

APLICACIÓN DEL MÉTODO SIMPLEX EN LA EVALUACIÓN DE TERPENOLES UTILIZANDO MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Alicia Lucía Morales P.*¹, Jadie Badrilly Cabrera A., Ángela Mireya Hernández G.,
y Carmenza Duque B.¹

Aprobado: Abril 14/00

Keywords: Solid-Phase Microextraction, SPME, Terpenols, Simplex.

RESUMEN

La microextracción en fase sólida (MEFS) es una técnica de adsorción simple para la evaluación de los compuestos presentes en el espacio de cabeza (*headspace*) de una muestra. En el desarrollo del presente trabajo, utilizando soluciones modelo de linalool, α -terpineol, nerol y geraniol, se determinaron el tiempo necesario para establecer el equilibrio entre la muestra y su espacio de cabeza, la temperatura y el tiempo de contacto de la fibra con el espacio de cabeza. Para definir los valores óptimos de temperatura y tiempo de contacto se utilizó el modelo matemático Simplex. Según este diseño experimental se pudo establecer una temperatura de muestreo de 29°C y un tiempo de contacto de 13,8 minutos. Con estos parámetros se determinaron los niveles mínimos detectable y cuantificable, la repetibilidad y la selectividad de esta metodología para los compuestos mencionados.

ABSTRACT

Solid phase microextraction (SPME) is a simple adsorption technique for the isolation of headspace flavor compounds. This paper focuses on the development of a headspace SPME method using standard solutions of linalool, α -terpineol, nerol and geraniol. The optimum headspace SPME sampling parameters (extraction and adsorption time and temperature) were established using simplex model. Those optimal conditions are: temperature 29°C and adsorption time 13.8 min. Linearity, repeatability and limits of detection and quantitation have been determined for the mentioned compounds.

INTRODUCCIÓN

Para el estudio por cromatografía de gases de alta resolución (CGAR) de los compuestos volátiles presentes en matrices sólidas y líquidas generalmente se requieren metodologías que involucran procesos de extracción prolongados y la utilización de solventes; para facilitar el análisis de estos compuestos se han desarrollado nuevas técnicas de muestreo como el espacio de cabeza en sus modalidades.

* Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, A.A. 14490 Bogotá, Colombia.

dades: dinámico, estático y al vacío (1) y la microextracción en fase sólida (2-4).

La MEFS es una técnica de preparación de muestra libre de solvente, en la que una fibra de sílica fundida, recubierta por un material adsorbente, se introduce en la muestra o en el espacio de cabeza sobre la muestra. Cuando se hace MEFS en el espacio de cabeza de la muestra, están involucrados dos procesos: la liberación de los analitos de la muestra y la adsorción de los analitos por el recubrimiento de la fibra. Los analitos orgánicos volátiles son extraídos y concentrados en el recubrimiento de la fibra y luego transferidos al instrumento analítico para desorción por calor y análisis (2).

El muestreo en el espacio de cabeza consiste en evaluar los componentes volátiles que se encuentran en la fase de vapor ubicada sobre una matriz sólida o líquida, en un recipiente cerrado. Dicha matriz se equilibra con su fase de vapor a una temperatura determinada, por lo que el muestreo en el espacio de cabeza exige un estricto control de temperatura; esta temperatura se denomina *temperatura de equilibrio*. Las concentraciones de los analitos en las fases no cambian con el tiempo después de que el sistema ha alcanzado el equilibrio, por lo que se debe determinar cuánto tiempo precisa el sistema para alcanzar el equilibrio (1).

El equilibrio completo no es necesario para lograr exactitud y precisión altas en la MEFS; sin embargo, el tiempo de muestreo debe ser constante y el control de otros parámetros de muestreo es esencial: así, es importante el tamaño del recipiente de trabajo, el volumen de muestra y, cuando se usan muestras líquidas, la

profundidad a la que es inmersa la fibra en la muestra (3, 4).

Puesto que la MEFS es muy sensible a las condiciones experimentales, tales como temperatura, tiempo de calentamiento, volumen, concentración y matriz de la muestra, es necesario proveer las mejores condiciones en las cuales se desarrolla esta metodología; en otras palabras, se debe optimizar la técnica.

Una de las formas de optimizar cualquier metodología analítica es la utilización del modelo matemático Simplex; éste utiliza un algoritmo capaz de variar simultáneamente diferentes parámetros para obtener un nivel óptimo de respuesta en la metodología en estudio (5).

En los estudios sobre la composición del aroma de algunas frutas tropicales se ha encontrado que los terpenoles (especialmente el linalol) desempeñan un papel relevante. Como continuación de dichos estudios se están desarrollando investigaciones sobre la distribución de los terpenoles en las partes aéreas (fruto: cáscara y pulpa, hojas y flores) de algunas especies frutales. Para la evaluación de los terpenoles en las flores es indispensable la utilización de metodologías analíticas, como la microextracción en fase sólida (MEFS), que utilizan cantidades pequeñas de material vegetal.

Con el propósito de optimizar esta metodología para estudios futuros en flores de especies frutales, en este trabajo se presenta la utilización del modelo matemático Simplex para establecer las mejores condiciones experimentales de la MEFS de terpenoles utilizando los resultados del análisis por CGAR (áreas) como criterio de evaluación.

PARTE EXPERIMENTAL

Materiales

Soluciones de terpenoles: este trabajo se desarrolló sobre soluciones patrón de linalol, α -terpineol, nerol y geraniol aplicadas sobre una cantidad fija de algodón para obtener concentraciones entre 0,0025 ppm y 0,05 ppm.

Especificaciones de la fibra adsorbente: fibra de polidimetilsiloxano ($d_f = 100 \mu\text{m}$).

Determinación del tiempo de equilibrio

Para establecer el tiempo de equilibrio, se hicieron ensayos con solución de terpenoles de 0,05 ppm, a 25°C con un tiempo de contacto de 17,3 minutos, condiciones determinadas en un Simplex preliminar con una solución de linalol de 0,05 ppm.

Aplicación del modelo matemático Simplex

Las variables en evaluación con el modelo matemático Simplex son la temperatura y el tiempo de contacto.

El dominio de la temperatura (T) se fijó entre 25 y 35°C, y el dominio del tiempo (t) entre 10 y 30 minutos.

Cálculo para la matriz de partida: la matriz del Simplex de partida se calculó con base en las ecuaciones que se presentan a continuación:

Punto 1

$$T^0 = -\frac{1}{2} \left(\frac{T_{\max}^0 - T_{\min}^0}{N^0 \text{ pasos}} \right) + T_{\text{media}}^0$$

$$t = -\frac{1}{2\sqrt{3}} \left(\frac{t_{\max} - t_{\min}}{N^0 \text{ pasos}} \right) + t_{\text{medio}}$$

Punto 2

$$T^0 = -\frac{1}{2} \left(\frac{T_{\max}^0 - T_{\min}^0}{N^0 \text{ pasos}} \right) + T_{\text{media}}^0$$

$$t = -\frac{1}{2\sqrt{3}} \left(\frac{t_{\max} - t_{\min}}{N^0 \text{ pasos}} \right) + t_{\text{medio}}$$

Punto 3

$$T^0 = 0 \left(\frac{T_{\max}^0 - T_{\min}^0}{N^0 \text{ pasos}} \right) + T_{\text{media}}^0$$

$$t = -\frac{2}{2\sqrt{3}} \left(\frac{t_{\max} - t_{\min}}{N^0 \text{ pasos}} \right) + t_{\text{medio}}$$

El paso escogido fue de un décimo del rango, el número de pasos se fijó en 5 y la variable por optimizar fue la mayor respuesta (área) del linalol en el análisis por CGAR.

Cromatografía de gases de alta resolución (CGAR)

Las condiciones cromatográficas utilizadas en la optimización de la MEFS en el headspace fueron: cromatógrafo de gases HP 5890 Serie II con detector de ionización de llama (FID), equipado con columna capilar DB-Wax (30 m x 0,25 mm i.d., $d_f 0,25 \mu\text{m}$). Programa de temperatura para la columna: temperatura inicial 50°C por 4 min, luego se calentó con un incremento de 4°C/min hasta 200°C. Las

temperaturas del detector y del inyector se fijaron en 200°C. El gas de transporte fue helio con un flujo de 1,22 mL/min y la inyección se hizo en modo *splitless*.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

La gráfica 1 presenta los resultados de la variación del área de los terpenoletos en función del tiempo para establecer el tiempo de equilibrio a 25°C; puede observarse que el área varía en función del tiempo durante los primeros 40 minutos y luego la respuesta se estabiliza. Por tanto, se puede considerar que a estas condiciones (temperatura 25°C, tiempo de contacto 17,3 min) se necesita un mínimo de 40 minutos para que se establezca el equilibrio entre la muestra y su espacio de cabeza. Para evitar tiempos de muestreo prolongados y trabajar en el valor mínimo

establecido, se utiliza como tiempo de equilibrio 45 minutos. Una vez determinado el tiempo de equilibrio (45 minutos) se procedió a fijar las condiciones óptimas de trabajo por medio del modelo matemático Simplex. Después de tener el Simplex de partida, tabla 1, se evalúan las respuestas obtenidas y se sigue la teoría pesimista, que consiste en alejarse del punto de peor respuesta. El criterio para la escogencia de las condiciones óptimas

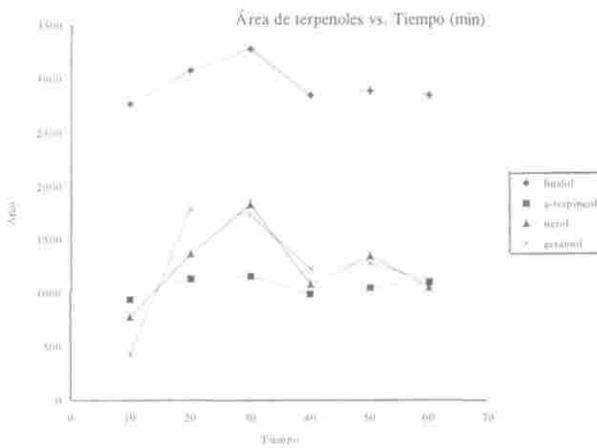
Tabla 1. Simplex de partida.

Punto	T (°C)	t (min)	Área en CGAR			
			linalol	α-terpineol	nerol	geraniol
1	29	13.8	5.008	1.565	3.766	2.657
2	31	13.8	4.438	1.653	2.124	1.133
3	30	17.3	4.643	1.689	2.989	2.168

de trabajo fue la mayor respuesta (área) obtenida para el linalol en el análisis por CGAR.

Al evaluar la primera matriz compuesta por los puntos 1, 2 y 3, se observa que el punto de peor respuesta es el 2, por lo que se descarta. Se calcula el punto 4 (27°C y 17,3 min), y se evalúa la matriz compuesta por los puntos 1, 3 y 4. La peor respuesta la proporciona el punto 4, por lo que se continúa el estudio descartando el punto 4 y calculando el punto 5 (33°C y 12,6 min). Siguiendo esta secuencia se llegó a un Simplex giratorio con la mejor respuesta, el punto 1, correspondiente a una temperatura de ad-

Gráfica 1. Determinación del tiempo de equilibrio.



sorción de 29°C y un tiempo de contacto de 13,8 minutos.

Utilizando las condiciones óptimas se evaluaron la repetibilidad (basada en el área de los terpenoles en el análisis por CGAR) y los niveles mínimos detectable y cuantificable. Los resultados se presentan en las tablas 2 y 3.

Tabla 2. Datos estadísticos de repetibilidad.

Variables estadísticas	Área			
	linalol	α -terpineol	nerol	geraniol
\bar{x}	4414,5	1.574,4	2.841,1	1.832,2
s	205,5	223,9	24,5	441,8
RSD	4,65%	14,22%	7,90%	24,11%

\bar{x} : promedio aritmético; s : desviación estándar; RSD: desviación estándar relativa.

Teniendo en cuenta la ecuación de Horwitz (6) [RSD (%) = $2^{(1 - 0,5 \log C)}$], en el presente estudio la relación entre la RSD y la concentración de los analitos es del 25%; entonces se puede decir que los

En el presente estudio, también se evaluó la linealidad de la respuesta de cada uno de los compuestos en forma individual y en mezcla; las ecuaciones correspondientes a cada caso se presentan en la tabla 4.

Los sistemas ensayados presentaron buenos coeficientes de correlación, con excepción del sistema linalol- α -terpineol-geraniol. Se puede concluir que la respuesta (área) es una función lineal de la concentración para los valores analizados; sin embargo, al comparar la ecuación de la recta que corresponde a cada terpenol individual con las ecuaciones

correspondientes al mismo terpenol pero en presencia de los otros, se observan diferencias en los valores de pendiente y de intercepto indicando una variación grande de la respuesta de cada terpenol con relación a la presencia de otros compuestos en el medio. Este hecho representa una limitación para la utilización de la técnica con fines cuantitativos en muestras reales, pues para hacer la calibración de cada compuesto se debe conocer la composición general del medio.

Tabla 3. Valores de nivel mínimo detectable y nivel mínimo cuantificable.

Compuesto	Nivel mínimo detectable	Nivel mínimo cuantificable
linalol	0,0026 ppm	0,0116 ppm
α -terpineol	0,0045 ppm	0,0229 ppm
nerol	0,0011 ppm	0,0140 ppm
geraniol	0,0061 ppm	0,0186 ppm

valores de RSD obtenidos para este estudio (entre 4,65% y 24,11%) son satisfactorios en las condiciones de trabajo mencionadas anteriormente.

CONCLUSIONES

1. Las condiciones óptimas de trabajo para el análisis de terpenoles utilizando

Tabla 4. Valores estadísticos para determinar la linealidad de la selectividad del método.

Ensayo	Componentes de la solución patrón	r	Ecuación de la recta (Y = mx + b)
Evaluación para linalol			
1	Linalol	0,9989	Y = 71202 x + 2139,5
5	Linalol- α -terpineol	0,9999	Y = 109999 x + 1819,6
6	Linalol- α -terpineol- nerol	0,9987	Y = 83884 x + 102,23
7	Linalol- α -terpineol- geraniol	0,6755	Y = 39387 x + 14305
8	Linalol- nerol- geraniol	0,9196	Y = 80368 x + 5819,7
Evaluación para α-terpineol			
2	α -terpineol	0,9969	Y = 43041 x + 1818,9
5	Linalol- α -terpineol	0,9961	Y = 21672 x + 420,98
6	Linalol- α -terpineol- nerol	0,9993	Y = 3225,1 x + 551,89
7	Linalol- α -terpineol- geraniol	0,6185	Y = 11519 x + 4923,9
Evaluación para nerol			
3	Nerol	0,9992	Y = 70913 x + 1746,2
6	Linalol- α -terpineol- nerol	0,9967	Y = 100214 x - 2192
8	Linalol- nerol- geraniol	0,9186	Y = 30850 x + 3398,2
Evaluación para geraniol			
4	Geraniol	0,9997	Y = 68492 x + 2266
7	Linalol- α -terpineol- geraniol	0,6665	Y = 19447 x + 7174,6
8	Linalol- nerol- geraniol	0,9219	Y = 36590 x + 3844,5

Rango de concentración de los analitos en la solución patrón entre 0,005-0,05 ppm.

MEFS en el *headspace* son: tiempo de equilibrio, 45 minutos; temperatura de muestreo, 29°C, y tiempo de contacto, 13,8 minutos.

2. El método presenta respuesta lineal entre 0,005 y 0,05 ppm para los terpenoles estudiados.

3. Los valores de repetibilidad y de los niveles mínimos detectable y cuantificable dependen del compuesto evaluado.

4. Los resultados obtenidos muestran que la MEFS sobre el espacio de cabeza es una metodología muy sencilla y rápida

para el seguimiento cualitativo de compuestos volátiles, pero para su aplicación en la determinación cuantitativa en material biológico se requiere su optimización en la matriz natural.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el grupo de investigación Estudio y aprovechamiento de productos naturales colombianos (Línea Química de Aromas), gracias al apoyo económico de Colciencias e IPICS, Universidad de Uppsala (Suecia).

REFERENCIAS

- Núñez, A. J., González, L. F., Janak, J. (1984). Preconcentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatography, *J. Chromatogr.* 300, 127-162.
- Elmore, J., Erbahadir, M. A., Motttram, D. S. (1997). Comparison of Dynamic Headspace Concentration on Tenax with Solid Phase Microextraction for the Analysis of Aroma Volatiles. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2638-2641.
- Optimizing SPME: Parameters to control to Ensure Consistent Results, (1996). *Nota 95, Supelco*,
- Solid Phase Microextraction: Solventless sample preparation for Monitoring flavor and fragrance compounds by capillary gas chromatography, (1995). *Bulletin 869 Supelco*,
- Villaveces, J. L., Arias, H. (1987). La optimización de procesos químicos con ayuda del simplex, *Química e Industria*. 13, 2-14.
- Quattrocchi, O. A., Abelaira, S. (1992). Lab, R. F. *Introducción a la HPLC aplicación y práctica*, Editorial Buenos Aires.