fue modificado a partir de un método base de BrukerDaltonics. Para el análisis de datos MALDI-TOF-MS se utilizó el software FlexAnalysis (BrukerDaltonics), mientras que para el análisis estadístico se utilizó el software ProfileAnalysis (Bruker Daltonics).

Para el análisis de FAMEs por el sistema FIA-ESI-QTOF se utilizó el programa Chromeleon Xpress para controlar la bomba del equipo UHPLC Dionex UltiMate 3000, la adquisición de datos se realizó mediante el software TOFControl, el análisis de datos se llevó a cabo por medio de DataAnalysis (BrukerDaltonics), donde a partir del cromatograma de iones totales (TIC) se generaron los cromatogramas de iones extraídos (EIC) para cada uno de los iones monitoreados, obteniéndose los fiagramas correspondientes. Para la substracción de línea base, se adoptó el parámetro de llanura 0.5, se utilizó algoritmo de Gauss para filtración con 3 puntos y 7 ciclos. La integración de los picos en fiagramas se realizó de manera automática o bien por integración manual si fue requerida. Las listas de alturas y áreas generadas fueron exportadas al programa Excel para obtener curvas de calibración por regresión lineal y para la cuantificación de los FAMEs en las muestras reales.

Finalmente, en el análisis de FAMEs por GC-FID se utilizó el software TotalChrom Navigator versión 6.2.1 para controlar el cromatógrafo de gases modelo Clarus 500 de Perkin-Elmer. El programa Gramms 8.0 se utilizó para la conversión del formato de los archivos adquiridos por TotalChrom Navigator con la finalidad de procesar los datos en el programa Agilent Chemstation.



Universidad de Guanajuato

CAPÍTULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Perfil de TAGs por MALDI-TOF-MS

Para el análisis de los TAGs, la preparación de muestra inicialmente fue basada en el artículo del Calvano et.al. quienes siguieron el método Bligh-Dyer, disolviendo la muestra en $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (1:2)²⁵; posteriormente, se agregó agua y se realizó la extracción con CHCl_3 . En preparación para MALDI de los extractos obtenidos, se examinaron distintos disolventes como son el cloroformo-metanol (1:2), metanol-agua (9:1), isopropanol-acetonitrilo (60:40), hexano-etanol-agua (60:30:8), en estos experimentos preliminares se utilizó como matriz la solución de DHB preparada de acuerdo con el protocolo de la compañía Bruker (20 mg/mL acetonitrilo 30:70 (v/v): TFA 0.1% en agua). En cuanto a la aplicación de la muestra en la placa, se examinaron diferentes métodos de mezclar/depositar la matriz/muestra, obteniéndose los depósitos de mejor homogeneidad con el método de gota seca para lo cual se mezcló 1 μL de muestra con 1 μL de matriz y se depositó 1 μL de mezcla en la placa de acero inoxidable, como se describió en la Tabla 8 de la sección 1.3.

Una vez establecidas las condiciones para el depósito en placa, se examinaron diferentes condiciones de tratamiento de muestra con la finalidad de simplificar y acortar el tiempo de análisis sin sacrificar magnitud de las señales en los espectros MS. En esta etapa se utilizó el aceite 1 (Tabla 13) y se sustituyó la extracción por una simple dilución probando diferentes solventes y sus mezclas de diferentes proporciones. El criterio de selección fue lograr la rápida y completa evaporación en la placa MALDI y tener una buena calidad de los espectros (la mejor posible relación S/R con buena repetibilidad). Finalmente, se optó por disolver la muestra de aceite en isopropanol-acetonitrilo (60:40) teniendo su concentración 10 mg/mL. A partir de esta solución se tomó 1 μL para el procedimiento de depositado de gota seca. A continuación se examinaron distintas matrices como son el DAN, PAN, 9AA, que han sido utilizadas previamente en el análisis de distintos lípidos, principalmente en el caso de los fosfolípidos²⁸. La preparación de la soluciones de matrices se presenta en la Tabla 18, para cada

una de las matrices, se utilizaron dos intensidades de láser a 30 y 60%, obteniéndose los mejores espectros en términos de repetibilidad e intensidad de señales para el caso de DHB a 30 mg/mL en isopropanol-acetonitrilo (60:40) con una intensidad de láser al 60%.

Tabla 18 Preparación de matrices.

Matriz	Preparación	Disolvente
DHB	30 mg/mL	Isopropanol-acetonitrilo (60:40)
PAN	10 mg/mL	Isopropanol-acetonitrilo (60:40)
9 AA	10 mg/mL	Isopropanol-acetonitrilo (60:40)
DAN	35 mg/mL	Isopropanol-acetonitrilo (60:40)
HCCA	10 mg/mL	85% ACN, 15% H ₂ O, 0.1% TFA

Utilizando las condiciones seleccionadas, se registraron los espectros MS en modo positivo de ionización. En la Figura 10 se presenta de manera de ejemplo el espectro de masas de un aceite de ricino comercial y el espectro adquirido para la matriz DHB (blanco). En el caso de la matriz, como se puede observar se presentan un número considerable de señales por debajo de un valor de $m/z < 600$ lo que causa interferencia y complica la identificación de señales provenientes de la muestra en esta región de masas. Puesto que los valores m/z reportados para TAGs en aceites vegetales se encuentran en el intervalo de $m/z > 800$,^{21, 32} en este trabajo se utilizó el intervalo de $m/z 500 - 1200$.

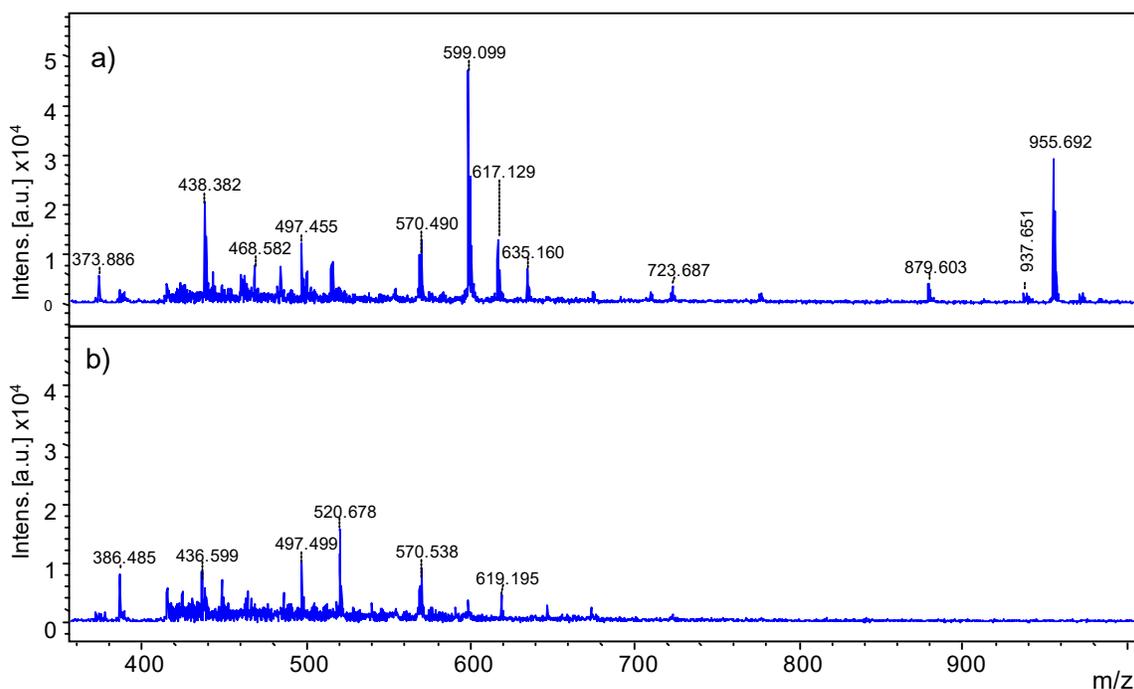


Figura 10 Espectros MALDI-TOF para a) muestra de aceite de ricino y b) matriz DHB.

De manera de ejemplo, en la Figura 11 se presentan espectros obtenidos para tres diferentes aceites comerciales de ricino ajustando la misma escala de intensidad (eje Y) en todos los espectros, lo que permite comparar magnitudes de las señales de triglicéridos correspondientes a: $\text{RRR}+\text{Na}^+$ (m/z 955.7), $\text{RRRi}+\text{Na}^+$ (m/z 971.7) y $\text{RRL}+\text{Na}^+$ (m/z 937.6)^{26, 44}; se puede observar claramente que el contenido de estos compuestos es diferente en los tres productos y disminuye en el siguiente orden: Tecnofarma > Pris > Wetts.

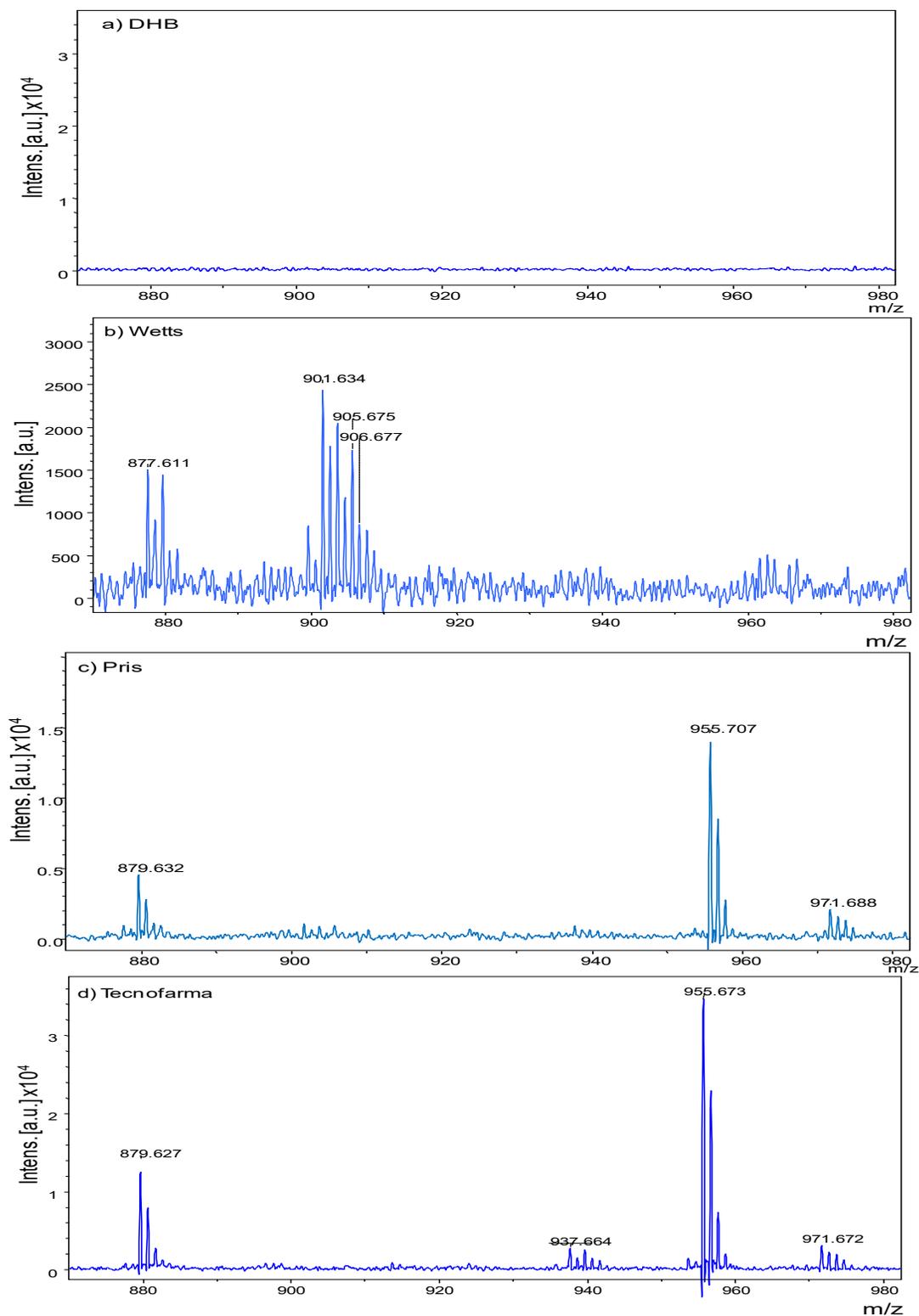


Figura 11 Espectros de masas obtenido para la matriz DHB utilizada, así como tres diferentes aceites de ricino comerciales por MALDI-TOF.

En el caso del espectro MALDI-TOF del aceite Wetts, la característica más notable es la ausencia de las señales características a m/z 955.69 de la molécula de ricinoleína, así como las demás señales de TAGs de aceite de ricino, en cambio se identificaron distintas moléculas cationizadas con sodio de TAGs como trioleína, linoleoildioilglicerol, trilinoleína, como se puede observar en la Figura 12.

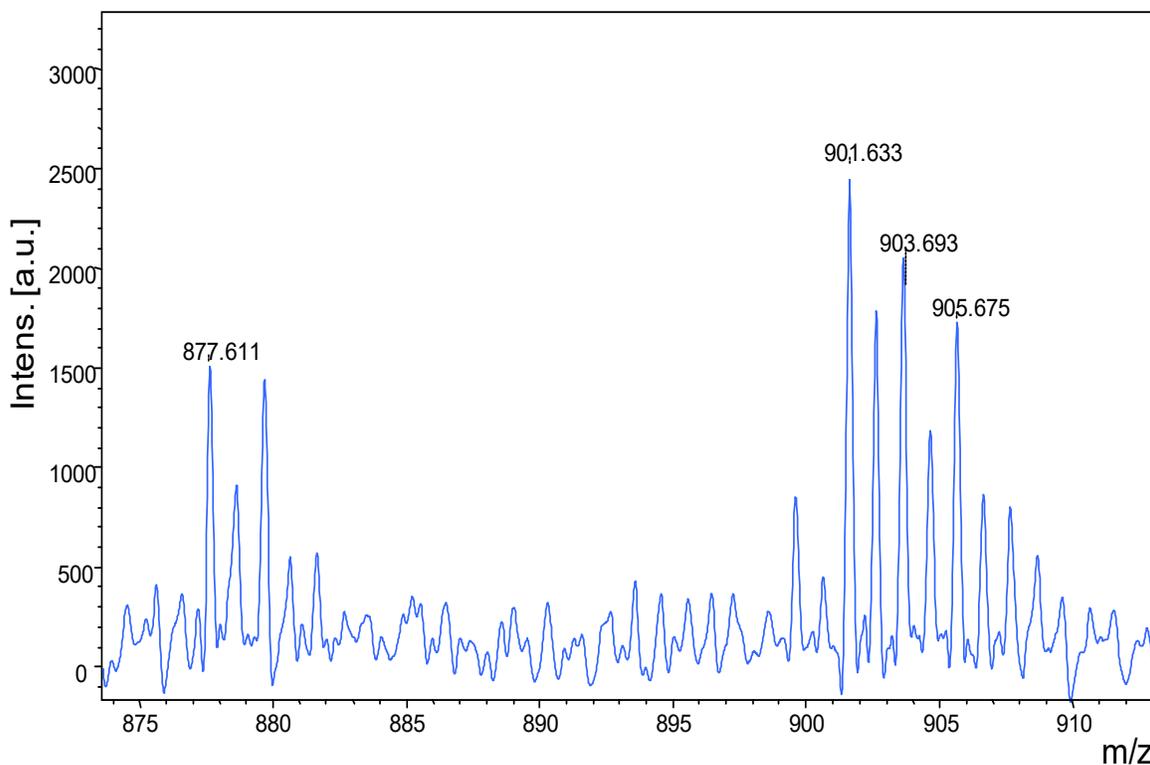


Figura 12 Región m/z 870-910 de la muestra de aceite de ricino comercial Wetts.

En la Tabla 19, se presenta la lista de una serie de señales que pudieron ser asignados a diferentes TAGs con base en reportes anteriores³⁸ y espectros incluidos en bases de datos LIPID MAPS. De acuerdo a la asignación de los distintos TAGs, es de esperar que en el análisis del perfil de FAMEs se encuentren los FAMEs de ácidos correspondientes a los ácidos grasos ricinoleico, oleico, linolenico, linoleico, palmítico y esteárico.

Tabla 19 Asignaciones TAGs en aceite de ricino

Masa teórica	m/z experimental	Asignación	LMID MAPS
879.7412	879.6267	[PLO+Na] ⁺	LMGL03010121
907.7725	907.672	[OOO+Na] ⁺	LMGL03010250
905.7569	905.6710	[OOL+Na] ⁺	LMGL03010288
905.7569	905.6710	[OLiE+Na] ⁺	LMGL03010291
905.7569	905.6710	[LLE+Na] ⁺	LMGL03010287
903.7412	903.7148	[LOL+Na] ⁺	LMGL03010327
901.7256	901.6330	[LLL+Na] ⁺	LMGL03010371
901.7256	901.6330	[ELiLi+Na] ⁺	LMGL03016150
877.7280	877.6080	[LLLi+H] ⁺	LMGL03013037
881.7569	881.6827	[OOP+Na] ⁺	LMGL03010100

(R-ácido ricinoleico, S-ácido esteárico, O- ácido oleico, L- ácido linoleico, Li- ácido linolenico, P, ácido palmítico, enlazados al glicerol mediante un enlace éster.)

Los resultados obtenidos sugieren que los aceites cosméticos podrían ser elaborados mezclando aceite de ricino con otros aceites vegetales, de tal manera que el ácido ricinoleico no es el ácido principal en los aceites y por lo tanto estos aceites no cumplen con la descripción proporcionada por el fabricante. Por ello, es importante contar con un método analítico que permita cuantificación de los ácidos grasos en aceites de uso cosmético de una manera rápida para su aplicación en el control de calidad de estos productos.

4.2 Desarrollo de un nuevo procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS para la determinación de FAMES en aceites vegetales.

En esta sección se describe un nuevo procedimiento del análisis de FAMES, basado en el análisis por inyección en flujo (FIA) y sistema ESI-QTOF-MS, los que permite la determinación de FAMES en aceites cosméticos de manera mucho más rápida en comparación a las técnicas tradicionales (Tabla 5), especialmente respecto GC-FID la cual presenta un tiempo largo de corrida cromatográfica que suele ser cercano a los 30 minutos. La idea original del trabajo fue eliminar la etapa de separación cromatográfica (posible gracias a la alta resolución del sistema ESI-QTOF-MS) e introducir los estándares y las muestras (extractos de los aceites después de la transesterificación) por infusión directa a la fuente de ionización, mediante un simple sistema de inyección al flujo, montado en el laboratorio. Con este diseño, se asegura que el volumen de las soluciones/muestras sea constante y que este volumen se transporte en forma de un segmento en el flujo del portador, adquiriendo los espectros de masas de manera continua. De esta manera, se puede ajustar el volumen de inyección adecuado para la adquisición de espectros en un intervalo m/z dado y también ajustar la frecuencia de inyecciones para lograr el tiempo más corto posible de corrida. Posterior a la adquisición de datos, se pueden obtener los “fiagramas” de iones extraídos, correspondientes a los iones más abundantes para cada uno de los FAMES de interés. Además de un tiempo corto de corrida, la importante ventaja del sistema FIA es su muy buena repetibilidad de las señales asegurada por el volumen de muestra constante y por la velocidad del flujo constante, controlada por la bomba UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific). Cabe mencionar que la infusión directa al sistema ESI-MS ha sido utilizada previamente en el análisis de aceites vegetales para la identificación de TAGs, así como proporcionar huellas dactilares de ácidos grasos libres, además de permitir la detección de contaminantes residuales provenientes de la oxidación de los ácidos grasos, sin embargo aún no se ha explorado el potencial de este sistema en la determinación de los FAMES. Con el sistema FIA, se evita el uso de la jeringa

eliminado el lavado de la misma y reduciendo de manera substancial posibles efectos de memoria.

En el desarrollo del procedimiento se utilizó la solución de FAMES Mix C14-C22 la cual contiene los FAMES más recurrentes de los ácidos grasos que constituyen los TAGs de aceites vegetales tales como el oleico, linoleico, esteárico y palmítico, sin embargo en este estándar no se encuentra presente el ácido ricinoleico. Para poder llevar a cabo el análisis de aceites de ricino, al estándar comercial de los FAMES se agregó ricinolato de metilo como se describe en la figura 9.

En primer lugar, se estableció un intervalo de calibración adecuado para ESI(+)-MS probando diferentes diluciones de la solución estándar de los FAMES para asegurar suficiente señales altas ($S/R > 10$) y por otro lado, evitar la saturación del detector. El intervalo de concentraciones seleccionado finalmente se presenta en la parte experimental (Figura 9). Utilizado la mezcla de los FAMES, se procedió con la selección de los iones mayoritarios para cada uno de los compuestos de interés. En los espectros de masa de compuestos individuales, se observaron distintos iones correspondientes a aductos de la molécula con diferentes cationes: $[M + H]^+$, $[M + NH_4]^+$, $[M + K]^+$, $[M + Na]^+$, esta complejidad de espectros es indeseable ya que compromete la cuantificación.

Con la finalidad de disminuir la formación de múltiples aductos y favorecer la formación de un solo ion mayoritario, a la muestra y a todas soluciones estándar se agregó una solución estándar de formiato de sodio 1.16 mM (típicamente utilizada para la calibración interna del espectrómetro Maxis Impact QTOF-MS); como resultado, en los espectros obtenidos se favoreció la formación de aductos con sodio para todos los FAMES presentes en la mezcla. En la Tabla 16 (Parte experimental) se presenta lista de iones seleccionados para la determinación de los FAMES en aceites cosméticos.

En las pruebas iniciales, como estándar interno se utilizó éster metílico de ácido tridecanoico; sin embargo, debido su baja polaridad tuvo un efecto negativo

en la eficacia de ionización obteniéndose bajas señales. Se decidió entonces emplear como estándar interno el mismo formiato de sodio que se agregaba a la muestra para favorecer la formación de aductos con sodio; las señales analíticas de los FAMEs individuales fueron normalizados por área o altura, respectivamente, de la señal registrada en el EIC del ion formiato m/z 226.9500.

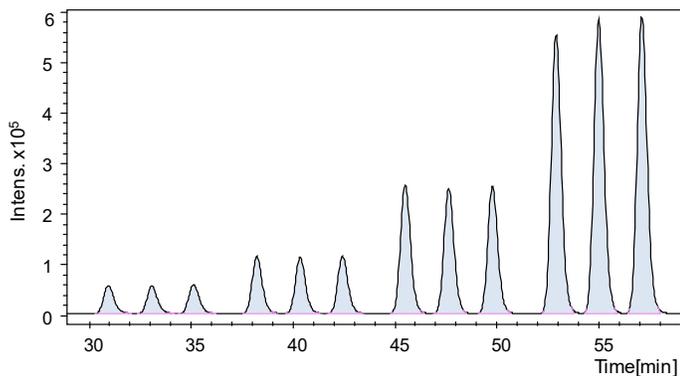
Una desventaja de utilizar típica jeringa para la infusión directa de lípidos al ESI es que se presentan efectos de memoria; era de esperar que el sistema FIA propuesto en este trabajo permita evitar dicho problema ya que se elimina la jeringa y el sistema se limpia entre las inyecciones con la solución del portador. De acuerdo con la propuesta inicial, se montó el sistema FIA, donde la solución de muestra (o estándares) se inyecta al flujo de un portador mediante una válvula de inyección, equipada con un loop de inyección de 1.2 μL ; este volumen asegura tiempo suficiente para adquisición de espectros. El flujo continuo es controlado por la bomba del equipo UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific). Se examinaron diferentes composiciones de la solución portadora, buscando que tiempo de regreso a línea base sea mínimo, eligiendo finalmente la mezcla 75 % isopropanol-agua (3:1) y 25 % ACN a un flujo de 80 $\mu\text{L}/\text{min}$. Con estos parámetros línea base para todos iones era estable entre las señales de las inyecciones sucesivas realizadas cada 2 min, permitiendo una buena integración de las señales y confirmando que no se presentaban efectos de memoria. La válvula de inyección se conecta con la entrada a la fuente ESI mediante un tubo PEEK, tal como se describe en la Parte Experimental.

La Figura 11 muestran los diagramas de iones extraídos para los FAMEs de ácidos grasos insaturados, obtenidos en el proceso de calibración, donde se puede observar una buena respuesta instrumental directamente proporcional a la concentración del analito. En la misma figura se presenta el diagrama del estándar interno (IS) adquirido en la misma corrida analítica que calibración de todos los FAMEs, se observan pequeñas fluctuaciones de la intensidad del IS entre las inyecciones sucesivas; confirmando la necesidad del IS en el procedimiento propuesto. En el caso de los FAMEs de ácidos grasos saturados (Figura 12), la

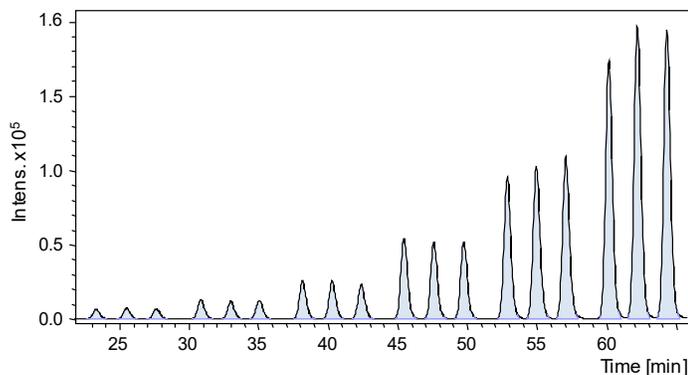
sensibilidad fue peor respecto a los ácidos insaturados. Puesto que ESI es especialmente adecuado para la ionización de compuestos polares, la mejor respuesta obtenida para ácidos insaturados respecto a los saturados era de esperarse. Hay que resaltar que los TAGs de ácidos insaturados son principales componentes de los aceites vegetales, por lo que el procedimiento propuesto parece útil para fines de este trabajo.

Figura 13 Figramas obtenidos en la calibración de FAMES para ácidos grasos insaturados (cada estándar inyectado por triplicado).

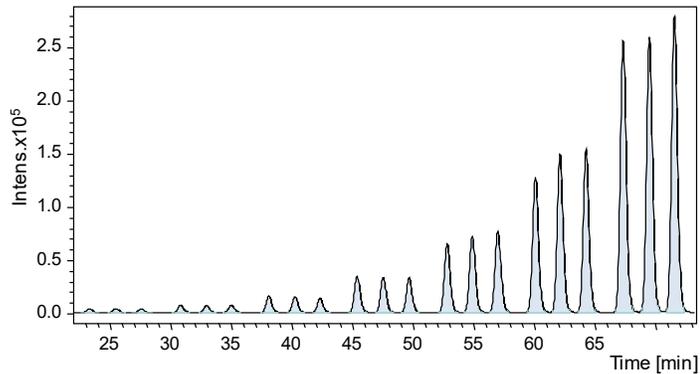
a) Ricinolato de metilo



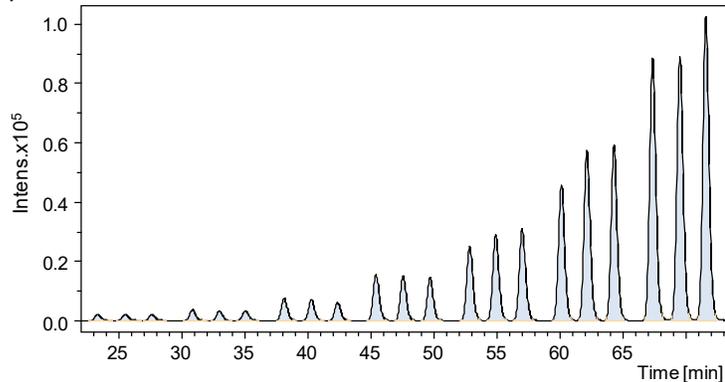
b) Linolenato de metilo



c) Linoleato de metilo



d) Oleato de metilo



e) Formiato de sodio

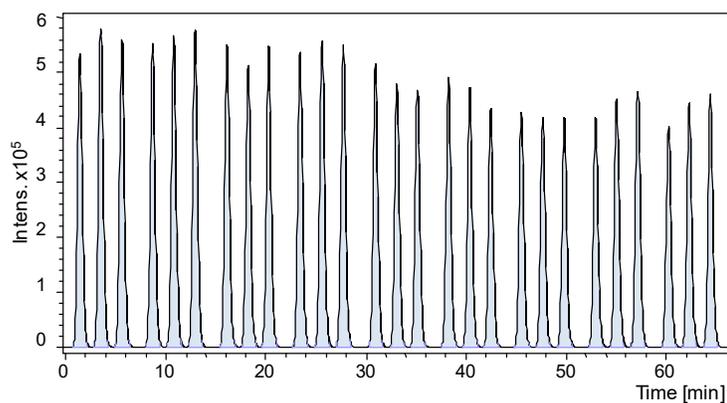
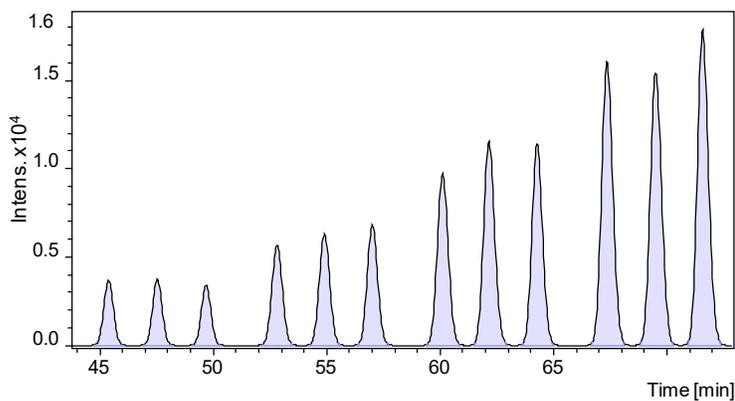
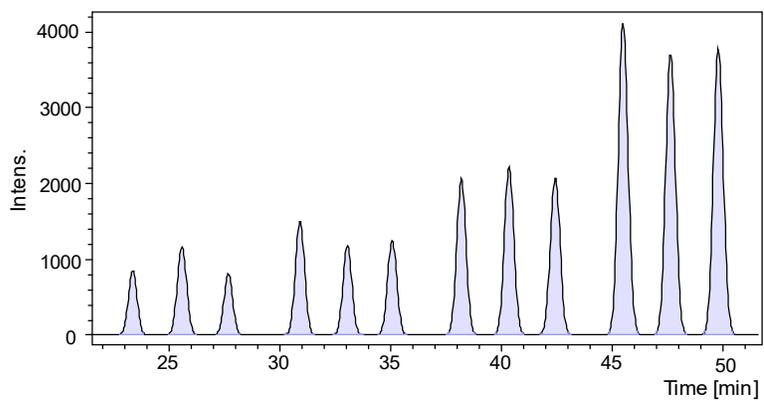


Figura 14 Figramas obtenidos en la calibración de FAMES de ácidos grasos saturados.

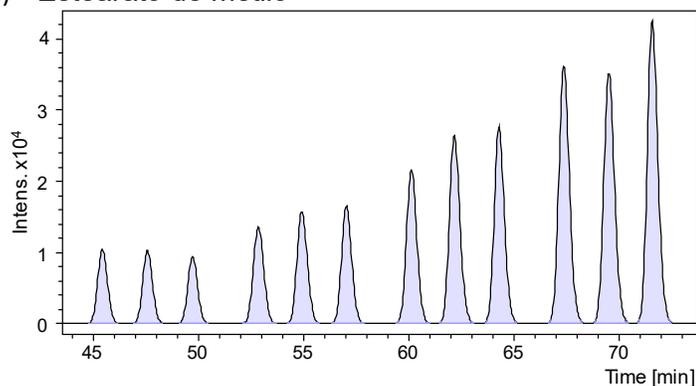
a) Docosanoato de metilo



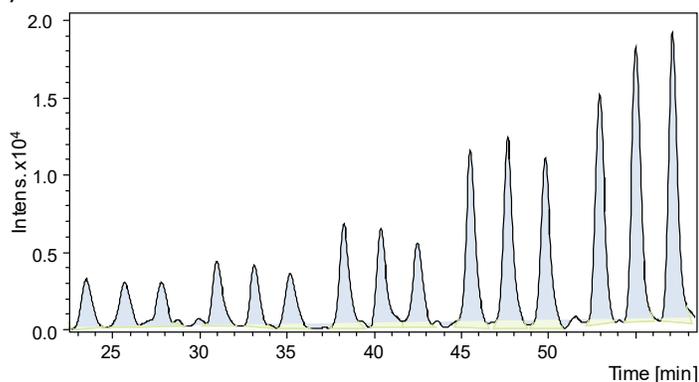
b) Esicosanoato de metilo



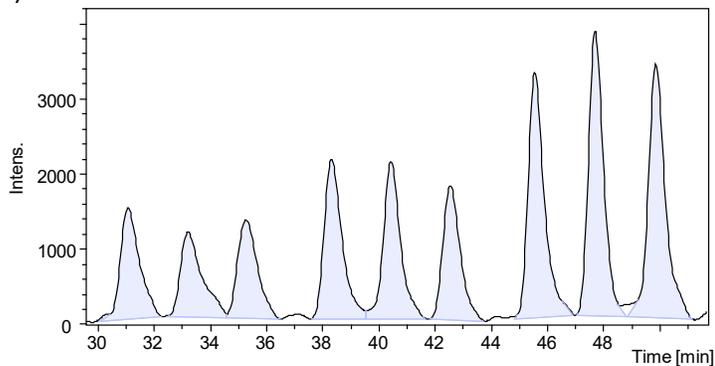
c) Estearato de metilo



d) Palmitato de metilo



e) Miristato de metilo



El proceso de calibración y cuantificación se realizó con base en tres réplicas para cada estándar, tomando el área o altura de pico como señal analítica, se calcularon las respectivas funciones de regresión lineal junto con sus coeficientes de regresión. Cabe señalar que la repetibilidad de las señales de las FAMEs fue buena tanto para área como para altura de picos (RSD 4.7 y 3.8, respectivamente, para 5 inyecciones sucesivas); pero se vio mejorada utilizando las señales normalizadas por el IS (RSD 0.9 y 2.5, respectivamente, para 5

inyecciones sucesivas). En la Tabla 20, se presentan los parámetros analíticos evaluados para FAMES de ácidos grasos insaturados con base en el área de los picos (normalizados por IS). De igual manera en la Tabla 21 se muestran los resultados obtenidos para los FAMES de ácidos grasos saturados; los resultados muestran que para los ácidos grasos insaturados se logra una mejor sensibilidad (pendiente de la curva de calibración) y un mayor intervalo lineal respecto a los FAMES de ácidos grasos saturados. Hay que resaltar sin embargo que, los coeficientes de regresión lineal para todos los FAMES fueron aceptables ($r^2 > 0.99$).

Por su parte, la Tabla 22 y 23 resume los principales parámetros analíticos evaluados utilizando como señal analítica la intensidad de pico (altura) de los FAMES de ácidos grasos insaturados y saturados respectivamente, cada uno de ellos normalizado por la intensidad de estándar interno. Se observa el mismo comportamiento que en el caso del área como señal analítica donde el rango lineal de calibración es mayor para los FAMES de ácidos grasos insaturados, a su vez, el coeficiente de calibración para todos los FAMES evaluados es mayor a 0.99 las curvas de calibración obtenidas para cada FAME de ácido se muestran en el apéndice A.

Tabla 20 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMES insaturados mediante área.

Parámetro		Ricinoleico	Linolenico	Linoleico	Oleico
Rango de calibración (ng/mL)		58.80 – 471.4	18.60 – 596.4	126.3 – 8081	11.60 – 5959
Regresión Lineal	Pendiente	3004	760.3	920.6	439.0
	Intercepto	-0.067	0.0030	-0.1495	0.0023
	R ²	0.9987	0.9975	0.9977	0.9995
Error de típico de intercepto		-0.0670	0.0053	0.0629	0.0074
Error de típico de pendiente		74.80	18.99	16.86	3.422

Tabla 21 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMES saturados mediante área.

Parámetro		Esteárico	Docosanoico	Araquídico	Palmítico	Mirístico
Rango de calibración, (ng/mL)		178.6 -1429	29.8 – 119	7.40 – 59.5	18.6 – 149	29.8 – 119
Regresión Lineal	Pendiente	65.61	92.60	136.9	80.08	64.02
	Intercepto	0.0123	0.0026	0.0005	0.0044	0.002
	R ²	0.9997	0.9991	0.9994	0.9986	0.9981
Error de típico de intercepto		0.0006	0.0005	7.543E-5	0.0002	0.0002
Error de típico de pendiente		0.7708	1.901	2.199	2.101	2.721

Tabla 22 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMES insaturados mediante intensidad.

Parámetro		Ricinoleico	Linolenico	Linoleico	Oleico
Rango de calibración, (ng/mL)		29.50 – 477.4	2.300 - 1193	63.1 - 404	2.300 – 5959
Regresión Lineal	Pendiente	2864	753.3	838.1	421.53
	Intercepto	-0.0583	2.553E-05	-0.060	0.0039
	R ²	0.9976	0.9993	0.9995	0.9996
Error de típico de intercepto		0.0195	0.0029	0.0144	0.0073
Error de típico de pendiente		79.98	6.767	8.187	3.177

Tabla 23 Parámetros analíticos obtenidos para la curva de calibración FIA-ESI-QTOF de FAMEs saturados mediante intensidad.

Parámetro		Esteárico	Docosanoico	Araquídico	Palmítico	Mirístico
Rango de calibración (ng/mL)		22.3 - 179	59.50 – 476.2	7.44 –59.5	4.70 -300	29.8 – 119
Regresión Lineal	Pendiente	133.2	85.83	143.5	78.63	63.81
	Intercepto	-0.0002	0.0038	0.0005	0.0028	0.0008
	R ²	0.9978	0.9989	0.9975	0.9959	0.9965
Error de típico de intercepto		0.0004	0.0005	0.0002	0.0003	0.0003
Error de típico de pendiente		4.338	1.925	4.985	2.246	3.746

Para ambas modalidades de la señal analítica (área y altura de pico), se obtuvo el siguiente orden decreciente de sensibilidad para FAMEs de los ácidos grasos insaturados:

á. ricinoleico > á. linoleico ≈ á. linolenico > á. oleico

de acuerdo a su polaridad debida a la presencia de enlaces dobles y/o grupos funcionales en su estructura:

1 enlace doble + 1 grupo hidroxilo > dos enlaces dobles ≈ tres enlaces dobles > un enlace doble.

De manera general, la sensibilidad (pendiente de la función de regresión lineal) siempre fue más alta midiendo el área de los picos, sin embargo el error de la pendiente en mayoría de los casos fue menor para altura del pico.

Con base en el proceso de calibración, se evaluaron los límites de detección (LD) y los límites de cuantificación (LC), los cuales se presentan en la tabla 24. En concreto, se utilizaron las fórmulas:

$$LD = 3\sigma/m, LC = 10\sigma/m$$

donde σ se obtuvo como desviación estándar con base en 11 lecturas individuales del blanco y m corresponde a la pendiente de función de regresión lineal obtenida para un FAME dado.

Tabla 24 Límites de detección y límites de cuantificación evaluados en el proceso de calibración utilizando altura de pico (I) y área del pico (A) de los FAMES y del IS.

FAME de ácido	Calibración $S=A_{FAME}/A_{IS}$		Calibración $S=I_{FAME}/I_{IS}$	
	LD ($\mu\text{g/L}$)	LC ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	LC ($\mu\text{g/L}$)
Ricinoleico	3.12	10.4	1.57	5.23
Linolenico	5.52	18.4	0.49	1.63
Linoleico	8.85	29.51	9.29	30.95
Oleico	11.6	38.6	0.97	3.24
Docosanoico	25.9	86.3	11.0	36.7
Araquídico	9.15	30.5	13.4	44.7
Estearico	51.3	171	19.3	64.3
Palmítico	79.3	264	54.4	181
Mirístico	72.6	242	56.4	188

Es de notar que más bajos valores de LD y de LC fueron obtenidos para altura de pico como señal analítica, prácticamente para todos los FAMES.

Las funciones de calibración se utilizaron para la cuantificación de FAMES individuales en muestras de aceites comerciales. Los resultados obtenidos se presentan en la sección 4.4.

4.3. Análisis de los FAMES en aceites de ricino por GC-FID.

Para validación de los resultados obtenidos en aceites cosméticos por el procedimiento propuesto FIA-ESI-QTOF-MS, en las mismas muestras transesterificadas se llevó a cabo la determinación de los FAMES por GC-FID, utilizado como método de referencia. El hecho de utilizar las mismas muestras transesterificadas en ambos procedimientos permitió evaluar el desempeño de FIA-ESI-QTOF-MS. Las condiciones instrumentales GC-FID se describen en la sección 3.3.1. Las condiciones de separación se ajustaron para asegurar la resolución cromatográfica de los 10 compuestos presentes en la mezcla FAME MIX C14–C22 a la que se agregó el estándar de ricinolato de metilo.

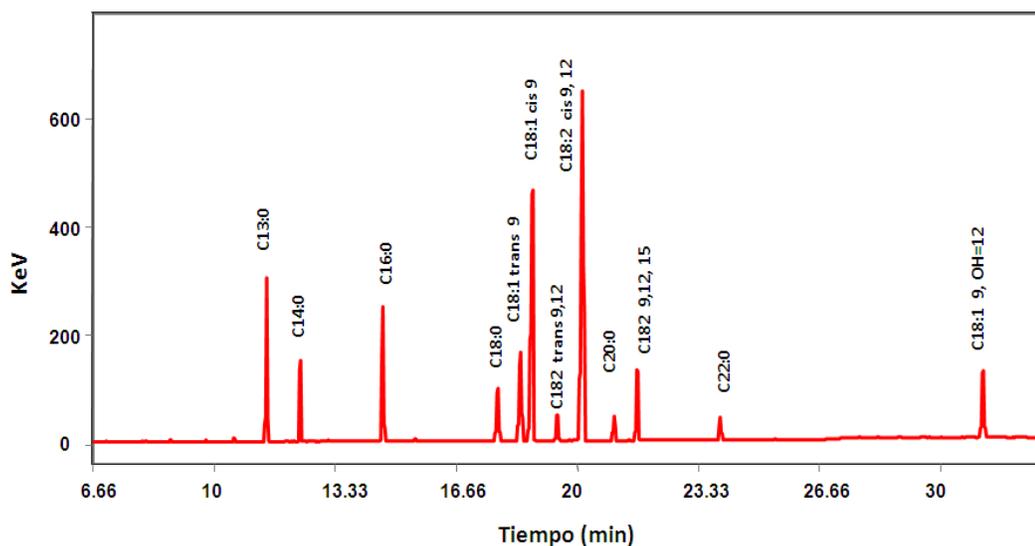


Figura 15 Cromatograma típico para la solución V de estándar de FAMES de la figura 9.

En la Figura 15 se presenta un cromatograma obtenido para una solución de calibración, posteriormente en la Tabla 25 se resumen los parámetros

analíticos evaluados para cada uno de los FAMEs. Las funciones de calibración y la cuantificación en muestras reales se realizaron tomando el área de pico como señal analítica.

En la calibración de FAMEs por GC-FID se utilizó como estándar interno el FAME del ácido tridecanoico, como se observa en la Tabla 25 los coeficientes de correlación para cada FAME era mayor que 0.99, para el caso de muestras reales se analizaron nueve diferentes tipos de aceite de ricino, su descripción se muestra en la Tabla 13, los resultados para la cuantificación de los FAMEs presentes en las distintas muestras se presentan en la siguiente sección.

Tabla 25 Parámetros analíticos evaluados en el proceso de calibración por GC-FID.

FAME	Tiempo de retención (min)	Rango de calibración (mg/mL)			m	b	R ²
C14	12.38	0.02	-	0.12	0.865	7.40E-03	0.9987
C16	14.65	0.06	-	0.30	0.807	6.43E-03	0.9995
C18	17.79	0.04	-	0.18	0.756	-3.51E-03	0.9981
C18:1, n9 trans	18.42	0.06	-	0.30	0.798	1.35E-03	0.9993
C18:1, n-9 cis	18.73	0.15	-	0.74	0.881	-9.13E-03	0.9991
C18:2, n=9,12 trans	19.45	0.20	-	1.02	0.752	5.82E-03	0.9957
C18:2, n-9,12 cis	20.12	0.01	-	0.07	0.887	-4.61E-04	0.9993
C20	21.02	0.01	-	0.06	0.739	6.26E-03	0.9975
C18:3, n-9,12,15 cis	21.66	0.03	-	0.15	0.939	-1.73E-02	0.9978
C22	23.95	0.01	-	0.06	0.731	5.65E-03	0.9977
C18:1, OH-9	31.19	0.04	-	0.20	0.834	-5.91E-03	0.9999

*m=pendiente, b=intercepto, R²= coeficiente de correlación.

4.4. Resultados de determinación de los FAMEs en aceites cosméticos por FIA-ESI-QTOFMS y por GC-FID.

Los procedimientos descritos en las secciones anteriores fueron utilizados para la determinación de los FAMES en nueve aceites cosméticos comerciales. En las tablas 26-34 se presentan los datos obtenidos para los dos procedimientos. En las mismas tablas se incluye el porcentaje de recuperación total de FAMES evaluado de la manera siguiente:

$$R = (\Sigma \text{FAMES}/m) \cdot 100$$

Donde ΣFAMES es suma de masas de FAMES individuales determinados en una muestra dada (mg/g), de la cual se tomó para el análisis masa m (g). Es importante señalar que el aceite contiene triglicéridos mientras que ambos procedimientos proporcionan concentraciones de FAMES (mg/g). La diferencia de masa molar entre un TAG y tres FAMES es solo de 4Da correspondiente a 4 átomos de hidrógeno, como se muestra en la ecuación siguiente:

$$M_{\text{TAG}} = 3(M_{\text{FAME}} - M_{\text{C}} - 3M_{\text{H}}) + 3M_{\text{C}} + 5M_{\text{H}} = 3M_{\text{FAME}} + 4M_{\text{H}}$$

por lo que error que se comete tomando suma de FAMES para balance de masa de TAGs en la muestra es despreciable.

En las Tablas 26-34 se presenta también el contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, el porcentaje calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$R_{\text{ins}} = (\Sigma \text{FAMES}_{\text{ins}} / (\Sigma \text{FAMES})) \cdot 100$$

donde $\Sigma \text{FAMES}_{\text{ins}}$ corresponde a la suma de los FAMES de los ácidos insaturados y ΣFAMES es suma de todos FAMES determinados en la muestra.

Finalmente, en las mismas tablas se muestra el valor p obtenido en el test t de dos colas empleado para comparar resultados obtenidos por FIA-ESI-MS (altura o área) respecto GC-FID.

Tabla 26 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Jaloma. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS, altura		p	FIA área		P
	C, mg/g	DE	C, mg/g	DE		C, mg/g	DE	
Ricinoleico	185	9	189	12	>0.05	195	18	>0.05
Linolenico	5.63	0.18	4.82	1.12	>0.05	5.60	1.59	>0.05
Linoleico	35.1	1.2	39.7	1.7	0.0093	68.4	7.1	0.0007
Oleico	26.3	0.9	32.1	2.2	0.0067	30.6	7.7	>0.05
Docosanoico			6.61	0.71		15.4	0.7	
Araquídico			6.62	0.68		21.4	1.7	
Esteárico	21.2	1.4	20.4	1.3	>0.05	45.1	3.6	0.0002
Palmítico	38.4	2.2	45.3	2.6	>0.05	66.8	2.7	0.0001
R, %	31.2		34.5			44.8		
Rins, %	80.9		77.1			66.8		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 26 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Guadalajara. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		p	FIA-ESI-MS área		P
	C, mg/g	DE	C, mg/g	DE		C, mg/g	DE	
Ricinoleico	112	4	126	6	0.0141	128	7	0.0132
Linolenico	8.87	0.63	10.2	0.9	>0.05	11.2	1.1	0.0167
Linoleico	293	10	308	11	>0.05	316	13	0.0360
Oleico	167	6	175	5	>0.05	179	11	>0.05
Docosanoico	nd	-	7.71	0.32	-	16.2	0.2	-
Araquídico	nd	-	12.8	0.3	-	25.9	1.8	-
Esteárico	38.4	1.8	36.1	4.6	>0.05	60.8	5.3	0.0011
Palmítico	118	4	121	6	>0.05	159	17	0.0076
R, %	73.7		80.4			89.6		
Rins, %	78.8		77.7			70.8		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 28 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Wetts. (se presentan valores promedio *c*, con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; *p* – valor obtenido en prueba *t* de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		<i>p</i>	FIA-ESI-MS área		<i>P</i>
	<i>C</i> , mg/g	DE	<i>C</i> , mg/g	DE		<i>C</i> , mg/g	DE	
Ricinoleico	nd	-	6.71	0.67	-	8.51	1.56	-
Linolenico	68.9	1.9	76.4	2.6	0.0166	80.8	4.1	0.0052
Linoleico	474	9	481	11	>0.05	469	18	>0.05
Oleico	224	7	234	9	>0.05	239	12	>0.05
Docosanoico	nd	-	9.32	1.90	-	22.6	2.8	-
Araquídico	nd	-	12.3	0.1	-	23.2	2.7	-
Esteárico	58.5	2.1	62.1	2.4	>0.05	72.6	2.5	0.0009
Palmítico	103	3	109	6	>0.05	159	10	0.0004
<i>R</i>, %	92.8		99.1			107.5		
<i>Rins</i>, %	82.6		80.6			74.2		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 27 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Farmacon. (se presentan valores promedio *c*, con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; *p* – valor obtenido en prueba *t* de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC_FID		FIA-ESI-MS altura		<i>p</i>	FIA-ESI-MS área		<i>P</i>
	<i>C</i> , mg/g	DE	<i>C</i> , mg/g	DE		<i>C</i> , mg/g	DE	
Ricinoleico	112	7	115	2	>0.05	121	4	>0.05
Linolenico	33.4	2.4	38.3	3.2	>0.05	39.7	4.2	0.0435
Linoleico	112	8	122	5	>0.05	133	6	0.0110
Oleico	215	12	221	11	>0.05	245	9	0.0129
Docosanoico	nd	-	5.32	0.89	-	22.6	0.2	-
Araquídico	nd	-	4.80	0.74	-	23.2	0.5	-
Esteárico	35.2	2.1	33.1	1.5	>0.05	41.9	2.8	0.0147
Palmítico	51.0	2.5	46.9	1.8	0.0412	62.9	4.2	0.0068
<i>R</i>, %	55.9		58.7			68.9		
% FAMES ins	84.6		84.6			78.2		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 28 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Inodrim. (se presentan valores promedio *c*, con respectiva desviación estándar, *DE* obtenidos para tres replicas; *p* – valor obtenido en prueba *t* de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		<i>p</i>	FIA-ESI-MS área		<i>p</i>
	<i>C</i> , mg/g	<i>DE</i>	<i>C</i> , mg/g	<i>DE</i>		<i>C</i> , mg/g	<i>DE</i>	
Ricinoleico	179	11	172	4	>0.05	197	6	0.0338
Linolenico	nd	-	4.81	0.11	-	4.80	0.19	-
Linoleico	38.1	1.8	41.1	1.9	>0.05	46.2	2.8	>0.05
Oleico	28.3	1.4	26.5	1.6	>0.05	29.6	1.5	>0.05
Docosanoico	nd	-	5.09	0.29	-	9.18	0.67	-
Araquídico	nd	-	10.3	0.1	-	15.9	0.2	-
Esteárico	10.2	0.9	10.2	0.6	>0.05	14.4	4.6	>0.05
Palmítico	18.9	1.7	36.9	1.1	0.0001	45.0	2.1	0.0000
<i>R</i>, %	27.5		30.7			36.2		
% FAMES ins	89.4		79.6			76.7		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 29 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Tecnofarma. (se presentan valores promedio *c*, con respectiva desviación estándar, *DE* obtenidos para tres replicas; *p* – valor obtenido en prueba *t* de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		<i>p</i>	FIA-ESI-MS área		<i>p</i>
	<i>C</i> , mg/g	<i>DE</i>	<i>C</i> , mg/g	<i>DE</i>		<i>C</i> , mg/g	<i>DE</i>	
Ricinoleico	189	8	182	13	>0.05	187	12	>0.05
Linolenico	5.59	1.21	5.01	0.32	>0.05	5.18	0.17	>0.05
Linoleico	38.9	0.9	41.1	2.9	>0.05	48.3	2.1	0.0010
Oleico	25.5	0.5	26.5	1.6	>0.05	30.9	2.7	0.0136
Docosanoico	nd	-	5.12	0.28	-	13.8	1.2	-
Araquídico	nd	-	10.3	0.1	-	18.6	1.6	-
Esteárico	15.6	0.6	14.3	2.4	>0.05	25.6	1.8	0.0004
Palmítico	30.8	1.1	26.9	2.1	0.0232	35.6	2.7	0.0219
<i>R</i>, %	30.5		31.1			36.5		
% FAMES ins	84.8		81.8			74.4		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 30 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Crystal. (se presentan valores promedio *c*, con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; *p* – valor obtenido en prueba *t* de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		<i>p</i>	FIA-ESI-MS área		<i>P</i>
	<i>C</i> , mg/g	DE	<i>C</i> , mg/g	DE		<i>C</i> , mg/g	DE	
Ricinoleico	167	7	164	11	>0.05	171	13	>0.05
Linolenico	11.4	0.6	8.42	0.73	0.0027	9.54	0.32	0.0045
Linoleico	42.8	1.2	43.9	1.3	>0.05	52.7	1.4	0.0004
Oleico	23.7	0.4	27.0	2.6	0.0478	34.7	2.2	0.0005
Docosanoico	nd	-	5.56	0.61	-	11.7	1.5	-
Araquídico	nd	-	7.61	0.64	-	16.1	1.9	-
Estearico	12.1	0.6	10.8	0.8	>0.05	46.9	0.8	0.0000
Palmítico	35.9	2.1	38.3	1.3	>0.05	55.4	0.9	0.0001
<i>R</i>, %	29.3		30.5			39.8		
% FAMES ins	83.6		79.6			67.3		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 31 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Pris. (se presentan valores promedio *c*, con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; *p* – valor obtenido en prueba *t* de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		<i>p</i>	FIA-ESI-MS área		<i>p</i>
	<i>C</i> , mg/g	DE	<i>C</i> , mg/g	DE		<i>C</i> , mg/g	DE	
Ricinoleico	47.2	1.5	48.9	4.2	>0.05	53.3	0.2	0.0011
Linolenico	61.7	2.6	63.4	5.1	>0.05	67.7	0.3	0.0083
Linoleico	373	13	380	13	>0.05	391	4	>0.05
Oleico	177	6	169	10	>0.05	172	3	>0.05
Docosanoico	nd	-	7.91	1.10	-	18.5	1	-
Araquídico	nd	-	8.43	0.24	-	22.8	0.2	-
Estearico	54.7	1.2	61.7	2.8	0.0082	69.5	5.7	0.0058
Palmítico	78.7	2.4	83.2	3.5	>0.05	133	11	0.0006
<i>R</i>, %	79.2		82.2			92.8		
% FAMES ins	83.2		80.4			73.7		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

Tabla 32 Resultados obtenidos por GC-FID y mediante FIA-ESI-QTOF para el aceite de ricino marca Linat. (se presentan valores promedio \bar{c} , con respectiva desviación estándar, DE obtenidos para tres replicas; p – valor obtenido en prueba t de dos colas comparando los resultados del procedimiento propuesto con los del GC-FID).

FAME del ácido:	GC-FID		FIA-ESI-MS altura		p	FIA-ESI-MS área		p
	mean	SD	Mean	SD		mean	SD	
Ricinoleico	196	17	211	19	>0.05	189	22	>0.05
Linolenico	6.21	0.31	6.39	0.56	>0.05	6.91	0.62	>0.05
Linoleico	47.6	3.4	50.6	4.4	>0.05	65.7	2.3	0.0008
Oleico	29.6	2.3	33.3	3.3	>0.05	37.5	0.2	0.0020
Docosanoico	nd	-	3.52	0.71	-	9.38	0.57	-
Araquídico	nd	-	7.19	0.21	-	15.6	0.8	-
Esteárico	18.3	1.1	16.5	1.1	>0.05	50.2	2.4	0.0000
Palmitico	35.2	1.2	41	1.4	0.0280	56.3	1.9	0.0000
R, %	33.3		36.9			43.0		
% FAMES ins	83.9		81.5			69.5		

R - porcentaje de recuperación total de FAMES, %;

Rins - contenido relativo de FAMES de ácidos insaturados respecto a todo los FAMES encontrados, %

De manera general, en las Tablas 26-34 se observa una mejor congruencia entre los resultados GC-FID y FIA-ESI-QTOF-MS con base en la altura respecto los obtenidos por el procedimiento propuesto utilizando área de los picos. Debido a este mejor desempeño, se tomaron en cuenta los resultados obtenidos midiendo altura de los picos.

En la evaluación comparativa del GC-FID y FIA-ESI-QTOF-MS (altura), en la mayoría de los análisis la prueba t no reveló diferencias estadísticamente significativas, lo que es indicativo de la veracidad de los resultados obtenidos. Cabe señalar también que la congruencia entre dos procedimientos fue mejor para FAMES de ácidos insaturados (83% de resultados con $p > 0.05$) respecto a los saturados (61% de resultados con $p > 0.05$). Para los ácidos saturados docosanoico y araquídico, estos solamente pudieron ser cuantificados por el procedimiento propuesto mientras que GC-FID no presentó suficiente poder de detección para estos ácidos minoritarios. Es relevante que, además de resultados congruentes para los FAMES individuales, los porcentajes de recuperación de FAMES y los porcentajes del contenido relativo de FAMES insaturados fueron muy

similares para GC-FID y FIA-ESI-QTOF-MS (altura), confirmando aún más la validez de los resultados obtenidos.

En cuanto a los resultados obtenidos para nueve productos comerciales, hay que resaltar dos siguientes aspectos:

1. La recuperación de FAMES totales varía desde 30.5% hasta 99.1%, lo que indica que diferentes fabricantes utilizan cantidades diferentes de aditivos en los aceites cosméticos (Tablas 26-34).
2. La cantidad del ácido ricinoleico y la distribución relativa de los FAMES individuales fue diferente en cada uno de los productos, como se presenta en la Figura 12. Tomando en cuenta que todos aceites fueron descritos por el fabricante como “aceite de ricino”, nuestros resultados sugieren adulteraciones y confirman la necesidad de llevar a cabo el control de calidad de aceites cosméticos.

En cuanto a los aditivos, los cosméticos suelen presentar una serie de varias clases de aditivos a fin de obtener efectos sinérgicos entre ellos como son humectantes, tensoactivos, aromatizantes, conservantes, antioxidantes etc. Los antioxidantes se utilizan para retardar los procesos oxidativos en los lípidos evitando de este modo el deterioro, el enranciamiento y la decoloración. Entre algunos de los antioxidantes sintéticos más utilizados se encuentran los antioxidantes fenólicos como el t-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-di-t-butil-p-hidroxitolueno (BHT), y t-butilhidroquinona, su uso en productos cosméticos se debe principalmente a su estabilidad química, al bajo costo y disponibilidad. El uso de antioxidantes naturales como la vitamina E especialmente el α -tocoferol (α -t) y acetato de α -tocoferol (α -ta) son ampliamente⁴⁵ usados en la industria cosmética. Sin embargo, a largo plazo y en uso desmedido pueden resultar en riesgos para la salud. Recientemente la administración de alimentos y fármacos de Estados Unidos (FDA) permite la utilización de BHA y BHT a una concentración máxima de 0.02% (w/w) debido a que pueden presentar alteraciones endocrinas.

La conservación de productos cosméticos es necesaria para evitar la alteración y degradación de la formulación a través de la contaminación microbiana. Los conservantes en alimentos, bebidas, cosméticos y productos farmacéuticos se utilizan para retardar o inhibir el crecimiento de organismos microbianos ya que presentan actividad antibacteriana y antifúngica eficaz. Los conservantes usados comúnmente son el ácido benzoico, ácido sórbico, y ésteres del ácido *p*-hidrozibenzoico (parabenos). En la industria cosmética los parabenos, como el metil parabeno (MP), etilparabeno (EP), propilparabeno (PP) y butilparabeno (BP) son aditivos importantes. Estos parabenos se utilizan en la formulación de la mayoría de todos los tipos de cosméticos (cremas, aceites etc.) debido a que no presentan olor y sabor perceptible, su pH es neutro, no producen decoloración y no causan endurecimiento. El amplio uso de parabenos en cosméticos surge de su baja toxicidad, amplio espectro de actividad, aceptación reguladora en todo el mundo, estabilidad química, la biodegradabilidad y bajo costo. La directiva de la Comunidad Económica Europea (CEE) permite el uso de parabenos con una concentración máxima individual de 0.4% (w/w) y la concentración total máxima de 0.8% (w/w).⁴⁶

Nuestros resultados sugieren que la proporción de aceite:aditivo no es constante en todos productos y demuestran la necesidad de contar con procedimientos analíticos adecuados para la identificación y cuantificación de dichos aditivos con fines de control de calidad.

En cuanto a segundo aspecto, el aceite de ricino típicamente contiene TAG de ácido ricinoleico como componente mayoritario (Tabla 4), pero el intervalo del contenido relativo de este FAME en productos analizados en este trabajo fue de 0.7 a 58.5 % (Figura 15).

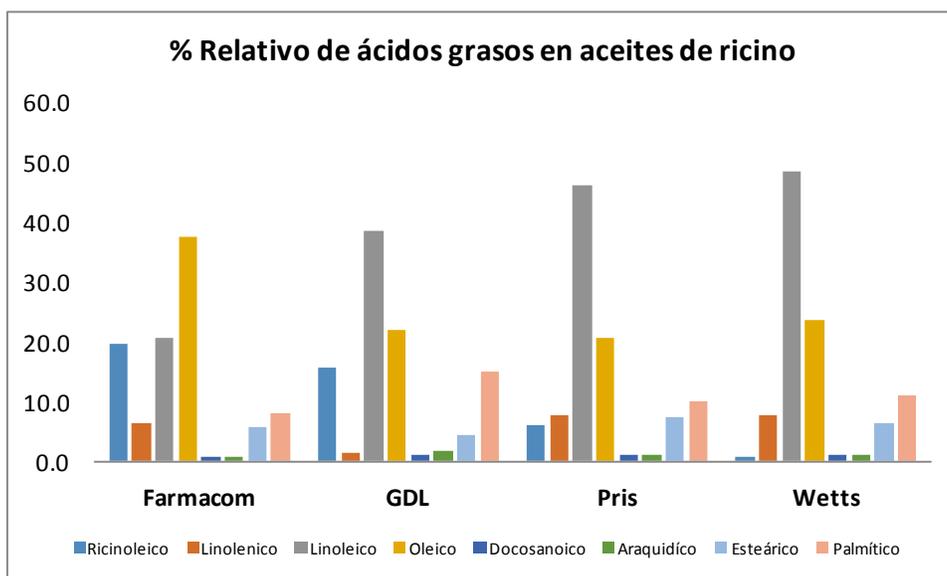
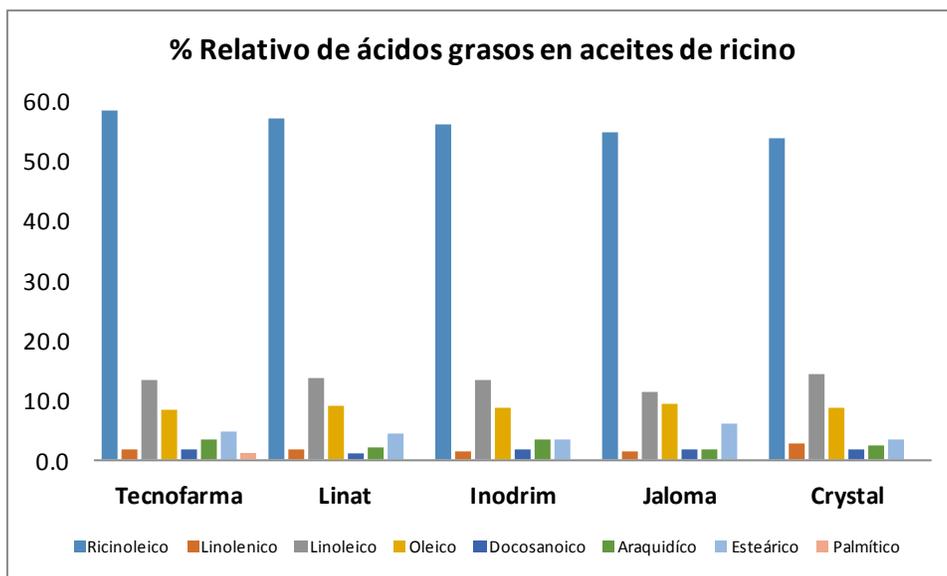


Figura 15 Distribución relativa de FAMES en aceites de ricino.

Cabe resaltar que únicamente el aceite Pris en sus especificaciones menciona que es una mezcla de aceite de ricino y aceites vegetales, la comparación de distribución relativa de ácidos grasos de este aceite con los demás sugiere que los aceites Farmacom, Guadalajara y Wetts presentan una

distribución relativa similar donde el ácido ricinoleico no es componente mayoritario, por lo que se presenta adulteración en los aceites.

En el caso extremo (producto Wetts), ácido ricinoleico correspondió a 0.7% de FAMEs totales y este producto parece ser una mezcla de aceites vegetales baratos, con alta proporción del ácido palmítico. Por su parte, los aceites Jaloma, Inodrim, Tecnorama, Linat y Crystal cumplen con la descripción en la etiqueta debido al alto contenido del ácido ricinoleico (Figura 15). De nuevo, el análisis de nueve aceites comerciales claramente indica la necesidad de un control rutinario de la composición de estos productos que se encuentran en el mercado. Para este fin, el procedimiento propuesto (FIA-ESI-QTOF-MS (altura)) es muy adecuado, debido a que no se requiere una separación cromatográfica y se acorta el tiempo de adquisición/análisis de datos. Al utilizar el método GC-FID el tiempo de corrida cromatografía fue de 34 minutos, FIA-ESI-QTOF-MS se pueden correr 23 muestras por hora.



Universidad de Guanajuato

CAPITULO V CONCLUSIONES

5.1 Conclusiones

El presente trabajo de tesis se enfocó en el desarrollo de un procedimiento analítico para la determinación de FAMEs de ácidos grasos en muestras de aceite de ricino cosméticos adquiridos en el mercado local. En primera etapa, fue importante conocer el perfil de los TAGs presentes en los distintos aceites, los cuales se examinaron por medio de MALDI-TOF-MS. Los resultados obtenidos confirmaron presencia del TAG del ácido ricinoleico; sin embargo, en diferente cantidad en cada uno de los productos y no siempre como el componente mayoritario. En particular, para uno de los aceites (Wetts), no se detectaron señales características del TAGs ricinoleina. Aunado a esto, se identificaron TAGs de ácidos grasos insaturados y, en menor proporción, de ácidos grasos saturados; datos que en su conjunto sugirieron posibles adulteraciones.

En la segunda parte de la tesis, se desarrolló un nuevo procedimiento para la determinación de FAMEs por ESI-QTOF-MS. La idea original fue eliminar separación cromatográfica de compuestos, aprovechando alta resolución del ESI-QTOF-MS. Se montó un simple sistema FIA para la introducción directa de las muestras/estándares con el fin de: (i) eliminar el uso de la jeringa, (ii) usar una solución portadora adecuada para evitar efectos de memoria, (iii) establecer un volumen constante de inyección y lograr buena frecuencia de muestreo. Otro punto importante fue favorecer formación de un ion mayoritario para cada compuesto (aducto de sodio), para lo cual a las muestras y estándares se agregó formiato de sodio (concentración final 1.6 mM). Al mismo tiempo, ion formiato se utilizó como estándar interno mejorando el desempeño del método en términos de precisión. El tratamiento de datos adquiridos consiste en la obtención de “fiagramas” de iones extraídos, correspondientes a los iones más abundantes para cada uno de los FAMEs de interés y al IS. Los datos de fiagramas se filtran y se exportan a la hoja Excel para obtener funciones de calibración y llevar a cabo la cuantificación. Además de rapidez, la importante ventaja del sistema FIA es muy buena repetibilidad de las señales asegurada por el volumen de muestra

constante y por la velocidad del flujo constante, controlada por la bomba UHPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific), pudiéndose procesar 23 muestras por una hora. En cuanto a la modalidad de las señales analíticas, se decidió utilizar altura de picos normalizada por la altura de la señal del IS. Los límites de detección para FAMEs de los ácidos insaturados evaluados en el proceso de calibración fueron en el intervalo 0.49 - 1.57 $\mu\text{g/L}$ y, para ácidos saturados en el intervalo 11.0 - 156.4 $\mu\text{g/L}$. Este procedimiento se empleó en la determinación de FAMEs en nueve productos comerciales.

En la tercera parte de este trabajo, se llevó a cabo el análisis de los mismos aceites cosméticos por GC-FID, mediante adaptación de un método establecido. Los resultados obtenidos permitieron confirmar la exactitud del procedimiento propuesto (FIA-ESI-QTOF-MS (altura)).

Por otro lado, los resultados obtenidos para nueve diferentes productos revelaron la presencia de aditivos en aceites cosméticos, cuya identidad queda como reto para estudios posteriores. Por otro lado, la distribución relativa de los FAMEs en las muestras analizadas no fue uniforme, siendo el FAME del aceite ricinoleico el componente mayoritario en cuatro aceites cosméticos, mientras que otros productos parecieron mezclas de aceite de ricino con otros tipos de aceites vegetales (o incluso de origen animal considerando alta proporción del ácido palmítico en uno de ellos).

En conclusión, el procedimiento FIA-ESI-QTOF-MS es una buena alternativa para la determinación de los FAMEs en aceites vegetales, ofreciendo las ventajas de: (i) adecuado poder de detección, (ii) sin necesidad de separación cromatográfica; (iii) buena repetibilidad de las señales; (iii) rapidez y (iv) fácil manejo de datos en la etapa de calibración/cuantificación.

Bibliografía

1. Fahy, E.; Subramaniam, S.; Murphy, R. C.; Nishijima, M.; Raetz, C. R. H.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; Wakelam, M. J. O.; Dennis, E. A., Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* **2009**, *50*, S9-S14.
2. Fahy, E., A comprehensive classification system for lipids (vol 46, pg 839, 2005). *Journal of Lipid Research* **2010**, *51* (6), 1618-1618.
3. Lam, S. M.; Shui, G., Lipidomics as a Principal Tool for Advancing Biomedical Research. *Journal of Genetics and Genomics* **2013**, *40* (8), 375-390.
4. Fahy, E.; Cotter, D.; Sud, M.; Subramaniam, S., Lipid classification, structures and tools. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2011**, *1811* (11), 637-647.
5. Sajjadi, B.; Raman, A. A. A.; Arandiyani, H., A comprehensive review on properties of edible and non-edible vegetable oil-based biodiesel: Composition, specifications and prediction models. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **2016**, *63*, 62-92.
6. Borges, T. H.; Pereira, J. A.; Cabrera-Vique, C.; Lara, L.; Oliveira, A. F.; Seiquer, I., Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chemistry* **2017**, *215*, 454-462.
7. Di Girolamo, F.; Masotti, A.; Lante, I.; Scapaticci, M.; Calvano, C. D.; Zambonin, C.; Muraca, M.; Putignani, L., A Simple and Effective Mass Spectrometric Approach to Identify the Adulteration of the Mediterranean Diet Component Extra-Virgin Olive Oil with Corn Oil. *International Journal of Molecular Sciences* **2015**, *16* (9), 20896-20912.
8. Aparicio, R.; Aparicio-Ruiz, R., Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* **2000**, *881* (1-2), 93-104.
9. Thomas, T. P.; Birney, D. M.; Auld, D. L., Optimizing esterification of safflower, cottonseed, castor and used cottonseed oils. *Industrial Crops and Products* **2013**, *41*, 102-106.
10. Seppanen-Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R., Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *465* (1-2), 39-62.
11. Musharraf, S. G.; Ahmed, M. A.; Zehra, N., Quantification of FAMES in biodiesel blends of various sources by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical Methods* **2015**, *7* (8), 3372-3378.
12. Andrikopoulos, N. K., Triglyceride species compositions of common edible vegetable oils and methods used for their identification and quantification. *Food Reviews International* **2002**, *18* (1), 71-102.
13. Cunha, S. C.; Oliveira, M., Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD. *Food Chemistry* **2006**, *95* (3), 518-524.
14. Aliakbarzadeh, G.; Sereshti, H.; Parastar, H., Fatty acids profiling of avocado seed and pulp using gas chromatography-mass spectrometry combined with multivariate chemometric techniques. *Journal of the Iranian Chemical Society* **2016**, *13* (10), 1905-1913.
15. Jimenez-Carvelo, A. M.; Gonzalez-Casado, A.; Cuadros-Rodriguez, L., A new analytical method for quantification of olive and palm oil in blends with other vegetable edible oils based on the chromatographic fingerprints from the methyl-transesterified fraction. *Talanta* **2017**, *164*, 540-547.
16. Wirasnita, R.; Hadibarata, T.; Novelina, Y. M.; Yusoff, A. R. M.; Yusop, Z., A Modified Methylation Method to Determine Fatty Acid Content by Gas Chromatography. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2013**, *34* (11), 3239-3242.

17. Karn, A.; Heim, C.; Flint-Garcia, S.; Bilyeu, K.; Gillman, J., - Development of Rigorous Fatty Acid Near-Infrared Spectroscopy Quantitation Methods in Support of Soybean Oil Improvement. **2017**.
18. Velioglu, S. D.; Ercioglu, E.; Temiz, H. T.; Velioglu, H. M.; Topcu, A.; Boyaci, I. H., Raman Spectroscopic Barcode Use for Differentiation of Vegetable Oils and Determination of Their Major Fatty Acid Composition. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2016**, *93* (5), 627-635.
19. Carvalho, M. S.; Mendonca, M. A.; Pinho, D. M. M.; Resck, I. S.; Suarez, P. A. Z., Chromatographic Analyses of Fatty Acid Methyl Esters by HPLC-UV and GC-FID. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2012**, *23* (4), 763-769.
20. Park, Y. W.; Chang, P. S.; Lee, J., Application of triacylglycerol and fatty acid analyses to discriminate blended sesame oil with soybean oil. *Food Chemistry* **2010**, *123* (2), 377-383.
21. Cozzolino, R.; De Giulio, B., Application of ESI and MALDI-TOF MS for triacylglycerols analysis in edible oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2011**, *113* (2), 160-167.
22. Herrera, L. C.; Potvin, M. A.; Melanson, J. E., Quantitative analysis of positional isomers of triacylglycerols via electrospray ionization tandem mass spectrometry of sodiated adducts. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24* (18), 2745-2752.
23. Lay, J. O.; Liyanage, R.; Durham, B.; Brooks, J., Rapid characterization of edible oils by direct matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry analysis using triacylglycerols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2006**, *20* (6), 952-958.
24. Schiller, J.; Suss, R.; Arnhold, J.; Fuchs, B.; Lessig, J.; Muller, M.; Petkovic, M.; Spalteholz, H.; Zschornig, O.; Arnold, K., Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Progress in Lipid Research* **2004**, *43* (5), 449-488.
25. Calvano, C. D.; De Ceglie, C.; D'Accolti, L.; Zambonin, C. G., MALDI-TOF mass spectrometry detection of extra-virgin olive oil adulteration with hazelnut oil by analysis of phospholipids using an ionic liquid as matrix and extraction solvent. *Food Chemistry* **2012**, *134* (2), 1192-1198.
26. Ayorinde, F. O.; Elhilo, E.; Hlongwane, C., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of canola, castor and olive oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1999**, *13* (8), 737-739.
27. Sun, G.; Yang, K.; Zhao, Z.; Guan, S.; Han, X.; Gross, R. W., Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric analysis of cellular glycerophospholipids enabled by multiplexed solvent dependent analyte-matrix interactions. *Analytical Chemistry* **2008**, *80* (19), 7576-7585.
28. Dong, W.; Shen, Q.; Baibado, J. T.; Liang, Y. M.; Wang, P.; Huang, Y. Q.; Zhang, Z. F.; Wang, Y. X.; Cheung, H. Y., Phospholipid analyses by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry using 1,5-diaminonaphthalene as matrix. *International Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *343*, 15-22.
29. Estrada, R.; Yappert, M. C., Alternative approaches for the detection of various phospholipid classes by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **2004**, *39* (4), 412-422.
30. Calvano, C. D.; Palmisano, F.; Zambonin, C. G., Laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of triacylglycerols in oils. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19* (10), 1315-1320.
31. Picariello, G.; Romano, R.; Addeo, F., Nitrocellulose Film Substrate Minimizes Fragmentation in Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry Analysis of Triacylglycerols. *Analytical Chemistry* **2010**, *82* (13), 5783-5791.
32. Saraiva, S. A.; Cabral, E. C.; Eberlin, M. N.; Catharino, R. R., Amazonian Vegetable Oils and Fats: Fast Typification and Quality Control via Triacylglycerol (TAG) Profiles from Dry Matrix-

- Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Mass Spectrometry Fingerprinting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, 57 (10), 4030-4034.
33. Shinn, S. E.; Liyanage, R.; Lay, J. O.; Proctor, A., Using MALDI MS for rapid analysis of food lipids. *Lipid Technology* **2015**, 27 (11), 255-257.
34. Endalew, A. K.; Kiros, Y., Catalytic Autoxidation of Fatty Acid Methyl Esters from Jatropha Oil. *Journal of Fuels* **2014**, 2014.
35. La Nasa, J.; Ghelardi, E.; Degano, I.; Modugno, F.; Colombini, M. P., Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer. *Journal of Chromatography A* **2013**, 1308, 114-124.
36. La Nasa, J.; Degano, I.; Modugno, F.; Colombini, M. P., Alkyd paints in art: Characterization using integrated mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2013**, 797, 64-80.
37. Mutlu, H.; Meier, M. A. R., Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2010**, 112 (1), 10-30.
38. Salimon, J.; Noor, D. A. M.; Nazrizawati, A. T.; Firdaus, M. Y. M.; Noraishah, A., Fatty Acid Composition and Physicochemical Properties of Malaysian Castor Bean *Ricinus communis* L. Seed Oil. *Sains Malaysiana* **2010**, 39 (5), 761-764.
39. Ramamurthi, S.; Manohar, V.; Mani, V. V. S., Characterization of fatty acid isomers in dehydrated castor oil by gas chromatography and gas chromatography mass spectrometry techniques. *Journal of the American Oil Chemists Society* **1998**, 75 (10), 1297-1303.
40. Lin, J. T.; Chen, G. Q., Ratios of Regioisomers of Minor Acylglycerols Less Polar than Triricinolein in Castor Oil Estimated by Mass Spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2012**, 89 (10), 1785-1792.
41. Lin, J. T.; Chen, G. Q.; Hou, C. T., Mass Spectrometry of the Lithium Adducts of Diacylglycerols Containing Hydroxy FA in Castor Oil and Two Normal FA. *Journal of the American Oil Chemists Society* **2013**, 90 (1), 33-38.
42. Catharino, R. R.; Milagre, H. M. S.; Saraiva, S. A.; Garcia, C. M.; Schuchardt, U.; Eberlin, M. N.; Augusti, R.; Pereira, R. C. L.; Guimaraes, M. J. R.; de Sa, G. F.; Caixeiro, J. M. R.; de Souza, V., Biodiesel typification and quality control by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. *Energy & Fuels* **2007**, 21 (6), 3698-3701.
43. Ayorinde, F. O.; Garvin, K.; Saeed, K., Determination of the fatty acid composition of saponified vegetable oils using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2000**, 14 (7), 608-615.
44. Bataglioni, G. A.; da Silva, F. M. A.; Santos, J. M.; dos Santos, F. N.; Barcia, M. T.; de Lourenco, C. C.; Salvador, M. J.; Godoy, H. T.; Eberlin, M. N.; Koolen, H. H. F., Comprehensive characterization of lipids from Amazonian vegetable oils by mass spectrometry techniques. *Food Research International* **2014**, 64, 472-481.
45. Yang, T. J.; Tsai, F. J.; Chen, C. Y.; Yang, T. C. C.; Lee, M. R., Determination of additives in cosmetics by supercritical fluid extraction on-line headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2010**, 668 (2), 188-194.
46. Lee, M. R.; Lin, C. Y.; Li, Z. G.; Tsai, T. F., Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1120 (1-2), 244-251.

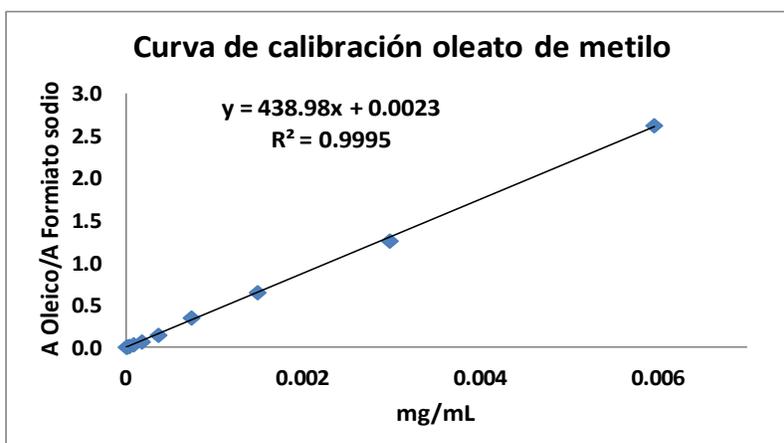
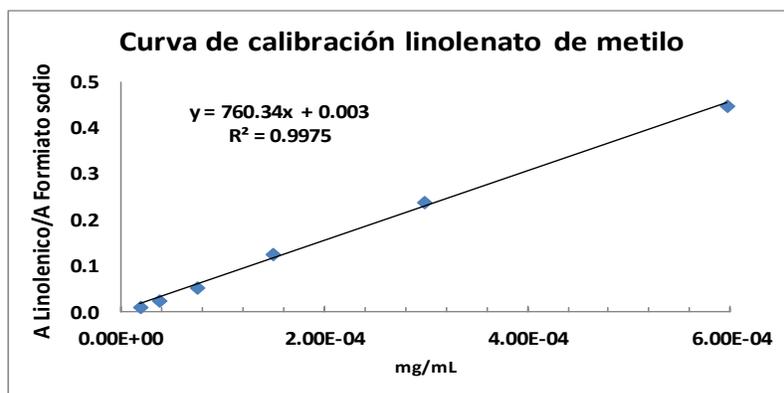
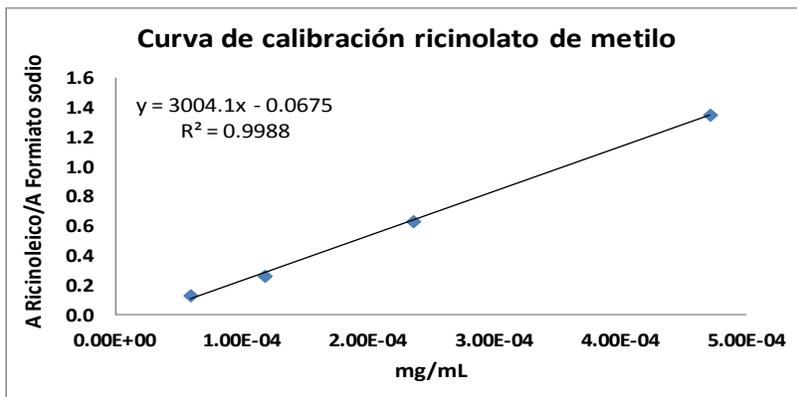


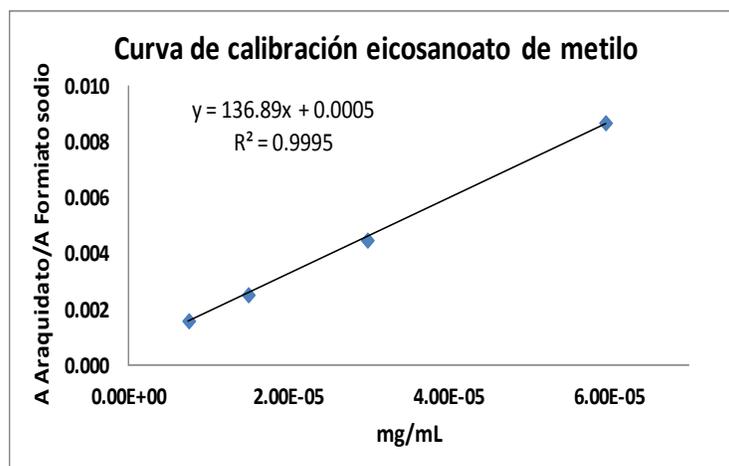
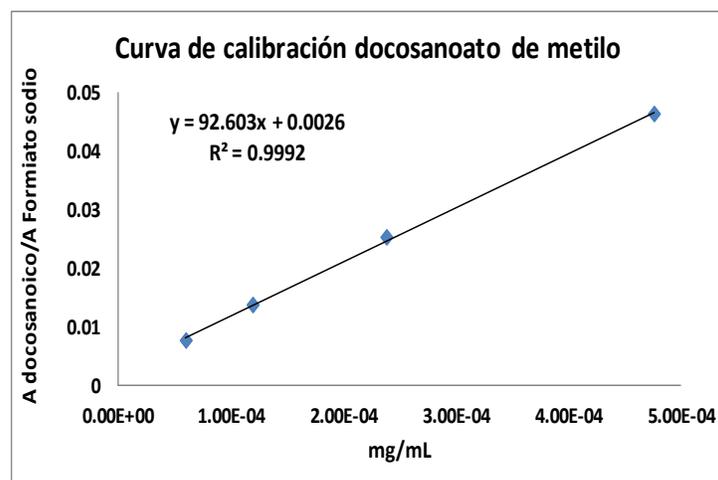
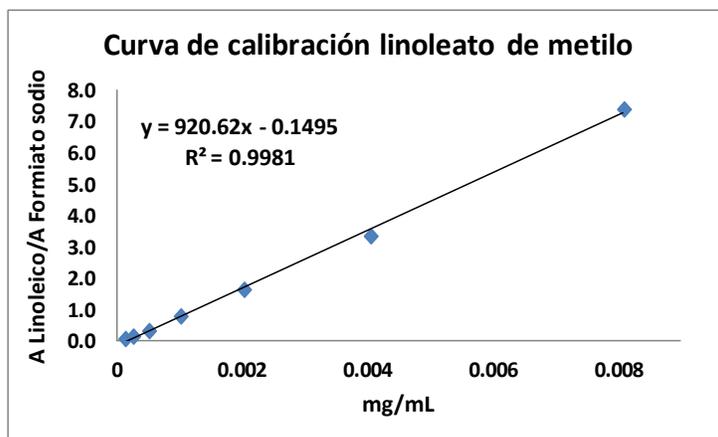
Universidad de Guanajuato

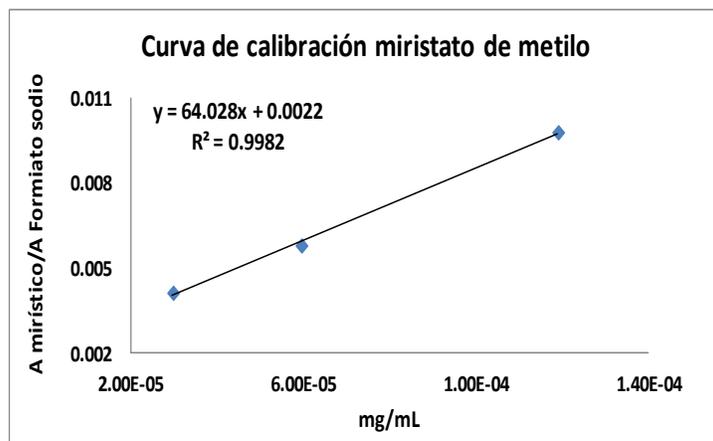
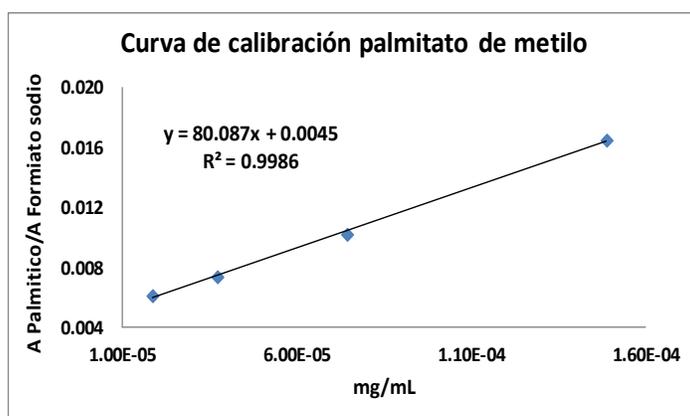
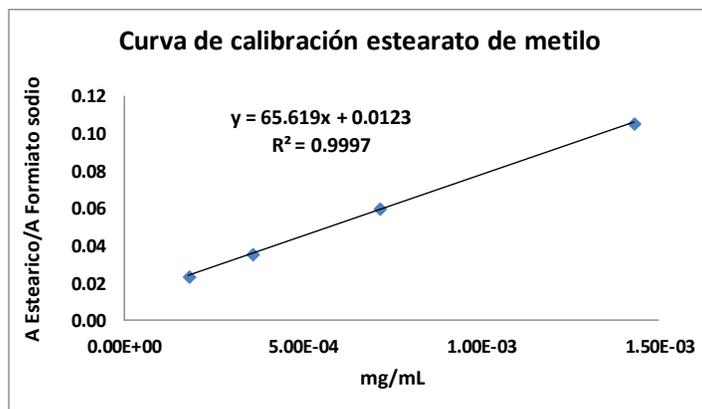
CAPÍTULO VI ANEXOS

Anexo A

Curvas de Calibración obtenidas en el análisis de FAMEs por FIA-ESI-QTOF-MS utilizando el área como señal analítica.







Curvas de Calibración obtenidas en el análisis de FAMEs por FIA-ESI-QTOF-MS utilizando intensidad como señal analítica.

