DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS (ALDEHÍDOS Y CETONAS) Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN MUESTRAS DE AIRE

AMANDA LUCIA MORA MARTÍNEZ

Trabajo de investigación para optar al título de Doctora en Química

Directora

ELENA STASHENKO. Química, Ph. D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA
BUCARAMANGA
2006

DESARROLLO DE MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS (ALDEHÍDOS Y CETONAS) Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN FASE GASEOSA

AMANDA LUCÍA MORA MARTÍNEZ

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de *Doctor* en Química

Directora: Elena E. Stashenko, Química, Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER,
FACULTAD DE CIENCIAS, ESCUELA DE QUÍMICA
Bucaramanga
2006

DEDICATORIA

Esta tesis, constituye el final de una parte muy importante de mi vida y por tanto, quiero dedicarla a Dios, el motor de mi vida, y a mis seres queridos.

A Mi madre, Amanda
A Mis hermanos, Martha Rocío y Gustavo Andrés
A Mi sobrina, Valentina
A Mi tío Henry y mi tía Ruth y,
A Mi esposo, José David.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por estar a mi lado en los momentos fáciles y difíciles de mi vida, por llenarme de fe constantemente, por darme la fortaleza y la sabiduría necesarias para enfrentar las situaciones de la vida cotidiana y por permitirme culminar una etapa más en mi vida.

También, quiero expresar mis sinceros agradecimientos a las personas e instituciones que de una u otra forma, hicieron posible la realización de está tesis, especialmente:

A mi directora, la doctora Elena Stashenko, auténtica embajadora de la cultura y la sabiduría, quien me brindó la oportunidad de realizar mis estudios doctorales y sabiamente me guió a lo largo de esta investigación, mi más sincera gratitud, admiración y respeto. Le estaré eternamente agradecida, por formar parte de mi vida profesional, por compartir conmigo sus conocimientos, por todo el tiempo que me dedicó, por los valiosos consejos que me dio y por la amistad que me brindó.

Al doctor Jairo Rene Martínez Morales, codirector de esta investigación, por sus valiosos aportes y enseñanzas, que contribuyeron a los logros de los objetivos planteados.

A los jurados de la tesis, la doctora Martha Isabel Páez Melo, el doctor Jesús Tadeo Olivero Verbel y el doctor Alirio Palma Rodríguez, Álvaro Ignacio Martínez, por el tiempo que dedicaron a la evaluación de este trabajo y por sus valiosas sugerencias.

A mis compañeros del Laboratorio de Cromatografía de la UIS, con quienes compartí una gran parte de mi vida y con quienes trasnoché semanas enteras, especialmente a Martha, Mónica, Amner, Geovanna, José Luís, Camilo y William, gracias por su amistad y colaboración.

A mis compañeros de la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, especialmente a María del Socorro, Carmen Lucrecia, Olga Inés, María Elena, Ricardo, Carlos Mario, Orlando Simón, Jorge y Mario, por su colaboración constante en todas las gestiones administrativas requeridas a los largo de mis estudios doctorales.

A los voluntarios, Mónica, Camilo, José Luís, Domingo, William, José David, Víctor y Felipe, por las muestras suministradas, sin las cuales no hubiera sido posible la realización de una buena parte de esta tesis.

Al Laboratorio de Cromatografía – CIBIMOL- CENIVAM de la Universidad industrial de Santander (UIS), donde pase una gran parte de mi vida y semanas de trasnocho, por la co-financiación de la investigación.

A la Universidad Nacional de Colombia-Sede Medellín, por brindarme la oportunidad de culminar mis estudios doctorales.

A Colciencias, por el aporte económico para el desarrollo de esta investigación.

A José David, por su amor, su apoyo incondicional, su compañía en las noches de trasnocho, sus palabras de animo y especialmente, por enseñarme a sobrellevar las dificultades que se presentan en la vida y por alentarme siempre a no detenerme hasta llegar a la meta.

Por último, quiero agradecer infinitamente a mi madre, Amanda y a mis hermanos, Martha y Gustavo, que aún en la distancia, siempre estuvieron cerca de mi y me brindaron su amor y sus oraciones.

A todos, muchísimas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

Página

INTRODUCCIÓN. **1**

1. MARCO TEÓRICO. **13**

1.1 CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS. **13**

1.2 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOC's). **18**

1.3 COMPUESTOS CARBONÍLICOS. **21**

1.3.1 Estructura y reactividad del grupo carbonilo. 21

1.3.1.1 Propiedades físicas de compuestos carbonílicos. 23

1.3.1.2 Propiedades químicas de compuestos carbonílicos. 25

1.3.2 Actividad biológica y toxicidad de los compuestos carbonílicos. 26

1.3.3 Fuentes e importancia ambiental de los compuestos carbonílicos. 29

1.3.3.1 Fuentes biogénicas. 31

1.3.3.2 Fuentes antropogénicas. 33

1.3.3.3 Producción fotoquímica de aldehídos. 34

1.4 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS. **36**

1.4.1 Estructura y reactividad del grupo carboxílico. 36

1.4.1.1 Propiedades físicas de compuestos carboxílicos. 37

1.4.1.2 Propiedades químicas de compuestos carboxílicos. 38

1.4.2 Actividad biológica y toxicidad de los compuestos carboxílicos. 39

1.4.3 Fuentes e importancia ambiental de los compuestos carboxílicos. 42

1.4.3.1 Fuentes biogénicas. 44

1.4.3.2 Fuentes antropogénicas. 44

1.4.3.3 Producción fotoquímica. 45

1.5 TÉCNICAS DE MONITOREO DE AIRE. 47

1.5.1 Análisis de compuestos carbonílicos en aire. 53

1.5.2 Análisis de compuestos carboxílicos en aire. 58

1.5.3 Microextracción en fase sólida. 61

1.5.3.1 Aplicación de la SPME para el análisis de compuestos orgánicos volátiles. 71

1.5.3.2. Microextracción en fase sólida combinada con la derivatización química. 74

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL. 80

2.1 REACTIVOS Y MATERIALES. 80

2.1.1 Aldehídos, ácidos carboxílicos y agentes derivatizantes. 80

2.1.2 Otros reactivos. 80

2.1.3 Solventes. 81

2.1.4 Fibras SPME. 81

2.1.5 Otros materiales. 81

2.1.6 Equipos menores. 82

2.2 PARÁMETROS INSTRUMENTALES. 83

2.2.1 Cromatografía de gases (GC) con detector fotométrico de llama (FPD). 83

2.2.2 Cromatografía de gases (GC) con detector de captura de electrones (ECD). 84

2.2.3 Cromatografía de gases (GC) con detector selectivo de masas (MSD). 85

2.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR. 86

2.3.1 Derivados de aldehídos. 86

2.3.1.1 HBT-hidrazonas. 86

2.3.1.2 PFPH-hidrazonas. 87

2.3.2 Derivados de ácidos carboxílicos. 91

2.3.2.1 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio orgánico. 91

2.3.2.2 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio acuoso. 92

2.3.3 Determinación de figuras de mérito para las soluciones de calibración de los ésteres de pentaflúorbencilo. 93

2.4 MUESTREO. 93

2.4.1 Análisis de aliento humano. 93

2.4.1.1 Muestreo dinámico por SPME-GC/ECD. 93

2.4.1.2 Recolección de aire de exhalación. 95

2.4.2 Cuantificación de sustancias carbonílicas y carboxílicas en aire interior (*indoors*). 96

2.4.3 Obtención del perfil cuantitativo de compuestos carbonílicos y carboxílicos en gases de tubo de escape de carros, operados con gasolina. 100

2.4.4. Monitoreo de compuestos carbonílicos de origen biogénico. 102

2.4.4.1 Muestreo *in vitro*. 102

2.4.4.2 Muestreo *in vivo*. 102

2.4.5 Obtención del perfil cuantitativo de compuestos carbonílicos y carboxílicos en sudor humano (pies). 104

2.5 IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS COMO HIDRAZONAS. 105

2.5.1 Determinación de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, mediante HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra, con HBT. 105

2.5.1.1 Estudio de las variables que afectan el proceso de la saturación de la fibra de SPME con HBT. 106

2.5.1.1.1 Selección de la fibra de SPME. 106

2.5.1.1.2 Efecto de la temperatura y el tiempo del la exposición de la fibra sobre la eficiencia de extracción del HBT por SPME. 106

2.5.1.1.3 Determinación del tiempo de equilibrio. 107

2.5.1.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular (C_2-C_{10}), en fase gaseosa. 108

2.5.1.3 Determinación del hexanal (C_6) en fase vapor. 108

2.5.2 Determinación por HS-SPME de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, con extracción-derivatización (PFPH) simultánea *in situ*. 109

2.5.2.1 Estudio de las variables que afectan la saturación de la fibra de SPME con PFPH. 109

2.5.2.1.1 Selección de la fibra de SPME. 109

2.5.2.1.2 Determinación del tiempo de equilibrio. 109

2.5.2.1.3 Adición de sal (*salting out*). 110

2.5.2.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en matrices líquidas. 110

2.5.2.2.1 Determinación del tiempo de equilibrio. 110

2.5.2.2.2. Efecto del agente derivatizante. 111

2.5.2.3 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular en matrices gaseosas simuladas. 111

2.5.2.3.1 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en el aire contenido en un recipiente de vidrio de 12 mL. 111

2.5.2.3.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular en fase gaseosa, usando un dispositivo de *headspace* estático. 112

2.5.2.4 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular en muestras de aire. 114

2.5.3 Determinación de compuestos carboxílicos de bajo peso molecular en fase líquida, mediante derivatización con PFBBr y extracción posterior de los derivados por HS-SPME. 114

2.5.3.1 Estudio de las variables que afectan la derivatización de ácidos carboxílicos con bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) en medio acuoso. 115

2.5.3.1.1 Efecto del pH. 116

2.5.3.1.2 Tiempo de reacción. 116

2.5.3.1.3 Temperatura de reacción. 117

2.5.3.1.4 Concentración de agente derivatizante. 117

2.5.3.2 Estudio de las variables que afectan el proceso de HS-SPME de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB) en solución acuosa. 117

2.5.3.2.1 Efecto del pH. 118

2.5.3.2.2 Efecto del tiempo. 118

2.5.3.2.3 Efecto *salting-out*. 118

2.5.3.3 Determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en muestras de aire. 119

2.6 APLICACIONES DE SPME AL ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES POLARES EN DIFERENTES MATRICES (VALIDACIÓN DEL MÉTODO). 120

2.6.1 Aplicaciones biológicas. 120

2.6.1.1 Determinación por HS-SPME con derivatización (PFPH) sobre la fibra de compuestos carbonílicos volátiles en muestras de aliento, orina, saliva y sudor. 120

2.6.1.1.1 Determinación del etanal en aliento humano mediante muestreo dinámico por SPME-GC/ECD. 121

2.6.1.1.2 Determinación del etanal en aliento humano recolectado en bolsas *Tedlar*®. 122

2.6.1.1.3 Determinación del etanal en muestras de orina y saliva, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) *in situ* sobre la fibra. 123

2.6.1.1.4 Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos en sudor humano (pies). 123

2.6.2 Aplicaciones en alimentos y productos naturales. 124

2.6.2.1 Determinación del etanal en licores, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) simultánea sobre la fibra. 125

2.6.2.2 Determinación de los aldehídos presentes en aceites comestibles, mediante HS-SPME con derivatización simultánea sobre la fibra por reacción con PFPH y/o con HBT. 125

2.6.2.2.1 Derivatización con HBT. 126

2.6.2.2.2 Derivatización con PFPH. 126

2.6.2.3 Monitoreo de compuestos carbonílicos de origen biogénico, por HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra con PFPH. 126

2.6.3 Aplicaciones ambientales. 127

2.6.3.1 Cuantificación de compuestos carbonílicos volátiles en aire interior (*indoors*). 127

2.6.3.2 Cuantificación de compuestos carbonílicos y carboxílicos volátiles en gases de tubo de escape de carros operados con gasolina. 129

2.6.3.3 Cuantificación de sustancias carbonílicas y carboxílicas en aguas lluvia. 139

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS. 131

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES. 131

3.2 PARÁMETROS INSTRUMENTALES. 135

3.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR. 135

3.3.1. Derivados de aldehídos. 135

3.3.1.1 HBT-hidrazonas. 136

3.3.1.2 PFPH-hidrazonas. 139

3.3.2 Derivados de ácidos. 149

3.3.2.1 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio orgánico. 149

3.3.2.2 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio acuoso. 155

3.4 IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS. 157

3.4.1 Determinación de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, mediante HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra, con HBT. 157

3.4.1.1 Estudio de las variables que afectan la saturación de la fibra de SPME con HBT. 157

3.4.1.1.1 Selección de la fibra de SPME. 157

3.4.1.1.2 Efecto de la temperatura y el tiempo de la exposición de la fibra sobre la eficiencia de extracción del HBT por SPME. 158

3.4.1.1.3 Determinación del tiempo de equilibrio. 159

3.4.1.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en fase gaseosa. 161

3.4.1.3 Determinación del hexanal (C_6) en fase vapor. 165

3.4.1.3.1 Determinación del hexanal en matrices líquidas, mediante HS-SPME-GC/FPD, con derivatización directa sobre la fibra, saturada con HBT. 167

3.4.2 Determinación por HS-SPME de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, con extracción-derivatización (PFPH) simultánea *in situ*. 170

3.4.2.1 Estudio de las variables que afectan la saturación de la fibra de SPME con PFPH. 170

3.4.2.1.1 Selección de la fibra de SPME. 170

3.4.2.1.2 Determinación del tiempo de equilibrio. 172

3.4.2.2 Extracción de aldehídos de bajo peso molecular, presentes en matrices líquidas. 176

3.4.2.2.1 Determinación del tiempo de equilibrio. 177

3.4.2.2.2 Efecto del agente derivatizante. 177

3.4.2.3 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en matrices gaseosas simuladas. 181

3.4.2.3.1 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en el aire contenido en un recipiente de vidrio de 12 mL. 181

3.4.2.3.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en fase gaseosa, usando un dispositivo de *headspace* estático. 182

3.4.2.4 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en muestras de aire. 186

3.4.3 Determinación de compuestos carboxílicos de bajo peso molecular mediante derivatización con PFBBr en fase líquida, acompañada de la HS- SPME de los derivados. 188

3.4.3.1 Estudio de las variables que afectan la derivatización de ácidos carboxílicos con bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) en medio acuoso. 191

3.4.3.1.1 Efecto del pH. 191

3.4.3.1.2 Tiempo de reacción. 194

3.4.3.1.3 Temperatura de reacción. 196

3.4.3.1.4 Concentración del agente derivatizante. 198

3.4.3.2 Estudio de las variables que afectan el proceso de HS-SPME de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB) en solución acuosa. 201

3.4.3.2.1 Efecto del pH en la extracción. 203

3.4.3.2.2 Efecto del tiempo de exposición de la fibra. 205

3.4.3.2.3 Efecto *salting-out*. 207

3.4.3.2.4 Efecto de la temperatura. 209

3.4.3.3 Determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en muestras de aire. 211

3.5 DETERMINACIÓN POR HS-SPME DE ALDEHÍDOS VOLÁTILES Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN DIFERENTES MATRICES. 213

3.5.1 Aplicaciones biológicas. 214

3.5.1.1 Determinación por HS-SPME con derivatización (PFPH) sobre la fibra de compuestos carbonílicos volátiles en aliento, orina, saliva y sudor. 214

3.5.1.1.1 Determinación del etanal en aliento humano mediante muestreo dinámico por HS-SPME-GC/ECD. 214

3.5.1.1.2 Determinación del etanal en aliento humano recolectado en bolsas *Tedlar*®. 228

3.5.1.1.3 Determinación del etanal en muestras de orina y saliva, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) *in situ* sobre la fibra. 229

3.5.1.1.4 Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos volátiles en sudor humano (pies). 236

3.5.2 Aplicaciones en alimentos y productos naturales. 241

3.5.2.1 Determinación por HS-SPME del etanal en bebidas alcohólicas, usando la extracción-derivatización simultánea sobre la fibra. 241

3.5.2.2 Determinación de los aldehídos en aceites comestibles, por HS-SPME con derivatización simultánea sobre la fibra. 242

3.5.2.2.1 Derivatización con HBT. 243

3.5.2.2.2 Derivatización con PFPH. 246

3.5.2.3 Monitoreo de compuestos carbonílicos de origen biogénico, por HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra con PFPH. 248

3.5.3 Aplicaciones ambientales. 250

3.5.3.1 Cuantificación de compuestos carbonílicos volátiles en aire interior (*indoors*). 250

3.5.3.2 Cuantificación de compuestos carbonílicos y carboxílicos volátiles en gases de tubo de escape de carros operados con gasolina. 252

3.5.3.3 Cuantificación de sustancias carbonílicas y carboxílicas en aguas lluvia. 255

4. CONCLUSIONES. 256

5. BIBLIOGRAFÍA. 260

6. ANEXOS. 283

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1.	Principales contaminantes atmosféricos y sus orígenes.	14
Tabla 2.	Clasificación de los contaminantes orgánicos del aire, según la WHO.	17
Tabla 3.	Efectos importantes sobre la salud asociados con la exposición a diversos contaminantes del aire.	20
Tabla 4.	Propiedades físicas la serie C_1-C_{10} de aldehídos y cetonas.	24
Tabla 5.	Efectos humanos por la exposición al formaldehído durante períodos de tiempo cortos.	28
Tabla 6.	Concentraciones atmosféricas de carbonilos fuera de áreas urbanas y sus fuentes naturales.	32
Tabla 7.	Propiedades físicas de la serie C_1-C_8 de ácidos carboxílicos.	38
Tabla 8.	Métodos estándar para muestreo de compuestos tóxicos en aire**.**	52
Tabla 9.	Metodologías analíticas aplicadas al estudio de compuestos carbonílicos en aire.	55
Tabla 10.	Preparación de muestras y determinación por cromatografía de gases de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular.	62
Tabla 11.	Propiedades fisicoquímicas de los reactivos utilizados para la derivatización de aldehídos y ácidos carboxílicos.	133
Tabla 12.	Toxicidad de reactivos usados para la derivatización de aldehídos.	133
Tabla 13.	Tiempos de retención (t_R), de los derivados HBT-hidrazónicos obtenidos a partir de los compuestos carbonílicos (C_1-C_{10}). Columna DB-5 (30 m). FPD (250 °C). Volumen de inyección: 1 µL (500 µmoles/L, metanol).	138
Tabla 14.	Parámetros de calibración de aldehídos, analizados como sus PFPH-hidrazonas, en matrices líquidas. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	142

Tabla 15.	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas del acetaldehído, analizado en forma de su derivado PFPH-hidrazónico, determinadas en orina enriquecida. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm), Temperatura: 27 °C; Desorción: 250 °C (5 min). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	143
Tabla 16.	Parámetros de calibración de aldehídos, analizados como sus PFPH-hidrazonas, en matrices gaseosas. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	144
Tabla 17.	Áreas cromatográficas de los aldehídos (C_2-C_{10}), analizados en forma de sus derivados PFPH-hidrazónicos, determinadas en muestras gaseosas enriquecidas, contenidas en bolsas *Tedlar*® y almacenadas a temperatura ambiente (27 °C) durante diferentes periodos de tiempo. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm), Temperatura: 27 °C; GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min).	145
Tabla 18.	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas del acetaldehído, en forma de su derivado PFPH-hidrazónico, en aire enriquecido. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm), Temperatura: 27 °C. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min).	148
Tabla 19.	Características de los ésteres de PFB, derivados de los ácidos carboxílicos relevantes en la química de la atmósfera. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	150
Tabla 20.	Tiempos de retención determinados para los ésteres de PFB, derivados de los ácidos carboxílicos relevantes en la química de la atmósfera. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	152
Tabla 21.	Intensidades relativas (%) de fragmentos característicos en los espectros de masas (EI, 70 *eV*) de los ésteres PFB, derivados de los ácidos carboxílicos relevantes en la química de la atmósfera.	153
Tabla 22.	Parámetros de calibración de ácidos carboxílicos, analizados como ésteres de PFB, en aire. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	156
Tabla 23.	Parámetros de calibración de ácidos carboxílicos, analizados como ésteres de PFB, en matrices líquidas. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	156
Tabla 24.	Adsorción de hidracinobenzotiazol sobre la fibra de PA, en función del tiempo de exposición de la fibra. HS-SPME; Cantidad de HBT: 0.3 mg; Temperatura: 95 °C. GC/FPD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min).	160

Tabla 25.	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas del hexanal, analizado en forma de su derivado HBT-hidrazónico, determinadas en matrices acuosas enriquecidas. HS-SPME (PA, 80 µm); GC/FPD, Columna DB-5 (30 m).	168
Tabla 26.	Recuperación (%) del hexanal, presente en matrices acuosas enriquecidas, analizado en forma de su derivado HBT-hidrazónico,. HS-SPME (PA, 80 µm); GC/FPD, Columna DB-5 (30 m).	169
Tabla 27.	Adsorción de pentaflúorfenilhidracina (PFPH) sobre la fibra PDMS-DVB, en función del tiempo de exposición de la fibra. HS–SPME. Solución acuosa de PFPH (0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm).	175
Tabla 28.	Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de los aldehídos (C_2-C_{10}), analizados en forma de sus derivados PFPH-hidrazónicos, a partir de soluciones gaseosas (24 *pptv*) contenidas en bolsas *Tedlar*® y almacenadas a temperatura ambiente (27 °C) durante 30 min. HS-SPME-GC/ECD. Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). Columna DB-5 (30 m).	188
Tabla 29.	Relación µmolar de reactantes en la derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr. Volumen de reacción: 10 mL.	199
Tabla 30.	Determinación de ácidos carboxílicos, en forma de sus ésteres PFB, en aire sintético enriquecido. HS-SPME (PA, d_f = 80 µm).	211
Tabla 31.	Recuperación (%) de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) desde la fase gaseosa enriquecida (1.76 *ppmv*, c/u ácido), después de su reacción con PFBBr en medio acuoso y subsiguiente extracción de los derivados por HS-SPME (PA, d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).	212
Tabla 32.	Recuperación (%) de ácidos carboxílicos, C_2-C_6 y benzoico, desde la fase acuosa enriquecida, después su reacción con PFBBr y extracción por HS-SPME (PA, d_f = 80 µm). ECD; Columna DB-5 (30 m).	213
Tabla 33.	Características de los voluntarios participantes en el experimento para determinar compuestos volátiles en el aliento.	215
Tabla 34.	Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en dos días consecutivos, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	218

Tabla 35.	Etanal determinado como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido *Vodka* (50 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	220
Tabla 36.	Etanal determinado como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido *Vodka (mL)*. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	220
Tabla 37.	Aldehídos medidos como sus PFPH-hidrazonas en el sudor de pies de un voluntario (piel morena). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	238
Tabla 38.	Ácidos carboxílicos volátiles, medidos como sus ésteres de PFB, en el sudor de los pies de dos voluntarios, uno de piel morena y otro de piel blanca. HS-SPME-GC/FPD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m).	240
Tabla 39	Hexanal (medido con como su derivado C_6-HBT) formado durante el proceso de calentamiento (190 °C, 2 h) y almacenamiento (2 meses, 27 °C), después del calentamiento (190 °C), del aceite de Girasol. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	245
Tabla 40.	Aldehídos medidos como sus PFPH-hidrazonas, en aceites comestibles comerciales. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	246
Tabla 41.	Aldehídos volátiles determinados como sus PFPH-hidrazonas, en el aire interior de dos zonas de una fábrica de calzado, con diferentes operaciones de manufactura. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	252
Tabla 42	Aldehídos volátiles determinados como sus PFPH-hidrazonas, en el aire de tubos de escape de automóviles operados con gasolina. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).	253
Tabla 43.	Ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, determinados como sus ésteres de PFB, en el aire de tubos de escape de automóviles operados con gasolina. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m).	253

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1.	Orbitales moleculares π y π* del grupo carbonilo.	22
Figura 2.	Estructura general de los aldehídos y las cetonas.	23
Figura 3.	Estructura química de los ácidos carboxílicos.	36
Figura 4.	Mecanismo general del proceso de adición nucleofílica-eliminación.	37
Figura 5.	Estructura de resonancia del ion carboxilato.	39
Figura 6.	Camino metabólico para los ácidos carboxílicos.	41
Figura 7.	Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME).	68
Figura 8.	Modos de extracción de la SPME.	68
Figura 9.	Preparación de estándares gaseosos.	89
Figura 10.	Equipo SPME modificado para análisis de aliento humano.	94
Figura 11.	Muestreo de aliento humano.	94
Figura 12.	Bolsas *Tedlar*® para muestreo del aliento humano.	95
Figura 13.	Toma de muestra de aire de exhalación.	96
Figura 14.	Equipo para muestreo de aire M18 *VacBag Sampler System*, modelo SK-M180 (*Environmental Sampling Supply*, ESS, Oakland, California, EE.UU.).	97
Figura 15.	Muestreo de aire al interior de una fábrica de calzado (Bucaramanga, Santander).	98
Figura 16.	Extracción-derivatización de compuestos carbonílicos presentes en aire. **A**. Saturación de la fibra con el agente derivatizante (PFPH). **B**. Exposición de la fibra saturada a la matriz gaseosa, que contiene sustancias carbonílicas volátiles.	99
Figura 17.	Dispositivo empleado para absorber los ácidos carboxílicos presentes en la matriz gaseosa, en solución acuosa de carbonato de potasio.	100
Figura 18.	Muestreo de gases del tubo de escape de un automóvil, operado con gasolina.	101
Figura 19.	Muestreo *in vitro* de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* (“Borrachero”).	103

Figura 20.	Muestreo *in vivo* de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* (“Borrachero”).	103
Figura 21.	Muestreo de sudor de pies, usando una plantilla de algodón recubierta con gasa aséptica.	105
Figura 22.	Dispositivo para SPME de *headspace* estático. El frasco inferior se puede aislar del frasco superior, y sólo la fase vapor en el frasco superior se somete al muestreo SPME.	113
Figura 23.	Estructura química de los reactivos utilizados para la derivatización de aldehídos y ácidos carboxílicos: **A**. Hidracinobenzotiazol (HBT); **B**. Pentaflúorfenilhidracina (PFPH); **C**. Bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr).	132
Figura 24.	Reacción de derivatización de compuestos carbonílicos con HBT.	136
Figura 25.	Perfil cromatográfico de las HBT-hidrazonas de: 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal; 4- Butanal; 5- Isopentanal; 6- Pentanal; 7- Hexanal; 8- Heptanal; 9- Octanal; 10- Nonanal. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). HBT-hidrazonas en MeOH (500 µmoles/L); Inyección: 1 µL (*Split* 10:1).	137
Figura 26.	Perfil cromatográfico del 2-hidracinobenzotiazol (HBT). GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). HBT en MeOH (1.0 mmol/L); Inyección: 1 µL (*Split* 10:1).	139
Figura 27.	Reacción de derivatización de compuestos carbonílicos con PFPH.	140
Figura 28.	Perfil cromatográfico típico de las PFPH-hidrazonas de: 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). PFPH-hidrazonas en MEOH (60 µmoles/L); Inyección: 1 µL (*Split* 30:1).	141
Figura 29.	Efecto del tiempo de almacenamiento de la muestra gaseosa, contenida en bolsas *Tedlar*® a temperatura ambiente (27 °C), sobre los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}), determinados en forma de sus PFPH-hidrazonas. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Desorción: 250 °C (5 min).	146
Figura 30.	Reacción de derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos.	149

Figura 31. Perfil cromatográfico típico de los ésteres de PFB derivados de: 1- Ácido acético; 2- Ácido propanoico; 3- Ácido butanoico; 4- Ácido pentanoico; 5- Ácido hexanoico; 6- Ácido benzoico. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Ésteres de PFB en MeOH (400 µmoles/L); Inyección: 1 µL (*Split* 1:30). 151

Figura 32. Espectro de masas obtenido por impacto de electrones (70 *eV*) del derivado PFB del ácido butanoico. Columna HP-5MS (50 m). Temperatura de la cámara de ionización (180 °C). 154

Figura 33. Cantidad de hidracinobenzotiazol adsorbido sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME. HS-SPME; Temperatura: 95 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 10 min. GC/FPD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 158

Figura 34. Cantidad de hidracinobenzotiazol adsorbido sobre el recubrimiento de poli(acrilato) de la fibra SPME, en función de la temperatura de calentamiento de la muestra. HS-SPME; Tiempo de exposición de la fibra: 10, 60 y 120 min. GC/FPD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 159

Figura 35. Perfiles cromatográficos típicos de las HBT-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal; 8-Decanal . Aldehídos en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L). HS-SPME (PA, 80 µm). Tiempo de exposición de la fibra: 2 min. Tiempo de pre-equilibrio de la muestra: 0.5, 5 y 15 min. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 162

Figura 36. Perfiles cromatográficos típicos de las HBT-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal; 8-Decanal . Aldehídos en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L). HS-SPME (PA, 80 µm). Tiempo de exposición de la fibra: 2 min. Tiempo de pre-equilibrio de la muestra: 0.5, 5 y 15 min. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 163

Figura 37. Perfiles cromatográficos típicos de las HBT-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal; 8-Decanal . Aldehídos en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L). HS-SPME (PA, 80 µm). Tiempo de pre-equilibrio de la muestra: 0.5, 5 y 15 min. Tiempo de exposición de la fibra: 1 min. Temperatura: 27 y 65 °C. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 164

Figura 38. C_6-Hidrazona en la reacción de derivatización del hexanal con el HBT, en función del tiempo de exposición de la fibra (PA, 80 µm). HS-SPME Temperatura: 27 °C. GC/FPD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 166

Figura 39. Curva de calibración para la HBT-hidrazona del hexanaldehído, obtenida medainte HS-SPME-GC/FPD, con derivatización directa sobre la fibra. Fibra: PA (80 µm); GC/FPD, Columna DB-5 (30 m). 167

Figura 40. Cantidad de PFPH, adsorbida sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME, en función del tiempo de su exposición. HS-SPME; Temperatura: 27 °C. GC/ECD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 171

Figura 41. Perfiles cromatográficos de la PFPH obtenidos durante: **A**. La primera y **B**. la segunda desorciones de la fibra. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Exposición de la fibra, al *headspace* de la solución, por 60 min; Temperatura: 27 °C. GC/ECD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 172

Figura 42. Perfil de saturación de la fibra PDMS/DVB con PFPH, usando SPME en modo *headspace*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Solución acuosa de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm). 173

Figura 43. Cantidad de la PFPH adsorbida sobre la fibra PDMS/DVB *Vs* el tiempo de la exposición de la fibra y la concentración de la PFPH en solución (2 mL). HS–SPME (27 °C, 800 rpm). 176

Figura 44. Perfil cromatográfico típicos de las PFPH-hidrazonas de: 1- Etanal, 2- Propanal, 3- Butanal, 4- Pentanal, 5- Hexanal, 6- Octanal, 7- Nonanal y 8- Decanal. Solución acuosa aldehídos (2 mL, 0.2 µmoles/L, c/u). HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 40 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción 250 °C (5 min). 178

Figura 45. Cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm), saturada previamente con PFPH (2 mL, 1.6 mmoles/L), en función del tiempo de exposición de la fibra. Solución acuosa aldehídos (2 mL, 0.2 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C. GC/ECD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 179

Figura 46. Efecto del exceso de agente derivatizante sobre la cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). HS–SPME; Solución acuosa aldehídos (2 mL, 0.2 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 40 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 180

Figura 47. Efecto del tiempo de "pre-equilibrio" de la muestra (2, 5, 10 y 20 min) sobre la cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). HS–SPME; Solución de aldehídos patrón en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 5 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 183

Figura 48. Cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm), en función del tiempo de exposición de la fibra saturada previamente con PFPH (2 mL, 2.4 mmoles/L, 3 min). HS–SPME; Solución de aldehídos patrón en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L c/u); Temperatura: 27°C; Tiempo de pre-equilibrio: 5 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 184

Figura 49. Efecto del tiempo de "pre-equilibrio" sobre la cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). Sistema *HS-estático* (**Figura 22**); Solución estándar de aldehídos (100 mL, 4 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 30 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 185

Figura 50. Cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm), en función del tiempo de la exposición de la fibra. Sistema *HS-estático* (**Figura 22**); Solución estándar de aldehídos (100 mL, 4 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de pre-equilibrio: 60 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (5 min). 187

Figura 51. Efecto del pH sobre la eficiencia de la derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos C_4-C_6 y benzoico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m). 193

Figura 52. Efecto del tiempo de reacción de ácidos carboxílicos, C_4-C_6 y benzoico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa) sobre el rendimiento de derivados. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m). 195

Figura 53. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos C_4-C_6 y benzóico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m). 197

Figura 54. Efecto de la cantidad del agente derivatizante sobre la eficiencia de la derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos C_4-C_6 y benzóico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m). 200

Figura 55. Efecto del pH sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 27 °C; 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 204

Figura 56. Efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 27 °C; 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 206

Figura 57. Efecto de la adición de la sal, NaCl, sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 27 °C; 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 208

Figura 58. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD, Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min). 210

Figura 59. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, en función del tiempo transcurrido después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 216

Figura 60. Etanal (*), medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 217

Figura 61. Etanal (*), medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido *Vodka* (50 mL). HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 219

Figura 62. Etanal (*), medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido cerveza (350 mL). HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 222

Figura 63. Cantidad de metanal y etanal, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aliento de voluntarios sin (1, 2 y 3) y con (4) *brackets* en su dentadura. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 223

Figura 64. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar de aldehídos, C_2-C_{10}, en metanol (60 µmoles/L); **B**. Humo de un cigarrillo. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. 225

Figura 65. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aliento de una persona no fumadora, antes (blanco) y después (5 y 30 min) de fumar un cigarrillo. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal. 226

Figura 66. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aliento de personas: **A**. No fumadora, 5 min después de fumar un cigarrillo; **B**. Fumador empedernido, 4 h después de fumar. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal. 227

Figura 67. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido vino rojo (150 mL) en ayunas. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 230

Figura 68. Etanal, medido en forma de su PFPH-hidrazona, en el aliento, orina y saliva de un voluntario sano, después de haber ingerido *Vodka* (100 mL) HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 233

Figura 69. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en la orina de un voluntario sano, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 234

Figura 70. Análisis comparativo del etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento y la orina de un voluntario sano, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 235

Figura 71. Perfiles cormatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar acuoso de aldehídos (10 µmoles/L) y, en el sudor de pies de: **B**. Un voluntario de piel morena; **C**. Un voluntario de piel blanca. HS-SPME Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. 237

Figura 72. Perfil cromatográfico de ácidos carboxílicos volátiles a saber: 1-Acético, 2- Propanoico, 3- Butanoico, 4- Pentanoico, 5-Hexanoico, 6- Benzoico, medidos como sus ésteres de PFB, en el sudor de pies del voluntario de piel morena. HS-SPME; Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; columna DB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm). 239

Figura 73. Acetaldehído, medido como su PFPH-hidrazona, en diferentes bebidas alcohólicas. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). 242

Figura 74. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: Aceite de *Girasol* calentado (190 °C, por 2 h): A. Analizado después del calentamiento; **B**. Analizado 2 meses después de haber sufrido el calentamiento y **C**. Aceite de *Girasol* sin calentar. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Heptanal; 8- Octanal; 9- Nonanal. 244

Figura 75. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar de aldehídos, C_2-C_{10}, en metanol (60 µmoles/L); **B**. Aceite de *Girasol Gourmet*; **C**. Aceite de *Girasol Premier* y, **D**. Aceite *Oleocalí*, *Cero Colesterol*. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. 247

Figura 76. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar de aldehídos, C_2-C_{10}, en metanol (60 µmoles/L); **B**. Fragancia de flores de *B. suaveolens*. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal, 2- Etanal; 3- Propanal; 4- Butanal; 5- Ventanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal; 10- Benzaldehído; 11- Citronelal; 12- Geranial. 249

Figura 77. Perfil cromatográfico de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aire interior de una fábrica de calzado. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. 251

Figura 78. Perfil cromatográfico de ácidos carboxílicos volátiles a saber: 1-Ácetico; 2- Propanoico; 3- Butanoico; 4- Pentanoico; 5- Hexanoico; 6- Benzoico, medidos como sus ésteres de PFB, en el aire del tubo de escape de un carro sin convertidor catalítico. HS-SPME; Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 254

LISTA DE ANEXOS

		Página
Anexo 1.	Lista de compuestos orgánicos volátiles (ECA, 1997).	283
Anexo 2.	Toxicidad de aldehídos.	286
Anexo 3.	Toxicidad de ácidos carboxílicos.	289
Anexo 4.	Técnicas generales de monitoreo de aire.	292
Anexo 5.	Caracterización de algunos adsorbentes sólidos usados para el análisis de contaminantes atmosféricos.	295
Anexo 6.	Caracterización de varios polímeros orgánicos porosos.	297
Anexo 7.	Tablas de calibración para la determinación de aldehídos. Estándares líquidos. GC/ECD. Columna DB-5 (30 m).	299
Anexo 8.	Tablas de calibración para la determinación de aldehídos. Estándares gaseosos. GC/ECD. Columna DB-5 (30 m).	309
Anexo 9.	Tablas de calibración para la determinación de pentaflúorfenilhidracina (PFPH). Estándar líquido. GC/ECD. Columna DB-5 (30 m).	313
Anexo 10.	Tabla de calibración para la determinación de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico). Estándares líquidos. GC/ECD. Columna DB-5 (30 m).	315
Anexo 11-1	Efecto del pH sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr.	318
Anexo 11-2	Efecto del tiempo sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr.	323
Anexo 11-3	Efecto de la temperatura sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr.	329

Anexo 11-4 Efecto de la concentración de agente derivatizante sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr. 333

Anexo 12. Efecto de diferentes parámetros (pH, tiempo, temperatura, cantidad de agente derivatizante) sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr. 339

Anexo 13-1 Efecto del pH sobre la eficiencia de extracción de ésteres de pentaflúorbencilo PFB. 350

Anexo 13-2 Efecto del tiempo sobre la eficiencia de extracción de ésteres de pentaflúorbencilo PFB. 354

Anexo 13-3 Efecto salino sobre la eficiencia de extracción de ésteres de pentaflúorbencilo PFB. 360

Anexo 13-4 Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de extracción de ésteres de pentaflúorbencilo PFB. 365

Anexo 14. Efecto de diferentes parámetros (pH, tiempo, *salting-out* y temperatura), sobre la HS-SPME de ésteres de PFB. 369

LISTA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

BTEX´s:	*Bencene, Toluene, Etilbencene and Xylenes* (Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xilenos).
CIBIMOL:	Centro de Investigación en Biomoléculas (UIS).
CI:	*Chemical Ionization* (Ionización química).
CV:	Coeficiente de variación.
d.i:	Diámetro interno.
d.e:	Diámetro externo.
d_f:	Espesor de la fase estacionaria o del recubrimiento de la fibra.
ECD:	*Electron Capture Detector* (Detector de captura de electrones).
EI:	*Electrón Impact* (Impacto de electrones).
fmoles:	Fentomoles*.*
FID:	*Flame Ionization Detector* (Detector de ionización en llama).
FPD:	*Flame Photometric Detector* (Detector fotométrico de llama).
GC:	*Gas Chromatography* (Cromatografía de gases; Cromatógrafo de gases, según el contexto).
GC-MS:	*Gas Chromatography and Mass Spectrometry* (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas o cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas, según el contexto).
GC-ITMS:	*Gas Chromatography with Ion Trap Mass Spectrometry* (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con trampa iónica).
GC-CIMS:	*Gas Chromatography with Chemical Ionization-Mass*

Spectrometry (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización química).

GC-CIMS/IT: *Gas Chromatography with Chemical Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry* (Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de trampa iónica con ionización química).

HBT: *2-Hydrazinobenzothiazole* (2-Hidracinobenzotiazol).

HPLC: *High Performance Liquid Chromatography* (Cromatografía líquida de alta eficiencia).

HS-SPME: *Headspace Solid-Phase Microextraction* (Microextracción en fase sólida en modo *headspace*).

LD_{50}

LDLo

LOD: *Limit of detection* (Límite de detección).

LOQ: *limit of quantitation* (Límite de cuantificación).

LLE: *Liquid-Liquid Extraction* (Extracción líquida-líquida).

MTBE: *Methyl-tert-butyl-ether* (Éter metil *terc*-butílico).

MP: Material partículado.

MS: *Mas Spectrometry; Mass spectrum(a)* (Espectrometría de masas; Espectro(s) de masas, según el contexto).

MSD: *Mass Selective Detector* (Detector selectivo de masas).

m/z: Relación masa/carga.

NOx: *Nitrogen Oxides* (Óxidos de nitrógeno).

NIOSH: *National Institute for Occupational Safety and Health* (Instituto Nacional para la Salud y la Seguridad Ocupacional).

PAH´s: *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons* (Hidrocarburos poliaromáticos).

PAN(s): *Peroxyacetyl Nitrate* (Nitrato de peroxiacetilo).

PCB´s: *Polychlorinated Biphenyls* (Bifenilos policlorados).

PDMS: *Poly(dimethylsiloxane)* [Poli(dimetilsiloxano].

PFBBr: *Pentafluorobenzyl bromide* (Bromuro de pentaflúorbencilo).

PFPH: 2,3,4,5,6-*Pentafluorophenylhydrazine* (Pentaflúorfenilhidracina).

ppb: Partes por billón.

Ppbv: Partes por billón por volumen.

Ppt: Partes por trillón.

Pptv: Partes por trillón por volumen.

s: *Desviación estándar.*

SPE: *Solid-Phase Extraction* (Extracción en fase sólida).

SPME: *Solid-Phase Microextraction* (Microextracción en fase sólida).

SVOC´s: *Semivolatile Organic Compounds* (Compuestos orgánicos semivolátiles).

TCPH: *Trichlorophenylhidrazine* (Triclorofenilhidracina).

TOPO: *tri-n-Octylphosphine Oxide* (Óxido de *tri-n*-octilfosfina).

U.S.: United State (Estados Unidos).

U.S. EPA: *United State Environmental Protection Agency* (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos).

VOC´s: *Volatile Organic Compounds* (Compuestos orgánicos volátiles).

WHO: *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud).

INTRODUCCIÓN

Dentro de la gran gama de compuestos orgánicos volátiles (VOC´s) que contaminan el aire, figuran las sustancias carbonílicas (aldehídos y cetonas) y carboxílicas (ácidos carboxílicos), las que aún en concentraciones muy bajas, a nivel de trazas, representan un peligro para los seres vivos y el ecosistema en general.

Los compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas) y carboxílicos, pueden ser dispersados al aire desde fuentes primarias antropogénicas y biogénicas, o ser originados en la atmósfera como consecuencia de las diferentes reacciones fotoquímicas, que sufren los contaminantes hidrocarbonados (McClenny W. *et. al.*, 2001). Los hidrocarburos volátiles, por ejemplo, reaccionan rápidamente con el O_3, el ión nitrato (NO_3^-) y/o el radical hidroxilo ($OH^\bullet$), produciendo compuestos carbonílicos; tal es el caso de los terpenos isopreno, β-pineno, limoneno y sabineno, los cuales por ozonólisis directa generan formaldehído. Los compuestos ocimeno, mirceno y linalool, por su parte, reaccionan con O_3, produciendo acetona (Larsen B**.** *et. al.*, 1998; McClenny W. *et. al.*, 2001).

Varios compuestos carbonílicos, entre los cuales se encuentran el formaldehído, el acetaldehído, la acroleína y la acetofenona, pueden llegar a causar efectos serios e irreversibles en la salud de los humanos, debido a su potencial tóxico, cancerígeno, mutagénico y teratogénico, por lo que su análisis y control han empezado a recibir atención regulatoria (Ho S. H. y Yu J., 2002). Los aldehídos más abundantes en el aire, formaldehído y acetaldehído, se encuentran incluídos en la lista de contaminantes atmosféricos peligrosos regulados por U.S. EPA, en la

Sección 112 de la Ley de Aire Limpio de 1990 (Levart A. y Veber M., 2001). Aunque el tiempo de vida media de estos contaminantes es del orden de horas (Tanner R. *et. al.*, 1998), sus emisiones y formaciones continuas, generan concentraciones constantes en el ambiente, lo que constituye un problema ambiental grave. Las sustancias carbonílicas, a su vez, son fuentes de radicales y aerosoles orgánicos, y contribuyen en gran proporción, a la generación de ácidos orgánicos y oxidantes fotoquímicos fuertes, tales como el nitrato de peroxiacetilo (PAN) y el O_3, este último es el componente principal del *smog* fotoquímico.

A nivel troposférico el O_3 es un agente corrosivo muy nocivo, que afecta los sistemas cardiovascular y respiratorio de los seres humanos. Esta molécula también se asocia con el deterioro de los productos hechos de goma y con los daños producidos en la vegetación. Los estándares ambientales establecidos por organismos internacionales como la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, U.S. EPA, y la Organización Mundial de la Salud, OMS, establecen un límite máximo por hora de exposición, de 235 g/m^3 y 150 -200 g/m^3, respectivamente (Kiely G., 1996). En Colombia, el valor máximo para oxidantes fotoquímicos (O_3) fue fijado en 170 g/m^3 por hora de exposición (República de Colombia, 2001). En muchas zonas urbanas de los Estados Unidos, donde las concentraciones medidas para O_3, exceden los valores permitidos, se exige el control de los compuestos carbonílicos con menos de 5 átomos de carbono (Grosjean E. y Grosjean D., 1996).

Los ácidos carboxílicos de origen antropogénico y biogénico o los producidos fotoquímicamente por oxidación de hidrocarburos insaturados y carbonilos, son componentes comunes en las fases acuosas y gaseosas troposféricas. Estos contaminantes orgánicos han ganado importancia, por su contribución a la formación de aerosoles y a la acidez de las precipitaciones (Chien C-J. *et. al.*, 1998). En la atmósfera urbana su presencia está asociada con las emisiones vehiculares, entre otras fuentes antropogénicas, mientras que en el ambiente rural,

su aparición está relacionada con los incendios forestales y las trasformaciones fotoquímicas de hidrocarburos biogénicos (Grosjean D., 1989; Dabek-Zlotorzynska E. *et. al.*, 2001). Las principales fuentes de ácidos en el ambiente son las reacciones de oxidación de aldehídos en fase acuosa con el radical $OH^{\bullet}$ y la reacción de alquenos con O_3 (Chien C-J. *et. al.*, 1998). Concentraciones altas de ácidos carboxílicos en el aire, pueden producir irritación de ojos y mucosas y causar graves daños en el sistema respiratorio de los seres humanos. Su contribución a la acidez de lluvias, nubes y nieve, puede ocasionar daños indirectos en la fauna, flora y cultivos agrícolas, así como en construcciones (edificios, casas, puentes) y monumentos al aire libre (Dabek-Zlotorzynska E. *et. al*., 2001).

En los últimos años, la legislación de Colombia para la protección del medio ambiente, ha establecido una serie de reglamentaciones en relación con la prevención y el control de la contaminación atmosférica y la protección de la calidad del aire, que incluyen el análisis rutinario de emisiones contaminantes, desde fuentes fijas y móviles (República de Colombia, 2001).

El progreso alcanzado por la legislación colombiana necesita ser apoyado en los métodos analíticos prácticos, confiables y sensibles, para determinar los contaminantes atmosféricos y, de esta manera, establecer las respectivas regulaciones. Debido a la importancia ambiental de los compuestos carbonílicos y carboxílicos y a su significativo papel en la fotoquímica atmosférica, se requieren métodos de análisis sensibles y selectivos, que permitan determinar de manera eficiente y directa, el tipo y las concentraciones de contaminantes, lo que puede relacionarse con su tiempo de vida media y las fuentes de contaminación, así como con las diferentes reacciones químicas que éstos pueden sufrir a nivel troposférico. Sin embargo, el muestreo, así como la detección y la cuantificación de este tipo de moléculas en aire, son tareas analíticas difíciles.

Durante el muestreo de los compuestos orgánicos con funcionalidades carbonílicas y carboxílicas, pueden presentarse pérdidas debido a fugas o adsorción de los analitos sobre los medios de colección tradicionales, *e.g*., bombonas de vidrio o de acero inoxidable y sorbentes sólidos (U.S. EPA, 1999). Aunque los adsorbentes sólidos, bien sea en polvo o espuma, poseen características muy buenas para la recolección de los contaminantes atmosféricos no volátiles, su aplicación a los compuestos polares está muy limitada, puesto que éstos son retenidos fuertemente sobre sus superficies, lo que dificulta su posterior desorción térmica rápida y completa (Baltussen *et. al.*, 1998). Asimismo, los tiempos de residencia largos sobre la superficie activa y caliente del adsorbente, durante la desorción, pueden generar reacciones de los analitos con la superficie misma o con otras especies adsorbidas, produciendo adhesión permanente y/o formación de productos colaterales (Baltussen *et. al.*, 1998). Otro inconveniente cuando se trabaja con adsorbentes es la generación de los analitos de interés, tal es el caso del adsorbente polimérico Tenax®, el cual se degrada fácilmente formando benzaldehído y acetofenona (Baltussen *et. al.*, 1998).

Por otra parte, el análisis directo de los compuestos carbonílicos y carboxílicos en aire, presenta cierta dificultad. Sus presiones de vapor y volatilidad altas, unidas a su naturaleza química fuertemente polar, inducen posibles pérdidas en las superficies de los inyectores y las columnas cromatográficas (Ho S. H. y Yu J., 2002). Adicionalmente, muchos de estos compuestos se presentan en concentraciones muy bajas (en el orden de los $\mu g/m^3$ y ng/m^3), por lo que generalmente se requiere un paso de concentración, previo a su identificación y cuantificación. Ésto, además de prolongar el tiempo de análisis, puede ocasionar la contaminación cruzada de la muestra y, por ende, errores en la cuantificación de estas sustancias.

Por ello, para analizar los compuestos carbonílicos y carboxílicos, se ha recurrido a su derivatización química con reactivos específicos, la cual permite obtener

productos menos polares, relativamente volátiles y térmicamente estables, lo que mejora sus características cromatográficas de separación y detección. Para el análisis de grupos funcionales, la derivatización confiere muy buena selectividad, dado que únicamente permite la cuantificación de aquellos compuestos que reaccionan con el agente derivante específico (Stashenko E. *et. al.*, 1997; Rosenfeld J. M., 1999).

Aunque la derivatización química es muy favorable para el análisis de compuestos polares, incluye un paso adicional en la preparación de la muestra y además, durante la reacción se pueden generar productos colaterales que dificultan el análisis (Rosenfeld J. M., 1999). Una solución a los problemas de tiempo prolongado de análisis y posible contaminación cruzada de la muestra durante la derivatización analítica, consiste en llevar a cabo el proceso simultáneo de extracción y derivatización sobre fase sólida. En este caso, la derivatización ocurre *in situ*, junto con el aislamiento de los analitos presentes en la matriz (muestreo-derivatización simultáneo) o puede llevarse a cabo después de la sorción de los mismos sobre el medio sólido. Los reactivos analíticos, derivados y productos colaterales, retenidos sobre la fase sólida durante la sorción y derivatización, pueden ser eluídos con solvente o por medio de calor, y luego ser separados por cromatografía de gases (GC). (Rosenfeld J. M., 1999).

Ante esta problemática, surgió la presente investigación, cuyo objetivo principal fue la implementación de metodologías sencillas, sensibles y eficientes para el estudio de los compuestos carbonílicos (C_2-C_{10}) y carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) de bajo peso molecular, en las que se combinan la microextracción en fase sólida (SPME) y la derivatización química.

La investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Cromatografía, adscrito al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, de la Universidad Industrial de Santander, UIS, dentro del Proyecto macro "*Desarrollo de metodologías para la*

determinación confiable de compuestos polares en aire", financiado por Colciencias (Contrato 348-2002, Código 1102-05-12401). Para la ejecución de la parte experimental, se usaron equipos novedosos de Laboratorio (*e.g.*, sistema de microextracción en fase sólida, SPME; equipo de evaporación programada, dotado con sistemas de control de temperatura y presión automáticos; diferentes sistemas de muestreo) e instrumentación química (*e.g.*, GC-MS, GC/ECD, GC/FPD), que permitieron realizar el trabajo con precisión y exactitud analíticas requeridas. También se contó con la experiencia adquirida por el grupo de Cromatografía, en el desarrollo de técnicas de SPME con derivatización sobre la fibra, para el muestreo de los compuestos carbonílicos presentes en muestras líquidas (Stashenko E. *et. al*., 2000), extendiendo el *know-how* a muestras de aire.

Los procedimientos más comunes para analizar ácidos carboxílicos en muestras de aire ambiental y emisiones de vehículos, incluyen filtros alcalinos de hidróxido de potasio, KOH, o hidróxido de calcio, $Ca(OH)_2$, (Kawamura K. and Kaplan I. R., 1985; McClenny W. A. *et al.*, 2001) y cartuchos impregnados con KOH (Dabek-Zlotorzynska E. y McGrath M., 2000). Cada uno de estos métodos generalmente emplea un filtro de Teflón™ o Nucleopore™, para remover partículas antes de atrapar los vapores orgánicos. Las técnicas analíticas usadas para medir ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en muestras aire y de exhosto de vehículo, incluyen: cromatografía iónica (IC) (Barcelona M. J. *et al.*, 1980), HPLC, electroforesis capilar (CE) (Dabek-Zlotorzynska E. y McGrath M., 2000) y GC (Chien Ch.-J. *et al.*, 1998). La aplicación directa de la IC, CE y HPLC suele ser relativamente sencilla y económica, sin embargo, posee baja eficiencia en la separación y poca selectividad e involucra tiempos de análisis largos (Dabek-Zlotorzynska E. y McGrath M., 2000). Por otra parte, la fracción ácida de las moléculas reacciona fácilmente con la matriz de las columnas cromatográficas, aumentando así la retención de los analitos y bajando sustancialmente la resolución cromatográfica. Para lograr un análisis seguro de ácidos orgánicos mediante GC (Chien Ch.-J. *et. al.*, 1998; Docherty K. y Ziemann P. J., 2001) y

HPLC (You J. *et. al*., 2001), es necesario llevar a cabo su derivatización, previo al análisis por cromatografía (You J. *et al.*, 2001). Para la conversión de los ácidos a sus ésteres, se han utilizado diferentes reactivos, entre los cuales se incluyen: BF_3/butanol (Kawamura K., 1993), BF_3/metanol (Cecinato A. *et al.*, 2001), diazometano (Rogge W. F. *et al*., 1993), bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) (Chien C-J. *et al.*, 1998) y dibromoacetofenona (Nolte C. G. *et al*., 1999).

En el presente trabajo, se implementó un método cromatográfico para el análisis de ácidos carboxílicos, el cual se basó en la reacción de alquilación de los ácidos con PFBBr en medio acuoso y en la separación e identificación de los ésteres formados, mediante la combinación de la microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) y la cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC/ECD). Cuando se tratan muestras gaseosas, los ácidos orgánicos presentes se atrapan directamente en una solución acuosa de carbonato de potasio, K_2CO_3 (30 mL, 0.36 mmoles/L), en un *impinger*. Las muestras de aire, también pueden ser recolectadas en bolsas de *Tedlar®,* que son transportadas hasta el laboratorio, donde el aire se hace pasar a través de dos trampas de carbonato (*impingers*) y, luego, se procede con la derivatización de los ácidos con PFBBr y el análisis de los ésteres de pentaflúorbecilo (PFB), mediante HS/SPME-GC/ECD. En este estudio, la efectividad de la trampa, combinada con la extracción, fue cercana al 80% para los ácidos acético y hexanóico, y superior al 99% para los ácidos de 3, 4 y 5 átomos de carbono. Sin embargo, para el ácido benzóico sólo alcanzó el (6%). Las curvas de calibración y los factores de respuesta para cada analito, se calcularon con base en los cromatogramas obtenidos mediante HS-SPME-GC/ECD, para los ésteres derivados en soluciones de ácidos de diferentes concentraciones. Los niveles mínimos de detección y de cuantificación, LODs, (S/N=5) y LOQs (S/N=5), para los ácidos en fase gaseosa, alcanzaron los ordenes de los $\mu g/m^3$ y, en matrices líquidas, el orden de los nmoles/L. El método implementado, tiene la ventaja de permitir el análisis

selectivo de los ácidos de bajo peso molecular (C_2-C_6), presentes en concentraciones traza en matrices gaseosas y líquidas.

Para el análisis de compuestos carbonílicos en aire se han reportado varias metodologías, las cuales se basan en la derivatización de los analítos con dansilhidracina (DNSH) (Nondek L. *et. al*., 1992), 2,4,6-triclorofenilhidracina (TCPH) (Lehmpuhl D. W. y Birks J. W., 1996), pentaflúorfenilhidracina (PFPH), (Cecinado A. *et. al*., 2001; Stashenko E. E. *et. al.*, 2000) y pentaflúorbencilhidroxilamina (PFBHA) (Ho S. H. y Yu J. Z, 2002). Los derivados formados sufren desorción líquida o desorción térmica y son analizados selectivamente mediante diferentes técnicas cromatográficas (*e.g.,* HPLC, cromatografía de gases con detector selectivo de masas, GC-MS, y/o GC/ECD). Pero, el método más utilizado para la determinación de aldehídos y cetonas en aire, combina la reacción de derivatización con 2,4-DNPH y el análisis de los respectivos derivados, mediante la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta (HPLC-UV) (U.S. EPA, 1999; Levart A. y Veber M., 2001; Sandner F. *et al.*, 2001). Las metodologías varían en los niveles de sensibilidad, así como en el número y la clase de analitos que pueden ser detectados.

En el presente trabajo, se implementó una metodología sensible y eficiente para la determinación de los compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, en la cual se combina la HS-SPME con derivatización química de los analitos con PFPH y la GC/ECD. En este procedimiento la reacción de derivatización se llevó a cabo directamente sobre la fibra (fase sólida) de SPME, por lo que los analitos se aislaron y se concentraron, simultáneamente. El reactivo derivatizante se depositó, previamente, sobre la fibra de SPME que se expuso a la fase vapor sobre una matriz líquida o gaseosa, recolectada en bolsas *Tedlar*®. Las hidrazonas formadas se analizaron selectivamente mediante GC/ECD, alcanzándose límites de detección (LODs) para estos analitos, del orden de los pmoles/L y pg/m^3, para las fases líquida y gaseosa, respectivamente.

La utilización de bolsas *Tedlar*® en combinación con la SPME, es una técnica de monitoreo muy práctica y efectiva para el estudio de *VOC´s*. La naturaleza química de las bolsas, permite recolectar los analitos con pérdidas mínimas durante su almacenamiento. Combinando este sistema de muestreo con la derivatización de los compuestos carbonílicos sobre la fibra de SPME, por reacción con PFPH, y el análisis de las hidrazonas mediante GC/ECD, se alcanzan límites de cuantificación (LOQs) de los compuestos carbonílicos de bajo peso molecular (C_2-C_{10}) del orden de los pg/m^3. Esta metodología, relativamente sencilla, puede aplicarse fácilmente para el monitoreo ambiental de diferentes zonas contaminadas con sustancias carbonílicas.

Las técnicas analíticas, basadas en la combinación de la SPME combinada con la derivatización química, implementadas en el presente trabajo, fueron validadas para analizar compuestos carbonílicos y carboxílicos en diferentes muestras líquidas y/o gaseosas biológicas (aliento, orina y saliva), en muestras ambientales (aire interior y emisiones vehiculares), para el análisis biogénico (metabolitos de plantas, fragancia de flores) y de alimentos (vinos y aceites vegetales). Los resultados muestran, que la HS-SPME con derivatización *in situ* y análisis de los derivados por GC/ECD, es una excelente alternativa para el análisis de sustancias carbonílicas y carboxílicas volátiles, presentes en residuos de producción o metabolitos, en diferentes matrices y/o en productos de consumo humano. Las metodologías permiten la detección de los analitos en cantidades traza, con tiempos (< 1 h) y costos de análisis reducidos. Por otra parte, la manipulación de la muestra y el uso de disolventes son mínimos, de esta manera, se previenen problemas de volatilización de los analitos y de contaminación cruzada.

Los métodos implementados, permiten el muestreo y el análisis de sustancias polares (carbonílicas y carboxílicas) en aire, con especificidad y precisión altas y, sirven de base para tomar medidas preventivas y correctivas, que permitan controlar el impacto medioambiental de varias actividades humanas y establecer

criterios para la conservación de la calidad del aire, en lugares de trabajo y zonas urbanas.

Otra aplicación de los métodos implementados para el análisis de compuestos carbonílicos y carboxílicos en aire, es en el campo investigativo, donde en combinación con otras técnicas (GC-MS, RMN, etc.), éstos pueden ser utilizados para la elucidación de los mecanismos de reacciones asociadas con los VOC´s en la atmósfera, la formación de aerosoles orgánicos secundarios, la generación de oxidantes fotoquímicos y los efectos de los contaminantes sobre la salud. Las metodologías analíticas validadas en este proyecto, también pueden ser implementadas en laboratorios analíticos, organizaciones de protección ambiental y secciones de salud ocupacional, así como en muchas otras industrias.

Los resultados parciales de esta investigación han sido compartidos con otros investigadores adscritos al Centro de Investigación en Biomoléculas, CIBIMOL, y publicados en las memorias de diferentes congresos nacionales e internacionales, así como a través de un artículo en una revista indexada internacional, a saber:

1. Stashenko, E.; Martínez, J.; **Mora, A.**; Cervantes, M. "HS-SPME Determination of Volatile Carbonyl and Carboxylic Compounds in Different Matrices". *Journal of Chromatographic Science*, **2006**, aceptado para publicación.

2. E. E. Stashenko, **A. L. Mora**, M. Cervantes, and J. R. Martínez. "Human breath and human scent characterisation based on the HS-SPME-GC/ECD determination of aldehydes and carboxylic acids". En: Abstracts International Congress on Analytical Sciences, Moscú, Rusia, mayo 25-30, **2006**.

3. E. E. Stashenko, M. Cervantes, **A. L. Mora**, and J. R. Martínez. "HS-SPME-GC/ECD Determination of Aldehydes and Carboxylic Acids in Human Sweat". En: Abstracts International Congress on Analytical Sciences, Moscú, Rusia, mayo 25-30, **2006**.

4. Stashenko, Elena; Cervantes Díaz, Martha; **Mora Martínez, Amanda Lucia** y Martinez Morales, Jairo René. "Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos presentes en el sudor humano, empleando *HS-SPME-GC/ECD*". En: Resúmenes del XIV Congreso Colombiano de Química, Armenia, Quindío, Colombia, mayo 17-20, **2006**.

5. Stashenko, E.; Cervantes, M.; Martínez, J., and **Mora, A**. "*Determination of Carbonyls and Carboxylic Acids among Foot Odor Compounds by Derivatization and HS-SPME-GC/ECD*". En: Abstracts 57th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, Orlando, Florida, EE. UU., marzo 12-17, **2006**.

6. Elena E. Stashenko, **Amanda L. Mora** and Jairo R. Martínez. "*HS-SPME with on-Fiber Derivatisation of Volatile Carbonyls in Human Breath, after Alcoholic Beverages Consumption*". En: Abstracts 8th Conference of the Israel Analytical Chemistry Society, Tel Aviv, Israel, enero 11-12, **2005**.

7. Elena E. Stashenko, José L. Molina, **Amanda L. Mora,** and Jairo R. Martínez. "*HS-SPME and GC-MS Analysis of Volatiles from Brugmansia suaveolens Flowers during Day and Night*". En: Abstracts 8th Conference of the Israel Analytical Chemistry Society, Tel Aviv, Israel, enero 11-12, **2005**.

8. Elena E. Stashenko, **Amanda Lucia Mora** and Jairo René Martínez. "*HS-SPME with on-Fiber Derivatisation of Volatiles in Human Breath*". En: Abstracts 10th Latin American Symposium on Chromatography, COLACRO X, Campos do Jordão, Brasil, octubre 19-24, **2004**.

9. Elena E. Stashenko, José Luis Molina, **Amanda Lucia Mora,** and Jairo René Martínez. "*HS-SPME/GC-MS Analysis of Brugmansia suaveolens Fragance*". En: Abstracts 10th Latin American Symposium on Chromatography, COLACRO X, Campos do Jordão, Brasil, octubre 19-24, **2004**.

10. **Amanda Lucia Mora**, Elena E. Stashenko y Jairo René Martínez. "*Análisis de compuestos carbonílicos en aliento humano*". En: Resúmenes del XIII Congreso Colombiano de Química, Cartagena, Colombia, octubre 15-17, **2004**.

11. Elena E. Stashenko, **Amanda Lucia Mora** and Jairo René Martínez. "*HS-SPME with on-Fiber Derivatisation of Volatile Carbonyls in Human Breath, after Alcoholic Beverages*

Consumption". En: Abstracts 25th International Symposium on Chromatography, Paris, Francia, octubre 4-8, **2004**.

12. Elena E. Stashenko, José L. Molina, **Amanda L. Mora,** and Jairo R. Martínez. "*HS-SPME and GC-MS Analysis of Volatiles from Brugmansia suaveolens Flowers during Day and Night*". En: Abstracts 25th International Symposium on Chromatography, Paris, Francia, octubre 4-8, **2004**.

13. Stashenko E. E., **Mora A. L.**, Martínez J. R., and Muñoz A. "*Solid Phase Micro-Extraction in situ Derivatization With 2-Hydrazinobenzothiazole, Applied to the Analysis of Airborne Carbonyl Compounds*". En: Abstracts 3rd Int. Symposium on Separations in BioSciencies: 100-Years of Chromatography, Moscú, Rusia, mayo 13-18, **2003**.

14. Elena E. Stashenko (Conferencia Plenaria). "*Determination of Volatile Carbonyl Compounds by HS-SPME with Simultaneous on-Fiber Derivatization/Extraction*". En: Abstracts 5th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Extech, Tampa, Florida, EE. UU., marzo 5-7, **2003**.

15. Stashenko E. E., **Mora A. L.**, Muñoz A., and Martínez J. R. **"***Solid-Phase Micro-Extraction in situ Derivatisation with 2-Hydrazinobenzothiazole, Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds"*. En: Abstracts 24th International Symposium on Chromatography, Leipzig, Alemania, septiembre 15-20, **2002**.

El presente documento contiene 408 páginas, 42 Tablas, 78 Figuras y 14 Anexos, distribuidos en 6 capítulos, los cuales se exponen a continuación.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 CONTAMINANTES ATMOSFÉRICOS

La atmósfera juega un papel esencial en la vida de todos los seres vivos y su alteración, conocida como “contaminación atmosférica”, tiene una gran repercusión sobre los humanos, el ecosistema y la vida animal. Hasta hace algunas décadas, la "contaminación atmosférica", estaba asociada a la presencia de partículas en suspensión (hollín, humo) y dióxido de azufre (SO_2), provenientes principalmente de equipos de calefacción doméstica; procesos industriales y plantas de generación (Nilsson A., 2004). Hoy en día, el término obedece a la presencia en el aire de sustancias (sólidas, líquidas o gaseosas) y formas de energía, que alteren la calidad del mismo, de modo que implique riesgos, daño o molestia grave para las personas y bienes, de cualquier naturaleza (República de Colombia, 2001).

Si bien es cierto que fuentes naturales tales como erupciones volcánicas, terremotos, maremotos, huracanes, metabolismo de plantas, descomposición de animales, entre otros, emiten numerosas sustancias a la atmósfera, también el hombre, consciente o inconscientemente, ha contribuido a su deterioro. La diversidad de actividades humanas unidas al desarrollo industrial y el impresionante aumento del uso del petróleo y sus derivados, han ayudado a incrementar la lista de contaminantes atmosféricos.

Aunque los contaminantes biogénicos se liberan en cantidades mayores que los antropogénicos, estos últimos presentan la amenaza más significativa a largo plazo. En la **Tabla 1**, se indica el origen de los contaminantes más relevantes en el aire rural y urbano (Corvalán R., 1998).

Tabla 1. Principales contaminantes atmosféricos y sus orígenes (Corvalán R., 1998).

CONTAMINANTES	ORIGEN
Óxidos de azufre (SO_2, SO_x)	Plantas de generación a carbón o petróleo Calderas Industriales Incineradores Calefactores domésticos Vehículos Diesel Fundiciones Industria papelera Volcanes
Sulfuro de hidrógeno (H_2S)	Plantas (material vegetal en descomposición)
Partículas (humo, polvo, PM_{10}, polen, virus)	Plantas de generación a carbón o petróleo Calderas Industriales Incineradores Calefactores domésticos Procesos industriales Vehículos Diesel Construcción Minería Industria del cemento Volcanes y vendavales Fuegos forestales Plantas (vivas) Suelo
Óxidos de nitrógeno, NO_x	Plantas de generación a carbón y a gas Calderas industriales Incineradores Vehículos motorizados Fuegos forestales
Compuestos orgánicos volátiles, VOC's	Gases de escape de motores Fugas en estaciones de distribución de combustibles Industria de pinturas Plantas (vivas) Mar
Sustancias orgánicas tóxicas (Hidrocarburos, dioxinas, *etc*.)	Residuos de incineradores Producción de carbón Combustión de carbón Vehículos Diesel

Tabla 1, Continuación.

CONTAMINANTE	ORIGEN
Metales tóxicos (plomo, cadmio)	Gases de escape de vehículos Procesamiento de metales Residuos de incineradores Combustión del petróleo y carbón
Gases de invernadero (metano, dióxido de carbono)	Procesos de combustión (dióxido de carbono) Plantas de generación (dióxido de carbono) Minas de carbón (metano) Vehículos Diesel Fugas de gas (metano) Plantas (material vegetal en descomposición) Fuegos forestales
Monóxido de carbono, CO	Vehículos motorizados Procesos de combustión Fuegos forestales
Sustancias químicas tóxicas (cloro, flúor, amonio)	Plantas químicas Procesamiento de metales Producción de fertilizantes Mar, océanos
Partículas de sal	Mar, océanos
O_3	Contaminante secundario formado por VOC's y NO_x

Con base en la capacidad de los contaminantes del aire para sufrir cambios químicos o no, cuando llegan a la atmósfera, éstos se clasifican en primarios y secundarios. Los contaminantes primarios, emitidos directamente por las fuentes (*e.g.,* volcanes y exhostos de vehículos), están constituidos por NO_x; óxidos de azufre (SO_x); óxidos de carbono (CO y CO_2); óxidos de metales, especialmente de plomo (Pb), cadmio (Cd), hierro (Fe) y cobre (Cu); compuestos halogenados (HF y HCl); hidrocarburos y material partículado (MP) (Kiely G., 1996).

Entre los contaminantes secundarios, originados por interacción química de los primarios y los componentes normales de la atmósfera, figuran el trióxido de azufre (SO_3), el ácido sulfúrico (H_2SO_4), el dióxido de nitrógeno (NO_2), diferentes sulfatos (SO_4M) y nitratos (NO_3M), y los oxidantes fotoquímicos, nitrato de peroxiacetilo (PAN) y ozono (O_3), este último, componente fundamental del *smog fotoquímico* (Kiely G., 1996; De Nerves N., 1998).

La Organización Mundial de la Salud (WHO, por su abreviatura en inglés), clasificó los contaminantes orgánicos con base en sus rangos de punto de ebullición, en cuatro grupos principales, tal como se presenta en la **Tabla 2** (ECA, 1997). Esta clasificación se basa en la volatilidad del compuesto, pues es el factor más importante que determina la eficacia de diversos adsorbentes de muestreo para recoger los contaminantes atmosféricos; sin embargo, no existe un límite claro entre las cuatro categorías, pues en la práctica, están determinadas por los métodos usados para muestrear las sustancias orgánicas del aire (Véase **Tabla 2**).

En la mayoría de los métodos los analitos se concentran sobre adsorbentes sólidos y, por lo tanto, el tipo y la cantidad de adsorbente, así como el volumen de muestra, determinan, hasta cierto punto, el rango del punto de ebullición de los compuestos atrapados. Usando combinaciones apropiadas de adsorbentes, los compuestos orgánicos muy volátiles (VVOC's, por su abreviatura en ingles) y los compuestos orgánicos volátiles (VOC's, por su abreviatura en ingles) se pueden muestrear simultáneamente y, por lo tanto, la distinción entre ellos puede llegar a ser mínima (ECA, 1997).

Tabla 2. Clasificación de los contaminantes orgánicos del aire, según la WHO (Tomada de ECA, 1997).

Descripción	Abreviatura	Rango de puntos de ebullición, °C		Métodos de muestreo usados en estudios de campo
		Desde	Hasta	
Compuestos orgánicos muy volátiles, incluyendo gases.	VVOC's	<0	50-100	Muestreo *batch*, adsorción sobre carbón.
Compuestos orgánicos volátiles.	VOC's	50-100	240-260	Adsorción sobre Tenax®, carbón negro grafitizado, o carbón de madera.
Compuestos orgánicos semi-volátiles.	SVOC's	240-260	380-400	Adsorción sobre espuma de poliuretano (PUF) o copolímero de estireno-divinil(benceno) (XAD-2).
Compuestos orgánicos asociados con el material partículado o material orgánico partículado.	POM	>380		Recolección sobre filtros.

Los distintos contaminantes atmosféricos, tienen diferentes efectos nocivos sobre la salud de las personas y, su acumulación en el organismo a lo largo del tiempo, conlleva a daños sicológicos, enfermedades crónicas o, en algunos casos, hasta la muerte. Los efectos nocivos dependen, entre otros, del tiempo y lugar de exposición, de las características del individuo (*e.g.,* edad y factores fisiológicos, estrato social y características laborales, entre otros). En la **Tabla 3**, se resumen los efectos sobre la salud de algunos de los más relevantes contaminantes atmosféricos (Corvalán R., 1998).

1.2 COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOC's)

Los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) son contaminantes importantes del aire, por dos razones: (1) Algunos de éstos, junto con los NO_x, son precursores para la producción fotoquímica del O_3 (Jurvelin A. J., 2003; Srivastava A. *et al.*, 2005) y (2) Los VOC's incluyen especies químicas que tienen, individualmente, efectos agudos o crónicos en los seres humanos (IEH, 2001).

La WHO clasifica los VOC's como el grupo de los compuestos orgánicos del aire, que tienen una temperatura de ebullición entre 50-100 y 240-260 °C (Véase **Tabla 2**). Sin embargo, esta clasificación no aplica para la lista de VOC's, presentada por el Comité Europeo de Acción Colaborativa Sobre la Calidad del Aire Interior (Véase el **Anexo 1**) (ECA, 1997). Aunque el formaldehído no cae dentro de la definición de la WHO, se incluye en este grupo, dado que constituye una amenaza particular para la salud humana.

Los VOC's, normalmente alcanzan concentraciones atmosféricas superiores a 100 $\mu g/m^3$, mientras que los SVOC's con frecuencia, varían en el rango de ng a pg/m^3 (Khaled A. y Pawliszyn J., 2000). Las concentraciones de VOC's son típicamente de 5 a 50 veces más altas en espacios cerrados que en exteriores, incluso en ciudades con niveles de contaminación relativamente altos y en zonas industriales.

Los edificios nuevos, inclusive, contienen niveles de VOC's 100 veces más altos que los del aire exterior (Steinemann A., 2004). Puesto que la gente pasa la mayor parte de su tiempo en ambientes interiores, la exposición a los contaminantes del aire interior es más relevante que la exposición al aire exterior. En el aire de ambiente interior, se han identificado más de 500 diferentes VOC's (Steinemann A., 2004); en estos espacios, sumado a las fuentes directas de VOC's, se presentan las reacciones químicas de compuestos orgánicos insaturados (*e.g.,* terpenos) con oxidantes fuertes (*e.g.,* O_3 y NO_x), las cuales producen una variedad de compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas), que pueden actuar como irritantes de las vías respiratorias.

Dentro de la amplia gama de VOC's, merecen especial atención los compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas), conocidos por su papel como precursores fotoquímicos y por su potencial tóxico mutagénico y carcinógeno (Levart A. y Veber M., 2001; Grosjean D. *et al.*, 2002), y los compuestos carboxílicos, los cuales contribuyen significativamente a la precipitación ácida y juegan un papel importante como agentes corrosivos (Pan L. y Pawliszyn J., 1997; Dabek-Zlotorzynska E. *et al.,* 2001). Ambas familias de sustancias químicas, son causa común de efectos agudos y crónicos sobre la salud humana, extendiéndose desde la irritación de mucosas y dolores de cabeza, hasta el daño neurológico y el cáncer (Otto D. *et al.*, 1990; Pierson T. K. *et al.*, 1991).

Tabla 3. Efectos importantes sobre la salud asociados con la exposición a diversos contaminantes del aire (Corvalán R., 1998).

Contaminantes	Efectos sobre la salud	
	Exposición a corto plazo	**Exposición a largo plazo**
Material particulado	• Reacciones inflamatorias del pulmón. • Síntomas respiratorios. • Efectos adversos sobre el sistema cardiovascular. • Incremento en el uso de medicamentos. • Incrementos en las admisiones a hospitales. • Incremento en la mortalidad.	• Incremento en síntomas respiratorios más bajos. • Reducción en la función pulmonar en los niños y adultos. • Incremento en la enfermedad pulmonar obstructora crónica. • Reducción de la esperanza•de vida en los adultos, debido principalmente a la mortalidad cardiopulmonar y, probablemente, al cáncer de pulmón.
O_3	• Efectos nocivos sobre la función pulmonar. Reacciones inflamatorias del pulmón. • Efectos nocivos sobre el tracto respiratorio. • Incremento en el uso de medicamentos. • Incremento en las admisiones a los hospitales, aumento de mortalidad.	• Reducción en el desarrollo de la función de pulmón.
Dióxido de nitrógeno (NO_2)*	• Efectos sobre la función pulmonar, particularmente, en asmáticos. • Incremento en las reacciones inflamatorias alérgicas de las vías respiratorias. • Incremento en las admisiones a hospitales. • Incremento en la mortalidad.	• Reducción en la función pulmonar. • Aumentó en la probabilidad de síntomas respiratorios.

* En el aire exterior, el NO_2 sirve como indicador de la contaminación atmosférica, asociada principalmente al tráfico vehicular.

1.3 COMPUESTOS CARBONÍLICOS

1.3.1 Estructura y reactividad del grupo carbonilo. Los compuestos carbonílicos pertenecen a la familia de sustancias químicas que contienen en su estructura el grupo carbonilo (C=O), que, junto con otras agrupaciones atómicas, constituye el grupo funcional característico. Entre estos compuestos se pueden citar: ácidos carboxílicos [—COOH], halogenuros de acilo [—C(=O)—X], ésteres [—COOR], amidas [—(C=O)NR_2], *etc*. Sin embargo, el nombre de compuestos carbonílicos suele utilizarse en sentido restringido para designar exclusivamente a los aldehídos R-CHO y las cetonas, R—CO—R´.

Dos aspectos notables del grupo carbonilo son su geometría y su polaridad. Los átomos de carbono y oxígeno, que lo conforman, se encuentran unidos mediante dos enlaces: uno σ y otro π. El átomo de carbono del grupo carbonilo presenta hibridación sp^2 y está enlazado al átomo de oxígeno y a otros dos átomos mediante tres enlaces σ coplanares, separados entre sí aproximadamente en 120°. El enlace π del grupo carbonilo se forma por combinación de un orbital 2*p* del carbono con un orbital 2*p* del oxígeno. Si los orbitales interaccionan de forma constructiva se forma un orbital molecular π enlazante y si la interacción es destructiva se forma un orbital molecular π* antienlazante (**Figura 1**).

Los orbitales π y π* del grupo carbonilo C=O se parecen a los orbitales π y π* del doble enlace C=C, con la diferencia de que son menos simétricos. Los dos electrones del enlace π ocupan el orbital molecular π enlazante y debido a la forma de este orbital, existe más probabilidad de encontrar un electrón en la proximidad del átomo de oxígeno electronegativo, que en la proximidad del átomo de carbono más electropositivo.

Debido a la electronegatividad alta del oxígeno, la densidad electrónica en ambos componentes σ y π del doble enlace carbono-oxígeno, está desplazada hacia el oxígeno. Esta tendencia, conduce a un estado resonante, en el que el carbono está parcialmente positivo (con carácter de carbocatión) y el oxígeno parcialmente negativo (débilmente básico), **Figura 2** (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999). Así, el átomo de carbono puede actuar fácilmente como centro electrofílico, mientras que el átomo de oxígeno, cargado negativamente, actuará como centro nucleofílico. La reactividad del grupo carbonilo, está gobernada por las reacciones de adición nucleofílica sobre el carbono polarizado positivamente.

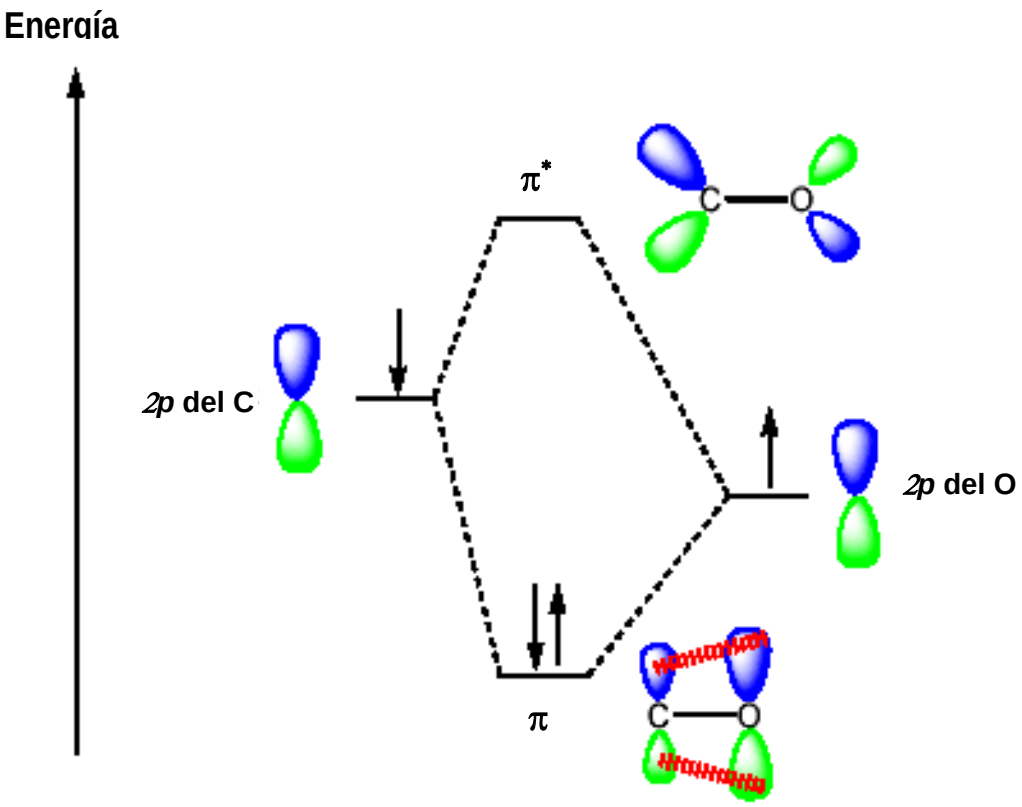


Figura 1. Orbitales moleculares π y π* del grupo carbonilo.

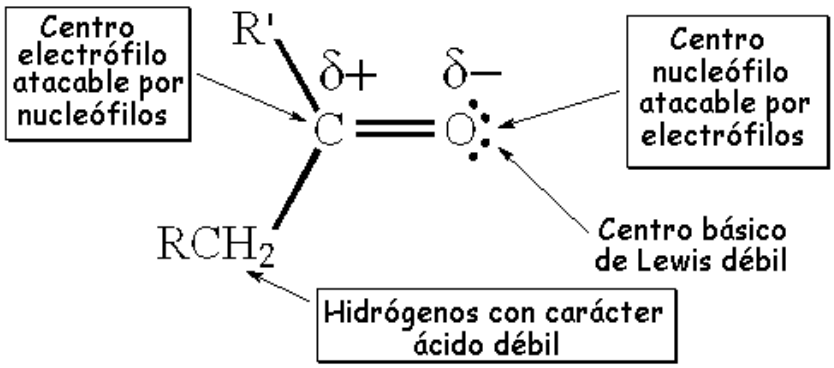


Figura 2. Estructura general de los aldehídos y las cetonas.

1.3.1.1 Propiedades físicas de compuestos carbonílicos. Dada su polaridad, los compuestos carbonílicos exhiben momentos dipolares elevados y, por tanto, fuerzas de atracción dipolo-dipolo, relativamente fuertes. Como consecuencia, los aldehídos y cetonas tienen puntos de fusión y de ebullición más altos que los de los hidrocarburos análogos de peso molecular comparable. Sin embargo, las moléculas de aldehídos y cetonas no pueden asociarse entre si, mediante enlaces de hidrógeno, por lo que sus puntos de fusión y de ebullición son más bajos que los de los alcoholes y ácidos carboxílicos de peso molecular comparable (Solomons T. W. G., 1996).

Concretamente, los puntos de ebullición de los primeros aldehídos y cetonas de la serie C_1-C_{10}, son unos 60 °C más altos que los de los hidrocarburos del mismo peso molecular y también unos 60 °C más bajos que los de los correspondientes alcoholes. Esta diferencia se hace cada vez menor, al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada y perder influencia relativa, el grupo funcional. En la **Tabla 4**, se presentan algunas propiedades físicas, para la serie C_1-C_{10} de aldehídos y cetonas.

Tabla 4. Propiedades físicas la serie C_1-C_{10} de aldehídos y cetonas (Solomons T. W. G., 1996).

Compuesto	Estructura	Peso molecular, g/mol	Punto de ebullicón,°C	Punto de fusión, °C
Aldehídos				
Formaldehído	HCHO	30	-21	-92
Acetaldehído	CH_3CHO	44	21	-121
Propanaldehído	CH_3CH_2CHO	58	49	-81
Butanaldehído	$CH_3(CH_2)_2CHO$	72	76	-99
Pentanaldehído	$CH_3(CH_2)_3CHO$	86	103	-92
Hexanaldehído	$CH_3(CH_2)_4CHO$	100	128	-56
Heptanaldehído	$CH_3(CH_2)_5CHO$	114	153	-43
Octanaldehído	$CH_3(CH_2)_6CHO$	128	171	12-15
Nonanaldehído	$CH_3(CH_2)_7CHO$	142	192	63
Decanaldehído	$CH_3(CH_2)_8CHO$	156	209	-5
Cetonas				
Acetona	CH_3COCH_3	58	56	-95
2-Butanona	$CH_3CH_2COCH_3$	72	80	-86
2-Pentanona	$CH_3(CH_2)_2COCH_3$	86	102	-78
3-Pentanona	$CH_3CH_2COCH_2CH_3$	86	102	-40
2-Hexanona	$CH_3(CH_2)_3COCH_3$	100	128	-57
3-Hexanona	$CH_3(CH_2)_2COCH_2CH_3$	100	125	130
2-Heptanona	$CH_3(CH_2)_4COCH_3$	114	151	-36
2-Octanona	$CH_3(CH_2)_5COCH_3$	128	173	-16
2-Nonanona	$CH_3(CH_2)_6COCH_3$	142	195	-7
2-Decanona	$CH_3(CH_2)_7COCH_3$	156	210	14

Los compuestos carbonílicos son solubles en disolventes orgánicos no polares, como éter etílico, benceno, *etc*. La presencia de dos pares de electrones no compartidos sobre el átomo de oxígeno permite la formación de puentes de hidrógeno con otros compuestos que tengan enlaces —O-H ó —N-H—; por lo

que, los primeros miembros de ambas series de aldehídos y cetonas, son completamente solubles en H_2O. Sin embargo, al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada disminuye rápidamente su solubilidad (Solomons T. W. G., 1996). Así, por ejemplo, los aldehídos y cetonas de cadena lineal con ocho o más átomos de carbono son prácticamente insolubles en H_2O. Debido a estos puentes de hidrógeno, los aldehídos y las cetonas son buenos disolventes de sustancias polares, como los alcoholes. La acetona, por ejemplo, es un excelente disolvente orgánico, muy utilizado por su especial capacidad para disolver tanto compuestos polares (alcoholes, aminas, H_2O, *etc*.), como apolares (hidrocarburos, éteres, grasas, *etc*.).

1.3.1.2 Propiedades químicas de compuestos carbonílicos. Los aldehídos se oxidan con facilidad, incluso bajo la acción de agentes oxidantes suaves (*e.g.,* ácido nítrico, cromato y dicromato de potasio), dando lugar a un ácido carboxílico (o sus sales) con el mismo número de átomos de carbono que el aldehído sometido a oxidación, mientras que las cetonas no se oxidan bajo condiciones semejantes (Solomons T. W. G., 1996).

La facilidad con la que se oxidan los aldehídos permite identificarlos cualitativamente mediante diferentes pruebas de oxidación conocidas como la reacción de Tollens**,** reacción de Fehling y reacción de Baeyer-Villiger. Los aldehídos también pueden reducirse a alcoholes primarios mediante agentes reductores típicos como el hidruro de litio y aluminio, $LiAlH_4$; el borohidruro de sodio, $NaBH_4$, y la hidrogenación catalítica. Aunque las cetonas tienden a ser mucho más estables que los aldehídos, bajo estas mismas condiciones, se reducen a alcoholes secundarios (Solomons T. W. G., 1996).

1.3.2 Actividad biológica y toxicidad de los compuestos carbonílicos.

Los aldehídos son contaminantes carbonílicos de interés especial para toxicólogos e higienistas industriales, que estudian la contaminación ambiental de interiores y exteriores, así como para aquellos que participan en la elaboración de leyes y regulaciones ambientales y laborales; pues aún en bajas concentraciones, estos compuestos exhiben cierto grado de toxicidad (Véase **Anexo 2**). Naturalmente, los aldehídos participan como intermediarios en el metabolismo de humanos y animales; sin embargo, cuando ingresan al organismo, como contaminantes, pueden interactuar con macromoléculas biológicas, inhibiendo la biosíntesis de ácidos nucléicos y proteínas, y la división celular (mitosis). Como consecuencia, pueden causar toxicidad aguda, narcosis e irritaciones de piel, dejándola susceptible al ataque por microorganismos; actuar como mutagénicos y carcinogénicos y, promover la reproducción de virus (Feron V. J. *et al*., 1991).

Las concentraciones bajo las cuales los aldehídos ejercen una acción tóxica (Véase **Anexo 2**), han sido establecidas con base en pruebas (LC_{50} y LD_{50}), que implican la exposición aguda de animales (*e.g.*, ratas, conejos y *hamsters*) y algunos microorganismos, a la sustancia pura. La EPA, por su parte, utiliza modelos matemáticos, basados en estudios con humanos y animales, para estimar la probabilidad de que una persona desarrolle un cáncer, al inhalar una sustancia química en concentraciones específicas, presente en el aire que respira.

Debido a su ubicuidad y, a las continuas y altas emisiones atmosféricas de los aldehídos más livianos, *i.e.* formaldehído y acetaldehído, la toxicidad y el potencial carcinogénico de estos compuestos han sido estudiados ampliamente (Koeck M. *et al.*, 1997). La **Tabla 5**, resume los posibles efectos agudos sobre los seres humanos, por exposición durante un tiempo corto, a los vapores de formaldehído (WHO, 2001). La exposición aguda de humanos a los vapores de acetaldehído, se asocia con la irritación de los ojos, la piel y el tracto respiratorio (sensación de

tos e irritación en la nariz y tórax), náuseas, vómito, dolor de cabeza, pérdida de la conciencia y edema pulmonar (U.S. EPA IRIS, 2005).

Los estudios sobre el potencial carcinogénico del formaldehído en humanos, realizados directamente con trabajadores expuestos a altas concentraciones de formaldehído, no encontraron evidencia fuerte de un riesgo de cáncer (Nelson L. *et al.*, 1986). Una de las pocas evidencias de cáncer nasofaríngeo, por exposiciones típicas al formaldehído en ambientes interiores (casas móviles), fue presentada por Vaughan T. L. y colaboradores (1986). No obstante, basados en "evidencia limitada en seres humanos" y "evidencia suficiente en experimentos con animales" (IARCa, 1995; U.S. EPA IRIS, 2005), el formaldehído es clasificado como probable agente carcinógeno humano por el IARC (grupo 2A) y por la U.S. EPA IRIS (grupo B1). Los estudios epidemiológicos de personas expuestas profesionalmente (*e.g.*, directores de funerarias, anatomistas, patólogos, *etc*.) o industrialmente (*e.g.*, trabajadores en fábricas de formaldehído, resinas, *etc*.), sugieren una asociación causal de niveles altos de formaldehído con el desarrollo de cáncer nasofaríngeo. Mientras que, las pruebas biológicas de la inhalación en ratas, muestran incidencia significativa del formaldehído en la formación de tumores del epitelio respiratorio nasal, a niveles de exposición ≥ 6.9 mg/m^3 (5.6 *ppm*), y formación de tumores desproporcionadamente grandes, a exposiciones más altas (≥ 12 mg/m^3, 10 *ppm*).

De igual forma, existe información limitada sobre estudios epidemiológicos, pero suficiente evidencia con animales para la carcinogenicidad del acetaldehído, por lo que éste ha sido clasificado como probable carcinógeno humano, grupos 2B (IARCa, 1995) y B2 (U.S. EPA IRIS, 2005). Los estudios de inhalación en ratas han mostrado que el compuesto causa cáncer en la mucosa nasal, produciendo dos tipos de tumores, adenocarcinomas en el epitelio olfativo y, a niveles de

exposición más altos, carcinomas de células escamosas derivadas principalmente del epitelio respiratorio (IARCa, 1995).

Tabla 5. Efectos humanos por la exposición al formaldehído durante períodos de tiempo cortos (WHO, 2001).

Efecto	Tiempo de exposición	Formaldehído, mg/m^3
Umbral de detección de olor	Exposición repetida	0.06-1.2
Umbral de irritación de ojos	Sin especificar	0.01-1.9
Umbral de irritación de tórax y la nariz	Sola o exposición repetida	0.1-3.1
Sensación de picazón en nariz y ojos	Sin especificar	2.5-3.7
Tolerable por 30 min (lagrimeo). Lagrimeo fuerte después de 1 h.	30 min	5-6.2
Tolerable por 1 h (lagrimeo fuerte)	1 h	12-25
Dañino para la vida, edema, inflamación y neumonía	Sin especificar	37-60
Muerte	Sin especificar	60-125

La toxicidad de los aldehídos, puede ser explicada por la naturaleza electrofílica del grupo carbonilo, el cual promueve reacciones específicas con los grupos nucleofílicos de proteínas y ácidos nucléicos. Los aldehídos saturados, por ejemplo, ejercen su actividad inhibitoria únicamente, a través del grupo carbonílico; mientras que, los aldehídos insaturados (*e.g.*, 2-alquenales), pueden actuar a través de la función aldehído o a través del grupo olefínico vecinal. En los 4-hidroxi-alquenales, los efectos nocivos son promovidos solamente por el grupo olefínico, que es activado, por un lado, por el grupo aldehído y, por otro, por el grupo hidroxilo; mientras que, en los cetoaldehídos, son función del grupo aldehído, activado particularmente por el grupo vecinal ceto (Schauenstein E. *et al*., 1977; FFHPVC, 1999).

Los sitios de acción más probables en el proceso metabólico por el cual los aldehídos modifican las estructuras biológicas, son el grupo sulfihidrilo, de tioles no protéicos y de moléculas de proteínas, y el grupo amino, de aminas de bajo peso molecular, aminoácidos, proteínas y/o ácidos nucléicos. En general, los alcanales, 2-alquenales y α–cetoaldehídos, atacan grupos sulfihidrilo y grupos amino, mientras que los 4-hidroxi-2-alquenales, actúan sobre los grupos hidroxilo (Schauenstein E. *et al*., 1977).

1.3.3 Fuentes e importancia ambiental de los compuestos carbonílicos. Los compuestos carbonílicos pueden ser contaminantes primarios, producidos directamente por combustión incompleta de biomasa y/o de combustibles fósiles, o contaminantes secundarios, productos de la foto-oxidación atmosférica de hidrocarburos (Carlier P. *et al*., 1986; Satsumabayashi H. *et al.*, 1995) y de las reacciones de alquenos con O_3 y NO_3, que se generan particularmente en la noche (Altshuller A. P., 1993). En el aire interior, su presencia se asocia con las emisiones de materiales de construcción, muebles y productos de consumo; en algunos ambientes, también se han observado como productos de la ozonólisis de olefinas de bajo peso molecular (Kelley T. J. *et al.*, 1999).

Los compuestos carbonílicos son precursores y, a la vez, productos de las oxidaciones fotoquímicas de VOC's con $NO_x^{\bullet}$. El formaldehído, por ejemplo, es el precursor principal de los radicales hidroperoxilo ($HO_2^{\bullet}$) e hidroxilo $OH^{\bullet}$ (Calvert J. G. y Stockwell W. R., 1983), necesarios para la producción del O_3 y de los nitratos de peroxiacilo (Carlier P. *et al*., 1986; Moortgat G. K., 2001).

La relativa importancia de las fuentes primarias y secundarias de carbonílicos depende de la cantidad y la reactividad química de los VOC's en cuestión, la época del año, la hora del día y de las características de las fuentes móviles, *i. e.* tipo de vehículos y de combustibles. Las emisiones de formaldehído y, en algunos casos, de acetaldehído, aumentan con el uso de combustibles oxigenados, incluyendo metanol, etanol y metil-*t*-butil-eter (MTBE) (Bakeas E. B. *et al.*, 2003). Se puede suponer, que si la fracción de los vehículos accionados con metanol o gas natural, aumenta, las emisiones primarias de aldehídos, especialmente de formaldehído, podrían predominar sobre su producción secundaria, particularmente, durante la noche y en las primeras horas de la mañana (Altshuller A. P., 1993).

En el verano, cuando la formación fotoquímica es más significativa, la importancia de oxidaciones de VOC's promovidas por luz, como fuente de carbonilos parece ser similar (Possanzini M. *et al.*, 1996), o aún más importante, que las emisiones primarias. En Houston (Texas), por ejemplo, dos tercios de la formación del formaldehído se atribuyen a las reacciones de VOC's (Friedfeld S. *et al.*, 2002). En invierno, en cambio, predominan las emisiones primarias (Anderson L. G. *et al.*, 1996).

Los compuestos carbonílicos se han medido en atmósferas limpias y contaminadas (Anderson L. G. *et al*., 1996; Possanzini M. *et al.*, 1996; Granby K. *et al*., 1997). En la mayoría de los estudios, el formaldehído es el compuesto carbonílico más abundante (Salas L. J. y Singh H. B., 1986; Anderson L. G. *et al.*, 1996; Possanzini M. *et al.*, 1996). Sin embargo, en el Brasil, debido al uso intensivo de etanol como combustible en vehículos, se presentan concentraciones más altas de acetaldehído (Grosjean D. *et al.*, 1990).

Por otra parte, se ha observado una buena correlación entre los niveles detectados de los aldehídos de peso molecular bajo (C_1-C_3) y la acetona, lo que sugiere fuentes primarias comunes y caminos de formación y descomposición análogos para estos analitos (Possanzini M. *et al.*, 1996). La correlación más fuerte se observa, por lo general, entre formaldehído y acetaldehído (Granby K. *et al*., 1997).

1.3.3.1 Fuentes biogénicas. Las plantas emiten una gran cantidad de aldehídos, especialmente, de cadena larga (C_{24}-C_{32}), que se depositan en la capa cuticular de las hojas y los frutos. La descomposición lipídica oxidativa de estos compuestos, inducida por la lipoxigenasa, conduce a la formación de aldehídos de bajo peso molecular, C_6, tales como hexanal, *cis*-3-hexenal y *trans*-2-hexenal; estos compuestos contribuyen a la fragancia característica de las hojas frescas (Hatanaka K. y Harada T., 1973; Hatanaka A. *et al.*, 1987; Hatanaka A., 1996). Otras fuentes biogénicas primarias directas, están representadas por las heces de insectos y de animales (Kesselmeier J. y Staudt M., 1999).

Los precursores biogénicos más significativos son algunos terpenos y el isopreno, que pueden generar concentraciones de aldehídos altas, dentro de una población vegetal dada (Altshuller A. P., 1993). Los compuestos (*Z*)-3-hexen-1-ol y acetato de (*Z*)-3-hexenilo, emitidos por una gran cantidad de plantas, por ejemplo, pueden transformarse al propanal y, en presencia de los radicales $OH^{\bullet}$ y $NO_x^{\bullet}$, en formaldehído y en acetaldehído (Atkinson R., 1990). Las emisiones de metanol por las plantas (Granby K. *et al*., 1997), también contribuyen a la producción del formaldehído.

La **Tabla 6** resume las fuentes naturales de los compuestos carbonílicos (aldehídos y cetonas) atmosféricos más relevantes y sus concentraciones fuera de las ciudades (Kesselmeier J. y Staudt M., 1999).

Tabla 6. Concentraciones atmosféricas de carbonilos fuera de áreas urbanas y sus fuentes naturales (Kesselmeier J. y Staudt M., 1999).

Compuesto carbonílico	Concentración, $\mu g/m^3$	Fuentes
Formaldehído	1-25	1, 2, 3
Acetaldehído	1-20	1, 2, 3, 4, 5
Propanaldehído	0.1-5.2	1, 2, 3, 4, 5
Butanaldehído	<1	1, 2, 3
Pentanaldehído	<1	1, 3
Hexanaldehído	<1	1, 3
Heptanaldehído	<1	1, 3
Octanaldehído	3	1, 3
Nonanaldehído	8	1, 3
Decanaldehído	7	1

Fuentes. 1: Vegetación (directa o indirectamente); 2: Incendios forestales; 3: Procesos microbianos; 4: Insectos; 5: Volcanes.

La ozonólisis de alquenos, así como su reacción con el $OH^{\bullet}$, desempeñan un papel significativo en la producción de los aldehídos (Carlier P. *et al*., 1986; Atkinson R., 1990; Atkinson R. *et al.*, 1995). Sin embargo, una valoración de la producción exacta es difícil debido a los numerosos caminos de reacción disponibles. La ozonólisis que ocurre en la superficie vegetal, por ejemplo, puede producir acetona, 4-oxopentanal, 6-metil-5-hepten-2-ona, y geranil acetona, entre otros productos (Fruekilde P. *et al.*, 1998).

1.3.3.2 Fuentes antropogénicas. La combustión incompleta y la degradación térmica (pirólisis) de sustancias orgánicas tales como combustibles, tabaco, grasas, polímeros naturales y sintéticos y algunos productos comestibles, dan lugar a la emisión de aldehídos. Las fuentes principales incluyen fogones y chimeneas, que funcionan con leña, procesos que involucran la quema de carbón, centrales eléctricas que funcionan con aceite o gas natural, quema de combustibles en automóviles e incineración de la basura y de la vegetación (Lipari F. *et al.*, 1984). La especie dominante, en estas emisiones es el formaldehído, pero la acroleína puede representar del 3 al 10%, de los aldehídos totales, emitidos por tubos de escape de automóviles, y entre el 1 y el 13% de los aldehídos totales, presentes en el humo de la madera y el 7% de los aldehídos presentes en el humo del cigarrillo (Oberdorfer P. E., 1971; Rickert W. S., *et al.,* 1980; Lipari F. *et al.,* 1984). Además, los vehículos de motor, emiten hidrocarburos que experimentan oxidación fotoquímica atmosférica, generando formaldehído y otros carbonilos. Esto se ha controlado un poco con la introducción de convertidores catalíticos, en los automóviles modernos, que retiran casi todos los aldehídos de los gases de escape.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA, por su abreviatura en inglés) estima que las fuentes móviles de carretera contribuyen aproximadamente con el 27 y el 20% de las emisiones de formaldehído y acetaldehído, respectivamente, en los Estados Unidos. De estas emisiones, un alto porcentaje (*ca.* 35 y 33%, para formaldehído y acetaldehído, respectivamente) es aportado por los vehículos pesados (camiones que trabajan con combustible Diesel). En todos estos casos, el acetaldehído es producto de la combustión incompleta de la gasolina o del Diesel y no de una emisión evaporativa del combustible como tal. La acroleína también ha sido encontrada en emisiones Diesel, alcanzando el 53% de las emisiones de fuentes móviles de carretera (U.S. EPA, 2000).

1.3.3.3 Producción fotoquímica de aldehídos. Como contaminantes secundarios, la mayor fuente de carbonílicos corresponde a las reacciones fotoquímicas de metano e isopreno y otros hidrocarburos, biogénicos y antropogénicos, en las que adicionalmente se producen H_2O y O_3, según la reacción neta (Tanner R. *et al.*, 1998; Grosjean E. y Grosjean D., 1996):

$$RH + 4\ O_2 + 2h\upsilon \longrightarrow RCHO + H_2O + 2\ O_3 \qquad \textbf{(Ecuación 1)}$$

Entre los productos de fotoxidación del isopreno figuran formaldehído, metacroleína, metil-vinil-cetona y 3-metilfurano (Yu J. *et al.*, 1995), los cuales han sido clasificados, por la U.S. EPA, como contaminantes tóxicos del aire.

En general, el tiempo de vida de los aldehídos es del orden de horas; éstos reaccionan rápidamente vía fotólisis y/o con los radicales $OH^{\bullet}$, para generar otros radicales y aerosoles orgánicos, que actúan como productos de partida para la formación de ácidos orgánicos y oxidantes tales como PAN y O_3, entre otros (Tanner R. *et al.*, 1998; Atkinson R. y Arey J., 1998). El formaldehído en la atmósfera, por ejemplo, puede reaccionar con el $OH^{\bullet}$ (**Ecuación 2**) y vía fotólisis (**Ecuaciones 3, 3a y 3b**), con la formación de uno o dos radicales $HO_2^{\bullet}$, los cuales pueden oxidar moléculas del óxido nítrico (NO), generando dióxido de nitrógeno, NO_2 y el radical $OH^{\bullet}$, o recombinarse para producir altos niveles de peróxido de hidrógeno gaseoso, H_2O_2 (**Ecuación 4**), un fuerte oxidante que participa en la formación de la lluvia ácida (Tanner R. *et al.*, 1998).

La fotólisis de acetaldehído en la atmósfera genera radicales $HO_2^{\bullet}$, metilperoxilo $CH_3O_2^{\bullet}$ y monóxido de carbono, CO (**Ecuación 5**) y, por reacción con $OH^{\bullet}$, produce el radical acetilperoxílo, $CH_3C(O)\text{-}O_2^{\bullet}$, y PAN, (**Ecuaciones 6-8**), (Tanner R. *et al.*, 1998).

$HCHO + OH^{\bullet} + O_2 \longrightarrow HO_2^{\bullet} + CO + H_2O$ (**Ecuación 2**)

$HCHO + h\nu\ (\lambda < 360\ nm) \longrightarrow HCO^{\bullet} + H$ (**Ecuación 3**)

$HCO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow HO_2^{\bullet} + CO$ (**Ecuación 3a**)

$H + O_2 \longrightarrow HO_2^{\bullet}$ (**Ecuación 3b**)

$2HO_2^{\bullet} \longrightarrow H_2O_2 + O_2$ (**Ecuación 4**)

$CH_3CHO + h\nu \longrightarrow CH_3 + CHO + 2O_2 \longrightarrow CH_3O_2^{\bullet} + HO_2 + CO$ (**Ecuación 5**)

$CH_3CHO + OH^{\bullet} \longrightarrow CH_3CO^{\bullet} + H_2O$ (**Ecuación 6**)

$CH_3CO^{\bullet} + O_2 \longrightarrow CH_3C(O)\text{-}O_2^{\bullet}$ (**Ecuación 7**)

$CH_3C(O)\text{-}O_2^{\bullet} + NO_2 \longrightarrow CH_3C(O)\text{-}OONO_2^{\bullet}$ (**Ecuación 8**)

Las cetonas también sufren reacciones fotoquímicas en las que los productos principales son aldehídos y radicales peroxihidroxilo; Atkinson R. *et al*. (2000) en su estudio sobre química atmosférica, detectaron formaldehído, acetaldehído y propanaldehído, como productos principales de la reacción del $OH^{\bullet}$ con 2-pentanona, y formaldehído, acetaldehído, propanaldehído, butanaldehído y pentanaldehído, en la reacción del radical con la 2-heptanona.

1.4 ÁCIDOS CARBOXÍLICOS

1.4.1 Estructura y reactividad del grupo carboxílico. Los ácidos carboxílicos se caracterizan por poseer en su estructura el grupo carboxilo (-COOH o CO_2H), a partir del cual se origina una serie de compuestos orgánicos, entre los que se encuentran los haluros de ácido (RCOCl), los anhídridos de ácido (RCOOCOR´), los ésteres (RCOOR´) y las amidas ($RCONH_2$) (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999).

El mapa de reactividad de un ácido carboxílico está marcado, en primer lugar, por la elevada acidez del grupo OH y, en segundo, por la electrofilia del carbono carbonílico (**Figura 3**).

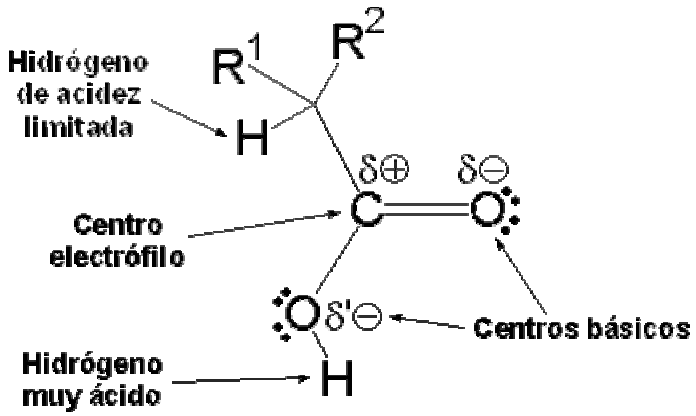


Figura 3. Estructura química de los ácidos carboxílicos.

Al contrario de los aldehídos y las cetonas, los ácidos carboxílicos y sus derivados se caracterizan por experimentar reacciones de sustitución nucleofílica (**Figura 4**).

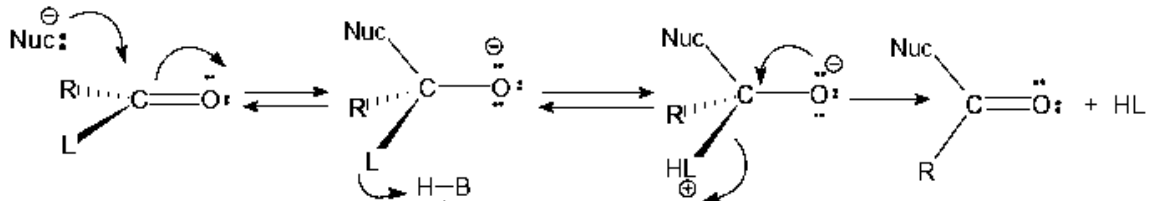


Figura 4. Mecanismo general del proceso de adición nucleofílica-eliminación.

Inicialmente se da un ataque nucleofílico sobre el carbono del grupo carboxílico. En la segunda fase del proceso, el intermediario tetraédrico formado, elimina un grupo saliente, lo que provoca la regeneración del doble enlace carbono-oxígeno y, por tanto, un producto de sustitución (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999).

1.4.1.1 Propiedades físicas de compuestos carboxílicos. La naturaleza polar del grupo carboxilo y su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con otros grupos de naturaleza química semejante, confiere a los ácidos carboxílicos puntos de ebullición y solubilidad en agua (H_2O), relativamente altos. No obstante, a medida que aumenta la longitud de la cadena hidrocarbonada, la solubilidad en H_2O disminuye; así, los ácidos con más de diez átomos de carbono son totalmente insolubles en agua. Como los alcoholes (*e.g.,* EtOH, MeOH), son menos polares que el H_2O, los ácidos de cadena larga se solubilizan mejor en estos solventes que en H_2O. Por otra parte, la mayoría de los ácidos carboxílicos son bastante solubles en solventes no polares como el cloroformo. La geometría del grupo carboxilo (**Figura 3**), permite la formación de dos enlaces de hidrógeno por molécula, de tal manera, que los ácidos carboxílicos más livianos, existen predominantemente como dímeros (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A.,

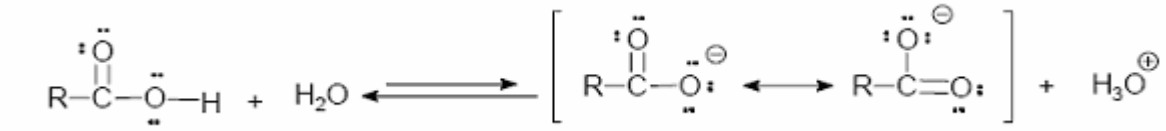
1999). Los puentes de hidrógeno del dímero no se rompen cuando el ácido se disuelve en un solvente polar, facilitando su solubilidad en el mismo.

Los ácidos carboxílicos con más de ocho átomos de carbono, por lo general, son sólidos, a menos que contengan enlaces dobles (especialmente, enlaces dobles *cis*-). Mientras que, en los ácidos dicarboxílicos la presencia de dos grupos funcionales en la molécula, intensifica las fuerzas de los puentes de hidrógeno, por lo que los puntos de fusión son muy altos (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999). En la **Tabla 7**, se presentan algunas propiedades físicas para la serie C_1-C_8 de ácidos carboxílicos.

Tabla 7. Propiedades físicas de la serie C_1–C_8 de ácidos carboxílicos.

Nombre	Fórmula	Punto de fusión, °C	Punto de ebullicón,°C	Solubilidad, g/100 mL H_2O
Fórmico	HCOOH	8	100.5	∞
Acético	CH_3COOH	16.6	118	∞
Propiónico	CH_3CH_2COOH	-22	141	∞
Butírico	$CH_3(CH_2)_2COOH$	-6	164	∞
Valérico	$CH_3(CH_2)_3COOH$	-34	187	3.7
Capróico	$CH_3(CH_2)_4COOH$	-3	205	1.0
Caprílico	$CH_3(CH_2)_6COOH$	16	239	0.7
Cáprico	$CH_3(CH_2)_8COOH$	31	269	0.2

1.4.1.2 Propiedades químicas de compuestos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos son las especies orgánicas más ácidas, debido a la estabilización por resonancia del ion carboxilato, que resulta de su disociación en H_2O (**Figura 5**) (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999).



Ácido carboxílico **Ion carboxilato**

Figura 5. Estructura de resonancia del ion carboxilato.

Los rangos de pK_a, se encuentran alrededor de 3-5, para la mayoría de los ácidos carboxílicos, haciéndolos, por lo menos, diez órdenes de magnitud más ácidos que los alcoholes (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999).

Un sustituyente que estabilice al ión carboxilato aumenta la disociación y la fuerza del ácido. De este modo, los átomos electronegativos incrementan la fuerza ácida, su efecto inductivo electrón-atrayente contribuye a deslocalizar la carga negativa del ión carboxilato. La magnitud del efecto depende de su distancia al grupo carboxilo; los sustituyentes en el carbono α son los más eficaces (Carey F. A. and Richard J., 1990; Carey F. A., 1999). El efecto inductivo se incrementa aún más, con dos grupos electrón-atrayentes en el átomo de carbono α.

1.4.2 Actividad biológica y toxicidad de los compuestos carboxílicos.

Los compuestos químicos que contienen la función carboxilo en sus moléculas, se metabolizan por varias rutas, conocidas como conjugación del ácido glucurónico, conjugación de la glicina, conjugación de la taurina y β-oxidación, aunque ocasionalmente, también se puede dar la conjugación de carnitina (**Figura 6**) (Kanazu T. y Yamaguchi T., 1997). Entre estos caminos metabólicos, la conjugación de glicina es una ruta muy común para los ácidos carboxílicos. Por

ejemplo, en seres humanos, el salicilato del sodio o la aspirina se conjugan con la glicina para formar el ácido salicilúrico (Levy G., 1965). En seres humanos y en ratas, el ácido benzoico se elimina exclusivamente vía la conjugación con la glicina (Bridges J. W. *et al*., 1970); sin embargo, esta eliminación también depende de la dosis.

Los ácidos orgánicos endógenos, tales como el ácido isovalérico, que se acumula produciendo acidemia orgánica y la hipoglicina, que causa la enfermedad jamaicana (Kanazu T. y Yamaguchi T., 1997), actúan conforme a la conjugación de glicina. La reacción de conjugación con la glicina se produce tanto en el hígado, como en el riñón; sin embargo, este último presenta actividad sintética baja, por lo que en estos casos, el hígado es el órgano más importante, además, su masa excede considerablemente la de los riñones (Kanazu T. y Yamaguchi T., 1997).

Al igual que los alcoholes y los aldehídos, los ácidos carboxílicos se absorben a través del tracto gastrointestinal o respiratorio (Katz G. V. y Guest D., 1994), de donde pasan al torrente sanguíneo. El tiempo de vida media de estos compuestos en el plasma es difícil de predecir, dado que muchos aldehídos y ácidos de bajo peso molecular (*e.g.,* ácido propiónico) son endógenos en humanos. Antes de la absorción, los aldehídos alifáticos simples pueden experimentar la oxidación para producir los correspondientes ácidos carboxílicos. El ácido reacciona luego con la coenzima A (CoA), para formar el respectivo éster, que entonces participa en el camino del ácido graso y el ciclo del ácido tricarboxílico.

Los ácidos de cadena media se condensan con acetil CoA, para formar ácidos grasos (*e.g.,* C_{10}-C_{18}), o bajo oxidación omega, para formar diácidos, que luego son metabolizados vía β-oxidación en el ciclo de los ácidos grasos (Katz G. V. y Guest D., 1994). Los ácidos carboxílicos ramificados se transforman en cadenas

ramificadas más largas, vía β-oxidación, seguidas por rompimiento para producir fragmentos ácidos lineales, los cuales se oxidan completamente hasta CO_2 y H_2O, siguiendo el camino del ácido graso o el ciclo del ácido tricarboxílico.

El potencial tóxico de estas sustancias es consecuencia de su reactividad metabólica común. En el **Anexo 3**, se presentan los valores de LC_{50}, LD_{50}, LDLo, determinados para la serie de ácidos carboxílicos (C_1-C_{10}) y el ácido benzóico.

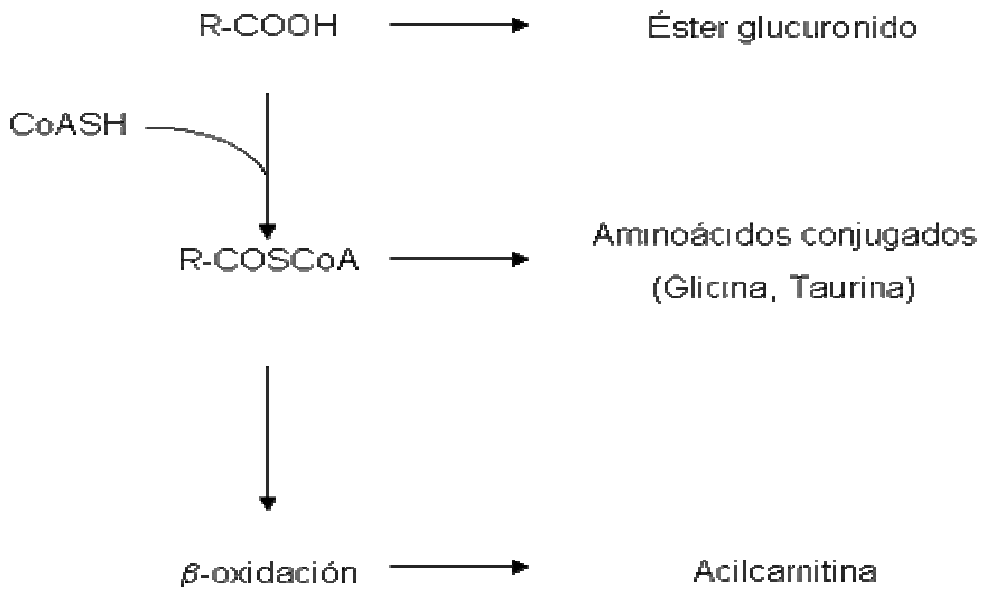


Figura 6. Camino metabólico para los ácidos carboxílicos (Kanazu T. y Yamaguchi T., 1997).

1.4.3 Fuentes e importancia ambiental de los compuestos carboxílicos. Los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular son componentes ubicuos en las fases acuosa y gaseosa, de la troposfera y en partículas de aerosoles. Su presencia ha sido detectada en ambientes marinos y continentales, en atmósferas urbanas, rurales y alejadas, en bosques tropicales y en zonas templadas (Chebbi A. y Carlier P., 1996).

El papel de los ácidos carboxílicos como componentes químicos en la troposfera, es variado y de gran importancia; gracias a su naturaleza polar éstos pueden estar implicados en transformaciones atmosféricas y contribuir a la formación de oxidantes fotoquímicos. Puesto que tienen pesos moleculares bajos y polaridades altas, son solubles en H_2O y representan, junto con los compuestos carbonílicos, una fracción importante del carbono orgánico total en niebla, nubes y en las precipitaciones (Chebbi A. y Carlier P., 1996). Los ácidos carboxílicos también son relevantes en la química atmosférica, porque influyen significativamente sobre la acidez de las precipitaciones en regiones alejadas y en zonas urbanas y/o industriales (Keene W. C. y Galloway J. N., 1984; Andreae M.O. *et al*., 1988).

Aunque las especies carboxílicas detectadas en muestras de lluvia, recogidas en áreas urbanas, rurales y forestales en diferentes zonas del mundo incluyen ácidos mono- y dicarboxílicos (C_1-C_{30}) (Lunde G. *et al*., 1977; Kawamura K. y Kaplan I. R., 1985; 1986), los ácidos fórmico y acético, predominan, en particular, en áreas alejadas, donde a menudo son los únicos ácidos carboxílicos medidos. De esta forma, la acidificación en áreas alejadas se debe, principalmente, a la presencia de los ácidos fórmico y acético, aunque pueden presentarse otras especies (Lunde G. *et al*., 1977); mientras que en áreas industriales, los ácidos sulfúrico y nítrico, dominan la influencia sobre el pH de las aguas lluvia (Chebbi A. y Carlier P., 1996). Keene y colaboradores (1983) estimaron que los ácidos carboxílicos, en particular, los ácidos fórmico y acético, pueden contribuir con la acidez de la

precipitación en los E.E.U.U, en un 16-35%. La contribución de estos ácidos a la acidez de la precipitación en áreas no urbanas, puede alcanzar valores del 65% (Galloway J. N. *et al*., 1982).

Los ácidos orgánicos también juegan un papel significativo en la troposfera. Debido a sus presiones parciales altas, particularmente, los ácidos fórmico y acético son las especies más abundantes, especialmente, en atmósferas urbanas contaminadas. Las concentraciones de estos ácidos en fase gaseosa presentan variaciones diurnas (Talbot R. W. *et al.,* 1988) y estacionales (Grosjean D., 1989), observándose concentraciones más altas en el día y durante el verano.

Debido a que los ácidos dicarboxílicos son menos volátiles y tienen presiones de vapor más bajas (por un factor entre 10^2-10^4) que las de los correspondientes ácidos monocarboxílicos, son las especies carboxílicas predominantes en las partículas de aerosol, sobretodo, en las atmósferas contaminadas. Kawamura K. y Kaplan I. R., (1987), detectaron la presencia de la serie de diácidos C_2-C_{10}, en el aire de Los Ángeles, encontrando como la especie principal el ácido oxálico, seguida de los ácidos succínico, malónico, maléico, adípico y ftálico. Aunque una pequeña fracción de estos diácidos fue detectada en la fase vapor, la composición principal fue asociada a las partículas de aerosol; los autores sugieren la posibilidad que algunos diácidos de peso molecular bajo (*e.g.,* oxálico) pasen a la fase vapor, bajo condiciones de temperatura elevadas. Posteriormente, Satsumabayashi H. y colabroadores (1990), reportaron la presencia de la serie dicarboxílica (C_2-C_{10}), en regiones rurales afectadas por la contaminación del área metropolitana de la bahía de Tokio (Japón); el ácido succínico fue la especie más abundante, seguida de los ácidos malónico y ftálico. Estudios más recientes sobre la distribución molecular de ácidos dicarboxílicos, indican el predominio del ácido oxálico, seguido del ácido malónico o del ácido succínico (Kawamura K. y Ikushima K., 1993).

1.4.3.1 Fuentes biogénicas. Las fuentes biogénicas primarias de ácidos carboxílicos en la atmósfera abarcan emisiones de procesos metabólicos bacterianos, de hormigas (ácido fórmico) y del suelo y de la vegetación (Chebbi A. y Carlier P., 1996).

Las emisiones biogénicas de la vegetación, desempeñan un papel predominante dentro del "presupuesto" de ácidos orgánicos troposféricos (Andreae M. O. *et al*., 1988). Los árboles son emisores directos de los ácidos fórmico y acético; Kesselmeier J. y Staudt M. (1999) estimaron emisiones anuales globales, en el continente europeo, de 1-6 y de 0,6-2 Tg ($=10^{12}$ g) /año para los ácidos fórmico y acético, respectivamente. Tales números reflejan una contribución del 15-30% por las emisiones directas del bosque, al contenido global de ácidos orgánicos en Europa.

La emisión biogénica indirecta desde la vegetación, está representada por el isopreno, el cual se puede oxidar para generar los ácidos, fórmico y pirúvico (Andreae M. O. *et al*., 1988; Chebbi A. y Carlier P., 1996).

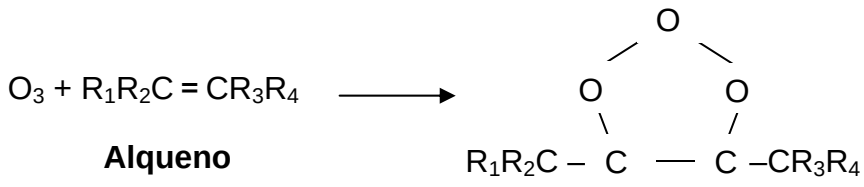
1.4.3.2 Fuentes antropogénicas. Las emisiones directas desde varias fuentes antropogénicas incluyen residuos animales, combustión de plásticos, emisiones desde fábricas de productos químicos y de alimentos, humo del tabaco, incineración de basura, entre otras. Sin embargo, las contribuciones más importantes a nivel global están asociadas con la combustión de la biomasa y las emisiones a través de los tubos de escapes de motores. En el primer caso, se tienen actividades asociadas con la combustión en estufas caseras y hornos industriales, que funcionan a base de madera; incendios forestales y quemas agrícolas. Talbot R. W. y colaboradores (1988), estudiaron los volátiles liberados después de quemar madera seca y vegetación verde fresca, encontrando

concentraciones muy altas de los ácidos fórmico y acético generados directamente sobre el fuego, en los rangos de 300-500 y 3000- 5000 partes por billón por volumen (*ppbv*), respectivamente. Estas concentraciones fueron de 2 a 3 órdenes de magnitud más altas que las detectadas en la misma región, pero lejos del fuego.

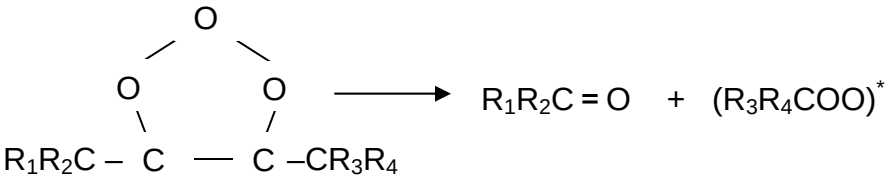
Las emisiones de tubos de escape (productos de la quema incompleta del combustible o de sus aditivos), constituyen una de las fuentes principales de ácidos orgánicos en la atmósfera. Kawamura K. y Kaplan I. R. (1985), detectaron ácidos orgánicos de bajo peso molecular en aire ambiental (Los Ángeles) y en el tubo de escape de un motor de auto deteriorado. La distribución de los ácidos individuales fue similar en aire y en el tubo de escape, pero las concentraciones fueron 17 veces más altas en este último. En esta mezcla de ácidos predominaron los ácidos acético y fórmico, seguidos del ácido propiónico. Posteriormente, Kawamura K. y Kaplan I. R. (1987), encontraron una gran similitud en la fracción de ácidos dicarboxílicos (C_2-C_{10}), presente en el aire de zonas urbanas y la fracción emitida por motores de vehículos. Las concentraciones de estos ácidos en los tubos de escape de los motores a base de gasolina y de combustible Diesel, fueron 28 y 144 veces más altas, respectivamente, que el promedio de concentraciones atmosféricas. Talbot R. W. y colaboradores (1988), también investigaron las emisiones de ácidos fórmico y acético en un túnel a través del cual pasan cerca de 10^5 vehículos por día, y concluyeron que los vehículos de motor emiten estos ácidos directamente a la atmósfera.

1.4.3.3 Producción fotoquímica. Los principales mecanismos de producción de ácidos carboxílicos, en fase gaseosa atmosférica, incluyen ozonólisis de olefinas y reacciones con radicales peroxiacilo (Chebbi A. y Carlier P., 1996). Los mecanismos exactos de las reacciones del O_3 con varias olefinas no están todavía

completamente elucidados. En el esquema general, las reacciones proceden por adición electrofílica del O_3 al enlace insaturado de las olefinas. El primer paso es una cicloadición 1,3-dipolar del ozono al alqueno, que conduce a la formación del ozónido primario 1,2,3-trioxolano (**Ecuación 9**), el cual se descompone rápidamente para dar un compuesto carbonilo (aldehído o cetona) y un óxido carbonilo o intermedio de Criegee (**Ecuación 10**) (Atkinson R. y Arey J., 1998).



Alqueno **Ozónido primario** **Ecuación 9**



Ozónido primario **Compuesto carbonílico** **Radical Criegee** **Ecuación 10**

Donde R_1, R_2, R_3, y R_4, son H o sustituyentes alquilo (CH_3, C_2H_5, *etc*.). Los intermediarios Criegee, pueden descomponerse unimolecularmente, generando otros radicales (*e.g.*, $OH^{\bullet}$, $HO2^{\bullet}$), o isomerizarse, para producir ácidos carboxílicos (Chebbi A. y Carlier P., 1996).

Reacciones atmosférica de radicales peroxilo y peroxiacilos.

Los radicales peroxiacilo $RCO(OO)^{\bullet}$ se producen por degradación atmosférica de compuestos orgánicos volátiles (Atkinson R., 1990). La fotólisis parcial de hidrocarburos oxigenados y su reacción con radicales $OH^{\bullet}$ y NO_3, seguida de la adición rápida de la molécula O_2, son fuentes importantes de estas especies químicas (**Ecuaciones 12-14**):

$$RCOR + h\nu + 2O_2 \rightarrow RCO(OO^{\bullet}) + R(OO) \qquad \textbf{Ecuación 12}$$

$$RCHO + OH^{\bullet} + O_2 \rightarrow RCO(OO^{\bullet}) + H_2O \qquad \textbf{Ecuación 13}$$

$$RCHO + NO_3^{\bullet} + O_2 \rightarrow RCO(OO^{\bullet}) + HNO_3 \qquad \textbf{Ecuación 14}$$

La descomposición térmica de PANs, también es importante fuente de radicales peroxiacilo (**Ecuación 15**):

$$RC(O)OONO_2 \rightarrow RCO(OO^{\bullet}) + NO_2 \qquad \textbf{Ecuación 15}$$

Los radicales peroxiacilo reaccionan, principalmente, con NO y NO_2, para producir, respectivamente, PANs, en dirección opuesta a la reacción de la **Ecuación 15**.

1.5 TÉCNICAS DE MONITOREO DE AIRE

Existen varias metodologías analíticas para el monitoreo de aire, las cuales van desde los métodos de *screening*, menos sofisticados, en los que se utilizan instrumentos de lectura directa con la exactitud y la precisión relativamente bajas, hasta los métodos de recolección, que son más precisos y exactos. En ambos casos se incluyen tanto el muestreo de aire, como la detección y la cuantificación

de los contaminantes. En el **Anexo 4,** se resumen las técnicas generales de monitoreo de aire.

Las técnicas de recolección para monitoreo de aire permiten, ya sea la toma de una muestra completa en un recipiente adecuado [bombonas de acero inoxidable, bolsas de poli(propileno), *etc*.] o el muestreo y la concentración simultáneos de los compuestos químicos, sobre alguna clase de material sorbente. A diferencia de los métodos de *screening*, estas técnicas permiten alcanzar mayor sensibilidad y brindan mayor precisión y exactitud en la cuantificación. El proceso global incluye el atrapamiento de los analitos, transporte al laboratorio y análisis de la muestra; las tres etapas tienen la misma importancia en el proceso y deben ser realizadas con sumo cuidado a fin de obtener resultados confiables (Harper M., 2000).

A su vez, cada una de las metodologías para la toma de muestras de aire, puede involucrar muestreo activo o pasivo (difuso). En el primer caso, se utilizan fuentes de energía y bombas, para impulsar el aire a una velocidad de flujo constante, a través del medio de muestreo (sorbente sólido, absorbentes líquidos o cualquier otro equipo apropiado). Por el contrario, el muestreo pasivo, depende sólo de la energía cinética de las moléculas gaseosas y de su difusión hacia el sistema de recolección (Khaled A. y Pawliszyn J., 2000). El muestreo activo puede aplicarse por períodos de tiempo largos, lo que permite obtener datos sobre niveles promedio de contaminante. Entre sus desventajas figuran los costos y la complejidad del equipo, que incrementa la probabilidad de errores durante la toma de muestras.

El monitoreo de la calidad del aire requiere metodologías sensibles, precisas y con límites de detección bajos, especialmente, para el estudio de muestras ambientales, donde los analitos se presentan en concentraciones relativamente bajas o a nivel de trazas. Para alcanzar los límites de detección de las técnicas

analíticas comúnmente aplicadas, es necesario concentrar las muestras antes de su análisis (Dettmer K. y Engewald W., 2002). Entre los métodos de concentración más aplicados a los contaminantes de aire figuran las siguientes: atrapamiento criogénico, adsorción sobre sorbentes sólidos (tubos o cartuchos con sorbentes) y derivatización química (Clements J. B. y Lewis R. G., 1993).

La limpieza de los medios sólidos y la desorción (elución) de los analitos atrapados sobre sus superficies, empleando extracción líquida, puede llegar a ser un proceso largo, y multi-etapa, particularmente, cuando la metodología involucra la extracción Soxhlet (Scharf J. y Sarafin R., 1995). Entre los solventes más usados para la elución de hidrocarburos, figura el disulfuro de carbono (CS_2), éste también emerge rápidamente de muchas columnas cromatográficas y genera una respuesta del detector de ionización en llama (FID) muy baja. No obstante, puede reaccionar con algunos compuestos (*e.g.,* aminas) e interferir con los análisis de ciertos compuestos clorados volátiles. Además, el CS_2 no es apropiado para el detector de captura de electrones (ECD), es altamente tóxico y tiene un olor muy desagradable (Harper M., 2000).

Una excelente alternativa a la extracción líquida es la desorción térmica, que constituye una técnica más amigable para el ambiente, puesto que no requiere disolventes, lo que, a su vez, disminuye la posibilidad de contaminación cruzada de la muestra durante su preparación (Harper M., 2000). Con los dispositivos de desorción térmica, disponibles comercialmente, para adaptar a los sistemas cromatográficos, la sensibilidad mejora notoriamente (Harper M., 2000). En estos sistemas las sustancias desorbidas son reatrapadas, en un medio líquido (*e.g.,* nitrógeno líquido) o sobre una superficie sólida (*e.g.,* sorbentes poliméricos, Tenax®, Porapack, *etc*.), antes de ser transferidas a la columna cromatográfica, lo que mejora sustancialmente la resolución de picos (Oliver K. D. *et al.*, 1996).

La desorción térmica es una técnica muy apropiada para el análisis de contaminantes ambientales, aunque su éxito está condicionado por la correcta selección del sorbente para el muestreo. En la actualidad, se comercializa una amplia variedad de adsorbentes sólidos para monitoreo de aire (**Anexo 5**); todos difieren en el número y el tipo de sustancias que pueden atrapar, y en la cantidad de adsorbato que son capaces de retener (Dettmer K. y Engewald W., 2002). Los adsorbentes se subdividen de acuerdo con su naturaleza química, en polímeros orgánicos, polvos inorgánicos y adsorbentes carbonados.

Los polímeros orgánicos porosos, constituyen un grupo grande de adsorbentes con diferentes áreas de superficie y polaridad, entre los cuales figuran las resinas poliméricas porosas de óxido de 2,4-difenil-*p*-fenileno, conocido comercialmente como Tenax®, y las resinas copoliméricas de estireno-divinilbenceno (**Anexo 6**) (Clements J. B. y Lewis R. G., 1993). Estos materiales tienen la característica importante de poder atrapar cantidades mínimas de H_2O, lo que favorece el muestreo de grandes volúmenes de aire. Sin embargo, su aplicación en combinación con la desorción térmica se ve limitada, debido a la baja estabilidad térmica que muestran varios de ellos y a su capacidad muy reducida para atrapar compuestos orgánicos muy volátiles (*e.g.,*, cloruro de vinilo) y sustancias polares de bajo peso molecular (*e.g.,* alcoholes y cetonas). Aunque el material polimérico Tenax® se caracteriza por la estabilidad térmica alta, éste no es apropiado para compuestos orgánicos altamente volátiles, debido a su baja área superficial. Adicionalmente, durante su utilización el polímero se degrada liberando benzaldehído, octanal, nonanal, decanal y acetofenona, además puede reaccionar con el O_3 y los NO_x presentes en la atmósfera (Dettmer K. y Engewald W., 2002).
El muestreo y concentración con sorbentes, en combinación con la desorción térmica y la cromatografía de gases (GC), es de gran utilidad en el análisis atmosférico de compuestos orgánicos tóxicos no polares (**Tabla 8**). Sin embargo, su aplicación para la determinación de compuestos más polares en este tipo de

matrices, es aún un desafío, ya que éstos tienden a adherirse al medio de muestreo y durante la desorción pueden perderse en las superficies de los inyectores y las columnas (Masqué N. *et al.*, 1999).

En el 2002, Dettmer y colaboradores, reportaron el uso de *Carbotrap X* y *Carbograph* 5, para el muestreo de compuestos oxigenados de peso molecular bajo (acetaldehído, propanaldehído, acroleína, metacroleína y acetona) en muestras gaseosas, bajo atmósferas húmedas. Los resultados mostraron pérdidas significativas (60%) para propanaldehído y acroleína, inmediatamente después del muestreo sobre *Carbotrap X*. Los autores atribuyen estas pérdidas a la adsorción irreversible de los analitos sobre sitios activos (o impurezas) de la superficie del adsorbente. La recuperación de los compuestos carbonílicos remanentes varió entre el 68% para el acetaldehído y el 80% para la acetona. Las recuperaciones relativas de los analitos obtenidas en *Carbograph* 5, inmediatamente después del muestreo, fueron superiores al 80%, a excepción del propanaldehído (77%). Sin embargo, después de 7 días de almacenamiento de los tubos a 25 °C, su recuperación fue sólo del 16%. En general, se requiere el análisis inmediato de las muestras para evitar pérdidas de los analitos durante su almacenamiento (Dettmer K. y Engewald W., 2002).

Los analitos polares pueden convertirse a formas químicas menos polares, menos volátiles y térmicamente más estables, gracias a la combinación de los sorbentes sólidos con la derivatización química, que permiten la determinación analítica muy sensible de estos contaminantes en muestras de aire (Hollender J. *et al.*, 2002). Recientemente, Ho S. H. y Yu J. Z. (2002) reportaron la derivatización de aldehídos (formaldehído, acetaldehído, benzaldehído, glioxal y metilglioxal) sobre sólidos poliméricos. En su trabajo, los autores usaron Tenax® enlazado al agente derivatizante *o*-(2,3,4,5,6-pentaflúorbencil)hidroxilamina (PFBHA), para atrapar los analitos de interés en forma de sus oximas, las cuales fueron desorbidas

térmicamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases y analizadas con detector selectivo de masas (MSD). Usando este método, los investigadores alcanzaron a determinar los aldehídos en el aire, en niveles de ng/m^3 y sub-ng/m^3.

Tabla 8. Métodos estándar para muestreo de compuestos tóxicos en aire.

Método	Descripción: Técnica de colección/Sistema de análisis	Tipos de compuestos determinados
TO-1	Tenax® / GC-MS	Orgánicos volátiles no polares (*e.g.*, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos clorados) con puntos de ebullición en el rango de 80 °C a 200 °C.
TO-2	Mallas de carbón molecular / GC-MS	Orgánicos no polares altamente volátiles (*e.g.*, cloruro de vinilo, benceno y tolueno), con puntos de ebullición en el rango de -15 a +120 °C.
TO -3	Atrapamiento criogénico / GC/FID o GC/ECD	Orgánicos no polares altamente volátiles, con puntos de ebullición en el rango de -10 a +200 °C.
TO -4	Espuma de poliuretano de alto volumen (PUF) / GC/ECD	Pesticidas organoclorados y PCB´s
TO -5	Burbujeadores con solución de dinitrofenilhidracina (DNPH) / HPLC-UV	Aldehídos y cetonas
TO -6	Burbujeadores con solución líquida de anilina / HPLC	Fosgeno
TO -7	Adsorción sobre Thermosorb-N	N-Nitrosodimetilamina
TO -8	Burbujeadores con solución de hidróxido de sodio /HPLC	Cresol, fenol
TO -9	Espuma de poliuretano de alto volumen (PUF)/ GC-HRMS	Dioxinas (dibenzo-*p*-dioxinas policloradas); dibenzofuranos policlorados
TO -10	Espuma de poliuretano de bajo volumen (PUF)/ GC/ECD	Pesticidas
TO -11	Cartuchos de gel de sílice impregnados con DNPH/ HPLC	Formaldehído
TO -12	Preconcentración criogénica y detección directa con ionización en llama	Compuestos orgánicos no metanogénicos (NMOC)
TO -13	PUF-XAD2 /GC y HPLC	Hidrocarburos poliaromáticos (PAH´s)

Fuente: Compendio de métodos para la determinación de compuestos orgánicos tóxicos en aire. EPA/600/4-89/017 (U.S. EPA, 1999).

1.5.1 Análisis de compuestos carbonílicos en aire. Para el análisis de compuestos carbonílicos en aire se han reportado varias metodologías (**Tabla 9**), las cuales varían según su sensibilidad, así como en el número y la clase de analitos que pueden ser detectados. Indudablemente, el método más utilizado para la determinación de aldehídos y cetonas en aire, combina la reacción de derivatización con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNPH) y el posterior análisis de los derivados obtenidos, mediante la cromatografía líquida de alta eficiencia con detector ultravioleta (HPLC-UV) (Sakuragawa A. *et al*. 1999; Levart A. and Veber M., 2001; Sandner F. *et al*., 2001, U.S. EPA, 1999). Aunque esta metodología permite alcanzar buenos resultados, su aplicación presenta ciertos inconvenientes y limitaciones, a saber:

- Los límites de detección alcanzados dependen del número de átomos de carbono presentes en la molécula. Compuestos carbonílicos muy volátiles, tales como formaldehído, acetaldehído y acetona, pueden detectarse a nivel de 0.4 *ppbv* en 60 L de aire. Sin embargo, para la detección de compuestos con más de 5 átomos de carbono, se requiere concentrar la muestra a partir de cientos de litros de aire.

- La resolución de las columnas empleadas, en cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), no permite separar todos los compuestos isoméricos con número de carbonos entre 5 y 12 (Possanzini M. *et al.*, 2000). Con frecuencia se utiliza cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con ionización química (GC-CIMS) (Kolliker S. *et al.*, 1998; Grosjean E. *et al*., 1999). Sin embargo, esta técnica es bastante costosa y requiere estándares para la identificación de los compuestos.

- Cuando la muestra contiene NO_2 en concentraciones altas, éste compite con los compuestos carbonílicos por la 2,4-DNPH y genera 2,4-dinitrofenilazida, la cual presenta un comportamiento cromatográfico similar al de la 2,4-dinitrofenilhidrazona de formaldehído (Buldt A. y Karst U., 1999; Suliman E. O., 2002).
- El O_3 presente en la muestra puede reaccionar con los compuestos carbonílicos y sus respectivas hidrazonas y generar una gran cantidad de subproductos que pueden coelir en la columna con diferentes hidrazonas. Para solucionar estos inconvenientes se hace necesario adaptar trampas para O_3 y NO_x, en el sistema de muestreo (Possanzini M. *et al.,* 2000).

Otro agente derivatizante que se utiliza en combinación con la HPLC, para la determinación de compuestos carbonílicos, es el 5-(dimetilamino) naftaleno-1-sulfohidrazida, conocido comúnmente como dansilhidracina (DNSH), el cual reacciona generando hidrazonas fluorescentes (**Tabla 9**) (Nondek L. *et al*., 1992; Houdier S. *et al.*, 1999). Al igual que en los métodos que emplean 2,4-DNPH, el O_3 representa una interferencia negativa seria, lo que limita la amplia aplicación de esta técnica (Rodler D. R. *et al.*, 1993).

Lehmpuhl D. W. y Birks J. W. (1996) aprovecharon la naturaleza química de la 2,4,6-triclorofenilhidracina, para derivar aldehídos y cetonas y analizar sus respectivas hidrazonas mediante CG/ECD (**Tabla 9**). Este método es sencillo, presenta buena sensibilidad y en él, las interferencias relativas al O_3 (~300 *ppbv*) son eliminadas con una trampa de tiosulfato de sodio. Su principal desventaja está dada por la presencia de formaldehído en el blanco, lo cual limita la detección sensible y reproducible de este analito en concentraciones de 0.1 *ppbv*, en una muestra de 10 L de aire.

Tabla 9. Metodologías analíticas aplicadas al estudio de compuestos carbonílicos en aire.

Analitos	Sistema de muestreo	Agente derivatizante/ Productos	Sistema de detección	LOD	Referencias
Alcanales C_2-C_5, benzaldehído, 2,5-dimetilbenzaldehído, crotonaldehído, *o*-, *m*- y *p* –tolualdehídos, acetona, metil-etil-cetona	Sistema dinámico Cartuchos rellenos con gel de sílice, C_{18}, enlazada con DNPH	DNPH/ 2,4-Dinitrofenilhidrazonas	HPLC/UV/DAD (350 nm)	0.5-100 ng/m^3 60 L	U.S. EPA, 1999
Alcanales C_1-C_6, acroleína, metacroleína, crotonaldehído, acetona, 2-butanona	Sistema dinámico Cartuchos rellenos con gel de sílice, C_{18}, enlazada con DNPH	DNPH/ 2,4-Dinitrofenilhidrazonas	HPLC/UV/DAD (365 nm)	0.05-0.4 µg/m^3 60 L	Sandner F. *et al*., 2001
Alcanales C_1-C_2, acroleína, acetona	Sistema dinámico Cartuchos rellenos con gel de sílice, C_{18}, enlazada con DNPH	(DNPH/ 2,4-Dinitrofenilhidrazonas	HPLC/UV/DAD (360 nm) HPLC-MS	ng/m^3 20 L	Akio S. *et al.*, 1999
Alcanales C_1-C_4, acetona, benzaldehído	Atrapamiento por criogenización y posterior derivación con solución de DNPH	DNPH/ 2,4-Dinitrofenilhidrazonas	HPLC/UV/DAD (360 nm)	0.01-0.1 µg/m^3 100 L 0.02-0.2 µg/m^3 50 L	Levart A. y Veber M., 2001
Alcanales C_1-C_{12}	Sistema dinámico Trampas de carbón grafitizado con diferentes áreas de superficie, seguidas de cartuchos rellenos con gel de sílice, C_{18}, enlazada con DNPH.	DNPH/ 2,4-Dinitrofenilhidrazonas	GC-MS/ desorción térmica (sorbentes de carbón) HPLC/UV/DAD (360 nm)	C_2-C_7: 1.0-1.5 µg/m^3 C_8-C_{10}:2.0-5.0 µg/m^3 10-20 L de aire	Possanzine M. *et al.*, 2000

Tabla 9, Continuación.

Analitos	Sistema de muestreo	Agente derivatizante/ Productos	Sistema de detección	*LOD*	Referencias
Alcanales C_1-C_2	Sistema dinámico Microcartuchos de vidrio con lechos de vidrio poroso enlazado con dansilhidracina (DNSH)	DNSH Dansilhidrazonas	HPLC/UV/DAD	C_1: 0.13 µg/m^3 C_2: 0.20 µg/m^3 1 L	Nondek L. *et al*., 1992
Alcanales C_1-C_8, benzaldehído, metacroleína, crotonaldehído, 2-metil-butiraldehído, acetona, 2-butanona, metil-vinil-cetona, 2-heptanona, *trans*-2-hexenal	Sistema dinámico Cartuchos rellenos con gel de sílice, C_{18}, enlazada con 2,4,6-triclorofenilhidracina (TCPH)	TCPH/ Triclorofenilhidrazonas	GC/ECD	C_1: 0.13 µg/m^3 otros aldehídos: 0.02-0.03 ng/m^3 10 L	Lehmpuhl D. W. y Birks J. W., 1996
Alcanales C_1-C_{11}	Cartuchos rellenos con gel de sílice, C_{18}, enalzada con PFPH	(PFPH)/ (*E*)- y (*Z*)-Pentaflúorfenilhidrazonas	GC-MS/SIM	20 fg/m^3 20 L	Cecinato A. *et al*., 2001
Alcanales C_1-C_2, benzaldehído, glioxal, metilglioxal	Atrapamiento sobre Tenax®	(PFBHA)/Oximas	GC-MS con Desorción térmica	Sub-ng/m^3 4.8 L	Ho S. H. y Yu J. Z., 2002
trans-hexenal, benzaldehído, 2-heptanona, acetofenona	Atrapamiento sobre Tenax®	(PFBHA)/Oximas	GC-MS/SIM	µg/m^3 1.5 L	Strassing S.*et al.*, 2000

LOD: Límite de detección (por su abreviatura en ingles).

Cecinato A. y colaboradores (2001), utilizaron pentaflúorfenilhidracina (PFPH), como agente derivatizante de compuestos carbonílicos (**Tabla 9**). La presencia de cinco átomos de flúor en estas moléculas, permite obtener derivados estables, que pueden ser analizados con sensibilidad alta utilizando el MSD, operado en el modo de monitoreo de ion seleccionado (SIM) (Cecinato A. *et al.*, 2001) o el ECD (Stashenko E. E. *et al.,* 1997).

También se ha reportado la utilidad de las *o*-oximas, para la determinación cromatográfica de compuestos carbonílicos; entre los reactivos usados figuran clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina (Levine S. P. *et al.*, 1981), clorhidrato de *o*-bencilhidroxilamina (Matsunaga S. y Kawamura K., 2000) y el clorhidrato de *o*-(2,3,4,5,6-pentaflúorbencil)-hidroxilamina (PFBHA) (Frazey P. *et al.*, 1999; Destaillats H. y Charles M. J., 2002).

Recientemente, Ho S. H. y Yu J. Z., (2002) reportaron la derivatización de aldehídos (formaldehído, acetaldehído, benzaldehído, glioxal y metilglioxal) sobre sólidos poliméricos. En su trabajo, los autores usaron Tenax® enlazado al agente derivatizante PFBHA, para atrapar los analitos de interés, los cuales en forma de oximas, fueron desorbidos térmicamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases y analizados por MSD. Con este método, los investigadores alcanzaron a determinar los aldehídos presentes en el aire, en niveles de *ppbv* y sub-*ppbv*. Una metodología similar fue aplicada por Strassing S. (2000), para analizar *trans*-hexenal, benzaldehído, 2-heptenona y acetofenona; después de hacer pasar 1.5 L de aire a través del cartucho de Tenax®, los derivados sufrieron desorción líquida y fueron analizados mediante GC-MS/SIM. En este caso, los límites de detección fueron del orden de los *ppmv*.

1.5.2 Análisis de compuestos carboxílicos en aire. Los procedimientos más comunes para analizar ácidos carboxílicos en muestras de aire ambiental y emisiones de vehículos, incluyen una primera fase de recolección de los analitos en trampas alcalinas de naturaleza sólida o líquida. Entre las trampas más usadas figuran los filtros de cuarzo o Whatman, impregnados con hidróxido de potasio (KOH) (Kawamura K. y Kaplan I. R., 1985; Nolte C. G., 1999) o carbonato de sodio Na_2CO_3 (Allen A. G. y Miguel A. H., 1995) los cartuchos de gel de sílice C_{18}, enlazados con KOH (Grosjean D. *et al.*, 1990; Docherty K. y Ziemann P. J., 2001) y *Denuder tubes* con KOH (Lawrence J. E. y Koutrakis P., 1996) o Na_2CO_3 (Puxbaum H. *et. al.,* 1988). Los ácidos también han sido atrapados en agua pura y en soluciones acuosas de KOH (Kawamura K. y Kaplan I. R., 1985); o de Na_2CO_3 (Dabek-Zlotorzynska E. *et. al.*, 2001).

Cada uno de estos métodos generalmente emplea un filtro de Teflón^{TM} o Nucleopore^{TM}, para remover partículas, antes de atrapar los vapores orgánicos. Los analitos son separados con un solvente orgánico apropiado, comúnmente agua. Todos los autores afirman que, este medio tiene una eficiencia mayor del 90%, pero los valores dependen de las condiciones de operación, tales como flujo de gas y la concentración de los ácidos orgánicos en fase gaseosa, entre otras (Dabek-Zlotorzynska E. *et al.*, 2001).

Las técnicas analíticas utilizadas para medir ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en muestras de aire y/o de tubos de escapes de vehículos, incluyen: cromatografía iónica (IC) (Barcelona M. J. *et al.*, 1980), HPLC, electroforesis capilar (CE) (Dabek-Zlotorzynska E. *et al*., 2001) y GC (Chien C-J. *et al.*, 1998). La aplicación directa de la IC, CE y HPLC suele ser relativamente sencilla y económica, sin embargo, posee baja eficiencia en la separación y poca selectividad, e involucra tiempos de análisis largos (Dabek-Zlotorzynska E. *et al*., 2001). Por otra parte, la fracción ácida de las moléculas reacciona fácilmente con

la fase estacionaria de las columnas cromatográficas, aumentando así la retención de los analitos y bajando sustancialmente la resolución cromatográfica. Por lo que, para lograr un análisis seguro de ácidos orgánicos mediante GC (Docherty K. y Ziemann P. J., 2001) y HPLC (You J. *et al.*, 2001), es necesario llevar a cabo la derivatización de analitos, previa al análisis cromatográfico (Blau K. y Halket J. M., 1993).

La derivatización de los ácidos, comúnmente ocurre por mecanismos de alquilación o sililación (Blau K. y Halket J. M., 1993; Docherty K. y Ziemann P.J., 2001). Para la conversión de los ácidos a sus ésteres, se han utilizado diferentes reactivos, entre los cuales se incluyen BF_3/butanol (Kawamura K., 1993), BF_3/metanol (Lawrence J. E. y Koutrakis P., 1996; Cecinato A. *et. al.*, 2001), diazometano (Rogge W. F. *et al*., 1993), bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) (Chien C-J. *et al.*, 1998) y dibromoacetofenona (Nolte C. G. *et al*., 1999). La esterificación con compuestos diazo, es un método común en la determinación de los ácidos carboxílicos; la reacción es rápida, el rendimiento es alto y los productos colaterales son mínimos (Schneede J. y Ueland P. M., 1992). Las mayores desventajas de este reactivo son su toxicidad e inestabilidad durante el almacenamiento (Blau K. y Halket J. M., 1993). En algunos casos, se prefiere la reacción de los ácidos con reactivos de trimetilsililo (TMS); aunque éstos son sensibles a la humedad y deben ser combinados con solventes apróticos, ofrecen grandes ventajas en cuanto a velocidad de reacción (Docherty K. y Ziemann P. J., 2001).

La esterificación de ácidos carboxílicos con PFBBr, permite obtener derivados altamente fluorados, los cuales tienen excelentes propiedades cromatográficas y pueden ser detectados en muy bajas concentraciones, por GC/ECD o cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas con trampa iónica e ionización química (GC-MS/ITCI) (Blau K. y Halket J. M., 1993; Frazey P. *et al.*,

1999). En general, la técnica más usada para la determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en aire es la GC (**Tabla 10**).

En 1998, Chien y colaboradores reportaron el análisis de ácidos carboxílicos y fenoles presentes en aire, mediante la derivatización con PFBBr y detección por (GC-MS/ITCI). Los autores presentaron, por primera vez, la utilización del alcohol pentaflúorbencilo (PFBOH) como un reactivo para ionización química, que facilita la determinación de los iones moleculares de los derivados PFBBr. El método permitió medir el ácido metacrílico, generado por la oxidación de isopreno. Sus resultados coinciden con los obtenidos por Frazey P. y colaboradores (1999), quienes resaltan la presencia de iones característicos de los derivados del PFBOH bajo condiciones de ionización química, que facilitan la identificación de los compuestos polares presentes en aire.

Yu y colaboradores (1998), presentaron un método que permite la identificación de productos atmosféricos que contienen los grupos funcionales carbonilo (-C=O), carboxilo (-COOH) e hidroxilo (-OH). Para derivar los grupos carbonilo se utilizó PFBHA, mientras que los grupos carboxílicos e hidroxilo, fueron sililados con NO-bis-(trimetilsilil)-triflúoracetamida (BSTFA). Los derivados fueron analizados mediante GC-MS/IT, usando tanto ionización química (CI) de iones negativos con metano, como impacto de electrones (EI). El procedimiento combinado también fue aplicado por Spaulding y colaboradores (1999) y por Frazey y colaboradores (1999) para el análisis de compuestos polares en aire.

Los procedimientos de derivatización en fase líquida son de mucha utilidad en el análisis por GC, pero involucran pasos adicionales en la preparación de la muestra, incrementando así el tiempo total de su análisis. Adicionalmente, pueden conducir a errores experimentales asociados con la pérdida de la muestra y la contaminación cruzada durante los pasos de evaporación y resuspensión y, en el

caso de derivados TMS, con la presencia de agua en el sistema de reacción, pues tanto el reactivo TMS, como sus derivados, son extremadamente sensibles al agua (Docherty K. y Ziemann P. J., 2001).

Aplicando métodos de derivatización en fase sólida (Rosenfeld J. M., 1999) o combinando la derivatización en medio líquido con la microextracción en fase sólida (SPME), estos problemas se reducen sustancialmente.

1.5.3 Microextracción en fase sólida. La SPME es excelente alternativa a los métodos convencionales de extracción, su aplicación presenta muchas ventajas sobre otros métodos analíticos dado que, combina el muestreo, la concentración y la transferencia directa de los analitos al sistema cromatográfico, GC o HPLC (Pawliszyn J., 1997). La SPME permite analizar un amplio rango de sustancias, desde volátiles hasta no volátiles (Alpendurada M. F., 2000; Ruiz J. *et al.*, 2001; Lambropoulou D. A. y Triantafyllos A., 2002), presentes en matrices gaseosas (Koziel J. A. *et al.* 2001; Martos P. A. y Pawliszyn J., 1998), líquidas (Stashenko E. E. *et al.*, 2000; Barshick S-A. Griest W. H., 1998; Young R. *et al.*,1996) y/o sólidas (Ruiz J., 2001; Lee M-R. *et al.*, 1998a).

En la SPME se utiliza una fibra de sílice fundida (1 cm de longitud), recubierta con un material sorbente apropiado, fijada en el interior de una aguja en acero inoxidable, la cual se ubica dentro de un dispositivo similar al de una jeringa, que facilita su manipulación y protección durante el transporte y almacenamiento, (**Figura 7**) (Pawliszyn J., 1997; Alpendurada M. F., 2000).

Tabla 10. Preparación de muestras y determinación por cromatografía de gases de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular.

Analitos	Matriz	Extracción	Condiciones de derivación	Columna GC	Detección	Referencias
16 Diácidos (C_2-C_{11})	Aire ambiental y material particulado (PM).	Sonicación con agua (10 mL x 3); rotaevaporación hasta 1 mL; columna de vidrio de cuarzo; concentración con N_2 hasta sequedad.	0.3 mL de BF_3/*n*-butanol, 14 % (100 °C, 30 min); extracción con hexano (5 mL); lavado con agua pura (3 mL) y acetonitrilo (0.3 mL); evaporación hasta 50 ó 100 µL.	HP-5; DB-5	FID, MS	Kawamura K., 1993; Kawamura K. y Ikushima K., 1993; Kawamura K. y Usukura K., 1993
10 Diácidos	Aire ambiental y PM	Sonicación: BF_3 / MeOH (125 g/L), (15 min x 3); evaporación hasta 300 µL; extracción con hexano (2 mL x 3), evaporación y disolución en 100 µL de hexano.	BF_3 en MeOH.	Nukol™	FID	Lawrence J. E. y Koutrakis P., 1994 Lawrence J. E. y Koutrakis P., 1996
10 Diácidos	Aire ambiental y PM	Sonicación continua: hexano (2 x 15 mL); benceno/2-propanol (2:1, 3 x15 mL), 10 min cada paso; evaporación con N_2 hasta 300 ó 500 µL.	Diazometano.	OV-1701	FID, MS	Rogge W. F. *et al*., 1993
8 Diácidos 7 Ácidos grasos	Aire ambiental y PM (continental)	Sonicación continua: dietiléter; MeOH/H_2O, 33%; cartuchos de extracción en fase sólida, $C_{18,}$ eluidos con MeOH, flujo 2-3 mL/min.	BF_3/*n*-Propanol, extracción con ciclohexano.	INNOWax	FID, MS	Limbeck A. y Puxbaum H., 1999

Tabla 10, Continuación.

Analitos	Matriz	Extracción	Condiciones de derivación	Columna GC	Detección	Referencias
8 Monoácidos y 3 Diácidos	Aire ambiental y PM	Muestra acuosa extraída con solución TOPO/MTBE, 0.5% (2 mL x 2); acidificación con 2 gotas de H_2SO_4;, secado sobre Na_2SO_4; evaporación con N_2 hasta sequedad, disolución en 1 mL de acetona.	PFBBr/acetona (10 µL, 10%); éter 18-corona-6/acetona (50 µL, 4 mg/mL), K_2CO_3, 10 mg; sonicación (40-60 °C, 2-3 h).	RTX-5 MS con trampa iónica	IT/MS	Chien C-J. *et al.*, 1998
Ácidos cetocarboxílicos de cadena media	Aire ambiental y PM (zona marina)	KOH en MeOH al 0.1% (bajo reflujo); acidificación a pH 1.0 con HCl 6M; extracción con CH_2CL_2	BF_3/MeOH; fraccionamiento en cromatografía de columna con gel de sílice.	DB-5	FID, MS	Kawamura k. y Gagosian R. B., 1990
10 Monoácidos alifáticos (C_2-C_{10}), ácido benzoico	Aire ambiental y PM (Zona urbana)	Sonicación: adición de estándares deuterados (ácidos propiónico, hexanoico y benzoico); Sonicación moderada con 5 mL de agua HPLC (3x10 min); columna de intercambio catiónico. Ajuste de pH (8-9) con HCL 1M; rotaevaporación; disolución en acetonitrilo y conversión a ésteres.	2,4-dibromoacetofenona/ CH_2Cl_2, (40 µL, 0.2 M) y diciclohexano-18-corona-6 / acetonitrilo (25 µL , 0.03 M), baño de agua (80 °C, 1 h), rotaevaporación, dilución en hexano/CH_2CL_2 (2:1), evaporación hasta 100 ó 250 µL.	DB-5	MS	Nolte C. G. *et al*., 1999

Tabla 10, Continuación.

Analitos	Matriz	Extracción	Condiciones de derivación	Columna GC	Detección	Referencias
Acido benzoico y otros compuestos orgánicos	PM/ túnel de carretera	Sonicación continua con *n*-hexano (2 x 35 mL) y benceno/isopropanol, 2:1, (3x35 mL), 10 min cada paso; concentración, de los extractos combinados, hasta 400 µL	Diazometano	DB-1701	MS	Fraser M. P. *et al*., 1998
12 Monoácidos y diácidos, C_1-C_{10}	Aire ambiental y PM/ tubo de escape de motores	Sonicación con 5 mL de agua HPLC (3 x 10 min); centrifugación; rota-evaporación (50°C) hasta 2 mL; ajuste de pH (8.0-8.5) con HCL 1 N, evaporación con N_2 a sequedad.	0.5 mL de solución BF_3 /*n*-butanol, 14% (100 °C, 30 min), lavado con hexano y agua; extracción con hexano, evaporación a 100 µL.	DB-5	FID	Kawamura K. y Kaplan I. R., 1985 Kawamura K. y Kaplan I. R., 1987

Los recubrimientos para las fibras usadas en la SPME, disponibles comercialmente, pueden ser clasificados en dos grupos: a. Recubrimientos poliméricos puros (polímeros homogéneos) y b. Partículas porosas embebidas en una fase polimérica (polímeros heterogéneos) (Mani V., 1999). El primer grupo está integrado por poli(dimetilsiloxanos), PDMS, de diferentes espesores (7, 30 y 100 µm), y poli(acrilato), PA, de 85 µm, y el segundo grupo, por los siguientes adsorbentes (Mani V., 1999; Vas G. y Vékey K., 2004):

- Poli(dimetilsiloxano)/Divinilbenceno (PDMS/DVB) de 60 y 65 µm;
- Poli(dimetilsiloxano)/Carboxen^{TM} (PDMS/Carboxen) de 75 µm;
- Carbowax/Divinilbenceno (CW/DVB) de 65 µm;
- Carbowax/Resina templada (CW/TPR) de 50 µm.

Estos recubrimientos, a su vez, pueden clasificarse como no polares (PDMS), semipolares (PDMS/DVB y PDMS/Carboxen) y polares (PA, CW/DVB y CW/TPR) (Mani V., 1999). Además de las fibras comerciales, algunos autores han fabricado otros recubrimientos para aplicaciones más específicas, como por ejemplo los de carbón o poli(pirrol) (Peñalver A. M., 2002; Vas G. y Vékey K., 2004). También se han desarrollado recubrimientos que permiten la extracción de compuestos organometálicos o compuestos inorgánicos que son difícilmente extraídos con las fibras disponibles comercialmente (Peñalver A. M., 2002)**.**

La selectividad de la fibra de extracción puede variarse cambiando el tipo de fase estacionaria (recubrimiento) o su espesor, según con las características de los analitos a aislar (Pawliszyn J., 1997; Alpendurada M. F., 2000). Por ejemplo, compuestos volátiles aromáticos y clorados de polaridad baja y constantes de distribución pequeñas, exigen el uso de una fase estacionaria apolar de espesor grande para una ab(d)sorción eficiente; mientras que un recubrimiento delgado es más apropiado para compuestos semivolátiles. La constante de distribución aumenta con el peso molecular y el punto de ebullición del analito (Pawliszyn J., 1997).

La SPME es una técnica rápida y sensible, que involucra el proceso de partición de los analitos entre la matriz y el recubrimiento de la fibra. Una vez se ha alcanzado el equilibrio de fases, la fibra es transferida al instrumento analítico donde se llevan a cabo la desorción, separación y cuantificación de los componentes de la muestra. La desorción ocurre directamente en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, o en una interfase, como es el caso de la HPLC (Chen J. y Pawliszyn J., 1995; Alpendurada M. F., 2000). Después de cada proceso de extracción y desorción, se incluye un paso de limpieza de la fibra.

Existen tres modalidades para SPME (**Figura 8**): 1. Extracción en el modo *headspace* (HS), en donde los analitos son transferidos al recubrimiento polimérico a través de la fase vapor de la muestra (sólida o líquida); 2. Extracción directa en la fase líquida (por inmersión) y, 3. Extracción directa y/o exposición directa usando una membrana protectora (Pawliszyn J., 1997; Alpendurada M. F., 2000). En el último caso, el recubrimiento polimérico se protege con una membrana, antes de su inmersión en una muestra (líquida) muy contaminada o que contiene sustancias de alto peso molecular, afines con el recubrimiento (*e.g.*, azúcares, proteínas, *etc.)* (Alpendurada M. F., 2000).

Para compuestos orgánicos volátiles, tales como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), se emplea tanto el muestreo directo por inmersión, como el modo HS. Sin embargo, para este tipo de sustancias se prefiere el modo HS, debido a que el equilibrio se alcanza más rápidamente en la fase vapor y, además, se facilita por la ausencia de moléculas de disolvente (*i.e*. agua, orina, *etc.)* que impiden la difusión del analito hacia la fase estacionaria de la fibra. El modo de inmersión es utilizado cuando se analizan muestras acuosas (*e.g.,* aguas subterráneas), especialmente, si se quiere extraer compuestos semivolátiles en concentraciones muy bajas (Jinno K. *et al*., 1994; Eisert R. y Pawliszyn J., 1997).

En la microextracción en fase sólida, la cantidad de analitos retenidos por la fibra en el estado del equilibrio, depende linealmente de su concentración, según la siguiente expresión (Pawliszyn J., 1997; Eisert R. y Pawliszyn J., 1997; Alpendurada M. F., 2000; Ulrich S., 2000):

$$n_s = KV_sC \qquad \textbf{Ecuación 16}$$

Donde:

n_s: Moles ad(b)sorbidas por la fase estacionaria (*f.e.*);.

K: Constante de distribución;

V_s: Volumen del recubrimiento (*f.e.*) de la fibra;

C: Concentración de analitos en la muestra.

En condiciones de equilibrio, la cantidad de compuestos extraídos es independiente de la localización de la fibra en el sistema, es decir, ésta puede estar ubicada en el HS o inmersa en la muestra (Pawliszyn J., 1997); siempre y cuando los parámetros operacionales tales como el tipo del recubrimiento polimérico, los volúmenes del espacio de cabeza y de la muestra, el tiempo de muestreo y el modo de la agitación, se mantengan constantes (Pawliszyn J., 1997; Alpendurada M. F., 2000).

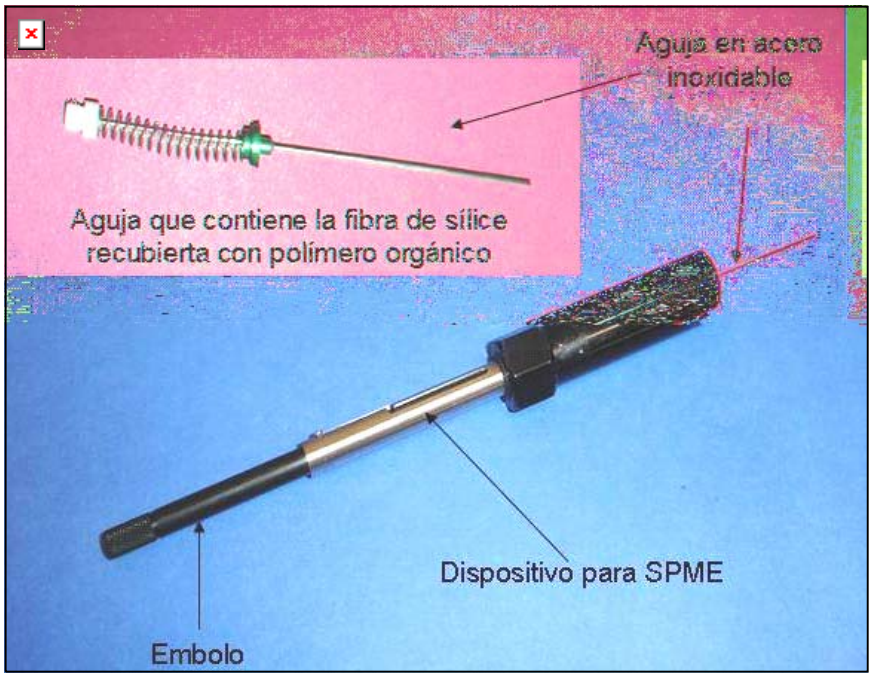


Figura 7. Dispositivo para microextracción en fase sólida (SPME).

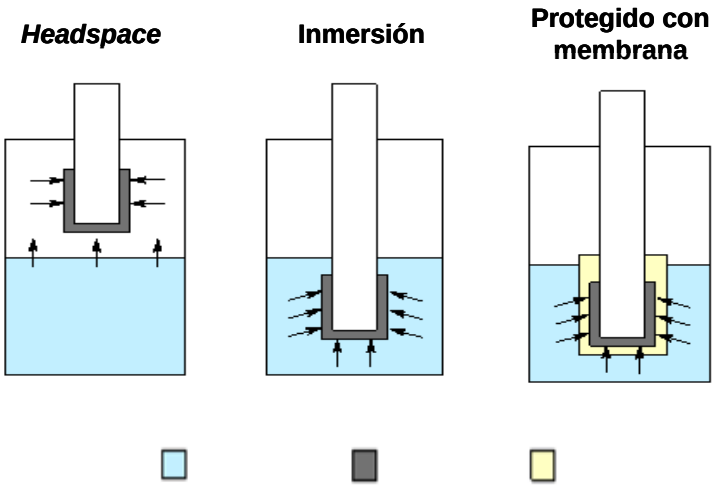


Figura 8. Modos de extracción de la SPME.

Entre los factores que pueden afectar la precisión del método de la SPME, se encuentran:

- Condiciones de agitación (sin/con-, velocidad);
- Tiempo de muestreo (si no se logra alcanzar el equilibrio);
- Temperatura;
- Volumen de la muestra;
- Volumen de *headspace*;
- Tipo de fibra (naturaleza química del recubrimiento);
- Componentes de la matriz de la muestra (sales, materia orgánica, humedad, pH, *etc.*);
- Tiempo que transcurre entre la extracción y el análisis;
- Pérdida de analitos (adsorción sobre las paredes del vial, permeación a través del teflón, adsorción por el *septum*);
- Condiciones de inyección en el equipo cromatográfico (temperatura y tiempo de desorción, entre otros).

Cuando se analizan compuestos muy polares como ácidos o bases fuertes, que son difíciles de extraer, ya que poseen una alta afinidad por la matriz acuosa, se ajusta el pH y/o se adiciona una sal para aumentar el rendimiento de su extracción. Aunque diferentes factores pueden afectar la eficiencia de extracción y condicionar el modo de muestreo (por inmersión o en HS) la adición de un electrolito a la solución (*e.g*., NaCl), generalmente, mejora la extracción (Pawliszyn J., 1997; Eisert R. y Pawliszyn J., 1997; Alpendurada M. F., 2000; Ulrich S., 2000).

La técnica de SPME presenta muchas ventajas (Namieśnik J. *et al.*, 2000; Shirey R. E., 1995; Harper M., 2000; Khaled A. y Pawliszyn J., 2000), las cuales pueden ser resumidas así:

1. El tiempo de uso de las fibras es relativamente largo, -comparado con el requerido por los sorbentes empacados-cerca de 100 operaciones por fibra;

2. El tiempo de muestreo es relativamente corto, usualmente menos de 1 hora;
3. El procedimiento de extracción es más simple que el de los métodos convencionales, además la pérdida de los analitos durante la extracción es mínima;
4. No involucra etapas adicionales de preparación y limpieza de la muestra;
5. No requiere el uso de disolventes durante la preparación de la muestra;
6. El analito se introduce directamente a la columna cromatográfica: No se requieren desorbedores térmicos especiales o trampas criogénicas costosas;
7. Aplicabilidad a un amplio espectro de analitos, en una variedad de matrices líquidas, sólidas y/o gaseosas;
8. Compatibilidad con diferentes sistemas de inyección en el GC: *split/splitless*, *on-column* y vaporizador de temperatura programada (PTV); así como en HPLC;
9. Fácil muestreo en campo: El equipo es liviano y compacto;
10. Posibilidad de automatización de muestreo e inyección de la muestra al instrumento analítico;
11. Fácil adaptabilidad como muestreador difuso, para el monitoreo de VOC's y compuestos orgánicos semivolátiles (SVOC's), en el tiempo (8 h) (*Time-Weighted Average*, TWA), resultando como una buena alternativa a los extensos y costosos métodos, adoptados por el Instituto Nacional para la Salud y la Seguridad Ocupacional (NIOSH, por su abreviatura en inglés).

Las desventajas de la SPME pueden ser resumidas en los siguientes puntos:

1. Los analitos de baja volatilidad no alcanzan el equilibrio de partición rápidamente;

2. La estabilidad de algunos analitos, durante el almacenamiento de la fibra, una vez realizada la extracción, es mínima (menos de 1 hora, excepto bajo refrigeración);
3. El tiempo de equilibrio varía ampliamente con la temperatura;
4. En algunos casos se requieren estándares gaseosos para la calibración;
5. En algunos casos, la muestra se consume completamente y no hay oportunidad de hacer réplicas;
6. Las fibras son bastante frágiles;
7. Si el coeficiente de partición es alto y/o la muestra es de tamaño pequeño, ésta debe ser analizada inmediatamente;
8. En combinación con GC, la técnica no puede aplicarse a compuestos con pesos moleculares altos;
9. En muchas situaciones se dificulta la selección del recubrimiento de la fibra, con la polaridad cercana a la de los analitos, sobre todo, cuando éstos son de volatilidad y polaridad diferentes.

1.5.3.1 Aplicación de la SPME para el análisis de compuestos orgánicos volátiles. La SPME se ha utilizado ampliamente en estudios ambientales, a saber: aguas de mar (Barshick S. A. *et al.*, 1998), subterráneas (Young R. *et al.*, 1996), superficiales y residuales (Boyd-Boland A. A. y Pawliszyn J., 1996; Wenner A. y Wortberg M., 1998; Valor I. *et al.*, 1996), suelos (Lee M-R. *et al.*, 1998b; Prosen H. y Zupancic-Kralj L., 1998), especies vegetales (Alcaraz Z. *et al.*, 2001; Beaulieu J. C. y Grima C. C., 2001) y en el análisis de alimentos (Kataoka H. *et al.*, 2002), entre los cuales figuran aceites vegetales (Stashenko E. E. *et al.*, 2000), bebidas (Steffen A. y Pawliszyn J., 1996; De la Calle D. *et al.*,1996; Lambropoulou D. A. y Triantafyllos A., 2002) y carne (Ruiz J. *et al.*, 2001), entre otras aplicaciones. Varios estudios se han centrado en la aplicación de la SPME para determinar contaminantes del aire (Chai M. *et al.*, 1993; Chai M. y Pawliszyn J., 1995; Martos P. A. y Pawslizyn J., 1997; Gorlo D. *et al.*, 1997; Namiésnik J. *et al*.,

1998 y Gorlo D. *et al.*, 1999). Los primeros experimentos en esta área fueron desarrollados por el grupo de investigación dirigido por el doctor Pawslizyn, en ellos, el sistema SPME/PDMS fue usado en modo estático, para el muestreo de hidrocarburos clorados volátiles (Chai M. *et al.*, 1993) y compuestos aromáticos (Chai M. y Pawliszyn J., 1995).

Martos P. A. y Pawslizyn J. (1997) reportaron la aplicación del sistema SPME/PDMS, al muestreo dinámico de una mezcla gaseosa de 11 estándares de hidrocarburos, que incluía compuestos alifáticos (*n*-C_5, *n*-C_6 y *n*-C_{10}), aromáticos [benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos, BTEX´s, y mesitileno] y mono-terpenos (pineno y limoneno). Los límites de detección, alcanzados por GC/FID con los métodos de muestreo convencionales, se encuentran en el rango de 1-10 µg/muestra, dependiendo del volumen de aire. Cuando los autores utilizaron la SPME, reportaron límites de detección del 0.3 ng/muestra, usando los mismos equipos instrumentales. Los estudios de reproducibilidad del método realizados con una mezcla de BTEX´s gaseosa estándar (34 µg/L) a 298 °K, usando la misma fibra (n=8) y las fibras diferentes (n=10), indican una buena consistencia del método presentando valores de desviación estándar relativa, RSD, en los rangos de 2-6% y 3-9%, respectivamente, para todos los analitos evaluados.

Gorlo y colaboradores (1997) aplicaron el sistema SPME/PDMS al muestreo dinámico de aire, reportando el procedimiento de calibración para los compuestos orgánicos volátiles (tetracloruro de carbono, tolueno, *p*-xileno, clorobenceno y *n*-decano); se alcanzaron límites de detección por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), del orden de los *ppm*. Los investigadores extendieron su estudio de laboratorio al análisis de los contaminantes presentes en aire interior (Namiésnik J. *et al.*, 1998; Gorlo D. *et al.*, 1999).

Tuduri L. y colaboradores (2002) realizaron el estudio comparativo de modos de muestreo dinámico y estático, usando SPME/PDMS-Carboxen, en combinación con GC/FID. Los límites de detección alcanzados para ambos tipos de muestreo, se encuentran en el orden de los µg/m^3. Mientras que, en el muestreo en el modo dinámico, los compuestos con mayor afinidad por el recubrimiento de la fibra, mostraron un rango lineal muy estrecho, indicando competencia en la adsorción; en el experimento realizado en modo estático, se obtuvo un rango lineal más ancho, especialmente para los compuestos con mayor afinidad por el recubrimiento de la fibra. Para un muestreo de 1 min, por ejemplo, la acetona mostró un rango de adsorción lineal de 3 a 60 al µg/m^3 en el modo dinámico, el cual se extendió desde 5 hasta 300 µg/m^3 en el modo estático.

Los modos de extracción por inmersión y en fase vapor, usando microextracción en fase sólida, fueron aplicados por Llompart M. y colaboradores (1998) para el análisis de contaminantes volátiles y semivolátiles en agua y aire. Se realizó una comparación entre la microextracción en fase sólida en modo *headspace* (HS-SPME) y el *headspace* estático convencional (S-HS), encontrando similitud en los resultados obtenidos, sin embargo, para el caso particular del butilbenceno, la sensibilidad alcanzada fue 40 veces mayor. Los autores determinaron límites de detección y de cuantificación en el nivel de los ng/L (7-274 y 4.3-913 ng/L, respectivamente) con un coeficiente de variación menor del 15%, para la mayoría de los analitos.

La SPME en los modos *HS* y por inmersión, fue aplicada por De la Calle D. y colaboradores (1998), para el análisis del aroma de vinos. Para aumentar la concentración de los compuestos tipo terpenoide en la fase vapor, los autores usaron ondas de ultrasonido para irradiar la muestra del vino. Sin embargo, este método, comparado con la agitación magnética, no permitió observar variaciones significativas en la cantidad de analitos extraídos, aunque sí se presentaron

algunos cambios químicos en los extractos, obtenidos con la asistencia de la radiación.

1.5.3.2. Microextracción en fase sólida combinada con la derivatización química. Otra interesante forma de aplicar la SPME ha sido su combinación con la derivatización química. Durante este proceso, el recubrimiento de la fibra, que es un polímero líquido de alto peso molecular o un sólido, actúa como el medio orgánico, de tal forma, que la reacción se realiza sobre el recubrimiento de la fibra y no en la matriz de la muestra (Stashenko E. E. y Martínez J. R., 2004).

En este caso, tanto la sensibilidad, como la selectividad altas, se alcanzan gracias a la derivatización. Comparada con la SPME directa, la derivatización-SPME, permite límites de detección (LOD's), de tres o más órdenes de magnitud, más bajos. La sensibilidad del método puede ser mejorada cuando la derivatización se utiliza para introducir una especie química que puede causar una respuesta específicamente más alta del detector. Esto sucede cuando se usan reactivos de derivatización que contienen el grupo pentaflúorbenceno, que genera una respuesta sensible y selectiva en GC, operado con ECD (Martos P. A. y Pawliszyn J., 1998; Stashenko E. E. *et al*., 2000; 2004).

La técnica presenta grandes ventajas sobre la derivatización en solución líquida, en la que se utiliza material de vidrio, sistemas de calentamiento o enfriamiento, bombas y fuentes de energía y, adicionalmente, se tiene una manipulación permanente de la solución, en el campo y en el laboratorio, lo que aumenta la probabilidad de contaminación cruzada de la muestra y la posibilidad de errores en la cuantificación (Pan L. y Pawliszyn J., 1997; Namieśnik J. *et al*., 2000).
En la SPME con la derivatización en fase sólida, la reacción entre el analito y el agente derivatizante puede ocurrir de 3 modos, a saber:

- Después de que el analito esté depositado sobre la fibra;

- Simultáneamente con el muestreo SPME, usando la fibra saturada previamente con el agente derivatizante;
- Cuando el analito esté siendo desorbido en el puerto de inyección cromatográfico, junto con el agente derivatizante y la reacción sucede en el inyector, a temperatura alta;

La SPME ha sido evaluada en el estudio de compuestos carbonílicos y carboxilicos, en combinación con la derivatización química, usando diferentes reactivos derivatizantes.

Pan y Pawliszyn (1997) utilizaron diazometano como reactivo de derivatización, en procesos de SPME aplicados al análisis de ácidos carboxílicos de cadena larga C_{10}-C_{22}. Inicialmente, la fibra PDMS fue expuesta al HS de una solución acuosa equimolar (250 ng/L) de los analitos. Después del proceso de extracción, la fibra se expuso a los vapores de una solución de diazometano en dietiléter. Finalmente, los derivados se desorbieron en el puerto de inyección de un GC. Los resultados indicaron un tiempo de reacción de 20 min, operando a temperatura ambiente. Para la determinación de ácidos de cadena corta (C_2-C_5) en aire, los investigadores realizaron esterificación sobre la fibra, con 1-pirenildiazometano (PDAM). Dada la volatilidad baja del PDAM, éste fue adsorbido sobre una fibra de PA/SPME, la cual fue expuesta posteriormente a los ácidos carboxílicos aislados desde la fase acuosa. Finalmente, los ésteres de pirenilmetilo fueron desorbidos térmicamente en el puerto de inyección del GC, para su respectivo análisis. Los límites de detección alcanzados fueron del orden de los sub-pg/mL a fg/mL (Pan L. y Pawliszyn J., 1997).

Lee M-R. y colaboradores (1998b), también hicieron uso del reactivo diazometano para derivatizar los herbicidas acídicos (2,4-diclorofenol, 2,4,5-triclorofenol, 4-cloro-3-metilfenol, entre otros), presentes en muestras acuosas. Los autores combinaron la derivatización con la SPME, para la extracción de los analitos, y el

sistema GC-MS, para su respectivo análisis, alcanzando límites de detección del orden de 10 a 30 ng/L.

Jurado C. y colaboradores (2000), reportaron la determinación de anfetaminas en la orina, empleando la derivatización con anhídrido trifluoroacético (TFA), para lo cual emplearon una fibra de PDMS, que fue expuesta a los vapores de la muestra durante 10 min y, luego, transferida a otro vial, donde se expuso al agente derivatizante, TFA (20 min, 60 °C). Los derivados se analizaron por GC-MS y el nivel mínimo de detección (LOD) alcanzado fue de 10 µg/L para anfetamina y metanfetamina, y 20 µg/mL para 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) y 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA).

Huang M. K. y colaboradores (2002), reportaron un método analítico en un solo paso para la determinación de anfetamina (AM) y metanfetamina (MA) en la orina humana. La muestra (1mL) fue colocada en un vial de 7 mL y tratada con KOH (1mL), NaCl (0.5g) y 100 µ/L de estándares perdeuterados, con agitación magnética. El vial fue sellado y, luego, se introdujo un inserto de vidrio que contenía los agentes derivatizantes anhídrido heptaflúorbutirico y cloruro de heptaflúorbutirico (4:1 v/v). La fibra de PDMS (100 µm) fue insertada en el vial y expuesta por 20 min al HS de la solución calentada (100 °C) y con agitación magnética (600 rpm). Los analitos fueron abdsorbidos sobre la fibra y al mismo tiempo reaccionaron con el agente derivatizante. Los niveles de detección estuvieron entre 0.3–1.0 µg/L para MA y AM, usando GC-MS.

Okeyo P. y colaboradores (1997) determinaron esteroides en suero humano, primero extrayendo de la matriz los analitos por HS-SPME. Luego, expusieron la fibra saturada con los esteroides a los vapores de un agente derivantizante. La desorción de los derivados se realizó directamente en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La identificación de los productos de reacción se hizo con base en sus espectros de masas.

Otros investigadores han evaluado la SPME con derivatización simultánea sobre la fibra. El número más grande de aplicaciones de estos procedimientos de derivatización ha sido para la determinación de compuestos carbonílicos.

Martos P. A. y Pawliszyn J. (1998), describieron un método, basado en el uso de la fibra de PDMS, previamente impregnada con el reactivo PFBHA, que se expuso a los vapores de formaldehído por diferentes períodos de tiempo, el derivado fue analizado por GC-MS. Este proceso fue perfeccionado y aplicado para el muestreo de formaldehído en campo y en aire interior; las concentraciones medidas estuvieron en el rango de 10 a 380 ng/m^3 y presentaron muy buena correlación con el método NIOSH (Koziel J. A. *et al.*, 2001).

Stashenko E. E. y colaboradores (2000), emplearon como agente derivatizante PFPH, para la derivatización de compuestos carbonílicos sobre la fibra de SPME, expuesta al HS de la muestra, obteniendo de este modo, las respectivas hidrazonas, las cuales fueron analizadas por GC/ECD. Esta metodología fue aplicada a la determinación de los compuestos carbonílicos que se forman durante la peroxidación lipídica térmicamente inducida y, luego, fue extendida a la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de aceites esenciales, midiendo hexanal como marcador del proceso de lipoxidación, en un sistema lipídico modelo sometido a la oxidación. El método ofrece alta sensibilidad (10-90 fmol) y buena reproducibilidad (RSD<10%). Esta aplicación se empleó también para la evaluación de la actividad antioxidante *in vitro* de algunas especies vegetales. El hexanal, determinado por HS-SPME con la derivatización (PFPH) sobre la fibra, fue utilizado como marcador del proceso de peroxidación lipídica, inducida por radiación UV, calentamiento, o iones Fe^{+2} en la presencia de O_2, en un sistema lipídico modelo (Stashenko E. E. *et al.,* 2000).

Vesely P. y colaboradores (2003) utilizaron PFBHA, como reactivo de derivatización (PFBHA), y la fibra de PDMS, para el muestreo por HS-SPME de

aldehídos en cerveza. Nueve aldehídos fueron determinados por GC-MS. Las concentraciones fueron medidas durante los cambios del sabor de la cerveza, producidos por el envejecimiento.

Tsai S-W. y Chang C-M. (2003) utilizaron la derivatización sobre la fibra, para determinar aldehídos en agua. Una fibra de PDMS/DVB (65 µm) fue expuesta por 2 min a los vapores de una solución acuosa de PFBHA (17 g/L), agitada a 1100 rpm, a temperatura ambiente. Una ventaja que tiene la derivatización de analitos *in situ*, sobre su derivatización en solución, seguida de HS-SPME, es el tiempo de análisis más corto (10 *Vs* 30 min), requerido para obtener una eficiencia de extracción mayor del 80%.

El 2-hidrazinobenzotiazol (HBT) es otro reactivo derivatizante, que reacciona con compuestos carbonílicos para formar hidrazonas. La presencia del azufre y nitrógeno en la estructura del HBT, ofrece la ventaja adicional de usar detectores selectivos tales como el NPD y detector fotométrico de llama (FPD). La utilización de HBT en la derivatización de compuestos carbonílicos, directamente en la matriz de la muestra, seguida de la LLE y posterior análisis por GC-NPD, fue reportada por Stashenko E. E. y colaboradores (1996). En este trabajo, la derivatización se llevó a cabo sobre la fibra; la aplicación dio lugar a un método simple y eficiente, que se utilizó para la determinación de los aldehídos generados durante la degradación térmica del aceite de girasol (Stashenko E. E. y Martínez J. R., 2004).

Debido a la importancia ambiental de los compuestos carbonílicos y carboxílicos y a su significativo papel en la fotoquímica atmosférica, se requieren métodos de análisis sensibles y selectivos, que permitan determinar de manera eficiente y directa, el tipo y las concentraciones de contaminantes, lo que puede relacionarse con su tiempo de vida media y las fuentes de contaminación, así como con las diferentes reacciones químicas que éstos pueden sufrir a nivel troposférico. Sin embargo, el muestreo, así como la detección y la cuantificación de este tipo de

moléculas en aire, son tareas analíticas complejas. Las presiones de vapor altas unidas a sus concentraciones atmosféricas bajas (en el orden de los *ppbv* y partes por trillón por volumen, *pptv*) y su naturaleza química fuertemente polar, dificultan el muestreo y el análisis cuantitativo.

La finalidad del presente proyecto fue implementar y validar un método analítico en fase sólida, particularmente, SPME, que permitiera medir aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos en muestras de aire (exterior e interior), de una manera reproducible, rápida y sensible. La ejecución del estudio se basó en la experiencia alcanzada por el grupo de Cromatografía de la Universidad Industrial de Santander (UIS), en el desarrollo de técnicas de SPME con derivatización sobre la fibra, para el muestreo de compuestos carbonílicos en muestras líquidas (Stashenko E. E. *et. al*., 2000). En este trabajo, la metodología de SPME se extendió al análisis de aldehídos y ácidos carboxílicos en muestras gaseosas. En las secciones siguientes se presentan los procedimientos experimentales desarrollados y se dan ejemplos de las diferentes aplicaciones de los métodos implementados.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 REACTIVOS Y MATERIALES

2.1.1 Aldehídos, ácidos carboxílicos y agentes derivatizantes. Se emplearon los siguientes compuestos carbonílicos: etanal (99.5%), propanal (98%), butanal (99%), pentanal (97%), hexanal (98%), octanal (99%), nonanal (95%), decanal (95%), citral (95%), citronelal (≥ 85%), benzaldehído (≥ 99%) (todos GA, *Aldrich Chemical Co. Inc.*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) y acetona (99,8%, *Mallinckrodt*, AR®, Xalostoc, Estado de México, México); como agentes derivatizantes se usaron 2-hidracinobenzotiazol, HBT, (99%, *Chem. Service*, West Chester, Pennsylvania, EE.UU.) y 2,3,4,5,6-pentaflúorfenilhidracina (99%, *Aldrich*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.). Además, se utilizaron ácidos carboxílicos de cadena corta, *i.e.* ácidos acético glacial (99,9%, *Mallinckrodt* AR®, Xalostoc, Estado de México, México), propiónico (99%, GA, *Merck-Schuchardt*, Hohenbrunn, Alemania) y los ácidos butanoico, pentanoico, caproico y benzoico (todos con una pureza del 99%, GA, *Aldrich*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.). Para obtener los respectivos derivados de ácidos, se empleó bromuro de pentaflúorbencilo, PFBBr (99%, GA, *Aldrich*, Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.).

2.1.2 Otros reactivos. Cloruro de sodio, NaCl, y carbonato de potasio, K_2CO_3, (ambos con una pureza del 99%, *Merck-Schuchardt*, Hohenbrunn, Germany), sulfato de sodio anhidro ($NaSO_4$), ácido sulfúrico (H_2SO_4) (98%, *Mallinckrodt* AR®, Xalostoc, Estado de México, México), ácido clorhídrico (HCl) (grado ACS, 37%, *J. T. Baker*, Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.), aire sintético grado cero (20 ± 0.5% O_2 en N_2) (*AGA Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia).

2.1.3 Solventes. Acetona y acetato de etilo (99,8% y 99,9%; respectivamente, *Mallinckrodt* AR®, Xalostoc, Estado de México, México), éter etílico (99,9%, *J. T. Baker*, Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.), isopropanol (≥ 99.5%, GR) y *n*-hexano (96%, GR) (*Merck* KGaA, Darmstadt, Alemania), metanol y etanol (ambos con una pureza del 99,8%, GC, *Fluka y Riedel-de Haën*, Seelze, Alemania), acetonitrilo (100%, ACS, *J. T. Baker*, Phillipsburg, New Jersey, EE.UU.) y agua grado HPLC (*Mallinckrodt* ChromAR®, Xalostoc, Estado de México, México).

Adicionalmente, se utilizó agua desionizada, preparada en el laboratorio, para lo cual se utilizó un equipo desmineralizador e intercambiador de iones, marca *Rovic*, modelo 30-A, serie SXP (Rovic, Lima, Perú), suministrado por *Walter Röthlisberger* y Co. Ltda. (Medellín, Colombia).

2.1.4 Fibras SPME. Las fibras de SPME con recubrimientos poliméricos de poli(dimetilsiloxano), PDMS, ($d_f = 100$ µm), poli(acrilato), PA, ($d_f = 85$ µm), y poli(dimetilsiloxano)-divinilbenceno, PDMS-DVB, ($d_f = 65$ µm), y el *holder* de SPME para muestreo manual, fueron obtenidos de *Supelco Inc*. (Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.). Las tres fibras fueron acondicionadas según las recomendaciones del fabricante, probadas y comparadas tanto para el análisis de ácidos carboxílicos, como para el de compuestos carbonílicos.

2.1.5 Otros materiales. Barras de agitación magnética de 3 x 10 mm, recubiertas con Teflón [poli(tetraflúoretileno), PTFE] blanco; frascos de vidrio, color ámbar, de tapa rosca con capacidades de 4.5 y 12 mL (*Supelco* Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.), *septa* de silicona blanca recubiertas con poli(tetraflúoretileno), PTFE, para viales de 4.5 y 12 mL (*Agilent Technologies*,

Palo Alto, California, EE.UU.), balones aforados con tapas esmeriladas de 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250 y 500 mL (*Kimax*, Kimble Glass Inc., Vineland, New Jersey, EE.UU.), pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL y pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 mL (*Blau Brand*, Brand GMBH-CO KG, Wertheim, Alemania), pipetas de émbolo aspirante *Transferpette*® de 2-20, 25-250 y 100-1000 µL, con sus respectivas puntas de poli(propileno) (*Brand GMBH-CO* KG, Wertheim, Alemania), microjeringas de 0.1-1 y 1.0-10 µL (*Hamilton Company*, Reno, Nevada, EE.UU.), termómetro de mercurio (*Silber Brand* 150 °C, Brand GMBH-CO KG, Wertheim, Alemania), papel indicador universal rango de pH 0-14 (*Merck-Schuchardt*, Hohenbrunn, Alemania).

2.1.6 Equipos menores. Balanza analítica de precisión (± 0.001 g), modelo AG285 y pH-metro, modelo MPC227; ambos de marca *Mettler Toledo* (Columbus, Ohio, EE.UU.), plancha de agitación–calentamiento (*Thermolyne Nuova II*, Supelco Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.) y dispositivo para SPME (*Supelco* Inc*.*, Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU), equipo evaporador de marca *TurboVap LV* (*Zymark Corporation*, Hopkinton, Massachussets, EE.UU.), dotado con sistemas de control de temperatura y presión automáticos. Adicionalmente, se utilizó un sistema de muestreo M18 *VacBag Sampler System* (modelo SK-M180), con una bomba *Gas Sampling Pump* (modelo TBP-102) y bolsas para muestreo de gases *Tedlar*® de 3 L; manufacturados en conjunto por *Environmental Sampling Supply*, *ESS* (Oakland, California, EE.UU.), los cuales fueron suministrados por *Apex Instruments Inc.* (Holly Spring, Carolina del Norte, EE.UU.).

2.2 PARÁMETROS INSTRUMENTALES

2.2.1 Cromatografía de gases (GC) con detector fotométrico de llama (FPD). Los derivados hidrazónicos, productos de la reacción de los aldehídos (C_1-C_{10}) con el HBT, fueron analizados en un cromatógrafo de gases, modelo HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un sistema de inyección *split/splitless* (*split* 10:1) y un FPD, los cuales fueron operados a 250 °C. El tiempo de desorción de los derivados de aldehídos, retenidos sobre la fibra de SPME, fue de 10 min; en este caso, se utilizó un *liner* para SPME de 78.5 mm (L) x 6.5 mm (d.e.) x 0.75 mm (d.i.) (*Supelco* Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.), mientras que para la inyección automática de los patrones puros, se utilizó un *liner* estándar para inyección *split/splitless* de 78.5 mm (L) x 6.3 mm (d.e.) x 4.0 mm (d.i.) (*Supelco* Inc.*,* Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.).

Para la separación de las HBT-hidrazonas, se utilizó una columna DB-5 (*J&W Scientific*, Folsom, California, EE.UU.), de 30 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.25 µm (d_f), con fase estacionaria de 5%-fenil poli(metilsiloxano). La temperatura del horno se programó desde 100 °C (10 min) hasta 250 °C (10 min) con una velocidad de calentamiento de 20 °C/min. Se utilizó helio (99.995%, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre (1 mL/min, 70 °C), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 100 kPa. Los flujos de nitrógeno (99.995%, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia), hidrógeno (99.995%, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia) y aire sintético grado cero (20 ± 0.5% O_2 en N_2, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia) en el detector, se mantuvieron en 30, 60 y 200 mL/min, respectivamente. Los datos cromatográficos fueron procesados con el software *HP ChemStation* A.06.03 (*Hewlett-Packard,* Palo Alto, California, EE.UU.).

2.2.2 Cromatografía de gases (GC) con detector de captura de electrones (ECD). El análisis de las PFPH-hidrazonas, obtenidas por reacción de los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) con PFPH y de los ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), productos de la reacción de los ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con el PFBBr, se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases, modelo HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), equipado con un sistema de inyección *split/splitless* (*split* de 30:1) y un ^{63}Ni-ECD, los cuales fueron operados a 250 y 280 °C, respectivamente. El tiempo de desorción de los derivados de aldehídos fue de 5 min, mientras que para los ácidos fue de 10 min. En este caso, se utilizó un *liner* para SPME de 78.5 mm (L) x 6.5 mm (d.e.) x 0.75 mm (d.i.) (*Supelco* Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.), mientras que para la inyección automática de los patrones puros, se utilizó un *liner* estándar para inyección *split/splitless* de 78.5 mm (L) x 6.3 mm (d.e.) x 4.0 mm (d.i.) (*Supelco* Inc., Bellefonte, Pennsylvania, EE.UU.).

Los derivados de aldehídos y de ácidos, fueron analizados en una columna DB-5 (*J&W Scientific*, Folsom, California, EE.UU.), de 30 m x 0.25 mm (d.i.) x 0.25 µm (d_f), con fase estacionaria de 5%-fenil poli(metilsiloxano). Para el análisis de las PFPH-hidrazonas, la temperatura del horno se programó desde 120 hasta 250 °C (4 min) a 8 °C/min, mientras que para el análisis de los ésteres de PFB, la programación se realizó desde 60 °C (2 min) hasta 250 °C (2 min), con una velocidad de calentamiento de 8 °C/min. Se utilizó helio (99.995%, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre (1 mL/min, 70 °C), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 90 kPa y, una mezcla de argón:metano (9:1 v/v, *Aga Fano* S. A., Bucaramanga, Colombia) a un flujo de 60 mL/min, como gas auxiliar en el sistema de detección. Los datos cromatográficos fueron procesados con el software *HP ChemStation* A.06.03 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.).

2.2.3 Cromatografía de gases (GC) con detector selectivo de masas (MSD). Para la identificación de los derivados de aldehídos y ácidos, se utilizó un cromatógrafo de gases modelo HP-5890A *Series II* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un FID y a un detector selectivo de masas HP 5972 (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), dotado con un puerto de inyección *split/splitless* (*split* 30:1), sistema de inyección automática HP 7683 *Series* (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.) y un sistema computarizado de datos *MSChemStation* Rev. A.05.01. (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), con las bibliotecas de espectros de masas de NBS75K y Wiley 138K.

Se empleó una columna HP-5MS (*Hewlett-Packard*, Palo Alto, California, EE.UU.), con fase estacionaria de 5%-fenil poli(metilsiloxano) de 50 m x 0.32 mm (d.i.) x 0.25 µm (d_f) y helio (99.995%, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia) como gas de arrastre (1 mL/min, 50 °C), con una presión de entrada en la cabeza de la columna de 105 kPa. La temperatura del horno se programó desde 60 °C (2 min) hasta 250 °C (2 min) a 8 °C/min, mientras que las temperaturas de la cámara de ionización y de la línea de transferencia fueron 180 y 285 °C, respectivamente.

Los espectros de masas se obtuvieron por impacto de electrones (EI, 70 *eV*), usando un analizador cuadrupolar; las corrientes iónicas reconstruidas se obtuvieron por barrido automático de radiofrecuencia, en el rango de masas *m/z* 40-350, a 3.5 scan s^{-1}.

2.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

2.3.1 Derivados de aldehídos. Para el desarrollo del trabajo se utilizaron derivados de los aldehídos C_1-C_{10}, obtenidos por medio de su reacción con las hidracinas, HBT y PFPH.

2.3.1.1 HBT-hidrazonas. Los derivados HBT de los aldehídos C_1-C_{10}, sintetizados siguiendo el procedimiento descrito por Stashenko E. E. *et al*. (1996), fueron recristalizados en etanol al 95%, previo a su uso. Para verificar la pureza de los compuestos, una mezcla de las hidrazonas en MeOH (1000 mg/L), fue analizada por GC-MS. Para la identificación de los derivados hidrazónicos, mediante GC/FPD, un estándar metanólico (500 µmoles/L), que contenía las HBT-hidrazonas puras, fue analizado mediante GC/FPD.

Para la calibración, se preparó una serie de estándares de HBT-hidrazonas en hexano:isopropanol (9:1 v/v), en concentraciones de 0.0125, 0.025, 0.035, 0.050, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 2.0 mmoles/L, que fueron inyectados en modo automático al GC/FPD (Véase **Sección 2.2.1**). La curva obtenida permitió calcular la cantidad de HBT-hidrazonas, formadas con la derivatización directa sobre la fibra, mediante HS-SPME.

Para calcular la cantidad de HBT retenida sobre el recubrimiento polimérico de PA, seleccionado previamente por su mayor capacidad para retener el agente derivatizante, se preparó una solución *stock* de HBT en MeOH (2 mmoles/L) y, a partir de ésta, se elaboraron soluciones de calibración en concentraciones de 1 a 10 mmoles/L, que fueron analizadas por GC/FPD (Véase **Sección 2.2.1**).

El hexanal presente en diferentes muestras líquidas se cuantificó como C_6-HBT-hidrazona, utilizando una curva de calibración construida mediante

HS-SPME-GC/FPD. Para ésto, se preparó una solución *stock* (2 mmoles/L) de hexanal en MeOH, a partir de la cual se obtuvieron soluciones diluídas (10, 20, 30, 40, 60 y 80 µmoles/L) en agua grado HPLC. Cada una de las soluciones de calibración fue sometida a derivatización sobre la fibra de SPME, de acuerdo con la metodología presentada en la **Sección 2.5.1.3**. Los derivados fueron desorbidos en el puerto de inyección del GC/FPD, a 250 °C, por 10 min (Véase **Sección 2.2.1**).

2.3.1.2 PFPH-hidrazonas. Las pentaflúorfenilhidrazonas de los compuestos carbonílicos estudiados (C_2-C_6, C_8-C_{10}), fueron preparadas siguiendo el procedimiento descrito por Stashenko E. E. *et al*., (1997). La PFPH en solución metanólica, reaccionó con un exceso estequiométrico (50%) de cada uno de los compuestos carbonílicos. Los derivados resultantes se usaron para preparar soluciones metanólicas de trabajo, en concentraciones bajas (5.0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 y 100 µmoles/L) y altas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 y 1.5 mmoles/L), que fueron analizadas mediante GC/ECD, según el procedimiento descrito en la **Sección 2.2.2**. Las áreas obtenidas para cada compuesto, en las diferentes concentraciones de los analitos, permitieron construir las respectivas curvas de calibración externa. Las PFPH-hidrazonas, formadas durante el análisis de las muestras problema, fueron identificadas comparando sus tiempos de retención con los de las hidrazonas estándar.

Para la identificación de algunos monoterpenoides biogénicos, con funcionalidades carbonílicas, se prepararon soluciones metanólicas de citral, citronelal y benzaldehído, en concentraciones de 80 µmoles/L, las cuales se sometieron a las mismas condiciones de HS-SPME-GC/ECD, que las muestras reales evaluadas, *i.e.* fragancia de las flores de un arbusto (*Brugmansia suaveolens*). De esta forma, la fibra de PDMS-DVB, seleccionada previamente por su más alta capacidad para almacenar PFPH y las respectivas hidrazonas, se expuso a una solución acuosa del agente derivatizante (2 mL, 2.4 mmoles/L,

27 °C, 800 rpm, 10 min); después de su saturación con PFPH, la fibra se expuso al *headspace* del patrón de cada aldehído (2 mL, 80 µmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 20 min). Los derivados formados sobre la fibra, se analizaron individualmente mediante GC/ECD (Véase **Sección 2.2.2**).

Determinación del acetaldehído en orina

Para determinar la cantidad del acetaldehído presente en muestras de orina, por el método HS-SPME (Véase **Sección 2.6.1.1.3**), se prepararon diferentes soluciones de calibración (10, 20, 30, 49.9 y 79.9 nmoles/L), usando como matriz de la muestra, la orina donada por un voluntario. En esta muestra blanco de orina (testigo), no se detectó el analito de interés, por debajo del nivel mínimo de detección.

El acetaldehído presente en las soluciones de orina, fue determinado mediante HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra, saturada previamente con PFPH, y GC/ECD. La fibra de PDMS-DVB, expuesta al *headspace* de una solución de PFPH (2mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 10 min), se expuso a la fase vapor de la muestra (orina) (2 mL, pH 6, 27 °C, 800 rpm, 5 min). Los derivados formados sobre la fibra, se desorbieron térmicamente (250 °C, 5 min) en el puerto de inyección del GC/ECD, y se analizaron bajo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**. Las curvas de calibración *i.e.* área *Vs* concentración, permitieron cuantificar por HS-SPME-GC/ECD el acetaldehído en muestras de orina, siguiendo la misma metodología analítica aplicada a los estándares de calibración.

Determinación de aldehídos en aire

Para el análisis de los aldehídos en fase gaseosa, se construyó una curva de calibración de PFPH-hidrazonas, mediante HS-SPME-GC/ECD. Los estándares gaseosos de aldehídos, se prepararon usando inyección volumétrica (Véase **Figura 9**). Inicialmente, se preparó una solución *stock* (2 mmoles/L) de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en MeOH, a partir de la cual, utilizando una microjeringa de 0.1-1 µL, se tomaron volúmenes exactos y se depositaron en las bolsas *Tedlar*®, que contenían 3 L de aire sintético grado cero (20 ± 0.5% O_2 en N_2, *Aga Fano* S.A., Bucaramanga, Colombia). Transcurridos 15 min, se procedió con la extracción-derivatización de los analitos (Véase **Sección 2.5.2.4**) y su respectivo análisis cromatográfico por GC/ECD (Véase **Sección 2.2.2**).

Figura 9. Preparación de estándares gaseosos.

Los estándares gaseosos fueron preparados y analizados secuencialmente. La linealidad se midió, analizando 6 mezclas que contenían 9, 13.7, 18.2, 22.8, 27.3 y

30 *pptv* de aldehídos. Las incertidumbres se expresaron como la desviación estándar, s, entre réplicas (n=2). Una mezcla gaseosa estándar que contenía 22.8 *pptv* de aldehídos en aire sintético grado cero, fue usada para establecer la repetibilidad (n=3) de las mediciones.

Estabilidad de los aldehídos (C_2-C_{10}) en bolsas Tedlar®

Para determinar la estabilidad de almacenamiento de los aldehídos en bolsas *Tedlar®* (hermeticidad), a partir de la solución *stock* (10 mmoles/L) de aldehídos en MeOH, se prepararon 3 soluciones (0.18 *ppbv*) en aire sintético grado cero (3 L). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (27 °C) y se analizaron a las 0.5, 36 y 55 h, respectivamente, siguiendo la metodología descrita para los estándares de calibración en los párrafos anteriores.

Para establecer la reproducibilidad de las medidas usando bolsas *Tedlar®*, a partir de la solución *stock* (10 mmoles/L) de aldehídos en MeOH, se prepararon 2 mezclas gaseosas (24 *pptv*) en aire sintético grado cero (3 L). Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente (27 °C) y transcurridos 30 min, se procedió a analizar los aldehídos mediante HS-SPME con derivatización sobre la fibra, saturada previamente con PFPH (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.5.2.4**).

La solución (10 mmol/L) de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en metanol, se preparó en un balón aforado de 10 mL; inicialmente, se depositaron 5 mL de MeOH; a continuación, usando una microjeringa (10 µL), se adicionó un volumen conocido de cada uno de los compuestos y, finalmente, se procedió a completar la solución con MeOH, hasta el aforo.

La solución del agente derivatizante (PFPH), se preparó en agua desionizada, en una concentración de 1.6 mmoles/L. La cantidad del agente derivatizante retenido sobre la fibra, se calculó, usando una curva de calibración externa de PFPH,

construida por GC/ECD con base en los valores de áreas para diferentes soluciones (0.1, 0.2, 0.3, 0.5 y 0.8 mmoles/L) de PFPH en MeOH, bajo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**.

Acetaldehído en aire de exhalación

Dado que el aire de exhalación tiene alto contenido de agua, para la cuantificación del acetaldehído en aliento humano, se utilizó una curva de calibración construida para el derivado del analito, mediante HS-SPME-GC/ECD. La muestra blanco de aire exhalado, donada por un voluntario, antes de consumir licor, se analizó previamente y no mostró la presencia aldehídos. Los estándares gaseosos de acetaldehído, se prepararon y analizaron de la misma forma, que los estándares gaseosos de los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}). La linealidad fue establecida usando 6 soluciones del acetaldehído en aire (0.65, 1.42, 2.86, 4.31, 6.47 y 8.63 µg/m^3). Las incertidumbres se expresaron como la desviación estándar, s, entre réplicas (n=2).

2.3.2 Derivados de ácidos carboxílicos. El análisis de ácidos carboxílicos, en fases acuosa y gaseosa, se basó en la derivatización de los analitos con PFBBr en medio acuoso y, en la extracción de los derivados, mediante HS-SPME. El procedimiento se detalla en las siguientes secciones.

2.3.2.1 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio orgánico. La derivatización de los ácidos carboxílicos en fase orgánica, se realizó siguiendo la metodología propuesta por Kawahara F. K. (1968). Para ésto, se preparó una solución de ácidos carboxílicos (C_2-C_6, y benzoico) en acetona (25 mL; 0.2 mg/L), la cual fue transferida a un balón, de fondo redondo con boca esmerilada, de 250 mL. A continuación, se añadieron 31,25 mg (22 µL) de PFBBr y 12.5 mg de K_2CO_3 (99%); la mezcla se sometió a reflujo con calentamiento (60 °C) durante

3 h. Una vez cumplido este tiempo, el sistema se dejó a temperatura ambiente por 3 h. Luego, el producto de la reacción fue transferido a un embudo de separación de 500 mL, donde se trató con una mezcla de éter etílico (125 mL) y acetato de etilo (5 mL). A continuación, se adicionaron 5 mL de agua, con el fin de remover la acetona presente en el medio; la fase orgánica final, se secó con sulfato de sodio anhidro ($NaSO_4$) y se concentró a sequedad, en atmósfera de nitrógeno. Finalmente, los ésteres de PFB se redisolvieron en 1 mL de *n*-hexano, para su posterior análisis por GC/ECD y GC-MS (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.2.3**).

2.3.2.2 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio acuoso. Se prepararon, una solución (430 mmoles/L) de bromuro de pentaflúorbencilo en acetona y una solución *stock* (10 mmoles/L) de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (C_2-C_6) y ácido benzoico, en acetona. A partir de la solución *stock* de ácidos, se prepararon soluciones de trabajo en concentraciones de 1.27, 2.70, 5.20, 7.20, 10.8, 21.6, 32.0, 43.2 y 86.4 µmoles/L, cada una de las cuales se sometió a derivatización. De cada una de estas soluciones se tomaron 9 mL y se transfirieron a un vial de 12 mL (con tapa rosca y *septum* de silicona), donde se les añadieron el PFBBr (430 mmoles/L) en exceso estequiométrico (9 veces) y 1 mL de la solución acuosa de K_2CO_3, (500 ppm). Después de tapar los viales de reacción y cubrir sus tapas con papel parafínico, para prevenir la volatilización de los reactivos, éstos se calentaron en un baño de agua a 60 °C, durante 4 h. Transcurrido este tiempo, los viales se retiraron y, luego, se introdujeron a un baño con hielo, durante 10 min. Los ésteres formados, fueron extraídos inmediatamente, por SPME en modo *headspace* y analizados por GC/ECD (Véase **Sección 2.2.2**). Las áreas cromatográficas de los derivados, obtenidas para las diferentes soluciones de reacción, se utilizaron para construir la curva de calibración (concentración *Vs* área), para cuantificar, por HS-SPME-GC/ECD, los ácidos carboxílicos volátiles en solución.

2.3.3 Determinación de figuras de mérito para las soluciones de calibración de los ésteres de pentaflúorbencilo. Las figuras de mérito [exactitud y reproducibilidad de tiempos de retención (t_R), tiempos de retención relativos (t_{RR}), áreas cromatográficas, factores de respuesta (R_f) y factores de respuesta relativos (RR_f) del ECD], fueron determinadas tanto para las calibraciones con inyección automática, como para la calibración mediante HS-SPME-GC/ECD. En el primer caso, 1.0 µL de cada solución de calibración, se inyectó al cromatógrafo de gases. Cada medición se realizó por triplicado, determinando parámetros estadísticos, tales como desviaciones estándar (s) y coeficientes de variación (*CV*, %). En el último caso, para cada concentración en la curva de calibración, se prepararon 3 soluciones, que fueron analizadas por HS-SPME-GC/ECD, y los resultados fueron evaluados estadísticamente.

2.4 MUESTREO

Para el desarrollo del presente trabajo, se adaptó una serie de sistemas de muestreo, de acuerdo con el tipo de matriz a estudiar, los cuales se describen en las secciones siguientes.

2.4.1 Análisis de aliento humano. Para este estudio se utilizaron dos sistemas de muestreo, *i.e.* dinámico y estático.

2.4.1.1 Muestreo dinámico por SPME-GC/ECD. Aunque la fibra de SPME se puede exponer directamente en la boca de un voluntario, es necesario evitar que entre en contacto con su lengua, por lo que para estos ensayos, se usó un dispositivo de SPME modificado (Véase **Figura 10**), similar al reportado por Grote C. y Pawliszyn J. (1997), en su trabajo sobre análisis de hidrocarburos en aliento humano. Para proteger la fibra, los autores adaptaron una boquilla

elaborada con un tubo de vidrio, dentro de la cual se inserta el *holder* de SPME. El tubo posee un pequeño orifico en su superficie, lo que permite que el voluntario pueda disminuir el volumen muerto dentro del tubo y exhalar durante el procedimiento de muestreo. La boquilla puede reemplazarse fácilmente, lo que disminuye la posibilidad de contaminación cruzada y resulta muy favorable, por razones higiénicas.

Figura 10. Equipo SPME modificado para análisis de aliento humano.

Para el análisis de aliento, después de colocar el dispositivo entre sus labios (Véase **Figura 11**), el voluntario tomó aire, lo retuvo por 10 seg y, luego, exhaló lentamente sobre la fibra, por *ca.* 50 seg. El proceso se repitió periódicamente durante un tiempo predeterminado (5 y/o 10 min). Una vez finalizado el muestreo, la fibra se retrajo y el *holder* de SPME se llevó al puerto de inyección del GC.

Figura 11. Muestreo de aliento humano.

2.4.1.2 Recolección de aire de exhalación. En el otro procedimiento, *i.e.* muestreo estático, el aire exhalado se recogió en bolsas *Tedlar*® de 3 L con válvula de PTFE y *septum Thermogreen* de muestreo, a través del cual se insertó la aguja de SPME (Véase **Figura 12**).

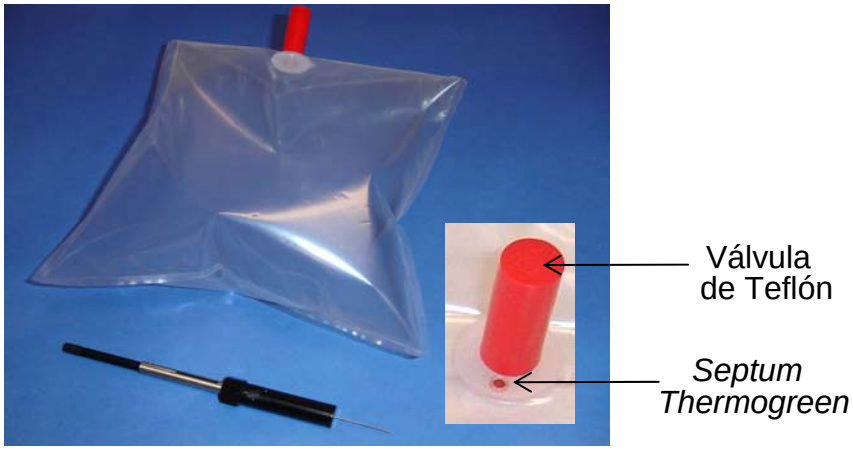


Figura 12. Bolsas *Tedlar*® para muestreo del aliento humano.

Para facilitar la recolección del aire y disminuir su humedad en las bolsas, a la válvula de Teflón, se le adaptó una manguera de PTFE de 10 cm de longitud x 0.4 mm de d.i., con un orificio superior en la mitad (≈ a los 5 cm), para liberar un porcentaje del vapor de agua presente en el aire exhalado, a la atmósfera (Véase **Figura 13**).

Antes del muestreo, las bolsas fueron purgadas exhaustivamente, para lo cual, se llenaron con aire sintético grado cero (20 ± 0.5% O_2 en N_2) y, seguidamente, se sometieron a la presión reducida; o sea, se les aplicó vacío. Al evacuar el aire, cualquier compuesto carbonílico residual fue removido, el proceso se repitió 5 veces. A continuación, para verificar la ausencia de contaminantes, cada bolsa se llenó con 3 L de aire sintético grado cero y se dejó en reposo por 15 min;

transcurrido este período de tiempo, se procedió a determinar los compuestos (ácidos carboxílicos y/o aldehídos, según el caso), presentes en el aire (blanco) y, luego, en el aire recolectado para los experimentos.

Durante el muestreo, el voluntario tomó aire, lo retuvo por 10 seg y, luego, exhaló lentamente (por *ca* .50 seg) hacia la bolsa, a través de la sonda de PTFE, tal como se ilustra en la **Figura 13**. El proceso se repitió periódicamente durante 6 min, hasta llenar completamente la bolsa.

Figura 13. Toma de muestra de aire de exhalación.

2.4.2 Cuantificación de sustancias carbonílicas y carboxílicas en aire interior (*indoors*). Las muestras de aire fueron recolectadas en bolsas *Tedlar*® (de 3 L), usando un M18 *VacBag Sampler System* (SK-M180), recomendado por la EPA para el estudio de VOC´s en aire (EPA Method 18), el cual funciona en

línea con el modulo de muestreo *Gas Sampling Pump* (TBP-102), que, a su vez, está equipado con rotámetro, flujómetro y cronómetro, previamente calibrados (Véase **Figura 14**). La cubierta superior del sistema posee dos orificios, que permiten conectar dos sondas de PTFE, una (1), que comunica la bomba de muestreo con el interior del muestreador y la otra (2), que une la bolsa de recolección con el sitio de muestreo. Este sistema previene que la muestra entre en contacto con la bomba, evitando, por tanto, la posible contaminación cruzada.

Durante la toma de muestra, el flujo permaneció a 0.02 L/min, para un tiempo total de muestreo de 12.5-15 min. Una vez finalizado el proceso (**Figura 15**), las bolsas fueron transportadas al laboratorio, para el respectivo análisis de los compuestos carbonílicos y carboxílicos.

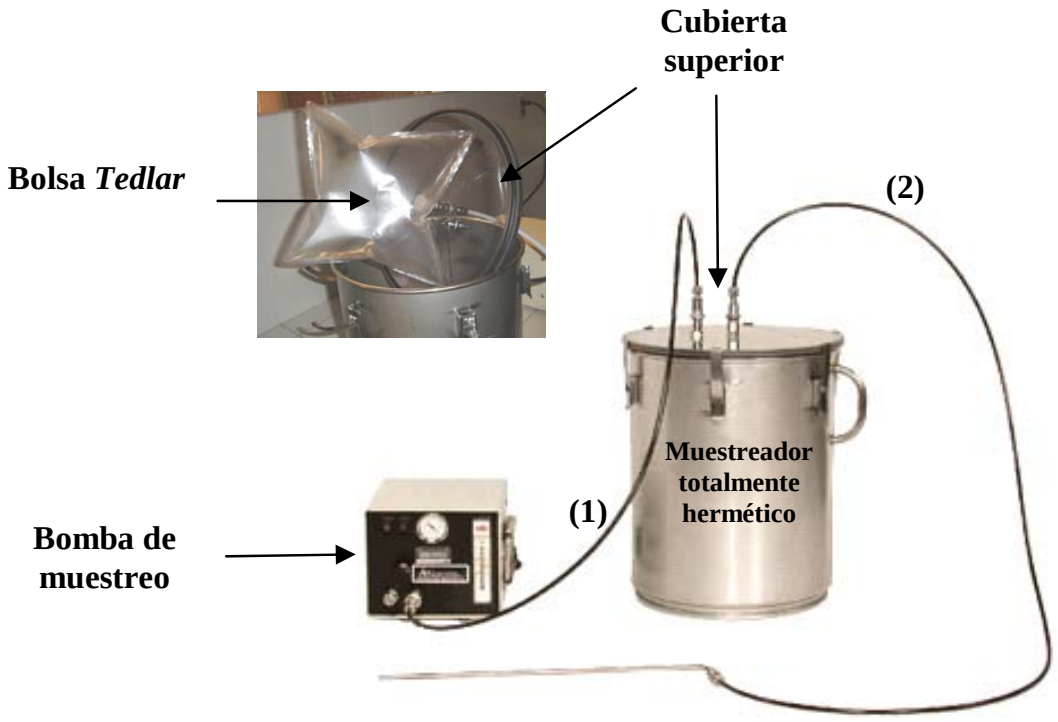


Figura 14. Equipo para muestreo de aire M18 *VacBag Sampler System*, modelo SK-M180 (*Environmental Sampling Supply*, ESS, Oakland, California, EE.UU.).

Figura 15. Muestreo de aire al interior de una fábrica de calzado (Bucaramanga, Santander).

Para la extracción-derivatización de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de aire, inicialmente, el recubrimiento polimérico de PDMS-DVB, se expuso al *headspace* de una solución acuosa de PFPH (2 mL, 1.6 mmoles/L) (Véase **Figura 16A**). Una vez extraído el agente derivatizante y saturado el recubrimiento, la fibra se retrajo y se trasladó a la bolsa que contenía los analitos (Véase **Figura 16B**), se insertó a través del *septum* de la bolsa y se expuso a la matriz gaseosa, por 15 min. Después de este tiempo, la fibra se retiró y se llevó al puerto de inyección del GC/ECD, para la desorción (250 °C, 5 min) de los derivados carbonílicos, formados sobre el recubrimiento polimérico.

Todas las muestras se analizaron por duplicado y las incertidumbres se expresaron como la desviación estándar, s, entre réplicas.

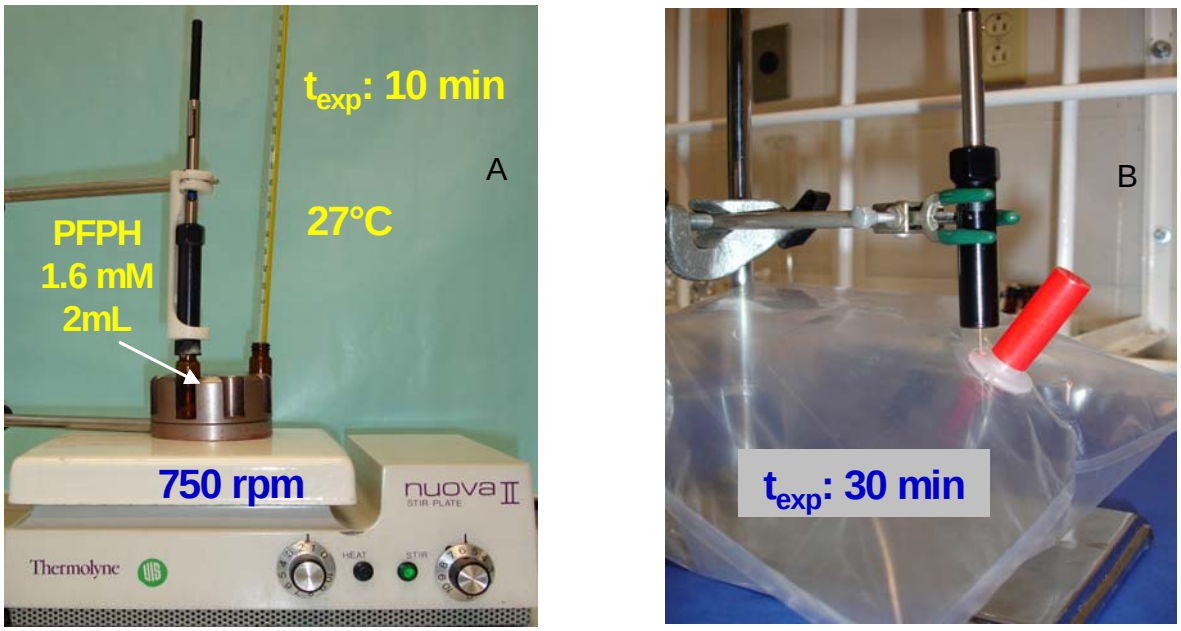


Figura 16. Extracción-derivatización de compuestos carbonílicos presentes en aire. **A**. Saturación de la fibra con el agente derivatizante (PFPH). **B**. Exposición de la fibra saturada a la matriz gaseosa, que contiene sustancias carbonílicas volátiles.

Para el análisis de los ácidos carboxílicos, la muestra de aire (3 L) se pasó a un flujo de 0.2 L/min, a través de dos *impingers*, cada uno de los cuales contenía 30 mL de solución acuosa de K_2CO_3 (50 mg/L). Para evitar la volatilización de los analitos, los *impingers* se sumergieron en un termo *Dewar*, que contenía la mezcla de agua con hielo y NaCl en saturación (Véase **Figura 17**). A continuación, se realizó la derivatización de los ácidos en fase acuosa, seguida de la extracción de los derivados mediante HS-SPME y, finalmente, los ésteres se desorbieron en el puerto de inyección y se analizaron por GC/ECD, tal como se describe en la **Sección 2.2.2**.

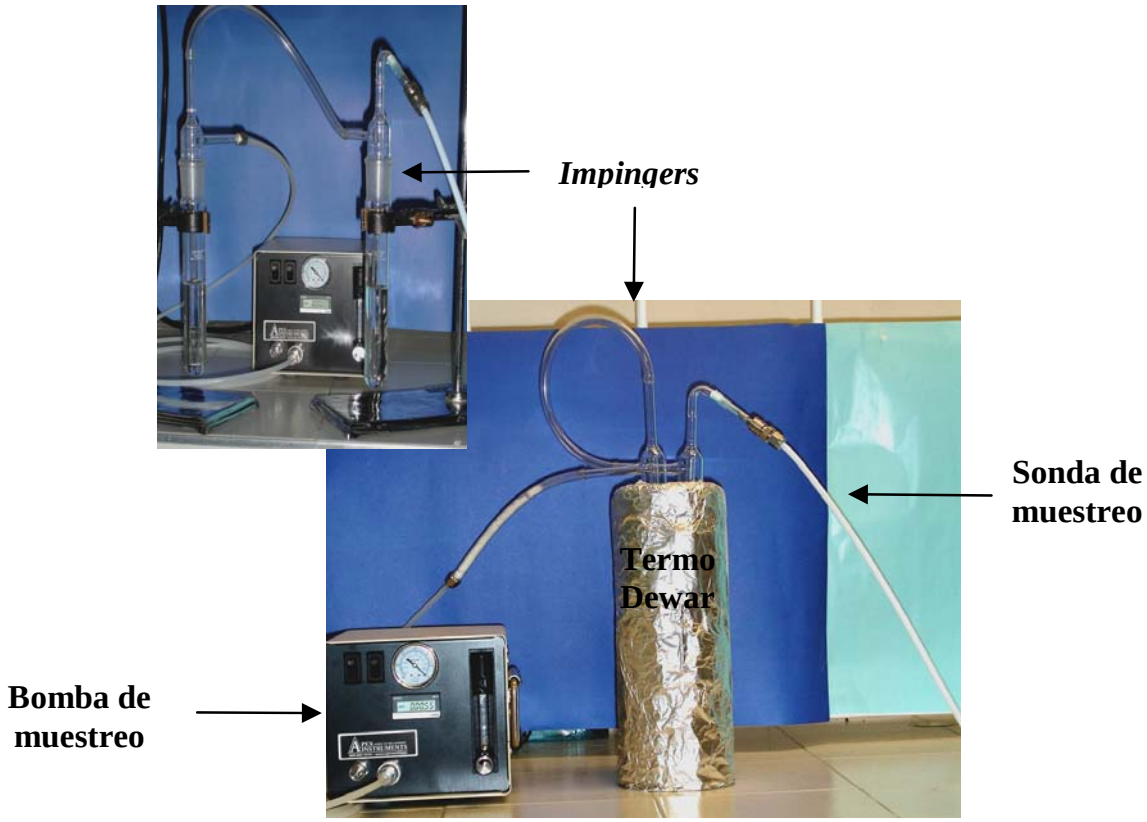


Figura 17. Dispositivo empleado para absorber los ácidos carboxílicos presentes en la matriz gaseosa, en solución acuosa de carbonato de potasio.

2.4.3 Obtención del perfil cuantitativo de compuestos carbonílicos y carboxílicos en gases de tubo de escape de carros, operados con gasolina. Las muestras de aire se recolectaron, por duplicado, en bolsas *Tedlar*® de 3 L, utilizando el sistema M18 *VacBag Sampler System* (SK-M180), descrito en la **Sección 2.4.2**. Para tomar la muestra de gases de *exhosto* con este sistema, se utilizó un tubo de acero inoxidable de 1 m x 0.8 cm (d.i.), el cual se introdujo (*ca.* 10 cm) en el tubo de escape del carro, tal como se ilustra en la **Figura 18**.

Después del muestreo, las bolsas se transportaron al laboratorio, y se procedió a realizar los respectivos análisis de aldehídos y ácidos carboxílicos en aire, mediante la SPME, tal como se describe en las **Secciones 2.5.2.4** y **2.5.3.3**.

Figura 18. Muestreo de gases del tubo de escape de un automóvil, operado con gasolina.

El tubo de muestreo se encuentra conectado a la bolsa *Tedlar*® a través de una sonda de PTFE, suficientemente larga (6 m), con el propósito de aumentar el recorrido del aire y permitir que éste se enfríe antes de llegar a la bolsa. Tanto el tubo de acero, como la sonda de PTFE, sirven para atrapar material particulado (cenizas). Durante el muestreo de automóviles sin convertidor catalítico, se forma un depósito negro sobre las paredes de la sonda; como consecuencia, una vez tomada la muestra, la sonda debe lavarse con agua, jabón y diferentes solventes, someterse a secado al vacío y, finalmente, purgarse con aire sintético grado cero. Eventualmente, algunas partículas pueden pasar a la bolsa, pero ninguna entra a las trampas líquidas (*impingers*), usadas para absorber los ácidos carboxílicos.

2.4.4. Monitoreo de compuestos carbonílicos de origen biogénico. En este trabajo se presenta un ejemplo de aplicación de la técnica de SPME, para monitorear aldehídos y cetonas, emitidos por plantas.

2.4.4.1 Muestreo *in vitro*. Para el análisis *in vitro* de los compuestos carbonílicos, presentes en la fragancia liberada por las flores de *Brugmansia suaveolens* ("Borrachero"), se utilizó un sistema estático constituido por un recipiente para *headspace* de 20 mL, con *septum* de butilo, recubierto con PTFE, y agrafe de aluminio.

Para el muestreo, se retiraron cuidadosamente las flores del arbusto y se llevaron inmediatamente al laboratorio, donde se cortaron en pedazos uniformes, se pesaron (*ca.* 4-5 g) y se depositaron en el recipiente de vidrio de 20 mL, el cual se llenó hasta la mitad, para dejar espacio de cabeza suficiente para la exposición de la fibra de SPME. Una vez depositado el material vegetal, el frasco se tapó y se dejó en reposo por 10 min. A continuación, se procedió a exponer el recubrimiento polimérico de PDMS-DVB, previamente saturado con PFPH, al *headspace* de la muestra, durante 30 min (**Figura 19**). Terminado el proceso, se retiró la fibra y los derivados de sustancias que contenían el grupo carbonilo, se analizaron por GC/ECD (Véase **Sección 2.2.2**).

2.4.4.2 Muestreo *in vivo*. Para estudiar compuestos orgánicos volátiles de origen biogénico (BVOC), emitidos *in vivo* por las flores de *Brugmansia suaveolens* ("Borrachero"), se utilizó una cámara, constituida por un cilindro de material acrílico, de 11 cm de diámetro por 30 cm de largo, con una adaptación rectangular especial en la mitad (≈ a los 15 cm), para la inserción del *holder* con la fibra de SPME. El cilindro tenía uno de sus extremos totalmente sellados, mientras que el otro permitía retirar y poner, una tapa de un polímero de silicona flexible con un orificio en el centro, a través del cual se introdujo la flor viva, tal como se ilustra en la **Figura 20**.

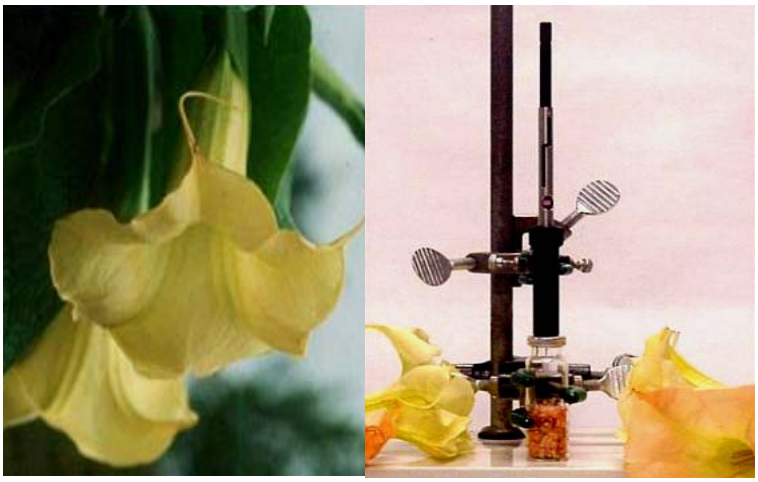


Figura 19. Muestreo *in vitro* de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* (“Borrachero”).

Figura 20. Muestreo *in vivo* de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* (“Borrachero”).

Para el muestreo por SPME, de los compuestos carbonílicos presentes en la fragancia liberada por la flores de *Brugmansia suaveolens*, se seleccionó una de las flores y se introdujo en el cilindro directamente desde el arbusto. Transcurridos 10 min, se introdujo la fibra de SPME, previamente saturada con el agente derivatizante (PFPH), y se expuso al aire alrededor del *especimen*, por 30 min; la distancia entre la fibra SPME y la muestra fue *ca.* 5 cm. Los compuestos carbonílicos derivatizados sobre la fibra, se analizaron luego por GC/ECD (Véase **Sección 2.2.2**). El tiempo transcurrido entre el muestreo y el análisis cromatográfico fue menor de 10 min. Se supone, que bajo estas condiciones, las pérdidas del material absorbido fueron mínimas.

2.4.5 Obtención del perfil cuantitativo de compuestos carbonílicos y carboxílicos en sudor humano (pies). Para la recolección del sudor humano originado en los pies, se utilizó una plantilla de algodón prensado recubierta con gasa aséptica (**Figura 21**). La plantilla, acorde con la talla del pie de cada voluntario, se usó durante una jornada laboral de 8 h, al término de la cual, se retiró y se sometió a los respectivos análisis de ácidos carboxílicos y aldehídos. Durante dos días, previos al muestreo, se les solicitó a los voluntarios realizar el lavado de sus pies sólo con agua y no usar talcos o productos antitranspirantes.

Con el fin de estandarizar las condiciones de trabajo, para todos los análisis, se utilizó un pedazo de plantilla de la parte central del pie. Para el monitoreo de aldehídos, la muestra se pesó (*ca.* 1.5 g) directamente en un vial *headspace* de 20 mL, el cual se tapó y se guardó en la oscuridad, en la nevera, hasta el respectivo análisis por SPME. Para los ácidos carboxílicos, la muestra se depositó en un frasco tapa azul, de 30 mL, al cual se le agregaron 25 mL de agua HPLC, para solubilizar los ácidos carboxílicos presentes. El conjunto se dejó en reposo por 24 h; luego 9 mL del extracto acuoso se transfirieron a un recipiente de

vidrio de 12 mL con tapa rosca y *septum* de PTFE, y se procedió con la derivatización de los ácidos carboxílicos.

Figura 21. Muestreo de sudor de pies, usando una plantilla de algodón recubierta con gasa aséptica.

2.5 IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS COMO HIDRAZONAS.

2.5.1 Determinación de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, mediante HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra, con HBT.

Con el fin de establecer las condiciones más apropiadas para la reacción de aldehídos con HBT, directamente sobre la fibra de SPME, se evaluaron algunos de los parámetros operacionales, que afectan el proceso de extracción (Pawliszyn J., 1997) y se describen a continuación.

2.5.1.1 Estudio de las variables que afectan el proceso de la saturación de la fibra de SPME con HBT.

2.5.1.1.1 Selección de la fibra de SPME. La SPME es un proceso de equilibrio, donde los analitos se distribuyen entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra. El coeficiente de partición está condicionado por la afinidad del analito con la fase estacionaria, donde el factor predominante es la polaridad de esta última (Pawliszyn J., 1997; 1999). Por lo tanto, escogiendo correctamente la fibra de SPME, se puede incrementar la cantidad de los analitos extraídos.

En este sentido, se hizo un estudio comparativo sobre la capacidad de los recubrimientos de poli(dimetilsiloxano) (PDMS, 100 µm) y de poli(acrilato) (PA, 80 µm), con características apolar y polar, respectivamente, para absorber el agente derivatizante (HBT). Dado que este compuesto es poco soluble en agua y tiene una presión de vapor muy baja, se procedió a trabajar con la muestra sólida. Para ésto, se pesó una cantidad exacta (0.3 mg) de HBT en un recipiente de vidrio de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona, a través del cual se insertó la fibra de PDMS para exponerla durante 10 min al *headspace* de la muestra. Para favorecer la volatilización del HBT y, por tanto, el proceso de SPME, la muestra se calentó a 95 °C. Luego, el HBT retenido sobre el recubrimiento de SPME, fue desorbido en el puerto de inyección del GC/FPD, a 250 °C por 10 min, y cuantificado de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.1.1**. El mismo proceso se repitió con la fibra de PA.

2.5.1.1.2 Efecto de la temperatura y el tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de extracción del HBT por SPME. La temperatura de extracción es un factor de importancia a considerar en la estandarización de los procesos de SPME; aunque en la mayoría de los casos su incremento favorece la extracción, pueden presentarse también efectos adversos tales como volatilización, descomposición o contaminación de la muestra, que aumentan el costo y el

tiempo del experimento. Así mismo, el tiempo de exposición de la fibra, juega un papel importante en la SPME y, en combinación con la temperatura, puede aumentar considerablemente la eficiencia de la extracción de sustancias poco volátiles. Con el fin de establecer las condiciones de temperatura y tiempo (min) más apropiadas para la SPME de HBT, se evaluaron diferentes temperaturas (65, 75, 85 y 95 °C) combinadas con varios tiempos (10, 60 y 120 min) de extracción.

El FPD se satura rápidamente con el analito; con el tiempo de extracción su cantidad sobre la fibra aumenta considerablemente, por ello, para cada ensayo se utilizaron sólo 0.1 mg de HBT. La muestra fue pesada en un recipiente de vidrio de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona, a través del cual se insertó la fibra de PA, seleccionada previamente por su afinidad con el compuesto en estudio (ambos, el compuesto y el recubrimiento, son polares). El HBT retenido, fue desorbido en el puerto de inyección del GC/FPD, a 250 °C, por 10 min, y cuantificado siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.3.1.1**.

2.5.1.1.3 Determinación del tiempo de equilibrio. Una vez seleccionada la fibra y la temperatura de trabajo, se determinó el tiempo de equilibrio, correspondiente al tiempo requerido para extraer la cantidad máxima de HBT, mediante SPME en modo *headspace*. Para ésto, se realizó una serie de experimentos en los que la fibra de PA se expuso a la fase vapor sobre el HBT (0.3 mg), a 95 °C, durante 10, 20, 40, 60, 80 y 120 min.

El perfil de adsorción de HBT sobre la fibra en función del tiempo de exposición, determinado mediante GC/FPD (Véase **Secciones 2.2.1** y **2.3.1.1**), mostró un aumento constante de la cantidad de HBT adsorbida sobre la fibra; sin embargo, transcurridos 120 min, aún no se había alcanzado el equilibrio, o sea, la saturación de la fibra con el agente derivatizante (0.3 mg de HBT, 95 °C, fibra de PA). Ante esta situación, se procedió a trabajar bajo condiciones de no-equilibrio, fijando el tiempo de exposición de la fibra, de tal manera, que la cantidad de HBT adsorbida

sobre el recubrimiento de PA, fuera suficiente para llevar a cabo las reacciones de derivatización de los aldehídos en estudio.

2.5.1.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en fase gaseosa. La derivatización de aldehídos de bajo peso molecular con HBT, sobre la fibra de PA, se evaluó en una atmósfera gaseosa simulada. Para ésto, se preparó una solución (2 mmoles/L) de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en metanol, de la cual se tomó 1 µL y se depositó en el interior de un recipiente de vidrio de 12 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona. El sistema se dejó en reposo a temperatura ambiente (27 °C) durante 5 min; transcurrido este tiempo, se perforó el *septum* y se introdujo una fibra de PA, previamente expuesta a los vapores de HBT (0.3 mg, 95 °C, 20 min). La extracción-derivatización de los analitos sobre la fibra de SPME, se llevó a cabo a temperatura ambiente (27 °C) durante 1 min. Las HBT-hidrazonas de aldehídos, se analizaron por GC/FPD (Véase **Secciones 2.2.1** y **2.3.1.1**).

2.5.1.3 Determinación del hexanal (C_6) en fase vapor. El análisis de aldehídos mediante SPME con derivatización sobre la fibra con HBT, fue valorado para la determinación del hexanal en matrices líquidas. A partir de una solución *stock* (2 mmoles/L) del hexanal en metanol, se preparó una solución de trabajo (40 µmoles/L) en agua HPLC, de la cual se tomaron 2 mL y se transfirieron a un recipiente de vidrio de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona. La fibra de PA, previamente cargada con el agente derivatizante, HBT (0.3 mg, 95 °C, 20 min), se expuso al *headspace* de la solución del hexanal, a temperatura ambiente (25 °C) y con agitación magnética (800 rpm). El tiempo de exposición de la fibra se varió entre 10 y 80 min; los derivados formados en cada caso, fueron cuantificados por GC/FPD, siguiendo la metodología descrita en las **Secciones 2.2.1** y **2.3.1.1**. El proceso se llevó a cabo por duplicado.

2.5.2 Determinación por HS-SPME de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, con extracción-derivatización (PFPH) simultánea *in situ*.

Con el fin de establecer las condiciones más favorables, para la determinación de aldehídos de bajo peso molecular en matrices líquidas y gaseosas, mediante SPME con derivatización (PFPH) simultánea sobre la fibra y el análisis por GC/ECD, se estudiaron las variables descritas a continuación.

2.5.2.1 Estudio de las variables que afectan la saturación de la fibra de SPME con PFPH.

2.5.2.1.1 Selección de la fibra de SPME. Se evaluó la capacidad de la fibra para adsorber el agente derivatizante (PFPH), usando los recubrimientos poliméricos de PDMS (d_f = 100 µm), PDMS-DVB (d_f = 65 µm) y PA (d_f = 80 µm), de naturaleza apolar, medianamente polar y polar, respectivamente. Inicialmente, la fibra de PDMS, se expuso durante 10 min al *headspace* de una solución acuosa de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L), colocada previamente en un recipiente de 4.5 mL, a 27 °C y bajo agitación magnética (800 rpm). Luego, la PFPH fue desorbida en el puerto de inyección del sistema GC/ECD, a 250 °C, durante 5 min, y cuantificada tal como se describe en la **Sección 2.3.1.2**. Para descartar los posibles efectos de memoria (*carry-over*), después de retirar la fibra del puerto de inyección, ésta fue protegida y mantenida a temperatura ambiente por 20 min, transcurrido este tiempo, se sometió a una segunda desorción. El mismo procedimiento se realizó para las fibras de PDMS-DVB y de PA.

2.5.2.1.2 Determinación del tiempo de equilibrio. El tiempo requerido para extraer por HS-SPME la cantidad máxima de PFPH, se determinó exponiendo la fibra de PDMS-DVB, seleccionada previamente por su capacidad más alta de retener el agente derivatizante (Véase **Sección 2.5.2.1.1**), al *headspace* de una

solución acuosa de PFPH (2 mL; 0.1 mmoles/L), a 27 °C y 800 rpm. El tiempo de exposición se varió en el rango de 10-120 min. El proceso se repitió con soluciones de 0.8, 1.6, 2.4, 4.8 y 7.2 mmoles/L. Después de cada tiempo de exposición, la PFPH fue desorbida en el puerto de inyección del sistema GC/ECD, a 250 °C, por 5 min, y cuantificada de acuerdo con el procedimiento de la **Sección 2.3.1.2**.

2.5.2.1.3 Adición de sal (salting out). Otro parámetro de interés, en la evaluación de metodología basada en la SPME, es el efecto *salting out*; en trabajos previos del grupo (Stashenko E. E. *et al.*, 2002) se observó, que aunque la adición de sales (*e.g.*, KCl), aumentaba la eficiencia de extracción de PFPH, también se presentaba la co-extracción, en alto grado, tanto de las impurezas presentes en el agente derivatizante, como de las provenientes de la sal. Por lo que, en la presente investigación, se optó por no añadir la sal a las soluciones.

2.5.2.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en matrices líquidas.

2.5.2.2.1 Determinación del tiempo de equilibrio. La SPME con derivatización con PFPH sobre la fibra de PDMS-DVB, se evaluó en fase vapor. Para ésto, se preparó una solución acuosa de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en concentraciones equimolares de 0.2 µmoles/L, de donde se tomaron 2 mL, que se transfirieron a un recipiente de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona. Luego, la fibra de PDMS-DVB, previamente saturada con PFPH (1.6 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 20 min), se expuso al *headspace* de la solución de aldehídos. La extracción-derivatización simultánea de los analitos, se realizó a temperatura ambiente (27 °C) y bajo agitación magnética (800 rpm), durante 5, 10, 20, 40 y 60 min. Las PFPH-hidrazonas formadas sobre la fibra, fueron analizadas y cuantificadas por GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.1.2**).

2.5.2.2.2. Efecto del agente derivatizante. Para observar el efecto de la cantidad de agente derivatizante sobre la reacción, la extracción-derivatización de aldehídos mediante HS-SPME (2 mL, solución acuosa 0.2 µmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 40 min) se realizó con 14.2 ± 0.7, 16.9 ± 0.8 y 25.9 ± 0.5 nmoles de PFPH. Para ésto, la fibra de PDMS/DVB se expuso a los vapores de soluciones acuosas de PFPH de 1.6 mmoles/L (6 min), 2.4 mmoles/L (4 min) y 4.8 mmoles/L (12 min), respectivamente. Las cantidades de PFPH con las cuales se realizaron los experimentos, fueron determinadas como un promedio de las mediciones derivadas de las dos exposiciones de la fibra a la respectiva solución de PFPH.

2.5.2.3 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en matrices gaseosas simuladas. Para extender la metodología de derivatización de aldehídos en fase vapor, al análisis de compuestos carbonílicos en aire, se realizaron estudios de escalado, utilizando recipientes de vidrio de 12 mL, con tapas rosca y *septa* de silicona, y un sistema de vidrio para análisis de SPME bajo condiciones de no equilibrio, diseñado con base en el sistema publicado por Ai J. (1997).

2.5.2.3.1 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en el aire contenido en un recipiente de vidrio de 12 mL. La derivatización de aldehídos de bajo peso molecular con PFPH, sobre la fibra de PDMS, se evaluó en una atmósfera gaseosa simulada. Para ésto, se preparó una solución (2 mmoles/L) de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en metanol, de la cual se tomó 1 µL y se depositó en el interior de un recipiente de vidrio de 12 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona. El sistema se dejó en reposo a temperatura ambiente (27 °C) durante 5 min; transcurrido este tiempo, se perforó el *septum* y se introdujo una fibra de PDMS-DVB, previamente saturada con PFPH (2 mL, 2.4 mmoles/L, 3 min). La extracción-derivatización de los analitos sobre la fibra de SPME, se llevó a cabo a

temperatura ambiente (27 °C), variando el tiempo entre 1 y 4 min. Los derivados PFPH-hidrazonas, se analizaron por GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.1.2**).

El tiempo de pre-equilibro, o tiempo requerido para lograr la completa distribución de los analitos entre las fases, vapor y líquida, antes de empezar su extracción, se determinó con base en una serie de experimentos, desarrollados según el protocolo descrito en el párrafo anterior, usando 5 min de reacción. Los tiempos de pre-equilibrio evaluados fueron 2, 5, 10 y 20 min.

2.5.2.3.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en fase gaseosa, usando un dispositivo de headspace estático. También se realizaron estudios de fase gaseosa usando un *headspace* estático, para ésto, se utilizó un dispositivo (**Figura 22**), construído con base en el diseño publicado por Ai J. (1997). Este dispositivo está diseñado de tal manera, que permite trabajar con la fase vapor aislada totalmente del *headspace* de la solución de los analitos. La solución acuosa se deposita en el recipiente inferior (1), el cual tiene una capacidad de 250 mL. Los aldehídos presentes en el *headspace* de la solución, se distribuyen entre los dos recipientes (1 y 2), a través de una válvula de aguja (fabricada en Teflón), que los comunica. Después de cierto período de tiempo (*ca.* 60 min), cuando se alcanza el equilibrio entre los dos espacios libres, se cierra la válvula de conexión. A continuación, la fibra de PDMS-DVB, cargada previamente con el agente derivatizante (PFPH, 2 mL, 2.4 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 3 min), se inserta en el frasco superior para el muestreo, que ocurre solamente en la fase gaseosa. El volumen del frasco superior (2), que corresponde al volumen de la matriz gaseosa, es *ca.* 50 mL.

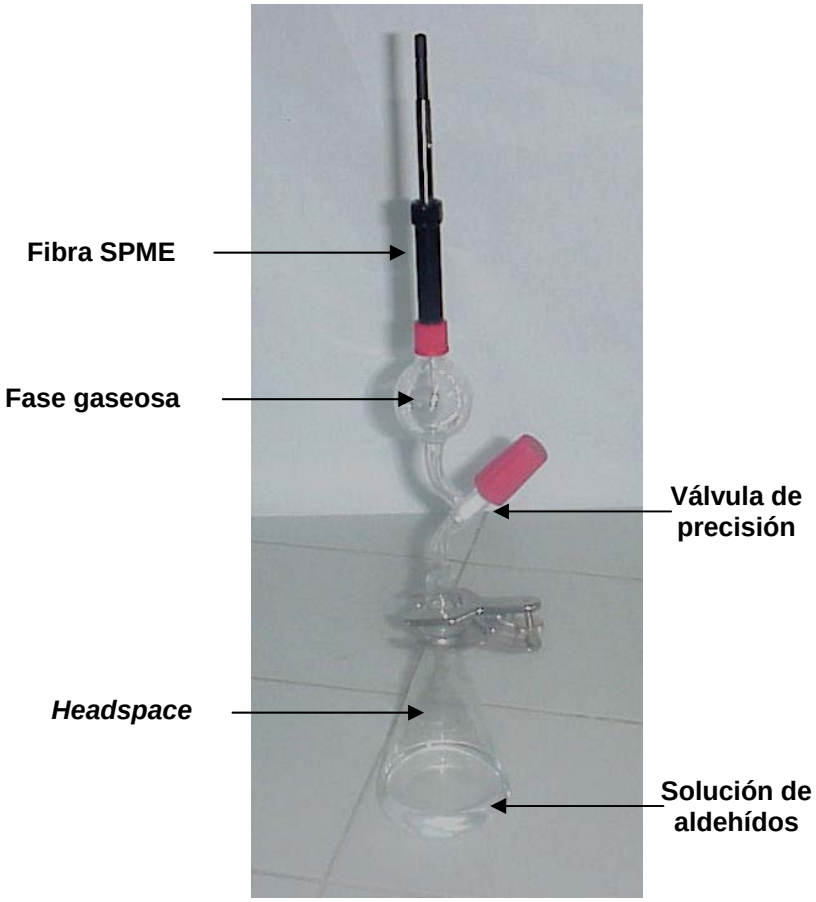


Figura 22. Dispositivo para SPME de *headspace* estático. El frasco inferior se puede aislar del frasco superior, y sólo la fase vapor en el frasco superior se somete al muestreo SPME.

Para determinar el tiempo en el que se alcanza el equilibrio de fases entre los dos recipientes, a partir de un *stock* de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en MeOH, se preparó una solución acuosa de aldehídos (100 mL, 4 µmoles/L). La solución se depositó en el frasco inferior (1) del dispositivo para SPME de *headspace* estático (Véase **Figura 22**) y se mantuvo a temperatura ambiente (27 °C), bajo agitación magnética (800 rpm), durante 20 min. Transcurrido este tiempo, se suspendió la agitación, se cerró la válvula de precisión que conecta los recipientes 1 y 2, se introdujo la fibra de SPME en el recipiente superior (2) y se expuso el

recubrimiento polimérico (27 °C, 30 min), saturado previamente con PFPH, a la fase gaseosa enriquecida con aldehídos. El proceso se repitió con tiempos de pre-equilibrio de 40, 60, 80 y 120 min.

Para estudiar el efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre el proceso de derivatización, se prepararon varias soluciones que fueron procesadas tal como se describe en los párrafos anteriores, con un tiempo de pre-equilibro de 60 min (fijado previamente) y con tiempos de muestreo de 20, 30, 40 y 80 min, respectivamente.

2.5.2.4 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular en muestras de aire. A partir de una solución *stock* (2 mmoles/L) de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en MeOH, se prepararon diferentes mezclas gaseosas (Véase **Sección 2.3.1.2, Figura 9**). Una vez preparado el estándar, éste se dejó en reposo por 15 min; luego, la fibra de PDMS-DVB, previamente expuesta a una solución acuosa de PFPH (2 mL, 2.4 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 5 min), se introdujo en la bolsa de aire, a través del *septum*, y se expuso a los analitos por 30 min. Los derivados hidrazónicos, formados sobre la fibra de SPME, se desorbieron en el puerto de inyección del GC/ECD a 250 °C, por 10 min, y se analizaron bajo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**.

2.5.3 Determinación de compuestos carboxílicos de bajo peso molecular en fase líquida, mediante derivatización con PFBBr y extracción posterior de los derivados por HS-SPME. Para facilitar el análisis de ácidos carboxílicos en muestras de aire en campo, éstas fueron recolectadas en bolsas *Tedlar*® y transportadas al laboratorio, donde se transfirieron a trampas acuosas de carbonato de potasio, K_2CO_3. La determinación de los analitos se realizó tal como se describe en las siguientes secciones.

2.5.3.1 Estudio de las variables que afectan la derivatización de ácidos carboxílicos con bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) en medio acuoso. Los procedimientos más comunes para analizar ácidos carboxílicos en muestras de aire ambiental y emisiones de vehículos, normalmente, incluyen una primera fase de recolección de los analitos en trampas alcalinas de naturaleza sólida o líquida, a través de las cuales se hacen pasar grandes volúmenes de aire (Dabek-Zlotorzynska E. *et al*., 2001). Los compuestos de interés son, entonces, extraídos con solventes orgánicos (*e.g*., acetona, hexano), que son removidos hasta sequedad, bajo atmósfera de nitrógeno. Finalmente, los analitos se redisuelven en un solvente orgánico apropiado, para su posterior análisis por GC (Dabek-Zlotorzynska E. *et al*., 2001). Una alternativa de concentración, podría ser la SPME, sin embargo, el proceso no funciona bien cuando se usan solventes orgánicos, por lo que en el presente trabajo se emplearon matrices acuosas.

Así se propuso una metodología de análisis de ácidos carboxílicos basada en la HS-SPME. Las muestras de aire recolectadas en bolsas *Tedlar*®, se burbujean en una matriz líquida rica en K_2CO_3, para facilitar la sobulización de los analitos y evitar su volatilización. A continuación, los ácidos carboxílicos en solución son derivatizados con bromuro de pentaflúorbencilo, PFBBr, siguiendo el procedimiento general descrito en la literatura para la reacción en medio orgánico (Kawahara F. K., 1968), en la que se utiliza K_2CO_3 como catalizador. Aunque en la mayoría de los casos la reacción se lleva a cabo en medio orgánico, ésta también transcurre en medio acuoso, que es más apropiado para HS-SPME (Brill J. H. *et al.*, 1991). Con la metodología propuesta en este trabajo, la derivatización de los ácidos carboxílicos se realizó directamente en la matriz acuosa, sin necesidad de extraer los analitos con disolventes orgánicos (Acetona; óxido de *tri-n*-octilfosfina, TOPO; metil-*t*-butil-éter, MTBE). Así, el K_2CO_3 adicionado a las trampas líquidas tenía doble finalidad, a saber: ionizar los ácidos en solución acuosa y catalizar la reacción nucleofílica. Finalmente, los ésteres de

PFB fueron extraídos mediante HS-SPME, para lo cual, no se necesitaban volúmenes grandes de muestra.

El proceso de estandarización de la metodología de análisis de ácidos carboxílicos mediante derivatización con PFBBr, seguida de la extracción de los ésteres de PFB con HS-SPME, se presenta en las secciones siguientes.

2.5.3.1.1 Efecto del pH. Se preparó una solución *stock* de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (C_1-C_6) y ácido benzoico, en metanol, en concentraciones equimolares (44.44 µmoles/L). Del *stock* se tomaron 9 mL y se transfirieron a un recipiente de 12 mL, donde se les adicionaron 1 mL de una solución acuosa de K_2CO_3 (500 mg/L) y 40 µL de PFBBr en acetona (430 mmoles/L). De esta forma, las concentraciones de ácidos, K_2CO_3 y PFBBr en la mezcla de reacción, fueron de 40 µmoles/L, 50 mg/L y 1.72 mmoles/L, respectivamente, y el pH se ajustó a 6. Para la reacción, el recipiente se tapó, se cubrió con papel parafínico y se sumergió en un baño de agua (60 °C) por 4 h; transcurrido este tiempo, se transfirió a un baño con hielo, durante 10 min. Seguidamente, se procedió a extraer y analizar los ésteres formados, mediante HS-SPME-GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**). El procedimiento se repitió a pH 3, 7 y 8, para lo cual se utilizaron soluciones acuosas de H_2SO_4 (1 moles/L) y NaOH (1 moles/L). Cada experimento se llevó a cabo por duplicado.

2.5.3.1.2 Tiempo de reacción. Siguiendo la metodología descrita en la **Sección 2.5.3.1.1**, se prepararon 10 mezclas de reacción (ácidos: 40 µmoles/L, c/u; K_2CO_3: 50 mg/L y PFBBr: 1.72 mmoles/L) a pH 6, y se sometieron a calentamiento (60 °C) en un baño termostatado. El proceso se llevó a cabo, por duplicado, variando el tiempo de reacción (1, 2, 3 ,4 y 5 h). Al final de cada tiempo, los viales fueron retirados y sumergidos en un baño con hielo, por 10 min. Seguidamente, se procedió a extraer y analizar los ésteres de PFB formados, mediante HS-SPME-GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**).

2.5.3.1.3 Temperatura de reacción. Siguiendo la metodología descrita en la **Sección 2.5.3.1.1**, se prepararon 2 mezclas (ácidos: 40 µmoles/L, c/u; K_2CO_3: 50 mg/L y PFBBr: 1.72 mmoles/L) a pH 6, y se sometieron a reacción, a 60 °C por 4 h. El procedimiento se repitió variando la temperatura de la reacción, *i.e.* 70 y 80 °C. Los ésteres de PFB, obtenidos en cada caso, fueron analizados por HS-SPME-GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**).

2.5.3.1.4 Concentración de agente derivatizante. Para este ensayo, se prepararon cinco mezclas iguales (ácidos: 40 µmoles/L,c/u; K_2CO_3: 50 mg/L) (Véase **Sección 2.5.3.1.1**) y se sometieron a reacción a 60 °C, por 4 h. El agente derivatizante (PFBBr) se adicionó a las mezclas con un exceso estequiométrico de 4, 6, 7, 9 y 13 veces, respectivamente, y el pH de cada medio fue ajustado a 6. Transcurrido el tiempo de reacción (4 h), las muestras fueron sumergidas en un baño con hielo, por 10 min. Finalmente, los ésteres de PFB, obtenidos en cada caso, se analizaron por HS-SPME-GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**). Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

2.5.3.2 Estudio de las variables que afectan el proceso de HS-SPME de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB) en solución acuosa. La extracción de los ésteres, formados por la reacción de los ácidos carboxílicos con bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr), en la matriz líquida, se llevó a cabo mediante SPME en modo *headspace*. Con el fin de obtener la máxima sensibilidad, se evaluaron los siguientes parámetros: tiempo y temperatura de extracción, adición de sal (*e.g.*, NaCl) a la muestra y su pH.

Considerando las características de los compuestos a determinar (ésteres de PFB), experimentos preliminares, y los reportes de la literatura (Pan L. y Pawliszyn J., 1997), para este procedimiento se escogió la fibra de SPME con recubrimiento de poli(acrilato), PA (d_f = 85 µm).

2.5.3.2.1 Efecto del pH. La solución acuosa (2 mL) de ésteres de PFB, a pH igual a 7, se transfirió a un recipiente de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de silicona, a través del cual se insertó la fibra de SPME. Seguidamente, el recubrimiento polimérico de poli(acrilato) (PA) se expuso a la fase vapor de la muestra, por 30 min, a temperatura ambiente (30 °C) y bajo agitación magnética (800 rpm). Los ésteres de PFB, fueron desorbidos térmicamente en el puerto de inyección del sistema GC/ECD, a 250 °C, por 10 min, y analizados según los procedimientos descritos en las **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**. El experimento se repitió, variando el pH de la muestra (3 y 9), utilizando soluciones acuosas de H_2SO_4 (1 mmoles/L) y NaOH (1 mmoles/L), respectivamente

2.5.3.2.2 Efecto del tiempo. El tiempo requerido para extraer por SPME la máxima cantidad de ésteres, se determinó repitiendo el proceso de extracción con diferentes tiempos de exposición de la fibra de SPME. El recubrimiento de poli(acrilato) se expuso a los vapores de la solución (2 mL, pH 7, 30 °C y 800 rpm), durante 20, 30, 40, 60 y 80 min. Después de cada tiempo, los ésteres de PFB extraídos, fueron analizados por GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**).

2.5.3.2.3 Efecto salting-out. El efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de extracción, se evaluó adicionando cloruro de sodio (NaCl) a las muestras, en concentraciones de 10, 20 ó 30% (p/v), antes del procedimiento de HS-SPME. En un recipiente de 4.5 mL, se pesaron 100 mg de NaCl y se depositaron 2 mL de la solución de ésteres; luego, el pH de la mezcla fue ajustado a 7. A continuación, la fibra de PA se expuso durante 30 min a la fase vapor de la solución (30 °C, 800 rpm, 40 min). Los ésteres de PFB extraídos fueron analizados por GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**). El proceso se repitió, adicionando 200 y 400 mg de NaCl a la solución de extracción. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

2.5.3.3 Determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en muestras de aire. Para evaluar el alcance de la metodología implementada (Véase **Secciones 2.5.3.1.** y **2.5.3.2.**), se procedió a analizar una matriz gaseosa (aire sintético grado cero, 2.5 L), enriquecida con una mezcla de ácidos (C_2-C_6 y benzoico), en una concentración de 1.76 *ppmv*. La muestra se hizo pasar, a un flujo de 0.2 mL/min, a través de dos *impingers* colocados en serie y sumergidos en un baño con agua-hielo, cada uno de los cuales contenía solución acuosa de K_2CO_3 (30 mL, 500 mg/L). Una vez disueltos los ácidos en la matriz líquida, se procedió a realizar su derivatización, seguida de la extracción por HS-SPME de los derivados.

Cada *impinger* se analizó por separado. Para la derivatización, de los 30 mL contenidos en el *impinger*, se tomaron 9 mL y se transfirieron a un recipiente de 12 mL, donde se mezclaron con 1 mL de solución de K_2CO_3 (500 mg/L) y 50 µL de PFBBr/acetona (430 mmoles/L); el pH del medio se ajustó a 6. Luego, la mezcla se sometió a reacción, a 60 °C por 4 h. Transcurrido este tiempo, las muestras fueron sumergidas al baño con hielo, por 10 min. A continuación, se procedió a extraer los ésteres de PFB, para lo cual, la fibra de PA fue expuesta al *headspace* de la solución acuosa (2 mL) de ésteres por 40 min, a 30 °C, con agitación magnética a 800 rpm. Antes de la extracción, se adicionó NaCl (20% p/v) y se ajustó el pH de la solución a 7. Los ésteres extraídos fueron analizados mediante GC/ECD, de acuerdo con los procedimientos descritos en las **Secciones 2.2.2** y **2.3.2.2**.

2.6 APLICACIONES DE SPME AL ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES POLARES EN DIFERENTES MATRICES (VALIDACIÓN DEL MÉTODO).

Las técnicas analíticas, basadas en la combinación de la SPME con la derivatización química, implementadas en el presente trabajo, fueron validadas para analizar compuestos carbonílicos y carboxílicos en diferentes muestras líquidas y/o gaseosas biológicas (aliento, orina y saliva), en muestras ambientales (aire interior y emisiones vehiculares), para el análisis biogénico (metabolitos de plantas) y de alimentos (vinos y aceites).

2.6.1. Aplicaciones biológicas. El monitoreo biológico para la valoración de exposiciones humanas a contaminantes peligrosos ha crecido marcadamente en los últimos años. Sin embargo, debido a que las personas normalmente se exponen, en la casa o en el trabajo, a una gran variedad de sustancias, las interpretaciones de resultados y consecuencias, a menudo, se dificultan, por lo que, la implementación de técnicas de monitoreo y análisis altamente selectivas, es necesaria, para contribuir productivamente al desarrollo de este campo. En este trabajo, se evaluó la HS-SPME con derivatización simultánea sobre la fibra con PFPH, para la determinación de compuestos orgánicos volátiles en el aliento humano y en fluidos biológicos (orina y saliva).

2.6.1.1 Determinación, por HS-SPME con derivatización (PFPH) sobre la fibra, de compuestos carbonílicos volátiles en muestras de aliento, orina, saliva y sudor. El análisis de la composición química del aliento humano es una herramienta de diagnóstico importante en medicina (Sánchez J. M. y Sacks R. D., 2003) y en higiene industrial (Draper W. M., 2001). Los compuestos orgánicos volátiles (VOC´s) presentes en el aire exhalado, pueden ser usados como

biomarcadores de diferentes enfermedades y/o como indicativos de la contaminación ambiental a la cual están expuestas las personas (Draper W. M., 2001).

La orina, por su parte, es un fluido biológico relativamente fácil de recoger, que se utiliza con frecuencia para el *screening* de drogas, estudios forenses y el monitoreo de las exposiciones a sustancias químicas en el lugar de trabajo, puesto que contiene los analitos de interés junto con sus metabolitos, en concentraciones relativamente altas.

La saliva es otro fluido biológico que ofrece muchas ventajas como matriz analítica, por ejemplo, para la detección de drogas de abuso; al igual que la orina, puede ser obtenida fácilmente por técnicas no invasivas y contiene analitos de interés, útiles para diversos propósitos (investigación toxicológica, diagnosis clínica, *etc*.).

2.6.1.1.1 Determinación del etanal en aliento humano, mediante muestreo dinámico por SPME-GC/ECD. La técnica de análisis de aldehídos de bajo peso molecular, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) simultánea sobre la fibra (Véase **Sección 2.5.2**), fue aplicada al estudio de compuestos carbonílicos volátiles, en el aliento humano de 5 voluntarios. Antes del muestreo, el primer voluntario tomó un trago de vino rojo (150 mL), el segundo ingirió *Vodka* (50 y 100 mL) y el tercero una cerveza (350 mL). Al cuarto voluntario, que usaba *brackets*, se le analizó el aliento, a la mitad de la mañana (10 a.m.), cuando su estómago no estuviera muy lleno; su composición se comparó con la de una persona que no usaba *brackets*. Al quinto voluntario, un fumador empedernido, se le pidió que no fumara por 4 h, al término de las cuales, se le analizaron los compuestos carbonílicos en el aliento. El aliento de los primeros cuatro voluntarios, se analizó periódicamente, antes (blanco) y después (0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min) de ingerir la bebida alcohólica. Los licores utilizados en el estudio, fueron adquiridos

de un distribuidor oficial en un supermercado local (Bucaramanga). Los voluntarios eran personas jóvenes (entre 23-30 años), en buen estado físico y sin aparentes problemas de salud.

Siguiendo la metodología de muestreo, descrita en la **Sección 2.4.1.1**, una fibra de PDMS-DVB, expuesta previamente a la fase vapor de una solución de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 10 min, 800 rpm), se expuso durante 10 min, al aliento de los voluntarios, usando el dispositivo que aparece en la **Figura 10**. Los derivados hidrazónicos se analizaron selectivamente mediante GC/ECD, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**. La cantidad de derivados retenida sobre la fibra, fue calculada con base en la curva de calibración construida usando patrones de los PFPH-derivados (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en MeOH (Véase **Sección 2.3.1.2**).

2.6.1.1.2 Determinación del etanal en aliento humano recolectado en bolsas Tedlar®. La técnica SPME se aplicó a la cuantificación del etanal exhalado por un voluntario después de beber vino rojo (150 mL) y de recolectar las muestras de aire exhalado en bolsas *Tedlar®* de 3 L. El monitoreo se realizó durante 2 h seguidas (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 min, después de ingerir el licor), siguiendo la metodología descrita en la **Sección 2.4.1.2**. Después de cada muestreo, la fibra de PDMS-DVB, expuesta previamente a los vapores de una solución de PFPH (2 mL, 1.6 mmoles/L, 5 min, 27 °C, 800 rpm), fue insertada a través del *septum* de la bolsa y expuesta a los analitos presentes en la fase gaseosa. Los derivados formados sobre la fibra, se analizaron por GC/ECD, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**. La cantidad del etanal en el aire de exhalación se cuantificó como su PFPH-hidrazona, con base en la curva de calibración del estándar gaseoso del analito (Véase **Sección 2.3.1.2**).

2.6.1.1.3 Determinación del etanal en muestras de orina y saliva, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) in situ sobre la fibra. Paralelamente con el muestreo de aliento (Véase **Sección 2.6.1.1.1**) de uno de los voluntarios, se recolectaron muestras de orina (10 mL) y saliva (2 mL), en las cuales se determinaron compuestos carbonílicos, mediante HS-SPME con derivatización directa sobre la fibra, saturada con PFPH. Para ésto, la fibra de PDMS-DVB, expuesta previamente al *headspace* de una solución de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 20 min), se expuso a la fase vapor de la respectiva muestra (2 mL), a 27 °C, con agitación magnética (800 rpm), por 30 min. Las PFPH-hidrazonas se analizaron por GC/ECD, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**. La cantidad de derivados retenida sobre la fibra, fue calculada con base en la curva de calibración construida usando patrones de los PFPH-derivados (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en MeOH (Véase **Sección 2.3.1.2**).

Las muestras de orina del voluntario, cuyo aliento fue recolectado en bolsas *Tedlar*® (Véase **Sección 2.6.1.1.2**), también se procesaron siguiendo la metodología descrita en el párrafo anterior. En este caso, la concentración del etanal se determinó en función del tiempo, con base en la curva de calibración -área *Vs* concentración-, construida mediante HS-SPME-GC/ECD, para una serie de soluciones del etanal en orina “blanco”, (obtenida del mismo voluntario, antes de ingerir el licor), según se describe en la **Sección 2.3.1.2**.

2.6.1.1.4 Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos en sudor humano (pies). Para el desarrollo de esta fase experimental, se contó con la colaboración de 2 voluntarios jóvenes (31 años de edad), uno de piel blanca y otro de piel morena, de sexo masculino, sanos y en buen estado físico. Cada voluntario usó un par de plantillas de algodón prensado recubierto con gasa aséptica, durante una jornada laboral de 8 h. Para el análisis de los compuestos

carbonílicos, la muestra (*ca.* 1.5 g) se depositó en el vial *headspace* de 20 mL (Véase **Sección 2.4.5**), que fue sumergido a un baño con agua (*ca*. 37 °C), con el fin de simular la temperatura del cuerpo humano. Transcurridos 20 min de pre-equilibrio, la fibra de PDMS-DVB, expuesta previamente a los vapores de una solución de PFPH (2 mL, 2.4 mmoles/L, 27 °C, 10 min, 800 rpm), se colocó en el espacio de cabeza de la muestra, durante 20 min. Las PFPH-hidrazonas obtenidas sobre la fibra, se analizaron por GC/ECD, siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**. La cantidad de derivados retenida sobre la fibra, fue calculada con base en la curva de calibración construida usando patrones de los PFPH-derivados (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en MeOH (Véase **Sección 2.3.1.2**).

Los extractos acuosos de plantillas, obtenidos de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.4.5**, se emplearon para analizar los compuestos carboxílicos presentes en el sudor de los pies, siguiendo las metodologías implementadas en las **Secciones 2.5.3.1** y **2.5.3.2**.

2.6.2. Aplicaciones en alimentos y productos naturales. El análisis de alimentos es importante para evaluar su valor nutricional, para el control de calidad de productos frescos y procesados, y para la detección de los aditivos y de otros contaminantes tóxicos. En general, el sabor se cambia con las alteraciones composicionales. Por lo tanto, es importante saber el patrón cromatográfico típico del *flavour* de un producto alimenticio dado (fruta fresca, muestra de vino auténtico, *etc.*), para definir el patrón composicional durante su procesamiento o almacenamiento y para registrar los respectivos cambios. Además, la supervisión de las posibles adulteraciones del producto es vital tanto para la industria, como para la salud del consumidor. El presente trabajo de investigación, incluyó el análisis de diferentes matrices alimenticias, mediante HS-SPME, siguiendo los protocolos experimentales descritos a continuación.

2.6.2.1 Determinación del etanal en licores, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) simultánea sobre la fibra. La técnica implementada para el análisis de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular (Véase **Sección 2.5.2**), permitió determinar la cantidad (µmoles) del etanal presente en bebidas alcohólicas, *i.e.* vino rojo, *Vodka*, *Whisky* y cerveza, adquiridos en un supermercado local (Bucaramanga). El etanal presente en la fase vapor de cada muestra (2 mL, 27 °C, 800 rpm, 5 min), fue extraído usando una fibra de PDMS-DVB, previamente expuesta al *headspace* de una solución de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 10 min). La cantidad del etanal, derivado sobre la fibra, fue determinada por GC/ECD, así como se describe en las **Secciones 2.2.2** y **2.3.1.2**.

2.6.2.2 Determinación de los aldehídos presentes en aceites comestibles, mediante HS-SPME con derivatización simultánea sobre la fibra por reacción con PFPH y/o con HBT. Los compuestos carbonílicos, particularmente, aldehídos volátiles, productos finales de la oxidación lipídica de aceites comestibles, afectan considerablemente su *flavour* y pueden producir daños en la salud de los consumidores, puesto que interfieren con el metabolismo humano, causando daños a nivel celular. Por lo que, tanto en el área de alimentos como en el área de salud, el desarrollo de las metodologías analíticas para determinar aldehídos de bajo peso molecular (C_1-C_{10}) es muy importante. En esta aplicación, se evaluó la técnica de HS-SPME con derivatización sobre la fibra con HBT y/o PFPH (Véase **Secciones 2.5.1** y **2.5.2**), para determinar compuestos carbonílicos en aceites comestibles.

2.6.2.2.1 Derivatización con HBT. Para este experimento se utilizó aceite comestible, de marca comercial *Girasol*, que fue adquirido de un distribuidor oficial, en un supermercado local (Bucaramanga). Las muestras del aceite, fueron procesadas de acuerdo con la metodología descrita en la **Sección 2.5.1.3**. Previo

al análisis, el aceite (2 mL) se calentó a 190 °C, por 2 h. Transcurrido este tiempo, la muestra se retiró y se dejó en reposo a temperatura ambiente (27 °C) durante 10 min; luego, se introdujo la fibra de PA, previamente saturada con el agente derivatizante HBT (0.3 mg, 95 °C, 20 min); el HBT reaccionó con los aldehídos volátiles presentes en el *headspace* de la muestra, directamente sobre la fibra. La extracción-derivatización de los analitos se llevó a cabo por 10 min, a 27 °C, con agitación magnética (800 rpm). Los derivados hidrazónicos formados sobre la fibra fueron desorbidos térmicamente (250 °C, 10 min) en el puerto de inyección del GC/FPD y analizados bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.2.1**.

2.6.2.2.2 Derivatización con PFPH. Para este experimento se utilizaron tres aceites comestibles, de marcas comerciales, a saber: *Girasol Gourmet*; *Girasol Premier* y *Oleocali Cero Colesterol*, adquiridos de un distribuidor oficial, en un supermercado local (Bucaramanga). Las muestras de aceite, fueron analizadas tal como llegan al consumidor, sin tratamiento previo ni calentamiento. Una vez destapado el frasco con aceite, 2 mL fueron transferidos a un recipiente de vidrio color ámbar de 4.5 mL, con tapa rosca y *septum* de Teflón, a través del cual se insertó la fibra de PDMS-DVB, saturada previamente con la PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L; 800 rpm, 27 °C, 60 min). La extracción-derivatización de los analitos, se llevó a cabo por 30 min, a 27 °C, con agitación magnética (800 rpm). Los derivados hidrazónicos formados sobre la fibra, fueron desorbidos térmicamente (250 °C, 5 min) en el puerto de inyección del GC/ECD y analizados bajo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.2.2**.

2.6.2.3 Monitoreo de compuestos carbonílicos de origen biogénico, por HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra con PFPH. La metodología desarrollada en el presente estudio fue aplicada a la determinación de los compuestos carbonílicos en la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens*

("Borrachero"), emitidos por la planta a las 9 p.m., cuando el olor de las flores era más intenso (Molina J. L., 2005).

El análisis de los VOC´s puede ser realizado *in vitro*, usando partes de la planta (maceradas o cortadas) o *in vivo*; sin embargo, en algunos casos el muestreo *in vivo*, permite obtener la información más idónea acerca de la composición de los metabolitos volátiles (Zini C. A. *et al.*, 2001). En este estudio, los metabolitos volátiles liberados por las flores de *Brugmansia suaveolens*, en particular, compuestos carbonílicos, se analizaron tanto *in vitro,* como *in vivo*, usando las metodologías de muestreo aplicadas para cada caso, que se describen en las **Secciones 2.4.4.1** y **2.4.4.2**, respectivamente.

Para ambos muestreos (*in vitro* e *in vivo*), la derivatización de los aldehídos, se llevó a cabo sobre una fibra de PDMS/DVB, expuesta previamente a los vapores de una solución de PFPH (2 mL, 2.4 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm, 10 min). Las PFPH-hidrazonas fueron desorbidas térmicamente en el puerto de inyección del GC/ECD, y analizadas siguiendo los parámetros operacionales descritos en la **Sección 2.2.2**. La identificación de los compuestos carbonílicos se realizó por comparación de los tiempos de retención de los derivados formados sobre la fibra, con los de las PFPH-hidrazonas patrón, *i.e.* C_2-C_{10}, citral, citronelal y benzaldehído (Véase **Sección 2.3.1.2**).

2.6.3 Aplicaciones ambientales. Las metodologías implementadas en esta investigación para el análisis de compuestos carbonílicos y carboxílicos en fase gaseosa, fueron aplicadas a diferentes matrices ambientales.

2.6.3.1 Cuantificación de compuestos carbonílicos volátiles en aire interior (*indoors*). Debido a su potencial tóxico y, en algunos casos, propiedades cancerígenas y/o mutagénicas, los aldehídos y los ácidos carboxílicos volátiles,

tienen impacto negativo sobre la salud de los seres vivos, cuando se encuentran en concentraciones elevadas o durante largos tiempos de exposición. Dado que las personas pasan una gran parte del tiempo en ambientes cerrados, la determinación de estos compuestos en aire interior, es necesaria, para saber a qué concentraciones se exponen las personas, y, de esta manera, poder llevar a cabo acciones correctivas.

Una de las principales aplicaciones de la metodología analítica implementada en esta investigación, consistió en determinar las sustancias contaminantes con funcionalidades carbonílicas y carboxílicas, en aire interior. Para ésto, se escogió una fábrica manufacturera de calzado, ubicada en el centro de la ciudad de Bucaramanga (Santander), con un área de 150 m^2 y 50 empleados. La fábrica se especializa en la producción de calzado deportivo y fino, categoría exportación (Venezuela, Ecuador).

El muestreo de los aldehídos y los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, se realizó en dos zonas de la fábrica de calzado con diferentes operaciones de manufactura. En la zona I, la actividad consiste en remontar el cuero sobre las hormas metálicas, a fin de darle forma al zapato; este proceso, a la vez, involucra actividades “contaminantes” tales como la pega y la quema del cuero. En la zona II, se emplantilla el zapato, se dan acabados a la suela y se usan limpiadores para retirar los restos de impurezas y brillar el calzado; estas operaciones liberan contaminantes al ambiente, básicamente, hidrocarburos volátiles (tolueno, xilenos, hexano, entre otros) y algunos productos oxigenados.

Las muestras de aire se recolectaron siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.4.2**, en el último día de la semana laboral (viernes) y al final de la jornada (6-7 p.m.), con una temperatura promedio de 26 °C. El análisis de los aldehídos y ácidos carboxílicos en el aire interior de la fábrica, se hizo siguiendo los protocolos descritos en las **Secciones 2.5.2.4** y **2.5.3.3**, respectivamente.

2.6.3.2 Cuantificación de compuestos carbonílicos y carboxílicos volátiles en gases de tubo de escape de carros operados con gasolina. Entre las fuentes antropogénicas de VOC´s, los medios de transporte (aéreo, fluvial, terrestre) merecen especial atención. Los VOC´s se producen directamente por la combustión incompleta de hidrocarburos o por la oxidación atmosférica de los mismos, por lo que, la calidad de los combustibles y las emisiones durante la quema de los mismos, llama la atención de las entidades ambientales de todo el mundo. En este trabajo, se evaluaron técnicas analíticas basadas en la HS-SPME con derivatización, para el análisis de sustancias carbonílicas y carboxílicas de bajo peso molecular, en gases de tubos de escape.

Para este experimento, se escogieron dos automóviles, ambos con motor de combustión de 4 tiempos, el cual funciona con gasolina, pero sólo uno de éstos tenía convertidor catalítico. Para la toma de muestras, los automóviles fueron conducidos hasta uno de los estacionamientos de la Universidad, al medio día, cuando la temperatura promedio era de 27 ± 2 °C. Las muestras fueron tomadas tal como se describe en la **Sección 2.4.3** y analizadas por GC/ECD, aplicando los protocolos descritos en las **Secciones 2.5.2.4** y **2.5.3.3**, para el análisis de aldehídos y ácidos carboxílicos en fase gaseosa, respectivamente.

2.6.3.3 Cuantificación de sustancias carbonílicas y carboxílicas en aguas lluvia. El análisis de los ácidos orgánicos volátiles, es importante en la química atmosférica, puesto que éstos tienen un gran impacto en la llamada precipitación ácida, en zonas remotas e industriales. Debido a su solubilidad en agua, diferentes ácidos han sido detectados en niebla, rocío y muestras de nieve (Chebbi A. y Carlier P., 1996). La metodología analítica para aldehídos (Véase **Sección 2.5.2.2**) y ácidos carboxílicos (Véase **Secciones 2.5.3.1** y **2.5.3.2**), implementada en este trabajo, fue aplicada al análisis de aguas lluvia.

Para la recolección de las aguas lluvia se escogió una plazoleta (200 m^2), rodeada por dos de sus lados de edificios y por los otros dos de árboles, que fue delimitada en X. En cada extremo y en el centro de la X, se ubicó un recipiente de vidrio de boca ancha con capacidad de 1000 mL. El agua se recolectó durante los 30 min de lluvia. Seguidamente, los recipientes se taparon y se llevaron al laboratorio, donde las aguas lluvia, recolectadas en cada punto, se mezclaron para obtener una muestra compuesta. El proceso de muestreo en cada punto, se realizó por duplicado, dando lugar a dos muestras compuestas, que fueron analizadas por separado, tal como se describe a continuación.

De la muestra compuesta se tomaron 2 mL de agua lluvia y se transfirieron a un recipiente de 4.5 mL, donde se procedió a realizar la derivatización y la extracción de compuestos carbonílicos, siguiendo el procedimiento descrito en la **Sección 2.5.2.2**.

Para determinar los compuestos carboxílicos presentes en las aguas lluvia, se siguieron las metodologías implementadas en las **Secciones 2.5.3.1** y **2.5.3.2**. De la muestra compuesta se tomaron 9 mL de aguas lluvia y se transfirieron a un recipiente de 12 mL, donde se les adicionaron 1 mL de solución de K_2CO_3 (500 ppm) y 50 µL de solución de PFBBr en acetona (430 mmoles/L). Después de ajustar el pH a 6, la mezcla se sometió a reacción. El proceso se realizó por duplicado.

3. RESULTADOS

3.1 REACTIVOS Y MATERIALES

Para el desarrollo de la presente investigación se utilizaron aldehídos volátiles y ácidos carboxílicos certificados, de pureza alta (95-99% y ≥85%, para citronelal), los cuales fueron suministrados, en su mayoría, por la firma *Aldrich Chemical Co.* Inc. (Véase **Sección 2.1.1**).

Los reactivos de derivatización fueron adquiridos de empresas químicas certificadas, con el mayor grado de pureza posible, y se utilizaron sin purificación adicional. Para la derivatización de los aldehídos de bajo molecular (C_2-C_6, C_8-C_{10}) en fase gaseosa, se evaluaron dos reactivos analíticos, a saber: hidracinobenzotiazol (HBT, 99%) (**Figura 23 A**) y pentaflúorfenilhidracina (PFPH, 99%) (**Figura 23 B**), de las firmas *Chem-Service* y *Aldrich Chemical Co. Inc*, respectivamente. Para la conversión de los ácidos carboxílicos a sus ésteres, menos polares, se utilizó bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr, 99%, *Aldrich*) (**Figura 23 C**).

Las propiedades fisicoquímicas de cada una de estas sustancias se presentan en la **Tabla 11**. Al igual que los aldehídos (**Anexo 2**) y los ácidos carboxílicos (**Anexo 3**), estos compuestos se consideran carcinógenos potenciales, son muy irritantes y exhiben cierto grado de toxicidad (**Tabla 12**), por lo que en el trabajo fueron manipulados con precaución, bajo las recomendaciones de los fabricantes.

Con tiempos de exposición cortos, las hidracinas, de consistencia sólida, pueden ocasionar irritación de las mucosas, tos y dificultades respiratorias, tras inhalación del polvo; en contacto con la piel y los ojos producen irritación y por ingestión

pueden causar irritación de las mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto estómago–intestinal (Merck-Schuchardt OHG, 2006).

El PFFBr, es un líquido lacrimógeno muy corrosivo, que puede producir quemaduras severas en el sistema respiratorio, ojos y piel. Los derrames pueden causar fuego o liberar gases venenosos. Exposiciones prolongadas pueden producir irritación crónica de los ojos y del sistema respiratorio, ocasionando en este último caso, infecciones bronquiales frecuentes (Pierce, 2005).

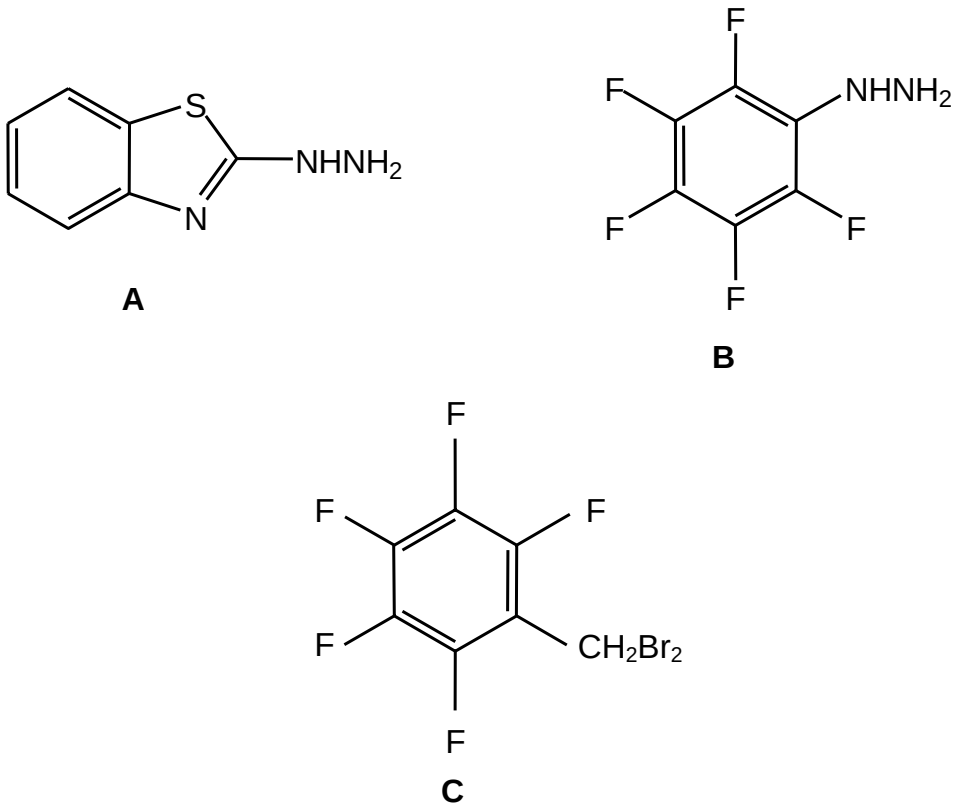


Figura 23. Estructura química de los reactivos utilizados para la derivatización de aldehídos y ácidos carboxílicos: **A**. Hidracinobenzotiazol (HBT); **B**. Pentaflúorfenilhidracina (PFPH); **C**. Bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr).

Tabla 11. Propiedades fisicoquímicas de los reactivos utilizados para la derivatización de aldehídos y ácidos carboxílicos.

Compuesto	Peso molecular, g/mol	Punto de fusión, °C	Punto de ebullición, °C	Densidad, g/cm^3
HBT	165.22	198	-	-
PFPH	198.09	73-76	-	-
PFBBr	260.99	-	174 -175	1.728

Tabla 12. Toxicidad de reactivos usados para la derivatización de aldehídos.

Compuesto	Organismo	Tipo de prueba	Vía	Dosis reportada, *mg/kg*	Fuente
* PFPH	Ratón	LD_{50}	Intravenosa	180	U.S. Army Armament Research & Development Command, Chemical Systems Laboratory, NIOSH Exchange Chemicals. Vol. NX03414.
**HBT	Ratón	LD_{50}	Intraperitoneal	100	National Technical Information Service. Vol. AD277-689.
	Ratón	LDLo	Parenteral	200	National Research Council Chemical-Biological Coordination Center. Vol. 7, pg. 686, 1955.
	Rata	LDLo	Oral	100	National Academy of Sciences, National Research Council, Chemical-Biological Coordination Center, Review. Vol. 5, pg. 23, 1953.

Tomado de U.S. National Library of Medicine. Disponible en:
(*)http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/hemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=000615214;
(**)http://chem2.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=000828739.

Todas las reacciones que implicaron el manejo de los reactivos de derivatización (**Figura 23**), se llevaron a cabo en una campana de extracción y las personas que manipularon las sustancias, siempre usaron bata de laboratorio de manga larga, máscara para vapores, gafas para vapores orgánicos y guantes de poli(propileno).

Los estándares de aldehídos, ácidos y reactivos derivatizantes, fueron preparados disolviendo una cantidad conocida del analito puro en un solvente orgánico apropiado (*e.g*., MeOH o acetona). Para las pruebas de derivatización en matriz líquida, usando sistemas modelo, en algunos casos, se utilizó agua grado HPLC y, en otros, agua desionizada ultrapura. Las soluciones ácidas (H_2SO_4) y básicas (NaOH, K_2CO_3), fueron preparadas con agua grado HPLC.

Todas las fibras de SPME utilizadas en la experimentación, se acondicionaron según las sugerencias del fabricante; así, antes de su uso, las fibras con recubrimientos de PDMS se colocaron en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases, bajo corriente de helio, a 250 °C por 2 h; las que tenían capa polimérica de PA, a 300 °C por 3 h, y las de PDMS-DVB, a 250 °C por 30 min, respectivamente.

El material (frascos y magnetos) usado en las pruebas de HS-SPME, fue lavado muy bien (jabón y mezcla sulfocrómica), purgado con solventes (*e.g.,* MeOH) y calentado a 100 °C, para ayudar a evaporar las trazas de ácidos, aldehídos u otras interferencias que pudieran afectar los análisis. Antes del muestreo, los viales fueron enfriados a temperatura ambiente. Exceptuando la etapa de calentamiento, el mismo procedimiento se aplicó a todo el material volumétrico empleado en la preparación de estándares y muestras y, a los *impingers* utilizados en el análisis de ácidos carboxílicos. Las impurezas de fabricación (*e.g.,* formaldehído), presentes en las bolsas *Tedlar*® para muestreo de aire, fueron removidas con aire grado cero.

Todos los equipos instrumentales (balanzas, flujómetros) fueron debidamente calibrados, antes de su uso.

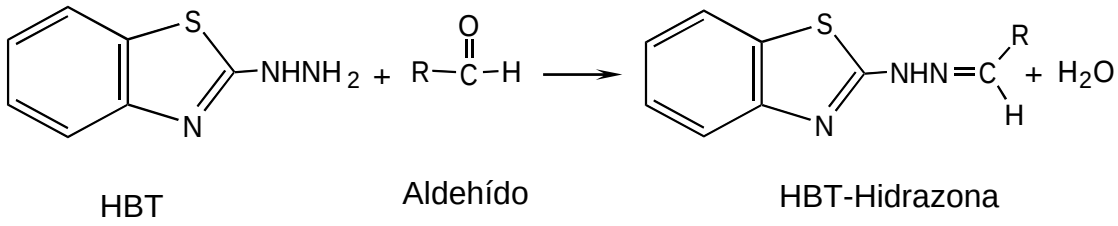
3.2 PARÁMETROS INSTRUMENTALES

En el desarrollo de la presente investigación se utilizó la cromatografía de gases de alta resolución acoplada a detectores selectivos, tales como FPD, ECD y MSD (Véase **Secciones 2.2.1**, **2.2.2** y **2.2.3**). La presencia de átomos de azufre en las HBT-hidrazonas, facilita su detección selectiva mediante el FPD, por ello, estos derivados fueron determinados mediante GC/FPD. Mientras que, para la detección de las PFPH-hidrazonas y de los ésteres de PFBBr, se utilizó el sistema GC/ECD. Cinco átomos de flúor en sus moléculas, incrementan notoriamente la respuesta del detector. La presencia de los derivados hidrazónicos (HBT y PFPH) y de los ésteres de PFB, fue confirmada mediante GC-MS de acuerdo con el procedimiento descrito en la **Sección 2.2.3**.

3.3 SÍNTESIS DE DERIVADOS Y PREPARACIÓN DE SOLUCIONES ESTÁNDAR

3.3.1. Derivados de aldehídos. Los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) fueron analizados como sus derivados hidrazónicos, mediante SPME con derivatización directa sobre la fibra. Con el fin de escoger el mejor reactivo para la derivatización de estos analitos en fase gaseosa, se evaluaron dos hidracinas, a saber: HBT y PFPH. Las HBT-hidrazonas y las PFPH-hidrazonas, necesarias para la determinación cuantitativa usando métodos cromatográficos, fueron sintetizadas en el Laboratorio siguiendo los protocolos descritos en las **Secciones 2.3.1.1** y **2.3.1.2**, de la Parte Experimental.

3.3.1.1 HBT-hidrazonas. Los compuestos carbonílicos pueden sufrir adición nucleofílica al reaccionar con bases nitrogenadas tales como la 2-hidracinobenzotiazol, generando una hidrazona, tal como se ilustra a continuación en la **Figura 24**:



HBT Aldehído HBT-Hidrazona

Figura 24. Reacción de derivatización de compuestos carbonílicos con HBT.

Los derivados HBT, sintetizados en fase sólida (sobre el recubrimiento de la fibra de SPME), fueron registrados mediante GC/FPD; sus tiempos de retención se compararon con los de los compuestos puros, analizados bajo las mismas condiciones (Véase **Sección 2.3.1.1**). En la **Figura 25** se presenta el perfil cromatográfico típico de una mezcla estándar de HBT-hidrazonas (500 µmoles/L); en la **Tabla 13** se relacionan los tiempos de retención de cada pico, con la respectiva evaluación estadística.

El mismo procedimiento se siguió para la detección del agente derivatizante (HBT). La **Figura 26**, corresponde al perfil cromatográfico de un estándar (1.0 mmol/L) de HBT en MeOH; el tiempo de retención de este compuesto (t_R=16.48 ± 0.10 min; n=10), en la columna DB-5 (30 m), es cercano al de la HBT-hidrazona del formaldehído (t_R=16.55 ± 0.03 min, n=3), lo que dificulta su análisis y por ello, el formaldehído no se incluyó en este estudio.

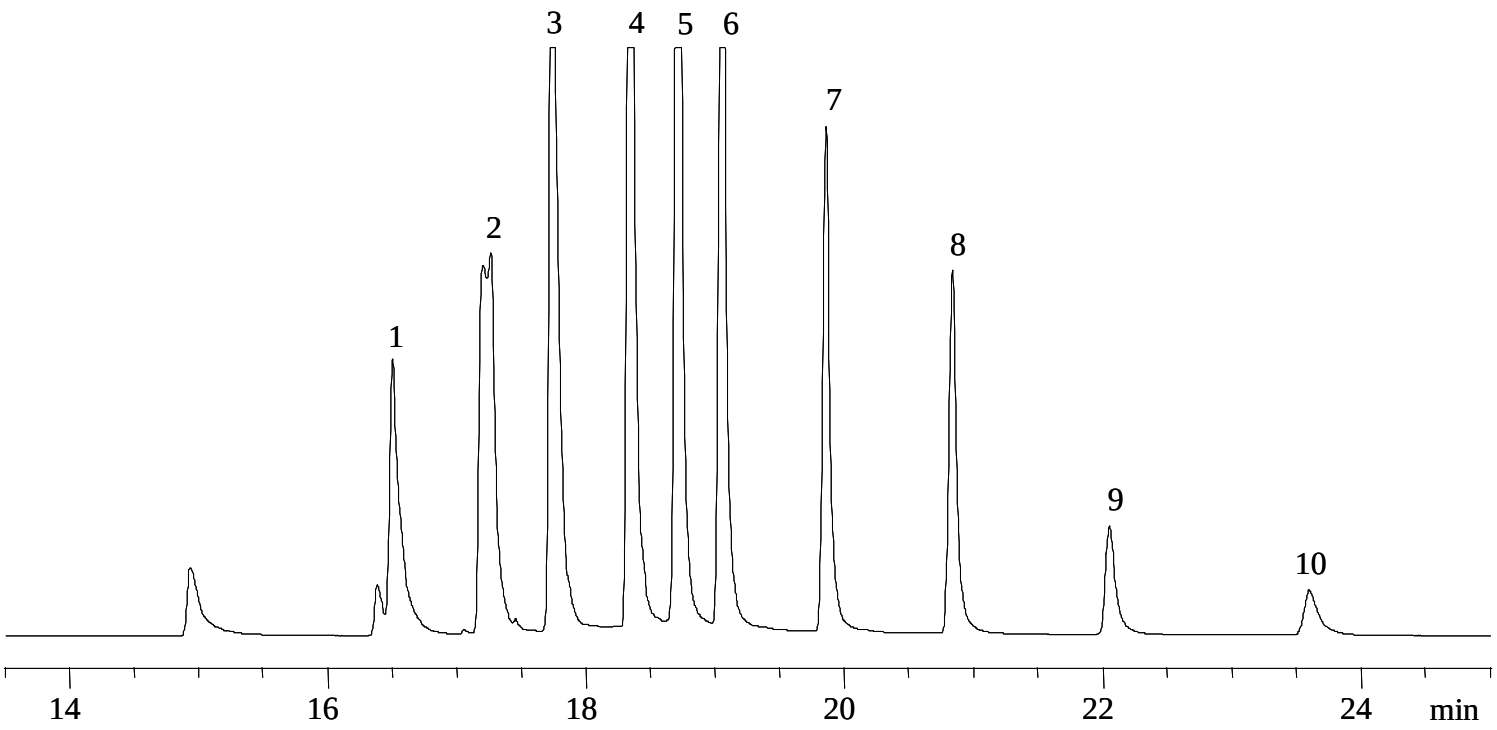


Figura 25. Perfil cromatográfico de las HBT-hidrazonas de: 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal; 4- Butanal; 5- Isopentanal; 6- Pentanal; 7- Hexanal; 8- Heptanal; 9- Octanal; 10- Nonanal. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). HBT-hidrazonas en MeOH (500 µmoles/L); Inyección: 1 µL (*Split* 10:1).

Tabla 13. Tiempos de retención (t_R), de los derivados HBT-hidrazónicos obtenidos a partir de los compuestos carbonílicos (C_1-C_{10}). Columna DB-5 (30 m). FPD (250 °C). Volumen de inyección: 1 µL (500 µmoles/L, metanol).

Número del pico	**Aldehído**	**t_R , min**		
		Promedio	**s (n=2)**	***CV*, %**
1	Metanal	16,55	0,03	0,2
2	Etanal	17,234	0,009	0,05
3	Propanal	17,753	0,002	0,01
4	Butanal	18,34	0,02	0,1
5	Isopentanal	18,70	0,03	0,2
6	Pentanal	19,05	0,02	0,1
7	Hexanal	19,79	0,06	0,3
8	Heptanal	20,63	0,03	1,4
9	Octanal	22,03	0,03	0,2
10	Nonanal	23,58	0,06	0,2

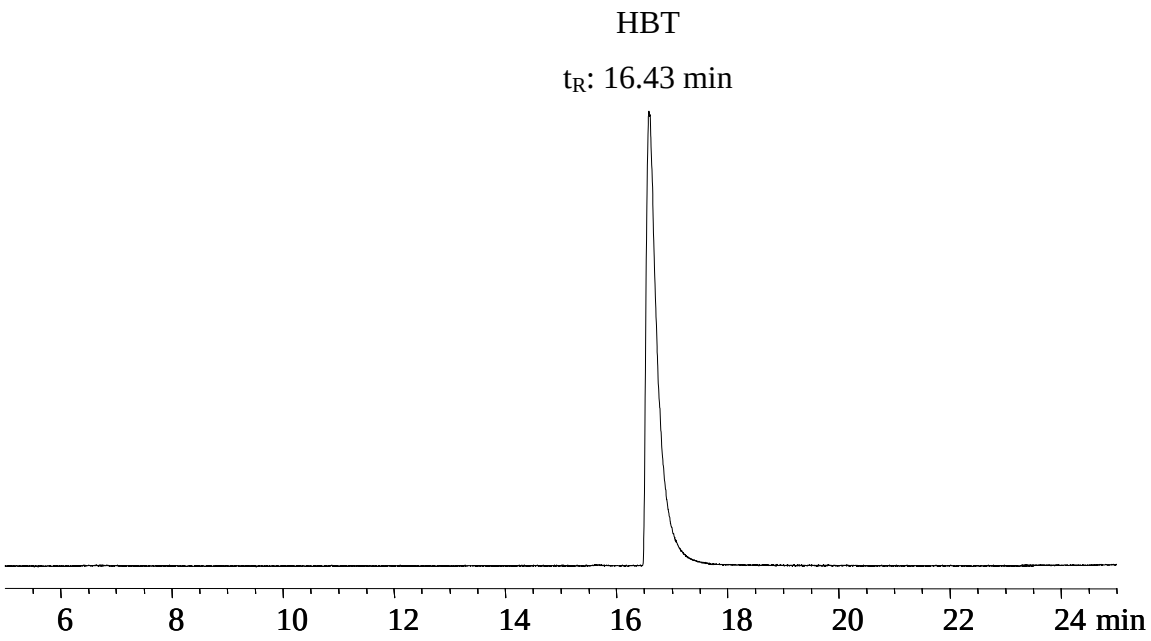


Figura 26. Perfil cromatográfico del 2-hidracinobenzotiazol (HBT). GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). HBT en MeOH (1.0 mmol/L); Inyección: 1 µL (*Split* 10:1).

3.3.1.2 PFPH-hidrazonas. Los aldehídos saturados (C_2-C_6, C_8-C_{10}) también fueron determinados, indirectamente, en forma de sus derivados PFPH-hidrazónicos (**Figura 27**).

Las soluciones de calibración en MeOH, preparadas de acuerdo con la metodología descrita en la **Sección 2.3.1.2**, fueron inyectadas automáticamente en el GC/ECD, y los derivados se separaron en la columna DB-5 (30 m), con fase estacionaria apolar (**Sección 2.2.2.**); en la **Figura 28** se presenta el perfil cromatográfico típico de la mezcla de calibración (60 µmoles/L) de las hidrazonas.

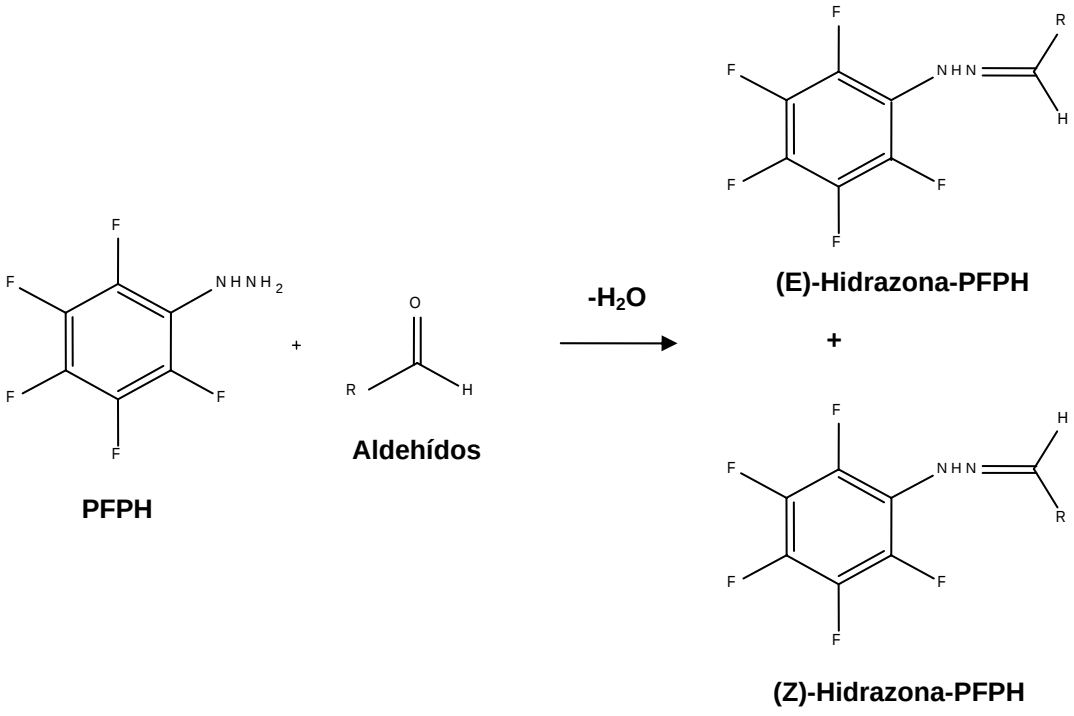


Figura 27. Reacción de derivatización de compuestos carbonílicos con PFPH.

Las áreas cromatográficas obtenidas para cada compuesto (se usaron las de los isómeros mayoritarios), en las diferentes concentraciones, permitieron construir las curvas de calibración externa, para la cuantificación de cada compuesto carbonílico. En el **Anexo 7**, se presentan las tablas de calibración para niveles de concentración baja y alta, respectivamente; en ellas, se registran los tiempos de retención (t_R), los factores de respuesta (R_f) y las ecuaciones lineales, asociadas con la curva de calibración de cada hidrazona. Para todos los derivados evaluados en niveles de concentración baja, la linealidad presentó valores $R^2 \geq 0.99$; para concentraciones altas, la linealidad mejoró notablemente, presentándose valores $R^2 = 1.00$.

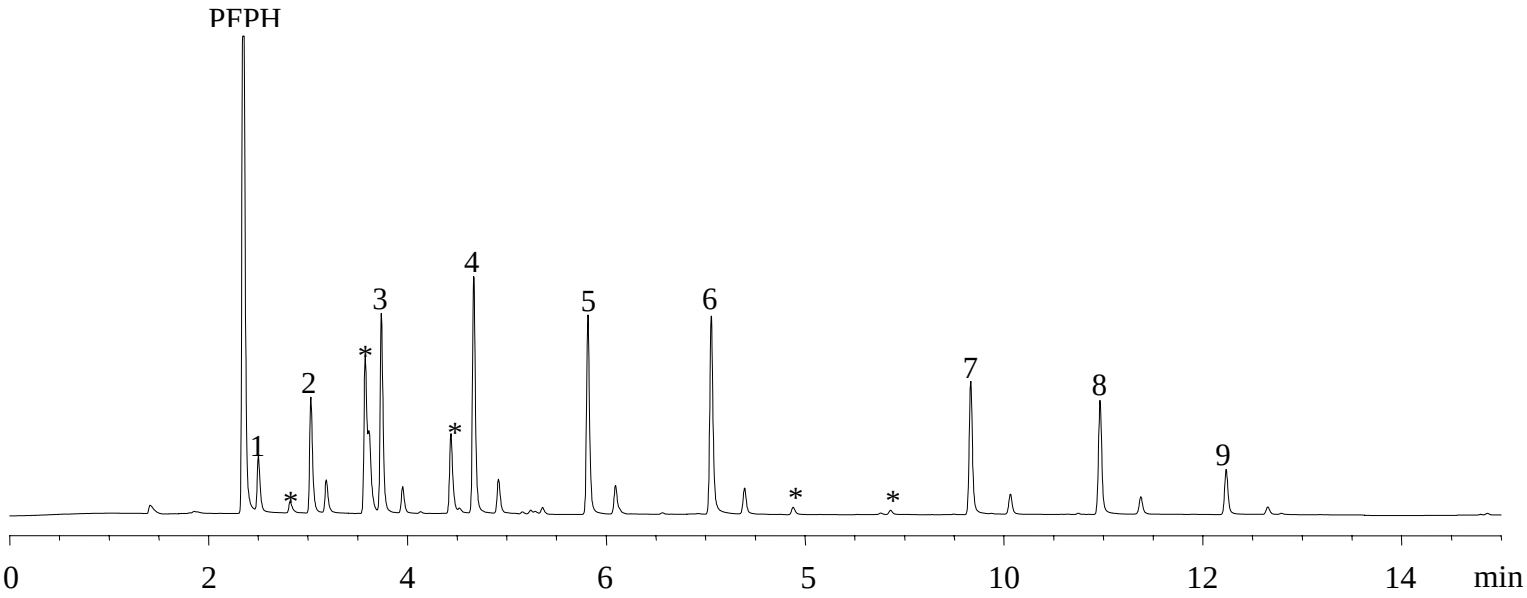


Figura 28. Perfil cromatográfico típico de las PFPH-hidrazonas de: 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). PFPH-hidrazonas en MEOH (60 µmoles/L); Inyección: 1 µL (*Split* 30:1). (* - Impurezas del reactivo derivatizante).

La presencia de 5 átomos de flúor en las PFPH-hidrazonas, aumenta la respuesta del detector, alcanzándose límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs) muy bajos (pmoles/L) (Stashenko E. E. *et al*., 1997). En esta investigación, los valores estuvieron en el orden de los nmoles/L (Véase, **Tabla 14**). La disminución en los LODs, podría estar asociada con la posible contaminación del ECD, de la columna cromatográfica y/o del gas de arrastre.

Tabla 14. Parámetros de calibración de aldehídos, analizados como sus PFPH-hidrazonas, en matrices líquidas. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Aldehído	LOD, nmoles/L (S/N=5)	LOQ, nmoles/L	R^2
Etanal	12	24	0.99
Propanal	250	500	0.99
Butanal	140	280	1.00
Pentanal	190	380	1.00
Hexanal	210	420	1.00
Octanal	73	146	0.99
Nonanal	66	132	0.99
Decanal	290	580	1.00

Determinación del acetaldehído en orina

La **Tabla 15** contiene los resultados de la calibración del acetaldehído en orina, enriquecida con este analito, usando HS-SPME-GC/ECD con derivatización directa sobre la fibra de PDMS-DVB, saturada previamente con PFPH. Para la determinación cuantitativa del acetaldehído en muestras de orina se utilizó el protocolo descrito en la **Sección 2.3.1.2**. Los coeficientes de variación (*CV*, %)

para las áreas estuvieron entre 1.7 y 3.1%, exceptuando el valor correspondiente a la muestra de menor concentración (10 nmoles/L), para la cual se presentó una variación cercana al 10%.

Tabla 15. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas del acetaldehído, analizado en forma de su derivado PFPH-hidrazónico, determinadas en orina enriquecida. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Temperatura: 27°C; Desorción: 250°C (5 min). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Concentración, nmoles/L	Área, cuentas	Promedio de áreas	s (n=2)	*CV*, %	R_f
10.0	3,7E+06	4,0E+06	3,9E+05	9,7	5,1E-07
	4,3E+06				
20.0	7,0E+06	7,0E+06	2,2E+05	3,1	5,4E-07
	7,4E+06				
30.0	9,4E+06	1,0E+07	2,8E+05	2,9	5,1E-07
	9,8E+06				
49.9	1,7E+07	1,8E+07	4,7E+05	2,7	5,8E-07
	1,8E+07				
79.9	2,7E+07	2,8E+07	4,7E+05	1,7	5,6E-07
	2,8E+07				

Los LODs y LOQs alcanzados con este procedimiento, fueron de 49.5 y 99.0 pmoles/L, respectivamente, y la linealiad de la curva de calibración presentó valores de R^2 = 0.999. La recuperación del analito fue del 97%.

Determinación de aldehídos en aire

En el **Anexo 8**, se presentan los datos de calibración para las PFPH-hidrazonas en fase gaseosa, usando SPME-GC/ECD, para muestras de aire, enriquecidas con aldehídos en cantidades conocidas (Véase, **Sección 2.3.1.2**). Con esta metodología se alcanzaron LOQs del orden de los pg/m^3, para todos los aldehídos evaluados (**Tabla 16**) y la linealidad presentó valores $R^2 \geq$ de 0.995 (**Anexo 8**). Los porcentajes de recuperación, en su mayoría fueron del 98%, sólo para nonanal y decanal se alcanzó una recuperación del 99%.

Tabla 16. Parámetros de calibración de aldehídos, analizados como sus PFPH-hidrazonas, en matrices gaseosas. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Aldehídos	**LOD, *pg/m^3* (S/N = 5)**	**LOQ, *pg/m^3***	**R^2**	**Recuperación, %**
Etanal	100	222	0.998	98
Propanal	128	256	0.997	98
Butanal	127	257	0.997	98
Pentanal	152	303	0.998	98
Hexanal	160	320	0.999	98
Octanal	37	73	0.998	98
Nonanal	35	70	0.997	99
Decanal	274	541	0.995	99

Estabilidad de los aldehídos (C_2-C_{10}) en bolsas Tedlar®

Tres soluciones gaseosas de aldehídos (0.18 *ppbv*), mantenidas a temperatura ambiente (27 °C), fueron analizadas en función del tiempo, mediante HS-SPME-GC/ECD, con derivatización directa sobre la fibra de PDMS-DVB, saturada

previamente con PFPH. La primera muestra fue procesada a los 30 min, la segunda y la tercera, después de 36 h y 55 h de almacenamiento, respectivamente. En la **Tabla 17** se registran las áreas cromatográficas medidas para cada derivado hidrazónico, para cada caso y, en la **Figura 29** se puede observar el comportamiento de los analitos en bolsas *Tedlar*®, en función del tiempo de su almacenamiento.

Tabla 17. Áreas cromatográficas de los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}), analizados en forma de sus derivados PFPH-hidrazónicos, determinadas en muestras gaseosas enriquecidas, contenidas en bolsas *Tedlar*® y almacenadas a temperatura ambiente (27°C) durante diferentes periodos de tiempo. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Temperatura: 27°C. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250°C (5 min).

Aldehídos	**Áreas cromatográficas, cuentas**		
	Tiempo de almacenamiento, h		
	0.5	**36**	**55**
Etanal	1,2E+06	1,4E+06	1,6E+06
Propanal	3,5E+06	3,9E+06	3,8E+06
Butanal	7,0E+06	7,7E+06	7,6E+06
Pentanal	1,0E+07	1,1E+07	1,1E+07
Hexanal	1,5E+07	1,5E+07	1,6E+07
Octanal	2,1E+07	1,9E+07	2,0E+07
Nonanal	2,8E+07	2,4E+07	2,3E+07
Decanal	8,7E+06	6,9E+06	6,8E+06
TOTALES	**1,84E+08**	**1,73E+08**	**1,74E+08**

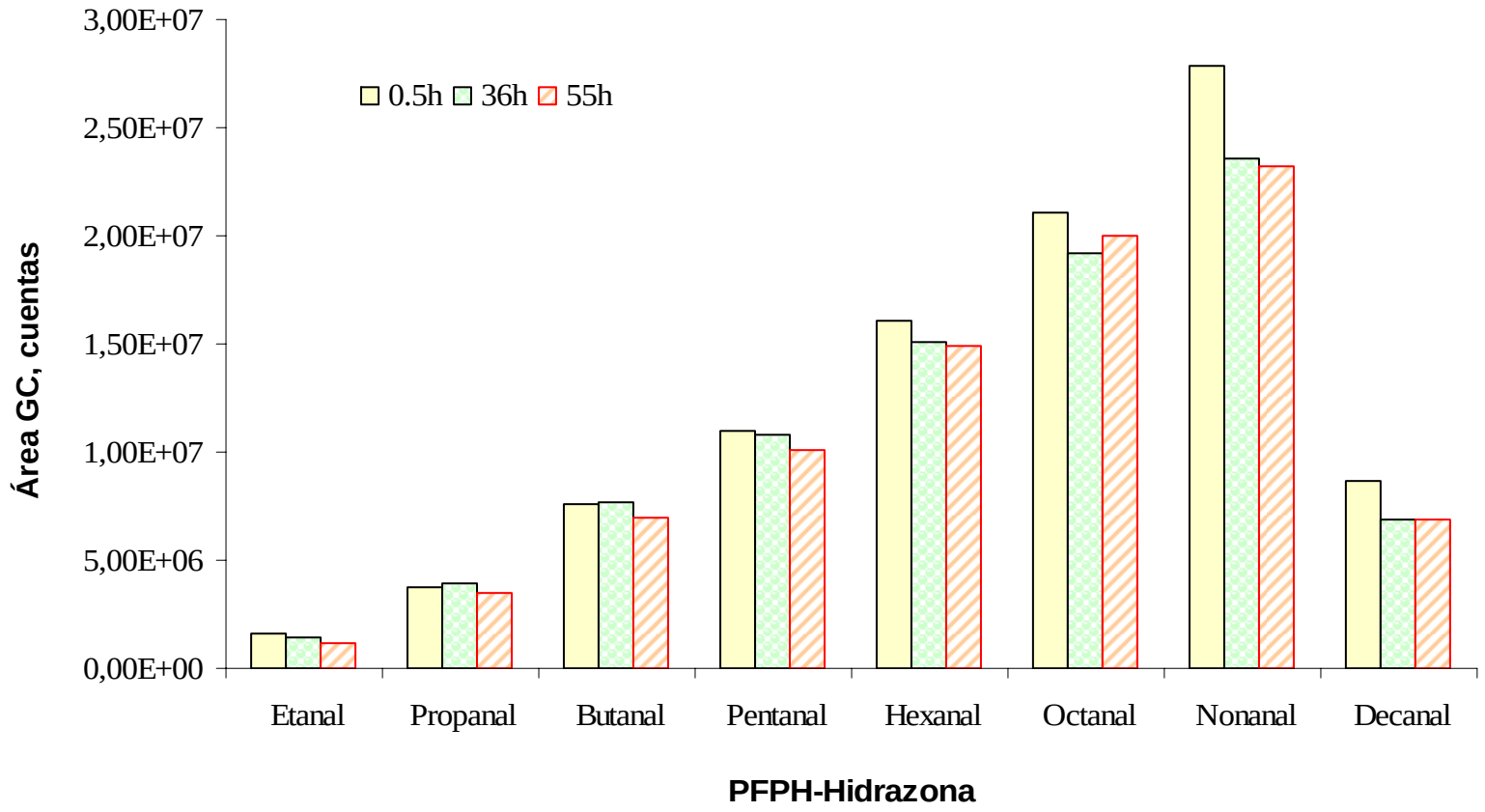


Figura 29. Efecto del tiempo de almacenamiento de la muestra gaseosa, contenida en bolsas *Tedlar*® a temperatura ambiente (27°C), sobre los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}), determinados en forma de sus PFPH-hidrazonas. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); Desorción: 250 °C (5 min). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.3.1.2**.

Como se puede apreciar, las bolsas ofrecen una buena hermeticidad para almacenar los analitos: comparando las áreas totales (Σ áreas) medidas a los 30 min y a las 36 h, se observa una pérdida de los analitos del 9%; si la comparación se hace con el área total medida a las 55 h, la disminución es del 11%. Por otra parte, los coeficientes de variación entre las 3 mediciones realizadas no superan el 6%; aunque estas variaciones podrían estar asociadas con la metodología de análisis (SPME-GC/ECD), los resultados muestran, que sólo una pequeña fracción de los analitos (5-6%), posiblemente se adsorbe sobre las paredes de la bolsa *Tedlar*®, o se escapa por difusión, por lo que estos recipientes resultan muy apropiados para el monitoreo de aldehídos en aire.

Acetaldehído en aire de exhalación

La HS-SPME-GC/ECD del acetaldehìdo, con derivatización directa sobre la fibra, saturada previamente con PFPH, fue utilizada para construir la curva de calibración, utilizada para su cuantificación en el aliento humano (aire de exhalación) (Véase, **Sección 2.3.1.2**). La **Tabla 18** muestra la información correspondiente a la reproducibilidad de las áreas cromatográficas de los picos del derivado, analizado en la columna DB-5 (30 m), que para las muestras evaluadas fue alta; los coeficientes de variación (*CV*, %, n=2), en su mayoría, estuvieron entre 0.2 y 3.5%. El análisis de una muestra de aire enriquecida con acetaldehído (1.42 µg/m^3), mostró porcentaje de recuperación del 99%. El estudio detallado de un estándar gaseoso, que contenía 0.65 µg/m^3 de acetaldehído, arrojó niveles mínimos de detección y de cuantificación, del 13.2 y 26.5 pg/m^3, respectivamente. Estos resultados confirmaron que la metodología propuesta es reproducible, sensible y de fácil aplicación, para la determinación del acetaldehído en el aliento humano.

Tabla 18. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas del acetaldehído, medido en forma de su derivado PFPH-hidrazónico, en aire de exhalación enriquecido. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Temperatura: 27°C. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250°C (5 min).

Concentración, *µg/m³*	**Áreas, cuentas**	**Promedio de áreas**	**s (n=2)**	***CV*, %**	**R_f**
0.65	1,4E+06	1,4E+06	3,3E+03	0,2	4,7E-07
	1,4E+06				
1.42	3,0E+06	3,0E+06	3,0E+05	10,7	5,1E-07
	3,57E+06				
2.86	5,8E+06	5,4E+06	6,0E+04	1,1	5,4E-07
	5,0E+06				
	5,1E+06				
4.31	8,7E+06	9,0E+06	8,1E+05	9,6	5,1E-07
	8,1E+06				
6.47	1,1E+07	1,2E+07	1,8E+05	1,6	5,8E-07
	1,1E+07				
	1,1E+07				
8.63	1,6E+07	1,6E+07	5,4E+05	3,5	5,6E-07
	1,5E+07				

Determinación de PFPH

La cuantificación de PFPH en las diferentes muestras se realizó con base en la curva de calibración construida por inyección manual de PFPH en metanol. En el **Anexo 9**, se presentan los resultados de la calibración de PFPH en niveles de concentración baja y alta.

3.3.2 Derivados de ácidos. Los ácidos carboxílicos volátiles (C_2-C_6 y benzoico) fueron analizados como sus ésteres de PFB, mediante HS-SPME y GC/ECD. Con el fin de establecer las mejores condiciones para la derivatización de los ácidos, en fase acuosa, y para la HS-SPME de los derivados, se evaluaron diferentes parámetros. Los resultados obtenidos en cada caso, se presentan en las siguientes secciones.

3.3.2.1 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio orgánico. Los productos de reacción entre el bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) y los ácidos carboxílicos (**Figura 30**), obtenidos según el método descrito en la **Sección 2.3.2.1**, fueron identificados mediante GC/ECD y GC-MS.

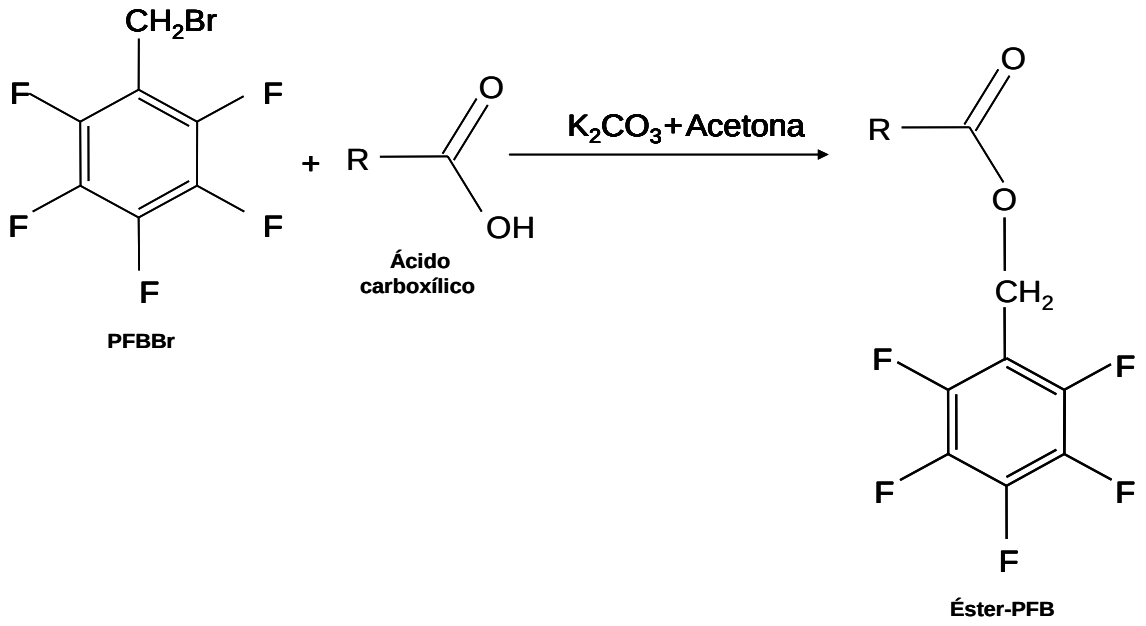


Figura 30. Reacción de derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr.

Aunque, según reportes bibliográficos (Galceran M. T. *et al*., 1995), el reactivo de derivatización puede sufrir degradación y presentar alguna contaminación,

alterando así los resultados del análisis de los derivados de pentaflúorbencilo por GC/ECD; en la presente investigación, no se observó este fenómeno. En el blanco del reactivo, además de unos pequeños picos cromatográficos que no interfieren con los de analitos de interés, se detectaron los ésteres de los ácidos acético y propanoico, en cantidades bajas. Sin embargo, ésto no afectó el análisis, que se realizó sustrayendo las áreas de los analitos en el cromatograma del blanco, de las obtenidas en los cromatógramas de las muestras problema (**Figura 31**). La columna DB-5 (30 m), con fase estacionaria apolar, de 5%-fenil poli(metilsiloxano), resulta muy apropiada para la resolución de la mezcla de ésteres de PFB. Los compuestos patrón, reportados en la **Tabla 19**, fueron escogidos por su relevancia en la química de la atmósfera (Chebbi A. y Carlier P., 1996).

Tabla 19. Características de los ésteres de PFB, derivados de los ácidos carboxílicos relevantes en la química de la atmósfera. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Nº del pico	**t_R, min**	**t_{RR}**	**Ácido carboxílico**	**Estructura del derivado**	**Peso molecular, g/mol**
PFBBr	6.59		Agente derivatizante	$C_6F_5CH_2Br$	262
1	7.98	1.21	Acético	$CH_3C(O)OCH_2C_6F_5$	240
2	9.69	1.47	Propanoico	$CH_3CH_2C(O)OCH_2C_6F_5$	254
3	11.22	1.70	Butanoico	$CH_3(CH_2)_2C(O)OCH_2C_6F_5$	268
4	12.88	1.96	Pentanoico	$CH_3(CH_2)_3C(O)OCH_2C_6F_5$	282
5	14.49	2.20	Hexanoico	$CH_3(CH_2)_4C(O)OCH_2C_6F_5$	296
6	17.70	2.69	Benzoico	$C_6H_5C(O)OCH_2C_6F_5$	302

(*) t_{RR} = Tiempo de retención relativo al agente derivatizante.

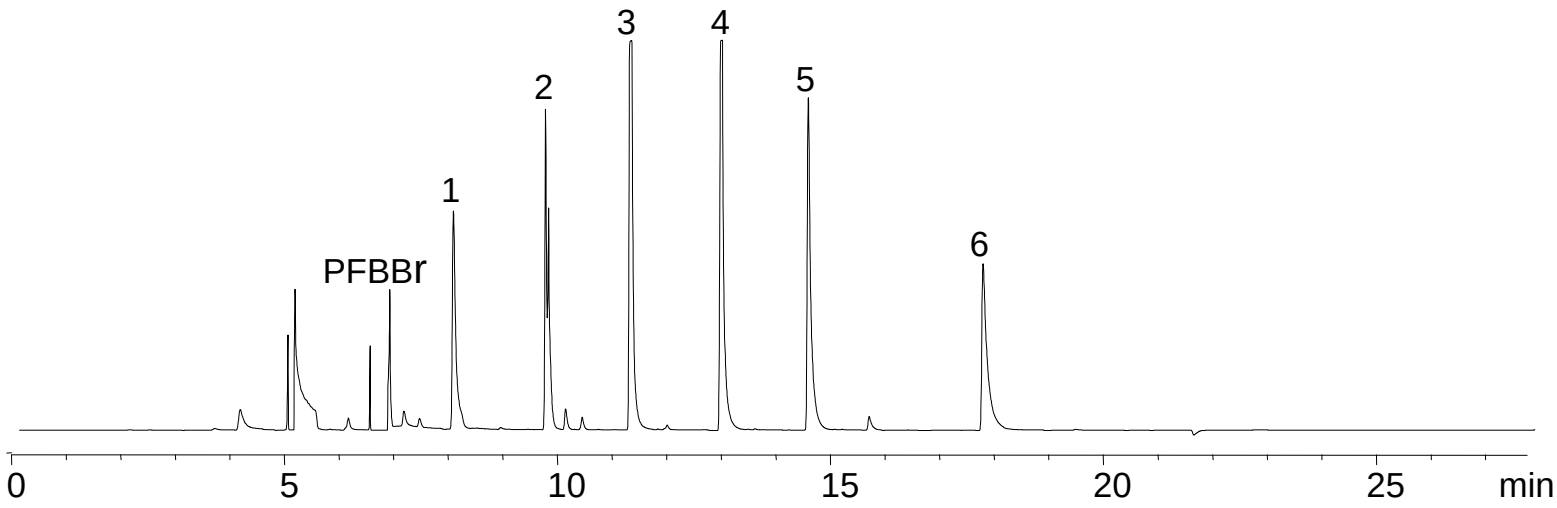


Figura 31. Perfil cromatográfico típico de los ésteres de PFB derivados de: 1- Ácido acético; 2- Ácido propanoico; 3- Ácido butanoico; 4- Ácido pentanoico; 5- Ácido hexanoico; 6- Ácido benzoico. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Ésteres de PFB en MeOH (400 µmoles/L); Inyección: 1 µL (*Split* 1:30).

En la **Tabla 20**, se presenta el estudio de la reproducibilidad de los tiempos de retención determinados en la columna DB-5 (30 m), usando SPME. Como se puede apreciar, los coeficientes de variación (*CV*, %, n=4) de los tiempos de retención no superaron el 0.6%, indicando una reproducibilidad alta de las inyecciones realizadas en los análisis de los ésteres de PFB mediante HS-SPME-GC/ECD.

Tabla 20. Tiempos de retención determinados para los ésteres de PFB, derivados de los ácidos carboxílicos relevantes en la química de la atmósfera. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Ácido carboxílico	**Tiempos de retención, min**				**Promedio de t_R, min**	**s**	***CV*, %**
	1	**2**	**3**	**4**			
PFBBr*	6.626	6.598	6.545	6.572	6,59	0,03	0,5
Acético	7.976	7.978	7.976	7.976	7,977	0,001	0,01
Propanoico	9.686	9.685	9.684	9.686	9,685	0,001	0,01
Butanoico	11.217	11.217	11.217	11.217	11,217	0,000	0,00
Pentanoico	12.878	12.878	12.878	12.878	12,878	0,000	0,00
Hexanoico	14.486	14.486	14.486	14.486	14,486	0,000	0,00
Benzoico	17.702	17.699	17.692	17.698	17,698	0,004	0,02

(*) Agente derivatizante

En la **Tabla 21**, se resumen los fragmentos característicos obtenidos por EI (70 *eV*), de los derivados PFB de ácidos carboxílicos patrón. En la **Figura 32**, aparece un espectro de masas del butanoato de pentaflúorbencilo.

Tabla 21. Intensidades relativas (%) de fragmentos característicos en los espectros de masas (EI, 70 *eV*) de los ésteres PFB, derivados de los ácidos carboxílicos relevantes en la química de la atmósfera.

Ácido carboxílico, derivado	**$M^{+\bullet}$**	**Φ_1 $[C_6F_5CH_2]^+$**	**$[M-C_6F_5CH_2]^+$**	**Φ_2 $[C_6F_5CH_2\text{-}HF]$**	**Φ_3 $[C_6F_5CH_2O]^+$**
Acético	240 (13%)	181 (100%)	59 (N.D.)	161 (15%)	197 (8%)
Propanoico	254 (10%)	181 (100%)	73 (3%)	161 (27%)	197 (3%)
Butanoico	268 (5%)	181 (100%)	87 (3%)	161 (8%)	197 (2%)
Pentanoico	282 (1%)	181 (100%)	101 (12%)	161 (7%)	197 (2%)
Hexanoico	296 (1%)	181 (100%)	115 (16%)	161 (7%)	197 (3%)
Benzoico	302 (32%)	105 (100%)	197 (3%)	161 (12%)	197 (3%)

N.D. – No detectado.

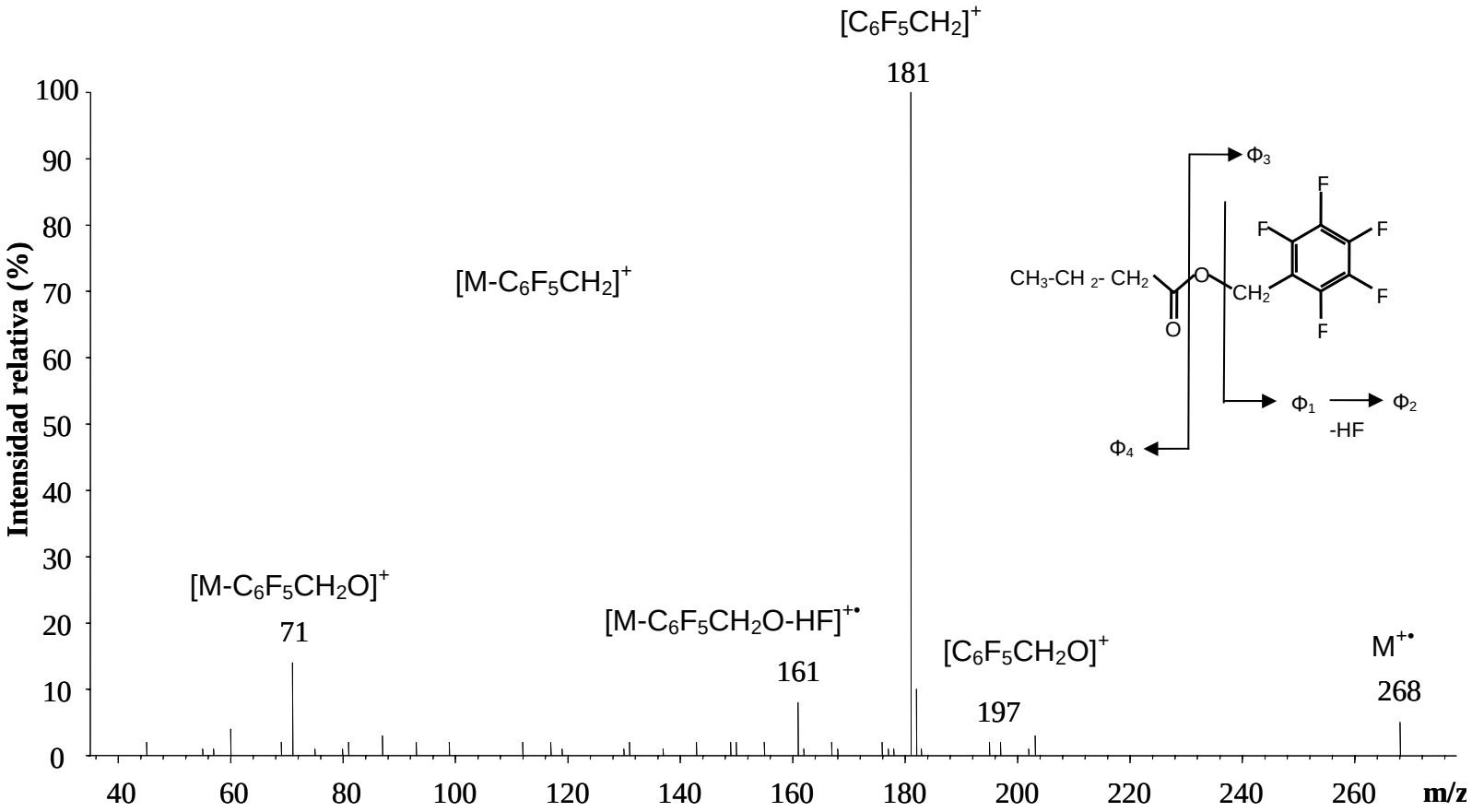


Figura 32. Espectro de masas obtenido por impacto de electrones (70 *eV*) del derivado PFB del ácido butanoico. Columna HP-5MS (50 m). GC-MS. Temperatura de la cámara de ionización-180 °C.

En los espectros de masas, obtenidos por impacto de electrones (70 *eV*) de los derivados de los ácidos carboxílicos, aparecen iones moleculares con intensidades relativamente bajas: C_2 (M^+; *m/z* 240, 13%), C_3 (M^+; *m/z* 254, 10%), C_4 (M^+; *m/z* 268, 5%), C_5 (M^+; *m/z* 282, 1%), C_6 (M^+; *m/z* 296, 1%), excepto para el ácido benzoico (M^+; *m/z* 302, 32%), lo que concuerda con lo reportado por Sinkkonen S. *et al*. (1995), para estos compuestos. Todos los derivados presentaron un pico de base en *m/z* 181, correspondiente al ion pentaflúortropilio $[C_6F_5CH_2]^+$, junto con otros picos en *m/z* 161, $[C_6F_5CH_2 - HF]^+$, (Sinkkonen S. *et al*., 1995; Jennings K. R. y Whiting A., 1972), y en *m/z* 197, correspondiente al fragmento pentaflúorbenciloxi $[C_6F_5CH_2O]^+$, acompañado de la aparición de su ion complementario en *m/z* = [M-197]. En espectros de masas de algunos derivados también se observó un pico *m/z* = [M-225], debido a la liberación del radical $C_6F_5CH_2CO_2^{\bullet}$ del ion molecular

3.3.2.2 Síntesis de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB), en medio acuoso. Para la determinación de compuestos carboxílicos en aire, el contenido de las muestras recolectadas en bolsas *Tedlar*®, se sometió al burbujeo a través de una solución de carbonato de potasio (2 *impingers* en línea, 30 mL c/u, 50 mg/L). Una fracción (9 mL) de la solución acuosa, se separó y se sometió a derivatización con PFBBr, seguidamente, se llevó a cabo la extracción y análisis de los derivados mediante HS-SPME-GC/ECD; las curvas de calibración (Véase **Anexo 10**), construidas de acuerdo con el procedimiento de la **Sección 2.3.2.2**, permitieron determinar los ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) en las muestras de aire. Los resultados de la calibración, muestran niveles de detección y de cuantificación del orden de los µg/m^3 en matrices gaseosas (**Tabla 22**) y de los nmoles /L en líquidos (**Tabla 23**), para todos los analitos evaluados; la linealidad de las curvas presentó valores R^2 de 0.996-0.999.

Tabla 22. Parámetros de calibración de ácidos carboxílicos, analizados como ésteres de PFB, en aire. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Ácido carboxílico	LOD, $\mu g/m^3$ (S/N=5)	LOQ, $\mu g/m^3$	R^2	Recuperación, %
Acético	20	40	0.999	90 ± 6
Propanoico	12	24	0.996	100 ± 2
Butanoico	25	50	0.999	100.0 ± 0.2
Pentanoico	37	74	0.997	100.0 ± 0.2
Hexanoico	106	212	0.997	90 ± 1
Benzoico	271	542	0.997	6.5 ± 0.5

Tabla 23. Parámetros de calibración de ácidos carboxílicos, analizados como ésteres de PFB, en matrices líquidas. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Ácido carboxílico	LOD, nmoles/L (S/N=5)	LOQ, nmoles/L	R^2	Recuperación, %
Acético	28	56	0.999	97.0 ± 0.5
Propanoico	13.	26	0.996	95.0 ± 0.7
Butanoico	24	48	0.999	100 ± 2
Pentanoico	30	60	0.997	100 ± 1
Hexanoico	76	152	0.997	96.0 ± 0.9
Benzoico	185	370	0.997	92.0 ± 0.1

La ionización parcial de los ácidos carboxílicos en la solución básica (pH=9), permitió disminuir las pérdidas de los analitos debido a su volatilización; de esta forma, las recuperaciones calculadas después de la derivatización, acompañada de HS-SPME, estuvieron en el rango de 86-88%, para los ácidos acético y hexanoico; para los ácidos propanoico, butanoico y pentanoico, los valores fueron superiores al 99%, sin embargo, el ácido benzoico presentó las recuperaciones

muy bajas (6.5%) (**Tabla 22)**. Partiendo de matrices líquidas enriquecidas con ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) en una cantidad conocida, se obtuvieron recuperaciones superiores al 92%, para todos los analitos evaluados (**Tabla 23)**. Las bajas recuperaciones del derivado PFB del ácido benzoico en las muestras de aire, pueden estar asociadas a pérdidas del ácido precursor por adsorción sobre las paredes de las bolsas de muestreo y a su baja volatilidad, más no a la ineficiencia del proceso de derivatización.

3.4 IMPLEMENTACIÓN DE TÉCNICAS BASADAS EN LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS.

3.4.1 Determinación de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, mediante HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra, con HBT

. A continuación, se describen los resultados de estudio de la determinación de aldehídos volátiles, usando el HBT, como agente derivatizante, y la HS-SPME-GC/FPD, como método de extracción y análisis.

3.4.1.1 Estudio de las variables que afectan la saturación de la fibra de SPME con HBT. La metodología incluyó el estudio de las variables que afectan el proceso de SPME, lo que se describe en las siguientes secciones.

3.4.1.1.1 Selección de la fibra de SPME. Tal como se aprecia en **Figura 33**, las fibras evaluadas (PA, 85 µm y PDMS, 100 µm) presentan un comportamiento de sorción muy similar frente al HBT, aunque con un ligero aumento de la cantidad de HBT adsorbida, en el caso de la fibra con recubrimiento de PA. Con base en estos resultados, se seleccionó esta fibra, para llevar a cabo los ensayos de derivatización de aldehídos con HBT, en fase vapor.

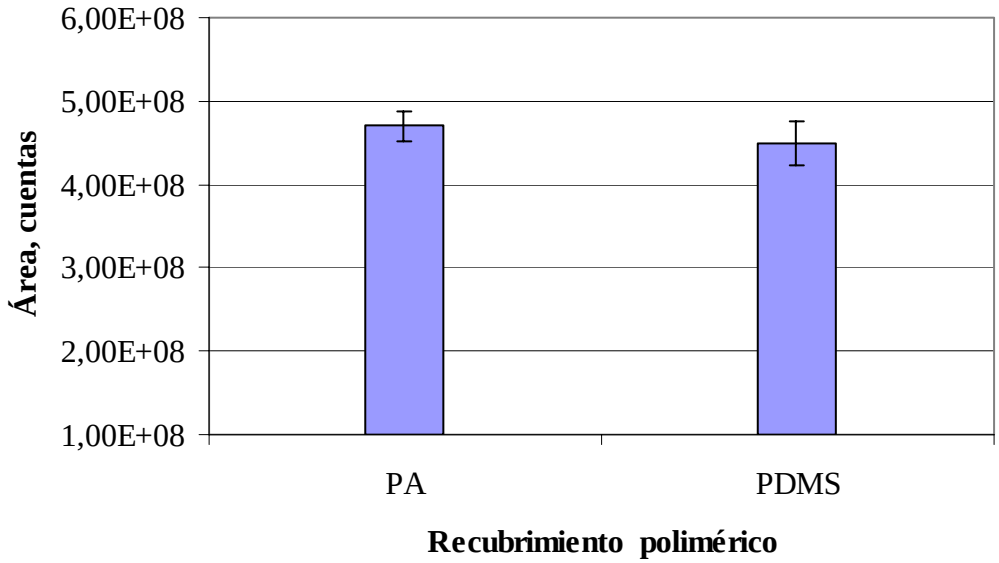


Figura 33. Cantidad de hidracinobenzotiazol adsorbido sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME. HS-SPME; Temperatura: 95 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 10 min. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

3.4.1.1.2 Efecto de la temperatura y el tiempo de la exposición de la fibra sobre la eficiencia de extracción del HBT por SPME. Como se puede apreciar en la **Figura 34**, el HBT requiere temperaturas del orden de los 95 °C para pasar parcialmente a la fase gaseosa o tiempos de exposición muy prolongados, a temperaturas más bajas (120 min a 85 °C). Temperaturas superiores a los 95 °C promocionan el paso a la fase vapor, de los contaminantes de manufactura que acompañan el HBT. Además, a temperaturas elevadas, el HBT retenido sobre la superficie del recubrimiento empieza a desorberse. Ante esta situación, se eligió una temperatura de calentamiento de 95 °C, para promover suficiente cantidad de las moléculas de HBT a la fase vapor.

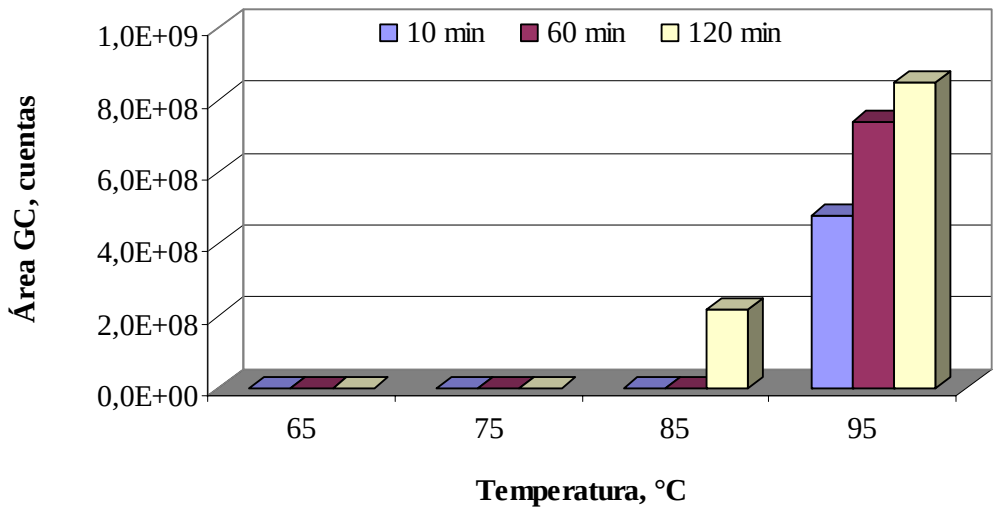


Figura 34. Cantidad de hidracinobenzotiazol adsorbido sobre el recubrimiento de poli(acrilato) de la fibra SPME, en función de la temperatura de calentamiento de la muestra. HS-SPME; Tiempo de exposición de la fibra: 10, 60 y 120 min. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

3.4.1.1.3 Determinación del tiempo de equilibrio. Una vez seleccionado el recubrimiento polimérico y la temperatura de trabajo, se procedió a estudiar el perfil de adsorción de HBT sobre la fibra de PA; el procedimiento se llevó a cabo por duplicado. Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 24**, acompañados de desviaciones estándar (s, n=2) y coeficientes de variación (*CV*, %), que están en el rango 1-10%. Como se puede apreciar, se presenta un aumento constante de la cantidad de HBT adsorbido sobre la fibra, con el tiempo de exposición; los cambios entre los 80 y 120 min son pequeños. Sin embargo, a los 120 min de exposición aún no se ha logrado la saturación de la fibra con el agente derivatizante, bajo las condiciones de operación empleadas. Ante esta situación, se trabajó bajo condiciones de no-equilibrio, escogiendo un tiempo fijo de exposición de la fibra al agente derivatizante, que permitiera obtener una

Tabla 24. Adsorción de hidracinobenzotiazol sobre la fibra de PA, en función del tiempo de exposición de la fibra. HS-SPME; Cantidad de HBT: 0.3 mg; Temperatura: 95 °C. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m). Desorción: 250 °C (10 min).

Réplicas	**Tiempo, min**					
	10		**20**		**40**	
	µmoles	**Área, cuentas**	**µmoles**	**Área, cuentas**	**µmoles**	**Área, cuentas**
1	0,07	4,43E+08	0,08	5,36E+08	0,11	6,40E+08
2	0,06	4,13E+08	0,09	5,60E+08	0,12	6,51E+08
Promedio	0,065	4,3E+08	0,09	5,5E+08	0,10	6,5E+08
s	0,007	2,1E+07	0,01	1,7E+07	0,01	8,0E+06
***CV*, %**	**11**	**5**	**8**	**3**	**7**	**1**

Réplicas	**60**		**80**		**120**	
	µmoles	**Área, cuentas**	**µmoles**	**Área, cuentas**	**µmoles**	**Área, cuentas**
1	0,17	7,29E+08	0,25	8,40E+08	0,29	8,70E+08
2	0,18	7,48E+08	0,27	8,51E+08	0,26	8,34E+08
Promedio	0,20	7,4E+08	0,30	8,46E+08	0,30	8,5E+08
s	0,01	1,4E+07	0,02	7,73E+06	0,03	2,5E+07
***CV*, %**	**4**	**1,8**	**6**	**0,9**	**9,9**	**3**

cantidad de HBT suficiente, para llevar a cabo las reacciones de derivatización de los analitos. La cantidad del HBT adsorbido sobre la fibra (120 min, 95 ^{o}C) correspondió a 0.26 μmoles.

3.4.1.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en fase gaseosa. La derivatización de aldehídos con HBT, se usó para determinar los compuestos carbonílicos presentes en un sistema gaseoso simulado (Véase, **Sección 2.5.1.2**). La muestra de aire fue enriquecida con aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}), (16 mmoles, c/u). Los analitos fueron derivatizados sobre el recubrimiento de PA, cargado previamente con 0.085 μmoles de HBT. La reacción se llevó a cabo con un exceso estequiométrico de 0.5. Inicialmente, se procedió a establecer el tiempo de pre-equilibro (5 min), necesario para lograr una buena homogeneización de la muestra. Para ésto, la derivatización se aplicó a tres muestras que permanecieron a temperatura ambiente (27 °C) antes de su análisis, durante 0.5, 5 y 15 min, respectivamente. El tiempo de reacción se fijó en 2 min. En la **Figura 35**, se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos en cada caso. Como se puede apreciar, los tiempos de pre-equilibrio cortos (*e.g.,* 0.5 min) y largos (*e.g.,* 15 min), afectan los procesos de extracción-derivatización: el mejor perfil cromatográfico se obtiene cuando la muestra permanece en reposo durante 5 min, previo a su análisis.

También se evaluó el efecto del tiempo de exposición de la fibra, cargada previamente con el agente derivatizante (HBT), sobre la reacción de derivatización de los aldehídos. En la **Figura 36**, se presentan los perfiles cromatográficos obtenidos para cada tiempo de reacción. A medida que se incrementa el tiempo de exposición, se favorece la extracción-derivatización de los compuestos más pesados (C_8 - C_{10}). Además, concentraciones más altas de derivados, producen picos asimétricos, por sobrecarga de la columna, y la elevación de la línea base. Ante ésto, se escogió un tiempo de exposición de la fibra de 1 min.

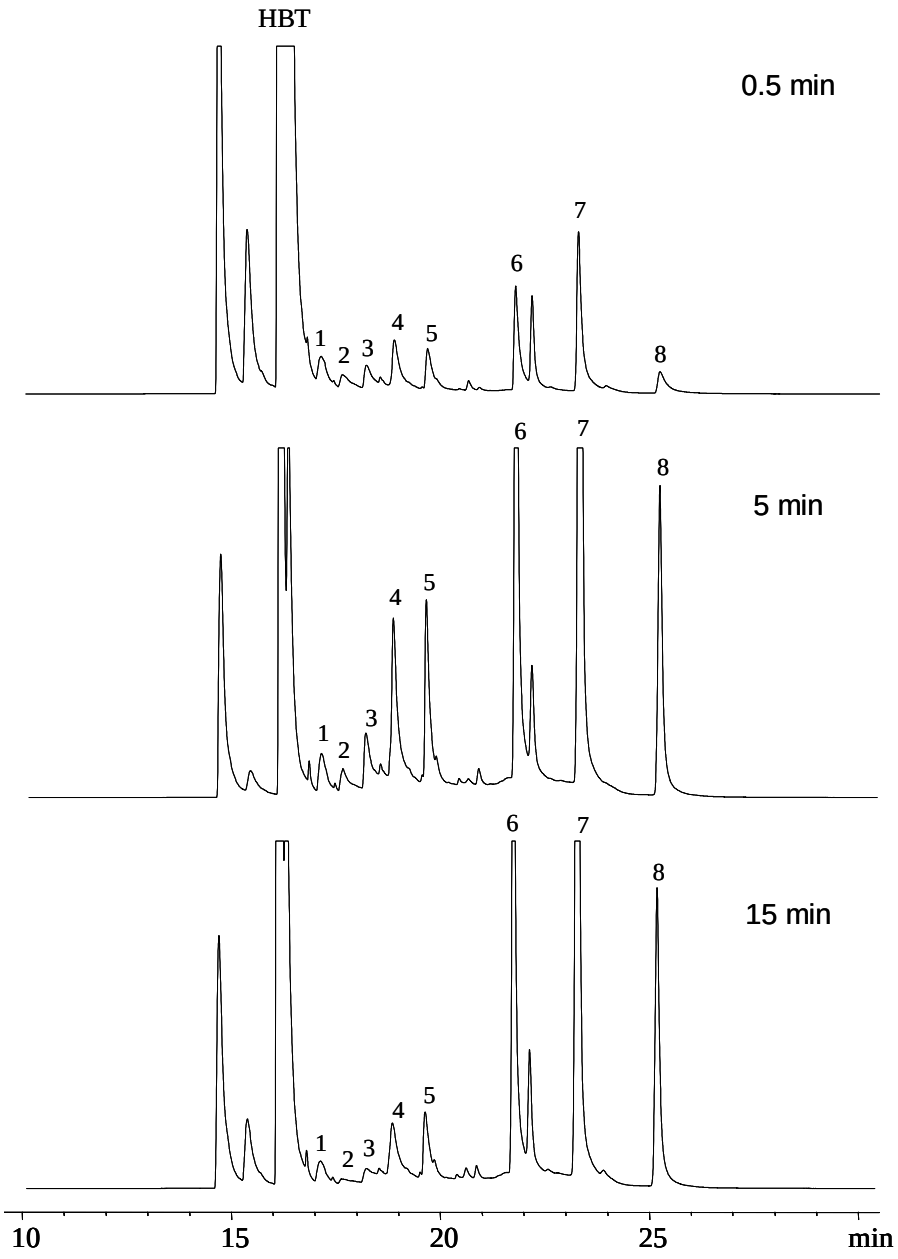


Figura 35. Perfiles cromatográficos típicos de las HBT-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal; 8-Decanal . Aldehídos en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L). HS-SPME (PA, 80 µm). Tiempo de exposición de la fibra: 2 min. Tiempos de pre-equilibrio de la muestra: 0.5, 5 y 15 min. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); Desorción: 250 °C (10 min).

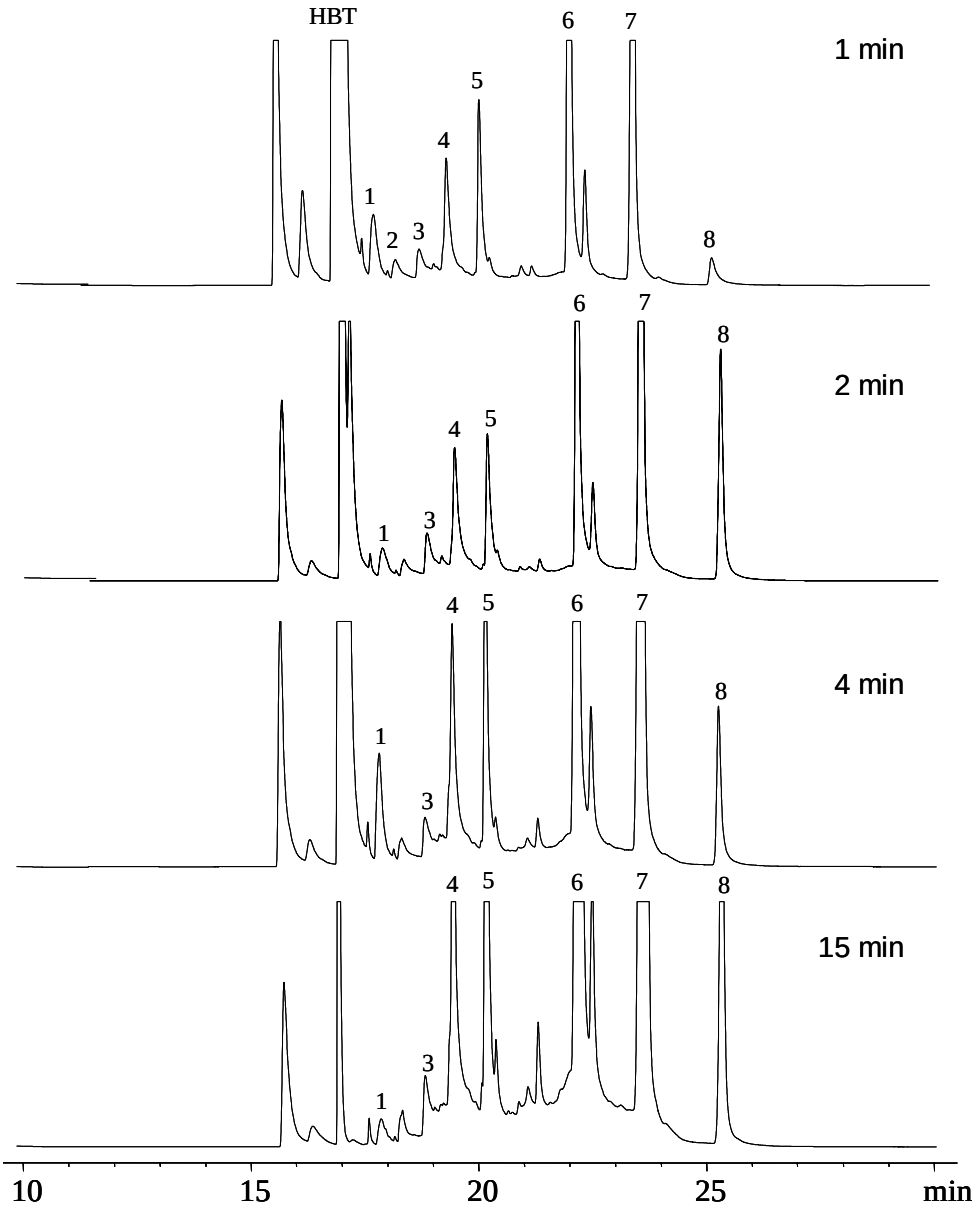


Figura 36. Perfiles cromatográficos típicos de las HBT-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal; 8-Decanal. Aldehídos en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L). HS-SPME (PA, 80 µm). Tiempo de pre-equilibrio de la muestra: 5 min. Tiempos de exposición de la fibra: 1, 2, 4 y 15 min. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); Desorción: 250 °C (10 min).

Una vez definidos el tiempo de pre-equilibro (5 min) y de exposición de la fibra (1 min), para la extracción-derivatización de los aldehídos, se evaluó el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la extracción. En la **Figura 37**, se presentan los perfiles cromatográficos típicos de las hidrazonas sintetizadas sobre la fibra de PA. El proceso se realizó a 27 y a 65 °C. Se puede apreciar, que el calentamiento de la muestra no favorece el proceso, ésto puede tener dos causas: (1) que los analitos sufran volatilización antes de la derivatización y, (2) que los derivados formados sobre la fibra, experimenten desorción a temperaturas más altas. Por lo tanto, el proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente (27 °C).

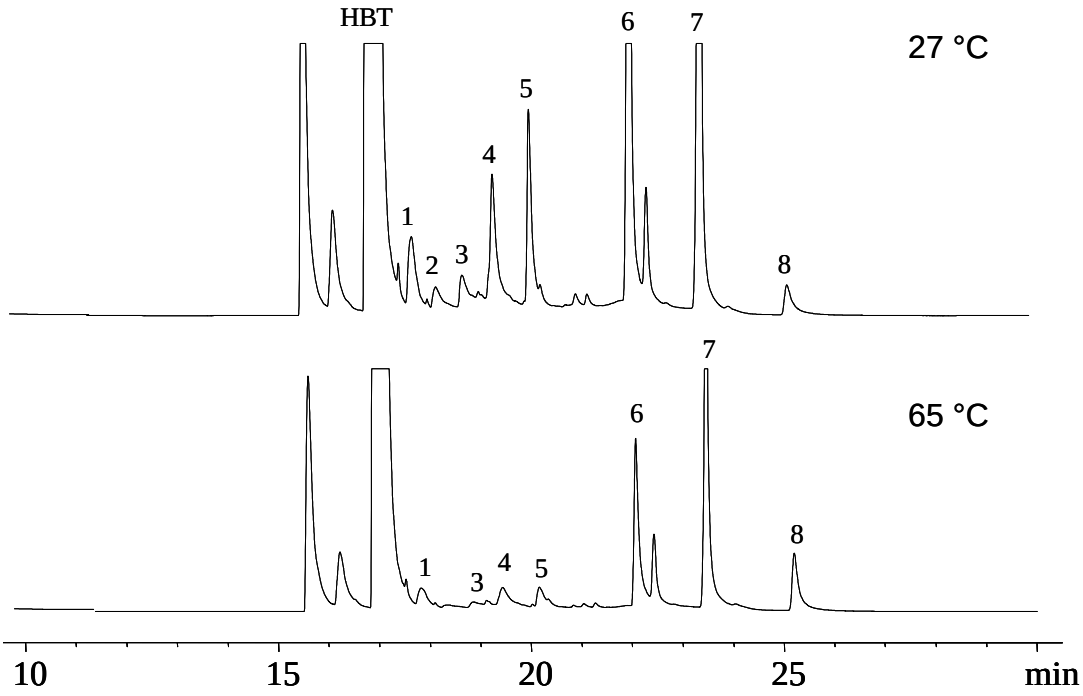


Figura 37. Perfiles cromatográficos típicos de las HBT-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal; 8-Decanal . Aldehídos en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L). HS-SPME (PA, 80 µm). Tiempo de pre-equilibrio de la muestra: 5 min. Tiempo de exposición de la fibra: 1 min. Temperaturas: 27 °C y 65 °C. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm); Desorción: 250 °C (10 min).

Los resultados indican que, la derivatización de aldehídos sobre la fibra de PA, cargada previamente con HBT, no es muy apropiada, cuando la matriz gaseosa que se desea analizar contiene la serie de aldehídos C_2-C_{10}; alcanzándose mayor extracción de los aldehídos con 4 o más átomos de carbono, mientras que la extracción de los aldehídos más livianos (C_2-C_3) es baja. Además, los LODs alcanzados con esta metodología, se encuentran en el orden de los mg/m^3. Ante ésto, se decidió evaluar otro agente derivatizante, *i.e.* PFPH (Véase **Secciones 2.5.2**), cuyas aplicaciones se describen en la **Sección 3.4.2**.

3.4.1.3 Determinación del hexanal (C_6) en fase vapor. Aprovechando el potencial de la SPME con derivatización (HBT) directa sobre la fibra, para la determinación de aldehídos con 4 o más átomos de carbono (Véase **Sección 3.4.1.2**), ésta se aplicó para determinar el hexanal presente en matrices líquidas; el aldehído en estudio, fue escogido debido a su gran importancia en alimentos y aplicaciones biomédicas, como un marcador de la peroxidación lipídica.

La primera fase de este experimento consistió en determinar el tiempo necesario para realizar la reacción entre el hexanal presente en solución acuosa y el HBT adsorbido previamente sobre la fibra (PA) de SPME. La reacción de derivatización se llevó a cabo en relación µmolar aldehído:HBT de 1:1, las condiciones operacionales del ensayo se especifican en la **Sección 2.5.1.3**. Para la cuantificación de la HBT-hidrazona del hexanal y el HBT remanente sobre la fibra, se utilizaron las respectivas curvas de calibración, construidas mediante inyección convencional (Véase **Sección 2.3.1.1**).

Como se puede apreciar en la **Figura 38**, a los 80 min aún no se alcanza el equilibrio. En este punto sólo han reaccionado el 21.6% de las moléculas del hexanal adicionadas al medio. Para mejorar la eficiencia de la reacción, podría aumentarse la cantidad de agente derivatizante sobre la fibra; sin embargo, no es

conveniente, debido a que a concentraciones muy altas de HBT, éste satura el FPD, además los picos cromatográficos se deforman y la línea base del cromatograma se eleva notoriamente. Ante ésto, y con el fin de disminuir los tiempos experimentales, se fijó un tiempo de reacción de 30 min (condiciones de no-equilibrio), para efectuar todos los ensayos de derivatización del hexanal presente en matrices líquidas.

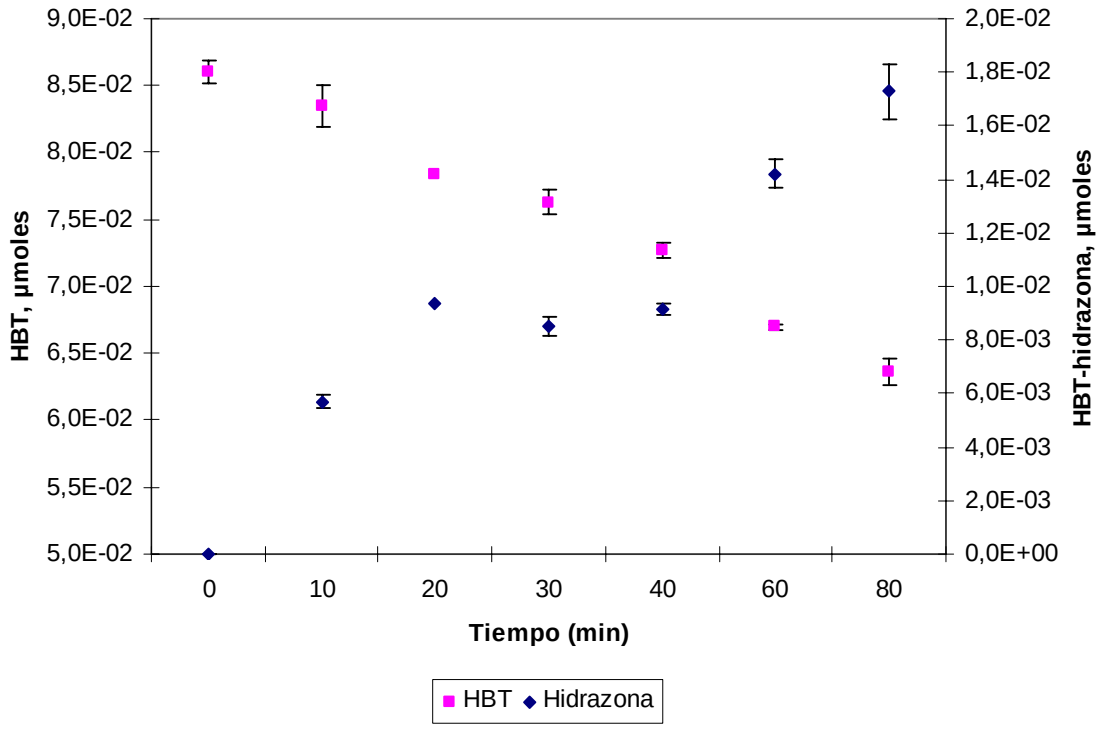


Figura 38. C_6-Hidrazona en la reacción de derivatización del hexanal con el HBT, en función del tiempo de exposición de la fibra (PA, 80 µm). HS-SPME. Temperatura: 27 °C. GC/FPD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

3.4.1.3.1 Determinación del hexanal en matrices líquidas, mediante HS-SPME-GC/FPD, con derivatización directa sobre la fibra, saturada con HBT. Para cuantificar el hexanal en matrices líquidas, se construyó una curva de calibración (cuadrática) del analito (**Figura 39**), mediante HS-SPME-GC/FPD con derivatización sobre la fibra, por reacción con HBT (Véase, **Sección, 2.3.1.1**). En la **Tabla 25**, se presentan las áreas cromatográficas para cada punto de la curva, así como sus desviaciones estándar (s), coeficientes de variación (*CV*, %) y factores de respuesta (R_f).

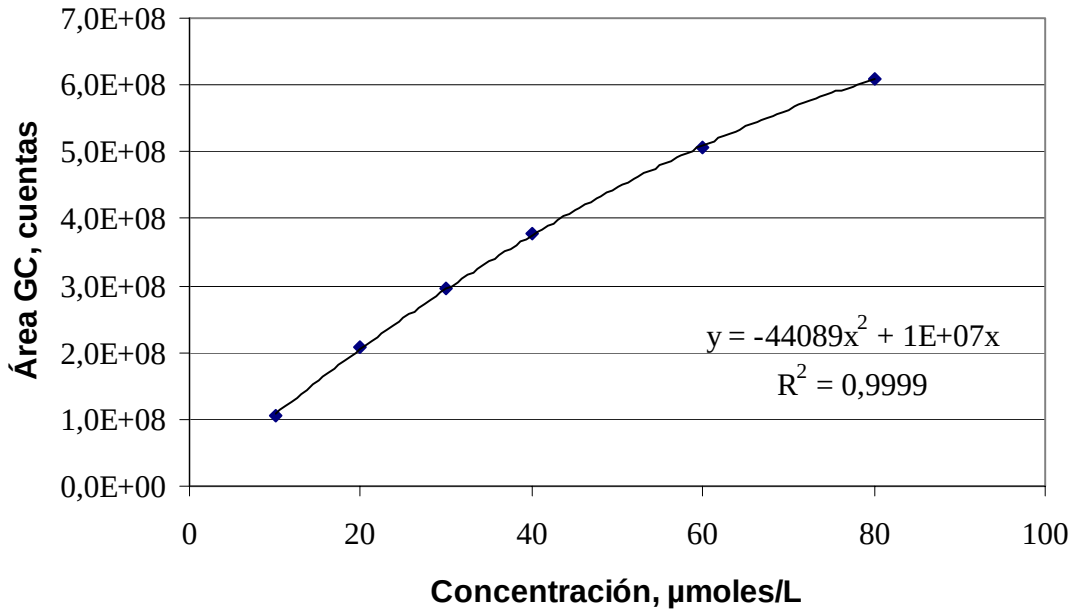


Figura 39. Curva de calibración para la HBT-hidrazona del hexanal, obtenida medainte HS-SPME-GC/FPD, con derivatización directa sobre la fibra. Fibra: PA (80 µm); GC/FPD; Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.3.1.1**.

Tabla 25. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas del hexanal, determinado en matrices acuosas enriquecidas y analizado en forma de su derivado HBT-hidrazónico. HS-SPME (PA, 80 µm); GC/FPD; Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.3.1.1**.

Concentración, *µg/L*	**Área, cuentas**	**Promedio de áreas**	**s**	***CV*, %**	**R_f**
10	1,0E+08	1,1E+08	4,0E+06	3,3	9.59E-8
	1,1E+08				
	1,0E+08				
20	2,1E+08	2,2E+08	8,0E+06	4,0	9.67E-8
	2,0E+08				
30	2,9E+08	3,0E+08	1,0E+06	0,4	1.02E-7
	2,9E+08				
	3,0E+08				
40	3,8E+08	3,8E+08	8,0E+06	2,1	1.06E-7
	3,9E+08				
	3,7E+08				
60	5,1E+08	5,2E+08	8,0E+06	1,5	1.20E-7
	5,0E+08				
	5,1E+08				
80	6,0E+08	6,1E+08	2,5E+06	0,4	1.34E-7
	6,0E+08				
	6,3E+08				

Como se puede apreciar, la curva de calibración presentó muy buena correlación R^2 >0.99 y los coeficientes de variación (*CV*, %, n=3) para las áreas cromatográficas no sobrepasaron el 4%, indicando una buena reproducibilidad de las mediciones realizadas, mediante este método.

En la **Tabla 26** se presentan los porcentajes de recuperación del derivado-HBT del hexanal, obtenidos partiendo de soluciones acuosas del hexanal de diferente concentraciones. Para todas las concentraciones evaluadas, la eficiencia de la extracción del derivado fue mayor del 96%.

Tabla 26. Recuperación (%) del hexanal, presente en matrices acuosas enriquecidas y analizado en forma de su derivado HBT-hidrazónico. HS-SPME (PA, 80 µm); GC/FPD; Columna DB-5 (30 m).

Concentración, µmoles/L		**Promedio de áreas**	**s (n=2)**	***CV*, %**	**Recuperación, %**
Adicionada	**Medida**				
10	9,4	9,7	0,3	3,1	97,3
	10,0				
	9,8				
30	27,9	29.0	1,1	3,6	96,6
	29,4				
	29,8				
40	39,6	38,8	0,6	1,6	96,9
	38,2				
	38,5				

3.4.2 Determinación por HS-SPME de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, con extracción-derivatización (PFPH) simultánea *in situ*.

El análisis de aldehídos volátiles mediante HS-SPME con derivatización sobre la fibra, también se realizó empleando PFPH como agente derivatizante. La metodología fue implementada para la determinación de aldehídos (C_2-C_{10}) en matrices líquidas y gaseosas; los resultados obtenidos se presentan en las siguientes secciones.

3.4.2.1 Estudio de las variables que afectan la saturación de la fibra de SPME con PFPH.

A continuación, se presentan los resultados de la implementación de la metodología de HS-SPME con derivatización sobre la fibra (PFPH), para la determinación de aldehídos en diferentes matrices.

3.4.2.1.1 Selección de la fibra de SPME. El criterio de selección de la fibra de SPME para el análisis de aldehídos mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) *in situ*, se basó en su capacidad de sorción del reactivo derivatizante. Tres recubrimientos de fibras SPME, a saber: PDMS (d_f = 100 µm); PDMS-DVB (d_f = 65 µm) y PA (d_f = 80 µm), fueron ensayados. Cada una de las fibras se expuso por 10 y 60 min, al *headspace* de una solución de PFPH (0.1 mmoles/L), en orden aleatorio. Las temperaturas de desorción (250 °C), se fijaron por debajo del valor máximo de operación recomendado por el fabricante para cada fibra (250 °C para PDMS, 290 °C para PA y, 260 °C para PDMS-DVB); las condiciones de SPME se describen en la Parte Experimental (**Sección 2.5.2.1.1**). En la **Figura 40**, se ilustra el perfil de adsorción de la PFPH sobre las fibras evaluadas. Como se aprecia, la fibra recubierta con PDMS/DVB presentó mayor capacidad de adsorción del reactivo derivatizante. Este efecto se puede explicar por el grado de polaridad de la PFPH, el cual favorece su retención por el polímero de PDMS/DVB, especial para analitos de polaridad intermedia.

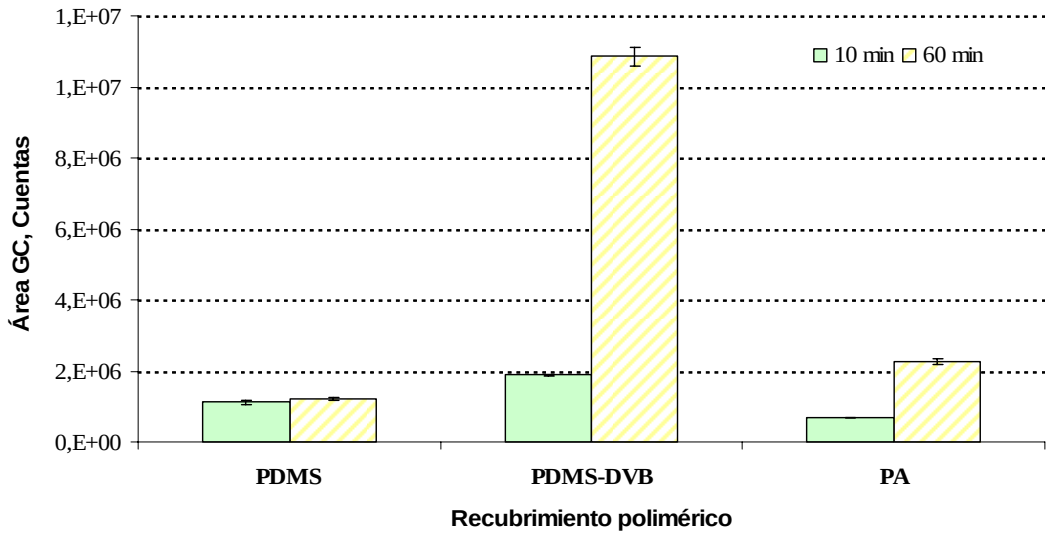


Figura 40. Cantidad de PFPH, adsorbida sobre diferentes recubrimientos de la fibra SPME, en función del tiempo de su exposición. HS-SPME; Temperatura: 27 °C. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

Los resultados mostraron que 5 min (250 °C) son suficientes para desorber la PFPH retenida sobre la fibra PDMS/DVB. Bajo estas condiciones, tampoco se observó el efecto *carry-over* en la segunda desorción, para otras fibras. En la **Figura 41** se muestran los perfiles cromatográficos típicos de la PFPH extraída desde la solución acuosa (2 mL, 0.1 mmoles/L), mediante HS-SPME con recubrimiento de PDMS/DVB. El analito sufrió en el puerto de inyección del GC/ECD: (a) la primera desorción térmica de la fibra a 250 °C, durante 5 min; (b) la segunda desorción de la fibra también a 250 °C (5 min). Se pudo concluir, que ya en la primera desorción, sucedió la completa transferencia de la PFPH a la columna cromatográfica.

Con base en los resultados obtenidos, la fibra de PDMS/DVB fue seleccionada y utilizada en todos los ensayos siguientes.

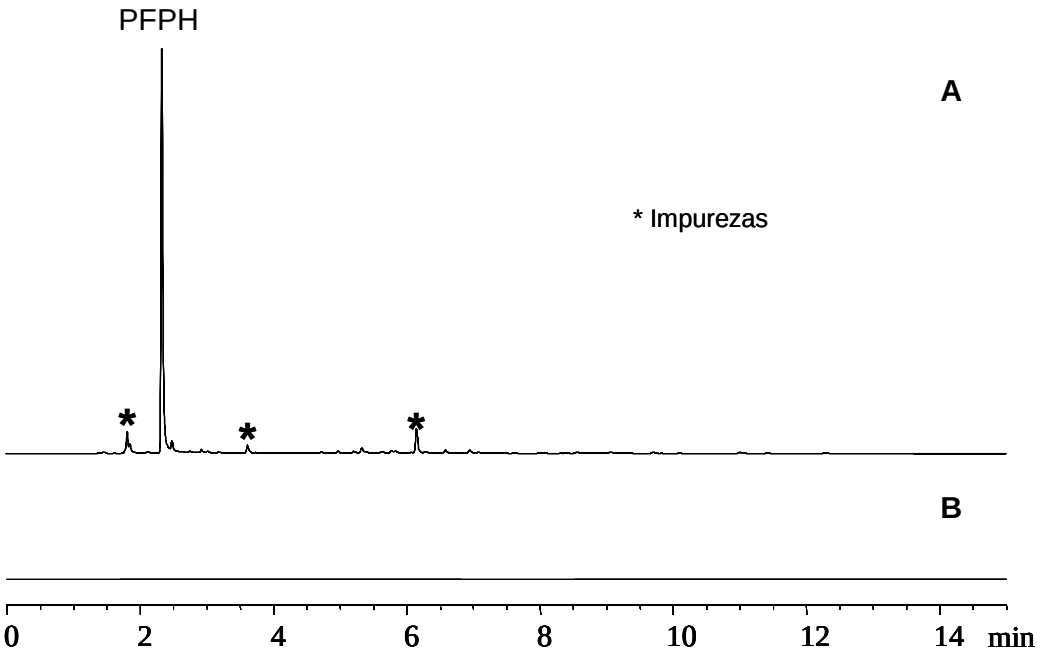


Figura 41. Perfiles cromatográficos de la PFPH obtenidos durante: **A**. La primera y **B**. La segunda desorciones de la fibra. HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Exposición de la fibra, al *headspace* de la solución, por 60 min; Temperatura: 27 °C. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

3.4.2.1.2 Determinación del tiempo de equilibrio. Para alcanzar el tiempo de adsorción más favorable, la fibra de PDMS-DVB, se expuso a los vapores de soluciones acuosas de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm) por 20, 40, 50, 60 y 80 min, respectivamente; cada ensayo se llevó a cabo por triplicado. En la **Figura 42**, se muestra el perfil de saturación de la fibra PDMS-DVB con PFPH, aplicando SPME en modo *headspace*. Como se puede apreciar, se presenta un incremento lineal de la cantidad de pentaflúorfenilhidracina retenida sobre el recubrimiento con el tiempo de exposición, hasta alcanzar el nivel de saturación aproximadamente a los 60 min; a tiempos de exposición superiores (80 min) se observa una ligera pérdida del analito, que posiblemente empieza a experimentar su desorción desde la fibra.

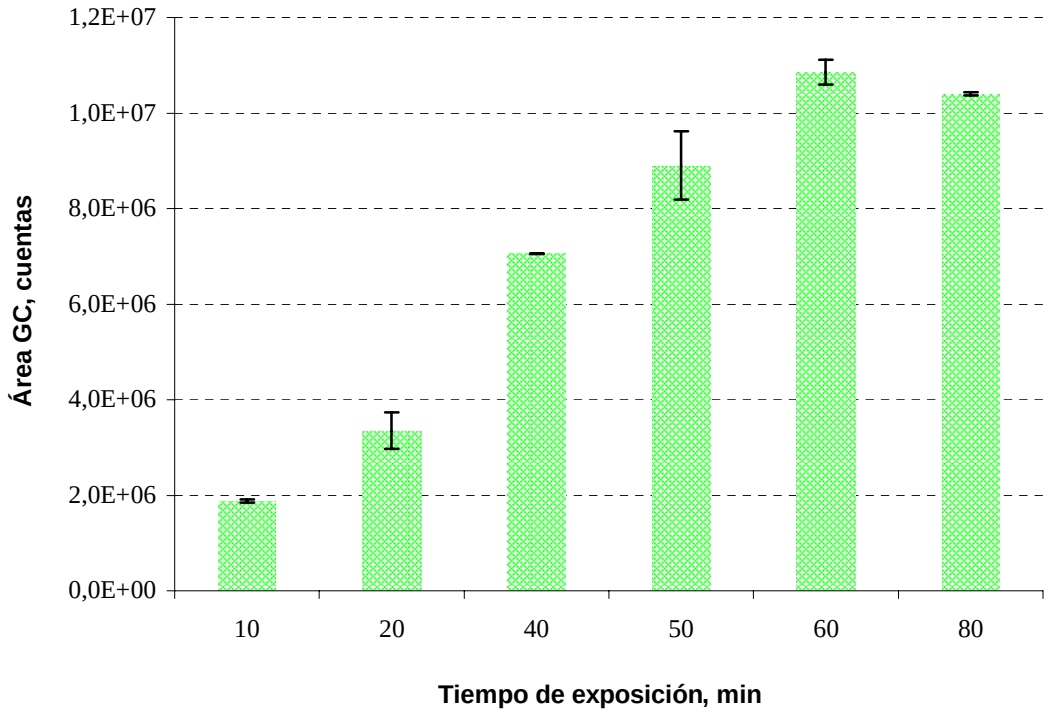


Figura 42. Perfil de saturación de la fibra PDMS/DVB con PFPH, usando SPME en modo *headspace*, en función del tiempo de exposición de la fibra. Solución acuosa de PFPH (2 mL, 0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm).

Las áreas de los picos cromatográficos y la curva de calibración (**Anexo 9-2)**, se usaron para cuantificar la cantidad de PFPH adsorbida por el recubrimiento polimérico. En la **Tabla 27** se presentan los valores respectivos, junto con sus desviaciones estándar (s, n=2) y coeficientes de variación (*CV*, %), los cuales están en el rango 0.01-8%.

Con base en estos resultados, el tiempo para la saturación de la fibra con PFPH se fijó en 60 min (temperatura 27 ^{o}C), ésto concuerda con lo reportado por Stashenko E. E. *et al.*, 2000. No obstante, con el fin de disminuir los tiempos experimentales, fue necesario realizar otros estudios de saturación de la fibra,

partiendo de soluciones de PFPH más concentradas. Las concentraciones evaluadas fueron 0.8, 1.6, 2.4, 4.8 y 7.2 mmoles/L. En la **Figura 43**, se muestra el perfil de la cantidad de PFPH adsorbida en función del tiempo de exposición de la fibra PDMS/DVB y la concentración del agente derivatizante en la solución.

Para todos los casos se observa un incremento de la cantidad de pentaflúorfenilhidracina adsorbida, sobre la fibra, con el tiempo de exposición de la fibra. Al utilizar una solución de PFPH en concentración de 0.8 mmoles/L, la saturación de la fibra se alcanza aproximadamente a los 30 min, tiempo en el que se adsorben 14,0 nmoles de PFPH. Mientras que con la solución de 0.1 mmoles/L de PFPH, se requieren 60 min para alcanzar el quilibrio (PFPH adsorbida = 14,0 nmoles) (Véase **Figura 42**).

La etapa de adsorción de PFPH sobre la fibra PDMS-DVB, puede ser aún más corta, si se utiliza una solución de 1.6 mmoles/L o de 2.4 mmoles/L; en estos casos, la fibra adsorbe 14,0 y 16,0 nmoles, resepctivamente, en tan sólo 3 min. Para concentraciones más altas (4.8 mmoles/L y 7.2 nmoles/L), aunque se logra retener mayor cantidad de PFPH sobre el recubrimiento polimérico, en períodos cortos de tiempo, también se extrae mayor cantidad de las impurezas, que están presentes en el reactivo derivatizante.

Tabla 27. Adsorción de pentaflúorfenilhidracina (PFPH) sobre la fibra PDMS-DVB, en función del tiempo de exposición de la fibra. HS-SPME. Solución acuosa de PFPH (0.1 mmoles/L, 27 °C, 800 rpm).

Réplicas	**Tiempo, min**					
	10		**20**		**40**	
	Área, cuentas	**nmoles**	**Área, cuentas**	**nmoles**	**Área, cuentas**	**nmoles**
1	1,7E+06	2,23	3,8E+06	4,94	7,1E+06	9,20
2	1,8E+06	2,41	3,8E+06	4,94	7,1E+06	9,20
Promedio	1,8E+06	2,3	3,8E+06	4,94	7,1E+06	9,20
s	9,9E+04	0,1	0,0	0,00	0,0	0,00
***CV*, %**	**5,6**	**5,7**	**0,0**	**0,00**	**0,0**	**0,00**

Réplicas	**50**		**60**		**80**	
	Área, cuentas	**nmoles**	**Área, cuentas**	**nmoles**	**Área, cuentas**	**nmoles**
1	8,4E+06	10,94	1,1E+07	13.99	1,0E+07	13,59
2	9,4E+06	12,25	1,1E+07	13,91	1,0E+07	13,53
Promedio	8,9E+06	11,6	1,1E+07	13,95	1,0E+07	13,56
s	7,1E+05	0,9	0,0	0,06	0,0	0,04
***CV*, %**	**8,0**	**8,0**	**0,0**	**0,4**	**0,0**	**0,3**

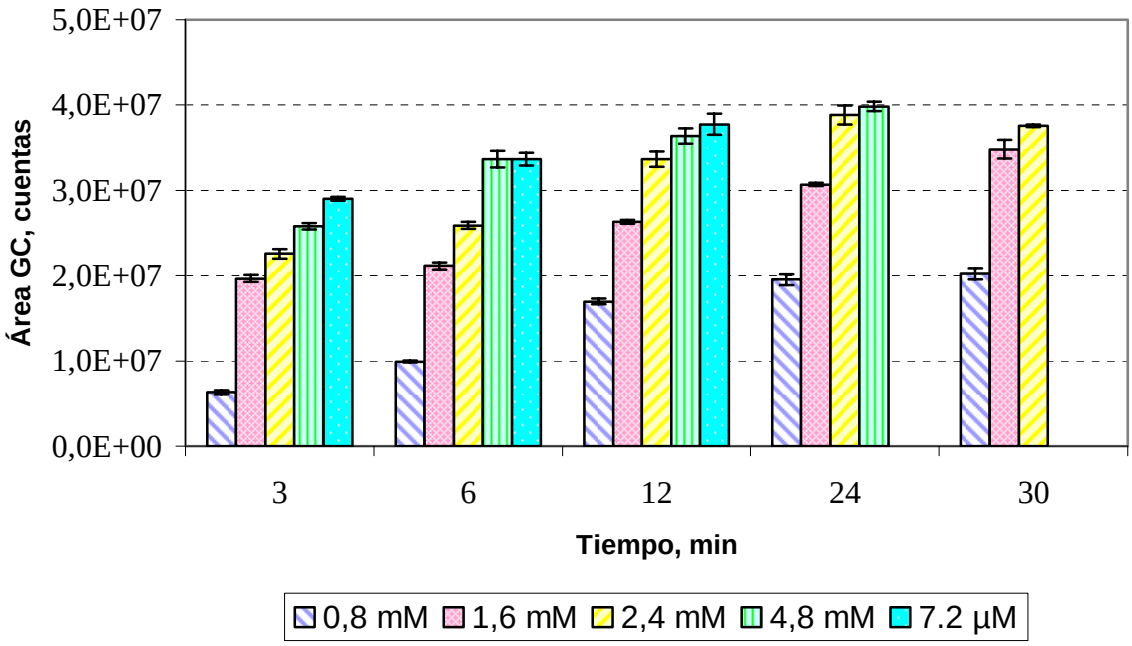


Figura 43. Cantidad de la PFPH adsorbida sobre la fibra PDMS/DVB *Vs* el tiempo de la exposición de la fibra y la concentración de la PFPH en solución (2 mL). HS-SPME (27 °C, 800 rpm).

Con base en estos resultados, para obtener cantidades apropiadas de PFPH sobre la fibra PDMS-DVB en tiempos más cortos, se utilizaron soluciones acuosas de PFPH en concentraciones de 1.6 ó 2.4 mmoles/L, que permitieron disminuir notoriamente los tiempos de análisis.

3.4.2.2 Extracción de aldehídos de bajo peso molecular, presentes en matrices líquidas. A continuación, se presentan los resultados de análisis de aldehídos volátiles por HS-SPME-GC/ECD, con derivación *in situ*, en función de diferentes variables.

3.4.2.2.1 Determinación del tiempo de equilibrio. La extracción-derivatización de aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}) con PFPH, fue estudiada en el período de tiempo (5 - 60 min), utilizando las condiciones de la HS-SPME, que se presentan en la **Sección 2.5.2.2.1**. La **Figura 44**, muestra el perfil cromatográfico típico de las PFPH-hidrazonas formadas sobre la fibra de SPME, durante un tiempo de exposición de la fibra de 40 min (27 °C).

La **Figura 45**, ilustra la formación de PFPH-hidrazonas, en función del tiempo de exposición de la fibra. La velocidad de formación de los derivados de los aldehídos, fue alta al inicio, con un incremento lineal de los productos durante los primeros 40 min, tiempo en el que se ha alcanzado *ca*. el 83% de la producción total, para el período total evaluado de 60 min. En los últimos 20 min, la reacción se hace más lenta, especialmente, para los aldehídos octanal, nonanal y decanal, los cuales tienden a alcanzar el equilibrio a los 60 min.

Con base en estos resultados, se puede estimar, un tiempo de exposición de la fibra saturada con agente derivatizante (PFPH), a la fase vapor de la matriz líquida que contiene aldehídos (C_2-C_{10}, 0.2 µmoles/L c/u), de 40 min, siempre y cuando la fibra se haya expuesto previamente por 3 min a una solución de PFPH de 1.6 mmoles/L o por un período de tiempo más largo, a una solución más diluída.

3.4.2.2.2. Efecto del agente derivatizante. En la **Figura 46**, se ilustra el efecto de la cantidad de reactivo derivatizante, sobre la eficiencia de la reacción de aldehídos con PFPH, utilizando HS-SPME con derivatización *in situ*. La reacción se evaluó adicionando el reactivo en exceso de 4.4, 5.3 y 8.1 veces, respectivamente. Las condiciones experimentales se describen en la **Sección 2.5.2.2.2**.

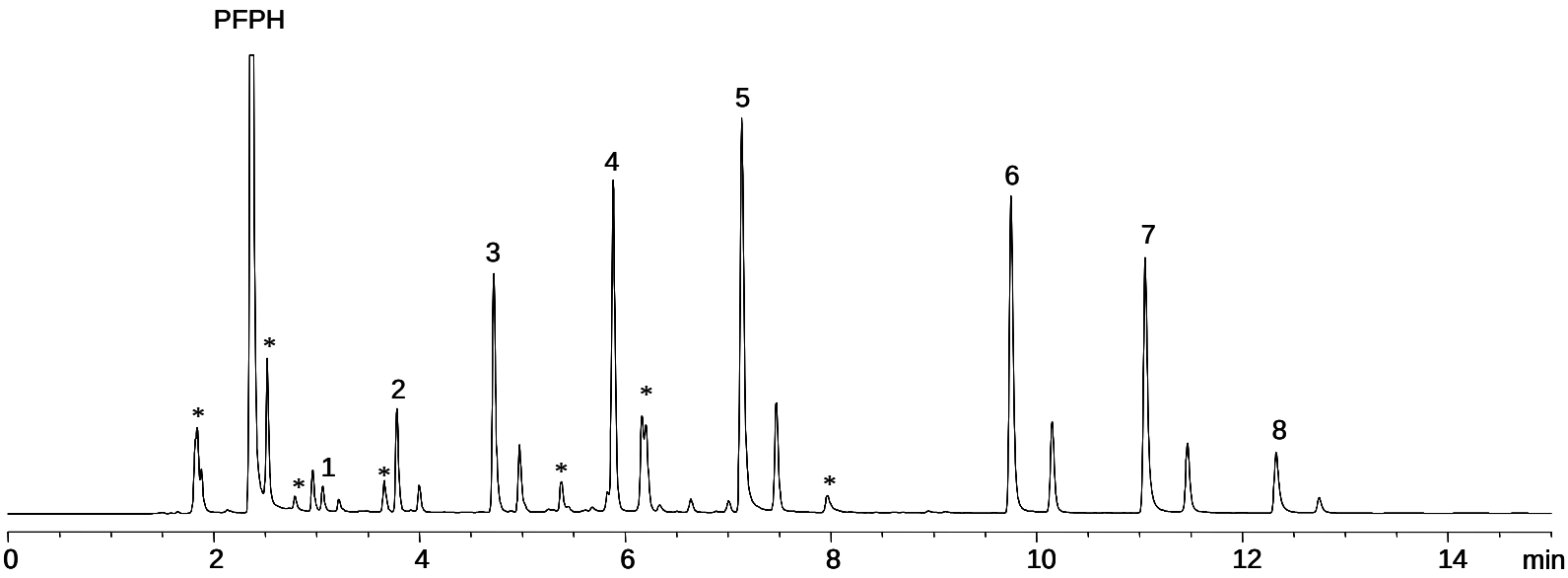


Figura 44. Perfil cromatográfico típico de las PFPH-hidrazonas de: 1- Etanal; 2- Propanal; 3- Butanal; 4- Pentanal; 5- Hexanal; 6- Octanal; 7- Nonanal y 8- Decanal. Solución acuosa de aldehídos (2 mL, 0.2 µmoles/L c/u). HS-SPME (PDMS-DVB, 65 µm); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 40 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción 250 °C (5 min). (* - Impurezas del reactivo derivatizante).

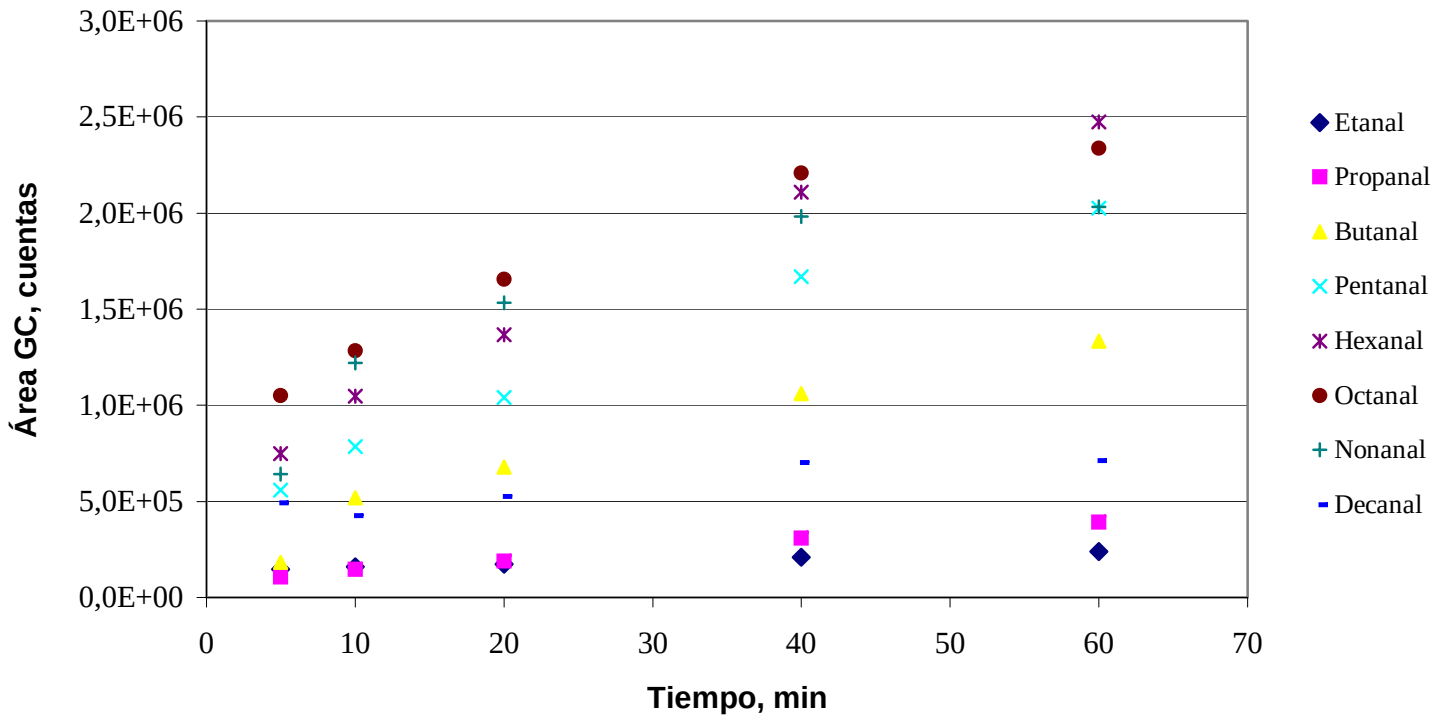


Figura 45. Cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm), saturada previamente con PFPH (2 mL, 1.6 mmoles/L), en función del tiempo de exposición de la fibra. Solución acuosa de aldehídos (2 mL, 0.2 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

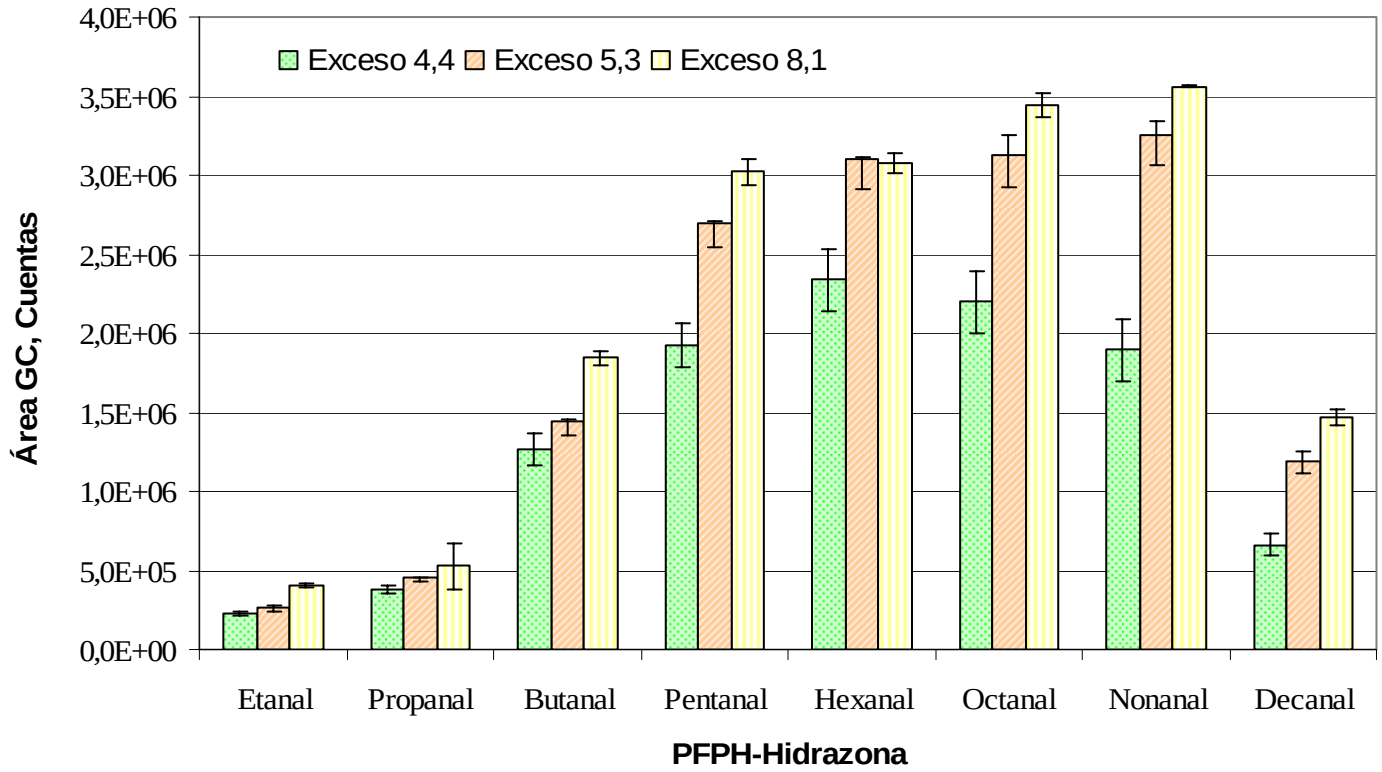


Figura 46. Efecto del exceso del agente derivatizante sobre la cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). HS-SPME; Solución acuosa de aldehídos (2 mL, 0.2 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 40 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

La reacción de aldehídos con PFPH, utilizando HS-SPME con derivatización *in situ*, se beneficia notoriamente cuando la relación nanomolar PFPH:aldehídos totales es 5.3 a 1, presentándose un incremento en la cantidad de los derivados totales obtenidos *ca*. del 30%. Sin embargo, con una cantidad adicional de PFPH (*e.g.,* exceso de 8.1), la variación en la cantidad de derivados generados es sólo del 10%. Aunque se favorece la reacción de derivatización, en este último caso, se extraen también contaminantes presentes en el reactivo derivatizante.

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir, que para el análisis de aldehídos en fase vapor podría aplicarse la metodología de HS-SPME con derivatización directa sobre la fibra, bajo condiciones tanto de equilibrio, como de no-equilibrio. En el primer caso, la fibra previamente saturada con PFPH (2 mL, 2.4 mM, 6 min), debe exponerse a los vapores de los aldehídos durante tiempos mayores de 60 min. Mientras que bajo condiciones de no-equilibrio, el proceso puede reducirse a tiempos más cortos, *i.e.* entre 5-40 min. La temperatura de exposición de la fibra en todos los ensayos fue de 27 °C.

3.4.2.3 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular en matrices gaseosas simuladas. A continuación, se presentan los resultados de análisis de aldehídos volátiles por HS-SPME-GC/ECD, con derivación *in situ*, en función de diferentes parámetros.

3.4.2.3.1 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en el aire contenido en un recipiente de vidrio de 12 mL. Simulando una matriz gaseosa, el aire contenido en un recipiente de vidrio de 12 mL, se enriqueció con aldehídos volátiles, tal como se describe en la **Sección 2.5.2.3.1**. El análisis inicialmente incluyó el estudio del tiempo necesario para lograr una completa homogeneización de los analitos en el recipiente.

En la **Figura 47**, se presenta el perfil de formación de las PFPH-hidrazonas en función del tiempo de pre-equilibro. Como se aprecia, la distribución homogénea de los aldehídos en el recipiente, se alcanzó en 5 min. Una vez definido el tiempo de pre-equilibro, se procedió a estudiar la reacción de derivatización con el tiempo. Los resultados se ilustran en la **Figura 48**. Usando cantidades muy pequeñas de aldehídos (1.6 nmoles) en la fase gaseosa, su derivatización se puede llevar a cabo en segundos. Bajo las condiciones de trabajo (1 µL, solución de aldehídos en metanol 2 mmoles/L; 27 °C), la velocidad de reacción fue muy rápida al inicio; a los 30 seg, ya se había logrado un rendimiento del 54% respecto al alcanzado (100%) a los 240 seg. Estos resultados muestran que para el análisis de acetaldehído en aliento humano, la metodología desarrollada será adecuada, puesto que se requieren tiempos de muestreo muy cortos.

3.4.2.3.2 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en fase gaseosa, usando un dispositivo de headspace estático. La interacción de los analitos presentes en fase gaseosa con el recubrimiento polimérico de SPME, cargado previamente con PFPH (Véase **Sección 2.5.2.3.2**), fue estudiado bajo diferentes tiempos de pre-equilibro; los resultados se resumen en la **Figura 49**. Con un tiempo de "pre-equilibrio" de 120 min, bajo las condiciones de trabajo (solución acuosa de aldehídos, 100 mL, 4 µmoles/L c/u, 27 °C, 800 rpm), aún no se ha alcanzado el equilibrio de fases para algunos analitos, *i.e*. derivados de aldehídos con 8, 9 y 10 átomos de carbono. Sin embargo, tiempos de "pre-equilibrio" tan largos afectan notoriamente la eficiencia de extracción de los derivados de los aldehídos con 2-6 átomos de carbono, cuyas cantidades extraídas disminuyen notoriamente después de los 60 min. Aparentemente, por la volatilización; por ello, el tiempo de "pre-equilibrio" se fijó en 60 min.

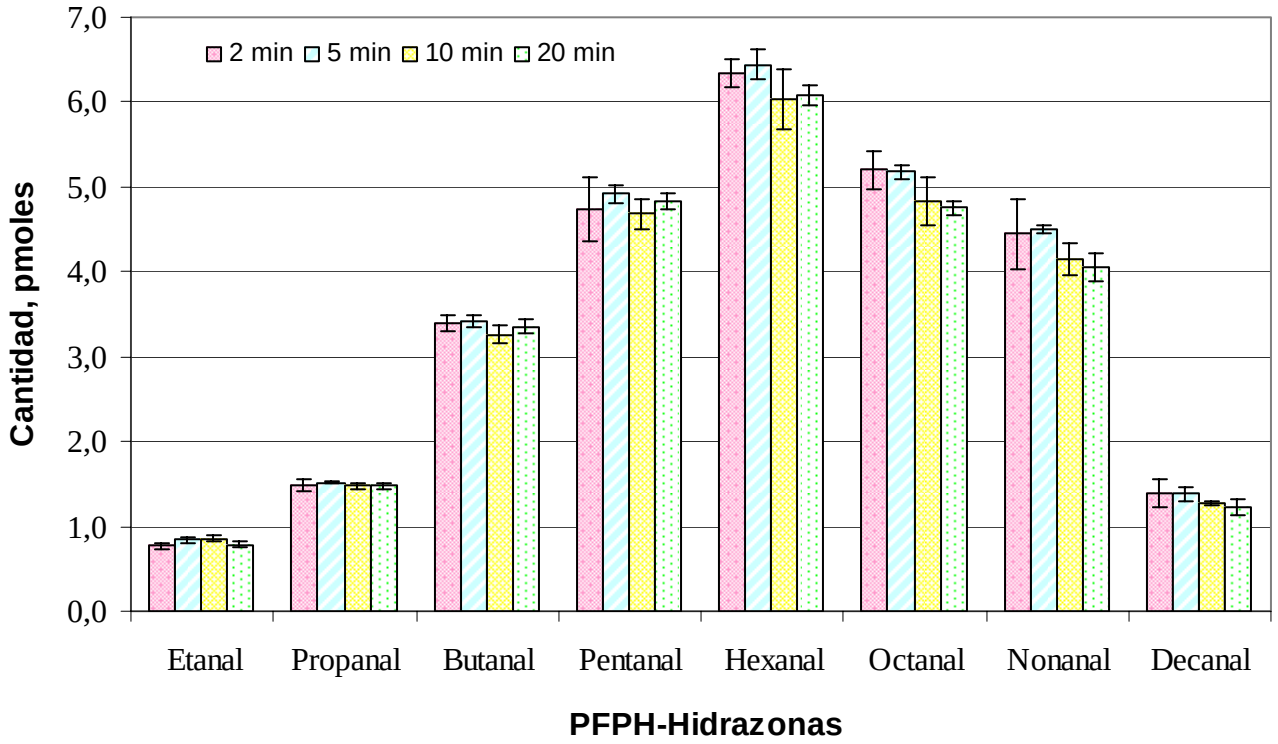


Figura 47. Efecto del tiempo de "pre-equilibrio" de la muestra (2, 5, 10 y 20 min) sobre la cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). HS-SPME; Solución de aldehídos patrón en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 5 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

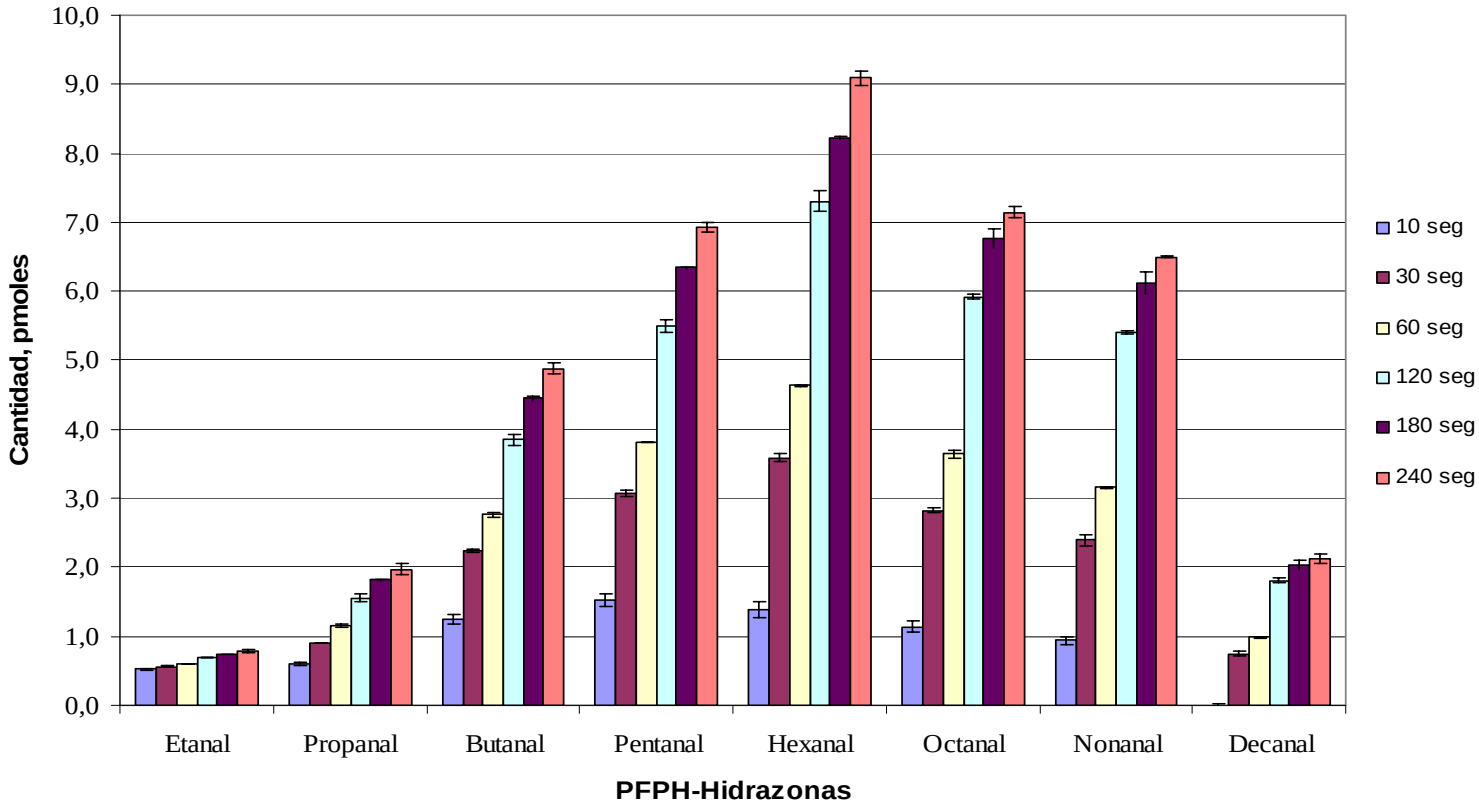


Figura 48. Cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm), en función del tiempo de exposición de la fibra saturada previamente con PFPH (2 mL, 2.4 mmoles/L, 3 min). HS-SPME; Solución de aldehídos patrón en MeOH (1 µL, 2 mmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de pre-equilibrio: 5 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

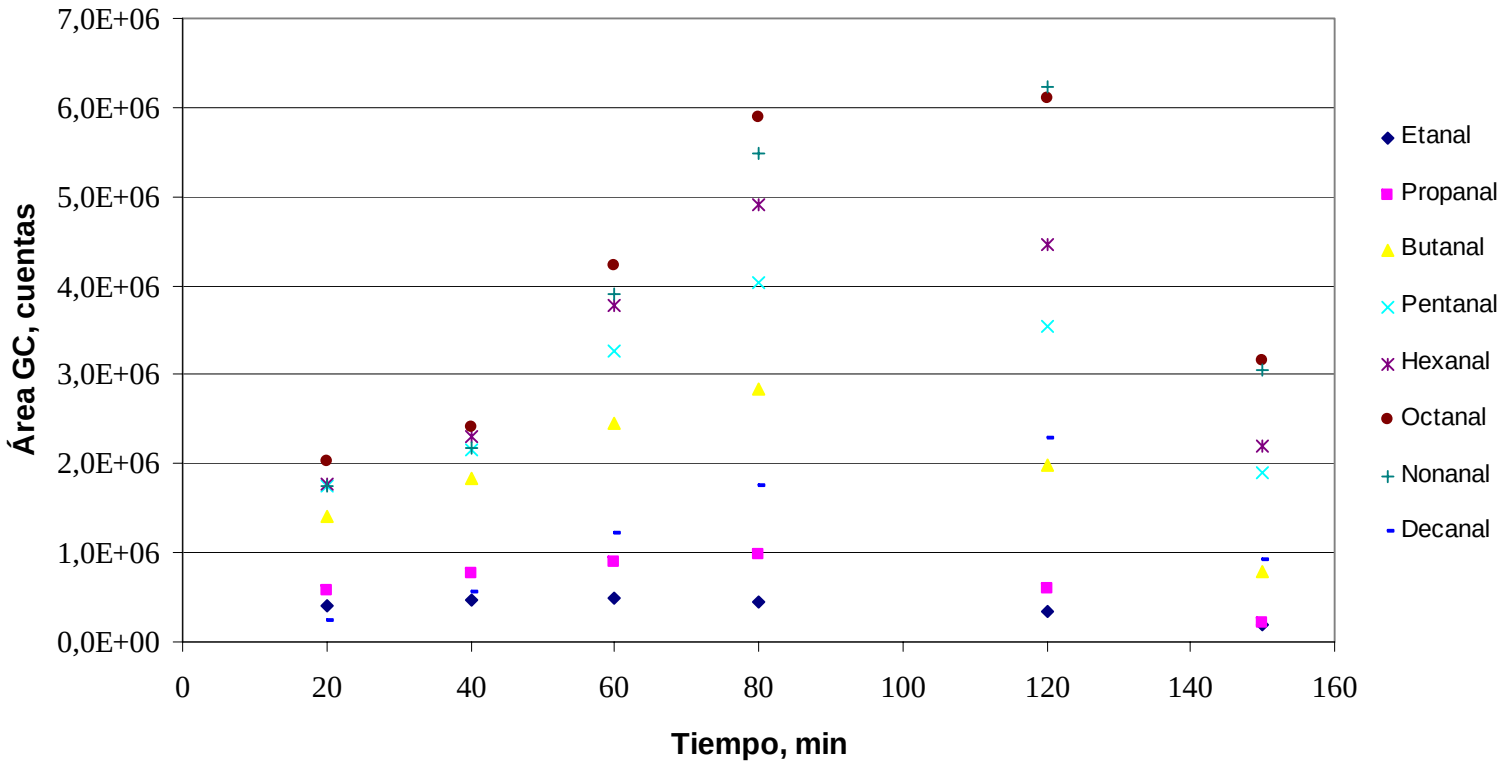


Figura 49. Efecto del tiempo de "pre-equilibrio" sobre la cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). Sistema *HS-estático* (**Figura 22**); Solución estándar de aldehídos (100 mL, 4 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de exposición de la fibra: 30 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

En la **Figura 50**, se presenta el perfil de los derivados de PFPH obtenidos, en función del tiempo de exposición de la fibra a la fase gaseosa. Como se aprecia, después de 30 min (27 °C), los derivados de los aldehídos más pesados (C_8-C_{10}), tienden a alcanzar el equilibrio. Mientras que para los derivados más livianos, se observan pérdidas de los analitos precursores, con tiempos de exposición de la fibra mayores de 30 min. Por lo tanto, las reacciones de derivatización de aldehídos en fase gaseosa se llevaron a cabo durante 30 min.

3.4.2.4 Determinación de aldehídos de bajo peso molecular, en muestras de aire. El método de derivación de aldehídos con PFPH en fase gaseosa, fue evaluado usando la matriz de aire grado Cero, recolectado en bolsas *Tedlar*® y enriquecido con aldehídos, de acuerdo con la metodología descrita en la **Sección 2.5.2.4**. La **Tabla 28**, muestra la información correspondiente al estudio de la reproducibilidad de las áreas de los picos cromatográficos de los derivados PFPH-hidrazónicos, determinados en una muestra gaseosa de aldehídos (24 *pptv*) y su réplica; las condiciones de SPME se describen en la **Sección 2.5.2.4**. En general, se observó una reproducibilidad alta, con coeficientes de variación por debajo del 9%; los valores más altos se presentaron para propanal (5,9%), octanal (6,9%), nonanal (8,6%) y decanal (7,2%). Los analítos se cuantificaron, usando la curva de calibración construída con estándares gaseosos (**Sección 2.3.1.2**)

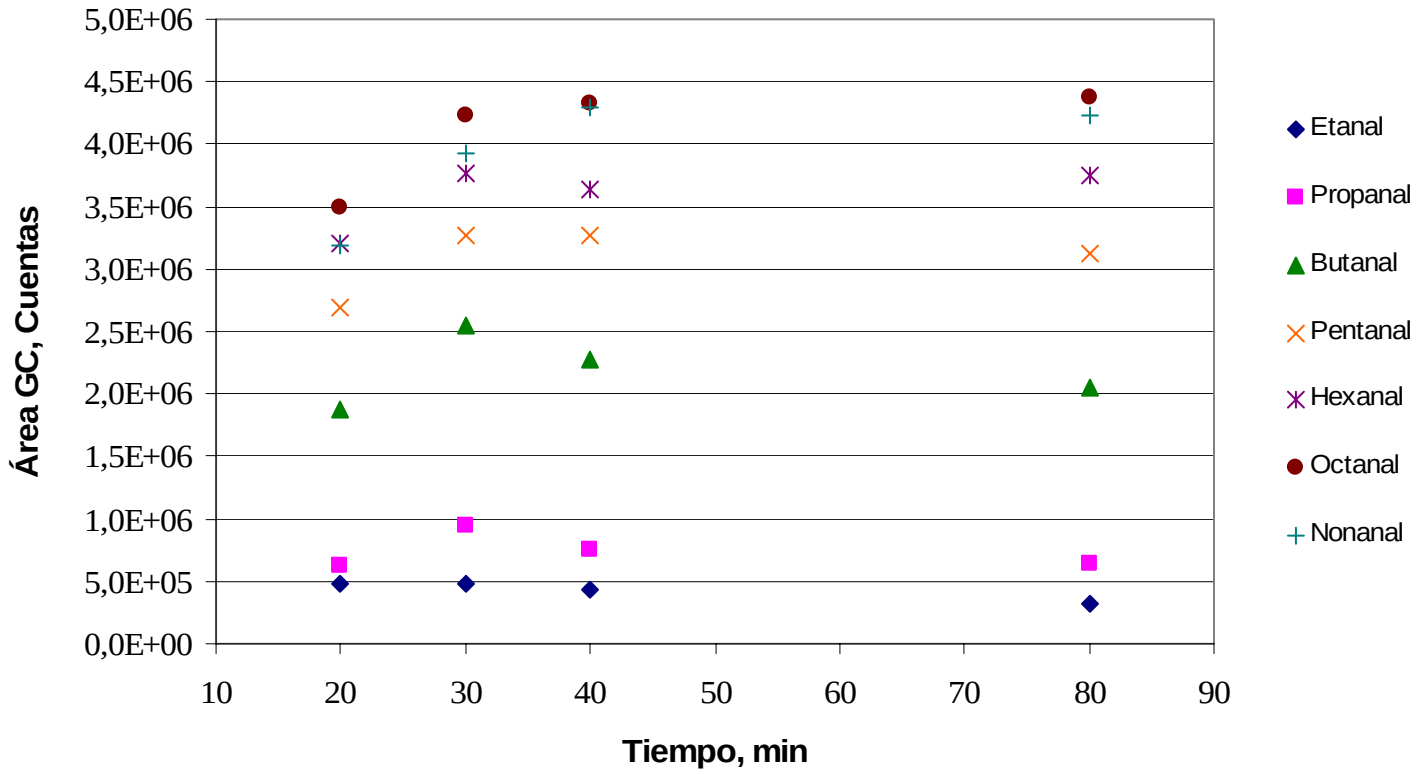


Figura 50. Cantidad de PFPH-hidrazonas obtenidas mediante derivatización *in situ* sobre la fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm), en función del tiempo de la exposición de la fibra. Sistema *HS-estático* (**Figura 22**); Solución estándar de aldehídos (100 mL, 4 µmoles/L c/u); Temperatura: 27 °C; Tiempo de pre-equilibrio: 60 min. GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (5 min).

Tabla 28. Reproducibilidad de las áreas cromatográficas de los aldehídos (C_2-C_6, C_8-C_{10}), analizados en forma de sus derivados PFPH-hidrazónicos, a partir de soluciones gaseosas (24 *pptv*) contenidas en bolsas *Tedlar*® y almacenadas a temperatura ambiente (27°C) durante 30 min. HS-SPME-GC/ECD. Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Aldehído	Área, cuentas		Promedio de áreas	s (n=2)	*CV*,%
	Muestra 1	Muestra 2			
Etanal	1,3E+06	1,4E+06	1,4E+06	2,1E+04	1,6
Propanal	1,7E+06	1,9E+06	1,8E+06	1,1E+05	5,9
Butanal	3,3E+06	3,4E+06	3,4E+06	7,1E+04	2,1
Pentanal	5,1E+06	5,3E+06	5,0E+06	1,1E+05	2,0
Hexanal	8,4E+06	8,1E+06	8,0E+06	2,1E+05	2,5
Octanal	1,2E+07	1,1E+07	1,2E+07	7,8E+05	6,9
Nonanal	1,5E+07	1,3E+07	1,4E+07	1,2E+06	8,6
Decanal	3,6E+06	3,3E+06	4,0E+06	2,5E+05	7,2

3.4.3 Determinación de compuestos carboxílicos de bajo peso molecular mediante derivatización con PFBBr en fase líquida, acompañada de la HS-SPME de los derivados

El objetivo de esta parte del trabajo, era establecer las condiciones de derivatización y de extracción más apropiadas para la cuantificación confiable de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, presentes en fase acuosa. Ello, a su vez, permitió determinar estos compuestos en fase gaseosa (aire del interior y tubos de escape de vehículos), después de su absorción en trampas líquidas.

El análisis de ácidos carboxílicos por GC, requiere columnas con fases estacionarias especiales o su derivatización. Para la conversión de los ácidos a sus respectivos ésteres se han utilizado diferentes reactivos, entre los cuales figuran BF_3/butanol (Kawamura K.,1993) y PFBBr (Chien C-J. *et al*., 1998). Para esta investigación, se escogió el PFBBr, debido a su similitud estructural con la PFPH, que ya se ensayó en trabajos previos (Stashenko E. E. *et al.*, 2000), para derivatizar compuestos carbonílicos y hacer su análisis GC/ECD, logrando LODs del orden de las fentomoles (*fmoles*).

El PFBBr ha sido utilizado por varios investigadores para la determinación de ácidos carboxílicos de cadena corta, en muestras de aire y de agua (Kawahara F.K., 1968; Brill J. H. *et al*., 1991). Con frecuencia, la derivatización se lleva a cabo en acetona, usando carbonato de potasio como catalizador (Kawahara F.K., 1968; Galceran M. T. *et al*., 1995).

Algunos autores han reportado el uso del éter corona 18-crown-6 (18c6), para acelerar la reacción de esterificación (Chien C-J. *et al*., 1998; Jang M. y Kames R., 1999). Los ácidos carboxílicos atrapados en agua pura, son extraídos con un solvente orgánico (*e.g*., acetona) o con mezcla de solventes (*e.g*., óxido de tri-*n*-octilfosfina, TOPO, en metil *ter*-butil éter, MTBE, al 5%). El extracto es acidificado (2 gotas de H_2SO_4), secado sobre Na_2SO_4, evaporado completamente en atmósfera de nitrógeno y redisuelto en acetona (1 mL). Luego, para obtener los ésteres, se adicionan 10 µL de PFBBr (10% en acetona), 50 µL de 18c6 (4000 ppm en acetona) y 10 mg de K_2CO_3 en polvo. La mezcla total se somete a sonicación (40 – 60 °C) por 2-3 h. Finalmente, los ésteres resultantes se analizan, según Chien C-J. *et al*. (1998), por GC/CI-IT-MS.

El uso del agente derivatizante, PFBBr, altamente fluorado, favorece la detección sensible de los derivados mediante la GC/ECD (Blau K. y Halket J. M., 1993), alcanzándose LODs, del orden de las *fmoles* (Stashenko E. E, 2000). Además,

cuando la derivación se combina con la SPME, tanto la sensibilidad, como la selectividad mejoran y se logran LODs aún más bajos (Stashenko E. E. y Martínez J. R., 2004). Por lo que, los equipos analíticos sofisticados y de poca disponibilidad, como GC-IT-MS con ionización química (CI) de iones negativos (NI), ya no son necesarios.

En el presente trabajo, se combinó la derivatización química de los ácidos carboxílicos con la SPME. Teniendo en cuenta que la extracción de los analitos desde una matriz orgánica resulta en este caso poco eficiente, pues durante la etapa de adsorción sobre la fibra, éstos pueden ser desplazados por las moléculas del solvente, la derivatización de los ácidos se llevó a cabo en solución acuosa, seguida de la extracción de los derivados por HS-SPME-GC/ECD.

En el presente trabajo, para la reacción de derivación sólo se usaron el carbonato de potasio K_2CO_2 (500 ppm en agua desionizada) y el agente derivatizante (PFBBr en acetona, 430 mM). El uso del K_2CO_2 tiene doble finalidad, a la vez que ioniza los ácidos en solución acuosa, actúa como catalizador en la reacción nucleofílica, la cual se realiza directamente en la matriz acuosa, sin necesidad de extraer los analitos con disolventes (*e.g*., acetona, TOPO, MTBE).

En la mayoría de los casos la reacción de derivatización ocurre en medio orgánico (Kawahara F. K., 1968; Sinkkonen S. *et al.*, 1995; Chien C-J. *et al*., 1998; Hanada Y. *et al*., 2002), sin embargo, el proceso transcurre también en medio acuoso (Brill, J. H. *et al*., 1991). Para la extracción de los ésteres de PFB, en este trabajo tampoco se utilizaron solventes orgánicos ni se aplicaron procesos de concentración bajo flujo de nitrógeno, comunes en otras metodologías; los analitos se aislaron mediante HS-SPME y se desorbieron térmicamente en el puerto de inyección del GC/ECD. A pesar de que los tiempos de reacción en fase acuosa son más largos, en comparación con el medio orgánico, en la metodología propuesta, se obvian las etapas de extracción de derivados y su concentración en

el extracto, -etapas, que consumen mucho tiempo,- por lo que el tiempo total requerido se redujo en un 50%. Adicionalmente, se evitan problemas de contaminación cruzada y pérdida de los analitos presentes a nivel de trazas.

Para establecer las mejores condiciones de análisis, se estudiaron los parámetros que gobiernan la reacción, en medio acuoso, de los ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr, y algunas variables que afectan el proceso de la HS-SPME de los ésteres de PFB.

3.4.3.1 Estudio de las variables que afectan la derivatización de ácidos carboxílicos con bromuro de pentaflúorbencilo (PFBBr) en medio acuoso. La derivatización de ácidos carboxílicos volátiles con PFBBr, en medio acuoso, se estudió en función de diferentes parámetros (Véase **Sección 2.5.3.1**). En las siguientes secciones se presentan los resultados obtenidos.

3.4.3.1.1 Efecto del pH. El pH es un parámetro importante que afecta fuertemente la reacción de los ácidos carboxílicos con PFBBr en medio acuoso; en primera instancia, puede darse la derivación de los compuestos carboxílicos, pero las reacciones de hidrólisis del agente derivatizante (PFBBr) o de los iones carboxilato, dependientes del pH, también pueden presentarse (Wittmann G. *et al.*, 2000). Esto es consistente con el mecanismo de la derivación de ácidos con PFBBr, el cual constituye una sustitución nucleofílica, en la que el Br^- de la molécula de PFBBr, es desplazado por el grupo carboxilato ($RCOO^-$), que actúa como nucleófilo. La concentración de los iones $RCOO^-$, se incrementa con el pH, lo que podría favorecer la formación de los ésteres de PFB; sin embargo, a valores de pH altos, también están presentes los iones OH^-, de esta forma, podría darse una competencia entre los iones OH^- y $RCOO^-$ y, como resultado, la hidrólisis del PFB-Br (predominantemente, S_{N2}) y/o de los ésteres formados (hidrólisis

irreversible bajo condiciones básicas), en lugar de la esterificación del ácido (Wittmann G. *et al.*, 2000; Pan L. y Pawliszyn J., 1997). Por ello, fue necesario encontrar el valor de pH apropiado, para desplazar la reacción hacia la formación de los ésteres de PFB. La reacción de derivación de los ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con el PFBBr, se llevó a cabo, bajo los parámetros descritos en la **Sección 2.5.3.1.1**; los productos fueron extraídos mediante HS-SPME, usando una fibra de SPME con recubrimiento de PA (**Secciones 2.2.2** y **2.3.2**). Los perfiles cromatográficos de los productos se presentan en el **Anexo 11-1** (**Figuras 1- 4**).

Con el fin de establecer el valor de pH más adecuado, para la derivatización de los ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr, la reacción se llevó a cabo a pH 3, 6, 7 y 8. Los resultados se registran en la **Tabla 1** del **Anexo 12-1** y aparecen también en la **Figura 51**. A pH 3 y 8, los ésteres de PFB se forman en baja proporción, mientras que a pH 6 y 7, la reacción avanza, observándose la máxima producción de los derivados a pH 6. Bajo condiciones ácidas (pH 3), existe muy poca cantidad de iones $RCOO^-$ para llevar a cabo la reacción de derivatización. A pH 8, la concentración de iones OH^-, favorece la hidrólisis del PFBBr y de los ésteres de PFB, lo cual resulta en una marcada disminución de las cantidades de derivados de ácidos formados, sobretodo, para los de los ácidos C_4 - C_6 y benzoico.

A pH 6 y 7, se aumentaron las cantidades de ésteres sintetizadas, aparentemente, se incrementó la cantidad de los iones RCOO-, disociados a partir de la forma neutra, con su mayor producción a pH 6. Con base en estos resultados, fue escogido un pH de 6, para la derivatización de los ácidos acético (pK_a 4.74), propanoico (pK_a 4.88), butanoico (pK_a 4.81), pentanoico (pK_a 4.82), hexanoico (pK_a 4.85) y benzoico (pK_a 4.19).

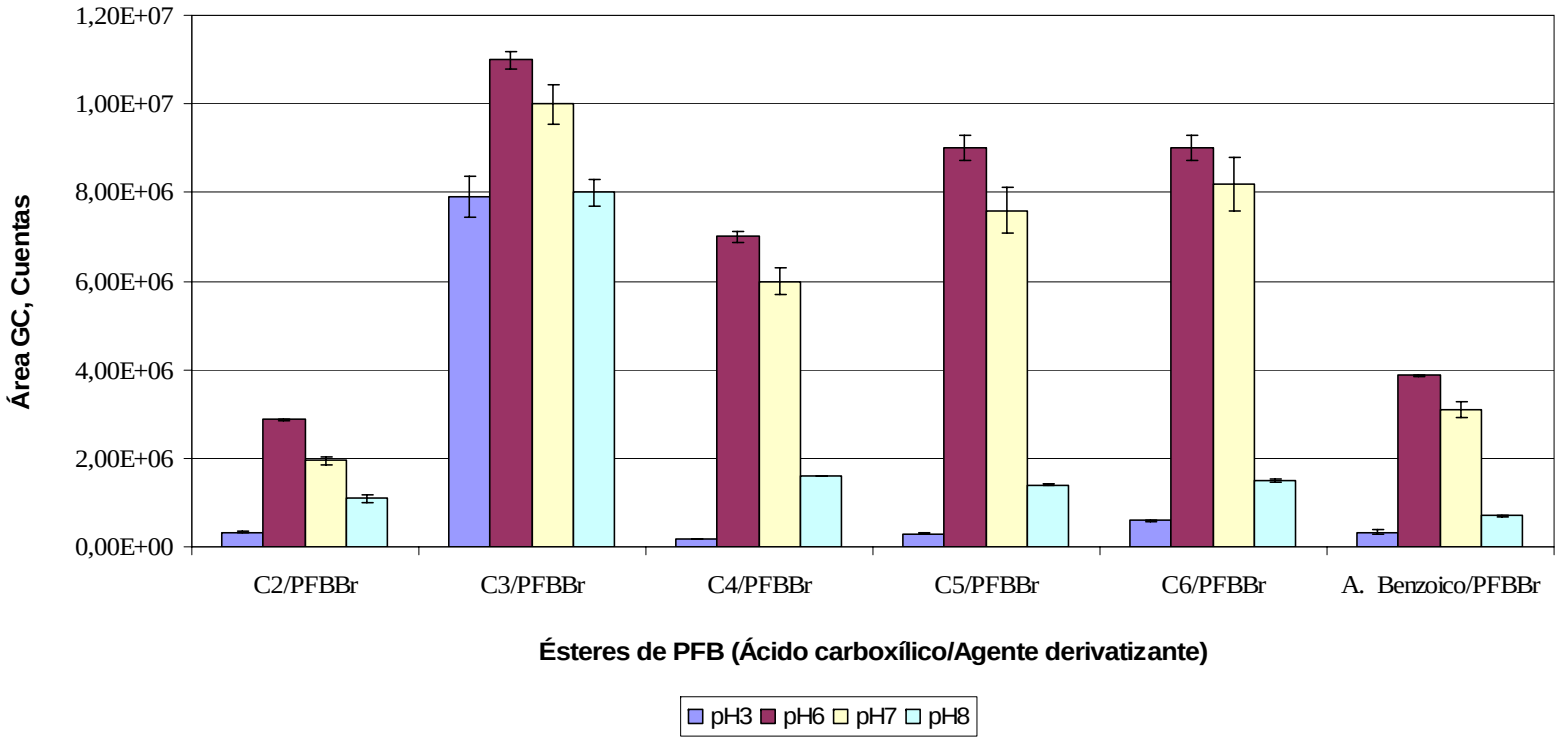


Figura 51. Efecto del pH sobre la eficiencia de la derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos C_2-C_6 y benzoico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm).

Pan L. y Pawliszyn J. (1997), establecieron un pH de 5.5, para la derivatización de los ácidos butanoico y pentanoico, con PFBBr, en medio acuoso. Los autores obtuvieron mayores cantidades de los ésteres de PFB a pH 5.5, seguidos de los rendimientos obtenidos a pH 7; las cantidades más bajas se obtuvieron en condiciones ácidas (pH 4) y en medio muy básico (pH 8 y 10), donde prácticamente, no ocurrió la reacción. Nilsson T. y colaboradores (1998) encontraron que la derivatización de herbicidas fenoxiacídicos (pK_a 3.17) con bromuro de bencilo, es más eficiente a pH 7.4; mientras que, Wittmann G. y colaboradores (2000), obtuvieron mayores rendimientos a pH de 7, para la reacción del ácido acético con el mismo agente derivatizante. En este último caso, los autores no encontraron cambios significativos en el rango de pH (6-8), durante los primeros 150 min de la reacción. Sin embargo, durante los 100 min siguientes, se observaron mayores rendimientos a pH 7, con una ligera disminución a los pH 6 y 8.

3.4.3.1.2 Tiempo de reacción. Para escoger correctamente el tiempo de reacción, se llevaron a cabo diferentes procesos de derivatización, evaluando tiempos desde 1 h hasta 5 h (**Sección 2.5.3.1.2**), al final de los cuales, los ésteres de PFB, fueron analizados mediante HS-SPME-GC/ECD. Los perfiles cromatográficos y las áreas correspondientes a cada derivado, se presentan en los **Anexos 11-2 (Figuras 1-5)** y **12-2**, respectivamente. Con base en los resultados obtenidos se escogió el tiempo de reacción de 4 h (60 °C), para obtener rendimientos más altos (Véase **Figura 52**). A tiempos de reacción más largos (5 h), las áreas cromatográficas, correspondientes a los derivados de los ácidos con 3, 4, 5 y 6 átomos de carbono, tienden a incrementarse; sin embargo, las de los ésteres de los ácidos acético y benzoico, decrecen en un 4 y 15 %, respectivamente. Teniendo en cuenta estas observaciones, el tiempo para derivatizar la mezcla acuosa de ácidos carboxílicos, C_2-C_6 y benzoico, con PFBBr, se fijó en 4 h.

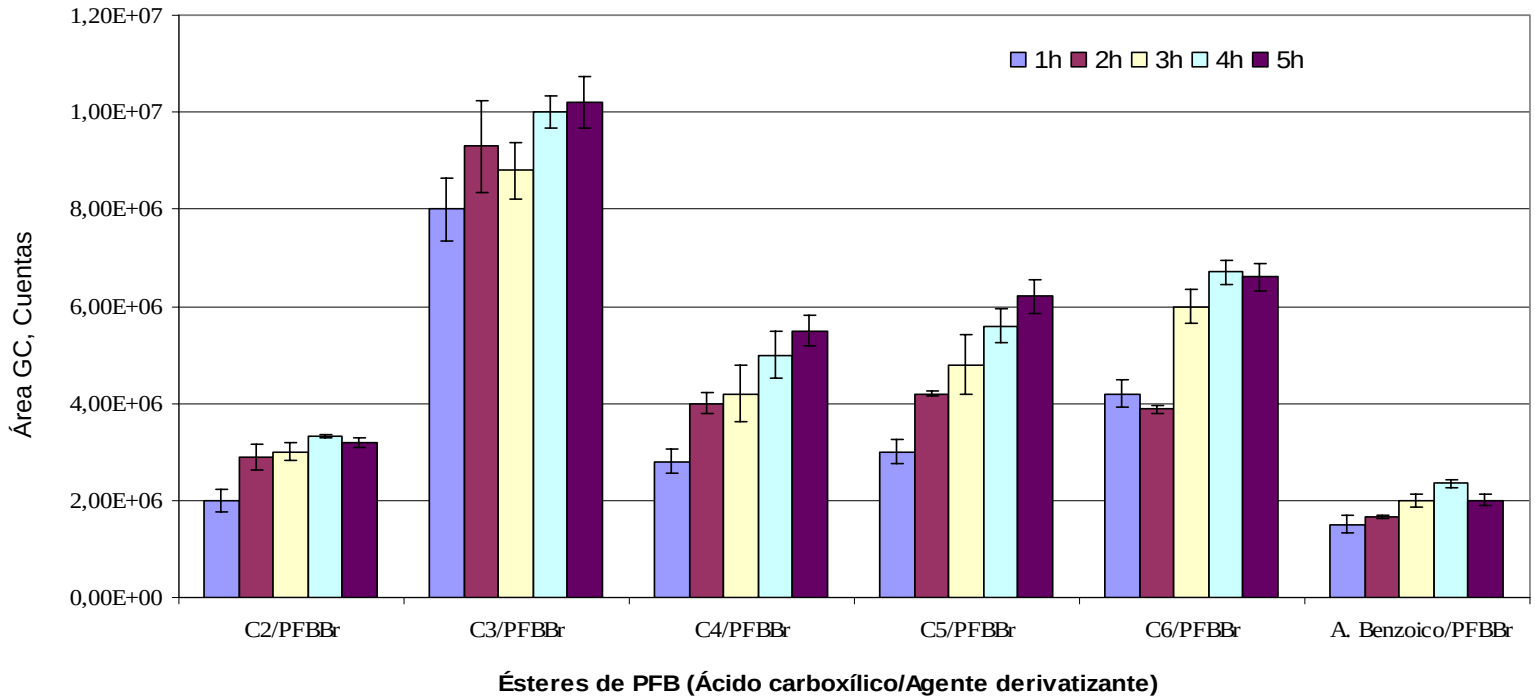


Figura 52. Efecto del tiempo de reacción de ácidos carboxílicos, C_2-C_6 y benzoico (10 mL; 44 µmoles/L c/u, fase acuosa) sobre el rendimiento de derivados. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm).

Pan L. y Pawliszyn J. (1997), establecieron un tiempo de 2 h, para la derivatización con PFBBr, de los ácidos butanoico (0.57 µmoles/L) y pentanoico (0.49 µmoles/L), en medio acuoso. Chien C-J. y colaboradores (1998), por su parte, llevaron a cabo la derivatización de los ácidos carboxílicos con PFBBr (10%) en acetona, utilizando K_2CO_3 y éter corona, como catalizadores, a 40-60 °C, usando sonicación y un tiempo de reacción de 2-3 h.

3.4.3.1.3 Temperatura de reacción. Un factor importante en las reacciones orgánicas es la temperatura; la velocidad de reacción puede verse favorecida con su incremento, tal como se observa en la **Figura 53**, para la derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr, en medio acuoso. Cuando la reacción procede en medio orgánico (*e.g.,* acetona, hexano), normalmente se utiliza reflujo a 60 °C (Kawahara F. K., 1968). Sin embargo, algunos autores (Chien C-J. *et al.*, 1998; Garcelan M. T. *et al.* 1995), han reportado temperaturas entre 40 y 60 °C, para la esterificación en medio orgánico (acetona), pero bajo sonicación. Pan L. y Pawliszyn J. (1997), por su parte, reportaron una temperatura de 55 °C, para la derivatización de los ácidos carboxílicos (C_2-C_5) con PFBBr, en medio acuoso.

En el presente trabajo, el proceso de derivatización de los ácidos carboxílicos con PFBBr, en medio acuoso, se llevó a cabo a temperaturas diferentes, a saber: 60, 70 y 80 °C (**Sección 2.5.3.1.3**). Los perfiles cromatográficos de los productos obtenidos a diferentes temperaturas se presentan en el **Anexo 11-3** (**Figura 1-3**); las respuestas del ECD (áreas de los picos) para los diferentes ésteres de PFB se registran en la **Tabla 1** del **Anexo 12-3** y se ilustran en la **Figura 53**. Con el aumento de la temperatura se incrementan las áreas cromatográficas de los derivados de PFB, indicando que la velocidad de reacción aumenta a temperaturas $\geq$ 60 °C. Al pasar de 60 a 70 °C, la producción de los derivados totales (Σ áreas cromatográficas) aumentó el 10.8%; el incremento de la

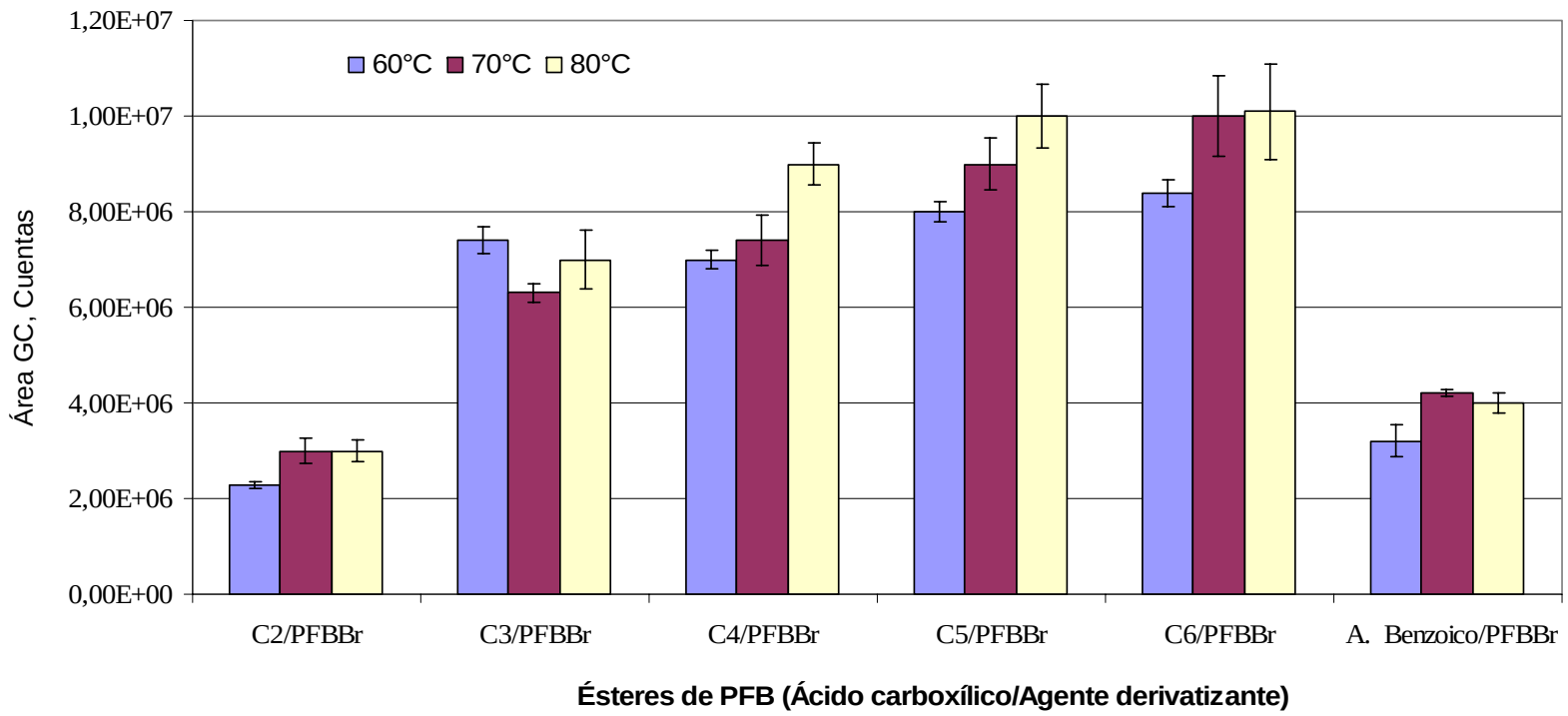


Figura 53. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos C_2-C_6 y benzoico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm).

temperatura de 70 a 80 °C, correspondió al aumento de la producción de derivados en un 7.2%. A temperaturas de 70 y 80 °C, los corredores de error para las áreas de los derivados de PFB, resultaron más amplios, excepto para el derivado del ácido benzoico.

A temperaturas mayores, se observa la volatización de derivados de ácidos más livianos. Teniendo en cuenta todo ésto, la derivatización de los ácidos C_2-C_6 y benzoico, se llevó a cabo a 60 °C.

3.4.3.1.4 Concentración del agente derivatizante. En la mayoría de los casos, las reacciones de derivatización se llevan a cabo con un exceso de reactivo derivatizante. Pan L. y Pawliszyn J. (1997) encontraron que al cambiar el exceso de PFBBr de 10 a 94, las cantidades de los derivados de los ácidos butanoico (0.57 µmoles/L) y pentanoico (0.49 µmoles/L), obtenidos en medio acuoso, se incrementan 10 veces. Cuando el exceso es de 142, no se observan cambios en el rendimiento, pero sí se presenta la elevación en la línea base del cromatograma, y se registran interferencias, que dificultan la cuantificación de los derivados de los ácidos más livianos (C_1- C_3).

Con el fin de encontrar la cantidad más apropiada de agente derivatizante (PFBBr), para llevar a cabo la esterificación de los ácidos carboxílicos (C_2- C_6 y benzoico, 40 µmoles/L) en medio acuoso, el proceso se repitió adicionando el reactivo en proporciones estequiométricas diferentes (Véase **Tabla 29**), tal como se describe en la **Sección 2.5.3.1.4**. Los derivados obtenidos en cada caso fueron analizados mediante HS-SPME-GC/ECD (Véase **Anexo 11- 4**, **Figuras 1-5**); las áreas cromatográficas correspondientes a cada éster de PFB, se graficaron en función del exceso de PFBBr (**Figura 54**).

Tabla 29. Relación µmolar de reactantes en la derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr. Volumen de reacción: 10 mL.

µmoles de ácidos*	µmoles de PFBBr	Relación PFBBr/ácidos
2.4	10.8	4
2.4	14.0	6
2.4	17.2	7
2.4	21.5	9
2.4	32.3	13

* Σ µmoles de ácido (C_2-C_6 y benzoico).

Como se aprecia, al adicionar mayor cantidad de PFBBr en el medio de reacción, el área cromatográfica asociada con cada uno de los derivados se incrementa (**Anexo 12- 4**, **Tabla 1**), lo cual es más notorio cuando el exceso de reactivo es de 9 y de 13; paralelamente, el nivel de ruido aumenta (**Anexo 11- 4**, **Figura 5**), principalmente, en el último caso. Por otra parte, el reactivo de derivatización (PFBBr), posee trazas de los ésteres de PFB, derivados de los ácidos acético y propanoico, que interfieren en la cantidad de los respectivos derivados, cuando se utiliza un exceso de PFBBr ≥ 13. Cuando la relación agente derivatizante:ácido es de 43 (ensayos preliminares), se observa una fuerte interferencia en el análisis del derivado del ácido acético, pues la cantidad excesiva de PFBBr genera un pico cromatográfico tan ancho, que éste se solapa con el respectivo derivado C_2, ésto coincide también con las observaciones hechas por Pan L. y Pawliszyn J. (1997).

Con base en los resultados obtenidos, se optó por realizar la esterificación de los ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico), adicionando el agente derivatizante (PFBBr), con un exceso estequiométrico de 9.

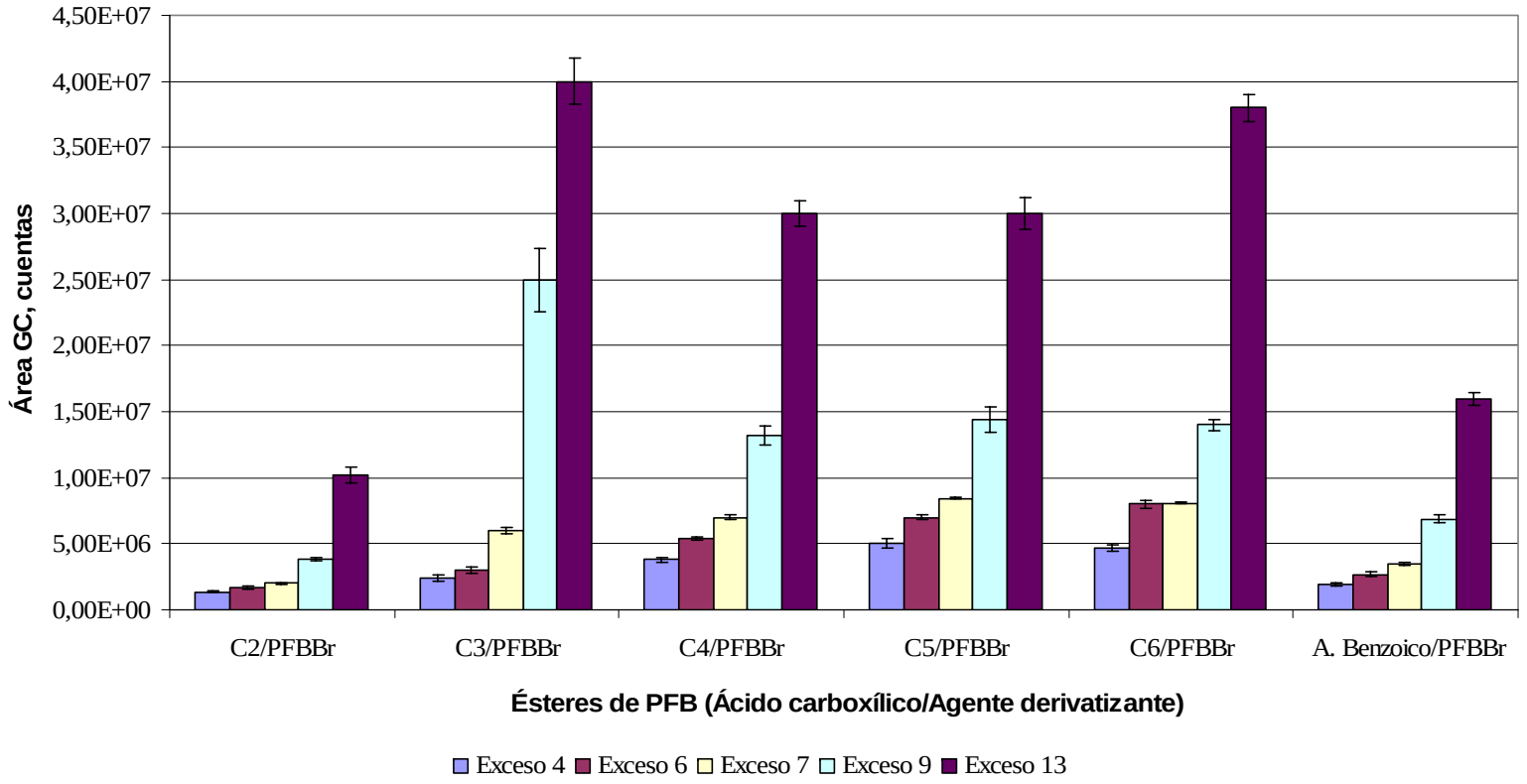


Figura 54. Efecto de la cantidad del agente derivatizante sobre la eficiencia de la derivatización con PFBBr de ácidos carboxílicos C_2-C_6 y benzoico (10 mL; 44 µmoles/L de c/u, fase acuosa). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m).

En los procedimientos de derivatización de ácidos con PFBBr en medio orgánico (acetona), las respuestas cromatográficas de las impurezas son más altas que las de los compuestos de interés, por lo que se requiere realizar una dilución o purificación del extracto, o disminuir el exceso de agente derivatizante hasta donde sea posible. Boucharat C. y colaboradores (1998) aplicaron un lavado con agua, seguido de la dilución (100 veces) del extracto en medio orgánico, para disminuir la presencia de interferencias en el análisis cromatográfico, pero el proceso no resultó reproducible y el límite de detección después de la dilución no fue satisfactorio. También probaron la purificación, usando la extracción en fase sólida, en este caso, el paso de dilución también fue necesario.

Bajo las condiciones operacionales (PFBBr:ácidos = 9:1; pH 6; 60 °C; 4 h), establecidas en el presente trabajo, los productos de la reacción, no se sometieron a ningún procedimiento posterior de limpieza o dilución, previo el análisis por GC/ECD. Todos los experimentos de derivatización, fueron acompañados de los análisis de los respectivos blancos (agua deionizada desprovista de ácidos), previa determinación de los derivados de los ácidos acético y propanoico por GC/ECD.

3.4.3.2 Estudio de las variables que afectan el proceso de HS-SPME de ésteres de pentaflúorbencilo (PFB) en solución acuosa. La eficiencia del proceso de SPME depende de una serie de variables experimentales (tiempo y temperatura de extracción, pH, agitación y salinidad de la muestra, recubrimiento polimérico, etc.), que pueden ser modificadas para incrementar el rendimiento de la extracción de los analitos (Pawliszyn J., 1997; 1999). En este sentido, el objetivo de esta parte del trabajo, fue establecer las condiciones más apropiadas para la SPME de los ésteres de PFB, obtenidos en medio acuoso por derivatización de los ácidos C_2-C_6 y benzoico con PFBBr, seguida de su

cuantificación por GC/ECD (**Secciones 2.5.3.1** y **3.4.3.1**). Como variables de estudio se escogieron el pH y la salinidad de la muestra, así como el tiempo y la temperatura de extracción. Los parámetros fijos fueron el recubrimiento polimérico (PA, d_f = 80 µm), la agitación magnética de la muestra (800 rpm) y la concentración de los analitos (40 µmoles/L, c/u). La metodología, que se llevó a cabo, se describe en la **Sección 2.5.3.2**.

La selección del recubrimiento de la fibra se basa principalmente en el principio: "lo semejante disuelve lo semejante", así los analitos no polares tendrán mayor afinidad con la fase apolar de PDMS; mientras que la fibra de PA, más polar, se usa para la extracción de compuestos polares (*e.g.,* fenoles, ácidos, ésteres) (Pawliszyn J., 1997; 1999; Theodoridis G. *et al*, 2000). Las fibras, cuyos recubrimientos combinan más de un polímero, por ejemplo, las de PDMS/DVB o CW/DVB, son más adecuadas para la determinación de analitos volátiles ya que a diferencia de la fibra de PDMS, la principal interacción entre el recubrimiento sólido y los analitos se produce por el proceso de adsorción (Theodoridis G. *et al*, 2000). El rendimiento de extracción de estas fibras, es más alto que el obtenido con las fibras de PDMS, pero los tiempos de uso útil de los recubrimientos son muy cortos (Theodoridis G. *et al*, 2000). Considerando estos aspectos y teniendo en cuenta la experiencia de otros investigadores para la HS-SPME de ésteres de PFB (Pan L. y Pawliszyn J., 1997) y acetato de bencilo (Wittmann G. *et al*., 2000), se escogió la fibra de SPME con recubrimiento poli(acrilato), PA, (d_f = 85 µm), para realizar la extracción de los ésteres de PFB presentes en medio acuoso (derivados de los ácidos carboxílicos, C_2-C_6 y benzoico).

La agitación de la muestra (*e.g.,* magnética, asistida por ultrasonido, con vibración de la fibra, etc.), es un parámetro que incrementa la difusión de los analitos desde la matriz a la fibra o al espacio de cabeza, por lo que se disminuye el tiempo requerido para llegar al equilibrio (Pawliszyn J., 1997). En el presente trabajo, la

extracción de los ésteres de PFB en solución acuosa, se llevó a cabo bajo la agitación magnética, con una velocidad fija de 800 rpm; bajo estas condiciones, se forma un *vortex* homogéneo, bien definido, recomendado para este tipo de extracciones (Pawliszyn J., 1997).

3.4.3.2.1 Efecto del pH en la extracción. Una forma de aumentar la extracción de algunos compuestos sobre el recubrimiento polimérico de la fibra, es ajustar el pH de la muestra a valores que favorezcan la presencia del analito en su forma neutra, no disociada (Peñalver A. *et al*, 1999).

Para examinar el efecto del pH sobre la eficiencia de la extracción de los analitos (ésteres de PFB), el proceso de HS-SPME se aplicó a muestras con diferentes valores de pH (3, 7 y 9), tal como se describe en la **Sección 2.5.3.2.1**. Los perfiles cromatográficos obtenidos en cada caso, se presentan en el **Anexo 13-1** (**Figuras 1-3**). Las respuestas del ECD (áreas de los picos) para los ésteres de PFB (**Tabla 1, Anexo 14-1**), expresadas en función del pH (**Figura 55**), ilustran un efecto favorable sobre la SPME a pH 7; cuando el pH se disminuye, se presenta un efecto negativo sobre la extracción para todos los analitos evaluados, notándose el decrecimiento de los derivados totales (Σ áreas cromatográficas) en un 38%. Cuando el pH se aumentó a 9, la eficiencia de la extracción también se disminuyó apreciablemente, en este caso, las áreas cromatográficas totales bajaron en un 51%. Los ésteres son moléculas neutras; pueden sufrir hidrólisis ácida o básica. Por ello, el pH seleccionado para la extracción de los ésteres de PFB fue 7.

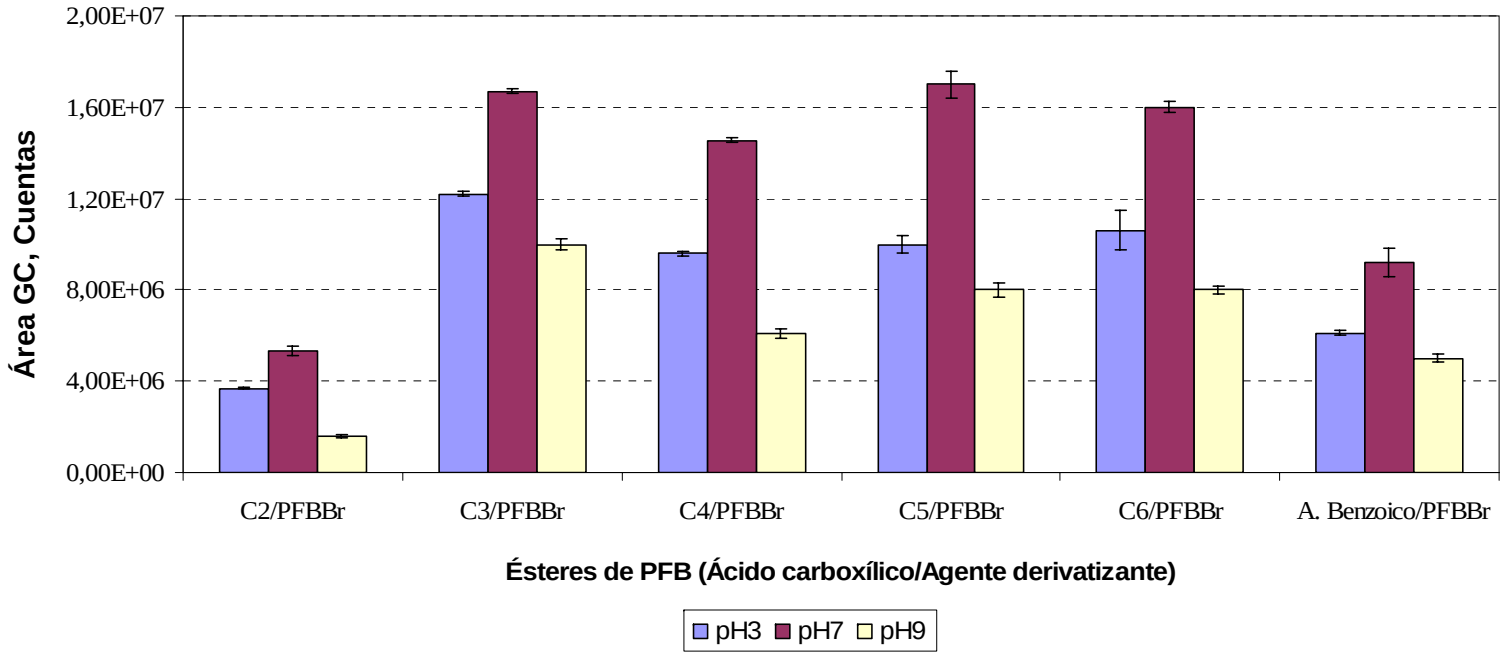


Figura 55. Efecto del pH sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 27 °C; 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

3.4.3.2.2 Efecto del tiempo de exposición de la fibra. Este parámetro, de gran importancia en la SPME, depende del coeficiente de partición del analito entre las fases (acuosa, vapor y recubrimiento polimérico) y de la agitación de la muestra (Prosen H. y Zupancic-Kralj L., 1999). Normalmente, se busca el tiempo de exposición de la fibra necesario para llegar al estado de equilibrio, donde la cantidad de analito extraída se mantiene constante, lo cual es característico para cada analito (Pawliszyn J., 1997). Por lo general, el tiempo de equilibrio es más corto para las extracciones, que se realizan en la fase de vapor; sin embargo, para algunos compuestos el tiempo de equilibrio, tanto en modo *headspace* como por inmersión, puede ser muy largo, por lo que, a menudo, se recomienda trabajar en condiciones de no-equilibrio, seleccionando tiempos de extracción más cortos, para no alargar el tiempo total de análisis (Pawliszyn J., 1997; Ai J., 1997; Bartelt R. J. y Zilkowski B.W., 1999), procurando no sacrificar la sensibilidad del método. En estos casos es muy importante mantener constante el tiempo de extracción, ya que pequeños cambios en su medida, pueden variar de forma considerable la cantidad de analitos extraídos (Pawliszyn J., 1997).

En este trabajo, se estudió la HS-SPME (recubrimiento de PA, 800 rpm, pH 7, 27 °C) de los ésteres de PFB, variando el tiempo de extracción de 20 a 80 min, de acuerdo con la metodología descrita en la **Sección 2.5.3.2.2**; los perfiles cromatográficos obtenidos, se presentan en el **Anexo 13-2** (**Figuras 1-5**). Las respuestas del ECD (áreas cromatográficas) para los diferentes analitos en función del tiempo de exposición de la fibra (**Anexo 14-2**), se ilustran en la **Figura 56**. Según se observa, el equilibrio se alcanza a los 60 min, con tiempos de exposición de 80 min, las áreas cromatográficas de los derivados bajo estudio (excepto la del ácido benzoico) empiezan a disminuir, probablemente, debido a la desorción de los ésteres retenidos sobre el recubrimiento de la fibra por los procesos competitivos de adsorción de analitos con diferentes constantes de distribución. Con base en estas observaciones, se optó por trabajar bajo

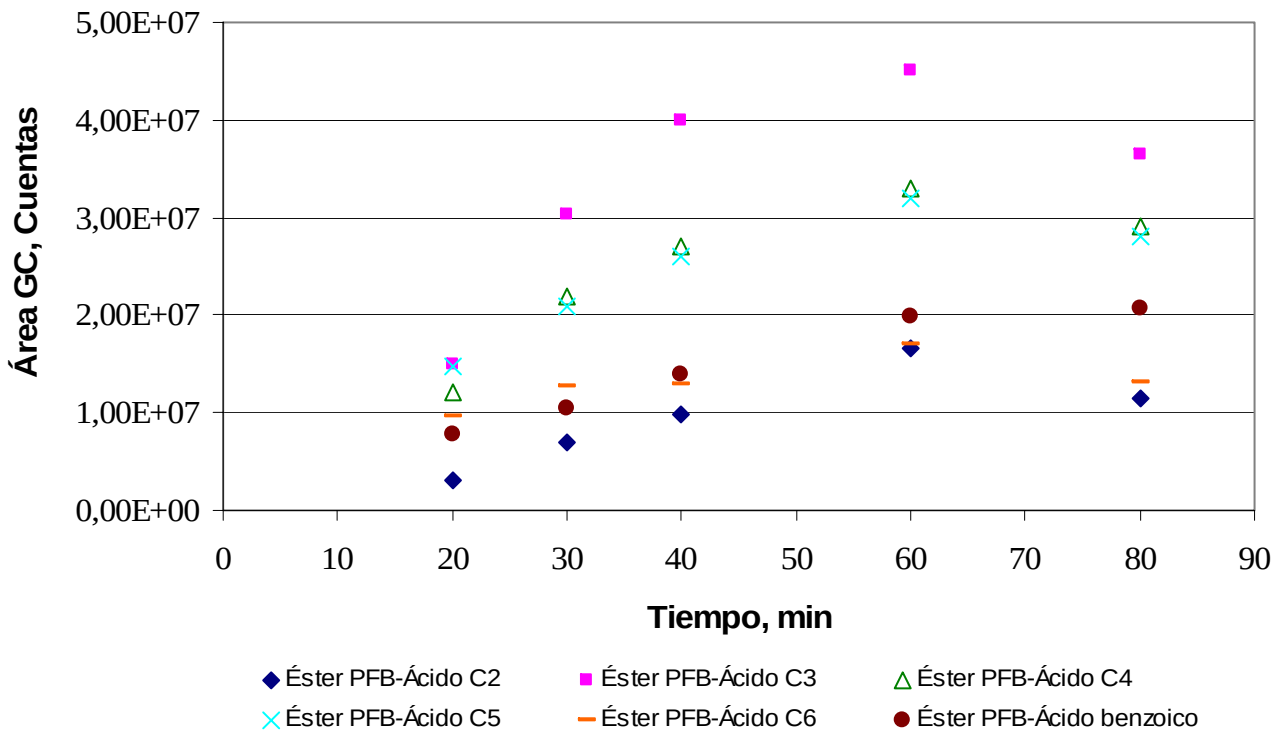


Figura 56. Efecto del tiempo de exposición de la fibra sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 27 °C; 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD, Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

condiciones de no-equilibrio, fijando el tiempo de extracción en 40 min, tiempo razonable para llevar a cabo el análisis de varias muestras por día.

3.4.3.2.3 Efecto salting-out. La adición de una sal puede aumentar la recuperación de los analitos, sobre todo, cuando se utilizan los métodos de extracción convencionales (*e.g*., LLE, SPE). Esto se debe a que la solubilidad en agua de muchos compuestos orgánicos disminuye en presencia de un exceso de sal. Este fenómeno también ha sido observado cuando se adiciona una base, usualmente NaOH, a la muestra líquida, antes del proceso de SPME; como consecuencia, la cantidad de analitos retenidos sobre la fibra de SPME se incrementa (Zhang Z. y Pawliszyn J., 1995). Sin embargo, el efecto contrario también puede presentarse, especialmente, cuando las solubilidades de los analitos no cambian o cuando el proceso de lleva a cabo en modo de inmersión (Lambropoulou D. A. *et al.*, 2000).

En la presente investigación, el efecto de la adición de sal sobre la eficiencia de la HS-SPME, se evaluó adicionando cloruro de sodio [10, 20 ó 30 % (p/v)], a la solución de extracción (pH 7). Los ésteres de PFB extraídos fueron analizados por GC/ECD (**Sección 2.5.3.2.3**). Los perfiles cromatográficos obtenidos se presentan en el **Anexo 13-3** (**Figuras 1- 4**). Las áreas cromatográficas **(Anexo 14-3**) expresadas en función de la cantidad de sal agregada a la muestra (%, p/v), indican un aumento inicial de la cantidad de analitos extraídos con el incremento de sal en el medio, alcanzándose un máximo cuando se adicionan 400 mg de NaCl (20% p/v), **Figura 57**. Luego, se observa una disminución de los derivados retenidos sobre la fibra, cuando la cantidad de la sal en la muestra aumenta hasta el 30% (p/v), excepto para el derivado del ácido acético. Este mismo comportamiento ha sido observado por otros investigadores, que estudiaron el proceso de la SPME de pesticidas (Yang K. *et al*., 1999) y barbituratos (Hall B. J. y Brodbelt J.S., 1997).

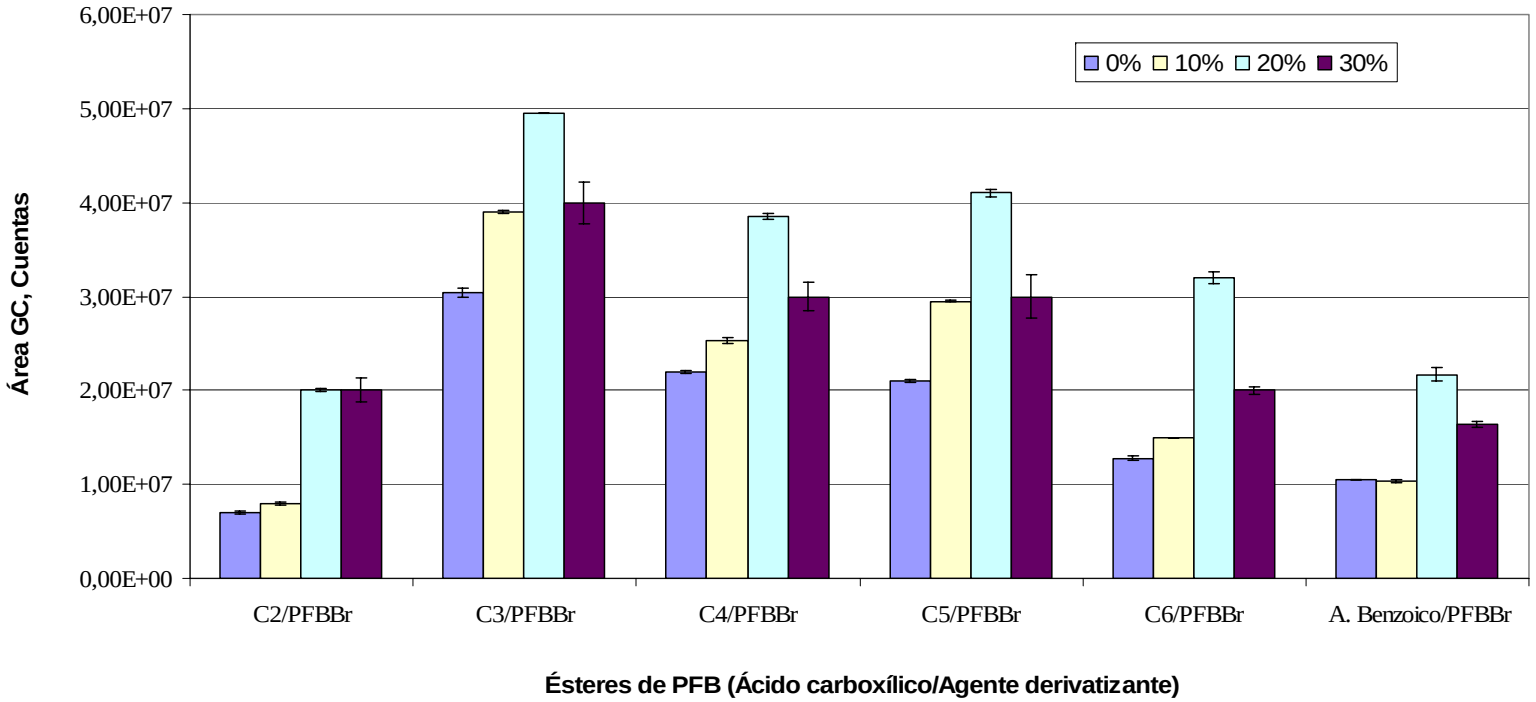


Figura 57. Efecto de la adición de la sal, NaCl, sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 27 °C; 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

En la primera fase, donde la recuperación de los ésteres de PFB se ve favorecida por la adición de sal (NaCl, 10 y 20% p/v), las moléculas de agua forman esferas de hidratación alrededor de las estructuras iónicas de NaCl, por lo que la cantidad de agua disponible para solvatar los analitos disminuye, como consecuencia, éstos son desplazados hacia la fase de extracción (Boyd-Boland A. A. y Pawliszyn J., 1995). En competencia con este fenómeno, a mayores concentraciones de sal, pueden presentarse interacciones electrostáticas entre los analitos de interés y los iones de la sal, reduciéndose así su capacidad para moverse hacia la fase de extracción, especialmente, cuando se trabaja con compuestos de naturaleza polar (Lord H. y Pawliszyn J., 2000); ello disminuye notablemente el rendimiento de la extracción. En el presente trabajo, se observó una disminución en las cantidades de los ésteres de PFB extraídos, con la adición de NaCl en concentración de 30% (p/v), lo que puede ser consecuencia de los procesos descritos anteriormente.

Con base en los resultados obtenidos, los procesos de la SPME de ésteres en medio acuoso, se llevaron a cabo, agregando NaCl en concentración de 20% (p/v).

3.4.3.2.4 Efecto de la temperatura. El efecto de la temperatura sobre la HS-SPME de los ésteres de PFB, fue estudiado a 30, 40 y 60 °C (**Anexos 13- 4** y **14- 4**). La temperatura más alta (60 °C) favoreció la extracción de los derivados de ácidos (**Figura 58**). A mayores temperaturas, se incrementa la cantidad de los analitos en el espacio de cabeza, por lo que la extracción sucede más rápidamente (Pawliszyn J., 1997); pero, paralelamente a ello, también se aíslan las impurezas asociadas a las sales usadas para aumentar la fuerza iónica del medio (Stashenko E. E. *et al.*, 2000), y al mismo reactivo de derivatización,

fenómeno que se observó cuando la temperatura se varió desde 30 hasta 60 °C (Véase **Anexo 13- 4**). Por otra parte, el error de cuantificación de los ésteres, fue mayor a temperaturas más altas (**Figura 58)**. Teniendo en cuenta estos resultados, se optó por realizar todas las extracciones de los ésteres de PFB a 30 °C. El tiempo de extracción se estableció en 40 min, pH = 7, y se agregó la sal, NaCl (20%, p/v).

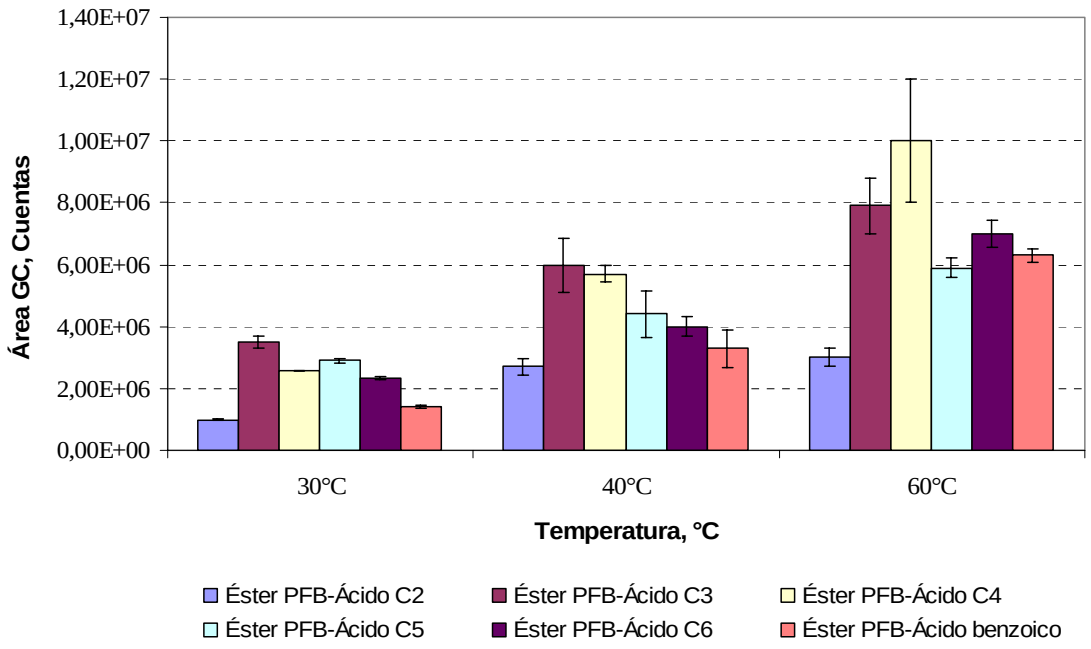


Figura 58. Efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la HS-SPME de ésteres de PFB (2 mL, *ca*. 44 µmoles/L, 800 rpm); Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción: 250 °C (10 min).

3.4.3.3 Determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular en muestras de aire. La derivatización de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) con PFBBr, en medio acuoso, y su extracción mediante HS-SPME, se empleó para el análisis de estos volátiles en fase gaseosa. La matriz gaseosa (2.5 L), enriquecida con ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) en concentración de 1.76 *ppmv* (c/u), fue analizada según el procedimiento descrito en la **Sección 2.5.3.3**. En la **Tabla 30**, se registran las cantidades de ésteres de PFB, detectadas en cada muestra, y en la **Tabla 31**, las respectivas recuperaciones (%).

Tabla 30. Determinación de ácidos carboxílicos, en forma de sus ésteres PFB, en aire sintético enriquecido. HS-SPME (PA, d_f = 80 µm).

Ácido	Muestra 1	Muestra 2	Promedio, *mg/m³*	s	*CV*, %
	mg/m³ (± s, n=2)				
Acético	3,55	3,90	3,7	0,2	6,5
Propanoico	5,21	5,10	5,16	0,08	1,5
Butanoico	6,35	6,37	6,36	0,01	0,2
Pentanoico	7,38	7,33	7,35	0,03	0,5
Hexanoico	7,31	7,46	7,4	0,1	1,4
Benzoico	0,54	0,60	0,57	0,04	7,4

Los resultados de la determinación de ácidos carboxílicos de bajo peso molecular (C_2-C_6 y benzoico) en fase gaseosa, muestran una buena reproducibilidad del método implementado. Los coeficientes de variación en las medidas (**Tabla 30**), fueron $<$ 2% para los derivados de los ácidos C_3-C_6; las variaciones mayores se presentaron para los ácidos acético y benzoico, cuyos *CV* estuvieron cercanos a 7%.

Los porcentajes de recuperación de los analitos de la muestra gaseosa (**Tabla 31**) alcanzaron valores alrededor del 90%, para los ácidos acético y hexanoico, y mayores al 99%, para los ácidos con 3, 4 y 5 átomos de carbono. La diferencia fue marcada para el ácido benzoico: su recuperación no excedió el 7%. Es posible, que el analito se pierda en la etapa de desorción desde la matriz gaseosa hacia la trampa acuosa de K_2CO_3, suposición, que se hace con base en las recuperaciones superiores al 92% (*CV*% < 10%) para todos los ácidos aislados de una matriz acuosa enriquecida (Véase **Tabla 32**).

Tabla 31. Recuperación (%) de ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico) desde la fase gaseosa enriquecida (1.76 *ppmv*, c/u ácido), después de su reacción con PFBBr en medio acuoso y subsiguiente extracción de los derivados por HS-SPME (PA, d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción (10 min).

Ácido	**Cantidad del ácido, *mg/m³* (± s, n=2)**		**Recuperación, %**
	Adicionada al medio de reacción	**Medida en el extracto como éster**	
Acético	4,30	3,7 ± 0.2	90 ± 6
Propanoico	5,30	5,22 ± 0.08	100 ± 27
Butanoico	6,30	6,36 ± 0.01	100,0 ± 0,2
Pentanoico	7,40	7,35 ± 0.03	100,0 ± 0,5
Hexanoico	8,40	7,4 ± 0.1	90 ± 1
Benzoico	8,80	0,57 ± 0.04	6.5 ± 0,5

Tabla 32. Recuperación (%) de ácidos carboxílicos, C_2-C_6 y benzoico, desde la fase acuosa enriquecida, después su reacción con PFBBr y extracción por HS-SPME (PA, d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m); Desorción (10 min).

Ácido	Cantidad del ácido, *µmoles/L* (± s, n=2)		Recuperación, %
	Adicionada al medio de reacción	Medida en el extracto como éster	
Acético	86.4	84,0 ± 0,4	97,2 ± 0,5
Propanoico	86.4	81,9 ± 0,8	94,8 ± 0,7
Butanoico	86.4	84 ± 2	100 ± 2
Pentanoico	86.4	85 ± 1	100 ± 1
Hexanoico	86.4	82,8 ± 0,8	95,9 ± 0,9
Benzoico	86.4	79,8 ± 0,1	92,4 ± 0,1

3.5 DETERMINACIÓN POR HS-SPME DE ALDEHÍDOS VOLÁTILES Y ÁCIDOS CARBOXÍLICOS EN DIFERENTES MATRICES.

Los resultados presentados en las siguientes secciones muestran cómo la técnica de HS-SPME puede ser una excelente herramienta en el análisis de sustancias carbonílicas y carboxílicas volátiles, presentes en residuos de producción o de metabolitos, en diferentes matrices y/o en productos de consumo humano. La técnica también es muy apropiada para la determinación del acetaldehído en diferentes bebidas alcohólicas (*e.g.*, vino, *Vodka*, *Whisky* y cerveza).

3.5.1. Aplicaciones biológicas. La preparación de muestras es uno de los pasos más críticos en el análisis de fluidos biológicos; hasta hace unos pocos años la extracción líquido-líquido (LLE, por su abreviatura en inglés) y la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés), eran las técnicas más usadas para la extracción de compuestos orgánicos en matrices biológicas (Vas G. y Vékey K., 2004). Para incrementar el rendimiento de extracción de los analitos, mejorar la eficiencia del método y reducir su costo, constantemente se desarrollan nuevas técnicas de preparación y análisis de muestras. Últimamente, los avances notables en métodos sensibles se han encaminado al análisis de drogas en muestras poco convencionales, *e.g.*, saliva (Fucci N. N. *et al.*, 2003; Kidwell D. A. *et al.*, 1998), cabello (Paterson S. *et al.*, 2001) y sudor (Huestis M. A. *et al.*, 1999). En el presente trabajo, se aplicó la técnica de HS-SPME para el análisis de aldehídos y ácidos carboxílicos volátiles en muestras de aliento, orina, saliva y sudor.

3.5.1.1 Determinación por HS-SPME con derivatización (PFPH) sobre la fibra de compuestos carbonílicos volátiles en aliento, orina, saliva y sudor. La metodología basada en la HS-SPME con derivatización, para el análisis de compuestos carbonílicos, fue aplicada para determinar aldehídos volátiles en diferentes muestras biológicas (aliento, orina, saliva y sudor); en las siguientes secciones se presentan los resultados obtenidos en cada caso.

3.5.1.1.1 Determinación del etanal en aliento humano, mediante muestreo dinámico por HS-SPME-GC/ECD. La naturaleza química y la cantidad de los compuestos detectados en el aire alveolar, son muy variadas; encontrándose hidrocarburos, alcoholes, cetonas y aldehídos, entre otros, con valores de concentración que pueden variar de los *ppm´s* a los *ppt´s* (Lord H. *et. al.*, 2002). Una metodología muy promisoria para el análisis de aliento humano, es la SPME. Grote C. y Pawliszyn, J. (1997), evaluaron esta técnica para determinar acetona e

isopreno en el aliento humano, detectando estos analitos en concentraciones de 38,0 y 10,0 nmol/L, respectivamente.

En el presente trabajo, se utilizó una metodología basada en la combinación de la SPME con la derivatización simultánea, para identificar y cuantificar aldehídos volátiles en el aliento humano, después de consumir licor o fumar un cigarrillo. La **Tabla 33** muestra las características físicas de los voluntarios que participaron en este estudio. El procedimiento de SPME para la determinación de los compuestos carbonílicos se presenta en la **Sección 2.6.1.1.1** de la Parte Experimental.

Tabla 33. Características físicas de los voluntarios participantes en el experimento para determinar compuestos volátiles en el aliento.

Características	**Voluntarios**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Estatura, cm	1.63	1.65	1.55	1.70	1.68
Peso, kg	43	87	54	68	70
Fumador	NO	NO	NO	NO	SÍ
Consumidor frecuente de licor	NO	NO	NO	NO	NO
Estómago lleno	SÍ	SÍ	SÍ	NO	SÍ
Uso de *brackets*, en su dentadura	NO	NO	NO	SÍ	NO

La **Figura 59** ilustra la cantidad del etanal, metabolito principal del etanol, exhalado por uno de los voluntarios, en función del tiempo transcurrido después de haber consumido una bebida alcohólica (vino rojo). La **Figura 60**, presenta los cromatógramas típicos del aliento a los 30, 60 y 120 min, después de ingerir vino rojo (150 mL). Tal como se aprecia en la **Figura 59**, el voluntario presentó la cantidad máxima del etanal en su aliento a los 60 min, después de los cuales

empezó su disminución, de tal manera, que transcurridos 160 min, aún se detectaban trazas (1.24 µmoles) del etanal en el aliento.

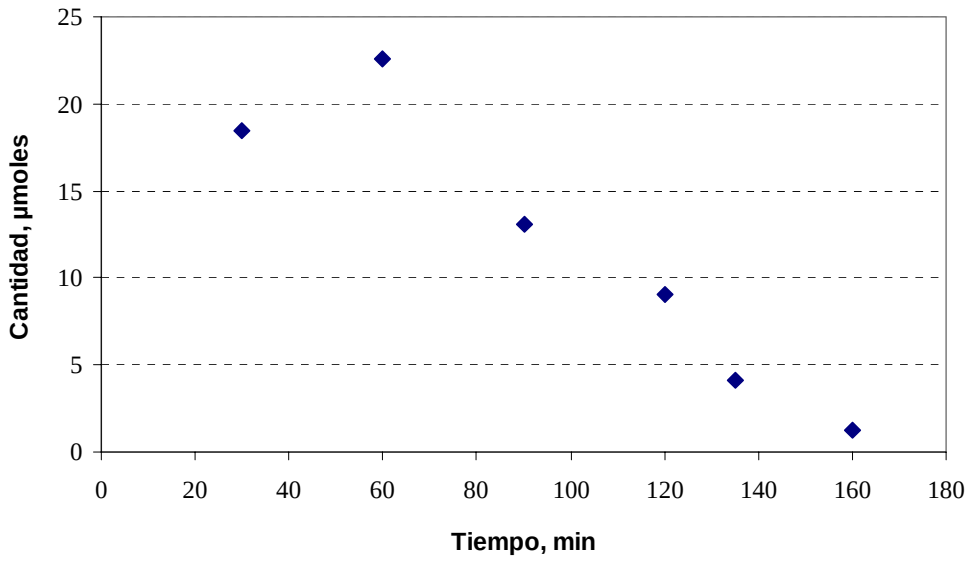


Figura 59. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, en función del tiempo transcurrido después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

El experimento realizado se repitió con el mismo voluntario un día después, bajo las mismas condiciones operacionales. Para lograr la reproducibilidad, la persona siguió la misma dieta. El monitoreo se hizo a 30, 60, 90 y 120 min, después de haber tomado el licor (vino rojo, 150 mL). En la **Tabla 34**, se comparan las cantidades del etanal determinadas en ambos experimentos. Aunque los *CV* estaban entre 12 y 73%, en ambos experimentos se presentó la misma tendencia, *i.e.* la cantidad máxima del etanal exhalado correspondía a los 60 min. A pesar de que en el primer ensayo se detectaron cantidades más altas del etanal, los *CV*

para los valores máximos (60 min), no superaron el 13%. Los valores relativamente altos de *CV* son aceptables, cuando se trabaja con seres vivos.

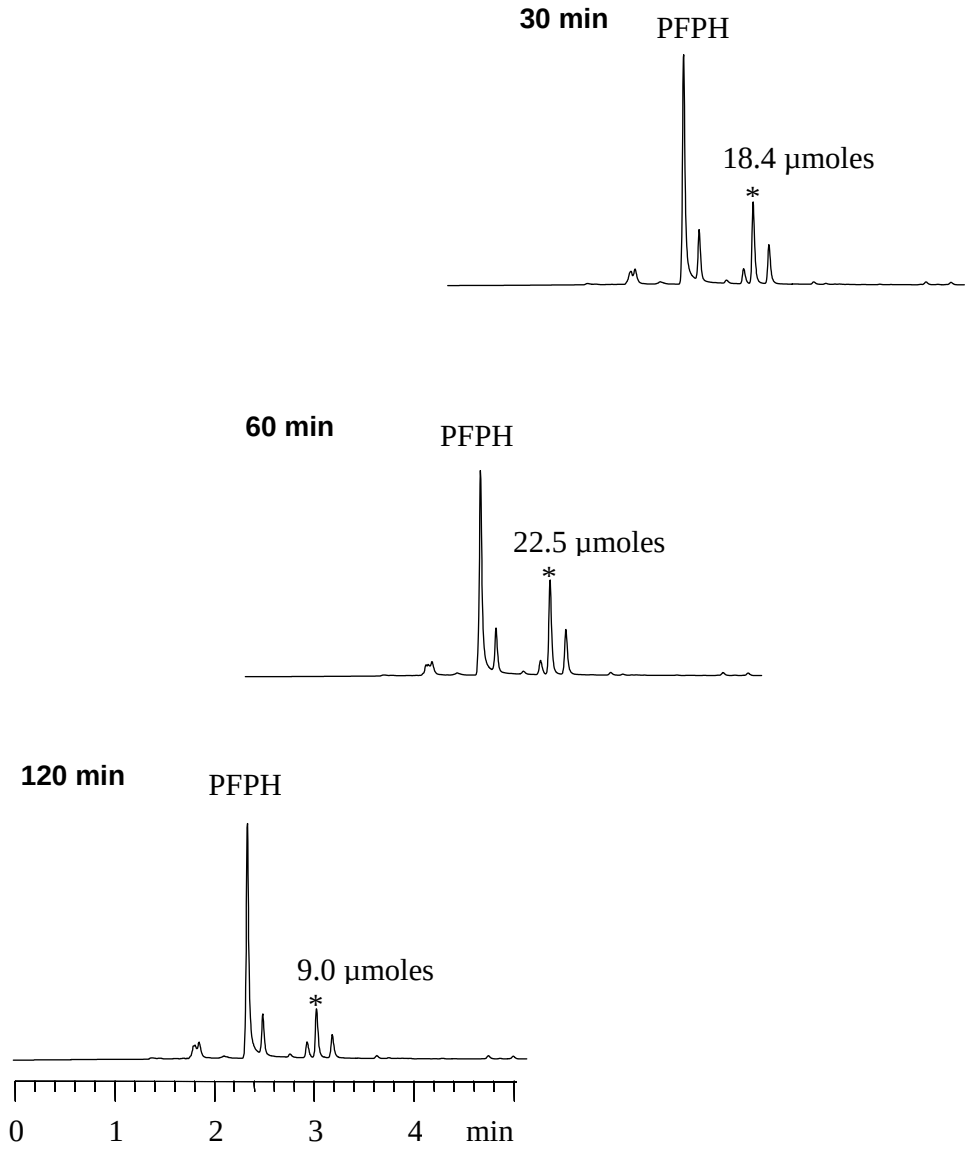


Figura 60. Etanal (*), medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

Tabla 34. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en dos días consecutivos, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Tiempo, min	Etanal, µmoles		Promedio	s*	*CV*, %
	Exprimento 1	Exprimento 2			
30	18,5	7,5	13	8	60,0
60	22,6	18,9	21	3	12,6
90	13,1	5,6	9	5	56,9
120	9,0	2,9	6	4	73,3

* (s, n=2), en dos dias consecutivos.

Otro voluntario, inicialmente tomó un trago de *Vodka* (50 mL). En la **Figura 61**, se presentan los perfiles cromatográficos de su aliento a los 7, 30, 60 y 90 min, después de ingerir el licor. En la **Tabla 35**, se presentan los promedios, desviaciones estándar (s) y *CV* (%), de dos experimentos llevados a cabo bajo las mismas condiciones operacionales, en días diferentes. En los dos experimentos se observó la misma tendencia. Inicialmente (a los 5 min), la cantidad del etanal medida en el aliento fue alta, debido a que este aldehído, *per se*, está presente en el licor y quedó retenido en la boca por unos minutos después de ingerir la bebida. Luego, se observó el crecimiento progresivo del etanal en el aliento, alcanzando un valor máximo a los 60 min. Aunque los coeficientes de variación entre ensayos superaron el 10%, los resultados son aceptables para trabajos con seres vivos, además, se observó la misma tendencia en las mediciones obtenidas en días diferentes.

Con el propósito de confirmar la tendencia general, el experimento se repitió en días consecutivos, suministrando al mismo voluntario una mayor cantidad de *Vodka* (100 mL). Los resultados se presentan en la **Tabla 36**.

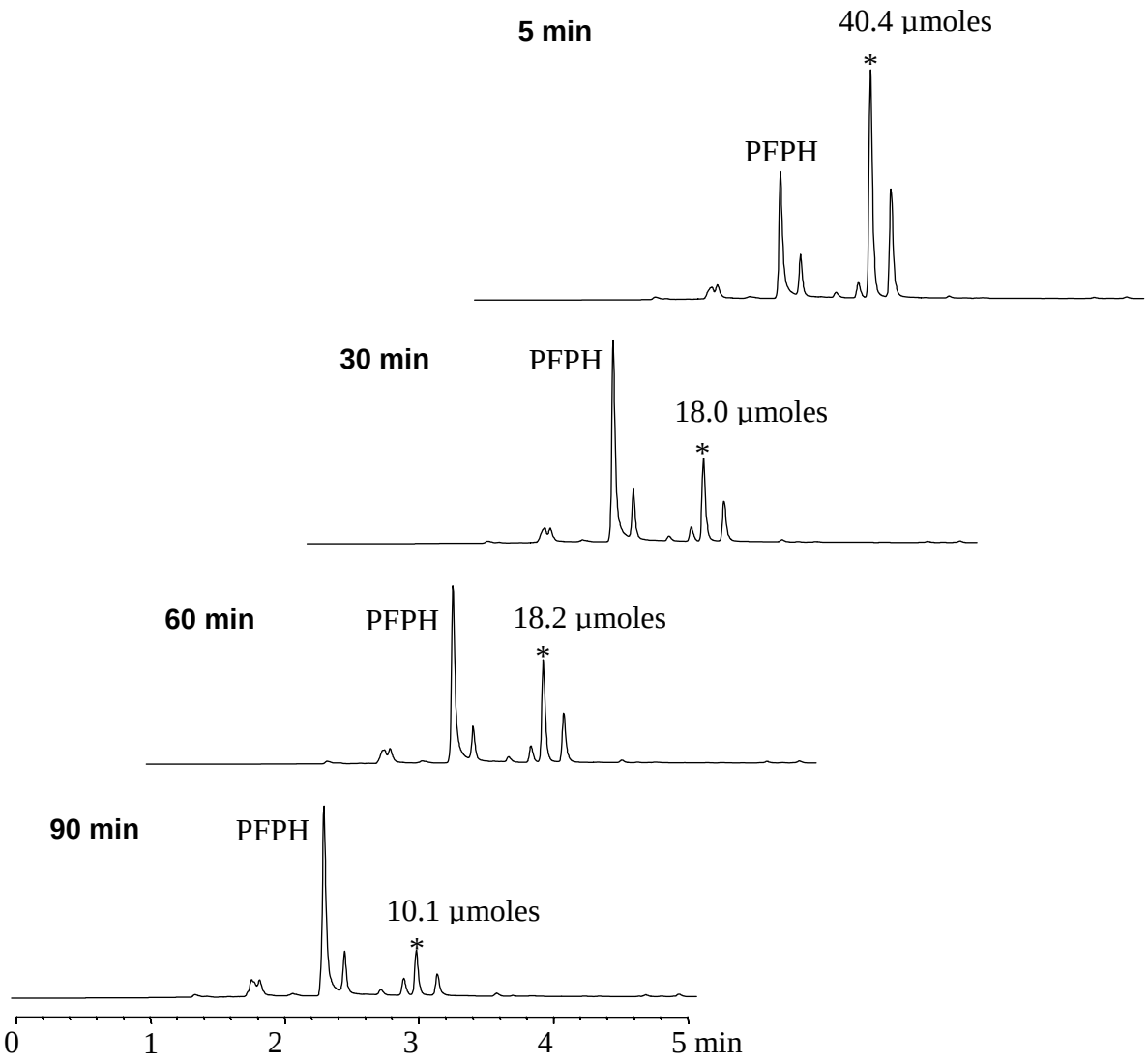


Figura 61. Etanal (*), medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido *Vodka* (50 mL). HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

Tabla 35. Etanal determinado como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido *Vodka* (50 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Tiempo, min	Etanal, µmoles		Promedio	s*	*CV*, %
	Exprimento 1	Exprimento 2			
Blanco**	3,760	3,772	3,77	0,008	0,2
5	36,9	30,3	34	5	13,9
30	11,8	9,8	11	1	13,1
60	14,8	12,4	14	2	12,5
90	10,08	10,18	10,13	0,07	0,7

*s (n=), en dias consecutivos.

** - Antes de ingerir bebida alcohólica.

Tabla 36. Etanal determinado como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido *Vodka*. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Tiempo, min	Etanal, µmoles	
	Volumen de *Vodka* ingerido,mL	
	50	100
Blanco*	3.8	3.7
5	30,2	56,0
30	9,8	25,3
60	12,4	35,1
90	10,2	35,9
120	8,7	29,0
160	3,6	21,5

* - Antes de ingerir bebida alcohólica.

De nuevo, se observa una cantidad alta del etanal en el aliento, analizado en los primeros 5 min, debido a su presencia en el licor y retención en la boca; luego, la cantidad del etanal decae en los próximos minutos y, vuelve a crecer en el aliento, debido al metabolismo propio del alcohol. En ambos ensayos, la mayor cantidad del etanal en el aliento se registra a los 60 min (**Tabla 36**); cuando se ingieren cantidades más altas del etanol (*e.g.*, *Vodka*, 100 mL), la cantidad alta del acetaldehído perdura en el aliento durante los 60-90 min. El alcohol contenido en un trago de *Vodka* de 50 mL se metaboliza aproximadamente en 160 min, mientras que al ingerir una cantidad doble, la eliminación del etanal en el aliento se extiende por más de 3 h.

Otro experimento consistió en medir el etanal en el aliento de una persona, que consumió cerveza (350 mL). En la **Figura 62**, se presenta el perfil cromatográfico del aliento del voluntario, en función del tiempo después de haber ingerido la bebida. En este caso, se observó la misma tendencia presentada en los voluntarios que tomaron *Vodka* y vino rojo, alcanzándose un máximo del etanal exhalado a los *ca.* 50 min.

Otra aplicación consistió en determinar los compuestos carbonílicos volátiles en el aliento de cuatro personas, en buen estado de salud. A diferencia de los tres voluntarios, el cuarto tenía *brackets* en su dentadura. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 63**. Como se puede apreciar, el voluntario con *brackets* presentó en su aliento una cantidad notoriamente alta del metanal, por encima del promedio detectado en el aliento de los otros tres voluntarios. Posiblemente, las ligas que ayudan a sostener los *brackets*, están constituidas por un co-polímero que al decomponerse pueden generar metanal; como este aldehído posee volatilidad alta, puede estar presente en la cavidad bucal, ser exhalado y detectado fácilmente.

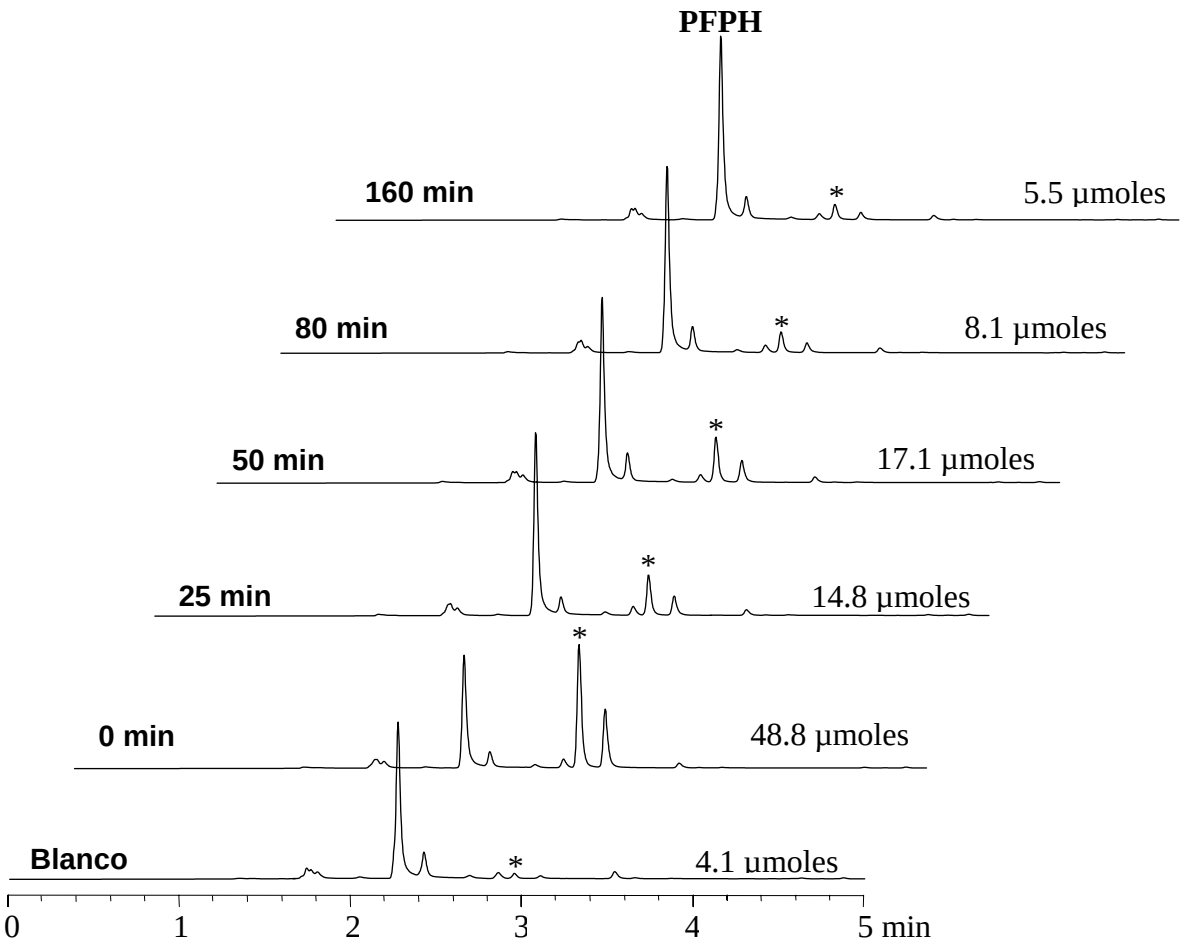


Figura 62. Etanal (*), medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido cerveza (350 mL). HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

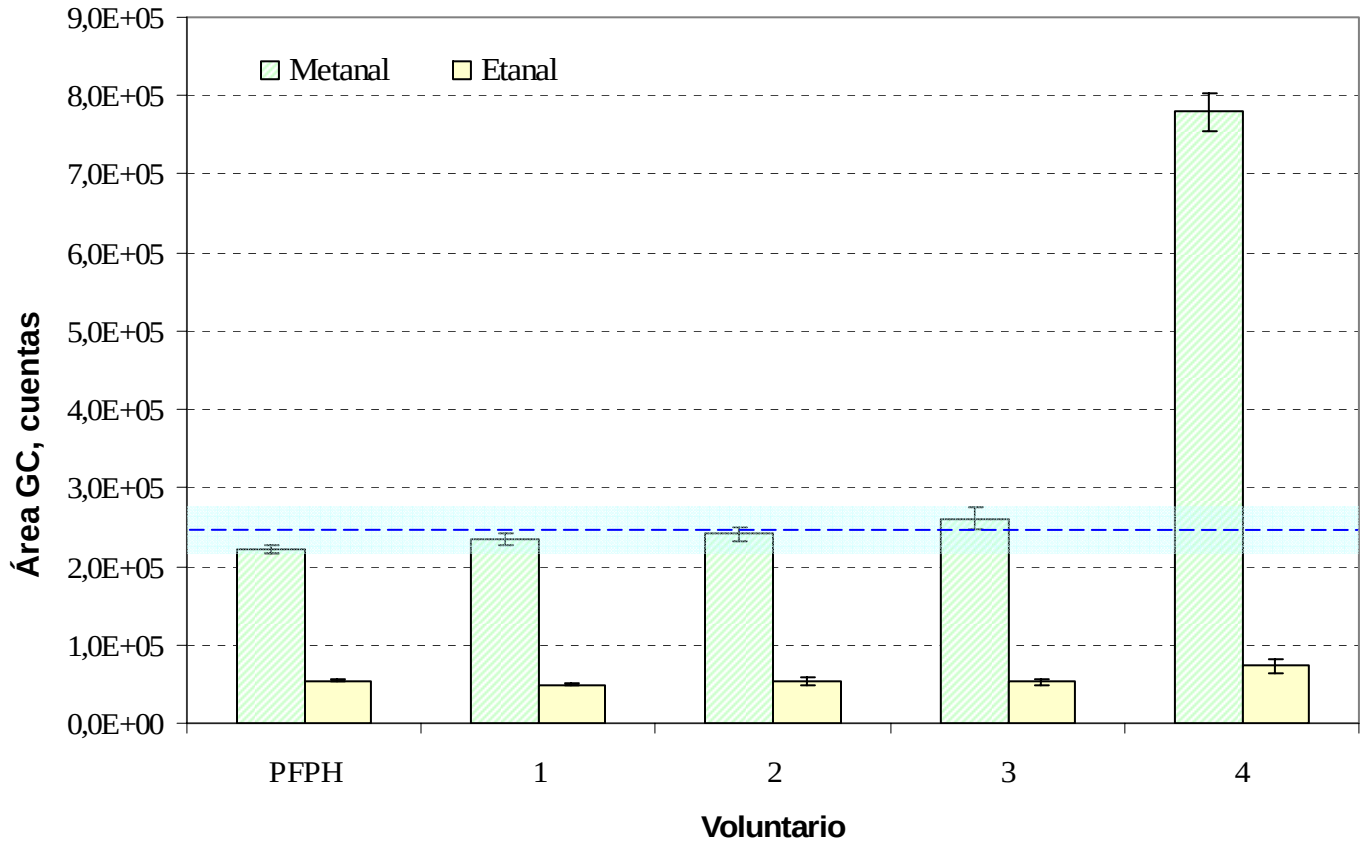


Figura 63. Cantidad de metanal y etanal, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aliento de voluntarios sin (1, 2 y 3) y con (4) *brackets* en su dentadura. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

La última prueba estuvo encaminada a cuantificar los aldehídos volátiles presentes en el aliento de una persona no fumadora, que eventualmente fumó un cigarrillo para el experimento, y de un fumador empedernido que fuma varios cigarrillos diariamente. También se obtuvo el perfil de los aldehídos volátiles presentes en el humo del cigarrillo (**Figura 64**), donde predominaron metanal, etanal y propanal.

En la **Figura 65**, se presenta el perfil de aldehídos en el aire exhalado por una persona no fumadora, antes y después (5 y 30 min) de fumar un cigarrillo. En la **Figura 66**, se compara el aliento del no fumador (5 min después de fumar un cigarrillo) con el del fumador empedernido (quién permaneció sin fumar durante 4 h). Como se puede apreciar, los aldehídos, producidos por la combustión del tabaco, permanecen en el aliento de la persona no fumadora por lo menos durante 30 min. Mientras que, en personas fumadoras, permanecen en el aliento por varías horas (rango evaluado: 4 h), especialmente, el metanal.

Los ensayos realizados muestran que el método aplicado para la determinación del etanal en aliento, es práctico y muy sensible. El ECD ofrece alta sensibilidad para la determinación de PFPH-hidrazonas, permitiendo el análisis de aldehídos volátiles en cantidades traza. Por otra parte, el tiempo total de análisis (muestreo y corrida cromatográfica) es relativamente corto (*ca.* 30 min), por lo que en una jornada laboral de 8 horas, se podrían analizar cerca de 16 muestras. Aunque los duplicados arrojan *CV* superiores al 10%, los resultados son aceptables para el *screening* en seres vivos.

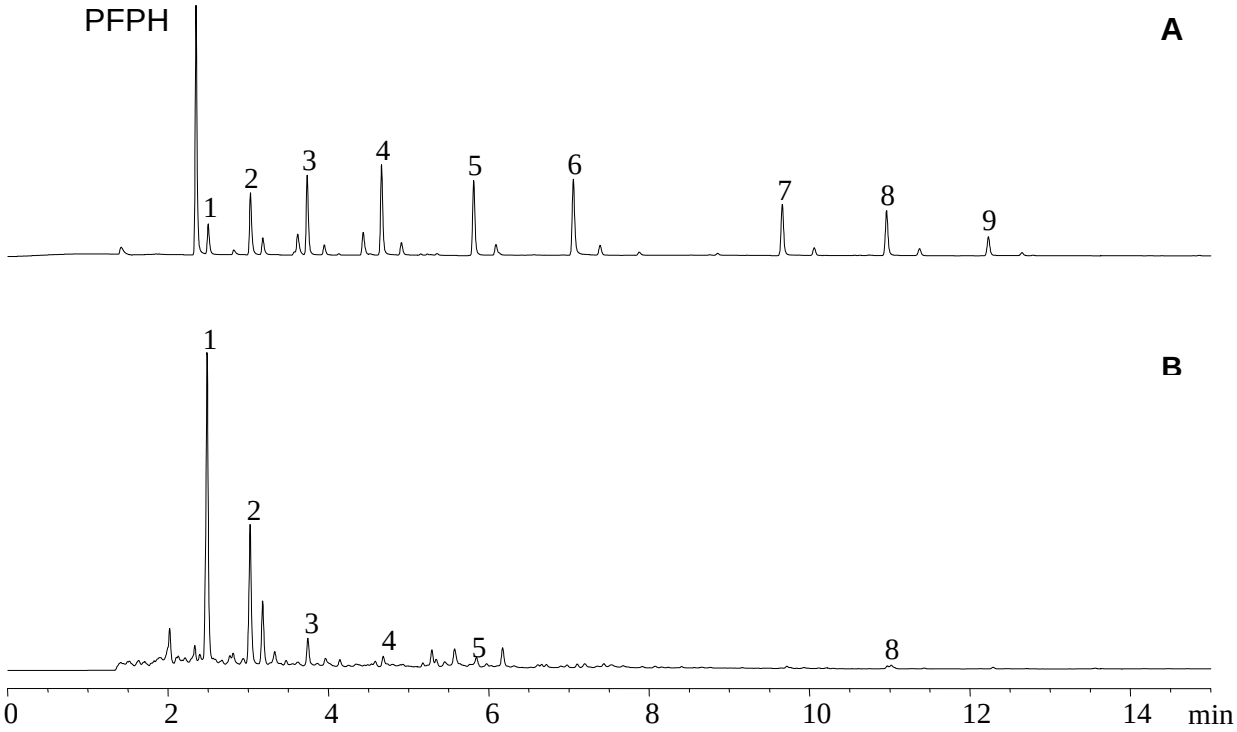


Figura 64. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar de aldehídos, C_2-C_{10}, en metanol (60 µmoles/L); **B**. Humo de un cigarrillo. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.**

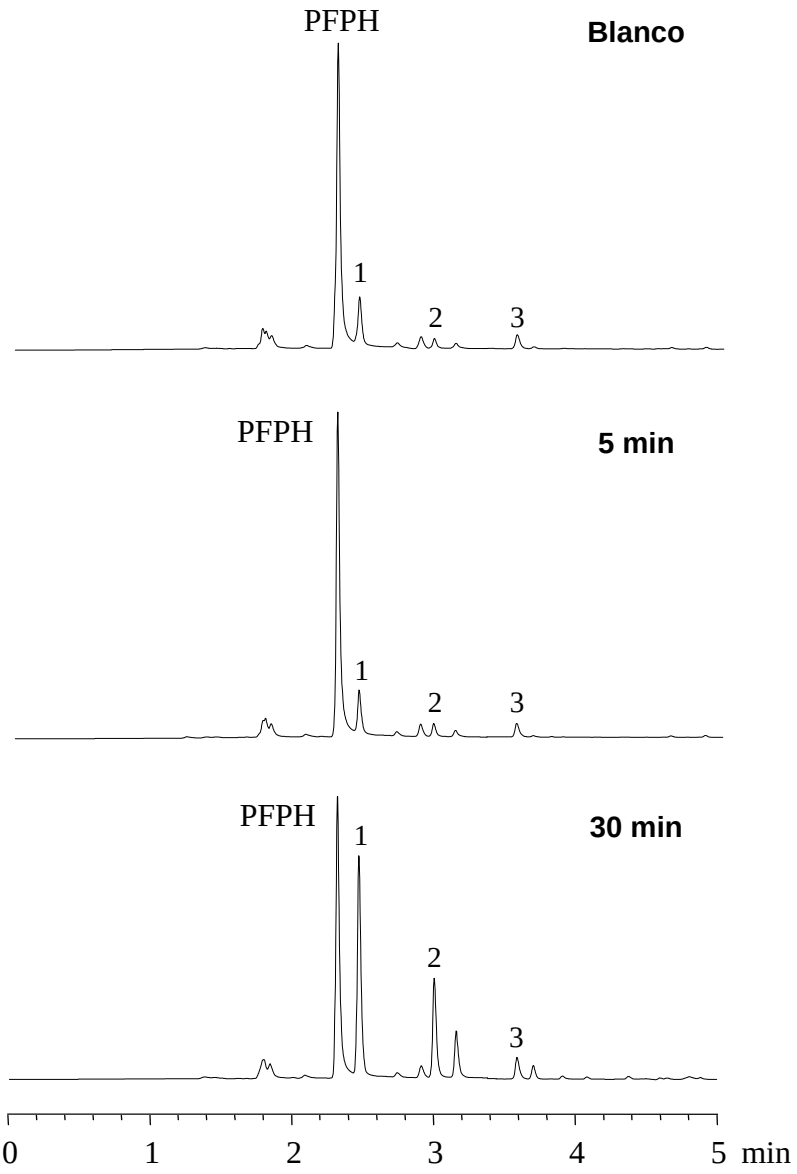


Figura 65. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aliento de una persona no fumadora, antes (blanco) y después (5 y 30 min) de fumar un cigarrillo. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

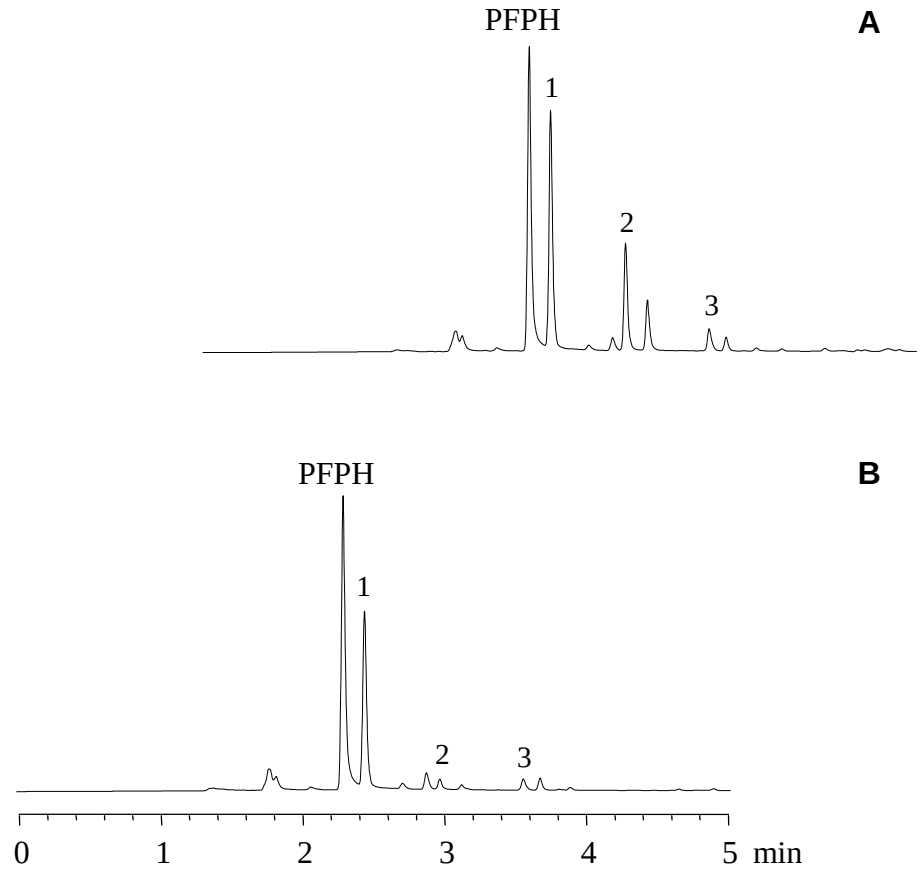


Figura 66. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aliento de persona: **A**. No fumadora, 5 min después de fumar un cigarrillo; **B**. Fumador empedernido, 4 h después de fumar. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3- Propanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

3.5.1.1.2 Determinación del etanal en aliento humano recolectado en bolsas Tedlar®. Debido a las bajas concentraciones de los VOC´s en el aliento humano, se requieren volúmenes de muestra muy grandes para el análisis directo (lo que en la práctica se dificulta) o concentración previa (enriquecimiento de la muestra). Entre los métodos de concentración más usados figuran atrapamiento criogénico, adsorción sobre sorbentes sólidos (tubos o cartuchos sorbentes) (Clements J. B. y Lewis R. G., 1993) y derivatización química (Rosenfeld J. M., 1999). Estas metodologías involucran tiempos de análisis largos, lo que puede llevar a la pérdida de analitos en la muestra, dado que muchos de los compuestos presentes en el aliento tienen tiempos de vida relativamente cortos (Sánchez J. M. y Sacks R. D., 2003). Por otra parte, la manipulación prolongada de la muestra y el uso de solventes, pueden generar problemas de contaminación cruzada y, por ende, errores en la cuantificación de estas sustancias.

Con la SPME, los analitos presentes en el aliento en concentraciones muy bajas pueden ser separados y concentrados simultáneamente, en tiempos relativamente cortos, debido a que poseen constantes de distribución pequeñas. La derivatización puede ocurrir simultáneamente con el aislamiento de los analitos presentes en la matriz (muestreo-derivatización simultáneo) o puede llevarse a cabo después de la sorción de los mismos sobre el medio sólido (derivatización *in-situ*) (Rosenfeld J. M., 1999), acortando así los tiempos de análisis.

Poli D. y colaboradores (2005) reportaron una combinación de los *Teflon® bulb* (muestreadotes de aliento *Bio-VOC®*) con la SPME para el análisis directo de 13 VOC´s en el aliento de pacientes con cáncer del pulmón. Entre los compuestos estudiados figuran los BTEX, isopreno, estireno y decano. Aunque no fue posible identificar una sola sustancia química como biomarcador de la enfermedad, el 80% de los pacientes mostró el mismo perfil de VOC´s. Después de operar a los pacientes, solamente las concentraciones de isopreno y decano disminuyeron notoriamente en el aliento.

En este trabajo se presenta una alternativa de análisis de VOC´s, especialmente, de sustancias carbonílicas volátiles, que combina el muestreo en bolsas *Tedlar*® con la SPME. Esta última permite trabajar con cantidades de muestra relativamente pequeñas, dado que los analitos durante su muestreo se concentran sobre el recubrimiento polimérico de la fibra. Adicionalmente, la combinación de la SPME con la derivatización química, permite detectar compuestos difíciles de analizar directamente, tal como ocurre con los aldehídos volátiles, y que normalmente se encuentran en cantidades traza.

Las pruebas de aliento se realizaron con una voluntaria (27 años, 45 kg), sometida a ayuno prolongado durante 12 h, tiempo después del cual, tomó vino rojo (150 mL). Las muestras de aliento fueron recolectadas en bolsas *Tedlar*® y analizadas bajo las mismas condiciones empleadas para la calibración (Véase **Sección 2.3.1.2**). Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 67,** observándose concentraciones altas del etanal a los 15-30 min, que sugiere el metabolismo más acelerado del etanol, cuando la persona se encuentra con el estomago vacío, después de ayuno. El uso de las bolsas ofrece la ventaja de un muestreo continuo y, como se demostró previamente (**Sección 3.3.1.2**), sin peligro de pérdidas de los analitos.

3.5.1.1.3 Determinación del etanal en muestras de orina y saliva, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) in situ sobre la fibra. Según la revisión biblográfica, el mayor número de publicaciones, donde se aplica la técnica SPME al análisis de la orina, está relacionado con la determinación de anfetaminas y sus metabolitos. Uno de los primeros métodos de análisis cualitativo y cuantitativo fue descrito por Yashiki *et al.* (1995), en él, se combinaron la HS-SPME y la espectrometría de masas con ionización química.

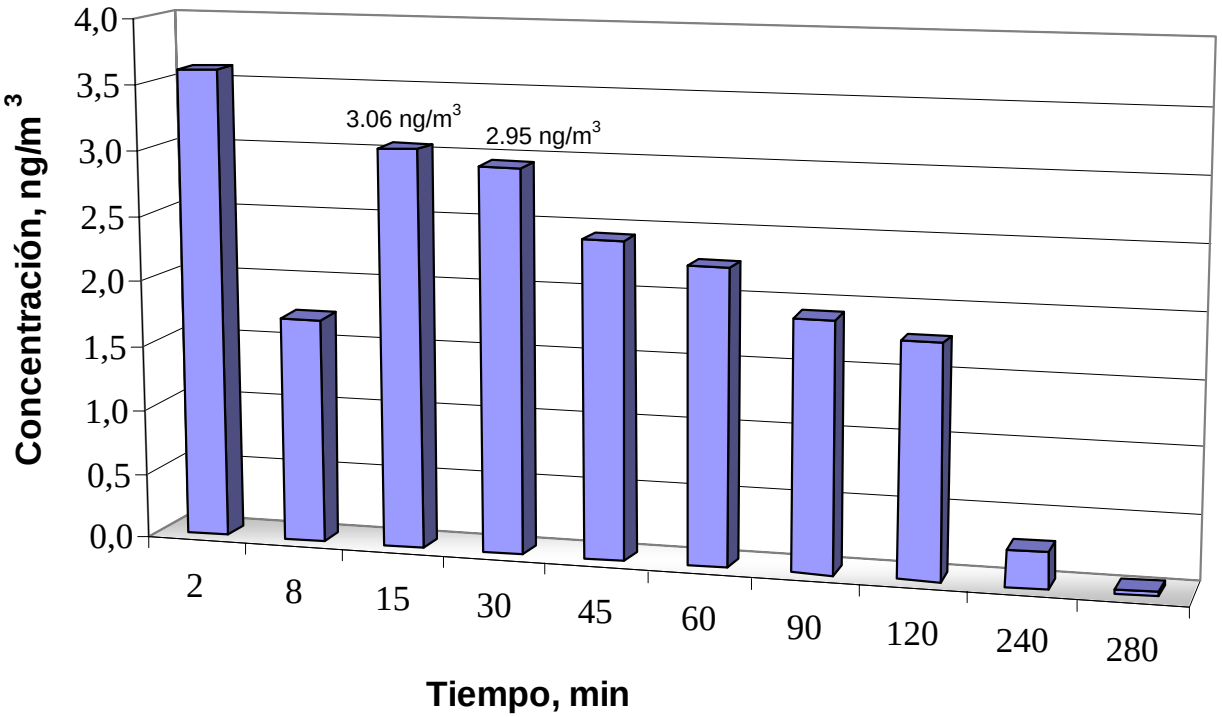


Figura 67. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento de un voluntario, después de haber ingerido vino rojo (150 mL) en ayunas. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.2**.

La sensibilidad del método propuesto fue del orden de los µg/L, 20 veces más alta que la obtenida con el método de HS convencional. La sensibilidad alcanzada no fue la óptima, pero la preparación de la muestra era simple y rápida (*ca.* 25 min), por lo tanto, es ideal para los métodos de *screening*, como es el caso del análisis de drogas en toxicología forense.

Fucci N. y colaboradores (2003), implementaron un método para la determinación simultánea de varias drogas de abuso en saliva, *e.g.*, cocaína, anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), cannabidiol (CBD), cannabinol (CBN) y Δ^9-tetrahidrocannabinol (THC). Los autores obtuvieron resultados satisfactorios para el propósito del análisis, no sólo como procedimiento de *screening*, sino también para la cuantificación de drogas encontradas en muestras de saliva, alcanzando LODs de orden de los µg/L, para todas las sustancias estudiadas.

Hall B. J. *et al.* (1998), por su parte, compararon la SPME con la LLE, para determinación de cannabinoides en saliva humana después de fumar marihuana. En ambos casos, los autores lograron detectar y cuantificar el tetrahidrocannabinol en concentraciones de orden de los ng/mL.

En el presente trabajo, se aplicó la HS-SPME con derivatización directa sobre la fibra (PFPH), para determinar etanal en fluidos biológicos (saliva y orina) y en el aliento de un voluntario, que tomó 100 mL de *Vodka*. Los resultados del experimento se ilustran en la **Figura 68**. Los perfiles de la cantidad de acetaldehído en las muestras de orina y de aliento, recolectadas entre 30 y 150 min, son bastante similares, presentando un máximo del etanal a los 90 min; mientras que, en saliva la concentración en el tiempo es relativamente constante. En las muestras de aliento y saliva, recolectadas 5 min después de tomar la bebida alcohólica, se puede observar la presencia del acetaldehído, que se halla, *per se*, en el *Vodka*. Éste permanece en la cavidad bucal, en cantidades

relativamente altas, durante los primeros minutos, después del consumo de la bebida.

La determinación de la concentración exacta del etanal en muestras de orina, se llevó a cabo así como se describe en la **Sección 2.6.1.1.3**. Las muestras de orina recogidas paralelamente con las muestras de aliento recolectadas en bolsas *Tedlar*® (**Sección 2.6.1.1.2**), se analizaron bajo los mismos parámetros de la calibración del método HS-SPME-GC/ECD (Véase **Secciones 2.2.2** y **2.3.1.2**). Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 69**. Los coeficientes de variación, se encontraron en el rango de 7-39 %. Cuando las cantidades del etanal fueron bajas, a 0 y 120 min, se observaron *CV* relativamente altos, *i.e.* 23 y 39 %, respectivamente. Para los demás tiempos evaluados los *CV* estuvieron en el rango de 7-19%. Sin embargo, estos valores son aceptables para el *screening* en seres vivos.

Un perfil comparativo del etanal detectado en las muestras de orina con el del aliento, se ilustra en la **Figura 70**. Se observa una buena correlación entre las cantidades detectadas en las dos muestras biológicas, con un máximo a los 30 min, en ambos casos.

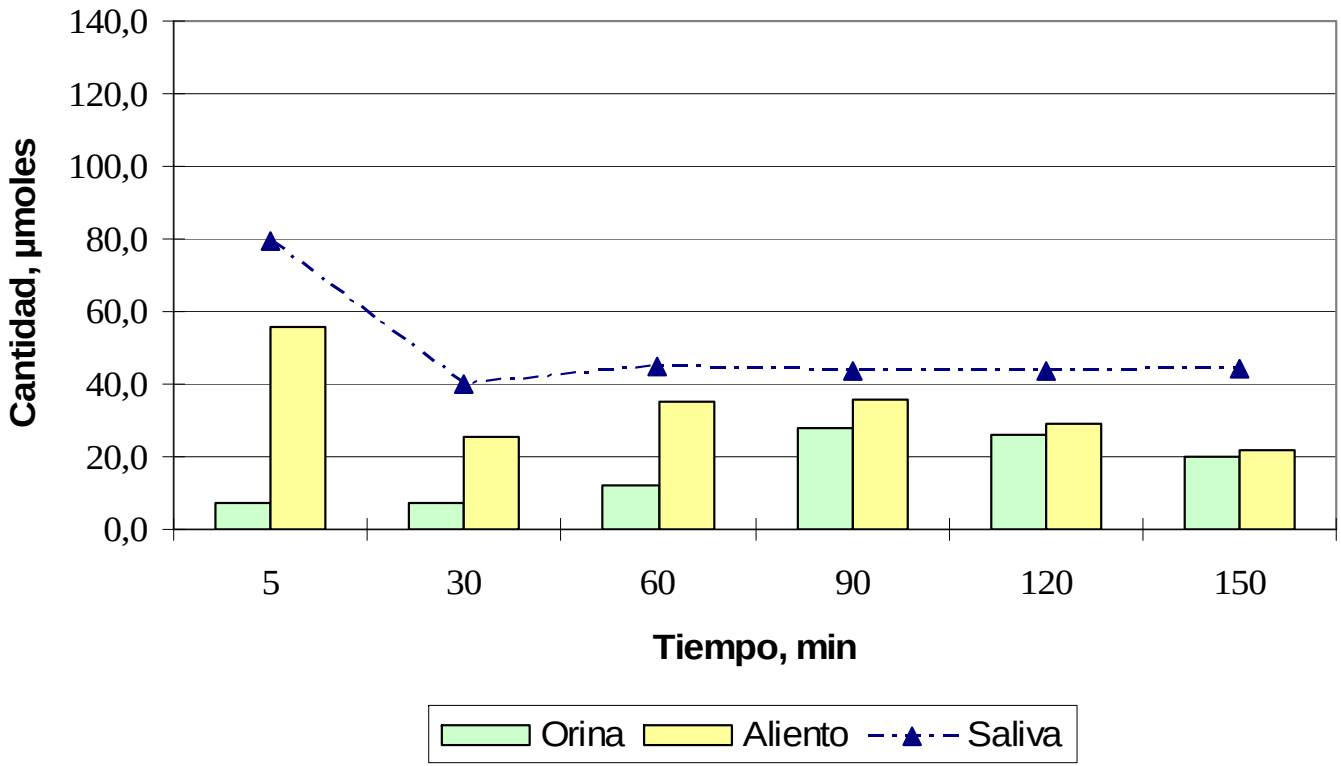


Figura 68. Etanal, medido en forma de su PFPH-hidrazona, en el aliento, orina y saliva de un voluntario sano, después de haber ingerido *Vodka* (100 mL) HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.1**.

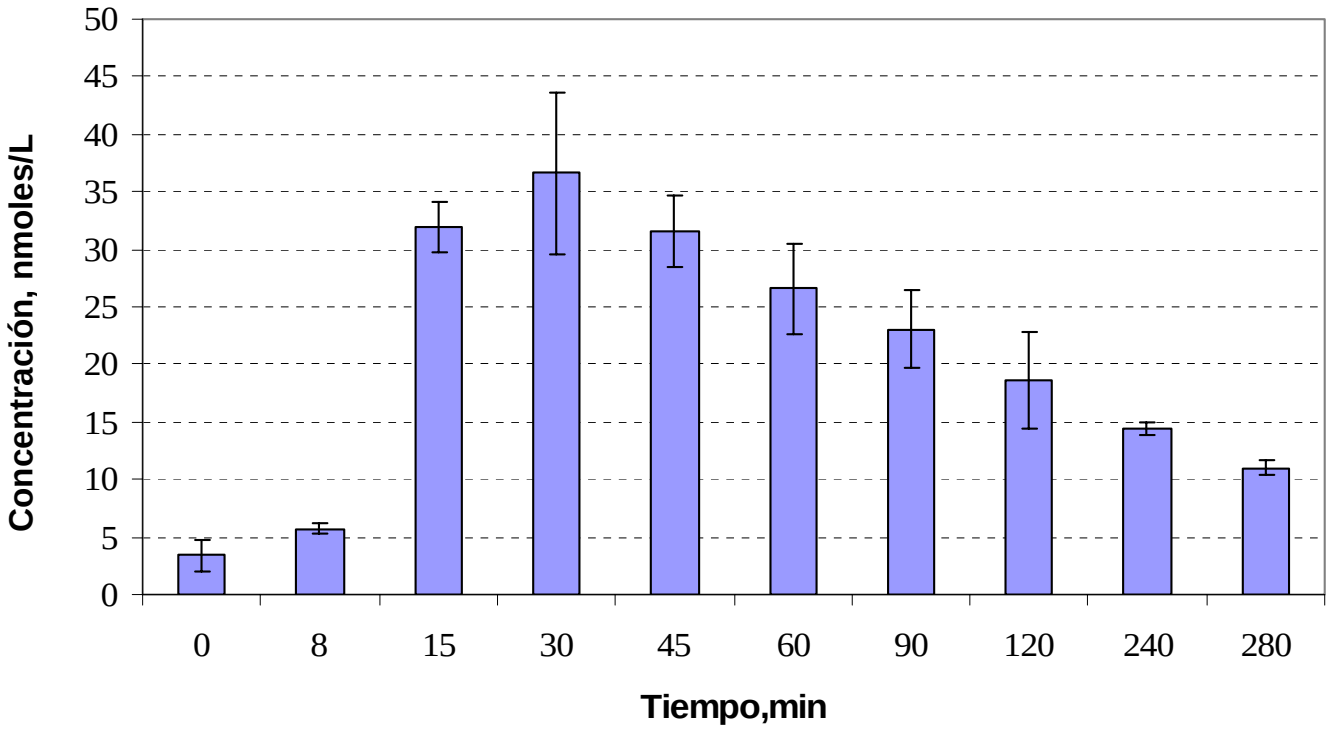


Figura 69. Etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en la orina de un voluntario sano, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.3**.

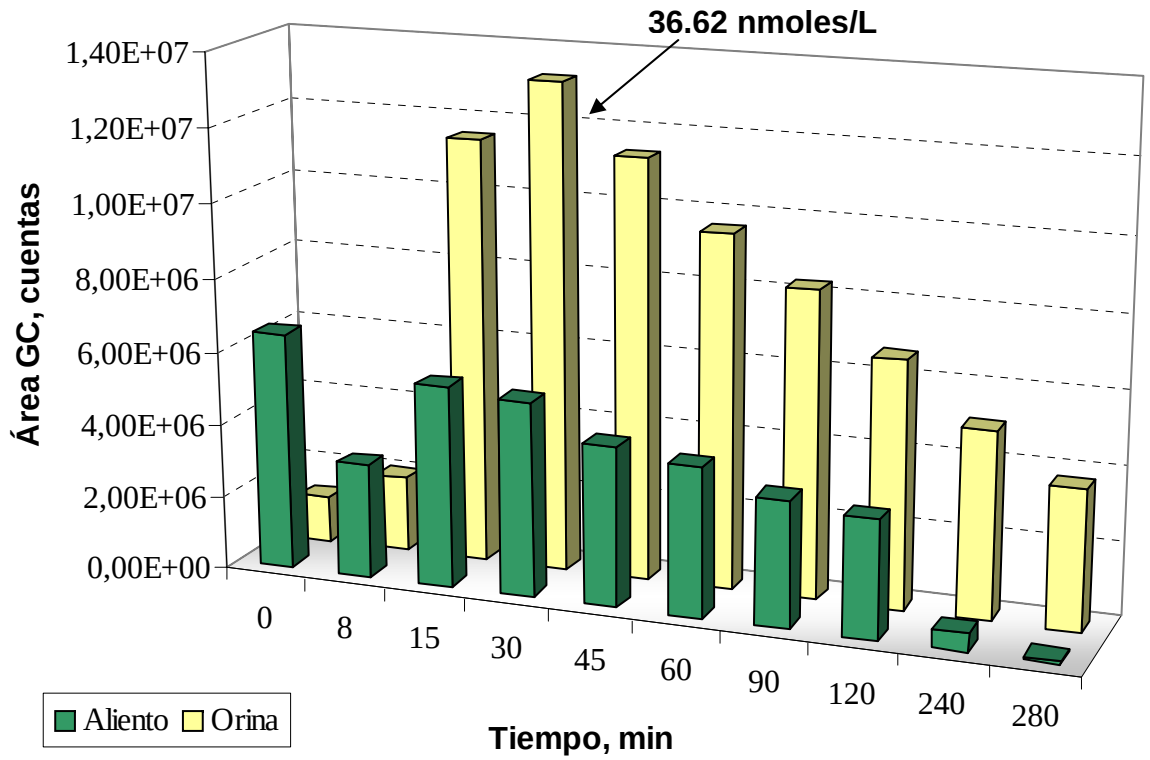


Figura 70. Análisis comparativo del etanal, medido como su PFPH-hidrazona, en el aliento y la orina de un voluntario sano, después de haber ingerido vino rojo (150 mL). HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.3**.

3.5.1.1.4 Determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos volátiles, en sudor humano (pies). Las muestras de sudor de pies, obtenidas de dos voluntarios, uno de piel morena y otro de piel blanca, fueron analizadas según el procedimiento descrito en la **Sección 2.6.1.1.4**. En la **Figura 71** se muestran los perfiles cromatográficos de aldehídos presentes en el sudor de pies de los dos voluntarios. En la **Tabla 37**, se reportan las cantidades de los aldehídos determinadas, en ambos casos. Como se puede apreciar, los *CV* (n=2), no superaron el 19%.

En el sudor de pies del voluntario de piel blanca se detectó toda la gama de aldehídos (C_2-C_{10}) en el rango de 0.05-2.52 nmoles; los componentes característicos fueron nonanal, decanal y hexanal, en cantidades de 2.52, 2.23 y 2.07 nmoles, respectivamente; mientras que el aldehído encontrado en la concentración más baja (0.024 nmoles) fue el butanal. En el sudor de pies del voluntario de piel morena, se registraron pentanal, nonanal y decanal en cantidades de 25.1, 3.20 y 1.7 nmoles, respectivamente; los demás aldehídos se presentaron en cantidades traza (0.23-0.83 nmoles).

La **Figura 72**, muestra los perfiles cromatográficos de ácidos carboxílicos presentes en el sudor de pies de los dos voluntarios. En la **Tabla 38**, se reportan las cantidades de los ácidos determinadas, en ambos casos. Como se puede apreciar, los *CV* (n=2), no superaron el 28% y para el voluntario de piel blanca, estuvieron, en su mayoría, entre 0 y 7 %. En ambos voluntarios, sobresalió el ácido acético, seguido del prapanoico y el benzoico. Sin embargo, mientras que en el voluntario de piel blanca el compuesto mayoritario fue el ácido acético (5.07 µmoles), en el voluntario de piel morena, fue el ácido benzoico (0.254 µmoles).

La metodología relativamente fácil y no invasiva, propuesta en este trabajo, permitió detectar selectivamente, aldehídos y ácidos carboxílicos en sudor humano, a nivel de trazas.

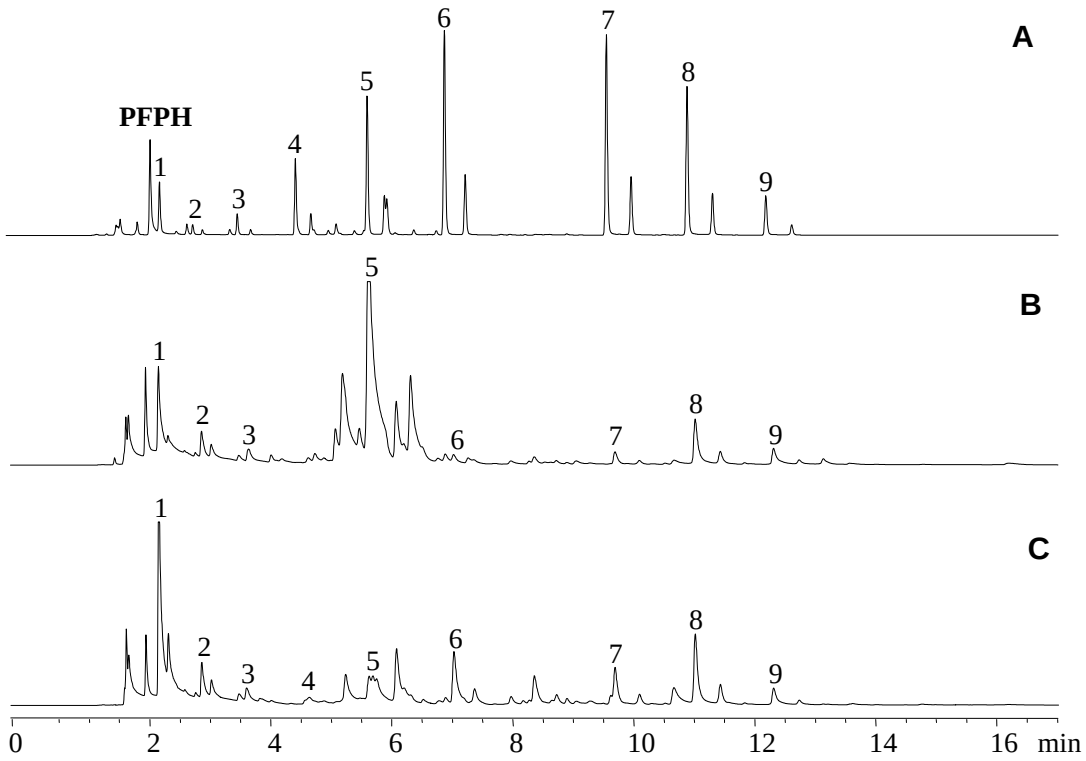


Figura 71. Perfiles cormatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar acuoso de aldehídos (10 µmoles/L) y, en el sudor de pies de: **B**. Un voluntario de piel morena; **C**. Un voluntario de piel blanca. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.4**.

Tabla 37. Aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el sudor de pies de dos voluntarios, uno de piel morena y otro de piel blanca. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Aldehídos	Cantidad, nmoles									
	Voluntarios									
	Piel morena					Piel blanca				
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	s (n=2)	*CV*, %	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	s (n=2)	*CV*, %
Etanal	0,681	0,601	0,64	0,057	9	0,048	0,052	0,050	0,003	6
Propanal	0,717	0,731	0,72	0,010	1	0,690	0,710	0,70	0,014	2
Butanal	0,235	0,231	0,233	0,003	1	0,026	0,022	0,024	0,003	12
Pentanal	25,614	24,570	25,1	0,738	3	0,134	0,132	0,133	0,001	1
Hexanal	0,737	0,654	0,70	0,058	8	2,048	2,092	2,07	0,031	2
Octanal	0,850	0,815	0,83	0,025	3	0,696	0,732	0,71	0,025	4
Nonanal	3,213	3,186	3,20	0,019	1	2,508	2,538	2,52	0,021	1
Decanal	1,466	1,919	1,7	0,320	19	2,250	2,210	2,23	0,028	1

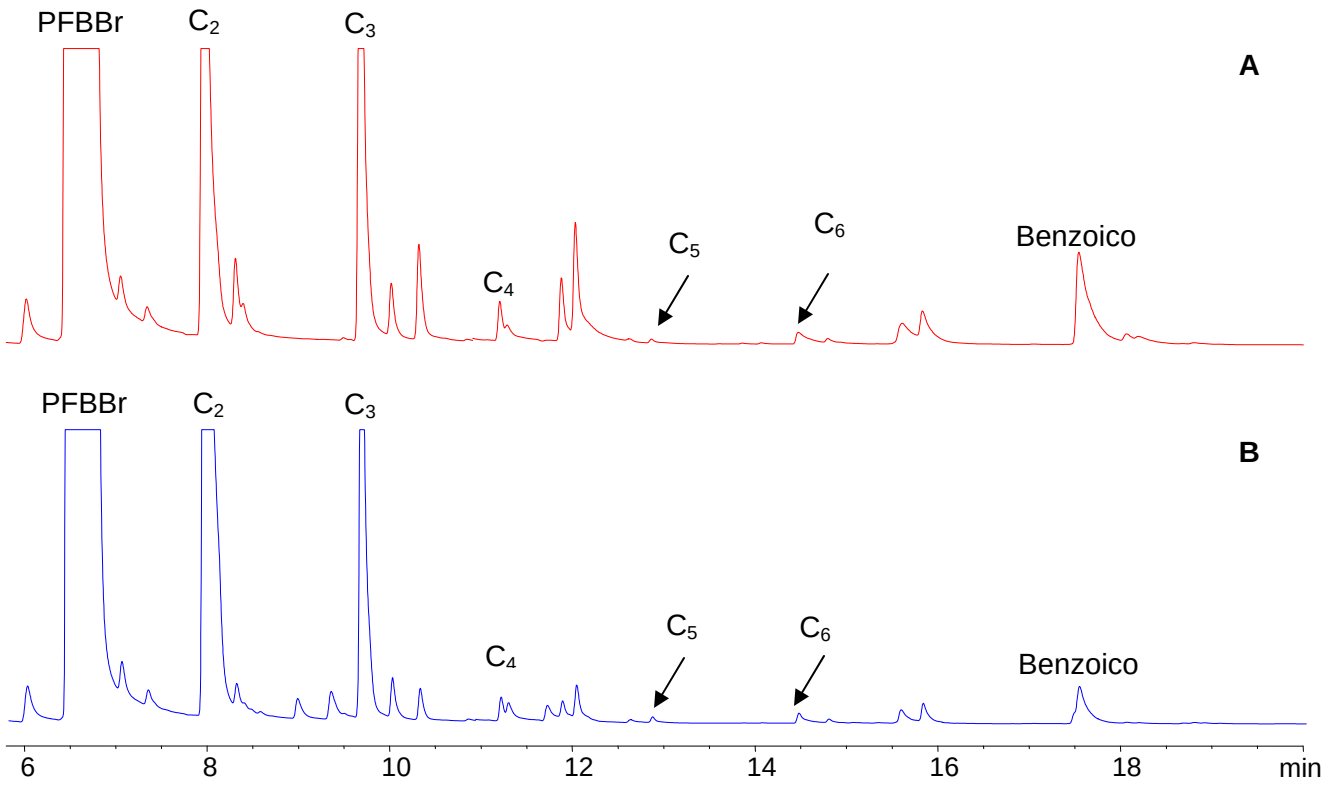


Figura 72. Perfil cromatográfico de ácidos carboxílicos volátiles: 1- Acético, 2- Propanoico, 3- Butanoico, 4- Pentanoico, 5- Hexanoico, 6- Benzoico; medidos como sus ésteres de PFB, en: **A**. Un voluntario de piel morena; **B**. Un voluntario de piel blanca. HS-SPME; Fibra PA (d_f = 80 µm);). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.1.1.4**.

Tabla 38. Ácidos carboxílicos volátiles, medidos como sus ésteres de PFB, en el sudor de pies de dos voluntarios, uno de piel morena y otro de piel blanca. HS–SPME/GC-ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); GC/ECD; Columna DB-5 (30 m).

Ácidos	Cantidad, µmoles									
	Voluntario									
	Piel morena					Piel blanca				
	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	s (n=2)	*CV*, %	Muestra 1	Muestra 2	Promedio	s (n=2)	*CV*, %
Acético	2,895	3,126	3,0	0,163	5	5,113	5,036	5,07	0,054	1
Propanoico	1,671	1,207	1,4	0,328	23	1,709	1,250	1,480	0,325	22
Butanoico	0,016	0,012	0,014	0,003	20	0,007	0,007	0,007	0,000	0
Pentanoico	0,003	0,002	0,003	0,001	28	0,003	0,003	0,003	0,000	0
Hexanoico	0,018	0,015	0,017	0,002	13	0,009	0,009	0,009	0,000	0
Benzoico	0,265	0,242	0,254	0,016	6	0,081	0,089	0,085	0,006	7

3.5.2 Aplicaciones en alimentos y productos naturales. Durante su almacenamiento, los productos comestibles se deterioran y/o se contaminan o se degradan, produciendo sustancias artefacto, bajo la acción de la luz, el calor, durante la oxidación y/o debido a la no hermeticidad del empaque. La cuantificación de los productos de degradación oxidativa, *e.g*., aldehídos, en el alimento, permite determinar el grado de su envejecimiento y/o deterioro, lo que podría prevenir efectos nocivos en el consumidor. En las siguientes secciones se presentan varias aplicaciones de la HS-SPME, para el análisis de compuestos carbonílicos en diferentes matrices alimenticias.

3.5.2.1 Determinación por HS-SPME del etanal en bebidas alcohólicas, usando la extracción-derivatización simultánea sobre la fibra. El aroma es una de las cualidades más apreciables en el vino; se han identificado *ca*. 1300 compuestos que marcan el *flavour* de esta bebida. Algunas sustancias provienen de la uva, pero la mayoría se forma durante la fermentación. La SPME se utilizó para aislar diversos componentes del HS de los vinos (De La Calle D. *et al*., 1996; 1998), y mostró ser un método rápido y reproducible, cuyos resultados pueden ser correlacionados con las propiedades organolépticas del vino.

Demyttenaere y colaboradores (2003), compararon dos métodos de extracción, la SPME “clásica” y la extracción en fase sólida sobre la barra magnética de agitación (SBSE, por sus siglas en inglés), para determinar la composición química del aroma de diferentes muestras de *Whisky*. Los autores lograron detectar más compuestos y alcanzaron mayores recuperaciones, cuando utilizaron la SPME en modo directo, con las fibras de PDMS “clásica” y modificada, de Carboxen-DVB-PDMS.

En el presente trabajo, se utilizó la HS-SPME-GC/ECD combinada con la derivatización química sobre la fibra, para determinar la cantidad de acetaldehído presente en bebidas alcohólicas. Los resultados obtenidos se ilustran en la

Figura 73. La cerveza contenía mayor cantidad del etanal, seguida del *Whisky*; este aldehído se encontró en menor proporción en vino rojo y *Vodka*. Los *CV* alcanzaron valores de 0.8, 7.9, 4.4 y 3.0 %, para cerveza, *Whisky*, vino rojo y *Vodka*, respectivamente, indicando una buena reproducibilidad que puede ser alcanzada con HS-SPME, usando derivatización *in situ*.

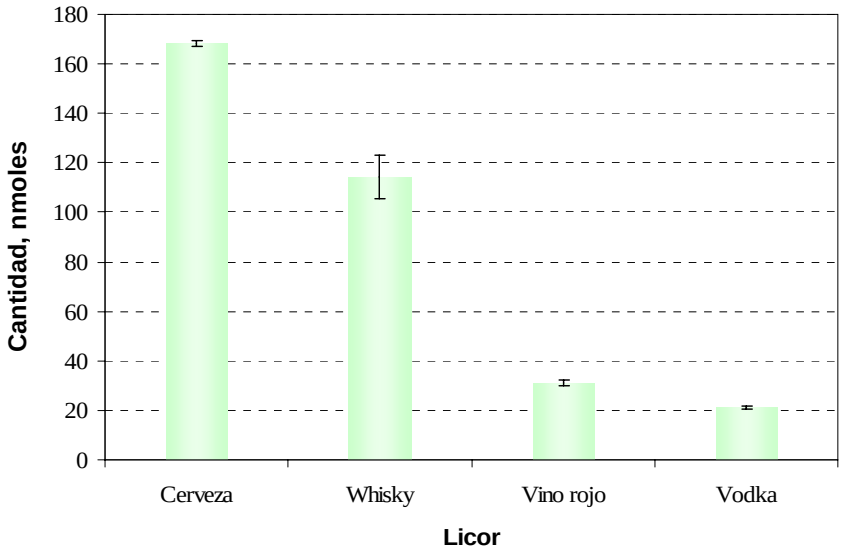


Figura 73. Acetaldehído, medido como su PFPH-hidrazona, en diferentes bebidas alcohólicas. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.2.1**.

3.5.2.2 Determinación de los aldehídos en aceites comestibles, por HS-SPME con derivatización simultánea sobre la fibra. Los materiales de empaque están en contacto directo con los productos alimenticios, éstos, en la mayoría de los casos, están constituidos por polímeros flexibles y pueden poseer contaminantes volátiles (*e.g.,* hidrocarburos y productos de su oxidación), los cuales imparten olores y sabores indeseable (Ezquerro O. *et al*., 2002). Estos compuestos se forman por la degradación termo-oxidativa del polímero, posiblemente, durante la fabricación del empaque. Para su determinación, el

método de HS estático usado convencionalmente no es suficientemente sensible, mientras que la técnica HS-SPME resulta apropiada para su análisis, debido a que la extracción de analitos es acompañada de su concentración simultánea. Ezquerro *et al*. (2003), aplicaron SPME con fibra de Carboxen-PDMS de 75 µm y GC-MS con calibración externa (inyección convencional), para la detección y cuantificación de 22 compuestos formados por la degradación termo-oxidativa del material de empaque de poli(etileno). Los autores compararon el método HS estático convencional con el de HS-SPME y encontraron que este último supera al HS estático en términos de sensibilidad.

En el presente trabajo, se evaluaron las metodologías de análisis de aldehídos basadas en la HS-SPME con derivatización con HBT o PFPH, para detectar compuestos carbonílicos en aceites comestibles empacados en envases plásticos. En este tipo de matrices, los compuestos carbonílicos pueden provenir tanto de la foto-oxidación del empaque, como del mismo aceite (productos finales de la lipoxidación). Uno de los marcadores del proceso de lipoxidación en aceites vegetales es el hexanal (Stashenko E. E. *et al.*, 1997; 2000), aldehído que se forma en mayor proporción, proveniente de la oxidación degradativa del ácido linoleico.

3.5.2.2.1 Derivatización con HBT. Los perfiles cromatográficos de aldehídos obtenidos para el aceite de G*irasol* sin calentar, calentado (190°C, 2 h) y para el almacenado (27 °C) durante 2 meses, después de haber sufrido calentamiento (190°C, 2 h), se presentan en la **Figura 74** (Véase **Sección 2.6.2.2.1**). Como se puede apreciar, los aceites calentados (**A** y **B**), presentan una amplia gama de aldehídos (C_1-C_9). Con el almacenamiento, los aldehídos más livianos (C_2-C_5) disminuyen, probablemente, por volatilización, mientras que los aldehídos más "pesados" (C_6-C_8) tienden a aumentar, como productos de oxidación degradativa de aceites.

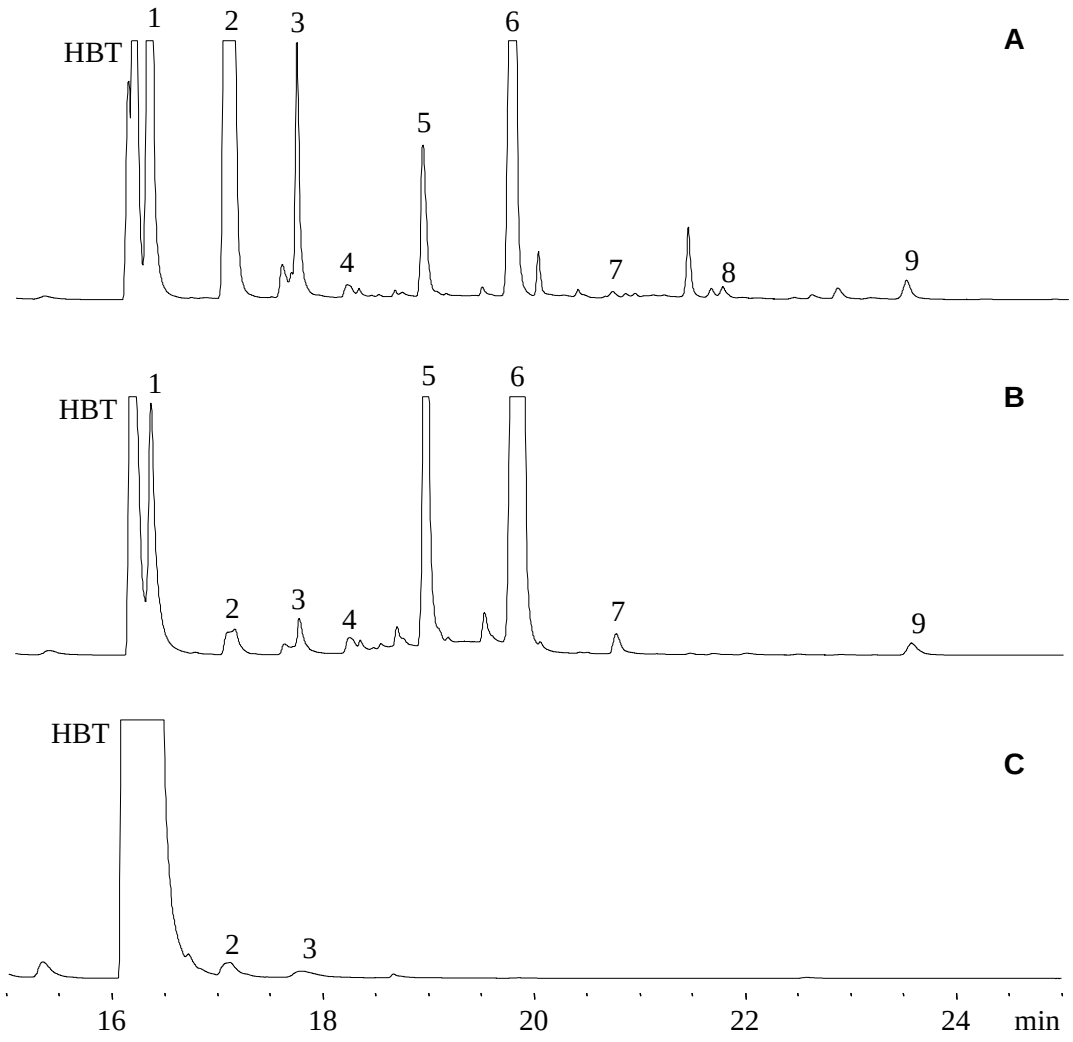


Figura 74. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: Aceite de *Girasol* calentado (190°C, por 2 h): **A**. Analizado inmediatamente después de su calentamiento; **B**. Analizado 2 meses después de haber sufrido el calentamiento y **C**. Aceite de *Girasol* sin calentar. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/FPD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Heptanal; 8- Octanal; 9- Nonanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.2.2.1**.

Las cantidades del hexanal (medido como su derivado C_6-HBT) en las muestras calentadas se registran en la **Tabla 39**, acompañadas de desviaciones estándar (s, n=2) y coeficientes de variación (*CV*, %), que están en el rango de 4-14%. Como se puede apreciar (**Tabla 39**), se presenta un aumento *ca.* del 54% en la cantidad del hexanal presente en el aceite calentado, con el tiempo de almacenamiento. En las muestras del aceite sin calentar (**Figura 74 C**) sólo se detectaron metanal y propanal, es posible que los demás aldehídos (C_4-C_9) se presenten en cantidades traza, no detectables por GC/FPD, bajo las condiciones del experimento.

Tabla 39. Hexanal (mediado como su derivado C6-HBT) formado durante el proceso de calentamiento (190 °C, 2 h) y almacenamiento (2 meses, 27 °C), después del calentamiento (190 °C), del aceite de Girasol. HS-SPME-GC/FPD; Fibra PA (df = 80 µm); Columna DB-5 (30 m).

Aceite	**C_6-HBT, µmoles/L**	
	Aceite calentado (190°C)	**Aceite calentado (190°C) y almacenado por 2 meses**
Muestra1	11,3	21,5
Muestra 2	10,6	26,4
Promedio	10,9	24
s	0,5	3,4
***CV*, %**	**4,7**	**14,4**

3.5.2.2.2 Derivatización con PFPH. El análisis del *headspace* del aceite vegetal también se realizó usando HS-SPME-GC/ECD y PFPH como reactivo derivatizante. En la **Tabla 40**, se presentan las cantidades de aldehídos (C_2-C_6), determinadas en forma de sus PFPH-hidrazonas, calculadas con base en la curva de calibración realizada con inyección automática para los respectivos derivados hidrazónicos (Véase **Sección 3.3.1.2**); los *CV* no superaron el 12%. Los perfiles cromatográficos obtenidos mediante GC/ECD, para los aceites comestibles sin usar (**Figura 75**), sugieren que la determinación de aldehídos usando PFPH como agente derivatizante, resulta más sensible (LOD = nmoles/L, S/N = 5) que aquella en la que se usa HBT como agente derivatizante (Véase **Sección 3.5.2.2.1**), permitiendo detectar una serie de contaminantes traza (*e.g.*, aldehídos C_2-C_6), en el aceite sin calentar, que no se registran en cantidades confiables por GC/FPD.

Tabla 40. Aldehídos medidos como sus PFPH-hidrazonas, en aceites comestibles comerciales. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Aldehídos	**Cantidad, µmoles (± s, n=2)**		
	Aceite de *Girasol*, *Gourmet*	**Aceite de *Girasol, Premier***	**Aceite *Oleocali, Cero colesterol***
Etanal	160 ± 5	50 ± 4	500 ± 19
Propanal	6,6 ± 0,7	6,0 ± 0,7	30 ± 1
Butanal	4,2 ± 0,3	2,48 ± 0,06	4,9 ± 0,6
Pentanal	20 ± 1	10 ± 1	11,4 ± 0,5
Hexanal	40 ± 2	10,8 ± 0,6	19,6 ± 0,9
Nonanal	4,1 ± 0.2	3,13 ± 0,07	3,8 ± 0,2

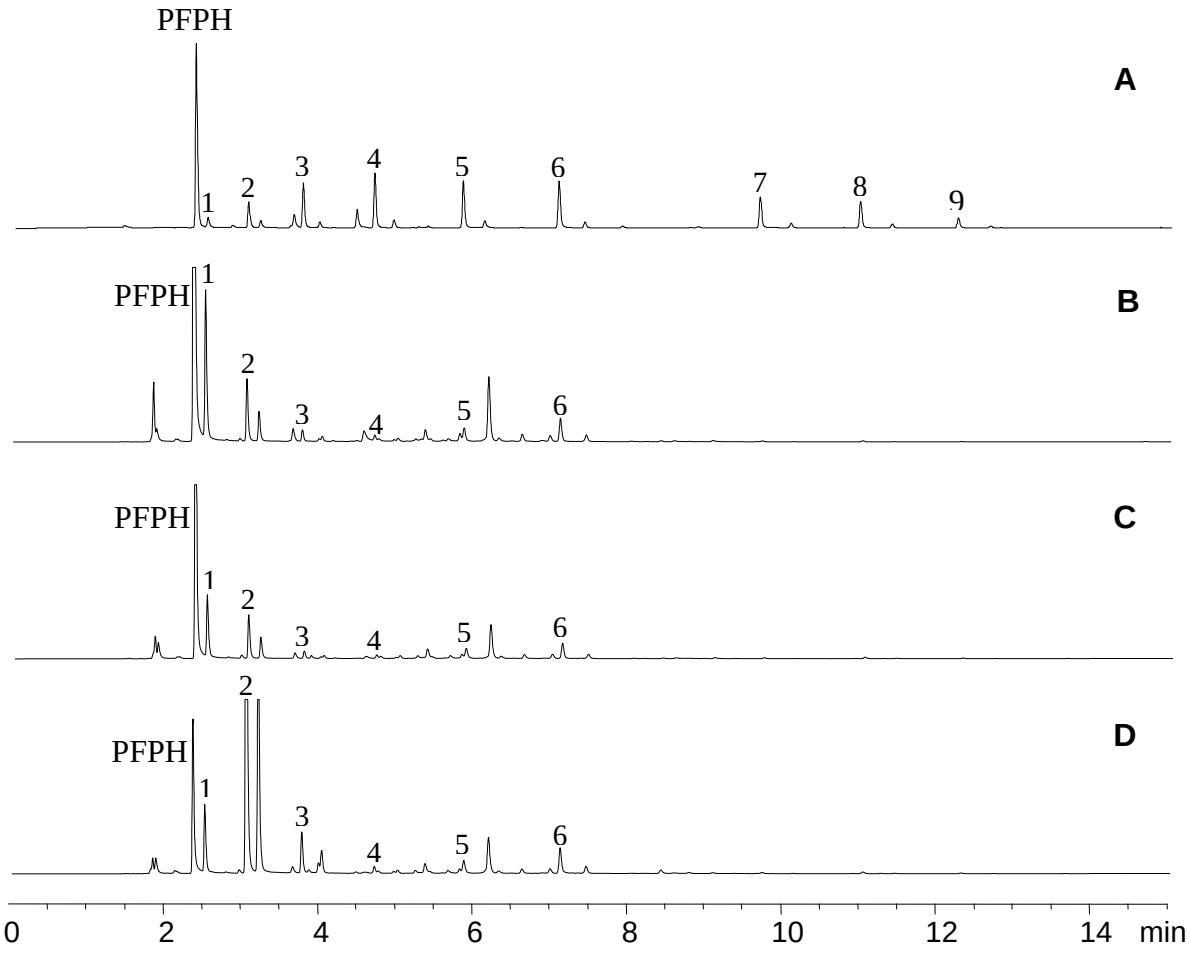


Figura 75. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar de aldehídos, C_2-C_{10}, en metanol (60 µmoles/L); **B**. Aceite de *Girasol Gourmet*; **C**. Aceite de *Girasol Premier* y, **D**. Aceite *Oleocalí*, *Cero Colesterol*. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.2.2.2**.

3.5.2.3 Monitoreo de compuestos carbonílicos de origen biogénico, por HS-SPME, con derivatización directa sobre la fibra con PFPH. El estudio de los compuestos emitidos a la atmósfera por las especies vivas, *e.g.*, plantas, como mecanismo de defensa y/o reproducción, o parte de su metabolismo, tiene gran importancia en las áreas de fitoquímica, fisiología vegetal y química atmosférica. La determinación de los compuestos orgánicos volátiles de origen biogénico (BVCO), liberados por las plantas, permite entender mejor los procesos biológicos involucrados en su producción, emisión y efectos sobre patógenos, depredadores y animales herbívoros y los procesos fotoquímicos (oxidación de terpenos) que ocurren en la atmósfera.

En la **Figura 76**, aparecen los perfiles cromatográficos obtenidos por GC/ECD, de los derivados (PFPH-hidrazonas) de aldehídos alifáticos patrón y aquellos, presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, obtenidos bajo las condiciones experimentales descritas en la **Sección 2.6.2.3**. Mediante la derivatización (PFPH) de los compuestos carbonílicos de la fragancia, se confirmó la presencia de los aldehídos alifáticos lineales, *i.e.* hexanal, nonanal y decanal, extraídos también por HS-SPME, sin derivatización. Fue detectado también el etanal, presente en la fragancia de las flores en concentración tan baja, que no fue registrado por HS-SPME/GC-MS, sin derivatización. Los demás compuestos identificados por GC/ECD, mediante la comparación de sus tiempos de retención con los de patrones certificados, analizados bajo las mismas condiciones operacionales, también se registraron en HS-SPME/GC-MS sin derivatización, a saber, benzaldehído, citronelal y geranial (Molina J. L., 2005).

Las fragancias obtenidas de las flores de *B. suaveolens*, *in vivo* e *in vitro*, fueron cualitativamente similares. La diferencia estuvo en el incremento de la cantidad de aldehídos detectados, cuando se llevó a cabo el muestreo *in vivo*. Posiblemente, los aldehídos se evaporaban de las flores cortadas en mayor grado, que cuando el monitoreo de volátiles se realizaba *in vivo*.

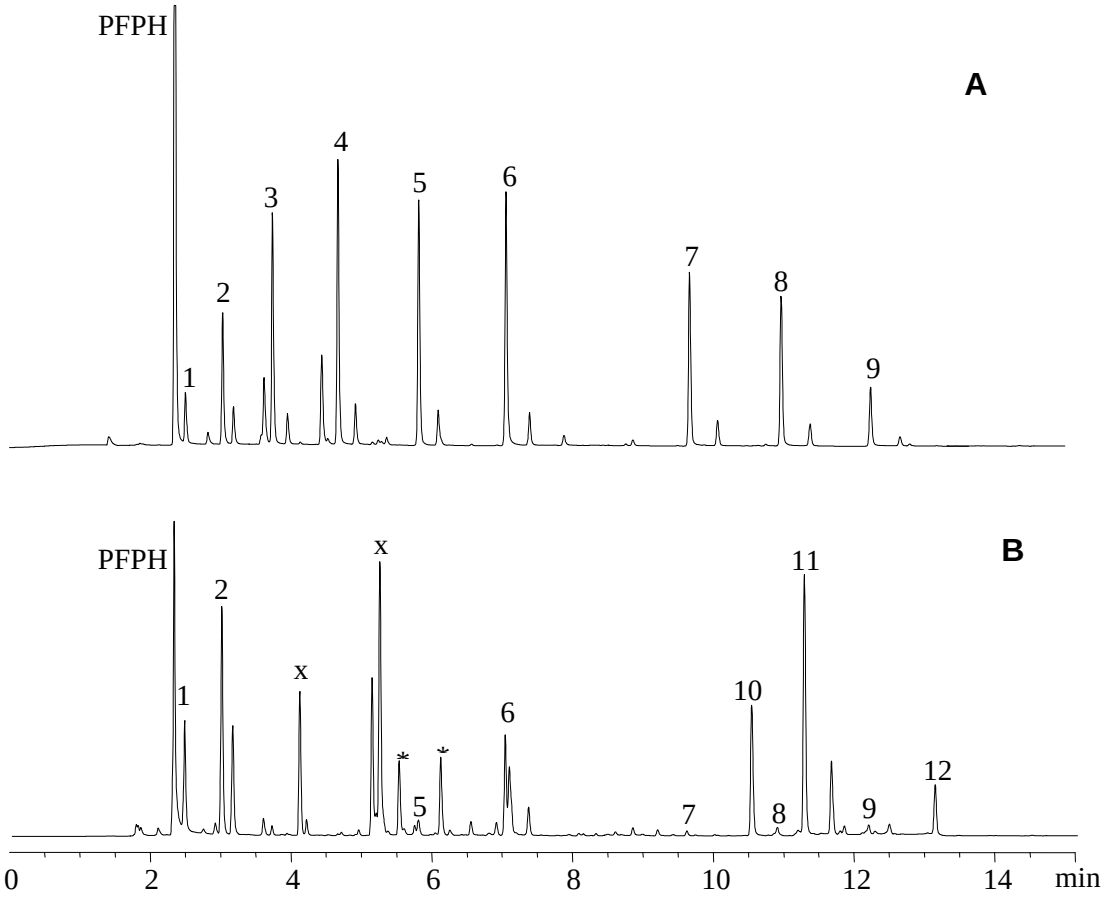


Figura 76. Perfiles cromatográficos de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en: **A**. Un estándar de aldehídos, C_2-C_{10}, en metanol (60 µmoles/L); **B**. Fragancia de flores de *B. suaveolens*. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal, 2- Etanal; 3- Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal; 10- Benzaldehído; 11- Citronelal; 12- Geranial; (*)- Impurezas del reactivo derivatizante; "x"– Posiblemente isopentanal. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.2.3**.

3.5.3. Aplicaciones ambientales. La SPME se ha utilizado ampliamente en análisis ambiental, para la determinación de analitos tales como pesticidas, BTEX, PAHs, PCBs, en fases sólida y líquida. Sin embargo, su aplicación para la determinación de compuestos carbonílicos y carboxílicos en fase gaseosa, en combinación con la derivatización química, ha sido poco explotada (Pan L. *et al*., 1995; Pan L. y Pawliszyn J., 1997; Martos P. A. y Pawliszyn J., 1998).

En este trabajo, se combinó la derivatización de los aldehídos sobre la fibra de PDMS/DVB, saturada previamente con PFPH, con la detección por GC/ECD. La derivatización de ácidos carboxílicos se llevó a cabo en medio acuoso, con posterior extracción de los derivados por HS-SPME. Las metodologías fueron aplicadas a muestras reales (aire interior, emisiones de escape de autos y aguas lluvia).

3.5.3.1 Cuantificación de compuestos carbonílicos volátiles en aire interior (*indoors*). La HS-SPME-GC/ECD con derivatización (PFPH) sobre la fibra, fue aplicada a muestras reales, usando las mismas condiciones operacionales de la calibración del método (Véase **Secciones 2312** y **3.3.1.2**). El perfil cromatográfico de los aldehídos presentes en el aire interior de una fábrica de calzado, se presenta en la **Figura 77**. Como componente carbonílico principal, se encontró metanal, seguido de etanal y heptanal. En la **Tabla 41** aparecen los componentes carbonílicos volátiles, cuantificados en el aire interior de la fábrica de calzado, siguiendo las condiciones operacionales descritas en la **Sección 2.6.3.1**.

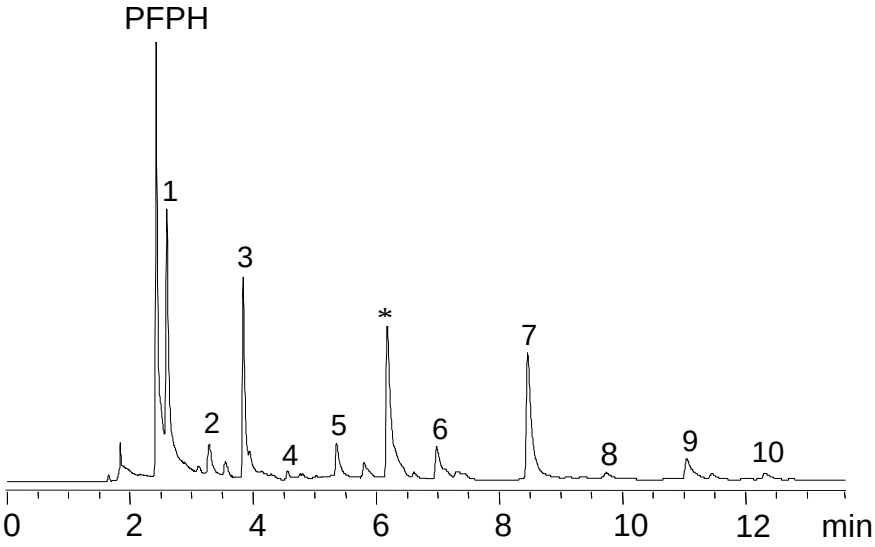


Figure 77. Perfil cromatográfico de aldehídos volátiles, medidos como sus PFPH-hidrazonas, en el aire interior de una fábrica de calzado. HS-SPME; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). 1- Metanal; 2- Etanal; 3-Propanal; 4- Butanal; 5- Pentanal; 6- Hexanal; 7- Octanal; 8- Nonanal; 9- Decanal. (*)- Sin identificar. Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.3.1**.

Aunque las concentraciones detectadas en el aire del lugar de trabajo, están en el orden de los ng/m^3, por debajo de los límites permisibles, los cuales son del orden de los mg/m^3, la exposición continua a los aldehídos volátiles, puede generar irritaciones en la mucosa respiratoria y otros problemas pulmonares y de alergias.

Tabla 41. Aldehídos volátiles determinados como sus PFPH-hidrazonas, en el aire interior de dos zonas de una fábrica de calzado, con diferentes operaciones de manufactura. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Aldehído	Cantidad, *ng/m³* (± s, n=2)	
	Zona I*	Zona II**
Etanal	60 ± 4	50 ± 1
Propanal	60 ± 2	103,3 ± 0,9
Butanal	9,8 ± 0,4	7,2 ± 0,2
Pentanal	20 ± 1	15,4 ± 0,7
Hexanal	12 ± 1	13,2 ± 0,4
Octanal	10 ± 1	8,0 ± 0,3
Nonanal	11,1 ± 0,8	13,4 ± 0,2
Decanal	40 ± 2	25,8 ± 0,5

(*) Zona I: En esta zona, se realiza el remonte del cuero sobre las hormas metálicas; este proceso, a la vez, involucra actividades "contaminantes" tales como la pega y la quema del cuero. **(**) Zona II:** En esta zona, se emplantilla el zapato, se dan acabados a la suela y se usan limpiadores para retirar los restos de impurezas y brillar el calzado.

3.5.3.2 Cuantificación de compuestos carbonílicos y carboxílicos volátiles, en gases de tubo de escape de carros operados con gasolina. Las metodologías de SPME, también fueron aplicadas al estudio de sustancias carbonílicas y carboxílicas, presentes en las emisiones de automóviles operados con gasolina. Los detalles del procedimiento seguido, se presentan en la **Sección 2.6.3.2**. En la **Tabla 42**, se registran los aldehídos y en la **Tabla 43**, los ácidos carboxílicos, detectados en los gases de escape, de los automóviles, con y sin convertidor catalítico. La **Figura 78**, presenta el perfil cromatográfico de los ésteres de PFB, derivados de los ácidos carboxílicos emitidos a la atmósfera por el auto sin convertidor catalítico.

Tabla 42. Aldehídos volátiles determinados como sus PFPH-hidrazonas, en el aire de tubos de escape de automóviles operados con gasolina. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PDMS-DVB (d_f = 65 µm); Columna DB-5 (30 m).

Aldehído	Cantidad, *ng/m³* (± s, n=2)	
	Sin convertidor	**Con convertidor**
Etanal	400 ± 15	500 ± 28
Propanal	200 ± 18	110 ± 3
Butanal	54,1 ± 0,8	80 ± 8
Pentanal	100 ± 2	80 ± 4
Hexanal	80 ± 2	20 ± 2
Octanal	50 ± 5	9,6 ± 0,4
Nonanal	10 ± 2	4,7 ± 0,7
Decanal	20 ± 3	10,5 ± 0,2
TOTALES C_2-C_{10}	**914± 48**	**814± 46**

Tabla 43. Ácidos carboxílicos de bajo peso molecular, determinados como sus ésteres de PFB, en el aire de tubos de escape de automóviles operados con gasolina. HS-SPME-GC/ECD; Fibra PA (d_f = 80 µm); Columna DB-5 (30 m).

Ácido	Cantidad, *mg/m³* (± s, n=2)	
	Sin convertidor	**Con convertidor**
Ácetico	43,6 ± 0,9	50 ± 3
Propanoico	6,2 ± 0,2	N.D
Butanoico	8,8 ± 0,2	0,053± 0,006
Pentanoico	0,220 ± 0,007	0,18± 0,02
Hexanoico	0,20 ± 0,01	0,045 ± 0,004
Benzoico	2,11 ± 0,07	0,27 ± 0,02
TOTALES	**61.1±1 .4**	**51±3**

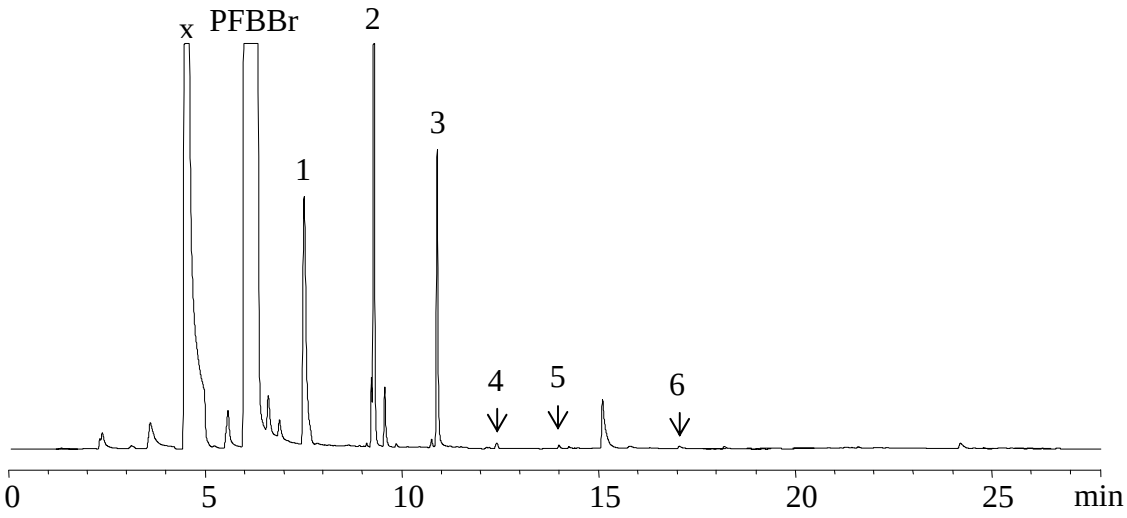


Figura 78. Perfil cromatográfico de ácidos carboxílicos volátiles, a saber: 1- Ácetico; 2- Propanoico; 3- Butanoico; 4- Pentanoico; 5- Hexanoico; 6- Benzoico, medidos como sus ésteres de PFB, en el aire del tubo de escape de un carro sin convertidor catalítico. "X" – Tentativamente, ácido fórmico. HS-SPME; Fibra PA (d_f = 80 µm). GC/ECD; Columna DB-5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Véase detalles operacionales en la **Sección 2.6.3.2**.

Los autos operados con gasolina, con y sin convertidor catalítico, son una fuente móvil importante en la contaminación atmosférica por aldehídos; aunque el convertidor catalítico reduce las cantidades de aldehídos emitidas a la atmósfera, principalmente, de los aldehídos más pesados (C_6-C_9), contribuye también notoriamente con los más livianos, especialmente, con el etanal. Los ácidos carboxílicos, se reducen casi completamente cuando se usa un convertidor catalítico, con excepción del ácido acético, y, tentativamente, del ácido fórmico.

3.5.3.3 Cuantificación de sustancias carbonílicas y carboxílicas en aguas lluvia. El análisis de las aguas lluvia, se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en la **Sección 2.6.3.3**. La derivatización de los analitos con PFBBr, mostró, que el ácido acético fue el único ácido presente en la matriz líquida, en una concentración de 110 ± 8.3 µmoles/L. El análisis del *headspace* de las aguas lluvia, mediante HS-SPME con derivatización (PFPH) sobre la fibra, no reveló la presencia de aldehídos en la matriz.

Las metodologías, basadas en la SPME, para el análisis de aldehídos y ácidos volátiles, resultan muy apropiadas para el estudio de estos analitos en diferentes matrices ambientales. En todas las evaluaciones realizadas, la sensibilidad y la reproducibilidad fueron altas y los coeficientes de variación fueron aceptables para todas las sustancias estudiadas (*CV* = 10-15%, n=2).

4. CONCLUSIONES

El uso de la derivatización química en fase sólida o en solución, combinada con métodos de muestreo basados en la microextracción en fase sólida (SPME), permitió desarrollar procedimientos analíticos para la determinación de aldehídos y ácidos carboxílicos, presentes en diferentes matrices en cantidades traza. Para el análisis de los aldehídos, se utilizó la SPME en modo *headspace* (HS-SPME) con derivatización directa sobre la fibra, usando pentaflúorfenilhidracina (PFPH) e hidracinobenzotiazol (HBT). Los derivados hidrazónicos, se analizaron por cromatografía de gases con ECD y FPD, respectivamente. Aunque en ambos casos se obtuvieron selectividad y sensibilidad altas, en tiempos relativamente cortos (5-40 min, dependiendo de la matriz a estudiar), la presencia de 5 átomos de flúor en la molécula de PFPH, permitió alcanzar límites de detección más bajos (pmoles/L, pg/m^3), al usar ECD. Para la determinación de los ácidos carboxílicos, se aplicó la derivatización con PFBBr en fase acuosa, seguida del análisis de los ésteres de PFB, mediante HS-SPME-GC/ECD.

El uso de bolsas *Tedlar*® en combinación con la SPME, resultó ser una técnica limpia, rápida, sencilla y reproducible, para el monitoreo de VOC´s en aire. Las bolsas *Tedlar*®, con buena hermeticidad y resistencia a la permeación -hacia adentro y hacia fuera- de los gases, permitieron almacenar los compuestos volátiles (*e.g*., aldehídos o ácidos carboxílicos), por periodos de tiempo superiores a las 24 horas, sin cambios en la identidad de los analitos. Los porcentajes de recuperación de los compuestos carbonílicos (C_2-C_{10}, ≥ 98%) y carboxílicos (C_2-C_6, 90-100%), en estudio, indican que sólo una pequeña fracción de éstos se absorbió sobre las paredes de la bolsa o se escapó por difusión.

El método de HS-SPME con derivatización con PFPH, directamente sobre la fibra de PDMS/DVB (d_f = 65 μm), implementado para el análisis de aldehídos volátiles (C_2-C_{10}) en matrices gaseosas y acuosas, presentó LODs del orden de los

pmoles/L y pg/m^3, respectivamente. En matrices líquidas los LODs fueron de 12, 73, 66 pmoles/L para etanal, nonanal y octanal, respectivamente, mientras que, para butanal (135 pmoles/L), pentanal (188 pmoles/L), hexanal (209 pmoles/L), propanal (247 pmoles/L) y decanal (291 pmoles/L), superaron los 100 pmoles/L. Para matrices gaseosas, los LODs estuvieron entre 35 y 274 pg/m^3, para todos los aldehídos evaluados. Tanto en fase gaseosa como en fase líquida, las recuperaciones fueron $\geq$ 98 %, la linealidad presentó valores de $R^2 > 0.995$ y los *CV* de las áreas cromatográficas no excedieron el 10%.

La HS-SPME/GC-ECD con derivatización de los ácidos con PFBBr en solución, implementada en este trabajo, permitió analizar ácidos carboxílicos (C_2-C_6 y benzoico), tanto en fase líquida (agua) como en fase gaseosa (aire). En todos los ensayos se observó buena reproducibilidad (*CV* $<$ 10%) del método. Los LODs para los ácidos en las fases líquida y gaseosa, se encontraron en los rangos de 13-185 nmoles/L y 12-271 µg/m^3, respectivamente. La linealidad de las curvas, en ambos casos, presentó valores de $R^2 \geq 0.997$. Las recuperaciones en matrices líquidas fueron $>$ 92%, para todos los analitos evaluados. En fase gaseosa, las recuperaciones fueron $>$ 99% para los ácidos con 3, 4 y 5 átomos de carbono, mientras que para los ácidos, acético y hexanoico, se encontraron alrededor del 90% y para el ácido benzoico no superaron el 7%; posiblemente el analito se adhiere a las paredes de las bolsas de muestreo o de las mangueras de *Teflón*, que se utiliza en la etapa de desorción de la matriz gaseosa hacia la trampa acuosa de K_2CO_3, involucrada en el análisis de ácidos carboxílicos.

La técnica de HS-SPME con derivatización con PFPH sobre la fibra (PDMS/DVB, d_f = 65 µm), se usó para determinar aldehídos en diferentes *especímenes* biológicos (aliento, orina, saliva y sudor), donde los volúmenes de muestra y las concentraciones de los metabolitos son muy pequeñas. En las diferentes aplicaciones del método se observaron selectividad alta y sensibilidad buena

(NMD: pmoles/L y pg/m^3). La metodología constituye una técnica analítica no invasiva, de gran potencial en el área clínica, para la determinación biomarcadores de enfermedades como el cáncer. Por otro lado, la aplicación de la SPME en modo HS, cuando se trabaja con fluidos biológicos, resulta particularmente útil, para prevenir la contaminación de la superficie de la fibra con las biomacromoléculas, presentes en al muestra, y mejorar la selectividad del análisis.

La técnica de HS-SPME-GC/ECD, con derivatización con PFPH sobre la fibra (PDMS/DVB, d_f = 65 μm), es más apropiada que la técnica de HS-SPME-GC/FPD, con derivatización con HBT sobre la fibra (PA, d_f = 80 μm), para el análisis aldehídos en aceites vegetales. La derivatización con PFPH, permitió detectar los aldehídos C_2-C_6, en el aceite de *Girasol Premier*, sin usar, que no se registraron cuando la derivatización se llevo a cabo con HBT.

La técnica de HS-SPME-GC/ECD con derivatización con PFPH, sobre la fibra (PDMS/DVB, d_f = 65 μm), tiene un gran potencial en estudios biogénicos; su aplicación para el análisis de compuestos carbonílicos presentes en la fragancia de las flores de *B. suaveolens*, confirmó la presencia de hexanal, nonanal, decanal, benzaldehído, citronelal y geranial, detectados también por HS-SPME/GC-MS sin derivatización, y se registro etanal, presente en concentraciones traza, no detectadas por HS-SPME/GC-MS.

Las técnicas basadas en HS-SPME con derivatización química con los análogos fluorados, PFPH y PFBBr, implementadas en el presente trabajo, permitieron establecer que los autos operados con gasolina, con o sin convertidor catalítico, son una fuente móvil de contaminación atmosférica, con compuestos carbonílicos y carboxílicos, significativa. En las emisiones de tubos de escape de los autos sin y con convertidor catalítico, se detectaron los aldehídos C_2-C_{10}, en concentraciones totales de 914 ± 48 ng/m^3 y 815 ± 46, respectivamente; en ambos casos la mayor concentración correspondió al etanal. En las mismas muestras se

detectaron los ácidos C_2-C_6 y benzoico, en concentraciones totales de 61.1 ± 1.4 ng/m^3 y 51 ± 3, respectivamente. Aunque los convertidores catalíticos reducen notoriamente los ácidos C_3-C_6 y benzoico, se observan contribuciones significativas del ácido acético, el cual alcanzó valores de 43,6±0,9 ng/m^3 y 50±3 ng/m^3, en los autos sin y con convertidor catalítico, respectivamente.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. **AI, J**. Solid-Phase Microextraction for Quantitative Analysis in Nonequilibrium Situations. *Anal. Chem*., **69**, 1997, pp. 1230-1236.

2. **AKIO, S.; TAKAHIRO, Y. and KAZUYA, I**. Trace Analysis of Carbonyl Compounds by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after Collection as 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivates. *J. Chromatogr. A*., **844**(1-2), 1999, pp. 403-408.

3. **ALLEN, A. G. and MIGUEL, A. H.** Biomass Burning in the Amazon – Characterization of the Ionic Component of Aerosols Generated from Flaming and Smoldering Rain-Forest and Savannah. *Environ. Sci. Technol.,* **29** (2), 1995, pp. 486–493.

4. **ALPENDURADA, M. F.** Solid-Phase Microextraction. A promising Technique for Sample Preparation an Environmental Analysis. *J. Chromatogr. A.,* **889**, 2000, pp. 3-14.

5. **ALTSHULLER, A. P.** Production of Aldehydes as Primary Emissions and from Secondary Atmospheric Reactions of Alkenes and Alkanes During the Night and Early Morning Hours. *Atmos. Environ.*, 27a, 1993, pp. 21–32. Citado En: **KESSELMEIER, J. and STAUDT, M**. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J. Atmos. Chem.*, **33**, 1999, pp. 23–88.

6. **ANDERSON, L. G.; LANNING, J. A.; BARRELL, R.; MIYA, G. J.**; **JONES, R. H., and WOLFE, P.** Sources and Sinks of Formaldehyde and Acetaldehyde: An Analysis of Denver´s Ambient Concentration Data. *Atmos. Environ*., **30**, 1996, pp. 2113– 2133.

7. **ANDREAE, M. O.; TALBOT, R. W.; ANDREAE, T. W., and HARRIS, R. C.** Formic and Acetic Acids over Central Amazon Region, Brazil: I Dry season. *J. Geophys*. *Res*., **93**, 1988, pp. 1616-1624.

8. **ATKINSON, R.** Gas-Phase Tropospheric Chemistry of Organic Compounds. *Atmos. Environ*., **24**(A), 1990, pp. 1-41.

9. **ATKINSON, R., TUAZON, E. C. and ASCHMANN, S. M.** Products of the Gas-Phase Reactions of O_3 with Alkenes. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1995, pp. 1860–1866.

10. **ATKINSON, R. and AREY, J.** Atmospheric Chemistry of Biogenic Organic Compounds. *Acc. Chem. Res.,* **31**(9), 1998, p.p. 574-583.

11. **ATKINSON, R; TUAZON, E. C. and ASCHMANN, S. M.** Atmospheric Chemistry of 2-Pentanone and 2-Heptanone. *Environ. Sci. Technol.,* **34**(4), 2000, pp. 623-631.

12. **BAKEAS, E. B.; ARGYRIS, D. I. and SISKOS, P. A.** Carbonyl Compounds in the Urban Environment of Athens, Greece. *Chemosphere*, **52** (5), 2003, pp. 805-813.

13. **BALTUSSEN, E.; DAVID, F. and SANDRA, P.** Sorption Tubes Packed with Polydimethylsiloxane: A New and Promising Technique for the Preconcentration of Volatiles and Semivolatiles from Air and Gaseous Samples. *J. High Resolut. Chromatogr.*, **1998**, 21, pp. 332-340.

14. **BARCELONA, M. J.; LILJESTRAND, H. M. and MORGAN, J. J.** Determination of Low-Molecular-Weight Volatile Fatty Acids in Aqueous Samples. *Anal. Chem.*, **52**(2), 1980, pp. 321-325.

15. **BARSHICK, S-A. and GRIEST, W. H.** Trace Analysis of Explosives in Seawater Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem*., **70**(14), 1998, pp. 3015-3020.

16. **BARTELT, R. J. and ZILKOWSKI, B. W.** Nonequilbrium Quantitation of Volatiles in Air Streams by Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem*., **71**, 1999, pp. 92-101.

17. **BEAULIEU, J. C. and GRIMA, C. C.** Identification of Volatile Compounds in Cantaloupe at Various Developmental Stages Using Solid-Phase Microextraction. *J. Agric. Food. Chem.*, **49**(**3**), 2001, pp. 1345-1352.

18. **BLAU, K. and HALKET, J. M.** Handbook of Derivates for Chromatography. Second Edition. Chichester: John Wiley & Sons, 1993, 369 p.

19. **BOUCHARAT, C.; DESAUZIERS, V. and LE CLOIREC, P.** Experimental Design for the Study of Two Derivatization Procedures for Simultaneous GC Analysis of Acidic Herbicides and Water Chlorination by-Products. *Talanta*, **47**, 1998, pp. 311-323.

20. **BOYD-BOLAND, A. A. and PAWLISZYN, J.** Solid-Phase Microextraction of Nitrogen Containing Herbicides. *J. Chromatogr*., **704**, 1995, pp. 163-17.

21. **BOYD-BOLAND, A. A. and PAWLISZYN, J. B.** Solid-Phase Microextraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Alkylphenol Ethoxylate Surfactants in Water. *Anal. Chem.*, **68**(9), 1996, pp. 1521-1529.

22. **BRIDGES, J. W.; FRENCH, M. R.; SMITH, R. L., and WILLIAMS, R. T.** The Fate of Benzoic Acid in Various Species. *Biochem. J.*, **118**, 1970, p.p. 47–51.

23. **BRILL, J. H.; NARAYANAN B. A. and MCCORMICK J. P.** Selective Determination of Pentaluorobenzyl Ester Derivatives of Carboxylic Acids by GC Using Microwave Plasma and Mass Selective Detection. *Appl. Spectrosc*., **45**(10), 1991 pp.1617-1620.

24. **BULDT, A. and KARST, U.** N-Methyl-4-Hydrozino-7-Nitrobenzofurazan (MNBDH) as a New Reagent for Air Monitoring of Aldehydes and Ketones. *Anal. Chem.*, **71**(9), 1999, pp. 1893-1898.

25. **CALVERT, J. G. and STOCKWELL, W. R.** Acid Generation in the Troposphere by Gas-Phase Chemistry. *Environ. Sci. Technol*., **17**, 1983, pp. 428–443.

26. **CAREY, F. A.** Química Orgánica, 3th. Ed. Mc Graw Hill, Interamericana de España, S.A.U., 1999, 1131 p.

27. **CAREY, F. A. and RICHARD J.** Advanced Organic Chemistry. Parte A. Structure and Mechanisms. 3th. Sundberg, New york, 1990, 802 p.

28. **CARLIER, P.; HANNACHI, H. and MOUVIER, G.** The chemistry of Carbonyl Compounds in the Atmosphere. *Atmos. Environ*., **20,** 1986, pp. 2079-2099.

29. **CECINATO, A.; DI PALO, V.; MABILIA, R., and POSSANZINI, M.** Pentafluorophenylhydrazine as a Coating Reagent for the HRGC-MS Determination of Semi-Volatile Carbonyl Compounds in Air. *Chromatogr.*, **54**(3-4), 2001, pp. 263-269.

30. **CHAI, M.; ARTHUR, C.; PAWLISZYN, J.; BELARDI, R., and PRATT, K.** Determination of Volatile Chlorinated Hydrocarbons in Air and Water with Solid-Phase Microextraction. *Analyst*, **118**(12), 1993, pp. 1501-1505.

31. **CHAI, M. and PAWLISZYN, J. B.** Analysis of Environmental Air Samples by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometer. *Environ. Sci. Technol*., **29**(3), 1995, pp. 693-701.

32. **CHEBBI, A. and CARLIER, P.** Carboxylic acids in the Troposphere, Occurrence, Sources, and Sinks: a review. *Atmos. Environ.*, **30**(24), 1996, pp. 4233-4249.

33. **CHEN, J. and PAWLISZYN, J. B.** Solid-Phase Microextraction Coupled to High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, **67**(15), 1995, pp. 2530-2533.

34. **CHIEN, C-J.; CHARLES, M. J.; SEXTON, K. G., and JEFFRIES, H. E.** Analysis of Airborne Carboxylic Acids and Phenols as Their Pentafluorobenzyl Derivatives: Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry with a Novel Chemical Ionization Reagent, PFBOH. *Environ. Sci. Technol.*, **32**(2), 1998, pp. 299-309.

35. **CLEMENTS, J. B. and LEWIS, R. G.** Sampling for Organic Compounds. En: **KEITH**, **L. H**. (Editor). Principles of Environmental Sampling. U.S.A.: ACS Professional Reference Book, 1993, pp. 287-294.

36. **CORVALÁN, R.** Contaminación atmosférica en la ciudad de Santiago. Ciencia al día, **1**(1), 1998. Disponible en Internet En: http://www.ciencia.cl/Cienciaaldia/volumen1/número1/artículos/artículo5.html. Página visitada el 15 de noviembre de 2005.

37. **DABEK-ZLOTORZYNSKA, E. and McGRATH, M.** Determination of Low-Molecular-Weight Carboxylic Acids in the Ambient Air and Vehicle Emissions: a review. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **367**, 2000, pp. 507–518.

38. **DABEK-ZLOTORZYNSKA, E.; PIECHOWSKI, M.; McGRATH, M., and LAI, E.P.C.** Determination of Low-Molecular-Mass Carboxylic Acids in Atmospheric Aerosol and Vehicle Emission Samples by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A.*, **910**(2), 2001, pp. 331–345.

39. **DE LA CALLE, D.; MAGNAGHI, S.; REICHENBACHER, M., and DANZER, K.** Systematic Optimization of the Analysis of Wine Bouquet Components by Solid-Phase Microextraction. *J. High. Resolut. Chromatogr.,* **19**(5), 1996, pp. 257-262.

40. **DE LA CALLE, D.; REICHENBACHER, M.; DANZER, K.; HURLBECK, C., BARTZSCH, C., and FELLER K-H.** Analysis of Wine Bouquet Components using Headspace Solid-Phase Microextraction-Capillary Gas Chromatography. *J. High. Resolut. Chromatogr.,* **21**(7), 1998, pp.373-377.

41. **DE NERVES, N.** Ingeniería de control de la contaminación del aire. Traducción: José Hernán Pérez Castellanos. McGraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V., México, D.F., México. 1998, 543 p.

42. **DEMYTTENAERE J. C. R.; MARTINEZ J. I. S.; VERHE R.; SANDRA P.; KALLITHARAKA S.; KIMPE N. D.** *J. Chromatogr. A,* **985,** 2003, pp. 221-226. Mencionado En: **VAS, G.** and **VÉKEY K.** Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom*. **39**, 2004, p.p. 233-254.

43. **DESTAILLATS, H. and CHARLES, M. J.** Henry's Law Constants of Carbonyl-Pentafluorobenzyl Hydroxylamine (PFBHA) Derivatives in Aqueous Solution. *J. Chem. Eng. Data*, **47**(6), 2002, pp. 1481 –1487.

44. **DETTMER, K. and ENGEWALD, W.** Adsorbent Materials Commonly Used in Air Analysis for Adsorptive Enrichment and Thermal Desorption of Volatile Organic Compounds. *Anal. Bioanal. Chem.*, **373**(6), 2002, pp. 490-500.

45. **DOCHERTY, K. and ZIEMANN, P. J.** On-line, Inlet-based Trimethylsilyl Derivatization for Gas Chromatography of Mono- and Dicarboxylic Acids. *J. Chromatogr. A.*, **921**(2), 2001, pp. 265–275.

46. **DRAPER, W. M.** Biological Monitoring: Exquisite Research Probes, Risk Assessment, and Routine Exposure Measurement. *Anal. Chem*., **73**, 2001, pp. 2745-2760.

47. **ECA.** Total Volatile Organic Compounds (TVOC) in Indoor Air Quality Investigations (Report No. 19 EUR 17675 EN), Luxembourg, Commission of the European Communities, 1997. Disponible en Internet En: http://www.inive.org/medias/ECA/ECA_Report19.pdf. Página visitada el 15 de noviembre de 2005.

48. **EISERT, R. and PAWLISZYN, J.** New Trends in Solid-Phase Microextraction. *Crit. Rev. Anal. Chem.,* **27**(2), 1997, pp.103-135.

49. **Ezquerro, O.; Pons, B.; Tena, M. T.** *J. Chromatogr. A,* 2002; 963: 381. Mencionado En: **VAS, G.** and **VÉKEY K.** Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom*. **39**, 2004, p.p. 233-254.

50. **Ezquerro, O.; Pons, B.; Tena, M. T.** *J. Chromatogr. A* 2003; **985**: 247. Mencionado En: **VAS, G.** and **VÉKEY K**. Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom*. **39**, 2004, p.p. 233-254.

51. **FERON, V. J.; TIL, H. P.; DE VRIJER, F.; WOUTERSEN, R. A.; CASSEE F. R., and VAN B., P. J.** Aldehydes: Occurrence, Carcinogenic Potential, Mechanism of Action and Risk Assessment. *Mutation Res.*, **259**, 1991, pp. 363- 385.

52. **FFHPVC.** Test Plan for C_7-C_9 Aliphatic Aldehydes and Carboxylic Acids. The Flavor and Fragrance High Production Volume Consortia, 1999. Disponible en Internet En: http://www.epa.gov/chemrtk/alipalde/c13033rt.pdf.

53. **FRASER, M. P.; CASS, G. R. and SIMONEIT B, R. T.** Gas-Phase and Particle-Phase Organic Compounds Emitted from Motor Vehicle Traffic in Los Angeles Roadway Tunnel. *Environ. Sci. Technol*., **32**(14), 1998, pp. 2051-2060.

54. **FRAZEY, P.; RAO, X. and PAULDING, R.** The Power of Pentafluorobenzyl Alcohol Chemical Ionization/Ion Trap Mass Spectrometry to Identify Pentafluorobenzyl Derivatives of Oxygenated Polar Organics. *Int. J. Mass Spectrom*., **190**/**191**, 1999, pp. 343-357.

55. **FRIEDFELD, S.; FRASER, M.; ENSOR, K.; TRIBBLE, S.; REHLE D.; LELEUX D., and TITTEL, F.** Statistical Analysis of Primary and Secondary Atmospheric Formaldehyde. *Atmos. Environ*, **36**, 2002, pp. 4767–4775.

56. **FRUEKILDE, P.; HJORTH, J.; JENSEN, N. R.; KOTZIAS, D., and LARSEN, B.** Ozonolysis at Vegetation Surfaces: A Source of Acetone, 4-Oxopentanal, 6-Methyl-5-Epten-2-One, and Geranyl Acetone in the Troposphere, *Atmos. Environ.*, **32**, 1998, pp.1893–1902. Citado En: **KESSELMEIER J. and TAUDT M.** Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J. Atmos. Chem.*, **33**, 1999, pp. 23–88.

57. **FUCCI, N.; DE GIOVANNI, N. and CHIAROTTI, M.** Simultaneous Detection of Some Drugs of Abuse in Saliva Samples by SPME Technique. *Forensic Sci. Int.*, 134, 2003, pp. 40–45.

58. **GALCERAN, M. T.; MOYANO, E. and POZA, J. M.** Pentafluorobenzyl Derivates for the Gas Chromatographic Determination of Hydroxy-polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Aerosols. *J. Chromatogr. A.*, **710**, 1995, pp. 139–147.

59. **GALLOWAY, J. N.; LIKENS, G. E.; KEENE, W.C., and MILLER, J. M.** The Composition of Precipitation in Remote Areas of the World. *J. Geophys. Res*. **87**(11), 1982, pp. 8771-8786.

60. **GORLO, D.; WOLSKA, L.; ZYGMUNT, B., and NAMIESNIK, J.** Calibration Procedure for Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatographic Analysis of Organic Vapors in Air. *Talanta*, **44**(9), 1997, pp. 1543-1550.

61. **GORLO, D.; ZYGMUNT, B.; DUDEK, M.; JASZEK, A., and PILARCZYK, M.** Application of Solid-Phase Microextraction to Monitoring Indoor Air Quality. *Fresenius J. Anal. Chem.*, **363**(7), 1999, pp. 696-699.

62. **GRANBY, K.; CHRISTENSEN, C. S. and LOHSE, C.** Urban and Semirural Observations of Carboxylic Acids and Carbonyls. *Atmos. Environ.*, **31**, 1997, pp. 1403-1415.

63. **GROSJEAN, D.** Organic Acids in Southern California Air: Ambient Concentrations, Mobile Source Emissions, *In-Situ* Formation and Removal Processes. *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 1989, pp. 1506-1514.

64. **GROSJEAN, D.; MIGUEL, A. H. and TAVARES, T. M.** Urban Air Pollution in Brazil: Acetaldehyde and Other Carbonyls. *Atmos. Environ*., **24**(B), 1990, pp. 101-106.

65. **GROSJEAN, E. and GROSJEAN, D.** Carbonyl Products of the Gas Phase Reaction of Ozone with Symmetrical Alkenes. *Environ. Sci. Technol.*, **30**(6), 1996, pp. 2036-2044.

66. **GROSJEAN, E.; GREEN, P. G. and GROSJEAN, D.** Liquid Chromatography Analysis of Carbonyl (2, 4-Dinitrophenyl) Hydrazones with Detection by Diode Array Ultraviolet Spectroscopy and by Atmospheric Pressure Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, **71**(9), 1999, pp. 1851-1861.

67. **GROSJEAN, D.; GROSJEAN, E. and MOREIRA, L., F. R.** Speciated Ambient Carbonyls in Rio de Janeiro, Brazil. *Environ. Sci. Technol.*, **36**(7), 2002, pp. 1389-1395.

68. **GROTE, C. and PAWLISZYN, J.** Microextraction for the Analysis of Human Breath. *Anal. Chem.,* **69**, 1997**,** pp. 587-596.

69. **HALL, B. J. and BRODBELT, J. S.** Determination of Barbiturates by Solid – Phase Microextraction (SPME) and Ion Trap Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A.,* **777**(2), 1997, pp. 275-282.

70. **HALL B. J.; SATTERFIELD-DOERR, M.; PARIKH, A. R., and BRODBELT, J. S**. Determination of Cannabinoids in Water and Human Saliva by Solid-Phase Microextraction and Quadrupole Ion Trap Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem*. **70**, 1998, pp. 1788-1796.

71. **HANADA, Y.; IMAIZUMI, I.; KIDO, K.; TANIZAKI, T.; KOGA, M.; SHIRAISHI, H., and SOMA, M.** Application of a Pentafluorobenzyl Bromide Derivatization Method in Gas Chromatography/Mass Spectrometry of Trace Levels of Halogenated Phenols in Air, Water and Sediment Samples. *Anal. Sci.*, **18**, 2002, pp. 655-659.

72. **HARPER, M.** Sorbent Trapping of Volatile Organic Compounds from Air. *J. Chromatogr. A.*, **885**(1-2), 2000, pp. 129-151.

73. **HATANAKA, A. and HARADA, T.** Formation of *cis*-3-Hexenal, *trans*-2-Hexenal and *cis*-3-Hexenol in Macerated *Thea sinensis* Leaves. *Phytochemistry*, **12**, 1973, pp. 2341–2346. Citado En: **KESSELMEIER J. and STAUDT M**. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J. Atmos. Chem.*, **33**, 1999, pp 23–88.

74. **HATANAKA, A.; KAJIWARA, T. and SEKIYA, J.** Biosynthetic Pathway for C_6-Aldehyde Formation from Linolenic Acid in Green Leaves. *Chem. Phys. Lipids* 44, 1987, pp. 341–361.

75. **HATANAKA, A.** The Fresh Odor Emitted by Plants. *Food Rev. Internat.*, **12**, 1996, pp. 303–350. Citado En: **KESSELMEIER J. and STAUDT M**. Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J. Atmos. Chem.*, **33**, 1999, pp. 23–88.

76. **HO S., S. H. and YU, J. Z.** Feasibility of Collection and Analysis of Airborne Carbonyls by On-Sorbent Derivatization and Thermal Desorption. *Anal. Chem.*, **74**(6), 2002, pp. 1232-1240.

77. **HOLLENDER, J.; SANDNER, F.; MÖLLER, M., and DOTT, W.** Sensitive Indoor Air Monitoring of Monoterpenes Using Different Adsorbents and Thermal Desorption Gas Chromatography with Mass-Selective Detection. *J. Chromatogr. A*, **962**(1-2), 2002, pp. 175-181.

78. **HOUDIER, S.; LEGRAND, M.; BOTURYN, D.; CROZE, S.; DEFRANCQ, E., and LHOMME, J.** A New Fluorescent Probe for Sensitive Detection of Carbonyl Compounds. *Anal. Chim. Acta*, **382**(3), 1999, pp. 253-263.

79. **HUANG**, **M. K.; LIU**, **C. R., and HUANG**, **S. D.** One Step and Highly Sensitive Headspace Solid-Phase and Amphetamine in Human Urine. *Analyst*, **127** (9), 2002, pp. 1203-1206.

80. **HUESTIS, M. A.; OYLER, J. M.; CONE, E. J.; WSTADIK, A. T.; SCHOENDORFER, D., and JOSEPH, R. E**. Sweat Testing for Cocaine, Codeine and Metabolites by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **733**,1999, pp. 247–264.

81. **IARCa.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Wood Dust and Formaldehyde. *International Agency for Research on Cancer*, **62**, 1995, p. 217. WHO publications, Lyon, France. Disponible en Internet En:: http://monographs.iarc.fr/htdocs/indexes/vol62index.html.

82. **IARCb.** Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. *International Agency for Research on Cancer*, **71**, 1999, p. 319. WHO publications, Lyon, France. Disponible en Internet En:: http://monographs.iarc.fr/htdocs/indexes/vol71index.html.

83. **IEH.** *Indoor Air Quality in the Home: Final Report on DETR Contract EPG 1/5/12*, Institute for Environment and Health, Leicester, UK, 2001. Disponible en Internet En: http://www.le.ac.uk/ieh/publications/publications.html.

84. **INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.).** Committee on the Assessment of Asthma and Indoor Air. Clearing the air: Asthma and Indoor Air Exposures. National Academy Press, Washington, D.C., **2003**, 456p.

85. **JANG, M. and KAMENS, R. M.** Newly Characterized Products and Composition of Secondary Aerosols from the Reaction of α-Pinene with Ozone. *Atmos. Environ.*, **33**, 1999, pp. 459-474.

86. **JENNINGS, K. R. and WHITING A.** Competing Metastable Transitions of the $[C_7H_6F]^+$ Ion. *Org. Mass Spectrom.*, **6** (8), 1972, pp. 917-921.

87. **JINNO, K.; SAITO, Y.; KISO, Y.; YAMAGUCHI, K.; YAMAGAMI, T.; MAGDIC, S.; ORTON, M., and PAWLISZYN, J.** Extraction and Analysis of Pesticides in Environmental Water Samples with SPME/GC/MS. *16th International Symposium on Capillary Chromatogr.* Riva del Garda, Italy. 1994, p. 325.

88. **JONES**, **A. P.** Indoor Air Quality and Health. *Atmos. Environ.*, **33**, 1999, pp. 4535-4564.

89. **JURADO, C.; GIMENEZ, M. P.; SORIANO, T.; MENENDEZ, M., and REPETTO, M.** Rapid Analysis of Amphetamine, Methamphetamine, MDA, and MDMA in Urine Using Solid-Phase Microextraction, Direct On-Fiber Derivatization, and Analysis by GC-MS. *J. Anal. Toxicol*. **24**(1), 2000, pp. 11-16.

90. **JURVELIN, A. J.** Personal Exposures to Volatile Organic Compounds and Carbonyls: Relationships to Microenvironment Concentrations and Analysis of Sources. National Public Health Institute, Kuopio, Finland, A9, 2003, 92 p. Disponible en Internet En: http://www.ktl.fi/publications/2003/a9.pdf.

91. **KANAZU, T. and YAMAGUCHI, T.** Comparison of *In Vitro* Carnitine and Glycine Conjugation with Branched-Side Chain and Cyclic Side Chain Carboxylic Acids in Rats. *Drug Metab. Dispos*., **25**(2), 1997, pp 149-153.

92. **KATAOKA, H.; LORD, H. L., and PAWLISZYN, J. B.** Applications of Solid-Phase Microextraction in Food Analysis. *J. Chromatogr. A.*, **880** (1-2), 2002, pp. 35–62.

93. **KATZ, G. V. and GUEST, D.** Aliphatic Carboxylic Acids in Patty's Industrial Hygiene Toxicology. 4th Edition., Vol. IID, Chpt. **36**, 1994, pp. 3523-3671.

94. **KAWAHARA, F. K.** Microdetermination of Pentafluorobenzyl Ester Derivatives of Organic Acids by Means of Electron Capture Gas Chromatography. *Anal. Chem*., **40**(13), 1968, pp. 2073-2075.

95. **KAWAMURA, K.** Identification of C_2-C_{l0} Oxocarboxylic Acids, Pyruvic Acid, and C_2-C_3 Dicarbonyls in Wet Precipitation and Aerosol Samples by Capillary GC and GC/MS. *Anal. Chem.,* **65**(**23**), 1993, pp. 3505-3511.

96. **KAWAMURA, K. and KAPLAN, I. R.** Determination of Organic Acids (C_l-C_{l0}) in the Atmosphere, Motor Exhausts, and Engine Oils. *Environ. Sci. Technol.,* **19**(11), 1985, pp. 1082-1086.

97. **KAWAMURA, K. and KAPLAN, I. R.** Biogenic and Anthropogenic Organic Compounds in Rain and Snow Samples Collected in Southern California. *Atmos. Environ.*, *20*, 1986, 115–124.

98. **KAWAMURA, K. and KAPLAN, I. R.** Motor Exhaust Emissions as a Primary Source for Dicarboxylic Acids in Los Angeles Air. *Environ. Sci. Technol*., **21**(1), 1987, pp. 105–110.

99. **KAWAMURA, K. and GAGOSIAN, R. B.** Mid-Chain Ketocarboxylic Acids in the Remote Marine Atmosphere: Distribution Patterns and Possible Formation Mechanisms. *J. Atmos. Chem.*, **11**, 1990, pp.107-122.

100. **KAWAMURA K. and USUKURA K.** Distributions of Low-Molecular-Weight Dicarboxylic Acids in the North Pacific Aerosol Samples. *J. Oceanogr.*, **49**, 1993, pp. 271-283.

101. **KAWAMURA, K. and IKUSHIMA K.** Seasonal Changes in the Distribution of Dicarboxylic Acids in the Urban Atmosphere. *Environ. Sci. Technol.*, **27**(10), 1993, pp. 2227-2235.

102. **KEENE, W. C., GALLOWAY, J. N. and HOLDEN, J. D.** Measurement of Weak Organic Acidity in Precipitation from Remote Areas of the World. *J. Geophys. Res.*, **88**, 1983, pp. 5122–5130.

103. **KEENE, W. C. and GALLOWAY, J. N.** Organic Acidity in Precipitation of North America, *Atmos. Environ*., **18**, 1984, pp. 2491-2497.

104. **KELLEY, T. J.; SMITH, D. L. and SATOLA, J.** Emission Rates of Formaldehyde from Materials and Consumer Products Found in California Homes. *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 1999, pp. 81-88.

105. **KESSELMEIER, J. and STAUDT, M.** Biogenic Volatile Organic Compounds (VOC): An Overview on Emission, Physiology and Ecology. *J. Atmos. Chem.,* **33**, 1999, pp. 23–88.

106. **KHALED, A. and PAWLISZYN, J.** Time-Weighted Average Sampling of Volatile and Semi-Volatile Airborne Organic Compounds by the Solid-Phase Microextraction Device. *J. Chromatogr. A.*, **892**(1-2), 2000, pp. 455–467.

107. **KIDWELL, D. A.; HOLLAND, J. C. and ATHANASELIS, S.** Testing for Drugs of Abuse in Saliva and Sweat. *J. Chromatogr. B.*, **713**, 1998, pp. 111–135.

108. **KIELY, G.** Ingeniería Ambiental: Fundamentos, Entornos, Tecnologías y Sistemas de Gestión. España: McGraw-Hill Interamericana de España, **2**, 1996, pp. 453-526.

109. **KOECK, M.; PICHLER-SEMMELROCK, F. P. and SCHLACHER, R.** Formaldehyde Study of Indoor Air Pollution in Austria. Central European. *J. Public Health,* **5**(3), 1997, pp. 127-130.

110. **KOLLIKER, S.; OEHME, M. and DYE, C.** Structure Elucidation of 2,4-Dinitrophenylhydrazone Derivatives of Carbonyl Compounds in Ambient Air by HPLC/MS and Multiple MS/MS Using Atmospheric Chemical Ionization in the Negative Ion Mode. *Anal. Chem.*, **70**(9), 1998, pp. 1979-1985.

111. **KOZIEL, J. A.; NOAH, J. and PAWLISZYN, J.** Field Sampling and Determination of Formaldehyde in Indoor Air with Solid-Phase Microextraction and On-Fiber Derivatization. *Environ. Sci. Technol*., **35**(7), 2001, pp. 1481-1486.

112. **LAMBROPOULOU, D. A.; KONSTANTINOU, I. K. and ALBANIS, T. A.** Determination of Fungicides in Natural Waters Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Coupled with Electron-Capture and Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr.* A., **893**(1), 2000, pp. 143-156.

113. **LAMBROPOULOU, D. A. and TRIANTAFYLLOS, A.** Headspace Solid Phase Microextraction Applied to the Analysis of Organophosphorus Insecticides in Strawberry and Cherry Juices**.** *J. Agric. Food. Chem.*, **50**(12), 2002, pp. 3359-3365.

114. **LARSEN, B. R.; BRUSSOL, C. and KOTZIAS, D.** Sample Preparation for Radiocarbon (^{14}C) Measurements of Carbonyl Compounds in the Atmosphere: Quantifying the Biogenic Contribution. *Atmos. Environ.*, 32(9), **1998**, pp. 1485-1492.

115. **LAWRENCE, J. E. and KOUTRAKIS, P.** Measurement of Atmospheric Formic and Acetic Acids: Methods Evaluation and Results from Field Studies. *Environ. Sci. Technol.* 1994, *28,* 957-964.

116. **LAWRENCE, J. E. and KOUTRAKIS, P.** Measurement and Speciation of Gas and Particulate Phase Organic Acidity in an Urban Environment. *J. Geophys. Res*., **101**(D4), 1996, pp. 9159-9170.

117. **LEE, M-R.; YEH, Y-C.; HSIANG, W-S., and HWANG B. H.** Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for Determining Chlorophenols from Landfill Leaches and Soil. *J. Chromatogr. A.*, **806**(2), 1998a, pp. 317–324.

118. **LEE, M-R; LEE, R-J. and LIN, Y-W.** Gas-Phase Post-derivatization Following Solid-Phase Microextraction for Determining Acidic Herbicides in Water. *Anal. Chem.*, **70**(9), 1998b, pp. 1963-1968.

119. **LEHMPUHL, D. W. and BIRKS, J. W.** New Gas Chromatographic-Electron Capture Detection Method for the Determination of Atmospheric Aldehydes and Ketones Based on Cartridge Sampling and Derivatization with 2, 4, 6-Trichlorophenylhydrazine. *J. Chromatogr. A.*, **740**, 1996, pp. 71-81.

120. **LEVART, A. and VEBER, M.** Determination of Aldehydes and Ketones in Air Samples Using Cryotrapping Sampling. *Chemosphere,* **44**, 2001, pp. 701-708.

121. **LEVINE, S. P.; HARVEY, T. M.; WAEGHE, T. J., and SHAPIRO, R. H.** O-Alkyloxime Derivate for Gas Chromatographic and Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Determination of Aldehydes. *Anal. Chem.*, **53**(6), 1981, pp. 805-809.

122. **LEVY G.** Pharmacokinetics of Salicylate Elimination in Man. *J. Pharm. Sci.* **54,** 1965, pp. 959–967. Citado En: Kanazu T. and Yamaguchi T. Comparison of *In Vitro* Carnitine and Glycine Conjugation with Branched-Side Chain and Cyclic Side Chain Carboxylic Acids in Rats. *Drug Metab. Dispos*., 25(2), 1997, pp 149-153.

123. **LIMBECK, A. and PUXBAUM, H.** Organic Acids in Continental Background Aerosols. *Atmos. Environ.*, **33**, 1999, pp. 1847-1852.

124. **LIPARI, F. and SWARIN, S. J.** Determination of Formaldehyde and other Aldehydes in Automobile Exhaust with an Improved 2,4-dinitrophenylhydrazine Method. *J. Chromatogr*., **247**, 1982, pp.297-306.

125. **LIPARI, F., DASCH, J. M. and SCRUGGS, W. F.** Aldehyde Emissions from Wood-Burning Fireplaces. *Environ. Sci. Technol*., **18**, 1984, 326-330.

126. **LLOMPART M.; LI K. and FINGAS, M.** Headspace Solid-Phase Microextraction for the Determination of Volatile and Semi-volatile Pollutants in Water and Air. *J. Chromatogr. A.,* **824**, 1998, pp. 53-61.

127. **LORD, H. and PAWLISZYN, J**. Microextraction of Drugs. *J. Chromatogr. A,* **902**(1*),* 2000, pp. 17-63.

128. **LORD, H.; YU, Y.; SEGAL, A. and PAWLISZYN, J.** Breath Analysis and Monitoring by Membrane Extraction with Sorbent Interface. *Anal. Chem*., **74**, 2002, pp. 5650-5657.

129. **LUNDE, G.; GEHTER, J. and LANDE, M. B.** Organic Micropollutants in Precipitation in Norway. *Atmos. Environ.*, **11**, 1977, pp. 1007-1014.

130. **McCLENNY, W. A.; COLÓN, M. and OLIVER, K. C.** Ozone Reaction with n-Aldehydes *(*n=4–10), Benzaldehyde, Ethanol, Isopropanol, and n-Propanol Adsorbed on a Dual-Bed Graphitized Carbon–Carbon Molecular Sieve Adsorbent Cartridge. *J. Chromatogr. A*, **929**(1-2), **2001**, pp. 89-100.

131. **MANI, V.** Properties of Commercial SPME Coatings. En: **PAWLISZYN, J.** (Editor). Applications of Solid Phase Microextraction. *Cambridge: Royal Society of Chemistry*, 1999. 654 p.

132. **MARTOS, P. A. and PAWLISZYN, J.** Calibration of Solid Phase Microextraction for Air Analyses Based on Physical Chemical Properties of the Coating. *Anal. Chem*., **69**(2), 1997, pp. 206-215.

133. **MARTOS, P. A. and PAWLISZYN, J.** Sampling and Determination of Formaldehyde Using Solid-Phase Microextraction with On-Fiber Derivatization. *Anal. Chem.*, **70**(11), 1998, pp. 2311-2320.

134. **MASQUÉ, N; GALIÁ, M; MARCÉ, R. M., and BORRULL, F.** Functionalized Polymeric Sorbents for Solid-Phase Extraction of Polar Pollutants. *J. High. Resolut. Chromatogr.,* **22**(10), 1999, pp. 547-552.

135. **MATSUNAGA, S. and KAWAMURA, K.** Determination of α- and β-Hydroxicarbonyls and Dicarbonyls in Snow and Rain Samples by GC/FID and GC/MS Employing Benzyl Hydroxyl Oxime Derivatization. *Anal. Chem*., **72**(19), 2000, pp. 4742-4746.

136. **MERCK-SCHUCHARDT OHG.** Ficha de Datos de Seguridad: PFPH (D-85662). Disponible en Internet en: http://www.chemdat.de/mda/co/index.html. Página visitada el 10 de enero de 2006.

137. **MOLINA G., J. L.** Estudio de la variación composicional de la fragancia de las flores de *Brugmansia suaveolens* durante el día y la noche. Tesis de grado. Universidad Industrial de Santander, 2005, 102p.

138. **MOORTGAT, G. K.** Important Photochemical Processes in the Atmosphere. *Pure Appl. Chem.*, **73**(3), 2001, pp. 487–490.

139. **NAMIEŚNIK, J.; GORLO, D.; WOLSKA, L., and ZYGMUNT B.** Analysis of Selected Gaseous Micropollutants in Air by Means of Solid Phase Microextraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Calibration Problems. *Analysis*, **26**, 1998, pp. 170-174.

140. **NAMIEŚNIK, J.; ZYGMUNT, B. and JASTRZECEDILBSKA, A.** Application of Solid-Phase Microextraction for Determination of Organic Vapours in Gaseous Matrices. *J. Chromatogr. A.*, **885**(1-2), 2000, pp. 405-418.

141. **NELSON, N.; LEVINE, R. J.; ALBERT, R. E.; BLAIR A. E.; GRIESEMER, R. A.; LANDRIGAN, P. J.; STAYNER, L. T., and SWENBERG, J. A.** Contribution of Formaldehyde to Respiratory Cancer. *Environ. Health Perspectives,* **70**, 1986, pp. 23-35.

142. **NILSSON A.** Novel Technique for Analysing Volatile Compounds in Indoor Dust: Application of Gas Chromatography – UV Spectrometry to the Study of Building-Related Illness. Linköping University Medical Dissertations. **856**, 2004, Linköping University, Linköping, Sweden, 67p. Disponible en Internet En: http://www.ep.liu.se/diss/med/08/56/digest.pdf. Página visitada el 10 de noviembre de 2005.

143. **NILSSON, T.; BAGLIO, D.; GALDO-MIGUEZ, I.; MADSEN, J. O. AND, FACCHETTI, S.** Derivatisation/Solid-Phase Microextraction Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry for the Analysis of Phenoxy Acid Herbicides in Aqueous Samples. *J. Chromatogr. A.* **826**, 1998, pp. 211-216.

144. **NOLTE, C. G.; FRASER, M. P. and CASS, G. R.** Gas Phase C_2-C_{10} Organic Acids Concentrations in the Los Angeles Atmosphere. *Environ. Sci. Technol*., **33**(4), 1999, pp. 540-545.

145. **NONDEK, L.; RODLER, D. R. and BIRKS, J. W.** Measurement of Sub-*ppbv* Concentrations of Aldehydes in a Forest Atmosphere Using a New HPLC Technique. *Environ. Sci. Technol*., **26**(6), 1992, pp. 1174-1178.

146. **OBERDORFER, P. E.** The Determination of Aldehydes in Automobile Exhaust Gas. En: Vehicle Emissions, Part III, *Soc. Automotive Engineers Prog. Tech*., **14**, 1971, pp. 32-42.

147. **OKEYO P.; RENTZ, M. and SNOW, N. H.** Analysis of Steroids from Human Serum by SPME with Headspace Derivatization and GC-MS. *J. High. Resolut. Chromatogr.,* **20**(3), 1997, pp. 171-173.

148. **OLIVER, K. D.; ADAMS, J. R. and DAUGHTREY, E. H., Jr.** Technique for Monitoring Toxic VOCs in Air: Sorbent Preconcentration, Closed-Cycle Cooler Cryofocusing, and GC/MS Analysis. *Environ. Sci. Technol.*, **30**(6), 1996, pp. 1939-1945.

149. **ORME, S. and KEGLEY, S.** PAN Pesticide Database*,* Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. 2004). Disponible en Internet En: http:www.pesticideinfo.org.

150. **OTTO, D.; MOLHAVE, L.; ROSE, G.; HUDNELL, H. K., and HOUSE D.** Neurobehavioral and Sensory Irritant Effects of Controlled Exposure to a Complex Mixture of Volatile Organic Compounds. *Neurotoxicol.Teratol*., **12**, 1990, pp.649-652.

151. **PAN, L.; ADAMS, M. and PAWLISZYN, J.** Determination of Fatty Acids Using Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem*., **67**(23), 1995, pp. 4396-4403.

152. **PAN, L. and PAWLISZYN, J.** Derivatization / Solid-Phase Microextraction: New Approach to Polar Analytes. *Anal. Chem.*, **69**(2), 1997, pp. 196-205.

153. **PATERSON, S.; MCLACHLAN-TROUP, N.; CORDERO, R.; DOHNAL, M. and CARMAN, S.** Qualitative Screening for Drugs of Abuse in Hair Using GC-MS. *J. Anal. Toxicol*., **25,** 2001, pp. 203–208.

154. **PAWLISZYN, J.** Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. Wiley-VCH, N. Y., USA,1997. 247 p.

155. **PAWLISZYN, J.** Applications of Solid Phase Microextraction. The Royal Society of Chemistry, Hertfordshire, UK, 1999. 654 p.

156. **PEÑALVER, A.; POCURULL, E.; BORRULL, F., and MARCÉ, R. M.** Trends in Solid-Phase Microextraction for Determining Organic Pollutants in Environmental Samples. *TrAC.*, **18**, 1999, pp. 557-568.

157. **PEÑALVER H., A. M.** Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental. Universitat Rovira I Virgili. Tarragona. España. 2002, 322 p.

158. **PIERCE CHEMICAL COMPANY**. Material Safety Data Sheet: PFBBr (MSDS #0597). Disponible en Internet En: http://www.piercenet.com/files/EN0597.pdf. Página visitada el 29 de diciembre de 2005.

159. **PIERSON, T. K.; HETES, R. G. and NAUGLE, D. F.** Risk Characterization Framework for Noncancer end Points. *Environ. Health Perspect*., **95**, 1991, pp. 121– 9.

160. **POLI, D.; CARBOGNANI, P.; CORRADI, M.; GOLDONI, M.; ACAMPA, O.; BALBI, B.; BIANCHI, L.; RUSCA, M., and MUTTI A**. Exhaled Volatile Organic Compounds in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer: Cross Sectional and Nested Short-Term Follow-Up Study. *Respiratory Research.* **6**(71), 2005, pp. 1-10. Disponible en Internet En: http://respiratory-research.com/content/6/1/71.

161. **POSSANZINI, M.; DI PALO, V.; PETRICCA, M.; FRATARCANGELI, R., and BROCCO, D.** Measurements of Low Carbonyls in Rome Ambient Air. *Atmos. Environ.*, **30**, 1996, pp. 3757-3764.

162. **POSSANZINI, M.; DI PALO, V.; BRANCALEONI, E.; FRATTONI, M., and CICCIOLI, P.** A Train of Carbon and DNPH-Coated Cartridges for the Determination of Carbonyls from C_1 to C_{12} in Air and Emission Samples. *Atmos. Environ.*, **34**, 2000, pp. 5311-5318.

163. **PROSEN, H. and ZUPANCIC-KRALJ, L.** Use of Solid-Phase Microextraction in Analysis of Pesticides in Soil. *Acta Chem.*, **45**(1), 1998, pp. 1-17.

164. **PROSEN, H. and ZUPANCIC-KRALJ, L.** Solid-Phase Microextraction. *TrAC*, **18**(4), 1999, pp. 272-282.

165. **PUXBAUM, H.; ROSENBERG, C.; GREGORI, M.; LANZERSTORFER, C.; OBER, E., and WINIWARTER, W.** Atmospehric Concentrations of Formic and Acetic Acid and Related Compounds in Eastern and Northern Austria. *Atmos. Environ*., **22**, 2841-2850, 1988.

166. **REPÚBLICA DE COLOMBIA.** Sistema General Ambiental Ley 99. Bogotá: Momo Ediciones. 2001, p 226-308.

167. **RICKERT, W. S.; ROBINSON, J. C. and YOUNG, J. C.** Estimating the Hazards of "Less Hazardous" Cigarettes. I. Tar, Nicotine, Carbon Monoxide, Acrolein, Hydrogen Cyanide, and Total Aldehyde Deliveries of Canadian Cigarettes. *J. Toxicol. Environ*. *Health,* **6**, 1980, pp. 351-365.

168. **RODLER, D. R.; NONDEK, L. and BIRKS, J. W.** Evaluation of Ozone and Water Vapor Interferences in the Derivatization of Atmospheric Aldehydes with Dansylhidrazine. *Environ. Sci. Technol.*, **27**(13), 1993, pp. 2814-2820.

169. **ROGGE, W. F.; MAZUREK, M. A.; HILDEMANN, L. M.; CASS, G. R., and SIMONEIT, B. R. T.** Quantification of Urban Organic Aerosols at a Molecular Level: Identification, Abundance and Seasonal Variation. *Atmos. Environ.*, **27A,** 1993, pp. 1309-1330.

170. **ROSENFELD, J. M.** Solid-Phase Analytical Derivatization: Enhancement of Sensitivity and Selectivity of Analysis. *J. Chromatogr. A.*, **843**(1-2), 1999, pp. 19-27.

171. **RUIZ, J.; VENTANAS, J. and CAVA, R.** New Device for Direct Extraction of Volatiles in Solid Samples Using SPME. *J. Agric. Food Chem.*, **49**(11), 2001, pp. 5115-5121.

172. **SAKURAGAWA, A.; YONENO, T. and OKUTANI, T.** Trace Analysis of Carbonyl Compounds by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry after Collection as 2,4-Dinitrophenylhydrazine Derivatives. *J. Chromatogr. A.* **844** (1-2), 1999, pp. 403-8.

173. **SALAS, L. J. and Singh, H. B.** Measurements of Formaldehyde and Acetaldehyde in the Urban Ambient Air. *Atmos. Environ*., **20**, 1986, pp. 1301-1304.

174. **SANCHEZ, J. M. and SACKS, R. D.** GC Analysis of Human Breath with a Series-Coupled Column Ensemble and a Multibed Sorption Trap. *Anal. Chem*., **75**, 2003, pp. 2231-2236.

175. **SANDNER, F.; DOTT, W. and HOLLENDER, J.** Sensitive Indoor Air Monitoring of Formaldehyde and other Carbonyl Compounds Using the 2, 4-Dinitrophenylhydrazine Method. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **203**(3), 2001, pp. 275-279.

176. **SATSUMABAYASHI, H.; KURITA, H.; YOKOUCHI, Y., and UEDA, H.** Photochemical Formation of Particulate Dicarboxylic Acids under Long-Range Transport in Central Japan. *Atmos. Environ*., **24**, 1990, pp.1443– 1450.

177. **SATSUMABAYASHI, H.; KURITA, H.; CHANG, Y.-S.; CARMICHAEL, G. R., and UEDA, H.** Photochemical Formations of Lower Aldehydes and Lower Fatty Acids under Long-Range Transport Conditions in Central Japan, *Atmos. Environ.*, **29**, 1995, pp. 255–266.

178. **SCHARF, J. and SARAFIN, R.** Analysis of Airborne Substances by Means of Microwave Thermal Desorption. *J. High. Resolut. Chromatogr.,* **18**(4), 1995, pp. 253-258.

179. **SCHAUENSTEIN, E.; ESTERBAUER, H. and ZOLLNER, H.** Aldehydes in Biological Systems: Their Natural Occurrence and Biological Activities. London, Pion, 1977, First Edition.181 p.

180. **SCHEEPERS, P. T. J. and HEUSSEN, G. A. H.** Assessing Health Risk of Toxic Substances by Analysis of Body Fluids and Exhaled Air. *TrAC.*, **21**(3), 2002.

181. **SCHNEEDE, J. and UELAND, P. M.** Formation in an Aqueous Matrix and Properties and Chromatographic Behavior of 1-Pyrenyldiazomethane Derivatives of Methylmalonic Acid and Other Short-Chain Dicarboxylic Acids. *Anal. Chem*., **64**, 1992, pp. 315-319.

182. **SHIREY, R. E.** Rapid Analysis of Environmental Samples Using Solid-Phase Microextraction (SPME) and Narrow Bore Capillary Columns. *J. High. Resolut. Chromatogr.*, **18**, 1995, pp. 495-499.

183. **SINKKONEN, S.**; **KOLEHMAINEN, E.; PAASIVIRTA, J.; HAMALAINEN, S. and, LAHTIPERA, M.** Analysis of Chlorinated Acetic and Propionic Acids as their Pentafluorobenzyl Derivates. I. Preparation of the Derivates. *J. Chromatogr. A.*, **718**, 1995, pp. 391–396.

184. **SOLOMONS, T. W. G.** Fundamentos de Química Orgánica. Ed. Limusa, Noriega Editores. 3a. Edición en Inglés, 1ª en Español. México.1996.

185. **SPAULDING, R. S.; FRAZEY, P. and RAO, X.** Measurement of Hydroxy Carbonyls and Other Carbonyls in Ambient Air Using Pentafluorobenzyl Alcohol as a Chemical Ionization Reagent. *Anal. Chem*., **71**(16), 1999, pp. 3420-3427.

186. **SRIVASTAVA, A.; JOSEPH, A. E.; PATIL, S.; MORE, A.; DIXIT, R. C., and PRAKASH, M.** Air Toxics in Ambient Air of Delhi. *Atmos. Environ.*, **39**, 2005, pp. 59-71.

187. **STASHENKO, E. E.; WONG, J. W.; MARTÍNEZ, J. R.; MATEUS, A., and SHIBAMOTO, T.** High-Resolution Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorous Detection of Saturated Volatile Aldehydes Derivatized with 2-Hydrazinobenzothiazole. *J. Chromatogr. A.*, **752**, 1996, pp. 209-216.

188. **STASHENKO, E. E.; FERREIRA, M. C.; SEQUEDA, L. E.; WONG, J. W., and MARTÍNEZ, J. R.** Comparison of Extraction Methods and Detection Systems in the Gas Chromatographic Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. *J. Chromatogr. A.*, **779**(1-2), 1997, pp. 360-369.

189. **STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; SALGAR, W.; DELGADO, W., and MARTÍNEZ, J. R.** Solid-Phase Microextraction with On-Fibre Derivatisation Applied to the Analysis of Volatile Carbonyl Compounds. *J. Chromatogr. A.*, **886**(1-2), 2000, pp. 175-181.

190. **STASHENKO, E. E. and MARTÍNEZ, J. R.** Derivatization and Solid-Phase Microextraction. *TrAC*. **23**(8). 2004, p.p. 553-561.

191. **STEINEMANN, A.** Human Exposure, Health Hazards, and Environmental Regulations. *Environ. Impact Assessment Review*, **24**, 2004, pp. 695–710.

192. **STEFFEN, A. and PAWLISZYN, J.** Analysis of Flavor Volatiles Using Headspace Solid-Phase Microextraction. *J. Agric. Food Chem.*, **44**(8), 1996, pp. 2187-2193.

193. **STRASSING, S; THOMAS, W. and LANKMAYR, E. P.** Microwave-Assisted Derivatization of Volatile Carbonyl Compounds with *O*-(2,3,4,5,6-Pentafluorobenzyl)Hydroxylamine. *J. Chromatogr. A.*, **891**(2), 2000, pp. 267-273.

194. **SULIMAN F., E. O.** Off-line Optimization of the Separation of 2,4-Dinitrophenylhydrazones by Gas Chromatography Using Chemometric Techniques. *Talanta*, **56**(1), 2002, pp. 175-183.

195. **TALBOT, R. W.; BEECHER, K. M.; HARRISS, R. C., and COFFER III, W. R.** Atmospheric Geochemistry of Formic and Acetic Acids at a Mid-Latitude Temperate Site. *J. Geophys. Res*., **93**, 1988, pp.1638-1652.

196. **TANNER, R.; MIGUEL, A. H. and ANDRADE, J. B.** Atmospheric Chemistry of Aldehydes: Enhanced Peroxyacetyl Nitrate Formation from Etanol-Fueled Vehicular Emissions. *Environ. Sci. Technol.*, **22** (9), 1998, pp. 1026-1034.

197. **THEODORIDIS, G.; KOSTER , E. H. M. and DE JONG, G. J.** "Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Biological Samples" *J. Chromatogr. B.*, **745**, 2000, pp. 49–82.

198. **TSAI, S-W. and CHANG, C-M.** Analysis of Aldehydes in Water by Solid-Phase Microextraction with On-Fiber Derivatization**.** *J. Chromatogr. A.,* **1050**, 2003, pp. 143-150.

199. **TUDURI, L.; DESAUZIERS, V. and FANLO, J. L.** Dynamic *versus* Static Sampling for the Quantitative Analysis of Volatile Organic Compounds in Air with Polydimethylsiloxane-Carboxen Solid-Phase Microextraction Fibers. *J. Chromatogr. A.*, **963**(1-2), 2002, pp. 49-56.

200. **ULRICH, S.** Solid Phase Microextraction in Biomedical Analysis, *J. Chromatogr. A.,* **902**, 2000, p.p. 167-194.

201. **U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES**. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS, online database). National Toxicology Information Program, National Library of Medicine, Bethesda, MD. 1993.

202. **U.S. EPA.** Draft Regulatory Impact Analysis for the Proposed Heavy-Duty Engine and Vehicle Standars and Highway Diesel Fuel Sulphur Control Requirements Rule. United States Environmental Protection. Agency Office of Air and Radiation Assessment and Standars Division, Office of Transportation and Air Quality EPA420-D-00-001, 2000.

203. **U.S. EPA.** Compendium of Methods for the Determination of Toxic Organic Compounds in Ambient Air. Second Edition. United States Environmental Protection Agency. Center for Environmental Research Information, Ohio, Junio 1999. Disponible en Internet En:: http://www.epa.gov/ttn/amtic/files/ambient/airtox/tocomp99.pdf. Página visitada el 4 de diciembre de 2002 y el 17 de julio de 2003.

204. **U.S. EPA IRIS.** Disponible en internent En: http://www.epa.gov/ngispgm3/iris/subst/0419.htm. Página visitada el 22 de diciembre de 2005.

205. **U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE**. 2-Hydrazinobenzothiazole, (RN:615-21-4, Toxicity). Disponible en Internet En: http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=000615214. Página visitada el 15 de diciembre de 2005 y el 3 de abril de 2006.

206. **U.S. NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE**. Pentafluorophenyl)hydrazine (RN:828-73-9), Toxicity. Disponible en Internet En: http://chem2.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=DBMaint&actionHandle=default&nextPage=jsp/chemidlite/ResultScreen.jsp&TXTSUPERLISTID=000828739. Página visitada el 15 de diciembre de 2005 y el 3 de abril de 2006.

207. **VALOR, I.; CORTADA, C. and MOLTO, J. C.** Direct Solid-Phase Microextraction for the Determination of BTEX in Water and Wastewater. *J. High. Resolut. Chromatogr.,* **19**(8), 1996, pp. 472-474.

208. **VAS, G.** and **VÉKEY K.** Solid-Phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom*. **39**, 2004, p.p. 233-254.

209. **VESELY, P.; LUSK, L.; BASAROVA, G.; SEABROOKS, J., and RYDER, D.** Analysis of Aldehydes in Beer Using Solid-Phase Microextraction with On-Fiber Derivatization and Gas Chromatography/Mass Spectrometry **J***. Agric. Food Chem.,* **51**(24), 2003, pp. 6941-6944.

210. **VAUGHAN, T. L.; STRADER, C.; DAVIS, S., and DALING, J. R.** Formaldehyde and Cancers of the Pharynx, Sinus, and Nasal Cavity: II. Residential exposures. *Inter. J. Cancer,* **38**(5), 1986, pp. 685-688.

211. **WENNER, A. and WORTBERG, M.** Use of Automated SPME Coupled to GC-AED for the Determination of Metazachlor in Wastewater. *J. High. Resol. Chromatogr*., **21**(12), 1998, pp. 661-664.

212. **WITTMANN, G., VAN LANGENHOVE, H. and DEWULF.** Determination of Acetic Acid in Aqueous Samples by Water-Phase Derivatisation, Solid-Phase-Microextraction, and Gas Chromatography. *J. Chromatogr. A*., **874**(2), 2000, pp. 225-234.

213. **WHO.** Air Quality Guidelines-Second Edition. Chapter 5.8 Formaldehyde. World Health Organization**,** Regional Office for Europe, Copenhagen, 2001, 25 p. Disponible en Internet En: http://www.euro.who.int/air/activities/20050223_4*.*

214. **WORLD HEALTH ORGANIZATION**. Health aspects of air pollution. Europa, Junio 2004. Disponible en Internet En: http://www.euro.who.int/document/E83080.pdf. Página visitada el 24 de noviembre de 2005.

215. **YASHIKI, M.; KOJIMA, T.; MIYAZAKI, T.; NAGASAWA, N.; IWASAKI, Y.; HARA, K.** *Forensic Sci. Int.* 1995; **76**: 169. Mencionado En: **VAS, G.** and **VÉKEY K**. Solid-phase Microextraction: A Powerful Sample Preparation Tool Prior to Mass Spectrometric Analysis. *J. Mass Spectrom*. **39**, 2004, p.p. 233-254.

216. **YANG, K., EISERT, R. H. and LORD, J**. Determination of Pesticides in Foods by Automated SPME–GCMS, 1999. En: Pawliszyn, J. (Eds.) *Applications of Solid-Phase Microextraction.* The Royal Society of Chemistry, Hertfordshire, UK, 1999. 654 p.

217. **YOU, J.; ZHANG, W. and ZHANG, Y.** Simple Derivatization Method for Sensitive Determination of Fatty Acids with Fluorescence Detection by High-Performance Liquid Chromatography Using 9-(2-hydroxyethyl)-Carbazole as Derivatization Reagent. *Anal. Chim. Acta*, **436**(1), 2001, pp. 163-172.

218. **YOUNG, R.; LOPEZ-AVILA, V. and BECKERT, W. F.** Online Determination of Organochlorine Pesticides in Water by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography with Electron Capture Detection. *J. High. Resolut. Chromatogr.*, **19**(5), 1996, pp. 247-256.

219. **YU**, **J.; JEFFRIES, H. E. and LE LACHEUR, R. M.** Identifying Airborne Carbonyl Compounds in Isoprene Atmospheric Photooxidation Products by their PFBHA Oximes Using Gas Chromatography/ion Trap Mass Spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, **29** (8), 1995, pp. 1923-1932.

220. **YU, J.; FLAGAN, R. C. and SEINFELD, J. H.** Identification of Products Containing -COOH, -OH, and –C=O in Atmospheric Oxidation of Hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.*, **32**(16), 1998, pp. 2357-2370.

221. **ZHANG, Z. and PAWLISZYN, J.** Quantitative Extraction Using Internally Cooled Solid Phase Microextraction Device with Simultaneous Heating of the Sample. *Anal. Chem*., **67**, 1995, pp. 34-43.

222. **ZINI, C. A.; AUGUSTO, F.; CHRISTENSEN, T. E.; SMITH, B. P.; CARAMAO, E. B., and PAWLISZYN, J.** Monitoring Biogenic Volatile Compounds Emitted by *Eucalyptus citriodora* Using SPME, *Anal. Chem.,* **73**(19), 2001, pp. 4729-4735.

ANEXO 1

Tabla 1. Lista de compuestos orgánicos volátiles (ECA, 1997).

Compuesto químico	CAS	Punto de ebullición, °C	Compuesto químico	CAS	Punto de ebullición, °C
Hidrocarburos aromáticos			**Glicoles/ Glicoletéres**		
Benceno	71–43–2	80.1	2-Metoxi-etanol	109–86–4	124–125
Tolueno	108–88–3	111	2-Etoxi-etanol	110–80–5	135
Etilbenceno	100–41–4	136.2	2-Butoxi-etanol	111–76–2	171
m-Xileno	108–38–3	139.1	1-Metoxi-2-propanol	107–98–2	118
p-Xilenos	106-42–3	138.3	2-Butoxi-etioxi-etanol	112–34–5	231
o-Xileno	95–47–6	144			
n-Propilbenceno	103–65–1	159			
1,2,4-Trimetilbenceno	95–63–6	169.4	**Aldehídos**		
1,3,5-Trimetilbenceno	108–67–8	165	Butanal	123–72–8	76
2-Etiltolueno	611–14–3	165.2	Pentanal	110–62–3	103
Estireno	100–42–5	145.2	Hexanal	66–25–1	129
Naftaleno	91–20–3	218	Nonanal	124–19–6	190–192
4-Fenilciclohexeno	31017–40–0	251–253	Benzaldehído	100–52–7	179

Tabla 1. Continuación.

Compuesto químico	CAS	Punto de ebullición, °C	Compuesto químico	CAS	Punto de ebullición, °C
Hidrocarburos alifáticos	**n= C_6-C_{16}**		**Cetonas**		
n -Hexano	110–54–3	69	Metil-etil-cetona	78–93–3	80
n -Heptano	142–82–5	98.4	Metil-isobutil-cetona	108–10–1	116.8
n -Octano	111–65–9	125.7	Ciclohexanona	108–94–1	155.6
n -Nonano	111–84–2	150.8	Acetofenona	98–86–2	202
n -Decano	124–18–5	174.1			
n -Undecano	1120–21–4	196	**Halocarbonos**		
n -Dodecano	112–40–3	216.3	Tricloroeteno	79–01–6	87
n -Tridecano	629–50–5	235.4	Tetracloroeteno	127–18–4	121
n -Tetradecano	64036–86–3	253.7	1,1,1-Tricloroetano	71–55–6	74.1
n -Pentadecano	629–62–9	270.6	1,4-Diclorobenceno	106–46–7	173
n -Hexadecano	544–76–3	287			
2-Metilpentano	107–83–5	60.3	**Ésteres**		
3-Metilpentano	96–14–0	63.3	Acetato de etilo	141–78–6	77
1-Octeno	111–66–0	121.3	Acetato de butilo	123–86–4	126.5
1-Deceno	872–05–9	170.5			

Tabla 1. Continuación.

Compuesto químico	CAS	Punto de ebullición, °C
Cicloalcanos		
Metilciclopentano	96–37–7	71.8
Ciclohexano	100–82–7	81
Metilciclohexano	108–87–2	101
Terpenos		
Δ^3-Careno	13466–78–9	167
α-Pineno	80–56–8	156
β-Pineno	181172–67–3	164
Limoneno	138–86–3	170
Alcoholes		
2-Propanol	67–63–0	82.4
1-Butanol	71–36–3	118
2-Etil-1-hexanol	104–76–7	182
Ácidos		
Ácido hexanoico	142–62–1	202–203
Éster		
Acetato de isopropilo	108–21–4	85
2-Etoxi-etil-acetato	111–15–9	156.4
TXIB (Isobutirato de texanilo)	6846–50–0	–
Otros		
2-Pentilfurano (2-*ter*-Butilfurano)	3777–69–3	>120
Tetrahidrofurano (THF)	109–99–9	67

ANEXO 2

Tabla 1. Toxicidad de aldehídos.

Sustancia carbonílica	Tipo de medición	Vía de administración	Especie	Valor determinado	Toxicidad
Formaldehído					
	LC_{50}	Inhalación	Mamífero (especie sin identificar)	92.0 mg/ m^3	Moderada
	LC_{50}	Inhalación	Ratón	400.0 mg/ m^3/2H	Moderada
	LC_{50}	Inhalación	Rata	590.0 mg/ m^3	Leve
	LCLo	Inhalación	Gato	400.0 mg/ m^3/2H	Ningún grado
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	270.0 mg/kg	Moderada
	LD_{50}	Intravenosa	Rata	87.0 mg/kg	Ningún grado
	LD_{50}	Oral	Cerdo de Guinea	260.0 mg/kg	Moderada
	LD_{50}	Oral	Ratón	42.0 mg/kg	Alta
	LD_{50}	Oral	Rata	800.0 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Subcutánea	Ratón	300.0 mg/kg	Ningún grado
	LD_{50}	Subcutánea	Rata	420.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Intraperitoneal	Ratón	16.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Intravenosa	Gato	30.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Intravenosa	Conejo	48.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Oral	Mujer	108.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Subcutánea	Perro	595.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Subcutánea	Conejo	240.0 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Sin reportar	Hombre	477.0 mg/kg	Ningún grado
Acetaldehído					
	LC_{50}	Inhalación	*Hamster*	17,000 ppm/4H	Aguda negativa
	LC_{50}	Inhalación	Mamífero (especie sin especificar)	21,800 mg/m^3	Aguda negativa
	LC_{50}	Inhalación	Rata	37 mg/m^3/30min	Aguda negativa
	LD_{50}	Intratraqueal	*Hamster*	96 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Intravenosa	Ratón	212 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Oral	Rata	661 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Subcutánea	Ratón	560 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Subcutánea	Rata	640 mg/kg	No valorado
	LDLo	Intraperitoneal	Rata	500 mg/kg	No valorado

Tabla 1. Continuación.

Sustancia carbonílica	Tipo de medición	Vía de administración	Especie	Valor determinado	Toxicidad
Propanaldehído					
	LC_{50}	Inhalación	Mamífero (especies sin identificar)	21,800 mg/ m^3	Aguda negativa
	LC_{50}	Inhalación	Ratón	21,800 mg/ m^3/2h	Aguda negativa
	LCLo	Inhalación	Rata	8,000 ppm/4h	No valorado
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	5,040 mg/kg	Aguda negativa
	LD_{50}	Oral	Rata	1,410 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Subcutánea	Ratón	680. mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Subcutánea	Rata	820.0 mg/kg	No valorado
	LDLo	Oral	Ratón	800.0 mg/kg	No valorado
Butiraldehído					
	LC_{50}	Inhalación	Mamífero (especies sin especificar)	64.0 mg/m^3	Aguda negativa
	LC_{50}	Inhalación	Ratón	44,610 mg/ m^3/2h	Aguda negativa
	LC_{50}	Inhalación	Rata	174.0 mg/ m^3/30min	Aguda negativa
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	3,560 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Intraperitoneal	Raton	1,140 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Intraperitoneal	Rata	800.0 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Oral	Rata	5.89 mg/kg	Aguda negativa
	LD_{50}	Oral	Rata	2,490 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Subcutánea	Ratón	2,700 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	subcutánea	Rata	10.0 mg/kg	No valorado
Valeraldehído					
	LDLo	Oral	Rata	3200 mg/kg	No valorado

Tabla 1. Continuación.

Sustancia carbonílica	Tipo de medición	Vía de administración	Especie	Valor determinado	Toxicidad
Hexanaldehído					
	LDLo	Oral	Rata	3000 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Oral	Rata	4890 mg/kg	
	LD_{50}	Oral	Ratón	8292 mg/kg	
	LD_{50}	Oral	Mamífero (epecies sin especificar)	3700 mg/kg	
Heptanaldehído					
	LD_{50}	Oral	Rata	LD50 > 5,000 mg/kg	Aguda
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	> 5,000 mg/kg	Aguda
Octanaldehído					
	LD_{50}	Oral	Rata	5.63 mL/kg	Aguda
	LD_{50}	Oral	Rata	4,616 mg/kg	Aguda
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	5,207 mg/kg	Aguda
Nonanaldehído					
	LD_{50}	Oral	Rata	> 5,000 mg/kg	Aguda
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	> 5,000 mg/kg	Aguda
Decanaldehído*					
	LD_{50}	Oral	Rata	3730 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Oral	Ratón	41750 mg/kg	
	LD_{50}	Oral	Rata	3730 μL/kg	
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	LD50 = 5040 μL /kg	

Fuente: Orme S. y Kegley S. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. 2004). En http:www.pesticideinfo.org

ANEXO 3

Tabla 1. Toxicidad de ácidos carboxílicos.

Ácido carboxílico	Tipo de estudio	Vía de administración	Especie	Valor determinado	Toxicidad
Ácido fórmico					
	LC_{50}	Inhalación	Ratón	6,200 mg/m^3/15min	Aguda negativa
	LC_{50}	Inhalación	Rata	15.0 mg/m^3/15min	Aguda negativa
	LC_{50}	Intraperitoneal	Ratón	940.0 mg/kg	Ningún grado
	LD_{50}	Intravenosa	Ratón	145.0 mg/kg	Ningún grado
	LD_{50}	Oral	Perro	4,000 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Oral	Ratón	700.0 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Oral	Rata	1,100 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Intravenosa	Perro	3,000 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Intravenosa	Conejo	239.0 mg/kg	Ningún grado
Ácido acético					
	LC_{50}	Inhalación	Ratón	5,620 ppm/1H	Aguda negativa
	LCLo	Inhalación	Rata	16,000 ppm/4H	Ningún grado
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	1,060 mg/kg	Toxicidad moderada
	LD_{50}	Intravenosa	Ratón	525.0 mg/kg	Ningún grado
	LD_{50}	Oral	Rata	3,530 mg/kg	Toxicidad leve
	LDLo	Oral	Conejo	1,200 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	rectal	Conejo	1,200 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	Subcutánea	Conejo	1,200 mg/kg	Ningún grado
	LDLo	No reportado	Hombre	308.0 mg/kg	Ningún grado
Ácido propiónico					
	LD50	Dérmica	Conejo	500.0 mg/kg	Moderada
	LD50	Intraperitoneal	Rata	200.0 mg/kg	Ningún grado
	LD50	Intravenosa	Ratón	625.0 mg/kg	Ningún grado
	LD50	Oral	Rata	3,500 mg/kg	Leve

Tabla 1. Continuación.

Ácido carboxílico	Tipo de estudio	Vía de administración	Especie	Valor determinado	Toxicidad
Ácido butírico					
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	530. 0 mg/Kg	Moderada
	LD_{50}	Intraperitoneal	Ratón	3,180 mg/Kg	No valorado
	LD_{50}	Intravenosa	Ratón	800.0 mg/Kg	No valorado
	LD_{50}	Oral	Rata	2.00 mg/Kg	Leve
	LD_{50}	Subcutánea	Ratón	3,180 mg/Kg	No valorado
Ácido *iso*-valérico*					
	LDLo	Oral	Ratón	3200 mg	
Ácido hexanoico					
	LD_{50}	Intravenosa	Ratón	600 mg	No valorado
	LD_{50}	Dérmica	Cerdo de Guinea	LD50 = 5 mL/kg	
	LC_{50}	Inhalación	Ratón	LC50 = 4100 mg/m3/2H	
.	LD_{50}	Oral	Ratón	5 gm/kg	
	LD_{50}	Oral	Rat	2050 μL /kg	
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	630 μL /kg	
Ácido heptanoico					
	LD_{50}	Subcutánea	Rata	1200 mg/kg	
	LC_{50}	Inhalación	Rata	0.0046 mg/m^3	
Ácido nonanoico					
	LD50	Oral	Ratón	>5 gm/kg	Moderada
	LD50	Oral	Rata	5 gm/kg	Moderada
	LD50	Dérmica	Rata	2 gm/kg	Moderada

Tabla 1. Continuación.

Ácido carboxílico	Tipo de estudio	Vía de administración	Especie	Valor determinado	Toxicidad
Ácido decanoico					
	LD_{50}	Oral	Rata	10080 mg/kg	
	LD_{50}	Dérmica	Conejo	>5 gm/kg	
	LDLo	Oral	Ratón	500.0 mg/Kg	No valorado
Ácido benzoico					
	LD_{50}	Intraperitoneal	Ratón	1,460 mg/kg	No valorado
	LD_{50}	Oral	Gato	2,000 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Oral	Perro	2,000 mg/kg	Leve
	LD_{50}	Oral	Ratón	2,370 mg/kg	Leve
	LD50	Oral	Rata	2,530 mg/kg	Leve
	LDLo	Intraperitoneal	Cerdo de Guinea	1,400 mg/kg	No valorado
	LDLo	Oral	Hombre	500.0 mg/kg	No valorado
	LDLo	Oral	Conejo	2,000 mg/kg	No valorado
	LDLo	Subcutánea	Rana	100.0 mg/kg	No valorado
	LDLo	Subcutánea	Conejo	2,000 mg/kg	No valorado

Fuente: Orme S. y Kegley S. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. 2004). En http:www.pesticideinfo.org

ANEXO 4

Tabla 1. Técnicas generales de monitoreo de aire.

TÉCNICA	INSTRUMENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Medida directa	Analizador de vapores orgánicos con detector de ionización en llama (FID).	• Detección y cuantificación en el sitio.	• Baja sensibilidad y especificidad; • No puede ser usado para medir cantidades absolutas.
	Analizador de vapores orgánicos con detector de fotoionización (PID).	• Capacidad para tomar concentraciones de salida.	
Métodos de campo	Cromatógrafo de gases (GC) portátil. Espectrómetro infrarrojo.	• Detección y cuantificación en el sitio; • Permite hacer un monitoreo continuo en el sitio; • Permite usar equipos de colección sencillos (*e.g*., *bolsas Tedlar*®); • Mejor capacidad de detección que las técnicas de medida directa.	• Es considerado como un método de *screening*, porque no involucra identificación usando un espectrómetro de masas; • Limitaciones debido a costo y estabilidad, dificultades para calibración en campo y con el suministro de energía.

Tabla 1. Continuación.

TÉCNICA	INSTRUMENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Métodos de colección	Bolsas de muestreo (*Sampling bags*).	• Livianas, fáciles de transportar, económicas.	• Se pueden presentar fugas y/o permeación de los compuestos; • Inapropiados para niveles muy bajos de contaminantes en aire; • Difíciles de limpiar.
	Botellas de vidrio con base redonda (*Glass globe samplers*).	• Fáciles de usar; • Fáciles de limpiar; • No se presenta absorción, ni fuga de la muestra; • Almacenamiento por períodos de tiempo más largos que con las bolsas.	• Pesados; • Frágiles; • Puede presentarse fotodescomposición; • Superficies activas para ciertos compuestos.
	Cilindros de metal (*e.g.*, Acero inoxidable) evacuables (*Evacuated metal canister samplers*)	• Pueden usarse para muestro por lotes; • No se presentan fenómenos de permeación o efectos químicos fotoinducidos; • Reusables, fáciles de limpiar y resistentes.	• Más costoso que el método de tubos adsorbentes; • Pesados; • Requieren manejo especial, para prevenir el deterioro de la muestra durante el transporte al laboratorio.

Tabla 1. Continuación.

TÉCNICA	INSTRUMENTO	VENTAJAS	DESVENTAJAS
Métodos de colección	Adsorbentes *e.g.*, cartuchos o tubos.	• Menos costosos que el método de cilindro evacuable.	• Pueden estar sujetos a problemas de saturación; • Requieren manejo especial, para prevenir el deterioro de la muestra durante el transporte al laboratorio.
Métodos de colección	Placas para muetreo pasivo (*Passive sampling badges*).	• Portátiles y de fácil manejo. No requieren bombas ni baterías para su funcionamiento; • Apropiadas para estudio de exposición en lugares de trabajo; • Sirven para monitorear durante períodos de tiempo largos; • Relativamente económicas. • Existen placas para: glutiraldehído (0.2-5 mg/m^3), formaldehído (0.1-5 mg/m^3), vapor de Hg (< 0.05 mg/m^3) y VOC´s.	• La alta humedad puede producir errores en los resultados; • Posible *backdiffusion* del medio de muestreo; • Posibles interferencias entre compuestos; • Alto umbral de detección. No se recomienda en monitoreo de aire ambiental; • Exactitud y precisión ± 25%; • Se requiere un periodo de muestreo de 8 horas; • Inapropiado para VOC´s.

Fuente: Clements, J. B. y LewiS, Robert G., 1993.

ANEXO 5

Tabla 1. Caracterización de algunos adsorbentes sólidos usados para el análisis de contaminantes atmosféricos.

Adsorbente	Proveedor	Tipo	Tamaño de partícula (malla)	Rango de muestreo	$T_{max,}$ °C [a]	Área de superficie específica, m^2g^{-1}
Carboxen						
Carboxen 563	Supelco	CMS*	20/45	C_2-C_5	>400	510
Carboxen 564	Supelco	CMS*	20/45	C_2-C_5	>400	400
Carboxen 569	Supelco	CMS*	20/45	C_2-C_5	>400	485
Carboxen 1000	Supelco	CMS*	60/80	C_2-C_5	>400	1200
Carboxen 1001	Supelco	CMS*	40/60	C_2-C_5	>400	500
Carboxen 1003	Supelco	CMS*	60/80	C_2-C_5	>400	1000
Carbosieve SIII	Supelco	CMS*	60/80	C_2-C_5	>400	820
Carbosphere	Alltech	CMS*	60/80	-	>400	1000
Carbotrap						
Carbotrap F	Supelco	BCG**	20/40	> C_20	>400	5
Carbotrap F	Supelco	BCG**	20/40	C_5-C_{12}	>400	100
Carbotrap F	Supelco	BCG**	20/40	C_{12}-C_{20}	>400	10

Tabla 1. Continuación.

Adsorbente	Proveedor	Tipo	Tamaño de partícula (malla)	Rango de muestreo	T_{max}, °C [a]	Área de superficie específica, m^2g^{-1}
Carbotrap						
Carbotrap F	Supelco	BCG**	20/40	C_{12}-C_{20}	>400	25
Carbotrap F	Supelco	BCG**	20/40	C_3-C_5	>400	250
Carbograph 5	LARA	BCG**	20/40	C_3-C_5	>400	560
Tenax®						
Tenax TA	Supelco	Óxido de 2,4-difenil-*p*-fenileno	60/80	C_7-C_{26}	350	35
Tenax GR	Supelco	30% de grafito y 70% de Tenax	35/60	-	350	-
Carbón activado	Supelco	Carbón	20/40	C_2-C_5	220	1070
Chromosorb 106	Supelco	Copolímero de estireno-divinil-benceno	60/80	Moléculas pequeñas	250	750

CMS*: Mallas de carbón molecular; BCG**: Blanco de carbón grafitizado; [a]Datos del fabricante

Fuente: Dettmer K. y Engewald W., 2002.

ANEXO 6

Tabla 1. Caracterización de varios polímeros orgánicos porosos.

Adsorbene	Tipo	Área de superficie específica, m^2g^{-1}	T_{max} ,°C
Tenax®			
Tenax GC	Óxido de 2,4-difenil-*p*-fenileno	19-30	450
Tenax A	Óxido de 2,4-difenil-*p*-fenileno de alta pureza	35	300
Chromosorb			
Chromosorb 101	Copolímero de estireno-divinilbenceno	<50	275
Chromosorb 102	Copolímero de estireno-divinilbenceno	350	250
Chromosorb 103	Poli(estireno) entrecruzado	350	275
Chromosorb 104	Copolímero de acrilonitrilo/divinilbenceno	100-200	250
Chromosorb 105	Resina poliaromática	600-700	250
Chromosorb 106	Copolímero de estireno-divinilbenceno	700-800	225
Chromosorb 107	Resina de éster poli(acrílico)	400-500	225
Chromosorb 108	Éster acrílico entrecruzado	100-200	225
Porapack			
Porapack N	Divinilbenceno/vinil pirrolidinona	250-350	190
Porapack P	Copolímero de estireno/divinilbenceno	100-200	250
Porapack Q	Etil vinil benceno/divinil benceno	500-600	250
Porapack R	Divinilbenceno/vinil pirrolidinona	450-600	250
Porapack S	Divinilbenceno/vinilpiridina	300-450	250
Porapack T	Etilenglicol/dimetacrilato	250-350	190

Tabla 1. Continuación.

Adsorbene	Tipo	Área de superficie específica, m^2g^{-1}	T_{max} ,°C
Resina deamberlita			
XAD-2	Copolímero de estireno/divinilbenceno	300	200
XAD-4	Copolímero de estireno/divinilbenceno	750	150
XAD-7	Resina del éster poli(metacrilato)	450	150
XAD-8	Resina del éster poli(metacrilato)	140	150

Fuente: Dettmer K. y Engewald W., 2002.

ANEXO 7

TABLAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS. ESTÁNDARES LÍQUIDOS. GC/ECD. COLUMNA DB-5 (30 m).

ANEXO 7.1

Tabla 1. Calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos (soluciones metanólicas) de la serie de aldehídos (C_2-C_{10}). Nivel de concentración bajo. Inyección automática.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Etanal	3.03	5.0	9,48E+04	5.2728E-5	0.997	13556,60 (x)
		10.0	1,54E+05	6.5056E-5		
		20.0	2,66E+05	7.5237E-5		
		30.0	4,21E+05	7.1241E-5		
		40.0	5,16E+05	7.7584E-5		
		60.0	8,20E+05	7.3128E-5		
Propanal	3.73	5.0	1,65E+05	3.0268E-5	0.998	21490,21 (x)
		10.0	2,52E+05	3.9746E-5		
		20.0	4,49E+05	4.4539E-5		
		30.0	6,59E+05	4.5544E-5		
		40.0	8,45E+05	4.7357E-5		
		60.0	1,28E+06	4.7057E-5		
Butanal	4.66	5.0	1,78E+05	2.8076E-5	1.000	25977,25 (x)
		10.0	2,86E+05	3.4994E-5		
		20.0	5,09E+05	3.9285E-5		
		30.0	7,76E+05	3.8680E-5		
		40.0	1,02E+06	3.9169E-5		
		60.0	1,57E+06	3.8277E-5		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Pentanal	5.81	5.0	1,36E+05	3.6647E-5	1.000	23298,56 (x)
		10.0	2,62E+05	3.8234E-5		
		20.0	4,67E+05	4.2831E-5		
		30.0	7,02E+05	4.2715E-5		
		40.0	8,97E+05	4.4582E-5		
		60.0	1,41E+06	4.2474E-5		
Hexanal	7.06	5.0	1,78E+05	2.8112E-5	1.000	25309,26 (x)
		10.0	2,59E+05	3.8583E-5		
		20.0	4,97E+05	4.0233E-5		
		30.0	7,20E+05	4.1660E-5		
		40.0	1,01E+06	3.9496E-5		
		60.0	1,54E+06	3.9071E-5		
Octanal	9.66	5.0	1,31E+05	3.8257E-5	0.997	17127,17 (x)
		10.0	1,70E+05	5.8691E-5		
		20.0	3,29E+05	6.0837E-5		
		30.0	4,61E+05	6.5058E-5		
		40.0	6,59E+05	6.0656E-5		
		60.0	1,07E+06	5.5967E-5		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Nonanal	10.97	5.0	9,97E+04	5.0131E-5	0.997	16150,66 (x)
		10.0	1,69E+05	5.9101E-5		
		20.0	3,18E+05	6.2899E-5		
		30.0	4,36E+05	6.8747E-5		
		40.0	6,35E+05	6.3037E-5		
		60.0	1,00E+06	6.0025E-5		
Decanal	12.24	5.0	4,63E+04	1.0809E-4	1.000	7555,04 (x)
		10.0	8,01E+04	1.2482E-4		
		20.0	1,61E+05	1.2459E-4		
		30.0	2,32E+05	1.2952E-4		
		60.0	4,72E+05	1.5196E-4		

ANEXO 7.2

Tabla 1. Calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos (soluciones metanólicas) de la serie de aldehídos (C_2-C_{10}). Nivel de concentración bajo. Inyección automática. Preparada para la cuantificación de los aldehídos presentes en sudor humano (pies).

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Etanal	2,99	20	5,01E+05	3,99E-05	1.000	30384.05 (x)
		40	1,17E+06	3,41E-05		
		60	2,08E+06	2,89E-05		
		80	2,29E+06	3,50E-05		
Propanal	3,69	10	2,80E+05	3,58E-05	1.000	26322.56 (x)
		20	5,16E+05	3,88E-05		
		40	9,84E+05	4,06E-05		
		60	1,66E+06	3,61E-05		
		100	2,61E+06	3,83E-05		
Butanal	4,91	10	2,89E+05	3,46E-05	1.000	31214.99 (x)
		20	6,34E+05	3,15E-05		
		40	1,18E+06	3,39E-05		
		60	2,01E+06	2,98E-05		
		100	3,06E+06	3,26E-05		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Pentanal	5,84	10	2,41E+05	4,15E-05	1.000	29166.87 (x)
		20	5,71E+05	3,50E-05		
		40	1,07E+06	3,72E-05		
		60	1,88E+06	3,19E-05		
		100	2,88E+06	3,47E-05		
Hexanal	7,11	10	2,06E+05	4,86E-05	1.000	29667.37 (x)
		20	5,15E+05	3,88E-05		
		40	1,01E+06	3,95E-05		
		60	1,89E+06	3,17E-05		
		100	2,99E+06	3,34E-05		
Octanal	9,73	10	8,23E+04	1,22E-04	0.979	20497.02 (x)
		20	2,18E+05	9,17E-05		
		40	5,08E+05	7,88E-05		
		60	1,39E+06	4,31E-05		
		80	1,55E+06	5,18E-05		
		100	2,20E+06	4,54E-05		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Octanal	9,73	10	8,23E+04	1,22E-04	0.978	20497.02 (x)
		20	2,18E+05	9,17E-05		
		40	5,08E+05	7,88E-05		
		60	1,39E+06	4,31E-05		
		80	1,55E+06	5,18E-05		
		100	2,20E+06	4,54E-05		
Nonanal	11,04	10	1,59E+05	1,25E-04	0.986	
		20	3,54E+05	1,13E-04		
		40	1,46E+06	4,12E-05		
		60	1,62E+06	4,93E-05		
		80	2,23E+06	4,48E-05		
Decanal	12,30	20	7,33E+04	2,73E-04	0.957	20804.56 (x)
		40	9,47E+04	4,22E-04		
		60	4,12E+05	1,46E-04		
		80	4,71E+05	1,70E-04		
		100	8,93E+05	1,12E-04		

ANEXO 7.3

Tabla 1. Calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos (soluciones metanólicas) de la serie de aldehídos (C_2-C_{10}). Nivel de concentración alto. Inyección automática.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, mmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Etanal	2,99	0.2	4,68E+06	4,27E-05	1,000	17086.02 (x)
		0.4	8,54E+06	4,68E-05		
		0.6	1,16E+07	5,18E-05		
		0.8	1,39E+07	5,77E-05		
		1.0	1,85E+07	5,41E-05		
		1.5	2,34E+07	6,40E-05		
Propanal	3,69	0.2	5,76E+06	3,47E-05	1,000	21738.08 (x)
		0.4	1,00E+07	3,98E-05		
		0.6	1,30E+07	4,63E-05		
		0.8	1,79E+07	4,46E-05		
		1.0	2,26E+07	4,42E-05		
		1.5	3,12E+07	4,81E-05		
Butanal	4,91	0.2	3,77E+06	5,30E-05	1,000	13101.01 (x)
		0.4	6,30E+06	6,35E-05		
		0.6	8,04E+06	7,46E-05		
		0.8	1,07E+07	7,49E-05		
		1.0	1,33E+07	7,50E-05		
		1.5	1,89E+07	7,94E-05		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, mmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Pentanal	5,84	0.2	7,92E+06	2,52E-05	1,000	29966.06 (x)
		0.4	1,40E+07	2,85E-05		
		0.6	1,79E+07	3,36E-05		
		0.8	2,50E+07	3,20E-05		
		1.0	3,12E+07	3,21E-05		
		1.5	4,28E+07	3,50E-05		
Hexanal	7,11	0.2	8,66E+06	2,31E-05	1,000	34638.05 (x)
		0.4	1,59E+07	2,51E-05		
		0.6	2,04E+07	2,93E-05		
		0.8	2,90E+07	2,76E-05		
		1.0	3,64E+07	2,75E-05		
		1.5	4,95E+07	3,03E-05		
Octanal	9,73	0.2	6,94E+06	2,88E-05	1,000	27439.68 (x)
		0.4	1,29E+07	3,09E-05		
		0.6	1,65E+07	3,64E-05		
		0.8	2,31E+07	3,47E-05		
		1.0	2,86E+07	3,50E-05		
		1.5	3,91E+07	3,84E-05		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, mmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Nonanal	11,04	0.2	7,05E+06	2,84E-05	1,000	29126.69 (x)
		0.4	1,35E+07	2,97E-05		
		0.6	1,72E+07	3,48E-05		
		0.8	2,46E+07	3,25E-05		
		1.0	3,09E+07	3,24E-05		
		1.5	4,13E+07	3,63E-05		
Decanal	12,30	0.2	2,71E+06	7,38204	1,000	14181.91 (x)
		0.4	5,45E+06	7,34E-05		
		0.6	7,30E+06	8,22E-05		
		0.8	1,12E+07	7,14E-05		
		1.0	1,49E+07	6,72E-05		
		1.5	2,14E+07	7,00E-05		

ANEXO 8

TABLAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ALDEHÍDOS. ESTÁNDARES GASEOSOS. GC/ECD. COLUMNA DB-5 (30 m).

ANEXO 8.1

Tabla 1. Calibración para los derivados PFPH-hidrazónicos (estándar gaseoso) de la serie de aldehídos (C_2-C_{10}). Microextracción en fase sólida (SPME) con inyección manual.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, mmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Etanal	3.05	90	4,22E+05	2,13E-08	0,998	41477594.8 (x)
		137	5,19E+05	2,64E-08		
		182	6,88E+05	2,64E-08		
		228	1,01E+06	2,26E-08		
		273	1,13E+06	2,41E-08		
Propanal	3.77	90	9,27E+05	9,71E-09	0,997	90859306.9 (x)
		137	1,37E+06	9,98E-09		
		182	1,77E+06	1,03E-08		
		228	1,85E+06	1,23E-08		
		273	2,49E+06	1,10E-08		
Butanal	4.71	90	1,70E+06	5,30E-09	0,997	155496175.0 (x)
		137	2,14E+06	6,39E-09		
		182	3,16E+06	5,76E-09		
		228	3,57E+06	6,38E-09		
		273	4,44E+06	6,15E-09		
		364	5,26E+06	6,92E-09		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, mmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Pentanal	5.88	90	2,24E+06	4,03E-09	0,998	239842930.0 (x)
		137	3,65E+06	3,75E-09		
		182	4,62E+06	3,94E-09		
		228	5,91E+06	3,86E-09		
		273	6,56E+06	4,16E-09		
		364	8,16E+06	4,46E-09		
Hexanal	7.13	90	2,77E+06	3,29E-09	0,999	378678602.0 (x)
		137	4,74E+06	2,89E-09		
		182	6,80E+06	2,68E-09		
		228	9,15E+06	2,49E-09		
		273	1,04E+07	2,63E-09		
		364	1,38E+07	2,63E-09		
Octanal	9.75	90	3,87E+06	2,32E-09	0,998	519866266.0 (x)
		137	6,38E+06	2,15E-09		
		182	9,04E+06	2,01E-09		
		228	1,33E+07	1,72E-09		
		273	1,44E+07	1,89E-09		
		364	1,86E+07	1,96E-09		

Tabla 1. Continuación.

PFPH-Hidrazona	t_R, min	Nivel de concentración, mmoles/L	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
Nonanal	11.05	90	4,71E+06	1,91E-09	0,997	660063492.0 (x)
		137	7,71E+06	1,78E-09		
		182	1,12E+07	1,63E-09		
		228	1,71E+07	1,33E-09		
		273	1,87E+07	1,46E-09		
		364	2,34E+07	1,55E-09		
Decanal	12.32	90	1,23E+06	7,30E-09	0,995	185235186.0 (x)
		137	2,15E+06	6,38E-09		
		182	2,82E+06	6,46E-09		
		228	4,74E+06	4,81E-09		
		273	5,35E+06	5,10E-09		
		364	6,73E+06	5,41E-09		

ANEXO 9

TABLAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE PENTAFLÚORFENILHIDRACINA (PFPH). ESTÁNDAR LÍQUIDO. GC/ECD. COLUMNA DB-5 (30 m).

ANEXO 9.1

Tabla 1. Calibración para la pentaflúorfenilhidracina (PFPH), solución metanólica. Nivel de concentración alto. Inyección automática.

t_R, min	Cantidad, nmoles	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
2.34	10.0	1.1165e7	8.9566E-7	0,999	1453380.08 (x)
	20.0	2.7701E7	7.2200E-7		
	30.0	3.7371E7	8.0276E-7		
	50.0	7.5856E7	6.5914E-7		
	80.0	1.1738E8	6.8156E-7		

ANEXO 9.2

Tabla 1. Calibración para la pentaflúorfenilhidracina (PFPH), solución metanólica. Nivel de concentración bajo. Inyección automática.

t_R, min	Cantidad, nmoles	Área, cuentas	R_f	R^2	Ecuación lineal
2.34	2.53	1.8745e6	1.3465e-6	0,999	767104.04 (x)
	5.05	3.3765e6	1.4951e-6		
	10.10	8.6845e6	1.1651e-6		
	15.15	1.1165e7	1.3564e-6		
	20.19	1.5490e7	1.3036e-6		

ANEXO 10

TABLA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (C_2-C_6 y BENZOICO). ESTÁNDARES LÍQUIDOS. GC/ECD. COLUMNA DB-5 (30 m).

ANEXO 10

Tabla 1. Calibración para los ésteres de PFB derivados de los ácidos carboxílicos C_2-C_6 y benzoico, estándar líquido. Microextracción en fase sólida (SPME) con inyección manual.

Ésteres de PFB	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas			R_f	Ecuación lineal
			Promedio	s	*CV, %*		
Acético	7.98	10.80	2,6E+06	1,1E+05	4,5	4,24E-06	237465.3 (x)
		21.60	4,4E+06	2,4E+05	5,5	4,93E-06	
		43.20	9,6E+06	2,0E+05	2,1	4,48E-06	
		86.40	1,8E+07	2,5E+05	1,4	4,89E-06	
		179,16	3,8E+07	1,2E+06	3,0	4,68E-06	
Propanoico	9.69	10.80	3,2E+06	6,7E+04	2,1	3,33E-06	361065.0 (x)
		21.60	5,7E+06	1,8E+05	3,2	3,77E-06	
		43.20	1,2E+07	3,5E+05	3,0	1,18E+07	
		86.40	2,4E+07	1,6E+05	0,7	3,57E-06	
		179,16	4,9E+07	1,4E+06	2,8	3,59E-06	
Butanoico	11.22	5.40	1,9E+06	4,8E+04	2,6	2,91E-06	411510.8 (x)
		10.80	4,9E+06	3,1E+05	6,4	2,24E-06	
		21.60	9,0E+06	3,8E+05	4,1	2,35E-06	
		32.00	1,4E+07	5,7E+05	4,1	2,29E-06	
		43.20	1,6E+07	5,0E+05	3,1	2,67E-06	
		86.40	3,6E+07	6,8E+05	1,9	2,40E-06	

Tabla 1. Continuación.

Ésteres de PFB	t_R, min	Nivel de concentración, µmoles/L	Área, cuentas			R_f	Ecuación lineal
			Promedio	s	*CV, %*		
Pentanoico	12.88	2.70	3,6E+07	6,8E+05	1,9	2,40E-06	393308.4 (x)
		5.40	9,0E+05	6,6E+04	7,7	3,13E-06	
		10.80	2,2E+06	1,1E+04	0,5	2,46E-06	
		21.60	4,7E+06	5,0E+04	1,1	2,29E-06	
		32.00	9,3E+06	4,0E+04	0,4	2,33E-06	
		43.20	1,5E+07	2,1E+05	1,4	2,20E-06	
		86.40	1,4E+07	2,2E+05	1,6	3,15E-06	294953.5 (x)
Hexanoico	14.49	2.70	6,1E+05	5,5E+04	9,1	4,46E-06	
		5.40	1,9E+06	2,5E+04	1,3	2,81E-06	
		10.80	4,1E+06	2,3E+05	5,6	2,61E-06	
		21.60	8,5E+06	9,7E+04	1,1	2,55E-06	
		32.00	1,0E+07	3,7E+05	3,5	3,15E-06	
		43.20	1,0E+07	4,8E+05	4,6	4,07E-06	
		86.40	2,6E+08	2,2E+06	8,6	3,37E-06	
Benzoico	17.70	2.70	1,0E+05	1,4E+04	14,3	7,67E-06	234144.7 (x)
		5.40	7,2E+05	7,9E+03	1,1	7,50E-06	
		10.80	2,1E+06	9,2E+04	4,3	5,13E-06	
		21.60	4,8E+06	1,1E+05	2,3	4,60E-06	
		32.00	8,5E+06	9,7E+04	1,1	3,78E-06	
		43.20	8,6E+06	7,3E+05	8,6	5,03E-06	
		86.40	2,1E+07	7,5E+05	3,6	4,15E-06	

ANEXO 11-1

EFECTO DEL pH SOBRE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (C_2-C_6 Y BENZOICO) CON PFBBr

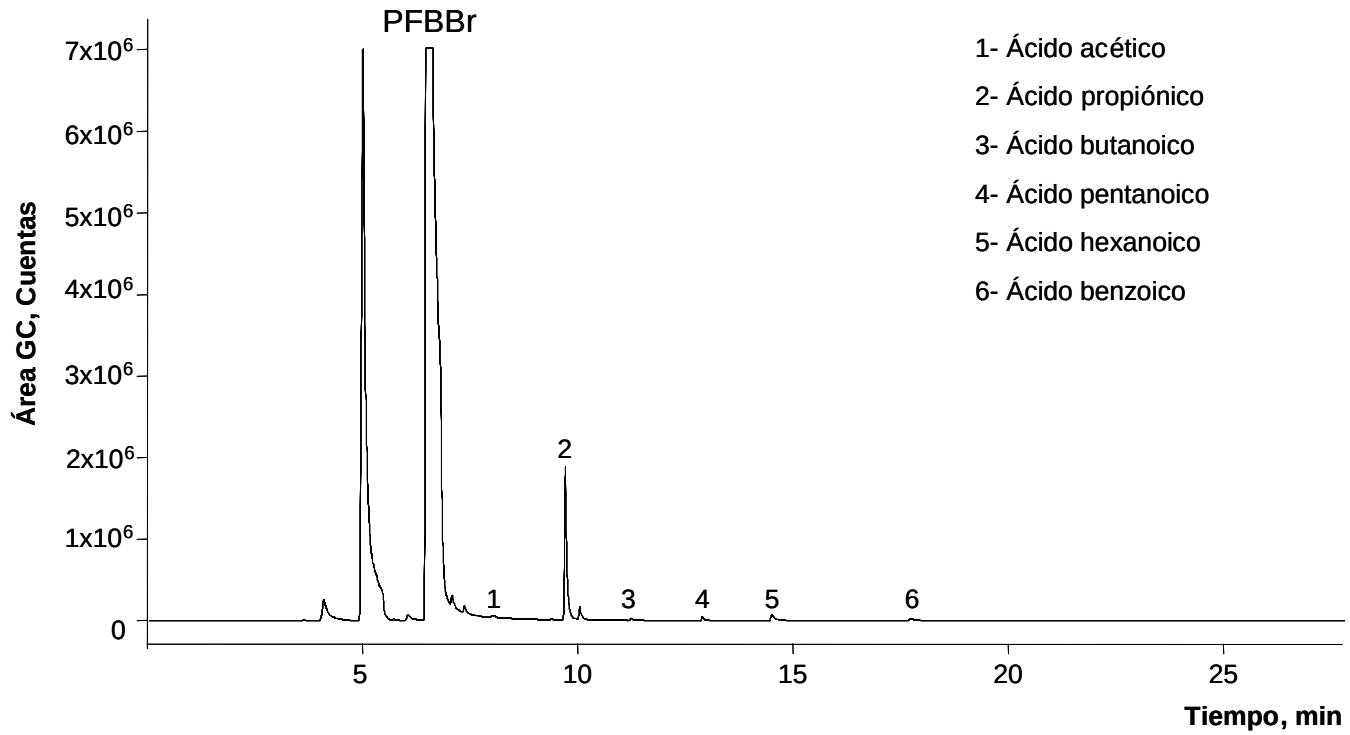


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de reacción: 3. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

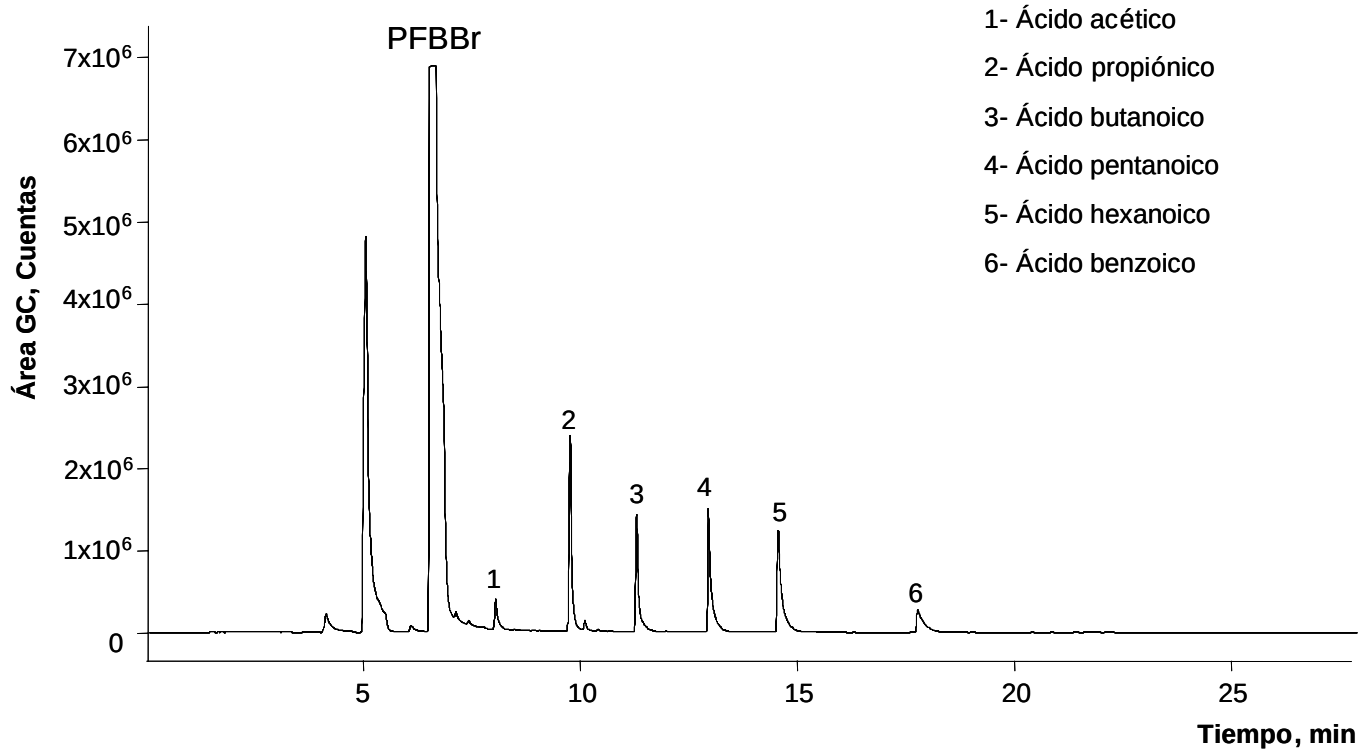


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de reacción: 6. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

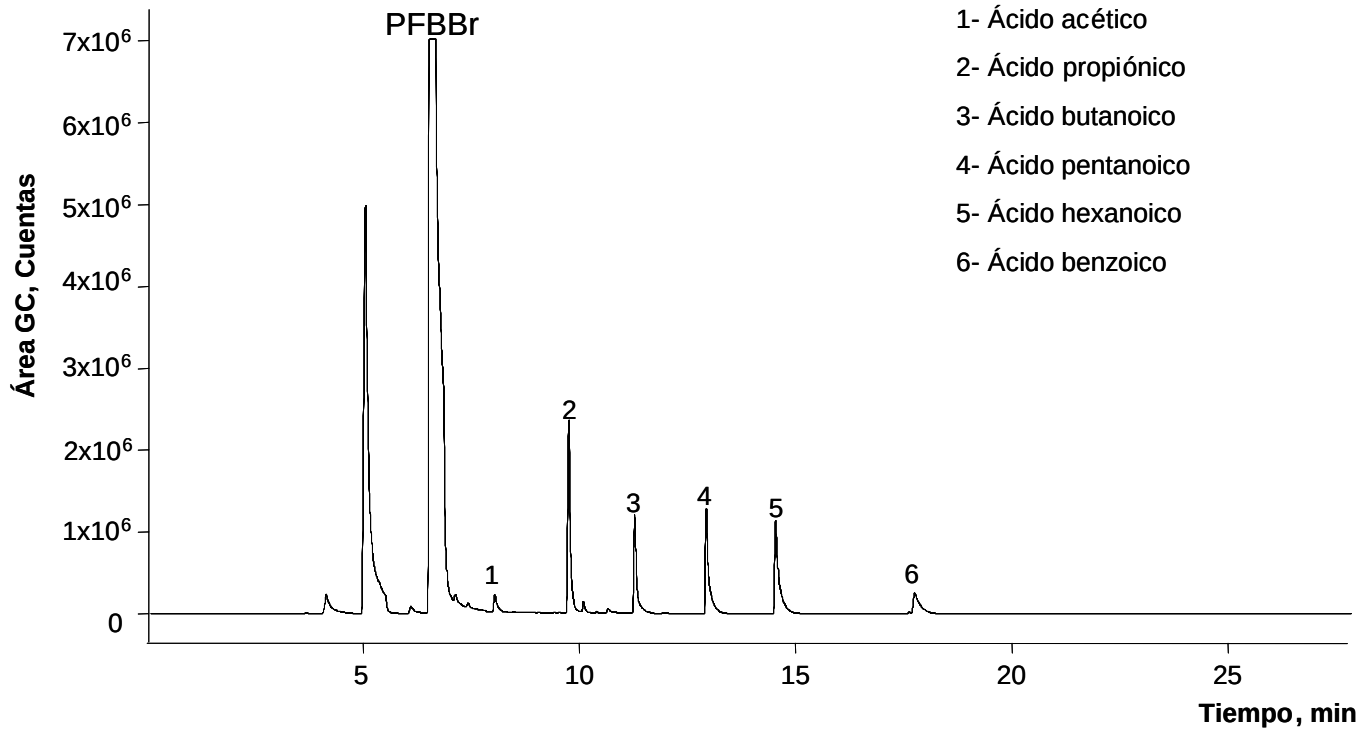


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de reacción: 7. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

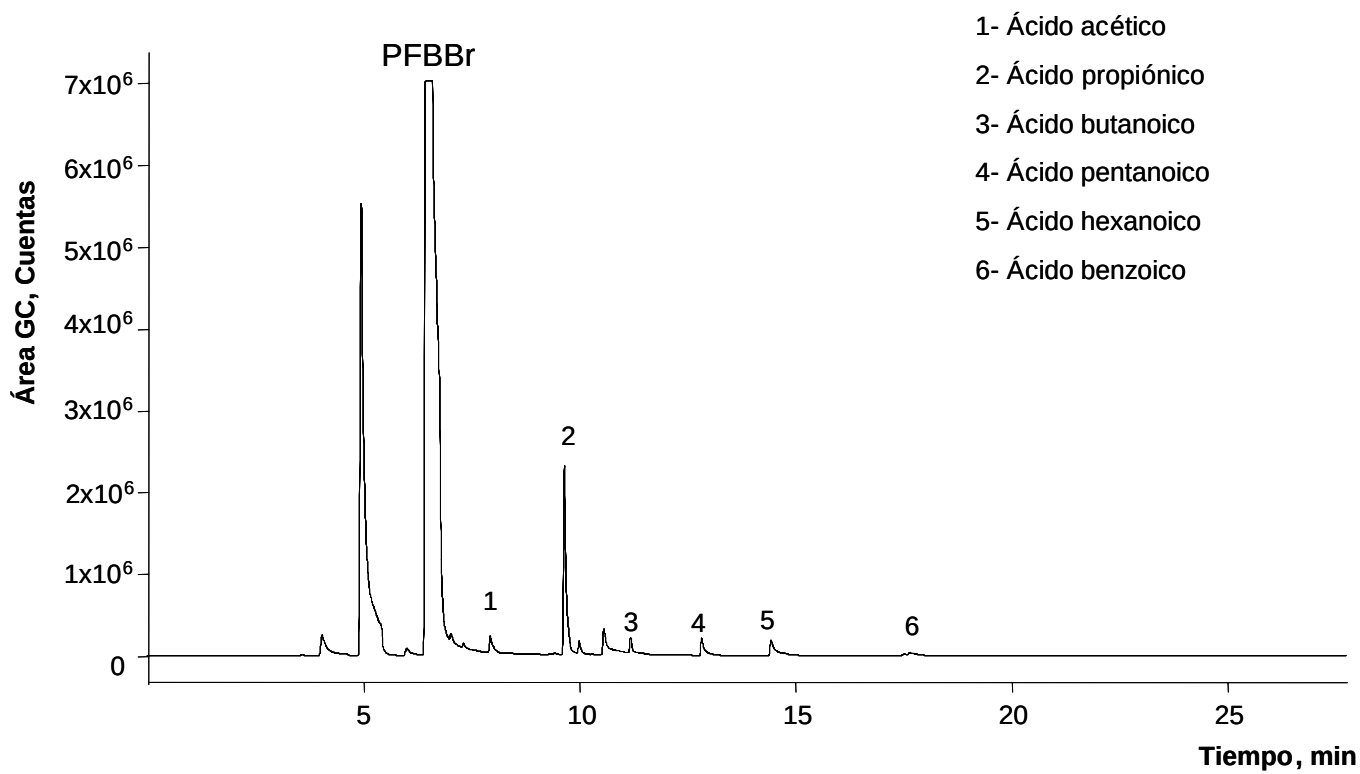


Figura 4. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de reacción: 8. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD

ANEXO 11-2

EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (C_2-C_6 Y BENZOICO) CON PFBBr

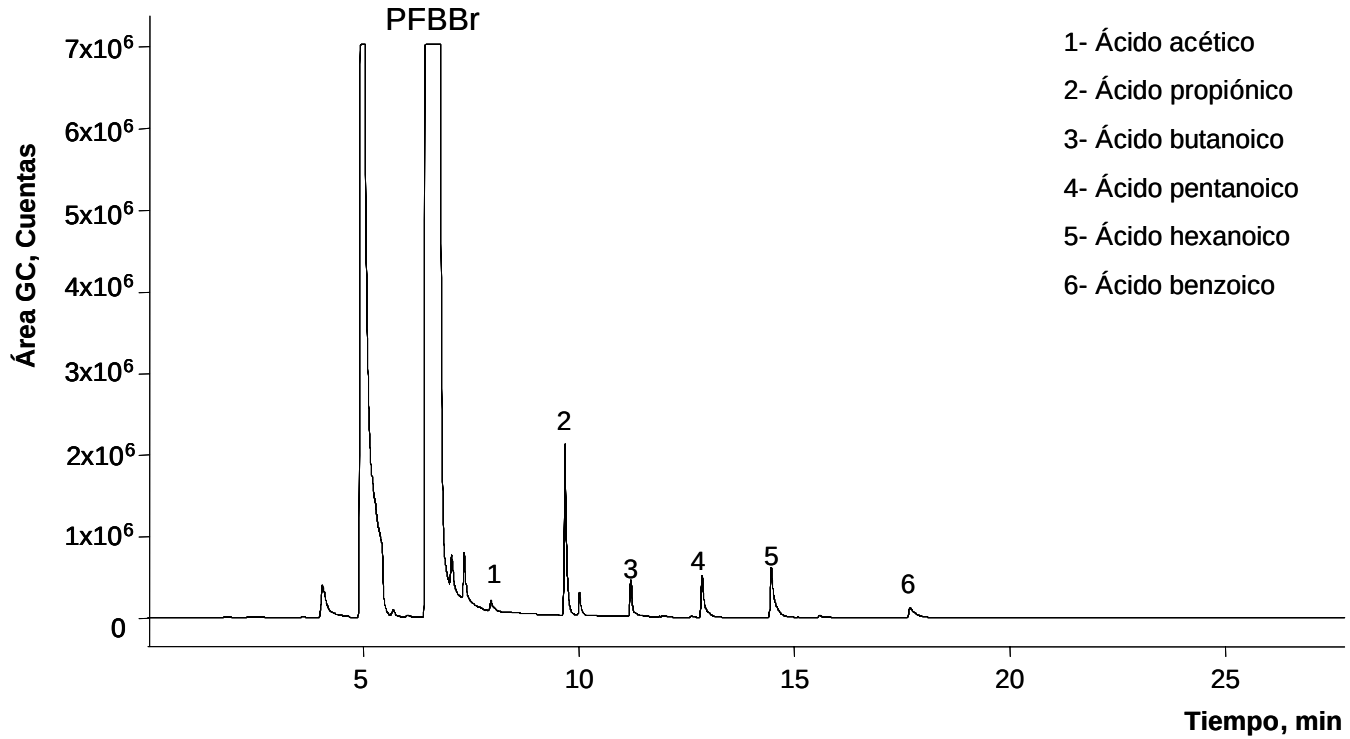


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de reacción: 1 hora. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

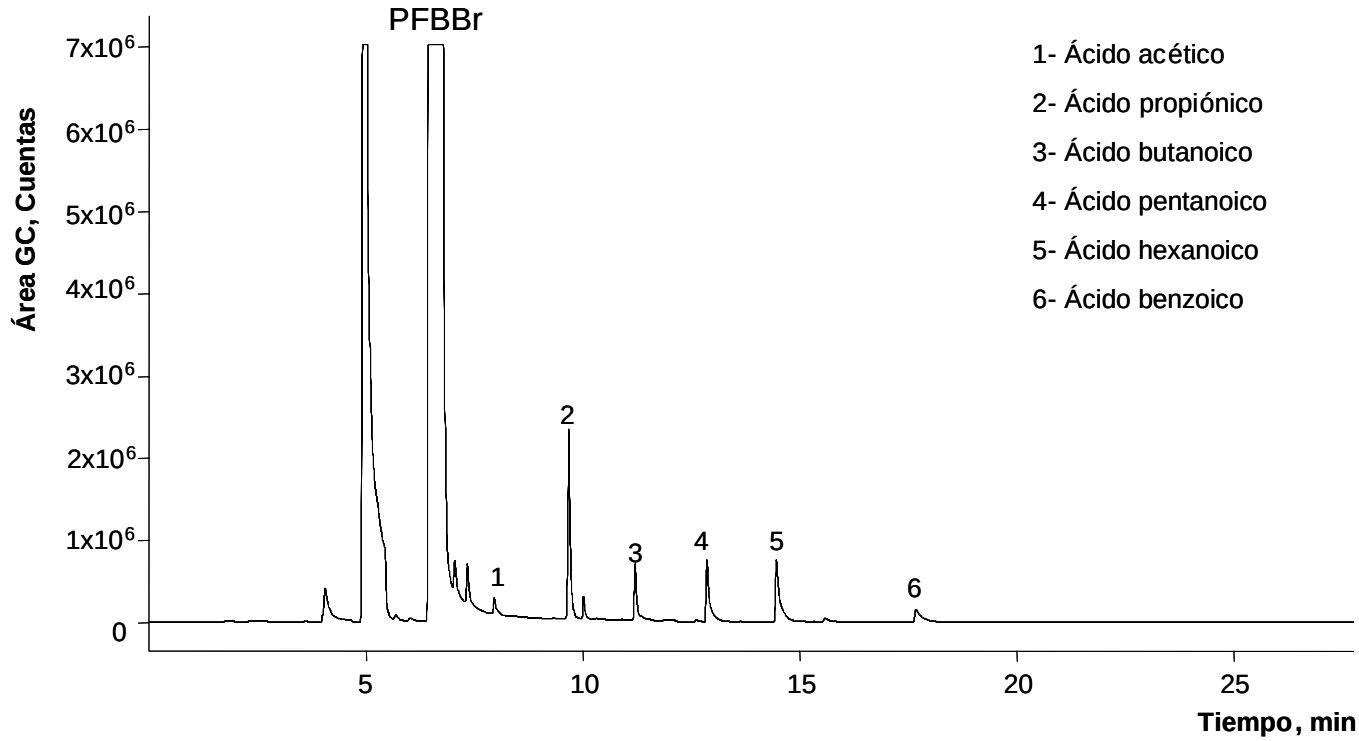


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de reacción: 2 horas. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

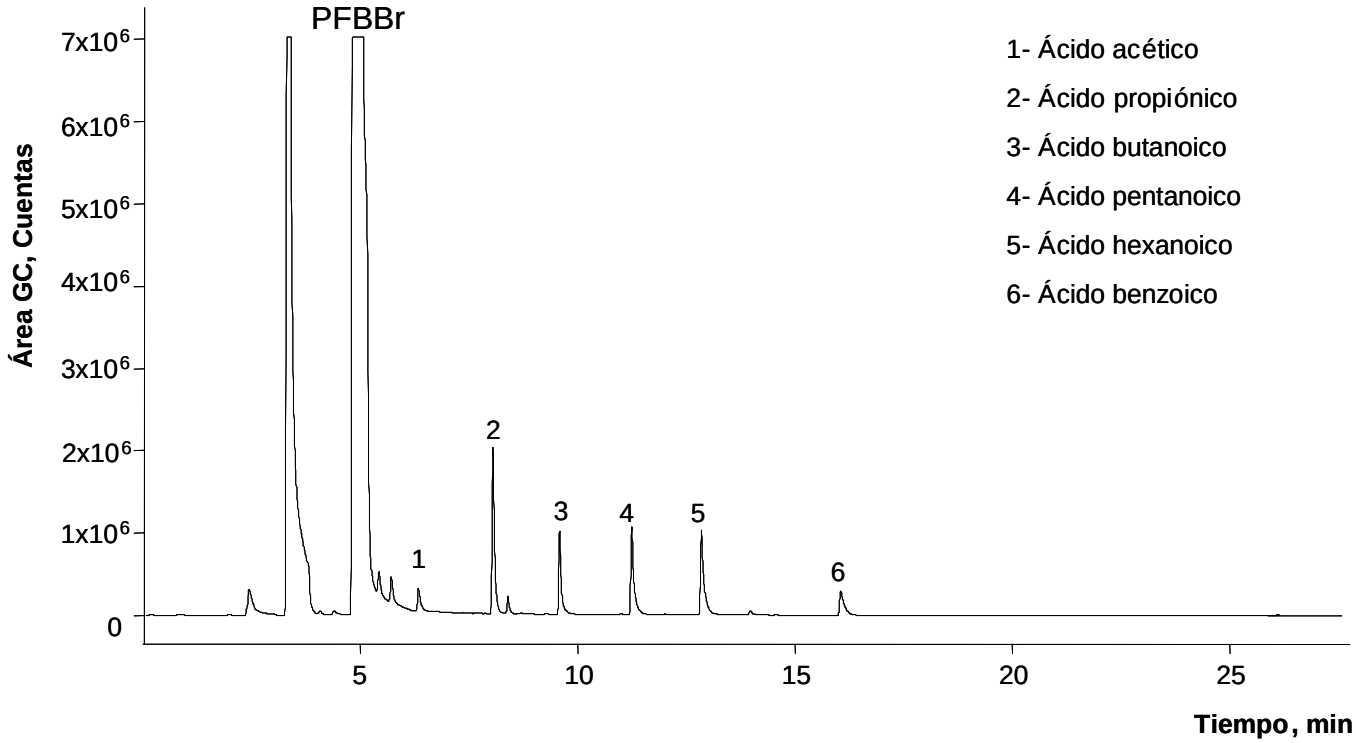


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de reacción: 3 horas. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

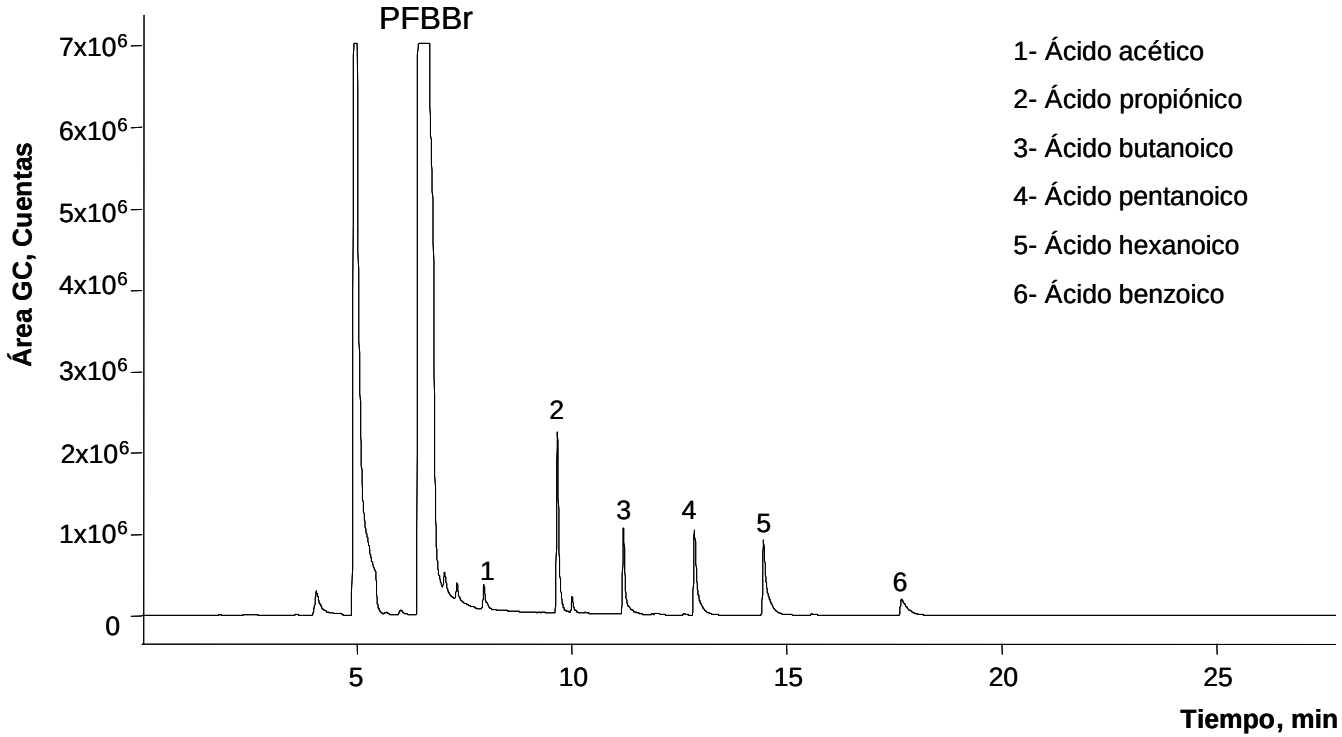


Figura 4. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de reacción: 4 horas. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

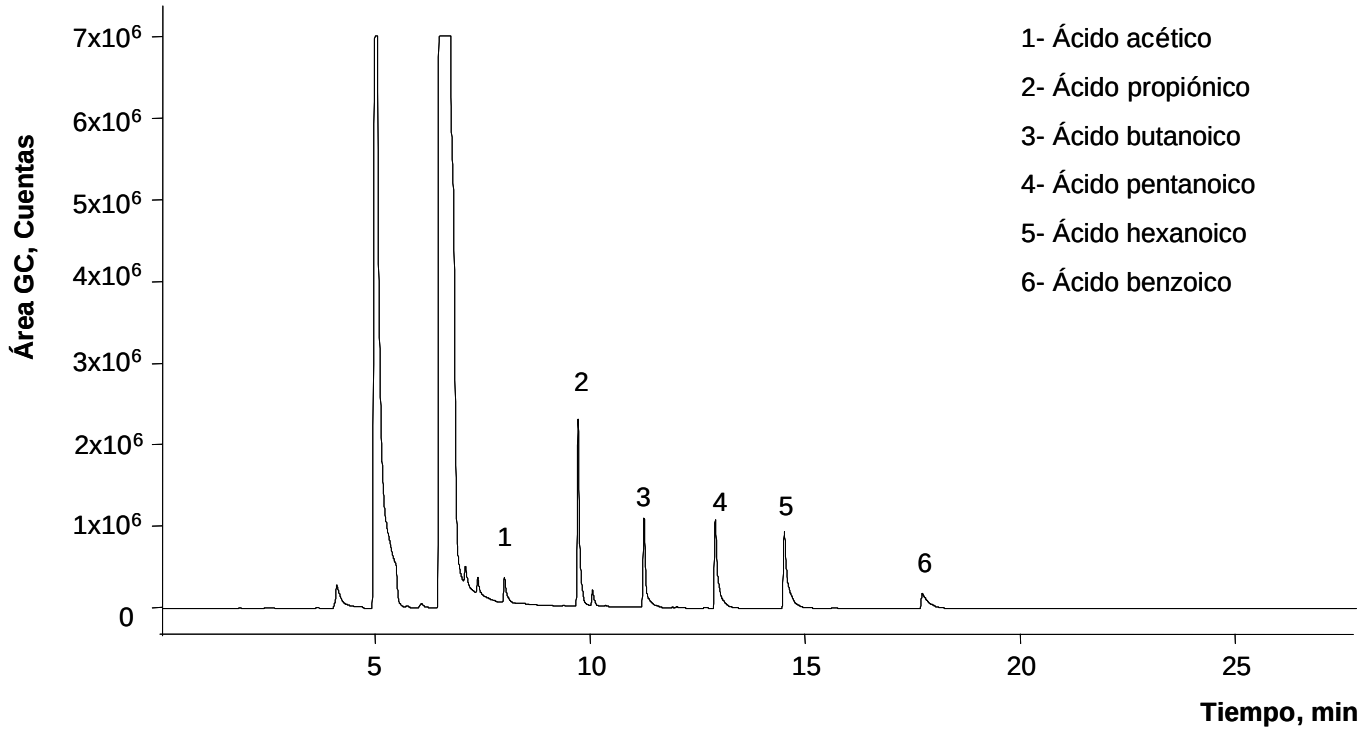


Figura 5. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de reacción: 5 horas. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

ANEXO 11-3

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (C_2-C_6 Y BENZOICO) CON PFBBr

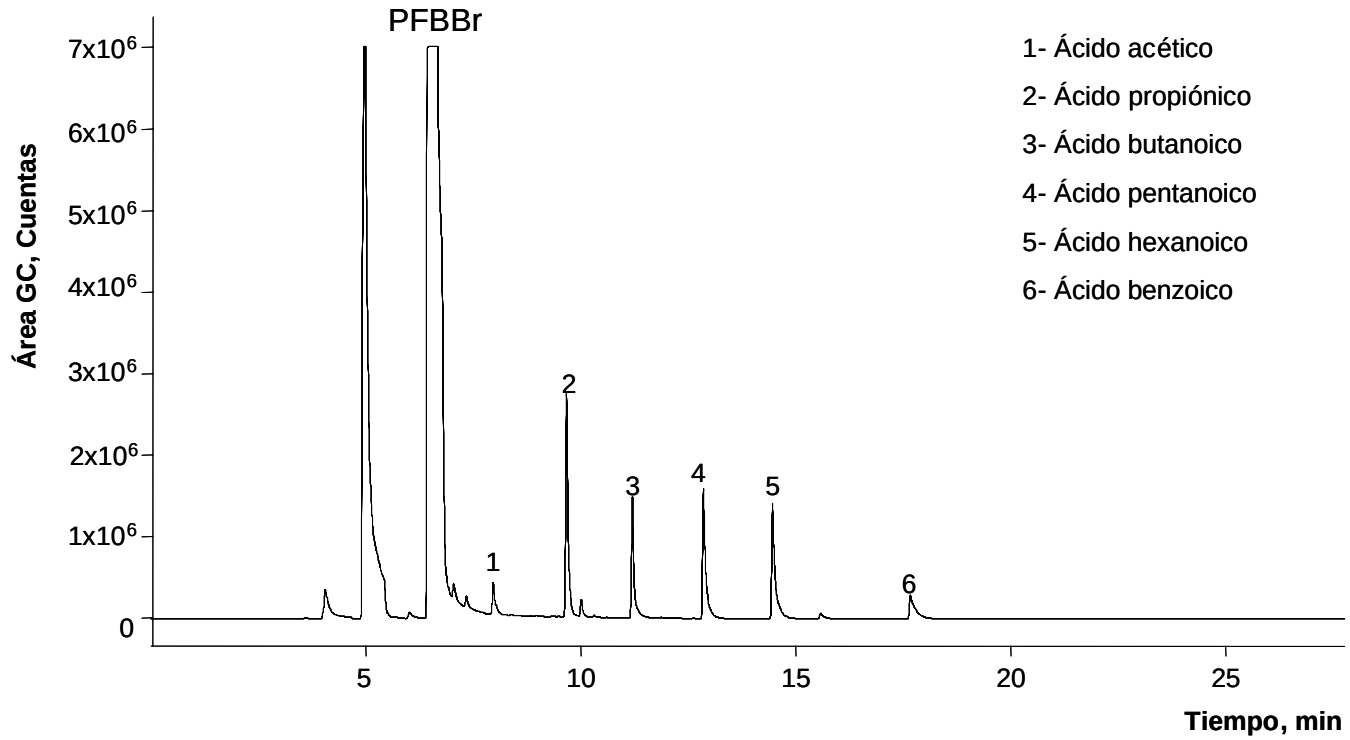


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Temperatura de reacción: 60°C. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

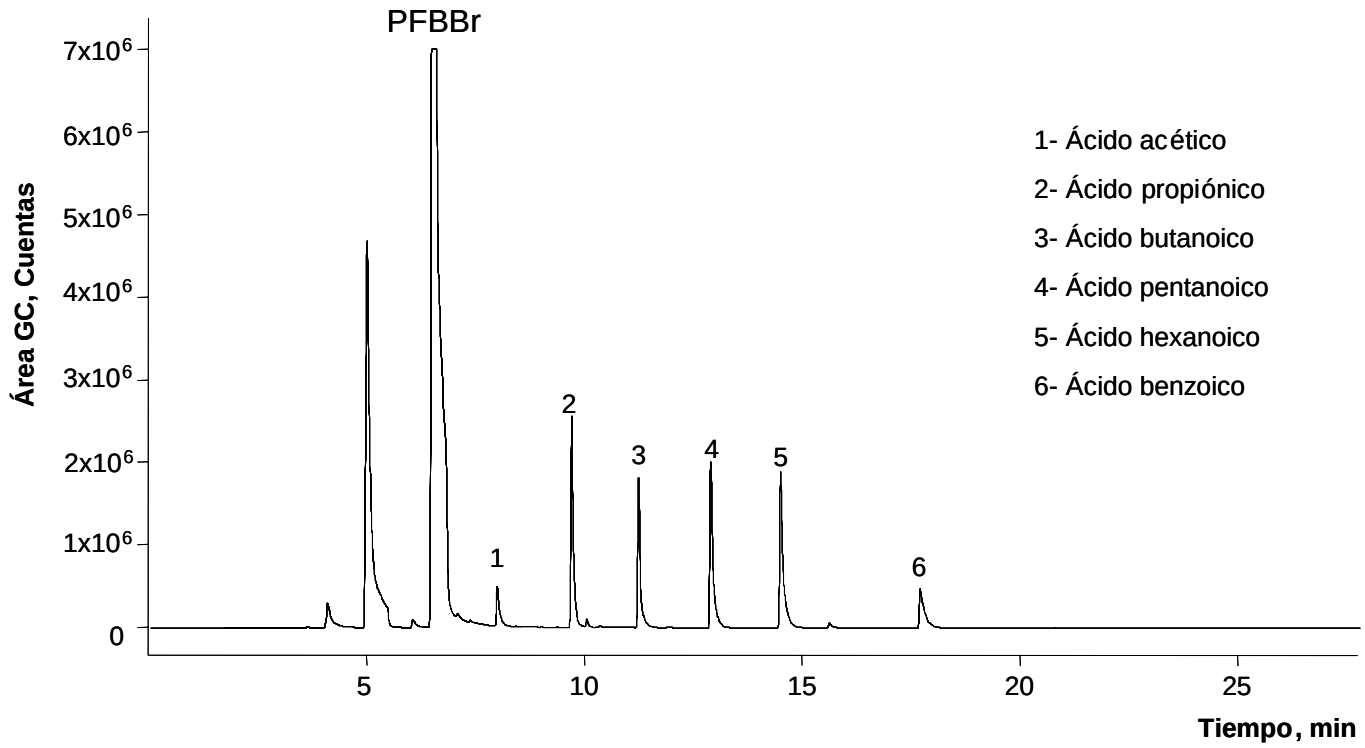


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Temperatura de reacción: 70°C. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

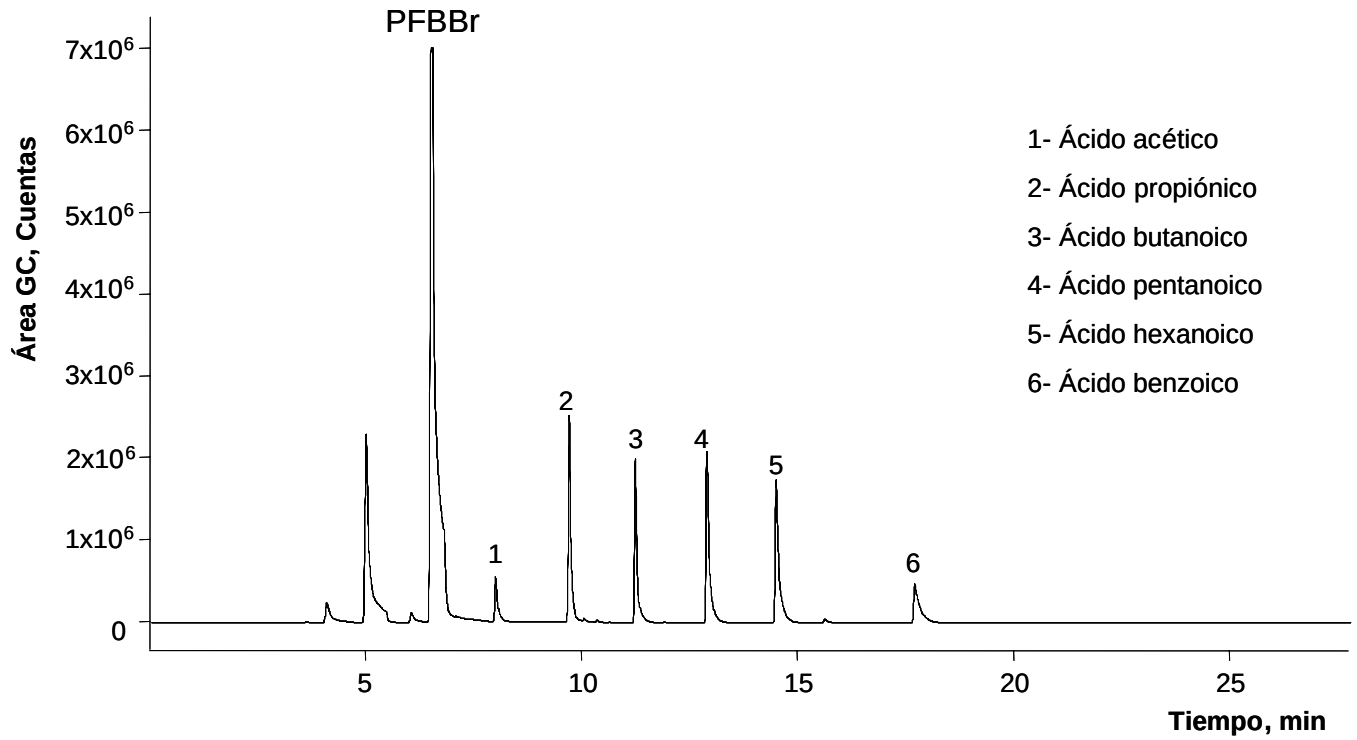


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Temperatura de reacción: 80°C. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

ANEXO 11- 4

EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE AGENTE DERIVATIZANTE SOBRE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS (C_2-C_6 Y BENZOICO) CON PFBBr

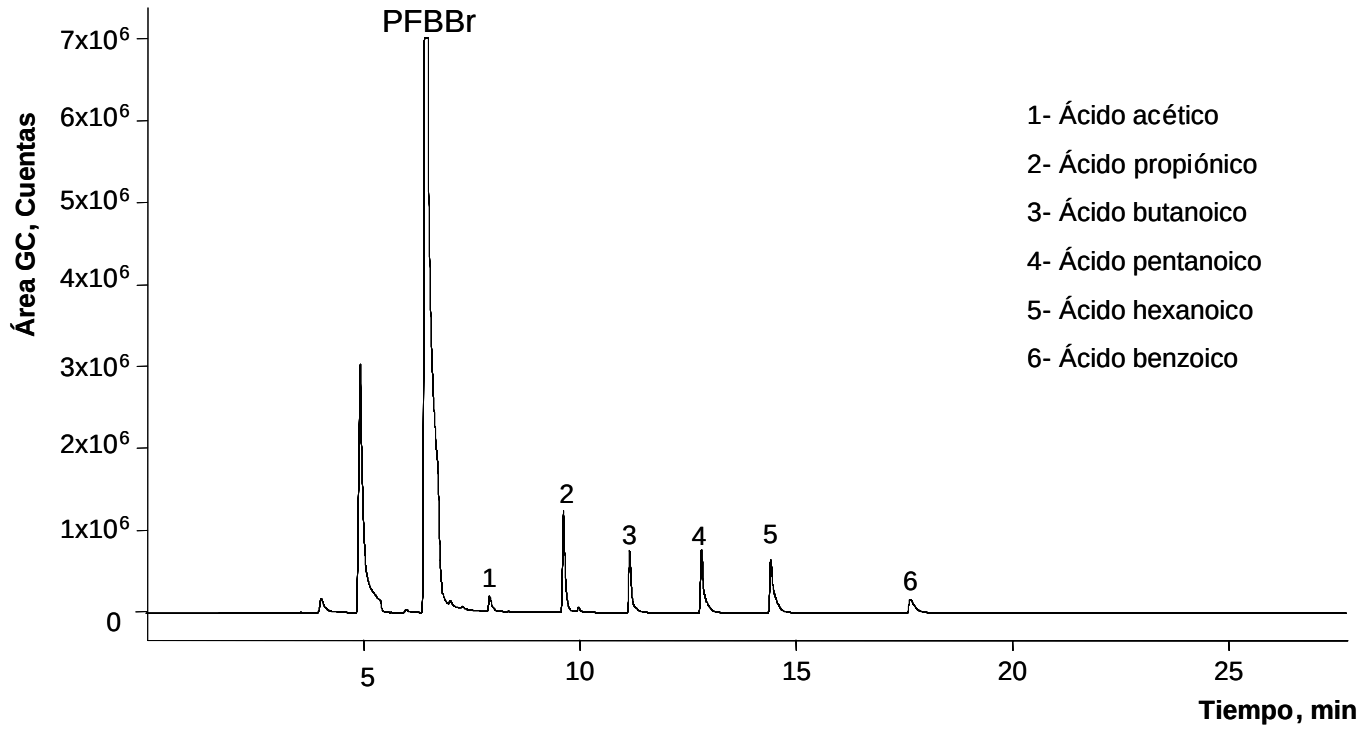


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Relación PFBBr/ácidos: 4. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

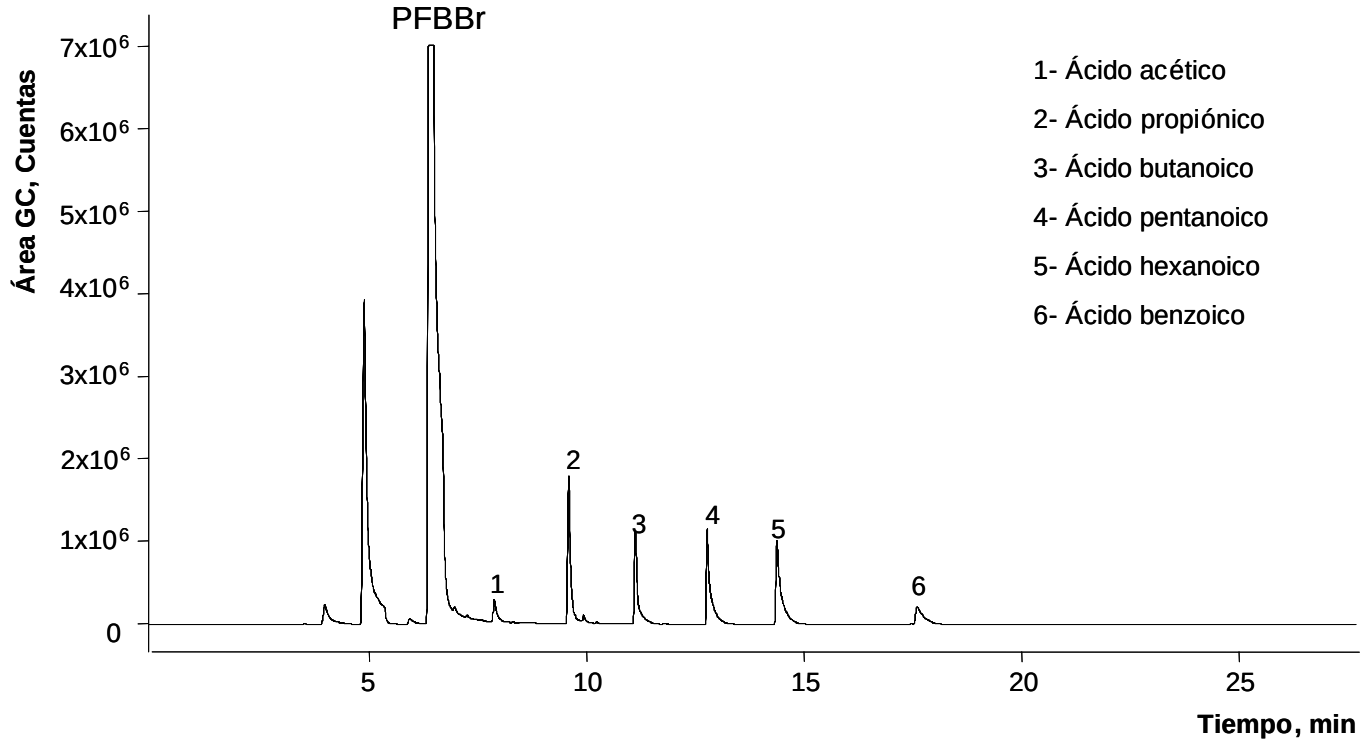


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Relación PFBBr/ácidos: 6. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

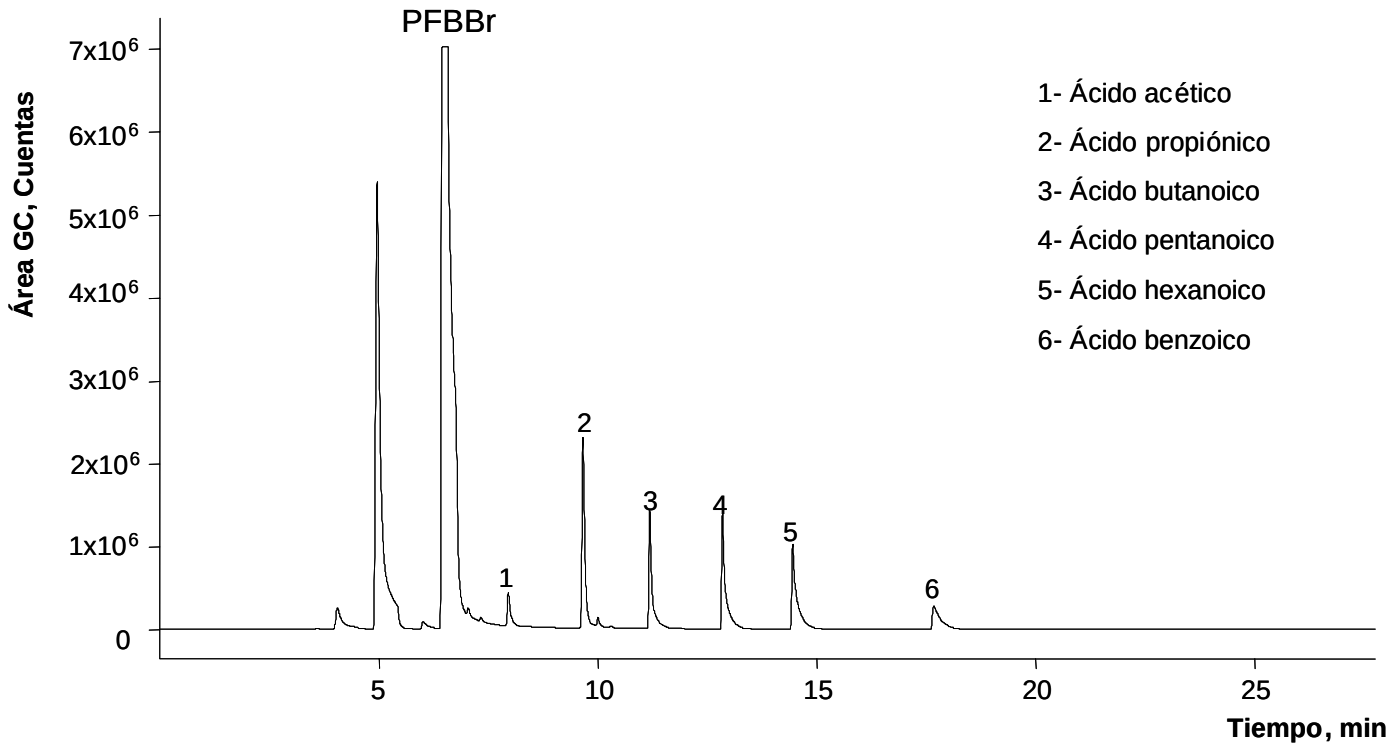


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Relación PFBBr/ácidos: 7. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

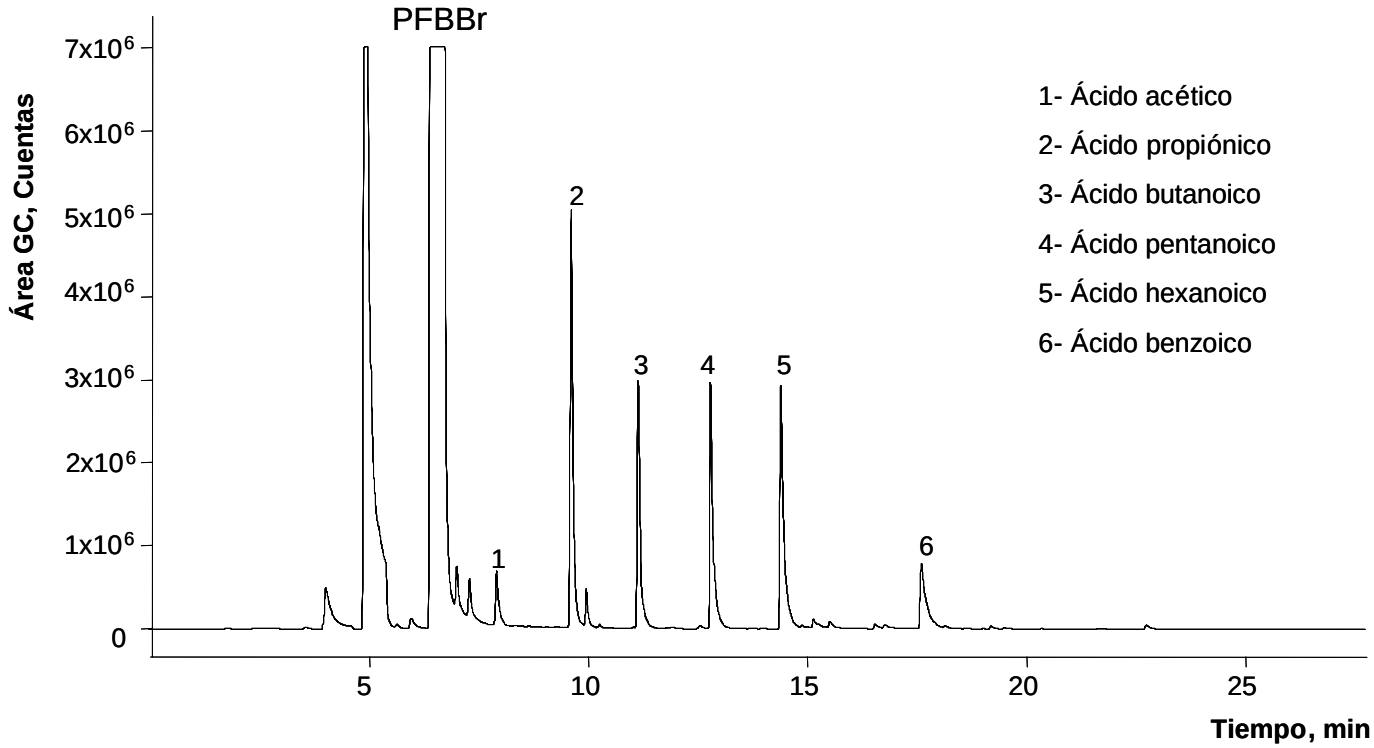


Figura 4. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Relación PFBBr/ácidos: 9. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

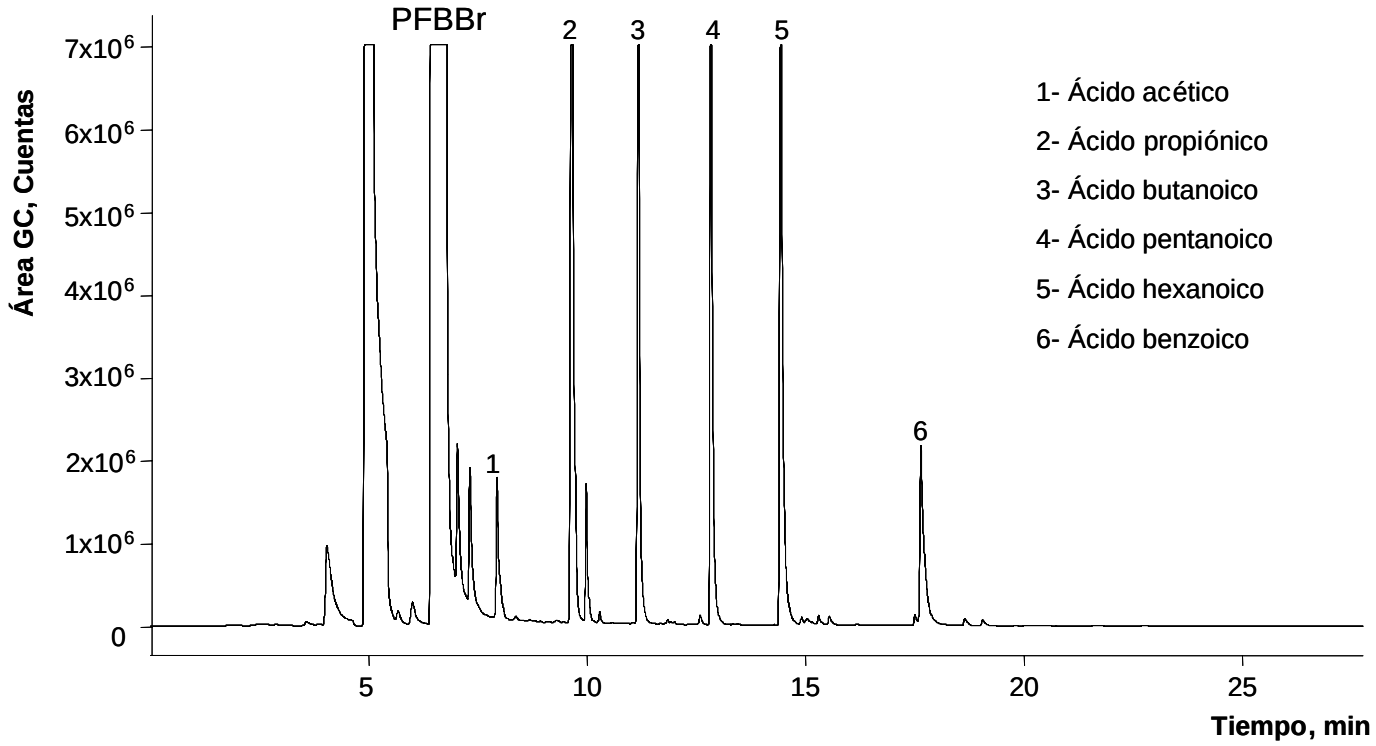


Figura 5. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Relación PFBBr/ácidos: 13. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

ANEXO 12

EFECTO DE DIFERENTES PARÁMETROS (pH, TIEMPO, TEMPERATURA, CANTIDAD DE AGENTE DERIVATIZANTE) SOBRE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN DE ÁCIDOS CARBOXÍLICOS CON PFBBr.

ANEXO 12-1

Tabla 1. Efecto del pH sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr.

pH del medio	Áreas, cuentas	Promedio	s	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido acético				
3	3,12E+05 3,46E+05	3,3E+05	2,4E+04	7
6	2,87E+06 2,86E+06	2,870E+06	7,071E+03	0,2
7	1,91E+06 1,93E+06	1,90E+06	1,41E+04	1
8	1,15E+06 1,03E+06	1,10E+06	8,49E+04	8
Éster de PFB/Ácido propiónico				
3	7,55E+06 8,22E+06	7,89E+06	4,74E+05	6
6	1,09E+07 1,07E+07	1,10E+07	1,41E+05	2
7	1,01E+07 9,94E+06	1,00E+07	1,13E+05	1
8	7,93E+06 7,59E+06	7,8E+06	2,4E+05	3
Éster de PFB/Ácido butanoico				
3	1,74E+05 1,79E+05	1,77E+05	3,54E+03	2
6	9,24E+06 1,07E+07	1,E+07	1,0E+06	10
7	5,72E+06 5,92E+06	6,0E+06	1,4E+05	2
8	1,60E+06 1,61E+06	1,61E+06	7,07E+03	0,4

Tabla 1. Continuación.

pH del medio	Áreas, cuentas	Promedio	s	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido pentanoico				
3	3,13E+05 2,96E+05	3,0E+05	1,2E+04	4
6	8,93E+06 9,34E+06	9,0E+06	2,9E+05	3
7	7,05E+06 7,29E+06	7,2E+06	1,7E+05	2
8	1,44E+06 1,41E+06	1,43E+06	2,12E+04	1
Éster de PFB/Ácido hexanoico				
3	5,92E+05 5,58E+05	5,8E+05	2,4E+04	4
6	9,14E+06 9,64E+06	9,4E+06	3,5E+05	4
7	7,58E+06 7,99E+06	7,8E+06	2,9E+05	4
8	1,50E+06 1,45E+06	1,48E+06	3,54E+04	2
Éster de PFB/Ácido benzoico				
3	3,62E+05 2,97E+05	3,3E+05	4,6E+04	14
6	3,88E+06 3,86E+06	3,9E+05	1,4E+04	0,4
7	2,92E+06 2,85E+06	2,89E+06	4,95E+04	2
8	7,11E+05 7,28E+05	7,2E+05	1,2E+04	2

ANEXO 12-2

Tabla 1. Efecto del tiempo sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr.

Tiempo de reacción, h	Áreas, cuentas	Promedio	σ	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido acético				
1	2,75E+06	2,7E+06	1,4E+05	5
	2,53E+06			
	2,80E+06			
2	3,08E+06	2,9E+06	2,8E+05	10
	2,69E+06			
3	2,92E+06	3,0E+06	1,8E+05	6
	3,22E+06			
	2,91E+06			
4	3,28E+06	3,30E+06	4,16E+04	1
	3,30E+06			
	3,36E+06			
5	3,31E+06	3,24E+06	6,43E+04	2
	3,19E+06			
	3,21E+06			
Éster de PFB/Ácido propiónico				
1	8,87E+06	8,0E+06	6,4E+05	8
	7,89E+06			
	7,66E+06			
2	9,94E+06	9,3E+06	9,4E+05	10
	8,61E+06			
3	8,84E+06	9,5E+06	5,8E+05	6
	1,00E+07			
	9,54E+06			
4	1,04E+07	1,00E+07	2,84E+05	3
	1,02E+07			
	9,84E+06			
5	1,02E+07	1,02E+07	5,25E+05	5
	9,65E+06			
	1,07E+07			

Tabla 1. Continuación.

Tiempo de reacción, h	Áreas, cuentas	Promedio	σ	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido butanoico				
1	2,49E+06	2,8E+06	2,5E+05	9
	2,91E+06			
	2,93E+06			
2	3,68E+06	4,0E+06	2,2E+05	6
	3,99E+06			
3	4,65E+06	4,5E+06	5,9E+05	13
	4,92E+06			
	3,79E+06			
4	4,95E+06	5,0E+06	4,8E+05	10
	4,41E+06			
	5,37E+06			
5	5,44E+06	5,5E+06	3,0E+05	5
	5,22E+06			
	5,81E+06			
Éster de PFB/Ácido pentanoico				
1	2,83E+06	3,0E+06	2,5E+05	8
	3,15E+06			
	3,32E+06			
2	4,16E+06	4,20E+06	4,95E+04	1
	4,23E+06			
3	5,28E+06	5,0E+06	6,1E+05	12
	5,63E+06			
	4,45E+06			
4	5,49E+06	5,6E+06	3,6E+05	6
	5,26E+06			
	5,96E+06			
5	6,06E+06	6,2E+06	3,6E+05	6
	5,91E+06			
	6,60E+06			

Tabla 1. Continuación.

Tiempo de reacción, h	Áreas, cuentas	Promedio	σ	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido hexanoico				
1	5,85E+06	6,0E+06	3,5E+05	6
	6,38E+06			
	5,72E+06			
2	6,63E+06	6,7E+06	2,1E+05	3
	6,90E+06			
	6,48E+06			
3				
	6,45E+06	6,6E+06	2,8E+05	4
	6,42E+06			
	6,92E+06			
4				
	1,35E+06	1,5E+06	1,8E+05	12
	1,43E+06			
	1,70E+06			
5				
	1,69E+06	1,66E+06	4,95E+04	3
	1,62E+06			
Éster de PFB/Ácido benzoico				
1	2,38E+06	2,0E+06	1,4E+05	6
	2,19E+06			
	2,11E+06			
2	2,43E+06	2,30E+06	7,57E+04	3
	2,31E+06			
	2,29E+06			
3				
	2,18E+06	2,3E+06	1,2E+05	5
	2,23E+06			
	2,40E+06			
4	5,85E+06	2,3E+06	7,6E+04	3
	6,38E+06			
	5,72E+06			
5	6,63E+06	2,3E+06	1,1E+05	5
	6,90E+06			
	6,48E+06			

ANEXO 12-3

Tabla 1. Efecto de la temperatura sobre la reacción de derivatización de ácidos carboxílicos con PFBBr.

Temperatura de reacción, °C	Áreas, cuentas	Promedio	σ	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido acético				
60	2,31E+06	2,30E+06	6,08E+04	3
	2,21E+06			
	2,32E+06			
70	2,81E+06	2,9E+06	1,6E+05	6
	2,61E+06			
	2,92E+06			
80	2,87E+06	2,9E+06	1,3E+05	4
	2,75E+06			
	3,00E+06			
Éster de PFB/Ácido propiónico				
60	7,24E+06	7,4E+06	2,7E+05	4
	7,18E+06			
	7,67E+06			
70	6,11E+06	6,3E+06	1,9E+05	3
	6,49E+06			
	6,23E+06			
80	7,28E+06	7,1E+06	5,9E+05	8
	6,38E+06			
	7,50E+06			
Éster de PFB/Ácido butanoico				
60	6,34E+06	6,6E+06	1,8E+05	3
	6,63E+06			
	6,67E+06			
70	7,38E+06	7,4E+06	5,4E+05	7
	6,84E+06			
	7,92E+06			
80	8,72E+06	8,7E+06	2,2E+05	3
	8,40E+06			
	8,83E+06			

Tabla 1. Continuación.

Temperatura de reacción, °C	Áreas, cuentas	Promedio	σ	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido pentanoico				
60	7,50E+06	7,8E+06	2,3E+05	3
	7,91E+06			
	7,88E+06			
70	8,72E+06	9,0E+06	5,5E+05	6
	8,64E+06			
	9,63E+06			
80	1,05E+07	1,00E+07	6,54E+05	7
	9,28E+06			
	1,03E+07			
Éster de PFB/Ácido hexanoico				
60	8,45E+06	8,4E+06	2,9E+05	3
	8,59E+06			
	8,04E+06			
70	9,02E+06	9,6E+06	8,1E+05	8
	9,18E+06			
	1,05E+07			
80	1,11E+07	1,04E+07	6,22E+05	6
	9,96E+06			
	1,01E+07			
Éster de PFB/Ácido benzoico				
60	3,30E+06	3,2E+06	3,4E+05	11
	3,42E+06			
	2,78E+06			
70	4,26E+06	4,24E+06	6,81E+04	2
	4,29E+06			
	4,16E+06			
80	4,18E+06	4,5E+06	2,7E+05	6
	4,69E+06			
	4,57E+06			

ANEXO 12- 4

Tabla 1. Efecto de la cantidad de agente derivatizante sobre la reacción de ácidos carboxílicos con PFBBr.

Exceso de agente derivatizante (Relación µmolar PFBBr/ácidos)	Áreas, cuentas	Promedio	s	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido acético				
4	1,28E+06 1,39E+06	1,3E+06	7,8E+04	6
6	1,78E+06 1,59E+06	1,7E+06	1,3E+05	8
7	2,02E+06 1,96E+06	2,0E+06	4,2E+04	2
9	3,68E+06 3,84E+06	3,8E+06	1,1E+05	3
13	1,06E+07 9,72E+06	1,0E+07	6,2E+05	6
Éster de PFB/Ácido propiónico				
4	2,25E+06 2,69E+06	2,5E+06	3,1E+05	13
6	3,25E+06 2,96E+06	3,0E+06	2,1E+05	7
7	6,47E+06 6,29E+06	6,4E+06	1,3E+05	2
9	2,28E+07 2,62E+07	2,5E+07	2,4E+06	10
13	4,63E+07 4,48E+07	4,6E+07	1,1E+06	2

Tabla 1. Continuación.

Exceso de agente derivatizante (Relación µmolar PFBBr/ácidos)	Áreas, cuentas	Promedio	s	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido butanoico				
4	3,68E+06 3,91E+06	3,8E+06	1,6E+05	4
6	5,48E+06 5,35E+06	5,42E+06	9,19E+04	2
7	7,49E+06 7,29E+06	7,4E+06	1,4E+05	2
9	1,37E+07 1,27E+07	1,30E+07	7,07E+05	5
13	3,07E+07 2,93E+07	3,00E+07	9,90E+05	3
Éster de PFB/Ácido pentanoico				
4	4,39E+06 4,91E+06	4,7E+06	3,7E+05	8
6	7,05E+06 6,85E+06	7,0E+06	1,4E+05	2
7	8,47E+06 8,42E+06	8,45E+06	3,54E+04	0,4
9	1,51E+07 1,27E+07	1,4E+07	1,7E+06	12
13	3,30E+07 3,22E+07	3,30E+07	5,66E+05	2

Tabla 1. Continuación.

Exceso de agente derivatizante (Relación µmolar PFBBr/ácidos)	Áreas, cuentas	Promedio	s	*CV*, %
Éster de PFB/Ácido hexanoico				
4	4,50E+06 4,86E+06	4,7E+06	2,5E+05	5
6	7,99E+06 7,61E+06	8,0E+06	2,7E+05	3
7	7,99E+06 8,16E+06	8,1E+06	1,2E+05	1
9	1,45E+07 1,40E+07	1,43E+07	3,54E+05	2
13	3,84E+07 3,69E+07	3,8E+07	1,1E+06	3
Éster de PFB/Ácido benzoico				
4	1,75E+06 1,95E+06	8,45E+06	1,41E+05	8
6	2,80E+06 2,55E+06	2,7E+06	1,8E+05	7
7	3,60E+06 3,47E+06	3,54E+06	9,19E+04	3
9	7,11E+06 6,63E+06	6,9E+06	3,4E+05	5
13	1,68E+07 1,61E+07	1,65E+07	4,95E+05	3

ANEXO 13-1

EFECTO DEL pH SOBRE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE ÉSTERES DE PENTAFLÚORBENCILO (PFB)

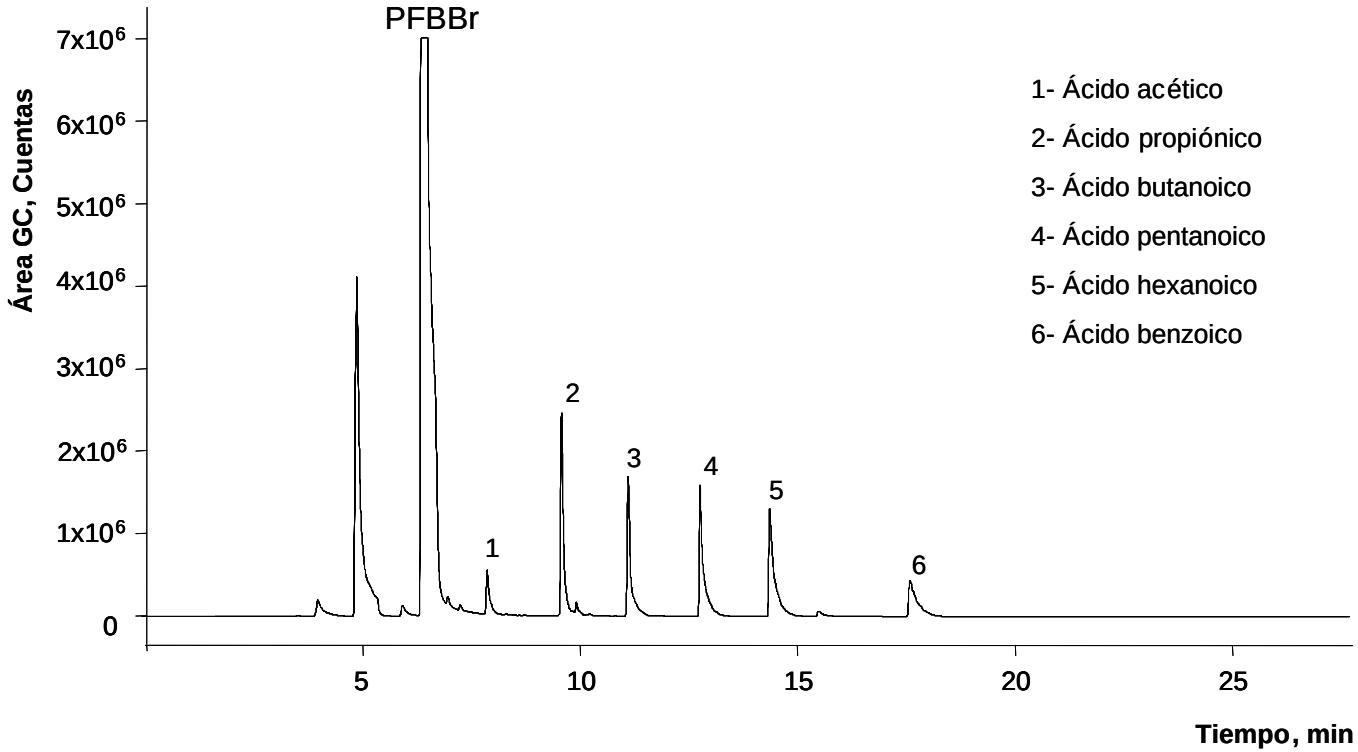


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de extracción: 2. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

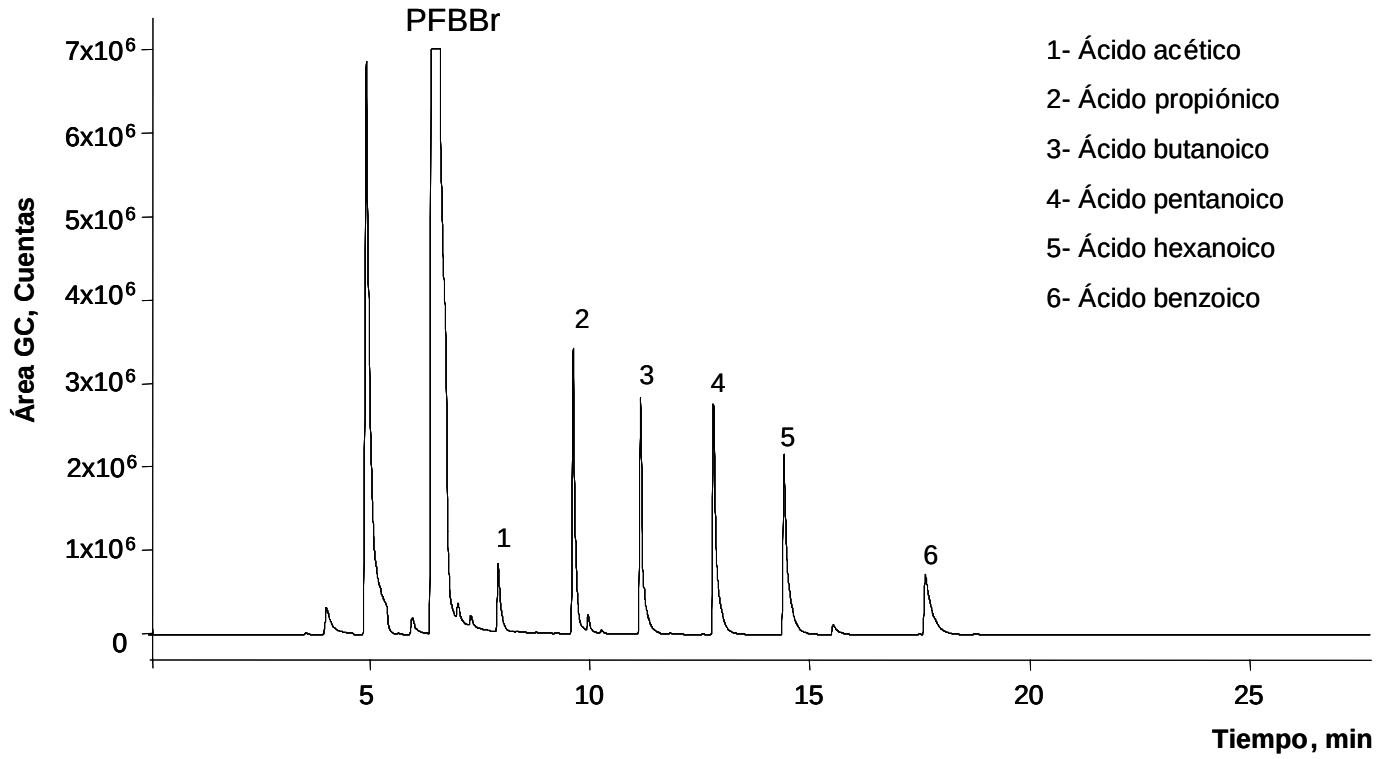


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de extracción: 9. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

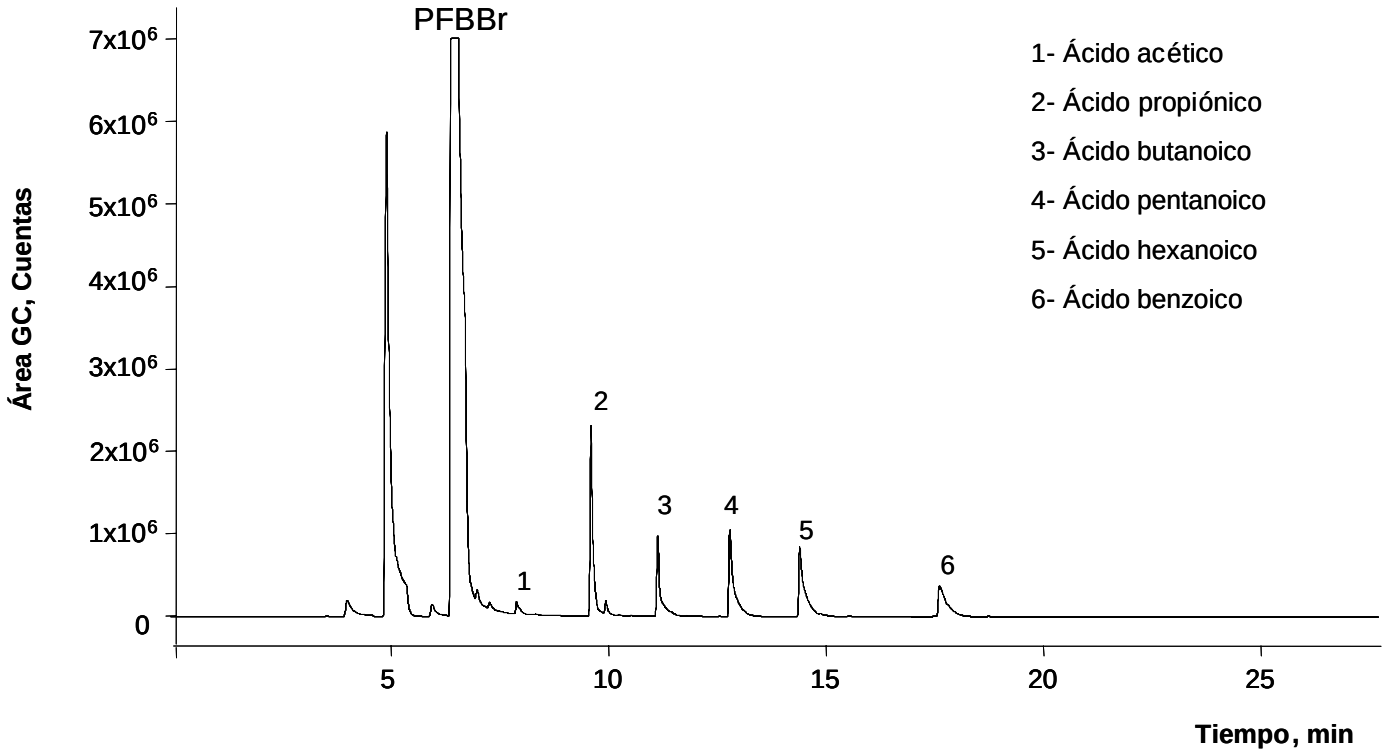


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); pH de extracción: 12. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

ANEXO 13-2

EFECTO DEL TIEMPO SOBRE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE ÉSTERES DE PENTAFLÚORBENCILO (PFB)

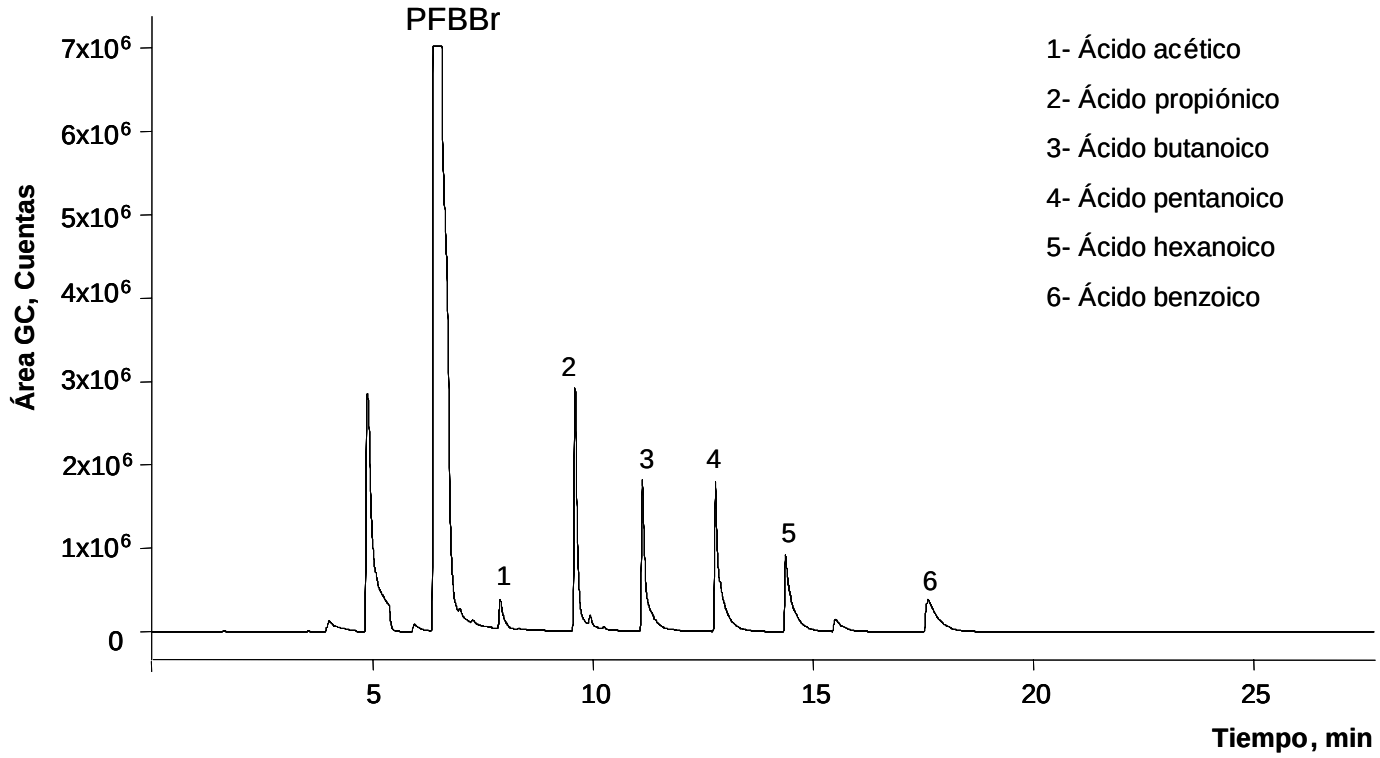


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de extracción: 20 min. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

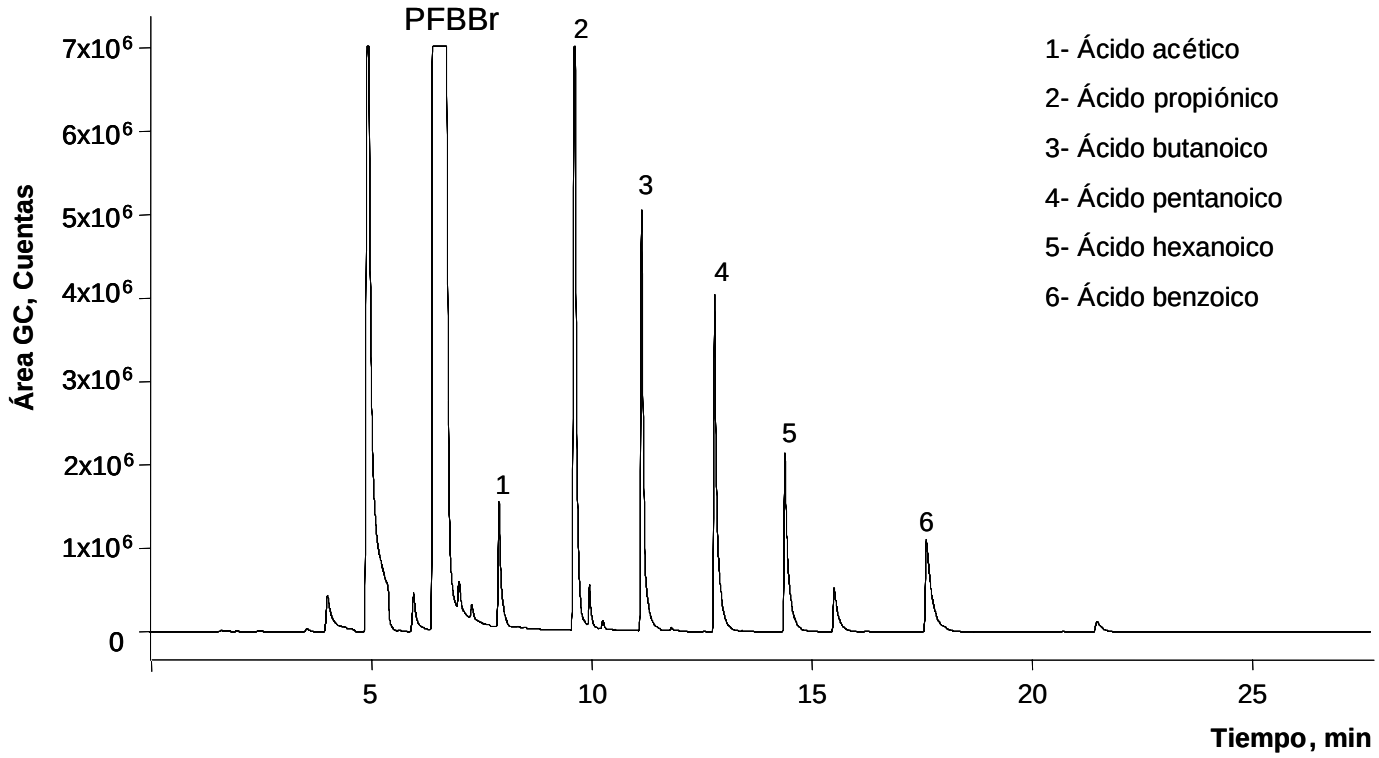


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de extracción: 30 min. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

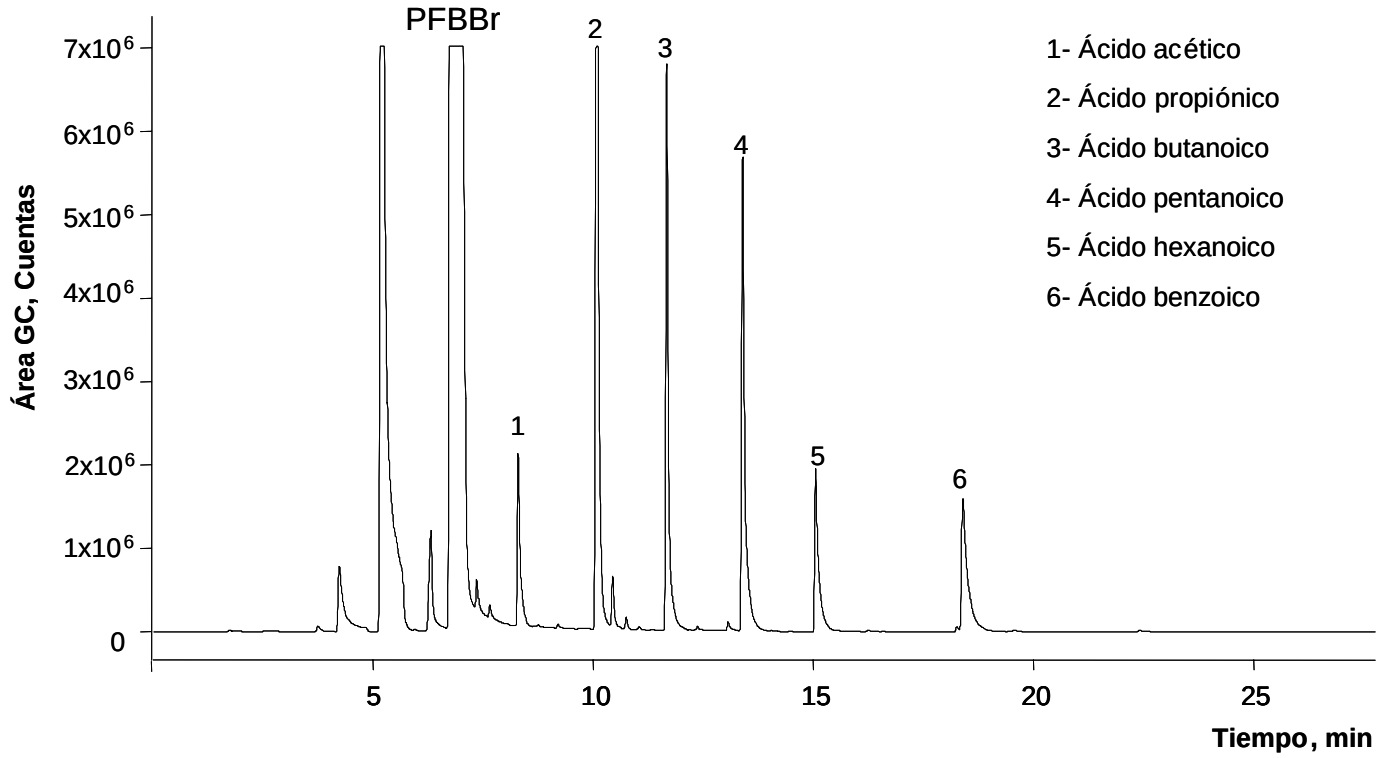


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de extracción: 40 min. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

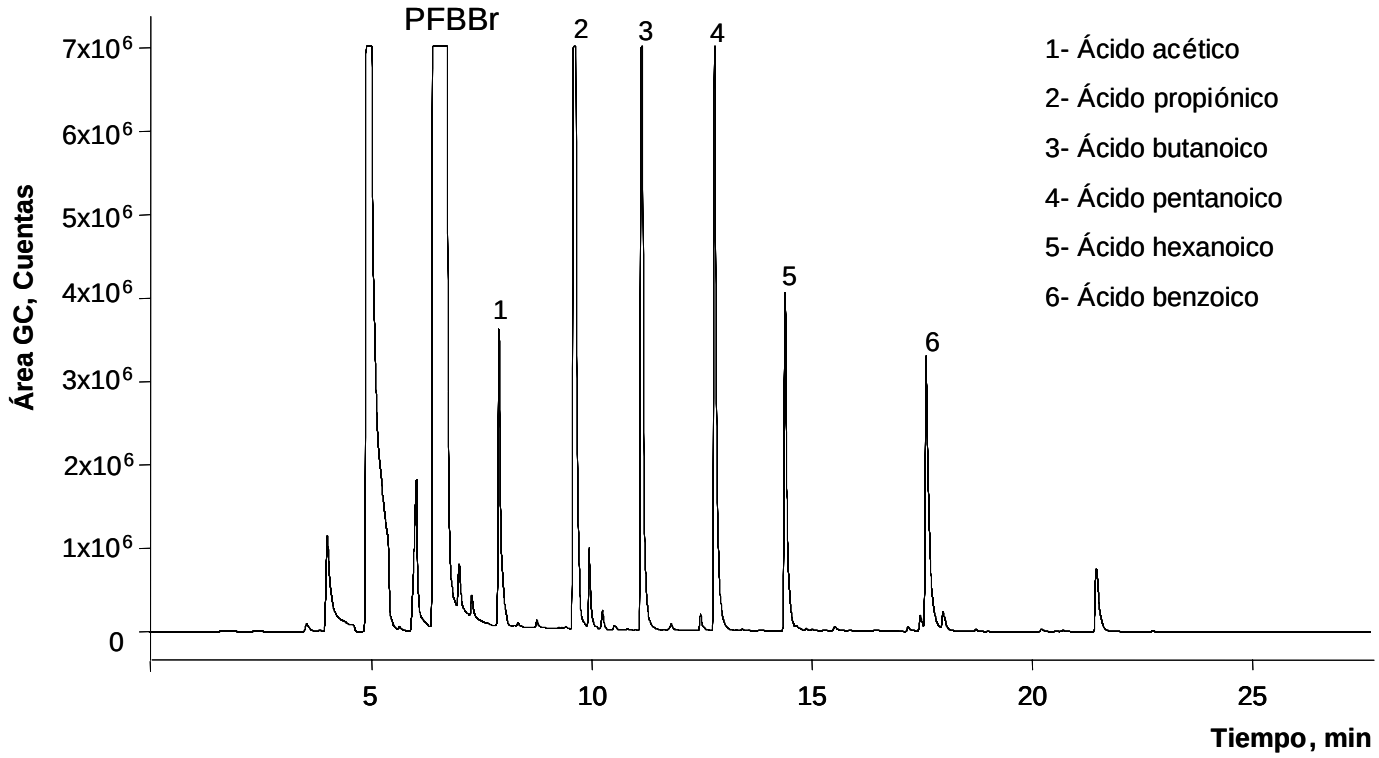


Figura 4. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de extracción: 60 min. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

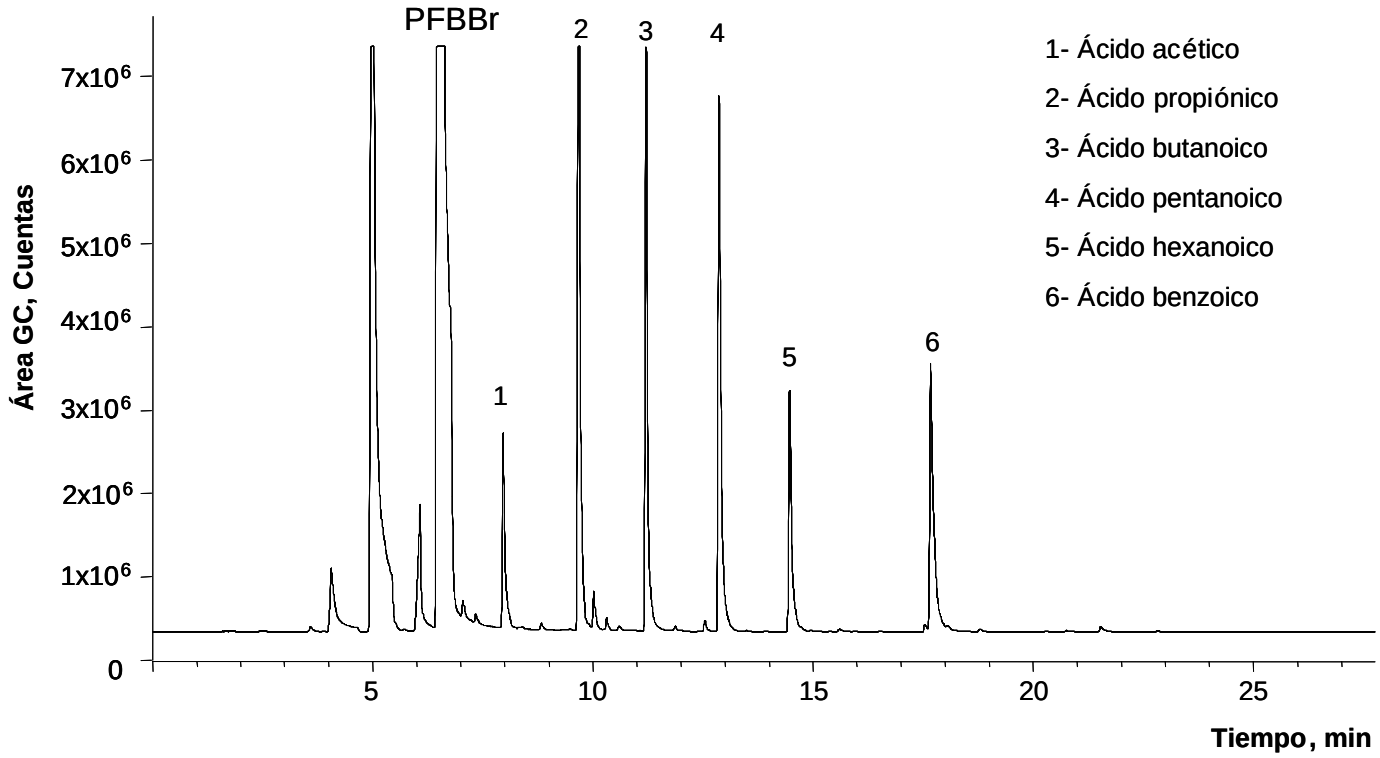


Figura 5. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Tiempo de extracción: 80 min. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

ANEXO 13-3

EFECTO SALINO SOBRE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE ÉSTERES DE PENTAFLÚORBENCILO (PFB)

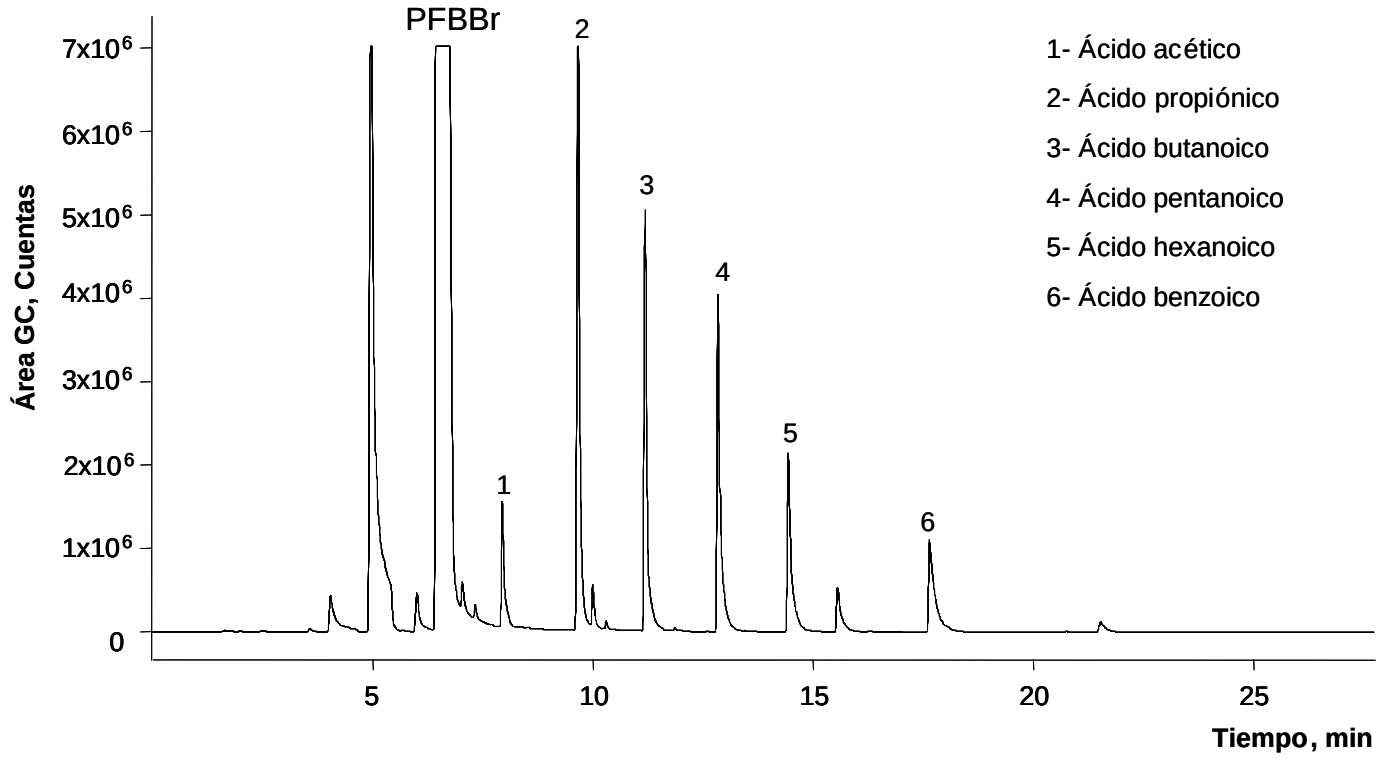


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Blanco (Sin añadir NaCl). Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

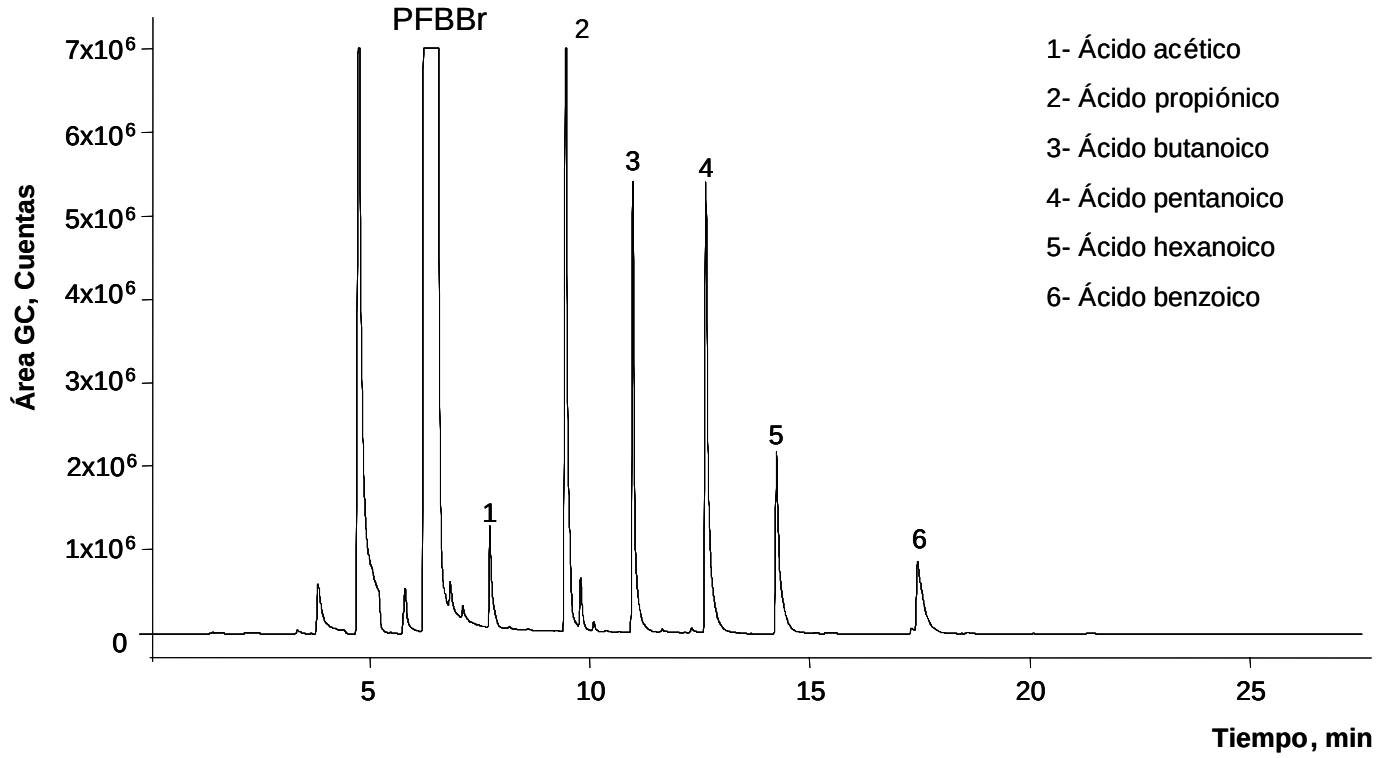


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); NaCl, 10%. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

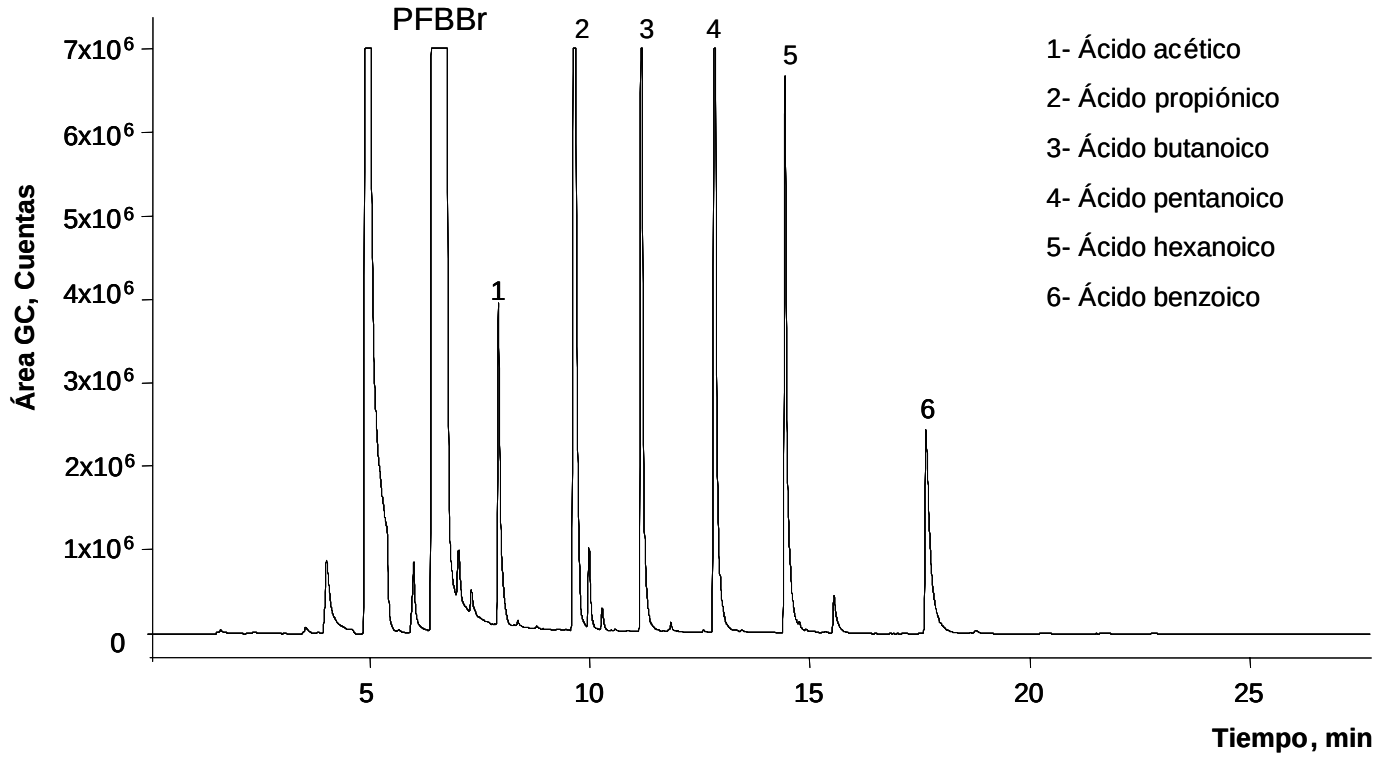


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); NaCl, 20%. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

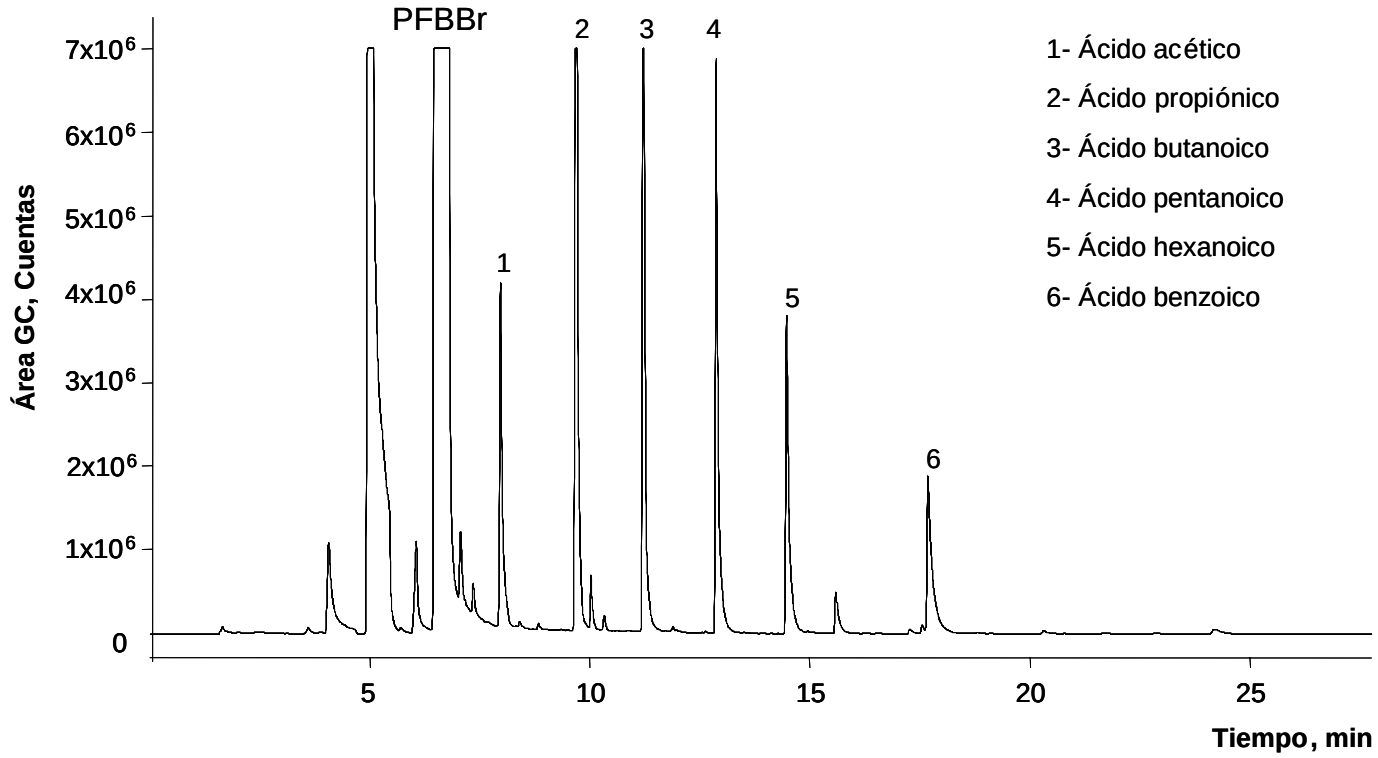


Figura 4. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); NaCl, 30%. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

ANEXO 13- 4

EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA EFICIENCIA DE EXTRACCIÓN DE ÉSTERES DE PENTAFLÚORBENCILO (PFB)

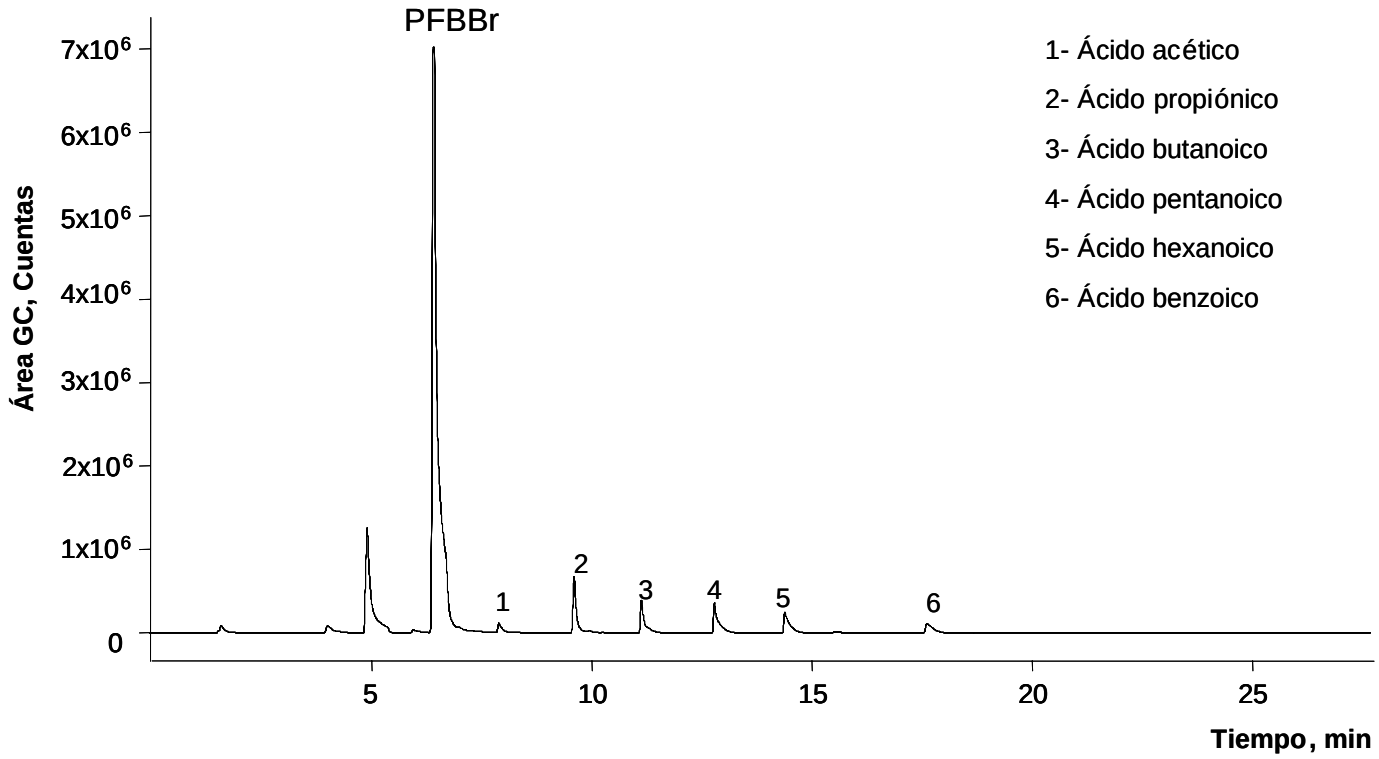


Figura 1. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Temperatura de extracción: 30°C. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

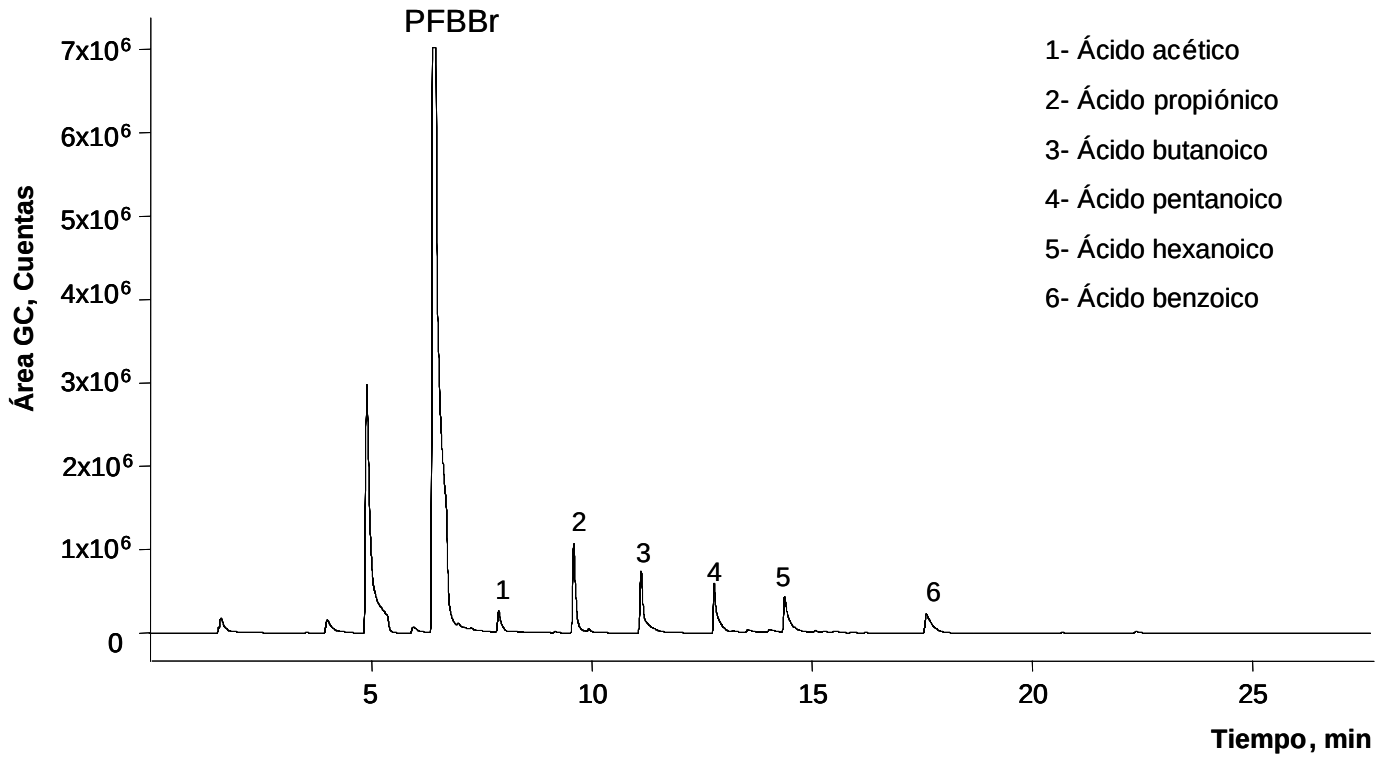


Figura 2. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Temperatura de extracción: 40°C. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.

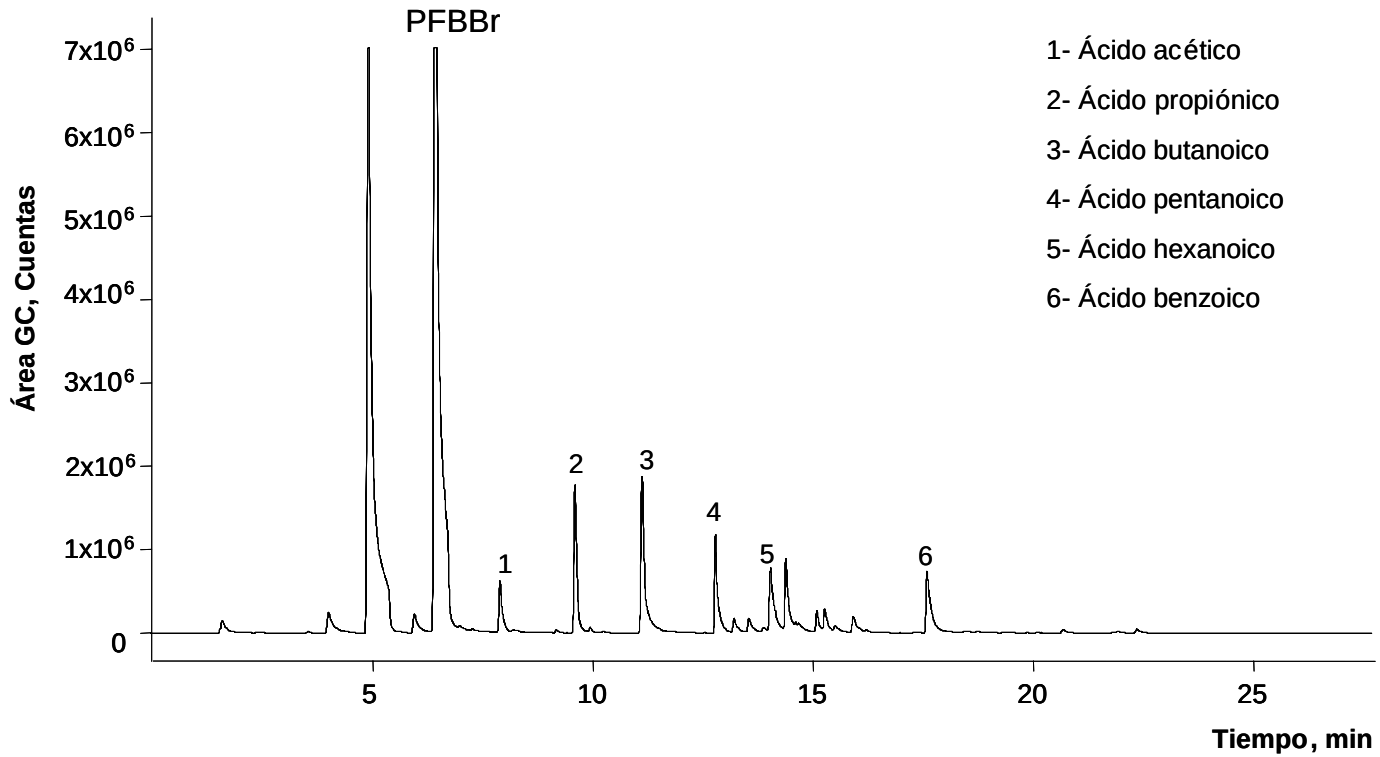


Figura 3. Perfil cromatográfico de los derivados de ácidos carboxílicos (ésteres de pentaflúorbencilo); Temperatura de extracción: 60°C. Columna DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); GC/ECD.