

# Universidad de Guanajuato



**CAMPUS GUANAJUATO**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS**  
**POSGRADO EN QUÍMICA**

**Determinación de ácidos grasos insaturados, utilizando diferentes estrategias de derivatización y herramientas de espectrometría de masas**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO EN:

**Maestro en Ciencias Químicas**

Presenta:

**Q.F.B. Ricardo Omar Fernández Hernández**

**Director: Dr. Kazimierz Wrobel**

**Codirectora: Dra. Katarzyna Dorota Wrobel**

**Miembro del comité tutorial: Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa**

**Guanajuato, Gto. 2024**

## Responsiva

Por medio de la presente me responsabilizo de la autenticidad del presente trabajo de tesis, titulado **“Determinación de ácidos grasos insaturados, utilizando diferentes estrategias de derivatización y herramientas de espectrometría de masas”**, que presenta el **Q.F.B. Ricardo Omar Fernández Hernández**, para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Químicas**, en las instalaciones del Departamento de Química de la Universidad de Guanajuato.

Alumno:

---

Q.F.B. Ricardo Omar Fernández Hernández

Director:

---

Dr. Kazimierz Wrobel

Co-Directora:

---

Dra. Katarzyna Dorota Wrobel

Miembro del comité tutorial

---

Dra. Alma Rosa Corrales Escobosa

Miembros del Jurado en el examen que para obtener el grado de Maestro en Ciencias Químicas presenta el Q. F. B. Ricardo Omar Fernández Hernández

## **Sinodales**

---

Dr. Oracio Serrano Torres

Presidente

---

Dr. Francisco Javier Acevedo Aguilar

Secretario

---

Dr. Armando Gómez Ojeda

Vocal

---

M.C. Israel Enciso Donis

Suplente

*A mis padres, por el amor y apoyo incondicional que siempre me han brindado, permitiendo encaminarme a convertirme en la persona que siempre he soñado ser.*

*Nunca me rajo y siempre mejores.*

*Los amo.*

## **Agradecimientos**

A mis padres y a Edith, por motivarme a intentarlo, apoyarme y acompañarme a lo largo de este proceso. Son los pilares en los que confío cuando todo lo demás parece no ir bien. Gracias por siempre confiar en mí.

A mi familia, mis abuelos, sobrinas, hermanos y mis niños.

A mis asesores y comité tutorial por la oportunidad brindada, el conocimiento y la guía sin las cuales el desarrollo de este proyecto no hubiera sido posible.

A mis sinodales por las atenciones brindadas y el tiempo dedicado a la revisión del documento.

A mi grupo de trabajo por la retroalimentación, el apoyo y las buenas charlas.

A mis amigos, los de siempre y los que encontré durante estos dos años, sin ustedes esta etapa de mi vida no hubiera sido una fracción de lo increíble que ha sido.

Al Tugurio S.A. de C.V. y a su director general Zugs, vinieron a cambiarlo todo.

## Índice

Responsiva	I
Sinodales	II
Dedicatorias	III
Agradecimientos	IV
Índice	V
Índice de tablas	VI
Índice de figuras	VII
Abreviaturas	X
Resumen	XII
1. Introducción	1
1.1. Estructura e importancia biológica de los ácidos grasos insaturados	1
1.2. Desafíos y estrategias para la determinación de los AGIs	6
1.3. Revisión de estrategias de derivatización de AGIs, útiles en el análisis por espectrometría de masas	9
1.3.1. Reacciones de transesterificación	10
1.3.2. Análisis directo de FAMEs	11
1.3.3. Derivatización de FAMEs	14
1.3.4. Hidrólisis de triglicéridos	19
1.3.5. Derivatización de los AGIs libres	19
2. Objetivos	27
2.1. Objetivo general	27
2.2. Objetivos particulares	27
3. Desarrollo experimental	28
3.1. Instrumentación para el análisis y procesamiento de muestras	28
3.2. Reactivos y estándares	28
3.3. Análisis de datos y análisis estadístico	28
4. Resultados y discusión	29
4.1. Liberación de AGPIs de los triacilgliceroles	29
4.1.1. Hidrólisis de TGs	29
4.1.2. Transesterificación de TGs	32
4.2. Bromación de AGLs y FAMEs	34
4.2.1. Bromación de un estándar comercial de FAMEs	37
4.2.2. Transesterificación de TGs y bromación de los FAMEs en una muestra real: aceite de aguacate	38
4.2.3. Efecto del tiempo de reacción en la obtención de FAMEs bromados	41
4.3. Proceso de calibración y evaluación de parámetros analíticos	42
4.4. Experimentos MS/MS enfocados en la detección de posición de enlaces dobles en AGIs	46
4.4.1. Cálculos <i>in-silico</i>	46
4.4.2. Experimentos CID	48
4.4.3. Experimentos bbCID	51
4.4.4. Experimentos isCID	53
5. Conclusiones	56
6. Referencias	58

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Algunos de los ácidos grasos más comunes en la naturaleza	<b>3</b>
<b>Tabla 2.</b> Análisis de AGs por determinación de FAMES	<b>12</b>
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos de reacciones de derivatización compatibles con el análisis de AGs por MS	<b>26</b>
<b>Tabla 4.</b> Lista de iones de AGLs en base a espectro de masa mostrado en Fig. 16. En cada caso, se presenta el valor m/z experimental, la formula elemental del ion $[M+Na^+]^+$ , error de masa y la anotación de tipo del ácido (saturado o insaturado).	<b>31</b>
<b>Tabla 5.</b> Lista de iones de FAMES en base a espectro de masa mostrado en Fig. 17. En cada caso, se presenta el valor m/z experimental, la formula elemental del ion $[M+Na^+]^+$ , error de masa y la anotación de tipo del ácido (saturado o insaturado).	<b>33</b>
<b>Tabla 6.</b> Parámetros analíticos obtenidos a partir de la elaboración de las curvas de calibración para el análisis de FAMES bromados por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS	<b>43</b>
<b>Tabla 7.</b> Iones producto calculados <i>in-silico</i> para los FAMES C18:1 n-7 Br <sub>2</sub> y C18:1 n-9 Br <sub>2</sub>	<b>47</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Estructuras del ácido linoleico (LA, 18:2 omega-6) y ácido $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3 omega-3).	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b> Ruta simplificada de síntesis de AG-Es de cadena larga a partir de sus precursores.	<b>4</b>
<b>Figura 3.</b> Estrategias para el análisis de ácidos grasos	<b>10</b>
<b>Figura 4.</b> Reacción de transesterificación de triglicéridos.	<b>11</b>
<b>Figura 5.</b> Formación de DMOX	<b>14</b>
<b>Figura 6.</b> Esquema general de la reacción de ozonólisis del ácido oleico	<b>16</b>
<b>Figura 7.</b> Espectro O3-APPI (+)-MS de a) FAME 9c,11t-ácido linoleico y b) FAME 10t,12c-ácido linoleico	<b>17</b>
<b>Figura 8.</b> Reacciones de bromación de FAMEs monoinsaturados (esquema general mostrado para el FAME de ácido oleico)	<b>17</b>
<b>Figura 9.</b> Hidrolisis alcalina de triglicéridos	<b>19</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema de la reacción de bromación de enlaces dobles entre carbonos	<b>20</b>
<b>Figura 11.</b> Esquema general de la reacción Paternò-Büchi para el ácido oleico	<b>21</b>
<b>Figura 12.</b> Derivatización secundaria con DEEA (N,N-dietil-1,2-etanodiamina) de uno de los dos isómeros productos de la reacción Paternò-Büchi con el ácido oleico	<b>22</b>
<b>Figura 13.</b> Espectro obtenido por ID-ESI (+)-Qtrap-MS en tandem del DHA con doble derivatización	<b>23</b>
<b>Figura 14.</b> Reacción de epoxidación de ácido oleico	<b>24</b>
<b>Figura 15.</b> Espectros nanoESI (-)-MS/MS de epóxidos a) AG 18:1 (9Z) y b) AG 18:1 (11Z)	<b>25</b>
<b>Figura 16.</b> Espectro de masas obtenido para aceite de menhaden después de hidrolisis de TGs y extracción de AGs libres, obtenido por infusión directa en ESI(-)-QTOF-MS.	<b>30</b>
<b>Figura 17.</b> Espectro de masas obtenido para aceite de menhaden después de la transesterificación de TGs y extracción de AGs libres, obtenido por infusión directa en ESI(-)-QTOF-MS.	<b>32</b>
<b>Figura 18.</b> Espectros de masas obtenidos por infusión directa en ESI-QTOF-MS	<b>36</b>

de ácido eláidico C18:1 como a) ácido graso libre antes (arriba) y después de bromación (abajo) y b) FAME; antes (arriba) y después de bromación. (abajo).

**Figura 19.** Espectros de masas de FAMES bromados a) C18:1, b) C18:2, c) C18:3, obtenidos por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS. **38**

**Figura 20.** Espectro de masas obtenido por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS de FAMES obtenidos de aceite de aguacate mediante transesterificación y posterior bromación. **39**

**Figura 21.** Espectro de masas de FAMES bromados de aceite de aguacate, obtenido por infusión directa en ESI-QTOF-MS **39**

**Figura 22.** Espectros de masas de compuestos no identificados bromados en muestra de aceite de aguacate, obtenidos por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS **40**

**Figura 23.** Intensidades medidas para señal 479.0955 m/z de ion correspondiente al  $[M+Na]^+$  del FAME C18:1 Br<sub>2</sub>, con respecto al tiempo de reacción. **41**

**Figura 24.** Curva de calibrado para FAME C18:1 Br<sub>2</sub> obtenida por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS **44**

**Figura 25.** Curva de calibrado para FAME C18:2 Br<sub>4</sub> obtenida por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS **44**

**Figura 26.** Curva de calibrado para FAME C18:3 Br<sub>6</sub> obtenida por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS **45**

**Figura 27.** Espectros MS/MS: 1) FAME C18:1 n<sub>7</sub> Br<sub>2</sub> y 2) FAME C18:1 n<sub>-9</sub> Br<sub>2</sub>, calculados in-silico empleando CFM-ID con una energía de ionización de 20 eV **47**

**Figura 28.** Esquema general de espectrómetro de masas maXis impact de Bruker (Bruker Daltonik, 2011) **48**

**Figura 29.** Espectros de MS/MS de ion C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+Na], con diferentes energías de colisión obtenidos por experimento CID, en ESI(+)-QTOF-MS **49**

**Figura 30.** Cambios de la intensidad del ion precursor (m/z 479.055) y del ion producto (m/z 317.2451) en experimento MS/MS aplicando diferentes energías de colisión en la zona CID **50**

**Figura 31.** Espectros de MS/MS de iones C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+Na], C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+Na] y C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>Br<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+Na] obtenidos por experimento CID a 10 eV, en ESI(+)-QTOF-MS. Los FAMES bromados corresponden a los ácidos C18:1 ω-9 cis y trans C18:2 ω-6 y C18:3 ω-3 respectivamente **51**

<b>Figura 32.</b> Espectros de MS/MS de ion C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [M+Na], con diferentes energías de colisión obtenidos por experimento bbCID, en ESI(+)-QTOF-MS	<b>52</b>
<b>Figura 33.</b> Monitoreo de ion precursor (479.055 m/z) y ion producto (317.2451) en experimento MS/MS bbCID con diferentes energías de colisión	<b>53</b>
<b>Figura 34.</b> Figura 34. Monitoreo de ion precursor (479.055 m/z) y ion producto (317.2451) en experimento MS/MS isCID con diferentes energías de colisión	<b>54</b>
<b>Figura 35.</b> Espectros de MS/MS de ion C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> Br <sub>2</sub> O <sub>2</sub> [M+Na] <sup>+</sup> , con diferentes energías de colisión obtenidos por experimento isCID, en ESI(+)-QTOF-MS	<b>54</b>

## Abreviaturas

µg	Microgramo
µL	Microlitro
AA	Ácido araquidónico
AGCCs	Ácidos grasos de cadena corta
AGCLs	Ácidos grasos de cadena larga
AG-Es	Ácidos grasos esenciales
AGILs	Ácidos grasos insaturados libres
AGIs	Ácidos grasos insaturados
AGLs	Ácidos grasos libres
AGMIs	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPIs	Ácidos grasos poliinsaturados
AGs	Ácidos grasos
AGSs	Ácidos grasos saturados
AIBN	2,2'-azobis(s-metilpropionitrilo)
ALA	Ácido alfa-linolénico
AMPP	N-(4-aminometilfenil)piridinio
API	Ionización a presión atmosférica
APPI	Fotoionización a presión atmosférica
ATR	Reflectancia total atenuada
bbCID	Broadband collision-induced dissociation
CA	Ácido cetoleico
CI	Ionización química
CID	Disociación inducida por colisiones
DART	Análisis directo en tiempo real
DEEA	N,N-dietil-1,2-etanodiamina
DGs	Diacilgliceroles
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMOX	Dimetiloxolina
DPA	Ácido docosapentaenoico
EA	Ácido esteárico
EI	Impacto de electrones
ELA	Ácido elaídico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESI	Ionización por electronebulización
ETA	Ácido eicosatetraenoico
EUA	Ácido erúcico
eV	electrón Volt
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FIA	Infusión directa en flujo
FID	Detector de ionización en llama
FLs	Fosfolípidos
FT	Transformada de Fourier
FTIR	Infrarrojo con transformada de Fourier
GA	Ácido gadoleico

GCxGC	Cromatografía de gases en dos dimensiones
GLA	Ácido gama-linoleico
GLs	Glicolípidos
GS	Cromatografía de gases
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución
ID	Infusión directa
isCid	In source collision-induced dissociation
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LA	Ácido linoleico
LAA	Ácido láurico
LC	Cromatografía de líquidos
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LOA	Ácido lauroleico
M	Molar
MA	Ácido mirístico
MALDI	Ionización/desorción laser asistida por matriz
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MGs	Monoacilgliceroles
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MRM	Monitoreo de reacciones múltiples
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas -masas
N	Normal
NBS	N-bromosuccinimida
NIR	Infrarrojo cercano
OA	Ácido oleico
PA	Ácido palmítico
PAO	Ácido palmitoleico
PB	Paternò-Büchi
Qtrap	Trampa iónica
SDA	Ácido estearidónico
TGs	Triacilgliceroles
TOF	Tiempo de vuelo
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra rendimiento
UV/VIS	Uv/Visible
VA	Ácido vaccínico

## RESUMEN

Los ácidos grasos (AG) son importantes componentes de sistemas biológicos, con funciones vitales en la estructura y funcionamiento celular. Entre ellos, los ácidos insaturados (AGIs), principalmente los omega-3 y omega-6, son muy relevantes para la salud del ser humano. El objetivo de este trabajo fue lograr el etiquetado de los átomos de carbono presentes en enlaces dobles de AGIs, mediante una reacción de derivatización que permita la identificación/confirmación y cuantificación de estos compuestos por espectrometría de masas con ionización suave (ESI-QTOF-MS). En una primera etapa se obtuvieron ácidos grasos libres (AGLs) y esteres metílicos de ácidos grasos (FAMEs) a partir de triacilgliceroles (TGs). Una vez demostrado que ambas estrategias liberan compuestos individuales de manera efectiva, se adoptó un procedimiento de bromación de los carbonos que forman dobles enlaces C=C. Los FAMEs bromados presentaron mejores características para su análisis por ESI(+)-QTOF-MS en comparación con los AGL bromados que fueron ionizados en modo negativo de ESI. Tomando en cuenta las relaciones m/z de las señales presentes en espectros de masas y los patrones isotópicos de iones de las moléculas bromadas, se confirmó la bromación efectiva de los FAMEs con hasta 3 insaturaciones, añadiendo dos átomos de bromo por cada insaturación. Se realizaron curvas de calibración para mezclas de isómeros de los FAMEs C18:1, C18:2 y C18:3 bromados y se obtuvieron los principales parámetros analíticos. Los valores de R<sup>2</sup> obtenidos se encontraron entre 0.9915 y 0.9980, los LOD instrumentales entre 6.4-47 ng mL<sup>-1</sup> y LOQ instrumentales entre 21-155 ng mL<sup>-1</sup>. Las curvas de calibración se utilizaron para determinar las concentraciones totales de isómeros de C18:1 y C18:2 en una muestra de aceite de aguacate las cuales en porcentajes de masas correspondieron a 62.31 ± 5.65 % y 1.42 ± 0.13% respectivamente, con RSD < 10%. Se utilizó la plataforma web CFM-ID 4.0 para calcular *in-silico* los espectros de fragmentación de los FAMEs bromados. Los resultados obtenidos de los cálculos *in-silico* predijeron la formación de fragmentos característicos de interés donde los átomos de bromo marcan posición de enlaces dobles. A continuación, se llevaron a cabo experimentos MS/MS empleando tres diferentes mecanismos de fragmentación (CID, bbCID e iCID), examinando diferentes energías de colisión en cada caso. En desacuerdo con los cálculos *in-silico*, los resultados de los

experimentos MS/MS no fueron alentadores porque durante la fragmentación del ion precursor siempre ocurría la pérdida de átomos de bromo en forma de HBr, incluso al aplicar muy bajas energías de colisión y también utilizando isCID y bbCID. Por ello, en los experimentos realizados no fue posible asignar la posición de los enlaces dobles. Como resultado final del trabajo realizado, se establecieron las condiciones de bromación de los FAMEs y de su análisis por ESI(+)-QTOF-MS, logrando la cuantificación de AGIs agrupados como isómeros con una, dos y tres insaturaciones, pero sin poder distinguir entre estos isómeros ni asignar la posición de enlaces dobles. Como prospectiva de un trabajo futuro se propone afinar el proceso de fragmentación en el sistema ESI(+)-QTOF-MS para que los iones fragmento conserven átomos de bromo.

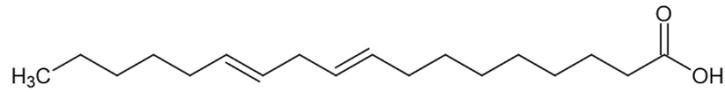
## 1. Introducción

### 1.1. Estructura química e importancia biológica de los ácidos grasos insaturados

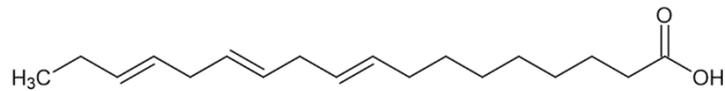
Los ácidos grasos (AGs) son ácidos orgánicos con al menos un grupo carboxilo. En la naturaleza, la mayoría de los AGs contiene cadenas no ramificadas con un número par de átomos de carbono, entre 4 y 28 (Chen, 2020). Estos compuestos se encuentran en diversos tejidos celulares y en algunos fluidos biológicos como el plasma sanguíneo, ya sea en forma de moléculas libres o incorporadas en estructuras más grandes. Los AGs son el principal componente de los triacilgliceroles (comúnmente llamados triglicéridos, TGs), fosfolípidos, esfingolípidos y otros lípidos complejos (Calder, 2015). Los organismos obtienen los AGs por medio de los alimentos o por biosíntesis celular. Algunos organismos son incapaces de realizar la síntesis de ciertos AGs o de realizarla en cantidades suficientes para cubrir la demanda metabólica, el crecimiento somático y su reproducción (De Carvalho, 2018). A los AGs que no pueden ser sintetizados de manera endógena o son sintetizados en cantidades insuficientes para satisfacer su demanda nutrimental, se les conoce como ácidos grasos esenciales (AG-Es). La deficiencia en la ingesta de AG-Es contribuye al desarrollo de desórdenes como: dermatitis, hipertensión renal, trastornos de la actividad mitocondrial, enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, deterioro cerebral, artritis, depresión y disminución de la resistencia del cuerpo a las infecciones (Simopoulos A. P., 1999)

Se conoce como ácidos grasos saturados (AGSs) a aquellos AGs que poseen únicamente enlaces sencillos carbono-carbono en su cadena principal, mientras que los que poseen dobles enlaces, son llamados ácidos grasos insaturados (AGIs). Estos últimos a su vez, pueden ser clasificados como ácidos grasos monoinsaturados (AGMIs), cuando tienen solo un doble enlace o como ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs), si tienen más de un doble enlace (Patkowska-Sokoła, Usydus, Szlinder-Richert, & Bodkowski, 2009).

Existen dos tipos principales de AGIs, la serie  $\omega$ -6 derivada de ácido linoleico (LA, 18:2) y la serie  $\omega$ -3 derivada del ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3) (Das, 2006), en la Figura 1 se presentan las estructuras químicas correspondientes a los ácidos LA y ALA.



Ácido linoleico



Ácido  $\alpha$ -linolénico

Figura 1.1 Estructuras del ácido linoleico (LA, 18:2 omega-6) y ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA, 18:3 omega-3)

Se ha determinado que una dieta rica en AGSs puede incrementar la concentración la lipoproteína de baja densidad (LDL, también conocida como “colesterol malo”) en la sangre y aumentar el riesgo de sufrir una enfermedad cardiovascular (Briggs, Petersen, & Kris-Etherton, 2017), mientras que su remplazo por AGIs puede disminuir la probabilidad de sufrir un evento coronario mortal (Jakobsen, y otros, 2010). Muchos alimentos de origen vegetal son ricos en LA, entre ellos podemos encontrar diferentes especies de nueces, semillas de cártamo, girasol y calabaza, cereales integrales, aceites de maíz, girasol, soja y azafrán; en cuanto a fuentes de origen animal se deben mencionar los huevos y carne de aves. Las nueces y el aceite de soja son considerados de igual manera fuentes importantes de ALA, además este acido se presenta en el aceite de pescado marino, los aceites de canola y linaza y en las verduras de hoja verde (Djuricic & Calder, 2021) (Kapoor, Kapoor, Gautam, Singh, & & Bhardwaj, 2021) (Das, 2006).

Los AGs cumplen funciones importantes y son indispensables para el buen funcionamiento fisiológico de los organismos. Entre sus funciones destacan las de: "bloques de construcción" de las membranas celulares, fuentes de energía y moléculas de señalización (De Carvalho, 2018). Los AGSs se encuentran involucrados en la producción y almacenamiento de energía, el transporte de lípidos, así como en la síntesis de fosfolípidos y esfingolípidos; necesarios para la síntesis de las membranas celulares.

Los AGMIs se encuentran relacionados con la fluidez de la bicapa lipídica, mientras que los AGPIs juegan un papel importante en la estructura y las propiedades físicas de la membrana celular, además de estar involucrados en la producción de eicosanoides, la transducción de señales y la activación de la transcripción nuclear (Spector, 1999).

Existen diversas notaciones en la nomenclatura de los AGIs, una de las más importantes es la del carbono omega ( $\omega$ ). En esta notación se inicia con el símbolo de carbono, seguido por el número de átomos de este elemento en la molécula, dos puntos y la cantidad de insaturaciones en la cadena de carbonos. Se añade además la letra “n” u “ $\omega$ ”, seguida de un guion y un número indicando la posición de la primera insaturación con respecto al carbono del grupo metil terminal. En la Tabla 1 se enlistan algunos de los AGs más comunes encontrados en la naturaleza, utilizando la notación omega para los AGIs.

Tabla 2. Algunos de los ácidos grasos más comunes en la naturaleza

Número de carbonos	Notación	Nombre común	Clasificación
12	C12:0	Ácido láurico (LAA)	Saturado
12	C12:1 $\omega$ -3	Ácido lauroleico (LOA)	Monoinsaturado
14	C14:0	Ácido mirístico (MA)	Saturado
16	C16:0	Ácido palmítico (PA)	Saturado
16	C16:1 $\omega$ -7	Ácido palmitoleico (POA)	Monoinsaturado
18	C18:0	Ácido esteárico (EA)	Saturado
18	C18:1 $\omega$ -9	Ácido oleico (OA)	Monoinsaturado
18	C18:1 $\omega$ -9	Ácido elaídico (ELA)	Monoinsaturado
18	C18:1 $\omega$ -7	Ácido vaccénico (VA)	Monoinsaturado
18	C18:2 $\omega$ -6	Ácido linoleico (LA)	Poliinsaturado
18	C18:3 $\omega$ -3	Ácido $\alpha$ -linolénico (ALA)	Poliinsaturado
18	C18:3 $\omega$ -6	Ácido $\gamma$ -linolénico (GLA)	Poliinsaturado
18	C18:4 $\omega$ -3	Ácido estearidónico (SDA)	Poliinsaturado
20	C20:1 $\omega$ -11	Ácido gadoleico (GA)	Monoinsaturado
20	C20:4 $\omega$ -3	Ácido araquidónico (AA)	Poliinsaturado
20	C20:5 $\omega$ -3	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	Poliinsaturado
22	C22:1 $\omega$ -11	Ácido cetoleico (CA)	Monoinsaturado
22	C22:1 $\omega$ -9	Ácido erúxico (EUA)	Monoinsaturado
22	C22:5 $\omega$ -3	Ácido docosapentaenoico (DPA)	Poliinsaturado
22	C22:6 $\omega$ 3	Ácido docosahexaenoico (DHA)	Poliinsaturado

Cabe mencionar que el uso de nombres comunes y en química, la nomenclatura sistemática es la dictada por la IUPAC, son de igual forma empleados para referirse a los AGs. Para los AGIs, puede también, adoptarse la nomenclatura del carbono omega tal como se describe en el párrafo anterior y se presenta en la Tabla 1. Los ácidos grasos omega-3 (AGs  $\omega$ -3) son aquellos cuyo primer doble enlace de ocurre a tres carbonos del metilo terminal, mientras que en los omega-6 (AGs  $\omega$ -6) el primer doble enlace se encuentra a 6 carbonos (Sokoła-Wysoczańska, 2018).

En su mayoría los AGPIs son considerados AG-Es y deben ser adquiridos por medio de la dieta. Los ácidos poliinsaturados de cadenas largas ( $\geq 20$  carbonos), tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5  $\omega$ -3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6  $\omega$ -3) son de interés especial; estos ácidos pueden ser sintetizados *in vivo* a partir de precursores insaturados C18 (principalmente LA y ALA) (Kapoor & Patil, 2011). En la Figura 2 se muestra esquemáticamente los ácidos insaturados sintetizados sucesivamente *in vivo* a partir de LA y ALA.

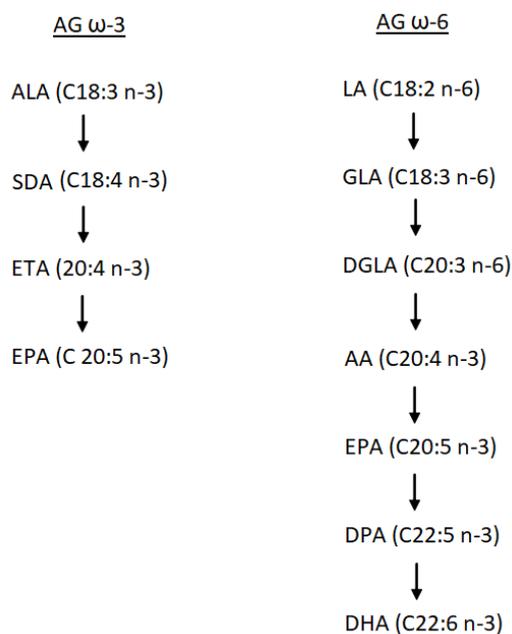


Figura 22. Ruta simplificada de síntesis de AG-Es de cadena larga a partir de sus precursores (Kapoor & Patil, 2011)

Los AGPIs, principalmente los omega-3 y omega-6, son muy relevantes para la salud del ser humano. En el cerebro, estos compuestos regulan la estructura y función de neuronas, células gliales y células endoteliales (Bazinet & Layé, 2014). El EPA, el DHA y el ácido araquidónico (AA, C20:4  $\omega$ -6), contribuyen en la fluidez de la membrana celular y en la regulación de la expresión génica (Schuchardt, Huss, Stauss-Grabo, & Hahn, 2009). Los AGIs  $\omega$ -3 presentan propiedades anticoagulantes y antihipertensivas, regulan el metabolismo de los lípidos y apoyan el funcionamiento del sistema nervioso central y la vista (Sokoła-Wysoczańska, 2018). Se ha demostrado que el consumo de AGIs  $\omega$ -3 C20-C22 protege contra el desarrollo del síndrome metabólico y la intolerancia a la glucosa (Ebbesson, y otros, 2005). Cabe señalar que síndrome metabólico es asociado con un mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 y es caracterizado por síntomas como: obesidad visceral, resistencia a la insulina, hipertensión arterial y dislipidemia (Hwu, Hsiung, & Wu, 2008). Aunado a esto, estudios epidemiológicos han encontrado una relación entre enfermedades como la depresión y una dieta baja en AGIs  $\omega$ -3, encontrando en estudios bioquímicos bajos niveles de estos ácidos en las membranas de eritrocitos tanto en pacientes depresivos como esquizofrénicos (Peet & Stokes, 2012). Por otro lado, se ha demostrado que los AGIs  $\omega$ -6 se encuentran estrechamente relacionados con la regulación del proceso inflamatorio y la respuesta del sistema inmune (Innes & Calder, 2018).

Además de la importancia del consumo de los AGIs  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, diferentes estudios revelan la necesidad de mantener una relación en ingesta entre AGIs  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 en los niveles más bajos posibles, idealmente en un rango de 1/1 a 4/1 (Simopoulos & Cleland, 2003). Cabe mencionar que los ácidos  $\omega$ -6 son más abundantes en los alimentos en comparación con  $\omega$ -3. El mantener la proporción más baja posible de AGIs  $\omega$ -6 respecto a  $\omega$ -3 ha demostrado disminuir el riesgo de desarrollar desordenes inflamatorios (DiNicolantonio, PharmD, & James O'Keefe, 2020), reducir la proliferación de células cancerígenas en pacientes con cáncer colorrectal y disminuir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y autoinmunes (Chaves, Singh, Khan, Wilczynska, & Takahashi, 2019). Como una medida de prevención ante enfermedades cardiovasculares, una relación 4/1 se ha asociado con una disminución del 70 % en la mortalidad total (Candela, López, & Kohen, 2005). En la actualidad, la dieta occidental

promedio presenta valores de la relación de AGIs  $\omega$ -6/  $\omega$ -3 alrededor de 15-20/1, en la población japonesa se observan valores de 4/1, en la India rural 5-6/1, en Reino Unido y el norte de Europa 15/1 y en la India urbana 38-50/1 (Simopoulos A. , 2004).

Tomando en cuenta lo anterior, existe una alta demanda de procedimientos analíticos que permitan la determinación de los diferentes AGs en alimentos y muestras biológicas y que a su vez puedan ser implementados en el análisis de largas series de muestras. Los resultados de estos análisis facilitan la implementación de dietas con una relación adecuada en la ingesta de AGs de diferentes series  $\omega$ .

En este proyecto de tesis se plantea evaluar la factibilidad de diferentes tipos de derivatización de los AGs para lograr su determinación confiable, mediante un protocolo simple. Específicamente, la propuesta consiste en la obtención de esteres metílicos de ácidos grasos (FAMES, por sus siglas en inglés) y una reacción adicional para introducir una etiqueta de enlaces dobles en la cadena de carbono Posteriormente, las muestras serán sometidas al análisis mediante diferentes técnicas instrumentales, enfocándose principalmente en el uso de espectrometría de masas con ionización suave (ESI-QTOF-MS).

## **1.2 Desafíos y estrategias para la determinación de los AGs**

Existen diferentes desafíos en el desarrollo de nuevos procedimientos para el análisis de AGs, entre los de mayor relevancia podemos destacar:

- a) Diversidad estructural y diversidad de formas (isómeros cis y trans e isomería posicional)
- b) Baja polaridad y volatilidad
- c) Baja eficacia de ionización en sistemas de ionización suave
- d) Omnipresencia de lípidos

Como se mencionó anteriormente los AGs pueden encontrarse en la naturaleza en diferentes formas. Los aceites vegetales están compuestos principalmente por triglicéridos (90-98%) y pueden contener pequeñas cantidades de diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres, además de fosfolípidos, fosfátidos, carotenos, tocoferoles, compuestos de azufre y rastros de agua (Srivastava & Prasad, 2000). Los triglicéridos son moléculas formadas por la esterificación entre una molécula de glicerol y tres AGs, cuando uno de los AGs es remplazado por un grupo fosfato se obtiene un fosfolípido. Los fosfolípidos son el principal constituyente de las membranas celulares en los seres vivos. Los AGIs debido a la presencia de dobles enlaces pueden presentar diferentes isómeros geométricos (cis-trans), aumentando el número de variantes de estos compuestos en la naturaleza. Los principales AGIs en aceites de semillas vegetales son el ácido linoleico y oleico, seguidos del palmítico, esteárico, láurico, mirístico y erúcido. Por otro lado, en grasas animales, comúnmente podemos encontrar al ácido mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, eicosenoico, araquidónico, EPA y DHA (Gunstone, 1996). En ambos casos, aceites vegetales y animales, la concentración de los diferentes AGs puede variar dependiendo de la especie.

Los AGs son considerados moléculas anfipáticas, en las cuales su carácter hidrofóbico aumenta con el tamaño de la cadena de carbonos. Los AGSs de cadena relativamente larga suelen encontrarse como sólidos a temperatura ambiente y su punto de fusión aumenta al aumentar el número de carbonos, esto se relaciona con una tendencia a establecer interacciones del tipo Van der Waals, lo cual ocurre como consecuencia de la configuración lineal de las moléculas. En el caso de los AGIs, la presencia de dobles enlaces y de isómeros trans, disminuyen las interacciones intermoleculares del tipo Van der Waals, por lo cual es común encontrar este tipo de compuestos en forma líquida a temperatura ambiente aun cuando su cadena de carbonos es larga.

Los procedimientos de análisis en base a cromatografía de gases y espectrometría de masas requieren la formación de los esteres metílicos de los AGs (FAMES). En estos sistemas típicamente se usa ionización por impacto de electrones (EI) con una energía de ionización de 70 eV. Debido a una buena repetibilidad de espectros EI, muchas de las bases de datos existentes en el mundo incluyen espectros adquiridos en estas condiciones permitiendo la identificación de los analitos de interés independientemente

del instrumento en el cual se realizó el análisis (Gross, 2004). Sin embargo, cabe mencionar que la identificación de compuestos, especialmente aquellos no incluidos en bases de datos, a menudo se dificulta debido a que los iones moleculares no siempre son adquiridos y los patrones de fragmentación pueden ser complejos. En 2018, Beccaria y otros utilizaron EI en un sistema GC-MS con un solo cuadrupolo, demostrando que al disminuir la energía de ionización (20, 30, 50 eV en lugar de 70 eV), se podían detectar los iones moleculares de los FAMES, aunque la sensibilidad en el análisis cuantitativo se vio disminuida (Beccaria, y otros, 2018). Una limitación de EI es que los padrones de fragmentación de isómeros cis y trans normalmente no pueden ser diferenciados sin una estrategia de análisis extra, como derivatización o separación previa.

Como alternativa a EI, existen técnicas de ionización suave, entre ellas ionización por electronebulización (ESI), misma que se usa acoplada a sistemas de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas. En este caso, el carácter apolar de los FAMES es la causa de una baja eficacia de su ionización y, por lo tanto, una baja sensibilidad. El uso de ESI es más factible en el caso de ácidos grasos no esterificados con el grupo metil e insaturados. Cabe también mencionar que los espectros de fragmentación, requeridos para la identificación contundente, dependen de la composición de la solución introducida (solventes, tampones, sales) y también de las condiciones aplicadas en zona CID (disociación inducida por colisiones) de tal manera que hay muy pocos bases de datos disponibles (Brugger, Erben, Sandhoff, Wieland, & Lehmann, 1996). Es necesario resaltar que, en espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) basada en ESI, los datos de la masa exacta, del padrón isotópico y los espectros de fragmentación son elementos suficientes para confirmar la identidad de un compuesto, aunque en el caso de ácidos grasos no siempre es posible discriminar sus isómeros.

Además de problemas relacionados con similitud en la polaridad/apolaridad, con la presencia de isómeros cis y trans e isómeros posicionales, el análisis de AGs forma un reto importante, debido a la omnipresencia de lípidos. Durante manejo de la muestra, su pretratamiento y el análisis instrumental, los lípidos pueden provocar las contaminaciones por el contacto con la piel humana, debido a la contaminación de reactivos, solventes, material de laboratorio, sistemas de introducción a instrumentos

analíticos, etc. El uso de buenas prácticas de laboratorio y una correcta limpieza del material son indispensables.

### **1.3. Revisión de estrategias de derivatización de AGs, útiles en el análisis por espectrometría de masas**

Existen diversas estrategias para poder sortear los desafíos implicados en el análisis de los AGs, la selección de la mejor estrategia a emplear dependerá de factores como: la composición de muestra, la estructura y forma de los ácidos grasos presentes en dicha muestra, así como de la técnica analítica que se pretenda utilizar. En la Figura 3 se presentan un esquema de algunas estrategias enfocadas en la determinación de AGs individuales reportadas previamente. Se puede observar dos etapas clave, (i) la liberación de los AGs de las estructuras en las que se encuentran de manera natural en la muestra original (típicamente triglicéridos) y (ii) una derivatización que permita lograr la separación y/o detección de los compuestos de interés de una manera más eficiente. Obviamente, el tipo de derivatización dependerá de la técnica analítica seleccionada. El análisis de los AGs libres comúnmente requiere una separación previa de los compuestos mediante técnicas cromatográficas, ya sea cromatografía de gases o de líquidos, además de un adecuado sistema de detección, siendo la espectrometría de masas de particular interés para el desarrollo del presente trabajo de tesis.

La liberación de los AGs de sus formas nativas puede llevarse a cabo de diferentes maneras, una opción consiste en la reacción de transesterificación formando FAMES y liberando glicerol. Alternativamente, la hidrólisis de triglicéridos catalizada en medio básico, ácido o por enzimas, permite la obtención de AGs libres. Cabe mencionar, que mientras que los FAMES típicamente son separados por cromatografía de gases con detector de ionización en flama o detector másico, los ácidos grasos libres requieren normalmente una derivatización previa a su separación por sistemas cromatográficos.

## Estrategias para el análisis de AGs

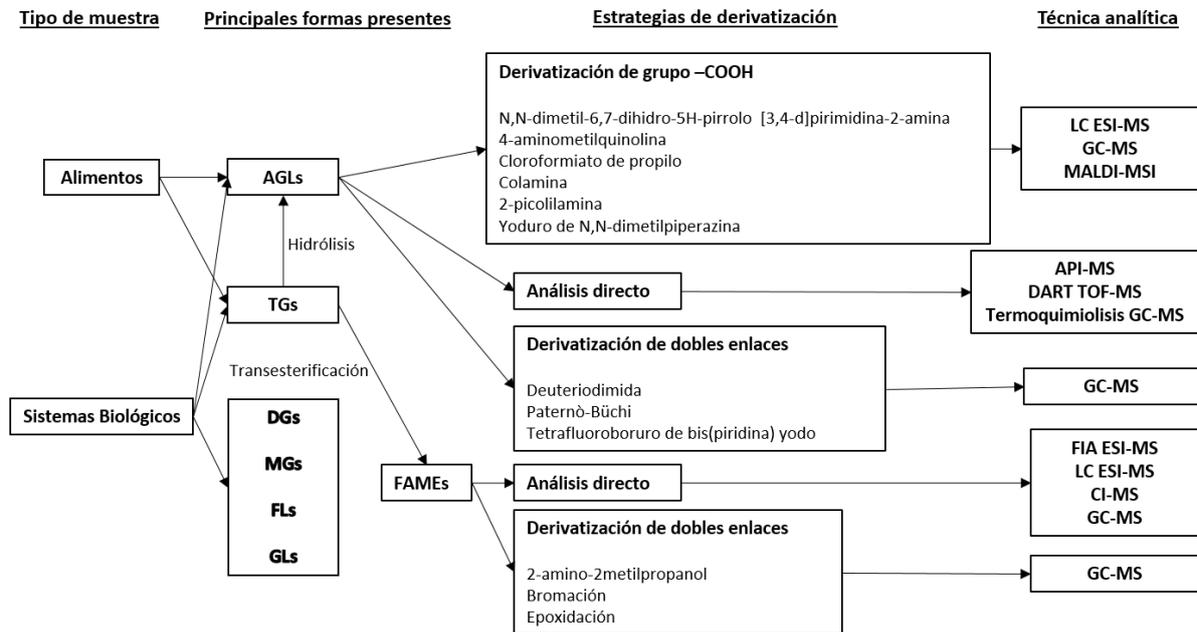


Figura 33. Estrategias para el análisis de ácidos grasos (AGs: ácidos grasos, AGLs: ácidos grasos libres, TGs: triacilglicérols, DGs: diacilglicérols, MGs: monoacilglicérols, FLs: fosfolípidos, GLs: glicolípidos, FAMEs: ésteres metílicos de ácidos grasos, LC: cromatografía de líquidos, GC: cromatografía de gases, FIA: inyección directa en flujo, CI: ionización química, MALDI: ionización/desorción laser asistida por matriz, DART: análisis directo en tiempo real, ESI: ionización por electronebulización, TOF: tiempo de vuelo, MS: espectrometría de masas) (Li, Lin, Yu, & Cai, 2020), (Christie, 1998), (Martínez-Lozano & Fernández de la Mora, 2008), (Reis, Reis, Leath, & Stelwagen, 2011), (Robert, Casey, Cox, Kirk, & Voorhees, 2015), (Fay & Richli, 1991), (Xia, He, Ren, Xu, & Wan, 2020), (Cheng, 2022), (Jensen, Kenneth, & Gross, 1985), (Xie & Xia, 2019), (Pelt & Brenna, 1991) (Mushtaq, y otros, 2011).

En base a una revisión bibliográfica, en la Figura 3 se presentan algunos agentes derivatizantes utilizados en la determinación de AGs por diferentes técnicas analíticas. Podemos diferenciar a estos derivatizantes en dos categorías, los que tienen como objetivo el grupo carboxílico y los que tienen por objetivo el marcaje directo de los dobles enlaces carbono-carbono en AGLs. A continuación, en el texto se desglosarán algunas de las estrategias para el análisis de AGs, compatibles con técnicas de espectrometría de masas.

### 1.3.1. Reacción de transesterificación

Como se ha mencionado anteriormente, los triglicéridos son la principal forma en que podemos encontrar a los AGs, tanto en muestras de aceites vegetales como en una

amplia variedad de alimentos. Una de las principales estrategias empleadas para el análisis de estos compuestos se basa en la transesterificación de triacilglicéridos en metanol, para la obtención de los FAMEs correspondientes. La reacción de transesterificación puede ser catalizada tanto por ácidos (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y BF<sub>3</sub>) como por bases (NaOCH<sub>3</sub>, KOH y NaOH), los cuales normalmente se encuentran disueltos en metanol (Liu, 1994).

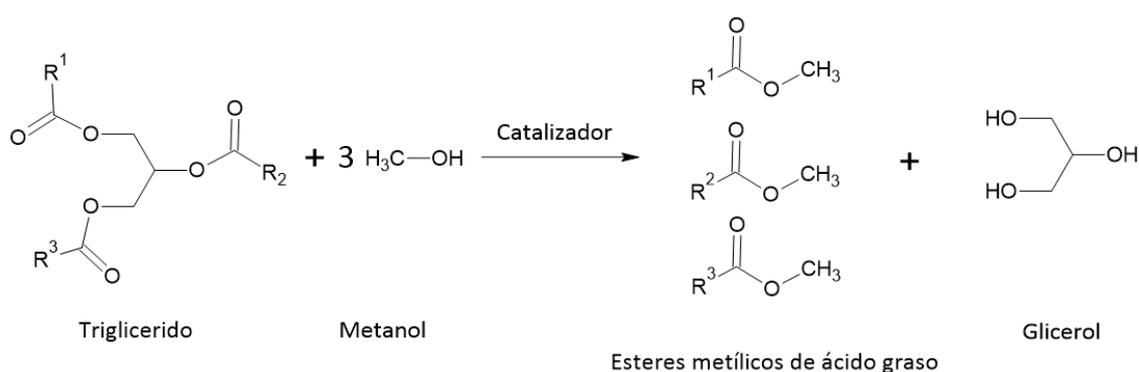


Figura 4 4. Reacción de transesterificación de triglicéridos

En la Figura 4 se muestra el esquema general de la reacción de transesterificación con la conversión de ácidos grasos en FAMEs y la liberación de glicerol. Existen reportadas en la literatura un gran número de variaciones de esta reacción en la que se modifican, los catalizadores y las condiciones empleadas. Es indispensable tomar en cuenta el tipo de muestra a analizar para la selección correcta de la técnica de transesterificación indicada. Cabe destacar que la eficacia en la reacción de transesterificación requiere de la eliminación del agua presente en el medio.

### 1.3.2. Análisis directo de FAMEs

Una vez obtenidos los FAMEs, estos pueden ser analizados por diferentes técnicas instrumentales, una de las más empleadas para el análisis de este tipo de compuestos es la cromatografía de gases con detección por ionización en flama (GC-FID). Otra opción de análisis es el acople de la separación por GC con espectrometría de masas (GC-MS).

**Tabla 2.** Análisis de AGs por determinación de FAMES

Referencia	Técnicas analíticas usadas	Tratamiento de ácidos grasos	Tipo Muestra	Método de identificación
(G.P.P.Kamatoua & A.M.Viljoenab, 2017)	GCxGC-TOF-MS GC-FID-MS	Formación de FAMES	Aceite de palma refinado de Ghana, Camerún y Nigeria.	Estándares de FAMES comprados en Sigma Aldrich
(Killeen, Marshall, Burgess, Gordon, & Perry, 2017)	GC-MS FT-Raman	Formación de FAMES	11 suplementos comerciales de aceite de PUFA $\omega$ -3 en cápsulas de gelatina blanda.	Estándar Supelco FAME mix (#18917)
(Silveira, y otros, 2017)	UV/VIS GC-FID	Análisis directo Formación de FAMES	8 muestras de aceite de oliva extra virgen.	Estándares da AGs
(Negrete, y otros, 2018)	FIA-ESI-QTOF-MS GC-FID	Formación de FAMES	9 aceites cosméticos.	Estándar Supelco FAME mix (#18917) estándar methyl ricinoleate (#83916 Sigma)
(Katkade, Syed, Andhale, & Sontakke, 2018)	GC-FID	Formación de FAMES	Semillas de girasol.	Uso de Estándares de FAMES
(Karunathilakaa, y otros, 2019)	Cromatografía en capa fina GC-FID ATR-FTIR FT-NIR	Formación de FAMES Análisis Directo	Suplementos dietéticos omega-3 comerciales, 76 en cápsulas blandas y 19 en forma líquida.	Estándares NIST SRM 3275-1 SRM 3275-2 SRM 3275-3
(Mihai, NEGOIȚĂ, & BELC, 2019)	GC-MS	Formación de FAMES	Estándar de referencia SRM®2387-peanut butter	F.A.M.E. Mix C4-C24 Bellefonte, PA, USA, SRM®2377, NIST. Estándar Interno FAME-IS C23:0 Sigma Aldrich.
(Ghaleshahi, H, Gh., & M., 2019)	GC-FID	Formación de FAMES	Semillas de lino, perilla y albahaca	Estándar de FAMES de Sigma Aldrich
(Rincón-Cervera, González-Barriga, Romero, Rojas, & López-Arana, 2020)	GC-FID	Formación de FAMES	8 especies de peces y 9 especies de mariscos	Estándar Supelco FAME mix (#18917)
(Nagumalli, Jacob, & Costa, 2020)	UPLC-ESI-MS/MS	Formación de FAMES	Estándares de referencia de aceite de semilla de algodón, aceite de semilla de girasol, aceite de palma, aceite de coco, aceite de canola, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja comprados en Sigma Aldrich	Mezcla estándar de FAMES comprado en USP
(Iwakoshi, y otros, 2021)	GC-FID GC-QTOF-MS	Extracción en fase sólida en fase reversa. Formación de BrFAME	2 tipos de refrescos carbonatados japoneses	Estándares BVO comprados en Spectrum Chemical y Penta Manufacturing Company
(Rydlewski, y otros, 2021)	GC-FID FIA-ESI-MS	Obtención de FAMES	Leche Materna	FAME Mix, C4-C24 de Sigma Aldrich

FAMES: esteres metílicos de ácidos grasos, UPLC: cromatografía de líquidos de ultra presión, MS: espectrometría de masas, MS/MS: espectrometría de masas-masas, ESI: ionización por electronebulización, GC: cromatografía de gases, GCxGC: cromatografía de gases de dos, FIA: infusión directa en flujo, TOF: analizador de tiempo de vuelo, FID: detector de ionización en llama, NIR: infrarrojo cercano, FT: transformada de Fourier, FTIR: infrarrojo con transformada de Fourier, ATR: reflectancia total atenuada

En la Tabla 2, se presentan un breve resumen de diferentes reportes de la determinación de FAMES, donde se puede notar una clara preferencia del uso de las técnicas instrumentales antes mencionadas. En particular, se puede observar que la GC-FID es una técnica ampliamente utilizada para el análisis de FAMES; entre sus ventajas hay que mencionar su simplicidad, no requerimiento de un equipo costoso, y una buena selectividad y reproductibilidad, aunque esta técnica no es apta para realizar el análisis cuantitativo a nivel de trazas o ultra-trazas y no permite distinguir entre isómeros cis y trans (Bollinger, Rohan, Sadilek, & Gelb, 2013).

Si bien la GC-FID a menudo suele ser utilizada para la evaluación de los perfiles lipídicos de aceites de origen animal y vegetal, el tiempo de corrida por muestra es considerable y la información obtenida sobre la estructura de los AGs es limitada. Como se puede observar en la Tabla 2, además de GC-FID y GC-MS, se han utilizado otras técnicas de separación como la cromatografía de líquidos de ultra alto rendimiento, acoplada mediante ESI con espectrometría de masas en tándem (UPLC-ESI-MS/MS) para el análisis de FAMES (Nagumalli, Jacob, & Costa, 2020).

El uso ESI para la ionización de FAMES en espectrometría de masas es viable para aquellos compuestos que presentan suficiente polaridad para ser ionizados eficientemente en modo negativo o positivo. Una de las principales ventajas de la HRMS es su excepcional selectividad, lo que hace posible la determinación de varios compuestos sin su separación previa, utilizando infusión directa (ID) de las muestras. De esta manera, se acorta el tiempo de análisis, manteniendo todos beneficios de HRMS, tales como: medición de masa exacta, registro de espectros de fragmentación, uso de compuestos marcados con isotopos estables para cuantificación, entre otros. Como un ejemplo, se puede mencionar el estudio de Vivarelli y otros en 2017, donde la determinación de FAMES en diésel se logró por DI-ESI (+)-HRMS, usando como estándar interno FAME C19:0 (Vivarelli, y otros, 2017). En otro estudio, usando la misma técnica de DI-ESI (+)-HRMS, se logró determinar concentraciones menores a 5 ppm de FAMES en combustible de avión con buena precisión y repetitividad (Eide, Neverdal, & Westad, 2010).

En 2018 Negrete y otros, realizaron la determinación de FAMES por FIA-ESI-QTOFMS, reemplazando el sistema convencional de la infusión directa por un sistema de inyección

de pequeñas alícuotas de muestra en flujo continuo de un portador (FIA, por sus siglas en inglés). En el trabajo citado, la ionización se llevó a cabo en modo positivo, observándose mayor sensibilidad en comparación con el modo ESI negativo; los iones monitoreados correspondieron a moléculas de los FAMES catonizadas con sodio. La eficacia de ionización resultó ser mejor para los FAMES de AGIs en comparación con los de AGSs, esto debido a su mayor polaridad (Negrete, y otros, 2018).

En este mismo estudio, como estándar interno se utilizó el ion de trímero de formiato de sodio ( $[\text{Na} (\text{NaCOOH})_3]^+$ ) para el sistema FIA-ESI-QTOFMS y el éster metílico de ácido tridecanoico (C13:0 Me) para el sistema GC-FID. Dependiendo de la técnica instrumental utilizada, otros estándares internos para el análisis de AGs que pueden ser empleados son: el ácido nonadecanoico (C19:0) (Schreiner, 2005) y ésteres metílicos tri-deuterados ( $\text{d}_3$ -FAMES) (Thurnhofer & Vetter, 2006), entre otros.

### **1.3.3. Derivatización de FAMES**

Si bien es posible realizar una determinación directa los FAMES obtenidos a partir de los triacilglicéridos, la determinación de las estructuras e identificación de los diferentes isómeros de AGIs sigue siendo un reto importante. Los FAMES de AGS son fáciles de identificar mediante técnicas de MS gracias a sus padrones de fragmentación sencillos, por otro lado, los AGIs presentan padrones de fragmentación complejos y la identificación y localización de dobles enlaces sin un tratamiento adicional resulta desafiante (Furuhashi & Weckwerth, 2013). Para poder dilucidar de manera adecuada las estructuras de los AGIs presentes en las muestras es de suma importancia la implementación de procedimientos que permitan localizar la posición de los dobles enlaces en las cadenas de carbono. Una de las estrategias más utilizadas es llevar a cabo una segunda derivatización, tomando los FAMES como punto de partida.

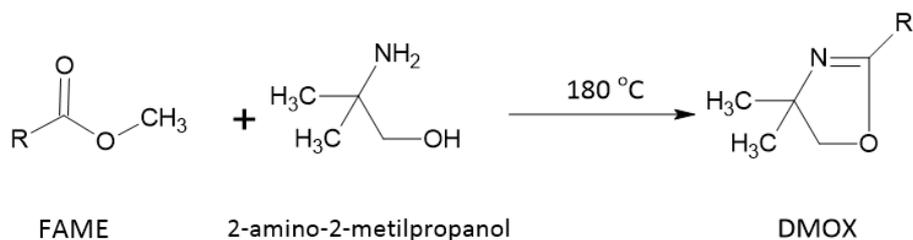


Figura 55. Formación de DMOX (Fay & Richli, 1991)

Como ya mencioné anteriormente, la determinación de las posiciones de los dobles enlaces en los AGIs es uno de los mayores retos para su análisis. La obtención de derivados de 2-alquenil-4,4-dimetiloxazolininas (DMOX) a partir de los FAMES ha sido ampliamente utilizada para este fin. Por ejemplo, la reacción entre los FAMES con el 2-amino-2-metilpropanol para la formación de un derivado de DMOX (Figura 5), con su posterior análisis por GC-MS, permitió la obtención de espectros de masas característicos, con los cuales fue posible llevar a cabo la asignación de las posiciones de los dobles enlaces en AGIs mono y poliinsaturados (Fay & Richli, 1991). Cabe destacar que esta estrategia no implica un marcaje de los dobles enlaces en los FAMES de AGIs, sin embargo, la simplicidad de la reacción, la mejora en la eficacia de ionización al añadir un átomo de nitrógeno y las propiedades cromatográficas de los derivados DMOX que permiten la resolución eficaz de mezclas complejas, hacen del uso combinado de FAMES y los derivados de DMOX un método muy atractivo para el análisis de AGPIs incluyendo sus isómeros (Fay & Richli, 1991).

En 2011 Svetashev empleó la misma estrategia con una modificación en las condiciones de reacción para la formación de DMOX, permitiendo la identificación de los AGIs C24:5 n-6 y C24:6 n-3 (Svetashev, 2011), sin embargo, el análisis de muestras complejas y los largos tiempos de las corridas cromatográficas siguen representando importantes limitaciones para estos procedimientos. Por último, es necesario mencionar que los trabajos citados anteriormente emplean métodos de ionización fuerte y no han sido estudiados para técnicas de ionización suave, las cuales son el objetivo del presente trabajo.

Una alternativa para la localización de dobles en FAMES es la cromatografía líquida de iones de plata combinada con ozonólisis y espectrometría de masas en línea ( $\text{Ag}^+$ -LC/ $\text{O}_3$ -MS), la cual permite la identificación de isómeros del ácido linoleico. En este sistema, se implementan cartuchos de extracción en fase sólida con ion-plata (a menudo varios en serie); gracias a la interacción del  $\text{Ag}^+$  con electrones  $\pi$  de enlaces dobles, ocurre la retención de los FAMES de ácidos grasos insaturados que posteriormente son introducidos a la columna de fase inversa y separados dependiendo del grado de insaturación. Así mismo, se logra la resolución de isómeros cis y trans. Por otro lado, el ozono reacciona con los dobles enlaces conjugados formando aldehídos y fragmentando la molécula (Figura 6), los fragmentos formados dentro de una fuente de fotoionización a presión atmosférica (APPI), son detectados en un espectrómetro de masas, lo cual permite asignar la posición de los dobles enlaces (Sun, Black, Zhao, Ganzle, & Curtis, 2013).

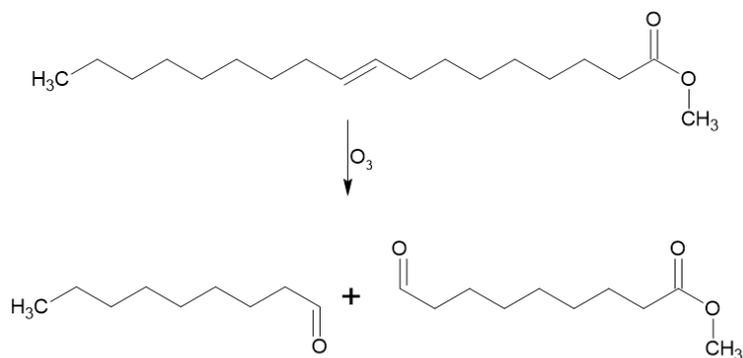


Figura 66. Esquema general de la reacción de ozonólisis del ácido oleico

En la Figura 7 se muestran los espectros obtenidos para los FAMES de dos isómeros del ácido linoleico (9c,11t y 10t,12c) por Sun y otros en el 2013, donde los padrones de fragmentación específicos obtenidos para cada compuesto permiten identificar y discriminar entre ambos isómeros.

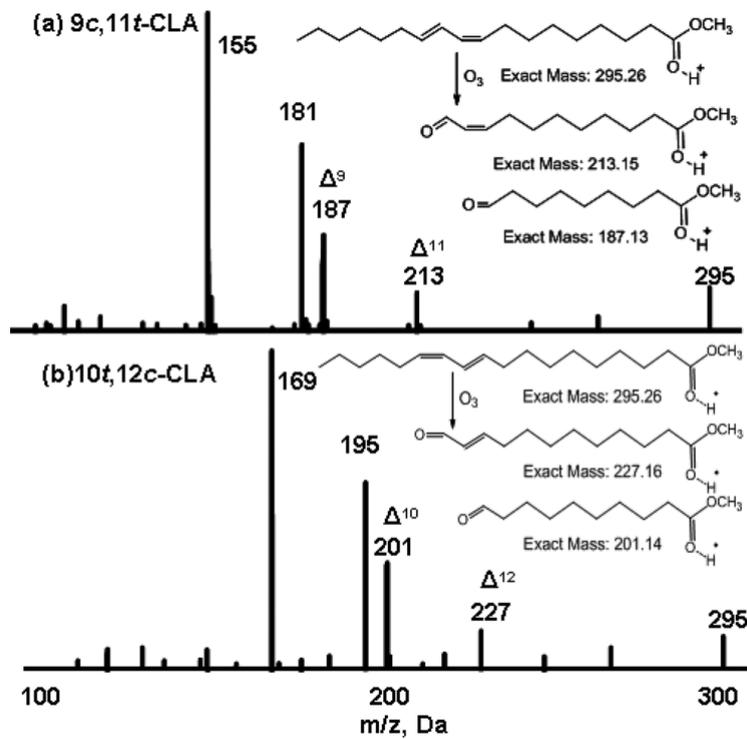


Figura 7.7. Espectro O3-APPI (+)-MS de a) FAME 9c,11t-ácido linoleico y b) FAME 10t,12c-ácido linoleico (Sun, Black, Zhao, Ganzle, & Curtis, 2013)

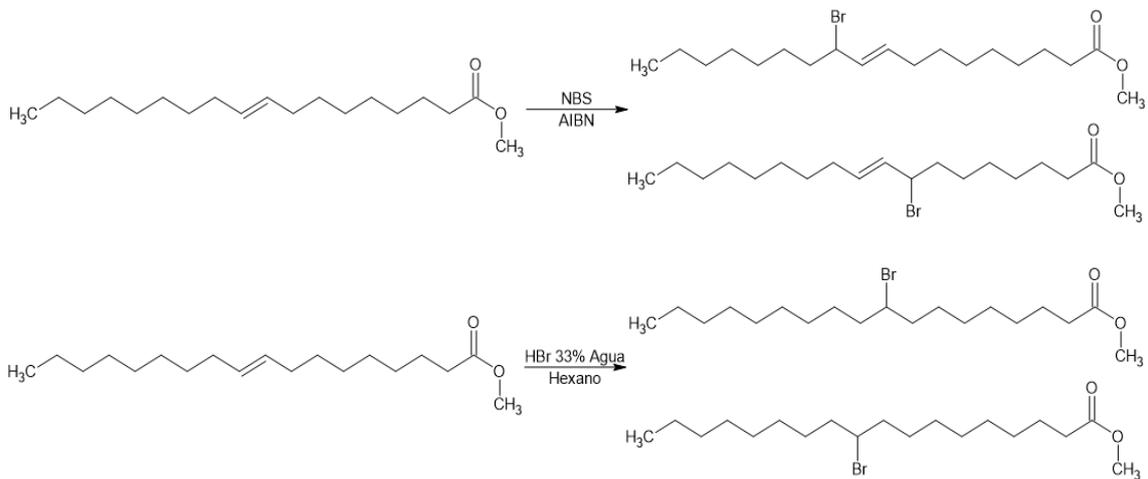


Figura 88. Reacciones de bromación de FAMEs monoinsaturados (esquema general mostrado para el FAME de ácido oleico). NBS: N-bromosuccinimida; AIBN:2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (Winkler, Steinbiß, & Michael, 2013)

En 2013, Winkler y otros investigaron la bromación de FAMEs insaturados mediante modificaciones a la reacción Wohl-Ziegler. Los bromuros alílicos obtenidos fueron posteriormente usados para la obtención de ácidos grasos conjugados mediante de reacciones de eliminación. En el mismo trabajo se realizó la síntesis de diaminas

mediante una serie de reacciones que incluyen como primer paso la hidrobromación de FAMES monoinsaturados, con su subsecuente funcionalización con azida y una reducción por hidrogenación catalizada con paladio sobre carbón. El objetivo principal de esta estrategia sintética fue la obtención de unidades monoméricas para la posterior formación de poliamidas (Winkler, Steinbiß, & Michael, 2013). Si bien el trabajo Winkler no considero el uso de herramientas de MS para la caracterización de los productos obtenidos, el marcaje de moléculas de interés empleando átomos con padrones isotópicos característicos, tal como lo es el Br, es una estrategia que favorece la identificación y cuantificación de compuestos de interés por medio de HRMS. Cabe destacar que las reacciones mencionadas anteriormente fueron utilizadas para la bromación de FAMES monoinsaturados y aún queda por explorar su utilidad para el marcaje de FAMES poliinsaturados (Winkler, Steinbiß, & Michael, 2013). Dicho lo anterior, no podemos dejar de mencionar que las reacciones utilizadas para la bromación de FAMES son de gran interés para el desarrollo del presente trabajo. En la Figura 8 se esquematizan algunas de las reacciones de bromación de AGMIs realizadas por Winkler y otros en el 2013.

Por último, una estrategia para la derivatización de FAMES insaturados enfocada en el marcaje de dobles enlaces que cabe destacar, es la síntesis de epóxidos. En este caso, se trata de la reacción de un oxidante con un doble enlace C=C, en presencia de un catalizador, para la formación de un anillo epóxido. La epoxidación ha sido ampliamente utilizada para el análisis de AGIs y en menor medida de sus FAMES, por esto mismo, las particularidades de la reacción serán abordadas posteriormente, en la sección dedicada a las reacciones de derivatización de AGs libres. Comúnmente la formación de epóxidos de AGIs y de sus FAMES se lleva a cabo en la producción de lubricantes y biocombustibles. Como ejemplo, podemos mencionar trabajos como los de (Rodríguez, y otros, 2021), en el cual se utiliza H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como oxidante y un catalizador enzimático (lipasa tipo B) para la epoxidación de FAMES obtenidos de aceite de semilla de uva, con el objetivo de usar estos productos como una opción más sustentable a los plastificantes convencionales. Si bien, el análisis de los productos obtenidos de la reacción de epoxidación por HRMS parece una buena opción para el análisis de FAMES, la alta

reactividad de los compuestos obtenidos brinda también una plataforma interesante para el posterior marcaje por medio de una reacción secundaria.

### 1.3.4. Hidrólisis de triglicéridos

Aunque la transesterificación permite la liberación de los AGs en forma de FAMEs y es una estrategia ampliamente utilizada para el estudio de este tipo de compuestos, una alternativa interesante se presenta en la hidrólisis de los TGs mediante un tratamiento enzimático o el tratamiento químico con bases como KOH o NaOH en presencia de agua. La hidrólisis de TGs permite la obtención de los AGs libres. La reacción de hidrólisis alcalina de TGs reportada por Eggstein y Kuhlman en 1974 se muestra en la Figura 9.

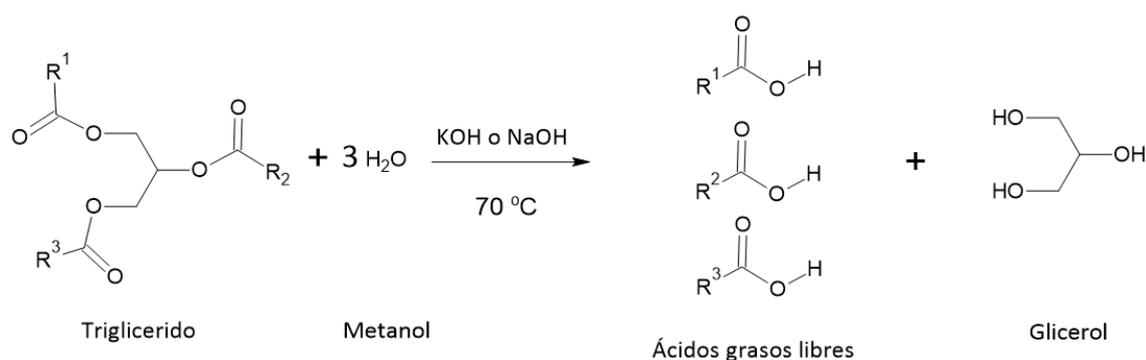


Figura 99. Hidrolisis alcalina de triglicéridos (Eggstein & Kuhlman, 1974)

### 1.3.5. Derivatización de AGIs libres

Como se ha mencionado varias veces, la espectrometría de masas de alta resolución ofrece importantes ventajas en la caracterización estructural de los compuestos; sin embargo, el requerimiento de la ionización suave por electro nebulización es que dichos compuestos puedan formar iones en fase gaseosa. En el caso de ácidos grasos, la eficacia de ionización es generalmente baja, aunque se han reportado aplicaciones de ESI para ácidos de cadena relativamente corta, para ácidos insaturados e hidroxiacidos. Por otro lado, la identificación de múltiples enlaces dobles requiere del registro de

padrones de fragmentación y/o análisis adicionales, donde se realiza el etiquetado de enlace(s) doble(s).

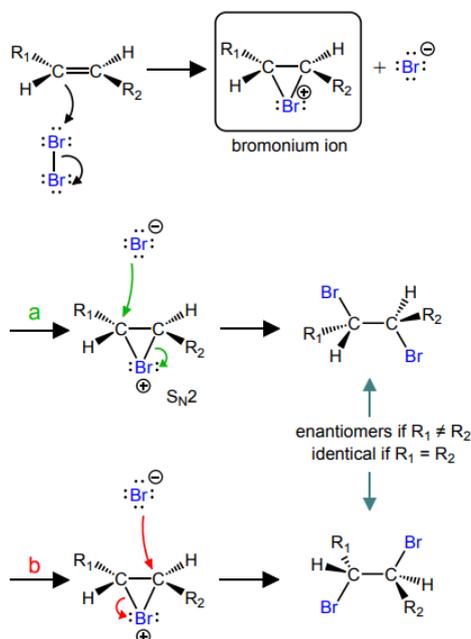


Figura 1010. Esquema de la reacción de bromación de enlaces dobles entre carbonos. (Trinklein, Jiang, & Synovec, 2022)

La reacción entre yodo y los dobles enlaces de AGIs es utilizada para la determinación del parámetro conocido como índice de yodo. Este valor se define como la medida del grado de insaturación de grasas y aceites y se expresa en términos del número de centigramos de yodo absorbidos por gramo de muestra (por ciento de yodo absorbible). El método se basa en la reacción del monobromuro de yodo, en presencia de ácido acético, sobre los lípidos, y en la medición de la cantidad de yodo libre después de la reacción, (NOM-F-408-S-1981). Si bien, la técnica anteriormente mencionada no involucra el uso de HRMS, es importante de mencionar debido a la importancia de la simplicidad de la reacción de las insaturaciones presentes en AGPIs con halógenos. Dicho lo anterior y como fue mencionado en la sección 1.3.3. el uso de bromo para el etiquetado de los dobles enlaces es una estrategia de interés para el análisis por técnicas de MS. La bromación, es una técnica que ha sido utilizada desde los primeros estudios sobre insaturación de lípidos, con la ventaja de poder obtener los productos cristalizados para su posterior caracterización (B. & Stoner, 1937). En 2022 Trinklein y

otros, utilizaron la bromación para la determinación de olefinas en gasolinas, por medio de cromatografía de gases en dos dimensiones con un analizador de tiempo de vuelo (GC X GC-TOFMS). En la Figura 10 se muestra la reacción entre  $\text{Br}_2$  y los dobles enlaces, para carbonos asimétricos, se obtienen dos enantiómeros del producto (Trinklein, Jiang, & Synovec, 2022).

La reacción Paternò-Büchi (PB) presenta una opción interesante para la determinación de la posición de dobles enlaces en AGIs. Se trata de una reacción fotocatalizada en la cual una cetona se une a un doble enlace de un AGIs formando un anillo de oxetano, el cual es posteriormente fragmentado mediante disociación inducida por colisión (CID) en un espectrómetro de masas (Mantzourani & Kokotou, 2022). Se ha demostrado que la reacción es regioselectiva únicamente para AGs conjugados, con preferencia a reaccionar con los dobles enlaces extrémales y orientando los grupos sustituyentes de la cetona en dirección del doble enlace más cercano (Xiaobo & Yu, 2019). La reacción PB has ido utilizada para el análisis de AGs libres, TGs e incluso fosfolípidos. En la Figura 11 se muestra el esquema general para la reacción PB para un AG no conjugado (ácido oleico) por lo cual podemos observar la formación indiscriminada de ambos productos.

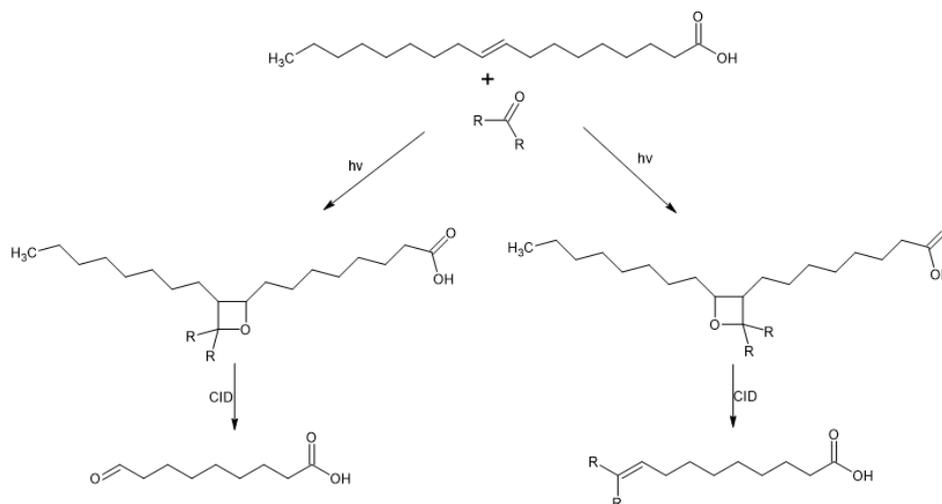


Figura11 11. Esquema general de la reacción Paternò-Büchi para el ácido oleico

En 2022, Xu y otros utilizaron una estrategia de doble derivatización, al hacer reaccionar N,N-dietil-1,2-etanodiamina (DEEA) con los productos obtenidos de la reacción PB, lo

cual permitió la adición de una carga positiva permanente a la molécula asegurando su forma iónica de estos compuestos en ESI (+) (Xu, y otros, 2022). En la Figura 12 se muestra el esquema general de la segunda derivatización anteriormente mencionada y su posterior fragmentación en la zona CID.

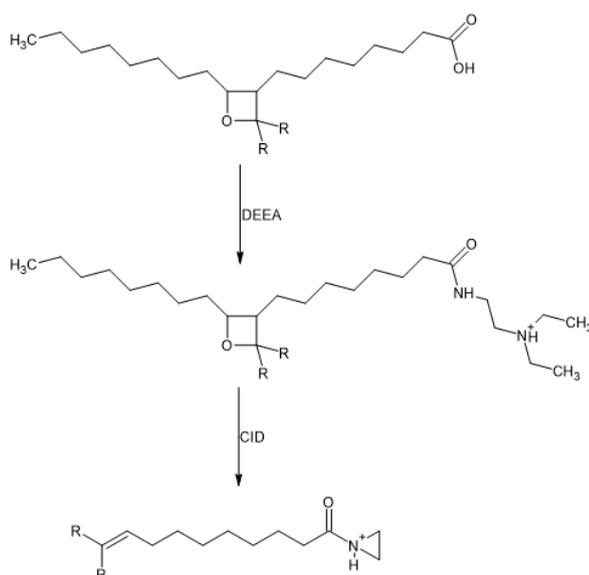


Figura 1212. Derivatización secundaria con DEEA (*N,N*-dietil-1,2-etanodiamina) de uno de los dos isómeros productos de la reacción Paternò-Büchi con el ácido oleico (Xu, y otros, 2022)

En la Figura 13 se muestra un espectro obtenido por Xu y otros para el DHA, empleando su estrategia de doble derivatización. La adición de la carga positiva permanente permitió obtener espectros de muy buena intensidad con patrones de fragmentación específicos; con los cuales fue posible la localización de hasta 6 insaturaciones en una molécula de AGPIs (Xu, y otros, 2022). Cabe mencionar que este y otros trabajos hacen un énfasis especial en cómo la derivatización del grupo carbonilo con un compuesto nitrogenado mejora significativamente la intensidad de los picos, permitiendo la localización de los dobles enlaces y mejorando la sensibilidad del método.

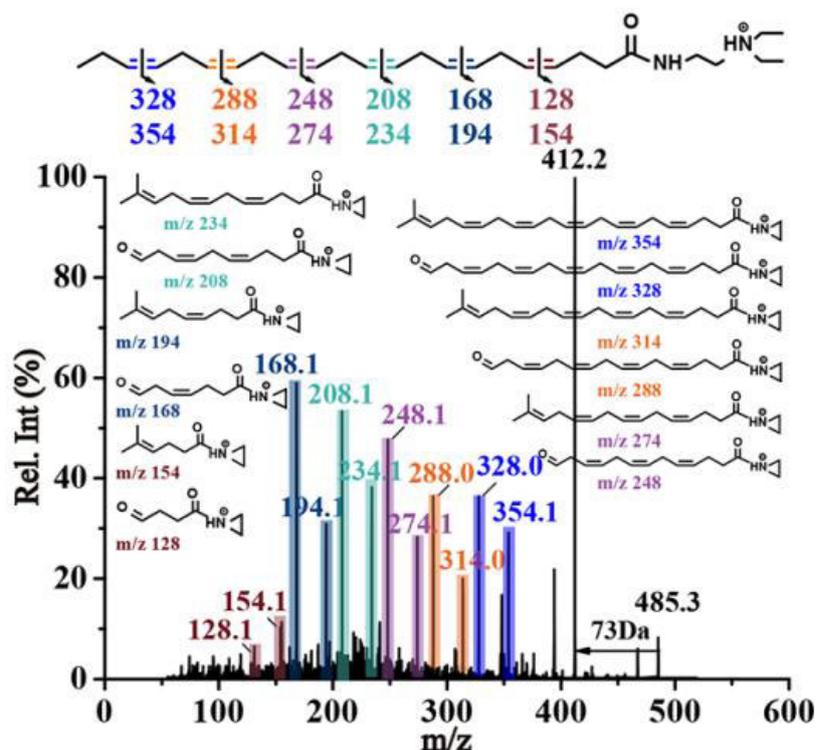


Figura 1313. Espectro obtenido por ID-ESI (+)-Qtrap-MS en tandem del DHA con doble derivatización 1) reacción Paternò-Büchi (con dimetilcetona) y 2) reacción con DEEA (Xu, y otros, 2022)

Existen numerosos trabajos, en los que se introduce una carga iónica permanente para el análisis de AGs, llevando a cabo la modificación sobre el grupo carboxilo por medio de derivatizantes a base de aminas primarias o secundarias. Un ejemplo de esto fue reportado por Bollinger y otros en el 2013; en este trabajo se llevó a cabo el análisis por LC-ESI (+)-MS/MS de AGs derivatizados con N-(4-aminometilfenil)piridinio (AMPP), mejorando la sensibilidad hasta 60 000 veces con respecto al análisis de AGs sin su derivatización (Bollinger, Rohan, Sadilek, & Gelb, 2013). En otro ejemplo, fue demostrado que la reacción del grupo carboxílico con N-metil-piridinio-3-metanamina, permite la separación cromatográfica y discriminación de isómeros estructurales, así como la localización de los dobles enlaces entre átomos de carbono (Young, y otros, 2022).

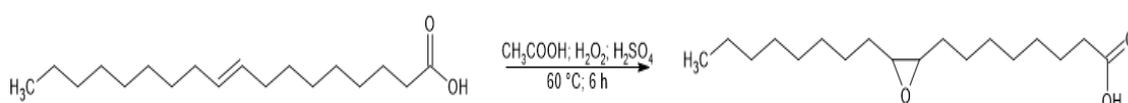


Figura 14. Reacción de epoxidación de ácido oleico (Cruz, y otros, 2021)

En la sección 1.3.3. se mencionó la reacción epoxidación de dobles enlaces entre átomos de carbono. Existen números trabajos enfocados en desarrollar y optimizar procedimientos de epoxidación de ácidos grasos debido a sus aplicaciones industriales en la producción de lubricantes y biocombustibles. Por ejemplo, la reacción entre AGPIs y ácido peracético (ácido acético + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) da como productos los compuestos muy estables a la oxidación, de baja acidez y con una gran capacidad para adsorberse en superficies metálicas; lo que lo que les confiere una gran capacidad de lubricidad y viscosidad (McNutt & He, 2016). En el 2021, Cruz y otros, realizaron una optimización de la reacción descrita previamente utilizando grasa de pollo como fuente de AGPIs, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como catalizador, proporciones molares 0.54 de ácido acético y 2.0 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con relación a la cantidad de insaturaciones, una temperatura de 60 ° C y un tiempo de reacción de 6 horas, obteniendo porcentajes de conversión del 94 % (Cruz, y otros, 2021). En la Figura 14 se muestra el esquema general de la reacción de epoxidación descrita anteriormente para el ácido oleico.

En cuanto al potencial de la reacción de epoxidación para fines analíticos, específicamente en el contexto de la identificación de isómeros de AGPIs, Whang y otros en el 2020 desarrollaron un procedimiento para el análisis de ácidos grasos, utilizando ácido m-cloroperoxibenzoico en diclorometano como agente epoxidante y dejando incubar a temperatura ambiente durante 10 min. Posteriormente, la mezcla de reacción fue introducida por infusión directa en un sistema nanoESI (-)-MS/MS, pudiendo diferenciar entre diferentes isómeros aprovechando los padrones específicos de su fragmentación. En la figura 13 se muestran los espectros MS/MS obtenidos para dos isómeros del ácido C18:1 (9Z y 11Z).

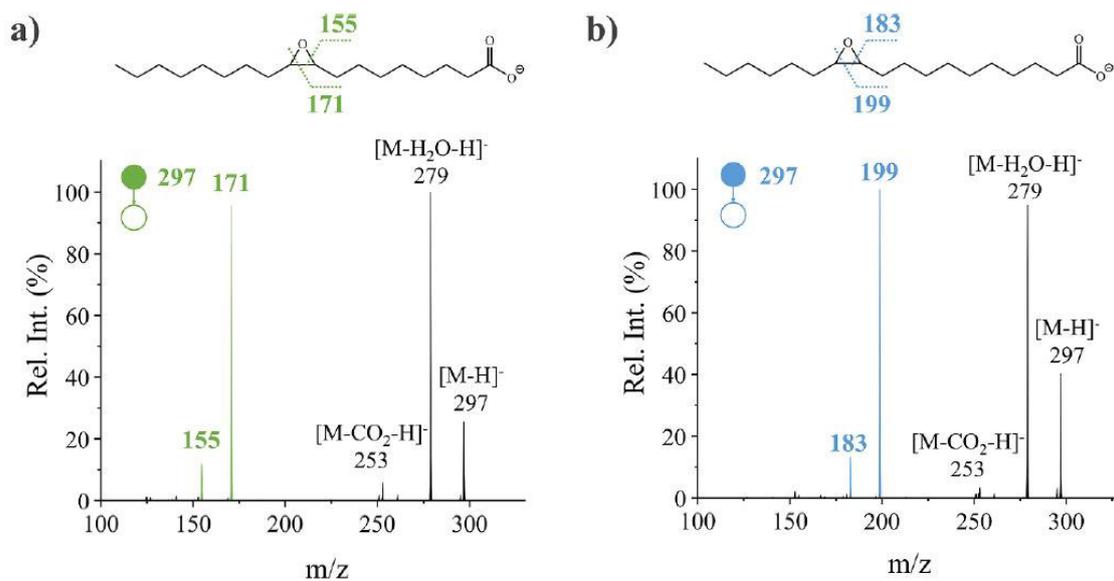


Figura 1514. Espectros nanoESI (-)-MS/MS de epóxidos a) AG 18:1 (9Z) y b) AG 18:1 (11Z) (Wang, Li, Jiang, Meng, & Nie, 2022)

Existe una gran variedad de derivatizantes para ácidos grasos compatibles con MS reportados. En la Tabla 3, resumida de (Mantzourani & Kokotou, 2022), y complementada con información de otras fuentes bibliográficas, se enlistan diversos procedimientos de derivatización para AGs y AGIs, compatibles con el análisis por HRMS.

El presente trabajo de tesis tiene como objetivo explorar diferentes estrategias de etiquetado de enlaces dobles en AGIs para su determinación por espectrometría de masas. El enfoque particular está en localización de los dobles enlaces, empleando para ello herramientas de espectrometría de masas como ESI-QTOF-MS. Se busca probar estrategias que permitan eliminar el largo tiempo de las corridas cromatográficas de los métodos convencionales y analizar muestras de alimentos ricos en TGs, mediante el etiquetado homogéneo de los carbonos del doble enlace, de manera sencilla.

**Tabla 3.** Ejemplos de reacciones de derivatización compatibles con el análisis de AGs por MS  
(Mantzourani & Kokotou, 2022).

Agente derivatizante	Técnica de análisis	Analitos de interés	Diana de derivatización	Referencia
Cloramina	UHPLC-ESI (+)-Q-TOF-MS	AGCL	Grupo carboxilo	(Bian y otros, 2017)
5-(diisopropilamino)amilamina	UHPLC-ESI (+)-Q-TOF-MS	AGs	Grupo carboxilo	(Bian, y otros, 2018)
3-(perfluorooctil)-propilamina	UHPLC-ESI (+)-MS/MS	AGICLs	Grupo carboxilo	(Yuhki, y otros, 2005)
N-(4-aminometilfenil)-piridinio	LC-ESI (+)-MS/MS	AGs	Grupo carboxilo	(Bollinger, y otros, 2010)
4-aminometilquinolina	UPLC-ESI (+)-MS/MS	AGCCs	Grupo carboxilo	(Narreddula, y otros, 2019)
1-(3-aminopropil)-3-bromoquinolinio bromuro	HPLC-ESI (+)-MS/MS	AGs	Grupo carboxilo	(Fu, y otros, 2020)
(R)-(+)-1-feniletilamina	LC-API (+)-DAD-MS	AGLs	Grupo carboxilo	(Algarra, y otros, 2010)
2,4-dimetoxi-6-piperazin-1-il pirimidina	LC-ESI (+)-MS/MS	AGLs	Grupo carboxilo	(Leng, y otros, 2013)
5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil piperazina / 5-dietilamino-naftaleno-1-sulfonil piperazina	LC-ESI (+)-MS/MS	AGLs	Grupo carboxilo	(Jiang, y otros, 2017)
Anilina	LC-ESI (+)-MS/MS	AGCCs	Grupo carboxilo	(Chan, y otros, 2017)
3-nitrofenilhidrazina	UPLC-ESI (-)-MS/MS	AGCCs	Grupo carboxilo	(Han, y otros, 2015)
Cloruro de trimetilaminoacetohidrazida	LC-ESI (+)-MS/MS	AGCCs	Grupo carboxilo	(Song, y otros, 2020)
Bromuro de fenacilo	LC-ESI (+)-MS/MS	AGCCs	Grupo carboxilo	(Ma, y otros, 2019)
Bromuro de dimetilaminofenacilo	UPLC-ESI (+)-MS/MS	AGLs	Grupo carboxilo	(Willacey, y otros, 2020)
O-bencilhidroxilamina	LC-ESI (+)-MS/MS	AGCCs	Grupo carboxilo	(Zeng & Cao, 2018)
Acetona, luz UV	ESI (-)-MS/MS	AGIs	Doble enlace	(Ma, y otros, 2016)
Acetona, luz UV	ESI (-)-MS/MS	AGPIs	Doble enlace	(Murphy, y otros, 2017)
Acetilpiridina	ESI (+)-MS/MS	AGIs	Doble enlace	(Esch & Heiles, 2018)
2',4',6'-trifluoroacetofenona	ESI (+)-MS/MS	AGIs	Doble enlace	(Zhao, y otros, 2020)
2-acetilpiridina	ESI (+)-MS/MS	AGILs	Doble enlace	(Zhao, y otros, 2021)
3-piridincarboxaldehído	UHPLC-ESI (+)-MS/MS	AGIs	Doble enlace	(Han, y otros, 2022)
Dimetildisulfuro	GC-MS	AGIs	Doble enlace	(Nichols, y otros, 1986)
Tetrafluoroboruro de bis(piridina)yodo	HPLC-ESI-MS/MS	AGIs	Doble enlace	(Cheng, y otros, 2022)
Ácido m-cloroperoxibenzoico	ID-nanoESI (-)-MS/MS MALDI-TOF/TOF-MS	AGILs	Doble enlace	(Wang, y otros, 2022)

AGLs: ácidos grasos libres, AGCL: ácidos grasos de cadena larga, AGCL: ácidos grasos de cadena corta, AGPIs ácidos grasos poliinsaturados, AGIs: ácidos grasos insaturados, AGILs: ácidos grasos insaturados libres, LC: cromatografía de líquidos, HPLC: cromatografía de líquidos de alta presión, UPLC: cromatografía de líquidos de ultra presión, UHPLC: cromatografía de líquidos de ultra alta presión, MS: espectrometría de masas, MS/MS: espectrometría de masas-masas, ESI: ionización por electronebulización, ID-nanoESI: ionización por nano con infusión directa, API: ionización a presión atmosférica, DAD: detector de arreglo de diodos, GC-MS: espectrometría de masas acoplada a cromatografía de gases, ID-nanoESI(-)-MS/MS: espectrometría de masas/masas, MALDI: ionización/desorción laser asistida por matriz, TOF: analizador de tiempo de vuelo, TOF/TOF: analizador de tiempo de vuelo con modo reflector.

## **2. Objetivos**

### **2.2. Objetivo general**

Lograr el etiquetado de los átomos de carbono presentes en enlaces dobles de AGIs, mediante una reacción de derivatización que permita la identificación/confirmación y cuantificación de estos compuestos por espectrometría de masas con ionización suave (ESI-QTOF-MS).

### **2.2. Objetivos específicos**

- a) Examinar las estrategias del etiquetado de enlaces dobles en la cadena de carbonos de los AGIs, enfocándose en la reacción de bromación.
- b) Explorar la factibilidad de introducir átomos de Br como una etiqueta de enlaces dobles en la cadena de carbonos para AGIs libres y para sus FAMEs.
- c) Análisis mediante técnicas instrumentales, enfocándose principalmente en el uso de espectrometría de masas con ionización suave por infusión directa ESI-QTOF-MS.

### 3. Desarrollo experimental

#### 3.1. Instrumentación para el análisis y procesamiento de muestras

- Espectrómetro de masas de alta resolución maxis Impact con dispositivo de ionización ESI y analizador de masas cuadrupolo-tiempo de vuelo, ESI-QTOF-MS, Bruker Daltonics.
- Purificador de agua Mili Q WaterPro Ps, Labconco
- Microcentrífuga MC-12, Benchmark
- Speed Vac Vacufuge plus, Eppendorf AG
- Balanza analítica
- Parrilla de calentamiento

#### 3.2. Reactivos y estándares

- Agua desionizada (18.2 MΩ cm, Labconco)
- Bromo, Sigma-Aldrich
- Hidróxido de Potasio, Karal R.A.
- Sulfito de sodio, J. T. Baker
- Metanol HPLC, Karal R.A.
- Isooctano HPLC, CHEM SERVICE
- Ácido sulfúrico, Fluka
- Carbonato de amonio, Sigma-Aldrich
- Aceite de pescado de menhaden F8020, Sigma-Aldrich
- F.A.M.E. Mix C14-C22, SUPELCO (Lote: XA21573V)
- Tridecanoato de metilo solución 1 mg mL<sup>-1</sup>, Sigma-Aldrich
- *trans*-9-eleaidic methyl ester 10 mg mL<sup>-1</sup>, SUPELCO
- *trans*-Vaccenic acid ≥99% (capillary GC), Sigma-Aldrich

#### 3.3. Análisis de datos y análisis estadístico

- Data Analysis 4.1, Bruker Daltonics
- Microsoft Excel
- ChemSketch

## 4. Resultados y discusión

El presente trabajo tuvo como objetivo principal lograr la determinación de AGIs en muestras reales, enfocándose en el desarrollo de un procedimiento de derivatización que permitiera el etiquetado de los carbonos presentes en dobles enlaces C=C, y que a su vez fuera compatible con sistemas de ionización suave en espectrometría de masas de alta resolución. Después de una profunda revisión bibliográfica y de evaluar la factibilidad de varias estrategias previamente reportadas por diversos autores para el etiquetado de carbonos insaturados, se optó por una reacción de bromación, con bromo molecular. La simplicidad de la reacción y la posibilidad de utilizar los patrones isotópicos característicos de las moléculas bromadas para su identificación por medio de técnicas de MS, son las principales ventajas de esta estrategia de derivatización. El desarrollo experimental consistió de varias etapas, las cuales se describen a continuación: 1) Obtención de AGLs y FAMEs a partir de sus formas nativas (TGs), 2) desarrollo de un protocolo de derivatización para el etiquetado de los carbonos insaturados de los compuestos obtenidos para su posterior análisis mediante ESI-QTOF-MS introduciendo la muestra por infusión directa, 3) puesta a punto del procedimiento para el análisis cuantitativo de AGIs, y evaluación de los principales parámetros analíticos para el procedimiento desarrollado, y 4) realización de experimentos de MS/MS que permitan la evaluación de la bromación como estrategia para obtener información estructural de los compuestos de interés.

### 4.1. Liberación de AGs de los triacilgliceroles

#### 4.1.1. Hidrólisis de TGs

Con el fin de obtener AGLs para su posterior bromación se decidió trabajar con el aceite de menhaden. Se tomaron 200  $\mu$ L del aceite y se diluyeron con 1.8 mL de i-octano. Se tomó una alícuota de 20  $\mu$ L del aceite diluido y se le agregaron 200  $\mu$ L de KOH 2N en MeOH a 80°C durante 20 min. Pasado el tiempo, se agregaron 200  $\mu$ L de agua y se dejó reaccionar a la misma temperatura 20 min más. Con la finalidad de neutralizar el exceso de KOH y bajar el pH de la mezcla para asegurar una correcta extracción de los AGs con

un solvente orgánico, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y posteriormente, se realizaron dos extracciones con 500  $\mu\text{L}$  de i-octano, agitando 3 min y centrifugando 5 min a 10 000 x g cada ocasión. El extracto obtenido (20  $\mu\text{L}$ ) fue diluido con 980  $\mu\text{L}$  de MeOH y posteriormente se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  20 mM, llevando el pH de la mezcla aproximadamente a 8, para asegurar una correcta ionización de los AGLs al operar ESI en el modo negativo. La solución previamente preparada se centrifugó 10 min a 10000 x g para precipitar cualquier partícula suspendida presente y se analizó por infusión directa en ESI(-)-QTOF-MS. Los parámetros analíticos del equipo fueron los siguientes: flujo de inyección de 3  $\mu\text{L min}^{-1}$ , con un flujo de nitrógeno como gas de secado de 4 L  $\text{min}^{-1}$  y temperatura de gas de secado 220°C, voltaje del capilar 4500 V, voltaje de desplazamiento en placa -500 V, tiempo de transferencia de 80  $\mu\text{s}$  y un intervalo de 200-600 m/z.

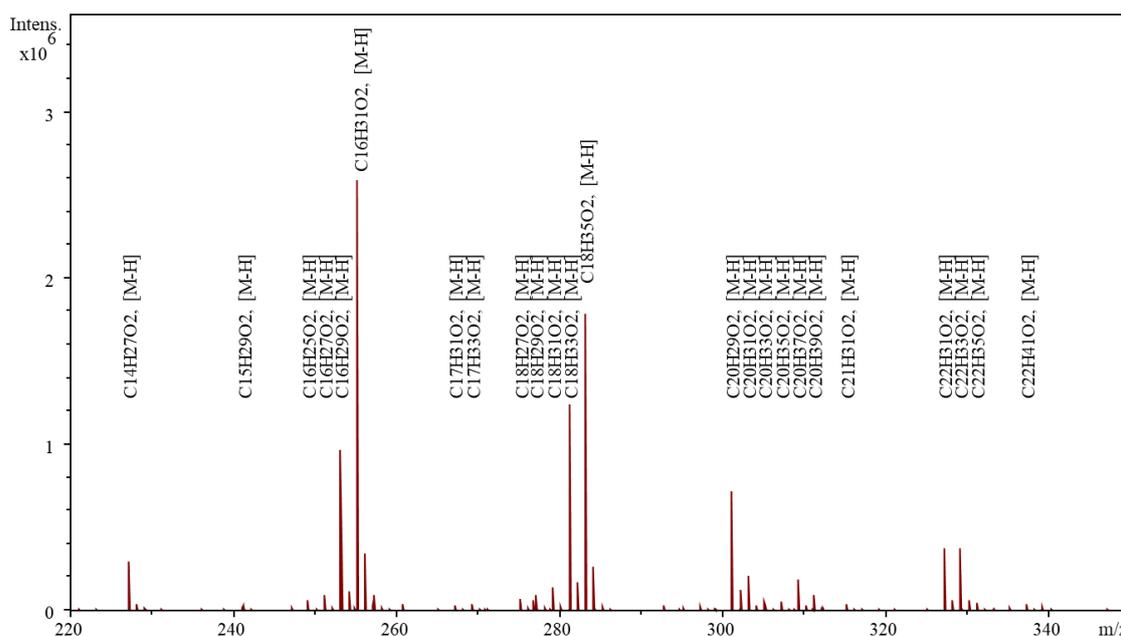


Figura 16 15. Espectro de masas obtenido para aceite de menhaden después de hidrólisis de TGs y extracción de AGs libres, obtenido por infusión directa en ESI(-)-QTOF-MS

En la Figura 16 se muestra un típico espectro de masas adquirido para un estándar de aceite de menhaden de Sigma F8020, tratado con el protocolo de hidrólisis previamente descrito. En la Tabla 4 se enlistan los valores m/z de iones correspondientes a los iones  $[\text{M}-\text{H}]^-$  observados para cada uno de los AGLs, respectivos errores de masas respecto la masas exacta calculada *in-silico* y la asignación de las fórmulas de los AGLs

correspondientes. La asignación se realizó considerando los errores de masas no superan las 5 ppm en ningún caso. Los AGLs identificados en el estándar de aceite de menhaden concuerdan con la descripción del producto proporcionada en la hoja de información del fabricante y lo reportado previamente por Nwosu en 1997 y Beccaria, y otros en 2015. Cabe mencionar que siempre se tomó en cuenta el ion monoisotópico del compuesto.

**Tabla 4.** Lista de iones de AGLs en base a espectro de masa mostrado en Fig. 16. En cada caso, se presenta el valor m/z experimental, la formula elemental del ion  $[M+Na]^+$ , error de masa y la anotación de tipo del ácido (saturado o insaturado).

Fórmula ion [M-H] <sup>-</sup>	m/z	Error [ppm] <sup>1</sup>	CX:n
C14H27O2	227.2016	-0.1	C14:0
C15H29O2	241.2172	-0.4	C15:0
C16H25O2	249.1859	0.3	C16:3
C16H27O2	251.2016	-0.2	C16:2
C16H29O2	253.2174	0.4	C16:1
C16H31O2	255.233	-0.2	C16:0
C17H31O2	267.233	0.3	C17:1
C17H33O2	269.2486	0.1	C17:0
C18H27O2	275.2017	-0.3	C18:4
C18H29O2	277.2174	-0.4	C18:3
C18H31O2	279.2331	-0.6	C18:2
C18H33O2	281.2489	-0.9	C18:1
C18H35O2	283.2642	-0.1	C18:0
C20H29O2	301.2179	1.9	C20:5
C20H31O2	303.2332	0.8	C20:4
C20H33O2	305.2488	-0.5	C20:3
C20H35O2	307.2647	1.6	C20:2
C20H37O2	309.2805	2	C20:1
C20H39O2	311.296	-1.3	C20:0
C21H31O2	315.2338	-2.6	C21:5
C22H31O2	327.234	-3.2	C22:5
C22H33O2	329.2496	-2.9	C22:4
C22H35O2	331.2642	0	C22:3
C22H41O2	337.3122	-2.9	C22:0

1: Valores calculados con Smart Formula, Data Analysis 4.1; 2: valor experimental; CX:n; nomenclatura de AG asignado en base a la formula obtenida.

#### 4.1.2. Transesterificación de TGs

Para la obtención de los FAMES a partir de una muestra de aceite se tomaron 200  $\mu\text{L}$  y se disolvieron en 1.8 mL de i-octano. Posteriormente se siguió el protocolo descrito por Negrete y otros 2018. A 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla anterior se le añadieron 400  $\mu\text{L}$  de una solución de KOH 2% m/v y NaOMe 0.5% m/v, en MeOH, agitando vigorosamente durante 2 min. Los FAMES se recuperaron empleando dos extracciones con 500  $\mu\text{L}$  de iso-octano, agitando durante 3 min y centrifugando 5 min a 10 000 x g en cada ocasión. Para comprobar que la reacción se había llevado a cabo y los FAMES habían sido obtenidos, se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  del extracto con 800  $\mu\text{L}$  de MeOH y 20  $\mu\text{L}$  de esta solución se diluyeron con MeOH 970  $\mu\text{L}$ . Por último, se añadieron 10  $\mu\text{L}$  de formiato de sodio 10 mM para promover la formación de aductos de sodio. La solución se analizó por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS. Las condiciones instrumentales para el análisis fueron las siguientes: flujo de inyección de 3  $\mu\text{L min}^{-1}$ , con un flujo de gas de secado de 4 L  $\text{min}^{-1}$  y temperatura de gas de secado 220  $^{\circ}\text{C}$ , voltaje del capilar 4500 V, voltaje de desplazamiento en placa -500 V, tiempo de transferencia de 80  $\mu\text{s}$  y un intervalo de 200-600 m/z.

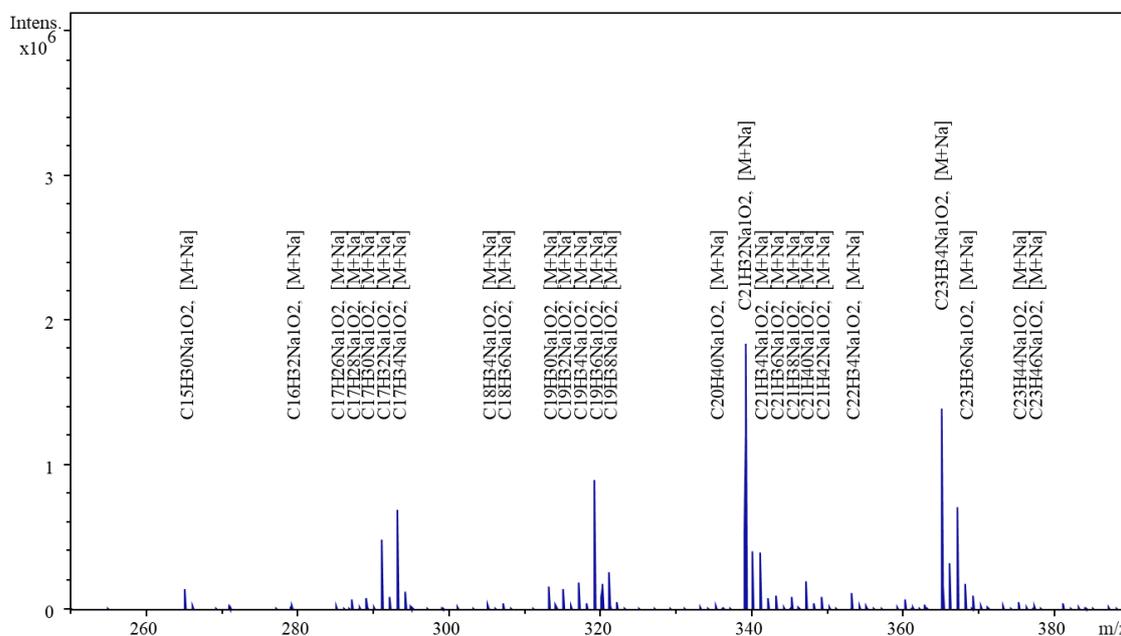


Figura 1716. Espectro de masas obtenido para aceite de menhaden después de la transesterificación de TGs y extracción de AGs libres, obtenido por infusión directa en ESI(-)-QTOF-MS

El espectro de masas de los FAMES obtenidos a partir de un estándar de aceite de pescado de menhaden por medio del protocolo de transesterificación previamente descrito se muestra en la Figura 17.

**Tabla 5.** Lista de iones de FAMES en base a espectro de masa mostrado en Fig. 17. En cada caso, se presenta el valor m/z experimental, la formula elemental del ion  $[M+Na]^+$ , error de masa y la anotación de tipo del ácido (saturado o insaturado).

Fórmula ion $[M+Na]^+$	m/z <sup>2</sup>	Error (ppm) <sup>1</sup>	CX:n
C15H30NaO2	265.2131	-2.6	C14:0
C16H32NaO2	279.2286	-2.9	C15:0
C17H26NaO2	285.1818	2.5	C16:4
C17H28NaO2	287.1974	-2.7	C16:3
C17H30NaO2	289.2132	-2.2	C16:2
C17H32NaO2	291.2292	0.9	C16:1
C17H34NaO2	293.2449	0.9	C16:0
C18H34NaO2	305.2443	2.7	C17:1
C18H36NaO2	307.2598	-2.9	C17:0
C19H30NaO2	314.2163	-3	C18:4
C19H32NaO2	315.2286	2.8	C18:3
C19H34NaO2	317.2445	-1.8	C18:2
C19H36NaO2	319.2607	0.1	C18:1
C19H38NaO2	322.2787	-3.5	C18:0
C20H40NaO2	335.2906	4.4	C19:0
C21H32NaO2	339.2298	1	C20:5
C21H34NaO2	341.2438	-3.7	C20:4
C21H36NaO2	343.2593	-4.1	C20:3
C21H42NaO2	349.3064	-3.6	C20:0
C22H34NaO2	353.2444	1.9	C21:5
C23H34NaO2	365.2454	-0.8	C22:6
C23H36NaO2	367.2603	1.3	C22:5
C23H44NaO2	375.3223	-2.7	C22:1
C23H46NaO2	377.3373	-4.4	C22:0

1: Valores calculados con Smart Formula, Data Analysis 4.1; 2: valor experimental; CX:n; nomenclatura de AG asignado en base a la formula obtenida.

Se llevó a cabo la asignación de compuestos utilizando la función SmartFormula del software Data Analysis 4.1; los errores de masa experimental respecto la masa exacta a

los aductos de sodio no sobrepasaron 5 ppm. Cabe mencionar que, gracias a la adición de formiato de sodio, se obtuvo una buena eficacia de ionización de los FAMEs en modo positivo de ESI registrando principalmente iones aductos de sodio  $[M+Na]^+$  en todos los casos. Los compuestos asignados mediante las relaciones  $m/z$  y los errores de masa calculados se enlistan en la Tabla 5.

Al comparar los espectros de masas de los AGLs y los FAMEs presentados en las Figuras 16 y 17, se observan perfiles muy similares de AGs obtenidos en cada uno de los casos, sugiriendo que ambas estrategias podrían utilizarse en este trabajo en la etapa de liberación de los AGs a partir de TGs. Cabe mencionar que, el protocolo para la obtención de FAMEs presenta algunas ventajas, ya que, es relativamente más simple y rápido. Una ventaja importante en el caso de los FAMEs es poder utilizar ESI(+) formando de manera casi exclusiva aductos con sodio, disminuyendo la cantidad de señales en los espectros y potencialmente facilitando la cuantificación de compuestos individuales. En cuanto a la eficacia de ionización, no se pueden hacer comparaciones en base a los espectros presentados en Figuras 16 y 17, debido a que el aceite fue mucho más diluido durante la preparación de los FAMEs. Por otro lado, una de las principales desventajas de la transesterificación es que la presencia de agua en los solventes, o generada durante la reacción, puede promover la hidrólisis de los FAMEs sintetizados transformándolos en AGs (Ichihara & Fukubayashi, 2010), por lo cual, es indispensable asegurar que los solventes empleados se encuentren secos y controlar el tiempo de reacción.

#### **4.2. Bromación de AGLs y FAMEs**

El protocolo empleado para la bromación se basa en los estudios realizados por Hardas y col. en 1999, y Trinklein y col. en 2022. Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de la solución de FAMEs o AGLs en isooctano, ambas preparadas como se describió en la sección anterior, y se mantuvieron a  $-10\text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 min. Posteriormente, a cada una de ellas se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de una solución de bromo en isooctano 2:3 (esta cantidad fue calculada para asegurar aproximadamente un exceso de 10 moles de  $\text{Br}_2$  por cada mol de insaturación), la cual se encontraba a la misma temperatura y protegida de la luz. Una vez añadida la solución de  $\text{Br}_2$  se agitaron los tubos de reacción suavemente durante 30 s y se dejaron

reaccionar en oscuridad a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 12 h. Una vez pasado ese tiempo, para eliminar el exceso de  $\text{Br}_2$ , se añadió 1 mL de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  al 20 % m/v y se agitó vigorosamente durante 1 min, la desaparición del color rojo característico indica la reducción del  $\text{Br}_2$  excedente. Se realizaron 2 extracciones con 500  $\mu\text{L}$  de i-octano, agitando vigorosamente durante 3 min y centrifugando 5 min a 10000 x g en cada ocasión. Para el análisis de los compuestos obtenidos por infusión directa en ESI-QTOF-MS, 200  $\mu\text{L}$  del extracto obtenido y se diluyeron con 800  $\mu\text{L}$  de MeOH para posteriormente tomar 20  $\mu\text{L}$  de esta solución y llevar a 1 mL con MeOH. En el caso de los AGs, se añadieron además 200  $\mu\text{L}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  20 mM, y en el caso de los FAMEs, 10  $\mu\text{L}$  de formiato de sodio 10 mM. Las condiciones instrumentales para el análisis de AGLs y FAMEs bromados fueron las descritas previamente en los capítulos 4.1.1. y 4.1.2., respectivamente. Para ambos casos la única modificación fue ampliar el intervalo de m/z a 200-1000.

Con el fin de comparar la eficacia de bromación de AGLs y FAMEs, se utilizó un estándar de FAME de ácido eláidico de 10 mg/mL, SUPELCO. Para obtener el FAME C18:1 bromado, se diluyeron 20  $\mu\text{L}$  del estándar en 380  $\mu\text{L}$  de i-octano (concentración final: 0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  de FAME) y se siguió el protocolo descrito en el párrafo anterior. En el caso de bromación de AGL C18:1, ya que no se contaba con un estándar de este compuesto, se decidió hidrolizar 50  $\mu\text{L}$  del estándar de FAME C18:1 siguiendo el protocolo descrito en el capítulo 4.1.1. Una vez obtenido el AGL se prosiguió con su bromación (concentración final después de la extracción: 0.5 mg  $\text{mL}^{-1}$  de AGL). En la Figura 18, se presentan los espectros obtenidos para: a) el AGL C18:1 y b) FAME C18:1, antes y después de la bromación; hay que enfatizar que, en todos casos la concentración de diferentes formas del ácido eláidico correspondió a 0.5 mg  $\text{L}^{-1}$  de AGL. Podemos observar en las imágenes superiores las señales m/z correspondientes a los iones del ácido eláidico  $[\text{M}-\text{H}]^-$  y su FAME  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (antes de la reacción de bromación) los errores de masa fueron de 0.1 y 0.3 ppm, respectivamente, lo cual permite confirmar la correcta asignación de ambos compuestos. Mas importante, las intensidades de las señales observadas en estos espectros son similares (en el rango de 3-4 millones de cuentas), lo que confirma en primer lugar una efectiva hidrolisis de FAME obteniendo C18:1 libre y, en segundo lugar, una similar eficacia de la ionización de C18:1 en ESI(-) y de su FAME en ESI(+), respectivamente.

En la parte inferior de la Figura 18 se muestran los espectros de masas obtenidos para el AGL C18:1 y su FAME después de la bromación. A primera vista se nota que los espectros después de bromación son mucho más complejos en comparación con los obtenidos antes de la reacción de derivatización. Para el ácido eláídico, se esperaban iones de un solo compuesto con la fórmula  $C_{18}H_{33}Br_2O_2 [M-H]^-$  ( $m/z$  441.0822), pero en el espectro se obtuvieron cuatro conjuntos de iones, mismos que fueron asignados a diversos aductos sodiados. En base a los patrones isotópicos y errores de masas exacta inferiores a 4 ppm, estos aductos fueron:  $C_{18}H_{31}Br_1O_2Na [M-H]^-$  ( $m/z$  381.1399),  $C_{18}H_{33}Br_1O_3Na [M-H]^-$  ( $m/z$  435.0214),  $C_{18}H_{32}Br_2O_2Na [M-H]^-$  ( $m/z$  463.0635) y  $C_{18}H_{33}Br_3O_2Na [M-H]^-$  ( $m/z$  542.9896). La formación de estos aductos hace el espectro más difícil de interpretar y pone en riesgo la cuantificación confiable. Además, es sumamente importante mencionar, que las intensidades de las señales observadas para el ácido eláídico bromado son aproximadamente 40-50 veces menores respecto a las intensidades para este ácido antes de bromación.

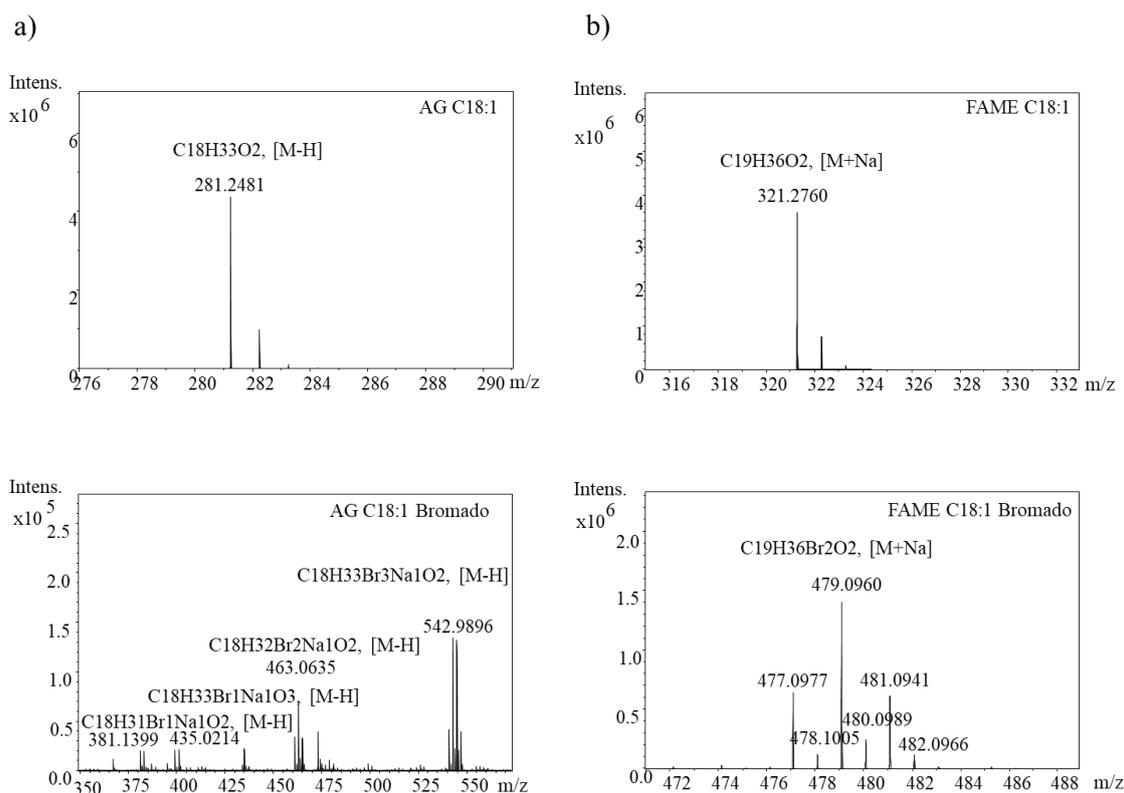


Figura 18 17. Espectros de masas obtenidos por infusión directa en ESI-QTOF-MS de ácido eláídico C18:1 como a) ácido graso libre antes (arriba) y después de bromación (abajo) y b) FAME; antes (arriba) y después de bromación. (abajo)

En el caso de la bromación del FAME C18:1, se obtuvo un solo conjunto de señales que presentaban el patrón isotópico característico para una molécula con 2 átomos de Br. En base a la medición de masa exacta y dicho patrón isotópico, se asignó la fórmula molecular y los iones observados correspondieron al aducto del ion molecular con sodio:  $C_{19}H_{38}Br_2O_2 [M+Na^+]^+$ , teniendo un error de masa de 1.2 ppm. La intensidad de la señal observada para el ion monoisotópico, se encontraba alrededor de 1.5 millones de cuentas, indicando mucho mejor respuesta al utilizar ESI(+) favoreciendo la formación de aductos de sodio agregando formiato de sodio a la solución. Por otro lado, cabe mencionar que, si bien la señal más intensa para el compuesto bromado es 2 veces menor que la del FAME sin bromar, esta reacción tiene varias ventajas. La presencia de bromo permite una rápida detección de señales de compuestos bromados y provee la información del número de enlaces dobles en base al patrón isotópico. Obtención de respectivos espectros de fragmentación deberían permitir la asignación de la posición de enlaces dobles en la molécula. Los resultados presentados en esta sección claramente muestran que la bromación de los FAMEs tiene ventajas importantes en comparación con la bromación de AGs. No solo la obtención de los FAMEs a partir de TGs es fácil y rápida, además, se demostró que agregando formiato de sodio después de marcaje con bromo, se obtienen espectros de masas relativamente simples (solamente aductos con un ion sodio) con altas magnitudes de las señales., Por ello, se tomó la decisión de continuar el proyecto enfocándose en la obtención de FAMEs bromados y los correspondientes experimentos complementarios.

#### **4.2.1. Bromación de un estándar comercial de FAMES**

Para evaluar la capacidad de la bromación para detección de saturaciones en AGIs utilizando el sistema ESI(+)-QTOF-MS, se utilizó un estándar F.A.M.E. Mix C14-C22, SUPELCO (Lote: XA21573V). Dicho estándar contiene una mezcla de compuestos entre los que se encuentran 5 FAMES saturados (C14:0, C16:0, C18:0, C20:0 Y C22:0) y 3 insaturados (C18:1, C18:2 Y C18:3). La concentración total de FAMES en el estándar es de  $4 \text{ mg mL}^{-1}$  (en i-octano), de los cuales, 35 % corresponden al C18:1, 36% al C18:2, 5% al C18:3 y el resto a los FAMES saturados. Se prepararon 400  $\mu\text{L}$  de una dilución 1:1 del estándar en i-octano y se procedió con el protocolo de bromación. Los espectros de los

FAMES bromados a) C18:1, b) C18:2 y c) C18:3 se muestran en la Figura 19. Los patrones isotópicos observados son correspondientes a compuestos con 2, 4 y 6 átomos de Br, es decir compuestos con una, dos y tres insaturaciones en cadena de carbonos. Lo anterior indica que es posible bromar compuestos con variable número de enlaces dobles mediante este procedimiento, logrando un etiquetado homogéneo de los respectivos carbonos de cada doble enlace. Las señales  $m/z$  fueron asignadas como aductos  $[M+Na]^+$  de cada compuesto, con errores de masa inferiores a las 2 ppm y con ayuda de los patrones isotópicos obtenidos.

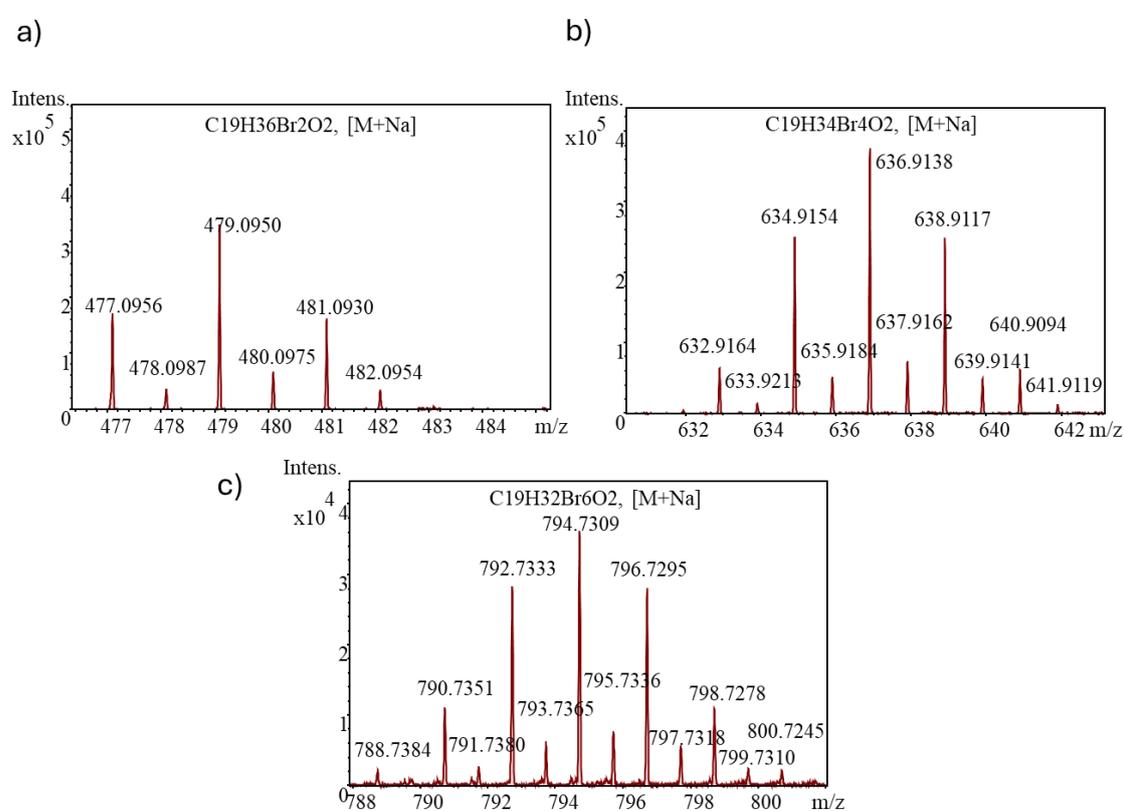


Figura 1918. Espectros de masas de FAMES bromados a) C18:1, b) C18:2, c) C18:3, obtenidos por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS.

#### 4.2.2. Transesterificación de TGs y bromación de los FAMES en una muestra real: aceite de aguacate

Se realizó un experimento para evaluar la viabilidad de los protocolos de transesterificación y bromación propuestos, en el análisis de muestras reales. Con este fin, se utilizó una muestra de aceite comestible de aguacate obtenida en un mercado

local. El aceite de aguacate tiene un alto contenido de ácido oleico (C18:1 n-9), pudiendo alcanzar hasta un 70-80% del total de AGs presentes, además de la presencia de ácidos saturados como el ácido palmítico e insaturados como el linoleico (C18:2 n-6) (Flores, y otros, 2019) (Qin & Zhon, 2016). El espectro de masas de los FAMES obtenidos a partir del aceite de aguacate por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS se muestran en la Figura 20. Tomando en cuenta los valores m/z y respectivos patrones isotópicos, mediante la función de SmartFormula de Data Analysis 4.1 se llevó a cabo la asignación de las fórmulas moleculares obteniendo errores de masas menores a 2.4 ppm. De esta manera, la señal más intensa corresponde al FAME C18:1 [M+Na<sup>+</sup>]<sup>+</sup>, que según lo esperado corresponde al ácido oleico. Así mismo, otras señales en espectro obtenido se pudieron asignar a los ácidos palmítico (C17H34O2, [M+Na]) y linoleico (C19H34O2, [M+Na]<sup>+</sup>), además de dos señales C19H34O3, [M+Na]<sup>+</sup> y C19H36O3, [M+Na]<sup>+</sup> que corresponden a compuestos no identificados. Puesto que las fórmulas de los últimos dos compuestos se asignaron con errores de masas inferiores a 5 ppm y asumiendo que se trata de los FAMES, estos compuestos podrían ser hidroxiácidos presentes en el aceite de aguacate, aunque nuestros datos espectrales no permiten en esta etapa una identificación contundente.

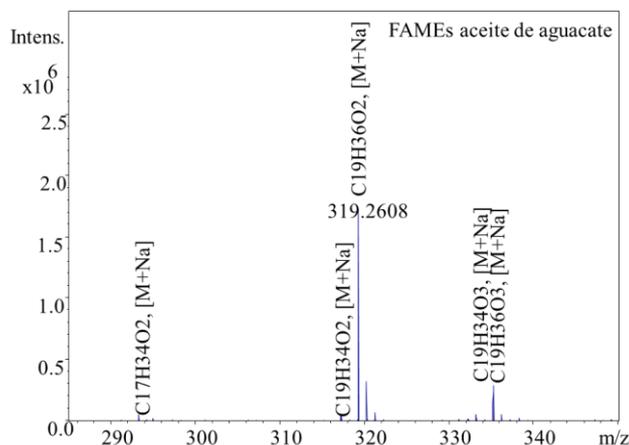


Figura 2019. Espectro de masas obtenido por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS de FAMES obtenidos de aceite de aguacate mediante transesterificación y posterior bromación.

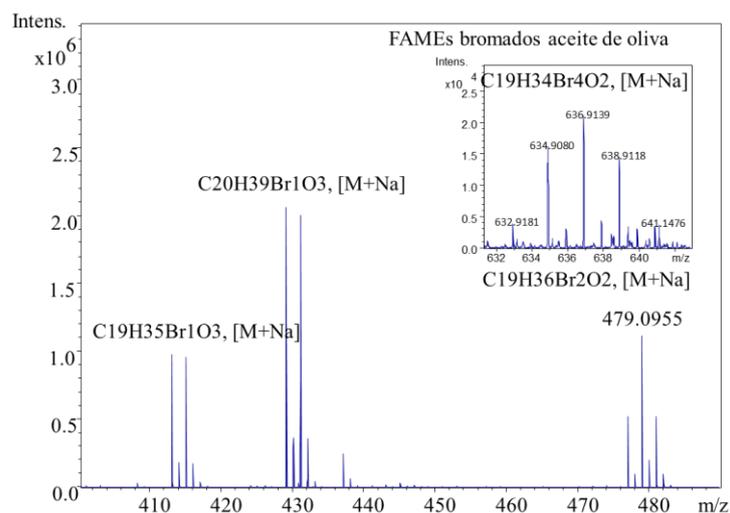


Figura 2120. Espectro de masas de FAMES bromados de aceite de aguacate, obtenido por infusión directa en ESI-QTOF-MS

En la figura 21 se presenta el espectro de masas de los FAMES bromados obtenidos a partir de aceite de aguacate. Se pueden observar principalmente tres conjuntos de señales con patrones isotópicos y características  $m/z$  correspondientes al FAME C18:1 bromado ( $C_{19}H_{36}Br_2O_2$ ,  $[M+Na]^+$ ) y a dos iones de compuestos no identificados  $C_{19}H_{35}BrO_3$ ,  $[M+Na]^+$  y  $C_{20}H_{39}BrO_3$ ,  $[M+Na]^+$ , además de que se observa un conjunto de señales correspondientes para el FAME C18:2 bromado, con una intensidad 100 veces menor a las señales principales. Se realizó un experimento de MS/MS para los iones  $C_{19}H_{35}BrO_3$ ,  $[M+Na]^+$  y  $C_{20}H_{39}BrO_3$ ,  $[M+Na]^+$  con el fin de tener información adicional de su estructura. Estos espectros se presentan en la Figura 22, observándose la fragmentación de ambos iones con pérdida de un átomo de H y Br para  $C_{19}H_{35}BrO_3$  y de un  $CH_2$  extra para  $C_{20}H_{39}BrO_3$  (Figura 22). Si bien este resultado no permite la confirmación contundente que los compuestos corresponden a hidroxiácidos propuestos, la fragmentación de iones es sin duda una herramienta útil en estudios de estructurales y el hecho de que FAMES bromados son eficientemente ionizados en ESI(+) permite utilizar esta herramienta en experimentos futuros. Por último, gracias a los experimentos realizados utilizando el aceite de aguacate se concluye que el procedimiento propuesto, consistente de la transesterificación, bromación y adquisición de espectro en sistema ESI(+)-QTOF-MS puede ser empleado para el análisis de AGIs en muestras reales de aceites vegetales.

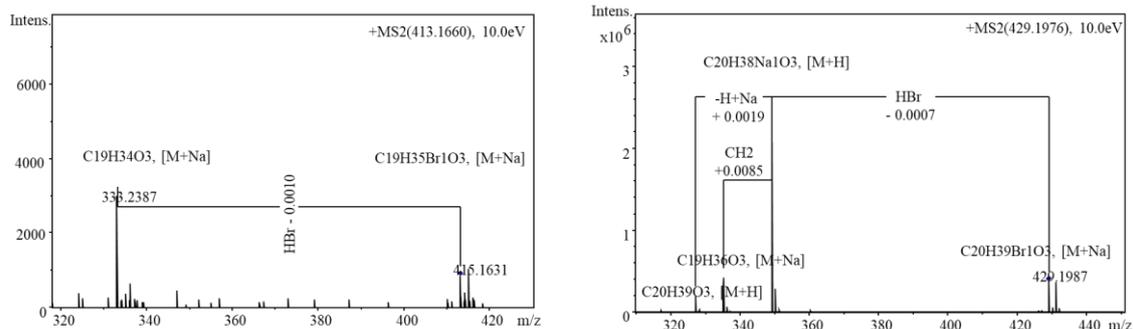


Figura 2221. Espectros de masas de compuestos no identificados bromados en muestra de aceite de aguacate, obtenidos por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS

#### 4.2.3. Efecto del tiempo de reacción en la obtención de FAMES bromados

Con la finalidad de examinar como el tiempo de reacción influye en la eficacia de esta, medida mediante intensidad de las señales de los compuestos bromados, se realizaron experimentos variando el tiempo de bromación (1, 4, 12, 24 y 48 h). Para esto, se tomó la más intensa señal de FAME bromado de C18:1, (m/z 479.0955) y se monitoreo su intensidad a diferentes tiempos. Para el experimento se utilizó una muestra de aceite de aguacate, ya que previamente habíamos demostrado su alto contenido de ácido C18:1 y pudimos obtener fácilmente el FAME bromado correspondiente. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 22, donde podemos observar que a las 12 h se obtiene la mayor intensidad, por lo que se seleccionó este tiempo como el más adecuado para llevar a cabo la reacción de bromación, en las condiciones del protocolo propuesto.

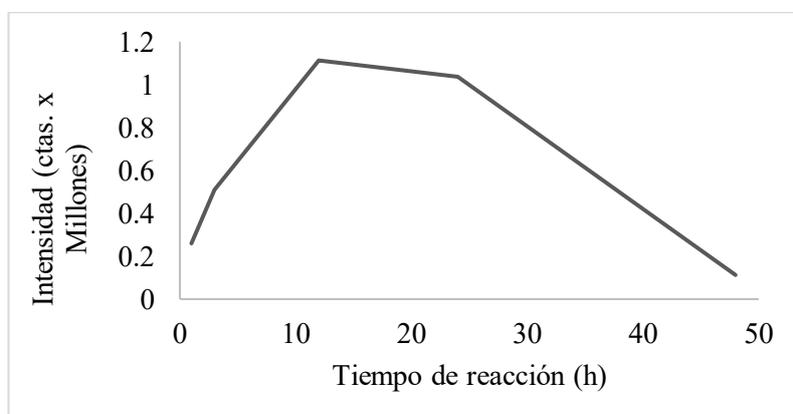


Figura23 22. Intensidades medidas para señal 479.0955 m/z de ion correspondiente al  $[M+Na]^+$  del FAME C18:1 Br<sub>2</sub>, con respecto al tiempo de reacción.

### 4.3. Proceso de calibración y evaluación de parámetros analíticos

Con el propósito de obtener los parámetros analíticos para el método desarrollado, se realizaron curvas de calibración por triplicado con el siguiente procedimiento. Se empleó una solución estándar F. A. M. E. Mix C14-C22, SUPELCO con una concentración de 4 mg mL<sup>-1</sup> en i-octano. Entre los FAMES insaturados encontrados en el estándar se encuentran los de los ácidos eláidico (C18:1 trans ω-9), oleico (C18:1 cis ω-9), linoleáidico (C18:2 ω-6), linoleico (C18:2 ω-6) y linolénico (C18:3 ω-3). A partir de la solución estándar se realizaron diluciones consecutivas 1:2, 1:4, 1:8, 1:32, 1:128 y 1:512, con i-octano. Se tomaron 400 μL de cada solución, además de un blanco de reacción que consistía únicamente en i-octano y se llevó a cabo la bromación de las muestras con el protocolo descrito en el capítulo 4.2. Las concentraciones finales de los FAMES bromados fueron calculadas tomando en cuenta su concentración en la solución, la estequiometría de la reacción de bromación y las diluciones realizadas. De manera sencilla se puede obtener la concentración de cada FAME multiplicando la concentración en la solución estándar en mg mL<sup>-1</sup> por un factor de corrección K dado por la fórmula:

$$K = 1.6 \left( \frac{\%CF}{100} \right) (RMM)$$

Donde, %CF: % de concentración de FAME en cuestión; RMM: relación entre masa molecular de FAME bromado sobre la masa molar del FAME sin bromar y el término 1.6 es una simplificación que proviene de términos constantes como: el volumen usado en la bromación, la dilución para la inyección y la conversión de mg a μg. Simplificando la ecuación anterior obtenemos que para el FAME C18:1 K=2.506, para el FAME C18:2 K=3.425 y para el FAME C18:3 K=4.357. De este modo, se estableció el intervalo de para cada uno de los FAMES bromados. Se utilizaron 7 concentraciones diferentes para la calibración de cada compuesto, salvo para el FAME C18:3 bromado, ya que el punto más bajo utilizado para los otros dos FAMES, no generaba una señal detectable.

**Tabla 6.** Parámetros analíticos obtenidos a partir de la elaboración de las curvas de calibración para el análisis de FAMES bromados por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS

FAME	Rango de concentración $\mu\text{g mL}^{-1}$	Función de regresión lineal	$R^2$	Em	Eb	LOD $\text{ng mL}^{-1}$	LOQ $\text{ng mL}^{-1}$
C18:1	0.007-3.508	$I=8.999 \cdot 10^4 \cdot [\text{C18:1 Br}_2] + 9.165 \cdot 10^3$	0.9980	$1.64 \cdot 10^3$	$2.34 \cdot 10^3$	6.3?	21
C18:2	0.010-4.932	$I=7.528 \cdot 10^4 \cdot [\text{C18:2 Br}_4] + 5.571 \cdot 10^3$	0.9970	$1.69 \cdot 10^3$	$3.40 \cdot 10^3$	9.7?	30
C18:3	0.007-0.218	$I=3.799 \cdot 10^4 \cdot [\text{C18:3 Br}_6] + 2.422 \cdot 10^3$	0.9951	$1.24 \cdot 10^3$	$4.69 \cdot 10^2$	47	155

Los valores del rango de concentración fueron calculados tomando en cuenta la concentración inicial del FAME en cuestión en el estándar, la masa del FAME bromado y las diluciones realizadas. En la función de regresión lineal, I: intensidad en ctas. y [C18:n Brn]: concentración de FAME bromado en cuestión. Em: error típico de la pendiente, Eb: error típico del intercepto, LOD: límite de detección calculado a partir del punto más bajo en la curva y estimando una relación S/N de 3, LOQ: límite de cuantificación: calculado multiplicando LOD x 3.3.

Para obtener las funciones de regresión lineal de las curvas de calibración se graficaron el promedio de las intensidades obtenidas para los iones cuantificadores ( $n=3$ ), los cuales, fueron elegidos por ser los iones de mayor intensidad en el patrón isotópico característico correspondiente para cada FAME bromado. Los valores  $m/z$  de estos iones fueron 479.0955 para el FAME 18:1 Br<sub>2</sub>, 636.9145 para el FAME 18:2 Br<sub>4</sub> y 794.7335 para el FAME 18:3 Br<sub>6</sub>. En cuanto a los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se utilizaron las fórmulas:  $\text{LOD}=3 S_b/m$  y  $\text{LOQ}=10 S_b/m$ , donde la  $S_b$  es la desviación estándar en base a siete lecturas del blanco ( $n=7$ ) y  $m$  la pendiente de la función de regresión lineal. Las funciones obtenidas, los intervalos de concentraciones usadas para la calibración, el coeficiente de correlación  $R^2$  y los LOD y LOQ instrumentales para cada uno de FAMES bromados analizados, se enlistan en la Tabla 6.

En las Figuras 24, 25 y 26 se muestran las señales obtenidas para cada punto de calibración y las curvas de calibración correspondientes a los siguientes compuestos: FAME 18:1 Br<sub>2</sub>, FAME 18:2 Br<sub>4</sub> y FAME 18:3 Br<sub>6</sub>, respectivamente. Se observa muy buena linealidad en cada uno de los casos con  $R^2$  que van de 0.9951 a 0.9980, los cuales podrían mejorarse empleando un estándar interno adecuado.

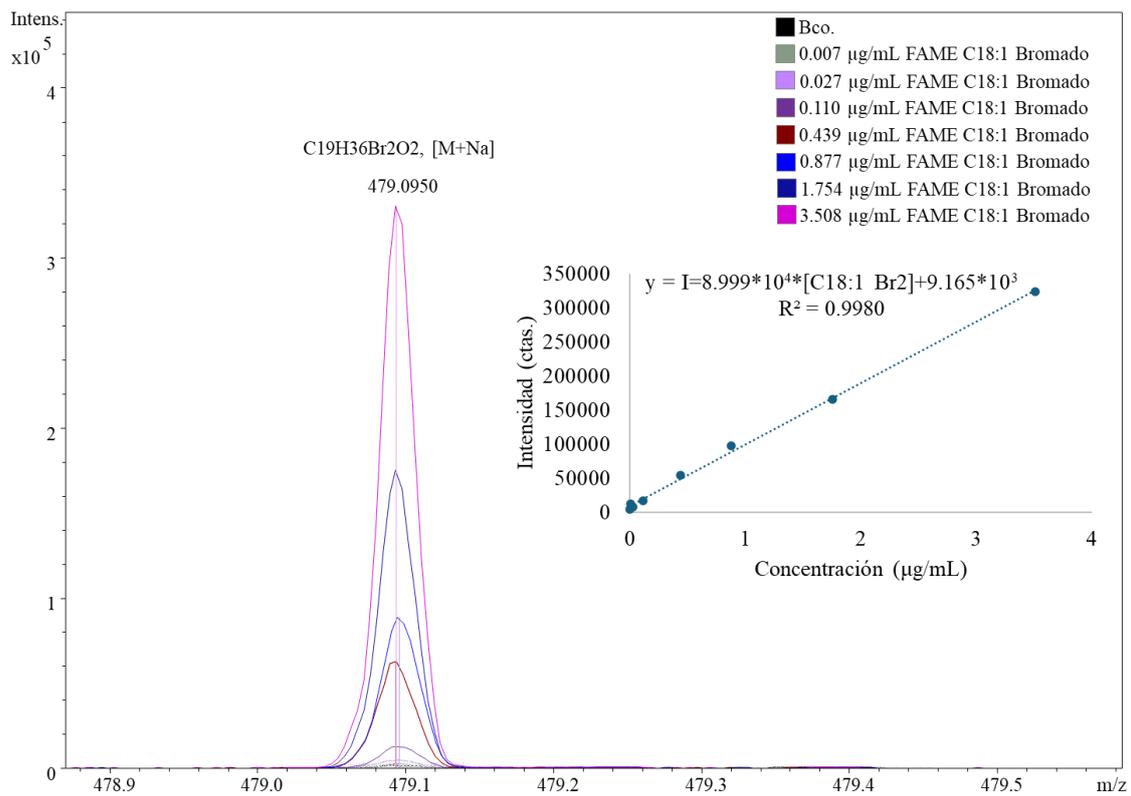


Figura 24 23. Curva de calibrado para FAME C18:1 Br2 obtenida por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS

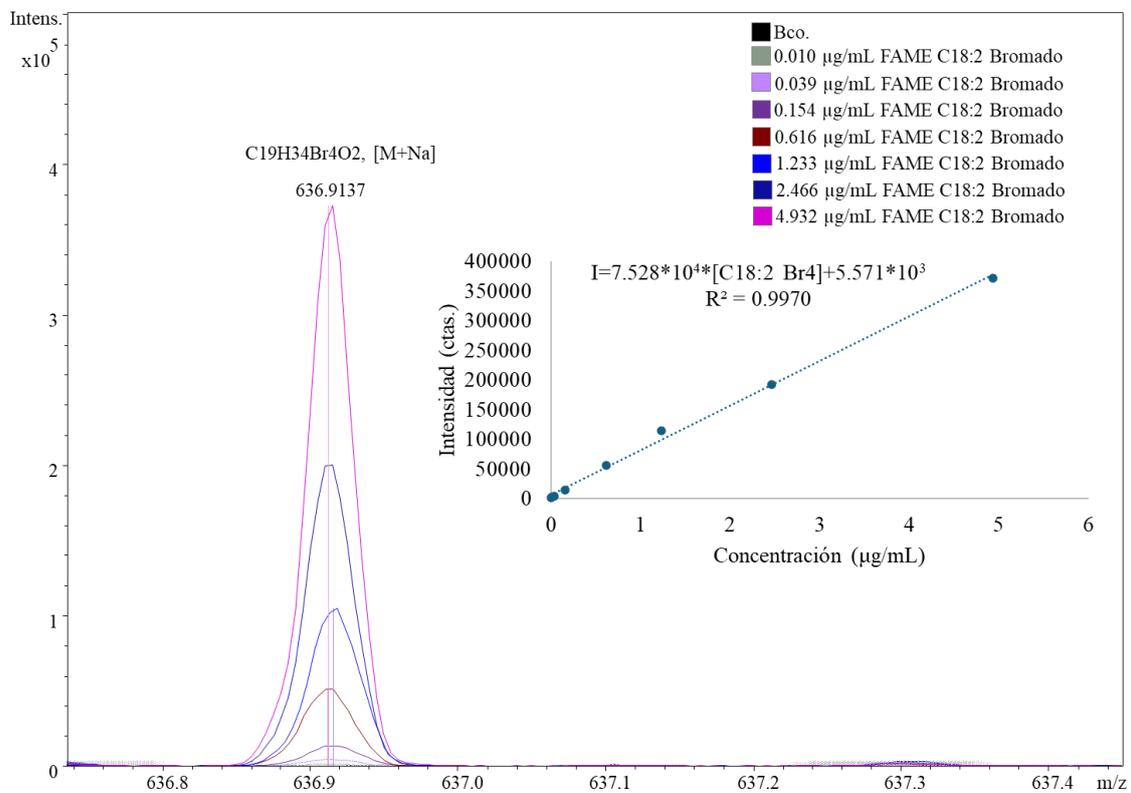


Figura 25 24. Curva de calibrado para FAME C18:2 Br4 obtenida por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS

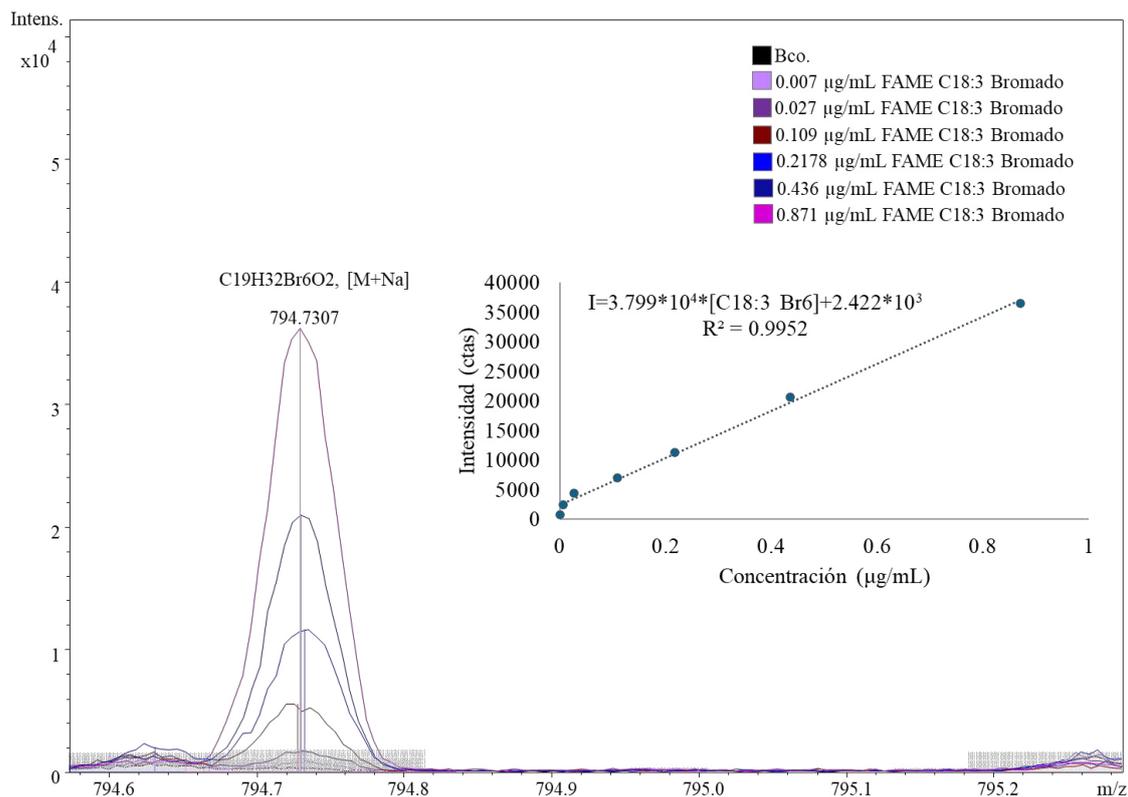


Figura 26 25. Curva de calibrado para FAME C18:3 Br6 obtenida por infusión directa en ESI(+)-QTOF-MS

Utilizando la calibración externa, se llevó a cabo la determinación de tres AGIs (C18:1, C18:2 y C18:3) en una muestra de aceite comestible de aguacate. Esta muestra se había analizado en la etapa inicial de este trabajo, detectando las señales de los ácidos grasos C18:1 y C18:2. Ahora, se emplearon las condiciones afinadas durante el desarrollo del procedimiento y el análisis se llevó a cabo por triplicado. La concentración de ácido C18:1 en porcentaje de masa fue de  $62.31 \pm 5.65 \%$  (RSD 9.07%), en el caso del C18:2 la concentración media fue del  $1.42\% \pm 0.13\%$  (RSD 9.49 %); el ácido C18:3 no fue detectado en este análisis. Cabe señalar que la concentración calculada para cada ácido graso corresponde a la suma de los isómeros presentes en el aceite.

#### 4.4. Experimentos MS/MS enfocados en la detección de posición de enlaces dobles en AGIs

##### 4.4.1. Cálculos *in-silico*

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los mayores retos en el desarrollo de nuevos procedimientos analíticos para determinación de AGIs, es poder obtener información estructural que permita identificar la posición de los dobles enlaces C=C. En este trabajo se propuso utilizar el etiquetado de los carbonos olefínicos con Br y el uso de herramientas de HRMS, con experimentos MS/MS, con el fin de obtener fragmentos característicos para cada AGIs. Para predecir los espectros de fragmentación de los compuestos obtenidos se utilizó el servidor web CFM-ID (Compound Fragmentation Method Identification) 4.0. Este servidor puede proporcionar herramientas para la interpretación de datos de espectrometría de masas en tándem y es utilizado comúnmente para la predicción de espectros adquiridos utilizando ESI. Entre sus funciones se encuentran la predicción de espectros, asignación de picos e identificación de metabolitos. El rendimiento de dicho servidor ha sido validado en pruebas de validación cruzada, superando a otros métodos existentes en la identificación de metabolitos (Wang, y otros, 2021) (Allen, Pon, Wilson, Greiner, & Wishar, 2014). Los espectros de fragmentación calculados *in-silico* para los FAMEs C18:1  $\omega$ -7 trans-Br<sub>2</sub> y C18:1  $\omega$ -9 cis-Br<sub>2</sub>, utilizando una energía de 20 eV se muestran en la Figura 27. Fue justo la energía de 20 eV la que generó mayor cantidad de iones producto de interés para los FAMEs n-7 y n-9 bromados, pudiéndose distinguir cuatro señales para el primero y dos para el segundo.

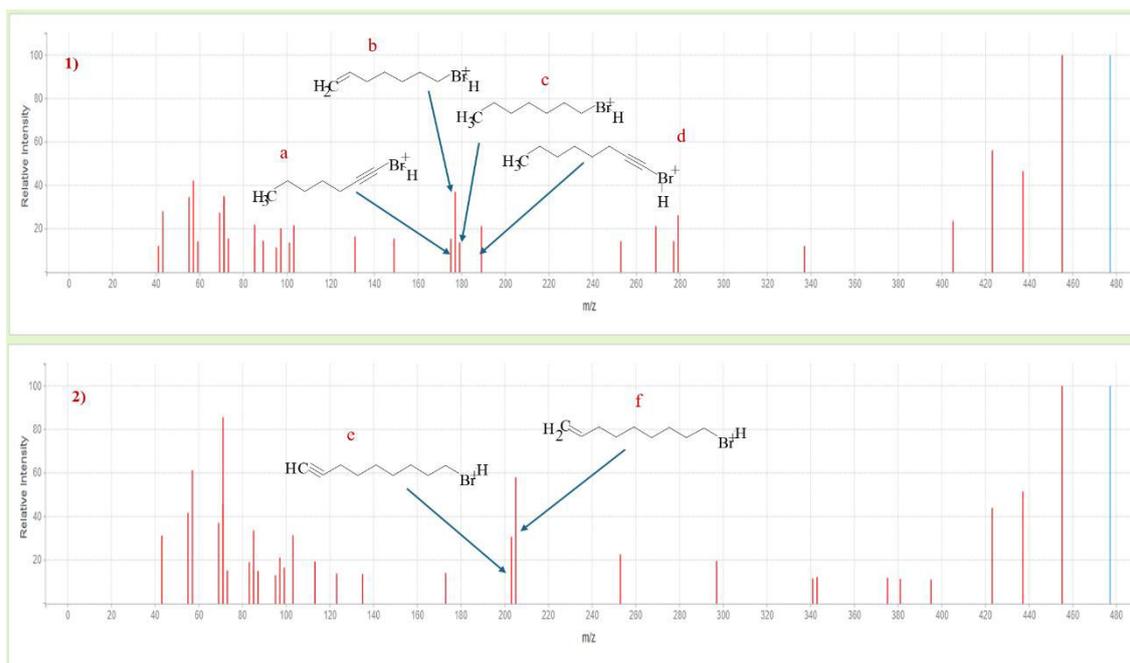


Figura 27 26. Espectros MS/MS: 1) FAME C18:1 n7 Br<sub>2</sub> y 2) FAME C18:1 n-9 Br<sub>2</sub>, calculados *in-silico* empleando CFM-ID con una energía de ionización de 20 eV

**Tabla 7.** Iones producto calculados *in-silico* para los FAMEs C18:1 n-7 Br<sub>2</sub> (a, b, c, d) y C18:1 n-9 Br<sub>2</sub> (e, f).

	Ion producto	Fórmula	m/z calculado
a)		C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> Br <sup>+</sup>	175.0117
b)		C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> Br <sup>+</sup>	177.0273
c)		C <sub>7</sub> H <sub>16</sub> Br <sup>+</sup>	179.0430
d)		C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> Br <sup>+</sup>	189.0273
e)		C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> Br <sup>+</sup>	205.0586
f)		C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> Br <sup>+</sup>	203.0430

La estructura de los iones formados, su fórmula elemental y valor teórico m/z se resumen en la Tabla 7. Se incluyen solamente los iones generados a partir de bromación

y ruptura de enlaces dobles; estos iones pueden servir para la asignación de la posición de enlace doble en la cadena de carbonos.

Una vez obtenidos los FAMEs bromados, se utilizó el sistema ESI(+)-QTOF-MS para obtener espectros de fragmentación y hallar iones fragmentos, esperando detectar aquellos calculados *in-silico* (como aductos con sodio). En la Figura 28 se muestra un esquema general del equipo utilizado. Específicamente, en el cuadrupolo se selecciona el ion precursor correspondiente a FAME bromado. Dicho ion es fragmentado en una celda de colisiones (CID), para finalmente separar los fragmentos en el analizador de tipo tiempo de vuelo.

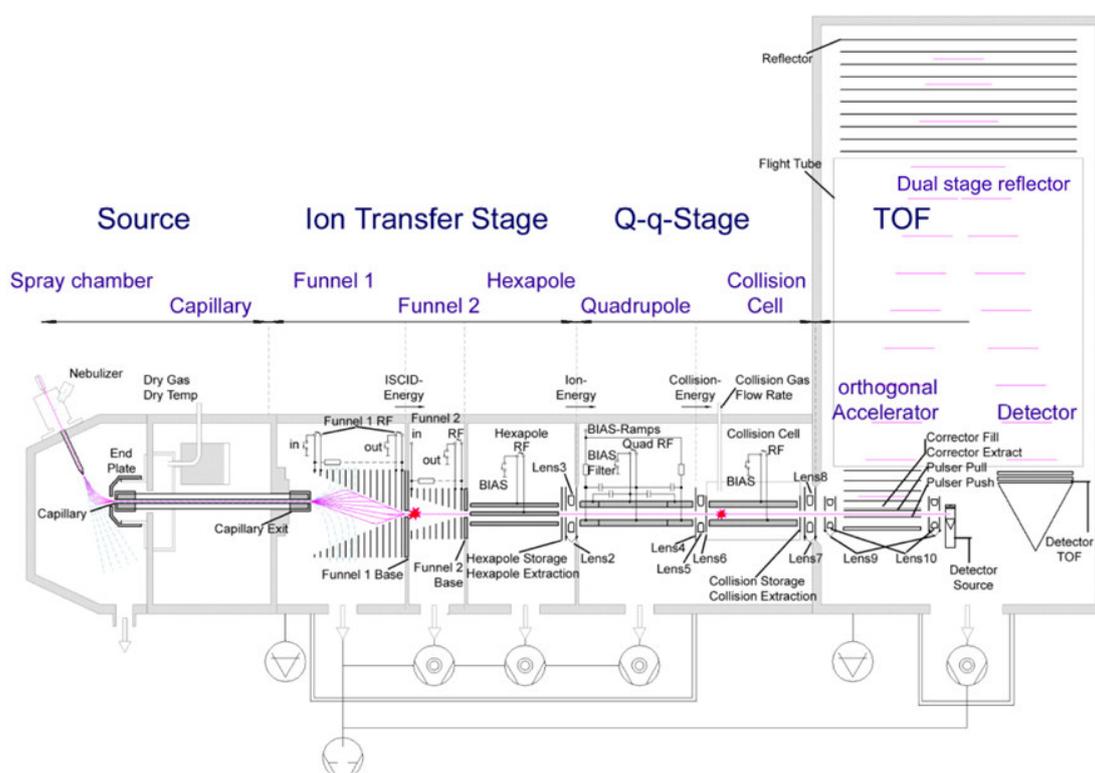


Figura 2827. Esquema general de espectrómetro de masas maXis impact de Bruker (Bruker Daltonik, 2011)

#### 4.4.2. Experimentos CID

Para el análisis MS/MS se trabajó con el estándar de del FAME de ácido eláidico C18:1  $\omega$ -9 cis-Br<sub>2</sub> tomando como ion precursor a aquel de m/z 479.0955 aplicando una ventana m/z 4 para asegurarnos de poder conservar r el patrón isotópico característico.

Los resultados del experimento se muestran en la Figura 29 donde podemos observar el espectro de MS/MS obtenido con 5 diferentes energías de colisión.

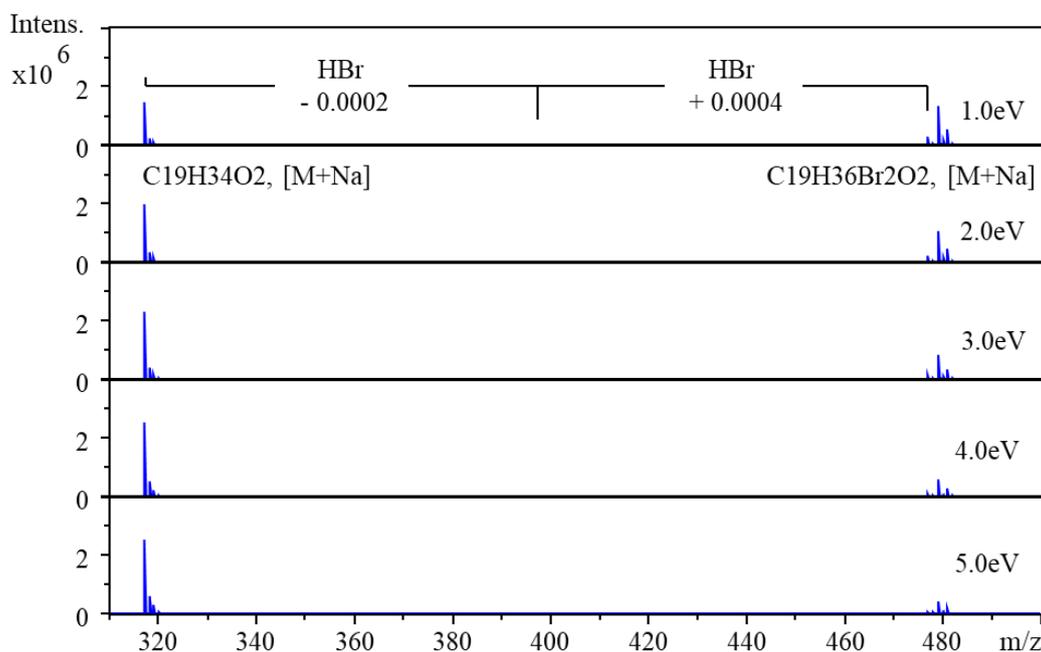


Figura 29 28. Espectros de MS/MS de ion  $C_{19}H_{36}Br_2O_2$   $[M+Na]^+$ , con diferentes energías de colisión obtenidos por experimento CID, en ESI(+)-QTOF-MS

Se observa el conjunto de señales característico para el ion precursor  $C_{19}H_{36}Br_2O_2$   $[M+Na]^+$  y dos conjuntos de señales en la región de  $m/z$  más bajos, correspondientes a los iones productos  $C_{19}H_{35}BrO_2$   $[M+Na]^+$  y  $C_{19}H_{34}BrO_2$   $[M+Na]^+$ , siendo la intensidad de las señales para el primer ion de muy baja intensidad (a penas detectable) en comparación con las señales para el segundo ion producto. Las diferencias de masa de 80.9119 y 161.8238 ( $80.9119 \times 2$ ) indican la pérdida de uno y dos átomos de Br entre el ion precursor y los iones producto en forma de una pérdida neutra de HBr. Por otro lado, se puede observar que mientras la intensidad de las señales correspondientes al ion  $C_{19}H_{35}BrO_2$   $[M+Na]^+$  se mantienen constantes al aumentar la energía de colisión, las señales del ion  $C_{19}H_{34}BrO_2$   $[M+Na]^+$  aumentan mientras la señal del ion precursor disminuye. El monitoreo de las intensidades de las señales correspondientes para el ion precursor  $C_{19}H_{36}Br_2O_2$   $[M+Na]^+$  (479.0955  $m/z$ ) y el ion producto  $C_{19}H_{34}O_2$   $[M+Na]^+$  (317.2451  $m/z$ ) se muestran en la Figura 30. Los resultados indican que, durante el proceso CID del ion correspondiente a FAME del ácido elaídico se lleva a cabo pérdida

de ambos átomos de bromo en dos pasos sucesivos y que el ion  $C_{19}H_{35}BrO_2 [M+Na]^+$  es muy inestable (muy baja intensidad) pasando rápidamente al ion  $C_{19}H_{34}O_2 [M+Na]^+$ . Debido a la pérdida de bromo, los espectros obtenidos mediante fragmentación convencional en zona CID no generan iones que podrían indicar la posición de dobles enlaces en AGIs, en desacuerdo con los cálculos *in-silico*, los resultados experimentales mostraron que, sin importar la energía de colisión empleada, siempre ocurre la pérdida de los átomos de bromo y, al perder esta etiqueta no es posible determinar la posición de los dobles enlaces.

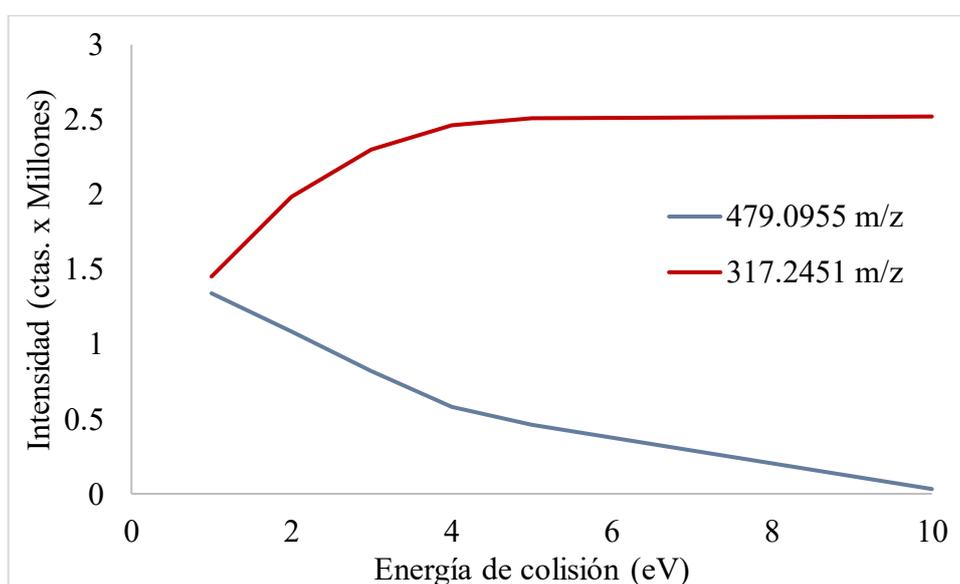


Figura 30. Cambios de la intensidad del ion precursor ( $m/z$  479.055) y del ion producto ( $m/z$  317.2451) en experimento MS/MS aplicando diferentes energías de colisión en la zona CID

Al analizar los espectros MS/MS de los FAMEs bromados ( $C_{18}:1$  cis y trans  $\omega$ -9,  $C_{18}:2$   $\omega$ -6 y  $C_{18}:3$   $\omega$ -3) con 2, 4 y 6 átomos de bromo (Figura 31) los resultados fueron similares en cada caso, sin observar la formación de iones con átomos de bromo, necesarios para ubicar la posición de los dobles enlaces en la cadena de carbonos de los AGIs. Al realizar una búsqueda sobre este fenómeno en fuentes bibliográficas se encontraron varios reportes donde la pérdida de átomos de Br en experimentos MS/MS de moléculas orgánicas bromadas se ha observado anteriormente (Paul Bendig, 2013) (Ålander, 2020). Los resultados obtenidos descartan que la estrategia basada en el marcaje de dobles enlaces en los FAMEs con bromo y obtención de fragmentos bromados en la zona CID, podría proporcionar información sobre posición de dobles

enlaces en la cadena de carbonos. Cabe mencionar que, además del convencional modo de operación CID utilizado hasta ahora, el instrumento de Bruker ofrece otras opciones de fragmentación de iones precursores. En las siguientes secciones se describen experimentos realizados utilizando dos diferentes procedimientos de ionización disponibles.

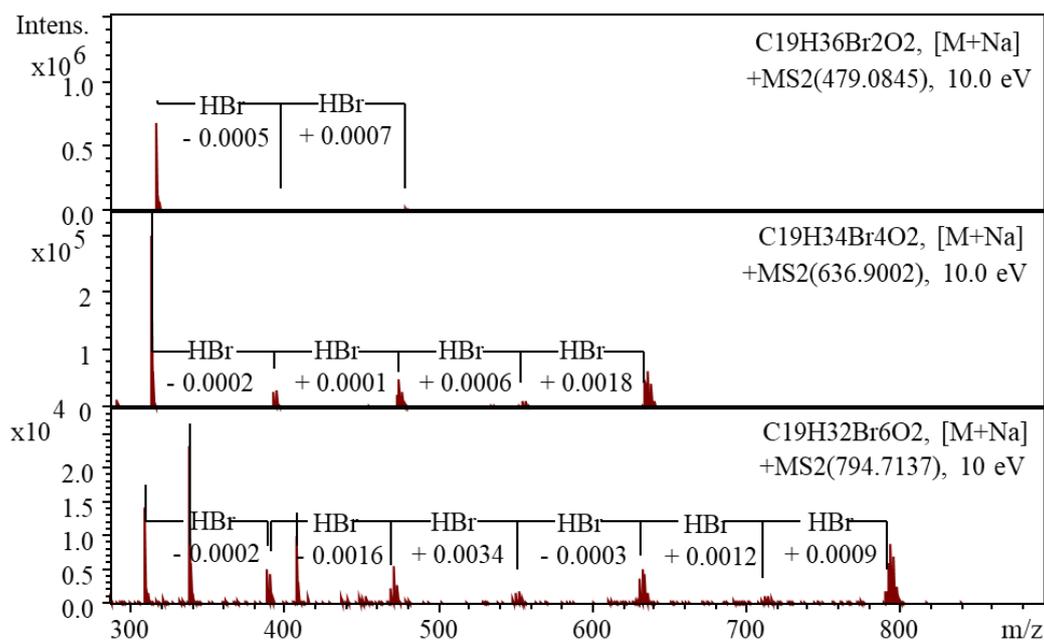


Figura 31 29. Espectros de MS/MS de iones C<sub>19</sub>H<sub>36</sub>Br<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup>, C<sub>19</sub>H<sub>34</sub>Br<sub>4</sub>O<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> y C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>Br<sub>6</sub>O<sub>2</sub> [M+Na]<sup>+</sup> obtenidos por experimento CID a 10 eV, en ESI(+)-QTOF-MS. Los FAMES bromados corresponden a los ácidos C18:1 ω-9 cis y trans C18:2 ω-6 y C18:3 ω-3 respectivamente

#### 4.4.3. Experimentos bbCID

La disociación inducida por colisión de banda ancha o bbCID por sus siglas en inglés, es un tipo de fragmentación que alterna rápidamente entre energías de colisión altas y bajas, permitiendo realizar el monitoreo simultáneo de ion precursor y iones producto, esto se logra variando el potencial del cuadrupolo que se encuentra antes de la cámara de colisión (Narciso Couto, 2018). Los resultados obtenidos con la fragmentación bbCID fueron muy similares a los obtenidos en la fragmentación CID, observando una diferencia en que aun 30 eV era posible observar las señales correspondientes al ion precursor. Sin embargo, nuevamente puede observarse el mecanismo de fragmentación que involucra la pérdida de los átomos de bromo en forma de HBr. En la Figura 32 se

presentan los espectros de MS/MS obtenidos al variar la energía de colisión (0 eV-70 eV) en modo bbCID. Se observan los mismos iones fragmento que fueron obtenidos por CID. Al relacionar las intensidades del ion precursor y el ion producto  $C_{19}H_{34}Br_4O_2 [M+Na]^+$  con el valor de energía de fragmentación aplicada, se observa que al aumentar dicha energía el ion precursor desaparece mientras que se forma el ion producto. Para energías mayores de 20 eV el ion producto también comienza a desaparecer (Figura 33), lo que indica la formación de iones más pequeños, no considerados en la Figura 33. Cabe también mencionar que los iones en la región  $m/z$  440 y 360 son impurezas introducidas durante la preparación de muestra y/o presentes como residuos de los análisis realizados por otros usuarios del equipo.

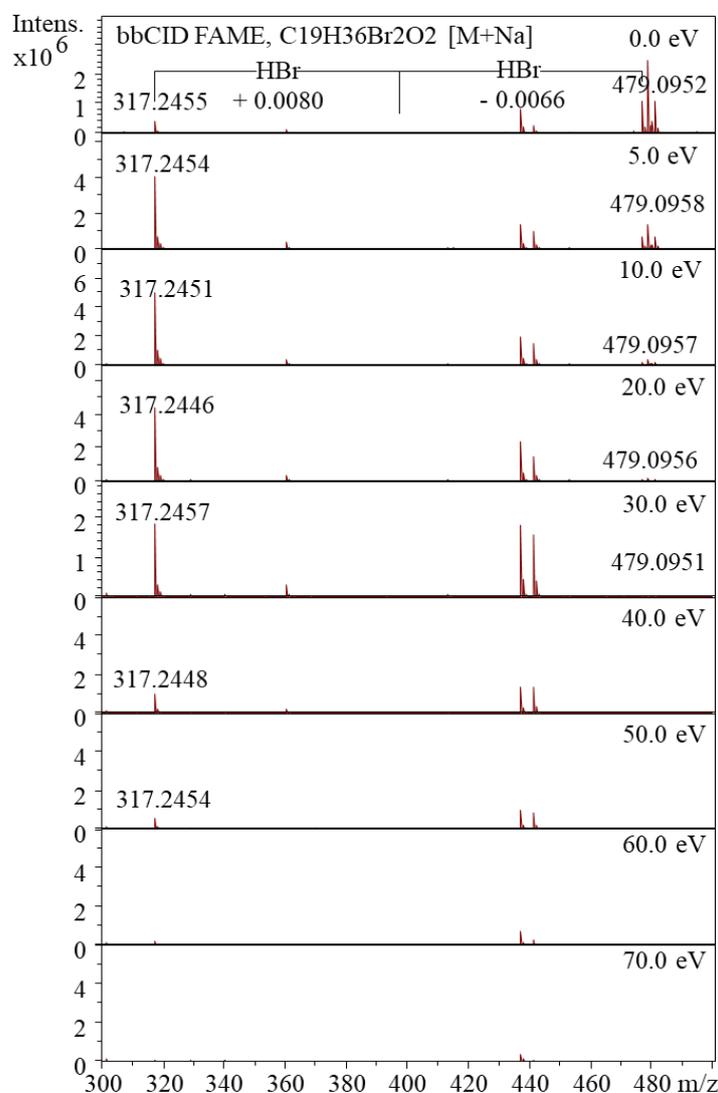


Figura32 30. Espectros de MS/MS de ion  $C_{19}H_{36}Br_2O_2 [M+Na]$ , con diferentes energías de colisión obtenidos por experimento bbCID, en ESI(+)-QTOF-MS

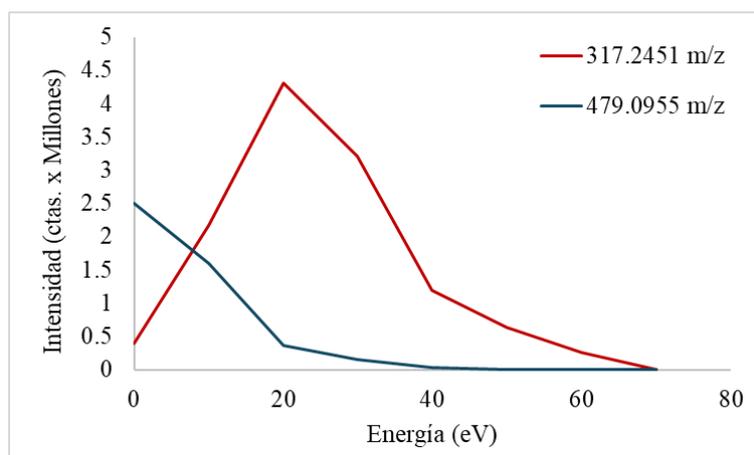


Figura 3331. Monitoreo de ion precursor (479.055 m/z) y ion producto (317.2451) en experimento MS/MS bbCID con diferentes energías de colisión

#### 4.4.4. Fragmentación isCID

Para conservar el átomo de bromo durante fragmentación de los FAMEs bromados y de esta manera poder asignar posiciones de enlaces dobles, claramente se requieren las condiciones de fragmentación más suaves respecto a los existentes en la zona CID. Por ello, se realizó un experimento llevando a cabo la disociación inducida por colisiones en fuente de ionización (isCID). Este es el modo de fragmentación suave, que se lleva a cabo modificando el potencial aplicado entre la salida del embudo 1 y la entrada del embudo 2 (Fig. 28). De esta manera ocurre la fragmentación de los iones moleculares antes de su entrada en el primer cuadrupolo. Nuevamente las señales observadas para el FAME bromado del ácido eláidico en los espectros de MS/MS indican pérdida de bromos. (Figuras35). Empleando energías entre 0 y 60 eV, se observa gradual desaparición del ion molecular y la aparición del ion producto  $C_{19}H_{34}Br_4O_2 [M+Na^+]$ , mismo que para energías más altas de 20 eV se comienza a fragmentar.

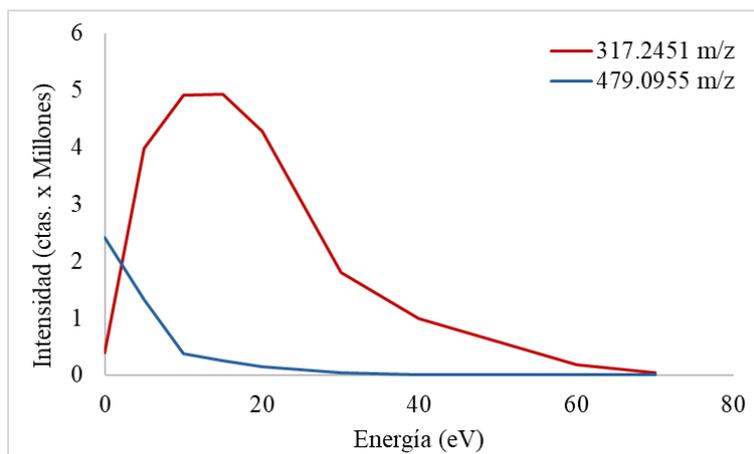


Figura 3432. Monitoreo de ion precursor (479.055 m/z) y ion producto (317.2451) en experimento MS/MS isCID con diferentes energías de colisión

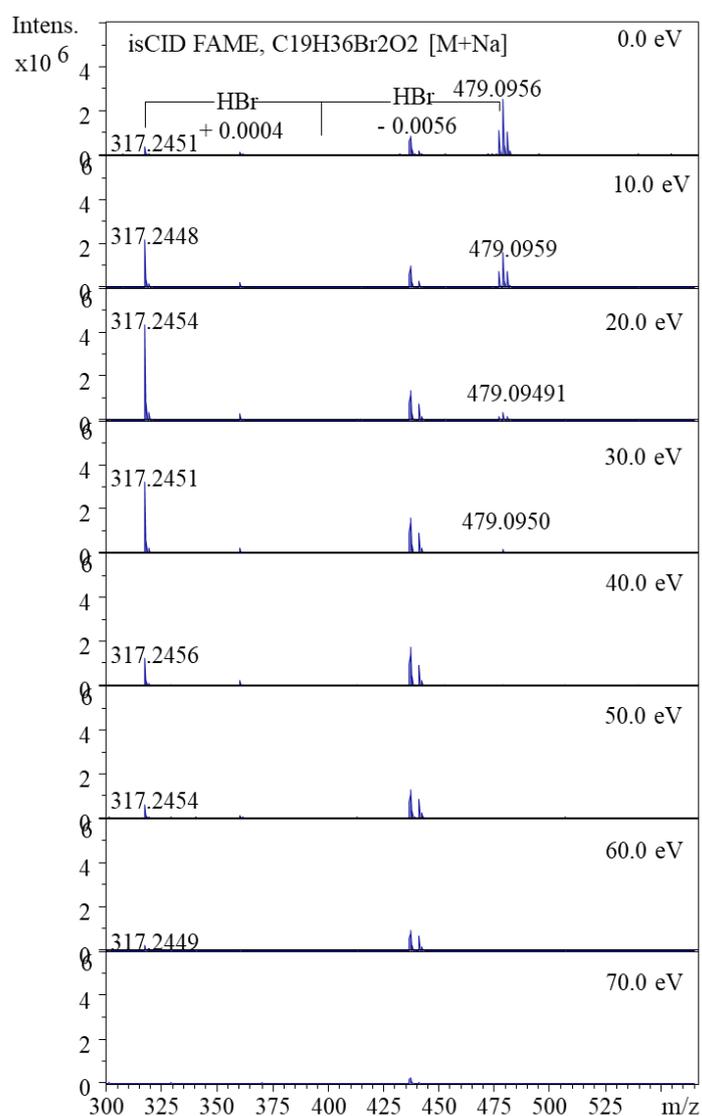


Figura 3533. Espectros de MS/MS de ion  $C_{19}H_{36}Br_2O_2 [M+Na]^+$ , con diferentes energías de colisión obtenidos por experimento isCID, en ESI(+)-QTOF-MS

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, el etiquetado de los FAMES con Br en combinación con técnicas de HRMS como lo es el ESI-QTOF-MS puede ser útil en establecer el número de insaturaciones y en el análisis cuantitativo de los AGIs, pero parece no ser una buena estrategia para caracterizar estos compuestos en términos de la posición de enlaces dobles en la cadena de carbonos. Cabe también señalar que los espectros de fragmentación obtenidos tanto para isómero cis como trans del ácido oleico (C18:1  $\omega$ -9) empleando diferentes condiciones/energías de fragmentación no presentaron diferencias.

## 5. Conclusiones

Respondiendo a la demanda de procedimientos analíticos que permitan la determinación y cuantificación de AGPIs proporcionando además información estructural sobre los mismos, en el presente trabajo se propuso realizar el etiquetado de los átomos de carbono en dobles enlaces C=C, mediante una reacción de bromación. Esta reacción de derivatización se lleva a cabo de manera eficaz en condiciones químicas suaves y resulta atractiva para el análisis HRMS debido a que el Br confiere a las moléculas orgánicas un patrón isotópico específico.

Particularmente, en base los valores de  $m/z$  e intensidad de las señales en espectros de masa obtenidos, se esperaba lograr la cuantificación de AGI agrupando sus isómeros con una, dos o tres insaturaciones. Por su parte, mediante la fragmentación de iones moleculares bromados en experimentos MS/MS, se intentó hallar la posición de insaturaciones en la cadena de carbonos de los AGIs. Los resultados obtenidos en la realización del proyecto permitieron formular las siguientes conclusiones:

1. Los ácidos grasos fueron liberados de los triglicéridos mediante transesterificación obteniendo respectivos FAMEs y mediante hidrolisis para obtener AGs. Ambos procesos resultaron efectivos, pudiendo analizar los productos por espectrometría de masas con ESI en modo positivo y negativo, respectivamente.
2. Al aplicar la reacción de bromación para etiquetar dobles enlaces en FAMEs y en AGIs, mejores resultados se obtuvieron para FAMEs. Específicamente, la adición de formiato de sodio a la solución analizada por ESI(+)-QTOF-MS, permitió obtener espectros de masa relativamente simples, debido a la muy efectiva formación de un solo aducto de sodio para cada uno de los FAMEs obteniéndose señales de alta intensidad. En caso de AGIs, se obtenían varios iones para cada compuesto en ESI(-) y la intensidad de las señales fue menor respecto a los FAMEs. En las siguientes etapas de trabajo se decidió realizar la bromación de los FAMEs
3. De acuerdo con lo esperado, el etiquetado de los FAMEs con bromo resultó ser una estrategia efectiva para la detección de las señales de los AGIs en el espectro de masas, conocer el número de insaturaciones en sus moléculas (en base al patrón isotópico de bromo) y llevar a cabo cuantificación de estos compuestos agrupados

como isómeros de AGIs individuales con una, dos y tres insaturaciones, respectivamente. Para afinar las condiciones de reacción, se estudió efecto de tiempo, seleccionando 12 h ya que para este tiempo la intensidad de las señales de compuestos bromados fue más alta. En esta etapa del proyecto, se trabajó con mezcla comercial de estándares de los FAMES y se analizó el aceite de aguacate. Los límites de detección y cuantificación instrumentales obtenidos para los compuestos contenidos en el estándar de los FAMES de Supelco, C18:1  $\omega$ -9, C18:2  $\omega$ -6 y C18:3  $\omega$ -3, se encuentran entre los intervalos de 6.4-47 ng mL<sup>-1</sup> y 21-155 ng mL<sup>-1</sup>, respectivamente. En aceite de aguacate, se encontraron y cuantificaron mezclas de isómeros de los ácidos C18:1 y C18:2 (los isómeros por separados no pueden ser identificados por este procedimiento), cuyas concentraciones en porcentaje de masa fueron  $62.31 \pm 5.65 \%$  y  $1.42 \pm 0.13\%$  respectivamente, con RSD en base a tres replicas menores al 10%.

4. Para poder establecer la posición de los enlaces dobles en FAMES bromados y poder cuantificar isómeros individuales, se llevó a cabo la fragmentación de sus respectivos iones en la zona CID utilizando diferentes energías de colisión. Así mismo, se utilizó el método bbCID y se realizó la fragmentación en la fuente de ionización (isCID) empleando diferentes voltajes entre dos embudos. En todos experimentos se observó la pérdida de átomos de bromo durante fragmentación, por lo que no era posible identificar la posición de enlaces dobles ni observan una posible diferencia en patrones de fragmentación entre isómeros cis y trans de los AGIs. En los estudios futuros, sería necesario buscar las condiciones adecuadas de la fragmentación de los iones, porque los cálculos *in-silico* realizados y descritos en la sección 4.4.1. apuntan a la factibilidad de conservar los átomos de bromo en los respectivos fragmentos.

## 6. Referencias

- Ålander, L. (2020). Evaluation of lipid bromination: For the relative measurement of a chlorine gas biomarker. *UMEÅ UNIVERSITY*.
- Alexandra, H., Anke, P., & Martin, J. (2007). Selective detection of unknown organic bromine compounds and quantification potentiality by negative-ion electrospray ionization mass spectrometry with induced in-source fragmentation. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 415-424(10).
- Algarra, M., Rodríguez-Borges, J. E., & Silva, J. C. (2010). LC-MS Identification of derivatized free fatty acids from adipocere in soil samples: Liquid chromatography. *J. Sep. Sci*, 143-154.
- Allen, F., Pon, A., Wilson, M., Greiner, R., & Wishar, D. (2014). CFM-ID: a web server for annotation, spectrum prediction and metabolite identification from tandem mass spectra. *Nucleic Acids Research*, w94-w99.
- B., B. J., & Stoner, G. G. (1937). Studies on the Chemistry of the Fatty Acids. I. The Purification of Linoleic Acid by Crystallization Methods1. *Journal of the American Chemical Society*, 3-6.
- Bazinot, R. P., & Layé, S. (2014). Polyunsaturated fatty acids and their metabolites in brain function disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 771-785.
- Beccaria, M., Franchina, F., Nasir, M., Mellors, T., Hill, J., & Purcaro, G. (2018). Investigation of mycobacteria fatty acid profile using different ionization energies in GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 7987–7996.
- Bian, X., Li, N., Tan, B., Sun, B., Guo, M.-Q., Huang, G., . . . Wu, J.-L. (2018). Polarity-Tuning Derivatization-LC-MS Approach for Probing Global Carboxyl-Containing Metabolites in Colorectal Cancer. *Analytical Chemistry*, 11210-11215.
- Bian, X., Sun, B., Zheng, P., Li, N., & Wu, J.-L. (2017). Derivatization enhanced separation and sensitivity of long chain-free fatty acids: Application to asthma using targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometry approach. *Analytica Chimica Acta*, 59-70.
- Bollinger, J. G., Thompson, W., Lai, Y., Oslund, R. C., Hallstrand, T. S., Sadilek, M., . . . Gelb, M. H. (2010). Improved sensitivity mass spectrometric detection of eicosanoids by charge reversal derivatization. *Analytical Chemistry*.
- Bollinger, J., Rohan, G., Sadilek, M., & Gelb, M. (2013). LC/ESI-MS/MS detection of FAs by charge reversal derivatization with more than four orders of magnitude improvement in sensitivity. *Journal of Lipid Research*, 3523-3530.
- Briggs, M. A., Petersen, K. S., & Kris-Etherton, P. M. (2017). Saturated Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Replacements for Saturated Fat to Reduce Cardiovascular Risk. *Healthcare*, 29.
- Brugger, B., Erben, G., Sandhoff, R., Wieland, F., & Lehmann, W. (1996). Quantitative analysis of biological membrane lipids at the low picomole level by nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2339-2344.

- Bruker Daltonik, G. (2011, Septiembre). Maxis Impact User Manual.
- Calder, P. C. (2015). Functional Roles of Fatty Acids and Their Effects on Human Health. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 185.
- Candela, López, & Kohen. (2005). Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health. *Nutritional recommendations. Nutricion hospitalaria*,, 323-329.
- Chan, J. C., Kioh, D. Y., Yap, G. C., Lee, B. W., & Chan, E. C. (2017). A novel LCMSMS method for quantitative measurement of short-chain fatty acids in human stool derivatized with 12C- and 13C-labelled aniline. *J Pharm. Biomed. Anal.*, 43-53.
- Chaves, H., Singh, R. B., Khan, S., Wilczynska, A., & Takahashi, T. (2019). High Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Diets and Risk of Noncommunicable Diseases. *The Role of Functional Food Security in Global Health*, 217–259.
- Chen, J. &. (2020). Nutritional Indices for Assessing Fatty Acids: A Mini-Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 5695.
- Cheng, J. e. (2022). Quaterization Derivatization with Bis (Pyridine) Iodine Tetrafluoroboride: High-Sensitivity Mass Spectrometric Analysis of Unsaturated Fatty Acids in Human Thyroid Tissues. *Analytical Chemistry*, 11185-11191.
- Cheng, J., Li, Y., Wang, Y., Zhang, J., Sun, T., Zhang, L., & Guo, Y. (2022). Quaterization Derivatization with Bis(Pyridine) Iodine Tetrafluoroboride: High-Sensitivity Mass Spectrometric Analysis of Unsaturated Fatty Acids in Human Thyroid Tissues. *ANalytical Chemistry*, 11185-11191.
- Christie, W. W. (1998). Gas Chromatography–Mass Spectrometry Methods for Structural Analysis of Fatty Acids. *Lipids*.
- Cruz, M. H., Gordillo, R. M., Domínguez, Z., Quintero, A. R., Arcilla, M. A., & T. Ayora Talavera, J. V. (2021). Optimization and characterization of in situ epoxidation of chicken fat with. *Fuel*.
- Das, U. N. (2006). Essential Fatty Acids - A Review. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 467-482.
- De Carvalho, C. C. (2018). The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules*, 2583.
- DiNicolantonio, J. J., PharmD, & James O’Keefe, M. (2020). the importance of Maintaining a Low Omega-6/Omega-3 Ratio for reducing the risk of inflammatory Cytokine Storms. *Missouri Medicine*, 539-542.
- Djuricic, I., & Calder, P. C. (2021). Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. *Nutrients*, 2421.
- Ebbesson, S. O., Risica, P. M., Ebbesson, L. O., M., J., Kennish, & Tejero, M. E. (2005). Omega-3 fatty acids improve glucose tolerance and components of the metabolic syndrome in Alaskan Eskimos: the Alaska Siberian project. *International Journal of Circumpolar Health*, 396-408.
- Eggstein, M., & Kuhlman, E. (1974). Triglycerides and Glycerol Determination after Alkaline Hydrolysis. *Methods of Enzymatic Analysis*, 1825–1831.

- Eide, Neverdal, & Westad. (2010). Eide, I., Neverdal, G., & Westad, F. (2010). Detection of 5 ppm Fatty Acid Methyl Ester (FAME) in Jet Fuel Using Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Chemometrics. *Energy & Fuels*, 3661-3664.
- Esch, P., & Heiles, S. (2018). . Charging and charge switching of unsaturated lipids and apolar compounds using Paternò-Büchi reactions. *J Am Soc Mass Spectrom*, 1971–1980.
- Fay, & Richli. (1991). Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization. *Journal of Chromatography*, 89-98.
- Fay, L., & Richli, U. (1991). Location of double bonds in polyunsaturated fatty acids by gas chromatography-mass spectrometry after 4,4-dimethyloxazoline derivatization. *Journal of Chromatography*, 89-98.
- Flores, M., Saravia, C., Vergara, C., Avila, F., Valdés, H., & Ortiz-Viedma, J. (2019). Avocado oil: Characteristics, properties, and applications. *Molecules*, 24(11), 2172.
- Fu, H., Zhang, Q.-L., Huang, X.-W., Ma, Z.-H., Zheng, X.-L., Li, S.-L., . . . Liu, J. (2020). A rapid and convenient derivatization method for quantitation of short-chain fatty acids in human feces by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*.
- Furuhashi, T., & Weckwerth, W. (2013). Furuhashi, T., & Weckwerth, W. (2013). Introduction to Lipid (FAME) Analysis in Algae Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *The Handbook of Plant Metabolomics*, 215–225.
- G.P.P.Kamatoua, & A.M.Viljoenab. (2017). Comparison of fatty acid methyl esters of palm and palmist oils determined by GCxGC–ToF–MS and GC–MS/FID. *South African Journal of Botany*, 483-488.
- Ghaleshahi, Z., H, E., Gh., R., & M., G. (2019). Comparison and analysis characteristics of flax, perilla and basil seed oils cultivated in Iran. *Journal of Food Science and Technology*, 1258–1268.
- Gross, J. H. (2004). *Mass Spectrometry: A Textbook*. Berlín: Springer-Verlag.
- Gunstone, F. (1996). *Fatty acid and lipid chemistry*. Scotland: Springer science business media, B. V.
- Háková, E., Vrkoslav, V., Míková, R., Schwarzová-Pecková, K., Bosáková, Z., & Cvačka, J. (2015). Localization of double bonds in triacylglycerols using high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization ion-trap mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 5175-5188.
- Han, J., Lin, K., Sequeira, C., & Borchers, C. H. (2015). An isotope-labeled chemical derivatization method for the quantitation of short-chain fatty acids in human feces by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 86-94.
- Han, Y., Chen, P., Li, Z., Wang, X., & Sun, C. (2022). Multi-wavelength visible-light induced [2+2] cycloaddition for identification of lipid isomers in biological samples. *Journal of Chromatography A*.

- Hardas, N. R., Adam, R., & Uden, P. C. (1999). Alkene determination by bromination and gas chromatography with element-selective atomic plasma spectroscopic detection. *Journal of Chromatography A*, 844(1-2), 249-258.
- Huan Fu 1 2, Q.-L. Z.-W.-H.-L.-L.-N.-C.-F.-J.-S. (s.d.).
- Hwu, C.-M., Hsiung, C. A., & Wu, K.-D. (2008). Diagnosis of insulin resistance in hypertensive patients by the metabolic syndrome: AHA vs. IDF definitions. *International Journal of Clinical Practice*, 1441-1446.
- Ichihara, K., & Fukubayashi, Y. (2010). Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipids*, 635-640.
- Innes, J. K., & Calder, P. C. (2018). Omega-6 fatty acids an inflammation. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 41-48.
- Iwakoshi, K., Ogawa, A., Iwakoshi, K., Nakajima, J., Kobayashi, C., & Sasamoto, T. (2021). Analyses of the brominated vegetable oil in soft drinks using gas chromatography–flame ionization detector and atmospheric pressure gas chromatography–quadrupole/time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry*, 127712.
- Jakobsen, M. U., Dethlefsen, C., Joensen, A. M., Stegger, J., Tjønneland, A., Schmidt, E. B., & Overvad, K. (2010). Intake of carbohydrates compared with intake of saturated fatty acids. *The American Journal of Clinical*, 1764-1768.
- Jensen, N., Kenneth, T., & Gross, M. (1985). Collisional activation decomposition mass spectra for locating double bonds in polyunsaturated fatty acids. *Analytical Chemistry*, 2018-2021.
- Jiang, R., Jiao, Y., Zhang, P., Liu, Y., Wang, X., Huang, Y., . . . Xu, F. (2017). Twin Derivatization Strategy for High-Coverage Quantification of Free Fatty Acids by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 12223-12230.
- Kapoor, & Patil. (2011). Importance and production of omega-3 fatty acids from. *International Food Research Journal*, 493-499.
- Kapoor, B., Kapoor, D., Gautam, S., Singh, R., & Bhardwaj, S. (2021). Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits. *Current Nutrition Reports*, 232–242.
- Karunathilakaa, S. R., HwanChoia, S., Mossobaa, M. M., Yakesa, B. J., Brücknera, L., Ellsworthb, Z., & Srigleya, C. T. (2019). Rapid classification and quantification of marine oil omega-3 supplements using ATR-FTIR, FT-NIR and chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 9-19.
- Katkade, M., Syed, H., Andhale, R., & Sontakke, M. (2018). MB Katkade, HM Syed, RR Andhale and MD Sontakke sanfflower (*Carthamus tinctorius*) oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3581-3585.
- Killeen, D. P., Marshall, S. N., Burgess, E. J., Gordon, K. C., & Perry, N. B. (2017). Raman Spectroscopy of Fish Oil Capsules: Polyunsaturated Fatty Acid Quantitation Plus Detection of Ethyl Esters and Oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3551–3558.

- Leng, J., Wang, H., Zhang, L., Zhang, J., Wang, H., & Guo, Y. (2013). A highly sensitive isotope-coded derivatization method and its application for the mass spectrometric analysis of analytes containing the carboxyl group. *Analytica Chimica Acta*, 114-121.
- Li, X., Lin, Z., Yu, H., & Cai, Z. (2020). Xiang, Li; Zhu, Lin; Huang, Yu; Cai, Zongwei (2020). Application of Derivatization in Fatty Acids and Fatty Acyls Detection: Mass Spectrometry-Based Targeted Lipidomics. *Small methods*.
- Liu, K.-S. (1994). Preparation of Fatty Acid Methyl Esters for Gas-Chromatographic Analysis of Lipids in Biological Materials. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1179-1187.
- Ma, S.-R., Tong, Q., Zhao, Z.-X., Cong, L., Yu, J.-B., Fu, J., . . . Jiang, J.-D. (2019). Determination of berberine-upregulated endogenous short-chain fatty acids through derivatization by 2-bromoacetophenone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 3191-3207.
- Ma, X., Chong, L., Tian, R., & Xia, Y. (2016). Identification and quantitation of lipid C=C location isomers: A shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2573-2578.
- Mantzourani, C., & Kokotou, M. G. (2022). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) Derivatization-Based Methods for the Determination of Fatty Acids in Biological Samples. *Molecules*.
- Marco Beccaria, R. C. (2015). Determination of the triacylglycerol fraction in fish oil by comprehensive liquid chromatography techniques with the support of gas chromatography and mass spectrometry data. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 5211-5225.
- Martínez-Lozano, P., & Fernández de la Mora, J. (2008). Direct Analysis of Fatty Acid Vapors in Breath by Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Ionization-Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 8210-8215.
- McNutt, J., & He, Q. (2016). Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 1-12.
- Mihai, A., NEGOIȚĂ, M., & BELC, N. (2019). Evaluation of fatty acid profile of oils/fats by GC-MS through two quantification approaches. *Rom Biotechnol Lett*, 973-985.
- Murphy, R. C., Okuno, T., Johnson, C. A., & Barkley, R. M. (2017). Determination of Double Bond Positions in Polyunsaturated Fatty Acids Using the Photochemical Paternò-Büchi Reaction with Acetone and Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 8545-8553.
- Mushtaq, M., Tan, I. B., Devi, C., Majidaie, S., Nadeem, M., & Lee, S. (2011). Epoxidation of Fatty Acid Methyl Esters derived from Jatropha oil. *2011 National Postgraduate Conference*, (pp. 1-4). Perak, Malaysia.
- Nagumalli, S. K., Jacob, C. C., & Costa, G. G. (2020). A rapid and highly sensitive UPLC-ESI-MS/MS method for the analysis of the fatty acid profile of edible vegetable oils. *Journal of Chromatography B*, 122415.
- Narciso Couto, L. D. (2018). Application of the broadband collision-induced dissociation (bbCID) mass spectrometry approach for protein glycosylation and phosphorylation analysis. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 75-85.

- Narreddula, V. R., Boase, N. R., Ailuri, R., Marshall, D. L., Poad, B. L., Kelso, M. J., . . . Blanksby, S. J. (2019). Introduction of a Fixed-Charge, Photolabile Derivative for Enhanced Structural Elucidation of Fatty Acids. *Analytical Chemistry*, 9901–9909.
- Negrete, M. A., Wrobel, K., Aguilar, F. J., Barrientos, E. Y., Escobosa, A. R., & Wrobel, K. (2018). Determination of fatty acid methyl esters in cosmetic castor oils by flow injection–electrospray ionization–high-resolution mass spectrometry. *International Journal of Cosmetic Science*, 295-302.
- Nichols, P. D., Guckert, J. B., & While, D. C. (1986). Determination of monosaturated fatty acid double-bond position and geometry for microbial monocultures and complex consortia by capillary GC-MS of their dimethyl disulphide adducts. *Journal of Microbiological Methods*, 49-55.
- NOM-F-408-S-1981. (s.d.). *Norma Oficial Mexicana NOM-F-408-S-1981, alimentos para humanos -aceites y grasas vegetales o animales-determinación del índice de yodo por el método de Hanus*. 1981.
- Nwosu, C. V., & Boyd, L. C. (1997). POSITIONAL DISTRIBUTION OF FATTY ACIDS ON TRIACYLGLYCEROLS OF MENHADEN (*BREVOORTIA TYRANNIS*) AND SALMON (*SALMO SALAR*) OILS. *Journal of Food Lipids*, 65-74.
- Patkowska-Sokoła, B., Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., & Bodkowski, R. (2009). Technology for recovering omega-3 fatty acids from family from fish oils and protecting them against oxidative changes. *Przem. Chem.*, 548-552.
- Paul Bendig, L. M. (2013). Mass spectra of methyl esters of brominated fatty acids and their presence in soft drinks and cocktail syrups. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 15;27(9):1083-9.
- Peet, M., & Stokes, C. (2012). Omega-3 Fatty Acids in the Treatment of Psychiatric Disorders. *Drugs*, 1051-1059.
- Pelt, C. V., & Brenna, T. (1991). Acetonitrile Chemical Ionization Tandem Mass Spectrometry To Locate Double Bonds in Polyunsaturated Fatty Acid Methyl Esters. *Analytical Chemistry*, 1981-1989.
- Pena-Abaurrea, M., Jobst, K. J., Ruffolo, R., Shen, L., McCrindle, R., Helm, P. A., & Reiner, E. J. (2014). Identification of Potential Novel Bioaccumulative and Persistent Chemicals in Sediments from Ontario (Canada) Using Scripting Approaches with GC×GC-TOF MS Analysis. *Environmental Science & Technology*, 9591-9599.
- Qin, X., & Zhon, J. (2016). A Review of Extraction Techniques for Avocado. *Journal of Oleo Scie*, 881-888.
- Reis, M. G., Reis, M. M., Leath, S., & Stelwagen, K. (2011). Direct analysis of fatty acid profile from milk by thermochemolysis–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, 316-323.
- Rincón-Cervera, M. Á., González-Barriga, V., Romero, J., Rojas, R., & López-Arana, S. (2020). Quantification and Distribution of Omega-3 Fatty Acids in South Pacific Fish and Shellfish Species. *Foods*, 233.

- Robert, C., Casey, M., Cox, C., Kirk, J., & Voorhees, K. (2015). Identification of bacteria by fatty acid profiling with direct analysis in real time mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2007-2012.
- Rodríguez, A. S., Rios, A. V., Bugarin, A., Sánchez, V. R., Dávila, A. C., Gutiérrez, B. R., & Flores, D. C. (2021). Chemoenzymatic Epoxidation of Highly Unsaturated Fatty Acid Methyl Ester and Its Application as Poly(lactic acid) Plasticizer. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 17016-17024.
- Rydlewski, A. A., Manin, L. P., Pizzo, J. S., Silva, P. D., Silveira, R., B.G.Tavares, C., . . . Visentainer, J. V. (2021). Lipid profile by direct infusion ESI-MS and fatty acid composition by GC-FID in human milk: Association with nutritional status of donors. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103797.
- Schreiner, M. (2005). Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy. *Journal of Chromatography A*, 126-130.
- Schuchardt, Huss, Stauss-Grabo, & Hahn. (2009). Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *European Journal of Pediatrics*, 149-164.
- Shuangfei, C., & Lisheng, W. (2011). Epoxidation of Unsaturated Fatty Acid Methyl Esters in the Presence of SO<sub>3</sub>H-functional Brønsted Acidic Ionic Liquid as Catalyst. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 57-63.
- Silveira, R., Vágula, J. M., Figueiredo, I. d., Claus, T., Galuch, M. B., Oliveira, O., . . . VergilioVisentainer, J. (2017). Rapid methodology via mass spectrometry to quantify addition of soybean oil in extra virgin olive oil: A comparison with traditional methods adopted by food industry to identify fraud. *Food Research International*, 43-50.
- Simopoulos, A. (2004). Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Reviews International*, 77-90.
- Simopoulos, A. P. (1999). Essential fatty acids in health and chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 560-569.
- Simopoulos, A. P., & Cleland, L. G. (2003). *Omega-6/omega-3 Essential Fatty Acid Ratio: The Scientific Evidence*. Karger Medical and Scientific Publishers.
- Siudem, P., Wawer, I., & Paradowska, K. (2019). Rapid evaluation of edible hemp oil quality using NMR and FT-IR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure*, 204-208.
- Sokoła-Wysoczańska, E. W.-S. (2018). Sokoła-Wysoczańska, E., Wysoczański, T., Wagner, J., Czyż, K., Bodkowski, R., Lochyński, SPolyunsaturated Fatty Acids and Their Potential Therapeutic Role in Cardiovascular System Disorders—A Review. *Nutrients*, 1561.
- Song, W.-S., Park, H.-G., Kim, S.-M., Jo, S.-H., Kim, B.-G., Theberge, A. B., & Kim, Y.-G. (2020). Chemical derivatization-based LC-MS/MS method for quantitation of gut microbial short-chain fatty acids. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 297-302.
- Spector, A. A. (1999). Essentialy of fatty acids. *Lipids*, S1-S3.

- Srivastava, & Prasad. (2000). Triglycerides-based diesel fuels. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 111–133.
- Sun, C., Black, B. A., Zhao, Y.-Y., Ganzle, M. G., & Curtis, J. M. (2013). Identification of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers by Silver Ion-Liquid Chromatography/In-line Ozonolysis/Mass Spectrometry (Ag<sup>+</sup>-LC/O3-MS). *Analytical Chemistry*, 7345-7352.
- Svetashev. (2011). Mild Method for Preparation of 4,4-Dimethyloxazoline Derivatives of Polyunsaturated Fatty Acids for GC–MS. *Lipids*, 463-467.
- Thurnhofer, S., & Vetter, W. (2006). Application of ethyl esters and d3-methyl esters as internal standards for the gas chromatographic quantification of transesterified fatty acid methyl esters in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 3209-3214.
- Trinklein, T. J., Jiang, J., & Synovec, R. E. (2022). Profiling Olefins in Gasoline by Bromination Using GC×GC-TOFMS Followed by Discovery-Based Comparative Analysis. *analytical Chemistry*, 9407-9414.
- Vivarelli, L. R., Gabriel, S., Luiz, L., Carius, G. B., Junqueira, C. L., Pires, R. E., & Peter, S. (2017). Potential of electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), using direct infusion, to quantify fatty acid methyl esters (FAME) in biodiesel. *Analytical Methods*.
- Wang, F., Liigand, J., Tian, S., Arndt, D., Greiner, R., & Wishart, D. S. (2021). CFM-ID 4.0: More Accurate ESI-MS/MS Spectral Prediction and Compound Identification. *Analytical Chemistry*, 11692–11700.
- Wang, X., Li, Y., Jiang, Y., Meng, L., & Nie, Z. (2022). In-depth free fatty acids annotation of edible oil by mCPBA epoxidation and tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*.
- Willacey, C. C., Karu, N., Harms, A. C., & Hankemeier, T. (2020). Metabolic profiling of material-limited cell samples by dimethylaminophenacyl bromide derivatization with UPLC-MS/MS analysis. *Microchemical Journal*.
- Winkler, M., Steinbiß, M., & Michael, M. (2013). A more sustainable Wohl–Ziegler bromination: Versatile derivatization of unsaturated FAMES and synthesis of renewable polyamides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 44-51.
- Xia, F., He, C., Ren, M., Xu, F.-G., & Wan, J.-B. (2020). Quantitative profiling of eicosanoids derived from n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids by twin derivatization strategy combined with LC-MS/MS in patients with type 2 diabetes mellitus. *Analytica Chimica Acta*, 24-35.
- Xiaobo, X., & Yu, X. (2019). Analysis of Conjugated Fatty Acid Isomers by the Paternò-Büchi Reaction and Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 7173-7180.
- Xie, X., & Xia, Y. (2019). Analysis of Conjugated Fatty Acid Isomers by the Paternò-Büchi Reaction and Trapped Ion Mobility Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 7173-7180.
- Xu, S.-l., W, B.-f., Orešič, M., Xie, Y., Yao, P., Wu, Z.-y., . . . Wei, F. (2020). Double Derivatization Strategy for High-Sensitivity and High-Coverage Localization of Double Bonds in Free Fatty Acids by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 6446-6455.

- Xu, S.-l., Wu, B.-f., Orešič, M., Xie, Y., Yao, P., Wu, Z.-y., . . . Wei, F. (2022). Double Derivatization Strategy for High-Sensitivity and High-Coverage Localization of Double Bonds in Free Fatty Acids by Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 6446-6455.
- Young, R., Flakelar, C., Narreddula, V., Jekimovs, L., Menzel, J., Poad, B., & Blanksby, S. (2022). Identification of Carbon-Carbon Double Bond Stereochemistry in Unsaturated Fatty Acids by Charge-Remote Fragmentation of Fixed-Charge Derivatives. *Analytical Chemistry*, 16180-16188.
- Yuhki, T., Tomofumi, S., Hiroshi, S., Kazuhiro, I., & Takashi, F. (2005). Synthesis of benzofurazan derivatization reagents for carboxylic acids and its application to analysis of fatty acids in rat plasma by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 802–808.
- Zeng, M., & Cao, H. (2018). Fast quantification of short chain fatty acids and ketone bodies by liquid chromatography-tandem mass spectrometry after facile derivatization coupled with liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 137-145.
- Zhao, J., Fang, M., & Xia, Y. (2021). A liquid chromatography-mass spectrometry workflow for in-depth quantitation of fatty acid double. *Journal of Lipid Research*.
- Zhao, J., Xie, X., Lin, Q., Ma, X., Su, P., & Xia, Y. (2020). Next-generation Paternò–Büchi reagents for lipid analysis by mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 13470–13477.