



FACULTAD DE QUÍMICA
GRADO EN QUÍMICA

Trabajo de Fin de Grado

Estudio de la composición de las ceras cuticulares de
Malus floribunda Siebold ex Van Houtte

Parte A

Autora:

Susana Pérez Gômes-Ortigão

Tutora:

Carmen María García Jares

Cotutora:

Marta Lores Agúin

2020/2021

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

El presente trabajo ha sido realizado en:

Facultad de Química

Av. das Ciencias s/n

Campus Vida

Universidad de Santiago de Compostela

15701 Santiago de Compostela, A Coruña, España

Departamento:

Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Área de conocimiento:

Química Analítica

D.^a Carmen María García Jares y D.^a Marta Lores Aguín informan que la presente memoria, titulada *Estudio de la composición de las ceras cuticulares de Malus floribunda Siebold ex Van Houtte (Parte A)*, presentada por **Susana Pérez Gômes-Ortigão** para superar los créditos correspondientes al Trabajo de Fin de Grado de la titulación Grado en Química, se ha realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela.

La tutora,

La cotutora,

La alumna,

Carmen María García
Jares

Marta Lores Aguín

Susana Pérez Gômes-
Ortigão

Resumen

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos ubicuos y persistentes que pueden encontrarse en todos los compartimentos medioambientales. Esta amplia distribución y sus propiedades cancerígenas han llevado a la Agencia Estadounidense para la Protección Medioambiental (EPA) a incluir 16 HAPs en su lista de contaminantes prioritarios.

Se propuso el estudio de la aptitud de los árboles ornamentales para biorremediar el aire urbano, centrándose en la capacidad de las hojas de la especie *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte para actuar como filtros de los HAPs atmosféricos.

Para ello es necesario conocer cómo es el proceso de captación de HAPs y qué variables lo controlan. Una de las variables estudiadas fue la composición y concentración de la cutícula foliar. En consecuencia, fue necesario optimizar previamente un método de extracción y análisis de las ceras cuticulares foliares, que es en lo que se centrará la presente memoria.

Este método consistió en una extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico de baja toxicidad asistida por ultrasonidos y análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. De esta forma se consiguió una metodología sencilla, económica, rápida y respetuosa con el medio ambiente para la determinación de los ácidos grasos cuticulares foliares de la especie objetivo.

Resumo

Os hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son contaminantes orgánicos ubicuos e persistentes que poden encontrarse en todos os compartimentos medioambientais. Esta ampla distribución e as súas propiedades cancerixenas levaron á Axencia Estadounidense para a Protección Medioambiental (EPA) a incluír 16 HAPs na súa lista de contaminantes prioritarios.

Propúxose o estudo da aptitude das árbores ornamentais para biorremediar o aire urbano, centrándose na capacidade das follas da especie *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte para actuar como filtros dos HAPs atmosféricos.

Para iso foi necesario coñecer como é o proceso de captación de HAPs e que variables o controlan. Unha das variables estudadas foi a composición e concentración da cutícula foliar. En consecuencia, foi necesario optimizar previamente un método de extracción e análise das ceras cuticulares foliares, que é no que se centrará a presente memoria.

Este método consistiu nunha extracción sólido-líquido cun disolvente orgánico de baixa toxicidade asistida por ultrasóns e análise mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Desta forma conseguiuase una metodoloxía sinxela, económica, rápida e respectuosa co medio ambiente para a determinación dos ácidos graxos cuticulares foliares da especie obxectivo.

Abstract

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous and persistent organic pollutants that can be found in all environmental compartments. This wide distribution and its carcinogenic properties have led the US Environmental Protection Agency (EPA) to include 16 PAHs on its list of priority pollutants.

The study of the aptitude of ornamental trees to bioremediate urban air was proposed, focusing on the ability of the leaves of the *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte species to act as filters for atmospheric PAHs.

For this, it is necessary to know what the process of capturing PAHs is like and what variables control it. One of the variables studied was the composition and concentration of the leaf cuticle. Consequently, it was necessary to previously optimize a method for the extraction and analysis of foliar cuticular waxes, which is what this report will focus on.

This method consisted of a solid-liquid extraction with a low toxicity organic solvent assisted by ultrasound and analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry. In this way, a simple, economical, fast and environmentally friendly methodology was achieved for the determination of the foliar cuticular fatty acids of the target species.

Índice de contenidos

1.	Introducción	1
1.1.	Contexto.....	1
1.2.	<i>Malus floribunda</i> Siebold ex Van Houtte	3
1.3.	Cutícula.....	4
1.4.	Ácidos grasos	5
1.5.	Estado del arte.....	7
1.5.1.	Técnicas de extracción.....	10
1.5.1.1.	Extracción asistida por agitación	10
1.5.1.2.	Extracción asistida por ultrasonidos	10
1.5.2.	Técnica de análisis.....	11
1.5.2.1.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	11
2.	Objetivos y justificación.....	13
3.	Procedimiento experimental.....	14
3.1.	Material y reactivos	14
3.1.1.	Material.....	14
3.1.2.	Reactivos y disolventes	14
3.1.3.	Patrones	14
3.1.4.	Gases.....	15
3.2.	Instrumentación	15
3.3.	Preparación de las disoluciones patrón.....	15
3.4.	Origen de las muestras	16
3.5.	Extracción mediante UAE	17
3.6.	Condiciones de determinación mediante CG-MS	18
4.	Resultados y discusión	19
4.1.	Identificación de los ácidos grasos	20
4.2.	Optimización de los parámetros experimentales	24

4.2.1. Ensayos preliminares	24
4.2.2. Diseño experimental	27
4.3. Estudio de la calidad del método analítico	30
4.3.1. Validación de la calidad del método instrumental (CG-MS)	30
4.3.1.1. Linealidad	30
4.3.1.2. Precisión.....	32
4.3.2. Validación de la metodología completa	33
4.3.2.1. Exactitud	33
4.3.2.2. Límites de detección y cuantificación.....	35
4.4. Aplicación de la metodología	36
Conclusiones.....	38
Bibliografía.....	41

1. Introducción

1.1. Contexto

Las zonas urbanas son el centro neurálgico de nuestra actividad social y económica. La mitad de la población mundial ya vive en las ciudades y para antes de 2050 se espera que esta cifra aumente hasta los dos tercios.¹ Esta gran concentración de población junto con todos los requerimientos que hay que suplir para su bienestar están teniendo un tremendo impacto sobre el medio ambiente.

Uno de los mayores problemas es la contaminación del aire. Según datos del 2016 de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la contaminación atmosférica en las ciudades y zonas rurales de todo el mundo provoca cada año 4,2 millones de muertes prematuras.² La contaminación atmosférica se debe a la alteración de la atmósfera terrestre por la adición de gases, partículas sólidas o líquidas en suspensión, o formas de energía en proporciones distintas a las naturales.³ La mayor parte de la mortalidad debida a la contaminación del aire está asociada a la exposición a partículas pequeñas de menos de 2,5 μm de diámetro ($\text{PM}_{2.5}$), que causan enfermedades cardiovasculares, respiratorias y cáncer.² Conformando las $\text{PM}_{2.5}$, entre otras sustancias, se encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).⁴

Los HAPs constituyen un amplio grupo de compuestos químicos que se caracterizan por estar formados por anillos bencénicos fusionados. Son moléculas planas conformadas por anillos de 5 o 6 átomos de carbono que se forman durante la combustión incompleta de material orgánico, por lo que pueden tener un origen tanto natural como antropogénico.⁵ Sus características físico-químicas son diversas, algunos son semivolátiles, por lo que se encuentran en forma gaseosa, mientras que otros tienen elevadas temperatura de ebullición, por lo que se encuentran como partículas sólidas. Mayoritariamente son lipofílicos, característica que se incrementa con la complejidad y peso molecular de los compuestos.⁶

Además, se consideran contaminantes orgánicos ubicuos y persistentes que pueden encontrarse en todos los compartimentos medioambientales: atmósfera, agua, suelo y sedimentos marinos. Esta amplia distribución y sus propiedades cancerígenas han llevado a la Agencia Estadounidense para la Protección Medioambiental (Environmental

Protection Agency, EPA) a incluir 16 HAPs en su lista de contaminantes prioritarios (Figura 1.1).⁷

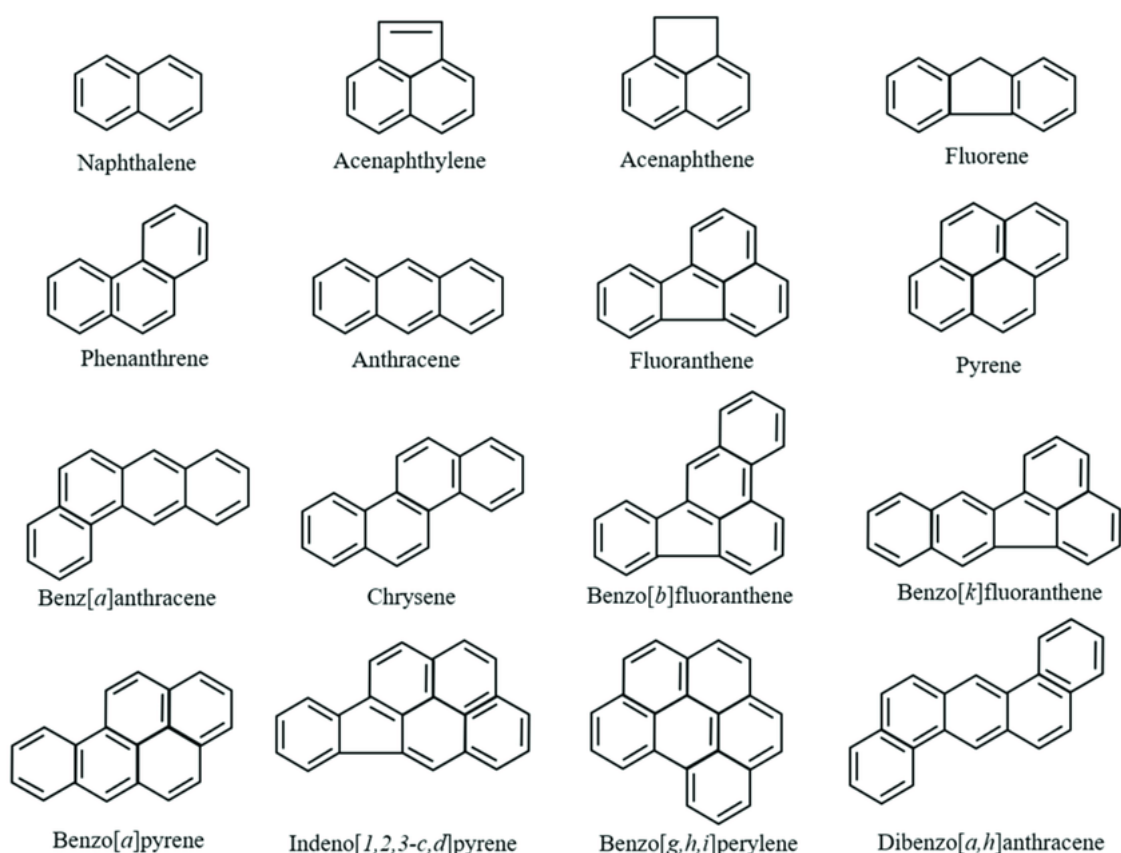


Figura 1.1: HAPs incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA.⁸

Con el conocimiento del potencial crecimiento poblacional y la cada vez mayor amenaza de este tipo de contaminantes es comprensible que las investigaciones en torno a esta área vayan en aumento.

Los grupos de investigación LIDSA⁹ y ECOTOX¹⁰, en los que se realizó el presente Trabajo de Fin de Grado, decidieron focalizarse en esta área de estudio bajo la premisa de encontrar una manera de remediar la contaminación del aire urbano, centrándose en la reducción de la concentración de los HAPs atmosféricos.

Emplear los árboles ornamentales urbanos es una forma muy sencilla de conseguirlo. Estos mitigan el efecto perjudicial de la contaminación atmosférica mediante la interceptación y absorción de los contaminantes, mejorando así la calidad del aire.¹¹ Este proceso se conoce como biorremediación, que es la utilización de organismos vivos para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el suelo, el agua y el aire.¹²

La hipótesis de partida es que las hojas de los árboles actúan como filtros de la contaminación aérea. Para confirmarlo se decidió estudiar la capacidad para captar HAPs del aire de las hojas de una especie de manzano ornamental muy abundante en la ciudad de A Coruña, *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte¹³, y de esta manera conocer cómo es el proceso de captación de HAPs y qué variables lo controlan.

Con este fin se estudió cómo la variabilidad intraespecífica de ciertos rasgos ecológicos de *Malus floribunda* hacía variar las cargas de sus hojas de los 16 HAPs incluidos por la EPA. Los rasgos ecológicos estudiados fueron la composición y concentración de la cutícula foliar, la densidad estomática, el área foliar específica, el δ^{13} de carbono y la ultraestructura foliar.

Para poder llevar a cabo este estudio previamente fue necesaria la optimización de un método de extracción y análisis de las ceras cuticulares foliares, que es en lo que se enfocó este Trabajo de Fin de Grado bajo las directrices del grupo de investigación LIDSA.

1.2. *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte

La especie estudiada para determinar su capacidad como biorremediadora de la contaminación atmosférica fue *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte, también denominada comúnmente como manzano japonés o manzano de flor. Es un árbol caducifolio perteneciente a la familia de las Rosáceas, originario del archipiélago nipón y de otras regiones del este de Asia. Debido a su gran resistencia a todo tipo de condiciones ambientales y a la belleza de sus flores y frutos se ha convertido en uno de los manzanos más empleados en jardinería y decoración urbanística (*Figura 1.2*).¹⁴



Figura 1.2: Flor (izquierda)¹⁵, árbol (centro)¹⁶ y fruto (derecha)¹⁷ de *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte.

1.3. Cutícula

Uno de los rasgos ecológicos estudiados para conocer su influencia en la captación de HAPs fue la concentración y composición de la cutícula foliar.

La cutícula es una cubierta lipídica extracelular que recubre la pared celular de las partes aéreas de las plantas superiores (hojas, tallos, flores y frutos), a excepción de la apertura estomática, y es sintetizada por las células epidérmicas.¹⁸ Está constituida principalmente de dos tipos de polímeros lipofílicos, la cutina y las ceras cuticulares, y se diferencian dos capas. La capa superior está conformada por las ceras epicuticulares y la capa inferior por cutina y ceras mezcladas con sustancias de la pared celular (pectinas, celulosa y otros carbohidratos) (Figura 1.3).¹⁸

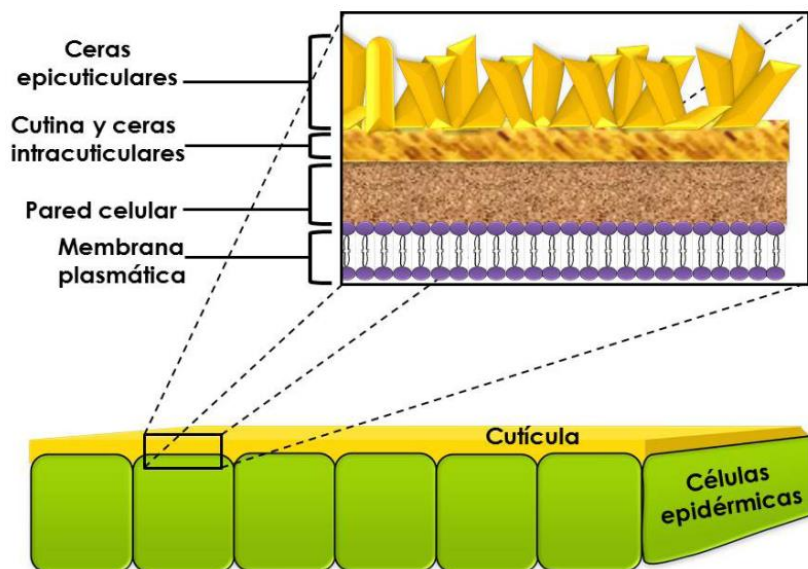


Figura 1.3: Disposición de la cutícula.¹⁸

La cutina es el principal componente de la cutícula. Es un polímero constituido mayoritariamente por ácidos grasos de cadena media, formando enlaces éster entre sí, y glicerol, dando lugar a una red rígida tridimensional que forma la estructura básica de la cutícula. En ella sobresale la presencia de ácidos grasos de 16 carbonos, aunque también destacan, en menor proporción, los de 18 carbonos.¹⁸

Los principales componentes químicos de las ceras son n-alcanos, ésteres, alcoholes, aldehídos, cetonas y ácidos grasos de cadena larga en el caso de las epicuticulares, o de ácidos grasos de cadena corta en el de las intracuticulares. También se han encontrado algunos metabolitos secundarios como los triterpenoides, compuestos

fenólicos (ácido cumárico y ferúlico, flavonoides, fenilpropanoides), polisacáridos (principalmente celulosa y pectina) y algunos polipéptidos.¹⁸

Las funciones principales que realiza la cutícula son la de protección y reducción de la pérdida de agua por evapotranspiración y de la difusión de los gases (CO₂, O₂) para que los estomas puedan regular estos procesos. Aun así, la cutícula no es totalmente impermeable por lo que las sustancias solubles que se depositan sobre ella pueden llegar a atravesarla.¹⁸ Dado que los HAPs son sustancias lipofílicas, su solubilidad en la cutícula propicia que las hojas puedan actuar como filtros que retengan estos contaminantes atmosféricos.⁵

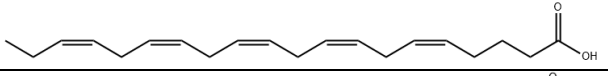
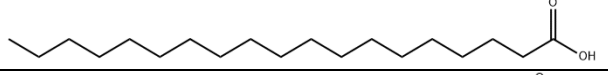
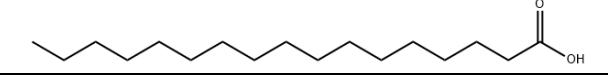
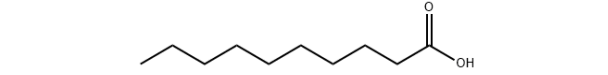
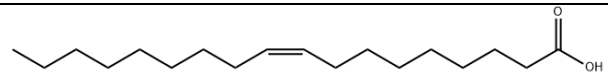
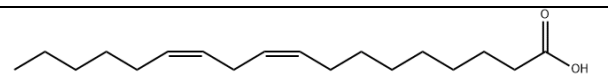
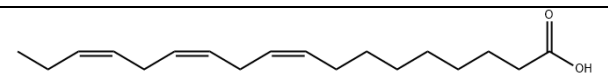
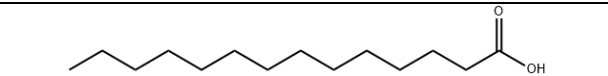
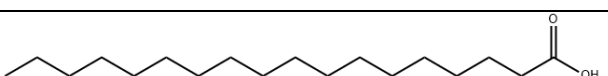

1.4. Ácidos grasos

Como ya se ha mencionado se estudió la influencia de la composición cuticular foliar en la captación de HAPs atmosféricos y la cutícula está compuesta mayoritariamente por ácidos grasos. Por ello este trabajo se centró en la extracción y análisis de 10 ácidos grasos objetivos de las muestras foliares (*Tabla 1.1*).

Los ácidos grasos son ácidos carboxílicos con cadenas hidrocarbonadas de 4 a 36 carbonos sin ramificar. Esta cadena puede contener o no dobles enlaces (cis), se habla entonces de ácidos grasos insaturados o saturados, respectivamente. Son moléculas anfipáticas en las que la cadena hidrocarbonada es apolar mientras que el grupo carboxílico es polar, lo que explica su poca solubilidad en agua y su gran solubilidad en disolventes orgánicos.

Los puntos de fusión (T_f) están muy influenciados por la longitud y saturación de la cadena hidrocarbonada. En general a mayor longitud y saturación más elevada es la temperatura de fusión debido a los enlaces de Van der Waals que se forman entre las cadenas.¹⁹ Presentan puntos de ebullición (T_e) muy elevados, por lo que son líquidos o sólidos a temperatura ambiente (25 °C). Es por ello por lo que, para poder determinarlos mediante cromatografía de gases, es necesario derivatizarlos (a ésteres metílicos, por ejemplo) para mejorar su volatilidad.

Tabla 1.1: Nomenclatura, estructura y características de los 10 ácidos grasos estudiados en las muestras de hojas.²⁰

Compuesto	Nombre IUPAC	CAS	Estructura	Peso Molecular	T _f (°C)	T _e (°C)
Ácido eicosapentaenoico	Ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico	10417-94-4		302,45	-54	439
Ácido nonadecanoico	Ácido nonadecanoico	646-30-0		298,5	69	297
Ácido heptadecanoico	Ácido heptadecanoico	506-12-7		270,45	60	227
Ácido decanoico	Ácido decanoico	334-48-5		172,26	30	269
Ácido oleico	Ácido (Z)-octadeca-9-enoico	112-80-1		282,46	13	360
Ácido linoleico	Ácido (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienoico	60-33-3		280,45	-5	230
Ácido linolénico	Ácido (9Z,12Z,15Z)-octadeca-9,12,15-trienoico	463-40-1		278,43	-11	231
Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	544-63-8		228,37	53	250
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	57-11-4		284,48	70	361
Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	57-10-3		256,42	62	352

*Temperatura de fusión (T_f) y temperatura de ebullición (T_e)

1.5. Estado del arte

Antes de comenzar a desarrollar la metodología experimental fue necesario realizar una recopilación bibliográfica sobre la disponibilidad de metodologías analíticas para la determinación de la composición de las ceras cuticulares. Los resultados de esta búsqueda se resumen en la *Tabla 1.2*.

Como se puede observar no se han encontrado procedimientos de extracción y análisis de las ceras cuticulares foliares de la especie objetivo.

La mayoría de los métodos de extracción disponibles hasta el momento se basan simplemente en la inmersión de la muestra en el disolvente extractante, empleando mayoritariamente grandes volúmenes de disolventes clorados (cloroformo y diclorometano), los cuales presentan elevada toxicidad humana y ambiental. Por ello es preciso poner a punto una alternativa metodológica más respetuosa con el medio ambiente, que se atenga a los principios de la Química Verde, mediante el uso de disolventes menos tóxicos y en volúmenes menores.

Además, se buscó reducir el tiempo de extracción mediante el uso de técnicas que aceleraran la extracción sólido-líquido (inmersión de la muestra sólida que contiene el analito en un disolvente en el que es soluble). Las técnicas que se testaron fueron la extracción asistida por agitación y por ultrasonidos (Ultrasound-Assisted Extraction, UAE).

Como se observa en la *Tabla 1.2*, se emplea mayoritariamente como técnica de análisis la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). Tanto la técnica de análisis por CG-MS como la derivatización previa que hay que llevar a cabo para el análisis de ácidos grasos ya habían sido optimizadas anteriormente en el grupo de investigación LIDSA, por lo que nos decantamos por ellas.

Tabla 1.2: Resumen de los diferentes métodos de extracción y análisis para la determinación de la composición de las ceras cuticulares recopilados.

Autores	Año	Revista	Muestra	Extracción	Descripción del método de extracción	Análisis	Método de derivatización
Zabka <i>et al.</i> ²¹	2008	New Phytologist	Hojas de <i>Hordeum vulgare</i>	Cloroformo	Inmersión, 2min, 20mL Evaporación del disolvente a temperatura ambiente bajo un flujo de N ₂	GC-FID y GC-MS	Sililación con bis-N, O-trimetilsililtri-fluoroacetamida (BSTFA) en piridina (30 min, 70°C)
Halinski <i>et al.</i> ²²	2012	Journal of food composition and analysis	Hojas de <i>Solanum macrocarpon</i>	Diclorometano	Inmersión, 40s, 80 mL Secado con Na ₂ SO ₄ anhidro, filtración y evaporación del disolvente a baja presión	HPLC-ELSD, cromatografía flash, GC-FID y GC-MS	----
Trivedi <i>et al.</i> ²³	2021	Food Chemistry	Arándanos	Cloroformo	Inmersión, 1min, 15mL Evaporación del disolvente a temperatura ambiente bajo un flujo de N ₂	GC-MS	Sililación
Bourgault <i>et al.</i> ²⁴	2020	Annals of Botany	Hojas de <i>Zea mays</i>	Cloroformo, cloroformo:hexano (1:1) y hexano:dietiléter (9:1)	Inmersión y agitación suave, 1 min Con cloroformo testaron diferentes tiempos de extracción (0'5, 1, 3, 5 min) No se encontraron diferencias significativas entre disolventes y tiempos	GC-FID y GC-MS	Sililación con BSTFA en piridina (bajo N ₂ , agitación, 10 min, 110°C)
Klavins, Klavins ²⁵	2020	Foods	Bayas	Cloroformo y hexano:etilacetato (1:1)	Inmersión, 100mL, 30s Evaporación del disolvente en el rotavapor y en un baño de agua (40°C) bajo atmósfera de N ₂ .	GC-MS	Sililación con BSTFA en piridina (1h, 60°C)
Simões <i>et al.</i> ²⁶	2020	Plants	Hojas de <i>Quercus suber</i>	Diclorometano	6h, Extractor Soxhlet. Evaporación del disolvente.	GC-MS	Sililación con BSTFA en piridina (30 min, 60°C)
Chai <i>et al.</i> ²⁷	2020	Food Chemistry	Manzanas	Cloroformo	Inmersión y agitación, 1h Evaporación del disolvente a temperatura ambiente bajo un flujo de N ₂	GC-MS	Sililación con BSTFA (40 min, 70°C)

Serrano <i>et al.</i> ²⁸	2012	(Patente)	Aceites vegetales	---	---	HPLC acoplado a GC-FID y GC-MS mediante TOTAD	---
Jouraeva <i>et al.</i> ²⁹	2002	Environmental Pollution	Hojas de <i>Tilia x euchlora</i> y <i>Pyrus calleryana</i>	Cloroformo	Primera extracción 15min y segunda 5min Secado y pesada.	Pesada	---
Tian <i>et al.</i> ³⁰	2008	Environmental Pollution	Hojas de <i>Pinus massoniana</i> , <i>Cunninghamia lanceolata</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> , <i>Acacia auriculaeformis</i> , <i>Acacia mangium</i> y <i>Schima superba</i> .	Diclorometano:hexano (1:1)	3g de muestra, 48h. Concentración, secado y pesada.	Pesada	---
Razeq <i>et al.</i> ³¹	2014	Phytochemistry	Semillas, raíces y partes aéreas de <i>Camelina sativa</i>	Cloroformo	Inmersión, 30s, 8-24mL	GC-FID y GC-MS	Sililación con bis-N, O-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) en piridina bajo un flujo de N ₂ (100 µL, 10 min, 110°C) y evaporación. Heptano:tolueno (1:1 v/v) para análisis GC.
Wang <i>et al.</i> ³²	2021	Journal of Plant Growth Regulation	Peras	Metanol:cloroformo (1:3)	Inmersión, 75s. Concentración, secado bajo un flujo de N ₂ a 40°C y pesada.	GC-MS	Metilación con trifluoruro de boro en metanol. 50mg cera y 50mL de reactivo (5 min, 70°C)

1.5.1. Técnicas de extracción

Las dos técnicas testadas tienen como finalidad acelerar la extracción sólido-líquido. Esta extracción consiste en una transferencia de materia entre un líquido y un sólido insoluble. En ella el analito de interés que está retenido en la matriz del sólido pasa a la fase líquida en la que está inmersa la muestra.

1.5.1.1. Extracción asistida por agitación

La extracción sólido-líquido asistida por agitación es la metodología más sencilla y tradicional. Consiste en agitar la muestra inmersa en el extractante, en el que es soluble el analito, empleando un equipo agitador como el agitador vórtex (*Figura 1.4*). Este tipo de extracción mejora la tasa de transferencia de materia sobre la simple inmersión, ya que esta transferencia no ocurre simplemente por fenómenos difusivos (gradiente de concentración) sino que, al encontrarnos en un régimen turbulento, también se produce por convección (transferencia debida al movimiento del fluido).

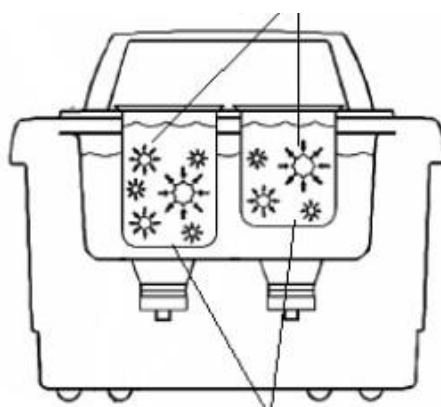


Figura 1.4: Esquema de un agitador vórtex.³³

1.5.1.2. Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos utiliza sonidos de alta frecuencia que generan en el líquido extractante ciclos fluctuantes de baja y alta presión, creando microburbujas de vacío que van aumentando de tamaño hasta que colapsan (*Figura 1.5*). Este fenómeno se conoce como cavitación. Durante la implosión se alcanzan localmente altas temperaturas, presiones y corrientes lo que ayuda a desprender el analito del material vegetal.

Formación de burbujas internas que implosionan



Hojas inmersas en el disolvente de extracción

Figura 1.5: Esquema de extracción asistida por ultrasonidos.³⁴

1.5.2. Técnica de análisis

1.5.2.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica que permite la separación de mezclas complejas que presenten compuestos volátiles o semivolátiles termoestables. El problema que presenta esta técnica es que una vez separados, detectados y cuantificados los compuestos individuales de la muestra, tan solo disponemos del tiempo de retención de los diferentes picos cromatográficos para su identificación, para lo que debemos disponer de sus patrones. No es una técnica que por sí sola nos permita una identificación inequívoca de los analitos.³⁵

En cambio, la espectrometría de masas permite la identificación casi inequívoca de cualquier sustancia pura, pero no de mezclas. Por ello la combinación de ambas técnicas nos permite la identificación absoluta de los componentes de una mezcla compleja, y del análisis cuantitativo de ellos si se tiene disponibilidad de los correspondientes patrones.³⁵

El mecanismo de actuación de las técnicas combinadas es el descrito a continuación (Figura 1.6).

La muestra se inyecta en el cromatógrafo de gases donde se volatilizan los componentes. Pasan a la fase móvil, un gas inerte, que se emplea para transportar los analitos a lo largo de la columna cromatográfica en la que se encuentra fijada la fase estacionaria. La columna se encuentra dentro de un horno con programación de

temperatura. La diferente afinidad entre cada analito y la fase estacionaria da lugar a que la velocidad de migración de cada uno de ellos por la columna sea diferente, lo que permite su separación. Cada analito presentará un tiempo de retención en la columna diferente.³⁵

Tras la separación, los compuestos van entrando en el espectrómetro de masas donde se produce la ionización de cada uno de los compuestos individuales a medida que salen de la columna. El sistema de ionización empleado es el de ionización electrónica (Electron Ionization, EI), que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón y así ionizarlas.³⁵

A mayores de los iones moleculares (M^+) se forman fragmentos ionizados debido a la descomposición de los iones moleculares con exceso de energía. La proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característica de las moléculas analizadas y de las condiciones del proceso de ionización, por lo que el espectro de masas obtenido del analito puro es diferente para cada compuesto químico. Este espectro puede compararse con los espectros de una librería de espectros para identificarlo inequívocamente.³⁵

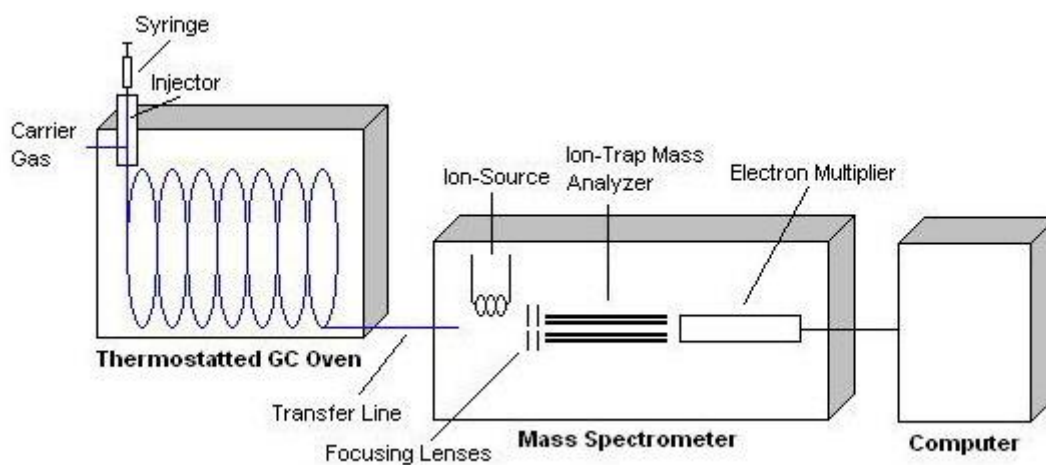


Figura 1.6: Esquema de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.³⁶

2. Objetivos y justificación

El objetivo de este trabajo es la optimización de un proceso de extracción y análisis mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS) de ciertos ácidos grasos objetivo que conforman las ceras cuticulares de las hojas de la especie arbórea seleccionada para el estudio.

La motivación que subyace tras este trabajo es el estudio de la aplicación de especies arbóreas ornamentales como biorremediadoras de la contaminación atmosférica, especialmente de especies orgánicas consideradas contaminantes prioritarios como son los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Para ello, en colaboración con el grupo de investigación ECOTOX, se pretende conocer el efecto que juega la composición cuticular de las hojas de *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte, junto con otros rasgos ecológicos, en la captación de HAPs.

Para poder llevar a cabo esa investigación, fue necesario la elaboración de un método analítico rápido, sencillo, económico, fiable y respetuoso con el medio ambiente, que permitiera la determinación de los ácidos grasos ahí presentes. En concreto, el trabajo se enfocó en el análisis de los 10 ácidos grasos que se muestran en la *Tabla 1.1*.

Por ello, los objetivos perseguidos con el presente Trabajo de Fin de Grado se resumen en:

- Desarrollo y optimización de un método de extracción de la cera cuticular.
- Validación de la metodología propuesta para la extracción y determinación de los ácidos grasos.
- Aplicación de la metodología a una serie de muestras de hojas recogidas en el emplazamiento seleccionado para determinar su composición en ácidos grasos.

3. Procedimiento experimental

3.1. Material y reactivos

3.1.1. Material

- Micropipetas automáticas de 5-50 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL .
- Puntas para micropipetas.
- Encapsulador y desencapsulador.
- Soportes para viales.
- Viales de vidrio transparentes de 10 mL.
- Viales de vidrio transparentes de 2 mL.
- Cápsulas de aluminio con septum de teflón para viales de 10 mL y 2 mL.
- Filtros de jeringa de teflón de 0,22 μm .
- Jeringas de polipropileno de 2 mL.
- Espátulas y pinzas.
- Equipo de protección individual (EPI): bata de laboratorio, gafas de seguridad, guantes de nitrilo y mascarilla para uso sanitario.

3.1.2. Reactivos y disolventes

- Acetato de etilo (AcOEt), Scharlab, Barcelona, España.
- Metil tert-butil éter (MTBE), TCI, Kyoto, Japón.
- Hidróxido de trimetilsulfonio (TMSH), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Acetona, Scharlab, Barcelona, España.
- Diclorometano, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Cloroformo, Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Hexano, Scharlab, Barcelona, España.

Todos los reactivos y disolventes empleados son de grado analítico.

3.1.3. Patrones

- Ácido eicosapentaenoico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido nonadecanoico (99%), TCI, Kyoto, Japón.

- Ácido heptadecanoico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido decanoico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido oleico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido linoleico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido linolénico (98%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido mirístico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido esteárico (98,5%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.
- Ácido palmítico (99%), Sigma Aldrich, Steinheim, Alemania.

3.1.4. Gases

- Nitrógeno (99,999%) en el sistema de secado por corriente de nitrógeno, Nippon Gases, Madrid, España.
- Helio (99,999%) como gas portador del cromatógrafo de gases, Nippon Gases, Madrid, España.

3.2. Instrumentación

- Balanza analítica de precisión, Sartorius, Goettingen, Alemania.
- Baño de ultrasonidos, JP Selecta, Barcelona, España.
- Agitador vórtex con adaptador multiposición, Velp Scientifica, Usmate, Italia.
- Campana extractora.
- Sistema de secado por corriente de nitrógeno, VLM, Bielefeld, Alemania.
- Cromatógrafo de gases y espectrómetro de masas, Agilent 7890 A-5975C.

3.3. Preparación de las disoluciones patrón

Durante el desarrollo del proceso experimental fue necesaria la utilización de diversas disoluciones patrón de concentración conocida. Para su preparación se emplearon las disoluciones concentradas de cada uno de los ácidos grasos objetivo elaboradas previamente a partir del producto comercial puro.

A partir de estas disoluciones individuales concentradas se preparó el resto de las disoluciones patrón:

- Se elaboraron dos disoluciones que contenían una mezcla de todos los ácidos grasos objetivo en una concentración de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en acetona. Estas disoluciones se emplearon en el estudio de recuperación de los compuestos para fortificar las muestras y como patrones.
- Para la realización de las curvas de calibrado se prepararon distintas disoluciones patrón en un rango de concentraciones desde 10 a 10 000 ng/mL . Para ello, en primer lugar, se elaboró una mezcla en acetato de etilo de todos los compuestos a partir de las disoluciones individuales concentradas. Posteriormente, empleando esa mezcla, por dilución se obtuvieron los distintos niveles del calibrado.

3.4. Origen de las muestras

Las muestras de hojas empleadas en este trabajo corresponden a dos especies de árboles ornamentales caducifolios pertenecientes a la familia de las Rosáceas, *Prunus cerasifera* Pissardii (ciruelo rojo) y *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte (manzano japonés).

Las muestras de hojas de *Prunus cerasifera* se obtuvieron de árboles situados en la plaza Rodríguez Cadarso, Santiago de Compostela en febrero de 2021. Las de *Malus floribunda* se recogieron en la calle Juan Flórez, A Coruña en abril de 2021.



Figura 3.1: Hojas de *Prunus cerasifera* Pissardii (izquierda)³⁷ y *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte (derecha)³⁸.

3.5. Extracción mediante UAE

El método de extracción empleado para la determinación de los ácidos grasos objetivo que conforman las ceras cuticulares de la especie estudiada fue la extracción asistida por ultrasonidos. A continuación, se describe la metodología optimizada seguida para la extracción de las muestras (*Figura 3.2*).

En primer lugar, se pesan 0,2 g de fragmentos de hojas frescas del árbol de interés (1) sobre los que se añaden 2 mL de acetato de etilo (2). Seguidamente se introduce la muestra en un baño de ultrasonidos durante 2 min para acelerar la extracción (3), tras lo cual se recogen 200 μ L de extracto (4 y 5) que se diluyen en acetato de etilo hasta un volumen final de 1 mL (6). De esta dilución se toman 100 μ L (7) para concentrarlos hasta sequedad en un sistema de secado por corriente de nitrógeno (8). El sólido restante se reconstituye en 500 μ L de MTBE (9). Posteriormente se lleva a cabo la derivatización de los ácidos grasos siguiendo el proceso optimizado previamente por el grupo de investigación³⁹. Para ello se hace reaccionar la disolución con 50 μ L de TMSH, un agente alquilante, durante 30 minutos en oscuridad (10). Una vez finalizada la reacción se añaden 450 μ L de MTBE (11). La dilución se filtra empleando filtros de jeringa (12) y se analiza mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (13).

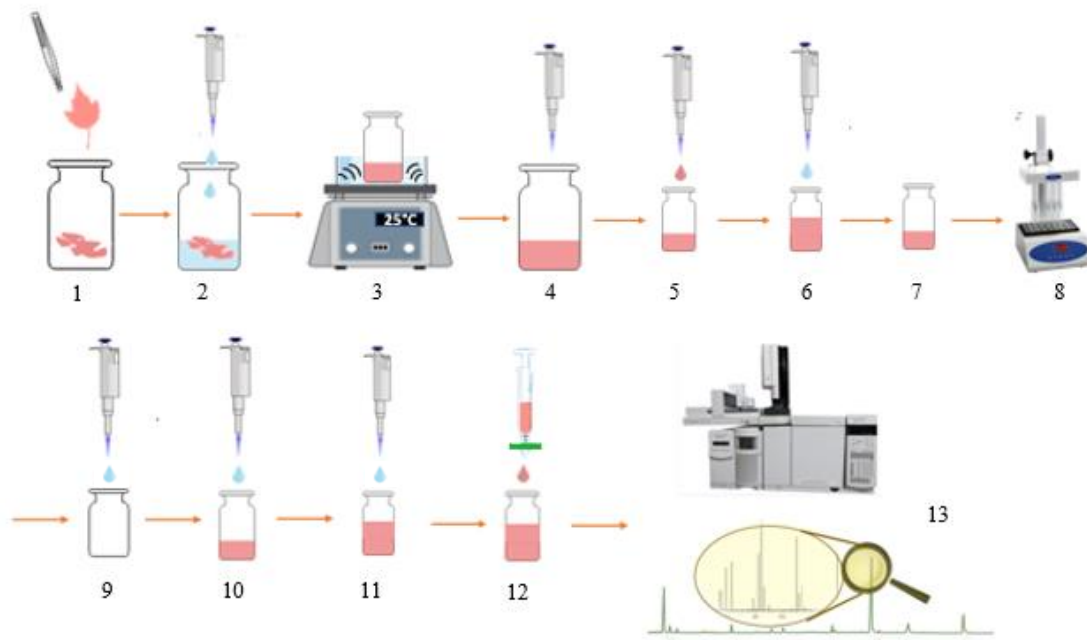


Figura 3.2: Esquema del procedimiento de extracción mediante UAE.

3.6. Condiciones de determinación mediante CG-MS

Los análisis mediante CG-MS se llevaron a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5975C con detector de triple eje y un muestreador automático Agilent 7693 de Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

Las condiciones de determinación de los ácidos grasos mediante CG-MS, que fueron optimizadas previamente en el grupo de investigación para llevar a cabo una separación e identificación eficiente de los ácidos grasos ⁴⁰, se describen a continuación.

Para la separación cromatográfica se empleó una columna ZEBRON ZB-Semivolátiles (30 m x 0.25 mm d.i., 0,25 µm espesor) de la casa comercial Phenomenex (Torrance, CA, USA), con una rampa de temperatura que comenzó en 60 °C (1 min) hasta 150 °C (2 min) a 20 °C min⁻¹ y una rampa final hasta 290°C a 10°C min⁻¹ (10,5 min). El tiempo total de análisis fue de 32 min.

Se empleó helio (pureza 99,999%) como gas portador a un flujo constante de 1 mL min⁻¹.

Se inyectó 1 µL de muestra en splitless (1,2 min) y la temperatura del inyector se mantuvo a 260 °C.

El detector de espectrometría de masas (Mass Spectra Detector, MSD) operó en el modo de ionización electrónica (Electron Ionization, EI) en modo positivo (+70 eV). La temperatura de la fuente de iones y de la línea de transferencia fue 150 °C y 290 °C, respectivamente. Se empleó el modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (Selected Ion Monitoring, SIM), monitorizando 3 o 4 fragmentos masa/carga (m/z) para cada uno de los compuestos objetivo para obtener su inequívoca identificación (*Tabla 4.1*).

4. Resultados y discusión

En la presente sección de la memoria se describe todo el proceso que tuvo lugar para el desarrollo del procedimiento experimental (sección 3) y los resultados que se fueron obteniendo.

Lo primero que se llevó a cabo fue la identificación de los ácidos grasos presentes en las muestras que fueran de interés para el estudio.

Posteriormente se optimizaron los parámetros experimentales del método de extracción. Esta optimización se llevó a cabo en tres etapas. Primero se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer el estado del arte sobre la disponibilidad de metodologías analíticas para la determinación de la composición de las ceras cuticulares de especies vegetales. Los resultados de esta investigación se mostraron en el apartado 1.5. En segundo lugar, se realizaron experimentos preliminares para acotar el rango experimental y, por último, se elaboró el diseño experimental.

Para los ensayos preliminares y el diseño experimental se empleó una especie diferente a la de objeto de estudio debido que no disponíamos de muestras de hojas de *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte en el momento en el que se comenzó el trabajo experimental. Esta es una especie caducifolia y todavía no había brotado, por ello para poder empezar a trabajar se escogió la especie de Rosácea, que brota primero, *Prunus cerasifera* Pissardii. Ambas especies pertenecen a la misma familia, por lo que las características de las hojas son muy similares. Además, posteriormente se comprobó que la metodología desarrollada con la especie *Prunus cerasifera* era perfectamente válida para su aplicación en la especie *Malus floribunda*.

Para finalizar la etapa experimental se aplicó la metodología optimizada a una serie de muestras reales de *Malus floribunda*.

4.1. Identificación de los ácidos grasos

Para poder identificar y cuantificar inequívocamente en el CG-MS los ácidos grasos objetivos presentes en las muestras se empleó el modo de adquisición de monitoreo de iones seleccionados (SIM).

Para ello se derivatizó una disolución patrón preparada en acetato de etilo que contenía una mezcla de todos los ácidos grasos en estudio y se introdujo en el CG-MS en modo *full scan* 44-800 m/z. De esta forma conseguimos el cromatograma completo de la disolución y para cada uno de los picos presentes obtuvimos su espectro de masas. Esto nos permitió identificar mediante comparación con el espectro teórico de la biblioteca de espectros NIST el compuesto al cual correspondía dicho pico.

Así obtuvimos el tiempo de retención al que eluye cada analito y pudimos seleccionar sus fragmentos de iones identificativos (*Tabla 4.1*), con el fin de que al introducir las muestras en el CG-MS, este realizara un cribado y que el cromatograma tan solo mostrase los picos de los iones seleccionados y que eluyen al tiempo de retención marcado para obtener una mayor selectividad y sensibilidad en la medida.

Tabla 4.1: Identificación de los ácidos grasos objetivo en modo SIM.

Compuesto	CAS	TR (min)	Ion cuantificación (m/z)	Iones confirmación (m/z)
Ácido eicosapentaenoico	10417-94-4	17,032	79	91 (79), 105 (40,4), 119 (31,5)
Ácido nonadecanoico	646-30-0	16,714	74	87 (77,2), 312 (3,8), 269 (10,8)
Ácido heptadecanoico	506-12-7	14,839	74	87 (75,2), 241 (11,1), 284 (2,9)
Ácido decanoico	334-48-5	6,505	74	87 (57,1), 143 (15,4)
Ácido oleico	112-80-1	15,554	55	74 (50), 83 (21,1)
Ácido linoleico	60-33-3	15,485	81	67 (113,5), 95 (69,6)
Ácido linolénico	463-40-1	15,544	79	95 (50,6), 108 (30,5)
Ácido mirístico	544-63-8	11,572	74	87 (68,7), 143 (15,7)
Ácido esteárico	57-11-4	15,793	74	87 (75,8), 143 (18,7)
Ácido palmítico	57-10-3	13,812	74	87 (72,5), 43 (24,9), 55 (20,7)

*Los datos entre paréntesis indican el porcentaje de ese ion respecto al pico del ion cuantificación.

En la *Figura 4.1* se presenta el cromatograma de ion total (Total Ion Chromatogram, TIC) de un patrón que contiene una mezcla de los 10 ácidos grasos objetivo derivatizados.

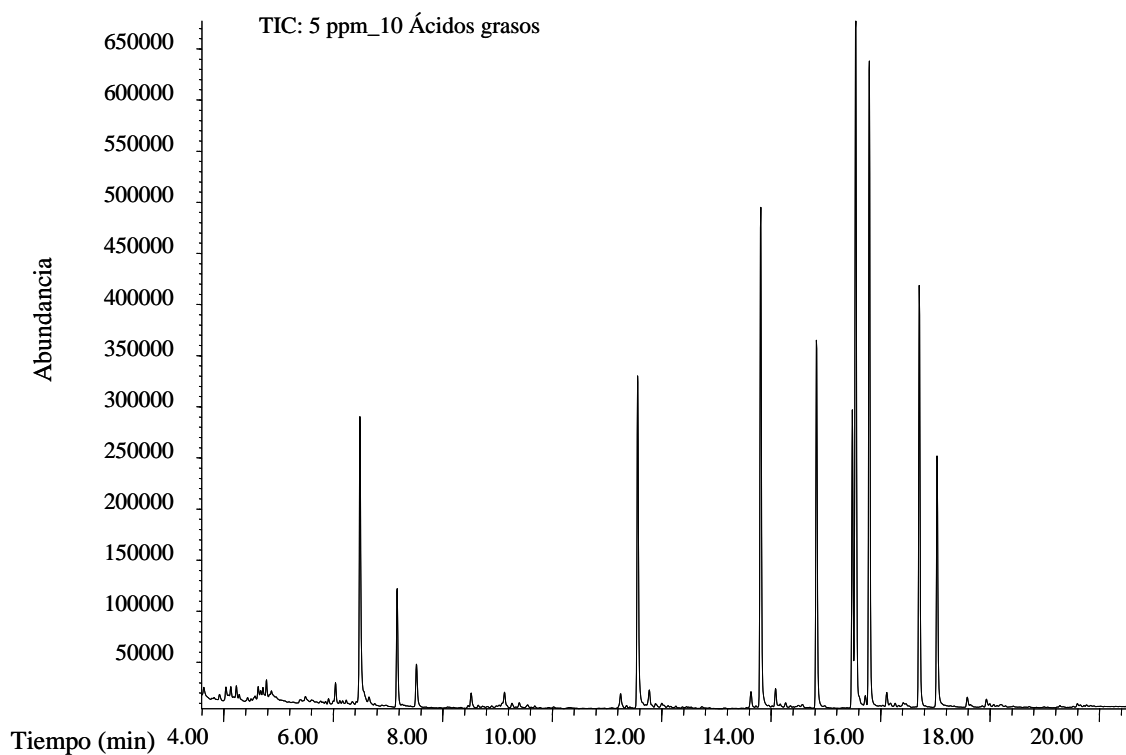


Figura 4.1: Cromatograma TIC de una disolución patrón de 5 $\mu\text{g/g}$ de los 10 ácidos grasos de estudio metilados.

A modo de ejemplo se muestran en las *Figuras 4.2 y 4.3* los cromatogramas de ion extraído (Extracted Ion Chromatogram, EIC) del ácido esteárico y del ácido palmítico y sus correspondientes espectros de masas.

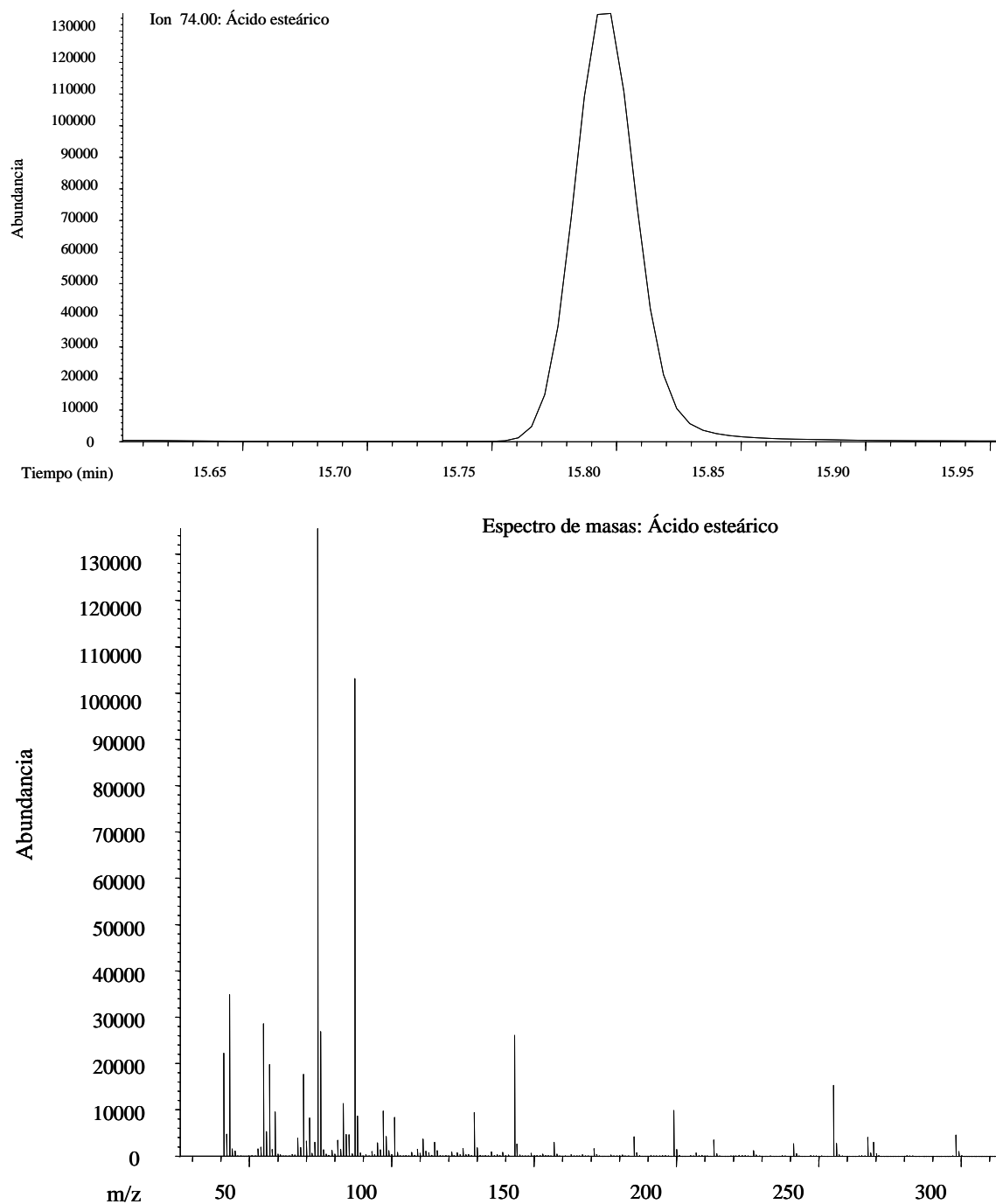


Figura 4.2: Cromatograma EIC del ion 74 del ácido esteárico metilado (arriba) y su espectro de masas (abajo).

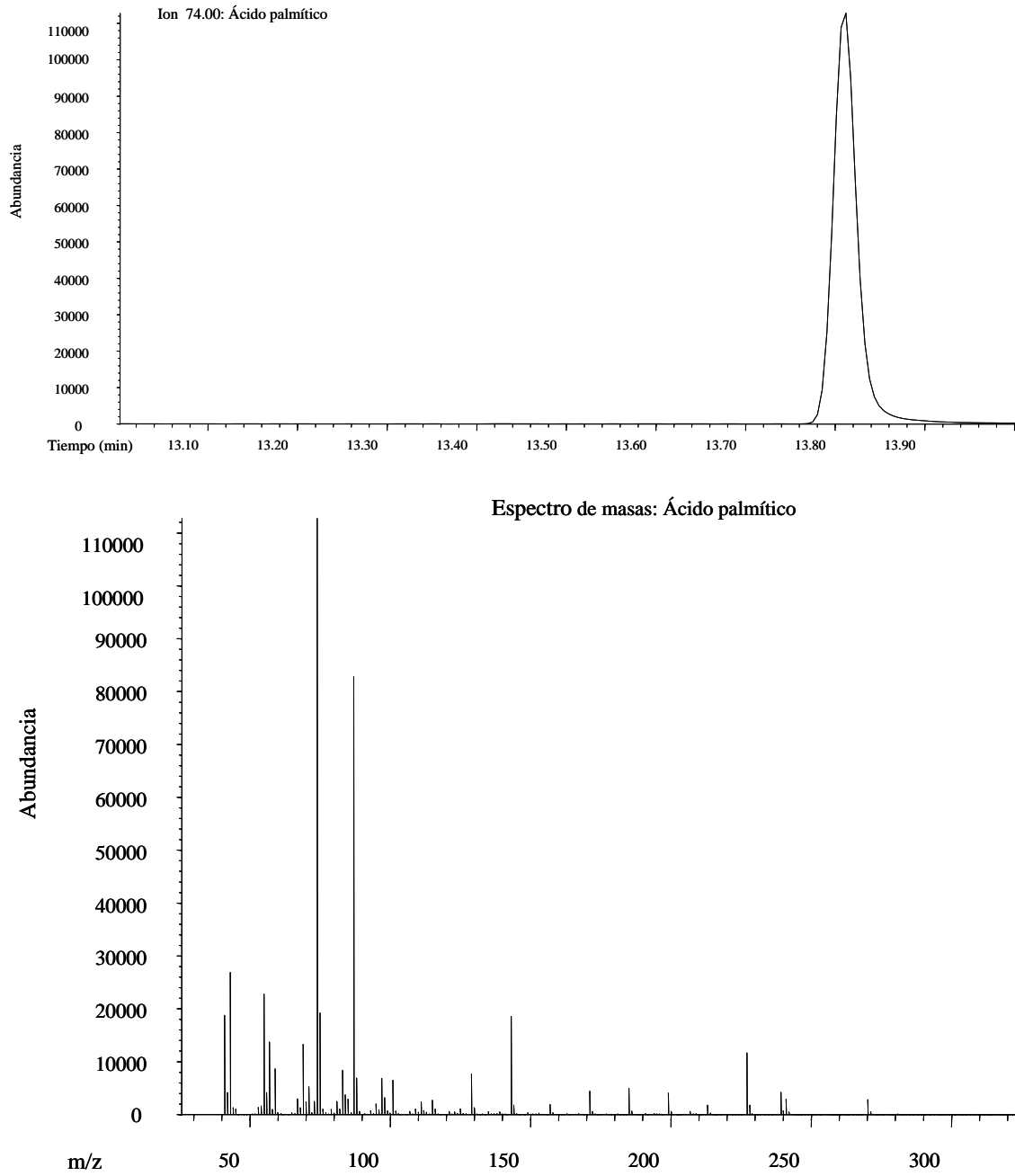


Figura 4.3: Cromatograma EIC del ion 74 del ácido palmítico metilado (arriba) y su espectro de masas (abajo).

4.2. Optimización de los parámetros experimentales

De los datos bibliográficos obtenidos (apartado 1.5) se decidieron las condiciones y los disolventes con los que realizar los ensayos preliminares de extracción, y a partir de esos resultados se hizo un cribado de las condiciones de extracción a estudiar en el diseño experimental.

4.2.1. Ensayos preliminares

Los factores experimentales que se ensayaron en las pruebas preliminares de extracción fueron el disolvente de extracción, el procesado de las hojas previo a la extracción y la técnica de extracción (*Tabla 4.2*).

Tabla 4.2: Resumen de las condiciones experimentales estudiadas en los ensayos preliminares.

Factores		
Muestra	Disolvente	Técnica
Hojas enteras	Diclorometano	Vórtex
	Cloroformo	
Hojas partidas	Acetato de etilo	UAE
	Hexano	

La elección del extractante depende de la solubilidad del analito a extraer, y de la volatilidad y toxicidad de los posibles disolventes a emplear. Según los datos bibliográficos recabados, los disolventes que se emplean mayoritariamente para la extracción de las ceras cuticulares son el diclorometano y el cloroformo. También en menor medida el hexano. Por sus características como disolvente también se testó la extracción de los ácidos grasos en acetato de etilo. En la *Tabla 4.3* se muestran las características de estos disolventes.

Tabla 4.3: Características de los disolventes empleados en los ensayos preliminares.

Compuesto	CAS	Momento dipolar a 20°C (D)	Punto de ebullición (°C)	Peligrosidad
Diclorometano	75-09-2	1,14	41	Tóxico
Cloroformo	67-66-3	1,15	61	Tóxico
Acetato de etilo	141-78-6	1.88	78	Inflamable, irritante
Hexano	110-54-3	0.08	69	Inflamable

Se decidió estudiar la influencia del procesado previo de las muestras en la determinación de los ácidos grasos cuticulares para conocer si se podían emplear hojas

troceadas o si por el contrario era necesario usarlas enteras debido a la existencia de interferencias en la medida provocadas por los componentes del interior de las hojas.

También se probaron dos técnicas para evaluar su capacidad de acelerar la extracción de los analitos de las hojas. Estas fueron extracción asistida por agitación que emplea un agitador vórtex y extracción asistida por ultrasonidos (UAE).

En todos los ensayos se empleó el mismo protocolo cambiando uno de los factores mencionados de cada vez para ver su influencia en la extracción.

El protocolo seguido fue: pesar 0,2 g de hoja, extraer con 2 mL de disolvente, tomar un extracto de 100 μ L, secar el disolvente bajo un flujo de nitrógeno, derivatizar y analizar en el CG-MS siguiendo en ambos casos la metodología previamente optimizada en el grupo de investigación. La dilución total realizada a los analitos de la muestra tras todo el procedimiento experimental sería de 1:100.

Los ensayos realizados y sus resultados se describen a continuación.

En primer lugar, se estudió si realizar la extracción con hojas enteras u hojas partidas variaba los resultados obtenidos. Se comprobó que, para los cuatro disolventes, las respuestas fueron similares independientemente del procesado o no de la muestra, por ello se decidió trabajar con hojas partidas, ya que nos garantizaban el poder emplear baja cantidad de hoja y bajos volúmenes de extractante.

En segundo lugar, se evaluó la capacidad de extracción de los 4 disolventes seleccionados. Se realizaron dos réplicas por experimento para disponer de datos de error. Se observó que todos los ácidos grasos estudiados presentan una mayor respuesta, en mayor o menor medida, si la extracción se realiza con hexano, excepto el ácido linoleico que presenta mayor respuesta con acetato de etilo (*Figura 4.4*). Con los otros dos disolventes, diclorometano y cloroformo, la respuesta fue mucho menor, por lo que no se tuvieron en cuenta en el diseño experimental.

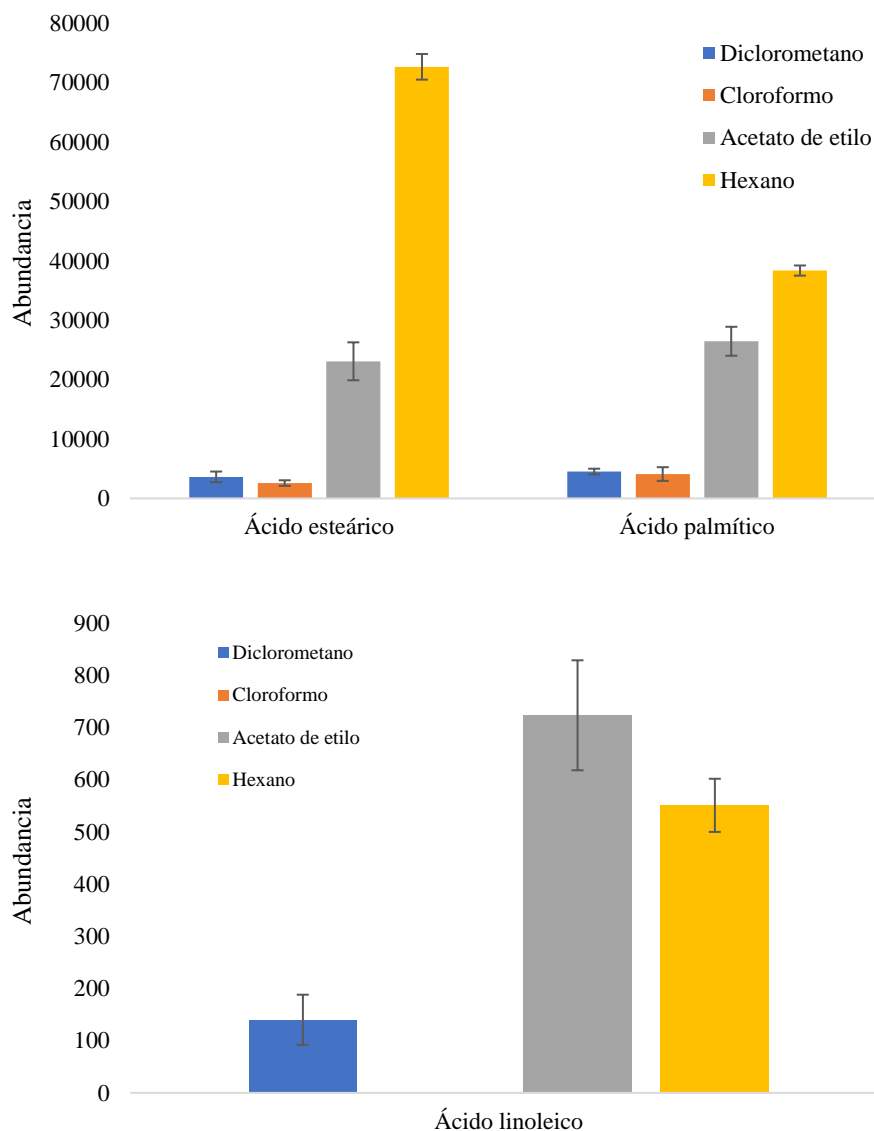


Figura 4.4: Comparación de la respuesta obtenida en tres de los ácidos grasos de estudio en función del disolvente empleado para la extracción.

Con respecto a la técnica empleada en la extracción no se encontró gran diferencia entre usar un agitador vórtex o un baño de ultrasonidos, por lo que se decidió evaluar este factor también en el diseño experimental con el fin de afinar su posible implicación en la extracción.

4.2.2. Diseño experimental

Tras las pruebas preliminares se acotó el rango de condiciones experimentales a aquellas que eran dignas de un mayor análisis. Los parámetros que se optimizaron con el diseño experimental fueron el tiempo, la técnica y el disolvente de extracción. En la *Tabla 4.4* se muestran los factores seleccionados y sus niveles.

Tabla 4.4: Niveles de los factores considerados para la elaboración del diseño experimental.

Factores	Nivel bajo	Nivel intermedio	Nivel alto
Tiempo (min)	2	6	10
Técnica	UAE	-	Vórtex
Disolvente	AcOEt	-	Hexano

Para la optimización de estos tres factores se empleó un diseño factorial 3x2x2 que consta de 12 experimentos, 10 variables respuesta (los 10 analitos de estudio) y 2 grados de libertad para el error. La matriz del diseño se presenta en la *Tabla 4.5*.

Tabla 4.5: Matriz de experimentos del diseño experimental.

Experimento	Tiempo (min)	Técnica	Disolvente
1	2	UAE	AcOEt
2	2	UAE	Hexano
3	2	Vórtex	AcOEt
4	2	Vórtex	Hexano
5	6	UAE	AcOEt
6	6	UAE	Hexano
7	6	Vórtex	AcOEt
8	6	Vórtex	Hexano
9	10	UAE	AcOEt
10	10	UAE	Hexano
11	10	Vórtex	AcOEt
12	10	Vórtex	Hexano

Una vez obtenidos los resultados de los experimentos indicados en la *Tabla 4.5*, se llevaron a cabo los análisis estadísticos de los mismos en el programa *Statgraphics Centurion 18*. Se empleó la técnica de análisis de la varianza (ANOVA) que es una herramienta estadística que permite el estudio del efecto de uno o más factores, cada uno con dos o más niveles, sobre la media poblacional de una variable. En este caso ANOVA nos permite conocer cuáles de los parámetros evaluados son estadísticamente significativos en la extracción de los ácidos grasos cuticulares de estudio.

En la *Tabla 4.6* se observan los factores que afectan significativamente a la extracción con un 95% de confianza. Esto ocurre cuando el valor de p obtenido en el

análisis estadístico es menor de 0,05. Se observa que para la mitad de los compuestos estudiados el factor tiempo de extracción es estadísticamente significativo. Y de forma similar ocurre con el disolvente empleado en la extracción. En cambio, no existen diferencias significativas entre emplear agitador vórtex o UAE como técnicas de extracción para ninguno de los analitos. No se muestran los valores F y p de las interacciones entre dos factores ya que ninguna de las interacciones resultó estadísticamente significativa.

Tabla 4.6: Tabla del análisis de la varianza (ANOVA) que muestra la significancia (valores de F y p) de los factores evaluados en el diseño.

Compuesto	Tiempo		Técnica		Disolvente	
	F	p	F	p	F	p
Ácido eicosapentaenoico	-	-	-	-	-	-
Ácido nonadecanoico	145,86	0,0068	6,69	0,1226	25,9	0,0365
Ácido heptadecanoico	196,95	0,0051	2,93	0,2293	7,39	0,1128
Ácido decanoico	5,92	0,1445	0,88	0,4471	0,9	0,4419
Ácido oleico	0,1	0,9106	3,02	0,2242	17,95	0,0514
Ácido linoleico	2,86	0,259	1,77	0,3149	1,37	0,3619
Ácido linolénico	0,12	0,8908	11,98	0,0743	35,3	0,0272
Ácido mirístico	57	0,0172	1,53	0,3418	7,14	0,1161
Ácido esteárico	324,45	0,0031	9,83	0,0884	27,83	0,0341
Ácido palmítico	55,33	0,0178	7,14	0,1161	21,6	0,0433

*Los valores en **negrita** indican que son estadísticamente significativos ($p < 0,05$).

Cuanto mayor sea el valor de F, más afectado se ve el analito por el factor correspondiente. En este caso vemos que el ácido esteárico se ve muy afectado por el tiempo de extracción y que el ácido linolénico es el que se encuentra más afectado por el disolvente de extracción.

También se realizó un análisis de medias, que es una alternativa gráfica del ANOVA que muestra la igualdad entre medias poblacionales proporcionando la media y su variabilidad. Este tipo de gráfico nos sirve para analizar de forma visual si un factor es significativo en la extracción de un determinado compuesto y a qué nivel del factor conseguimos maximizar su extracción. La *Figura 4.5* muestra dos ejemplos de este tipo de gráficas.

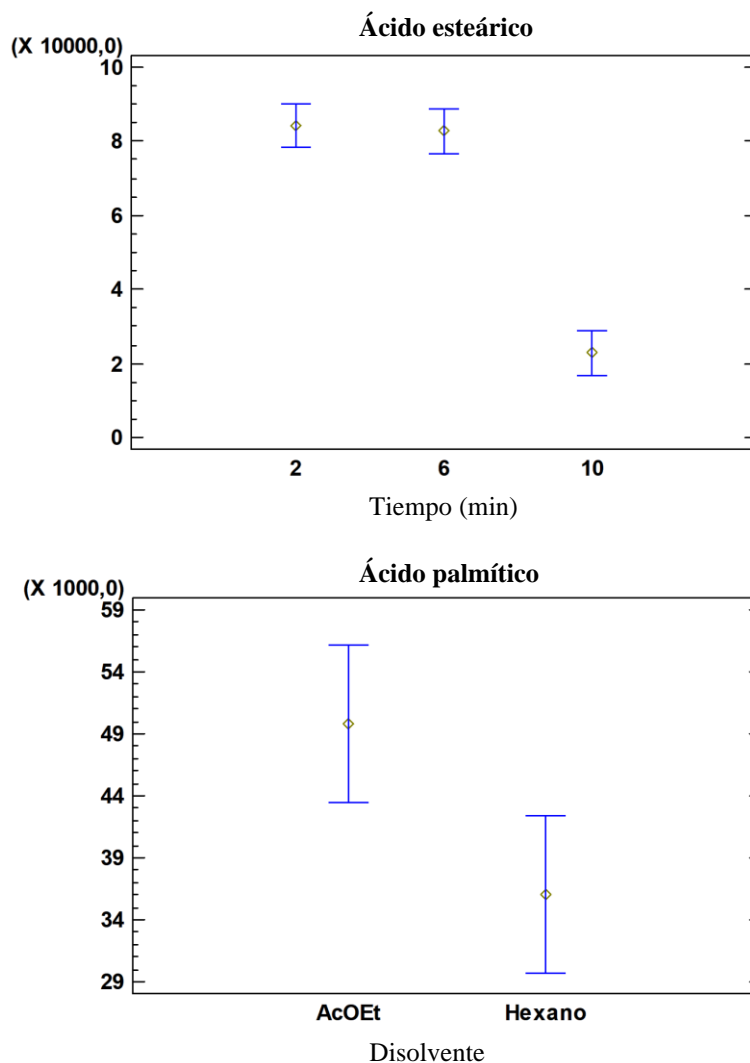


Figura 4.5: Gráficas de medias e intervalos de confianza al 95% de la LSD de Fisher para los factores tiempo y disolvente de extracción de dos de los ácidos grasos de estudio, ácido esteárico y palmítico, respectivamente.

Los resultados que se obtuvieron del análisis estadístico fueron que, para todos los compuestos en los que el tiempo de extracción era significativo, su respuesta se veía maximizada con 2 min de extracción, y para aquellos en los que lo era el disolvente, con acetato de etilo, excepto en el caso del ácido linolénico que se extraía mejor con hexano. Sorprende que el disolvente de extracción favorable en este caso sea acetato de etilo y no hexano como se obtuvo en los ensayos preliminares. Pero hay que tener en cuenta que en el diseño se ve cómo afectan a la extracción todos los factores estudiados de forma simultánea. Aun así, para asegurar que el resultado obtenido en el diseño era el correcto se repitieron algunos puntos experimentales. Como el resultado volvió a ser el mismo se dio por válido.

Puesto que la técnica de extracción no era significativa se escogió emplear UAE por simplicidad y comodidad, ya que permite la ejecución de varias extracciones simultáneamente.

Tras la realización de las pruebas preliminares y del diseño experimental se obtuvo que las condiciones más favorables para llevar a cabo la extracción de los ácidos grasos presentes en la cutícula de las hojas eran las presentadas en la siguiente tabla (*Tabla 4.7*).

Tabla 4.7: Resumen de las condiciones óptimas de extracción de los ácidos grasos cuticulares.

Parámetro experimental	Valor seleccionado
Cantidad de muestra	0,2 g
Procesado de la muestra	Sí
Cantidad de disolvente extractante	2 mL
Disolvente de extracción	AcOEt
Método de extracción	UAE
Tiempo de extracción	2 min

4.3. Estudio de la calidad del método analítico

Para evaluar la fiabilidad del método analítico desarrollado se estudió la linealidad y precisión instrumental, así como la exactitud de los resultados obtenidos en la extracción de los analitos y sus límites de detección y cuantificación.

4.3.1. Validación de la calidad del método instrumental (CG-MS)

4.3.1.1. Linealidad

Para el calibrado se utilizaron disoluciones patrón derivatizadas que contenían una mezcla de los ácidos grasos objetivo en un rango de concentraciones entre 10 ng/mL y 10 µg/mL. Se evaluaron 10 niveles y se realizaron 2 réplicas por nivel. La linealidad se comprobó mediante un análisis de regresión por el método de mínimos cuadrados. La *Figura 4.6* muestra dos gráficas para ejemplificar las curvas de calibrado obtenidas.

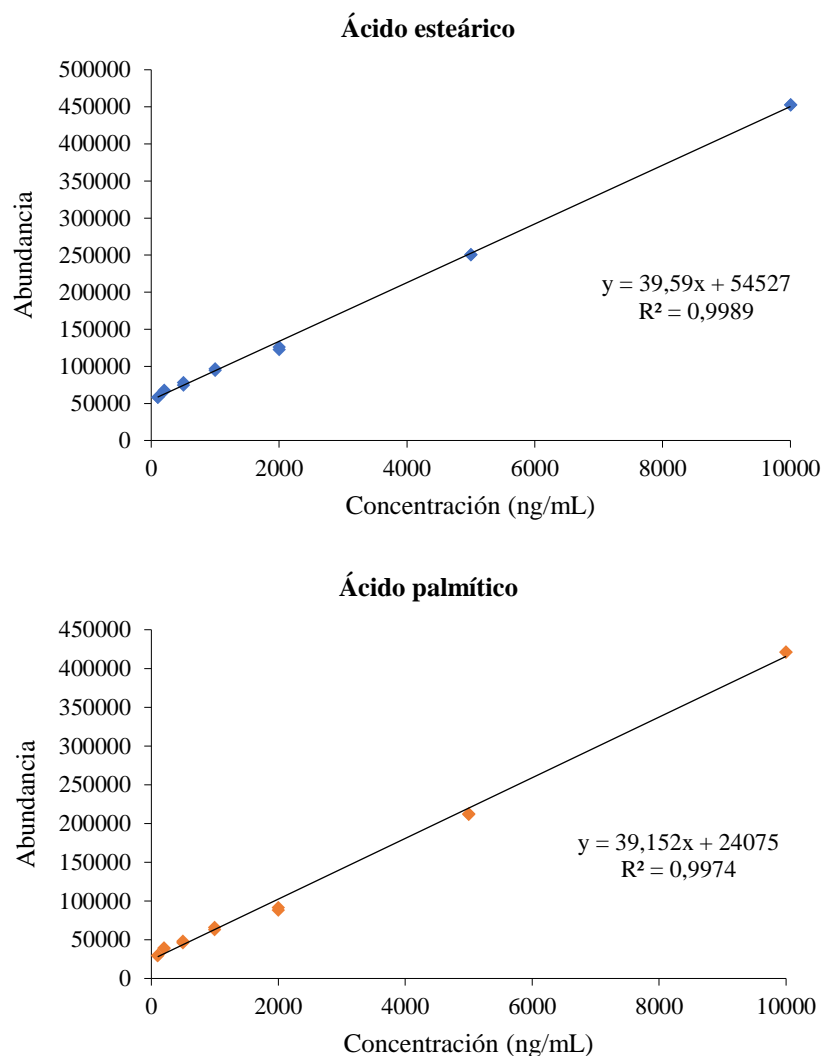


Figura 4.6: Curvas de calibrado del ácido esteárico y del ácido palmítico.

Los límites de detección instrumental (IDLs) se calcularon como la concentración de analito en la disolución patrón de menor concentración que generaba un coeficiente de señal/ruido de 3 ($S/N = 3$).

La *Tabla 4.8* resume los resultados obtenidos en la validación de la calidad del método instrumental. Como se observa, existe una buena linealidad en un amplio rango de concentraciones para todos los compuestos estudiados y la concentración mínima de analito que puede ser detectada con fiabilidad por el método es baja.

Tabla 4.8: Datos de linealidad de los compuestos estudiados y su límite de detección instrumental (IDL).

Compuesto	Rango lineal (ng/mL)	R ²	IDL (ng/mL)
Ácido eicosapentaenoico	200-10 000	0,9928	21,9
Ácido nonadecanoico	10-10 000	0,9955	20,5
Ácido heptadecanoico	50-10 000	0,9955	6,7
Ácido decanoico	10-10 000	0,9971	19,1
Ácido oleico	100-10 000	0,9979	37,6
Ácido linoleico	100-10 000	0,9909	36,8
Ácido linolénico	100-10 000	0,9967	27,4
Ácido mirístico	20-10 000	0,9948	10,1
Ácido esteárico	100-10 000	0,9989	0,4
Ácido palmítico	100-10 000	0,9974	0,8

4.3.1.2. Precisión

Para comprobar la homogeneidad en las medidas se calculó su repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad refleja la precisión de un método cuando se estudia la variación de las mediciones obtenidas del mismo patrón realizadas por el mismo analista, en el mismo equipo y en el mismo día, o lo que es lo mismo, mide la variabilidad de la medida intradía. Por su parte, la reproducibilidad mide la consistencia de la medida tomada en distintos días cuando se realizan sobre el mismo patrón, por el mismo analista y en el mismo equipo, es decir, mide la variabilidad interdía.⁴¹

Para ello se midió en el CG-MS una disolución patrón de 1 µg/mL derivatizada que contenía una mezcla de los compuestos de estudio durante 3 días realizando 2 réplicas cada día. La repetibilidad se calculó para cada día como el coeficiente de variación (CV%) entre las réplicas y la reproducibilidad se calculó como el coeficiente de variación entre las medidas de los tres días (Tabla 4.9).

Tabla 4.9: Resultados de la precisión de la medida.

Compuesto	Precisión (%CV)			
	Repetibilidad (n=2)			Reproducibilidad (n=6)
Ácido eicosapentaenoico	5,6	0,7	5,2	15
Ácido nonadecanoico	1,8	6,3	0,8	9,2
Ácido heptadecanoico	2	9,2	2,3	8,3
Ácido decanoico	2	5,6	0,1	3,6
Ácido oleico	1,3	8,5	1,2	15
Ácido linoleico	0,5	3,7	4	12
Ácido linolénico	4,9	7,8	0,8	16
Ácido mirístico	2,4	9,7	0,8	9
Ácido esteárico	1,5	0,5	0,4	16
Ácido palmítico	2,8	1,6	0,8	15

Todos los valores de coeficiente de variación (%CV) obtenidos, tanto para la repetibilidad como para la reproducibilidad, son inferiores al 20%, lo que demuestra que las medidas en las condiciones cromatográficas empleadas son precisas.

4.3.2. Validación de la metodología completa

4.3.2.1. Exactitud

La exactitud de la medida se evaluó como el porcentaje de recuperación de los analitos presentes en muestras fortificadas de *Malus floribunda*. Para ello, se realizó la extracción de los ácidos grasos de las muestras empleando las condiciones óptimas que obtuvimos del diseño experimental, tras lo cual se fortificaron. Empleamos tres niveles de adición: 20, 100 y 200 µg /g, y se realizaron dos réplicas por adición.

Las recuperaciones se calcularon como el porcentaje de la diferencia entre la señal de la muestra fortificada y la del blanco dividido entre la del patrón (*Ecuación 4.1*).

$$\% \text{Recuperación} = \frac{S_{\text{muestra}} - S_{\text{blanco}}}{S_{\text{patrón}}} \times 100 \quad (4.1)$$

Se emplearon como blancos muestras de *Malus floribunda* sin fortificar a las que se realizó el mismo proceso de extracción y análisis que a las muestras fortificadas.

Utilizamos dos tipos de patrones:

- Disoluciones patrón de los ácidos graso objetivo en MTBE derivatizadas en las mismas concentraciones que los tres niveles de adición.
- Disoluciones patrón sobre las que realizamos el mismo procedimiento de “extracción” y análisis que en las muestras fortificadas (control interno). Estos patrones se obtuvieron a la misma concentración que los tres niveles de adición.

Los resultados de las recuperaciones obtenidos, empleando tanto el patrón como el control interno, caían fuera del rango, reconocido como aceptable, de entre 70-120%.

Esto se debía a la existencia de un fuerte efecto matriz que generaba que la respuesta cromatográfica obtenida al medir las muestras no fuera la real. Para mitigar este efecto se incluyó en el procedimiento experimental una etapa de dilución del extracto (en total se realizó una dilución 1:500 de la muestra). Los resultados de las recuperaciones obtenidos al aplicar este procedimiento se muestran en la *Tabla 4.10* y en la *Figura 4.7*. En este

caso solo se empleó como patrón el control interno y las adiciones solo se realizaron a dos niveles: 100 y 200 $\mu\text{g/g}$.

Tabla 4.10: Porcentaje de recuperación de los compuestos estudiados y su precisión medida como el coeficiente de variación (%CV) entre las réplicas.

Compuesto	% Recuperación (%CV)	
	Nivel intermedio	Nivel alto
Ácido eicosapentaenoico	94 (22)	81 (17)
Ácido nonadecanoico	103 (17)	94 (9)
Ácido heptadecanoico	100 (3)	107 (4)
Ácido decanoico	114 (0)	95 (4)
Ácido oleico	95 (6)	100 (5)
Ácido linoleico	97 (11)	106 (8)
Ácido linolénico	104 (12)	94 (10)
Ácido mirístico	125 (14)	97 (0)
Ácido esteárico	92 (16)	98 (9)
Ácido palmítico	94 (11)	124 (11)

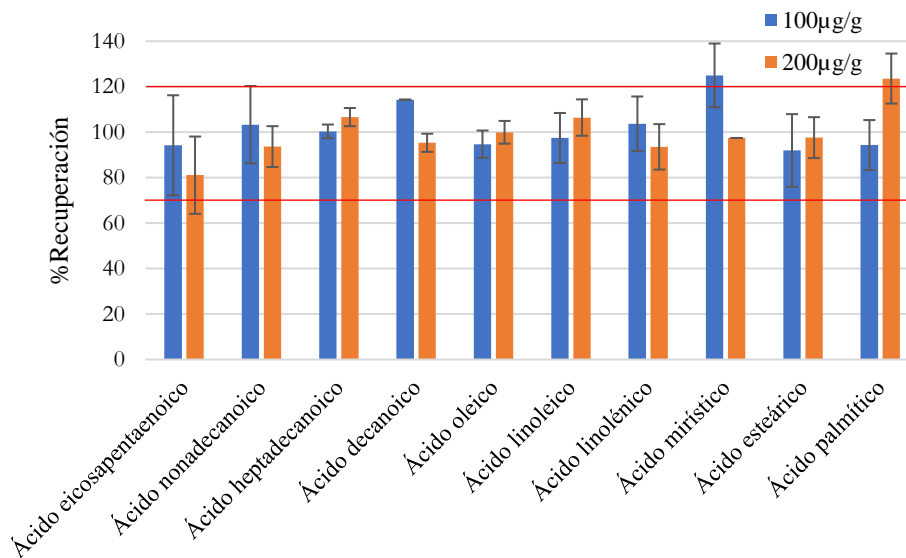


Figura 4.7: Porcentaje de recuperación de los analitos estudiados.

Como se puede observar, en general los compuestos se recuperan cuantitativamente (70-120%) y la precisión de los resultados es buena (CV menor del 20%), excepto para el caso del ácido eicosapentaenoico en el nivel de adición intermedio.

Gracias a este análisis se consiguió perfilar la metodología de extracción de los ácidos grasos cuticulares, puesto que además de conocer el disolvente, la técnica y el tiempo de extracción óptimos, se determinó la dilución que debe aplicarse a la muestra para su correcta cuantificación y con ello evitar el efecto matriz.

4.3.2.2. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección (Limit Of Detection, LOD) es la concentración mínima de analito en la muestra que puede detectarse con fiabilidad siguiendo un método analítico determinado, puesto que su señal puede distinguirse de la del ruido con un cierto grado de confianza.

También se evaluó el límite de cuantificación (Limit Of Quantitation, LOQ), que es la concentración mínima de analito que permite realizar determinaciones cuantitativas dentro de los límites especificados de precisión y exactitud.

Se empleó una muestra fortificada con 100 $\mu\text{g/g}$ para calcularlos. El LOD se calculó como la concentración mínima de analito en la muestra que generaba una señal cromatográfica con una relación señal/ruido de 3 ($S/N = 3$). El LOQ se calculó de la misma manera, pero empleando una relación señal/ruido de 10 ($S/N = 10$). En la *Tabla 4.11* se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 4.11: Límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ).

Compuesto	LOD ($\mu\text{g/g}$)	LOQ ($\mu\text{g/g}$)
Ácido eicosapentaenoico	11,4	37,6
Ácido nonadecanoico	1,6	5,4
Ácido heptadecanoico	1,0	3,2
Ácido decanoico	1,6	5,2
Ácido oleico	4,3	14,2
Ácido linoleico	4,6	15,3
Ácido linolénico	3,7	12,1
Ácido mirístico	0,5	1,8
Ácido esteárico	0,1	0,4
Ácido palmítico	0,1	0,5

Los límites de detección de la metodología desarrollada son en general bajos, lo que permite la identificación de estos compuestos en muestras foliares, aunque su presencia sea escasa.

4.4. Aplicación de la metodología

Para que se pudiera estudiar la influencia de la composición cuticular en la captación de HAPs fue necesario aplicar la metodología de extracción y análisis desarrollada en este Trabajo de Fin de Grado a 60 muestras de 15 individuos de *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte. De cada individuo se tomaron 4 muestras foliares a diferentes alturas y orientaciones. En la *Tabla 4.12* se muestran los parámetros utilizados en la clasificación de las muestras foliares recolectadas y el código empleado.

Tabla 4.12: Parámetros utilizados en la clasificación de las muestras foliares recolectadas y el código empleado.

Parámetros	Descripción	Código
Árbol	Se numeraron todos los individuos partícipes en el muestreo.	A n°
Distancia del tronco	Se tuvo en cuenta si las hojas recogidas se situaban cercanas al tronco o hacia el exterior.	D: dentro F: fuera
Distancia de la calzada	Se tuvo en cuenta la posición relativa entre la hoja y la calzada.	C: cerca L: lejos
Altura	Las hojas se tomaron a 3 alturas diferentes en cada árbol: superior, media e inferior.	sup/med/inf

En la *Tabla 4.13* se muestran los resultados globales obtenidos sobre la composición cuticular de la especie arbórea *Malus floribunda*.

Tabla 4.13: Concentración promedio de cada ácido graso estudiado y su coeficiente de variación (%) en las 60 muestras foliares analizadas.

Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/g}$ hoja fresca)	%CV
Ácido eicosapentaenoico	-	-
Ácido nonadecanoico	-	-
Ácido heptadecanoico	90,57	2
Ácido decanoico	60,54	10
Ácido oleico	117,94	12
Ácido linoleico	212,10	4
Ácido linolénico	149,59	3
Ácido mirístico	96,33	37
Ácido esteárico	881,06	29
Ácido palmítico	2060,46	18

Como se observa en la *Tabla 4.13*, de los 10 ácidos grasos objetivo, 8 fueron detectados tras el análisis de las muestras. Sobresale la presencia de ácido esteárico y ácido palmítico en concentraciones mayores a 800 y 2 000 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Los ácidos grasos que presentan una mayor variabilidad en su concentración en las diferentes muestras son el ácido mirístico y el esteárico, por lo que *a priori* son los ácidos grasos que presentan un mayor interés para analizar su efecto en la captación de HAPs.

En la *Figura 4.8* se muestra gráficamente la concentración total de los ácidos grasos en 8 muestras foliares de *Malus floribunda* de dos individuos diferentes (A7 y A13).

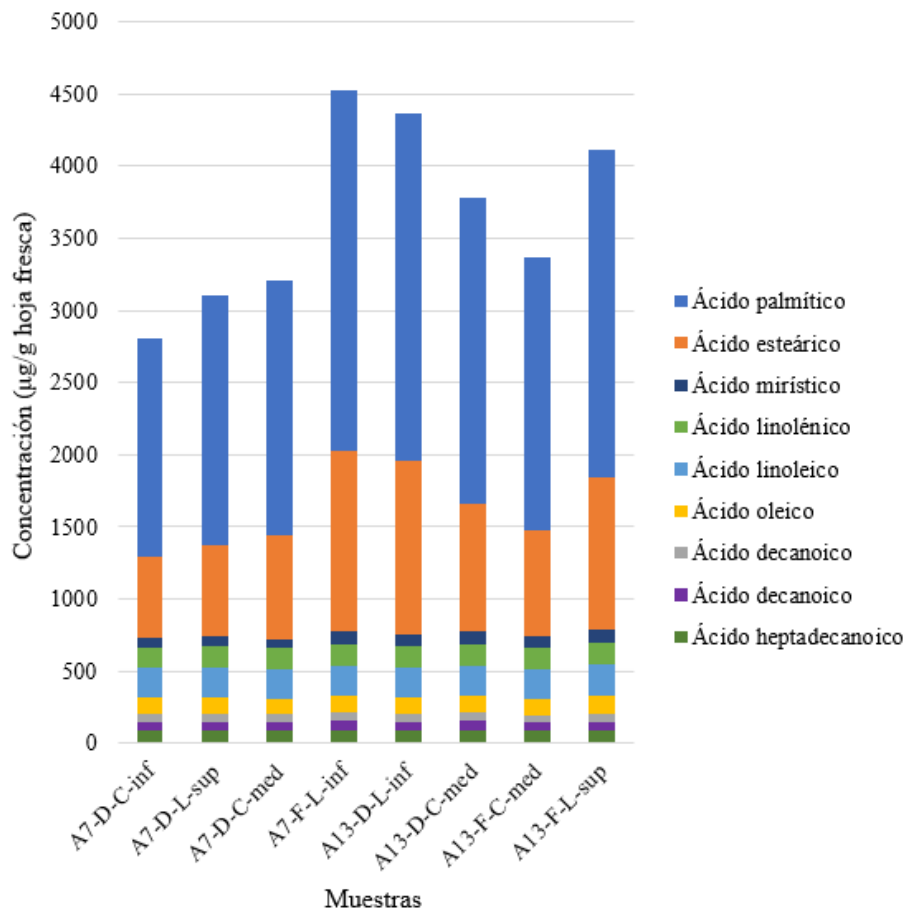


Figura 4.8: Concentración de los ácidos grasos estudiados en una serie de muestras foliares de *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte.

El análisis de los resultados obtenidos de las 60 muestras recolectadas se realizará en mayor detalle en el Trabajo de Fin de Grado de la titulación Grado en Biología (Parte B).

Conclusiones

En el presente Trabajo de Fin de Grado se ha logrado desarrollar, optimizar, validar y aplicar un método analítico para la extracción y determinación de los ácidos grasos cuticulares presentes en las hojas de dos especies arbóreas, *Prunus cerasifera* Pissardii y *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte.

La metodología de extracción alcanzada es una alternativa interesante respecto a las ya existentes puesto que emplea un disolvente orgánico de baja toxicidad y, gracias a la aplicación de ultrasonidos, disminuye el tiempo de extracción de los analitos y el volumen necesario de disolvente que ha de adicionarse para ello. Esto implica que este procedimiento es mucho más respetuoso con el medio ambiente que las metodologías actuales. Además, es un método sencillo, económico y rápido que no requiere de una instrumentación compleja.

En el trabajo se presenta la validación del método expuesto en términos de linealidad, precisión, exactitud y LOD/LOQ. Los resultados de la validación instrumental han demostrado que la metodología empleada en el análisis es precisa, selectiva y sensible, y que el procedimiento completo de extracción y análisis de los analitos es exacto, ya que ofrece recuperaciones cuantitativas y presenta límites de detección bajos, lo que permite la identificación de los compuestos en matrices vegetales complejas como son las muestras foliares, aunque su presencia sea escasa.

El desarrollo de esta técnica permitió conocer la composición cuticular foliar de la especie arbórea objetivo (*Malus floribunda*), lo que posibilita, en colaboración con el grupo de investigación ECOTOX, seguir investigado en su capacidad para biorremediar la contaminación del aire urbano.

Conclusións

No presente Traballo de Fin de Grao logrouse desenvolver, optimizar, validar e aplicar un método analítico para a extracción e determinación dos ácidos graxos cuticulares presentes nas follas de dúas especies arbóreas, *Prunus cerasifera* Pissardii e *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte.

A metodoloxía de extracción acadada é unha alternativa interesante ás xa existentes posto que emprega un disolvente orgánico de baixa toxicidade e, grazas á aplicación de ultrasóns, diminúe o tempo de extracción dos analitos e o volume necesario de disolvente que debe engadirse para iso. Isto implica que este procedemento é moito máis respectuoso co medio ambiente cás metodoloxías actuais. Ademais, é un método sinxelo, económico e rápido que non require dunha instrumentación complexa.

No traballo preséntase a validación do método exposto en termos de linearidade, precisión, exactitude e LOD/LOQ. Os resultados da validación instrumental demostraron que a metodoloxía empregada na análise é precisa, selectiva e sensible, e que o procedemento completo de extracción e cuantificación dos analitos é exacto, xa que ofrece recuperacións cuantitativas e presenta límites de detección baixos, o que permite a identificación dos compostos en matrices vexetais complexas como son as mostras foliares, aínda que a súa presenza sexa escasa.

O desenvolvemento desta técnica permitiu coñecer a composición cuticular foliar da especie arbórea obxectivo (*Malus floribunda*), o que posibilita, en colaboración co grupo de investigación ECOTOX, seguir investigando na súa capacidade para biorremediar a contaminación do aire urbano.

Conclusions

In this Final Degree Project it has been possible to develop, optimize, validate and apply an analytical method for the extraction and determination of cuticular fatty acids present in the leaves of two tree species, *Prunus cerasifera* Pissardii and *Malus floribunda* Siebold ex Van Houtte.

The extraction methodology achieved is an interesting alternative to the existing ones since it uses a low toxicity organic solvent and, thanks to the application of ultrasound, reduces the extraction time of the analytes and the necessary volume of solvent that must be added for this. This implies that this procedure is much more environmentally friendly than current methodologies. In addition, it is a simple, inexpensive, and fast method that does not require complex instrumentation.

The work presents the validation of the exposed method in terms of linearity, precision, accuracy, and LOD/LOQ. The results of the instrumental validation have shown that the methodology used in the analysis is precise, selective, and sensitive, and that the complete procedure of extraction and analysis of the analytes is exact, since it offers quantitative recoveries, and presents low detection limits which allows for the identification of the compounds in complex plant matrices such as foliar samples even though their presence is scarce.

The development of this technique has permitted to obtain the foliar cuticular composition of the target tree species (*Malus floribunda*), which enables, in collaboration with the ECOTOX research group, to continue investigating its ability to bioremediate urban air pollution.

Bibliografía

1. Cambios demográficos, Naciones Unidas (ONU). Disponible en: <https://www.un.org/es/un75/shifting-demographics> (consultado el 7 de julio de 2021).
2. Calidad del aire y salud, Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health) (consultado el 6 de julio de 2021).
3. Astorga, F. R. Utilización de follaje de *Pinus halepensis* Mill. como bioindicador de contaminación atmosférica por material particulado (Tesis). *Universidad Autónoma de Chihuahua* **2010**.
4. Martínez, A. El índice de tolerancia a la contaminación atmosférica (APTI) como herramienta en el uso de biomonitores pasivos de contaminación atmosférica por quema de biomasa (Tesis). *Universidad Autónoma de San Luis Potosí* **2017**.
5. Martins, M.; Ferreira, A. M.; Vale, C. Retention and partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Sarcocornia fruticosa* from two Portuguese salt marshes. *Ciencias Marinas* **2008**, *34*, 373-380.
6. Agudo, A. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP): Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. *UGT Comisión Ejecutiva Confederal Hortaleza* **2010**.
7. Pérez, B. Establecimiento de valores background de PAHs y PAHs alquilados en sedimentos de la costa Atlántica Española (Tesis). *Universidad de Vigo* **2016**.
8. Honda, M.; Suzuki, N. Toxicities of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Aquatic Animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **2020**, *17*.
9. LIDSA Cross-Research in Environmental Technologies (CRETUS), Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: <https://cretus.usc.es/grupo-lidsa/> (consultado el 7 de julio de 2021).
10. ECOTOX Cross-Research in Environmental Technologies (CRETUS), Universidad de Santiago de Compostela. Disponible en: <https://cretus.usc.es/grupo-ecotox/> (consultado el 17 de junio de 2021).
11. Ferriol, M.; Muñoz, S.; Merle, H.; Garmendia, A.; López, C. Papel de los árboles ornamentales como bioindicadores de la contaminación atmosférica urbana. *VI Jornadas Ibéricas de Horticultura Ornamental* **2014**.
12. Silvana, C. E.; Martínez, M. A.; Arocena, L. A. Estudio comparativo del agregado de enmiendas orgánicas e inorgánicas en procesos de biorremediación de suelos norpatagónicos contaminados con petróleo. *Revista de la Sociedad Química del Perú* **2014**, *80*, 251-261.

13. Un espacio rodeado de manzanos, La voz de Galicia. Disponible en: https://www.lavozdeg Galicia.es/noticia/coruna/2009/02/21/espacio-rodeado-manzanos-ornamentales/0003_7544865.htm (consultado del 8 de julio de 2021).
14. Manzano japonés: Características y cultivo, Flor de Planta. Disponible en: <https://www.flordeplanta.com.ar/arboles/manzano-japones-caracteristicas-y-cultivo/> (consultado el 8 de julio de 2021).
15. Flor de Malus floribunda, Plants of the World Online. Disponible en: <http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:726291-1> (consultado el 8 de julio de 2021).
16. Árbol de Malus floribunda, Gardenia. Disponible en: <https://www.gardenia.net/plant/malus-prairifire> (consultado el 8 de julio de 2021).
17. Fruto de Malus floribunda, Plant Net. Disponible en: <https://identify.plantnet.org/weurope/species/Malus%20floribunda%20Siebold%20ex%20Van%20Houtte/data> (consultado el 8 de julio de 2021).
18. Tafolla-Arellano, J. C.; González-León, A.; Tiznado-Hernández, M. E.; García, L. Z.; Báez-Sañudo, R. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana* **2013**, 36, 3-12.
19. Nelson, D. L.; Cox, M. M.; Cuchillo, C. M.; Lehninger, A. L. Lehninger: Principios de bioquímica. *Omega: Barcelona* **2009**.
20. Chemical Book. Disponible en: https://www.chemicalbook.com/ProductIndex_EN.aspx (consultado el 9 de julio de 2021).
21. Zabka, V.; Stangl, M.; Bringmann, G.; Vogg, G.; Riederer, M.; Hildebrandt, U. Host Surface Properties Affect Prepenetration Processes in the Barley Powdery Mildew Fungus. *The New phytologist* **2008**, 177, 251-263.
22. Haliński, Ł P.; Paszkiewicz, M.; Gołębiowski, M.; Stepnowski, P. The chemical composition of cuticular waxes from leaves of the gboma eggplant (*Solanum macrocarpon* L.). *Journal of food composition and analysis* **2012**, 25, 74-78.
23. Trivedi, P.; Nguyen, N.; Klavins, L.; Kvišis, J.; Heinonen, E.; Remes, J.; Jokipii-Lukkari, S.; Klavins, M.; Karppinen, K.; Jaakola, L.; Häggman, H. Analysis of composition, morphology, and biosynthesis of cuticular wax in wild type bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and its glossy mutant. *Food chemistry* **2021**, 354, 129517.
24. Bourgault, R.; Matschi, S.; Vasquez, M.; Qiao, P.; Sonntag, A.; Charlebois, C.; Mohammadi, M.; Scanlon, M. J.; Smith, L. G.; Molina, I. Constructing functional cuticles: analysis of relationships between cuticle lipid composition, ultrastructure and water barrier function in developing adult maize leaves. *Annals of botany* **2020**, 125, 79-91.

25. Klavins, L.; Klavins, M. Cuticular Wax Composition of Wild and Cultivated Northern Berries. *Foods* **2020**, *9*.
26. Simões, R.; Rodrigues, A.; Ferreira-Dias, S.; Miranda, I.; Pereira, H. Chemical Composition of Cuticular Waxes and Pigments and Morphology of Leaves of *Quercus suber* Trees of Different Provenance. *Plants* **2020**, *9*.
27. Chai, Y.; Li, A.; Chit Wai, S.; Song, C.; Zhao, Y.; Duan, Y.; Zhang, B.; Lin, Q. Cuticular wax composition changes of 10 apple cultivars during postharvest storage. *Food chemistry* **2020**, *324*.
28. Aragón, Á.; Cortes, J. M.; Toledano, R. M.; Villén, J.; Vázquez, A. M. Procedimiento para analizar ceras en aceites vegetales (Patente). *Oficina española de patentes y marcas* **2012**, *2* 390 034.
29. Jouraeva, V. A.; Johnson, D. L.; Hassett, J. P.; Nowak, D. J. Differences in accumulation of PAHs and metals on the leaves of *Tiliaeuchlora* and *Pyrus calleryana*. *Environmental pollution* **2002**, *120*, 331-338.
30. Tian, X.; Liu, J.; Zhou, G.; Peng, P.; Wang, X.; Wang, C. Estimation of the annual scavenged amount of polycyclic aromatic hydrocarbons by forests in the Pearl River Delta of Southern China. *Environmental pollution* **2008**, *156*, 306-315.
31. Razeq, F. M.; Kosma, D. K.; Rowland, O.; Molina, I. Extracellular lipids of *Camelina sativa*: Characterization of chloroform-extractable waxes from aerial and subterranean surfaces. *Phytochemistry* **2014**, *106*, 188-196.
32. Wang, Y.; Su, S.; Chen, G.; Mao, H.; Jiang, Y. Relationship Between Cuticular Waxes and Storage Quality Parameters of Korla Pear Under Different Storage Methods. *Journal of plant growth regulation* **2021**, *40*, 1152-1165.
33. Agitador Vórtex, Laboratorio químico. Disponible en: <https://www.tplaboratorioquimico.com/laboratorio-quimico/materiales-e-instrumentos-de-un-laboratorio-quimico/agitador-vortex-agitador-tubos-vortex.html> (consultado el 9 de julio de 2021).
34. Síntesis y caracterización de nanopartículas de ZnO₂ y sus aplicaciones antimicrobianas, Slideshare. Disponible en: <https://es.slideshare.net/cosuroca/sntesis-y-caracterizacin-de-nanopartculas-de-zno2-y-sus-aplicaciones-antimicrobianas> (consultado el 9 de julio de 2021).
35. Gutiérrez, M. C.; Droguet, M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. *Boletín INTEXTER* **2002**, *122*.
36. Basics of Gas Chromatography – Mass Spectrometry, Leckerman Law. Disponible en: <https://www.winning-dwi-defenses.com/basics-of-gas-chromatography-mass-spectrometry/> (consultado el 9 de julio de 2021).

37. Prunus cerasifera, Arte y Jardinería. Disponible en: <http://www.arteyjardineria.com/2012/05/prunus-cerasifera-var-pissardii.html> (consultado el 7 de julio de 2021).
38. Malus floribunda, BioLib. Disponible en: <https://www.biolib.cz/en/taxonimage/id68012/> (consultado el 7 de julio de 2021).
39. Gómez-Brandón, M.; Lores, M.; Domínguez, J. Comparison of extraction and derivatization methods for fatty acid analysis in solid environmental matrixes. *Anal Bioanal Chem* **2008**, 392, 505-514.
40. Garcia-Jares, C.; Sanchez-Nande, M.; Lamas, J. P.; Lores, M. Profiling the Fatty Acids Content of Ornamental Camellia Seeds Cultivated in Galicia by an Optimized Matrix Solid-Phase Dispersion Extraction. *Bioengineering* **2017**, 4.
41. Castillo, B.; González, R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista cubana de farmacia* **1996**, 30.