

IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN
DE CITRAL EMPLEANDO ULTRA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (UCLAR-EM)

EYMI JULIETH RAMÍREZ YANGANA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2018

IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN
DE CITRAL EMPLEANDO ULTRA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (UCLAR-EM)

EYMI JULIETH RAMÍREZ YANGANA

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de
Química

DIRECTOR
Dra. TANIA MILENA GUTIÉRREZ VALENCIA

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN
PROCESOS ELECTROQUÍMICOS (GIPEL)
POPAYÁN
2018

Nota de Aceptación:

Director
Dra. Tania Milena Gutiérrez V.

Jurado
Clara Inés Hurtado S.

Jurado
Claudia Ximena Martínez V.

Popayán, 11 de Octubre del 2018

DEDICATORIA

A Dios por su eterno amor, por brindarme una familia hermosa, por fortalecer mi corazón a pesar de todas las adversidades y brindarme todas las oportunidades para poder cumplir con cada meta en mi vida.

A mi familia, en especial a mi hermosa madre, Ana Lucía por ser mi ángel, mi amiga, por ser mi ejemplo a seguir. Por apoyarme en todo momento de mi formación académica, y por todos los sacrificios que esto ha conllevado. Gracias por dedicar su vida y su amor para brindarme todo lo necesario para hacerme feliz.

*Dedico este trabajo a la memoria de mi padre Misael Ramírez, quien como una estrella fantasma en el cielo, aún ilumina con su luz mucho después de haber dejado de existir.
“Cosmos”.★*

A la memoria de mi abuelo Rosalino Yangana (q.e.p.d.), porque fue un padre para mí, por darnos la gran familia que hoy somos.

A mis amigos, Leydi Conú, Alexander Jiménez, Melisa Noriega, Juan José Tobar, Ximena Prieto, Rafel Solano y muchos otros amigos y compañeros; gracias a todos ellos por haber estado conmigo en las buenas y en las malas, por todo el apoyo, por todas esas aventuras y locuras compartidas.

AGRADECIMIENTOS

A Dios padre celestial, por el cual mi vida tiene un sentido y un porque.

A mi madre, por cuidar siempre de mí con su amor infinito.

A mi directora de tesis, Dra. Tania Milena Gutiérrez por haber depositado su confianza en mí y en éste trabajo, pese a todas las adversidades, gracias por todo el tiempo que me brindo para asesorarme, sus consejos y dedicación.

Al profesor German Cuervo por todas sus enseñanzas y consejos durante este proceso de aprendizaje.

A la Universidad del Cauca y al Departamento de Química.

A los profesores que me han dado clases, por sus enseñanzas.

A la unidad de análisis industriales y a sus monitores.

Al profesor Fernando Hernández, por facilitarme el uso del material y los equipos de la UAI.

A los jurados Claudia Martínez y Clara Hurtado por tomarse su tiempo en la evaluación de este trabajo.

A esas personas que de una u otra forma fueron parte de este proyecto y de mi vida.

A la VRI por la financiación de la investigación con el ID 4373.

INDICE DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Revisión de metodologías analíticas para el análisis de citral -----	24
Tabla 2. Reactivos, solventes y equipos de laboratorio utilizados-----	34
Tabla 3. Equipos de laboratorio utilizados -----	34
Tabla 4. Ensayo determinación de volumen de elución del citral-----	39
Tabla 5. Condiciones del método para la determinación de citral por ESI-EM-TI-----	41
Tabla 6. Condiciones del método para la determinación de citral por ultra cromatografía líquida de alta resolución -----	47
Tabla 7. Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo (días consecutivos) -----	48
Tabla 8. Evaluación de normalidad de los datos en función del día -----	49
Tabla 9. Anova para área vs día-----	49
Tabla 10. Anova para área vs nivel de concentración -----	49
Tabla 11. Prueba de Tukey -----	50
Tabla 12. Coeficientes de correlación. (evaluación de la linealidad instrumental)- -----	52
Tabla 13. Resultados obtenidos en la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto-----	52
Tabla 14. Anova para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración ---	53
Tabla 15. Sensibilidad en C.V-----	53
Tabla 16. Resultados de las áreas empleadas para el análisis de reproducibilidad-----	55
Tabla 17. Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad-----	56
Tabla 18. Exactitud-----	58
Tabla 19. Análisis estadístico para evaluación de aceptación del sesgo-----	58
Tabla 20. Resumen de la validación para el método implementado y validado--- -----	59
Tabla 21. Variables para extracción de citral por DMFS -----	60
Tabla 22. Porcentaje de recuperación en la extracción por DMFS -----	60
Tabla 23. Resultados pruebas análisis de citral en jengibre -----	62
Tabla 24. Resultados pruebas análisis de citral en jabón -----	64
Tabla 25. Resultados pruebaS análisis de citral en perfume -----	64
Tabla 26. Fuentes de incertidumbre de la medición -----	67
Tabla 27. Relación de material volumétrico e incertidumbre-----	67
Tabla 28. Relación de patrón e incertidumbre -----	68
Tabla 29. Relación de datos analíticos de los patrones e incertidumbre -----	68

INDICE DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas-----	17
Figura 2. Cromatograma de un componente y parámetros más característicos-----	18
Figura 3. Partes espectrómetro de masas -----	19
Figura 4. Interfase con línea de transferencia-----	20
Figura 5. Conexión en T para UCLAR-EM-----	21
Figura 6. Isómeros del Citral-----	22
Figura 7. Extracción general de DMFS según la metodología -----	25
Figura 8. Esquema para la explicación de la exactitud-----	28
Figura 9. Diagrama general de la metodología-----	35
Figura 10. Procedimiento para realizar conexión en T -----	36
Figura 11. Procedimiento para extracción de citral por DMFS -----	38
Figura 12. Procedimiento para extracción de muestras por DMFS -----	40
Figura 13. Espectro de masas por ESI del citral + NH ₄ OH 0.1%-----	42
Figura 14. Patrón de fragmentación del citral-----	43
Figura 15. Perfil cromatografico del citral -----	45
Figura 16. Perfiles cromatograficos para el cambio de fase móvil -----	46
Figura 17. Gráfica log k' vs proporción metanol: agua -----	47
Figura 18. Gráfica respuesta lineal área vs concentración (ppm) -----	50
Figura 19. Gráficas de linealidad y repetibilidad de las curvas de calibración en los 7 días consecutivos-----	51
Figura 20. Gráfica curvas de calibración repetibilidad en 7 días consecutivos	54
Figura 21. Perfil cromatografico para la determinación del (LD) -----	56
Figura 22. Perfil cromatografico para la determinación del (LC) -----	57
Figura 23. Porcentaje de recobro por día. -----	61
Figura 24. Análisis citral en jengibre a) perfil cromatografico y b) espectros de masas-----	63
Figura 25. Análisis citral en perfume a) perfil cromatografico y b) espectros de masas-----	65
Figura 26. Análisis citral en jabón a) perfil cromatografico y b) espectros de masas-----	66

LISTADO DE ACRÓNIMOS

ANOVA: Análisis de varianza.

b: Intercepto de la curva en el eje Y.

CG-EM: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

CV: Coeficiente de variación.

DFMS: Dispersión de matriz en fase sólida.

EM: Espectrometría de masas.

ESI: Ionización por electrospray.

gl: Grados de libertad.

Ha: Hipótesis alternativa.

Ho: Hipótesis nula.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

k': Factor de capacidad.

LC: Límite de cuantificación.

LD: Límite de detección.

m: Pendiente de la curva.

m/z: Masa-carga.

Mⁿ: Masas a la n.

r: Coeficiente de correlación.

r²: Coeficiente de regresión.

s: Desviación estándar.

S: sesgo.

Sig: Significancia.

T_m: Tiempo muerto.

T_r: Tiempo de retención.

UCLAR: Ultra cromatografía líquida de alta resolución.

UCLAR-EM: Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa.

UCLAR-EM-TI: Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa con trampa de iones.

μ: Incertidumbre.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN -----	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA -----	15
1. OBJETIVOS -----	16
1.1 Objetivo general-----	16
1.2 Objetivos específicos-----	16
2. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE -----	17
2.1 Técnica ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones-----	17
2.1.1 Ultra cromatografía líquida de alta resolución-----	18
2.1.2 Espectrometría de masa-----	19
2.1.3 Acople ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia a espectrometría de masas con trampa de iones.-----	20
2.2 Citral-----	21
2.3 UCLAR-EM en la detección y cuantificación de Citral-----	23
2.4 Citral: Extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)-----	25
2.4.1 Principios generales de DMFS-----	25
2.4.2 Extracción de citral por DMFS-----	26
2.5 Estandarización de una metodología para la determinación de citral.---	27
2.6 Figuras de mérito analítico-----	27
2.6.1 Linealidad-----	27
2.6.2 Sensibilidad-----	28
2.6.3 Exactitud-----	28
2.6.4 Límite de cuantificación-----	29
2.6.5 Límite de detección-----	30
2.6.6 Precisión-----	30
2.6.7 Repetibilidad-----	30
2.6.8 Reproducibilidad-----	30
2.6.9 Incertidumbre-----	31
2.6.10 Pruebas de Normalidad-----	32
2.6.11 Pruebas Paramétricas-----	32
2.6.12 Pruebas No Paramétricas-----	33
2.6.13 Análisis de Regresión Lineal Simple-----	33
3. METODOLOGÍA -----	34
3.1 Equipos y reactivos-----	34
3.2 Método-----	34

3.3	Determinación de las condiciones de detección del citral por EM-TI ---	35
3.4	Determinación de condiciones operacionales en UCLAR-EM-TI -----	35
3.4.1	Determinación de parámetros cromatográficos -----	36
3.5	Estandarización del método de cuantificación -----	37
3.6	Adecuación de la dispersión de matriz en fase sólida-DMFS para extracción de citral en diferentes muestras -----	38
3.6.1	Estudio de recobros en la metodología de extracción por DMFS -----	39
3.7	Aplicación de la metodología implementada a muestra reales -----	39
3.8	Calculo de la incertidumbre -----	40
4.	RESULTADOS Y ANÁLISIS-----	41
4.1	Condiciones de operación en EM para la identificación de citral-----	41
4.2	Condiciones operacionales en ultra cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas-----	44
4.2.1	Determinación de parámetros en la separación cromatográfica-----	44
4.3	Implementación de la metodología analítica para determinar citral por UCLAR-EM-TI-----	48
4.3.1	Linealidad Instrumental -----	48
4.3.2	Evaluación de la sensibilidad-----	53
4.3.3	Precisión -----	53
4.3.4	Límite de cuantificación y detección -----	56
4.3.5	Exactitud -----	57
4.4	Extracción de citral por dispersión de matriz en fase sólida-DMFS-----	59
4.5	Aplicación de la metodología de extracción a muestras naturales y comerciales-----	61
4.6	Estimación de la incertidumbre en la determinación de citral -----	67
5.	CONCLUSIONES -----	70
6.	RECOMENDACIONES -----	71
7.	BIBLIOGRAFIA-----	02

ANEXOS

RESUMEN

El citral ($C_{10}H_{16}O$) es un monoterpeno que posee numerosas propiedades medicinales y biológicas de gran importancia dentro de la química aplicada e industrial, siendo empleado en productos cosméticos, perfumería e incluso como aditivo alimentario, sin embargo, el citral es considerado una sustancia alergénica que al ser utilizada en la elaboración de diversos productos, está sujeta a restricciones de uso o requisitos de etiquetado de acuerdo con la legislación. Por ende es importante ejercer el control de calidad de las formulaciones que contienen este analito, con el fin de garantizar la seguridad del producto y evaluar el riesgo para la salud. Para este fin la determinación de citral se llevó a cabo implementando la ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UCLAR-EM) en el modo de ionización por electrospray, debido a su selectividad, sensibilidad y versatilidad en general.

El presente documento exhibe las condiciones apropiadas para la identificación y cuantificación de citral mediante UCLAR-EM como un método alternativo para la determinación de este analito. Para la cuantificación del citral se elaboraron varias curvas de calibración con patrón externo a partir de las cuales se establecieron los parámetros analíticos de: linealidad, precisión, exactitud, rango dinámico además de los límites de detección y cuantificación.

Para el análisis de los datos obtenidos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 23 para el respectivo tratamiento y análisis de los resultados.

La metodología implementada para la determinación de citral cumplió con los parámetros estadísticos requeridos de linealidad y precisión instrumental registrando coeficientes de variación menores o iguales al 20%, límites de cuantificación de 0.75 ppm y detección 0.50 ppm.

Una vez implementada la metodología de análisis de citral por UCLAR-EM, se aplicó la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) para la extracción del compuesto en diferentes matrices (jengibre, perfume y jabón); en este procedimiento se evaluó la robustez del sistema cromatográfico.

El método de extracción por DMFS que se empleó, es un método de preparación de muestras efectivo y de bajo costo. Su simplicidad contribuye a que sea elegido sobre métodos clásicos para este propósito. Además, el consumo de solvente es menor respecto a las metodologías convencionales y las etapas de limpieza del extracto son eliminadas en el proceso, permitiendo así que los eluidos obtenidos en la DMFS sean llevados directamente al análisis instrumental, para la inyección directa sin ningún otro tipo de tratamiento. El proceso final requirió el uso de solo 50.00 mg de muestra y 1 mL de disolvente orgánico. Los niveles de concentración de citral para la muestra de jengibre fue mayor a 0.6 mg/g, se detectó que para las muestras de jabón y perfume la concentración de citral fue bastante alta a niveles $>0.1\%$ (1000 ppm) superaba el límite según la decisión 516 de la ANDI para productos terminados que no se enjuagan y que son enjuagados.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen numerosos ingredientes activos presentes en gran variedad en la naturaleza, formando parte de la composición de un sinnúmero de productos, que usamos en nuestra vida cotidiana. Por lo general en la industria química, farmacéutica, alimentaria y cosmética es necesario llevar a cabo un control de calidad de los diferentes tipos de compuestos que contienen ciertos productos. El citral es uno de esos ingredientes activos que puede encontrarse en la composición de diferentes productos naturales o sintéticos. Este componente natural es un constituyente de numerosos aceites esenciales y comúnmente es extraído de hierbas y frutas cítricas. Se utiliza como un aditivo alimentario, material de fragancia en productos cosméticos y para otros intereses. Asimismo tiene importantes efectos terapéuticos, actividades antioxidantes, anti-inflamatorias y biológicas como anti-bacteriano^{1,2}.

Debido al variado número de utilidades y propiedades que presenta este compuesto es importante implementar métodos para su identificación y cuantificación. La detección de citral en muestras se logra típicamente a través de algunos métodos analíticos que incluyen la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), espectroscopia de UV-Vis y métodos colorimétricos. El hecho de que estas técnicas de análisis sean las más comunes, no significa que sean las únicas, aunque sigan siendo las más adecuadas para ciertos casos, dependiendo del tipo de matriz que se esté sometiendo a evaluación. No obstante se encuentran limitadas por la volatilidad o la estabilidad de la muestra. Desde esta perspectiva, se plantea la necesidad de poseer una técnica no convencional para el análisis de citral en aceites esenciales y muestras comerciales, como alternativa se planteó la ultracromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (UCLAR-EM-TI) una técnica versátil para el análisis de los constituyentes presentes en las muestras; al ser el citral un compuesto muy volátil la CLAR puede mejorar el proceso de cuantificación al trabajar a temperaturas más bajas. En particular las fuentes hasta el momento consultadas no hacen referencia de este tipo de análisis para el citral utilizando UCLAR-EM con trampa iónica. Por lo anterior el objetivo de este estudio estuvo encaminado a la implementación de una metodología lo suficientemente robusta para la determinación y cuantificación de citral en diferentes muestras, dada la alta especificidad y sensibilidad con la que cuenta este tipo de técnica analítica, desde esta perspectiva se implementó en el análisis en muestras naturales y comerciales, debido al gran valor de este compuesto en la industria, además de la síntesis fina de moléculas orgánicas.

Adicional a esto, se planteó un método de extracción de citral, previo a su cuantificación usando UCLAR-EM. Debido a que la mayoría de los métodos de extracción presentan diversos problemas, desde técnicos hasta económicos. En este trabajo se presentó la aplicación de una técnica de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) que es útil para minimizar los consumos de muestras, reactivos y solventes, cumpliendo con los principios de "Química Verde"³.

La metodología en este trabajo permitió analizar las mejores condiciones para el desarrollo experimental y la estandarización instrumental del equipo UCLAR-EM-TI, esto con el fin de elaborar un protocolo con destino a la unidad de análisis industriales (UAI), para posibles análisis en docencia y prestación de servicios del laboratorio de análisis de la Universidad del Cauca.

1. OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

Implementar una metodología para identificar y cuantificar citral mediante ultracromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (UCLAR-EM-TI) en el modo de ionización por electrospray en el laboratorio de análisis industriales de la Universidad del Cauca.

1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer las mejores condiciones para la detección de citral empleando un espectrómetro de masas con trampa iónica (LCQ-fleet Thermo Scientific).
- Realizar la estandarización de la metodología para el análisis de citral por UCLAR-EM-TI, estimando los parámetros analíticos: Linealidad, exactitud, precisión, rango dinámico, límites de detección y cuantificación.
- Aplicar la metodología estandarizada a muestras reales (naturales y productos cosméticos), empleando la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) como técnica de extracción.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 Técnica ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones.

La cromatografía es una técnica analítica de separación dinámica en la que los componentes que se han de separar se distribuyen entre dos fases, la fase móvil y la fase estacionaria⁴, según la naturaleza de sus fases existen 4 tipos de cromatografía:

- ✓ Cromatografía líquido - líquido.
- ✓ Cromatografía gas - líquido.
- ✓ Cromatografía líquido -sólido.
- ✓ Cromatografía gas - sólido.

La técnica UCLAR que se utiliza en este trabajo se encuentra dentro de la cromatografía líquido-sólido puesto que la fase móvil es un líquido el cual fluye a través de la columna que contiene la fase estacionaria. El acople a un espectrómetro de masas permite hacer de forma rápida y precisa la identificación y cuantificación de los analitos separados.

El sistema de análisis que es objeto de este trabajo comprende el acople de un ultra cromatógrafo líquido de alta resolución a un espectrómetro de masas, esto permite hacer un estudio rápido y confiable, para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas complejas. Este sistema de UCLAR-EM consta de tres unidades: cromatógrafo líquido, espectrómetro de masas y un sistema de procesamiento de datos (Figura 1).

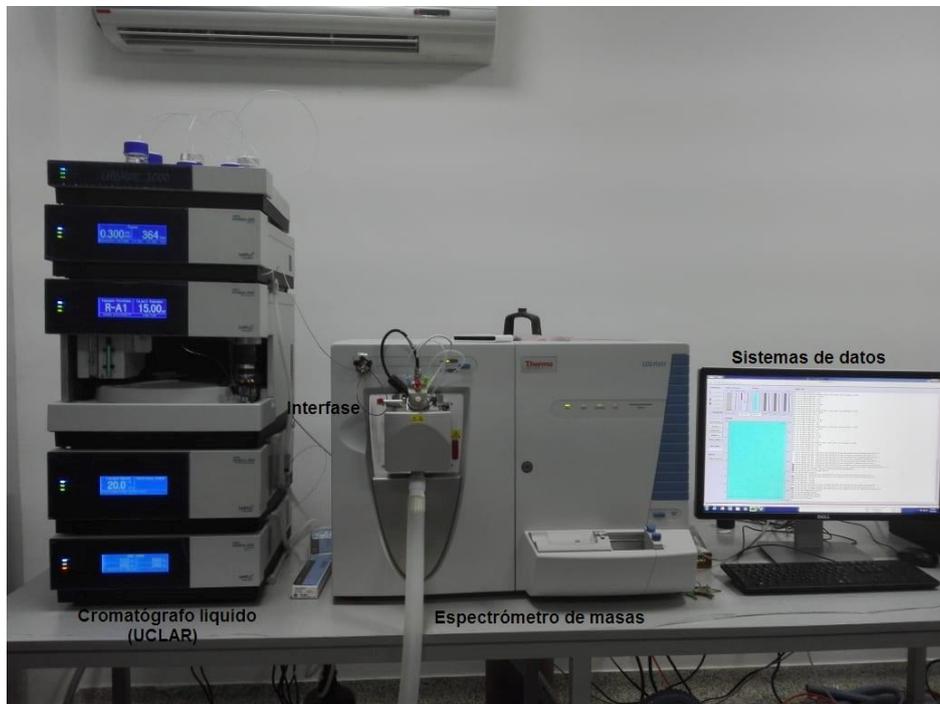


Figura 1. Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución acoplado a espectrómetro de masas
Fuente: Fotografía tomada por el autor en la UAI.

2.1.1 Ultra cromatografía líquida de alta resolución

La técnica cromatográfica UCLAR permite la identificación y cuantificación, en cortos períodos de tiempo. Esta técnica es ampliamente utilizada por su sensibilidad, automatización, capacidad para separar sustancias no volátiles o inestables térmicamente, además posee una amplia aplicabilidad a sustancias que son importantes en muchos campos de la ciencia⁴.

Para la separación en cromatografía líquida de alta resolución, los componentes de la muestra en solución son inyectados en la fase móvil la cual actúa como portador de la muestra, estos atraviesan la columna cromatográfica gracias a la aplicación de altas presiones; los analitos que componen la mezcla eluyen de la columna y pasan a un detector, el cual registra las diferentes sustancias separadas en función de sus tiempos de retención y genera una señal proporcional a su cantidad, lo que constituye el cromatograma, con lo cual se puede realizar la identificación cualitativa y cuantitativa de las especies separadas según sus propiedades físicas y químicas⁵.

Los parámetros básicos de cromatografía a tener en cuenta son:

Retención y factor de capacidad

Cuando se introduce un compuesto en la corriente de la fase móvil de un sistema cromatográfico, se presenta un comportamiento de retención que manifiesta la distribución del soluto entre la fase móvil y la estacionaria. Los parámetros de retención son:

- ✓ El tiempo de retención (t_r), corresponde al tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico alcance al detector.
- ✓ El tiempo muerto (t_m), es el tiempo que tarda en salir un componente que no se retiene (o el propio eluyente).

En la (Figura 2) se muestran los parámetros de retención para el caso de una única banda cromatográfica. Se observa que el tiempo de retención de la banda se divide en dos partes: el tiempo muerto (t_m) y el tiempo transcurrido a partir de ese momento hasta la aparición del máximo de la banda (t_r'), que se conoce como el tiempo de retención corregido, el cual se deduce que es el tiempo real en el cual aparece el compuesto⁶.

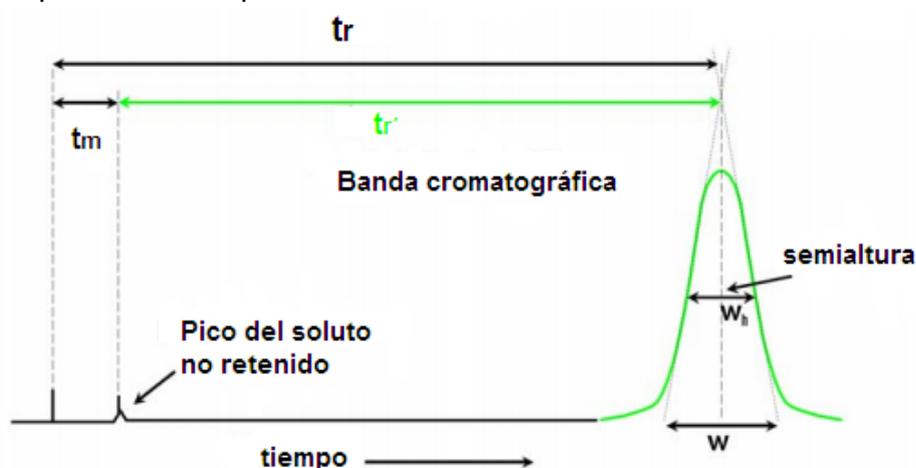


Figura 2. Cromatograma de un componente y parámetros más característicos

Fuente: Conceptos fundamentales de cromatografía. Recuperado de http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf.

Factor de capacidad

El factor de capacidad (k') se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor, menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna. El factor de capacidad se define como⁶:

$$k' = \frac{tr - tm}{tm} \quad \text{Ecuación 1}$$

2.1.2 Espectrometría de masas

El uso de metodologías microanalítica como la espectrometría de masas es útil para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura de las moléculas. El espectrómetro de masas consta de cuatro partes importantes (Figura 3)⁷:

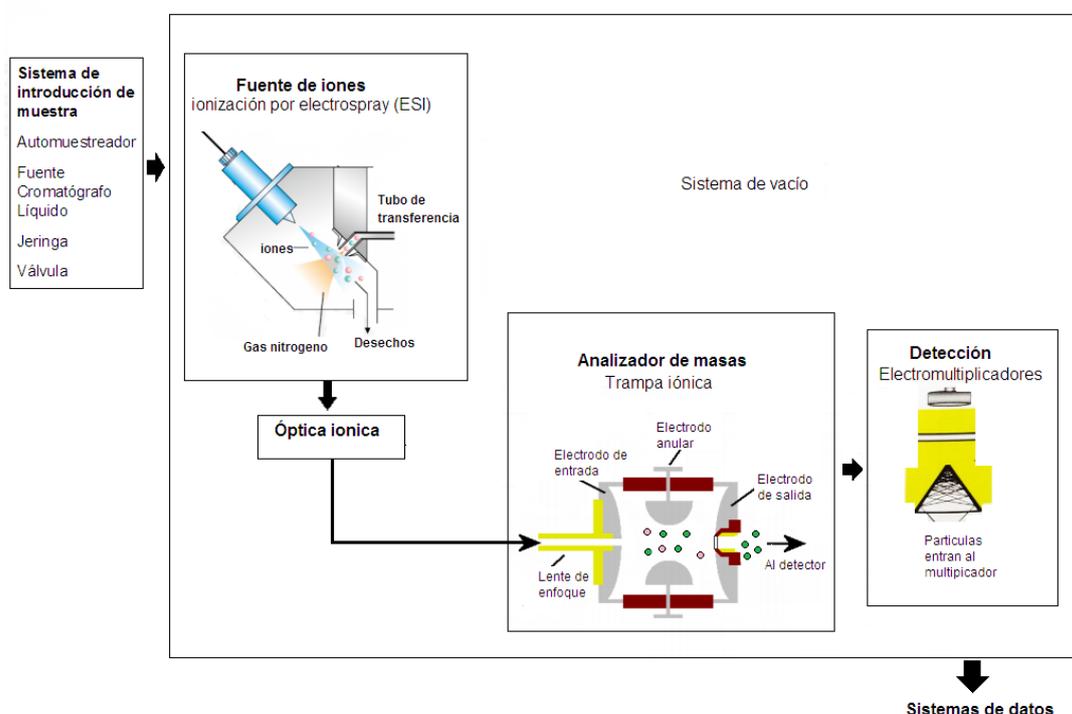


Figura 3. Partes espectrómetro de masas

Fuente: Adaptado de <https://www.notijenck.com.ar/notas/fuente-de-iones-duis-2010-analisis-con-resultados-inigualables> y www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/.../espectrometria_de_masas.pdf.

- 1) Sistema de introducción de muestra, según la naturaleza de la muestra que se estudia; se utiliza introducción de muestra directa a la fuente de iones como se describe en la (Figura 3).
- 2) Fuente de iones, la ionización de la muestra se puede promover por impacto o bombardeo electrónico, de igual forma empleando la ionización por electrospray (ESI), donde la sustancia ionizada pierde algunos electrones y se fragmenta dando diferentes iones, radicales y moléculas neutras.
- 3) Analizador de masas, a la salida de la fuente de iones se tiene una mezcla de iones, para la separación de estos existen varios procedimientos, los más

utilizados son el de campo magnético, cuadrupolar y trampa de iones este último analizador se basa en la utilización de una zona de confinamiento electromagnético generado por medio de dos señales de radiofrecuencia, donde un cambio del campo de radiofrecuencia, dará lugar a que los iones sean eyectados de la trampa en orden creciente de su relación m/z lo que da lugar al espectro de masas.

- 4) Posteriormente los iones son enfocados al detector⁸, transductor que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada, almacenada en la memoria de una computadora².

Durante la obtención del espectro tiene lugar procesos químicos y por lo tanto la destrucción de la muestra, sin embargo la ventaja de este método es que la cantidad de muestra que se necesita es pequeña y se obtiene información característica de la molécula⁸.

2.1.3 Acople ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia a espectrometría de masas con trampa de iones.

Para realizar el acople o interfase entre UCLAR y EM inicialmente se debe ajustar en el EM la posición de la sonda en D (Figura 4), ya que al unir la línea de transferencia de muestra del cromatógrafo líquido al espectrómetro de masa va a pasar un flujo mayor de solvente, y según las recomendaciones de manejo en el equipo se debe tener en cuenta este criterio, para que no se afecte el proceso de ionización de muestras o se presente efecto de arco por flujos y voltajes altos.



Figura 4. Interfase con línea de transferencia
Fuente: Fotografía tomada por el autor en la UAI.

De manera análoga la unión entre las técnicas, se puede realizar con una conexión en T; este tipo de conexión es útil para análisis primarios donde se requiere conocer la influencia de la fase móvil en la detección de un analito. En la Figura 5 se muestra como se ajusta el sistema, inicialmente se inyecta analito de forma directa a través de la jeringa, posteriormente se hace pasar un flujo de fase móvil desde el UCLAR; en la unión T se da la mezcla del solvente y el

analito, esta solución pasa a través del canal al espectrómetro de masas para su detección.

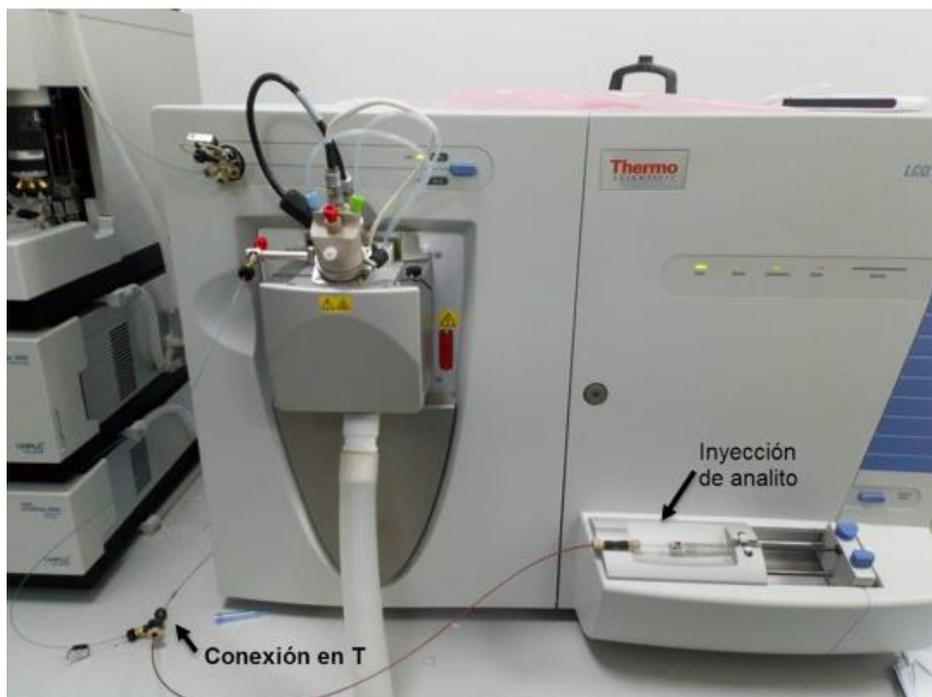


Figura 5. Conexión en T para UCLAR-EM
Fuente: Fotografía tomada por el autor en la UAI.

Es de resaltar que la unión de la UCLAR con la EM ofrece en general alta selectividad y rendimiento, lo que permite que sea eficaz para una gran variedad de análisis que con otras técnicas no son posibles por las limitaciones debidas a la volatilidad y la estabilidad de los analitos⁹.

2.2 Citral

El Citral ($C_{10}H_{16}O$) 3,7-dimetil-2,6-octadienal es un aldehído alifático de la serie de terpenos, es una mezcla natural de dos isómeros, geranial (E) y neral (Z) (Figura 6); cuya característica principal es su fuerte olor a limón y sabor agrídulce, además es sensible al calor, la exposición lumínica, y a pH fuertemente ácido se degrada totalmente^{1,9,10,11}.

En la química fina este compuesto α , β -insaturado es atractivo como materia prima en la elaboración de una amplia diversidad de productos químicos orgánicos, tanto intermediarios como productos de reacción; tal es el caso de la obtención de epóxidos y las β -iononas precursores en la síntesis de vitamina A y vitamina E^{12,13}.

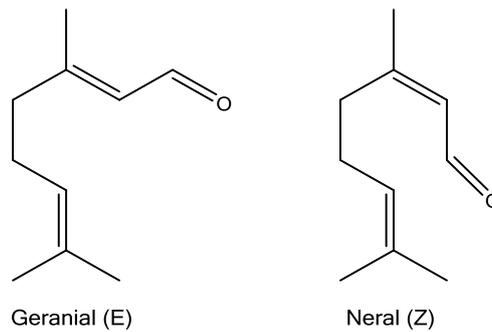


Figura 6. Isómeros del Citral
Fuente: ChemBio Draw Ultra - Autor.

Una de las principales fuentes naturales de citral es el aceite esencial del *Cymbopogon citratus* conocido popularmente como limoncillo, esta planta que se cultiva a nivel mundial contiene aproximadamente entre el 70 y 85% de citral por lo que se constituye como la principal fuente de extracción de este compuesto^{14,15}. Así mismo el citral está presente, en menor cantidad, en aceites esenciales de otras plantas como por ejemplo: albahaca, palmarosa, jengibre y en frutos cítricos (limón, naranja, lima, entre otros)¹⁶, cuyo contenido de citral varía según el área geográfica, factores climáticos, tiempo de recolección, el modo de extracción, etc^{1,9}.

Además se ha demostrado que los aceites ricos en citral muestran diversas actividades biológicas, como antimicrobiana, contra bacterias Gram-positivos, Gram-negativas y algunos protozoos. Sumado a esto poseen un gran valor debido a sus propiedades medicinales dentro de las cuales se incluye su acción antiinflamatoria, antiespasmódica, estimulantes del apetito, analgésica, diurética, sedante, y antitumoral^{1,10,17}; cabe destacar que tiene acción anticancerígena pues es capaz de reducir específicamente el crecimiento tumoral en algunas líneas celulares de cáncer, incluidas las células leucémicas y de linfoma¹⁸.

Habría que agregar que el citral al tener un agradable aroma a limón, ha sido empleado como aromatizante en la formulación de numerosos productos como repelentes de mosquitos, detergentes, jabón, cremas, perfumes, entre otros productos del hogar y para el cuidado de la piel¹⁹. Considerando que este compuesto tiene un gran uso, se debe mencionar que existen reglamentos y estándares para la regulación del uso de citral y otros compuestos considerados como alérgenos que hacen parte de la composición química de los productos. De ello se desprende las consideraciones de la comunidad andina, DECISIÓN 516, legislación en materia de productos cosméticos, para lo cual decide: Artículo 3: Los productos cosméticos que se comercialicen en la Subregión Andina deberán cumplir con los listados internacionales sobre ingredientes que pueden incorporarse o no a los cosméticos y sus correspondientes restricciones o condiciones de uso. Se reconocen, para tales efectos, los listados de ingredientes de la Food & Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de América, la Cosmetics Toiletry & Fragrance Association (CTFA), la European Cosmetic Toiletry and Perfumery Association (COLIPA) y las Directivas de la Unión Europea²⁰.

Teniendo en cuenta lo anterior se considera la disposición de la Administración de Alimentos y Medicamentos, que incluye al citral en su lista de sustancias seguras, para su uso como sustancia aromatizante sintética. No obstante, se

requiere que los fabricantes de cosméticos y productos de cuidado personal indiquen la presencia de citral en la lista de ingredientes cuando su concentración excede: 0.001% (10 ppm) en productos terminados que no se enjuagan y 0.01% (100 ppm) en productos que son enjuagados²¹.

2.3 UCLAR-EM en la detección y cuantificación de Citral

Con referencia a los ensayos empleados en la separación y cuantificación de citral, la gran mayoría se basan en el uso de la cromatografía de gases (CG-EM) siendo este el más popular. Las metodologías que emplean CLAR para la cuantificación de citral están basadas en la separación en fase reversa o normal, empleando como columna CN o C₁₈.

Los métodos en CLAR consultados incluyen diversas variantes, como la velocidad del flujo y principalmente la relación de solventes en la fase móvil, donde se utilizan mezclas de ACN (acetonitrilo) / agua o metanol / agua y n-hexano/etanol en modo isocrático^{22,26}. Éste método es muy usado independientemente del tratamiento previo que se le da a la muestra.

En general, hay varios métodos para la identificación y cuantificación de citral, pero sobresalen aquellos en los que se utiliza (CG-EM/CLAR-UV), estos métodos y sus diferencias se resumen en la (Tabla 1).

Con base en las referencias consultadas a partir de la investigación documental antes presentada, en la Tabla 1 se planteó realizar la determinación de citral utilizando la UCLA-EM-TI, analizando los factores más importantes para la identificación y cuantificación.

Tabla 1. Revisión de metodologías analíticas para el análisis de citral.

Analitos	Matriz	Método de Extracción	Método analítico	Referencia
Citral	Aceite esencial citral	Adquiridos comercialmente	HPLC-UV	Rauber, C. et al., (2005) ²² .
Citral, eucaliptol y canfeno	Aceite de jengibre	Hidrodestilación	GC-MS	Mangprayool et al., (2013) ²³ .
Citral, cidronela y limoneno	Aceites esenciales (albahaca santa y dulce, hierba de limón y citronela, lima y jengibre)	Adquiridos comercialmente	GC-MS	Taweechaisupapong S., et al., (2012) ²⁴ .
Carvona, limoneno y citral	Aceite hojas de L. alba.	Hidrodestilación	GC-FID/ GC-MS	Teles S. et al., (2012) ²⁵
[6]-gingerol, [6]-shogaol, citral y pirogalol.	Extracto etanólico de jengibre	Solventes	HPLC-UV	Gabr S et al., (2017) ²⁶ .
Citral y 1,8-cineol.	Aceites esenciales de clavo de albahaca y jengibre	Hidrodestilación	GC-MS	Brum, A. et al., (2017) ²⁷ .
Citral, eugenol y zingerona	Aceite esencial y oleorresinas de jengibre	Hidrodestilación y método Soxhlet	GC-MS	Singh, G. et al., (2008) ²⁸ .
Linalool, limoneno, citral y otros alérgenos	Cosméticos	Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)	GC-MS	Sanchez, L. et al., (2011) ²⁹ .
Linalool, limoneno, citral y otros alérgenos	Perfumes	Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)	GC-MS/MS	Celeiro, M. et al., (2014) ³⁰ .

2.4 Citral: Extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)

Desde su introducción en 1989 la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) se ha destacado como un proceso analítico para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras biológicas sólidas, semisólidas o viscosas, demostrando ser una técnica eficiente y versátil para aislar varias clases de sustancias, como pesticidas, drogas, contaminantes y compuestos naturales, de una amplia variedad de muestras de animales y plantas^{31,32}. La novedad de esta técnica consiste en el aislamiento de los analitos por dispersión de los tejidos en un soporte sólido, evitando muchas de las dificultades encontradas en los métodos clásicos como el pretratamiento de la muestra y en la extracción en fase sólida la disrupción incompleta de las células³³.

El éxito de la DMFS se debe a su simplicidad (no requiere ningún tipo de instrumentación o equipo específico), flexibilidad y robustez en comparación con otros métodos de preparación de muestras³¹. Además requiere un bajo consumo de solventes, la cantidad de muestra necesaria es mínima y presenta bajos costos en la extracción.

2.4.1 Principios generales de DMFS

El proceso y los principios físicos de la DMFS fueron descritos en profundidad por su inventor Barker, S.³⁰. El procedimiento consta de tres pasos principales, como se muestra en la (Figura 7).

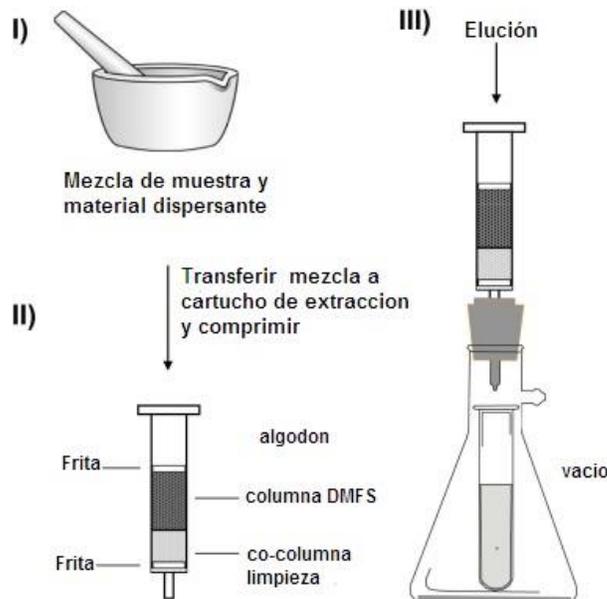


Figura 7. Extracción general de DMFS según la metodología
Fuente: Adaptada de (Barker, S. 2007, pp. 151-162)³².

Los pasos principales del procedimiento de extracción en DMFS son: I) la muestra se mezcla con el material dispersante en un mortero con una mano de mortero; II)

el polvo homogeneizado se transfiere a un cartucho de extracción en fase sólida y se comprime; III) la elución con un disolvente o mezcla de disolventes adecuados se realiza con la ayuda de una bomba de vacío. Se puede llevar a cabo un paso adicional de limpieza agregando un sorbente a la parte inferior de la columna de extracción o usando una columna externa.

Para esta técnica los materiales de fase reversa, tales como las fases enlazadas con sílice C₁₈ y C₈, se usan en la mayoría de los trabajos, mientras que la alúmina, sílice y Florisil se usan típicamente como materiales de fase normal. Un parámetro crítico es la relación de muestra y material dispersante que es (generalmente 1:1 - 1:4), que depende del tipo de muestra y las características físico-químicas del material. La elección del eluyente depende de la fuerza de las interacciones entre el soporte sólido y los analitos objetivos.

Para el mejoramiento del proceso de extracción se deben optimizar todos los parámetros principales de la DMFS (es decir, cantidad de muestra, cantidad y tipo de material dispersante, posible etapa de limpieza, composición del eluyente). Además el eluyente obtenido en DMFS puede ser tomado directamente para análisis instrumental, ya que es considerado "limpio" para inyección directa.

2.4.2 Extracción de citral por DMFS

Actualmente, existen diversos estudios donde se emplea la dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de citral en conjunto con otros analitos (análisis multianalíticos), en diversas matrices, por ejemplo, para el análisis de alérgenos en perfumes y conservantes en productos de cuidado personal, se usa 0.1 g de cosmético que se mezcla suavemente con 0.2 g de un agente de secado (anhidro Na₂SO₄) y 0.4 g de sorbente (Florisil o arena) en un mortero de porcelana usando una mano de mortero de porcelana (5 min) hasta que se obtiene una mezcla homogénea. La mezcla se transfiere a una pipeta Pasteur de vidrio, con una pequeña cantidad de lana de vidrio en la parte inferior, que contiene 0.1 g de Florisil (para mayor grado de fraccionamiento y limpieza de la muestra). Finalmente, se coloca una pequeña cantidad de lana de vidrio encima de la muestra antes de la compresión. La elución se realiza por flujo de gravedad con acetato de etilo o hexano:acetona (1:1, v/v), recogiendo 1 o 2 mL de extracto en un matraz volumétrico. Los extractos se analizan directamente por GC-MS y GC-MS/MS³⁴.

En cuanto a el análisis de los componentes de aceites esenciales en plantas como: clavo de olor, raíz de jengibre, canela entre otras, se emplea una muestra de 0.2 g de planta molida en un mortero de vidrio y se mezcla con 0.8 g del sorbente C₁₈ o la arena o el gel de sílice para obtener la relación de masa más comúnmente aplicada de 1:4. Los componentes se mezclan durante 10 minutos con 1 mL de 1,4-dioxano como líquido dispersante con un pistilo de vidrio para obtener una mezcla homogénea. Después, la mezcla se transfiere a una jeringa de 5 mL con una frita y se comprime, luego se eluye usando una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (9:1, v/v). Se añade un volumen apropiado de la solución de patrón interno antes del análisis por CG-MS³⁵.

2.5 Estandarización de una metodología para la determinación de citral

La estandarización del método consiste en encontrar aquellos parámetros operacionales y de preparación de la muestra que garanticen una respuesta adecuada y reproducible por parte del equipo, el análisis consiste en demostrar experimentalmente la funcionalidad del método para las aplicaciones analíticas propuestas, como también en obtener la evidencia documentada del procedimiento seguido, lo cual debe corresponder a un diseño experimental, un tratamiento estadístico apropiado y unos criterios de aceptación de acuerdo con los atributos que describen cada técnica analítica, para lo cual se establecen las variables químicas e instrumentales que permitan conseguir las mejores condiciones de selectividad, exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad³⁷.

2.6 Figuras de mérito analítico

Para el proceso de validación se obtiene evidencia que puede ser tratada estadísticamente para arrojar resultados o figuras de mérito analítico, que permiten concluir la funcionalidad de la técnica aplicada. A continuación se citan dichos parámetros^{36,37,38}.

2.6.1 Linealidad

Es el grado de proporcionalidad directa entre la concentración y la señal producida por el instrumento³⁷, con el fin de determinar el rango lineal se puede realizar un gráfico de concentración versus respuesta del método analítico, la cual se establece cada día con una cierta cantidad de valores formados por un blanco y los patrones de trabajo de valor teórico conocido, que cubran el intervalo de trabajo. En este sentido se recomienda abarcar valores desde cercano al cero y al valor de interés. El número de puntos a analizar deberá ser establecido por el analista (en general, se utiliza un mínimo de 4 valores). Luego de realizar el gráfico se puede observar el comportamiento de la curva y establecer cualitativamente el rango lineal. Después de establecer el comportamiento lineal del método se deberá realizar la curva de calibración que generalmente se reporta como la variación de la pendiente de la línea de regresión, que es calculada por el método de ajuste de mínimos cuadrados (Ecuación 2).

$$y = mx + b \quad \text{Ecuación 2}$$

Dónde x , es la concentración del analito; m es la pendiente de la recta; y es la respuesta del método (área) y b es el intercepto con el eje y . Los términos m y b se calculan a través de las Ecuaciones 3 y 4.

$$m = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$b = \frac{\sum y - m \sum x}{n}$$

Ecuación 4

Donde n : es el número de soluciones patrón. Se calcula además el coeficiente de regresión (r^2) el cual refleja el grado de ajuste de los puntos a la recta, y el coeficiente de correlación o proporcionalidad (r), que demuestra la relación entre las variables.

Finalmente, la viabilidad del método para la curva de calibración queda establecida por el valor del cuadrado del coeficiente de determinación, su valor máximo es 1, si r es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada³⁵.

2.6.2 Sensibilidad

Es la medida de la capacidad del instrumento para detectar pequeñas variaciones en la concentración de un analito y se expresa como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede utilizar el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de los ensayos de estandarización, indicando su desviación estándar o C.V. Se considera que a mayor pendiente, mayor sensibilidad y que mientras más pequeño sea el coeficiente de variación de la pendiente mayor será la linealidad³⁷.

2.6.3 Exactitud

Refleja la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero o de referencia. El término “exactitud” se refiere a una combinación de veracidad y precisión. En el siguiente esquema, se ejemplifica lo anterior, los puntos equivaldrían a los resultados analíticos y el círculo en el centro el rango en el cual se espera este el valor de referencia (o verdadero). En la (Figura 8) se esquematiza como entre más veraz y preciso sea un resultado analítico es más exacto³⁶.

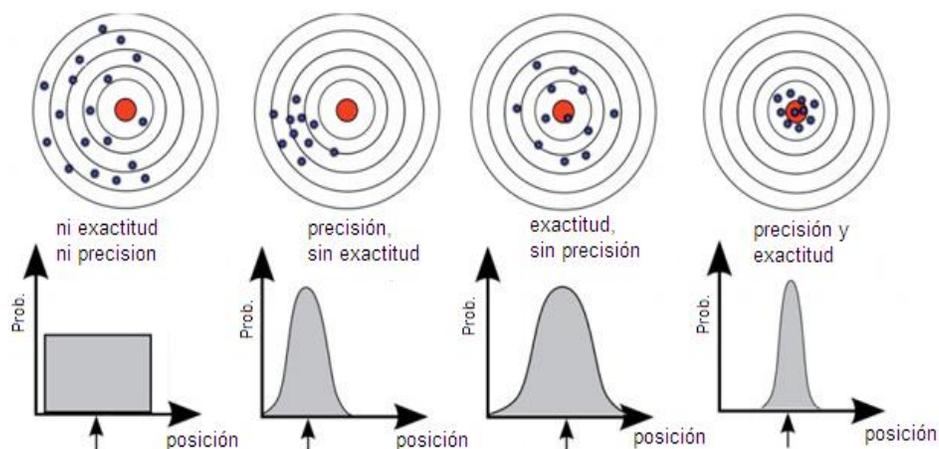


Figura 8. Esquema para la explicación de la exactitud

Fuente: Exactitud y precisión. Recuperado de https://farm3.staticflickr.com/2902/13985499610_508b8b2_f7b_z.jpg.

- Veracidad: Determina el grado de coincidencia existente entre el valor medio obtenido de una serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad puede ser determinada por sesgo o recuperación.

- Sesgo: La diferencia entre la expectativa relativa a los resultados de un ensayo o una medición y el valor verdadero. En la práctica el valor convencional de cantidad puede sustituir el valor verdadero. El sesgo es el error sistemático total en contraposición al error aleatorio.

Para determinar el sesgo puede utilizarse material de referencia, material fortificado, material control, material ensayo de aptitud: Para este fin, se debe medir un analito de concentración conocido y se determina la diferencia en valor absoluto entre el valor conocido y la media del valor obtenido (Ecuación 5). Una diferencia sistemática importante en relación al valor de referencia aceptado se refleja en un mayor valor del sesgo, cuanto más pequeño es el sesgo, mayor veracidad indica el método³⁶.

$$S = X - X_i \quad \text{Ecuación 5}$$

Dónde: S es el sesgo, X es valor esperado o verdadero y X_i es el valor promedio de las medidas obtenidas.

Para evaluar el sesgo se debe realizar la prueba t la cual se calcula en la Ecuación 6:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\mu - X_i|}{s\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

t_{cal} = t observado o calculado.

X_i = Valor esperado o valor certificado en concentración.

μ = Promedio de valores leídos u observados en concentración.

s = Desviación estándar.

n = Numero de lecturas o valores observados.

Normalmente se expresa en términos de porcentaje de recuperación, error o sesgo. La exactitud expresada como el porcentaje de error³⁷, se calcula por:

$$\% \text{ Error} = \frac{\text{valor experimental} - \text{valor real o esperado}}{\text{valor real o esperado}} \times 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

2.6.4 Límite de cuantificación

Es la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables bajo las condiciones en que se lleva a cabo el método. El límite de cuantificación es un término cuantitativo, encontrándose entre este y el límite de detección un rango de concentraciones en el que si bien no puede cuantificarse el analito en cuestión con razonable certeza, si puede detectarse su presencia sin incurrir en falsos positivos.

Existen diversos métodos de análisis y equipos instrumentales, dependiendo de cada uno se elige el método para hallar tanto el límite de detección como el de cuantificación³⁹.

2.6.5 Límite de detección

El límite de detección se define como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a la señal del blanco o ruido de fondo³⁵, aunque la concentración no necesariamente se cuantifica bajo las condiciones experimentales establecidas. Una alta sensibilidad del método analítico no siempre permite suponer inferiores límites de detección, ya que lo que definiría este límite es la relación entre el ruido y la señal debida al analito³⁸.

2.6.6 Precisión

Es la medida del grado de concordancia entre análisis repetidos de una muestra. Se puede determinar por el grado de reproducibilidad o de repetibilidad del método analítico bajo condiciones normales de operación^{36,37}. Los parámetros de calidad de la precisión son: El coeficiente de variación y la desviación estándar (Ecuación 8) y (Ecuación 9) respectivamente.

Una forma de expresarla es calculando el coeficiente de variación, el cual proporciona una interpretación porcentual del grado de variabilidad de la desviación estándar.

$$CV = \frac{s}{\bar{X}} \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde \bar{X} es el valor medio obtenido de una serie de datos y la desviación estándar, s , expresa la desviación de los valores con respecto al valor medio.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad \text{Ecuación 9}$$

Donde X_i es el valor individual obtenido para cada una de las diferentes determinaciones y n es el número de determinaciones o repeticiones.

2.6.7 Repetibilidad

Expresa la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante una misma sesión de trabajo en un período corto de tiempo (mismo día).

2.6.8 Reproducibilidad

Son aquellos resultados obtenidos dentro del laboratorio por el mismo analista, con los mismos equipos, en un intervalo largo de tiempo (días distintos).

2.6.9 Incertidumbre

La palabra “*incertidumbre*” significa duda, y por lo tanto, en un sentido más amplio “incertidumbre de medición” significa duda en la validez del resultado de una medición. Este parámetro está asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando (magnitud sujeta a la medida), una estimación que caracteriza el intervalo de valores dentro de los cuales se halla el valor verdadero de un mesurando^{36,37,40}.

La incertidumbre de la medición no implica duda acerca de la validez de una medición; por el contrario, implica un incremento de la confianza en la validez del resultado de una medición.

Componentes de la Incertidumbre

En la estimación de la incertidumbre puede ser necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarla por separado para obtener la contribución de esa fuente. Cada una de estas contribuciones a la incertidumbre, se entiende como componentes de la incertidumbre:

1. Determinación de las fuentes de incertidumbre como por ejemplo interferencias, muestreo, condiciones de almacenamiento, efectos instrumentales, pureza de los reactivos, condiciones ambientales, incertidumbre en el peso y volumen de reactivos, aproximaciones y suposiciones incorporadas al método de análisis.
2. Incertidumbre estándar. Este componente está expresado como una desviación estándar.
3. Incertidumbre estándar combinada (u y c). Para un resultado de la medición (y), la incertidumbre total o incertidumbre estándar combinada es una estimación de la desviación estándar igual a la raíz cuadrada positiva del total de la varianza obtenida por la combinación de todos los componentes de la incertidumbre.
4. Incertidumbre expandida (U). Provee un intervalo dentro del cual el valor del analito es dado con un alto nivel de confianza. La incertidumbre expandida se obtiene multiplicando la incertidumbre estándar combinada por un factor k. La elección del factor k es el nivel de confianza deseado (para un nivel de confianza del 95%, k es igual a 2)⁴¹.

Para demostrar que un método analítico es adecuado para el fin previsto, se debe demostrar a través de una evidencia objetiva que el método analítico ha sido adecuadamente estandarizado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO: Para llevar a cabo las pruebas estadísticas requeridas para este trabajo se utiliza el paquete estadístico SPSS versión 23 y el programa Excel, para esto se tiene en cuenta las siguientes pruebas.

2.6.10 Pruebas de Normalidad

La distribución normal sirve como punto de referencia para describir cómo se distribuyen muchos de los datos de los análisis que se realizan. Se utilizan dos pruebas, la de Shapiro-Wilk para un tamaño de muestra menor o igual a 50, y la prueba de Kolmogorov-Smirnov que se utiliza para un mayor número de datos. Ambas pruebas permiten contrastar la hipótesis nula de que los datos de los resultados de los análisis proceden de poblaciones normales. Rechazaremos la hipótesis de normalidad cuando el nivel de significancia sea menor que el nivel de significación establecido (generalmente 0.05). Cuando los valores presentan una distribución normal, se acepta la hipótesis nula y se aplican pruebas paramétricas. Cuando ocurre lo contrario, se aplican pruebas no paramétricas^{35,36}.

2.6.11 Pruebas Paramétricas

En estas pruebas de hipótesis estadísticas se asumen cierto comportamiento de muestras obtenidas aleatoriamente, y la distribución normal de las observaciones donde existe un parámetro de interés que se quiere estimar. Son pruebas de significancia estadística que cuantifican la asociación o independencia entre una variable cuantitativa y una categórica. Este tipo de pruebas exigen ciertos requisitos previos para su aplicación: como la distribución normal de la variable cuantitativa en los grupos que se comparan y la homogeneidad de varianzas en las poblaciones de las que proceden los grupos, para lo cual se utiliza los siguientes análisis.

- ✓ **Análisis de Varianza (ANOVA):** Este análisis permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que por lo menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés. La hipótesis es evaluada de la siguiente forma: Si el nivel crítico asociado al estadístico F es menor que 0.05, se rechaza la hipótesis de igualdad de medias y se concluye que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no se puede rechazar la hipótesis de igualdad y no se puede afirmar que los grupos comparados difieran en sus promedios poblacionales. En otras palabras, nos ayuda a comparar varios grupos en una variable cuantitativa^{35,36,37}.
- ✓ **Prueba de Tukey – Prueba de Duncan:** Son test de comparaciones múltiples. Permiten comparar las medias de los t niveles de un factor después de haber rechazado la hipótesis nula de igualdad de medias mediante la técnica ANOVA. Estos test tratan de perfilar, especificar y concretar una hipótesis alternativa genérica como la de cualquiera de los test ANOVA.
- ✓ **Prueba T:** Esta prueba permite contrastar hipótesis con base a una media poblacional, ajustándose a un modelo de distribución de probabilidad t de

student cuando la población muestreada es normal. La realización de esta prueba con el paquete estadístico SPSS permite contrastar dos muestras independientes o relacionadas según sea el caso.

Prueba T para muestras independientes: Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes. Si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es mayor que 0.05, podremos suponer que las varianzas poblacionales son iguales; si la probabilidad asociada al estadístico de Levene es menor que 0.05, rechazaremos la hipótesis de igualdad de varianzas y supondremos que son distintas.

Prueba T para muestras relacionadas: Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias relacionadas. Si el valor del nivel crítico es menor a 0.05 se rechaza la hipótesis de igualdad de medias.

Coefficiente de Correlación de Pearson (r): Es una prueba paramétrica que mide el grado de asociación lineal entre dos variables cuantitativas, tomando valores entre -1 y +1. Los valores próximos a +1 indican una fuerte asociación lineal positiva; los valores próximos a -1 indican una fuerte asociación lineal negativa; valores próximos a 0 indican que no existe asociación lineal entre las variables^{35,36,37}.

2.6.12 Pruebas No Paramétricas

Una prueba no paramétrica es una prueba de hipótesis que no requiere que la distribución de la población se caracterice en función de determinados parámetros. Por ejemplo, numerosas hipótesis se basan en el supuesto de que la población sigue una distribución normal. Las pruebas no paramétricas no tienen este supuesto, de modo que son útiles cuando sus datos sean firmemente no normales y resistentes a transformaciones. Sin embargo, las pruebas no paramétricas no están completamente exentas de supuestos sobre los datos. Por ejemplo, las pruebas no paramétricas requieren que los datos sean una muestra aleatoria independiente. Se aplican a una gran variedad de situaciones, ya que no se requiere que cumplan ciertas condiciones como lo es el de la distribución normal de los datos como es el caso de los métodos paramétricos. Los resultados estadísticos se obtienen de procedimientos de ordenación o en otros casos de recuento, donde el parámetro de centralización es la mediana que se define como un punto donde el valor de X está el 50% de las veces por debajo y el 50% por encima.

2.6.13 Análisis de Regresión Lineal Simple

En estadística, la regresión lineal o ajuste lineal es un modelo matemático usado para aproximar la relación de dependencia entre una variable dependiente Y, las variables independientes X_i y un término aleatorio ϵ . El procedimiento implica, básicamente, obtener la ecuación mínimo-cuadrática que mejor expresa la relación entre la variable dependiente y la variable independiente y estimar mediante el coeficiente de determinación la calidad de la ecuación de regresión obtenida³⁵.

3. METODOLOGÍA

3.1 EQUIPOS Y REACTIVOS

Tabla 2. *Reactivos y solventes*

Reactivos y solventes	Especificaciones
Metanol grado CLAR	Grado CLAR Fisher Scientific
Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal mezcla de isómeros E y Z)	Pureza: 95% Aldrich Chemistry
Acetonitrilo	Grado CLAR Fisher Scientific
Etanol	Grado CLAR Merck
Agua desionizada	
Hidróxido de amonio	Pureza: 29.54% Fisher Scientific
Ácido nítrico	Pureza: 65% Carlo Erba
Ácido acético	Pureza: 99.5% Fisher Scientific
Ácido fórmico	Pureza: 99%Merck
silica-C ₁₈	Supelco

Tabla 3. *Equipos de laboratorio utilizados*

Equipos de laboratorio	Especificaciones
Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución	Thermo Scientific modelo Dionex UltiMate 3000
Espectrómetro de masas	Thermo Scientific LCQ-fleet con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y detector de trampa de iones
Colector al vacío manifold	Supercol-Visiprep N°5-7044 para extracción en fase sólida (SPE)
Bomba de vacío	Cole-Parmer modelo N° 107CDC18TFEL-247E
Estufa	Precisa XT 220 ^a , (220 g / 0.0001 g)
Balanza analítica	Fisher Scientific

Para la recolección y análisis de los datos obtenidos a partir de UCLAR-EM, se usó el software Xcalibur 4.0. Para el tratamiento estadístico se empleó hoja de cálculo Excel 2013 y el paquete estadístico SPSS versión 23.

3.2 Método

Por lo general cualquier procedimiento analítico debe considerar la siguiente información como un soporte para su evaluación: una descripción del método que incluya detalles de los parámetros operacionales, tales como la preparación de la muestra, el método de extracción, los estándares de referencia y la preparación de reactivos. De igual manera, las características más relevantes cuando se realiza la estandarización de una metodología analítica son: linealidad, precisión, exactitud, rango, límites de detección y cuantificación, y robustez, las cuales pueden ser aplicadas parcial o totalmente dependiendo de la naturaleza de la prueba⁴².

En la Figura 9 se resume las actividades desarrolladas con el fin de cumplir los objetivos principales del presente trabajo.

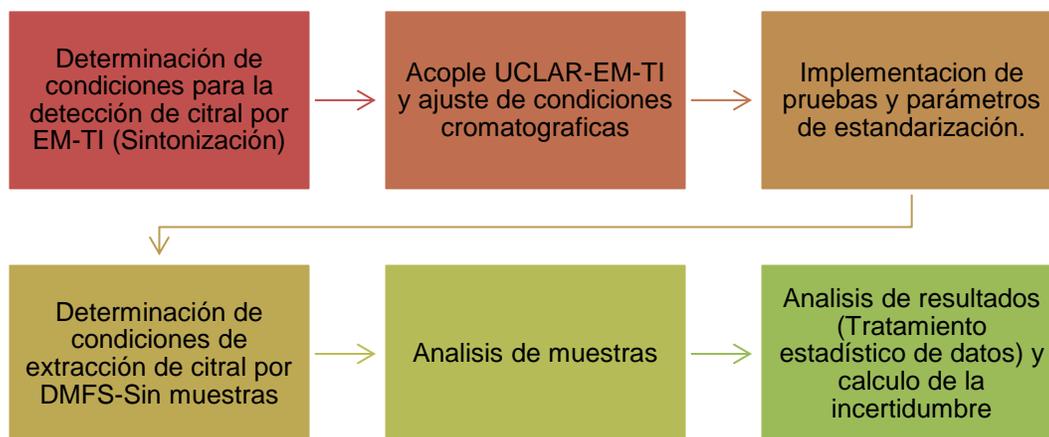


Figura 9. Diagrama general de la metodología

La primera fase en el proceso de implementación de un método para el análisis de cualquier sustancia es la adecuación de las condiciones instrumentales de mayor sensibilidad.

3.3 Determinación de las condiciones de detección del citral por EM-TI.

Para el análisis cualitativo de citral se emplea un espectrómetro de masas ThermoScientific LCQ-fleet con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y analizador de masas de trampa de iones. Se efectuaron diferentes análisis, inyectando de forma directa en el equipo soluciones patrón de citral (20 ppm) disueltas en metanol con diferentes agentes ionizantes (hidróxido de amonio, ácido fórmico y ácido acético al 0.1%) esto empleando una jeringa Hamilton de 500µL. Con cada solución patrón se realizó la modificación de los parámetros instrumentales de ionización como: voltaje del capilar, temperatura, gas auxiliar entre otras condiciones por medio de sintonización automática y semiautomática; esto con el fin de explorar el efecto de los diferentes agentes ionizantes sobre la ionización del analito. Del proceso se identificó la sustancia (agente ionizante) que brinda mayor sensibilidad para la determinación del analito, esto según su nivel de normalización el cual indica la sensibilidad, el patrón de fragmentación y los picos característicos para el citral.

3.4 Determinación de condiciones operacionales en UCLAR-EM-TI

El análisis cromatográfico se realizó en un equipo (UCLAR: UltiMate 3000 Thermo Scientific), que consta de un sistema de disolventes con bomba binaria, un desgasificador y un automuestreador automático. Se empleó columna cromatográfica Hypersil GOLD (C₁₈) tamaño de partícula 1.9 µm dimensiones de (100 X 2.1mm) y como detector el espectrómetro de masas LCQ-fleet.

Se usó como fase móvil metanol, según investigación de Mangprayool et al. (2013) y Brum, A. et al. (2017) [23,27].

En la Figura 10 se muestra el procedimiento que se utilizó para evaluar la influencia del flujo de la fase móvil sobre la identificación de citral con conexión en T.

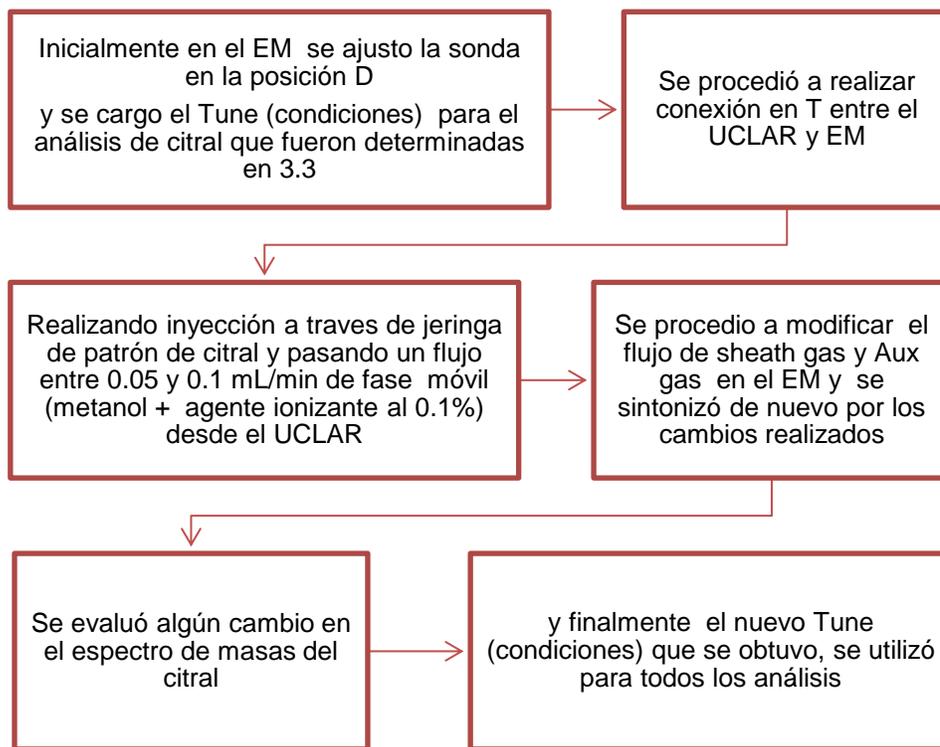


Figura 10. Procedimiento para realizar conexión en T

3.4.1 Determinación de parámetros cromatográficos

Las soluciones de trabajo son filtradas e inyectadas por el automuestreador.

Tiempo de retención y separación cromatográfica

Con el fin de determinar los parámetros de la columna cromatográfica tales como: tiempo de retención (t_r), tiempo muerto (t_m) y factor de capacidad (k'), se inyectó una solución de trabajo de 10 ppm del citral y se empezó a variar el flujo de fase móvil (metanol + agente ionizante) entre 0.05 y 0.20 mL/min, esto con el propósito de obtener una adecuada resolución de las señales o picos cromatográficos en el menor tiempo de corrida posible, además de hacer más versátiles y rápidas las medidas cromatográficas.

Durante la corrida cromatográfica el tiempo de retención del analito se evaluó al inyectar réplicas de la solución patrón de trabajo. Para la identificación del tiempo muerto se inyectó aire al sistema cromatográfico con vial vacío.

La separación de los isómeros (E) y (Z) del citral se evaluó, inyectando solución patrón de 10 ppm. Se realizaron las corridas iniciando con una relación de 100:0 de metano:agua (con agente ionizante), posteriormente se fue aumentando de forma gradual la proporción de agua; por cada cambio en la proporción de solvente se dejó

estabilizar la columna por 15min y se fue registrando con los cromatogramas si se daba la separación de los isómeros.

Factor de capacidad

Esta medida se determina directamente de los cromatogramas, utilizando los tiempos de retención en la separación de los isómeros y con base al t_m , se utilizó la Ecuación 1 para calcular k' .

3.5 Estandarización del método de cuantificación

Se realizó la estandarización del método para la determinación y cuantificación de citral por UCLAR-EM-TI. Para ello, se prepararon curvas de calibración, por patrón externo, preparando solución de citral en metanol de 1000 mg/L a partir del patrón de citral al 95%.

Las soluciones empleadas para las curvas de calibración se prepararon por triplicado y se les adiciono agente ionizante, los resultados obtenidos se reportaron como el promedio de las tres mediciones. Todos los patrones de calibración se filtraron con filtro de Nylon de 0.22 μm y fueron preparados justo antes del análisis.

Linealidad Instrumental: Para analizar la linealidad instrumental se evaluaron 7 niveles de concentración durante 7 días diferentes. Se prepararon 7 curvas de calibración durante los 7 días, una curva de calibración por día, las cuales fueron sometidas al proceso descrito anteriormente. Los resultados obtenidos en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permitieron establecer el rango dinámico de trabajo.

La sensibilidad: Se evaluó en términos de %C.V y s de la pendiente de la curva de calibración.

Precisión: Se evaluó bajo condiciones de repetibilidad (en un periodo corto de tiempo) y reproducibilidad a lo largo de un periodo de tiempo más prolongado. En condiciones de repetibilidad se prepararon 7 niveles de concentración durante 7 días, una curva de calibración por día. Para el ensayo de reproducibilidad se prepararon 3 curvas de calibración durante un tiempo prolongado o días diferentes. Se calculó la desviación estándar y el coeficiente de variación en términos de porcentaje (%C.V) por nivel de concentración bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

Límite de cuantificación y detección: La determinación del límite de detección (LD) se llevó a cabo por medio de análisis en orden decreciente de la concentración de citral, en busca de la concentración experimental a la cual la señal de citral fue distinguible del ruido, mientras que la determinación del límite de cuantificación (LC) se llevó a cabo mediante la determinación de la concentración en ppm a la cual el sistema de análisis de datos del EM puede integrar el área bajo los picos obtenidos para el citral.

Exactitud: Se evaluó el análisis del estándar por triplicado a concentraciones bajas, medias y altas en tres días consecutivos, así mismo la exactitud del método se estimó teniendo en cuenta material control, un patrón preparado por un analista de la unidad de análisis industriales, esto con el fin de medir un analito de concentración conocida y determinar la diferencia entre el valor conocido y la media del valor obtenido.

3.6 Adecuación de la dispersión de matriz en fase sólida-DMFS para extracción de citral en diferentes muestras.

Con el fin de evaluar la metodología analítica implementada por UCLAR-EM-TI en muestras reales, se empleó la DMFS como técnica de extracción del citral en jengibre, jabón y perfume.

Para llevar a cabo la adecuación del proceso de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS)-sin muestra, se tiene en cuenta la metodología planteada por (Barker, S., 2007)³⁰. Inicialmente el proceso se acondicionó determinando el porcentaje de recobro de citral en la extracción sin muestra, ósea empleando solución patrón.

El procedimiento general utilizado se muestra en la Figura 11. Inicialmente se procedió a mezclar 200 mg de material de soporte con 10 μ L de patrón de citral a 10 °C, el cual al adicionarlo al adsorbente es equivalente a una concentración de 10 ppm (dopaje del soporte sólido); los componentes son mezclados en un mortero de ágata mecánicamente usando un pistilo de ágata, por 30s. El patrón ya mezclado y distribuido en la fase soporte es transferido y empacado dentro de un cartucho de extracción, los cartuchos preparados fueron ligeramente comprimidos para eliminar espacios de aire interno. Finalmente se realiza la elución del citral empleando diferentes solventes según se describe en la Tabla 4. Utilizando como solvente de limpieza agua y para la extracción etanol o metanol.



Figura 11. Procedimiento para extracción de citral por DMFS

Tabla 4. *Ensayo determinación de volumen de elución del citral*

Fracción recolectada	Solvente	Volumen a ensayar
1	Agua	1,0 mL
2	Agua	1,0 mL
Secado al vacío		
3	Metanol o Etanol	0,5 mL
4	Metanol o Etanol	0,5 mL
5	Metanol o Etanol	0,5 mL
6	Metanol o Etanol	0,5 mL

Todas las fracciones recogidas se filtraron y analizaron directamente en UCLAR-EM-TI; a partir de los análisis de las fracciones recogidas utilizando el manifold para facilitar la elución del analito, se determinó las posibles pérdidas de analito en el lavado y el volumen total requerido para la extracción de citral. De manera análoga se realizó blanco de solvente de la sílica - C₁₈ y todos los análisis se realizaron por triplicado y por tres días.

3.6.1 Estudio de recobros en la metodología de extracción por DMFS

Se determinó el porcentaje de recobro para el procedimiento descrito en 3.6; de este ensayo se evaluó el área del analito extraído por DMFS ante el área del estándar de 10 ppm. A partir de los datos se calculó el porcentaje de recobro (%R) del método y se determinó la precisión en términos del % C.V y (s).

3.7 Aplicación de la metodología implementada a muestra reales

La implementación de la metodología para el análisis de citral en muestras reales, permite evaluar la robustez y versatilidad del método para la UAI del Departamento de Química. De esta forma se realizaron análisis a tres tipos de muestras reales: muestra natural (jengibre), cosmética (jabón y perfume).

Las muestras de jengibre, jabón y perfume fueron obtenidos comercialmente. La muestra natural se almaceno en frío a 10 °C y los productos comerciales se mantuvieron en su empaque original y a temperatura ambiente hasta su análisis. A las muestras solidas se aplicó la metodología de extracción por DMFS descrita en el ítem 3.6. En la Figura 12 se muestra el procedimiento de extracción por DMFS para muestras reales.

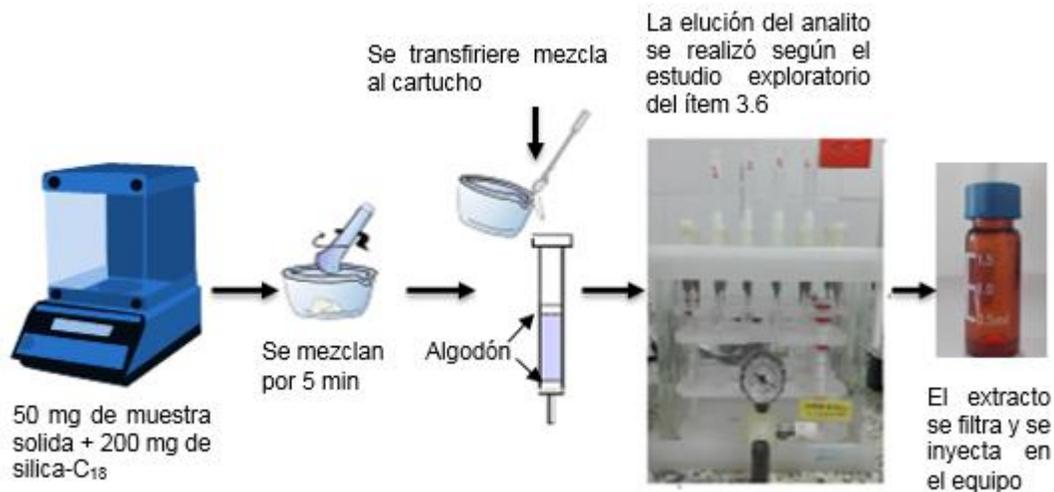


Figura 12. Procedimiento para extracción de muestras por DMFS

Para la muestra líquida solo se realizó una dilución, se filtró y se analizó directamente en el equipo. Todos los análisis para las muestras se hacen por triplicado durante días diferentes, los resultados obtenidos para las muestras se interpolan en la curva de calibración correspondiente. Se determinó la precisión en términos del % C.V y (s) para las muestras.

3.8 Cálculo de la incertidumbre

Por último se evaluó y se realizó los cálculos de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuertes globales que se exponen en ítem 2.6.9 y en el (Anexo 1).

4. RESULTADOS Y ANÁLISIS

4.1 Condiciones de operación en EM para la identificación de citral

En primer lugar, los parámetros de funcionamiento del EM para la determinación de citral, se optimizaron mediante observación de la respuesta máxima obtenida para los espectros de masas. Se encontró que para cada agente ionizante utilizado (hidróxido de amonio, ácido fórmico y ácido acético al 0.1%), se alcanzó una adecuada señal de respuesta en el EM. Sin embargo por medio de los análisis de los espectros se determinó que el mejor agente ionizante es el hidróxido de amonio, cuyo espectro de masa para el citral sugiere los iones moleculares de m/z 152.05, 135.04, y 107.06 siendo el más abundante el pico de 152.05; la presencia del pico a 169 corresponde a la posible formación de un aducto ($M+NH_4^+$) (Figura 13) en el (Anexo 2) se muestra los espectros de masas a la n donde se corrobora la presencia de los picos más comunes para el citral en este estudio. La relación de estos picos con el citral se representa mediante el fragmentograma de la (Figura 14). Al utilizar hidróxido de amonio como agente ionizante se registró un nivel de normalización E^4 (sensibilidad) esto implica que la cantidad de iones que entran a la trampa de iones es alta, por lo que el proceso de ionización que se efectúa es el adecuado para la identificación del analito; con el ácido fórmico no se identificó ninguna fragmentación distintiva para la caracterización del analito, por otro lado el ácido acético fue también un buen agente ionizante y presenta un espectro de masas parecido al que se registra con el hidróxido de amonio (Anexo 3. b), sin embargo la intensidad de los picos es menor, y debido a que el analito se degrada fácilmente a pH ácido se descarta utilizar fuentes ácidas para ionizar. La comparación directa de los espectros con la bibliografía no fue posible ya que la ionización depende parcialmente de los parámetros de ionización que se establecen en el espectrómetro de masas⁹. Finalmente en la (Tabla 5), se especifican las condiciones que fueron óptimas para la detección de citral por EM.

Tabla 5. Condiciones del método para la determinación de citral por ESI-EM-TI

CONDICIONES ESPECTRÓMETRO DE MASA	
I Spray Voltage (kV)	6
Spray Current (μ A)	0.20
Sheath Gas Flow Rate (arb)	20.9
Aux Gas Flow Rate (arb)	4.99
Sweep Gas Flow Rate (arb)	0
Capillary Temp ($^{\circ}$ C)	240
Capillary Voltage (V)	14
Tube Lens(V)	75
Agente ionizante	Hidróxido de amonio 0.1%

citralacnh4_3 #4-166 RT: 0.01-0.30 AV: 163 NL: 2.12E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-200

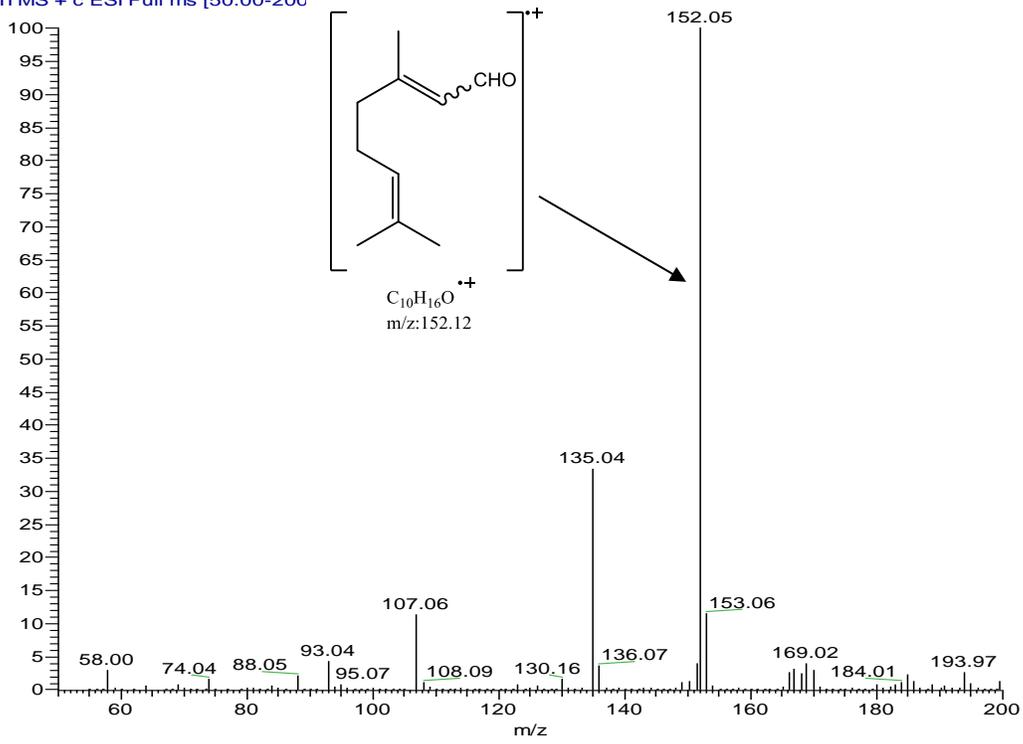


Figura 13. Espectro de masas por ESI del citral + NH₄OH 0.1%

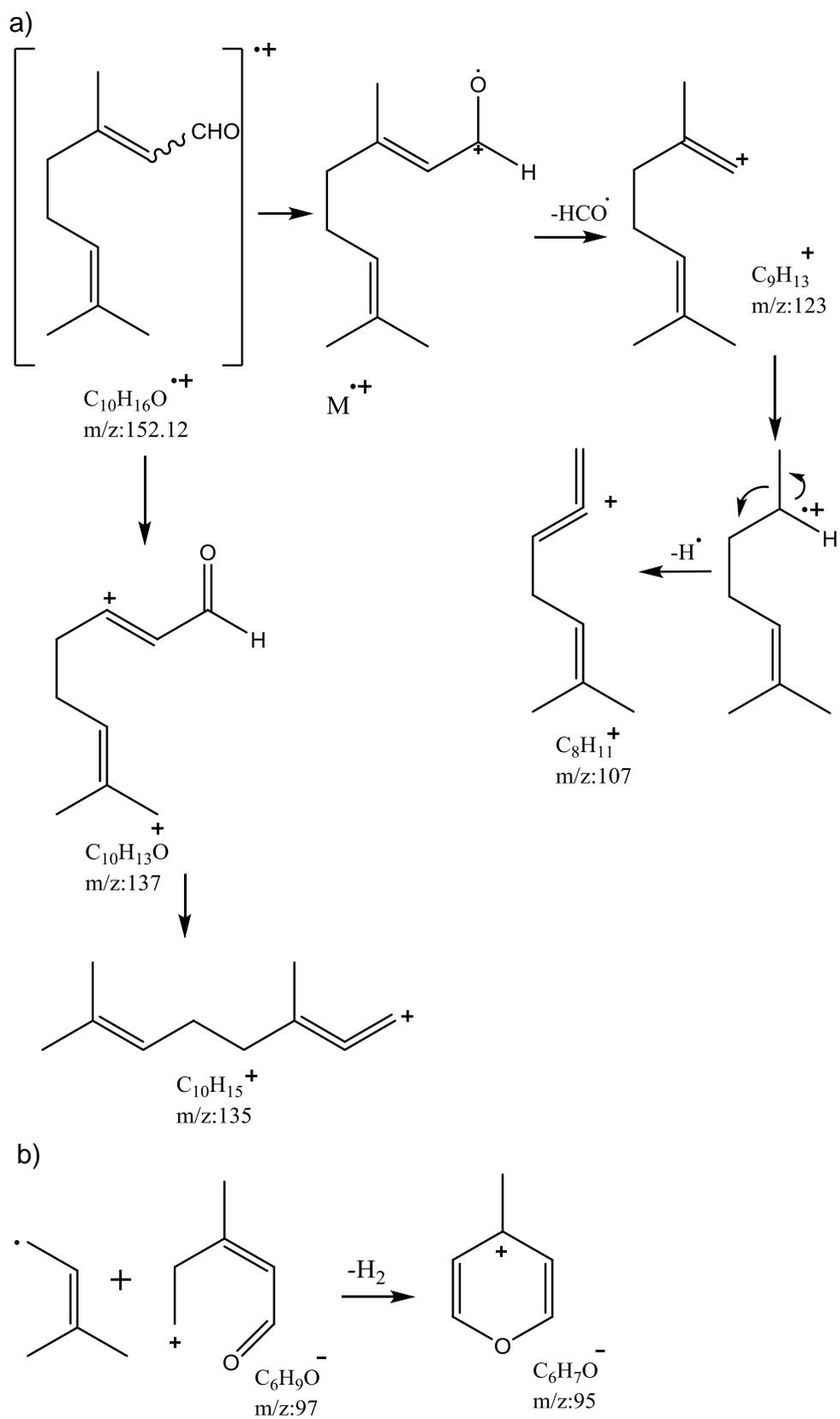


Figura 14. Patrón de fragmentación del citral

Fuente: Adaptado de Predicted LC-MS/MS Spectrum. Recuperado de http://www.hmdb.ca/spectra/ei_ms/30.

4.2 Condiciones operacionales en ultra cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas

Es importante resaltar que al realizar el acople UCLAR-EM-TI hay flujos más altos de solvente, por lo cual se requiere mayor flujo de gas para que se de formación del spray, es decir la nebulización de la solución.

Al realizar la conexión en T (acople) UCLAR y EM se determinó que al aumentar el flujo de la fase móvil entre 0.05-0.1 mL/min no afecta de forma significativa la identificación del analito, sin embargo cuando se realizó la sintonización variando el flujo de los gases que están implícitos en el desempeño de la formación del spray, tales como sheath gas y Aux gas (por sus siglas en inglés), se registró mayor sensibilidad en la detección del citral. A partir de esto, los valores finales optimizados de sheath gas 31.38 y Aux gas 6.00 se toman como referencia para proceso de implementación y estandarización de la metodología en UCLAR con detección en EM-TI.

4.2.1 Determinación de parámetros en la separación cromatográfica

Tiempo de retención.

Según lo reportado por Tirado et al. (2013) y Chien-C et al. (2017) [10-14] se pueden emplear diversos modificadores orgánicos como metanol, acetonitrilo y hexano; se escogió inicialmente como fase móvil metanol al cual se le adiciono 0.1% de hidróxido de amonio como agente ionizante esto según los resultados obtenidos en el ítem 4.1. Para el proceso, se observó que no es útil trabajar a flujos bajos de fase móvil puesto que el tiempo de análisis llega a durar 10 min y se da el ensanchamiento del pico cromatográfico y a flujos altos no mayores de 0,2 mL/min el pico eluye a un tiempo menor a 1 min muy cerca al t_m de la columna; de modo que se determinó que el flujo óptimo de fase móvil era 0.1 mL/min, permitiendo un análisis en tan solo 5 min.

A un flujo de 0.1 mL/min de fase móvil el analito eluye de la columna cromatografía a los 3 min de la corrida, se identificó al analito por la concordancia en la relación masa-carga de los picos en el espectro de masas analizado anteriormente (Figura 15).

El tipo de retención se explica por las características del analito que al ser de mediana polaridad es más afín a la fase móvil (metanol solvente polar), las fuentes polares del soluto favorecen la interacción con el solvente polar por lo que se retiene menos y eluye antes, las fuerzas de interacción posiblemente involucradas serían fuerzas de Van der Waals ya que la columna es no polar⁴³. En el cromatograma se registró un solo pico con ensanchamiento normal por la presencia de los dos isómeros aunque también puede ser debida a procesos de ensanchamiento de banda intracolumnar.

Separación cromatográfica

Con el propósito de realizar la separación de los picos cromatográficos se efectuó cambios en la composición de la fase móvil, al realizar una corrida a 100% metanol con el agente ionizante se observa un solo pico cromatográfico ya que al utilizar un

disolvente polar más rápido es el movimiento del analito y por ende es menos efectiva la separación, (la fase móvil es el parámetro fundamental que gobierna la separación de los compuestos). En la separación de los isómeros nerál y geranial del citral, se observó que al aumentar la proporción de agua en la fase móvil desde 100% metanol hasta la proporción 70:30 de metanol:agua el pico cromatográfico se desplaza a un mayor tiempo de retención, permitiendo que los fenómenos de difusión gobiernen el perfil cromatográfico y afecten la resolución; no se dio la separación de los dos isómeros nerál y genial, y se evidencio la pérdida completa de la gaussianidad de los picos al ir aumentado la cantidad de agua (Figura 16); es así que los cromatogramas obtenidos no serían útiles o adecuados para la cuantificación de los isómeros. Esto se pone en evidencia evaluando el factor de capacidad el cual se emplea para evaluar el tiempo de retención y en este proceso para ajustar la separación de los isómeros.

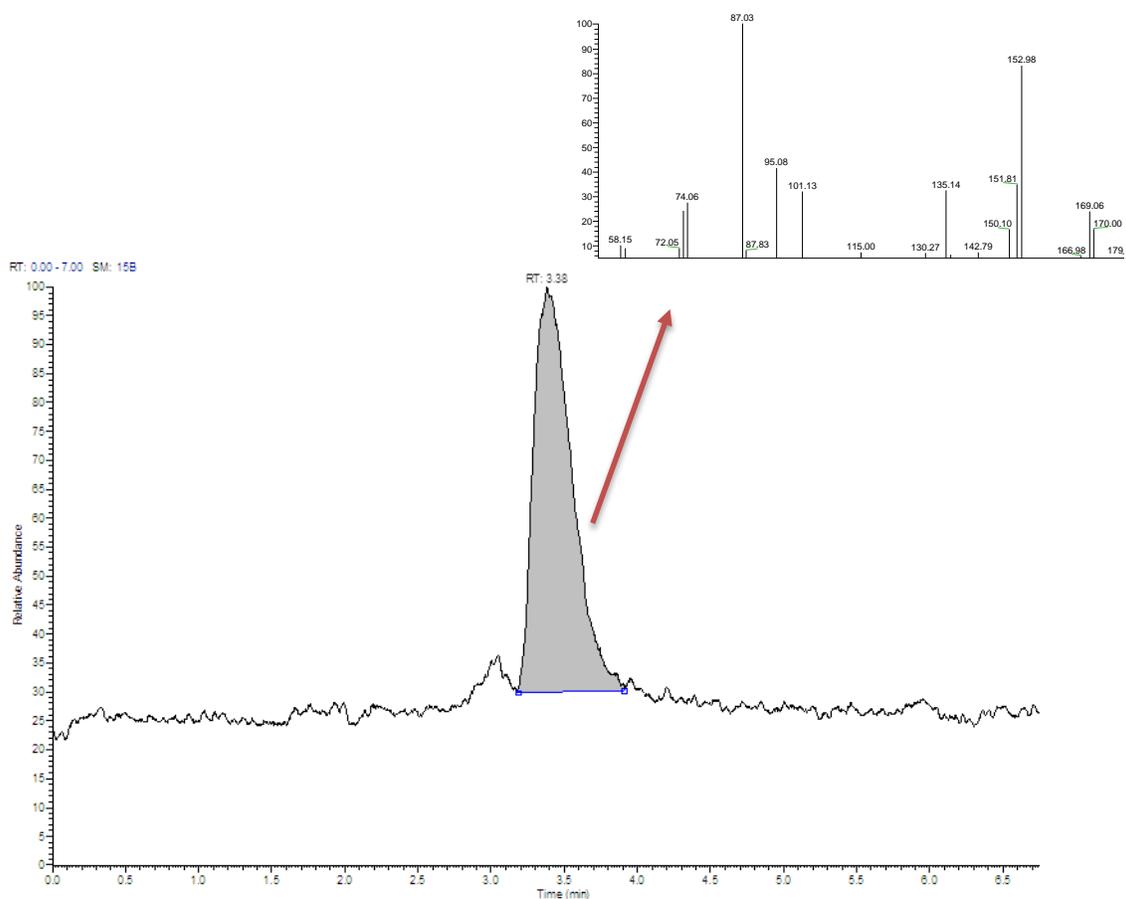


Figura 15. Perfil cromatográfico del citral

Condiciones cromatografías: fase móvil (metanol + NH_4OH 0.1%), flujo 0.1 mL/min, volumen inyección 15 μL , tiempo de corrida 5 min.

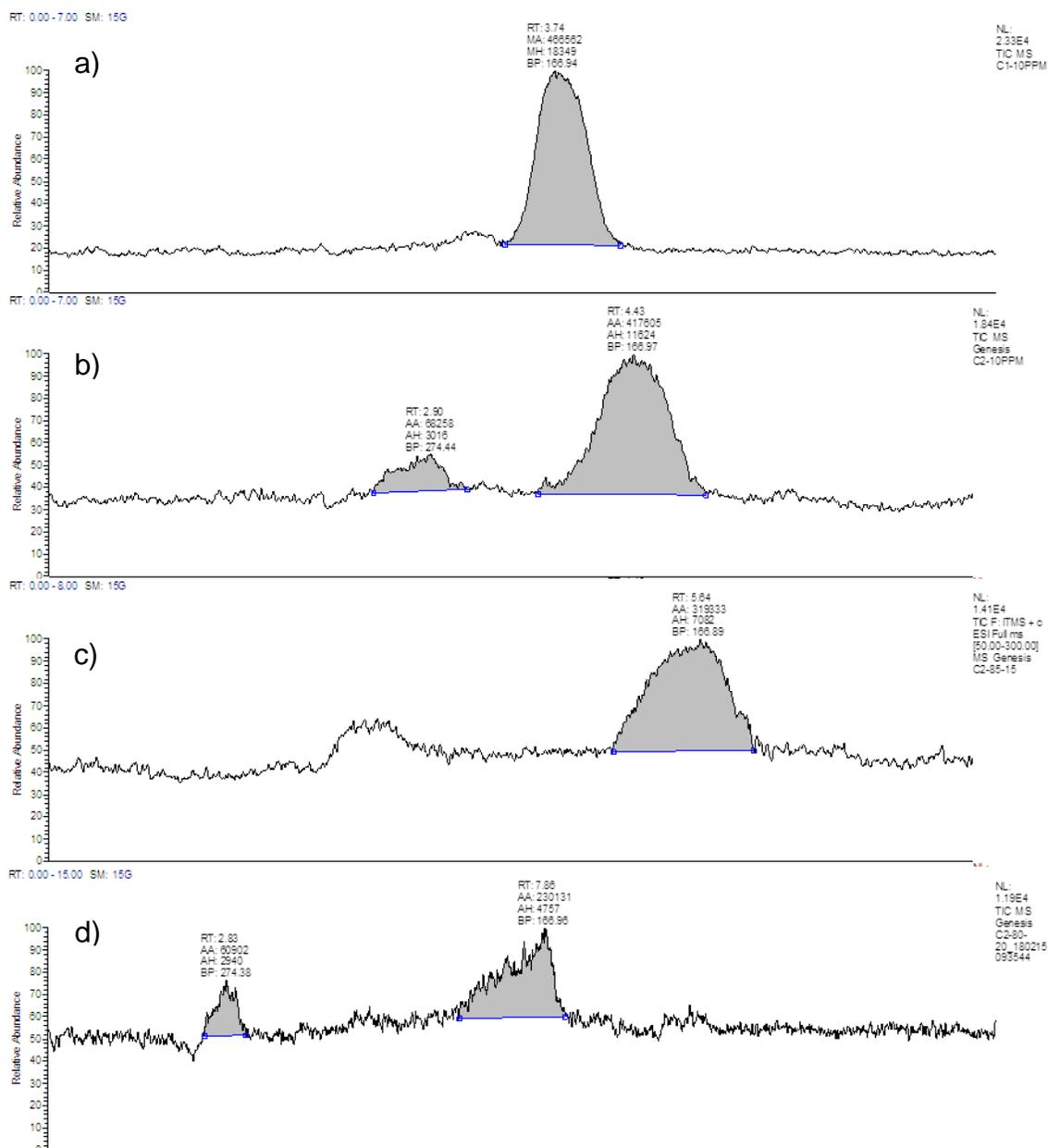


Figura 16. Perfiles cromatográficos para el cambio de fase móvil

a) 100% metanol, aumento de la proporción de agua, relación metanol:agua b) 95:5, c) 90:10 d) 85:15. Condiciones cromatografías: flujo 0.1 mL/min, volumen inyección 15 μ L.

La medida del factor de capacidad (k') se determinó directamente de los tiempo de retención en los cromatogramas (Figura 16), con la inyección de aire a través del cromatógrafo se determinó que el tiempo muerto equivale a 0.11 min, con la Ecuación 1 se determinó (k') para cada cambio en la proporción de metanol:agua y se graficó su logaritmo (Figura 17).

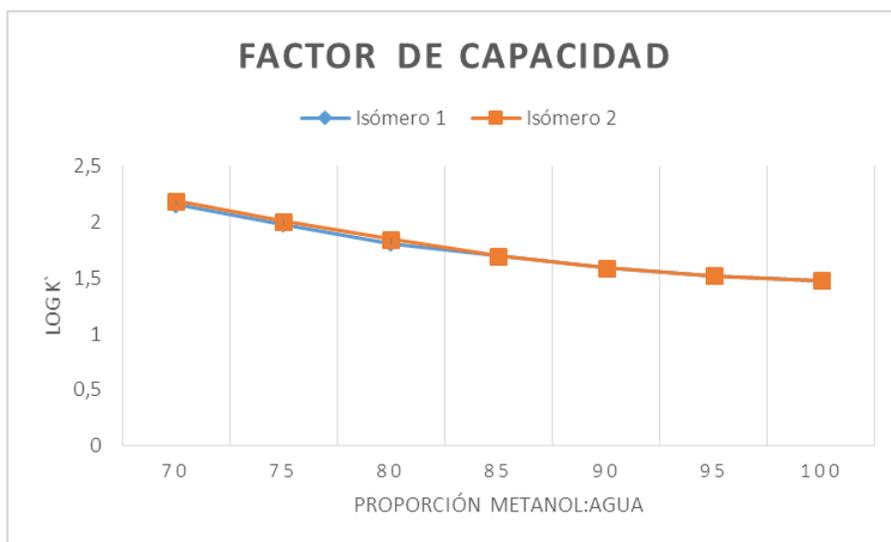


Figura 17. Grafica log k' vs proporción metanol: agua

Según los resultados del factor de capacidad se concluyó que ninguna de las proporciones de metanol:agua es útil para la separación de los isómeros neral y geranial; ya que al modificar la fuerza de elución de la fase móvil, al aumentar la proporción acuosa se da un incremento de la polaridad, lo que conlleva a un desplazamiento en el tiempo de retención, ensanchamiento y pérdida de la resolución de los picos. Teniendo en cuenta el perfil cromatográfico de la (Figura 16) y el k' se determinó trabajar con 100% metanol como fase móvil y cuantificar citral total como se expresa comercialmente. En la Tabla 6 se resume en su totalidad todos los parámetros establecidos para el análisis cromatográfico.

Tabla 6. Condiciones del método para la determinación de citral por ultra cromatografía líquida de alta resolución

Condiciones cromatográficas	
Columna	Hypersil GOLD (C ₁₈) tamaño de partícula 1.9 µm (100 X 2.1mm)
Fase móvil	Metanol + NH ₄ OH 0.1% Modo: Isocratico
Flujo fase móvil	0.1 mL/min
Temperatura del automuestreador	10 °C
Temperatura de la columna	20 °C
Tiempo de corrida	5 min
Volumen de muestra	10 µL

4.3 Implementación de la metodología analítica para determinar citral por UCLAR-EM-TI

Se evaluaron los parámetros descritos en la metodología del ítem 3.5, se prepararon curvas de calibración para citral en un rango entre 3 a 20 ppm a partir de una solución stock de 1000 mg/L, teniendo como blanco metanol + NH₄OH 0.1%, esto con el fin de estandarizar el método analítico y que éste conduzca con un alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones previamente establecidas.

4.3.1 Linealidad Instrumental

La linealidad instrumental es aquel grado de proporcionalidad directa entre un par de variables de un método analítico. Para medirse se realiza una “curva de calibración” con la cual se establece la proporcionalidad existente entre la concentración y la respuesta del método analítico³⁵.

Para el proceso se evaluaron (7 niveles de concentración) durante 7 días. Se preparó una curva de calibración por día, la cual se sometió al método descrito en la metodología. Los resultados se presentan en la tabla 7.

Tabla 7. Evaluación de la normalidad de los datos obtenidos en función del tiempo (días consecutivos).

Nivel de concentración (ppm)	Áreas						
	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
3	129209	209105	133450	129786	110127	181192	131684
5	255656	309157	295688	301243	210597	389113	389113
7	368365	461510	362162	467178	307905	519101	339492
10	485142	605136	509098	595099	430485	627001	525717
13	586221	721934	679677	740432	602114	792930	571374
15	681443	772623	791013	820670	708919	861458	636816
20	835655	929740	970881	998810	876579	1078545	749395

A estos resultados se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, para determinar si se aplican pruebas paramétricas o no paramétricas, teniendo como criterio de rechazo de la hipótesis nula el valor de significancia (p) de la prueba, la cual establece que para valores superiores de 0.05 se acepta la hipótesis nula de acuerdo a si el valor de significancia (p) de la prueba es superior o no a 0.05. Se planteó como hipótesis nula, H_0 : “el conjunto de datos obtenidos provienen de una población normal” y como hipótesis alternativa, H_a : “Los datos obtenidos no provienen de una población normal”. Los resultados se registran en la Tabla 8.

Tabla 8. Evaluación de normalidad de los datos en función del día.

Días	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.
1	0,948	21	0,307
2	0,920	21	0,085
3	0,931	21	0,141
4	0,945	21	0,277
5	0,928	21	0,123
6	0,950	21	0,340
7	0,924	21	0,104

gl: Grados de libertad, Sig: Significancia.

Los datos en la Tabla 8 se ajustan a la normalidad ($p > 0.05$), por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se considera que en función de los días los resultados siguen una distribución normal y se aplican pruebas paramétricas de ANOVA con el fin de establecer si existen diferencias significativas en los valores de área en términos de linealidad instrumental. En la Tabla 9 se presentan los datos de los análisis ANOVA.

Tabla 9. ANOVA para área vs día.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5,8E+11	6	9,7E+10	1,434	0,206
Dentro de grupos	9,5E+12	140	6,8E+10		
Total	1,0E+13	146			

gl: Grados de libertad, Sig: Significancia, F: Estadístico F.

El análisis ANOVA para los valores de área de los diferentes niveles de concentración en función del día, (Tabla 9) muestra que no existe diferencia significativa entre los valores de área ($p > 0,05$) en función del día, se encuentra que los resultados provienen de una población con distribución normal y el área de cada concentración no presenta variación con el tiempo, además sugiere que la metodología aplicada presenta repetibilidad.

En la Tabla 10 se muestran los resultados de la prueba ANOVA para conocer si existen diferencias significativas entre los valores de área en función del nivel de concentración.

Tabla 10. ANOVA para área vs nivel de concentración

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	9,3E+12	6	1,5E+12	277,747	0,000
Dentro de grupos	7,8E+11	140	5,5E+10		
Total	1,01E+13	146			

gl: Grados de libertad, Sig: Significancia, F: Estadístico F.

El resultado obtenido indica que las áreas difieren significativamente ($p < 0,05$) entre cada nivel de concentración, esto demuestra que existe una relación directamente proporcional del área con respecto a cada nivel de concentración. Para saber entre

cuáles niveles de concentración hay diferencia significativa, se aplica la prueba de Tukey Tabla 11, con un intervalo de confianza del 95%.

Tabla 11. Prueba de Tukey

Nivel de concentración ppm	N	Subconjunto $\alpha = 0.05$						
		1	2	3	4	5	6	7
3	21	146364,52						
5	21		286519,00					
7	21			403673,05				
10	21				539668,24			
13	21					670668,81		
15	21						753277,33	
20	21							919943,67
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

N: Número de datos en los grupos, α : Nivel de significación.

En los resultados de la prueba de Tukey para el método analítico, se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos en donde cada área es significativamente diferente, lo que sugiere que el área de cada nivel de concentración tiene un valor de significancia de $p > 0.05$, es decir, el incremento en el nivel de concentración produce incremento significativo y proporcional en el valor del área, indicando que hay una relación lineal directa entre el área y la concentración en los niveles de las curvas de calibración para el citral.

Como los datos de área difieren significativamente para cada nivel de concentración y a medida que incrementa el nivel de concentración incrementa el área. Los datos se evaluaron a través del gráfico relacionando el área respecto a la concentración de citral (ppm), la gráfica obtenida se muestra en la Figura 18.

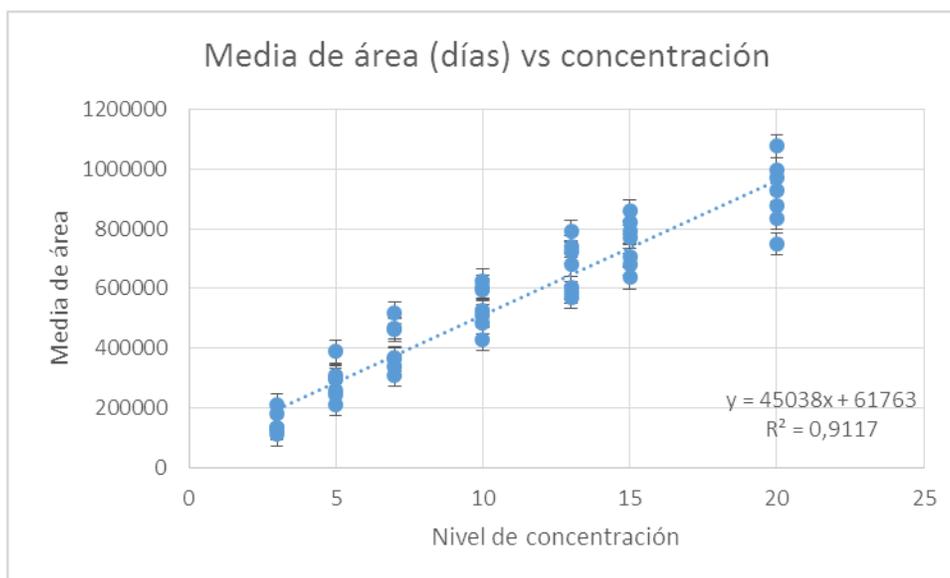


Figura 18. Gráfica respuesta lineal área vs concentración (ppm)

En la Figura 19 se representa la tendencia de los datos presentados en la Tabla 7. Estos datos fueron evaluados a través de un gráfico donde se relaciona el área

respecto a la concentración de citral (ppm), en la gráfica se observa la tendencia lineal de los resultados y la ecuación lineal de las curvas de calibración.

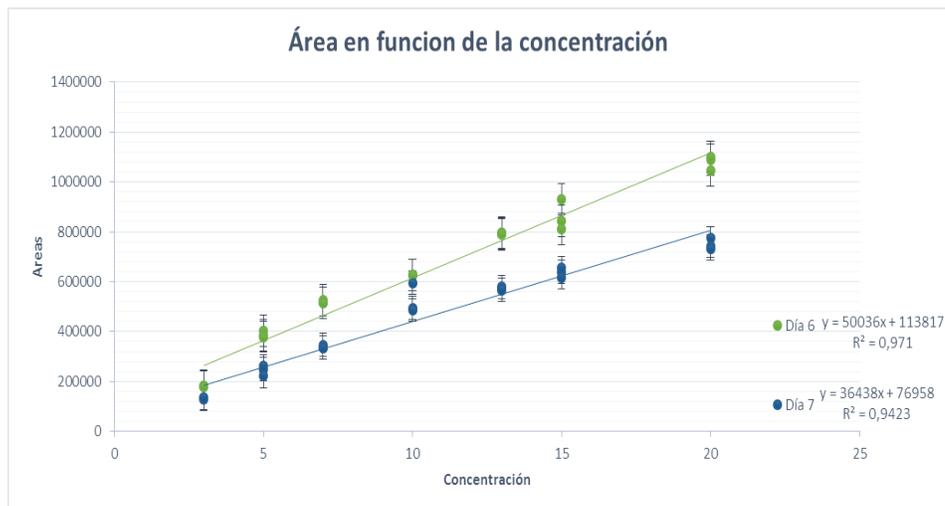
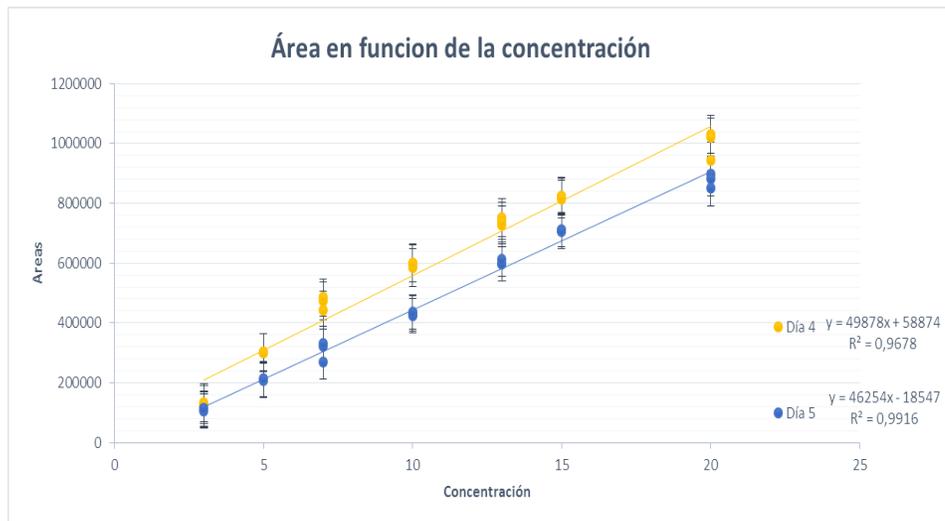
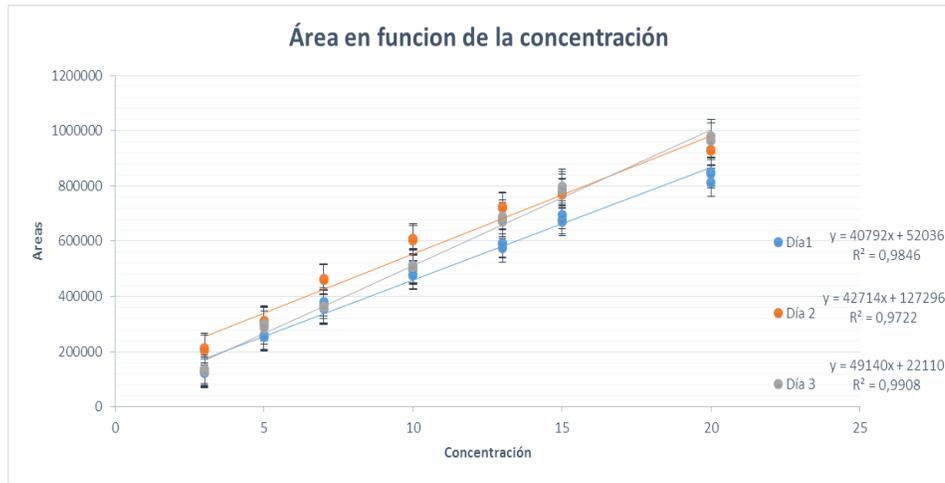


Figura 19. Gráficas de linealidad y repetibilidad de las curvas de calibración en los 7 días consecutivos (Concentración en ppm)

El coeficiente de correlación se evaluó estadísticamente mediante Correlación de Pearson teniendo como hipótesis nula H_0 : “No existe correlación significativa entre y e x ”. Como se observa en la Tabla 12, la prueba es significativa (Sig. 0.000 < 0.01), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se concluye que existe correlación altamente significativa entre el área y la concentración; la respuesta brindada por el equipo es adecuada puesto que se obtuvo un r mayor a 0.7 indicando que existe linealidad.

Tabla 12. Coeficientes de correlación. (Evaluación de la linealidad instrumental)

Parámetro	Valor
Coeficiente de Correlación	0,959
Coeficiente de correlación ²	0,920
Sig. Cambio en F	0,000

R^2 indica que el 92% de la variación del área esta explicada por la concentración. Para evaluar estadísticamente la pendiente (m) y el intercepto (b) se tienen las siguientes hipótesis:

- ❖ H_0 (Pendiente): “ m no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. < 0,05.
- ❖ H_0 (Intercepto): “ b no es significativamente diferente de cero”, la cual se rechaza cuando la prueba estadística es significativa, es decir cuando sig. < 0,05.

En la Tabla 13 se pueden observar los resultados obtenidos de la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto.

Tabla 13. Resultados obtenidos en la evaluación estadística de la pendiente y el intercepto

Modelo	Coeficientes no estandarizados	Coeficientes estandarizados	T	Sig.	95,0% intervalo de confianza para B	
	B	Beta			Límite superior	Límite inferior
Pendiente	28409,250	0,959	2,058	0,041	55691,96	1126,530
Intercepto	125758,92		40,74	0,000	131859,5	119658,3

La significancia estadística tanto para la pendiente como para el intercepto son inferiores a 0.05, por lo que se deben rechazar las hipótesis nulas, y concluir que la pendiente y el intercepto son significativamente diferentes de cero.

Mediante análisis de varianza (ANOVA) se evaluó estadísticamente la regresión en las curvas de calibración de la Tabla 7, los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. ANOVA para evaluar la regresión lineal en la curva de calibración

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	9,3E+12	1	9,3E+12	16660,0	0,000
Residuo	8,1E+11	145	5,6E+10		
Total	1,0E+13	146			

Para evaluar la regresión se tiene como hipótesis nula: “No hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 = 0$)”, y como hipótesis alternativa “Hay regresión significativa en la curva de calibración ($R^2 \neq 0$)”. Se observa que la significancia para la regresión es menor de 0.05 por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alternativa, concluyendo que existe regresión significativa en la curva de calibración. Los resultados que se obtuvieron en las pruebas estadísticas para la evaluación de linealidad, permiten concluir que el método instrumental empleado para determinación de citral es lineal en el rango de 3 a 20 ppm, con un coeficiente de correlación superior a 0.9.

4.3.2 Evaluación de la sensibilidad

Para el análisis de la sensibilidad del método se utilizó el promedio de las pendientes obtenidas en las rectas de calibración (Anexo 4). Para lo cual se indica el C.V y s (Tabla 15). Teniendo en cuenta la pendiente de las medidas de los 7 días consecutivos.

Se considera que la técnica posee una buena sensibilidad y linealidad puesto que el coeficiente de variación es aceptable, para la técnica evaluada³⁷.

Tabla 15. Sensibilidad en C.V

%C.V	Pendientes	Desviación estándar (s)
11,6	40792	± 5230
	42714	
	49140	
	49878	
	46254	
	50036	
	36438	

4.3.3 Precisión

La precisión se define en términos simples como el grado de concordancia mutua entre los datos que se han obtenido de una misma forma. La precisión se puede establecer en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Este parámetro se evaluó bajo condiciones de repetibilidad en un corto periodo de tiempo (días consecutivos) y reproducibilidad (diferentes días, tiempo más prolongado). En condiciones de repetibilidad se analizaron 7 curvas de calibración con 7 niveles de concentración, las cuales se analizaron bajo las mismas

condiciones en el laboratorio. Los datos obtenidos se presentan en el Anexo 4. De la relación entre el área y la concentración, se determinó que hay una buena repetibilidad del método, debido a que presentó un coeficiente de variación para las curvas menor al 12%, un valor aceptable para indicar el grado de concordancia de los datos en días consecutivos; así mismo el método presentó linealidad en el rango de trabajo, con un coeficiente de correlación superior a 0.9. En la Figura 20 se presenta la gráfica donde se relaciona el área y la concentración para el análisis de repetibilidad.

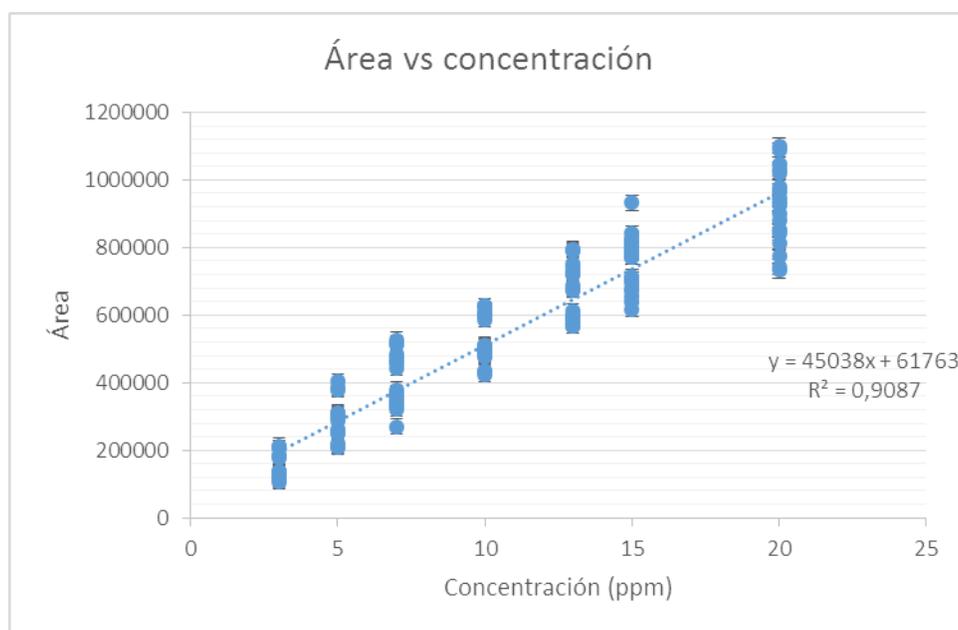


Figura 20. Gráfica curvas de calibración repetibilidad en 7 días consecutivos

Para el ensayo de reproducibilidad se analizaron 3 curvas de calibración, preparadas en un intervalo de tiempo prolongado, a los 10 días, 20 días y 30 días; una curva de calibración por día, los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 16.

Se calculó el C.V en términos de porcentaje por nivel de concentración. Bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones estadísticas para C.V:

- Hasta el 10% significa que existe una precisión buena.
- Entre el 10% y 20% precisión aceptable⁴⁴. Mayor al 20% indica que la estimación es poco precisa y por lo tanto se recomienda utilizarla con precaución.

Tabla 16. Resultados de las áreas empleadas para el análisis de reproducibilidad

Nivel de concentración ppm	Áreas		
	10 Días	20 Días	30 Días
3	135547	220035	43328
	130334	223541	43119
	122944	216226	43367
5	308566	328674	94146
	311989	324136	103477
	306915	316525	101205
7	454678	413386	127839
	474661	406884	128491
	435789	396490	130637
10	512345	464133	141335
	499987	460130	149620
	521348	469102	145195
13	698456	530300	197349
	701346	525269	191991
	704764	528175	200779
15	798967	600783	205986
	778920	578771	210061
	801613	587845	211024
20	921345	749795	257586
	911435	736683	266803
	931234	733957	270111

Los resultados para el análisis de precisión se presentan en la Tabla 17. Donde se observa que el primer nivel (3 ppm) presenta mayor variabilidad tanto en condiciones de repetibilidad como en condiciones de reproducibilidad. Los % CV para el análisis de repetibilidad en 7 días consecutivos (corto tiempo) fueron inferiores al 20%, por lo tanto se considera una precisión adecuada para la metodología, en la determinación de citral.

Sin embargo, para la reproducibilidad se observa un alto coeficiente de variación, mayores al 20% lo que implica que la relación de área con respecto a la concentración varía en largos intervalos de tiempo ya que las condiciones en el equipo pueden verse modificadas con impurezas, saturación de la columna o la posible decadencia en la eficiencia de ionización en el EM u otro tipo de condiciones de operación que puede afectar las medidas en el equipo de UCLAR-EM-TI.

Tabla 17. Precisión instrumental bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad

NIVEL	Repetibilidad		Reproducibilidad	
	DESV. EST	% C.V	DESV. EST	% C.V
N1	33523	22,9	76591	58,5
N2	55160	19,3	108509	44,5
N3	75666	18,7	152549	46,2
N4	71075	13,2	172533	46,2
N5	81711	12,2	222134	46,7
N6	79166	10,5	256881	48,4
N7	106276	11,6	293721	45,7

4.3.4 Límite de cuantificación y detección

Dentro de la realización del análisis se constituye la necesidad de diferenciar la señal más pequeña de un analito medido por el equipo, del ruido de fondo generado por el mismo, esta necesidad lleva a la determinación del Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC) para el citral.

Se estableció el límite de detección (LD) en una concentración de 0.5 ppm de citral con una relación señal/ruido de 3, donde la señal fue distinguible del ruido (Figura 21) (Anexo 5 a); para el LC se tiene en consideración un cociente S/N de 10 en el equipo. Analizando en orden decreciente la concentración de 3, 1.5, 0.75 y 0.5 ppm de citral; se determinó el límite de cuantificación en 0.75 ppm, esta es la concentración más baja a la cual el sistema de análisis de datos (Xcalibur) puede integrar el área bajo el pico. En la (Figura 22 a) se presenta el cromatograma para el LC en TIC que representa todo el rango de masa, esto se resalta debido a que solo es posible determinar el límite de cuantificación a concentraciones por debajo de 3 ppm especificando en el programa del equipo el pico base de interés (152) como se muestra en la (Figura 22 b); (ver Anexo 5 b) espectros de masas para los límites.

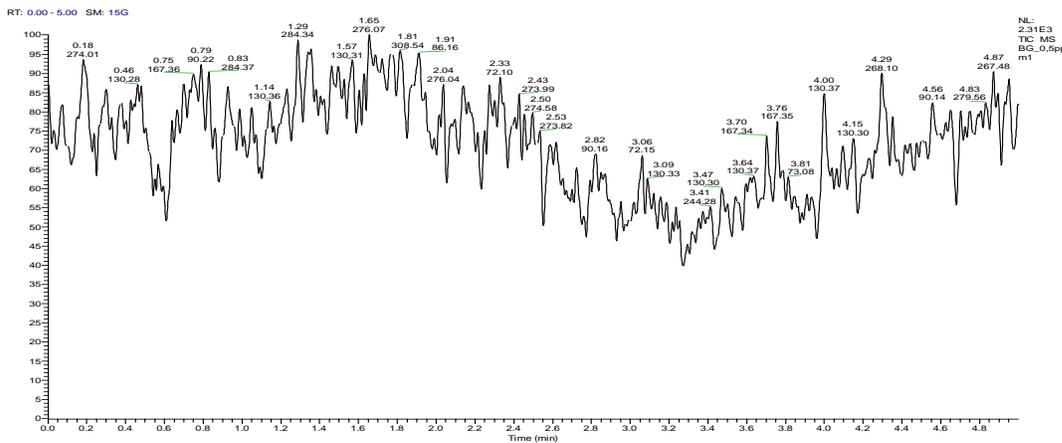


Figura 21. Perfil cromatográfico para la determinación del (LD)

Condiciones cromatografías: fase móvil (metanol + NH₄OH 0.1%), flujo 0.1 mL/min, volumen inyección 15 µL, tiempo de corrida 5 min.

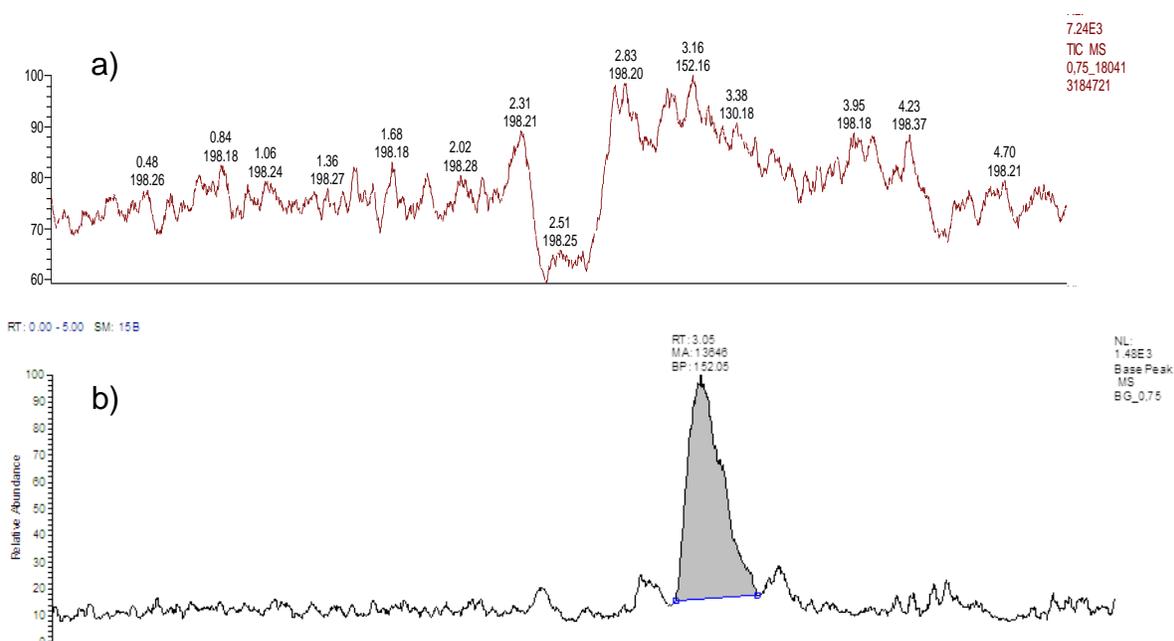


Figura 22. Perfil cromatográfico para la determinación del (LC), a) perfil cromatográfico TIC y b) perfil cromatográfico especificando pico de interés para el citral
 Condiciones cromatografías: fase móvil (metanol + NH_4OH 0.1%), flujo 0.1 mL/min, volumen inyección 15 μL , tiempo de corrida 5 min.

4.3.5 Exactitud

La determinación de la exactitud expresa la cercanía de los resultados obtenidos con respecto al valor verdadero.

Por tal razón se analizó tres estándares por triplicado de concentración de 4, 8 y 12 ppm durante tres días consecutivos, se mide la exactitud de la metodología por nivel de concentración en términos del %CV y sesgo, los resultados se presentan en la Tabla 18.

Los %C.V obtenidos son menores del 10%, demostrando buena reproducibilidad y repetibilidad; los valores de (s) por debajo del 2% indican una excelente exactitud de los resultados con respecto al valor esperado.

En este caso se puede verificar que el % de error, calculado utilizando la (Ecuación 7) con el valor (teórico y experimental para los estándares analizados), permitió evidenciar que el método de medición no tiene sesgo apreciable y que los errores se pueden considerar propios de los errores aleatorios del proceso de análisis, los datos demuestran que el error promedio es aceptable por la precisión de los resultados y concordancia con el valor verdadero.

Tabla 18. Exactitud

Día	Concentración de patrones		
	4 ppm	8 ppm	12 ppm
1	5,10	9,23	13,7
	4,24	10,1	13,4
	4,68	9,98	13,5
2	4,31	8,10	12,1
	4,32	8,17	11,3
	4,33	8,27	11,3
3	4,31	8,02	12,0
	4,35	8,13	11,4
	4,36	8,24	11,3
Número de datos	9	9	9
Desviación estándar (s)	0,277	0,848	1,04
Promedio (X)	4,44	8,69	12,2
Error	11,1%	8,68%	1,67%
%C.V	6,23%	9,75%	8,50%

De manera análoga, se determinó el sesgo, como el grado de concordancia entre los valores obtenidos y el valor esperado; se tienen los siguientes valores (Tabla 19).

Tabla 19. Análisis estadístico para evaluación de aceptación del sesgo

Concentración	Criterio	t cal	t tab
4	t _{cal} < t _{tab}	0,53	2,126
8		0,27	2,126
12		0,06	2,126

Al comparar los sesgos obtenidos a partir de los resultados experimentales, se encuentra que no existe diferencia estadística significativa entre ellos, esto es corroborado por el criterio de aceptación donde el valor de t-student calculado es menor que el t-student tabulada, de modo que los datos obtenidos en el ensayo no difieren considerablemente del valor real. De lo anterior podemos observar que los valores obtenidos para la t-student cumplen con los criterios de aceptación.

Para este parámetro también se calculó el error en la medida, teniendo en consideración que se estableció como material de control un patrón preparado por otro analista, cuyo valor esperado es 10.00 ± 0.01 . Se determinó la exactitud como porcentaje de error utilizando la Ecuación 7:

$$\% \text{ Error} = \frac{9.44\text{ppm} - 10 \pm 0.01\text{ppm}}{10 \pm 0.01\text{ppm}} \times 100 = 5.6 \pm 0.01\%$$

El valor determinado de error constituye una medida de *error aleatorio*. Sin embargo se puede observar el grado de coincidencia entre el valor obtenido de la concentración medida y el valor real preparado.

En la Tabla 20 se resumen las figuras de mérito analítico del método estandarizado.

Tabla 20. Resumen de la estandarización para el método implementado

Analito	Método	Rango de trabajo (ppm)	LD (ppm)	LC (ppm)	Linealidad R ²	Sensibilidad % C.V
Citral	Estandarización por UCLAR-EM-TI	3-20	0,50	0,75	0,920	11,6%

4.4 Extracción de citral por dispersión de matriz en fase sólida-DMFS.

La extracción por DMFS se implementó para llevar a cabo un análisis rápido del analito, ya que implica un tiempo de preparación de muestras rápido sin tener que llevar a cabo un pretratamiento.

Se llevó a cabo la evaluación de la extracción de citral a partir de diferentes muestras de interés comercial, utilizando la DMFS como técnica de extracción. Uno de los parámetros de calidad en un método de extracción es el porcentaje de recuperación o recobro.

Inicialmente se evaluó la extracción de citral a partir de una columna de DMFS - sin muestra. A continuación se describe los resultados para cada una de las etapas del estudio exploratorio que se presenta en la Tabla 4 del ítem 3.6:

Análisis sin muestras

a) Limpieza: Al realizar los lavados con agua, a la columna de DMFS dopada con el patrón de citral, no existe pérdida del analito, ya que el citral es insoluble en agua y estará retenido en la sílica-C₁₈, el espectro de masas de los lavados evidencia que no se da la elución del citral (Anexo 7 a).

b) Secado: Para el proceso se ajustó el secado al vacío del material adsorbente a 4 min, pues al no eliminar el agua de la columna de DMFS, se presenta un ensanchamiento de banda y la pérdida de resolución del pico cromatográfico.

c) Elución del analito del cartucho: De los resultados que brinda el perfil cromatográfico Anexo 6, al utilizar etanol como solvente para la extracción de citral, se da el ensanchamiento del pico cromatográfico, de ello se evidencia que al emplearse etanol como solvente de muestra y que al ser diferente al solvente de la fase móvil, se da distorsión por solventes o una posible alteración en la interacción entre el analito con la fase móvil y la fase estacionaria; por este motivo se descartar utilizar etanol. Con los cromatogramas de las fracciones 3 y 4 en metanol (Anexo 7 b y c) se observó la elución completa del analito, esto quiere decir que con 1 mL de metanol es posible llevar a cabo la extracción de citral.

En la Tabla 21 se resumen los parámetros del estudio exploratorio para la extracción de citral por DMFS-sin muestra; los parámetros de recobro obtenidos para la extracción en 3 días diferentes, se registran en la Tabla 22.

Tabla 21. Variables para extracción de citral por DMFS

Variables DMFS	
Material adsorbente	Silica-C ₁₈
Solvente de elución	Metanol
Volumen para elución	1 mL
Limpieza	1 mL agua
Tiempo se secado	4 min
Presión para secado manifold	55-60 kPa
Presión de extracción manifold	20 kPa
Tiempo de mezcla	5 min
Temperatura muestra	10 °C

Tabla 22. Porcentaje de recobro en la extracción por DMFS

Día	Áreas		
	Ensayos	Patrón 10 ppm	%Recobro (%R)
1	27534	X̄ = 10,11	94,11
	25405		86,83
	27529		94,09
2	24681	X̄ = 10,05	85,91
	28714		99,95
	28815		100,3
3	26615	X̄ = 10,91	106,0
	21580		85,91
	22430		89,29
Desviación estándar (s)	2614		7,254
Promedio (X)	25923		93,59
% C.V	10		7,750

La respuesta empleada para el análisis estadístico fue el recobro obtenido con cada tratamiento (%R). Cabe destacar que la temperatura es un factor importante para esta metodología, ya que el citral es un analito muy volátil y sensible a la temperatura, por ende se trabajó a 10 °C obteniendo un porcentaje de C.V menor al 10% para la extracción de citral valor que indica que el método es aceptable y preciso. Los valores de recobro entre 85,91 % y 106,0 %, para los tres días analizados ponen en evidencia que el método no presenta sesgo significativo debido al proceso de análisis mismo (Figura 23).

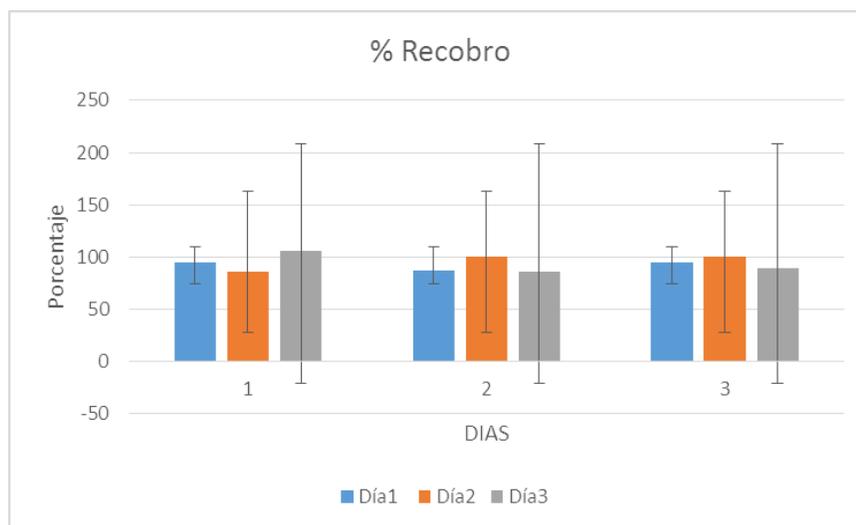


Figura 23. Porcentaje de recobro por día.

Condiciones de recobro: volumen de limpieza 1mL de agua, secado por 4min, volumen de elución 1 mL de metanol y temperatura de muestra 10 °C.

Empleando metanol y silica-C₁₈ las extracciones de citral fueron notablemente eficientes esto puede deberse a las interacciones intermoleculares entre el analito con el adsorbente. Adicionalmente se garantizó la idoneidad del método al trabajar tiempos cortos de mezcla y secado; obteniendo así recobros superiores al 80% del analito.

4.5 Aplicación de la metodología de extracción a muestras naturales y comerciales

Las muestras naturales y comerciales fueron adquiridas comercialmente, con ellas se implementó la metodología 3.7 y se realiza el procedimiento teniendo en cuenta las variables de la Tabla 21, se hizo los análisis por triplicado durante días diferentes, preparando una curva de calibración por día y los resultados obtenidos para las muestras se interpolaron en la curva de calibración correspondiente, se pasaron patrones junto a las muestras con el fin de asegurar la idoneidad del análisis y se realizó el análisis de precisión en términos del % C.V.

Las muestras utilizadas fueron jengibre, jabón y perfume; en las muestras cosméticas se verificó la presencia de este analito en su composición, y a ninguna de las muestras se le realizó pretratamiento, gran ventaja del proceso de extracción utilizado.

Cada muestra se sometió a los procedimientos de almacenamiento libre de humedad previo al análisis cromatográfico. Aplicando la metodología de DMFS se obtienen los siguientes resultados para el análisis de jengibre (Tabla 23).

Tabla 23. Resultados pruebas análisis de citral en jengibre

Tipo de muestra	Día 1 (mg/kg)	Día 2 (mg/kg)	Día 3 (mg/kg)
Jengibre	679	692	947
	571	568	742
	796	558	707
Promedios	682	606	799
s	113	74,6	129
% C.V	16,5	12,3	16,2
%citral en jengibre	0,0682%	0,0606%	0,0799%
Citral en jengibre (mg/g)	0,682	0,606	0,799

Se escogió rizomas de jengibre para el análisis, ya que es una raíz que posee diversos compuestos aromáticos y pungentes. Recientemente, el jengibre ha recibido una atención creciente, debido a sus actividades farmacológicas¹² y medicinales, pues es utilizado para disminuir la presión arterial y el dolor; muchas de esas propiedades son aportadas por la acción del citral^{11,14}.

Existen numerosos estudios para el análisis de citral en el aceite esencial de jengibre. Sin embargo, la mayoría de los estudios involucra procesos de extracción comunes que implican largos tiempos de extracción y en general la determinación del analito se realiza por CG-EM como se registra en la Tabla 1.

Con la implementación de la técnica de extracción por DMFS y cuantificación por UCLAR-EM-TI se revela que la respuesta del detector ante el analito después de la extracción para la muestra de jengibre, genera coeficientes de variación inferiores al 20% una precisión aceptable⁴⁴ y en términos de su desviación estándar son valores inferiores al 10% lo que implica que los datos no se encuentran dispersos con respecto a la media.

En 2016, Wianowska y Dawidowicz, realizaron análisis por CG-EM y la aplicación del método de DMFS para la preparación de muestras naturales como el jengibre, en ese trabajo obtuvieron 0,8 mg/g de citral en jengibre empleando líquido dispersante para la extracción; este resultado analítico es análogo a los obtenidos por el método de prueba, donde los valores de citral en jengibre están entre 0.606 y 0.799 mg/g, asimismo estos valores fueron superiores a 0.37 mg/g para la extracción sin líquido dispersante según lo reportado por los autores anteriormente mencionados. Aunque es la misma técnica de extracción cotejada, tienen variaciones en el proceso, y para la identificación y cuantificación del analito se emplearon diferentes técnicas. Además el porcentaje de citral en esta muestra natural varía debido a condiciones climáticas, geográficas, factores que están implícitos durante su crecimiento y la genética de esta especie.

En este estudio, los resultados del análisis por UCLAR-EM revelaron que la DMFS permite un aislamiento muy rápido y eficiente del analito de la matriz de la planta ya que se logró identificar de manera acertada con los picos cromatográficos y los espectros de masas al citral (Figura 24 a y b).

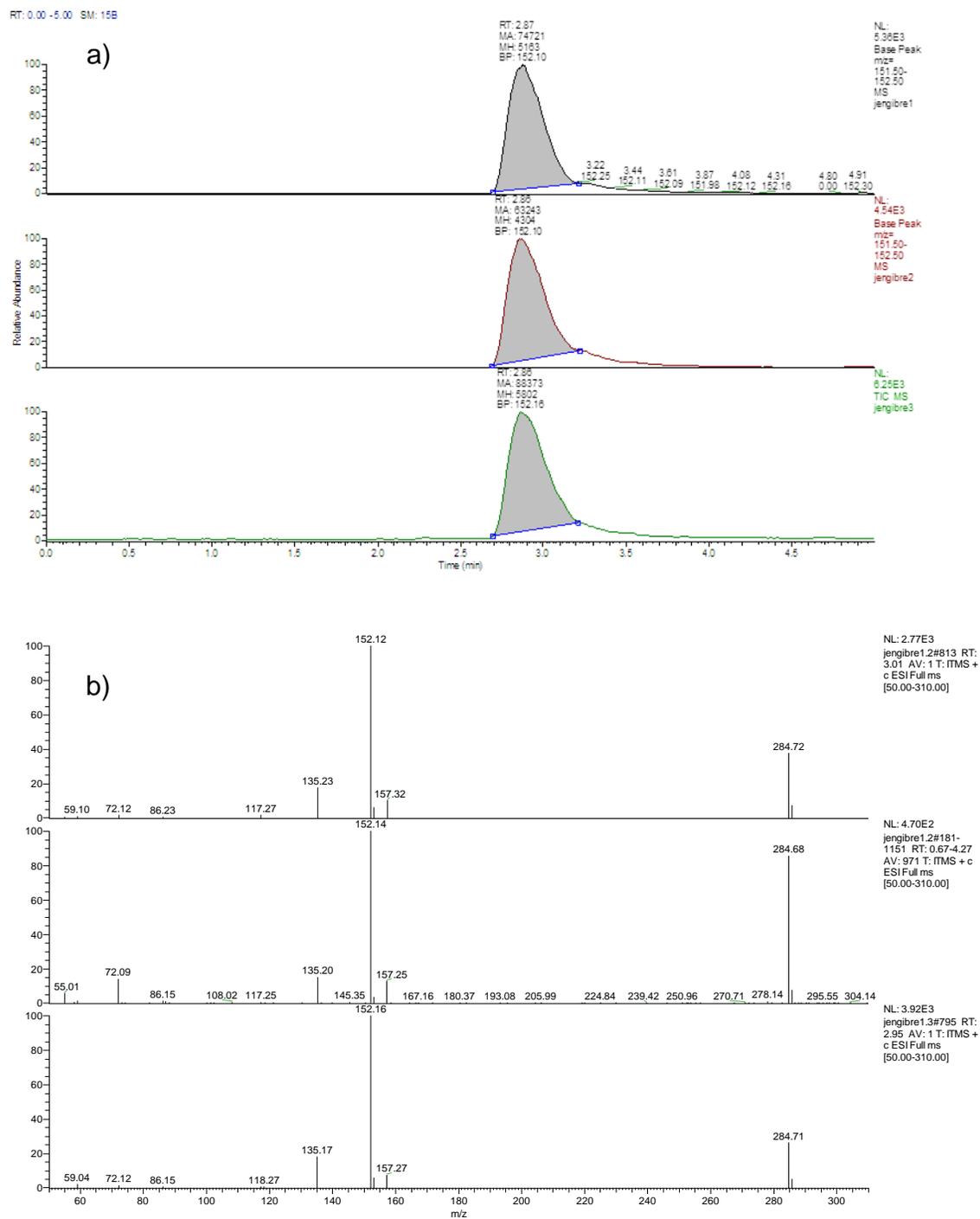


Figura 24. Análisis de citral en jengibre a) perfil cromatográfico y b) espectros de masas
 Condiciones cromatografías: fase móvil (metanol + NH₄OH 0.1%), flujo 0.1mL/min, volumen inyección 15µL, tiempo de corrida 5 min.

A continuación se muestran los datos para las muestras cosméticas (Tabla 24 y 25).

Tabla 24. Resultados pruebas análisis de citral en jabón

Tipo de muestra	Día 1 (mg/kg)	Día 2 (mg/kg)
Jabón	1806	1844
	1695	1695
	1646	1566
Promedio	1716	1701
s	82,20	139,2
%C.V	4,790	8,183
Citral (mg/kg) en jabón	1716	1701

Tabla 25. Resultados pruebas análisis de citral en perfume

Tipo de muestra	Día 1 (mg/L)	Día 2 (mg/L)
Perfume	10898	9265,2
	10740	9725,9
	11506	7123,6
Promedio	11048	8704,9
s	404,26	1388,7
%C.V	3,6592	15,953
mg/L citral en perfume	11048	8704,9

Todas las muestras comerciales objetivo de estudio como el jabón y el perfume; por lo general están sujetas a diferentes restricciones en cuanto a la composición, a su uso o requisitos de etiquetado de acuerdo con la respectiva directriz que los rige ya sea nacional o internacional. El citral es considerado un alérgeno el cual debe especificarse en la etiqueta del producto cuando la concentración excede: 0.001% (10 ppm) en productos terminados que no se enjuagan y 0.01% (100 ppm) en productos que son enjuagados²⁹. Según los resultados obtenidos la concentración de citral está entre 1701 y 1716 mg/kg en jabón, esta concentración es mayor a 100 ppm para un producto final enjuagable por lo cual está cumpliendo la especificación en las que se debe reportar en la etiqueta al exceder la concentración. Para el perfume los niveles de concentración que se determinaron son valores muy altos hasta los 11048 mg de citral/L para ser un producto que no se enjuaga, cumple con la especificación ya que se reporta en la etiqueta de la fragancia.

De los resultados se obtienen los respectivos espectros de masas y cromatogramas para el perfume (Figura 25) y el jabón (Figura 26) estos claramente permiten identificar la presencia del analito de interés en las diferentes matrices de análisis, con los perfiles cromatográficos se ve reflejada las variaciones en las medidas en cuanto a la respuesta del detector, el rigor analítico y la normalidad de los valores obtenidos, además hay que resaltar que el pico cromatográfico no presenta una pureza espectral alta, es decir hay presencia de co-eluidos que aumentan significativamente el área del pico, se manifiesta que para los procesos de extracción en el jabón la desviación estándar y el %C.V en los dos días de análisis

y se observa que es menor al 10% son datos con un comportamiento normal y precisos, para el perfume también se obtienen valores de %C.V menores al 20% implica que los datos son aceptables y adecuados. Con la implementación de la metodología de extracción y detección por UCLAR-EM-TI fue posible la determinación de citral, reportando valores seguros y fiables según las características de mérito analítico y la optimización en la extracción.

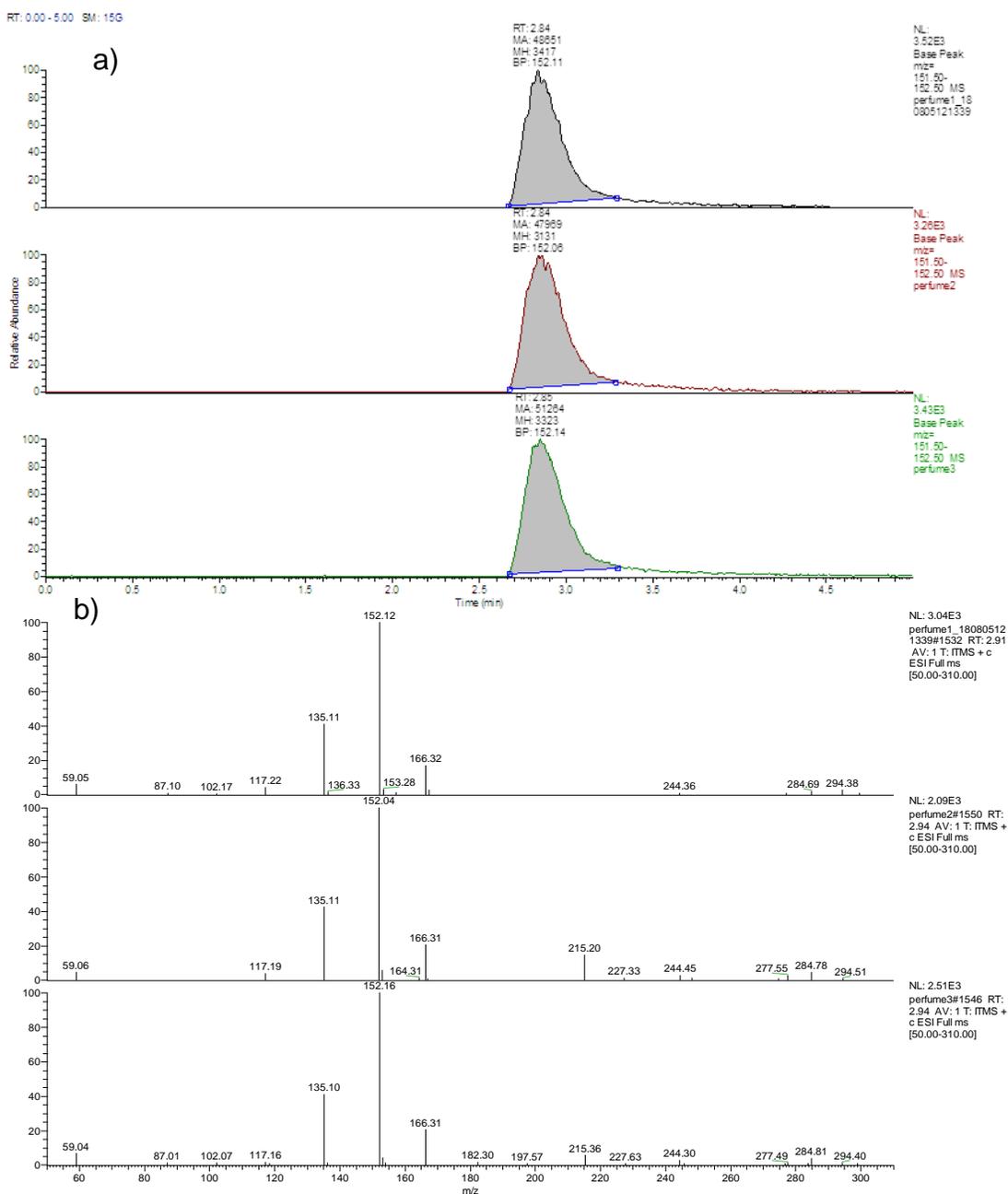


Figura 25. Análisis citral en perfume a) perfil cromatográfico y b) espectros de masas. Condiciones cromatografías: fase móvil (metanol + NH₄OH 0.1%), flujo 0.1 mL/min, volumen inyección 15 µL, tiempo de corrida 5 min.

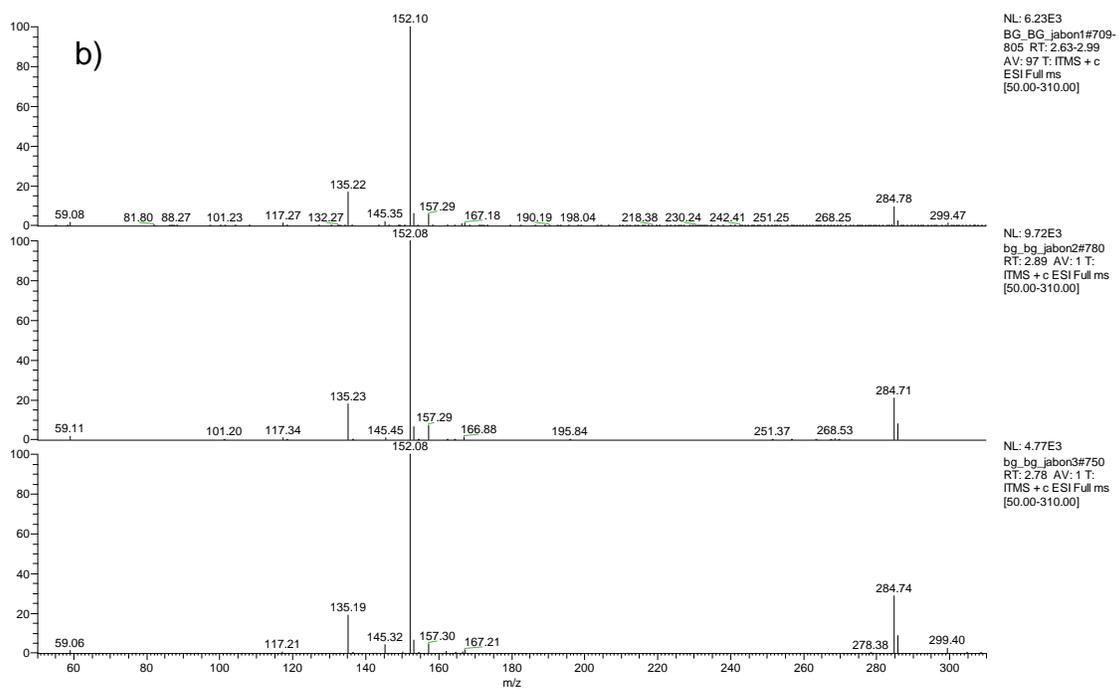
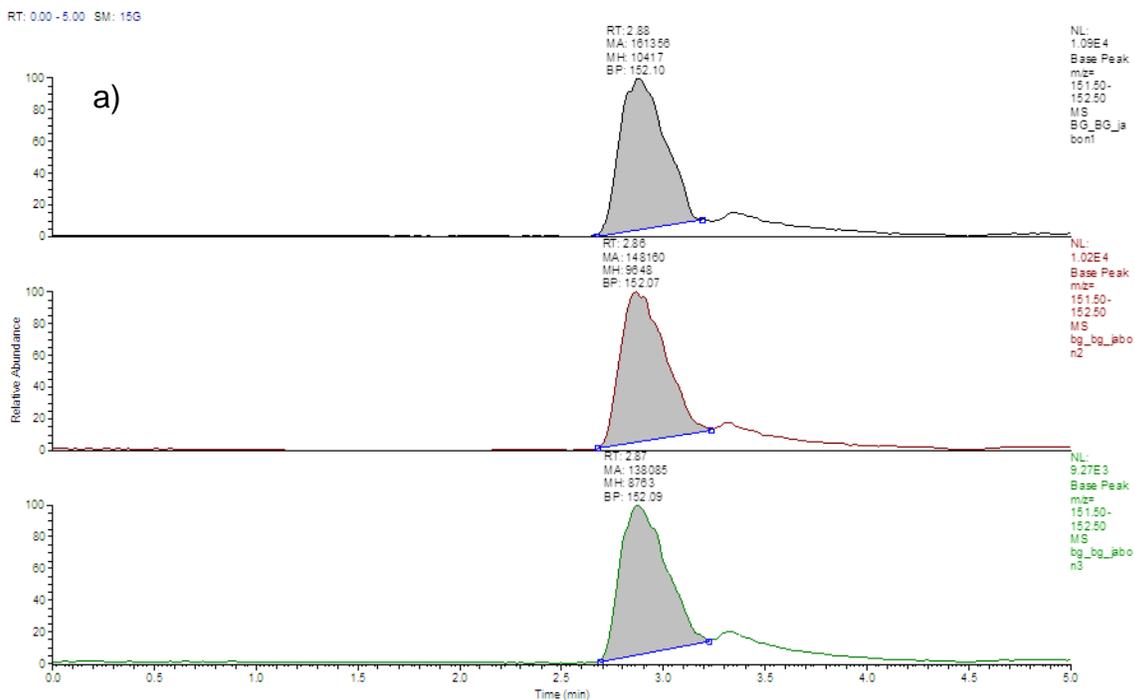


Figura 26. Análisis citral en jabón a) perfil cromatográfico y b) espectros de masas
 Condiciones cromatográficas: fase móvil (metanol + NH₄OH 0.1%), flujo 0.1mL/min, volumen inyección 15µL, tiempo de corrida 5min.

4.6 Estimación de la incertidumbre en la determinación de citral

Identificación de las fuentes de Incertidumbre

Tabla 26. Fuentes de incertidumbre de la medición

PROCESO	FACTOR	FUENTES INDIVIDUALES
Preparación de la solución patrón	Pureza del citral Volumen preparado de solución	Certificado del reactivo Tolerancia del material volumétrico
Incertidumbre del resultado	Alícuota de solución.	Calibración de las pipetas
Cálculos	Resultado final	Redondeo de cifras

Cuantificación Individual de las Fuentes de Incertidumbre

1. Aportes de la medición de volumen: La incertidumbre aportada por la medición de volúmenes mediante instrumentos volumétricos (balones aforados).

Tabla 27. Relación de material volumétrico e incertidumbre.

Instrumento	Micropipeta de 25-250µL	Micropipeta de 5-50 µL	Balón Aforado de 25 mL	Balón Aforado de 10 mL
Fuentes individuales de incertidumbre→	Tolerancia del instrumento	Tolerancia del instrumento	Tolerancia del instrumento	Tolerancia del instrumento
Símbolo	V_{T1}	V_{T2}	V_{T3}	V_{T4}
Origen de la información	Tolerancia marcada en el instrumento			
Ejemplo de valor original	10 ± 0,5 µL	10 ± 0,2 µL	25 ± 0,04 mL	10 ± 0,025 mL
Valor del semiintervalo, a_i	$a_{T1} = \pm 0,5 \mu\text{L}$	$a_{T2} = \pm 0,2 \mu\text{L}$	$a_{T3} = \pm 0,04 \text{ mL}$	$a_{T4} = \pm 0,025 \text{ mL}$
Tipo de distribución que se aplica	Triangular	Triangular	Triangular	Triangular
Cálculo para estandarizar el aporte	$u(V_{T1}) = \frac{0,5 \mu\text{L}}{\sqrt{6}}$	$u(V_{T2}) = \frac{0,2 \mu\text{L}}{\sqrt{6}}$	$u(V_{T3}) = \frac{0,04 \text{ mL}}{\sqrt{6}}$	$u(V_{T4}) = \frac{0,025 \text{ mL}}{\sqrt{6}}$
Incertidumbre estándar del aporte, $u(V_i)$	$u(V_{T1}) = 0,2 \mu\text{L}$	$u(V_{T2}) = 0,08 \mu\text{L}$	$u(V_{T3}) = 0,016 \text{ mL}$	$u(V_{T4}) = 0,010 \text{ mL}$
Incertidumbre estándar combinada, $u(V)$	$u(V_{T1}) = 0,2 \mu\text{L}$	$u(V_{T2}) = 0,08 \mu\text{L}$	$u(V_{T3}) = 0,016 \text{ mL}$	$u(V_{T4}) = 0,010 \text{ mL}$
Incertidumbre estándar relativa, $u(V)/V$	0,00088	0,0017	0,00064	0,001
Incertidumbre estándar combinada $u(V)$				
$u(V) = \sqrt{u(V_1)^2 + u(V_2)^2 + u(V_3)^2 + u(V_4)^2} = 0.00225$				

2. Aportes de la sustancia patrón

La incertidumbre aportada por la sustancia patrón trazable, en este caso se trata de la pureza de un reactivo patrón sólido:

Tabla 28. *Relación de patrón e incertidumbre*

Fuentes individuales de incertidumbre→	Pureza del reactivo patrón
Símbolo	P_p
Origen de la información	Certificado del reactivo
Ejemplo de valor original	Pureza = $95 \pm 0,1 \%$ Esta pureza se expresa como fracción de la unidad, dividiendo ambos valores por 100
Valor del semiintervalo, a	$a_p = \pm 0,001$
Tipo de distribución que se aplica	Rectangular
Cálculo para estandarizar el aporte	$u(P_p) = \frac{a_p}{\sqrt{3}}$
Incertidumbre estándar del aporte, $u(x)_i$	$u(P_p) = 0,00548$
Incertidumbre estándar combinada, $u(P)$	Como la pureza del reactivo tiene un único aporte, la incertidumbre combinada es igual a la incertidumbre estándar: $u(P) = 0,00548$
Incertidumbre estándar relativa, $u(P_p)/P_p$	La incertidumbre estándar combinada, $u(P_p)$, se divide por el valor de la pureza para obtener la incertidumbre estándar relativa, $u(P_p)/P_p$: $\frac{u(P_p)}{P_p} = \frac{0,00548 \text{ g}}{0,95\text{g}} = 0,00576$

Cuantificación de los aportes individuales a la incertidumbre del resultado

Se refiere a la desviación estándar de los ensayos obtenidos con los patrones de control, que se divide por \sqrt{n} , donde n equivale al número de datos analizados (9). En este caso se consideran los datos de desviación estándar más alta producida por las muestras analizadas.

Tabla 29. *Relación de datos analíticos de los patrones e incertidumbre*

Fuentes individuales de incertidumbre→	Reproducibilidad de los Ensayos
Símbolo	S_R
Origen de la información	Ensayos de Verificación del Método
Ejemplo de valor original	$S_R = 1,04$

Tipo de distribución que se aplica	Normal
Cálculo para estandarizar el aporte	$u(S_R) = \frac{S_R}{\sqrt{n}}$
Incertidumbre estándar del aporte, $u(x)_i$	$u(S_R) = \frac{1,04}{\sqrt{9}}$ $u(S_R) = 0,35$
Incertidumbre estándar combinada, $u(S_R)$	Como se tiene un único aporte, la incertidumbre combinada es igual a la incertidumbre estándar: $u(S_R) = 0,35$
Incertidumbre estándar relativa, $u(S_R)/S_R$	La incertidumbre estándar combinada, $u(S_R)$, se divide por el valor de la concentración del patrón para obtener la incertidumbre estándar relativa, $u(S_R)/S_R$: $\frac{u(S_R)}{S_R} = \frac{0,35 \text{ ppm}}{12 \text{ ppm}} = 0,0291$

1.1. Cálculo de la Incertidumbre Combinada y Expandida

La relación general entre la incertidumbre estándar combinada de un valor y la incertidumbre de los parámetros independientes de los cuales depende es llamada la ley de propagación de incertidumbre:

Las contribuciones de cada una de las variables a la incertidumbre del resultado se calculan como el cuadrado de cada incertidumbre multiplicada por el cuadrado del respectivo coeficiente de sensibilidad:

$$U_C = \sqrt{(U_1)^2 + \dots (U_n)^2}$$

$$U_C = 0,0297$$

$$\text{Incertidumbre Expandida} = 0,0297 \times 2 = 0,0595$$

1.2. Reporte de la Incertidumbre de los Resultados

Cuando se incluya la incertidumbre en un informe, el resultado se reporta como:

[citral] $\pm U_C$ ppm; la incertidumbre expandida se calculó con un factor de cobertura de 2, que equivale a un nivel de confianza de aproximadamente 95 %".

5. CONCLUSIONES

1. Se implementó y estandarizó la metodología planteada para la determinación de citral en muestras naturales y comerciales mediante la técnica analítica de ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.
2. El método por UCLAR-EM-TI para la determinación de citral queda debidamente implementado en el laboratorio de análisis industriales de la Universidad del Cauca siendo un método sensible, lineal y preciso en un intervalo de tiempo transitorio.
3. La DMFS demostró ser una metodología versátil y sencilla que permitió extraer citral en muestras naturales y comerciales; sin tener que realizar un pretratamiento de las muestras y proporcionando porcentajes de recobro apropiados para la extracción, esto sin la necesidad de instrumentación costosa o altos consumos de solventes.
4. Las mejores condiciones de extracción encontradas que permitieron la extracción de citral se establecieron con a) sílice-C18 como adsorbente en una relación 1:4 muestra/adsorbente, 1 mL de metanol como solvente de elución. Debido al costo de los reactivos y el tiempo que requieren para la extracción, se recomienda emplear este método.
5. Los resultados del %C.V en las muestras están entre los rangos permitidos estadísticamente (<20%), afirmando que la técnica es adecuada para la determinación de citral en este tipo de matrices (muestras naturales y comerciales).

6. RECOMENDACIONES

- Optimizar la extracción de citral en muestras complejas con alto contenido de lípidos mediante la técnica de DMFS. Por ejemplo con el uso de co-columnas tipo florisil, alumina; que contribuyeran a mejorar la limpieza del extracto.
- Para profundizar en la versatilidad y eficiencia de la técnica de extracción por DMFS es importante realizar un estudio más extenso del efecto de matrices grasas y viscosas sobre la extracción del citral.
- Emplear la espectrometría de masas en el modo MS^n con el fin de separar mediante eventos diferentes la señal proveniente del cromatógrafo líquido, y de esta forma se podrá identificar si se desea los dos isómeros por separado.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges, M., Elfeki, A., & Talarmin, H. (2017). Biological properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87653-660. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.104
- ² Thomas, M. L., de Antueno, R., Coyle, K. M., Sultan, M., Cruickshank, B. M., Giacomantonio, M. A., &... Marcato, P. (2016). Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. *Molecular Oncology*, 10(9), 1485-1496. doi:10.1016/j.molonc.2016.08.00
- ³ Doria Serrano, Ma. del Carmen. (2009). Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. *Educación química*, 20(4), 412-420. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.Php?script=sci_art_ext&p_id=S0187-893X2009000400004&lng=es&tlng=es
- ⁴ Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2008). *Principios De Análisis Instrumental*. 6ª Edición. Mexico, D.F: Editorial Cengage Learning
- ⁵ Garcia, A., Yusá, D. (2016). *HPLC instrumental*. València: Editorial Universitat politècnica, 5-13
- ⁶ Conceptos fundamentales de cromatografía. (2017). Recuperado de: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf
- ⁷ Espectrometría de masas. (2014). Recuperado de: http://www.Mncnscic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
- ⁸ Khorassani, R., Bojnourd, B. (2008). Identification by HPLC-MS of new detected compounds in sugar beet root exudates for soil P mobilization. Georg August, Germany: Editorial University Gottingen. 19-23
- ⁹ Trujillo Lacasa, C. (2016). Análisis de la migración de ESBO del envase al alimento. Universidad de Zaragoza. Facultad de veterinaria. 16
- ¹⁰ Tirado, C., Stashenko, E., Combariza, M., Martínez, J. (1995). Comparative study of Colombian citrus oils by high-resolution gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 697, 501-513. doi:10.1016/0021-9673(94)00955-9
- ¹¹ Lu, W., Huang, D., Wang, C. R., Yeh, C., Tsai, J., Huang, Y., & Li, P. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal Of Food And Drug Analysis*, 26(1), 82-89. doi:10.1016/j.jfda.2016.12.018
- ¹² Stolle A., Gallert T., Schmögera C., & Ondruschka B. (2013). Hydrogenation of citral: a wide-spread model reaction for selective reduction of α,β -unsaturated aldehydes. *RSC Advances*, 3, 11533. doi: 10.1039 / c3ra41966
- ¹³ Noda, C., Alt, G. P., Werneck, R. M., Henriques, C. A., & Monteiro, J. L. F. (1998). Aldol Condensation of Citral with Acetone on Basic Solid Catalysts. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 15(2) doi:10.1590/S0104-66321998000200004
- ¹⁴ Chien-C, L., Hsiang-Fu, Y., Chun-Hua C., Yun-Ta, L., Hsien-Tsung, Y. (2017). Effects of lemongrass oil and citral on hepatic drug-metabolizing enzymes, oxidative stress, and acetaminophen toxicity in rats. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 432-438. doi:10.1016/j.jfda.2017.01.008

- ¹⁵ Rauber, C. S., Guterres, S. S., & Schapoval, E. S. (2005). LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis*, 37(3), 597-601
- ¹⁶ Angulo, A., Montañez, C., Sancedo, A. (2012). Aceites esenciales y plantas. Convenio derivado N°2 del convenio marco N° 202 entre el SENA y la fundación de agricultores solidarios- España Bogotá- Colombia. Recuperado de: http://repositorio.sena.edu.co/sitios/aceites_esenciales_plantas/#
- ¹⁷Yarovaya, O., Salomatina, O., Korchagina, D., Polovinka, M., Barhash, V. (2012). Citral Epoxide Acid-Catalyzed Reactions, Chemistry and computational simulation. *Butlerov communications*, 2, 51-56
- ¹⁸ Thomas, M. L., de Antueno, R., Coyle, K. M., Sultan, M., Cruickshank, B. M., Giacomantonio, M. A., &... Marcato, P. (2016). Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. *Molecular Oncology*, 10(9), 1485-1496. doi:10.1016/j.molonc.2016.08.004
- ¹⁹Chemical book, Ciral. Recuperado de: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8364074.htm
- ²⁰Comunidad Andina. Decisión 516. Recuperado de: www.sice.oas.org/trade/JUNAC/decisiones/DEC516s.asp
- ²¹The science & safety behind your favorite products. (2016). Recupérate de: <http://www.cosmeticsinfo.org/ingredient/citral-0>
- ²² Rauber, C., Guterres, S., Schapoval, S. (2005). Determinación LC de citral en aceite volátil *Cymbopogon citratus*. *Análisis Farmacéutico y Biomédico*, 37, 597-601
- ²³ Mangprayool, T., Kupittayanant, S., Chudapongse N. (2013). Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action *Fitoterapia*, 89, 68-73. doi:10.1016/j.fitote.2013.05.012
- ²⁴ Taweechaisupapong, S., Aieamsaard, J., Chitropas, P., & Khunkitti, W. (2012). Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *South African Journal Of Botany*, 8195-102. doi:10.1016/j.sajb.2012.06.003
- ²⁵ Teles, S., Pereira, J. A., Santos, C. H., Menezes, R. V., Malheiro, R., Lucchese, A. M., & Silva, F. (2012). Geographical origin and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown. *Industrial Crops & Products*, 37(1), 247-252. doi:10.1016/j.indcrop.2011.12.029
- ²⁶ Gabr S., Alghadir A., Ghoniem, G. (2017). Biological activities of ginger against cadmium-induced renal toxicity. *Saudi Journal of Biological Sciences*. doi:10.1016/j.sjbs.2017.08.008
- ²⁷ Brum, A. et al., Effect of dietary essential oils of clove basil and ginger on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following challenge with *Streptococcus agalactiae*. *Aquaculture*, 468(1), 235-243. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.10.020
- ²⁸ Singh, G., Kapoor, I., Singh, P., de Heluani, C., de Lampasona, M. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (10), 3295-3302. doi:10.1016/j.fct.2008.07.017
- ²⁹ Sanchez, L., Lamas, J., Alvarez, G., Lores, M., Garcia, C., & Llompert, M. (2012). Determination of suspected fragrance allergens in cosmetics by matrix solid-phase dispersion gas chromatography–mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5055-5062. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.013

- ³⁰ Celeiro, M., Guerra, E., Lamas, J., Lores, M., Garcia, C., & Llompart, M. (2014). Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products. *Journal of Chromatography A*, 1344, 1-14. doi:10.1016/j.chroma.2014.03.0
- ³¹ Barker, S. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2), 151-162
- ³² Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Foglia, P., Samperi, R., Stampachiacchiere, S., Ventura, S., & Laganà, A. (2015). Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion. *Trends In Analytical Chemistry: TRAC*, 71186-193. doi:10.1016/j.trac.2015.03.012
- ³³ Chable, A. (2012). Desarrollo de un método de extracción por MSPD en arroz fermentado con *Monascus purpureus* y fortificado con lovastatina. [Tesis pregrado], Universidad Autónoma de Yucatán, México
- ³⁴ Celeiro, M., Guerra, E., Lamas, JP., Lores, M., Garcia-Jares, C., Llompart, M. (2104). Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products. *Journal of Chromatography A*, 344, 1-14. doi:10.1016/j.chroma. 2014.03. 070
- ³⁵ Wianowska, D., & Dawidowicz, A. L. (2016). Can matrix solid phase dispersion (MSPD) be more simplified? Application of solventless MSPD sample preparation method for GC-MS and GC-FID analysis of plant essential oil components. *Talanta*, 151179-182. doi:10.1016/j.talanta.2016.01.019
- ³⁶ Miller, J., Miller, J. (2002). *Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica*. 4ª Edición. España: Editorial Prentice Hall
- ³⁷ Duffau, B. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos*. Santiago de Chile: Departamento de salud ambiental. Instituto de Salud Pública
- ³⁸ Coy, G. (2006). *Protocolo estandarización de métodos analíticos*. Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM
- ³⁹ Osorno, C. (2015). Estandarización y evaluación de un método para la determinación de micotoxinas por medio de la tecnica fotometrica (kit elisa) a materias primas de avicultura en la industria de alimentos para animales cipa s.a. Tesis pregrado. Universidad tecnológica de Pereira, Colombia
- ⁴⁰ Guía para la expresión de incertidumbre de medida. (2008). Evaluación de datos de medición. Centro español de metrología
- ⁴¹ Baez, M. (2009). Validación de métodos de ensayo para el análisis de parámetros físico-químicos en aguas limpias y residuales en el laboratorio de medio ambiente. [Tesis pregrado], Escuela politécnica del ejército. Ecuador
- ⁴² Zuluaga, C., Díaz, C., Quicazán, M. (2018). *Estandarización y validación del método de análisis del perfil aromático por nariz electrónica aromático por nariz electrónico*, 31. Recuperado de: <http://bdigital.unal.edu.co/25954/1/23466-82718-1-PB.pdf>
- ⁴³ Quattrocchi, O., Andrizzi, S., Laba, R. (1992). *Introducción a la HPLC*. Aplicación y práctica. Capítulo 10 análisis cuantitativo. Buenos Aires, Argentina
- ⁴⁴ Coeficientes de variación e intervalos de confianza. (2005). Recuperado de: http://www.Coeficientes_de_variacion_EHPM_2005.pdf

ANEXOS

Anexo 1.

Cálculo de la incertidumbre teniendo en cuenta las fuentes globales de incertidumbre

Se calcula con base en los resultados de evaluaciones de repetibilidad, reproducibilidad y exactitud, de la siguiente forma:

Se calcula inicialmente el promedio de los resultados obtenidos a concentraciones bajas de analito, y altas concentraciones mediante la Ecuación 1.

$$X_{prom} = \frac{\sum X_i}{n} \quad \text{Ecuación 1}$$

Se calcula la desviación de los resultados obtenidos aplicando Ecuación 2.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Posteriormente se calcula la desviación estándar relativa de cada grupo de datos Ecuación 3.

$$RSD = \frac{s}{X_{prom}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Finalmente mediante Ecuación 4 se calcula la Desviación Estándar Relativa del total de datos (RSD_t)

$$RSD_t = \sqrt{\frac{\left(\left(\left(\frac{s_1}{x_{p1}} \right)^2 X(n-1) \right) + \left(\left(\frac{s_2}{x_{p2}} \right)^2 X(n-1) \right) \right)}{(n-1)_1 + (n-1)_2}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Y adicionalmente se calcula la recuperación en función de porcentajes (%R) de los patrones con base en la Ecuación 5.

$$\%R = \frac{\text{Concentración Experimental Obtenida}}{\text{Concentración Real Preparada}} * 100 \quad \text{Ecuación 5}$$

Se calcula el promedio de los porcentajes de recuperación con Ecuación 6.

$$\bar{R}_p = \frac{\sum \%R_i}{n} \quad \text{Ecuación 6}$$

La desviación estándar de los recuperados (SR_p) con Ecuación 7.

$$SRp = \sqrt{\frac{\sum(R_i - R_{prom})^2}{(n-1)}} \quad \text{Ecuación 7}$$

También se debe calcular la incertidumbre en la recuperación promedio, mediante la Ecuación 8:

$$U_{SRp} = \frac{SRp}{\sqrt{n}} \quad \text{Ecuación 8}$$

Se evalúa si el factor de recobro es significativamente diferente de 1 para un nivel de significancia (α) del 5% y un nivel de confianza del 95%, para $(n-1)$ grados de libertad (gl). Para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre el valor obtenido de recuperación y 1.

Se establece la hipótesis nula (H_0). El factor de recobro es significativamente diferente de 1.

Se calcula el t experimental (t_{exp}) y se compara con el t crítico (t_{crit}).

Si $t_{exp} > t_{crit}$ se rechaza la H_0 .

Si $t_{exp} < t_{crit}$ se acepta la H_0 .

$$t_{exp} = \frac{|R - 1| * \sqrt{n}}{s}$$

Donde t_{exp} es el t experimental; R es el factor de recobro experimental; s es la desviación estándar y n es el número de datos.

La incertidumbre se calcula mediante las Ecuaciones 9, 10 y 11.
Incertidumbre Combinada Total (U_{Ctotal}).

$$U_{Ctotal} = \sqrt{\left(\left(\frac{U_{Rp}}{Rp}\right)^2 + RSDt^2\right)} \quad \text{Ecuación 9}$$

Incertidumbre Expandida del Método (U_{expmet}) (\pm)

$$U_{expmet} = 2 * U_{Ctotal} \quad \text{Ecuación 10}$$

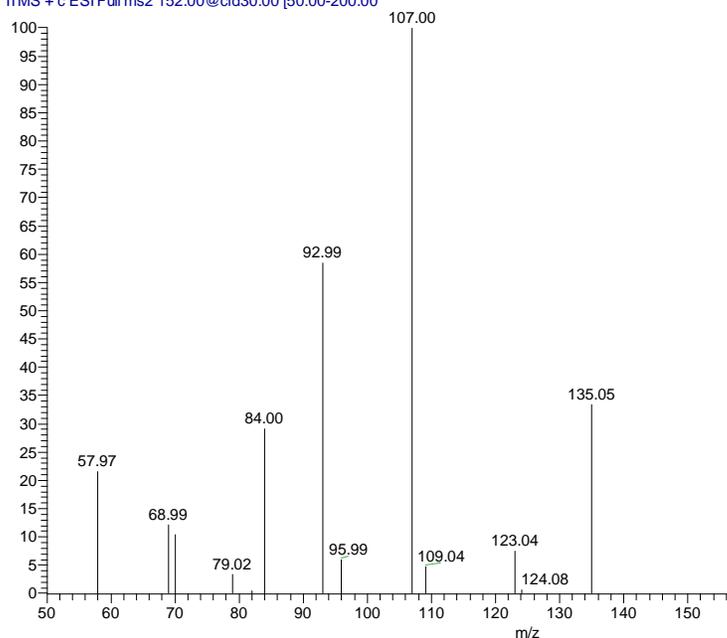
La incertidumbre expandida en la medición $U(\pm)$ se expresa:

$$U = \mp C * U_{expmet} \quad \text{Ecuación 11}$$

Anexo 2.

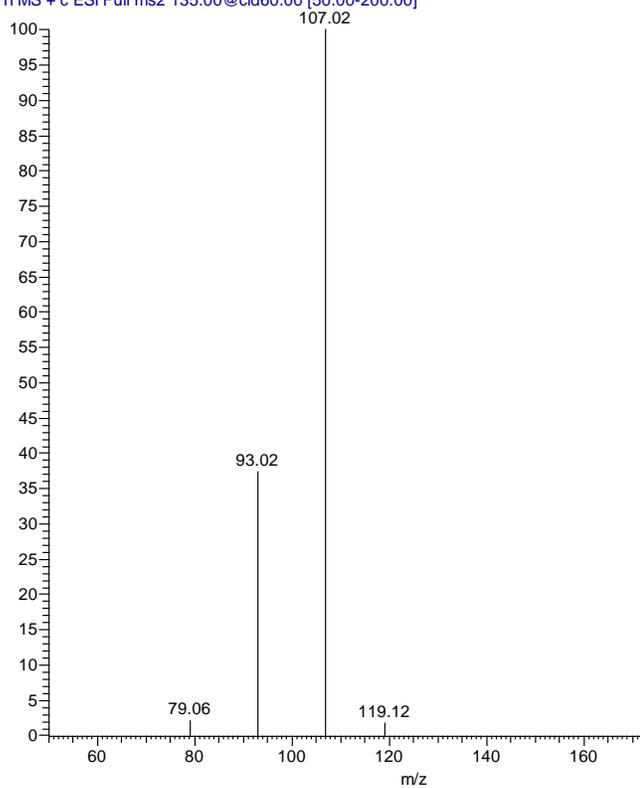
Espectros de masas ms^n de citral + NH_4OH 0.1% ms^2 de 152

citral20ppmNH4OH0_170907164734 #2-25 RT: 0.01-0.29 AV: 24 NL: 4.18E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 152.00@cid30.00 [50.00-200.00]



ms^2 de 135

citralacnh4_170901163827 #2-25 RT: 0.01-0.31 AV: 24 NL: 3.17E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 135.00@cid60.00 [50.00-200.00]

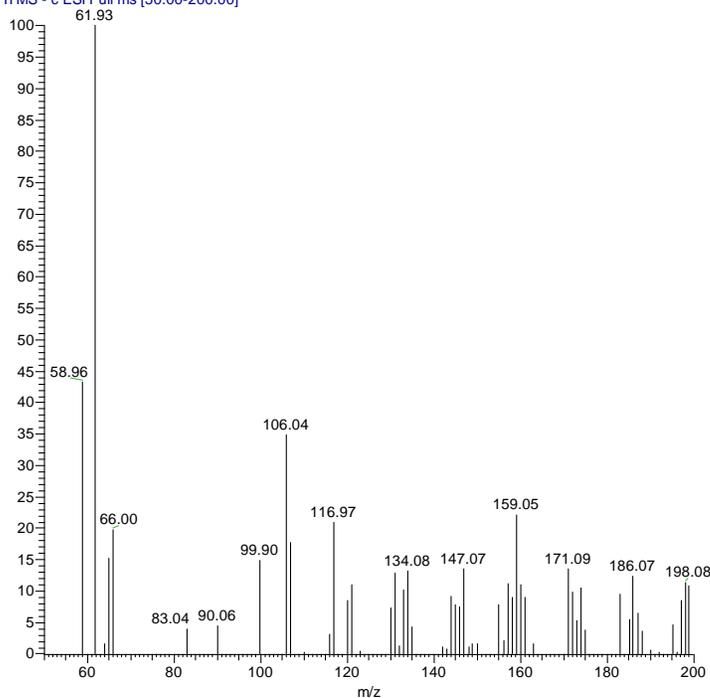


Anexo 3.

Espectros de masas para los diferentes agentes ionizantes al 0.1% utilizados.

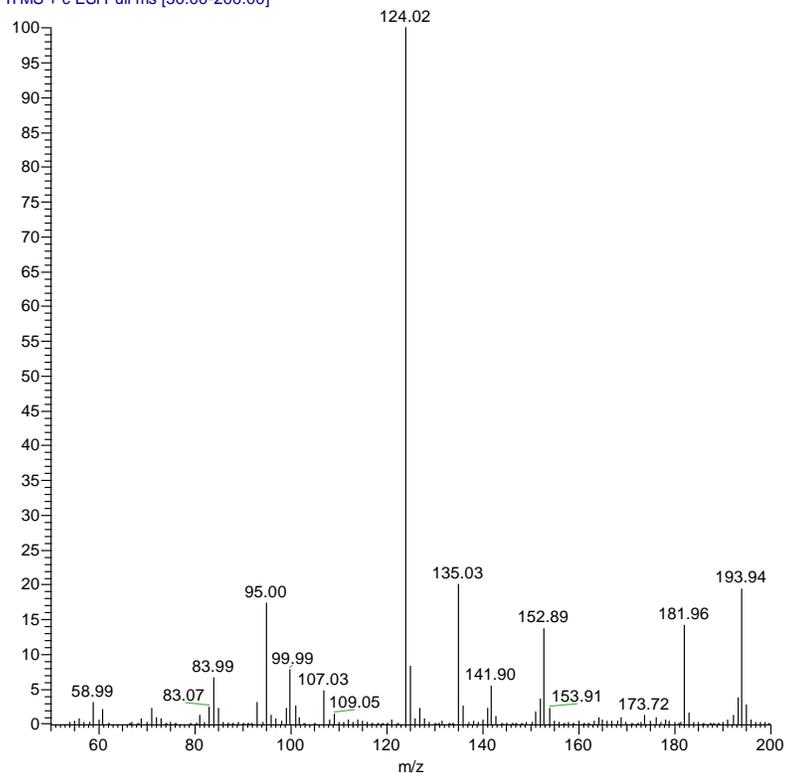
a) Espectro de masas citral + agente ionizante ácido fórmico

citral 20ppm_170901174155 #1-33 RT: 0.00-0.31 AV: 33 NL: 1.27E1
T: ITMS - c ESI Full ms [50.00-200.00]



b) Espectro de masas citral + agente ionizante ácido acético

20ppm citral ACN ac0_170904143736 #6-161 RT: 0.01-0.29 AV: 156 NL: 1.64E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-200.00]



Anexo 4.

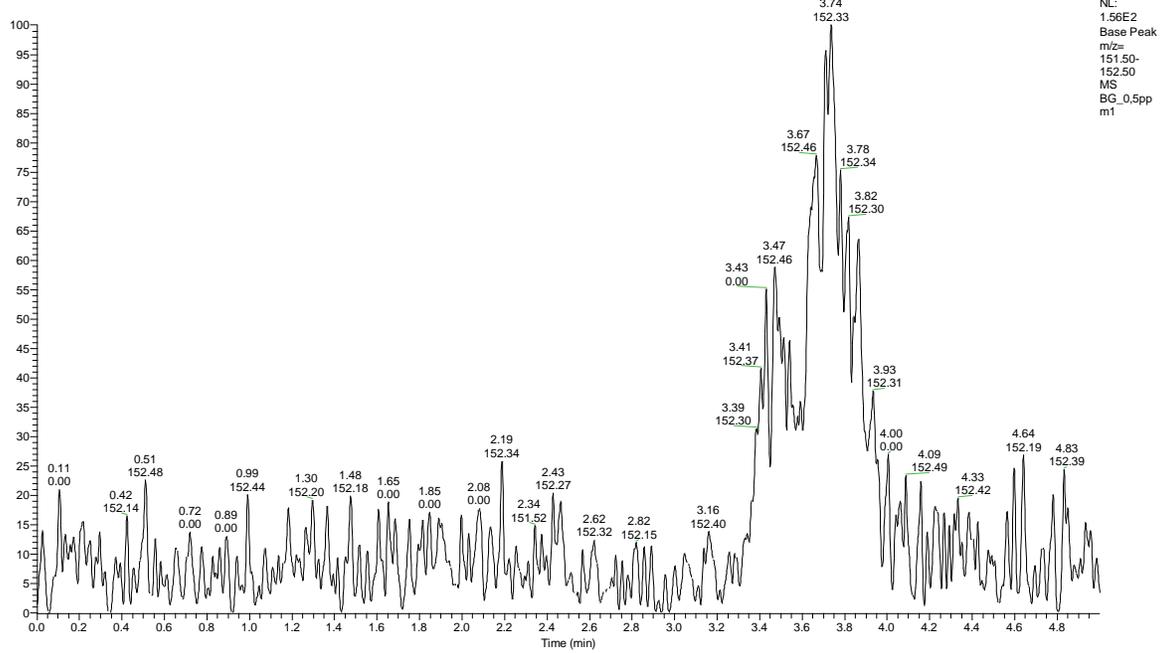
Tabla 1. Niveles de concentración vs áreas días curvas de calibración

DÍA	ESTANDARES						
	3ppm	5ppm	7ppm	10ppm	13ppm	15ppm	20ppm
Día 1	135547	253663	354774	479395	589310	671938	849888
	130334	255361	370914	477377	575587	677266	812670
	121745	257943	379407	498655	593765	695124	844408
Día 2	206970	308566	460989	602874	720657	773486	930885
	206789	311989	462927	604601	722049	771476	927240
	213555	306915	460613	607932	723096	772907	931094
Día 3	135542	299941	361913	505739	688469	782285	980447
	134335	287473	360158	509588	678313	791989	965948
	130472	299651	364414	511966	672248	798766	966248
Día 4	134338	300324	442097	598980	752788	822270	942914
	127032	302496	474661	585276	727446	814804	1031349
	127988	300908	484775	601040	741063	824935	1022168
Día 5	106199	207506	270313	431856	596491	706079	898613
	110453	211755	323089	423459	597564	712913	849871
	113729	212531	330312	436139	612287	707764	881254
Día 6	178910	403021	526783	628449	790148	931663	1087847
	184160	384732	515532	625778	795410	842463	1101373
	180506	379585	514987	626777	793233	810249	1046416
Día 7	131196	248912	336061	494967	567343	639605	773678
	128904	262201	346104	486115	578768	616656	742448
	134951	221426	336311	596070	568010	654186	732058

Anexo 5.

a) Cromatograma del límite de detección del citral, pico base de 152.

RT: 0.00 - 5.00 SM: 15G

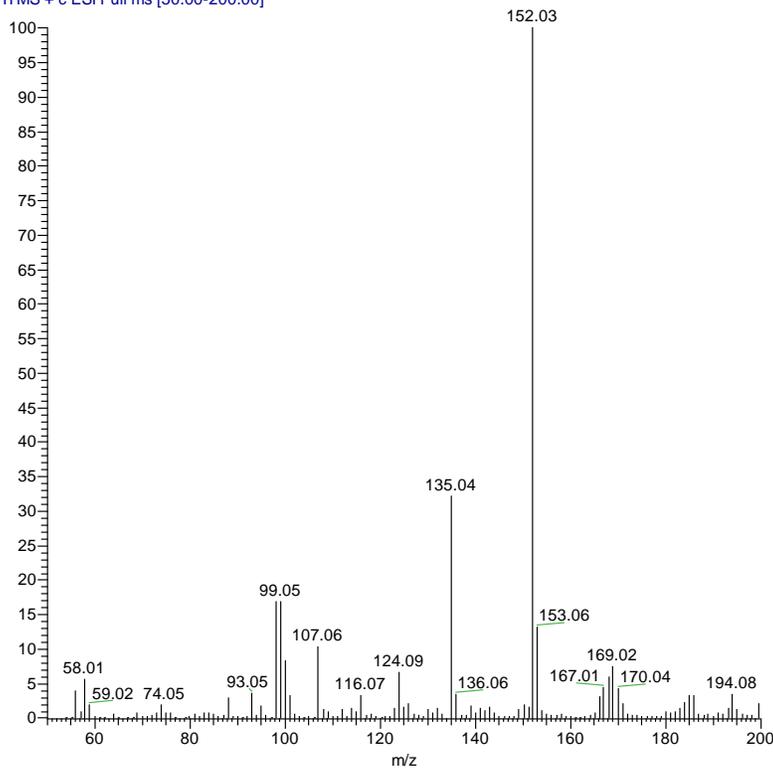


NL:
1.56E2
Base Peak
m/z:
151.50-
152.50
MS
BG_0.5pp
m1

b) Espectros de masas, límites de cuantificación y detección.

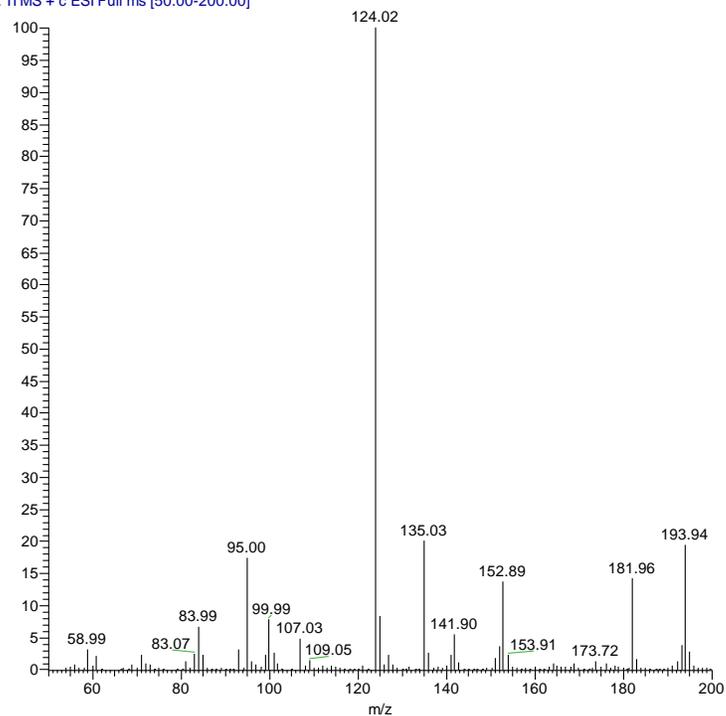
Espectro masas para (LC)

T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-200.00]



Espectro masas para (LD)

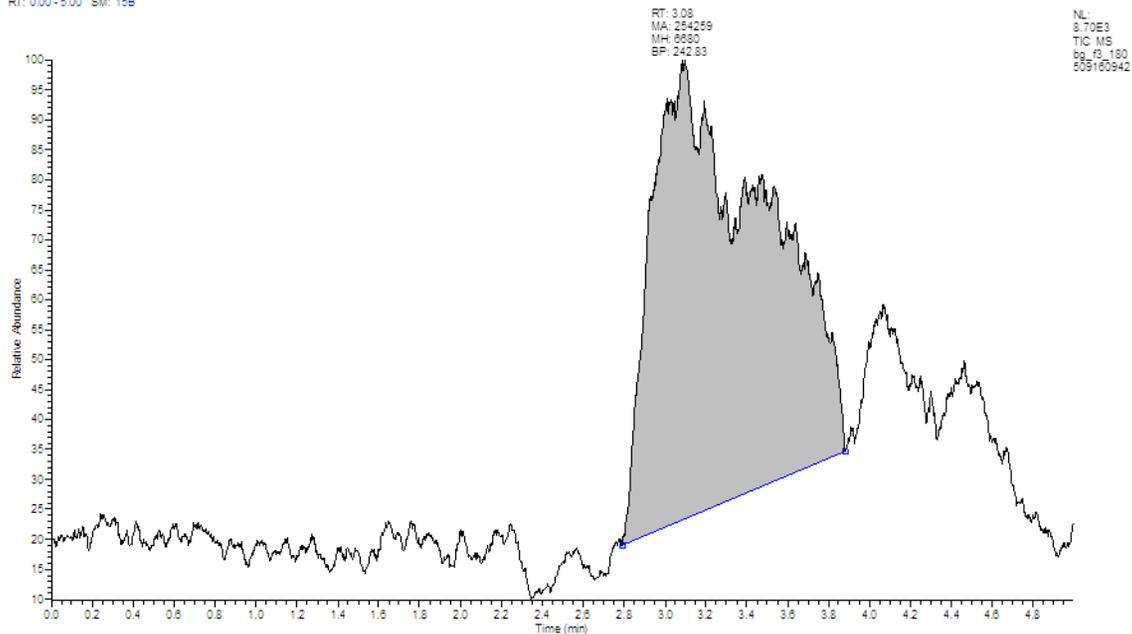
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-200.00]



Anexo 6.

Perfil cromatográfico al utilizar etanol como solvente de elución.

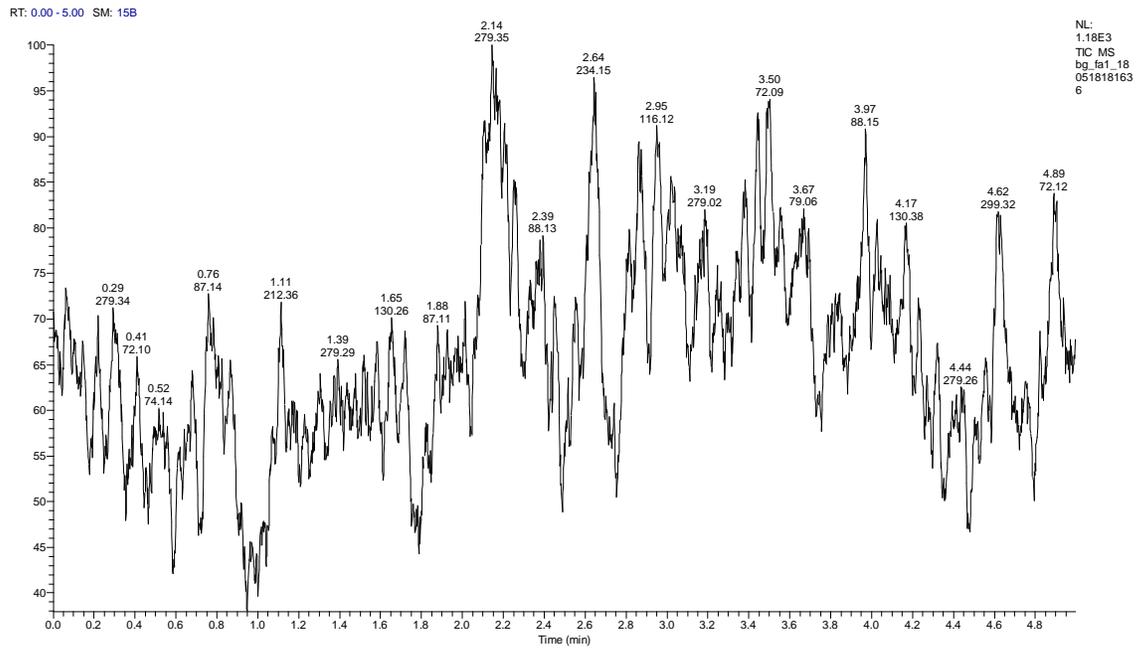
RT: 0.00 - 5.00 SM: 15B



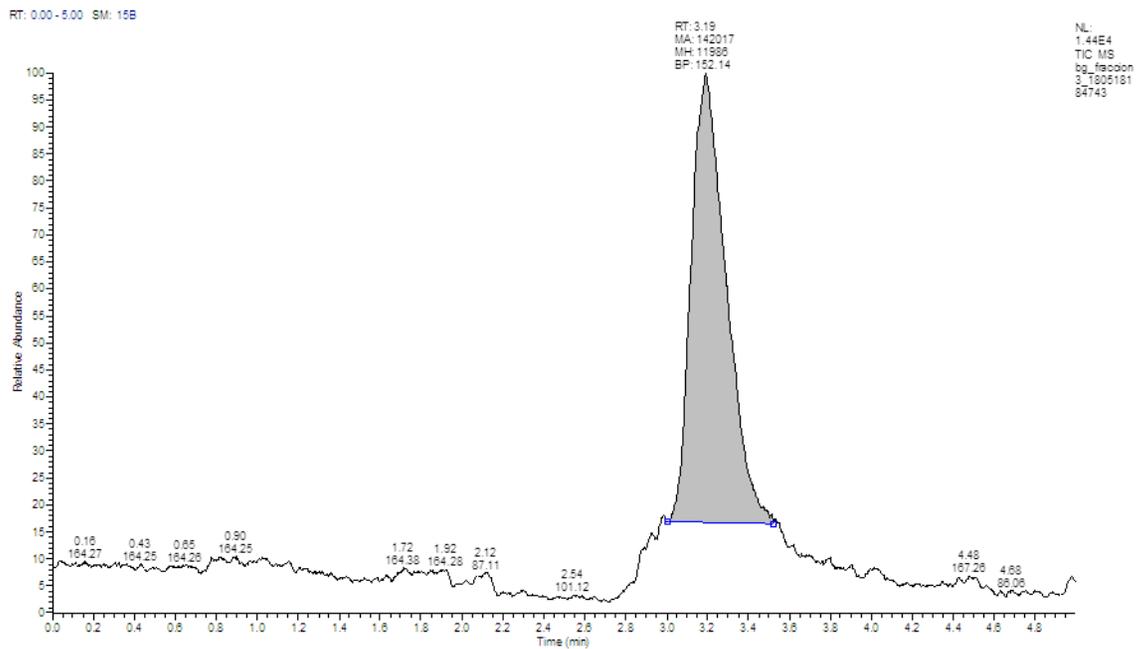
Anexo 7.

Perfiles cromatográficos en la optimización de las condiciones de extracción por DMFS.

a) Lavado con agua.



b) Fracción 3. Primera extracción del analito con 0,5 mL de metanol.



DETERMINACIÓN DE CITRAL
EMPLEANDO ULTRA CROMATOGRAFÍA
LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE
MASAS (UCLAR-EM)



UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATORIO DE ANÁLISIS INDUSTRIALES
2018

 UNIVERSIDAD DEL CAUCA	FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE QUIMICA	
	Protocolo Unidad de Análisis Industriales DETERMINACIÓN DE CITRAL EMPLEANDO LA ULTRA CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (UCLAR-EM)	Nº páginas: 9

TÍTULO: DETERMINACIÓN DE CITRAL EMPLEANDO LA ULTRA CROMATOGRFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (UCLAR-EM)

ELABORADO POR: EYMI JULIETH RAMÍREZ Y.

REVISADO POR: Dra. TANIA MILENA GUTIÉRREZ V.

APROBADO POR: M.SC. CLARA INÉS HURTADO S.
M.SC. CLAUDIA XIMENA MARTÍNEZ V.

LISTADO DE ACRÓNIMOS

CV: Coeficiente de variación.

DFMS: Dispersión de matriz en fase sólida.

EM: Espectrometría de masas.

ESI: Ionización por electrospray.

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry.

LC: Límite de cuantificación.

LD: Límite de detección.

m/z: Masa-carga.

Mⁿ: Masas a la n.

r: Coeficiente de correlación.

r²: Coeficiente de regresión.

s: Desviación estándar.

T_m: Tiempo muerto.

T_r: Tiempo de retención.

UCLAR: Ultra cromatografía líquida de alta resolución.

UCLAR-EM: Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa.

UCLAR-EM-TI: Ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa con trampa de iones.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN -----	1
2. OBJETIVOS-----	1
4. RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO -----	2
5. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO -----	2
6. PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA -----	3
7. PROCEDIMIENTO AJUSTE DE CONDICIONES OPERACIONALES EN EL UCLAR-EM-TI.-----	3
8. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES-----	5
8.1. Estándares de curva de calibración-----	5
8.2. Estándares de control -----	5
9. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA-----	5
9.1 EXTRACCIÓN DE CITRAL POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SOLIDA ---	5
10. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS -----	7
10.1 Curva de calibración -----	7
10.2 Procesamiento de la muestra-----	7
11. PROCESAMIENTO DE DATOS Y CÁLCULO DE RESULTADOS-----	8
12. CONTROL DE CALIDAD -----	8
13. RECUPERACIÓN, DESACTIVACIÓN Y/O ALMACENAMIENTO TEMPORAL DE LOS RESIDUOS QUÍMICOS -----	8
13.1 RECUPERACIÓN -----	8
13.2 ALMACENAMIENTO TEMPORAL -----	8
14. BIBLIOGRAFÍA -----	9
ANEXOS	

 UNIVERSIDAD DEL CAUCA	FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN DEPARTAMENTO DE QUÍMICA PROGRAMA DE QUIMICA
	Protocolo Unidad de Análisis Industriales DETERMINACIÓN DE CITRAL EMPLEANDO ULTRA CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (UCLAR-EM)

1. INTRODUCCIÓN

Existen numerosos ingredientes activos presentes en gran variedad en la naturaleza, formando parte de la composición de un sinnúmero de productos. Por lo general en la industria química, farmacéutica, alimentaria y cosmética es necesario llevar a cabo el análisis de los diferentes tipos de compuestos que contienen ciertos productos. El citral es uno de esos ingredientes activos que puede encontrarse en la composición de diferentes productos naturales o sintéticos. El citral ($C_{10}H_{16}O$) es un monoterpeno que posee gran importancia dentro de la química aplicada e industrial, este componente natural es un constituyente de numerosos aceites esenciales y comúnmente es extraído de hierbas y frutas cítricas. Se utiliza como un aditivo alimentario, material de fragancia en productos cosméticos y para otros intereses. Asimismo tiene importantes efectos terapéuticos, actividades antioxidantes, anti-inflamatorias y biológicas como anti-bacteriano^{1,2}. Debido al variado número de utilidades y propiedades que presenta este compuesto es importante implementar métodos para su identificación y cuantificación. La detección de citral en muestras se realiza típicamente a través de algunos métodos analíticos como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), espectroscopia de UV-Vis y métodos colorimétricos. Una técnica no convencional para el análisis de citral en aceites esenciales y muestras comerciales, es la ultra-cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones (UCLAR-EM-TI) una técnica versátil para el análisis de los constituyentes presentes en las muestras; al ser el citral un compuesto muy volátil la CLAR mejorar el proceso de cuantificación al trabajar a temperaturas más bajas, esta es una técnica de alta especificidad y sensibilidad.

Adicional a esto, el método de extracción de citral, previo a su cuantificación usando UCLAR-EM. Es la técnica de extracción por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) que es útil para minimizar los consumos de muestras, reactivos y solventes, cumpliendo con los principios de "Química Verde"³.

2. OBJETIVOS

2.1. Obtener el extracto del citral en muestras reales (naturales y productos comerciales) utilizando la técnica de dispersión de matriz en fase sólida, evaluando la eficiencia de la extracción.

2.2. Implementar la metodología estandarizada para identificar y cuantificar citral mediante ultra-cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones.

3. ASPECTOS DE SALUD Y SEGURIDAD

Revise antes de iniciar la práctica la Hojas de Seguridad Anexo 1. En el desarrollo de todo el análisis utilice de manera obligatoria los siguientes implementos de seguridad: bata, guantes, respirador para hidróxido de amonio y gafas protectoras.

4. RESULTADOS DE LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

La estandarización indicó que el método es exacto y preciso para la determinación de citral cumplió con los parámetros estadísticos requeridos, registrando coeficientes de variación menores o iguales al 20%, límites de cuantificación de 0.75 ppm y detección 0.50 ppm y un intervalo de trabajo hasta 1.0 mg/L. Además, el método de extracción por DMFS presenta porcentajes de recobro de citral mayores al 85%. La Tabla 1 resume los parámetros de la estandarización.

Tabla 1. *Resumen de la estandarización para el método implementado.*

Analito	Método	Rango de trabajo (ppm)	LD (ppm)	LC (ppm)	Linealidad R ²	Sensibilidad % C.V
Citral	Estandarización por UCLAR-EM-TI	3-20	0,50	0,75	> 0,9	11,6%

Anexo 2. Curva de calibración por triplicado y los valores de incertidumbre de las curvas.

5. EQUIPOS, REACTIVOS Y MATERIAL DE LABORATORIO

Tabla 2. *Materiales*

MATERIAL	CANTIDAD
Balones aforados de 10 mL	10
Balones aforados de 25 mL	2
Cartuchos para SPE	5
Erlenmeyer de 10 mL	2
Espátula	1
Filtro de Nylon de 0.22 µm	3
Jeringa de vidrio o plástico de 10 mL	1
Mortero de vidrio o ágata con pistilo	1
Pipeta de 2 mL	1
Probeta 50 mL	1
Vaso de precipitado de 50 mL	1
Varilla de agitación	1
Vidrio reloj	1
Viales de vidrio ámbar	10

Tabla 3. Reactivos y solventes

SUSTANCIAS*	CANTIDAD
Metanol grado CLAR	400 mL
Agua destilada	100 mL
Citral (3,7-dimetil-2,6-octadienal mezcla de isómeros E y Z) 95%	10 mL
Solución patrón de citral 1000 ppm	25 mL
Hidróxido de amonio	50 mL
silica-C ₁₈	2 mg

*Remitir al manual de protocolo de riesgo/ seguridad y fichas técnicas de seguridad.

Tabla 4. Equipos de laboratorio

EQUIPOS DE LABORATORIO	CANTIDAD
Ultra cromatógrafo líquido de alta resolución Thermo Scientific modelo Dionex UltiMate 3000	1
Espectrómetro de masas Thermo Scientific LCQ-fleet con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y detector de trampa de iones	1
Colector al vacío manifold Supercol-Visiprep N°5-7044 para extracción en fase sólida (SPE)	1
Bomba de vacío Cole-Parmer modelo N° 107CDC18TFEL-247E	1
Estufa	1
Balanza analítica	1

* Remitir al manual de protocolo de calibración de equipos

6. PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras naturales se deben almacenar en frío a 10 °C y los productos comerciales se deben mantener en su empaque original y a temperatura ambiente hasta su análisis.

7. PROCEDIMIENTO AJUSTE DE CONDICIONES OPERACIONALES EN EL UCLAR-EM-TI.

7.1. Ajustar la sonda en la posición D Figura 1 y verifique que el capilar no se haya desplazado hacia extremo inferior de la sonda.

7.2. Cargar las condiciones que fueron optimizadas para la detección de citral en el espectrómetro de masas, ir al software del equipo y buscar (carpetas: 1.UAI 2.xcalibur 3. LCQ-fleet 4. Tune y seleccionar el tune conexiónTcitral), verificar las condiciones con la Tabla 5.



Figura 1. Posición de sonda en D y unión entre el UCLAR y el EM
Fuente: Fotografía tomada por el autor en la UAI.

Tabla 5. Condiciones del método para la determinación de citral por ESI-EM-TI

CONDICIONES ESPECTRÓMETRO DE MASA	
I Spray Voltage (kV)	6
Spray Current (μ A)	0.20
Sheath Gas Flow Rate (arb)	20.9
Aux Gas Flow Rate (arb)	4.99
Sweep Gas Flow Rate (arb)	0
Capillary Temp ($^{\circ}$ C)	240
Capillary Voltage (V)	14
Tube Lens(V)	75
Agente ionizante	Hidróxido de amonio 0.1%

7.3. Conectar la línea de transferencia de muestra del UCLAR al espectrómetro de masa y colocar todos los parámetros establecidos para el análisis cromatográfico Tabla 6.

Tabla 6. *Condiciones del método para la determinación de citral por ultra cromatografía líquida de alta resolución*

Condiciones cromatográficas	
Columna	Hypersil GOLD (C ₁₈) tamaño de partícula 1.9 µm (100 X 2.1 mm)
Fase móvil	Metanol + NH ₄ OH 0.1%
Flujo fase móvil	Modo: Isocratico 0.1 mL/min
Temperatura del automuestreador	10 °C
Temperatura de la columna	20 °C
Tiempo de corrida	5 min
Volumen inyección de muestra	10 µL

8. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

8.1. Estándares de curva de calibración

Preparar solución de citral en metanol de 1000 mg/L a partir del patrón de citral al 95%. A partir de la solución patrón de citral prepare los estándares de las siguientes concentraciones 3.00, 5.00, 7.00, 10.0, 13.0, 15.0 y 20.0 ppm por triplicado, adicionar a cada solución agente ionizante (hidróxido de amonio 0,1%). Filtrar todos los patrones de calibración con filtro de Nylon de 0.22 µm, y elabore la curva de calibración con éstas concentraciones.

8.2. Estándares de control

Cada vez que pase un lote de muestras incluya estándares de control de 5.00 y 10.0 ppm, prepárelos teniendo en cuenta las especificaciones descritas en la preparación de estándares para la curva de calibración.

9. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

La extracción por DMFS se emplea para llevar a cabo un análisis rápido del analito, ya que implica un tiempo de preparación de muestras rápido sin tener que llevar a cabo un pretratamiento.

9.1 EXTRACCIÓN DE CITRAL POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SOLIDAD

9.1.1 Pesar 0.05 g (± 0.0001 g) de muestra y 0.2 g (± 0.0001 g) de silica-C₁₈ en un vidrio reloj.

9.1.2 Mezclar mecánicamente los componentes en un mortero de ágata o de vidrio usando un pistilo de ágata o de vidrio hasta homogeneidad por 5 min.

9.1.3 Transferir y empaçar la mezcla dentro de un cartucho de extracción para SPE.

9.1.4 Comprimir los cartuchos ligeramente con una varilla de vidrio para eliminar espacios de aire interno, el cartucho se lleva al colector al vacío donde se ajusta la presión para secado y extracción del analito, según se describe en la Tabla 7 donde se resumen los parámetros para la extracción de citral por DMFS.

9.1.5 Finalmente se realiza la elución del citral empleando 1 mL de metanol y utilizando como solvente de limpieza agua. En la Figura 2 se muestra el procedimiento de extracción por DMFS para muestras reales.

Tabla 7. Variables para extracción de citral por DMFS

Variables DMFS	
Material adsorbente	Silica-C ₁₈
Solvente de elución	Metanol
Volumen para elución	1 mL
Limpieza	1 mL agua
Tiempo se secado	4 min
Presión para secado manifold	55-60 kPa
Presión de extracción manifold	20 kPa
Tiempo de mezcla	5 min
Temperatura muestra	10 °C

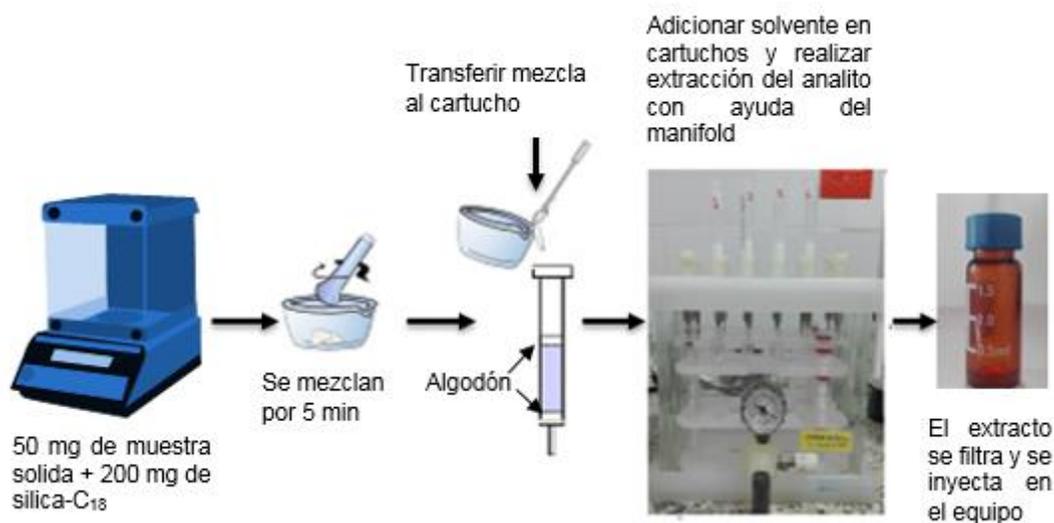


Figura 2. Procedimiento para extracción de citral por DMFS

Fuente: Ramírez, E. 2018, pp. 40

10. PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS

10.1 Curva de calibración

Prepare una curva de calibración a partir de los blancos y estándares, por lote de muestra o cuando se cambie de analista.

10.1.1 Verifique que estén bien todos los parámetros para el análisis por el UCLAR-EM especificados en el ítem 7. 15 minutos antes de iniciar las corridas cromatográficas, deje estabilizar la columna por 10 minutos haciendo pasar fase móvil (metanol + hidróxido de amonio al 0,1%), cerciórese que la línea de transferencia de salida de muestra del UCLAR este bien conectado, y compruebe que todo esté en correcto funcionamiento. Cargue la secuencia de análisis en el software Xcalibur, tenga en cuenta el manual LCQ-fleet si se requiere.

10.1.2 Prepare la curva de calibración con un blanco de metanol + agente ionizante y una serie de 7 estándares que cubra el intervalo de trabajo del método. Para la preparación, ver numeral 8.1.

10.1.3 Cuando vaya a iniciar la determinación de citral, transfiera una alícuota de blanco y estándares, a los viales de vidrio ámbar y proceda a hacer correr la secuencia programada anteriormente en el equipo, realizando la inyección de estándares en orden creciente desde los de más baja concentración a más alta concentración.

10.1.4 La gráfica de área contra concentración de citral da una línea recta. Almacene los datos en la carpeta de la fecha correspondiente, en la subcarpeta de citral. Guarde la curva, los estándares y las muestras de dicha curva de calibración, archivándola por la fecha en que se realizó.

NOTA: Filtrar fase móvil, patrones y muestra con filtro de Nylon de 0.22 µm.

10.2 Procesamiento de la muestra

10.2.1 Pretratamiento de la muestra: realice la extracción del analito en las muestras tal como lo indica el numeral 9.1.

10.2.2 Para muestras líquidas realice dilución y filtre la solución para análisis directo en el UCLAR-EM.

10.2.3 Reporte el valor de concentración de la muestra mediante cálculo adicional sustrayendo los valores de concentración de muestra y su blanco correspondiente.

10.2.4 Cuando pase un grupo de muestras corra inicialmente un blanco, enseguida pase un estándar de citral de baja y luego uno de alta concentración y léalos como muestra, continúe pasando las muestras leyendo un estándar y un duplicado por cada lote de muestras.

10.2.5 El equipo solicita la rotulación de cada muestra, el cual corresponde al asignado en el consecutivo y la dilución, no olvide registrar el valor de la dilución, cuando ésta se ha realizado para todas las muestras previo análisis.

10.2.6 Tenga en cuenta que en el espectrómetro de masas se recomienda no pasar concentraciones mayores a 20 ppm, por ende verifique que la muestra que va a inyectar en el equipo no sobrepase este valor. En tal caso se recomienda realizar diluciones de la muestra a un factor mayor a 50.

10.2.7 Almacene los resultados primarios en el disco duro del computador en el que queda registrado el nombre del analito, nombre del método, archivo de la curva, ecuación de calibración, fecha y hora del análisis, nombre del operador, nombre de la muestra, factor de dilución, concentración y área. Reporte la concentración redondeando el resultado con 3 cifras significativas y verifique que los valores se encuentren dentro de una precisión aceptable de un CV menor o igual al 20%.

11. PROCESAMIENTO DE DATOS Y CÁLCULO DE RESULTADOS

De los espectros de masas y de perfiles cromatográficos se lleva a cabo a identificación y cuantificación del analito mediante el área bajo la curva la cual integra el sistema de análisis Xcalibur se realiza el cálculo de la concentración del analito aplicando la ecuación de la recta de la curva de calibración. No olvide tener en cuenta el valor de la dilución para el cálculo de la concentración final.

12. CONTROL DE CALIDAD

- Cuando realice la curva de calibración acéptela si tiene un coeficiente de correlación mayor a 0,9
- Verifique los estándares de control, si el resultado analítico cae fuera de los límites de control normales, deben revisarse los estándares de calibración, los reactivos, material y los blancos. El análisis solo se puede reanudar cuando se corrija el problema.
- Analice por duplicado el 10% o por lo menos 1 de las muestras. El porcentaje de la diferencia entre los duplicados no debe ser mayor al 10%, si la variación excede este límite, debe repetirse el análisis.
- Los resultados del %C.V en las muestras y de la curva de calibración son aceptados estadísticamente si (<20%), afirmando que los resultados son adecuados para la determinación de citral ya sea en muestras naturales o comerciales.

13. RECUPERACIÓN, DESACTIVACIÓN Y/O ALMACENAMIENTO TEMPORAL DE LOS RESIDUOS QUÍMICOS

13.1 RECUPERACIÓN

El metanol utilizado como fase móvil y que es empleado para limpieza de la columna cromatográfica se debe disponer en único recipiente.

13.2 ALMACENAMIENTO TEMPORAL

NO APLICA

Nota: Para consulta de datos y resultados consultar trabajo de grado de pregrado: Ramírez, E. J. (2018). Implementación de una metodología para la determinación de citral empleando ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UCLAR-EM), trabajo de grado. Universidad del Cauca, Colombia.

14. BIBLIOGRAFÍA

1. Bouzenna, H., Hfaiedh, N., Giroux-Metges, M., Elfeki, A., & Talarmin, H. (2017). Biological properties of citral and its potential protective effects against cytotoxicity caused by aspirin in the IEC-6 cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 87653-660. doi:10.1016/j.biopha.2016.12.104
2. Thomas, M. L., de Antueno, R., Coyle, K. M., Sultan, M., Cruickshank, B. M., Giacomantonio, M. A., &... Marcato, P. (2016). Citral reduces breast tumor growth by inhibiting the cancer stem cell marker ALDH1A3. *Molecular Oncology*, 10(9), 1485-1496. doi:10.1016/j.molonc.2016.08.00
3. Doria Serrano, Ma. del Carmen. (2009). Química verde: un nuevo enfoque para el cuidado del medio ambiente. *Educación química*, 20(4), 412-420. Recuperado de: http://www.scielo.org.mx/scielo.Php?script=sci_art_ext&p_id=S0187-893X2009000400004&lng=es&tlng=es
4. Skoog, D., Holler, J., Crouch, S. (2008). *Principios De Análisis Instrumental*. 6ª Edición. Mexico, D.F: Editorial Cengage Learning
5. Garcia, A., Yusá, D. (2016). *HPLC instrumental*. València: Editorial Universitat politècnica, 5-13
6. Miller, J., Miller, J. (2002). *Estadística Y Quimiometría Para Química Analítica*. 4ª Edición. España: Editorial Prentice Hall
7. Duffau, B. *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición. Aspectos generales sobre la validación de métodos*. (2010). Santiago de Chile: Departamento de salud ambiental. Instituto de Salud Pública
8. Coy, G. (2006). *Protocolo estandarización de métodos analíticos*. Colombia: Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM
9. Coeficientes de variación e intervalos de confianza. (2005). Recuperado de: http://www.Coeficientes_de_variacion_EHPM_2005.pdf
10. Ramírez, E. J. (2018). Implementación de una metodología para la determinación de citral empleando ultra cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UCLAR-EM), trabajo de grado. Universidad del Cauca, Colombia.

Anexos

Anexo 1.

CITRAL ICSC: 1725			
CAS: 5392-40-5 RTECS: RG5075000 CE Índice Anexo I: 605-019-00-3 CE / EINECS: 226-394-6		3,7-Dimetil-2,6-octadienal Lemonal C10H16O Masa molecular: 152.2	
TIPO DE PELIGRO / EXPOSICIÓN	PELIGROS AGUDOS / SÍNTOMAS	PREVENCIÓN	PRIMEROS AUXILIOS / LUCHA CONTRA INCENDIOS
INCENDIO	Combustible.	Evitar las llamas.	Espuma. Polvo seco. Dióxido de carbono.
EXPLOSIÓN	Por encima de 82°C pueden formarse mezclas explosivas vapor/aire.	Por encima de 82°C, sistema cerrado y ventilación.	
EXPOSICIÓN		¡EVITAR LA FORMACIÓN DE NIEBLAS DEL PRODUCTO!	
Inhalación	Tos.	Ventilación, extracción localizada o protección respiratoria.	Aire limpio y reposo.
Piel	Enrojecimiento	Guantes de protección. Traje de protección.	Aclarar y lavar la piel con agua y jabón.
Ojos		Gafas de protección de seguridad.	Enjuagar con agua abundante durante varios minutos (quitar las lentes de contacto si puede hacerse con facilidad).
Ingestión		No comer, ni beber, ni fumar durante el trabajo	Enjuagar la boca.
DERRAMES Y FUGAS		ENVASADO Y ETIQUETADO	
Protección personal: Traje de protección química y filtro respiratorio para gases y vapores orgánicos. Eliminar toda fuente de ignición. Recoger el líquido procedente de la fuga en recipientes tapados.		Clasificación UE Símbolo: Xi R: 38-43 S: (2-)24/25-37 Clasificación GHS Atención Líquido combustible.	

Absorber el líquido residual en arena o absorbente inerte y trasladarlo a un lugar seguro. NO permitir que este producto químico se incorpore al ambiente.	Puede ser nocivo en caso de ingestión. Puede ser nocivo en contacto con la piel. Provoca irritación cutánea. Puede provocar una reacción cutánea alérgica. Tóxico para los organismos acuáticos.
ALMACENAMIENTO	
Mantener en lugar fresco. Ventilación a ras del suelo. Medidas para contener el efluente de extinción de incendios. Almacenar en un área sin acceso a desagües o alcantarillas.	

Fichas Internacionales de Seguridad Química

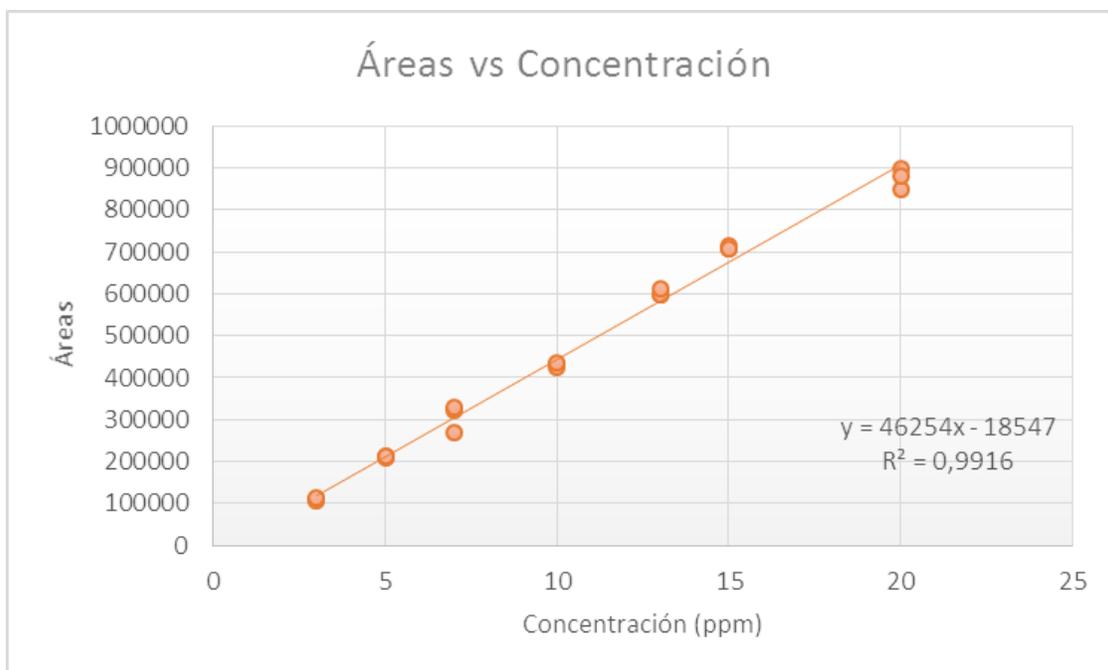
CITRAL

ICSC: 1725

DATOS IMPORTANTES	
<p>ESTADO FÍSICO; ASPECTO Líquido amarillo de olor característico.</p> <p>PELIGROS QUÍMICOS La sustancia se descompone al arder, produciendo humos irritantes. La sustancia puede polimerizar debido al calentamiento intenso.</p> <p>LÍMITES DE EXPOSICIÓN TLV no establecido. MAK no establecido.</p>	<p>RIESGO DE INHALACIÓN No puede indicarse la velocidad a la que se alcanza una concentración nociva en el aire por evaporación de esta sustancia a 20°C</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN DE CORTA DURACIÓN La sustancia irrita la piel.</p> <p>EFFECTOS DE EXPOSICIÓN PROLONGADA O REPETIDA El contacto prolongado o repetido puede producir sensibilización de la piel.</p>
PROPIEDADES FÍSICAS	
<p>Punto de ebullición: 226-228°C Punto de fusión: <-10°C Densidad: 0.9 g/cm³</p> <p>Solubilidad en agua, g/100 ml a 25°C: 0.059 (muy escasa) Presión de vapor, Pa a 100°C: <130 Densidad relativa de vapor (aire = 1): 5.3</p>	<p>Punto de inflamación: 82°C c.c. Temperatura de autoignición: 225°C Límites de explosividad, % en volumen en el aire: 4.3 - 9.9 Coeficiente de reparto octanol/agua como log Pow: 2.76</p>
DATOS AMBIENTALES	
La sustancia es tóxica para los organismos acuáticos. Se aconseja firmemente impedir que el producto químico se incorpore al ambiente.	
NOTAS	
El Citral es una mezcla de dos isómeros geométricos, geranial (configuración trans, aprox. 55-70%) y neral (configuración cis, 35-45%).	
INFORMACIÓN ADICIONAL	
<p>Límites de exposición profesional (INSHT 2013): VLA-ED: 5 ppm Notas: vía dérmica. Sensibilizante. Fracción inhalable y vap</p>	

Anexo 2.

➤ A través del gráfico se relaciona el área respecto a la concentración de citral (ppm), en la gráfica se observa la tendencia lineal de los resultados y la ecuación lineal de las curvas de calibración por triplicado en la estandarización del método.



➤ Estimación de la incertidumbre en la determinación de citral para las curvas de calibración. (para los 7 días de análisis)

Incertidumbre estándar x 7 días	5,73	5,77	5,84	5,78	5,71	5,77	5,86
---------------------------------	------	------	------	------	------	------	------

Incertidumbre Combinada y Expandida

La relación general entre la incertidumbre estándar combinada de un valor y la incertidumbre de los parámetros independientes de los cuales depende es llamada la ley de propagación de incertidumbre:

Las contribuciones de cada una de las variables a la incertidumbre del resultado se calculan como el cuadrado de cada incertidumbre multiplicada por el cuadrado del respectivo coeficiente de sensibilidad:

$$U_c = \sqrt{(U_1)^2 + \dots (U_n)^2}$$

$$U_c = 15,3$$

$$Incertidumbre Expandida = 15,3 \times 2 = 30,6$$