

Curso 2009/10
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/7
I.S.B.N.: 978-84-7756-938-1

BÁRBARA DELGADO SÁNCHEZ

**Compuestos carbonílicos en muestras
de interés medioambiental y agroalimentario**

Directores

**VENERANDO GONZÁLEZ DÍAZ
JUAN H. AYALA DÍAZ**



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas las personas e instituciones que con su ayuda han hecho posible la realización de esta tesis.

A mis directores Venerando González Díaz y Juan H. Ayala Díaz por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación.

A Venerando, por guiar este trabajo, por su talento y entusiasmo científico, por sus interesantes y valiosas sugerencias a lo largo de la dirección del mismo, además de su contribución en mi formación como investigadora. A Juan, por perfilar esta tarea de manera concienzuda y minuciosa, por aportar nuevos enfoques, transmitir su experiencia y conocimiento, y por su buena disposición, paciencia y comprensión.

A los miembros y compañeros de laboratorio que han formado y forman parte del grupo de investigación de Química Analítica Agroalimentaria y Medioambiental, por las horas de trabajo, cafés y tantos buenos momentos compartidos durante todos estos años: Ana, Verónica, Fran, Jessica, Arturo, Mónica, Diana y Jana. Y muy en especial a Aurora y Raquel por los ratos divertidos, vivencias y experiencias acumulados a lo largo del desarrollo de este trabajo. Su ayuda y disposición han sido muy importantes en el día a día.

Al Servicio de Medio Ambiente de la Universidad de La Laguna por el apoyo prestado y a todas las personas con las que he coincidido durante todos estos años, especialmente a Carmen y Celi, que me han animado durante esta etapa.

A los profesores, compañeros y técnicos de laboratorio del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, que de una u otra forma, han participado de manera desinteresada en esta labor, haciéndomela más agradable y amena. Mención especial a Eladia por su ayuda en el tratamiento estadístico de los datos.

A la Consejería de Industria, Comercio y Nuevas Tecnologías del Gobierno de Canarias y a CajaCanarias por la financiación que me han concedido en estos años.

A mis familiares y amigos, y muy especialmente a mis padres y hermano, cuyo apoyo constante ha sido imprescindible para alcanzar este propósito. Y como no a Alfonso, mi compañero de viaje, por su generosidad, amor y comprensión.

Mi reconocimiento para todos aquellos que sin haber sido citados han hecho posible este trabajo.

GRACIAS A TODOS.

ÍNDICE

<i>Prólogo</i>	I
----------------------	---

Capítulo I: Introducción General

I. INTRODUCCIÓN	3
I.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS	3
Propiedades químicas.....	3
Presencia en la naturaleza y usos	8
Efectos de aldehídos y cetonas en la salud humana	12
I.2. COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL AIRE	15
Características de interés medioambiental del formaldehído y la acetona.....	16
Aldehídos y cetonas en la troposfera	17
Transformaciones fotoquímicas	17
Compuestos carbonílicos en áreas urbanas	20
Compuestos carbonílicos en áreas rurales.....	23
Aldehídos y cetonas en aire interior.....	24
Aldehídos y cetonas asociados a los materiales	25
Aldehídos y cetonas asociados a procesos de combustión.....	27
I.3. EL HUMO Y LOS ALIMENTOS AHUMADOS	29
El humo	30
Efectos del ahumado en los alimentos	35
El queso ahumado en Canarias	36
I.4. EL QUESO Y LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS	39
El queso. Características generales	39
El queso. Aspectos organolépticos.....	43
Compuestos carbonílicos asociados al flavor de los quesos	47
Características de los quesos ahumados.....	49
I.5. GENERALIDADES ACERCA DE LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS	50
Derivatización	51
Muestras de aire	56
Muestras de queso.....	61
I.2. BIBLIOGRAFÍA	66

Capítulo II: Comparación de metodologías para la determinación de compuestos carbonílicos por HPLC y GC

II.1. INTRODUCCIÓN	83
II.1.1. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS	83
Determinación de compuestos carbonílicos mediante HPLC.....	84
Determinación de compuestos carbonílicos mediante GC	85
Formación de isómeros	86
Selección de metodologías.....	87
II.1.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS	88
II.1.3. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE	91
Definiciones y conceptos generales	91
Aproximaciones al cálculo de la incertidumbre.....	93
II.1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	99
II.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	101
II.2.1. REACTIVOS	101
II.2.2. EQUIPOS	101
II.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	102
Preparación de patrones para las curvas de calibrado.....	102
Purificación de la DNPH	103
Derivatización de los compuestos carbonílicos	103
Análisis por HPLC-UV y GC-MS	104
II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	105
II.3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	106
II.3.2. VALIDACIÓN. COMPARACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS A TRAVÉS DE PARÁMETROS DE CALIDAD	109
Curvas de calibrado. Linealidad y sensibilidad	110
Límites de detección y cuantificación.....	118
Precisión y exactitud.....	119
II.3.3. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRES	122
Incertidumbre derivada de la estimación de la concentración de analito desde la curva de calibrado, $u(CC)$	123
Incertidumbre expandida y sus contribuciones	131
ANEXO I	134
ANEXO II	140
II.4. BIBLIOGRAFÍA	143

Capítulo III: Metodologías de toma de muestra y calibración para la determinación de compuestos carbonílicos por HPLC

III.1. INTRODUCCIÓN	151
III.1.1. DERIVATIZACIÓN Y RETENCIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS	154
Derivatización con la DNPH	154
Retención de los compuestos carbonílicos contenidos en muestras de aire	155
III.1.2. METODOLOGÍAS OFICIALES DE ANÁLISIS	161
III.1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	164
III.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	167
III.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES	167
III.2.2. EQUIPOS	168
III.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	168
Purificación y preparación de disoluciones de DNPH	168
Preparación de las disoluciones patrón	169
Preparación de los cartuchos de DNPH	169
Procedimientos de calibración	170
Validación de las metodologías de muestreo-calibración	170
Análisis por HPLC-UV	172
III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
III.3.1. IMPUREZAS ASOCIADAS A LA 2,4-DINITROFENILHIDRACINA	175
Disoluciones de DNPH	175
Soportes sólidos impregnados con DNPH	177
III.3.2. INTERACCIONES DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS CON LA DNPH	180
Derivatización en fase líquida	180
Derivatización en fase sólida	186
III.3.3. RETENCIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS PRESENTES EN FASE GAS ...	189
Disoluciones absorbentes con DNPH	190
Cartuchos con adsorbentes impregnados con DNPH	192
III.3.4. METODOLOGÍAS DE TOMA DE MUESTRA Y CALIBRACIÓN	195
Curvas IA. Derivatización en el inyector automático	196
Curvas TC. Derivatización en tubo colector	197
Curvas CL. Derivatización en cartucho a partir de compuestos carbonílicos en fase líquida	200
Curvas CG. Derivatización en cartucho a partir de compuestos carbonílicos en fase gas	201
Curvas HC. Calibración con disoluciones comerciales de hidrazonas	202
III.3.5. COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRADO	204
Curvas establecidas a partir de hidrazonas comerciales o de hidrazonas obtenidas por derivatización	204
Curvas obtenidas por derivatización	209
Parámetros de calidad de las metodologías de calibración	213

III.3.6. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS.....	217
III.4. BIBLIOGRAFÍA	220
 Capítulo IV: Determinación de compuestos carbonílicos mediante SPME-HPLC	
IV.1. INTRODUCCIÓN	225
IV.1.1. FUNDAMENTO DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	225
Generalidades	225
Principios de la técnica	226
IV.1.2. ASPECTOS PRÁCTICOS DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	228
Métodos de extracción	228
Influencia de parámetros experimentales en la extracción	230
Desorción. Influencia de parámetros experimentales	234
Derivatización	236
Aplicaciones	241
IV.1.3. ALTERNATIVAS A LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CONVENCIONAL	242
Microextracción en una gota.....	242
Microextracción en fase líquida.....	242
Extracción con barras agitadoras adsorbentes	243
Microextracción en una capa delgada.....	244
IV.1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	244
IV.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	246
IV.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	246
IV.2.2. EQUIPOS	246
IV.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS.....	247
Preparación de las disoluciones patrón y de la DNPH	247
Procedimiento de extracción y desorción de los compuestos carbonílicos.....	248
Procedimiento de muestreo del humo procedente de la combustión de biomasa	249
Análisis por HPLC-UV.....	250
IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	251
IV.3.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN	252
Selección de la fibra apropiada.....	253
Influencia de la temperatura	254
Tiempo de extracción.....	256
IV.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DESORCIÓN-DERIVATIZACIÓN	258
IV.3.3. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS MEDIANTE SPME-HPLC. PARÁMETROS DE CALIDAD.....	266

IV.3.4. APROXIMACIÓN A LA VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍlicos MEDIANTE SPME-HPLC	272
IV.4. BIBLIOGRAFÍA	279
 <i>Capítulo V: Compuestos carbonílicos en el humo utilizado para el ahumado de alimentos</i>	
V.1. INTRODUCCIÓN	285
V.1.1. COMPUESTOS CARBONÍlicos PRODUCIDOS EN LA COMBUSTIÓN DE RESTOS VEGETALES	286
Compuestos carbonílicos producidos por pirólisis de madera	288
Compuestos carbonílicos producidos por combustión de madera	289
V.1.2. TRATAMIENTO DE DATOS	293
V.1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	297
V.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	299
V.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES.....	299
V.2.2. EQUIPOS	299
V.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	300
Preparación de las disoluciones patrón y de la DNPH.....	300
Procedimientos de calibración	300
Muestreo del humo	300
Análisis por HPLC-UV	301
V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	302
V.3.1. CONTENIDO DE COMPUESTOS CARBONÍlicos EN LOS HUMOS.....	303
Composición global	306
Componentes individuales	309
V.3.2. CORRELACIONES ENTRE CONTENIDOS DE COMPUESTOS CARBONÍlicos EN LOS HUMOS	314
V.3.3. PERFILES DE DISTRIBUCIÓN Y PARÁMETROS INDICADORES	319
Perfiles de distribución	319
Parámetros indicadores	321
V.3.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE	332
Análisis de componentes principales	333
Análisis de factores	338
Análisis discriminante lineal.....	340
V.4. BIBLIOGRAFÍA	345

Capítulo VI: Determinación de compuestos carbonílicos en muestras de queso

VI.1. INTRODUCCIÓN	351
VI.1.1. COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL QUESO	351
VI.1.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS	355
Técnicas de extracción. Fracción volátil.....	356
Fracción grasa.....	358
VI.1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	360
VI.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	364
VI.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES	364
VI.2.2. EQUIPOS	365
VI.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS	365
Preparación de las disoluciones patrón.....	365
Procedimiento para determinar los compuestos carbonílicos en el extracto graso de los quesos.....	366
Procedimiento para determinar los compuestos carbonílicos en la fracción volátil de los quesos.....	366
Análisis por HPLC-UV.....	367
VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	368
VI.3.1. INTRODUCCIÓN	368
Adaptación de la metodología de análisis.....	369
VI.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL EXTRACTO GRASO DE QUESOS	373
Optimización del proceso de extracción.....	375
Derivatización de compuestos carbonílicos en el extracto graso.....	385
Estudios de recuperación	389
Cuantificación.....	391
VI.3.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE QUESOS	397
VI.3.4. COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL EXTRACTO GRASO Y EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE QUESOS COMERCIALES	401
Contenidos totales en la fracción volátil y en el extracto graso.....	401
Contenidos en el extracto graso. Caracterización de muestras de queso	405
VI.4. BIBLIOGRAFÍA	411
Resumen y conclusiones	419

PRÓLOGO

Con la realización de esta tesis se pretenden desarrollar nuevas metodologías analíticas que permitan la determinación de compuestos carbonílicos:

- Presentes en muestras de humos utilizados en las Islas Canarias para el ahumado artesanal de queso, y obtenidas mediante la combustión incompleta de restos vegetales.
- Que forman parte de los componentes que contribuyen al flavor de los quesos, y que son de origen biogénico o que se han introducido a través de procesos de ahumado.

Los analitos objeto de este estudio son un grupo de compuestos carbonílicos formado por aldehídos alifáticos, olefínicos y aromáticos, así como por cetonas, habituales en los dos tipos de muestras, humo y queso, en los que se centrará el trabajo. A partir de un adecuado tratamiento de los resultados obtenidos en las determinaciones analíticas, se pretende obtener información útil, desde una consideración medioambiental y para los sectores relacionados con el consumo y comercialización del queso, mediante:

- El conocimiento de la composición del humo obtenido a partir de la combustión de distintos materiales, o de la diferenciación de muestras de humo en atención a su procedencia con la utilización de parámetros químicos representativos.
- La posibilidad de seleccionar el material vegetal a utilizar para obtener muestras de humo con características apropiadas para los procesos de ahumado.
- La posibilidad de disponer de metodologías que permitan obtener información acerca de la relación entre características asociadas con la elaboración y maduración del queso y su contenido en compuestos carbonílicos.

En la planificación del trabajo a realizar, el primer objetivo a plantearse será la elección de la técnica a utilizar para efectuar las determinaciones analíticas. La correspondiente búsqueda bibliográfica ha puesto de manifiesto que para el análisis de compuestos carbonílicos es habitual recurrir a su derivatización, antes de proceder a la determinación mediante técnicas cromatográficas. En tal sentido, se ha considerado oportuno

seleccionar la 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) como reactivo para convertir los compuestos carbonílicos en sus respectivas hidrazonas, para ser separadas y cuantificadas posteriormente mediante HPLC-UV o con el uso de GC-MS. Los resultados obtenidos en la validación de ambas metodologías, y al calcular las incertidumbres asociadas a las mismas, pueden aportar información de indudable interés para seleccionar la técnica de análisis adecuada para abordar las finalidades a alcanzar en este trabajo.

La toma de muestra, etapa fundamental del proceso analítico, adquiere especial significación cuando se trata de muestras, como las de humo, de escasa homogeneidad y elevada complejidad en su composición.

En atención a la considerable volatilidad de los compuestos carbonílicos a determinar y a la necesidad de su derivatización, impuesta por la metodología a utilizar en la etapa de medida, es necesario asociar la toma de muestra y la formación de las hidrazonas de los compuestos carbonílicos. En consecuencia, se necesitará establecer la cuantitatividad y la cinética de las reacciones de derivatización, características desconocidas o, al menos, poco conocidas para la mayoría de los aldehídos y cetonas incluidos en este trabajo. En otro orden de cosas, las condiciones experimentales que se utilicen en la toma de muestra-derivatización pueden afectar de distinta manera a los diferentes compuestos carbonílicos presentes en las muestras de humo. De igual forma, también pueden condicionar la preparación de los patrones a utilizar para construir las curvas de calibrado. En consecuencia, el proceso de calibración a emplear deberá tener en cuenta las condiciones experimentales en las que se efectúe la toma de muestra y la derivatización de los aldehídos y cetonas.

En principio, puede resultar atractiva la idea de utilizar la microextracción en fase sólida para al análisis de muestras de humo. Sin embargo, es posible que se presenten dificultades relacionadas, sobre todo, con la preparación de los patrones a emplear en los procesos de calibración, junto a las que puedan estar motivadas por la necesidad de introducir una etapa de derivatización. Ha de tenerse en cuenta que, para la obtención de resultados representativos, dichos patrones y las muestras a analizar deben encontrarse en condiciones experimentales similares en el momento de ser expuestas a la microfibras, especialmente en lo que se refiere a la temperatura y a la presencia de disolventes volátiles que acompañen a los analitos en la fase gas en la que se introduce la fibra.

Ante las dificultades comentadas, una posibilidad de solventar algunos problemas podría consistir en realizar la determinación en dos etapas. En la primera de ellas, los analitos serían extraídos de las muestras de humo con la utilización de una microfibras y, posteriormente, se trasladarían al sistema cromatográfico. A este respecto, podría intentarse el establecimiento de procedimientos en los que la derivatización se efectúe sobre la microfibras previamente impregnada con la DNPH, o bien, retener los analitos en la microfibras, que posteriormente se pondría en contacto con una disolución de DNPH. En este último caso, la metodología de medida implicaría la utilización de una interfaz, que sustituya el loop de un equipo de HPLC, en la que tendría lugar la derivatización y desorción de los analitos antes de ser inyectados en la columna analítica. En principio, el principal objetivo a conseguir consistiría en utilizar las ventajas y simplicidad de la técnica de microextracción en fase sólida para trasladar la muestra al inyector del cromatógrafo.

Las metodologías desarrolladas para la toma y tratamiento de las muestras de humo, así como para la determinación de compuestos carbonílicos presentes en las mismas, se aplicarán a muestras representativas de la combustión de materiales vegetales habitualmente utilizados en las islas de La Palma, La Gomera y El Hierro: maderas de pino, jara y brezo, acícula de pino, penca de tunera seca y cáscara de almendra, para la obtención del humo necesario para el ahumado de queso. La información que proporcionen los resultados obtenidos ha de tomar en consideración que la composición de las muestras de humo en compuestos carbonílicos, no sólo depende de la naturaleza del material empleado como combustible, sino de las condiciones en que se realiza la combustión y el dispositivo empleado para efectuarla. Se pretendería conseguir, a partir de las determinaciones que se efectúen en un elevado número de muestras, una adecuada caracterización de los distintos tipos de humo, en cuanto a su contenido en compuestos carbonílicos, y, además, poder diferenciar, mediante un tratamiento de datos apropiado, entre muestras de humo, atendiendo a la naturaleza de los restos vegetales utilizados como combustibles. Esta información podría resultar de interés para el sector ganadero responsable de esta actividad socio-económica de interés en Canarias.

En el caso de quesos, incluidos los que han sido ahumados, las características de los mismos con influencia en el sistema gustativo-olfativo, están relacionadas con el proceso de maduración de los quesos, con los tratamientos a que se someta y, en su caso, con el proceso de ahumado. Ahora bien, el establecimiento de dichas características, mediante la

determinación de parámetros químicos, se encuentra dificultado por la presencia de altos contenidos de grasa en las muestras, no sólo porque dificulta su puesta en disolución, sino porque afecta de forma significativa a las etapas de tratamiento y análisis de la muestra.

Como alternativa, la información más directamente relacionada con las características organolépticas de los quesos y, en concreto, con aquellas más estrechamente relacionadas con el olor y sabor de los mismos, puede establecerse a través del análisis de la fracción volátil y el extracto graso de los quesos. En el primer caso, la utilización de la metodología comentada anteriormente, basada en la utilización del acoplamiento SPME-HPLC, puede resultar de interés. En cuanto a las determinaciones de compuestos carbonílicos en el extracto graso, sería de interés disponer de una metodología que permita la cuantificación de estos analitos y que sustituya al procedimiento matemático descrito por otros autores. En tal sentido, podría ser de interés la posibilidad de efectuar la extracción de los analitos con acetonitrilo, de forma que se pueda efectuar la derivatización directa de los aldehídos y cetonas sobre el extracto obtenido, y su inyección, sin tratamientos adicionales, en el equipo de HPLC. Los datos que se obtengan acerca de la distribución de aldehídos y cetonas en las muestras de fracción volátil y extracto graso, podrían permitir establecer la idoneidad de utilizar uno u otro tipo de tratamiento de muestra, con objeto de obtener la información más adecuada, que pueda relacionarse con el olor y sabor de los quesos, aparte de poder diferenciar entre distintos tipos, atendiendo a su naturaleza, proceso de elaboración o tratamientos recibidos.



Capítulo I

Introducción General

I. INTRODUCCIÓN

I.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS

Propiedades químicas

La característica esencial que identifica a los aldehídos y cetonas es que contienen el grupo funcional carbonilo ($>C=O$). Se diferencian en que los aldehídos poseen este grupo en un extremo de la cadena hidrocarbonada y, en consecuencia, un átomo de hidrógeno se encontrará unido directamente al mismo ($R-CHO$), mientras que en las cetonas, el grupo carbonilo se encuentra unido a dos radicales hidrocarbonados ($R-CO-R$), llamándose *simétricas* si ambos son iguales y *asimétricas* si son distintos. Según el tipo de radical hidrocarbonado unido al grupo funcional, los aldehídos pueden ser alifáticos, olefínicos y aromáticos, mientras que las cetonas se clasifican en alifáticas, aromáticas y mixtas, según que los dos radicales unidos al grupo carbonilo sean alifáticos, aromáticos o uno de cada clase, respectivamente.

Debe advertirse que, aunque los aldehídos y cetonas son los compuestos más sencillos entre los que poseen el grupo carbonilo, también existen otros muchos compuestos que lo poseen en su molécula, junto a otras agrupaciones atómicas. Entre estos compuestos podemos citar: los ácidos carboxílicos, $-CO-OH$; halogenuros de acilo, $-CO-X$; ésteres, $-CO-OR$; amidas, $-CO-NH_2$, etc. Sin embargo, el nombre de compuestos carbonílicos suele utilizarse en sentido restringido para designar exclusivamente a los aldehídos y cetonas.

Además de los nombres que les corresponden en la nomenclatura sistemática, muchos aldehídos tienen nombres vulgares que derivan del nombre común del ácido carboxílico correspondiente (formaldehído, acetaldehído, etc.). Las cetonas también suelen nombrarse corrientemente mediante los nombres de los dos radicales unidos al grupo carbonilo, seguidos de la palabra cetona (metiletilcetona) o atendiendo al nombre común del ácido de igual número de átomos de carbono (acetona, butanona, etc.).

Las propiedades físicas y químicas, características de los aldehídos y cetonas, están determinadas por la presencia del grupo funcional carbonilo, en el que existe un enlace doble carbono-oxígeno. Al ser el átomo de oxígeno más electronegativo que el de carbono, se produce una apreciable polarización de dicho doble enlace, con una carga parcial positiva en

el carbono y otra negativa de igual valor sobre el oxígeno. Así pues, de los dos átomos presentes en el grupo carbonilo, el carbono es electrófilo y el oxígeno nucleófilo y ligeramente básico.

Como consecuencia, los aldehídos y cetonas poseen un elevado momento dipolar, que justifica el que existan en sus moléculas intensas fuerzas de atracción del tipo dipolo–dipolo, por lo que estos compuestos tienen puntos de fusión y de ebullición más altos que los correspondientes a los hidrocarburos de peso molecular análogo. Sin embargo, las moléculas de aldehídos y cetonas no pueden asociarse mediante enlaces de hidrógeno, por lo que sus puntos de fusión y de ebullición son más bajos que los de los correspondientes alcoholes. Concretamente, los puntos de ebullición de los primeros términos de las respectivas familias de compuestos carbonílicos, 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, como es lógico, al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada y perder influencia relativa el grupo funcional.

En cuanto a la solubilidad, los primeros miembros de ambas series de aldehídos y cetonas son completamente solubles en agua. Al aumentar la longitud de la cadena hidrocarbonada disminuye rápidamente la solubilidad en agua. Así, por ejemplo, los aldehídos y cetonas de cadena lineal con ocho o más átomos de carbono son prácticamente insolubles en agua. Sin embargo, los compuestos carbonílicos son muy solubles en disolventes orgánicos apolares, como éter etílico, benceno, etc. Por otra parte, la propia acetona es un excelente disolvente orgánico, muy utilizado por su especial capacidad para disolver tanto compuestos polares (alcoholes, aminas, agua, etc.) como apolares (hidrocarburos, éteres, grasas, etc.).

Los aldehídos son rápidamente oxidados para producir ácidos carboxílicos, pero las cetonas no son reactivas hacia la oxidación excepto en condiciones muy vigorosas. Esta diferencia de comportamiento es consecuencia de las diferencias estructurales entre los dos grupos funcionales. Los aldehídos tienen un protón –CHO que puede ser extraído con facilidad durante la oxidación, pero no así las cetonas.

En la Tabla I.1. se encuentran las estructuras y propiedades más significativas de los compuestos carbonílicos más frecuentes.

Tabla I.1. Compuestos carbonílicos del estudio. Propiedades.

Compuesto	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura molecular	T _{ebullición} (°C)	Potencial cancerígeno, IARC*
1. Formaldehído (FOR)	30	CH ₂ O		-19	1
2. Acetaldehído (ACE)	44	C ₂ H ₄ O		20	2B
3. Acroleína (ACR)	56	C ₃ H ₄ O		53	3
4. Acetona (ACET)	58	C ₃ H ₆ O		56	-
5. Propionaldehído (PRO)	58	C ₃ H ₆ O		48	-
6. Crotonaldehído (CRO)	70	C ₄ H ₆ O		104	3
7. Metacroleína (MET)	70	C ₄ H ₆ O		68	-

Tabla I.1. Compuestos carbonílicos del estudio. Propiedades.

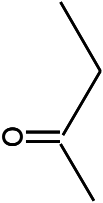

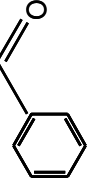



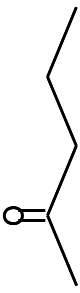
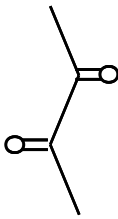
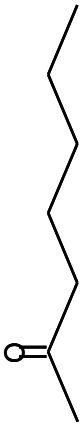


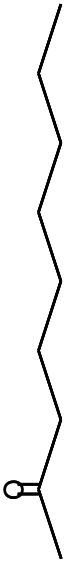

Compuesto	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura molecular	T _{ebullición} (°C)	Potencial cancerígeno, IARC*
8. 2-Butanona (BUTA)	72	C ₄ H ₈ O		79	-
9. Butiraldehído (BUTI)	72	C ₄ H ₈ O		75	-
10. Benzaldehído (BEN)	106	C ₇ H ₆ O		179	-
11. Valeraldehído (VAL)	86	C ₅ H ₁₀ O		103	-
12. <i>p</i> -tolualdehído (TOL)	120	C ₈ H ₈ O		204	-
13. Hexaldehído (HEX)	100	C ₆ H ₁₂ O		131	-
14. 2-Pentanona (PENTA)	86	C ₅ H ₁₀ O		105	-

Tabla I.1. Compuestos carbonílicos del estudio. Propiedades.

Compuesto	PM (g/mol)	Fórmula molecular	Estructura molecular	T _{ebullición} (°C)	Potencial cancerígeno, IARC*
15. 2,3-Butanodiona (BIO)	86	C ₄ H ₆ O ₂		90	-
16. 2-Heptanona (HEPTA)	114	C ₇ H ₁₄ O		154	-
17. Heptaldehído (HEP)	114	C ₇ H ₁₄ O		153	-
18. Octaldehído (OCT)	128	C ₈ H ₁₆ O		171	-
19. 2-Nonanona (NONA)	142	C ₉ H ₁₈ O		195	-
20. Nonaldehído (NON)	142	C ₉ H ₁₈ O		191	-

* IARC: Agencia internacional de investigación contra el cáncer [1].

1: Agente cancerígeno.

2B: Posiblemente carcinógeno para el ser humano.

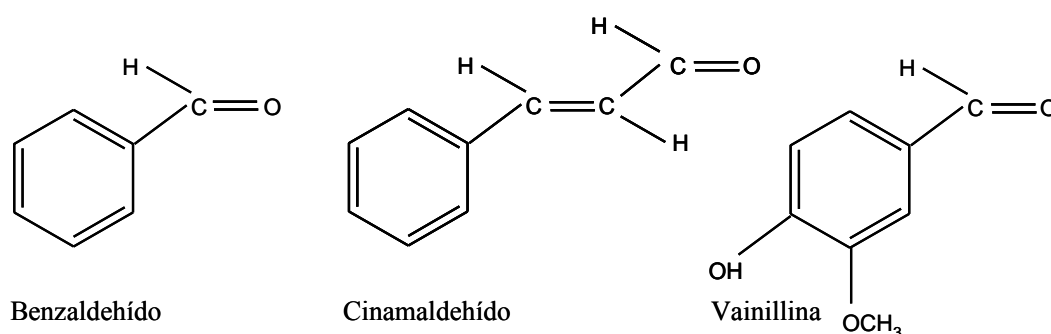
3: No puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano.

-No hay referencias.

Presencia en la naturaleza y usos

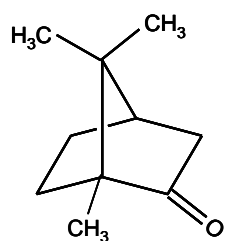
Los aldehídos y cetonas se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, son parcialmente responsables de los gustos y aromas que tienen muchos alimentos y participan también en la función biológica de diversas enzimas [2-4]. Además, la industria química hace un uso considerable de los mismos, ya que los utiliza como reactivos de síntesis o disolventes. De hecho, la función del grupo carbonilo suele considerarse como una de la más importante de la química orgánica.

Se han aislado una gran variedad de aldehídos y cetonas a partir de plantas y animales. Muchos de ellos, en particular los de peso molecular elevado, tienen olores intensos o penetrantes. De aquí que, en algunos casos, ciertos aldehídos aromáticos se hayan utilizado como agentes saborizantes. Por lo general, a estos compuestos carbonílicos se les conoce por sus nombres comunes, que indican la fuente de la que proceden, o hacen referencia a una determinada propiedad característica. Ejemplos representativos los encontramos en algunos aldehídos aromáticos, como los incluidos a continuación:

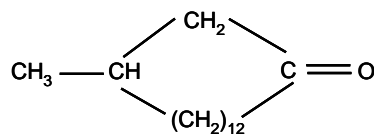


El benzaldehído, también llamado aceite de almendras amargas, es un líquido incoloro con agradable olor a almendra, y es un componente de dicho fruto; el cinamaldehído presenta un olor característico a la esencia de canela; y la vainillina, que produce el popular sabor a vainilla y que actualmente se produce sintéticamente, se obtuvo durante mucho tiempo a partir de las cápsulas, con formas de vaina, de ciertas orquídeas trepadoras [5].

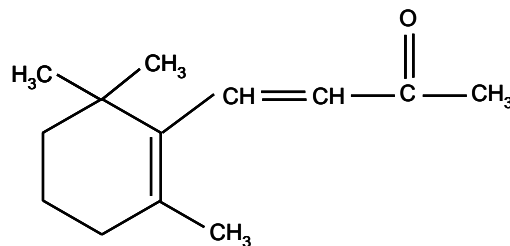
Entre las cetonas, pueden citarse algunas como las indicadas a continuación:



Alcanfor



Muscona

 β -Ionona

El alcanfor es una cetona que se encuentra de forma natural y se obtiene de la corteza del árbol del mismo nombre, tiene un olor fragante y penetrante, y es conocido desde hace mucho tiempo por sus propiedades medicinales, siendo muy usado como analgésico en linimentos. Otras dos cetonas naturales, la β -ionona y la muscona, se utilizan en perfumería. La β -ionona es la esencia de violetas y la muscona, obtenida de las glándulas odoríferas del venado almizclero macho, posee una estructura de anillo con 15 carbonos [5].

Entre las cetonas de interés industrial, destaca la 2-butanona que se halla con frecuencia disuelta en agua o como un gas en el aire, pudiendo considerarse como un producto natural producido por algunos árboles y que se encuentra en determinados frutos y vegetales.

En atención a las características comentadas, no es de extrañar que algunos aldehídos y cetonas que forman parte de ciertos productos naturales, principalmente flores y frutas, se utilicen en perfumería para la elaboración de aromas. Tal es el caso del benzaldehído, de la vainillina o el aldehído cinámico, así como del aldehído anísico (esencia de anís) o del piperonal (esencia de safrán). De origen animal, la muscona y la civetona, obtenida a partir de la secreción de una variedad de gato del África Oriental, también se utilizan en perfumería como fijadores, porque evitan la evaporación de los aromas, además de potenciarlos [5].

En general, los aldehídos, y en menor grado, las cetonas, están presentes en numerosos productos naturales, interviniendo muchos de ellos, de forma directa, en aspectos concretos de la vida cotidiana, o estando íntimamente relacionados con procesos vitales. Así, por ejemplo:

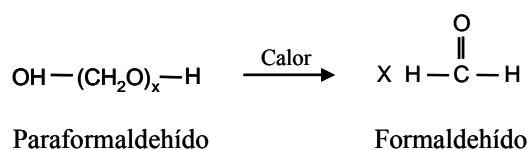
- La glucosa existe en una forma abierta que presenta un grupo aldehído.
- El acetaldehído formado como intermedio en procesos de metabolización del etanol, se cree que, en parte, es el responsable de los síntomas de la resaca tras la

ingesta de bebidas alcohólicas.

- Los azúcares son polihidroxialdehídos o cetonas.
- La vitamina K posee la estructura de una cetona.

Muchos aldehídos y cetonas tienen aplicaciones industriales importantes, destacando en este sentido el formaldehído y acetaldehído. Los usos principales se encuentran en la fabricación de resinas y plásticos, como disolventes y en pinturas, así como materias primas de perfumes y esencias, como se acaba de comentar.

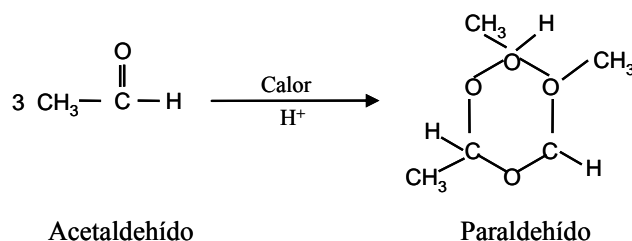
El aldehído más simple, el formaldehído, es un gas incoloro de olor irritante. Desde el punto de vista industrial es muy importante, pero difícil de manipular en estado gaseoso, por lo que suele hallarse en forma de una disolución acuosa al 40%, llamada formalina o formol, o como un polímero sólido de color blanco denominado paraformaldehído que, si se calienta suavemente, se descompone y libera formaldehído [5]:



La formalina se usa para conservar especímenes biológicos. El formaldehído en disolución se combina con la proteína de los tejidos y los endurece, haciéndolos insolubles en agua y evitándose, de esta manera, la descomposición del espécimen. Sus propiedades antisépticas justifican que se utilice como desinfectante de uso general y como preservante de la piel. En todo caso, las características tóxicas del formaldehído hacen recomendable una aplicación con cautela.

El principal empleo del formaldehído se encuentra, no obstante, en la fabricación de resinas sintéticas. Cuando se polimeriza con fenol, se forma una resina de fenol-formaldehído, conocida como baquelita. La baquelita es un excelente aislante eléctrico y durante algún tiempo se utilizó para fabricar bolas de billar. Además, el aldehído fórmico también se utiliza en la elaboración de explosivos (pentaeritrol y el tetranitrato de pentaeritrol), así como de resinas alquílicas y de poliuretano expandido.

Por su parte, el acetaldehído es un líquido volátil e incoloro, de olor irritante. Es una materia prima muy versátil que se utiliza en la fabricación de muchos compuestos. Si el acetaldehído se calienta con un catalizador ácido, se polimeriza para dar un líquido llamado paraldehído [5].



El paraldehído se utilizó como sedante e hipnótico, aunque su uso ha ido decayendo debido a su olor desagradable y al descubrimiento de sustitutos más eficaces.

La cetona industrial más importante es la acetona (propanona), un líquido incoloro, miscible con agua en todas las proporciones, que hierve a 56°C. Se utiliza principalmente como disolvente para lacas y resinas, aunque su mayor consumo es en la producción de metacrilato, empleándose también en la elaboración de resinas epoxi y poliuretanos. La acetona comercial es usada en la producción de elevadas cantidades de productos químicos, incluyendo metacrilatos, bisfenol A y otras cetonas. Pequeñas cantidades también son usadas en la industria farmacéutica [6].

La acetona se produce en el cuerpo humano como un subproducto del metabolismo de las grasas, siendo su concentración normal inferior a 1 mg/100 mL de sangre. Sin embargo, en la diabetes mellitus, la acetona se produce en cantidades mayores, provocando un aumento drástico de sus niveles en el cuerpo. Aparece en la orina y, en casos graves, se puede detectar incluso en el aliento. La acetona, también se emplea para la obtención de otros productos químicos, como la isobutilmetilcetona o el metalonato de metilo, disolvente de la acetocelulosa o lacas y resinas.

Entre las cetonas de interés industrial, destaca también la 2-butanona, ampliamente utilizada como disolvente para desparafinar aceites lubricantes y de uso común en los quita esmaltes de las uñas. Así mismo, la ciclohexanona es una cetona que, además de utilizarse como disolvente, se emplea en gran medida para la obtención de la caprolactama, monómero empleado en la fabricación de distintos tipos de Nylon 6 [6].

Efectos de aldehídos y cetonas en la salud humana

Los compuestos carbonílicos se encuentran entre los llamados compuestos orgánicos volátiles (COVs), que se caracterizan, entre otras propiedades, por ser sustancias químicas con distinto grado de volatilidad y liposolubilidad, que suelen ser utilizados en grandes cantidades en la industria, en el transporte y en el ámbito doméstico. Entre sus propiedades generales se encuentran, además de la volatilidad, su carácter no iónico y su reducido peso molecular, por lo que son buenos candidatos para la absorción por todas las vías de interés medioambiental, por ingestión, inhalación y cutánea.

En los últimos años, los compuestos carbonílicos, incluyendo sobre todo los aldehídos y cetonas de peso molecular bajo, han recibido bastante atención, debido en gran parte a sus efectos sobre la salud humana y animal. Pequeñas exposiciones de formaldehído y otros aldehídos específicos, tales como el acetaldehído, acroleína y crotonaldehído, causan irritación en los ojos, en la piel y en la membrana mucosa del tracto respiratorio superior [7,8]. Además, estudios con animales indican que, a elevadas concentraciones, muchos aldehídos y cetonas deben ser considerados como altamente citotóxicos y genotóxicos, como consecuencia de provocar ataques nucleofílicos a grupos funcionales amino y sulfhidrúlicos de biomoléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos, glutatión y cisteína. Consecuentemente, estos aldehídos tóxicos causan complicaciones biológicas de distinto tipo, incluyendo arteriosclerosis, enfermedades cardiovasculares, carcinogénesis, enfermedades inflamatorias, displasia mamográfica, gastritis crónica y displasia precancerosa [9,10]. También los aldehídos, tanto de forma directa como indirecta, pueden causar daños en las plantas [11].

En términos generales, sustancias gaseosas, como el cloroacetaldehído, formaldehído, acetaldehído y aldehídos insaturados, como la acroleína, poseen un gran poder irritante. Para el conjunto de derivados, cuanto menor es el peso molecular (formaldehído, acetaldehído), cuanto mayor es su insaturación (acroleína) y si disponen de un radical halogenado (cloroacetaldehído) en sus moléculas, mayores son los efectos corrosivos e irritantes que pueden provocar [12].

La manifestación clínica más significativa es la producción de edema pulmonar al alcanzar la vía aérea terminal y los alvéolos, pudiendo en casos extremos, como sucede con el formaldehído, encontrarnos ante productos que pueden actuar como cancerígenos [12].

Entre las fuentes de intoxicación por estos productos, destacan las relacionadas con su uso como desinfectantes, antisépticos, desodorantes, fumigantes o en la manufactura de plásticos, fibras sintéticas, resinas, textiles, herbicidas, etc. También cabe señalar, por su indudable importancia, la presencia de estos compuestos como componentes del humo obtenido por combustión de materiales que contienen: madera, papel y algodón. El límite ambiental tolerado es de 0.1 ppm. Concentraciones ambientales de 0.5 - 1 ppm son detectables por el olfato, concentraciones de 2 - 3 ppm producen irritación de la mucosa y mayores de 5 ppm no se toleran (1 ppm para la acroleína) [12].

La exposición a los productos químicos utilizados como adhesivos en la industria maderera, entre los que se encuentra de forma directa el formaldehído, puede repercutir negativamente en el sistema respiratorio. Los efectos irritantes o alergénicos del polvo de madera y otros materiales no se limitan al sistema respiratorio, sino que incluyen una considerable incidencia en la irritación ocular. En tal sentido, ha de tenerse en cuenta que, además de los compuestos carbonílicos presentes en las mismas, algunos fungicidas antimanchas utilizados en la protección de maderas blandas, provocan irritación ocular y cutánea [12].

En el caso concreto del formaldehído, la absorción en el organismo es eficaz por vía respiratoria y por ingestión. Al ser muy soluble en agua, se absorbe en las membranas mucosas de la nariz, en vías respiratorias superiores y ojos. Su absorción por vía cutánea es poco importante [12].

Aparte de por su acción irritante, puede manifestarse, de formas no específicas, como dolor de cabeza, náuseas y vómitos. En general, puede ser intolerable para la mayor parte de las personas expuestas a niveles de 4 - 5 ppm. El mecanismo de acción del formaldehído es por formación de ácido fórmico, con gran poder corrosivo y, a diferencia de los aldehídos insaturados (acroleína), no es depresor del sistema nervioso central [12].

Se han realizado estudios sobre la influencia del formaldehído en la capacidad respiratoria en exposiciones crónicas a bajas concentraciones, como las detectadas en edificios de viviendas, observándose que el formaldehído causa un descenso en dicha capacidad, especialmente en los niños. Además, se ha observado un aumento dosis-dependiente de la prevalencia de asma y bronquitis crónica en niños residentes en edificios en los que se ha detectado formaldehído en el aire interior, por lo que se ha relacionado con su

comportamiento alergénico. Esta actividad alergénica se ha demostrado en estudios realizados por aplicación cutánea, y se ha descrito la aparición de dermatitis por contacto con ropas impregnadas con formaldehído [12].

Se ha demostrado en estudios con ratas que la exposición a formaldehído, por inhalación, provoca un aumento de la incidencia de cáncer nasofaríngeo y sinonasal, superiores a lo normal. La clasificación del formaldehído, por la Agencia Internacional del Cáncer (IARC), en el grupo 1 [1], le cataloga como agente cancerígeno para personas, dada la evidencia suficiente en personas y en animales de laboratorio. Este efecto en la salud depende de los niveles ambientales y varía de acuerdo con la persona.

De forma indirecta, el formaldehído puede provocar daños irreparables en el organismo humano, aunque su presencia en el mismo estaría inducida por la ingesta de metanol, el llamado alcohol de madera que, como se sabe, es extremadamente tóxico. Cuando el metanol entra en el cuerpo, es rápidamente absorbido por el flujo sanguíneo y pasa al hígado, donde se oxida a formaldehído. El formaldehído destruye el poder catalítico de las enzimas y causa el endurecimiento del tejido hepático [12].

En el caso de la ingesta de bebidas alcohólicas, también se produce en el organismo un proceso de oxidación, por el cual el etanol se transforma en acetaldehído. Si el consumo de etanol es alto, se produce una acumulación de grandes concentraciones de acetaldehído en la sangre, lo cual puede conducir a un brusco descenso de la presión sanguínea, aceleración de los latidos del corazón y sensación general de incomodidad, síntomas que suelen corresponder a un estado de resaca. La presencia de altos niveles de acetaldehído en sangre, de forma continuada, puede dar lugar a una lesión de hígado denominada cirrosis [12].

Al grupo de los aldehídos pertenece también la acroleína, que es un candidato a ser clasificado como cancerígeno y que, como se ha comentado anteriormente, es extremadamente irritante para los ojos, piel y membranas mucosas. De hecho, ha sido utilizado en ocasiones como un adecuado indicador para advertir de la presencia de gases combustibles, dada su capacidad como agente irritante, que permite la detección de pequeños escapes. Otros aldehídos como el crotonaldehído y acetaldehído, están incluidos en los grupos 3 y 2B, respectivamente, según la clasificación de la IARC. Todos estos aldehídos son clasificadas como “sustancias extremadamente peligrosas” en el U.S. Emergency Planning and Community Right-to-Know Act [13].

Entre las cetonas, la exposición aguda a elevadas concentraciones de acetona causa depresión del sistema nervioso central, insuficiencia cardiorrespiratoria y muerte. En el medio laboral se ha descrito irritación ocular transitoria como resultado de la exposición aguda a acetona. No se ha descrito ningún efecto genotóxico o mutagénico de este compuesto, aunque la acetona exógena es fácilmente absorbida por inhalación, ingestión, utilizándose como vehículo para la administración de compuestos en ensayos de toxicidad en piel [12].

1.2. COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL AIRE

Como contaminantes medioambientales, los aldehídos y cetonas se suelen englobar dentro de un amplio grupo de compuestos de diferente naturaleza, conocidos como compuestos orgánicos volátiles, atendiendo a que, al menos los más representativos, se caracterizan por poseer bajas presiones de vapor y puntos de ebullición poco elevados. Su presencia en el medio ambiente es provocada, de forma mayoritaria, por la combustión de derivados del petróleo, madera, carbón o gas natural, además de por disolventes, pinturas, pegamentos u otros productos que, con frecuencia, se almacenan en hogares y centros de trabajo, además de transformaciones que ocurren en la atmósfera, como sucede con la fotooxidación de hidrocarburos [14,15]. Fuentes naturales también contribuyen a la concentración de los aldehídos y cetonas en el aire, mediante emisiones biogénicas de formaldehído, acetaldehído y algunos otros derivados [16-18]. De esta forma, se encuentran compuestos carbonílicos tanto en aire urbano contaminado [19-22] como en el aire limpio rural [17,23]. En atención a las diferentes fuentes de los compuestos carbonílicos, suele diferenciarse entre la contaminación de la atmósfera, o más concretamente de la troposfera, y la de los ambientes interiores.

La mayoría de las medidas de compuestos carbonílicos en el aire ambiente se han centrado en el formaldehído y acetaldehído, los dos aldehídos más importantes en la atmósfera, mientras que en aire interior las medidas se han dirigido casi exclusivamente al formaldehído. Sin embargo, también se han encontrado otros compuestos carbonílicos en aire interior y exterior. Por ejemplo, acroleína, crotonaldehído, glioxal y metilglioxal han sido medidos en aire ambiente en Los Ángeles [24] mientras que propionaldehído, 2-furalaldehído, butiraldehído, benzaldehído, isovaleraldehído, valeraldehído y hexaldehído han sido medidos tanto en aire interior como exterior en domicilios de New Jersey [25].

Características de interés medioambiental del formaldehído y la acetona

Entre los aldehídos más representativos, el formaldehído es un contaminante que tanto se produce de forma natural en la troposfera, durante el proceso de fotooxidación de los hidrocarburos, como en el metabolismo de la mayoría de los seres vivos, incluidas las personas, siendo un producto natural del metabolismo de la serina, glicina, metionina y colina, así como de la desalquilación en átomos nitrógeno, azufre u oxígeno de compuestos metilados. Ahora bien, como se ha comentado anteriormente, se utiliza en la fabricación de resinas, adhesivos, desinfectantes, conservantes y fertilizantes, por lo que su presencia en el aire interior de edificios, en los que se hayan utilizado materiales de construcción y aislantes capaces de emitir este aldehído, ha sido causa de debate en los últimos años, ya que su concentración es frecuentemente superior en el medio ambiente interior de edificios que en el exterior de los mismos [12].

En el aire, se produce su degradación por fotólisis directa y por reacción con radicales hidroxilo y nitrato, generados por vía fotoquímica. Los tiempos de vida media para estos procesos son, respectivamente, de 41 horas, 1.6 horas y 12 días. Además, presenta una gran movilidad en suelos y no se adsorbe en la fracción sólida de suelos y sedimentos. Por otra parte, se degrada fácilmente por transformación biológica en medio aerobio y anaerobio y no se bioconcentra en organismos acuáticos, como se ha demostrado en ensayos realizados en distintas especies de peces y crustáceos [12].

La acetona, ejemplo representativo de las cetonas, es un subproducto metabólico de plantas y animales, y se libera a la atmósfera por la actividad volcánica y por los incendios forestales, fuentes principales de su presencia en la troposfera. Por otra parte, suele encontrarse en ambientes interiores, por su utilización como disolvente en la producción de grasas, aceites, ceras, resinas, caucho, plásticos y productos farmacéuticos, o por su empleo abundante, como disolvente, producto base o intermedio en la industria de síntesis química. Se considera uno de los disolventes industriales menos peligrosos, aunque su gran volatilidad puede ser causa de que se inhale en grandes dosis en el medio ambiente laboral [12].

En el aire, al igual que el formaldehído, se degrada por fotólisis directa y por reacción con radicales hidroxilo generados por vía fotoquímica. La lluvia disuelve el vapor presente en la atmósfera y lo transporta al suelo, siendo la movilidad de la acetona muy elevada en los mismos y no se adsorbe en la fracción sólida de suelos y sedimentos. Se degrada fácilmente

por transformación biológica en medios acuáticos aerobios y anaerobios y, además, no presenta tendencia alguna a la bioconcentración en organismos acuáticos [12].

Aldehídos y cetonas en la troposfera

Como extensión a los comentarios que se acaban de realizar, referidos al formaldehído y la acetona, puede decirse que las fuentes de los compuestos carbonílicos presentes en la atmósfera pueden ser naturales, antropogénicas o procedentes de reacciones fotoquímicas atmosféricas. En consecuencia, los compuestos carbonílicos se pueden clasificar como contaminantes primarios o secundarios de la atmósfera [11].

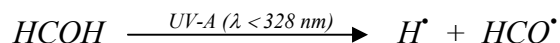
La mayor fuente de compuestos carbonílicos en la atmósfera se puede atribuir a la emisión por parte de vehículos y maquinaria industrial, en los que se queman, de forma incompleta, combustibles con base hidrocarbonada. En particular, el formaldehído es el compuesto carbonílico que se emite en mayor cantidad desde los automóviles, dando lugar al 50 - 70% de la carga total de carbonílicos emitidos a la atmósfera [26]. Además, los vehículos de motor emiten hidrocarburos que se pueden transformar en formaldehído y otros aldehídos/cetonas en la atmósfera mediante reacciones de oxidación fotoquímica [27].

Sin embargo, a pesar del aumento en el consumo de combustibles fósiles, siguen siendo importantes los procesos de combustión de biomasa para obtener energía (generación de electricidad, calefacción), para procesar alimentos (cocción, ahumado), para procesos lúdicos (hogueras, tabaco), y para eliminar residuos agrícolas o de otros tipos [28-31], a través de los que se incorporan cantidades importantes de aldehídos y cetonas a la troposfera. Además, como se ha comentado, los compuestos carbonílicos también se forman mediante reacciones fotoquímicas atmosféricas [32-34].

Transformaciones fotoquímicas

Entre las numerosas reacciones en las que participan los compuestos carbonílicos en la atmósfera, existen algunas que implican la destrucción de los aldehídos o cetonas implicados y, en consecuencia, suponen procesos que constituyen sumideros naturales para este tipo de contaminantes. La descomposición que pueden experimentar los compuestos carbonílicos se

produce al absorber radiación solar de energía suficiente, generalmente radiación UV-A o incluso visible, como para romper uno de los enlaces en la molécula, produciéndose de este modo dos radicales libres. Es el caso, por ejemplo, de la mayor parte de las moléculas del gas formaldehído, que se descomponen fotoquímicamente después de absorber radiación UV-A de la luz solar [35]:



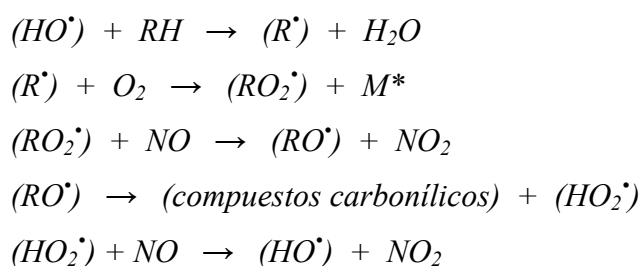
Al contrario, en la atmósfera se producen otras reacciones, como algunas en las que intervienen hidrocarburos, que constituyen fuentes de algunos aldehídos. Es el caso, por ejemplo, del metano gaseoso, gas que se emite a la atmósfera en grandes cantidades, como resultado de procesos biológicos anaerobios y del uso de combustibles como el carbón, petróleo y, especialmente, gas natural. El metano, durante su conversión a dióxido de carbono se transforma, por oxidación, en formaldehído. En el caso de otros alcanos y COVs que no posean enlaces múltiples, se siguen series de reacciones similares.

Sin embargo, como sustancias que intervienen en procesos de contaminación de la troposfera, quizás el fenómeno más importante en el que intervienen los compuestos carbonílicos es el que se denomina smog fotoquímico, a través del cual en muchas áreas urbanas en el mundo, ocurren episodios de contaminación del aire con importantes repercusiones en la salud de las personas. Bajo dicho nombre se engloba un conjunto de procesos que implican la formación de niveles relativamente altos de ozono y otros oxidantes, a nivel de suelo, como resultado de reacciones inducidas por la luz, en ambientes contaminados, con escasa circulación de aire [35].

En una ciudad, un episodio de smog fotoquímico empieza al amanecer, cuando la luz solar inicia la producción de radicales hidroxilo a partir del ácido nitroso y el ozono que subsisten del día anterior. La aportación inicial de óxido nítrico y de hidrocarburos reactivos, a causa del tráfico a la hora punta, produce en primer lugar aldehídos, cuya fotólisis aumenta la concentración de radicales libres y, de este modo, acelera la reacción global. El aumento de radicales libres durante las horas de la mañana sirve para oxidar el óxido nítrico a dióxido de nitrógeno; la fotólisis de este último produce el característico aumento de la concentración de ozono en el mediodía. Los oxidantes como el nitrato de peroxiacetilo (PAN) y peróxido de hidrógeno, también se producen en la tarde, debido a la alta concentración de radicales libres. Al atardecer, el tráfico de hora punta produce más

óxido nítrico e hidrocarburos, los cuales, presumiblemente, reaccionan rápidamente bajo las condiciones de concentración elevada de radicales libres. Las reacciones de smog cesan prácticamente al anochecer, debido a la falta de luz solar, aunque algo de oxidación de hidrocarburos continúa produciéndose a causa de la presencia del radical nitrato. El ácido nitroso que se forma en la oscuridad es estable hasta el amanecer, momento en el que su descomposición ayuda a iniciar otra vez el proceso de smog del día que da comienzo.

De manera común, en los procesos de oxidación troposférica de la mayoría de los compuestos orgánicos, la oxidación se inicia a través de radicales hidroxilo, desencadenando una rápida secuencia de reacciones tal y como se indica a continuación [35]:



En esta secuencia, se supone que el compuesto orgánico es un hidrocarburo (RH) y que el mecanismo se inicia por acción del radical OH^\bullet . Este radical libre, muy reactivo, puede provocar la captura de un átomo de hidrógeno, con la consiguiente ruptura del enlace covalente existente en RH, creando otro radical libre R^\bullet que, en presencia de oxígeno forma radicales oxigenados. El radical peroxo oxida al NO formándose el radical RO^\bullet , que, en presencia de oxígeno, produce un aldehído RCHO y un nuevo radical, hidroperoxilo HO_2^\bullet , que oxida otra molécula de NO. Puesto que se generan radicales hidroxilo en el último paso, estamos ante un ciclo catalítico en el cual las diversas especies radicalarias actúan como propagadores del mismo.

A modo de resumen, puede indicarse que como contaminantes secundarios, los compuestos carbonílicos se forman a través de mecanismos de oxidación fotoquímica muy complejos que implican, en general, a los compuestos orgánicos volátiles con el óxido de nitrógeno [32,33]. Tanto los hidrocarburos de origen antropogénico como de origen biogénico, permiten la formación in-situ de compuestos carbonílicos, especialmente de formaldehído. Este compuesto, es el mayoritariamente producido durante el proceso de

formación de ozono a través de las reacciones fotoquímicas [34] que ocurren en la troposfera.

Los resultados de estos mecanismos, conllevan a una acumulación de ozono y a una oxidación de hidrocarburos a aldehídos y cetonas que dan lugar a la producción continuada de radicales HO_2^* y OH^* , que son los verdaderos precursores del smog fotoquímico. Por consiguiente, la determinación de formaldehído y demás compuestos carbonílicos en la atmósfera es de gran interés, dada su importancia, tanto como precursores en la producción del smog fotoquímico, como por ser productos de reacciones fotoquímicos y por constituir la mayor fuente de radicales libres existentes en la atmósfera.

Cabe señalar que entre los hidrocarburos, el metano, por su reactividad despreciable en condiciones ambientes, contribuye en forma mínima en episodios de corta duración y es clasificado como no reactivo. Por otra parte, además de los hidrocarburos, existen otros compuestos orgánicos fotoquímicamente reactivos, tales como alcoholes, aldehídos, éteres y cetonas, que actúan como precursores del ozono en procesos atmosféricos. Por estas razones, los compuestos importantes como precursores suelen ser referidos como hidrocarburos no metano, escritos de forma abreviada como NMHC en la literatura anglosajona.

Compuestos carbonílicos en áreas urbanas

Las ciudades están expuestas, sobre todo, a la contaminación asociada a las emisiones de sustancias en estado gas y de la materia particulada procedentes de los vehículos a motor, que queman combustibles como el diesel o la gasolina. Pero además, también se encuentran afectadas por procesos específicos, entre los que destacan partículas y aerosoles procedentes de las calderas empleadas en los sistemas de calefacción doméstica. Entre los contaminantes propios de este medio se encuentran los óxidos de nitrógeno emitidos en la combustión interna de los motores, responsables directos del smog fotoquímico, así como los hidrocarburos volátiles, aparte de compuestos orgánicos volátiles y otros precursores del ozono troposférico.

Como se ha dicho anteriormente, los compuestos carbonílicos son constituyentes comunes en atmósferas urbanas. Además de contaminantes primarios tóxicos, producidos directamente por combustión incompleta de biomasa y/o fueles fósiles, son importantes contaminantes secundarios que se forman a partir de complejos mecanismos de fotooxidación

que suelen implicar a hidrocarburos de procedencia antropogénica [36]. Además, existen sobradas evidencias de que los compuestos carbonílicos presentes en la atmósfera de las ciudades, también pueden ser emitidos por fuentes naturales (emisiones biogénicas) y a través de la oxidación fotoquímica de hidrocarburos naturales como el isopreno.

Los compuestos carbonílicos presentes en el aire urbano han recibido una notable atención científica y regulatoria, como contaminantes tóxicos del aire y como importantes precursores de radicales libres, ozono y nitratos de peroxiacetilo [37-39]. En general, por las concentraciones en las que suelen presentarse y por su toxicidad, el formaldehído y acetaldehído suelen escogerse como compuestos de referencia para medidas de la contaminación por compuestos carbonílicos en aire exterior. No obstante, se han aportado conclusiones referidas a la presencia de otros muchos compuestos carbonílicos que suelen estar presentes en el aire de las ciudades. Así, como ejemplo, varios aldehídos alifáticos, como el heptaldehído, han sido identificados en emisiones de vehículos urbanos [40], aunque también el hexaldehído y heptaldehído han sido detectados en las emisiones de varias especies de plantas. Estos compuestos participan en reacciones químicas o de fotólisis, y pueden contribuir significativamente a la formación de aerosol secundario a través de procesos heterogéneos [41].

Determinaciones realizadas en distintas ciudades de tipo medio, han puesto de manifiesto una abundancia relativa de los compuestos carbonílicos en la troposfera, que suele seguir la secuencia: formaldehído > acetaldehído > acetona > butiraldehído > propionaldehído. Por otra parte, las concentraciones máximas, mínimas y medias de estos compuestos, establecidas a lo largo del día, en distintos intervalos horarios, muestran que, en general, estos derivados suelen proceder de fuentes comunes para la mayoría de ellos, generalmente asociadas a procesos antropogénicos, como la actividad fotoquímica. Sin embargo, otros compuestos, como la acetona, también detectada en el aire urbano, suele tener un origen biogénico [42].

Como ejemplo representativo, se incluyen a continuación resultados correspondientes a concentraciones de compuestos carbonílicos determinados en muestras de aire exterior e interior de salas de baile [42]. De todos los aldehídos y cetonas identificados en el medio ambiente externo, formaldehído ($12.37 \pm 7.33 \mu\text{g}/\text{m}^3$) y acetaldehído ($6.90 \pm 4.76 \mu\text{g}/\text{m}^3$) resultaron ser los más abundantes, seguidos por 2-butanona, propionaldehído, butiraldehído y benzaldehído. Los derivados de mayor peso molecular presentan concentraciones inferiores a

0.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, excepto el nonaldehído. La concentración total de todos los compuestos carbonílicos presenta un nivel medio externo de $36.72 \pm 21.95 \mu\text{g}/\text{m}^3$, al que el formaldehído contribuye con un $33.68 \pm 6.79\%$ y el acetaldehído con un $18.79 \pm 3.91\%$.

En la Tabla I.2, se han agrupado valores de concentraciones de formaldehído y acetaldehído en ciudades representativas.

Tabla I.2. Comparación de concentraciones medias ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de compuestos carbonílicos significativos por su abundancia en áreas urbanas.

Localidad	Formaldehído	Acetaldehído	Referencia [42]
Atlanta (USA)	3.3 - 3.7	4.7 - 5.7	43
Estado de California (USA)	3.3	2.0	44
Copenague (Dinamarca)	3.2	1.8	45
Hong Kong (China)	4.13 - 5.27	1.73 - 2.53	46
Kuopio (Finlandia)	1.3 - 2.8	1.1 - 3.2	47
Ciudad de Méjico (Méjico)	43.5	28.6	48
Rio de Janeiro (Brazil)	10.84	10.4	49
Roma (Italia)	13.7	8.2	50
Takasaki (Japón)	3.1 - 14	2.3 - 12	36
Guangzhou (China)	13.29	7.6	42

Es habitual que entre los contenidos de formaldehído y acetaldehído en aire externo existan correlaciones significativas. Además, con excepción de los compuestos carbonílicos de mayor peso molecular, todos los restantes también suelen estar razonablemente correlacionados con el formaldehído y acetaldehído. Basados en estos y otros datos, diferentes autores [46,50] han propuesto como admisible que, en invierno, en el aire urbano, los escapes de los vehículos son las principales fuentes primarias de compuestos carbonílicos, mientras que estas mismas fuentes y, además, las reacciones fotoquímicas que ocurren en la troposfera, son las fuentes que, en verano, contribuyen en mayor extensión a la contaminación por dichos compuestos.

Los compuestos carbonílicos de mayor peso molecular (HMW), como heptaldehído, octaldehído, nonaldehído o decaldehído, suelen presentar peores correlaciones con el

formaldehído y acetaldehído, indicando la posible procedencia de fuentes diferenciadas. Se suele admitir que las principales contribuciones a las concentraciones de HMW presentes en atmósferas exteriores suelen corresponder a emisiones biogénicas, aparte de las originadas por escapes de automóviles y reacciones fotoquímicas. De esta forma, estos compuestos carbonílicos pueden presentar mayores contenidos en ambientes exteriores que en interiores.

Las relaciones formaldehído/acetaldehído ($C1/C2$) y acetaldehído/propionaldehído ($C2/C3$) se han utilizado para diferenciar entre fuentes de procedencia de los compuestos carbonílicos en distintas áreas [17,19]. Se ha publicado que las relaciones $C1/C2$ varían habitualmente entre 1 y 2 en los ambientes urbanos, y que pueden alcanzar valores próximos a 10 en áreas rurales o de bosque.

Relaciones $C2/C3$ podrían ser usadas como indicadores efectivos del origen antropogénico de los compuestos carbonílicos presentes en el ambiente, puesto que el propionaldehído se cree que está asociado solamente a emisiones antropogénicas. En contraste, otros compuestos carbonílicos tienen su origen en fuentes antropogénicos y naturales. En consecuencia, las relaciones $C2/C3$ deben ser altas en atmósferas rurales y bajas en áreas urbanas contaminadas.

Compuestos carbonílicos en áreas rurales

En atención a sus efectos tóxicos o carcinogénicos para las personas, por su intervención en los procesos relacionados con la formación fotoquímica de ozono troposférico, etc., la mayor parte de estudios sobre compuestos carbonílicos en la troposfera se han desarrollado en ciudades [47,51-54]. Ahora bien, mientras en atmósferas urbanas las fuentes antropogénicas son las responsables directas o indirectas de una parte importante de los compuestos carbonílicos presentes en el aire, en atmósferas rurales las emisiones naturales pueden tener un gran impacto. Es el caso de los compuestos orgánicos volátiles biogénicos, COVBs, especialmente isopreno y terpenos, que actualmente reciben una considerable atención por su contribución a la formación de ozono [55,56]. Estos compuestos son producidos por las emisiones de plantas y árboles, aparte de otras emisiones que tienen origen animal, en incendios forestales, en procesos anaerobios en turberas y pantanos, etc. [57].

Por otra parte, algunos compuestos carbonílicos, además de un origen biogénico, [58-60] también están presentes en la atmósfera como resultado de la degradación fotoquímica de otros COVs. En efecto, estudios en cámaras fotoquímicas han puesto de manifiesto que COVBs como isopreno y metilbutenol, pueden oxidarse en la atmósfera formando aldehídos, cetonas y compuestos carbonílicos nitrogenados [57].

En atención a lo expuesto, es habitual encontrar distintos tipos de compuestos carbonílicos en áreas rurales. En la Tabla I.3 se han agrupado las concentraciones medias anuales correspondientes a aldehídos y cetonas. Las concentraciones se han medido cada dos días en muestras de aire tomadas durante 2006, en una estación de muestreo situada en Campisábalos (Guadalajara), perteneciente a la red EMEP/CAMP de la UE [61].

Tabla I.3. Concentraciones de compuestos carbonílicos en muestras de aire tomadas en 2006 en la estación de Campisábalos (Guadalajara) [61].

Compuesto	Concentración (ng/L)	Compuesto	Concentración (ng/L)
Formaldehído	0.42	Metacroleína	*
Acetaldehído	0.98	Butiraldehído	*
Acetona + Acroleína	8.43	Benzaldehído	0.29
Propionaldehído	0.07	Valeraldehído	0.14
Crotonaldehído	0.26	<i>p</i> -tolualdehído	0.27
2-Butanona	0.70	Hexaldehído	0.07

* Datos imprecisos por superposición de señales cromatográficas.

Aldehídos y cetonas en aire interior

La producción del formaldehído y otros aldehídos ha mostrado un crecimiento sustancial durante los últimos años debido, en parte, a su uso en una gran variedad de industrias químicas, como las de producción de caucho, curtidos, papel o perfumes, e industrias de alimentación. Pero sin duda, su mayor aplicación se encuentra como producto intermedio en la síntesis de compuestos orgánicos, incluyendo, los alcoholes, ácidos carboxílicos, tintes y medicinas. De manera específica, el formaldehído se utiliza en la producción de resinas de urea-formaldehído, adhesivos y espumas de aislamiento, con lo cual

las emisiones desde tableros y aislamientos de paredes son las mayores fuentes de formaldehído en ambientes interiores [62].

El formaldehído es el gas contaminante orgánico de interiores más importante y más controvertido. Mientras su concentración en el aire exterior es normalmente demasiado pequeña para ser importante (alrededor de 0.01 mg/L) en áreas urbanas, excepto durante episodios de smog fotoquímico, el nivel de formaldehído gas en ambientes interiores es, a menudo, de mayor magnitud, con una concentración promedio de 0.1 mg/L, excediéndose en algunos casos valores de 1 mg/L [35].

Aldehídos y cetonas asociados a los materiales

Centrando la atención en el formaldehído, las principales fuentes de exposición en aire interior de este compuesto gaseoso son las emisiones de humo de los cigarrillos y de materiales sintéticos que contienen resinas de formaldehído, usadas en espumas de aislamiento a base de poliuretano y como adhesivo en maderas y conglomerados (cartón-madera). El mismo formaldehído se utiliza en tintes y colas de alfombras, moquetas y telas.

Muchos materiales poliméricos se preparan por combinación de formaldehído y otras sustancias orgánicas, y son susceptibles de liberar, en los primeros meses y años después de su fabricación, pequeñas cantidades de gas formaldehído libre. En consecuencia, casas nuevas prefabricadas, como es el caso de las caravanas, que contienen conglomerado de madera y materiales plásticos, suelen presentar mayores niveles de formaldehído en su aire interior que las viejas y más convencionales. Por otra parte, el formaldehído también se puede liberar durante los primeros meses de envejecimiento de determinados barnices y pinturas, por lo que la cantidad de este aldehído emitida por un producto dado (el típico olor a nuevo) puede ser entre dos y ocho veces mayor, una vez concluido su proceso de fabricación [63]. Todos estos productos contribuyen, o son responsables, de lo que se ha dado en llamar síndrome del edificio enfermo.

El formaldehído tiene un olor agrio, posee un umbral de detección para seres humanos de alrededor de 0.1 mg/L y, a menudo, se puede detectar en almacenes y tiendas de alfombras y de fibras sintéticas. Muchas personas expuestas a niveles de este gas ligeramente superiores a 0.1 mg/L sufren irritaciones oculares, especialmente si utilizan lentes de contacto, así como

irritación en la nariz, garganta y piel. La presencia de formaldehído en el humo del cigarrillo, causa irritación ocular. A niveles mucho más elevados de formaldehído, que es improbable encontrar en los sitios de trabajo, la respiración se hace dificultosa. El formaldehído en el aire origina que los niños desarrollen más infecciones respiratorias, alergias y asma, si bien las evidencias de estos efectos están aún en discusión.

Como sucede en el aire ambiente con el formaldehído y acetaldehído, en el aire interior el formaldehído suele tomarse como el compuesto carbonílico de referencia [64,65]. En las Tablas I.4 y I.5 se han recogido algunos datos de emisiones de formaldehído para distintos productos, tanto secos como húmedos. En el caso de ciertos tipos de tableros de madera prensada, las emisiones de formaldehído, que inicialmente alcanzan valores de 300 - 400 mg/m²·h, pueden mantener niveles de emisión de 80 - 240 mg/m²·h, después de transcurrir períodos de tiempo de seis a diez meses [64].

Tabla I.4. Emisión de formaldehído por productos secos [65].

Producto comercial	Emisión típica (µg/m ² ·h)
Madera con resinas de urea-formaldehído (UF)	
- Tableros de madera prensada de 1/4"	1580
- Tableros industriales de madera prensada de 5/8-3/4"	104 - 237
Madera recubierta con UF	
- Laminados vinílicos rígidos	16
- Laminados de tableros industriales con melamina (domésticos)	2.7 - 5.7
Otros	
- Recubrimientos de techos con fibra de vidrio	16 - 23
- Bolsas de papel	< 0.5
- Toallas de papel	< 0.6

En cuanto a valores de referencia, en hogares en los que se acabe de instalar muebles nuevos de madera prensada, se pueden alcanzar 0.3 ppm de formaldehído, muy por encima de 0.1 ppm que establece la EPA (Environmental Protection Agency) como límite saludable [12], además de que puede haber personas especialmente sensibles a este o a otros COVs. Por último, la AFEC (Asociación de Fabricantes de Equipos de Climatización) [66] señala que

valores de 200 - 300 mg/m³, para la concentración de los COVs totales en el aire del ambiente de un edificio, pueden ser considerados como compatibles con el nivel de bienestar.

Tabla I.5. Emisión de formaldehído por productos húmedos [65].

Producto comercial	Carga (µg/m ³)	Emisión inicial (µg/m ² ·h)	Emisión final (22 h) (µg/m ² ·h)
Pintura de baja calidad	75	518	8.1
Pintura de alta calidad	79	326	9.8
Papel pintado	165 - 192	691	27
Pintura de uñas	180	178000	124

Aldehídos y cetonas asociados a procesos de combustión

La combustión de la madera emite un amplio rango de potenciales contaminantes del aire, la mayoría de una considerable peligrosidad para la salud de las personas y ecosistemas, incluyendo materia particulada, monóxido de carbono, benceno, 1,3-butadieno, aldehídos, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y muchos otros compuestos orgánicos tóxicos [67]. Estos compuestos son emitidos al aire ambiente y, en una extensión variable, también al aire interior, dependiendo del tipo de dispositivo utilizado para la combustión y el lugar en el que se produzca.

En países desarrollados de clima frío, como Suecia, es elevado el número de personas que usan calderas, estufas y chimeneas que utilizan madera como combustible alternativo a los fueles fósiles y a la electricidad, muchas veces con el beneplácito de los gobiernos, para promover un desplazamiento hacia el consumo de combustibles renovables. En general, la eficacia de los sistemas utilizados para la combustión y para la extracción del humo formado, hace que las repercusiones en la calidad del aire interior en los domicilios no se vea peligrosamente afectada.

En otro orden de cosas, según un reciente informe de la Organización Mundial de la Salud [68], más de tres mil millones de personas en todo el mundo, aunque distribuidas principalmente en África y Asia, dependen de combustibles sólidos, incluida la biomasa (restos de madera o leña, estiércol y residuos agrícolas) y el carbón, o de los llamados combustibles sucios derivados del petróleo, para satisfacer sus necesidades de energía:

cocinar, calentar agua y calefacción. La combustión insuficiente de los combustibles citados, en una fogata o en un fogón, en el interior de las viviendas, crea un cóctel peligroso de cientos de contaminantes, entre los que se encuentran distintos compuestos carbonílicos y otros productos químicos nocivos para la salud. Día tras día y durante varias horas seguidas, las mujeres y sus hijos pequeños inhalan cantidades de humo equivalentes a dos paquetes de cigarrillos por día. Se estima que al año se producen más de 1.5 millones de defunciones, principalmente entre niños pequeños y sus madres. Otros millones de personas sufren todos los días dificultad para respirar, irritación de los ojos, enfermedades respiratorias graves, y probablemente también cataratas, tuberculosis, ataques de asma y consecuencias adversas en el embarazo.

Los resultados obtenidos al efectuar determinaciones en muestras de aire tomadas en habitaciones donde se ha producido la combustión, en hornos/cocinas, de restos de diferentes cultivos y madera, keroseno, varios tipos de fuel y gases [69], muestran que en todos los hornos se produce formaldehído y acetaldehído y que, en la mayoría de los hornos de biomasa, se producen compuestos carbonílicos adicionales tales como acetona, acroleína, propionaldehído, crotonaldehído, 2-butanona, isobutiraldehído, butiraldehído, isovaleraldehído, valeraldehído, hexaldehído, benzaldehído, *o*-tolualdehído, *m*-tolualdehído, *p*-tolualdehído y dimetilbenzaldehído. Los hornos que queman keroseno y gases licuados del petróleo generan más compuestos carbonílicos que los hornos de carbón o gas natural, pero menos que los hornos de biomasa.

Determinaciones efectuadas en muestras de aire interior procedentes de habitaciones en las que se utilizó calefacción con madera en Suecia, ponen de manifiesto que las medianas correspondientes a la exposición personal de formaldehído son de unos 23 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mientras que para el acetaldehído alcanzan los 13 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [67]. Con fines comparativos, puede indicarse que la mediana de los resultados hallados en la determinación de formaldehído en 20 casas de la India, que usan cocinas con madera para cocinar, presentó un valor de 652 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [70].

El formaldehído y acetaldehído son emitidos por todos los tipos de combustión incompleta de materia orgánica, no sólo quemando madera, sino con combustibles fósiles, tabaco, incienso, etc. [67]. En general, aunque otros compuestos carbonílicos también se producen en los procesos de combustión, el formaldehído y el acetaldehído son los contaminantes mayoritarios.

I.3. EL HUMO Y LOS ALIMENTOS AHUMADOS

Desde la prehistoria, es conocido que, mediante los procesos de ahumado, es posible poner en contacto con los alimentos algunos compuestos presentes en el humo, que poseen propiedades bactericidas y antioxidantes. Sin embargo, el interés del ahumado de los alimentos, con objeto de conseguir su preservación, ha ido siendo postergado por técnicas de conservación más modernas, pasando a ser el ahumado un proceso cuyo principal interés reside en proporcionar a los alimentos determinadas características organolépticas, relacionadas con la textura, color, olor y sabor de los mismos. De esta forma, aunque en la actualidad existen varios métodos alternativos de conservación, el ahumado sigue gozando de una gran popularidad, ya que proporciona al producto un perfil organoléptico específico, muy apreciado por algunos consumidores. En el ahumado, la absorción de los componentes de la fase gaseosa, a través de la superficie del alimento, se considera mucho más importante que el depósito de la fracción aerosol del humo sobre la misma [71,72]. Los alimentos frecuentemente utilizados en el ahumado son: carnes, pescados, mariscos y quesos.

En general, los procesos de ahumado se realizan en condiciones en las que la temperatura del humo no suele sobrepasar los 60°C, aunque si se pretende cocinar el alimento al mismo tiempo que se produce el ahumado, se utiliza el ahumado en caliente, durante el que pueden alcanzarse temperaturas de 100°C [72,73]. Durante el proceso de ahumado, el agua intersticial que contiene el alimento absorbe muchos de los compuestos presentes en el humo, introduciéndolos hacia el interior del mismo. Ahora bien, durante este proceso, la humedad de los alimentos va disminuyendo progresivamente, de forma que mientras que al comenzar el ahumado los compuestos presentes en el humo se absorben rápidamente, al irse deshidratando el alimento, va disminuyendo la velocidad de retención de las sustancias presentes en el humo. Por tanto, la capacidad del alimento para absorber los compuestos del humo dependerá no sólo de la composición química del humo, sino también de las condiciones en las que se realice la combustión. Cuando el humo generado por la combustión de la biomasa se encuentra a altas temperaturas y el contenido de humedad es bajo, aumenta la velocidad con la que el alimento pierde el agua, dando lugar a alimentos con superficies firmes, que dificultan la absorción de los compuestos presentes en el humo [72-74].

El humo

El humo se produce a partir de procesos de combustión, fenómeno por el cual un material se combina con el oxígeno del aire, a partir de una temperatura determinada, dando lugar a productos oxidados y a un desprendimiento de energía. Es evidente la importancia que debe ejercer el combustible en la composición del humo. En un sentido amplio, el humo en Canarias se produce por combustión de biomasa vegetal de distinto tipo, si bien para el ahumado del queso, tradicionalmente realizado de forma artesanal, se han utilizado determinados tipos de restos vegetales, que pueden diferir de unas islas a otras y que los ganaderos han seleccionado por las características que proporcionan al humo y por la disponibilidad de los mismos en el entorno de sus domicilios.

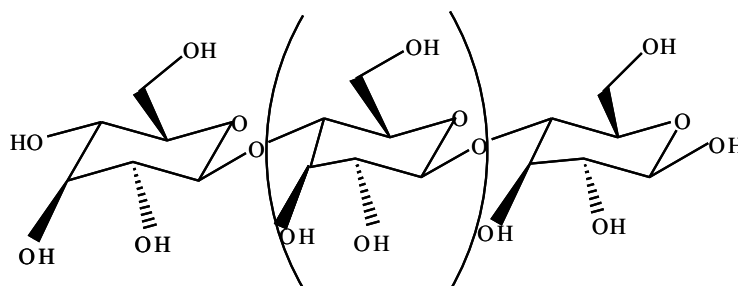
Composición de la biomasa

La biomasa vegetal está constituida fundamentalmente por materiales lignocelulósicos de naturaleza fibrosa que forman parte de la pared celular que recubren las células vegetales, en cuya composición se distinguen tres tipos de biopolímeros: celulosa, hemicelulosa y lignina, aunque también contiene una serie de compuestos de bajo peso molecular, solubles en agua (fracción hidrosoluble), y pequeñas cantidades de proteínas y sales minerales.

La celulosa y la hemicelulosa son polímeros de hidratos de carbono formados a partir de moléculas de monosacáridos mientras que la lignina es un polímero de unidades fenilpropanicas. Generalmente la madera contiene entre un 40 - 60% de celulosa, un 20 - 30% de hemicelulosa y un 20 - 30% de lignina y se clasifican en duras o blandas dependiendo de su origen botánico. Las duras (angiospermas) tienen un mayor contenido de hemicelulosa y las blandas (gimnospermas) tienen un mayor contenido en lignina [75].

La *celulosa* es uno de los biopolímeros más abundantes en la naturaleza, ya que se trata del principal componente de las células vegetales. Desde el punto de vista estructural, la celulosa es un polímero lineal, cuya unidad básica es la D-glucosa que se enlaza mediante un enlace glucosídico en la configuración β -(1-4) dando lugar a la unidad de celobiosa, que se repite exactamente en la cadena polimérica, tal y como se muestra en la Figura I.1. En la pared celular, las cadenas de celulosa se agregan formando microfibrillas que constituyen el

elemento base de los materiales celulósicos. El producto de descomposición procedente de la combustión de la celulosa más predominante es el levoglucosano [76].



Celulosa, $n=7-12 \cdot 10^3$ monómeros de D-glucosa

Figura I.1. Estructura de la celulosa.

Las *hemicelulosas* son polisacáridos químicamente heterogéneos, constituidas por diferentes unidades de monosacáridos: pentosas (xilosa y arabinosa), hexosas (glucosa, manosa y galactosa) y ácidos urónicos, enlazados entre sí por enlaces glicosídicos y formando estructuras ramificadas y en general amorfas. Actúan como matriz soporte para las microfibrillas de celulosa en la pared celular y son de menor masa molecular, más accesibles, más fácilmente degradables y se disuelven mejor que la celulosa. En la Figura I.2 se muestran diferentes estructuras de los monosacáridos componentes de las hemicelulosas [76].

La estructura de la celulosa es la misma en los distintos materiales lignocelulósicos. Sin embargo, en las hemicelulosas existe una considerable variación, especialmente entre las coníferas, frondosas y plantas herbáceas. En el caso de la madera de coníferas se suele apreciar una mayor cantidad de manosa y galactosa, mientras que la xilosa es más abundante en las frondosas [76].

En las plantas herbáceas, las hemicelulosas presentan una gran variedad en composición según las diferentes especies, siendo en algunas predominantes la manosa y la galactosa [77] y en otras la xilosa.

La *lignina* es un polímero aromático formado por la condensación oxidativa de precursores fenólicos, muy ramificado y amorfo. La lignina es un componente característico de la pared celular de las plantas vasculares, donde se forma por la polimerización oxidativa de tres alcoholes *p*-hidroxicinámicos; cumarílico (4-hidroxicinámico), coniferílico

(4-hidroxi-3-metoxicinámico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5-dimetoxicinámico), tal y como se muestra en la Figura I.3, dando lugar a una red tridimensional con diferentes tipos de enlaces. Este polímero es muy resistente a la biodegradación y sus funciones son proteger a la celulosa del ataque microbiano, conferir resistencia e impermeabilidad a los materiales lignificados y mantener unidas las fibras celulósicas [76].

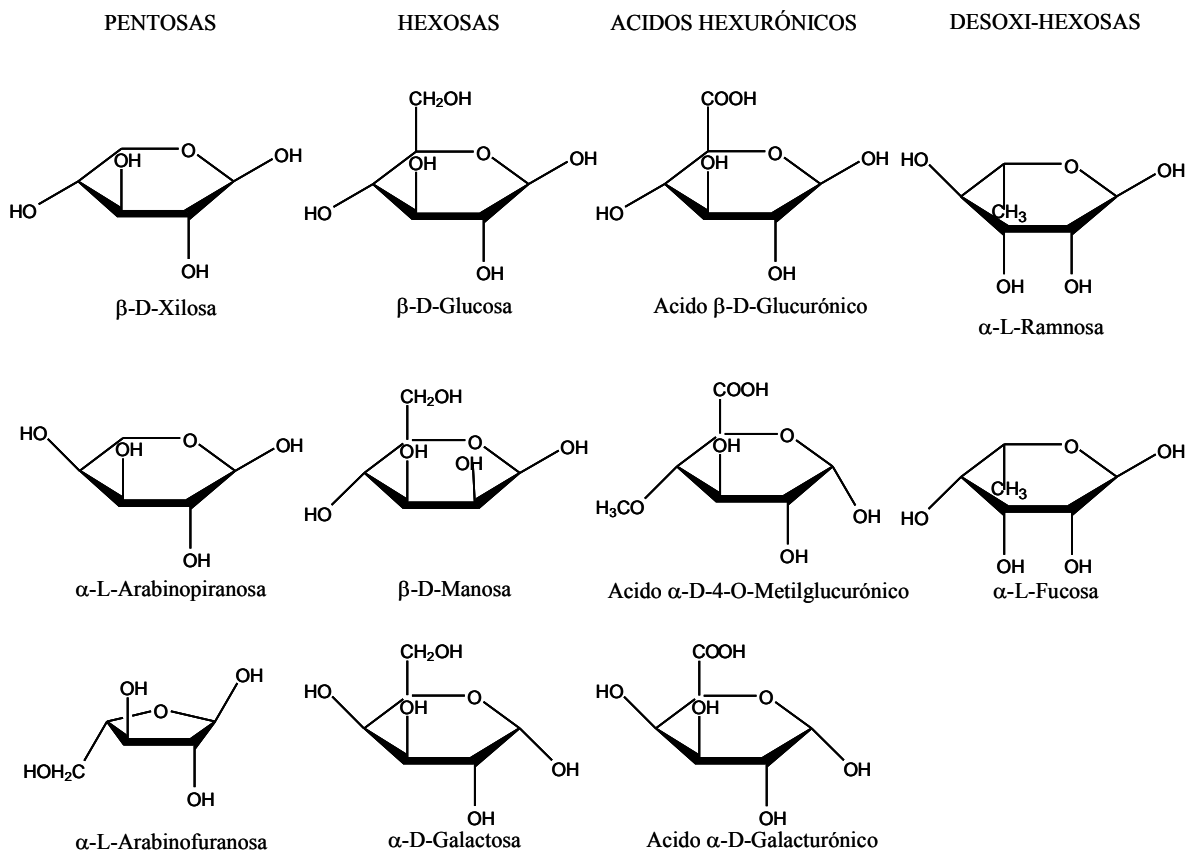


Figura I.2. Monosacáridos componentes de las hemicelulosas.

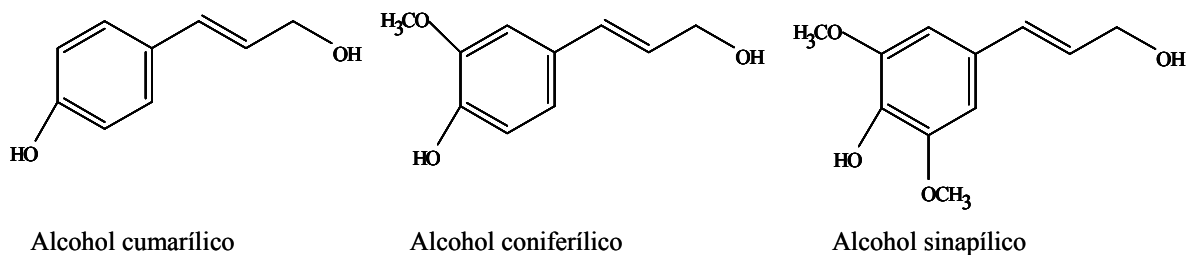


Figura I.3. Alcoholes *p*-hidroxicinámicos.

La biomasa vegetal incluye también una fracción de bajo peso molecular soluble en disolventes orgánicos que engloba diferentes compuestos lipofílicos y polares [76,78].

Entre las sustancias polares extraíbles se encuentran diferentes compuestos fenólicos libres de bajo peso molecular, lignanos (dilignoles y compuestos relacionados), taninos y flavonoides, entre otros. Los compuestos fenólicos libres incluyen precursores de la lignina (ácidos *p*-hidroxicinámicos y aldehídos *p*-hidroxicinámicos), ácidos bencenocarboxílicos relacionados (ácidos *p*-hidroxibenzoico, vainílico y siríngico), aldehídos y cetonas aromáticas (*p*-hidroxibenzaldehído, vainillina, siringaldehído y propioguayacona).

Combustión de la biomasa

La combustión de la biomasa es un proceso que se produce en varias etapas. Durante la primera, el agua de la biomasa es eliminada en forma de vapor. A medida que la temperatura aumenta, tienen lugar reacciones de oxidación, hidrólisis, deshidratación y pirólisis de los principales constituyentes de la biomasa, formándose en esta etapa sustancias alquitranosas, al tiempo que se desprenden compuestos orgánicos volátiles [79]. Cuando la temperatura supera los 270 - 400°C, se produce la combustión de dichas sustancias, lo que provoca la emisión de resinas y productos de descomposición [80]. El proceso de combustión continúa hasta que el flujo de compuestos volátiles disminuye a un nivel en el que no es posible la propagación de la llama [81-84].

El humo se produce sustancialmente al elevar la temperatura de la biomasa al tiempo que se limita el suministro de aire para prevenir la combustión, pero permitiendo la destilación destructiva. El destilado, tal como se genera, se encuentra en fase vapor, pero cuando se enfría algunos compuestos menos volátiles condensan para formar una fase líquida dispersa, la cual junto con las partículas de hollín, si están presentes, constituyen el humo visible. El resto de compuestos más volátiles se distribuyen entre la fase gaseosa y la fase líquida, de acuerdo con su solubilidad y volatilidad a la temperatura y humedad reinante [73].

Las emisiones procedentes de procesos de combustión dependen directamente del tipo de biomasa utilizado y de las condiciones con las que se lleva a cabo la combustión. Es conocido que la degradación térmica de la celulosa (> 300°C), hemicelulosa (> 250°C) y lignina (> 400°C), presentes en la biomasa, va acompañada por la emisión de compuestos

orgánicos que son característicos de cada una de ellas.

La celulosa puede descomponerse mediante dos vías diferentes; la primera ocurre a una temperatura $< 300^{\circ}\text{C}$ e implica reacciones de despolimerización, eliminación de agua, fragmentación y oxidación dando lugar a la formación de cadenas hidrocarbonadas. La segunda vía ocurre a una temperatura $> 300^{\circ}\text{C}$ e implica la rotura de enlaces por transglucosilación, reacciones de fisión que dan lugar a azúcares anhidro y a productos volátiles. Es esta segunda vía la que proporciona la fuente de los trazadores moleculares específicos, principalmente el levoglucosano, y otros como la furanosa. Entre los productos volátiles podemos encontrar algunos como los siguientes: CO, CO₂, metanol, acetaldehído y ácido acético, entre otros [85].

Teniendo en cuenta que la naturaleza química de la celulosa es uniforme en todos los tipos de vegetales, las variaciones en la composición de los humos procedentes de la combustión de los diferentes tipos de biomasa, puede considerarse que se deben fundamentalmente a la constitución de las hemicelulosas y, sobre todo, de las ligninas. Los productos de degradación procedentes de la combustión de estas últimas, se clasifican según posean las estructuras del cumarílico, vainílico y siríngico [86], derivados de los alcoholes *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, respectivamente. Las proporciones de estos compuestos varían considerablemente entre las diferentes clases de restos vegetales. Así, las ligninas de las maderas duras son ricas en productos procedentes del alcohol sinapílico y las maderas blandas, en cambio, tienen una proporción alta de productos del alcohol coniferílico con una componente menor del alcohol sinapílico [87]. La combustión de la lignina de la madera, tras la rotura de biopolímeros, da lugar a fenoles, aldehídos, cetonas, ácidos, y alcoholes, generalmente con la retención de los sustituyentes originales, ($-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$), en el anillo bencénico [88]. La mayoría de estos compuestos han sido identificados en el hollín y en el humo condensado de las estufas de madera residenciales y se han propuesto como trazadores para conocer el origen de la fuente [89,90]. Tanto las maderas duras como las maderas blandas producen derivados del guaiacol (2-metoxifenol) en el humo y, por el contrario, la madera dura produce además niveles altos de los derivados de siringol (1,3-dimetoxifenol). Se ha concluido que los derivados del guaiacol son trazadores potenciales para ambos tipos de humo de madera y los derivados del siringol indican una fuente de entrada de humo de madera dura. En la literatura se puede encontrar una evaluación

detallada de las fuentes de las emisiones de humo de la combustión de las maderas duras y blandas en estufas [86,91-92].

En cualquier caso, la composición precisa del humo de biomasa depende de numerosos factores, entre los que se encuentran: composición química, tamaño y humedad de la biomasa utilizada, temperatura que se alcanza en el proceso de combustión, concentración de oxígeno durante la misma, etc. [73]. A su vez, estos factores se encuentran interrelacionados, de manera que las variaciones que pueda experimentar cualquiera de ellos también pueden afectar al resto.

Efectos del ahumado en los alimentos

En general, el proceso de ahumado produce cambios en el valor nutricional y en las propiedades organolépticas de los alimentos.

Por acción de las temperaturas que se pueden alcanzar en el humo que interviene en los procesos de ahumado, es posible que se produzca la destrucción de algunos aminoácidos básicos como el triptófano, cisteína y lisina, en los alimentos. Estas pérdidas se producen, de forma preferente, en la capa superficial del alimento (5 - 10 mm), donde las condiciones ambientales son más severas. Sin embargo, la destrucción de estos aminoácidos no sólo es función de la temperatura, sino que también se debe a interacciones entre los componentes del humo e ingredientes que pueden ser añadidos durante el proceso de curado (nitratos, nitritos) [73,93].

Por otro lado, se ha demostrado que los compuestos fenólicos procedentes de la combustión de biomasa poseen propiedades antioxidantes que pueden retardar la peroxidación de los lípidos y otras biomoléculas esenciales. Además, algunos componentes del humo como el formaldehído pueden tener propiedades antimicrobianas e inhibir el crecimiento de determinados microorganismos. En general, la preferencia del ahumado con maderas duras puede ser debida a que proporciona a los alimentos bajos valores de pH y, por tanto, mayor estabilidad microbiológica [71,73,94-96].

En otro orden de cosas, como se ha dicho anteriormente, el perfil organoléptico que el ahumado le confiere al alimento es el principal motivo por el que el proceso de ahumado se sigue utilizando ampliamente en distintos países. En cuanto a los efectos que el ahumado

produce en las características sensoriales de los alimentos destacan los que provocan cambios en:

- *La textura.* Observándose que los procesos de ahumado que provocan rápidas deshidrataciones del alimento dan lugar a texturas firmes, con diferencias muy acusadas entre la superficie y el interior del producto [73].
- *El color.* En general, suele admitirse que las interacciones entre compuestos con grupos amino y carbonilo, presentes en el humo, resultan ser de gran importancia en el desarrollo del color de los alimentos ahumados. Diferentes estudios sugieren que las reacciones de la lisina con compuestos como el aldehído glicólico, 2,3-butanodiona, piruvaldehído, coniferaldehído o sinapaldehído son particularmente importantes. El color también se debe a compuestos del humo que presentan grupos cromóforos y se depositan directamente en el alimento [73,97,98].
- *El sabor y olor.* En general, la intensidad del sabor y el olor, que un proceso de ahumado confiere a un alimento determinado, depende de la naturaleza química y de la concentración de los componentes del humo, así como del tipo de alimento y de las interacciones entre los componentes del humo y el alimento. Varios estudios sugieren que los compuestos fenólicos simples son de gran importancia en el sabor y olor de alimentos ahumados [73,99,100].

El queso ahumado en Canarias

El queso es un producto importante en la gastronomía canaria. Los quesos canarios suelen caracterizarse por su calidad y variedad, por estar elaborados en su mayoría con leche cruda de cabra y por su comercialización antes de 60 días de su maduración. El consumo de este producto no se encuentra restringido al postre, sino que se utiliza como ingrediente principal en numerosas recetas [101].

Para la elaboración de los quesos, Canarias cuenta con excelentes razas autóctonas de cabras que se caracterizan por la calidad de su leche, así como por una situación sanitaria excepcional. En relación a su composición química, la leche procedente de la cabra palmera

destaca no sólo por los contenidos medios de grasa (4.06%) y proteínas (4.21%), sino también por los elevados niveles de α -caseína (3.52%) [102]. En diversos trabajos sobre la caracterización del queso canario, realizados por Fresno y col. [103], se han hallado valores medios en grasas y proteínas, referidos a extracto seco, del 35.0 y 19.5%, respectivamente.

Las Denominaciones de Origen (DO) obtenidas en 1996 y 2000 por los quesos elaborados en Fuerteventura y La Palma, respectivamente, han supuesto un importante reconocimiento a nivel regional, nacional e internacional de estos productos. Así, el queso El Juncal (La Palma) y los quesos curados de Guía (Gran Canaria) y de pasta prensada (Fuerteventura) obtuvieron galardones de oro en la edición de 2005 del certamen mundial “*World Cheese Awards*” celebrado cada año en Londres. En este certamen, la quesería de Arico (Tenerife) obtuvo tres reconocimientos, uno de plata y dos de bronce, y la Granja Flor de Güimar (Tenerife), dos de plata [104]. En la edición de 2008 del referido certamen, los quesos canarios fueron premiados con 12 medallas, cuatro de ellas de oro. Dicho año se produjeron 8 millones de kilogramos de queso en Canarias. Sin duda, con la implantación de las DO se ha conseguido que el nivel de calidad, aprecio y conocimiento del producto aumente en las islas y fuera de ellas. Los Consejos Reguladores de las DO, formado por los propios ganaderos y queseros, certifican al consumidor que aquellos quesos que lleven su contraetiqueta son auténticos y que han sido sometidos a estrictos controles para asegurar su origen y calidad.

Uno de los aspectos más destacados de los quesos elaborados en las Islas Canarias es su proceso de ahumado. En general, esta actividad es realizada por los ganaderos de forma artesanal. Entre los diferentes materiales utilizados en el ahumado de quesos se encuentran: madera de pino canario (*Pinus canariensis*), acícula de pino canario, penca de tunera seca (*Opuntia ficus indica*) y cáscara de almendra (*Prunus dulcis*), característicos de la isla de La Palma, y maderas de jara (*Cistus monspeliensis*) y brezo (*Erica arborea*) normalmente utilizados en las islas de La Gomera y El Hierro. En cuanto al proceso de combustión, se suelen emplear ahumaderos artesanales en los que no es posible controlar rigurosamente las condiciones de combustión. Con objeto de alcanzar los mejores resultados en el proceso de ahumado, los ganaderos canarios hacen uso de dos criterios fundamentales. En primer lugar, generar la mayor cantidad de humo posible y, en segundo lugar, impedir que el fuego se reavive durante el proceso, con objeto de evitar los efectos negativos que pueden causar las altas temperaturas en los quesos ahumados [103].

En Canarias, los quesos elaborados de forma artesanal, muchas veces a partir de leche de razas de cabra autóctonas, tienen grandes dificultades para convivir en los mercados con productos estándar con precios más competitivos. Una de las formas de poder subsistir es presentar unas características perfectamente diferenciadas que sean apreciadas por los consumidores. En tal sentido adquiere especial significación el ahumado, con objeto de proporcionar al queso un color, aroma, olor y sabor característicos [105-108].

El color de los alimentos ahumados influye de manera significativa en las preferencias del consumidor, siendo uno de los principales atributos utilizados en el momento de la compra. Constituye la primera sensación que se percibe y la que determina el primer juicio sobre la calidad, ayuda a distinguir unos alimentos de otros y a diferenciarlos en los distintos niveles de calidad [109], pudiendo contribuir en algunos casos a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y olor. Debe destacarse que el color de los productos ahumados se ve afectado por el tipo de material utilizado como combustible [110,111] y, en consecuencia, es un parámetro a cuidar, junto con el dispositivo utilizado para el ahumado, y un control adecuado de las variables que controlan el proceso.

Los resultados obtenidos a través de paneles de catadores muestran que el material empleado como combustible influye significativamente en todos los descriptores analizados, en relación con el olor y sabor del queso ahumado en Canarias [108]. En relación con la intensidad del olor que presentan los quesos ahumados, aquellos en los se utilizó humo procedente de madera de pino, acícula de pino y penca de tunera seca suelen presentar olores relativamente poco intensos, al contrario de los que se ahúman con humo de cáscara de almendra y madera de brezo. En cuanto al sabor, los resultados muestran que, en general, los catadores encuentran mayor intensidad aromática en los que se ahúman con humo de madera de jara, seguidos de los que utilizan humo de madera de brezo, de acícula de pino, cáscara de almendra, madera de pino y penca de tunera seca.

Mediante pruebas sensoriales discriminantes y hedónicas [105], se ha establecido que más del 70% de los consumidores son capaces de diferenciar los quesos atendiendo al material con el que han sido ahumados. A través de dichas pruebas, los quesos ahumados con el humo de materiales usados habitualmente en La Palma fueron valorados con notas entre 3.5 y 4.2, en una escala de 1 a 5, siendo los mejor valorados aquellos en los que se utilizó humo de cáscara de almendra, seguidos de los que fueron ahumados usando madera de pino, pencas de tunera seca y acícula de pino, como combustibles. De igual forma, para los quesos

ahumados en la Gomera, la valoración fue similar, entre regular y buenos, siendo mejor puntuados los ahumados con humo de madera de brezo que los que lo fueron con humo de madera de jara.

1.4. EL QUESO Y LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS

El queso. Características generales

El queso es el producto resultante de la coagulación ácida, enzimática o mixta, de la leche cruda o pasteurizada y que, en general, se somete posteriormente a maduración. Es un alimento de gran valor nutritivo, no sólo por el elevado contenido en proteína y grasa, sino también por ser una fuente importante de elementos minerales, principalmente calcio y fósforo [112].

Las distintas variedades de queso son la consecuencia del empleo de leches con diferencias en su composición, del conjunto de procesos físicos y químicos que inciden en la elaboración y de las sustancias añadidas, así como de los factores microbiológicos y bioquímicos que intervienen en el proceso de maduración. En todo caso, el objetivo más importante a alcanzar en la elaboración de cualquier tipo de queso es obtener un producto de calidad, tanto desde el punto de vista físico (textura), como desde un punto de vista organoléptico (olor y sabor).

En términos generales, las principales etapas en la elaboración del queso comienzan con la obtención de la cuajada, que se deja en reposo varias horas durante las que va aumentando la acidez, debido a la presencia de ácido láctico, y adquiriendo cierta firmeza. A continuación, se corta en pequeños trozos para permitir la eliminación del suero y, finalmente, se prensa. Antes del prensado se añade sal, para acelerar la eliminación del suero final y para frenar el crecimiento de microorganismos no deseados. La etapa final de la elaboración del queso, la maduración, precisa bajas temperaturas de almacenamiento durante un período considerable de tiempo, en aquellos quesos que no se consumen después de su elaboración. Durante esta etapa, se producen una serie de cambios en las propiedades físicas y químicas que proporcionan al queso su aspecto, textura y consistencia, así como su aroma y sabor característicos. El cambio más notorio en la maduración, con respecto al aspecto físico, es la transformación de la masa inicial, que es insípida, desmenuzable o viscosa, en otra

homogénea y flexible, recubierta de una cáscara, en la que ha desaparecido la estructura granulosa original.

En el queso, las sustancias responsables del sabor y olor se producen por transformaciones metabólicas de los componentes mayoritarios de la leche: hidratos de carbono (lactosa), proteínas (caseínas) y grasa (triglicéridos) [113], originándose los principales cambios químicos asociados a la maduración de los quesos que son los procesos de glucólisis, proteólisis y lipólisis [113]. Durante la maduración se producen, a su vez, transformaciones de los productos originados en estas reacciones que son, en gran parte, responsables de los cambios de textura, del sabor y olor de los quesos.

La proteólisis es el proceso bioquímico de mayor importancia entre los que tienen lugar durante la maduración de la mayoría de las variedades de queso. Afecta tanto a la textura como al sabor y modifica el pH. Los agentes responsables de la proteólisis, durante la maduración de los quesos, son el cuajo o sus sustitutos, quimosina, pepsina, cuajo vegetal y proteasas microbianas, que muestran especificidad sobre los enlaces peptídicos adyacentes a los aminoácidos hidrofóbicos, las enzimas endógenas de la leche, principalmente la plasmina, y las enzimas de microorganismos presentes en la leche cruda, principalmente bacterias lácticas o añadidas como cultivo iniciador. Otras enzimas proteolíticas son las procedentes de la microbiota secundaria asociada a la leche y, por último, las enzimas que proceden de bacterias que sobreviven a la pasteurización de la leche, o que llegan al queso por una posible contaminación durante la elaboración o la posterior maduración y/o conservación. Como quiera que la maduración es una etapa que puede durar desde días, a un número considerable de meses, diferentes variables físicas y químicas influyen de forma notable en la actividad microbiana y enzimática que condicionan las características de los quesos. Factores como la humedad, aireación, temperatura, contenido en sal y acidez del queso, intervienen activamente en el proceso de maduración [114].

Durante la proteólisis, los compuestos nitrogenados insolubles sufren cambios a formas solubles. En las primeras etapas, las caseínas son degradadas a péptidos y polipéptidos de alto peso molecular, que posteriormente son hidrolizados a péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos [115,116], así como a aminas, compuestos carbonílicos, amoníaco y dióxido de carbono. Durante la maduración de queso Manchego [117], se han identificado 14 aminoácidos libres, entre los que predominan valina, leucina e isoleucina y arginina, no detectándose tirosina, triptófano y fenilalanina, probablemente descarboxilados a sus

correspondientes aminas, mientras que la metionina, abundante en los quesos fabricados con leche cruda, no se ha detectado en los elaborados con leche pasteurizada, posiblemente por desaminación a metional.

En la Figura I.4, se visualiza un proceso de catabolismo microbiológico de aminoácidos producidos durante la maduración del queso [4].

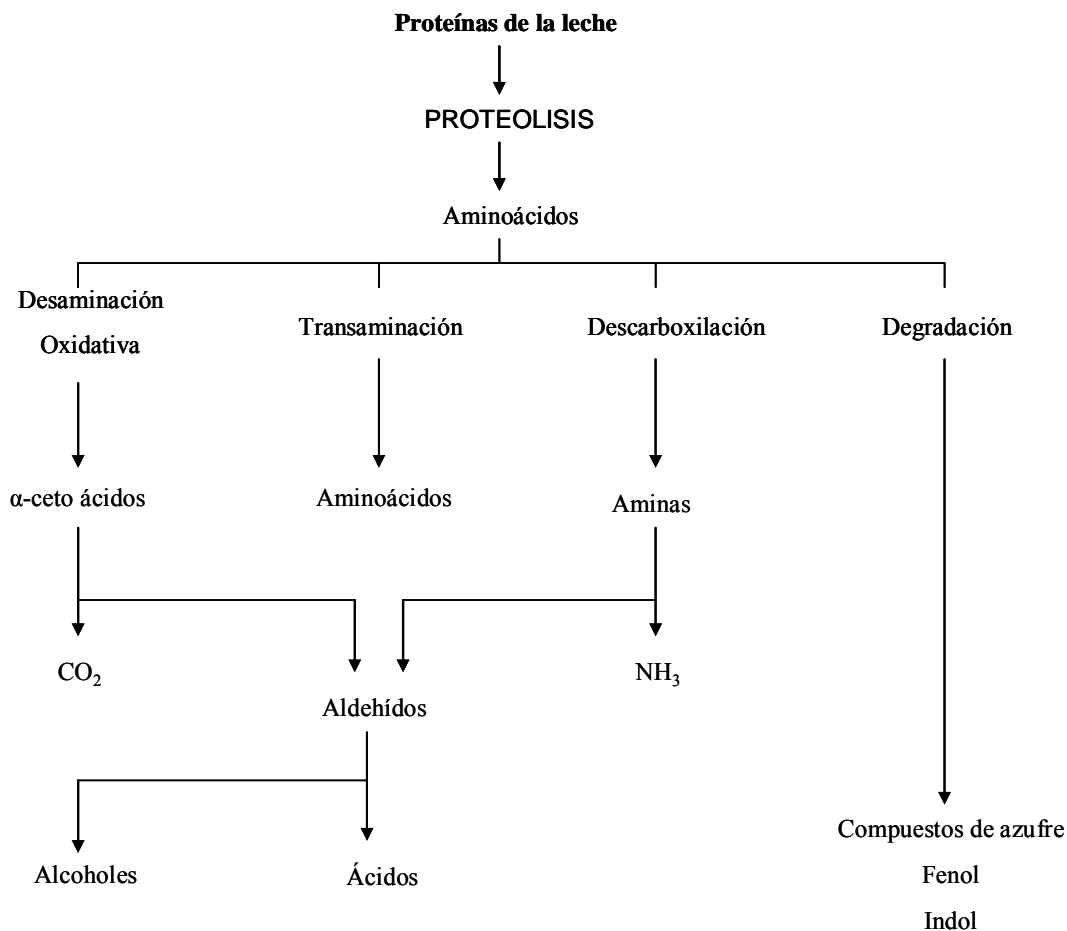


Figura I.4. Catabolismo microbiológico de aminoácidos durante la maduración del queso.

Por su parte, la lipólisis es un fenómeno poco destacado en la mayoría de los quesos, excepto en los azules, en algunas variedades españolas, como el Majorero e Idiazabal y en quesos italianos duros [118]. La hidrólisis enzimática de los triglicéridos, que constituyen más de un 98% de la grasa del queso, es la transformación bioquímica más importante que sufre la grasa durante la maduración del queso. Como resultado, se producen ácidos grasos libres que, junto con otros productos formados en etapas posteriores de degradación, como alcoholes,

ésteres, aldehídos, cetonas y lactonas, son los componentes principales del aroma y sabor característico de los quesos.

En la Figura I.5, se encuentran las rutas relacionadas con la formación de compuestos que forman parte del flavor, a partir de los lípidos [4].

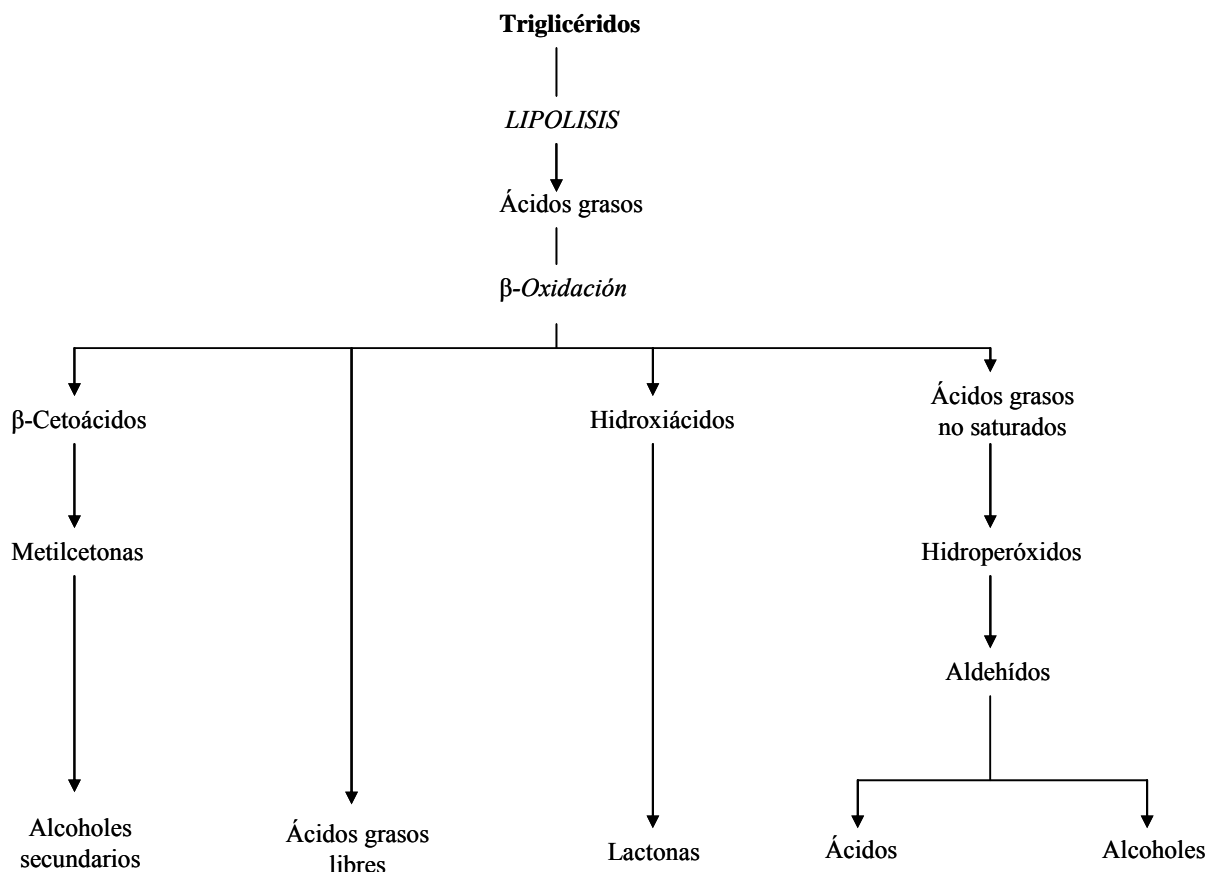


Figura I.5. Formación de componentes del flavor a partir de los lípidos.

La fermentación o glucólisis es otro de los cambios químicos responsables de la maduración de los quesos. Se realiza fundamentalmente por las bacterias lácticas y la principal transformación bioquímica que ocurre durante la misma es la transformación de la lactosa en ácido láctico y la producción de cantidades pequeñas de ácidos, como el acético y propiónico, diacetilo y dióxido de carbono. La glucólisis comienza durante la coagulación y la eliminación de suero, prolongándose hasta la desaparición casi completa de la lactosa.

En los apartados anteriores se han expuesto consideraciones generales acerca de procesos implicados en la maduración de los quesos. Sin embargo, ha de tenerse en cuenta

que existen distintos tipos de maduración, pudiendo distinguirse básicamente el de los quesos duros y el de los blandos. Entre los más habituales, los quesos duros maduran en condiciones que se establecen para evitar el crecimiento superficial de microorganismos y para que disminuya la actividad de los mismos y de las enzimas en el interior, procurándose una maduración lenta y uniforme en toda la masa del queso. Sin embargo, en los quesos blandos se mantienen unas condiciones que favorecen el crecimiento microbiano en su superficie, tanto si se trata de mohos como de bacterias. En estos casos, las enzimas producidas por estos microorganismos se difundirán hacia el interior del queso, progresando la maduración en esta dirección. Puede hacerse referencia a un tipo intermedio, que sería el utilizado en los quesos madurados internamente por mohos, conocidos como quesos azules. Inicialmente, los microorganismos y sus enzimas actúan provocando transformaciones en el interior del queso y posteriormente se favorece la penetración de aire, introduciéndose, de forma natural o mediante inoculación, mohos como *Penicilium roqueforti*, que provocan el aspecto característico de estos quesos, al tiempo que son responsables de su sabor característico.

En cualquier caso, los componentes de los quesos son modificados o degradados a través de la acción de enzimas, ya sean las nativas de la leche, adicionadas o de origen microbiano. Además de por la adición de cuajo u otras enzimas coagulantes, la maduración también puede conseguirse por intervención de bacterias productoras de ácido láctico y de mohos, como en el caso de los quesos azules.

El queso. Aspectos organolépticos

Aparte de las propiedades relacionadas con aspectos nutricionales, el queso posee unas características organolépticas específicas, diferentes entre las distintas variedades, que son esenciales en su consideración de producto comercial, y que están determinadas por la textura, la apariencia y el flavor, aún reconociendo que la textura influye notablemente en la apreciación del conjunto.

Los sentidos del olfato y el gusto son parte de nuestro sistema sensorial químico. Las células sensoriales en nuestra nariz, boca y garganta juegan un papel fundamental a la hora de ayudarnos a interpretar olores y sabores. Las moléculas microscópicas liberadas por las sustancias estimulan dichas células y, una vez que éstas detectan las moléculas, envían mensajes específicos a centros superiores del cerebro, donde se produce la identificación

efectiva del olor o el sabor percibido. Ahora bien, los sentidos del olor y el sabor también están influenciados por otro proceso neurosensorial llamado por algunos “el sentido químico común”, o el sentido “trigeminal” (que podría considerarse como nuestro “tercer sentido químico”), que implica a terminaciones nerviosas en nuestros ojos, nariz, boca y garganta, especialmente en las superficies húmedas. Más allá del olor y el sabor, estas terminaciones nerviosas nos ayudan a percibir las sensaciones de estímulo de ciertas sustancias, como la generación de lágrimas al cortar una cebolla o la sensación refrescante que produce la menta.

El término *flavor*, que se acepta con naturalidad en el ámbito del análisis sensorial, se utiliza para describir la sensación compleja de olor + aroma + sabor + sensaciones trigeminales. Ante la falta de un vocablo equivalente en español, a veces se tiende a traducirlo como *aroma*, si bien algunos autores prefieren emplear el concepto de “conjunto olfato-gustativo” puesto que, de alguna manera, se debe principalmente a un conjunto de sensaciones que se producen en la cavidad bucal y nasal [119].

En general, el *flavor* de un alimento u otro producto es proporcionado por un gran número de compuestos químicos que, en el caso del queso, se forman mayoritariamente durante la maduración. Según hemos comentado anteriormente, atendiendo a su origen, los compuestos del *flavor* se dividen en tres grupos, los derivados de los carbohidratos (lactosa), de las proteínas y de la grasa [113]. A su vez, los compuestos que forman parte de los *flavores* se pueden agrupar en volátiles, generalmente asociados con el olor del queso, y los no-volátiles, que suelen relacionarse con el gusto. De alguna forma, el *aroma* de los quesos se debe encontrar preferentemente en la fracción que reúne los compuestos volátiles presentes en el queso, mientras que el *sabor* lo proporciona aquellos otros que se encuentran en la fase acuosa o que son solubles o semisolubles en disolución acuosa.

Como ya se ha comentado, los principales cambios químicos asociados a la maduración de los quesos son debidos a los procesos de glucólisis, lipólisis y proteólisis [113], que agrupan reacciones primarias de componentes esenciales de la leche, como son la lactosa, las grasas y las proteínas. Durante la maduración se producen, a su vez, transformaciones de los productos originados en estas reacciones que son, en gran parte responsables de los cambios de textura, del *sabor* y *olor* de los quesos. Entre las sustancias químicas formadas se encuentran ácidos grasos, alcoholes, metilcetonas, aldehídos, lactonas y ésteres [4,120], que juegan un papel importante en el contenido global de los constituyentes del *flavor*. Además, la *grasa* juega un papel físico importante en la maduración del queso,

actuando como disolvente del flavor o proporcionando una interfase agua/proteína/grasa que ayuda a que se produzcan las reacciones que dan lugar al flavor [121].

Los ácidos grasos libres presentes en los quesos provienen, por una parte, de la acción de las lipasas sobre los triglicéridos y, por otra, del metabolismo de los carbohidratos y aminoácidos por las bacterias. Los ácidos grasos liberados mediante el proceso lipolítico, que contienen entre 4 y 12 átomos de carbono, poseen aromas específicos (a rancio, a picante, a cabra, a coco) y su intensidad depende de la concentración y distribución entre las fases acuosa y grasa, del pH del medio y de la presencia de otras sustancias, incluidos los productos de degradación de proteínas [122].

En relación con las sustancias que contribuyen al sabor de los quesos, no existe una que de forma específica sea la responsable, como sucede con el diacetilo en el caso de la mantequilla. En el caso de los quesos, se admite que la proteólisis, que ocurre durante la maduración, proporciona péptidos de bajo peso molecular y aminoácidos libres que intervienen en el sabor básico del mismo y son precursores de compuestos volátiles. Sin embargo, el mayor efecto sobre el sabor de los quesos suele estar relacionado con la actividad lipolítica asociada a las cadenas cortas que forman los ácidos libres de la grasa. Los ácidos butírico, caprónico y caprílico otorgan sabores fuertes y característicos al queso. El metabolismo de estos tres ácidos genera compuestos sápidos y volátiles responsables del sabor y aroma, respectivamente [123].

Los productos originados en la proteólisis, al no ser, en general, volátiles, contribuyen a la formación del gusto característico de algunos tipos de queso, pero no poseen influencia en la formación de aromas. Por su parte, la transformación de los lípidos de la leche durante la maduración, es decir, la lipólisis, aporta la mayor contribución, directa o indirectamente, al desarrollo del sabor en quesos fuertes, como en las variedades azules. La lipólisis puede ocurrir cuando la grasa es accesible a las lipasas o estereasas. Los ácidos grasos volátiles son los compuestos que más contribuyen al flavor de algunas variedades, siendo los ácidos grasos de cadena corta los que contribuyen de gran manera a los aromas, mientras que los ácidos grasos de cadena larga contribuyen más al sabor.

El aroma característico de los quesos suele asociarse a los compuestos volátiles que se forman durante las transformaciones que ocurren durante la maduración. En general, se trata de sustancias orgánicas de bajo peso molecular, inferior a 300, y parcialmente liposolubles.

De aquí la importancia de la grasa cuando se trata de explicar el aroma característico de muchos productos, como sucede en el caso del queso. Entre los compuestos volátiles asociados al aroma podemos encontrar distintos aldehídos y cetonas, responsables, a bajas concentraciones, de muchos olores a frutas, aunque en altas concentraciones pueden proporcionar aromas herbáceos, o ser responsables de algunos aromas indeseables, como a rancio. La mayoría de las cetonas tienen umbrales del flavor relativamente altos, siendo algunas de ellas, como las metilcetonas importantes para el flavor de los quesos [3].

A partir de las grasas se producen o liberan ácidos grasos volátiles, que proporcionan diversos aromas típicos de cada queso. De hecho, los ácidos grasos pueden ser los precursores de otros compuestos como ésteres, lactonas, cetonas y aldehídos, tal y como ya se ha comentado. Estos compuestos secundarios, derivados de la grasa, pueden ser muy importantes en el flavor. En algunos casos, como en el de las metilcetonas, entre las que destacan la 2-heptanona, 2-nonanona y 2-butanona, presentes en los quesos de tipo azul, son conocidos los mecanismos de formación y el origen de la actividad enzimática. Los mohos (*Penicillium roqueforti*) son los responsables de la transformación de los ácidos grasos en metilcetonas en este tipo de quesos [4].

En términos generales, los organismos proteolíticos que desdoblan proteínas y otros compuestos nitrogenados, producen olores y sabores de putrefacción y descomposición indeseables en los alimentos cuando rebasan un nivel determinado. También, los organismos lipolíticos que transforman las grasas, fosfolípidos y materiales semejantes producen olores y sabores rancios y a pescado, que no son deseables en la mayoría de los alimentos cuando rebasan un determinado nivel. Los organismos fermentativos transforman gran parte de los carbohidratos y sus derivados en alcoholes, ácidos orgánicos y dióxido de carbono. Estos compuestos, generalmente, añaden sabor a muchos alimentos y no son molestos a los sentidos del hombre.

Ahora bien, los sabores complejos de los diferentes quesos, son el resultado de diversos grados de desdoblamiento de proteínas y grasas, además de la fermentación que produce ácido láctico. Estos sabores equilibrados son deseables en algunos alimentos y se logran mediante la fermentación controlada y el equilibrio de los tipos de microorganismos que crecen en los alimentos.

Compuestos carbonílicos asociados al flavor de los quesos

En atención a lo expuesto en apartados anteriores, los numerosos compuestos asociados al aroma de los quesos son derivados principalmente de las tres mayores rutas metabólicas: metabolismo de la lactosa, metabolismo de los lípidos y metabolismo de las proteínas. Los activadores de estas rutas son las enzimas endógenas de la leche, enzimas coagulantes y enzimas que intervienen en la fabricación y maduración. Las actividades enzimáticas asociadas a la transformación de aminoácidos y ácidos grasos a compuestos de los aromas no se conoce con exactitud, y las rutas metabólicas son hipotéticas. Las moléculas derivadas de estas rutas metabólicas son principalmente los ácidos grasos, cetonas, metilcetonas, alcoholes, lactonas, ésteres, aldehídos, compuestos de azufre, aminas y pirazinas. De acuerdo con la finalidad de la tesis nos referiremos exclusivamente a las cetonas y, en particular, a las metilcetonas, y a los aldehídos.

Los precursores en la formación de las metilcetonas, según se observa en la Figura I.6, son los ácidos grasos [4]. La ruta metabólica basada en la β -oxidación de los mismos, es especialmente eficaz para la obtención de estas cetonas en presencia de determinados tipos de hongos, como *Penicillium camemberti*, *Penicillium roqueforti*, *Geotricum candidum*, situación que se presenta en la maduración de los quesos azules.

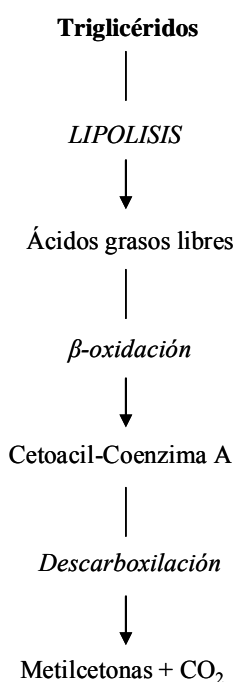


Figura I.6. Ruta para la síntesis de metilcetonas.

Las series homólogas de metilcetonas de cadenas impares, de C₃ a C₁₅, constituyen algunos de los compuestos más importantes en el aroma de los quesos azules y quesos maduros con moho superficial [124-127]. Diversos estudios [124,128-130] han contribuido al esclarecimiento de las rutas de formación de estos productos en los quesos.

Por sus connotaciones olorosas y por las cantidades en las que pueden estar presentes en los quesos, debe reconocerse la importante función de cetonas y metilcetonas en el aroma de los quesos. Estos compuestos volátiles no son solamente típicos de quesos tipo Camembert, sino que también son abundantes en quesos azules en los que la 2-heptanona es el compuesto presente en mayor cantidad [125]. Las metilcetonas también están presentes en quesos curados con superficies mohosas, Cheddar, Gruyere y Cantal [4].

Se ha descrito que las metilcetonas con átomos de carbono comprendidos entre 8 y 13, huelen a fruta, flores o a humedad, mientras que la 2-heptanona presenta el olor de queso azul [131]. Otras cetonas presentan sabores característicos, como la 1-octen-3-ona a champiñón en medio acuoso y metálico en medio lipídico [4]. La acetofenona tiene el olor del naranjo en flor [4], mientras que diacetilo y acetoína son bien conocidos por su olor a despensa [4].

Entre los aldehídos cuya presencia se ha detectado en distintos tipos de quesos, el hexaldehído y el 2-hexenaldehído proporcionan aromas de fruta verde, con umbrales de percepción en agua, de 9.18 y 24.2 ppb, respectivamente [132], mientras que para el octaldehído, nonaldehído, decilaldehído y dodecilaldehído se ha descrito que presentan olor parecido a naranja, con umbrales de percepción inferiores a los anteriores. Por su parte, el benzaldehído presenta un sabor a almendra amarga y un umbral de percepción de 350 ppb [133].

En cualquier caso, como concepto global, puede indicarse que muchos productos son importantes por su contribución al aroma de los quesos, pero se conoce muy poco acerca de la importancia aromática de muchas de las moléculas que están presentes en los mismos, sobre todo de los se encuentran en cantidades traza, por lo que puede afirmarse que no se conocen qué compuestos determinan la calidad organoléptica de los quesos. El aroma de los quesos blandos y de los quesos madurados con hongos es, de hecho, el resultado de un equilibrio sutil y frágil entre todos los componentes volátiles que contienen [4].

Características de los quesos ahumados

El interés por el ahumado de los alimentos ha recobrado un cierto auge, por ser una técnica que proporciona a los mismos determinadas características organolépticas relacionadas con la textura, color, olor y sabor de los mismos. En Canarias, donde el ahumado del queso se hace, al menos parcialmente, de forma artesanal, la utilización de distintas técnicas y materiales para conseguir el humo proporciona diferencias en los quesos, apreciadas por el consumidor y que podrían llegar a constituir signos de distinción de algunas Denominaciones de Origen. En consecuencia, la determinación de ciertos componentes de los quesos ahumados canarios, puede adquirir máxima significación al ser cada vez más frecuente la necesidad de disponer de información relacionada con la calidad e identidad del producto elaborado y comercializado.

En el humo se encuentran un gran número de componentes procedentes de la pirólisis de la celulosa, de la hemicelulosa y de la lignina, con diferentes grupos funcionales, entre los que destacan: cetonas, aldehídos, ácidos, éteres, hidrocarburos, derivados de los hidratos de carbono, derivados nitrogenados, derivados del fenol, guayacol, siringol, y pirocatecol, etc. [134,135]. En general, entre los compuestos químicos presentes en el humo, los derivados carbonílicos y carboxílicos, junto con los derivados de los hidratos de carbono, son los componentes mayoritarios, mientras que los derivados fenólicos se encuentran en pequeñas cantidades. En los procesos de ahumado, los componentes del humo se depositan al azar en la superficie del queso y, si no reaccionan o no interaccionan fuertemente con los componentes del alimento, el queso ahumado contendría los mismos compuestos que se forman durante la pirólisis de los productos utilizados como combustibles y en proporciones similares, aunque las concentraciones pueden ser muy diferentes.

Sin embargo, a pesar de que los derivados carbonílicos, furanos, piranos y derivados de los hidratos de carbono se encuentran en proporciones más altas que los derivados fenólicos en el humo [134,135], los resultados obtenidos en determinaciones que hacen uso de técnicas de espacio en cabeza, muestran que las relaciones entre componentes en el humo y en el queso pueden variar. Es posible que algunos derivados carbonílicos reaccionen con los grupos amino del queso, mediante reacciones similares a las reacciones de Maillard, modificando la textura y el color del queso, o que los derivados carbonílicos se retengan fuertemente por los componentes del queso, con lo cual su incorporación al espacio en cabeza

se encuentra impedida, aunque sea parcialmente y, en consecuencia, puede suceder que no sean detectados.

La deposición y penetración de los componentes del humo hacia el interior de los alimentos ahumados depende de diversos parámetros, entre los que se encuentran la actividad del agua del alimento o su contenido en grasa. Las concentraciones máximas de compuestos carbonílicos se encuentran normalmente en la superficie del alimento, pero la difusión hacia el interior puede tener lugar durante la maduración [136].

Normalmente, las determinaciones analíticas muestran que la región interior del queso es más pobre en compuestos volátiles que la región externa. Solamente aquellos componentes del humo presentes en cantidades importantes, que lleguen a depositarse en la región exterior del queso, como algunas cetonas cíclicas y dicetonas, algunos derivados del furano y del pirano de bajo peso molecular, ciertos derivados del fenol y del guaiacol, así como algunos alquil-aril éteres, difunden a través de la matriz de queso y alcanzan la región interior, aunque en concentraciones muy bajas. Una ligera difusión de los componentes del humo hacia la matriz del queso se puede deber al poco tiempo transcurrido entre el ahumado y el consumo del queso. Es probable que en los quesos ahumados con un largo período de maduración, esta difusión sea mayor.

1.5. GENERALIDADES ACERCA DE LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS

Las muestras de humo y queso que constituyen los materiales en los que hemos centrado nuestra atención, se caracterizan, desde un punto de vista analítico, por poseer una matriz con una composición compleja, incluyendo la presencia de una considerable variedad de aldehídos y cetonas que, además, pueden encontrarse en concentraciones dispares, incluso entre análisis de un mismo tipo de muestra. Ante estas expectativas, una primera decisión acerca de las metodologías analíticas a emplear, apoyada en los antecedentes bibliográficos, ha sido la de utilizar técnicas cromatográficas para la separación y medida de los analitos [137].

Por otra parte, con independencia de la naturaleza de las muestras, existen un conjunto de procesos comunes en las distintas etapas que constituyen las metodologías a utilizar. Así,

por ejemplo, en relación con los analitos, se admite que las características químicas de un número considerable de los mismos, les convierte en poco adecuados para su determinación cromatográfica. En consecuencia, se suele optar por convertir a los distintos aldehídos y cetonas en derivados, tras un proceso de derivatización, con características cromatográficas apropiadas para su separación y cuantificación. Evidentemente, estamos ante un proceso que, en gran medida, es independiente de que los analitos procedan de muestras de humo resultantes de la combustión de restos vegetales o de que tengan su origen en muestras de queso. Así mismo, una vez derivatizados los compuestos carbonílicos a determinar, el tratamiento de los mismos, incluida la etapa de medida, es independiente de la procedencia de los mismos. Sin embargo, otras etapas incluidas en el procedimiento analítico a emplear en cada caso, están condicionadas por la naturaleza de la muestra. Así sucede con la toma de muestra en el caso del humo, o con la extracción de componentes presentes en la fracción grasa de los quesos.

En la tesis, al organizar la información bibliográfica relativa a metodologías analíticas, se ha optado por incluir en cada capítulo los aspectos más directamente relacionados con la temática a tratar en el mismo, mientras que en esta Introducción General, se ha optado por agrupar información que permite adquirir una visión global acerca de los principales problemas asociados a las metodologías analíticas a emplear en la determinaciones analíticas indicadas: derivatización de los compuestos carbonílicos, toma de muestra y técnicas de medida.

Derivatización

Una de las finalidades importantes de las reacciones de derivatización es la de mejorar las propiedades cromatográficas de los analitos. Los compuestos que contienen en su molécula grupos funcionales con hidrógenos ácidos, como $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}$ y $-\text{SH}$, suelen provocar problemas en relación con los procesos de separación y detección al ser analizados por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y, con más frecuencia, mediante cromatografía de gases (GC). Estos grupos tienden a formar enlaces de hidrógeno intermoleculares, que afectan a la volatilidad y estabilidad térmica de los compuestos que los contienen. Además, son capaces de interactuar con sitios activos en el inyector de los cromatógrafos de gases y con las fases estacionarias no completamente desactivadas de las

columnas capilares. Por otra parte, si se producen interacciones fuertes entre los hidrógenos ácidos y los grupos silanol, en la superficie de la columna, se pueden originar efectos de adsorción no lineales, con la consiguiente formación de colas en los picos cromatográficos. Por tal motivo, se han introducido distintas metodologías para convertir grupos funcionales de analitos, como los compuestos carbonílicos, en otros menos interactivos, como bases de Schiff y ésteres. Adicionalmente, el proceso también mejora la estabilidad física, química y térmica de los analitos, aspectos especialmente importantes para su análisis, sobre todo por GC [139,140].

En cromatografía líquida y en cromatografía de gases, la derivatización es utilizada para mejorar las propiedades de detección con respecto a un detector específico. Una adecuada selección del agente derivatizante permite, por ejemplo, la introducción de un cromóforo fluorescente en un analito, permitiendo una detección con alta sensibilidad, mediante cromatografía líquida con detección fluorescente (HPLC-FL). Por otra parte, una sustancia que reaccione selectivamente con un grupo funcional particular, en presencia de otros, puede proporcionar selectividad, al mismo tiempo que mejora la sensibilidad del análisis [138-140].

Al seleccionar los agentes derivatizantes a utilizar, se deben tomar en consideración algunas características como las incluidas a continuación [141]:

- La reacción de derivatización debe poseer un elevado rendimiento y el derivado formado una estabilidad adecuada.
- El producto de reacción formado debe ser compatible con el procedimiento seleccionado, tanto para la separación como para la detección.
- La reacción entre el reactivo derivatizante y los analitos debe ser rápida, no necesitar de complicadas técnicas de laboratorio, ni de reactivos o condiciones experimentales peligrosas.
- En el muestreo en fase gas, si el agente derivatizante se encuentra presente, no debe ser demasiado volátil.
- En el análisis por GC, se aconseja una volatilidad considerable de los derivados formados.

A modo de resumen, a continuación se agrupan las principales ventajas y desventajas de la derivatización de analitos. Entre las ventajas destacan las siguientes:

- Mejora las propiedades de los analitos relacionadas con su detección.
- Mejora la volatilidad (propiedad física), polaridad y/o acidez (propiedad química) y características térmicas de los analitos.
- Mejora la selectividad de las determinaciones.

pudiendo citarse, entre las desventajas:

- Aumento en las etapas del proceso analítico y en los disolventes y reactivos necesarios.
- Potenciales errores asociados a la conversión incompleta de los analitos, a las pérdidas por manipulación de los mismos o a la contaminación por impurezas presentes en los disolventes y reactivos.

Los compuestos carbonílicos y, en especial, los de bajo peso molecular se caracterizan, según se indicó anteriormente, por poseer una elevada volatilidad y ser muy solubles en distintos disolventes, incluida el agua. En consecuencia, se aconseja someterlos a procesos de derivatización, antes de proceder a su determinación mediante metodologías que implican la utilización de separaciones cromatográficas. Entre las técnicas de derivatización más habitualmente utilizadas para la determinación de compuestos carbonílicos, se encuentran su conversión en hidrazonas o en oximas.

Formación de hidrazonas

En diferentes trabajos, el formaldehído es transformado en una hidrazona por reacción con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) en un medio ácido, con lo cual es posible su determinación usando HPLC con detección UV o mediante GC con un detector de captura electrónica (ECD), espectrometría de masas (MS), ionización con llama (FID) o termoiónico (TSD) [142-144]. Cuando se utiliza el análisis por cromatografía de gases, se recomienda eliminar el exceso de DNPH antes de la inyección del extracto, para evitar el deterioro de la columna y detector [144-146], aparte de limpiar con frecuencia el liner [147]. Por otra parte,

el derivado formado es relativamente poco volátil, y requiere de altas temperaturas en el horno. Para reducir los problemas que presenta el uso de la DNPH en GC, se ha utilizado [148] un cartucho con relleno de octadecilsílice impregnado con 2,4,6-triclorofenilhidracina (TCPH), necesitándose temperaturas de 100°C, durante 6 min, para la derivatización. La elución se realiza con acetonitrilo y la determinación mediante GC-ECD.

En general, se considera que la derivatización con DNPH es preferible cuando se utiliza HPLC-UV, al favorecer la sensibilidad y por ser relativamente fácil su utilización desde un punto de vista operativo [145-147]. Esta técnica es empleada en metodologías propuestas por la EPA [2,149-152] y por el Instituto Nacional Americano para la Salud Profesional (NIOSH) [153]. Para mejorar algunos aspectos negativos relacionados con la resolución y detección, se ha introducido un nuevo método de detección que utiliza la espectrometría de masas [154].

Una alternativa a la utilización de DNPH para la derivatización de aldehídos y cetonas en el caso de matrices con cantidades grandes de oxidantes, como pueden ser el ozono y los óxidos de nitrógeno presentes en la atmósfera, es el N-metil-2,4-dinitrofenilhidracina (MDNPH) [155] pues, aunque origina picos cromatográficos debidos a la N-metil-2,4-dinitroanilina, estos pueden separarse fácilmente de las hidrazonas de interés. Sin embargo, la desventaja mayor de este nuevo reactivo derivatizante es, en relación con la DNPH, su reducida reactividad, particularmente frente a las cetonas. Por tal motivo, se ha propuesto la utilización del N-metil-4-hidracino-7-nitrobenzofurano (MNBDH), con lo cual se consiguen, además, derivados con mayor absortividad molar [156] y reacciones de derivatización más rápidas. Otro reactivo, que destaca por los altos rendimientos (superiores al 80%) que se consiguen en la derivatización de compuestos carbonílicos, incluso a concentraciones muy bajas, es el N-metil-4-N',N'-dimetilamino-6-(4'-metoxi-1'-naftil)-1,3,5-triacina-2-hidracina (MDM-NTH) [157].

La derivatización de aldehídos y cetonas, en cartuchos de gel de sílice impregnado con 1-dimetil-aminonaftalina-5-sulfonilhidracina (DNSH), permite utilizar la detección fluorescente. Después de la extracción de las hidrazonas y de ser separadas mediante HPLC-FL, se alcanzan límites de detección en el rango de los picogramos [158].

La posibilidad de detectar aldehídos y cetonas a bajas concentraciones aumenta al formar derivados que contengan en su molécula un grupo pentafluoro [159], y emplear un

detector de captura electrónica. Después de hacer reaccionar los compuestos carbonílicos con *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorofenil)hidracina (PFPH), a temperatura ambiente, se separan los derivados mediante extracción líquido-líquido (LLE) o en fase sólida (SPE). Usando ECD o MS, se alcanzan límites de detección, para algunos aldehídos de 10^{-14} y 10^{-12} mol/mL, respectivamente. Más recientemente, usando el mismo concepto, Martos y Pawliszyn han introducido la utilización de una fibra de microextracción en fase sólida (SPME), para concentrar compuestos carbonílicos usando derivatización “in situ” en una fibra PDMS/DVB impregnada con PFPH, seguida de la desorción en un GC-ECD, con lo cual obtienen un límite de detección de 10 - 90 fmol [160,161].

Formación de oximas

Las oximas obtenidas por derivatización de distintos tipos de compuestos, pueden considerarse ideales para GC, debido a su volatilidad, al tiempo que proporcionan la posibilidad de obtener buenas separaciones. Además, las reacciones mediante las que se obtienen las oximas se producen en condiciones suaves, al contrario de lo que ocurre con algunas hidrazonas [162]. A continuación, se incluyen algunas aminas típicas usadas en reacciones de derivatización de formaldehído y otros compuestos carbonílicos.

La bencilhidroxilamina y la metoxiamina son reactivos que han sido empleados en el análisis de gases procedentes de emisiones de automóviles y de fuentes estacionarias. Sin embargo, no son adecuados para medidas en aire ambiente, pues su reacción con compuestos carbonílicos de bajo peso molecular produce compuestos de elevada volatilidad. En general, con la bencilhidroxilamina los compuestos carbonílicos se recogen en gel de sílice, y después de eluirlos con agua, se derivatizan y se analizan por GC-NPD (detección nitrógeno-fósforo), alcanzándose límites de detección del orden de picogramos [162]. Las *o*-metiloximas pueden proporcionar límites de detección de 40 ppb, para aldehídos en aire. Para la determinación de aldehídos no saturados, particularmente acroleína y crotonaldehído, sus respectivas *o*-metiloximas y benciloximas son bromadas y analizadas posteriormente mediante GC-ECD.

La *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina (PFBHA) es considerada por algunos autores como un reactivo ideal para la determinación de cantidades traza de aldehídos volátiles en muestras de aire [162]. Las oximas formadas en la derivatización con PFBHA son volátiles y estables a altas temperaturas, permitiendo su análisis por GC. Además, todas las

oximas presentan un pico de m/z 181, que permite su fácil reconocimiento con espectrometría de masas [163]. Este reactivo ha sido utilizado para la determinación de aldehídos en muestras líquidas [163-167]. Recientemente, también se ha empleado para determinar aldehídos en emisiones de vegetales y en aire ambiente [168,169]. Martos y Pawliszin [160] han introducido el uso de una fibra PDMS/DVB para la microextracción en fase sólida y derivatización “in situ” de formaldehído. La fibra se introduce en el espacio en cabeza de una disolución de PFBHA y posteriormente se expone a la atmósfera de formaldehído o al espacio en cabeza de una muestra. La fibra es entonces desorbida en el inyector de un cromatógrafo de gases. La técnica permite alcanzar límites de detección tan bajos como 15 ppb, usando GC-FID [160,170].

Muestras de aire

Toma y preparación de la muestra

Ante las dificultades que suelen estar asociadas a la toma de muestra, sobre todo cuando las mismas presentan una composición con un cierto grado de heterogeneidad, una alternativa es disponer de metodologías suficientemente contrastadas, como las que suelen formar parte de algunos métodos oficiales de análisis. No conocemos la existencia de metodologías diseñadas para muestras de humo. Sin embargo, la presencia de distintos compuestos carbonílicos en el aire ambiente, incluido el que respiramos en domicilios y lugares de trabajo, y la considerable toxicidad de algunos de dichos compuestos, ha contribuido, junto con otros muchos factores, a que, en los últimos años, se hayan desarrollado diferentes metodologías analíticas para la toma de muestra y cuantificación de estos compuestos en el aire. En general, estos métodos constan de una etapa de muestreo inicial, en la que se procura preconcentrar los analitos, seguida de la etapa de medida, en la que con frecuencia, la señal que permite su cuantificación corresponde a un compuesto químico obtenido mediante un proceso de derivatización [171].

Diversos métodos EPA [2,149-152] y la Norma UNE 77260-3 [172] se ocupan de la toma de muestra y determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos en muestras de aire de distinto tipo [2,149,151,172] y en emisiones de fuentes estacionarias [152].

En el método EPA TO-05 diseñado para determinaciones de compuestos carbonílicos en aire ambiente, las muestras se hacen pasar a través de borboteadores que contienen una disolución absorbente de 2,4-dinitrofenilhidracina. Sin embargo, el método EPA TO-11 incluye la utilización para la toma de muestra de cartuchos comercialmente preacondicionados con DNPH. Históricamente, han sido ampliamente utilizadas las técnicas de toma de muestra basadas en el uso de borboteadores que contienen disoluciones de DNPH, para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras atmosféricas. Sin embargo, debido a las limitaciones que surgen en la aplicación de las mismas en localizaciones remotas, las metodologías que hacen uso de adsorbentes sólidos han resultado ser una alternativa cada vez más empleada. Se ha ensayado la utilización de un número importante de adsorbentes sólidos como soportes en los que se retiene la DNPH. Entre ellos, los de gel de sílice son los que reúnen mejores características [173].

Metodologías de análisis

En todos los métodos oficiales antes citados, y en otros trabajos [62,69,174], la determinación de aldehídos y cetonas se realiza mediante HPLC. Previamente a la separación cromatográfica, los compuestos carbonílicos se convierten en sus correspondientes hidrazonas, por reacción con 2,4-dinitrofenilhidracina en medio ácido. Para la separación suelen utilizarse una [149,152,172] o dos columnas [2,150] rellenas con fases estacionarias de octadecilsílice y como fase móvil se emplean gradientes de acetonitrilo:agua. Las hidrazonas formadas con la DNPH se determinan por absorción de radiación UV a 360 nm [149].

Entre las desventajas de la separación por HPLC, se ha descrito que la identificación y cuantificación de butiraldehído puede verse dificultada por la coelución con isobutiraldehído y 2-butanona [172]. Por el mismo motivo, la acetofenona puede interferir en la determinación de *p*-tolualdehído. En otro orden de cosas, otros compuestos coloreados que se puedan formar en el proceso de derivatización, y que no tienen que estar relacionados químicamente, pueden originar interferencias, aunque con la detección a 360 nm es posible reducirlas, al menos en parte. Ante estas dificultades, se puede usar GC-MS como técnica confirmatoria. En este caso, los analitos son extraídos desde la disolución acuosa usando un disolvente adecuado, como el tolueno, si bien con esta técnica disminuye la sensibilidad a límites del orden de

1 ppm. La utilización de HPLC acoplada a MS/MS resuelve las dificultades comentadas, alcanzándose límites de detección para el formaldehído de unos 20 µg/L.

Mezclas de las hidrazonas de aldehídos y cetonas presentes en humo de tabaco, obtenidas al derivatizar con DNPH, también se han analizado por GC-MS [175]. Sin embargo, con la utilización de cromatografía de gases y, en especial de GC-MS, se han conseguido mejores resultados utilizando PFBHA para formar las oximas correspondientes a los distintos aldehídos, por reacción a pH 4 en disolución acuosa. El método EPA 556 [176], basado en esta reacción de derivatización utiliza hexano para extraer los derivados que luego se analizan por GC-ECD o GC-MS, consiguiéndose los mejores límites de detección con GC-ECD, del orden de 1 µg/L para algunos compuestos. La PFPH, enlazada en un adsorbente Tenax TA, ha sido descrita como mejor agente derivatizante que la PFBHA [177]. En este caso, los compuestos carbonílicos retenidos en el tubo de muestreo, son desorbidos térmicamente en la columna de un sistema GC-MS. Estudios comparativos, han demostrado que los resultados obtenidos en gases de cocina, con la utilización de los métodos basados en la derivatización con PFPH y con DNPH, no presentan diferencias sistemáticas [178].

En las Tablas I.6 y I.7 se han agrupado algunas de las metodologías desarrolladas propuestas para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de aire.

Tabla I.6. Resumen de algunos métodos de HPLC para determinar compuestos carbonílicos en aire.

Metodología	Derivatizante	Ventajas	Desventajas	Referencias
HPLC-UV	2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH)	Se forman hidrazonas estables de una amplia gama de carbonilos. Procedimiento internacionalmente reconocido, muy fiable y robusto	Interferencias con los oxidantes del aire	49,179
HPLC-MS				
HPLC-UV	Dansil hidracina	Bajos límites de detección	La hidracina y las correspondientes hidrazonas son propensas a la hidrólisis	180
HPLC-FL	2-Difenilacetil-1,3-indandiona-1-hidrazona	Bajos límites de detección	Aplicabilidad limitada para la cuantificación de cetonas	181
HPLC-DAD	N-Metil-2,4-dinitrofenilhidracina (MDNPH) N-metil-4-hidracino-7-nitrobenzofurano (MNBDFH) N-Metil-4-N', N'-dimetilamino-6-(4'-metoxi-1'-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidracina (MDM-NTH)	Produce un producto definido al reaccionar con O ₃ y NO ₂ Absorción ligeramente superior y produce un producto definido al reaccionar con O ₃ y NO ₂ Bajos límites de detección y amplios rendimientos de derivatización	Reactividad reducida comparada con el DNPH	155 156 157
HPLC-APCI-MS	2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH)	Bajos límites de detección		179

^aUV: Detección ultravioleta, MS: Detección con espectrometría de masas, FL: Detección con fluorescencia, DAD: Detección con fotiodos en serie. APCI-MS: Espectroscopia de masas con ionización química a presión atmosférica.

Tabla I.7. Resumen de algunos métodos de GC para determinar compuestos carbonílicos en muestras de aire.

^a Metodología	Derivatizante/Retención	Ventajas	Desventajas	Referencias
GC-FID	2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH)	Se forman hidrazonas estables	Debido a la baja volatilidad de las hidrazonas, se requieren alta temperaturas, grandes tiempos de análisis y la separación de los isómeros sin/anti de las hidrazonas	182 148
GC-ECD	2,4,6-triclorofenilhidracina (TCPH)			
GC-ECD	Pentafluorofenilhidracina (PFPH)	Elevada volatilidad y bajos límites de detección	Velocidad de reacción baja y separación de los isómeros <i>sin</i> y <i>anti</i>	161
GC-MS				
GC-FID				
GC-NPD	Benciloxima	Excelente volatilidad	Posibilidad de descomposición a la temperatura del inyector	183
GC-FID	Preconcentración por adsorción con desorción térmica	Análisis directo sin derivatización, alta sensibilidad y elevada resolución cromatográfica	Elección cuidadosa del adsorbente debido a los problemas de las muestras de aire húmedas	184-186
GC-MS				
GC- PDID				

^aFID: Detección con ionización por llama, ECD: Detección con captura electrónica, MS: Detección con espectrometría de masas, NPD: Detección nitrógeno-fósforo, PDID: Detección por ionización con descarga por pulsos.

La utilización de metodologías no cromatográficas ha sido propuesta para muestras menos complejas que las de humo y queso. Sin duda, las más prometedoras son las que hacen uso de la electroforesis capilar, debido a que pueden proporcionar una buena resolución y elevada sensibilidad, con muestras de pequeño tamaño. Así, la electrocromatografía ofrece las ventajas de la eficacia de la separación por HPLC [187,188] y la cromatografía electrocinética micelar se ha introducido como técnica de separación en combinación con la utilización como agente derivatizante de la 2,4-dinitrofenilhidracina [189].

Recientemente, se han introducido los métodos electroanalíticos [190] y las técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier [191], espectroscopía diferencial de absorción óptica [192] y espectroscopía de diodo-laser ajustable [193]. Aunque la mayoría de estos métodos espectroscópicos directos generalmente permiten el análisis in-situ, no son, a menudo, adecuados para el análisis de diversos compuestos carbonílicos en muestras de aire [171]. De hecho, muchos métodos espectroscópicos, no alcanzan la sensibilidad necesaria para este tipo de muestras [186] y, además, no pueden discriminar de forma eficaz entre los posibles componentes de la fase gas que puedan interferir [171]. Para aplicar técnicas de derivatización que permitan la utilización de estas técnicas analíticas, se requieren cantidades de muestra grandes, con el consiguiente aumento del tiempo de muestreo, para compensar las bajas sensibilidades. De esta manera, la eficiencia del muestro es, con frecuencia, la principal causa de incertidumbre para las determinaciones cuantitativas de compuestos carbonílicos en el aire ambiental [186].

Muestras de queso

En general, la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de queso, suele realizarse con objeto de disponer de información relacionada con sus características organolépticas. En tal sentido, son numerosos los estudios que intentan correlacionar la presencia de aldehídos y cetonas con el grado de maduración del queso, con el origen del mismo, con los procesos de elaboración utilizados, etc. [194-201]. En consecuencia, el interés de las determinaciones no se centra en conocer el contenido total de los aldehídos y cetonas presentes en el queso, sino en determinadas fracciones del mismo, a las que se pueda acceder con cierta facilidad y que sean representativas por la relación de sus componentes con el

flavor del queso. En este sentido, toman significación las determinaciones a efectuar en el extracto graso y, sobre todo, en la fracción volátil del queso.

Como se ha comentado con anterioridad, los componentes del flavor de los quesos son moléculas derivadas de rutas metabólicas, entre las que se encuentran: ácidos grasos, cetonas, metilcetonas, alcoholes, lactonas, ésteres, aldehídos, compuestos de azufre, aminas y pirazinas. Con objeto de obtener el máximo de información, la tendencia en los estudios realizados en relación con el flavor de los quesos, se orientan a la utilización de metodologías analíticas que utilicen sistemas de detección que se caractericen por su universalidad y sin proceder, en la mayoría de los casos, al empleo de procesos de derivatización. En tal sentido, la cromatografía de gases es la técnica habitual para la separación y determinación de los analitos, siendo el detector de espectrometría de masas el que se utiliza actualmente con mayor frecuencia [202-205].

El análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos que proporcionan el aroma a los quesos, requiere de su determinación en la fracción volátil, así como de la extracción desde la fracción no volátil. Por otra parte, la concentración de dichos compuestos suele ser con frecuencia pequeña y la sensibilidad de los detectores analíticos no suele ser suficiente como para detectar concentraciones a niveles inferiores a 10 ppb. Por otra parte, los constituyentes no volátiles mayoritarios de los quesos no son compatibles con el análisis directo por cromatografía de gases. Así, en general, la determinación de los componentes del flavor de los quesos requiere de procesos de extracción y preconcentración [4].

La gran diversidad de propiedades físicas y químicas de los compuestos involucrados en el aroma de los alimentos y las interacciones entre las moléculas aromáticas y la matriz, son las razones por las que no se dispone de un método de extracción ideal. Un gran número de técnicas han sido propuestas [206-208]. La utilización de muchas de estas técnicas se basa en el hecho de que las moléculas aromáticas son más volátiles que otros constituyentes de la matriz (como la grasa, proteínas e hidratos de carbono). Sin embargo, la volatilidad de estos compuestos implica que el agua puede ser también extraída. Entonces, una segunda etapa de extracción líquido-líquido es necesaria para la concentración del extracto. Otras técnicas se basan en las diferencias de las propiedades físicas y químicas entre moléculas, principalmente entre su tamaño y polaridad. La naturaleza lipofílica de los compuestos asociados al aroma es usada habitualmente para aislarlos de la matriz. En este caso, lípidos no polares pueden ser también extraídos.

Como se acaba de indicar, durante mucho tiempo, el análisis de los componentes asociados al flavor de los quesos se ha centrado en la fracción volátil de los mismos. Se han propuesto varias técnicas para la extracción y separación de componentes volátiles procedentes de productos lácteos [209-211]. Estos procedimientos pueden ser divididos en cinco grupos principales:

- Métodos de extracción directa a través de los cuales se obtiene un extracto orgánico, basados en el establecimiento de equilibrios líquido-líquido o líquido-sólido de los analitos, entre la muestra y la fase extractante.
- Métodos de extracción con fluidos supercríticos, con la utilización de CO₂.
- Métodos de destilación con corriente de vapor. Presentan como inconveniente principal el que producen grandes cantidades de extracto acuoso y, en consecuencia, es necesario proceder, en una etapa posterior, a realizar una preconcentración mediante equilibrios líquido-líquido o por crioconcentración.
- Destilación y extracción simultánea (SDE). Es una técnica que ha sido empleada para identificar el flavor del queso por diferentes investigadores [212,213]. Mediante esta técnica, se extrae mayor cantidad de compuestos de alto peso molecular procedentes del queso que con la utilización de técnicas de espacio en cabeza dinámicas, a expensas de perder los compuestos más volátiles.
- Técnicas de espacio en cabeza, estáticas y dinámicas, en las que la muestra a analizar es una alícuota de la fase gas que contiene los componentes volátiles liberados de la muestra del alimento a analizar.

Ante tal diversidad de metodologías, cabe preguntarse ¿qué método de extracción nos permite establecer los componentes más representativos de una mezcla, en atención a su contribución a las propiedades organolépticas del mismo?. Cada técnica de extracción tiene ventajas y desventajas. Los métodos de extracción directa son generalmente muy rápidos, pero limitados a las muestras con bajo contenido en grasa. Esto implica el uso de disolventes orgánicos que, por otra parte, pueden ser tóxicos y, además, facilitar fenómenos de contaminación y/o solapamientos de picos cromatográficos. Los métodos de extracción mediante fluidos supercríticos que usan CO₂, evitan los problemas asociados con el uso de disolventes orgánicos, pero también es una técnica cuya aplicación se encuentra limitada a

muestras con bajo contenido en grasa, debido a la extracción simultánea de mono, -di y -triglicéridos. Las técnicas de destilación por arrastre en corriente de vapor, seguidas por un proceso de extracción y concentración, con el uso de un disolvente orgánico, son usadas ampliamente y, en consecuencia, pueden considerarse como bastante populares. Sin embargo, estas técnicas también producen problemas de recuperaciones bajas de componentes muy volátiles, solapamiento de señales de interés analítico con el pico del disolvente, introducción de contaminación por el disolvente y la posible degradación térmica de compuestos lábiles, si la producción de vapor durante la destilación no se realiza con el empleo de presión reducida. Los métodos de destilación de alto vacío previenen o, al menos, limitan la degradación térmica, pues permiten trabajar a temperatura ambiente o inferiores, pero normalmente requieren de grandes cantidades de muestra y el consumo de una cantidad de tiempo considerable. Por otro lado, las técnicas de espacio en cabeza estático, están limitadas a los compuestos más volátiles. Las técnicas de espacio en cabeza dinámicas hacen posible obtener extractos más concentrados pero, si se usan durante un tiempo corto, tienden, como en las técnicas de espacio en cabeza estáticas, a enriquecerse selectivamente de los componentes más volátiles [214].

Actualmente, entre los métodos más empleados para la determinación de parámetros relacionados con el flavor del queso, se encuentran los que se basan en el uso de técnicas de espacio en cabeza dinámicas [215-217], que facilitan la determinación de un número importante de componentes que poseen una cierta volatilidad, presentes en muestras de distinta naturaleza. En la bibliografía consultada, se han encontrado trabajos que dan cuenta de la presencia, en muestras de producto lácteos, de ácidos con más de ocho átomos de carbono y compuestos neutros con más de doce átomos de carbono, detectados después de su extracción mediante técnicas de espacio en cabeza dinámico. No obstante, en los mismos trabajos se pone de manifiesto que, con estas técnicas, se obtienen bajas recuperaciones para los compuestos más pesados. En consecuencia, las técnicas citadas se consideran poco recomendables para un análisis en cierta profundidad de los compuestos derivados de la grasa. Por su parte, las técnicas de espacio en cabeza en modo estático, permiten una cuantificación más reproducible, pero solamente para un pequeño número de compuestos [204,218].

La microextracción en fase sólida se concibió originalmente como una variante de análisis del espacio en cabeza tradicional en el cual una fase estacionaria se introduce en el espacio en cabeza de la muestra. Después de un tiempo de equilibrio entre los compuestos

volátiles presentes en el espacio en cabeza y la pequeña fracción retenida sobre la superficie sólida de la fibra, los analitos son térmicamente desorbidos mediante su inserción en un puerto de inyección de un cromatógrafo de gases y separados en una columna capilar. En relación con otras técnicas también utilizadas para el análisis de la fracción volátil de los quesos, como las de purga y trampa, el equipo a utilizar en SPME es de un coste muy inferior, las determinaciones son más rápidas y pueden automatizarse.

Los comentarios efectuados se refieren, en general a las determinaciones a realizar en relación con los componentes de los quesos que poseen una cierta volatilidad y que, en consecuencia, puede asociarse a la denominada fracción volátil. Sin embargo, actualmente se admite que una parte importante de los compuestos que contribuyen al flavor del queso se encuentran asociados a la fracción grasa [113]. En consecuencia, la determinación de estos compuestos también puede aportar una información importante al referirnos al flavor de los quesos.

Para las determinaciones de los componentes de los quesos asociadas a su fracción grasa, se han propuesto metodologías basadas en la extracción con disolventes [113,194,219-221]. Las principales desventajas de estas técnicas, relacionadas con la introducción de cantidades importantes de grasa en las etapas de tratamiento de la muestra, se han resuelto, en gran parte, con el empleo de acetonitrilo como agente extractante, que posee, entre otras características positivas, la de presentar escaso poder disolvente frente a los triglicéridos. De esta forma, es posible la obtención de extractos que pueden ser analizados por cromatografía líquida o gaseosa [194], por inyección directa de los mismos, mientras que la matriz insoluble del queso puede ser descartada.

I.2. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Disponible en <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ListagentsCASnos.pdf>.
- [2] Compendium Method TO-11A. Determination of formaldehyde in ambient air using adsorbent cartridge followed by high performance liquid chromatography (HPLC) [Active sampling methodology]. *US Environmental Protection Agency* (1999).
- [3] Fisher C., Scott T.R. Food Flavours, Biology and Chemistry, *RSC, Paperback*, Reino Unido (1997).
- [4] Molimard P., Spinnler H.E. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses origins and properties. *Journal of Dairy Science*, **79**, 169-184 (1996).
- [5] Disponible en <http://es.wikipedia.org/wiki/Wikipedia>.
- [6] Disponible en <http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0128-tr.pdf>.
- [7] Naeher L.P., Brauer M., Lipsett M., Zelikoff J.T., Simpson C.D., Koenig J.Q., Smith K.R. Woodsmoke Health Effects: A Review. *Inhalation Toxicology*, **19**, 67-106 (2007).
- [8] World Health Organization Regional Office for Europe. Air Quality Guidelines for Europe, *WHO Regional Publications, European Series, No. 23*, Copenague (1987).
- [9] Kerns W.D., Pavkov K.L., Donofrio D.J., Gralla E.J., Swenberg J.A. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, **43**, 4382-4392 (1983).
- [10] Hibino M., Matsuda H., Sato T., Ose Y., Nagase H., Kito H. Generation of mutagenicity by ozonation of humic substances components. *Science of the Total Environment*, **116**, 1-13 (1992).
- [11] National Research Council. Committee on Aldehydes, Board of Toxicology and Environmental Hazards. Formaldehyde and Other Aldehydes, *National Academy Press*, Washington (1981).
- [12] Moreno Grau M.D. Toxicología ambiental. Evaluación de riesgo para la salud humana, *Mc Graw Hill, Interamericana de España, S.A.*, Madrid (2003).
- [13] Disponible en <http://www.epa.gov/oecaagct/lcra.html>.
- [14] Baugh J., Ray W., Black F., Snow R. Motor-vehicle emissions under reduced ambient-temperature idle operating-conditions. *Atmospheric Environment*, **21**, 2077-2082 (1987).
- [15] Calvert J.G., Madronich S. Theoretical-study of the initial products of the atmospheric oxidation of hydrocarbons. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, **92**, 2211-2220 (1987).
- [16] Nondek L., Rodler D.R., Birks J.W. Measurement of sub-ppbv concentrations of aldehydes in a forest atmosphere using a new HPLC technique. *Environmental Science and Technology*, **26**, 1174-1178 (1992).
- [17] Shepson P.B., Hastie D.R., Schiff H.I., Polizzi M., Bottenheim J.W., Anlauf K., Mackay G.I., Karecki D.R. Atmospheric concentrations and temporal variations of C-1 C-3 carbonyl-compounds at 2 rural sites in central Ontario. *Atmospheric Environment*, **25**, 2001-2015 (1991).

- [18] Lloyd A.C., Atkinson R., Lurmann F.W., Nitta B. Modeling potential ozone impacts from natural hydrocarbons.1. Development and testing of a chemical mechanism for the nox-air photooxidations of isoprene and alpha-pinene under ambient conditions. *Atmospheric Environment*, **17**, 1931-1950 (1983).
- [19] Grosjean D. Formaldehyde and other carbonyls in Los Angeles ambient air. *Environmental Science and Technology*, **16**, 254-262 (1982).
- [20] Grosjean D., Swanson R.D., Ellis C. Carbonyls in Los Angeles air. Contribution of direct emissions and photochemistry. *Science of the Total Environment*, **29**, 65-85 (1983).
- [21] Kuwata K., Uebori M., Yamasaki H., Kuge Y., Kiso Y. Determination of aliphatic-aldehydes in air by liquid-chromatography. *Analytical Chemistry*, **55**, 2013-2016 (1983).
- [22] Haszpra L., Szilagyi I., Demeter A., Turanyi T., Berces T. Nonmethane hydrocarbon and aldehyde measurements in Budapest, Hungary. *Atmospheric Environment*, **25**, 2103-2110 (1991).
- [23] Schulam P., Newbold R., Hull L.A. Urban and rural ambient air aldehyde levels in Schenectady, New-York and on Whiteface Mountain, New-York. *Atmospheric Environment*, **19**, 623-626 (1985).
- [24] Grosjean E., Grosjean D., Fraser M.P., Cass G.R. Air quality model evaluation data for organics.2. C-1-C-14 carbonyls in Los Angeles air. *Environmental Science and Technology*, **30**, 2687-2703 (1996).
- [25] Zhang J.F., He Q.C., Liou P.J. Characteristics of aldehydes - concentrations, sources, and exposures for indoor and outdoor residential microenvironments. *Environmental Science and Technology*, **28**, 146-152 (1994).
- [26] Komazaki Y., Narita Y., Tanaka S. Development of an automated measurement system using a diffusion scrubber and High-Performance Liquid Chromatography for the monitoring of formaldehyde and acetaldehyde in automotive exhaust gas. *Analyst*, **123**, 2343-2349 (1998).
- [27] Possanzini M., Di Palo V., Cecinato A. Evaluation of lower carbonyls and photochemical oxidants by HPLC-UV and HRGC-MS. *Atmospheric Environment*, **37**, 1309-1316 (2003).
- [28] Jauhiainen J., Martin-Gullon I., Conesa J.A., Font R. Emissions from pyrolysis and combustion of olive oil solid waste. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **74**, 512-517 (2005).
- [29] Kannan G.K., Gupta M., Kapoor J.C. Estimation of gaseous products and particulate matter emission from garden biomass combustion in a simulation fire test chamber. *Atmospheric Environment*, **38**, 6701-6710 (2004).
- [30] Kleeman M.J., Schauer J.J., Cass G.R. Size and composition distribution of fine particulate matter emitted from wood burning, meat charbroiling, and cigarettes. *Environmental Science and Technology*, **33**, 3516-3523 (1999).
- [31] Olsson M., Kjällstrand J., Petersson G. Specific chimney emissions and biofuel characteristics of softwood pellets for residential heating in Sweden. *Biomass and Bioenergy*, **24**, 51-57 (2003).

- [32] Altshuller A.P. Production of aldehydes as primary emissions and secondary atmospheric reactions of alkenes and alkanes during the night and early morning hours. *Atmospheric Environment*, **27**, 21-31 (1993).
- [33] Tanner R.L., Miguel A.H., De Andrade J.B., Gaffney J.S., Streit G.E. Atmospheric chemistry of aldehydes; enhanced peroxyacetyl nitrate formation from ethanol fueled vehicular emissions. *Environmental Science and Technology*, **22**, 1026-1034 (1988).
- [34] Grosjean D. Ambient levels of formaldehyde, acetaldehyde, and formic acid in Southern California: results of a one-year base-line study. *Environmental Science and Technology*, **25**, 710-715 (1991).
- [35] Baird C. Química Ambiental. Editorial Reverté S.A. (2001).
- [36] Satsumabayashi H., Kurita H., Chang Y.S., Carmichael G.R., Ueda H. Photochemical formations of lower aldehydes and lower fatty-acids under long-range transport in central Japan. *Atmospheric Environment*, **29**, 255-266 (1995).
- [37] Grosjean D., Williams E.L., Grosjean E. Peroxyacyl nitrates at southern California mountain forest locations. *Environmental Science and Technology*, **27**, 110-121 (1993).
- [38] Grosjean E., Grosjean D., Fraser M.P., Cass G.R. Air quality model evaluation data for organics.3. Peroxyacetyl nitrate and peroxypropionyl nitrate in Los Angeles air. *Environmental Science and Technology*, **30**, 2704-2714 (1996).
- [39] Carter W.P.L. Computer modeling of environmental chamber measurements of maximum incremental reactivities of volatile organic-compounds. *Atmospheric Environment*, **29**, 2513-2527 (1995).
- [40] Grosjean D., Grosjean E., Gertler A.W. On-road emissions of carbonyls from light-duty and heavy-duty vehicles. *Environmental Science and Technology*, **35**, 45-53 (2001).
- [41] Jang M.S., Kamens R.M. Atmospheric secondary aerosol formation by heterogeneous reactions of aldehydes in the presence of a sulfuric acid aerosol catalyst. *Environmental Science and Technology*, **35**, 4758-4766 (2001).
- [42] Feng Y., Wen S., Wang X., Sheng G., He Q., Tang J., Fu J. Indoor and outdoor carbonyl compounds in the hotel ballrooms in Guangzhou, China. *Atmospheric Environment*, **38**, 103-112 (2004).
- [43] Grosjean E., Williams E.L., Grosjean D. Ambient levels of formaldehyde and acetaldehyde in Atlanta, Georgia. *Journal of Air and Waste Management Association*, **43**, 469-474 (1993).
- [44] California Air Resources Board (CARB). California ambient air quality data 1990-1998. *Planning and Technical Support Division*, Los Angeles, USA (1999).
- [45] Granby K., Christensen C.S. Urban and semi-rural observations of carboxylic acids and carbonyls. *Atmospheric Environment*, **31**, 1403-1415 (1997).
- [46] Ho K.F., Lee S.C., Louie P.K.K., Zou S.C. Seasonal variation of carbonyls compound concentrations in urban area of Hong Kong. *Atmospheric Environment*, **36**, 1259-1265 (2002).
- [47] Viskari E., Vartiainen M., Pasanen P. Seasonal and diurnal variation in formaldehyde and acetaldehyde concentrations along a highway in Eastern Finland. *Atmospheric Environment*, **34**, 917-923 (2000).

- [48] Báez A.P., Belmont R., Padilla H. Measurement of formaldehyde and acetaldehyde in the atmosphere of Mexico City. *Environmental Pollution*, **86**, 166-187 (1995).
- [49] Grosjean D., Grosjean E., Moreira L.F.R. Speciated ambient carbonyls in Rio de Janeiro, Brazil. *Environmental Science and Technology*, **36**, 1389-1395 (2002).
- [50] Possanzini M., Di Palo V., Petricca R., Fratarcangeli R., Brocco D. Measurements of lower carbonyls in Rome ambient air. *Atmospheric Environment*, **30**, 3757-3764 (1996).
- [51] Bakeas E.B., Argyris D.I., Siskos P.A. Carbonyl compounds in the urban environment of Athens, Greece. *Chemosphere*, **52**, 805-813 (2003).
- [52] Grutter M., Flores E., Andraca-Ayala G., Báez A. Formaldehyde levels in downtown Mexico City during 2003. *Atmospheric Environment*, **39**, 1027-1034 (2005).
- [53] Ho K.F., Lee S.C. Identification of atmospheric volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in Hong Kong. *The Science of the Total Environment*, **289**, 145-158 (2002).
- [54] Christensen C.S., Skov H., Nielsen T., Lohse C. Temporal variation of carbonyl compound concentrations at a semi-rural site in Denmark. *Atmospheric Environment*, **34**, 287-296 (2000).
- [55] Pier P.A. Isoprene emission rates from northern red oak using a whole-tree chamber. *Atmospheric Environment*, **29**, 1347-1353 (1995).
- [56] Street R.A., Duckham S.C., Hewitt C.N. Laboratory and field studies of biogenic volatile organic compound emissions from sitka spruce (*Picea sitchensis* Bong) in the United Kingdom. *Journal of Geophysical Research-Atmospheres*, **101**, 22799-22806 (1996).
- [57] Martin R.S., Villanueva I., Zhang J., Popp C.J. Nonmethane hydrocarbon, monocarboxylic acid, and low molecular weight aldehyde and ketone emissions from vegetation in central New Mexico. *Environmental Science and Technology*, **33**, 2186-2192 (1999).
- [58] Kimmerer T.W., Macdonald R.C. Acetaldehyde and ethanol biosynthesis in leaves of plants. *Plant Physiology*, **84**, 1204-1209 (1987).
- [59] Bradow J.M., Connick W.J. Volatile seed-germination inhibitors from plant residues. *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 645-666 (1990).
- [60] Isidorov V.A., Zenkevich I.G., Ioffe B.V. Volatile organic-compounds in the atmosphere of forests. *Atmospheric Environment*, **19**, 1-8 (1985).
- [61] Disponible en: http://www.mma.es/portal/secciones/info_estadistica_ambiental/info_estadisticas_info/memorias/index.htm.
- [62] Oliva-Teles M.T., Paíga P., Delerue-Matos C.M, Alvim-Ferraz M.C.M. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **467**, 97-103 (2002).
- [63] Howard E.M., McCrillis R.C., Krebs K.A., Fortman R., Lao H.C., Guo Z. Indoor emissions from conversion varnishes. *Journal of the Air and Waste Management Association*, **48**, 924-930 (1998).

- [64] Brown S.K. Chamber assessment of formaldehyde and VOC emissions from wood-based panels. *Indoor Air-International Journal of Indoor Air Quality and Climate*, **9**, 209-215 (1999).
- [65] Kelly T.J., Smith D.L., Satola J. Emission rates of formaldehyde from materials and consumer products found in California homes. *Environmental Science and Technology*, **33**, 81-88 (1999).
- [66] Disponible en <http://www.afec.es>.
- [67] Gustafson P., Barregard L., Strandberg B., Sällsten G. The impact of domestic wood burning on personal, indoor and outdoor levels of 1,3-butadiene, benzene, formaldehyde and acetaldehyde. *Journal of Environmental Monitoring*, **9**, 23-32 (2007).
- [68] World Health Organization. Energía doméstica y salud: combustibles para una vida mejor, *WHO Press - Editions de l'OMS - Ediciones de la OMS* (2007).
- [69] Zhang J., Smith K.R. Emissions of carbonyl compounds from various cookstoves in China. *Environmental Science and Technology*, **33**, 2311-2320 (1999).
- [70] Raiyani C.V., Shah S.H., Desai N.M., Venkaiah K., Patel J.S., Parikh D.J., Kashyap S.K. Characterization and problems of indoor pollution due to cooking stove smoke. *Atmospheric Environment*, **27**, 1643-1655 (1993).
- [71] Coultate T.P. Alimentos. Química de sus componentes, *Acribia, S.A. (Ed)*, Zaragoza (1984).
- [72] Ordóñez J.A., Cambero M.A., Fernández L., García M.L., De Fernando G.G., De la Hoz L., Selgas M.D. Tecnología de los alimentos. Alimentos de origen animal. *Síntesis, S.A. (Ed)*, Madrid (1998).
- [73] Clifford M.N., Storey R.M., Ahmad J.I. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, *Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (Eds)*, Academic Press, Vol. 6, San Diego (1993).
- [74] Clifford M.N., Tang S.L., Eyo A.A. Smoking of foods. *Process Biochemistry*, **15**, 8-11 (1980).
- [75] Holtzaple M.T. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, *Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (Eds)*, Academic Press, Vol. 4, Londres, San Diego (1993).
- [76] Fengel D., Wegener G. Wood-chemistry, ultrastructure, reactions, *Walter de Gruyter (Ed)*, Berlín-Nueva York (1984).
- [77] Herbert Morrison W., Akin D.E., Archibald D.D., Dodd R.B, Raymer P.L. Chemical and instrumental characterization of maturing kenaf core and bast. *Industrial Crops and Products*, **10**, 21-34 (1999).
- [78] Sjöström E. Wood pulping. Wood chemistry. Fundamentals and applications, 2nd ed, *Academic Press Inc*, Londres (1993).
- [79] Roberts A.F. A review of kinetics data for the pyrolysis of wood and related substances. *Combustion and Flame*, **14**, 261-272 (1970).
- [80] Skaar C. Wood-water relationships. The Chemistry of Solid Wood, *R. Rowell (Ed)*, American Chemical Society, Washington, DC (1984).

- [81] Demirbas A. Combustion characteristics of different biomass fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, **30**, 219-230 (2004).
- [82] Simoneit B.R.T. Biomass burning - A review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Applied Geochemistry*, **17**, 129-162 (2002).
- [83] Zheng G., Kozinski J.A. Thermal events occurring during the combustion of biomass residue. *Fuel*, **79**, 181-192 (2000).
- [84] Paris O., Zollfrank C., Zickler G.A. Decomposition and carbonisation of wood biopolymers - a microstructural study of softwood pyrolysis. *Carbon*, **43**, 53-66 (2005).
- [85] Galletti G.C., Bocchini P. Pyrolysis gas chromatography/mass spectrometry of lignocellulose. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **9**, 815-826 (1995).
- [86] Simoneit B.R.T., Rogge W.F., Mazurek M.A., Standley L.J., Hildemann L.M., Cass G.R. Lignin Pyrolysis products, lignans, and resin acids as specific tracers of plant classes in emissions from biomass combustion. *Environmental Science and Technology*, **27**, 2533-2541 (1993).
- [87] Sarkanen K.V., Ludwig C.H. Lignins - Occurrence and formation in plants, K.V. Sarkanen and C.H. Ludwig (Ed), J. Wiley and Sons, Nueva York (1971).
- [88] Faix O., Meier D., Fortmann I. Thermal degradation of wood, gas chromatographic separation and mass spectrometric characterization of monomeric lignin derived products. *Holz als Roh- und Werkstoff*, **48**, 281-285 (1990).
- [89] Hawthorne S.B., Miller D.J., Langenfeld J.J., Krieger M.S. PM-10 high volume collection and quantification of semi-nvolatile phenols, methoxylated phenols, alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons from winter urban air and their relationship to wood smoke. *Environmental Science and Technology*, **26**, 2251-2283 (1992).
- [90] Edye L.A., Richards G.N. Analysis of condensates from wood smoke: components derive from polysaccharides and lignins. *Environmental Science and Technology*, **25**, 1133-1137 (1991).
- [91] Hawthorne S.B., Krieger M.S., Miller D.J., Mathiason M.B. Collection and quantitation of methoxylated phenol tracers for atmospheric pollution from residential wood stoves. *Environmental Science and Technology*, **23**, 470-475 (1989).
- [92] Pedersen J.R., Strömberg K., Olsson J.O. Emissions from slow pyrolysis of solid fuels studied by GC/MS in a miniature reactor. *Combustion Science and Technology*, **121**, 271-279 (1996).
- [93] Papavergou E., Herraiz T. Identification and occurrence of 1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxylic acid: the main beta-carboline alkaloid in smoked foods. *Food Research International*, **36**, 843-848 (2003).
- [94] Lien E.J., Ren S.J., Bui H.Y.H., Wang R.B. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 285-294 (1999).
- [95] Dizhbite T., Telysheva G., Jurkane V., Viesturs U. Characterization of the radical scavenging activity of lignins - natural antioxidants. *Bioresource Technology*, **95**, 309-317 (2004).

- [96] Ogata M., Shin-Ya K., Urano S., Endo T. Antioxidant activity of propofol and related monomeric and dimeric compounds. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **53**, 344-346 (2005).
- [97] Lea A., Scotter M.J. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, *Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (Eds), Academic Press, Vol. 2*, San Diego, (1993).
- [98] Choubert G., Blanc J.M., Courvalin C. Muscle carotenoid content and color of farmed rainbow-trout fed astaxanthin or canthaxanthin as affected by cooking and smoke-curing procedures. *International Journal of Food Science and Technology*, **27**, 277-284 (1992).
- [99] Kostyra E., Barylko-Pikielna N. Volatiles composition and flavour profile identity of smoke flavourings. *Food Quality and Preference*, **17**, 85-95 (2006).
- [100] Cardinal M., Cornet J., Serot T., Baron R. Effects of the smoking process on odour characteristics of smoked herring (*Clupea harengus*) and relationships with phenolic compound content. *Food Chemistry*, **96**, 137-146 (2006).
- [101] Disponible en <http://www.gobiernodecanarias.org/agricultura/otros/publicaciones/cuadernos/queso.pdf>.
- [102] Fresno M., Rodríguez A., Alvarez S., Batista P., Pino V., Fernández M., Guillén M.D. Preferencia de los consumidores en relación al color de los quesos palmeros debido al efecto del ahumado. *Industrias Lácteas Españolas*, **304**, 34-38 (2004).
- [103] Fresno M., Fernández M., Alvarez S., Darmanin N., Batista P., Pino V. Caracterización del proceso de ahumado del queso palmero. *Alimentación, Equipos y Tecnología*, **173**, 87-92 (2002).
- [104] Disponible en <http://www.consumer.es/web/es/alimentacion/2005/04/29/141606.php>.
- [105] Fresno M., Rodriguez V., Ruiz M.E., Darmanin N., Alvarez S. Consumer's preference and differentiation in goat cheeses smoked with different products. *Archivos de Zootecnia*, **56**, 713-717 (2007).
- [106] Fresno M., Alvarez S., Rodriguez V., Ruiz M.E. Sensorial texture in Canarian cheeses smoked with different products. *Archivos de Zootecnia*, **56**, 705-711 (2007).
- [107] Fresno M., Rodriguez V., Ruiz M.E., Alvarez S. Comparative study between instrumental and sensory analysis of colour in smoked cheeses. *Archivos de Zootecnia*, **56**, 699-704 (2007).
- [108] Alvarez S., Fresno M., Rodriguez V., Darmanin N., Ruiz M.E. Odour, flavour and taste profile of Canarian cheeses smoked with different materials. *Archivos de Zootecnia*, **56**, 673-680 (2007).
- [109] Otterstätter G. Coloring of Food, Drugs and Cosmetics, *Marcel Dekker Inc.* Nueva York (1999).
- [110] Ahmed J. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, *Macrae R., Robinson R.K., Sadler M.J. (Eds), Academic Press, Vol 6*, San Diego (1993).
- [111] Ruiz M.E. Proyecto Fin de carrera: "Caracterización de la textura y el color de los quesos de cabra canarios ahumados: efecto del material usado para ahumar" *Universidad de La Laguna* (2005).

- [112] Renner E. Nutritional aspects of cheese. Cheese: Chemistry, physics and microbiology. Vol 1: General aspects, *P.F.Fox (Ed) Elsevier Applied Science Publishers*, Londres (1987).
- [113] Alewijn M., Sliwinski E.L., Wouters J.T.M. A fast and simple method for quantitative determination of fat-derived medium and low-volatile compounds in cheese. *International Dairy Journal*, **13**, 733-741 (2003).
- [114] Juárez M., Fontecha J., Alonso L., Castillo I., Blasco L. Normalización y mejora de queso semiduro, tradicional y con reducido contenido en grasa de leche de cabra. *Fundación Alfonso Martín Escudero (Ed)*, Madrid (2001).
- [115] Crow V.L., Coolbear T., Gopal P.K., Martley F.G., McKay L.L., Riepe H. The role of autolysis of lactic acid bacteria in the ripening of cheese. *International Dairy Journal*, **5**, 855-875 (1995).
- [116] Farkye N.Y., Madkor S.A., Atkins H.G. Proteolytic abilities of some lactic-acid bacteria in a model cheese system. *International Dairy Journal*, **5**, 715-725 (1995).
- [117] Marcos A., Mora M.T. Proteolysis in Manchego cheese - evolution of free amino-acids. *Archivos de Zootecnia*, **31**, 115-129 (1982).
- [118] Fox P.F., Guinee T.P. Italian cheeses. En: Cheese, Chemistry, physics and microbiology. Vol 2: Major cheese groups, *P.F.Fox (Ed) Elsevier Applied Science Publishers*, Londres (1987).
- [119] Urbach G. Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal*, **5**, 877-903 (1995).
- [120] Mc Sweeney P.L.H., Sousa M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. *Lait*, **80**, 293-324 (2000).
- [121] Wijesundera C., Drury L. Role of milk fat in production of cheddar cheese flavour using a fat-substituted cheese model. *Australian Journal of Dairy Technology*, **54**, 28-35 (1999).
- [122] Gripon J.C., Monnet V., Lamberet G., Desmazeaud M.J. Microbial enzymes in cheese ripening. En: Food Enzymology. Vol 1, *P.F.Fox (Ed) Elsevier Applied Science Publishers*, Londres (1991).
- [123] Scott, R. Cheesemaking Practice, 2nd ed., *Elsevier Applied Science*, Londres (1986).
- [124] Dartey C.K., Kinsella J.E. Rate of formation of methyl ketones during Blue cheese ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19**, 771-774 (1971).
- [125] Day E.A., Anderson D.F. Cheese flavor - Gas Chromatographic and Mass Spectral identification of natural components of aroma fraction of Blue cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **13**, 2-4 (1965).
- [126] Schwartz D.P., Parks O.W. Methyl ketones in Camembert cheese. *Journal of Dairy Science*, **46**, 1136-1139 (1963).
- [127] Hawke J.C. Reviews of progress of dairy science section D Dairy Chemistry. The formation and metabolism of methyl ketones and related compounds. *Journal of Dairy Research*, **33**, 225-243 (1966).
- [128] Hall G., Andersson J. Volatile fat oxidation-products .1. Determination of odor thresholds and odor intensity functions by dynamic olfactometry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **16**, 354-361 (1983).

- [129] Larroche C., Arpah M., Gros J.B. Methyl-ketone production by Ca-alginate Eudragit RL entrapped spores of penicillium-roqueforti. *Enzyme and Microbial Technology*, **11**, 106-112 (1989).
- [130] Larroche C., Tallu B., Gros J.B. Aroma production by spores of penicillium-roqueforti on a synthetic medium. *Journal of Industrial Microbiology*, **3**, 1-8 (1988).
- [131] Rothe M., Engst W., Erhardt V. Studies on characterization of blue cheese flavor. *Nahrung-Food*, **26**, 591-602 (1982).
- [132] Ahmed E.M., Dennison R.A., Dougherty R.H., Shaw P.E. Flavor and odor thresholds in water of selected orange juice components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **26**, 187-191 (1978).
- [133] Buttery R.G., Turnbaugh J.G., Ling L.C. Contribution of volatiles to rice aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **36**, 1006-1009 (1988).
- [134] Guillén M.D., Ibargoitia M.L. Volatile components of aqueous liquid smokes Vitis vinifera L shoots and Fagus sylvatica L wood. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **72**, 104-110 (1996).
- [135] Guillén M.D., Manzanos M.J. Extractable components of the aerial parts of salvia lavandulifolia and composition of the liquid smoke flavoring obtained from them. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 3016-3027 (1999).
- [136] Guillén M.D., Ibargoitia M.L., Sopelana P., Palencia G., Fresno M.J. Components detected by means of solid-phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry in the headspace of artisan fresh goat cheese smoked by traditional methods. *Journal of Dairy Science*, **87**, 284-299 (2004).
- [137] Dewulf J., Van Langenhove H. Anthropogenic volatile organic compounds in ambient air and natural waters: a review on recent developments of analytical methodology, performance and interpretation of field measurements. *Journal of Chromatography A*, **843**, 163-177 (1999).
- [138] Stashenko E.E., Martinez J.R. Derivatization and solid-phase microextraction. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 553-561 (2004).
- [139] Rosenfeld J.M. Derivatization in the current practice of analytical chemistry. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 785-798 (2003).
- [140] SUPELCO. Guide to Derivatization Reagents for GC. *Bulletin 909A, Sigma-Aldrich Co.* <http://www.sigmaaldrich.com> (1997).
- [141] Vogel M., Büldt A., Karst U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **366**, 781-791 (2000).
- [142] Bolta S.V., Zupancic-Kralj L., Marsel J. Gas chromatographic determination of formaldehyde in air using solid-phase microextraction sampling. *Chromatographia*, **48**, 95-100 (1998).
- [143] Guenier J.P., Simon P., Delcourt J., Didierjean M.F., Lefevre C., Muller J. Air-sampling of aldehydes - application to chromatographic determination of formaldehyde and acetaldehyde. *Chromatographia*, **18**, 137-144 (1984).
- [144] Dalene M., Persson P., Skarping G. Determination of formaldehyde in air by chemisorption on glass filters impregnated with 2,4-dinitrophenylhydrazine using gas-

- chromatography with thermionic specific detection. *Journal of Chromatography*, **626**, 284-288 (1992).
- [145] Otson R., Fellin P. A review of techniques for measurement of airborne aldehydes. *Science of the Total Environment*, **77**, 95-131 (1988).
- [146] Kennedy E.R., Teass A.W., Gagnon Y.T. Industrial-hygiene sampling and analytical methods for formaldehyde - past and present. *Advances in Chemistry Series*, **210**, 3-12 (1985).
- [147] Otson R., Fellin P., Tran Q., Stoyanoff R. Examination of sampling methods for assessment of personal exposures to airborne aldehydes. *Analyst*, **118**, 1253-1259 (1993).
- [148] Lehmpuhl D.W., 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. *Journal of Chromatography A*, **740**, 71-81 (1996).
- [149] Compendium Method TO-5. Determination of aldehydes and ketones in ambient air using high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environmental Protection Agency* (1999).
- [150] Method 0100. Sampling for formaldehyde and other carbonyl compounds in indoor air. *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [151] Method 8315A. Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [152] Method 0011. Sampling for selected aldehyde and ketone emissions from stationary sources. *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [153] NIOSH. Manual of analytical methods. Method 2016, Formaldehyde. Disponible en <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/2016.pdf> (1998).
- [154] Grosjean E., Green P.G., 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. *Analytical Chemistry*, **71**, 1851-1861 (1999).
- [155] Büldt A., Karst U. 1-Methyl-1-(2,4-dinitrophenyl)hydrazine as a new reagent for the HPLC determination of aldehydes. *Analytical Chemistry*, **69**, 3617-3622 (1997).
- [156] Büldt A., Karst U. N-Methyl-4-hydrazino-7-nitrobenzofurazan as a new reagent for air monitoring of aldehydes and ketones. *Analytical Chemistry*, **71**, 1893-1898 (1999).
- [157] Kempter C., Berkhoudt T.W., Greve Tolbøl C., Egmosse K.N., Karst U. Air monitoring of aldehydes by use of hydrazine reagents with a triazine backbone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **372**, 639-643 (2002).
- [158] Schmied W., Przewosnik M., Bachmann K. Determination of traces of aldehydes and ketones in the troposphere via solid-phase derivatization with DNSH. *Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie*, **335**, 464-468 (1989).
- [159] Stashenko E.E., Ferreira M.C., Sequeda L.G., Martinez J.R., Wong J.W. Comparison of extraction methods and detection systems in the gas chromatographic analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A*, **779**, 360-369 (1997).

- [160] Martos P.A., Pawliszyn J. Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Analytical Chemistry*, **70**, 2311-2320 (1998).
- [161] Stashenko E.E., Puertas M.A., Salgar W., Delgado W., Martinez J.R. Solid-phase microextraction with on-fibre derivatisation applied to the analysis of volatile carbonyl compounds. *Journal of Chromatography A*, **886**, 175-182 (2000).
- [162] Nishikawa H., Sakai T. Derivatization and chromatographic determination of aldehydes in gaseous and air samples. *Journal of Chromatography A*, **710**, 159-165 (1995).
- [163] Cancilla D.A., Chou C.C., Barthel R., Hee S.S.Q. Characterization of the o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylamine hydrochloride (PFBOA) derivatives of some aliphatic monoaldehydes and dialdehydes and quantitative water analysis of these aldehydes. *Journal of AOAC International*, **75**, 842-854 (1992).
- [164] Nawrocki J., Kalkowska I., Dabrowska A. Optimization of solid-phase extraction method for analysis of low-ppb amounts of aldehydes-ozonation by-products. *Journal of Chromatography A*, **749**, 157-163 (1996).
- [165] Ojala M., Kotiaho T., Siirila J., Sihvonen M.L. Analysis of aldehydes and ketones from beer as o-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine derivatives. *Talanta*, **41**, 1297-1309 (1994).
- [166] Vidal J.P., Estreguil S., Cantagrel R. Quantitative-analysis of cognac carbonyl-compounds at the ppb level by GC-MS of their o-(pentafluorobenzyl amine) derivatives. *Chromatographia*, **36**, 183-186 (1993).
- [167] Strassnig S., Wenzl T., Lankmayr E.P. Microwave-assisted derivatization of volatile carbonyl compounds with O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine. *Journal of Chromatography A*, **891**, 267-273 (2000).
- [168] Wu L.J., Hee S.S.Q. A solid sorbent personal air sampling method for aldehydes. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **56**, 362-367 (1995).
- [169] Lahaniati M., Calogirou A., Duane M., Larsen B., Kotzias D. Identification of biogenic carbonyls in air with O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)hydroxylamine hydrochloride (PFBHA) coated C-18-silica gel cartridges. *Fresenius Environmental Bulletin*, **7**, 302-307 (1998).
- [170] Martos P.A., Pawliszyn J. Time-weighted average sampling with solid-phase microextraction devise: Implications for enhanced personal exposure monitoring to airborne pollutants. *Analytical Chemistry*, **71**, 1513-1520 (1999).
- [171] Vogel M. Sampling of airborne pollutants: strategies and developments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **381**, 84-86 (2005).
- [172] UNE-77260-3:2004. "Aire de interiores. Parte 3: Determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos. Método de muestreo activo". *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid (2004).
- [173] Tejada S.B. Evaluation of silica gel cartridges coated in situ with acidified 2,4-dinitrophenylhydrazine for sampling aldehydes and ketones in air. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **26**, 167-185 (1986).
- [174] Hedberg E., Kristensson A., Ohlsson M., Johansson C., Johansson P.A., Swietlicki E., Vesely V., Wideqvist U., Westerholm R. Chemical and physical characterization of

- emissions from birch wood combustion in a wood stove. *Atmospheric Environment*, **36**, 4823-4837 (2002).
- [175] Dong J.Z., Moldoveanu S.C. Gas chromatography–mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, **1027**, 25-35 (2004).
- [176] Method 556. Determination of carbonyl compounds in drinking water by pentafluorobenzylhydroxylamine derivatization and capillary gas chromatography with electron capture detection. *US Environmental Protection Agency* (1998).
- [177] Ho S.S.H., Yu J.Z., Chu K.W. Carbonyl emissions from commercial cooking sources in Hong Kong. *Journal of the Air and Waste Management Association*, **56**, 1091-1098 (2006).
- [178] Ho S.S.H., Yu J.Z. Determination of airborne carbonyls: Comparison of a thermal desorption/GC method with the standard DNPH/HPLC method. *Environmental Science and Technology*, **38**, 862-870 (2004).
- [179] Zurek G., Karst U., Luftmann H. HPLC-APCI-MS with calibration based on stable isotope-labeled internal standards for the quantification of carbonyls in air samples. *Analyst*, **124**, 1291-1295 (1999).
- [180] Bächmann K., Haag I., Han K.Y., Schmitzer R.Q. Determination of carbonyl compounds in the low ppb-range by capillary electrophoresis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **346**, 786-788 (1993).
- [181] Possanzini M., Di Palo V. Determination of formaldehyde and acetaldehyde in air by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia*, **46**, 235-240 (1997).
- [182] Görgenyi M., Van Langenhove H., Király Z. Prediction of gas chromatographic retention indices of 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Journal of Chromatography A*, **693**, 181-185 (1995).
- [183] Magin D.F. Gas chromatography of simple monocarbonyls in cigarette whole smoke as the benzyloxime derivatives. *Journal of Chromatography A*, **202**, 255-261 (1980).
- [184] Knobloch Th., Asperger A., Engewald W. Volatile organic compounds in urban atmospheres: Long-term measurements of ambient air concentrations in differently loaded regions of Leipzig. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **359**, 189-197 (1997).
- [185] Hallama R.A., Rosenberg E., Grasserbauer M. Development and application of a thermal desorption method for the analysis of polar volatile organic compounds in workplace air. *Journal of Chromatography A*, **809**, 47-63 (1998).
- [186] Hunter M.C., Bartle K.D., Seakins P.W., Lewis A.C. Direct measurement of atmospheric formaldehyde using gas chromatography-pulsed discharge ionisation detection. *Analytical Communications*, **36**, 101-104 (1999).
- [187] Fung Y.S., Long Y. Determination of carbonyl compounds in air by electrochromatography. *Electrophoresis*, **22**, 2270-2277 (2001).
- [188] Dabek-Zlotorzynska E., Lai E.P.C. Separation of carbonyl 2,4-dinitrophenylhydrazones by capillary electrochromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, **853**, 487-496 (1999).

- [189] Zhao S.L., Dai T.Y., Liu Z., Wei F.S., Zou H.F., Xu X.B. Determination of lower aliphatic carbonyl compounds in stack gas as their 2,4-dinitrophenylhydrazones by micellar electrokinetic chromatography. *Chemosphere*, **34**, 2131-2136 (1997).
- [190] Chang W.H., Xie T.Y. Determination of sub-ppbv levels of formaldehyde in ambient air using Girard's reagent T-coated glass fiber filters and adsorption voltammetry. *Analytica Chimica Acta*, **349**, 349-357 (1997).
- [191] Notholt J., Toon G., Stordal F., Solberg S., Schmidbauer N., Becker E., Meier A., Sen B. Seasonal variations of atmospheric trace gases in the high Arctic at 79°N. *Journal of Geophysical Research*, **102**, 12855-12861 (1997).
- [192] Harder J.W., Jakoubek R.O., Mount G.H. Measurement of tropospheric trace gases by long-path differential absorption spectroscopy during the 1993 OH Photochemistry Experiment. *Journal of Geophysical Research*, **102**, 6215-6226 (1997).
- [193] Mackay G.I., Karecki D.R., Schiff H.I. Tunable diode laser absorption measurements of H₂O₂ and HCHO during the Mauna Loa Observatory Photochemistry Experiment. *Journal of Geophysical Research*, **101**, 14721-14728 (1996).
- [194] Alewijn M., Sliwinski E.L., Wouters J.T.M. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal*, **15**, 733-740 (2005).
- [195] Barron L.J.R., Redondo Y., Flanagan C.E., Pérez-Elortondo F.J, Albisu M., Nájera A.I., Renobales M., Fernández-García E. Comparison of the volatile composition and sensory characteristics of Spanish PDO cheeses manufactured from ewes' raw milk and animal rennet. *International Dairy Journal*, **15**, 371-382 (2005).
- [196] Fernández-García E., Carbonell M., Gaya P., Núñez M. Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 701-711 (2004).
- [197] Fernández-García E., Gaya P., Medina M., Nuñez M. Evolution of the volatile components of rawewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 39-46 (2004).
- [198] Carbonell M., Núñez M., Fernández-García E. Evolution of the volatile components of ewe raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Lait*, **82**, 683-698 (2002).
- [199] Carbonell M., Núñez M., Fernández-García E. Seasonal variation of volatile compounds in ewe raw milk La Serena cheese. *Lait*, **82**, 699-711 (2002).
- [200] Fernández-García E., Carbonell M., Núñez M. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese. 1. Comparison of raw and pasteurized milk cheese. *Journal of Dairy Research*, **69**, 579-593 (2002).
- [201] Gómez-Ruiz J.A., Ballesteros C., González Viñas M.A., Cabezas L., Martínez-Castro I. Relationships between volatile compounds and odour in Manchego cheese: comparison between artisanal and industrial cheeses at different ripening times. *Lait*, **82**, 613-628 (2002).
- [202] Moon S.Y., Cliff M.A., Li-Chan E.C.Y. Odour-active components of simulated beef flavour analysed by solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry and -olfactometry. *Food Research International*, **39**, 294-308 (2006).

- [203] Chiofalo B., Zumbo A., Costa R., Liotta L., Mondello L., Dugo P., Chiofalo V. Characterization of Maltese goat milk cheese flavour using SPME-GC/MS. *South African Journal of Animal Science*, **34**, 176-180 (2004).
- [204] Pérès C., Begnaud F., Berdagué J.L. Fast characterization of Camembert cheeses by static headspace–mass spectrometry. *Sensors and Actuators B*, **87**, 491-497 (2002).
- [205] Frank D.C., Owen C.M., Patterson J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **37**, 139-154 (2004).
- [206] Adda J., Eriksson P.J. Study of flavors - physicochemical and sensory methods. *Cahiers de Nutrition et de Dietetique*, **14**, 115-129 (1979).
- [207] Molimard P., Spinnler H.E. Dialysis of flavor compounds - yields of extraction on model solution. *Zeitschrift fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung*, **197**, 419-423 (1993).
- [208] Weurman C. Isolation and concentration of volatiles in food odor research. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **17**, 370-384 (1969).
- [209] Mariaca R., Bosset J.O. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait*, **77**, 13-40 (1997).
- [210] Bosset J.O., Gauch R. Comparison of the volatile flavour compounds of six European “AOC” cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *International Dairy Journal*, **3**, 359-377 (1993).
- [211] Deibler K.D., Acree T.E., Lavin, E.H. Gas chromatography-olfactometry (GC/O) of vapor phases. In R. Teranishi, E. L. Wick, & I. Hornstein (Eds.), *Flavor Chemistry: 30 years of progress*, New York (1999).
- [212] Dirinck P., De Winne A. Flavour characterisation and classification of cheeses by gas chromatographic–mass spectrometric profiling. *Journal of Chromatography A*, **847**, 203-208 (1999).
- [213] Barbieri G., Bolzoni L., Careri M., Mangia J.A., Parolari G., Spagnoli S., Virgili R. Study of the volatile fraction of parmesan cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**, 1170-1176 (1994).
- [214] Curioni P.M.G., Bosset J.O. Review: Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, **12**, 959-984 (2002).
- [215] Valero E., Villaseñor M.J., Sanz J., Martínez Castro I. Comparison of two methods based on dynamic head-space for GC-MS analysis of volatile components of cheeses. *Chromatographia*, **52**, 340-344 (2000).
- [216] Gogus F., Ozel M.Z., Lewis A.C. Analysis of the volatile components of Cheddar cheese by direct thermal desorption- GCxGC-TOF/MS. *Journal of Separation Science*, **29**, 1217-1222 (2006).
- [217] Mallia S., Fernández-García E., Bosset J.O. Comparison of purge and trap and solid phase microextraction techniques for studying the volatile aroma compounds of three European PDO hard cheeses. *International Dairy Journal*, **15**, 741-758 (2005).

- [218] Milo C., Reineccius G.A. Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **45**, 3590-3594 (1997).
- [219] Engels W.J.M., Dekker R., Jong C., Neeter R., Visser S. A comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, **7**, 255-263 (1997).
- [220] García Falcón S., González Amigo S., Lage Yusty M.A., López de Alda Villaizán M.J., Simal Lozano J. Determination of Benzo[a]pyrene in smoking-flavour agents (water-soluble liquid smoke) by second derivative constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry. *Talanta*, **43**, 659-664 (1996).
- [221] Molina E., Martínez-Castro I., Ramos M., Amigo L. Taborda G. Composition of the water-soluble fraction of different cheeses. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **51**, 270-276 (2003).



Capítulo II

*Comparación de metodologías para la determinación
de compuestos carbonílicos por HPLC y GC*

II.1. INTRODUCCIÓN

II.1.1. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS

Como se ha expuesto en la Introducción General de la tesis, el objetivo central de la misma se orienta a la caracterización química de muestras de humo, procedentes de la combustión de restos vegetales, en relación con la potencial incidencia del mismo en las propiedades del queso ahumado.

Aldehídos y cetonas de distinta naturaleza destacan entre los componentes del humo con especial incidencia en los productos ahumados, por sus propiedades antimicrobianas, por su relativa toxicidad y por contribuir a las características organolépticas de los mismos [1]. Por otra parte, compuestos pertenecientes a dichas familias se producen en el queso a través de los procesos que ocurren en su maduración [1]. Por consiguiente, es de esperar, desde un punto de vista analítico, que se planteen problemas asociados con la toma y tratamiento de muestras tan diferentes como el humo y el queso. Ahora bien, la etapa de medida, una vez que los analitos se encuentren en disolución o que se encuentren retenidos en un determinado tipo de soporte, puede ser independiente de la naturaleza física original de las muestras.

No hemos encontrado trabajos en los que se aborde la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de humo. Sin embargo, en los últimos años se han propuesto diferentes métodos analíticos para la cuantificación de compuestos carbonílicos, presentes a niveles traza, en aire ambiente [2]. Normalmente, estos métodos constan de una etapa inicial de toma de muestra, en la que se produce una preconcentración de los analitos y que suele implicar la utilización de un medio de muestreo adecuado generalmente combinado con una reacción de derivatización [3].

En cuanto a la medida de los analitos, es habitual que para compuestos orgánicos volátiles en el medio ambiente, y sobre todo en la atmósfera [4], se recurra a la utilización de métodos cromatográficos.

Determinación de compuestos carbonílicos mediante HPLC

Los métodos más comunes de análisis de compuestos carbonílicos en aire hacen uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución [2]. En general, antes de la etapa de medida, para la toma de muestra de los aldehídos y cetonas presentes en el aire, se suele recurrir a la utilización de cartuchos que contienen adsorbentes sólidos impregnados con un reactivo derivatizante, o de borboteadores que contienen una disolución de un reactivo capaz de retener y reaccionar con los analitos para convertirlos en productos capaces de proporcionar señales analíticas apropiadas. En ambos casos, se controla el flujo de aire y el tiempo de muestreo, o se mide el volumen total de muestra. El extracto obtenido del cartucho o de la disolución absorbente es sometido a la correspondiente separación cromatográfica.

En cuanto a los agentes derivatizantes empleados, las hidracinas aromáticas son los más populares para el análisis de los compuestos carbonílicos, porque reaccionan de forma generalizada con este tipo de compuestos para formar las respectivas hidrazonas en presencia de catalizadores ácidos, generalmente ácidos inorgánicos fuertes tales como HCl, H₂SO₄, o HClO₄ [5]. Las hidracinas nitroaromáticas son consideradas como los agentes derivatizantes más importantes, siendo las nitrofenilhidracinas los compuestos más representativos de esta familia. Entre estos compuestos, la 2,4-dinitrofenilhidracina se ha convertido en el derivatizante más extendido, debido a su elevada velocidad de reacción.

Existen varios factores que influyen en las reacciones de derivatización de los compuestos carbonílicos con DNPH, siendo los más significativos el pH de la reacción, la concentración del reactivo y la temperatura [6]. Además, en ausencia de un disolvente orgánico en la disolución acidificada de DNPH, cabe esperar una recuperación cuantitativa para el formaldehído pero no para el resto de los compuestos carbonílicos [7].

En otro orden de cosas, la toma de muestra puede provocar la presencia de interferencias, siendo especialmente importantes las ocasionadas por la presencia de oxidantes comunes en la atmósfera, como el O₃ y el NO₂. Estas sustancias pueden causar descomposición oxidativa del reactivo, y las hidrazonas podrían recuperarse como diferentes subproductos, que pueden coeluir e interferir con el análisis por HPLC durante la separación cromatográfica. Las DNPH-hidrazonas de los compuestos carbonílicos son detectadas a una longitud de onda alrededor de 360 nm con la utilización de un detector de radiación ultravioleta. Sin embargo, debido a las diferencias espectrales significativas entre los distintos

grupos de analitos, se recomienda el uso de un detector de doble longitud de onda o un detector de diodos en fila para extender el rango de los analitos estudiados [6].

La humedad puede ser un problema importante para la determinación de los compuestos carbonílicos mediante HPLC [8]. Las hidrazonas de los aldehídos alifáticos saturados y de los aldehídos aromáticos no se ven afectadas por el agua. Sin embargo, la hidrazona de la acetona se hidroliza fuertemente en presencia de más de un 10% de agua. Como consecuencia, se han encontrado reducciones en el área de pico de esta cetona, durante muestreos de campo en ausencia de trampas de agua [9]. En el caso de la acroleína, la señal cromatográfica se presenta como dos picos, probablemente debido a la formación de dos conformeros [8]. Ahora bien, aunque la relación de áreas de los picos parece que se ve afectada por la humedad, la suma de sus áreas no se ve alterada. En la técnica que hace uso de los cartuchos, la presencia de agua, en un medio ácido, puede provocar que las DNPH-hidrazonas de la acetona y de la 2-butanona se transformen en la DNPH y en sus respectivas cetonas libres [10].

En general, las separaciones mediante HPLC utilizan fases móviles constituidas por gradientes binarios de acetonitrilo y agua, y fases estacionarias de C-18 [11-15]. Sin embargo, existen múltiples excepciones establecidas, en la mayoría de los casos, para resolver mezclas, como las correspondientes a las hidrazonas que forman la acetona y la acroleína o las de la 2-butanona y butiraldehído. Con tal finalidad se han utilizado fases estacionarias específicas y fases móviles ternarias, en las que a la mezcla acetonitrilo/agua suele incorporarse tetrahidrofurano [16-19].

Determinación de compuestos carbonílicos mediante GC

Durante los últimos años se han llevado a cabo grandes esfuerzos para determinar los compuestos carbonílicos con la utilización de la Cromatografía de Gases, con o sin la inclusión de una etapa de derivatización [2]. En general, las sensibilidades obtenidas en la determinación directa de aldehídos y cetonas, suelen ser pequeñas. En consecuencia, el análisis por GC para COVs, incluyendo los compuestos carbonílicos a nivel de traza, requiere habitualmente de un paso de preconcentración para poder detectarlos en las muestras medioambientales. Una técnica ampliamente conocida para la preconcentración es la que implica la retención de los analitos sobre adsorbentes sólidos, para luego ser sometidos en el

cromatógrafo a su desorción térmica [20].

La elección del material adsorbente depende de la volatilidad (presión de vapor) del analito estudiado. Actualmente existen numerosos materiales adsorbentes disponibles comercialmente para las técnicas de muestreo que impliquen compuestos orgánicos traza. La preconcentración de compuestos carbonílicos a través de una extracción por adsorción puede lograrse tanto mediante muestreos pasivos como con muestreos activos. La construcción de tubos de adsorción múltiples empaquetados con diferentes adsorbentes, con objeto de aumentar la capacidad de dichos adsorbentes, puede ampliar el rango de volatilidad y de polaridad de los analitos [3,21]. En los últimos años, se ha incrementado notablemente la lista de adsorbentes disponible para diferentes determinaciones [22-24]. La aplicación de esta técnica es aconsejable en el análisis de muestras de aire urbano, en el que el muestreo de múltiples analitos es difícil, o incluso imposible, mediante un sólo adsorbente. Con carácter general, en las técnicas de adsorción con diferentes adsorbentes, los solutos de baja volatilidad pueden retenerse en un determinado adsorbente, mientras otros más volátiles lo atravesarían para quedar retenidos en otro adsorbente de características diferentes [25].

Para analizar los compuestos carbonílicos en el aire ambiente, normalmente se usa un cromatógrafo de gases con un detector de ionización de llama equipado con un sistema de desorción térmica [26,27]. Sin embargo, el uso de una columna de GC específica con un solo detector no selectivo puede causar identificaciones incorrectas de estos compuestos, por lo que es adecuado la combinación de la información obtenida mediante la espectrometría de masas y la de los detectores rutinarios: ionización de llama, captura electrónica, nitrógeno-fósforo con diferentes columnas de GC para asegurar la adecuada identificación de los picos.

Formación de isómeros

El análisis mediante técnicas cromatográficas de los derivados formados mediante procesos de derivatización puede estar afectado por la formación de mezclas de isómeros *sin* y *anti*, que pueden causar dificultades en la identificación y cuantificación de los analitos. La formación de isómeros *sin* y *anti* de las 2,4-dinitrofenilhidrazonas procedentes de los compuestos carbonílicos no simétricos, se ha encontrado frecuentemente cuando se emplea la cromatografía de gases [28,29]. Sin embargo, la isomerización también se ha observado en el análisis por cromatografía líquida de alta resolución [30,31].

Los derivados de los aldehídos de cadena corta, con un número de átomos de carbono entre 2 y 10, contienen solamente el isómero *anti*. Sin embargo, este isómero *anti* puede convertirse parcialmente en un isómero *sin* por radiación UV o por adición de una disolución ácida. El espectro UV del isómero *sin* es diferente al del isómero *anti*, y normalmente las longitudes de onda de absorción máxima son menores para el isómero *sin* entre 5 y 8 nm [32].

Como quiera que, para el análisis cuantitativo de los compuestos carbonílicos en aire usando DNPH, la reacción de derivatización tiene lugar en presencia de un ácido como catalizador, la disolución preparada para el análisis mediante HPLC o GC contiene tanto el isómero *sin* como el isómero *anti*. La suma de las áreas de los picos de ambos isómeros, para su cuantificación, sólo es posible cuando la relación de isómeros es constante [32].

Otros autores señalan, además, que la cuantificación debería realizarse a la longitud de onda de los isómeros *anti*, porque los pequeños picos de los isómeros *sin* pueden solapar con otros picos [33].

Selección de metodologías

En general, las metodologías oficiales, propuestas por organismos como la “Environmental Protection Agency”, utilizan HPLC como técnica para la separación y cuantificación de aldehídos y cetonas en aire [34-38]. Sin embargo, como más adelante tendremos ocasión de comentar, las metodologías que utilizan esta técnica presentan inconvenientes en cuanto a la resolución de algunas mezclas, como sucede con especies que coeluyen o presentan picos con grados de solapamiento considerables, como la 2-butanona y butiraldehído o la acroleína, acetona y propionaldehído.

Como alternativa a la HPLC, las mejores metodologías son las basadas en la GC [39]. En primer lugar, la resolución en GC para compuestos diferentes, con similares propiedades químicas, es superior a la HPLC, con lo cual se puede alcanzar una identificación y cuantificación más exacta de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de aire. En segundo lugar, la temperatura programada en GC es generalmente más eficaz y más rápida que el gradiente de elución empleado en HPLC, con lo que se facilita la rapidez del análisis al ser menores los tiempos de equilibrio.

El desarrollo de diferentes técnicas de detección en GC (FID, ECD, PDID) junto con la introducción de MS, ha demostrado ser una herramienta importante para separar y cuantificar COVs a niveles de concentración que suelen ser habituales en muestras medioambientales [4]. Sin embargo, como hemos dicho, las sensibilidades de estas técnicas son escasas y, por ello, se ha recurrido a la conversión de los aldehídos y cetonas en derivados apropiados para la GC. En tal sentido, el empleo de las hidrazonas, como los derivados obtenidos con la DNPH, para la separación en GC no es lo satisfactoria que resulta en HPLC por la baja volatilidad de los derivados y porque a altas temperaturas algunas hidrazonas pueden descomponerse [6,39,40]. Sin embargo, los derivados obtenidos por reacción entre los compuestos carbonílicos y las benciloximas o las pentafluorofenilhidracinas muestran mejores características para la cuantificación de dichos analitos en muestras de aire por GC, al poseer una volatilidad considerablemente mayor que las correspondientes a los derivados de la DNPH [41]. Basados en la utilización de reactivos derivatizantes como los citados, se han desarrollado varios métodos de GC apropiados para el análisis a nivel de trazas de compuestos carbonílicos y, asociados a los mismos, ha ido ganando terreno el uso de adsorbentes con desorción térmica. Sin embargo, algunos autores han propuesto la utilización de metodologías basadas en la GC, sin necesidad de la etapa de derivatización de los analitos, como las que utilizan detección por ionización con descarga por pulsos [42].

A pesar de las indudables ventajas que puede ofrecer la GC, estudios comparativos han puesto de manifiesto que la técnica de HPLC, utilizando derivatización con DNPH, sigue siendo la adecuada en el análisis de muestras ambientales, sobre todo para la determinación de los compuestos carbonílicos más pesados, que suelen presentarse en concentraciones bajas. En consecuencia, no parece que en el momento actual pueda recomendarse la GC como método alternativo óptimo al de la HPLC con derivatización con DNPH. No obstante, parece evidente la necesidad de realizar estudios más detallados acerca de métodos experimentales para el análisis de aldehídos y cetonas mediante metodologías de GC directas o con derivatización, y su comparación, frente a muestras similares, de los métodos que hacen uso de HPLC.

II.1.2. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS

La validación de un método analítico permite poner de manifiesto si los resultados

producidos por el mismo son fiables y reproducibles, así como si el método es utilizable para la aplicación pretendida. De hecho, a partir de la publicación de la Norma UNE EN ISO 9000:2000 [43] se han establecido definiciones de la validación, como la siguiente: Es un proceso, basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante los cuales se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar.

En los últimos años, las ideas relacionadas con el control de calidad de los resultados analíticos han ido pasando a formar parte esencial de las estrategias de muchos laboratorios que deben demostrar, o que ven la conveniencia de demostrar, que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para dar respuesta al problema analítico planteado. Con tal finalidad, adquiere sentido la validación de las metodologías, junto a otras actividades englobadas en el control del aseguramiento de la calidad. Según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 [44], los laboratorios deben validar todos los métodos que se utilicen en él, tanto los desarrollados por ellos mismos como aquellos procedentes de fuentes bibliográficas o desarrollados por otros laboratorios.

Ante la inexistencia de materiales de referencia apropiados y de métodos que se puedan considerar como métodos de referencia para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de humo, habría que recurrir a la metodología publicada por la EPA para el análisis de aldehídos y cetonas en muestras de aire, basadas en la derivatización con DNPH y medida mediante HPLC de las hidrazonas formadas, a pesar de haberse desarrollado para un tipo de matriz menos compleja que el humo.

Las características de funcionamiento que deben poseer los métodos analíticos se concretan en parámetros de calidad, como son la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación, el rango de linealidad, la sensibilidad, la selectividad y la robustez. Por la incidencia que tienen sobre la calidad de un método analítico, la exactitud, la precisión y el límite de detección se consideran parámetros primarios. Los restantes parámetros ejercen menor incidencia y terminan poniéndose de manifiesto a través de los anteriores. En el presente trabajo, dada la importancia que tiene el poder determinar pequeñas concentraciones de los analitos, prestaremos especial atención a los parámetros primarios.

Por otra parte, la determinación de las características de un método analítico es, con frecuencia, esencial para evaluar la incertidumbre asociada a los resultados. Los datos sobre

las características del método suelen considerar también el efecto simultáneo de distintas contribuciones de la incertidumbre y, por tanto, su utilización puede simplificar considerablemente el proceso de evaluación de la incertidumbre.

En la práctica de la validación, algunas de las propiedades analíticas señaladas, como la exactitud, pueden resultar poco prácticas, o insuficientes, como sucede con la precisión. En efecto, el valor verdadero que acompaña al concepto de exactitud, es un valor hipotético que, en realidad, nunca se conoce. Así mismo, los errores que pueden estar asociados a una metodología, no sólo tienen que ser de tipo aleatorio, incluidos en la precisión, sino que también pueden ser sistemáticos, que afectarían directamente a la exactitud.

La precisión evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar medidas replicadas sobre una misma muestra. Depende exclusivamente de los errores aleatorios que afectan al proceso de medida. El parámetro estadístico que se utiliza normalmente para expresar la precisión es la desviación estándar, en términos absolutos o relativos. Dado que el número de factores que pueden afectar a la precisión de los resultados es elevado, al evaluar este parámetro es conveniente elegir unas condiciones de trabajo con una considerable variabilidad entre las mismas, es decir, en condiciones de reproducibilidad. Las dificultades que conlleva esta forma de proceder, hace que con frecuencia se sustituya por estudios de reproducibilidad intralaboratorio, en el que las medidas las realiza un mismo operador utilizando el mismo equipo y se evalúa la influencia de variables como: puesta en marcha del equipo, preparación de patrones y calibración del equipo.

El límite de detección es el parámetro de calidad que indica la capacidad de detección del método de medida. Teniendo en cuenta las dificultades asociadas a la estimación del límite de detección de un método de medida, tiene poco sentido intentar definirlo en términos muy estrictos, en términos de intervalos de confianza. En este sentido, es habitual que se acepte la definición establecida por la “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) [45], en la que se establece como límite de detección la concentración, o la cantidad de analito, establecida mediante la menor medida que pueda detectarse con una certeza razonable mediante una metodología o procedimiento analítico. Para fijar ese valor mínimo de la medida, a la media de un cierto número de medidas del blanco, se suma el producto de un factor (habitualmente se recomienda un valor de 3) por la desviación estándar de las medidas.

En las metodologías cromatográficas, es difícil definir el concepto de blanco y medir su valor, por lo tanto se han propuesto [46] otras metodologías para la determinación de los límites de detección. Una de ellas considera la ordenada en el origen de la recta de calibración como un valor aproximado del valor de la media de los blancos, y la desviación estándar residual de la calibración como un valor aproximado de la desviación estándar de las medidas del blanco. Con estas consideraciones se obtiene que el límite de detección es 3 veces la desviación estándar residual dividida por la pendiente de las curvas de calibración estudiadas.

La sensibilidad de un método analítico se asocia a su capacidad para diferenciar entre dos concentraciones próximas de un analito. Suele relacionarse a la posibilidad que ofrece el método para medir concentraciones muy bajas y se recurre al límite de detección como una estimación de la misma. Sin embargo, aunque cuanto mayor sea la sensibilidad de un método, menor será su límite de detección, la sensibilidad no queda restringida a la región de las bajas concentraciones. Este parámetro, aplicado a las técnicas instrumentales se mide a través de la pendiente de la función de calibración.

II.1.3. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

Definiciones y conceptos generales

En los últimos años, la tarea de evaluar la incertidumbre asociada a una magnitud sujeta a medida en Química Analítica ha generado un importante interés y discusión. Actualmente existe la necesidad de estimar la incertidumbre de ensayo y las incertidumbres asociadas a las calibraciones internas, que son aquellas realizadas en el propio laboratorio. El término “procedimiento analítico” significa una descripción detallada de lo que se ha hecho mientras se realizaba un análisis, sin hacer referencia a la calidad de la medida. Una definición más sólida de “procedimiento analítico” puede darse en términos de confianza en la medida (calidad de un resultado), en el que un procedimiento específico está asociado explícitamente con una exactitud de los resultados obtenidos.

El “Vocabulario Internacional de Términos Básicos y Generales en Metrología”, VIM, define la incertidumbre de la medida como “un parámetro asociado al resultado de una medida, que caracteriza el intervalo de valores que puede ser razonablemente atribuido al mensurando” [47]. El significado de esta definición no es clara, ya que depende en gran

medida de la interpretación del término “mensurando”, que se define como “la magnitud sujeta a medida” [48]. Previamente, la guía ISO 3534-1 [49] ya había definido la incertidumbre como “el intervalo alrededor de un resultado de una medida que contiene el valor verdadero con una elevada probabilidad”, definición que tiene poca aplicación práctica, ya que el valor verdadero no puede conocerse.

La “Guía para la Expresión de la Incertidumbre en la Medida”, GUM, publicada por la “International Organisation for Standardization”, ISO, establece las reglas generales para la evaluación y expresión de la incertidumbre para un amplio rango de procesos de medida [50]. Esta guía fue interpretada para Química Analítica por “a focus for Analytical Chemistry in Europe”, EURACHEM, en 1995 [51].

Las etapas de un proceso de estimación de la incertidumbre, las podemos observar en el siguiente esquema, Figura II.1:

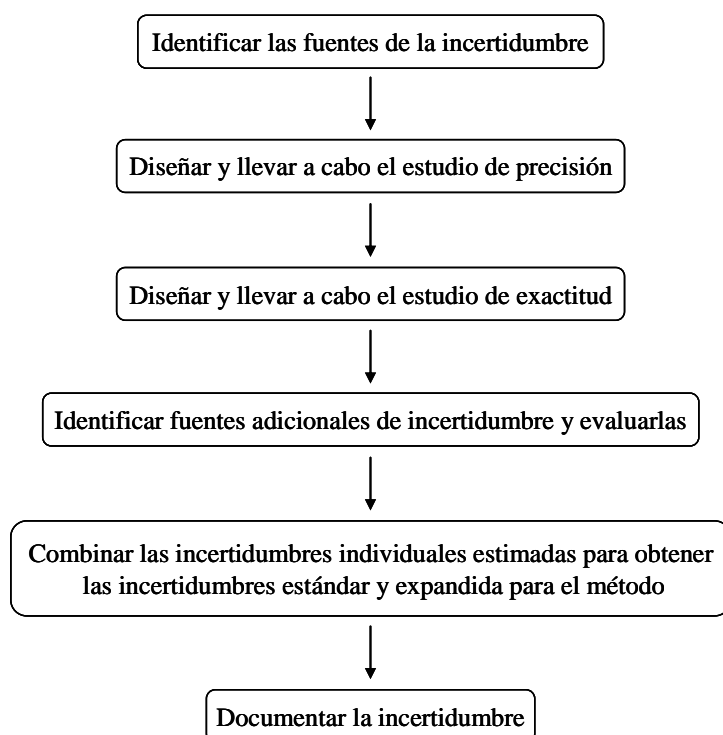


Figura II.1. Diagrama de flujo del proceso de estimación de la incertidumbre.

La aproximación descrita en la guía GUM requiere la identificación de todas las posibles fuentes de la incertidumbre asociadas con el procedimiento analítico; la estimación

de su magnitud, tanto mediante datos experimentales como datos publicados, y la combinación de estas incertidumbres individuales para dar una incertidumbre estándar o expandida para el procedimiento global.

Los principios de la guía GUM son significativamente diferentes a los métodos generalmente estudiados en Química Analítica para estimar la incertidumbre [48,52-54], que normalmente hacen uso de parámetros del “procedimiento global”, como, por ejemplo, la precisión y recuperación obtenidas durante un estudio con un método de validación casero o mediante desarrollo de métodos o estudios de colaboración [55].

Aproximaciones al cálculo de la incertidumbre

El elevado número de fuentes de errores presentes en un procedimiento analítico ha hecho que se hayan propuesto varias aproximaciones para calcular la incertidumbre.

Con frecuencia se usa la aproximación “bottom up”, que consiste en sumar todas las componentes individuales de incertidumbre para obtener una incertidumbre global, pero también se puede usar la información procedente de la aproximación “top down” que estima la incertidumbre global, procedente de ejercicios interlaboratorio, por ejemplo, sin la necesidad de subdividir la incertidumbre global en incertidumbres parciales.

En 1993 la ISO desarrolló una aproximación para el cálculo de la incertidumbre asociado a las medidas físicas [47] basada en identificar y cuantificar cada una de las componentes de la incertidumbre del proceso de medida. EURACHEM hizo una adaptación de la anterior aproximación a medidas químicas poco tiempo después [51], calculando la incertidumbre tal y como se hacía en las medidas físicas, sin considerar las diferencias que hay entre los procesos de medida químicos y los procesos de medida físicos [56,57], identificando y cuantificando cada una de las componentes de la incertidumbre presentes en el proceso de medida químico, haciendo de esta metodología no sólo muy costosa sino inviable en muchos de los procedimientos analíticos. De esta forma, fueron surgiendo otras metodologías basadas en calcular la incertidumbre de una forma más global, es decir, agrupando términos siempre que fuera posible, como la propuesta en 1995 por “Analytical Methods Comitee” [48]. Posteriormente fueron propuestas otras aproximaciones globales

basadas en calcular la incertidumbre utilizando la información obtenida en la validación de los métodos analíticos [58-63].

Finalmente en el año 2000, EURACHEM desarrolló una guía para el cálculo de la incertidumbre que contempla la posibilidad de calcular la incertidumbre utilizando información de la validación [64].

Aproximación “bottom-up”

El proceso de evaluación de la incertidumbre de la medida sugerida por la ISO, recibe comúnmente el nombre de “bottom-up”, debido a que divide el proceso de medida químico en sus partes fundamentales y cada una de ellas se subdivide a la vez en contribuciones más pequeñas. Después, se calcula la incertidumbre de cada una de las partes y se combina para obtener la incertidumbre global del proceso. El procedimiento para cuantificar la incertidumbre se puede dividir en 4 etapas:

1. Especificación.

En esta etapa se modela el proceso de medida que incluye el establecimiento de la relación entre el resultado analítico y los parámetros de los que depende.

En el caso de procedimientos analíticos más complejos, donde no es posible establecer una relación en la cual no estén presentes todos los parámetros de los que depende un resultado, debe dividirse el procedimiento analítico en sus diferentes etapas.

2. Identificación de las fuentes de incertidumbre.

Una aproximación práctica para identificar las fuentes de incertidumbre consiste en apuntar todos los cálculos involucrados en la obtención del resultado, incluyendo todas las mediciones intermedias, hacer una lista de todos los parámetros implicados y, por último, enumerar las contribuciones de la incertidumbre para cada uno de los parámetros de la lista.

3. Cuantificación de las componentes de la incertidumbre.

Consiste en medir o estimar la incertidumbre asociada con cada fuente de incertidumbre identificada. El objetivo de la aproximación componente por componente, es

encontrar las herramientas y las maneras necesarias para cuantificar las componentes de incertidumbre individuales.

4. Cálculo de la incertidumbre estándar combinada.

La información obtenida consiste en un número de contribuciones cuantificadas para la incertidumbre global, asociadas con parámetros individuales o con los efectos combinados de varios factores. Las contribuciones pueden ser expresadas como desviaciones estándar, y combinada de acuerdo a las reglas adecuadas para obtener una incertidumbre estándar combinada. En la Figura II.2 podemos observar el procedimiento para evaluar la incertidumbre medida según la aproximación “bottom-up”:

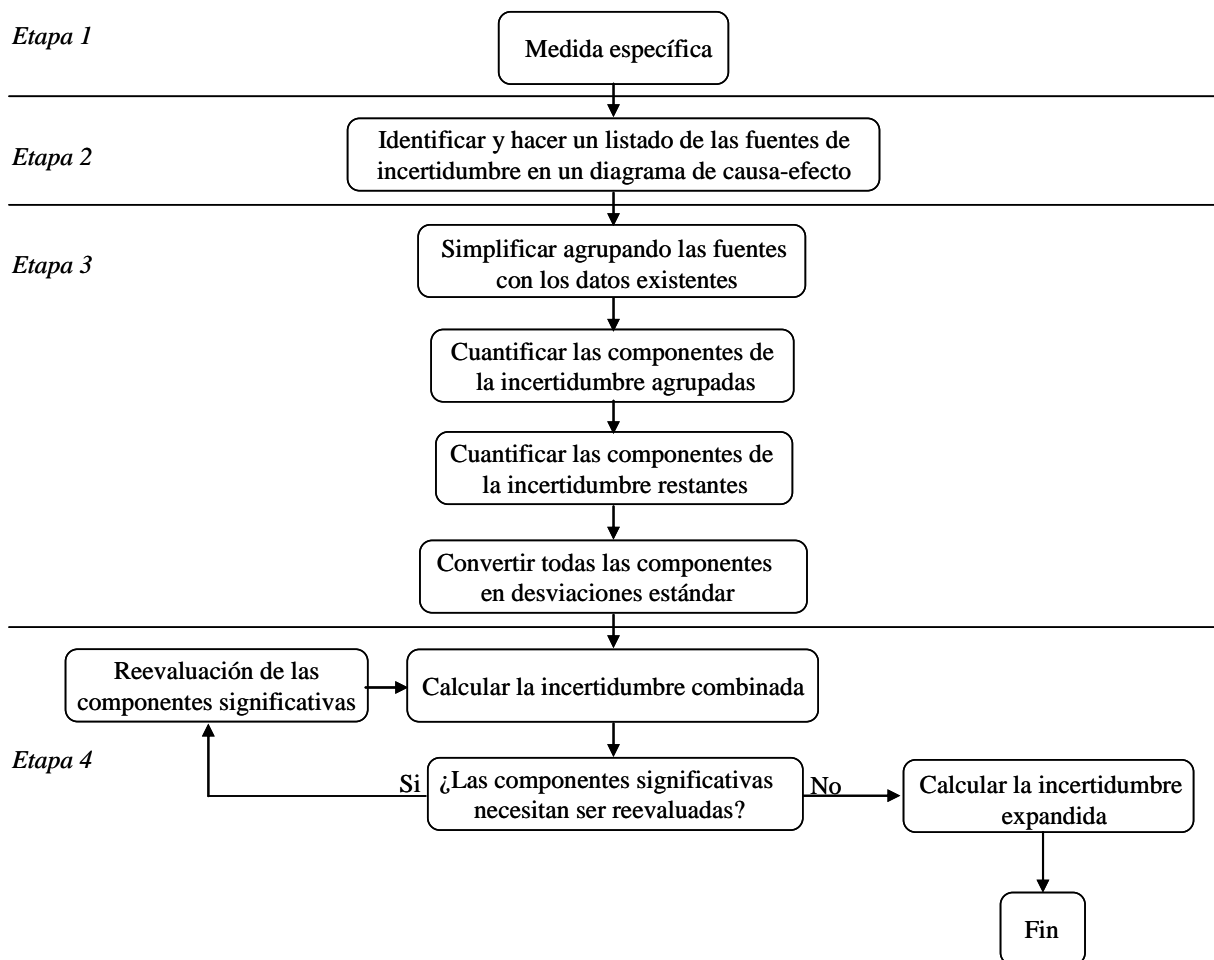


Figura II.2. Procedimiento para evaluar la incertidumbre de la medida.

En general, la incertidumbre asociada a una medida suele estar compuesta de varias componentes, que pueden agruparse en dos categorías [47]:

“Tipo A”. Aquellas que son evaluadas por métodos estadísticos.

“Tipo B”. Aquellas que son evaluadas por otros medios.

La evaluación de la incertidumbre “tipo A” debe estar basada en un método estadístico válido para el tratamiento de datos. Por ejemplo:

- Cálculo de la desviación estándar de la media de una serie de observaciones independientes.
- Uso del método de los mínimos cuadrados para ajustar una curva.
- Llevar a cabo un análisis de la varianza ANOVA para cuantificar efectos aleatorios.

Este tipo de incertidumbre suele estar asociada a la variabilidad de los resultados debido a los errores aleatorios. Por ejemplo, la repetitividad, precisión intermedia y la reproducibilidad, son incertidumbres “tipo A”.

Cuando no es posible calcular una componente de la incertidumbre de forma experimental y las incertidumbres deben evaluarse a partir de trabajos anteriores o bien a partir del criterio del analista, se les denominan incertidumbres estándar “tipo B”.

La evaluación de la incertidumbre “tipo B” puede hacer uso de toda la información relevante disponible, incluyendo:

- Datos medidos previamente.
- Información disponible acerca del comportamiento y propiedades de los materiales e instrumentos implicados.
- Especificaciones del fabricante.
- Certificados de calibración y alguna otra información disponible.

Antes de combinar las incertidumbres individuales para obtener la incertidumbre total o global, es necesario expresar todas las incertidumbres como “incertidumbres estándar”. En el caso de las incertidumbres “tipo A”, la desviación estándar de los resultados equivale a la incertidumbre estándar. Sin embargo, las incertidumbres de “tipo B” suelen estar expresadas como un intervalo de confianza y, para ello, es necesario conocer la distribución en que se basan estas incertidumbres, así como el nivel de significación del intervalo de confianza.

Muchas veces no se dispone de la información sobre la distribución, como es el caso de las tolerancias del material volumétrico. Entonces, si se asume que es igual de probable que el valor esté en cualquier lugar dentro de los límites del intervalo fijado por la tolerancia, corresponde a una distribución rectangular y, por tanto, la incertidumbre estándar se obtiene dividiendo el valor de la tolerancia por $\sqrt{3}$. Si es más probable que el valor esté en el centro del intervalo, se suele asumir una distribución triangular y, en este caso, la incertidumbre estándar se obtiene dividiendo el valor de la tolerancia por $\sqrt{6}$.

En la Figura II.3 observamos la evaluación de la incertidumbre estándar “tipo B” para una cantidad c dada según las diferentes distribuciones.

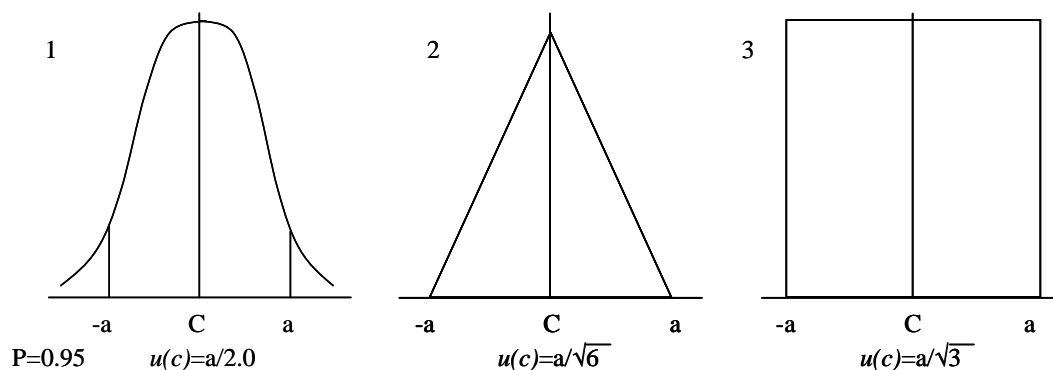


Figura II.3. Ejemplos de aplicación del modelo de distribución para determinar la incertidumbre estándar “tipo B”.

Incertidumbre estándar combinada

La incertidumbre estándar combinada de un valor medido, u_c , corresponde a la desviación estándar estimada de un resultado. En el caso de componentes independientes, ésta procede de la combinación de las incertidumbres estándar individuales u_i , que pueden

proceder tanto de incertidumbres “tipo A” o de “tipo B”. Las componentes de incertidumbre individuales deben combinarse siguiendo la ley de propagación de errores [50] y se expresa de la siguiente manera:

$$u_c^2 = \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i)$$

donde las derivadas parciales se refieren a los coeficientes de sensibilidad.

Incertidumbre expandida

Con frecuencia se requiere de una expresión de la incertidumbre que proporcione un intervalo de confianza dentro del cual se encuentra el valor verdadero con una determinada probabilidad. La medida de la incertidumbre que reúne este requisito, se denomina incertidumbre expandida, U_c , y se obtiene al multiplicar u_c por un factor de cobertura, k . De manera que $U_c = k \cdot u_c$. El valor del factor de cobertura k se elige en base a la probabilidad con la que queremos que se encuentre el valor verdadero dentro del intervalo definido por $U_c = k \cdot u_c$; $c \pm U_c$. El valor típico de k oscila entre 2 y 3. Cuando se asume una distribución normal, $U_c = 2 \cdot u_c$, se define un intervalo con una probabilidad aproximada del 95% de contener el valor verdadero.

Aproximación “top down”

El procedimiento por etapas descrito anteriormente es, en ocasiones, difícil de llevar a cabo en procesos analíticos complejos en los que no siempre es fácil evaluar las incertidumbres estándar de etapas intermedias. Una alternativa a este problema consiste en calcular una estimación global de la incertidumbre que afecta a un proceso analítico, incluyendo la variabilidad que introducen las muestras. Este tipo de aproximación, como ya hemos indicado anteriormente, se denomina “top down” y considera el proceso analítico como un todo o “caja negra” en el que se introducen las muestras y se obtienen los resultados asociados a dichas muestras. Para ello, se utilizan, en primer lugar, los datos obtenidos durante el proceso de validación para demostrar la trazabilidad del proceso analítico. Esta trazabilidad debe verificarse con una muestra representativa, es decir, una muestra que sea lo

más parecida posible a las muestras de rutina que se analizarían con el método analítico. También debe considerarse la variabilidad experimental del método analítico y la variabilidad de la matriz de la muestra.

Por otro lado, el cálculo de la incertidumbre con la aproximación propuesta por la ISO, tiene la ventaja de que, como se han tenido que identificar y cuantificar todas las fuentes de incertidumbre del método analítico, se puede disminuir la incertidumbre de los resultados mejorando aquellas partes del método que contribuyan más a la incertidumbre final del resultado.

II.1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En atención a las consideraciones expuestas al referirnos a las metodologías habitualmente utilizadas para la determinación de compuestos carbonílicos, hemos querido comparar las basadas en la derivatización de los analitos con la 2,4-dinitrofenildracina y posterior separación y cuantificación mediante HPLC-UV o con el empleo de GC-MS. En concreto, antes de proceder a establecer el contenido en compuestos carbonílicos en muestras de humo, se ha procedido a seleccionar la metodología que puede resultar más adecuada para su cuantificación.

Al escoger entre las metodologías a comparar, la elección de la que utiliza HPLC como técnica analítica de separación, y de la DNPH como agente derivatizante, es prácticamente obligatoria. No en vano, es la que suele encontrarse en las Normas Oficiales para el análisis de muestras de aire. Por otra parte, se ha seleccionado la metodología que hace uso de GC-MS, como técnica analítica para la separación y cuantificación de las hidrazonas obtenidas con la DNPH. De esta forma se selecciona, por una parte, la mayor sensibilidad y el superior grado de contraste que parece amparar a la metodología que hace uso de la técnica de HPLC-UV y, por otra parte, el mayor poder de resolución y la capacidad de diferenciación entre las señales correspondientes a picos solapados, que presenta la GC-MS.

Podría plantearse la utilización de otros agentes derivatizantes, cuando la técnica analítica es la GC, pues los datos bibliográficos indican que la utilización de las hidrazonas formadas con la DNPH no proporciona los mejores resultados por la baja volatilidad de dichos derivados. No obstante, nos hemos inclinado por utilizar el mismo derivatizante, con

independencia de la técnica analítica a emplear. La principal razón que ha motivado esta decisión se encuentra en la metodología de toma de muestra que se vaya a utilizar.

En principio, el sistema de muestreo debe basarse en la utilización de adsorbentes en los que se haya impregnado el reactivo derivatizante, de forma que las muestras de humo se hagan pasar a través de los mismos y los compuestos carbonílicos formen los correspondientes derivados. En un sistema de este tipo, la velocidad de reacción que parece acompañar a las reacciones de formación de hidrazonas, aconseja el empleo de la DNPH. Además, la eficiencia que se consigue en la solubilización con acetonitrilo de las hidrazonas retenidas en el soporte, es elevada. Por ambos motivos, y por la facilidad que la DNPH muestra para reaccionar con distintos aldehídos y cetonas, volátiles y semivolátiles, presentes en las muestras en concentraciones que pueden oscilar entre amplios intervalos, se ha seleccionado este agente derivatizante.

II.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

II.2.1. REACTIVOS

Los compuestos carbonílicos empleados en este estudio fueron: 1. formaldehído (For), 2. acetaldehído (Ace), 3. acroleína (Acr), 4. acetona (Acet), 5. propionaldehído (Pro), 6. crotonaldehído (Cro), 7. metacroleína (Met), 8. 2-butanona (Buta), 9. butiraldehído (Buti), 10. benzaldehído (Ben), 11. valeraldehído (Val), 12. *p*-tolualdehído (Tol) y 13. hexaldehído (Hex).

La disolución patrón, Carbonyl-DNPH Mix 1, que contiene los 13 compuestos carbonílicos derivatizados con 2,4-dinitrodifenilhidracina y disueltos en acetonitrilo, fue suministrada por Supelco (Bellefonte, PA, USA). La concentración de cada uno de los compuestos carbonílicos sin derivatizar en esta disolución viene dada por el certificado de análisis y es de 20 mg/L, exceptuando el formaldehído con 40 mg/L.

Los compuestos carbonílicos individuales fueron suministrados por Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Alemania), excepto el formaldehído suministrado por Aldrich (Steinheim, Alemania) en una disolución acuosa al 37% (p/v).

El compuesto 2,4-dinitrofenilhidracina usado como agente derivatizante fue suministrado por Aldrich (Steinheim, Alemania) y purificado antes de su uso mediante tres recristalizaciones con acetonitrilo.

Para el análisis por cromatografía líquida se emplearon como disolventes: acetonitrilo de grado isocrático para cromatografía en fase líquida suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania), y agua purificada a través de un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

Para preparar las disoluciones de los compuestos carbonílicos se empleó acetonitrilo de la misma calidad que el usado en el análisis cromatográfico.

II.2.2. EQUIPOS

Para preparar las disoluciones se emplearon dos micropipetas: una Pipetman P100 de Gilson (Villiers le Bel, Francia) y una Pluripet PL 1001 de Kartell (Noviglio, Milán, Italia),

con sus certificados de calibración correspondiente.

El material volumétrico empleado para la preparación de las disoluciones fue de Clase A.

El equipo de HPLC usado fue un cromatógrafo líquido L-2130 suministrado por Hitachi (Japón) acoplado a un muestreador automático ProStar 410 de Varian (USA) y con un detector espectrofotométrico de longitud de onda variable Waters-Lambda max 481 LC, (Millford, MA, USA). El software utilizado para la obtención de los cromatogramas y su posterior tratamiento fue el Autoanalysis 2.4 (SciWare, vcerda@p01.uib.es). El sistema analítico empleado en este cromatógrafo fue una precolumna μ Bondapak C₁₈, 10 μ m, 125 Å (20 mm x 3.9 mm de diámetro interno) suministrada por Waters (Millford, MA, USA) y dos columnas en serie, SUPELCOSIL™ LC-18, 5 μ m, 100 Å (25 cm x 4.6 mm de diámetro interno) suministradas por Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Para el análisis por cromatografía de gases se empleó un cromatógrafo de gases Varian 3800 acoplado a un espectrómetro de masas Varian Saturn 2000 y equipado con una columna capilar WCOT CP-Sil 8 CB de 30 m x 0.25 mm de diámetro interno, suministrada por Chrompack (Holanda). El equipo incorpora un muestreador automático Varian modelo 8200 CX. Para el control del instrumento y la adquisición de los datos se hizo uso del software Saturn GCMS Workstation 5.3.

Como termostato se empleó un baño de agua Selecta modelo Precistern (Barcelona, España).

II.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Preparación de patrones para las curvas de calibrado

Para poder llevar a cabo el calibrado de los compuestos carbonílicos se preparó una disolución madre de los 13 compuestos derivatizados con una concentración de 8 mg/L de cada compuesto sin derivatizar, excepto el formaldehído con 16 mg/L, por dilución de dos disoluciones estándar Carbonyl-DNPH Mix 1 a 5 mL con acetonitrilo. Esta disolución se conservó en nevera a 4°C durante los 6 días del estudio. A partir de esta disolución madre,

obtuvimos una disolución intermedia en acetonitrilo con una concentración de 1.02 mg/L para cada uno de los compuestos, excepto el formaldehído con 2.04 mg/L. Esta disolución intermedia fue preparada diariamente y por diluciones apropiadas de la misma con acetonitrilo se obtuvieron los patrones necesarios para realizar las curvas de calibrado.

Las curvas de calibrado se realizaron con 7 niveles de concentración, exceptuando el formaldehído, en el análisis por HPLC-UV, con 5 niveles. Además, se hicieron repeticiones del análisis de un patrón con un nivel bajo, con un nivel intermedio y con un nivel alto de concentración, en cada uno de los días del estudio y para las dos técnicas utilizadas (segundo, cuarto y sexto nivel de concentración para las curvas con 7 puntos y primer, tercer y quinto nivel, para las curvas con 5 puntos).

Purificación de la DNPH

Se preparó una disolución saturada de DNPH disolviendo un exceso de la misma en 200 mL de acetonitrilo y llevándola a ebullición durante aproximadamente 1 hora. Transcurrido este tiempo, se recoge y transfiere el sobrenadante a un vaso de precipitado cubierto colocado sobre un baño de agua, que permite un enfriamiento gradual hasta una temperatura de 50°C. Después, se mantiene la disolución a esta temperatura hasta que una gran parte del disolvente se haya evaporado. Se deja decantar la disolución y se recogen los cristales obtenidos que se lavan con acetonitrilo. Con estos cristales se repite el proceso dos veces más y finalmente, se guardan en un frasco color topacio.

Derivatización de los compuestos carbonílicos

Los compuestos carbonílicos derivatizados se obtuvieron por precipitación de la hidrazona correspondiente. Para esto, se preparó una disolución saturada de DNPH purificada en HCl 2M a la que se le añade el compuesto carbonílico correspondiente en cantidad suficiente para que se encuentre en exceso con respecto a su relación 1:1 molar con la DNPH. La hidrazona precipitada se filtra, luego se lava con HCl 2M y con agua destilada y se seca a temperatura ambiente. Los patrones se preparan disolviendo en acetonitrilo la cantidad necesaria del derivado obtenido.

Análisis por HPLC-UV y GC-MS

El método de HPLC usado para la separación y detección de los compuestos carbonílicos derivatizados consistió en un gradiente de elución con el detector espectrofotométrico operando a 360 nm. La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo y agua al 55% de acetonitrilo que se aumentó mediante un gradiente lineal hasta el 66% en 21.7 minutos, manteniendo luego este porcentaje durante 6.6 minutos, posteriormente se somete a otro gradiente lineal hasta el 75% de acetonitrilo en 5 minutos, para terminar con este porcentaje durante 8.7 minutos. La velocidad del flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μ L.

En el método de GC-MS se emplearon las siguientes condiciones: a) El cromatógrafo usó como gas portador helio a un flujo de 2 mL/min. Se inyectaron 2 μ l de muestra en modo splitless y manteniendo la temperatura del inyector a 200°C. La temperatura del horno se programó desde 100°C hasta 315°C, a una velocidad de 10°C/min, y se mantuvo a esta temperatura durante 20.8 min. b) La línea de transferencia con el espectrómetro de masas se mantuvo a 315°C y la trampa de iones a 200°C, con una temperatura del “Ion trap manifold” de 72°C. Como fuente de iones se empleó el impacto electrónico a 70 eV y el análisis de las masas se realizó en el modo “scan” mediante el barrido de masas entre 50 y 300 uma. Los derivados de los compuestos carbonílicos fueron identificados atendiendo a sus respectivos tiempos de retención y a sus espectros de masas. Las determinaciones cuantitativas se llevaron a cabo usando los valores de masa correspondientes a los iones mayoritarios obtenidos para los diferentes compuestos carbonílicos derivatizados, modo SIM (monitorización del ion seleccionado). Estos iones mayoritarios coinciden con los iones moleculares de los derivados para la mitad de los compuestos que se han determinado.

II.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha indicado en la introducción del capítulo, se han propuesto un número considerable de metodologías analíticas, generalmente basadas en la utilización de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución y de la Cromatografía de Gases, para la determinación de compuestos carbonílicos. En ambos casos, es habitual que los aldehídos y/o cetonas sean derivatizados antes de su introducción en el sistema cromatográfico. Entre las técnicas propuestas, en este capítulo se comparan los resultados obtenidos mediante HPLC-UV y GC-MS. En ambos casos, las determinaciones analíticas se basan en la separación y cuantificación de las hidrazonas que forman los compuestos carbonílicos al reaccionar con la 2,4-dinitrodifenilhidracina.

Como quiera que las reacciones de derivatización se encuentran influenciadas por numerosas variables, las experiencias se han realizado a partir de patrones comerciales de las hidrazonas. De esta forma, las diferencias que se observen en los resultados obtenidos en ambos sistemas cromatográficos, deben asociarse a las técnicas analíticas utilizadas, pues no sólo se ha mantenido la composición cualitativa de las disoluciones inyectadas, constituidas por una mezcla de los derivados con DNPH del formaldehído, acetaldehído, acroleína, acetona, propionaldehído, crotonaldehído, metacroleína, 2-butanona, butiraldehído, benzaldehído, valeraldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído, sino que se ha respetado la composición cuantitativa relativa, que es igual para todos los componentes de las disoluciones patrón, excepto para el formaldehído que es doble de la correspondiente a la de los restantes compuestos carbonílicos.

En atención a lo expuesto, las metodologías a comparar, basadas en la separación y cuantificación de las hidrazonas de cada uno de los compuestos carbonílicos citados, se encuentran afectadas por las mismas variables de operación y, en consecuencia, los resultados obtenidos deben estar afectados por los errores aleatorios cometidos en la manipulación de las disoluciones a inyectar en los sistemas cromatográficos, iguales para HPLC-UV y para GC-MS, y por las que condicionan la respuesta de los respectivos instrumentos. Por tanto, las diferencias que se obtengan en la comparación, realizada mediante el establecimiento de parámetros de calidad y el cálculo de incertidumbres, deben relacionarse principalmente con las características propias de cada una de las metodologías de separación y medida.

II.3.1. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

Con objeto de conseguir una resolución y cuantificación adecuada para las trece hidrazonas procedentes de la derivatización de los compuestos carbonílicos con DNPH, antes de establecer los parámetros a utilizar en la comparación de las técnicas, se procedió a optimizar las condiciones experimentales a utilizar en la separación de dichos derivados por HPLC-UV y GC-MS. En la Figura II.4 se muestran cromatogramas representativos, obtenidos con disoluciones patrón de la mezcla comercial de hidrazonas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en el apartado dedicado al desarrollo experimental.

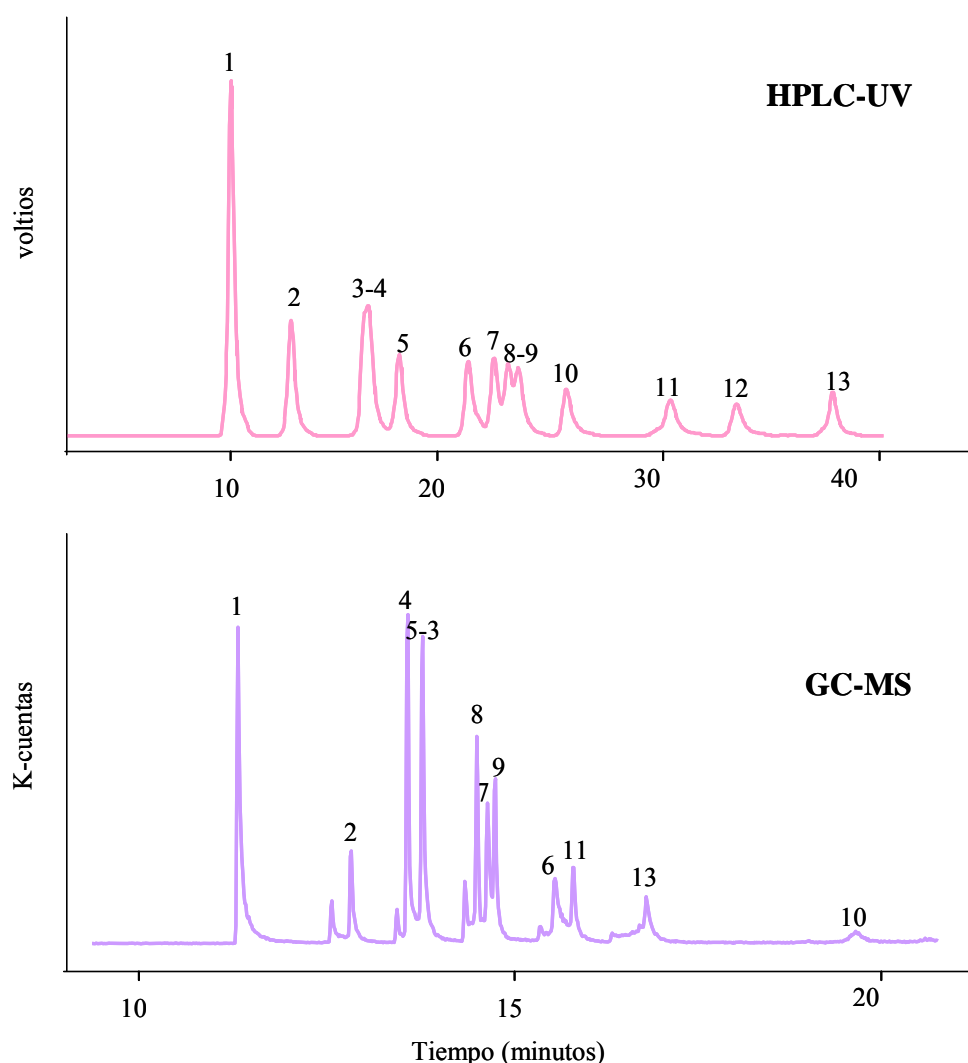


Figura II.4. Cromatogramas representativos de los compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH. 1. For, 2. Ace, 3. Acr, 4. Acet, 5. Pro, 6. Cro, 7. Met, 8. Buta, 9. Buti, 10. Ben, 11. Val, 12. Tol y 13. Hex.

En general, suele asumirse que para dos picos cromatográficos consecutivos, la resolución puede calcularse mediante la expresión:

$$R = \frac{2 \cdot \Delta x}{w_1 + w_2}$$

en la que Δx es la distancia entre picos, mientras que w_1 y w_2 representan la anchura de los picos. Admitiendo que dos picos pueden considerarse bien resueltos cuando $R > 1$, en los cromatogramas obtenidos con la metodología establecida para HPLC-UV, se observa que es posible conseguir una resolución cromatográfica satisfactoria para nueve de los trece compuestos carbonílicos derivatizados. Dos parejas de picos, las correspondientes a los derivados de la acroleína y acetona, así como la formada por la 2-butanona y el butiraldehído, no quedan resueltas de forma satisfactoria. Por tal motivo, como se pondrá de manifiesto posteriormente, su cuantificación se ha hecho conjuntamente y no como compuestos individuales.

También se estudiaron otros sistemas de separación, basados en propuestas formuladas por otros autores, en los que introducen modificaciones del flujo y del número de columnas o en el empleo de fases móviles constituidas por acetonitrilo, tetrahidrofurano, isopropanol y agua [65]. Los resultados obtenidos nos muestran que, a pesar de que conseguimos mejorar la separación de los compuestos, especialmente del par acroleína + acetona, perdemos alrededor de un 34% en sensibilidad. Por este motivo, se prefirió seguir utilizando la metodología inicialmente optimizada.

Se observa que en el sistema HPLC-UV existe una cierta similitud en la intensidad de los picos correspondientes a las distintas hidrazonas, que podría indicar que la sensibilidad correspondiente a la señal analítica de los distintos derivados es similar. En el caso del formaldehído, debe tenerse en cuenta que la concentración inyectada del mismo es doble de la correspondiente a los restantes compuestos carbonílicos. En otro orden de cosas, el tiempo necesario para alcanzar una separación, como la comentada para la mezcla seleccionada, es de unos 39 minutos.

Los cromatogramas realizados mediante GC-MS muestran diferencias significativas con respecto a los de HPLC-UV. Por una parte, en las sensibilidades correspondientes a cada una de las hidrazonas separadas, destacando en sentido negativo que, a la concentración utilizada, el derivado *p*-tolualdehído no fue detectado. En cuanto a la resolución entre picos, siguiendo criterios similares a los utilizados anteriormente, se observa que la mezcla de las

hidrazonas del propionaldehído y de la acroleína no se resuelven satisfactoriamente, si bien este hecho presenta una significación distinta en este caso, pues al poder utilizar en GC-MS los valores de masa correspondientes a los iones seleccionados para cada compuesto, las determinaciones analíticas son posibles aunque los picos no queden bien resueltos en el cromatograma, como sucede con la mezcla citada. Por último, puede observarse que al utilizar GC-MS, el tiempo necesario para realizar el cromatograma de la mezcla de hidrazonas es de unos 20 minutos, prácticamente la mitad del necesario en HPLC-UV.

En la Tabla II.1 se agrupan los tiempos de retención determinados para los derivados de los compuestos carbonílicos y las correspondientes desviaciones estándar, así como los iones usados para su cuantificación mediante GC-MS.

Los tiempos de retención incluidos en la citada tabla son los valores medios de los tiempos de retención obtenidos al realizar seis repeticiones de los cromatogramas correspondientes a la disolución patrón de la mezcla comercial de hidrazonas, en el caso de utilizar HPLC-UV, y cinco cuando se empleó GC-MS.

Tabla II.1. Tiempos de retención con sus desviaciones estándar (DS) e iones mayoritarios usados para cuantificar los compuestos carbonílicos derivatizados en HPLC-UV y en GC-MS.

HPLC-UV		GC-MS		
Compuesto	^a t _r (min) (DS)	Compuesto	^b t _r (min) (DS)	Ión (m/z)
1. Formaldehído	11.41 (0.21)	1. Formaldehído	12.22 (0.04)	79
2. Acetaldehído	14.20 (0.31)	2. Acetaldehído	13.54 (0.03)	79
3-4. Acr + Acet	17.71 (0.42)	4. Acetona	14.17 (0.01)	238
5. Propionaldehído	19.30 (0.45)	5-3. Pro + Acr	14.37 (0.02)	238 - 236
6. Crotonaldehído	22.55 (0.54)	8. 2-Butanona	14.99 (0.01)	252
7. Metacroleína	23.78 (0.58)	7. Metacroleína	15.17 (0.01)	173
8-9. Buta + Buti	24.73 (0.52)	9. Butiraldehído	15.23 (0.01)	252
10. Benzaldehído	26.78 (0.76)	6. Crotonaldehído	16.08 (0.02)	202
11. Valeraldehído	31.32 (0.98)	11. Valeraldehído	16.20 (0.01)	206
12. <i>p</i> -tolualdehído	34.62 (0.85)	13. Hexaldehído	16.97 (0.01)	83
13. Hexaldehído	38.83 (0.79)	10. Benzaldehído	19.50 (0.02)	286

^aMedia de 6 determinaciones. ^bMedia de 5 determinaciones.

Para identificar los derivados de los compuestos carbonílicos en los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-UV, fue necesario proceder a preparar los correspondientes derivados con DNPH. Con tal finalidad, se utilizó el procedimiento descrito en el método EPA 8315 A [37] y descrito en el apartado de desarrollo experimental. Los sólidos obtenidos para cada una de las hidrazonas se disolvieron en acetonitrilo y se inyectaron en el sistema cromatográfico.

En la cuantificación de los compuestos carbonílicos por GC-MS, se pueden presentar dificultades asociadas a la obtención de cromatogramas en los que determinados compuestos carbonílicos, después de ser derivatizados con DNPH, aparecen representados por dos picos, que corresponden a las formas isoméricas *sin* y *anti* de los mismos [32,40]. Generalmente, la forma *anti* está presente como la forma principal, mientras que la forma *sin* representa sólo un pequeño porcentaje, dependiendo la proporción entre ambas de la acidez de la muestra. En consecuencia, pueden presentarse situaciones en las que, al menos, algunos compuestos carbonílicos deberían cuantificarse teniendo en cuenta las dos formas isoméricas. En nuestro caso, los cromatogramas realizados mostraron que sólo se originaban las dos formas isoméricas en los derivados correspondientes a los siguientes compuestos: acetaldehído, acetona, 2-butanona y valeraldehído y que, además, en los cuatro casos, una de las formas predominaba claramente sobre la otra. Por tal motivo, en estos casos se cuantificó únicamente la forma mayoritaria.

Si consideramos el tiempo invertido en el proceso cromatográfico, la metodología GC-MS presenta notables ventajas, de hecho, para conseguir similares resoluciones, se necesita la mitad de tiempo que en la metodología HPLC-UV. Además, la posibilidad de cuantificar compuestos que presentan pobres resoluciones, junto con la información sobre la naturaleza de los componentes presentes en la muestra, hacen de la metodología GC-MS especialmente apropiada para el análisis de compuestos carbonílicos presentes en muestras complejas.

II.3.2. VALIDACIÓN. COMPARACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS A TRAVÉS DE PARÁMETROS DE CALIDAD

En general, como se ha comentado en la introducción de este capítulo, las metodologías analíticas deben poseer unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación en la que se vaya a utilizar, que se concretan en los llamados parámetros de

calidad. Por su parte, validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a unos determinados requisitos, previamente establecidos por el usuario, para poder resolver un problema analítico particular. Estos requisitos son los que definen los parámetros o criterios de calidad que debe poseer el método a utilizar para resolver el problema analítico.

Como ya se ha comentado, en el presente trabajo se ha prestado especial atención a los parámetros primarios de calidad (exactitud, precisión y límite de detección), a los que se ha añadido por su interés general la linealidad y sensibilidad de las respuestas.

El estudio efectuado ha comenzado con la realización diaria de curvas de calibrado, para cada uno de los compuestos carbonílicos incluidos en este estudio, mediante un procedimiento de calibración externo. El proceso se ha repetido durante seis días en el caso de las curvas realizadas con el sistema HPLC-UV, y durante cinco días las curvas representativas de GC-MS.

Curvas de calibrado. Linealidad y sensibilidad

Para establecer la linealidad de las respuestas proporcionadas por las metodologías a comparar, se han construido curvas de calibrado empleando el área de pico como medida de la respuesta analítica y con siete niveles de concentración, excepto para el derivado del formaldehído en el método HPLC-UV, para el que sólo se han utilizado patrones con cinco concentraciones. Las curvas se someten a regresión lineal y se utiliza el coeficiente de determinación (R^2) como valor representativo de la linealidad.

Puesto que se trata de comparar dos metodologías, al establecer los intervalos de concentración entre los que se comprueba la linealidad de las respuestas, se ha prestado mayor atención a la inclusión de concentraciones bajas que a la amplitud del rango. Así, cuando se utiliza el método basado en HPLC-UV, la linealidad fue evaluada en el rango de concentraciones comprendido entre 0.031 y 0.729 mg/L para todos los compuestos, excepto el formaldehído, para el que se emplean concentraciones en el rango comprendido entre 0.061 y 0.500 mg/L. En el método de separación y cuantificación mediante GC-MS, el rango de concentraciones utilizado en el caso del formaldehído es 0.500 - 1.941 mg/L, mientras que para el resto de los compuestos las concentraciones se variaron entre 0.250 y 0.971 mg/L. En

las Tablas II-A1 y II-A2, incluidas en el Anexo I del presente capítulo, se han agrupado los parámetros relacionados con el análisis de regresión obtenidos, para cada uno de los compuestos, a partir de los cromatogramas realizados cada uno de los días que duró el ensayo, mediante las dos metodologías usadas.

Los valores medios correspondientes a los coeficientes de determinación, representativos de la linealidad de las distintas curvas de calibrado, oscilan entre 0.996 y 0.999, cuando la técnica utilizada es HPLC-UV, mientras que para las curvas obtenidas con GC-MS los valores medios de R^2 se encuentran entre 0.991 y 0.997.

Al observar los valores obtenidos para las pendientes y ordenadas en el origen de las curvas de calibrado obtenidas cada día, se pone de manifiesto una cierta similitud para las rectas representativas de cada uno de los compuestos carbonílicos. Para comprobar si las diferencias observadas son significativas, se ha utilizado el test *t*-Student, conocido como prueba de comparación de medias [45].

Los resultados obtenidos muestran que, para un nivel de significación del 95% ($\alpha = 0.05$), existen diferencias significativas entre las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas para las curvas de calibrado representativas de un número considerable de derivados.

Las curvas de calibrado establecidas a partir de los cromatogramas de la técnica HPLC-UV, en cada uno de los ensayos realizados mientras duró el estudio, para el formaldehído, valeraldehído y hexaldehído, muestran pendientes entre las que no existen diferencias significativas, mientras que al comparar las ordenadas en el origen, solamente se han encontrado diferencias significativas para las curvas de calibrado correspondientes al propionaldehído, crotonaldehído y al par acroleína + acetona.

Cuando las curvas de calibrado se obtienen con la utilización de la técnica GC-MS, la comparación de las pendientes representativas de las calibraciones correspondientes a cada uno de los aldehídos y cetonas incluidos en este estudio, da lugar a peores resultados. En efecto, en todos los casos se obtienen diferencias significativas entre las pendientes, mientras que al comparar las ordenadas en el origen, sólo en el caso de la 2-butanona no se obtienen diferencias significativas.

Los resultados comentados aconsejan utilizar, para las determinaciones de compuestos

carbonílicos a realizar con las técnicas que estamos comparando, curvas de calibrado construidas en el momento en el que se vaya a proceder a efectuar los análisis o, al menos, establecer la adecuación de alguna curva anterior mediante la medida de patrones.

A partir de los datos agrupados en las Tablas II-A1 y II-A2 que se encuentran en el Anexo I del presente capítulo, se han establecido, mediante tratamiento estadístico, los valores medios y las desviaciones estándar de las ordenadas en el origen y de las pendientes correspondientes a las curvas de calibrado obtenidas mediante HPLC-UV y GC-MS, agrupadas en las Tablas II.2 y II.3.

Tabla II.2. Valores medios ($n = 6$) y desviaciones estándar (DS) de las ordenadas en el origen y de las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas en días distintos, mediante HPLC-UV, para cada uno de los compuestos carbonílicos.

Compuesto	Ordenada origen \pm DS (voltios·sg)	Pendiente \pm DS (voltios·sg)/(mg/L)
Formaldehído	-0.2 ± 0.1	52.4 ± 0.5
Acetaldehído	-0.4 ± 0.1	40.9 ± 0.2
Acr + Acet	-0.6 ± 0.1	34.1 ± 0.2
Propionaldehído	-0.3 ± 0.1	30.4 ± 0.2
Crotonaldehído	-0.3 ± 0.1	26.7 ± 0.4
Metacroleína	-0.1 ± 0.1	21.1 ± 2.0
Buta + Buti	0.1 ± 0.2	16.9 ± 1.0
Benzaldehído	-0.4 ± 0.1	18.7 ± 0.2
Valeraldehído	-0.5 ± 0.2	21.3 ± 0.1
<i>p</i> -tolualdehído	-0.3 ± 0.1	15.3 ± 0.2
Hexaldehído	-0.5 ± 0.2	18.8 ± 0.3

Al tomar en consideración los valores de las ordenadas en el origen, se observa que los correspondientes al valor medio hallado para cada uno de los compuestos analizados mediante HPLC-UV, suele acercarse mucho más a cero que los representativos de GC-MS. Para esta técnica se obtienen, además, valores individuales que, de forma sistemática, se sitúan en todos los casos por debajo del origen de coordenadas. En cuanto a las pendientes, las desviaciones

estándar con respecto a los valores medios obtenidos a partir de los que se encuentran en los intervalos de confianza, oscilan entre 0.1 y 2.0 (voltios·sg)/(mg/L), y entre 10 y 100 (kilocuentas·sg)/(mg/L), para las pendientes representativas de las curvas de calibrado halladas por HPLC-UV y por GC-MS, respectivamente.

Tabla II.3. Valores medios ($n = 5$) y desviaciones estándar (DS) de las ordenadas en el origen y de las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas en días distintos, mediante GC-MS, para cada uno de los compuestos carbonílicos.

Compuesto	(Ordenada origen \pm DS)·10 ⁻⁵ (cuentas·sg)	(Pendiente \pm DS)·10 ⁻⁵ (cuentas·sg)/(mg/L)
Formaldehído	-4.0 \pm 0.9	12.8 \pm 0.9
Acetaldehído	-1.0 \pm 0.3	6.2 \pm 0.4
Acroleína	-1.2 \pm 0.7	5.9 \pm 0.2
Acetona	-2.0 \pm 0.8	12.4 \pm 1.0
Propionaldehído	-1.1 \pm 0.3	6.5 \pm 0.3
Crotonaldehído	-1.1 \pm 0.5	6.3 \pm 0.7
Metacroleína	-0.9 \pm 0.3	5.7 \pm 0.3
2-Butanona	-1.1 \pm 0.3	7.5 \pm 0.3
Butiraldehído	-0.9 \pm 0.2	5.0 \pm 0.2
Benzaldehído	-0.9 \pm 0.1	2.3 \pm 0.1
Valeraldehído	-0.5 \pm 0.3	3.5 \pm 0.4
Hexaldehído	-0.8 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2

A partir de los resultados obtenidos para HPLC-UV, se observa que las mayores sensibilidades corresponden al formaldehído y acetaldehído, con pendientes de 52.4 y 40.9 (voltios·sg)/(mg/L), mientras que las menores se obtienen con el benzaldehído, *p*-tolualdehído, hexaldehído y el par 2-butanona + butiraldehído, para los que las pendientes halladas oscilan entre 15.3 y 18.8 (voltios·sg)/(mg/L). En cualquier caso, se observan diferencias que pueden catalogarse de moderadas, entre las sensibilidades obtenidas en las determinaciones de los distintos aldehídos y cetonas. También existe una notable similitud entre las correspondientes a los compuestos carbonílicos analizados por GC-MS. En este caso, las mayores sensibilidades se obtienen para el formaldehído y acetona, cuyas curvas de

calibrado presentan pendientes de 1280 y 1240 (kilocuentas·sg)/(mg/L), mientras que las menores corresponden al benzaldehído, valeraldehído y hexaldehído con pendientes que oscilan entre 200 y 350 (kilocuentas·sg)/(mg/L).

Para establecer comparaciones, obviando las unidades de las señales proporcionadas por los detectores, se han calculado los valores normalizados de las pendientes medias de las curvas de calibrado, con respecto a la correspondiente al formaldehído, a la que corresponde el mayor valor. Los resultados obtenidos se han representado en la Figura II.5.

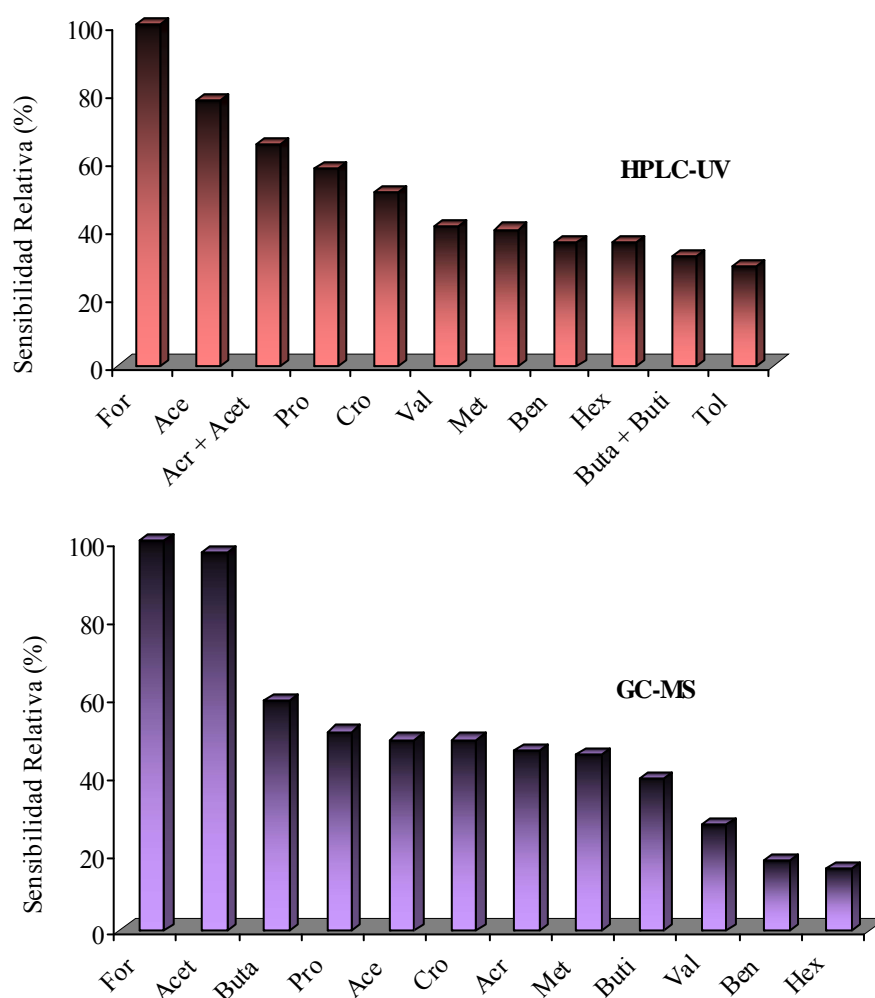


Figura II.5. Sensibilidades normalizadas con respecto al formaldehído.

Los resultados obtenidos para GC-MS ponen de manifiesto que los compuestos de menor peso molecular de cada familia: formaldehído y acetona destacan por su sensibilidad relativa, los correspondientes a los aldehídos lineales de 2, 3 y 4 átomos de carbono y a las

cetonas utilizadas presentan valores que representan entre un 39 y un 59% de la sensibilidad obtenida para el formaldehído, mientras que los aldehídos de mayor peso molecular, presentan sensibilidades que suponen entre un 16 y un 27% del compuesto de referencia. En HPLC-UV, la disminución de las sensibilidades de los compuestos carbonílicos parece tener mayor relación con el peso molecular de los compuestos que con su estructura.

En la Figura II.6 se han representado las sensibilidades normalizadas de aquellos compuestos carbonílicos separados de forma individual mediante ambas metodologías. Se observa que, en términos relativos, las sensibilidades correspondientes a las determinaciones efectuadas por cromatografía de gases son, en general, inferiores a las establecidas cuando se emplea HPLC-UV.

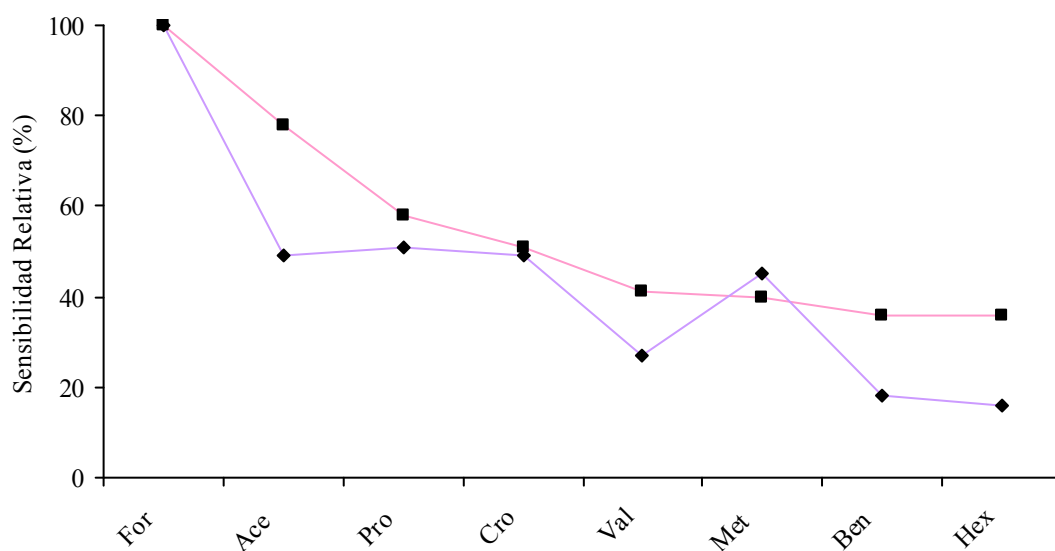


Figura II.6. Sensibilidades relativas para distintos aldehídos determinados por HPLC-UV (■) y por GC-MS (◆).

En otro orden de cosas, los resultados que se acaban de comentar nos han llevado a cuestionarnos si las metodologías que venimos comparando proporcionan resultados similares, o si existen diferencias significativas entre las concentraciones establecidas con la utilización de cada una de ellas para un mismo patrón. Con tal finalidad se ha realizado la prueba *t* por parejas, según la cual si adoptamos la hipótesis nula, es decir, que no existen diferencias significativas en las concentraciones dadas por ambos métodos, se puede probar si la media de las diferencias difiere significativamente de cero. Para la realización de este

estudio se han sometido a comparación valores de concentración que coinciden en ambas curvas de calibrado.

Para comparar los resultados obtenidos por las curvas de calibrado realizadas en un mismo día mediante los dos métodos analíticos, las diferentes concentraciones de un mismo analito, establecidas a partir de HPLC-UV con la utilización de diferentes patrones, se representan en el eje de abscisas de un gráfico, mientras que en el eje de ordenadas se incluyen las concentraciones halladas, para los mismos patrones, mediante GC-MS. De esta forma, cada uno de los puntos de la gráfica representa un mismo patrón analizado por los dos métodos separados. Si los resultados obtenidos para las distintas parejas de patrones son idénticos, se obtendrá una recta cuya ordenada en el origen será cero, que presentará una pendiente con un valor unidad y un coeficiente de correlación igual a 1.

En la Tabla II.4 se han incluido datos representativos de las rectas obtenidas al comparar los resultados al utilizar ambas metodologías. Como se observa, no aparecen resultados correspondientes al formaldehído por haber utilizado concentraciones diferentes para construir, en HPLC-UV y GC-MS, las curvas de calibrado. Tampoco se han comparado los resultados correspondientes a la acroleína y acetona, así como a la 2-butanona y butiraldehído, porque en la metodología que utiliza HPLC-UV se cuantifican como pares, mientras que con GC-MS se determinan individualmente. En el caso del *p*-tolualdehído, al

Tabla II.4. Parámetros representativos de las rectas obtenidas al comparar las concentraciones de compuestos carbonílicos obtenidas por HPLC-UV y GC-MS.

Compuesto	Pendiente	Ordenada Origen	R ²	<i>t</i> _{cal}	n
Acetaldehído	0.979	0.009	0.985	0.11	7
Propionaldehído	1.012	0.001	0.987	0.90	7
Crotonaldehído	1.059	-0.024	0.995	0.85	7
Metacroleína	0.996	-0.005	0.987	0.98	7
Benzaldehído	0.946	0.049	0.935	0.82	4
Valeraldehído	1.067	-0.028	0.977	0.38	7
Hexaldehído	1.053	-0.034	0.965	0.44	5

nivel de concentraciones estudiado no se detecta al emplear la metodología basada en el empleo de GC-MS.

La Figura II.7, referida a la comparación entre los resultados obtenidos con ambas metodologías analíticas, en el caso del acetaldehído, puede considerarse representativa de las que se obtienen para los distintos compuestos carbonílicos.

De los resultados calculados para cada una de las curvas obtenidas, se desprende que la pendiente y ordenada en el origen no difieren de forma significativa de los valores 1 y 0, respectivamente, y por lo tanto, puede admitirse que no existen diferencias sistemáticas entre las dos series de resultados. Además, el valor de t calculado es menor que el valor de t tabulado (2.45 para $n = 7$, 2.78 para $n = 5$ y 4.30 para $n = 4$) en todos los compuestos y para todas las curvas obtenidas en días diferentes, por lo que se acepta la hipótesis de que ambos métodos no dan valores significativamente diferentes para las concentraciones de los compuestos carbonílicos separados y cuantificados como hidrazonas.

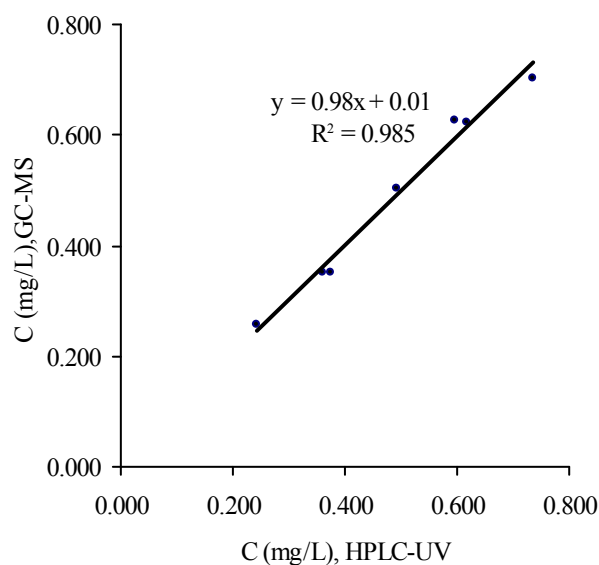


Figura II.7. Comparación de los resultados obtenidos para determinaciones de acetaldehído por HPLC-UV y GC-MS.

Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección (LDs) y los límites de cuantificación (LQs), para cada uno de los compuestos carbonílicos en estudio, fueron calculados como 3 y 10 veces la desviación estándar residual, dividida por la pendiente de las curvas de calibración establecidas en las mismas condiciones, día a día [45]. En la Tabla II.5 se han agrupado el rango y la medias de los valores de LDs calculados a partir de las curvas de calibrado representativas de las experiencias realizadas en días diferentes.

Tabla II.5. Límites de detección (mg/L) para los diferentes compuestos estudiados.

Compuesto	LDs (HPLC-UV)			LDs (GC-MS)		
	Mín.	Media	Máx.	Mín.	Media	Máx.
Formaldehído	0.016	0.028	0.040	0.084	0.116	0.145
Acetaldehído	0.006	0.021	0.032	0.049	0.058	0.063
Acr + Acet	0.008	0.031	0.043			
Acroleína				0.046	0.062	0.081
Acetona				0.027	0.052	0.070
Propionaldehído	0.012	0.018	0.023	0.043	0.059	0.074
Crotonaldehído	0.012	0.027	0.051	0.039	0.061	0.076
Metacroleína	0.017	0.034	0.054	0.032	0.054	0.070
Buta + Buti	0.044	0.077	0.126			
2-Butanona				0.027	0.050	0.077
Butiraldehído				0.052	0.059	0.069
Benzaldehído	0.028	0.036	0.048	0.040	0.054	0.065
Valeraldehído	0.026	0.041	0.059	0.025	0.060	0.085
<i>p</i> -tolualdehído	0.029	0.043	0.057			
Hexaldehído	0.033	0.050	0.064	0.030	0.053	0.068

Puede observarse que, cuando se utiliza la metodología basada en el uso de HPLC-UV, los valores de los límites de detección hallados para los distintos aldehídos y cetonas presentan valores medios comprendidos entre 0.018 y 0.077 mg/L, con valores individuales que oscilan entre 0.006 mg/L y 0.126 mg/L. Al efectuar las medidas a partir de

los cromatogramas obtenidos en GC-MS, se observa que el límite de detección medio hallado para el formaldehído es 0.116 mg/L, mientras los correspondientes a los restantes compuestos carbonílicos estudiados presentan valores muy cercanos entre sí, comprendidos entre 0.050 y 0.062 mg/L. En este caso, exceptuando al formaldehído, los valores individuales oscilan entre 0.025 mg/L y 0.085 mg/L.

En la Figura II.8 se han representado los límites de detección de algunos compuestos carbonílicos obtenidos a partir curvas de calibrado construidas mediante las dos técnicas analíticas utilizadas. Es evidente que los límites de detección son inferiores cuando se emplea HPLC-UV, especialmente para los aldehídos de menor tamaño.

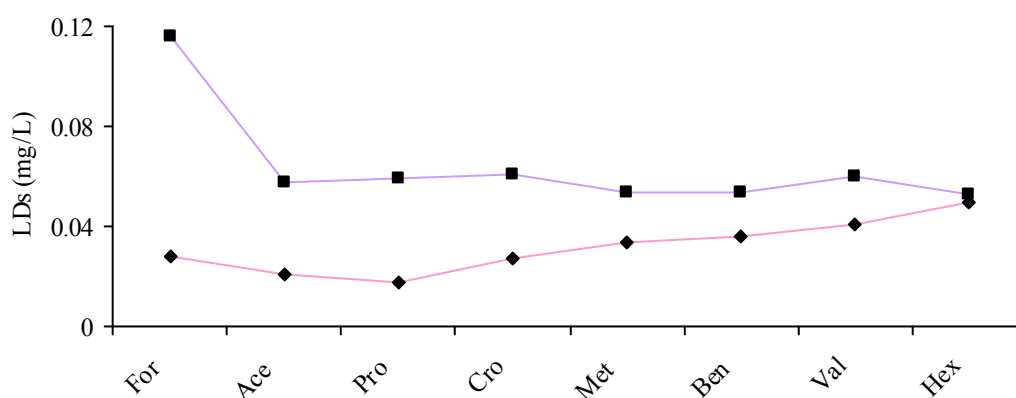


Figura II.8. Límites de detección de compuestos carbonílicos calculados a partir de curvas de calibrado establecidas mediante GC-MS (■) y HPLC-UV (◆).

Precisión y exactitud

Con objeto de determinar la precisión intermedia y la exactitud asociadas a la determinación de cada uno de los compuestos carbonílicos, se analizaron repetidamente tres patrones, cada uno de ellos con concentraciones incluidas en el rango de linealidad de cada compuesto, que se preparaban cada día a partir de la disolución patrón madre.

En las Tablas II.6 y II.7 se encuentran las precisiones intermedias (precisiones inter-días) y las exactitudes, expresadas como desviaciones estándar relativas, DSR (%) y como errores relativos, ER (%), respectivamente. Estos parámetros se calcularon para cada compuesto y para cada uno de los tres niveles de concentración estudiados.

Tabla II.6. Precisión intermedia y exactitud para los distintos compuestos carbonílicos analizados mediante HPLC-UV.

Compuesto	Concentración añadida (mg/L)	^a Concentración media hallada (mg/L)	DSR (%)	ER (%)
Formaldehído	0.061	0.061	4.8	0.1
	0.279	0.272	1.3	2.4
	0.500	0.492	1.6	1.6
Acetaldehído	0.139	0.137	2.4	1.9
	0.369	0.367	1.8	0.5
	0.610	0.608	1.1	0.4
Acr + Acet	0.279	0.273	2.4	2.0
	0.737	0.733	1.8	0.6
	1.221	1.214	1.1	0.6
Propionaldehído	0.139	0.136	3.2	2.5
	0.369	0.370	1.4	0.3
	0.610	0.605	1.5	0.8
Crotonaldehído	0.139	0.138	3.4	0.8
	0.369	0.366	2.9	0.8
	0.610	0.615	1.4	0.8
Metacroleína	0.139	0.135	4.3	3.1
	0.369	0.370	3.0	0.4
	0.610	0.608	3.1	0.3
Buta + Buti	0.279	0.256	6.5	8.2
	0.737	0.733	4.9	0.6
	1.221	1.190	3.3	2.5
Benzaldehído	0.139	0.136	4.6	2.6
	0.369	0.362	3.3	1.8
	0.610	0.606	1.9	0.7
Valeraldehído	0.139	0.133	6.1	4.4
	0.369	0.360	2.3	2.4
	0.610	0.596	4.5	2.3
<i>p</i> -tolualdehído	0.139	0.135	7.8	2.9
	0.369	0.367	3.7	0.5
	0.610	0.602	2.5	1.3
Hexaldehído	0.139	0.138	6.6	1.1
	0.369	0.364	5.3	1.2
	0.610	0.604	3.4	1.1

^aCada una de las disoluciones se inyecta durante seis días por duplicado (n = 12).

Tabla II.7. Precisión intermedia y exactitud para los distintos compuestos carbonílicos analizados mediante GC-MS.

Compuesto	Concentración añadida (mg/L)	^a Concentración media hallada (mg/L)	DSR (%)	ER (%)
Formaldehído	0.737	0.758	8.9	2.8
	1.221	1.189	3.8	2.6
	1.700	1.693	1.5	0.4
Acetaldehído	0.369	0.369	6.1	0.2
	0.610	0.616	2.5	0.9
	0.850	0.849	2.4	0.2
Acroleína	0.369	0.381	5.2	3.4
	0.610	0.607	5.5	0.6
	0.850	0.848	3.8	0.2
Acetona	0.369	0.376	4.9	2.1
	0.610	0.593	3.4	2.9
	0.850	0.859	2.8	1.0
Propionaldehído	0.369	0.389	7.7	5.5
	0.610	0.617	3.6	1.1
	0.850	0.850	3.0	0.1
Crotonaldehído	0.369	0.342	20	7.3
	0.610	0.599	11	1.9
	0.850	0.821	7.4	3.4
Metacroleína	0.369	0.380	11	3.2
	0.610	0.627	5.0	2.7
	0.850	0.862	4.4	1.4
2-Butanona	0.369	0.375	5.8	1.8
	0.610	0.618	7.1	1.2
	0.850	0.861	3.7	1.3
Butiraldehído	0.369	0.377	6.5	2.4
	0.610	0.608	3.4	0.4
	0.850	0.851	2.3	0.2
Benzaldehído	-	-	-	-
	0.610	0.632	7.2	3.5
	0.850	0.855	4.6	0.6
Valeraldehído	0.369	0.375	6.9	1.8
	0.610	0.608	3.5	0.4
	0.850	0.857	2.6	0.8
Hexaldehído	-	-	-	-
	0.610	0.612	4.4	0.3
	0.850	0.830	5.6	2.4

^a Cada una de las disoluciones se inyecta durante cinco días por duplicado (n = 10).

Como cabía esperar, los mayores valores de DSR se obtuvieron para los niveles más bajos de concentración, seleccionados en las proximidades de los respectivos LQs. En general, los valores hallados para este nivel más bajo, comprendidos entre un 2.4% y un 7.8%, son inferiores cuando los distintos derivados se separan mediante HPLC-UV. Cuando se utiliza GC-MS, se obtienen valores de DSR para el nivel más bajo que oscilan entre 4.9 y 11%, excepto en el caso del crotonaldehído para el que se alcanza un 20%.

En cuanto al error relativo, al utilizar HPLC-UV, los valores para los niveles más bajos de concentración oscilaron entre un 0.1 y 4.4%, excepto con el par 2-butanona + butiraldehído para el que se alcanzó un 8.3%. Las determinaciones realizadas mediante GC-MS presentan, también para los niveles inferiores de concentración, errores relativos inferiores al 5.5%, excepto en el caso del crotonaldehído para el que se alcanzó un 7.3%.

Al comparar los parámetros de la validación, HPLC-UV ofrece mejores características que GC-MS, como se puede observar en la precisión y en los errores relativos que se obtienen en la determinación de los diferentes compuestos carbonílicos. Por otro lado, los límites de detección alcanzados en HPLC-UV son generalmente más bajos que los obtenidos por GC-MS, sobre todo para los compuestos de menor peso molecular.

II.3.3. CÁLCULO DE INCERTIDUMBRES

Como ya se ha comentado, el cálculo de incertidumbres a aplicar se corresponde con la estrategia propuesta por la ISO también conocida como “bottom-up”, basada en identificar, cuantificar y combinar todas las fuentes de incertidumbre de un procedimiento analítico. Nuestro objetivo es estimar la incertidumbre asociada a la medida de una muestra y al proceso de calibración mediante las técnicas de HPLC-UV y GC-MS, asociadas a la cuantificación de 13 compuestos carbonílicos, previamente convertidos en sus correspondientes hidrazonas por derivatización con DNPH, así como comparar los resultados obtenidos mediante los dos métodos y elegir aquél con el que obtenemos la menor incertidumbre.

Incertidumbre derivada de la estimación de la concentración de analito desde la curva de calibrado, $u(CC)$

Como ya hemos comentado en la introducción, la evaluación de la incertidumbre total de un resultado analítico debe comprender todas las fuentes de incertidumbre que contribuyen al resultado analítico.

Con objeto de modelar el proceso de medida e identificar todas las fuentes de incertidumbre, en la Figura II.9 se representa el diagrama de flujo de la acumulación de incertidumbres en el proceso de cuantificación de los compuestos carbonílicos derivatizados, mediante HPLC-UV y GC-MS.

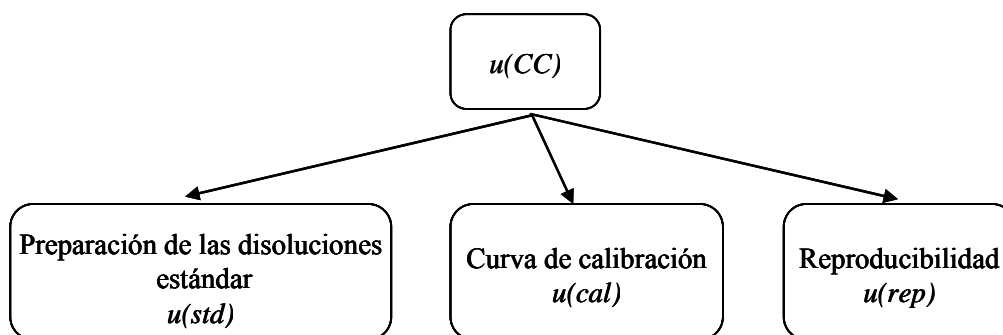


Figura II.9. Diagrama de flujo de la acumulación de la incertidumbre en la determinación de los compuestos carbonílicos.

Si sólo consideramos la incertidumbre del proceso de cuantificación, las fuentes de incertidumbre pueden limitarse a la medida de la señal analítica de la muestra y al proceso de calibración. La incertidumbre derivada de la estimación de la concentración del analito desde la curva de calibrado, $u(CC)$, es una combinación de las incertidumbres asociadas a la preparación de las disoluciones estándar usadas para trazar las curvas de calibrado, $u(std)$, la transformación de la señal cromatográfica en concentraciones, por interpolación en la curva de calibrado, $u(cal)$, y la reproducibilidad de las medidas, $u(rep)$. En consecuencia, la incertidumbre combinada se puede calcular a través de la expresión:

$$u(CC) = \sqrt{u^2(std) + u^2(cal) + u^2(rep)}$$

En algunos casos, es más práctico el uso de incertidumbres relativas, que representan el valor de la incertidumbre normalizada. Así, para una concentración dada C_i , se obtiene como el cociente entre la incertidumbre estándar $u(CC)$ y la concentración C_i :

$$u_{rel}(CC) = \frac{u(CC)}{C_i}$$

y, por tanto, la incertidumbre relativa estándar combinada se puede expresar también de la siguiente forma:

$$u_{rel}(CC) = \sqrt{u_{rel}^2(std) + u_{rel}^2(cal) + u_{rel}^2(rep)}$$

Incertidumbre asociada con la preparación de las disoluciones estándar, $u(std)$

La preparación de las disoluciones estándar para la construcción de las curvas de calibrado, conlleva una serie de diluciones a partir de la disolución estándar original, tal y como se detalla en el desarrollo experimental (apartado II.2.3). La incertidumbre asociada con la preparación de las disoluciones estándar viene dada por la expresión:

$$u_{rel}(std) = \sqrt{u_{rel}^2(ps) + u_{rel}^2(ss) + u_{rel}^2(ccs)}$$

Esta incertidumbre se estima para cada compuesto, siendo una combinación de la incertidumbre derivada de la preparación de la primera disolución estándar, $u_{rel}(ps)$, de la segunda disolución estándar, $u_{rel}(ss)$, y de la preparación de los patrones de la curva de calibrado, $u_{rel}(ccs)$, por dilución de la segunda disolución estándar.

La concentración de la primera disolución estándar viene dada por la dilución a 5 mL, (V_{f1}), de la disolución de la mezcla de los estándares que contiene los 13 compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH:

$$u_{rel}(ps) = \sqrt{u_{rel}^2(sm) + u_{rel}^2(V_{f1})}$$

La incertidumbre relativa asociada con la masa de cada estándar $u_{rel}(sm)$ se estimó usando los datos procedentes del certificado de análisis de la disolución de la mezcla de los

estándares, y viene dada por la desviación estándar dividida por la concentración funcional gravimétrica:

$$u_{rel}(sm) = \frac{ds}{C}$$

Los datos necesarios para el cálculo de esta incertidumbre se encuentran en la Tabla II.8.

Tabla II.8. Material volumétrico y compuestos carbonílicos derivatizados usados para la preparación de los estándares.

Micropipeta		Composición de las disoluciones estándar		
^a Error (%)	^b DS	Compuesto	Concentración gravimétrica funcional (mg/L)	DS
1.80 (20)	0.28 (30)	Acetaldehído-2,4-DNPH	20.05	0.05
0.80 (50)	0.36 (50)	Acetona-2,4-DNPH	20.00	0.04
0.80 (100)	0.39 (80)	Acroleína-2,4-DNPH	19.94	0.02
	0.24 (100)	Benzaldehído-2,4-DNPH	19.98	0.03
		Butiraldehído-2,4-DNPH	20.01	0.04
		Crotonaldehído-2,4-DNPH	20.18	0.03
		Formaldehído-2,4-DNPH	40.01	0.06
0.8 (200)	0.66 (200)	Hexaldehído-2,4-DNPH	19.97	0.07
0.7 (500)	0.94 (400)	Metacroleína-2,4-DNPH	20.17	0.03
0.6 (1000)	1.31 (640)	<i>p</i> -tolualdehído-2,4-DNPH	20.00	0.04
	1.24 (1000)	Propionaldehído-2,4-DNPH	19.99	0.03
		Valeraldehído-2,4-DNPH	20.08	0.05
		2-Butanona-2,4-DNPH	20.01	0.02

^a Los valores entre paréntesis corresponden a los volúmenes (μL) para los que el fabricante ha establecido el valor del error relativo.

^b Los valores entre paréntesis se corresponden con los volúmenes (μL) para los que se ha calculado la desviación estándar establecida por pesada.

La incertidumbre asociada con el volumen de dilución se calculó a partir de la tolerancia del matraz volumétrico usado, ± 0.02, asumiendo una distribución triangular,

$$u(V_{f1}) = 0.02 / \sqrt{6} :$$

$$u_{rel}(V_{f1}) = \frac{0.02 / \sqrt{6}}{V_{f1}}$$

La incertidumbre asociada a la preparación de la segunda disolución estándar viene dada por el volumen (V_{p1}) tomado con una micropipeta de la primera disolución estándar y el volumen (V_{f2}) al que se lleva la segunda disolución estándar. Así, obtenemos:

$$u_{rel}(ss) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{p1}) + u_{rel}^2(V_{f2})}$$

Donde $u(V_{f1}) = u(V_{f2}) = 0.02 / \sqrt{6}$.

La incertidumbre asociada con el volumen tomado con las micropipetas se calculó como la suma cuadrática de las incertidumbres asociadas con la calibración de las micropipetas, $u(mc)$ y la repetitividad, $u(rept)$:

$$u(V_{p1}) = \sqrt{u^2(mc) + u^2(rept)}$$

El valor de $u(mc)$ se calculó a partir de la exactitud, error relativo (%), dado por el fabricante. En nuestro caso, el fabricante no especificó el tipo de distribución, por lo que se supuso una distribución triangular y por tanto fue necesario dividir por la raíz de 6:

$$u(mc) = \frac{Er(\%)}{\sqrt{6} \cdot 100}$$

Mientras que $u(rept)$ fue evaluada como la desviación estándar obtenida usando un método gravimétrico. La repetitividad se obtuvo, para todos los volúmenes, haciendo 10 medidas con una sola micropipeta y una sola punta. La Tabla II.8 muestra los datos usados para el cálculo de estos términos. Cuando el volumen tomado es diferente al valor tabulado, los valores del error y la desviación estándar se obtuvieron por interpolación:

$$u(rept) = ds$$

Al intentar establecer la incertidumbre asociada con la preparación de los patrones de la curva de calibrado, aparece los términos: V_{p2} , que es el volumen tomado con la micropipeta desde la segunda disolución estándar y V_{p3} , que es el volumen de acetonitrilo tomado con la micropipeta para diluir hasta un volumen de 1 mL:

$$u_{rel}(CCS) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{p2}) + u_{rel}^2(V_{p3})}$$

La Tabla II.9 muestra los valores de V_{p2} utilizados para la preparación de cada uno de los estándares necesarios para obtener la curva de la calibración.

Tabla II.9. Datos para el cálculo de la incertidumbre asociada con la preparación de las disoluciones estándar.

Método	Compuesto	C (mg/L)	^a V_{p2} (μL)	
HPLC-UV	Formaldehído	0.061	30	
		0.172	84	
		0.279	136	
		0.389	190	
		0.500	244	
	Acetaldehído, Acroleína + Acetona, Propionaldehído, Crotonaldehído, Metacroleína, 2-Butanona + Butiraldehído, Benzaldehído, Valeraldehído, <i>p</i> -tolualdehído, Hexaldehído	0.031	30	
		0.139	136	
		0.250	244	
		0.369	360	
		0.489	478	
		0.610	596	
		0.729	712	
		Formaldehído	0.500	244
			0.737	360
0.979	478			
1.221	596			
1.458	712			
1.700	830			
1.941	948			
GC-MS	Acetaldehído, Acetona, Propionaldehído, Acroleína, 2-Butanona, Metacroleína, Butiraldehído, Crotonaldehído, Valeraldehído, Hexaldehído, Benzaldehído		0.250	244
			0.369	360
		0.489	478	
		0.610	596	
		0.729	712	
		0.850	830	
		0.971	948	

^a $V_{p2} + V_{p3} = 1$ mL.

Incertidumbre asociada a la transformación de las señales cromatográficas en concentraciones, $u(cal)$

El proceso de calibración está basado en las curvas de regresión lineal obtenidas representando la respuesta instrumental frente a las concentraciones estándar, siendo la respuesta analítica elegida el área de los picos.

La incertidumbre derivada de la estimación de la concentración de cada compuesto desde la curva de calibración se estima aplicando la expresión de la regresión de los mínimos cuadrados residuales:

$$u(cal) = \frac{1}{b} \sqrt{S_{y/x}^2 \cdot \left(\frac{1}{n}\right) + (x_0 - \bar{x})^2 \cdot S_b^2}$$

Donde b es la pendiente de la curva de calibrado, $S_{y/x}$ la desviación estándar de los residuales, x_0 la concentración del compuesto para cada nivel de concentración estudiado, \bar{x} representa la media de todos los estándares usados en la curva de calibración, S_b la desviación estándar de la pendiente de la curva de calibrado y n el número de valores de concentración de la regresión lineal. Para cada nivel de concentración donde se ha estudiado la reproducibilidad, se elige el valor más desfavorable de la incertidumbre entre los 6 y 5 días de estudio de las curvas realizadas para ambos métodos.

Incertidumbre asociada a la reproducibilidad de las medidas, $u(rep)$

Para estimar la incertidumbre asociada a la precisión, dos alícuotas de cada nivel de concentración fueron analizadas en condiciones de repetitividad durante 6 días mediante HPLC-UV y 5 días mediante GC-MS, como se ha indicado en el apartado dedicado a la precisión y exactitud, II.3.2.

La incertidumbre asociada a la reproducibilidad de las medidas, $u(rep)$, viene dada por la expresión:

$$u(rep) = \frac{Ds}{\sqrt{r}}$$

Siendo Ds la desviación estándar y r el número de réplicas de cada muestra cuando se analiza en análisis rutinarios. Hemos asumido que en análisis rutinarios las muestras se determinarían solamente una vez, con lo cual $r = 1$.

Una vez obtenidas todas las expresiones para el cálculo de la incertidumbre, estamos en disposición de calcular todas las contribuciones de la incertidumbre de forma individual. Así, en la Figura II.10 se muestra la incertidumbre parcial relativa calculada para cada fuente

de incertidumbre identificada para todos los compuestos analizados por ambos métodos. Se puede observar que el factor que más influye en la incertidumbre combinada está asociado a la reproducibilidad de las medidas.

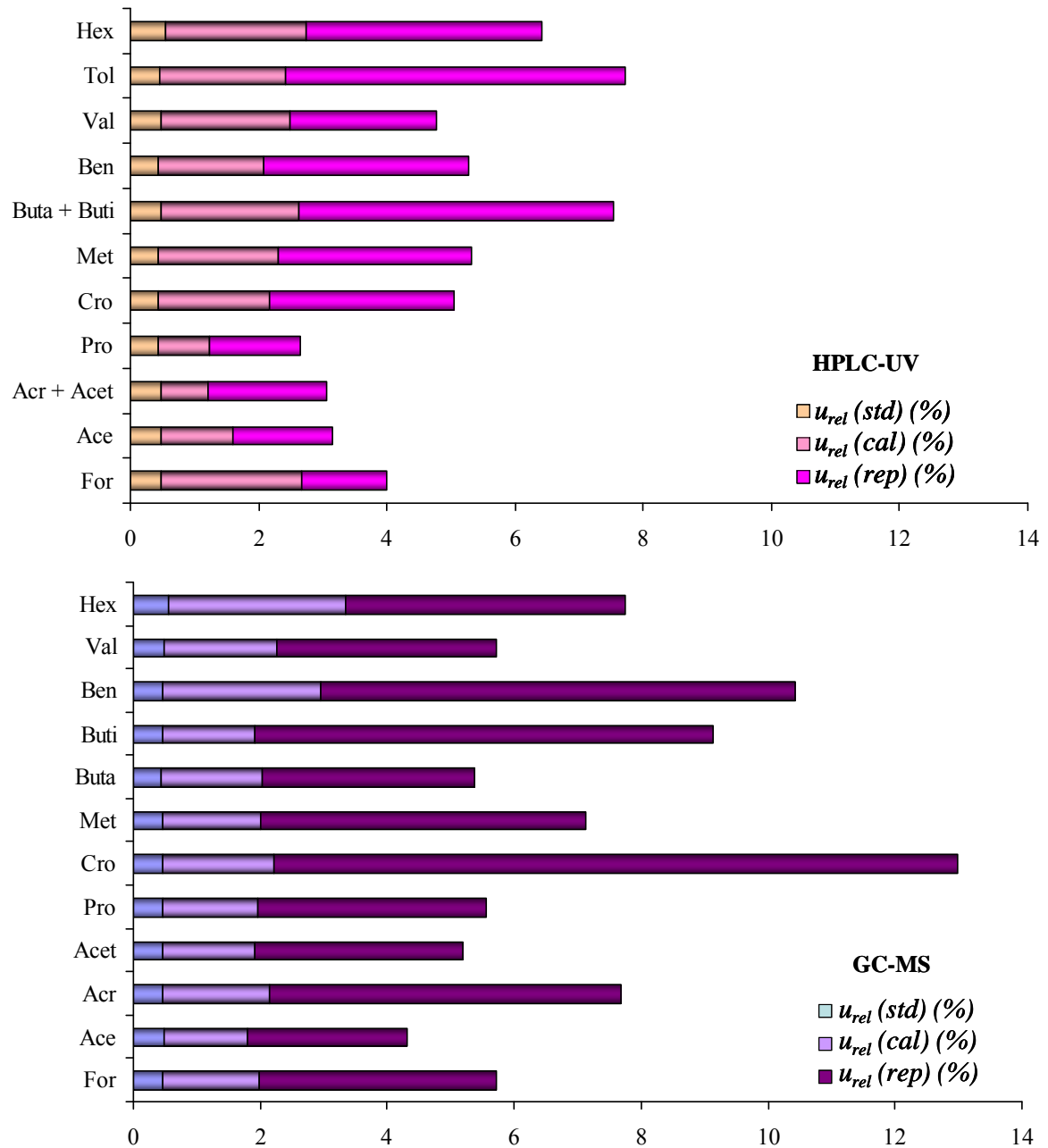


Figura II.10. Diagramas para las incertidumbres parciales relativas correspondientes a todos los compuestos analizados por HPLC-UV y GC-MS, para el nivel intermedio de concentración estudiado.

En general, el análisis por GC-MS presenta un mayor nivel de incertidumbre que el análisis por HPLC-UV y viene afectado por el nivel en el que se ha obtenido la precisión. Como puede observarse en la Figura II.11, esta componente de la incertidumbre aumenta cuando la concentración disminuye.

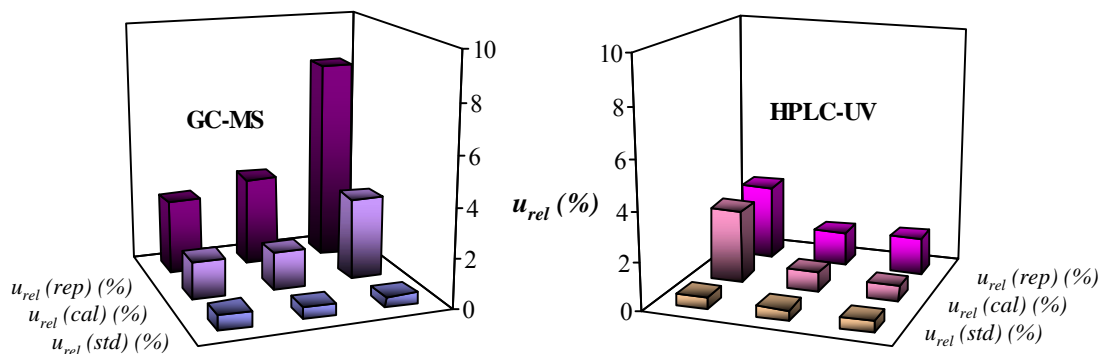


Figura II.11. Diagramas correspondientes a las diferentes componentes de la incertidumbre, en el caso del propionaldehído, para cada uno de los niveles de concentración estudiados.

La contribución de la incertidumbre asociada a la preparación de las disoluciones estándar no es significativa, comparada con la contribución de las incertidumbres asociadas a la curva de calibrado y a la precisión, y no depende del nivel de concentración considerado.

Finalmente, la contribución de la incertidumbre asociada a la curva de calibrado es comparable en ambos métodos y como cabe esperar, presenta valores máximos para bajos niveles de concentración y cercanos a los límites de cuantificación.

La Tabla II.10 muestra la incertidumbre relativa combinada en los diferentes niveles de concentración para ambos métodos. Las mayores incertidumbres pueden estar asociadas al análisis por GC-MS y a los niveles de concentración bajos. Así, en el análisis por GC-MS los valores medios obtenidos para cada uno de los niveles de concentración considerados son: 9.1%, 5.4% y 4.1%, mientras que los obtenidos en el análisis por HPLC-UV son: 8.7%, 3.4% y 2.8%, para los mismos niveles de concentración.

Tabla II.10. Incertidumbre relativa combinada (%) en los diferentes niveles de concentración estudiados en los métodos de HPLC-UV y GC-MS.

Compuesto	^a HPLC-UV			GC-MS		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
Formaldehído	18	2.6	2.6	9.7	4.1	2.1
Acetaldehído	5.2	2.0	1.6	6.8	2.9	2.8
Acr + Acet	3.7	2.0	1.3			
Acroleína				6.8	5.8	4.2
Acetona				5.9	3.6	3.3
Propionaldehído	4.3	1.7	1.7	8.8	3.9	3.4
Crotonaldehído	7.5	3.4	2.2	19	11	7.3
Metacroleína	8.3	3.6	3.5	12	5.4	4.8
Buta + Buti	10	5.4	3.7			
2-Butanona				7.5	3.7	2.9
Butiraldehído				6.7	7.4	4.1
Benzaldehído	7.7	3.6	2.4	^b ND	7.9	4.9
Valeraldehído	9.6	3.1	4.7	8.2	3.9	3.2
<i>p</i> -tolualdehído	9.9	5.7	3.9			
Hexaldehído	12	4.3	3.1	ND	5.4	5.7

^a La concentración correspondiente a los niveles 1, 2 y 3, para ambos métodos, se encuentra en las Tablas II.6 y II.7.

^b No detectado.

Incertidumbre expandida y sus contribuciones

Como ya se comentó en la introducción, otra forma de expresar la incertidumbre es mediante la incertidumbre expandida, que define un intervalo con un nivel de probabilidad que incluye el valor del mensurando y que se obtiene multiplicando la incertidumbre total combinada por el factor de cobertura k . La expresión sería:

$$U(x) = k \cdot u(x)$$

Con objeto de proporcionar un nivel de confianza del 95% para los resultados finales obtenidos, las incertidumbres expandidas se obtuvieron multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura $k = 2$. En el Anexo II se ha incluido, a modo de ejemplo,

el cálculo de la incertidumbre asociada a la determinación de formaldehído, mientras que en la Tabla II.11 se agrupan los resultados finales para la determinación de los compuestos carbonílicos mediante HPLC-UV y GC-MS, para el nivel de concentración más bajo, al que las incertidumbres son mayores.

Tabla II.11. Incertidumbre expandida, obtenida para el nivel de concentración más bajo, para los compuestos carbonílicos analizados mediante HPLC-UV y GC-MS.

Compuesto	HPLC-UV C (mg/L)	GC-MS C (mg/L)
Formaldehído	0.06 ± 0.02	0.74 ± 0.14
Acetaldehído	0.14 ± 0.01	0.37 ± 0.05
Acr + Acet	0.28 ± 0.02	
Acroleína		0.37 ± 0.05
Acetona		0.37 ± 0.04
Propionaldehído	0.14 ± 0.01	0.37 ± 0.06
Crotonaldehído	0.14 ± 0.02	0.37 ± 0.14
Metacroleína	0.14 ± 0.02	0.37 ± 0.08
Buta + Buti	0.28 ± 0.06	
2-Butanona		0.37 ± 0.06
Butiraldehído		0.37 ± 0.05
Benzaldehído	0.14 ± 0.02	* ND
Valeraldehído	0.14 ± 0.03	0.37 ± 0.06
<i>p</i> -tolualdehído	0.14 ± 0.03	
Hexaldehído	0.14 ± 0.03	ND

* No detectado.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que, en las incertidumbres calculadas se observa que la contribución debida a la preparación de las disoluciones estándares no es significativa. La incertidumbre asociada con la estimación de las concentraciones de los compuestos a partir de las curvas de la calibración es similar para ambas metodologías, o ligeramente menor cuando se usa HPLC-UV. La causa de la mayor incertidumbre, sobre todo, cuando se usa GC-MS, es la reproducibilidad de las medidas.

Por tanto, los resultados de estimación de la incertidumbre de la medida para ambos métodos, demuestran que HPLC-UV es el más apropiado para el análisis de compuestos carbonílicos en muestras medioambientales y agroalimentarias utilizadas a lo largo de este trabajo.

ANEXO I

**PARÁMETROS DEL ANÁLISIS DE REGRESIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRADO
CORRESPONDIENTES A LOS DISTINTOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS**

Tabla II-A1. Calibrados obtenidos diferentes días por HPLC-UV.

<i>Formaldehído</i>						
Día	Ordenada Origen (voltios·sg)	^a S _{o.o.}	Pendiente (voltios·sg)/ (mg/L)	^b S _b	^c S _{y/x}	R ²
1	-0.037	0.560	51.2	1.748	0.604	0.996
2	-0.238	0.258	53.0	0.805	0.278	0.999
3	-0.018	0.373	51.9	1.166	0.403	0.998
4	-0.329	0.594	52.2	1.857	0.642	0.996
5	-0.200	0.307	52.3	0.959	0.332	0.999
6	-0.049	0.666	53.3	2.082	0.720	0.995

<i>Acetaldehído</i>						
Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.593	0.315	41.2	0.714	0.442	0.998
2	-0.311	0.061	40.7	0.139	0.086	0.999
3	-0.412	0.208	41.0	0.471	0.292	0.999
4	-0.473	0.240	40.9	0.544	0.337	0.999
5	-0.425	0.238	40.3	0.541	0.335	0.999
6	-0.412	0.137	41.3	0.309	0.192	0.999

<i>Acroleína + Acetona</i>						
Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.758	0.317	34.4	0.359	0.445	0.999
2	-0.456	0.068	34.1	0.077	0.095	0.999
3	-0.987	0.304	35.0	0.345	0.427	0.999
4	-0.583	0.349	33.8	0.395	0.489	0.999
5	-0.567	0.264	34.0	0.299	0.371	0.999
6	-0.605	0.236	34.4	0.267	0.331	0.999

Propionaldehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.473	0.173	31.4	0.392	0.243	0.999
2	-0.437	0.088	30.7	0.200	0.124	0.999
3	-0.357	0.152	30.3	0.344	0.213	0.999
4	-0.173	0.133	30.2	0.301	0.186	0.999
5	-0.078	0.115	30.0	0.261	0.162	0.999
6	-0.268	0.120	30.6	0.271	0.168	0.999

Crotonaldehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.427	0.275	26.2	0.623	0.386	0.997
2	-0.172	0.148	26.7	0.335	0.208	0.999
3	-0.297	0.082	27.1	0.187	0.116	0.999
4	0.183	0.289	24.0	0.655	0.406	0.996
5	-0.387	0.114	26.3	0.259	0.161	0.999
6	-0.206	0.076	27.1	0.172	0.107	0.999

Metacroleína

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.173	0.230	21.1	0.522	0.324	0.997
2	0.112	0.207	16.1	0.470	0.291	0.996
3	-0.139	0.099	17.7	0.225	0.140	0.999
4	-0.009	0.202	21.7	0.459	0.284	0.998
5	-0.054	0.118	22.0	0.268	0.166	0.999
6	-0.148	0.094	23.1	0.213	0.132	0.999

2-Butanona + Butiraldehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	0.096	0.216	15.9	0.245	0.304	0.999
2	0.322	0.409	13.7	0.464	0.574	0.994
3	-0.135	0.180	16.1	0.204	0.253	0.999
4	0.274	0.456	17.9	0.517	0.640	0.996
5	0.080	0.328	17.6	0.371	0.460	0.998
6	0.077	0.200	19.0	0.227	0.281	0.999

Benzaldehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.292	0.210	18.6	0.476	0.295	0.997
2	-0.460	0.145	19.0	0.329	0.204	0.998
3	-0.425	0.129	19.3	0.292	0.181	0.999
4	-0.324	0.155	18.7	0.352	0.218	0.998
5	-0.164	0.121	18.1	0.274	0.170	0.999
6	-0.380	0.209	18.6	0.474	0.294	0.997

Valeraldehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.716	0.134	21.3	0.303	0.188	0.999
2	-0.596	0.157	20.8	0.356	0.221	0.998
3	-0.485	0.244	21.3	0.554	0.343	0.997
4	-0.434	0.211	21.2	0.479	0.297	0.997
5	-0.291	0.193	21.3	0.438	0.272	0.998
6	-0.685	0.302	21.6	0.684	0.424	0.995

p-tolualdehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.351	0.105	15.4	0.237	0.147	0.999
2	-0.253	0.164	15.3	0.371	0.230	0.997
3	-0.306	0.125	15.4	0.284	0.176	0.998
4	-0.404	0.145	14.7	0.330	0.204	0.997
5	-0.358	0.203	14.9	0.459	0.284	0.995
6	-0.406	0.192	15.4	0.414	0.250	0.997

Hexaldehído

Día	Ordenada Origen	S _{o.o.}	Pendiente	S _b	S _{y/x}	R ²
1	-0.343	0.155	18.6	0.351	0.217	0.998
2	-0.322	0.275	18.5	0.624	0.386	0.994
3	-0.317	0.149	19.0	0.337	0.209	0.998
4	-0.536	0.226	18.4	0.512	0.317	0.996
5	-0.634	0.311	19.0	0.652	0.324	0.995
6	-0.682	0.288	19.0	0.652	0.404	0.994

^a S_{o.o.}: Desviación estándar de la ordenada en el origen. ^b S_b: Desviación estándar de la pendiente. ^c S_{y/x}: Desviación estándar residual.

Tabla II-A2. Calibrados obtenidos diferentes días por GC-MS.

<i>Formaldehído</i>						
Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵ (cuentas·sg)	^a S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵ (cuentas·sg)/ (mg/L)	^b S _b ·10 ⁻⁴	^c S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-5.40	5.52	13.05	4.21	5.36	0.995
2	-5.84	7.63	15.35	5.82	7.41	0.993
3	-3.52	3.46	12.05	2.64	3.36	0.998
4	-3.55	5.39	12.06	4.11	5.23	0.994
5	-3.72	4.69	13.88	3.58	4.55	0.997

<i>Acetaldehído</i>						
Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.39	1.14	6.75	1.74	1.10	0.997
2	-1.60	1.66	7.63	2.53	1.61	0.995
3	-0.92	1.32	6.15	2.01	1.28	0.995
4	-0.91	1.14	6.19	1.75	1.11	0.996
5	-0.65	1.20	5.78	0.18	1.16	0.995

<i>Acroleína</i>						
Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.80	1.81	5.75	2.58	1.30	0.992
2	-1.51	1.24	6.07	1.89	1.20	0.995
3	-1.15	0.83	5.25	1.26	0.80	0.997
4	-1.27	1.20	6.03	1.83	1.16	0.995
5	-0.12	1.60	5.71	2.44	1.55	0.991

<i>Acetona</i>						
Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-3.31	3.28	13.64	5.01	3.19	0.993
2	-2.28	2.20	13.14	3.35	2.13	0.997
3	-1.46	1.08	11.55	1.65	1.05	0.999
4	-1.73	2.67	12.32	4.08	2.59	0.995
5	-1.40	1.85	11.16	2.82	1.79	0.997

Propionaldehído

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _{b.} ·10 ⁻⁴	S _{y/x.} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.61	1.02	6.89	1.56	0.99	0.997
2	-1.60	1.46	7.67	2.23	1.42	0.996
3	-1.16	1.68	6.64	2.56	1.63	0.993
4	-0.83	1.45	6.32	2.21	1.41	0.994
5	-0.93	1.21	6.10	1.85	1.18	0.995

Crotonaldehído

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _{b.} ·10 ⁻⁴	S _{y/x.} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.96	2.00	6.92	2.86	1.44	0.993
2	-1.33	1.64	7.08	2.51	1.59	0.994
3	-1.12	0.80	6.06	1.23	0.78	0.998
4	-0.78	1.54	5.90	2.35	1.49	0.992
5	-0.57	1.18	5.58	1.81	1.15	0.995

Metacroleína

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _{b.} ·10 ⁻⁴	S _{y/x.} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.28	1.37	5.72	2.09	1.33	0.993
2	-0.97	1.03	5.95	1.57	1.00	0.997
3	-0.62	0.58	5.35	0.89	0.56	0.999
4	-0.86	1.15	5.87	1.76	1.12	0.996
5	-0.67	1.08	5.20	1.65	1.05	0.995

2-Butanona

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _{b.} ·10 ⁻⁴	S _{y/x.} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.56	1.29	7.84	1.97	1.25	0.997
2	-1.10	1.80	7.44	2.75	1.75	0.993
3	-0.79	0.65	7.16	1.00	0.63	0.999
4	-1.13	0.76	7.58	1.17	0.74	0.999
5	-0.82	1.81	6.83	2.76	1.76	0.992

Butiraldehído

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.20	1.11	4.88	1.69	1.07	0.994
2	-0.88	1.05	5.32	1.61	1.02	0.995
3	-0.81	0.90	5.04	1.38	0.88	0.996
4	-0.92	1.16	4.88	1.78	1.13	0.993
5	-0.49	0.73	4.34	1.12	0.71	0.997

Benzaldehído

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-1.03	1.43	2.21	1.78	0.48	0.987
2	-1.39	1.12	2.83	1.40	0.38	0.995
3	-0.81	0.91	2.25	1.22	0.46	0.991
4	-0.46	0.65	1.76	0.86	0.33	0.993
5	-0.81	0.75	2.34	1.00	0.38	0.995

Valeraldehído

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-0.97	0.70	3.84	1.07	0.68	0.996
2	-1.05	1.41	4.85	2.16	1.37	0.990
3	-0.58	0.77	3.76	1.18	0.75	0.995
4	-0.30	0.83	3.16	1.27	0.81	0.992
5	-0.31	0.27	3.14	0.41	0.26	0.999

Hexaldehído

Día	Ordenada origen·10 ⁻⁵	S _{o.o.} ·10 ⁻⁴	Pendiente·10 ⁻⁵	S _b ·10 ⁻⁴	S _{y/x} ·10 ⁻⁴	R ²
1	-0.85	0.38	1.97	0.51	0.19	0.998
2	-1.39	1.79	2.69	2.24	0.60	0.986
3	-0.92	0.65	2.31	0.87	0.33	0.996
4	-0.60	0.57	1.81	0.81	0.41	0.992
5	-0.30	0.52	1.35	0.69	0.26	0.992

^aS_{o.o.}: Desviación estándar de la ordenada en el origen. ^bS_b: Desviación estándar de la pendiente. ^cS_{y/x}: Desviación estándar residual.

ANEXO II

CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE

Como ejemplo representativo, a continuación se incluye el cálculo de la incertidumbre asociada al primer nivel de concentración del formaldehído, cuando se utiliza HPLC-UV como técnica analítica:

$$u_{rel}(CC) = \sqrt{u_{rel}^2(1) + u_{rel}^2(2) + u_{rel}^2(3)}$$

$$1. u_{rel}(std) = \sqrt{u_{rel}^2(ps) + u_{rel}^2(ss) + u_{rel}^2(ccs)}$$

$$u_{rel}(ps) = \sqrt{u_{rel}^2(sm) + u_{rel}^2(V_{f1})}$$

$$u_{rel}(sm) = \frac{ds}{C} = \frac{0.06}{40.01} \text{ mg/l} = 0.0015$$

$$u_{rel}(V_{f1}) = u_{rel}(V_{f2}) = \frac{0.02/\sqrt{6}}{5\text{mL}} = 0.0016$$

$$\underline{u_{rel}(ps) = \sqrt{0.0015^2 + 0.0016^2} = 0.0022}$$

$$u_{rel}(ss) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{p1}) + u_{rel}^2(V_{f2})}$$

$$u(V_{p1}) = \sqrt{u^2(mc) + u^2(rep)}$$

Para un volumen de 640 microlitros:

$$u(mc) = \frac{\%Er}{\sqrt{6}} \cdot \frac{1}{100} = \frac{0.64}{\sqrt{6}} \cdot \frac{1}{100} = 0.0026$$

$$u(rep) = ds = 1.15$$

$$u(V_{p1}) = \sqrt{0.0026^2 + 1.15^2} = 1.15$$

$$u_{rel}(V_{p1}) = \frac{1.15}{640} = 0.0018$$

$$u_{rel}(V_{f1}) = u_{rel}(V_{f2}) = \frac{0.02/\sqrt{6}}{5mL} = 0.0016$$

$$\underline{u_{rel}(ss) = \sqrt{0.0018^2 + 0.0016^2} = 0.0024}$$

$$u_{rel}(ccs) = \sqrt{u_{rel}^2(V_{p2}) + u_{rel}^2(V_{p3})}$$

$$V_{p2} = 30 \mu\text{L}$$

$$V_{p3} = 1000 - 30 = 970 \mu\text{L}$$

$$u(V_{p2}) = \sqrt{u(mc)^2 + u(rept)^2} = \sqrt{0.0056^2 + 0.28^2} = 0.28$$

$$u_{rel}(V_{p2}) = \frac{0.28}{30} = 0.0094$$

$$u(V_{p3}) = \sqrt{u(mc)^2 + u(rept)^2} = \sqrt{0.0024^2 + 1.05^2} = 1.05$$

$$u_{rel}(V_{p3}) = \frac{1.05}{970} = 0.0010$$

$$\underline{u_{rel}(css) = \sqrt{0.0094^2 + 0.0010^2} = 0.0094}$$

$$\underline{u_{rel}(std) = \sqrt{0.0022^2 + 0.0024^2 + 0.0094^2} = 0.01}$$

$$\underline{u(std) = 0.01 \times 0.061 \text{mg} / \text{L} = 0.00062 \text{mg} / \text{L}}$$

$$2. u(cal) = \frac{1}{b} \sqrt{S_{y/x}^2 \cdot \left(\frac{1}{n}\right) + (x_0 - \bar{x})^2 \cdot S_b^2}$$

$$\bar{x} = (0.061 + 0.172 + 0.279 + 0.389 + 0.500) / 5 = 0.28$$

Para la curva del día 6, se obtiene el valor más alto para $u(cal)$, así que, con los siguientes datos:

$b = 53.3$, $o.o. = -0.05$; área del punto repetido = 3.05, obtengo $x_0 = 0.058$

$$u(cal) = \frac{1}{53.3} \sqrt{0.720^2 \cdot \frac{1}{5} + (0.058 - 0.280)^2 \cdot 2.08^2} = 0.011 \text{ mg / L}$$

$$u_{rel}(cal) = \frac{0.011}{0.061} = 0.17$$

$$3. u(rep) = \frac{Ds}{\sqrt{r}}$$

$$u(rep) = 0.0029 \text{ mg / L}$$

$$u_{rel}(rep) = \frac{0.0029}{0.061} = 0.047$$

$$u_{rel}(CC) = \sqrt{u_{rel}^2(std) + u_{rel}^2(cal) + u_{rel}^2(rep)} = \sqrt{0.01^2 + 0.17^2 + 0.05^2} = 0.18$$

$$u(CC) = 0.18 \times 0.061 \text{ mg / L} = 0.011 \text{ mg / L}$$

$$U(CC) = u(CC) \times 2 = 0.022$$

$$C_{\text{formaldehído}} = 0.061 \pm 0.022 \text{ mg/L}$$

II.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Molimard P., Spinnler H.E. Compounds involved in the flavour of surface mold-ripened cheeses: origins and properties. *Journal of Dairy Science*, **79**, 169-184 (1996).
- [2] Pal R., Kim K.H. Experimental choices for the determination of carbonyl compounds in air. *Journal of Separation Science*, **30**, 2708-2718 (2007).
- [3] Vogel M. Sampling of airborne pollutants: strategies and developments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **381**, 84-86 (2005).
- [4] Dewulf J., Van Langenhove H. Anthropogenic volatile organic compounds in ambient air and natural waters: a review on recent developments of analytical methodology, performance and interpretation of field measurements. *Journal of Chromatography A*, **843**, 163-177 (1999).
- [5] Nishikawa H., Sakai T. Derivatization and chromatographic determination of aldehydes in gaseous and air samples. *Journal of Chromatography A*, **710**, 159-165 (1995).
- [6] Vogel M., Büldt A., Karst U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis – a critical review. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **366**, 781-791 (2000).
- [7] Grosjean D. Formaldehyde and other carbonyls in Los Angeles ambient air. *Environmental Science and Technology*, **16**, 254-262 (1982).
- [8] Ferrari C.P., Durand-Jolibois R., Carlier P., Jacob V., Roche A., Foster P., Fresnet P. Comparison between two carbonyl measurement methods in the atmosphere. *Analisis*, **27**, 45-53 (1999).
- [9] Chiavari G., Laghi M.C., Torsi G. High-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes at trace level as their 3-methylbenzothiazolone azine derivatives. *Journal of Chromatography A*, **475**, 343-351 (1989).
- [10] Foster P., Ferrari C., Jacob V., Roche A., Baussand P., Delachaume J.C. Determination of C-1-C-5 carbonyls in the atmosphere by 2,4-dinitrophenylhydrazine-coated sorbent sampling and HPLC analysis. The influence of water on ketone analysis. *Analisis*, **24**, 71-73 (1996).
- [11] Feng Y., Wen S., Wang X., Sheng G., He Q., Tang J., Fu J. Indoor and outdoor carbonyl compounds in the hotel ballrooms in Guangzhou, China. *Atmospheric Environment*, **38**, 103-112 (2004).
- [12] Oliva-Teles M.T., Paíga P., Delerue-Matos C.M., Alvim-Ferraz M.C.M. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **467**, 97-103 (2002).
- [13] Possanzini M., Di Palo V., Brancaloni E., Frattoni M., Ciccioli P. A train of carbon and DNPH-coated cartridges for the determination of carbonyls from C1 to C12 in air and emission samples. *Atmospheric Environment*, **34**, 5311-5318 (2000).
- [14] García-Alonso S., Pérez-Pastor R.M. Use of C18 and silica-gel coated Sep-Pak cartridges for the determination of carbonyls in air by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **367**, 93-99 (1998).

- [15] Pires M., Carvalho L.R.F. An artifact in air carbonyls sampling using C18 DNPH-coated cartridge. *Analytica Chimica Acta*, **367**, 223-231 (1998).
- [16] Risner C.H. High-performance liquid chromatographic determination of major carbonyl compounds from various sources in ambient air. *Journal of Chromatographic Science*, **33**, 168-176 (1995).
- [17] Kiss Gy., Varga B., Varga Puchony Z., Gelencser A., Krivacsy Z., Hlavay J. Sample preparation of atmospheric aerosol for the determination of carbonyl compounds. *Talanta*, **48**, 755-762 (1999).
- [18] Viskari E.L., Vartiainen M., Pasanen P. Seasonal and diurnal variation in formaldehyde and acetaldehyde concentrations along a highway in Eastern Finland. *Atmospheric Environment*, **34**, 917-923 (2000).
- [19] Sandner F., Dott W., Hollender J. Sensitive indoor air monitoring of formaldehyde and other carbonyl compounds using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **203**, 275-279 (2001).
- [20] Dettmer K., Bittner T., Engewald W. Adsorptive enrichment and thermal desorption of low-boiling oxygenated compounds - Possibilities and limitations. *Chromatographia*, **53**, S322-S326 (2001).
- [21] Sanchez J.M., Sacks R.D. On-line multi-bed sorption trap for VOC analysis of large-volume vapor samples: injection plug width, effects of water vapor and sample decomposition. *Journal of Separation Science*, **28**, 22-30 (2005).
- [22] Dettmer K., Engewald W. Adsorbent materials commonly used in air analysis for adsorptive enrichment and thermal desorption of volatile organic compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **373**, 490-500 (2002).
- [23] Dettmer K., Engewald W. Ambient air analysis of volatile organic compounds using adsorptive enrichment. *Chromatographia*, **57**, S339-S347 (2003).
- [24] Matisová E., Skrabáková S. Carbon sorbents and their utilization for the preconcentration of organic pollutants in environmental samples. *Journal of Chromatography A*, **707**, 145-179 (1995).
- [25] Camel V., Caude M. Trace enrichment methods for the determination of organic pollutants in ambient air. *Journal of Chromatography A*, **710**, 3-19 (1995).
- [26] Knobloch T., Asperger A., Engewald W. Volatile organic compounds in urban atmospheres: Long-term measurements of ambient air concentrations in differently loaded regions of Leipzig. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **359**, 189-197 (1997).
- [27] Hallama R.A., Rosenberg E., Grasserbauer M. Development and application of a thermal desorption method for the analysis of polar volatile organic compounds in workplace air. *Journal of Chromatography A*, **809**, 47-63 (1998).
- [28] Kallio H., Linko R.R., Kaitaranta J. Gas-liquid chromatographic analysis of 2,4-dinitrophenyl-hydrazones of carbonyl compounds. *Journal of Chromatographia A*, **65**, 355-360 (1972).
- [29] Guenier J.F., Simon P., Delcourt J., Didierjean M., Lefevre C., Muller J. Air-sampling of aldehydes. Application to chromatographic determination of formaldehyde and acetaldehyde. *Chromatographia*, **18**, 137-144 (1984).

- [30] Binding N., Muèller W., Witting U. Syn/anti isomerization of 2,4-dinitrophenylhydrazones in the determination of airborne unsymmetrical aldehydes and ketones using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **356**, 315-319 (1996).
- [31] Lindahl R., Levin J., Martensson M. Validation of a diffusive sampler for the determination of acetaldehyde in air. *Analyst*, **121**, 1177-1181 (1996).
- [32] Uchiyama S., Ando M., Aoyagi S. Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, **996**, 95-102 (2003).
- [33] Uchiyama S., Matsushima E., Aoyagi S., Ando M. Measurement of acid-catalyzed isomerization of unsaturated aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives by high-performance liquid chromatography analysis. *Analytica Chimica Acta*, **523**, 157-163 (2004).
- [34] Compendium Method TO-11A. Determination of formaldehyde in ambient air using adsorbent cartridge followed by high performance liquid chromatography (HPLC) [Active sampling methodology]. *US Environmental Protection Agency* (1999).
- [35] Compendium Method TO-5. Determination of aldehydes and ketones in ambient air using high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environmental Protection Agency* (1999).
- [36] Method 0100. Sampling for formaldehyde and other carbonyl compounds in indoor air. *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [37] Method 8315A. Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [38] Method 0011. Sampling for selected aldehyde and ketone emissions from stationary sources. *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [39] Lehmpuhl D.W., 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. *Journal of Chromatography A*, **740**, 71-81 (1996).
- [40] Dong J.Z., Moldoveanu S.C. Gas chromatography–mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, **1027**, 25-35 (2004).
- [41] Magin D.F. Gas chromatography of simple monocarbonyls in cigarette whole smoke as the benzyloxime derivatives. *Journal of Chromatography A*, **202**, 255-261 (1980).
- [42] Hunter M.C., Bartle K.D., Seakins P.W., Lewis A.C. Direct measurement of atmospheric formaldehyde using gas chromatography-pulsed discharge ionisation detection. *Analytical Communications*, **36**, 101-104 (1999).
- [43] UNE-EN ISO 9000:2000, “Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario”. *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid (2000).
- [44] UNE-EN ISO/IEC 17025. Requisitos generales relativos a la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid (2000).
- [45] Miller J., Miller J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th Edition, *Pearson Education Limited, Publisher: Prentice Hall*, Inglaterra (2000).

- [46] Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Analytical Letters*, **26**, 1243-1258 (1993).
- [47] BIPM; IEC; IFCC; ISO; IUPAC; OIML, International Vocabulary of basic and general terms in Metrology, *International Organisation for Standardisation*, Génova (1993).
- [48] Analytical Methods Committee. *Analyst*, **120**, 2303-2308 (1995).
- [49] ISO 3534-1. Statistics, Vocabulary and symbols Statistics. Vocabulary and symbols. Part 1: Probability and general statistical terms. *International Organization for Standardization*, Génova (1993).
- [50] Guide to the expression of uncertainty in measurement. *International Organization for Standardization*, Génova (1993).
- [51] Quantifying uncertainty in analytical measurement. Laboratory of the Government Chemist (LGC). *Eurachem*, Londres (1995).
- [52] Ciarlini P., Cox M.G., Pavese F., Tichter D. Advanced Mathematical tools in metrology III. *World Scientific*, Singapur (1997).
- [53] Ellison S.L.R., Williams A. Measurement uncertainty and its implications for collaborative study method validation and method performance parameters. *Accreditation and Quality Assurance*, **3**, 6-10 (1998).
- [54] Ríos A., Valcárcel M. A view of uncertainty at the bench analytical level. *Accreditation and Quality Assurance*, **3**, 14-29 (1998).
- [55] ISO:5725. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. *International Organization for Standardization*, Génova (1994).
- [56] Horwitz W., Albert R. The concept of uncertainty as applied to chemical measurements. *Analyst*, **122**, 615-617 (1997).
- [57] Horwitz W. Uncertainty - A chemist's view. *Journal of Association of Official Analytical Chemists International*, **81**, 785-794 (1998).
- [58] Hässelbarth W. Measurement uncertainty procedures revisited: Direct determination of uncertainty and bias handling. *Accreditation and Quality Assurance*, **3**, 418-422 (1998).
- [59] Ellison S.L.R., Barwick V.J. Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation - Part 1. Principles of an approach using cause and effect analysis. *Analyst*, **123**, 1387-1392 (1998).
- [60] Barwick V.J., Ellison S.L.R. Estimating measurement uncertainty using a cause and effect and reconciliation approach Part 2. Measurement uncertainty estimates compared with collaborative trial expectation. *Analytical Communications*, **35**, 377-383 (1998).
- [61] Silva R.J.N.B., Camoes M.F.G.F.C., Barros J.S. Validation and quality control schemes based on the expression of results with uncertainty. *Analytica Chimica Acta*, **393**, 167-175 (1999).
- [62] Jülicher B., Gowik P., Uhlig S. A top-down in-house validation based approach for the investigation of the measurement uncertainty using fractional factorial experiments. *Analyst*, **124**, 537-545 (1999).

- [63] Barwick V.J., Ellison S.L.R, Fairman B. Estimation of uncertainties in ICP-MS analysis: a practical methodology. *Analytica Chimica Acta*, **394**, 281-291 (1999).
- [64] Quantifying uncertainty in analytical measurement, Guide, 2nd Edition, *Eurachem/CITAC*, Helsinki (2000).
- [65] Method T-104. Determination of selected carbonyls in mainstream tobacco smoke. *US Environmental Protection Agency* (1999).



Capítulo III

*Metodologías de toma de muestra y calibración para la
determinación de compuestos carbonílicos por HPLC*

III.1. INTRODUCCIÓN

De forma progresiva, a lo largo de los últimos años se ha ido prestando cada vez mayor atención a la presencia en el aire, ambientes interiores, lugares de trabajo, etc., de compuestos carbonílicos, incluyendo los aldehídos y cetonas de bajo peso molecular, debido, en gran parte, a sus efectos sobre la salud humana y animal [1]. Como se ha comentado anteriormente, la exposición, aunque sea durante períodos de tiempo relativamente cortos, a formaldehído y otros aldehídos específicos, tales como el acetaldehído, acroleína y crotonaldehído, puede causar irritación en los ojos, en la piel y en la membrana mucosa del tracto respiratorio superior [2]. Además, estudios realizados con animales han puesto de manifiesto que, a concentraciones elevadas, estos compuestos presentan una toxicidad considerable, pudiendo comportarse como cancerígenos [3,4] y afectar a los pulmones y otros órganos del cuerpo. También los aldehídos, tanto de forma directa como indirecta, pueden causar daños en las plantas [1].

En paralelo con el creciente interés por los compuestos carbonílicos, se han desarrollado numerosos métodos para la toma de muestra y análisis de los mismos [5]. Ahora bien, debido a la toxicidad asociada al formaldehído, a la ubicuidad de este compuesto en distintos ambientes y materiales, así como a su importancia en las reacciones que ocurren en la atmósfera, incluidas las relacionadas con la formación de smog fotoquímico, la mayoría de las metodologías establecidas se han diseñado específicamente para cuantificar este compuesto [6].

La determinación cuantitativa de compuestos carbonílicos en muestras gaseosas se encuentra afectada por dos problemas principales, la dificultad intrínseca a la manipulación de las muestras de gases y la escasa sensibilidad de las señales producidas por estos compuestos en la mayoría de las técnicas que podrían utilizarse para su análisis. De aquí, que tradicionalmente se haya recurrido, por una parte, a la retención de los analitos en soportes líquidos o sólidos adecuados, y por otra, a su conversión en derivados con características analíticas apropiadas.

Cronológicamente, los primeros métodos para la toma de muestras destinadas a la determinación de compuestos carbonílicos en aire, se centraron en la utilización de borboteadores, que contenían una disolución de un reactivo capaz de provocar una transformación química en los analitos al hacer atravesar la muestra a través de la misma

[5,6]. En general, estos reactivos o agentes derivatizantes se escogen, entre otras razones, por su capacidad de proporcionar compuestos no volátiles bastante estables y por su escasa tendencia a formar compuestos indeseables en la etapa posterior de medida analítica. Este tipo de técnicas, que emplean el uso de borboteadores como sistemas de muestreo, poseen inconvenientes que han propiciado la escasa aplicabilidad de las mismas [5,6].

Posteriormente, al centrar el interés en las determinaciones de formaldehído en muestras relacionadas con la salud ocupacional, tanto por su inhalación como por la evaluación de las fuentes, se desarrollaron dispositivos de muestreo pasivo personales [7]. En estos dispositivos, principalmente usados por los higienistas industriales para evaluar los esfuerzos respiratorios debido a la exposición de los trabajadores al formaldehído, la cantidad de contaminante que recoge un muestreador pasivo es función de la velocidad y del tiempo de muestreo, siendo la velocidad de muestreo una constante característica para cada compuesto químico y cada modelo de muestreador, que engloba la constante de diseño geométrico del mismo y el coeficiente de difusión del mencionado compuesto. El principal inconveniente de estos muestreadores se encuentra en que, debido a su diseño y a una velocidad de flujo limitada, es necesario disponer de tiempos de exposición grandes a la atmósfera, de varios días, para poder obtener las sensibilidades que se alcanzan con las técnicas basadas en la utilización de borboteadores. Por consiguiente, estos dispositivos tienen también una aplicabilidad limitada.

Debido a la necesidad de mejorar la sensibilidad de las determinaciones, de forma que se pudiesen determinar los compuestos carbonílicos en muestras de aire con metodologías en las que se alcanzasen límites de detección apropiados, en atención a los umbrales establecidos en salud ocupacional, se desarrolló una metodología que consistía en humedecer la superficie de un adsorbente sólido con una sustancia específica, capaz de reaccionar con los compuestos carbonílicos [8]. De esta forma, al utilizar un proceso de preconcentración más eficaz, que permitía el uso de mayores volúmenes de aire, fue posible una mejoría considerable en la sensibilidad.

Con posterioridad, se ha ensayado el empleo de diferentes combinaciones de agentes químicos y soportes sólidos con mayor o menor éxito [6]. En general, se han empleado distintos tipos de adsorbentes, normalmente escogidos entre los que suelen utilizarse en extracción en fase sólida, depositados en el interior de un dispositivo de plástico similar al receptáculo de una jeringuilla tradicional. De esta forma se dispone de un cartucho en el que

se introduce el agente derivatizante, que queda retenido en el adsorbente sólido. Como se ha comentado en los capítulos precedentes, las metodologías más usadas actualmente para la retención de compuestos carbonílicos presentes en muestras de aire, se basa en hacer reaccionar dichos compuestos con 2,4-dinitrofenilhidracina [6], agente derivatizante que se impregna previamente sobre el cartucho adsorbente. Posteriormente, se procede a la elución y análisis de las hidrazonas obtenidas en la reacción de derivatización.

En la actualidad, se dispone de diversos métodos, propuestos mayoritariamente por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos, que se ocupan de la toma de muestra y determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos en muestras de aire ambiente y de aire en recintos interiores, así como procedentes de emisiones a través de fuentes estacionarias [6,9-12]. Sin embargo, desconocemos de la existencia de Normas Oficiales que se refieran a la toma de muestra y determinación analítica de aldehídos y cetonas en muestras de humo.

Al proceder a la elección de los sistemas de retención y derivatización de los compuestos carbonílicos, debe tenerse en cuenta la etapa posterior de medida. Las metodologías propuestas por la EPA y las utilizadas en numerosos trabajos [13-17] para la determinación de aldehídos y cetonas, se basan en la separación y determinación mediante HPLC con detección UV. Previamente a la separación cromatográfica, los compuestos carbonílicos se convierten en sus correspondientes hidrazonas por reacción con DNPH en medio ácido. Para la separación, suelen utilizarse una o dos columnas cromatográficas rellenas con fases estacionarias de octadecilsílice y, como fase móvil, se emplean gradientes de acetonitrilo:agua o de metanol:agua. En tal sentido, el empleo de sistemas de retención basados en cartuchos, con soportes sólidos impregnados con DNPH, facilita la obtención de las hidrazonas a separar en el sistema cromatográfico disueltas en acetonitrilo o metanol, disolventes apropiados para la solubilización de las mismas y, por consiguiente, para su elución desde el cartucho en el que se han formado.

III.1.1. DERIVATIZACIÓN Y RETENCIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS

Derivatización con la DNPH

Como se ha comentado en capítulos anteriores, entre los agentes derivatizantes empleados para transformar los compuestos carbonílicos en sustancias con características apropiadas para su retención y análisis, destacan las hidracinas aromáticas debido a la selectividad y a la facilidad con la que se transforman en hidrazonas por reacción con los aldehídos y cetonas, en presencia de catalizadores ácidos [18]. La 2,4-dinitrofenilhidracina ha llegado a ser el derivatizante más popular, debido a una elevada velocidad de reacción, y porque las hidrazonas formadas son apropiadas para la separación por HPLC y detección ultravioleta.

En general, los métodos establecidos por la EPA para la toma de muestra y determinación de compuestos carbonílicos presentes en muestras de aire [6,9-12], así como el que constituye la Norma UNE 77260-3 [19], implican el paso del aire, mediante aspiración con una bomba, a través de un cartucho que contiene un relleno de gel de sílice o C-18 recubierto con la 2,4-dinitrofenilhidracina, o a través de borboteadores que contienen una disolución del reactivo derivatizante. El principio del método se basa en la reacción específica del grupo carbonilo con la DNPH en presencia de un ácido para formar derivados estables, de acuerdo con la reacción que se indica en la Figura III.1.

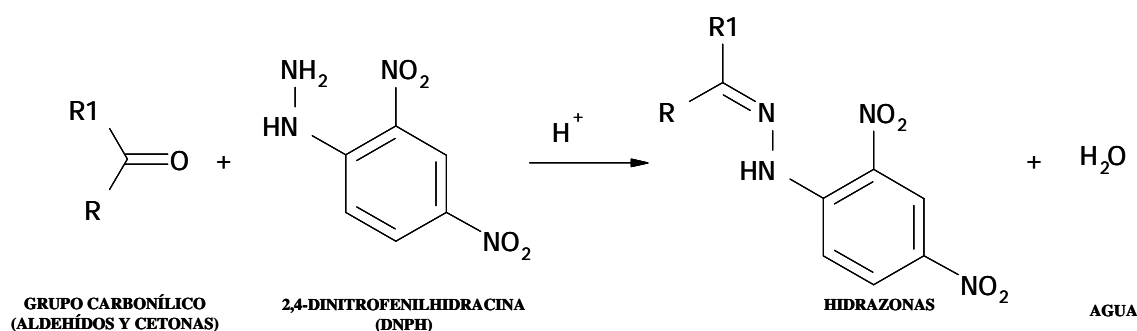


Figura III.1. Reacción de derivatización de los compuestos carbonílicos.

La reacción de la DNPH con los compuestos carbonílicos implica una adición nucleofílica en el enlace C=O, seguida por la eliminación de agua [20,21].

La presencia de un ácido es necesaria para catalizar la reacción de los compuestos carbonílicos con DNPH. Con tal finalidad, se han utilizado satisfactoriamente la mayoría de los ácidos fuertes inorgánicos: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico o ácido perclórico. Sin embargo, se ha descrito que, aunque sea de forma excepcional, la utilización de los ácidos clorhídrico y sulfúrico, pueden provocar dificultades [19].

El ácido añadido facilita, vía protonación del grupo carbonilo, la reacción de los compuestos carbonílicos con la DNPH, un nucleófilo de carácter débil. El muestreo con cartuchos en aire seco no es adecuado, debido a que la reacción entre los compuestos carbonílicos y el reactivo derivatizante no llega a completarse, es decir, no se produce de forma cuantitativa, posiblemente porque el medio en el que tiene lugar la derivatización puede llegar a ser demasiado ácido [22]. En estas condiciones, la reacción de la DNPH con el ácido para formar una sal provoca una disminución de la cantidad del reactivo derivatizante disponible para reaccionar con los compuestos carbonílicos [20].

Retención de los compuestos carbonílicos contenidos en muestras de aire

Utilización de borboteadores

Ya hemos indicado que una de las alternativas a utilizar cuando se plantea la determinación del contenido en compuestos carbonílicos presentes en el aire, consiste en hacer burbujear las muestras a través de borboteadores que contienen disoluciones de la DNPH.

En general, los factores más importantes a tener en cuenta en las técnicas que hacen uso de los borboteadores [23] son los siguientes:

- La solubilidad y la velocidad de difusión de los analitos en el sistema colector.
- La presión de vapor de los analitos y la volatilidad en el sistema colector.
- La reactividad química de los analitos con el reactivo, el área de contacto, definida por el tamaño de las burbujas, y el tiempo de contacto entre analitos y disolución, en el que interviene, de forma importante, la velocidad de flujo del analito a través de la disolución.

- La proporción del volumen de analito con respecto al volumen de disolución absorbente.
- La técnica analítica aplicada para recoger las muestras, la eficacia de la bomba de muestreo para mantener un flujo constante en el tiempo y que la temperatura no se modifique significativamente durante el muestreo.

En el caso de las disoluciones obtenidas en la toma de muestra de compuestos carbonílicos presentes en muestras gaseosas, el tiempo de conservación, es decir, el tiempo que transcurre entre la toma de muestra y el análisis de dichas disoluciones, también es un factor importante a ser considerado en la recuperación debido a la posibilidad de hidrólisis ácida de las hidrazonas [23].

Con carácter general, una de las dificultades importantes del empleo de borboteadores se encuentra en la utilización de disoluciones acuosas o acuo-orgánicas poco apropiadas para su inyección en los sistemas cromatográficos o que requieren de procesos posteriores de extracción, para mejorar la sensibilidad de las determinaciones, o para conseguir un cambio de disolvente. Por otra parte, a las técnicas de retención de analitos mediante el uso de disoluciones absorbentes se les considera como muy laboriosas, que suelen conducir a determinaciones analíticas poco sensibles, que dan lugar a la aparición de interferencias y que poseen una baja reproducibilidad, sobre todo a los niveles de concentración a los que suelen encontrarse los compuestos carbonílicos en muestras ambientales [6,9].

En atención a lo expuesto, aunque en un principio fueron las técnicas basadas en el uso de borboteadores, que contenían la DNPH, las que se utilizaron para determinar los compuestos carbonílicos presentes en la atmósfera, progresivamente fueron sustituidas por otras que minimizan algunos de los inconvenientes mencionados, así como la dificultad adicional que supone su utilización en lugares remotos, situación habitual si se tiene en cuenta la naturaleza de las muestras.

Utilización de adsorbentes sólidos

La alternativa más utilizada a las técnicas que hacen uso de disoluciones absorbentes, para dar solución a los problemas asociados a la toma de muestra de compuestos carbonílicos

presentes en muestras gaseosas, es la que se basa en el uso de cartuchos que contienen sólidos adsorbentes.

El fundamento de la extracción en fase sólida es similar al de la extracción líquido-líquido, es decir, se basa en la diferente afinidad que presentan los analitos por una fase sólida o por la matriz que constituye la muestra. De esta manera, al hacer pasar la muestra a través de una fase sólida, algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasarán inalterados.

En el caso de la retención de compuestos carbonílicos contenidos en el aire, el soporte sólido, que se deposita en el interior de un cartucho de vidrio o polietileno, se impregna con el reactivo derivatizante. De esta forma, la fase sólida se comporta como el adsorbente de la SPE y, al mismo tiempo, como soporte sobre el que tiene lugar la reacción de derivatización entre los compuestos carbonílicos y la DNPH. Así, al pasar a través del cartucho la muestra objeto de análisis, las hidrazonas formadas quedarán retenidas en el mismo. Con independencia de los posibles problemas asociados a la utilización de la DNPH y de las reacciones de derivatización, se dispone de un sistema que reúne características positivas en cuanto a [5]:

- La posibilidad de eliminar interferencias presentes en las muestras.
- Que permite la preconcentración de analitos al poder pasar a través del cartucho volúmenes elevados de muestra. Los analitos quedan retenidos en la fase sólida y son eluidos posteriormente con un pequeño volumen de un disolvente.
- La conservación y transporte de la muestra, permitiendo su utilización en trabajos de campo.
- La disponibilidad comercial de cartuchos que incorporan distintas cantidades de fases sólidas, en las que se ha incorporado el agente derivatizante.

A través de los comentarios realizados, se pone de manifiesto que la técnica de muestreo que hace uso de los cartuchos difiere bastante de la técnica basada en el empleo de borboteadores. En cualquier caso, la selección de los cartuchos a utilizar en la toma de muestra dependerá de la naturaleza de los analitos, de la matriz en la que se encuentre y de su nivel de concentración. Como quiera que, en el caso que nos ocupa, determinaremos compuestos carbonílicos en muestras gaseosas, los principales factores a tener en cuenta son:

- La capacidad de la fase sólida para retener analitos, que no sólo depende de la naturaleza del soporte utilizado, sino de las características de las reacciones entre los aldehídos y cetonas presentes en la muestra y la DNPH.
- El máximo volumen de muestra que puede hacerse pasar a través del cartucho sin que se produzcan pérdidas de analito.

Por otra parte, el proceso de muestreo conlleva la transformación química de los analitos con el agente derivatizante. Por consiguiente, los productos de reacción deben ser eluidos por el paso de un disolvente a través del cartucho que, de ser posible, debe ser compatible con el sistema de medida a utilizar. Así, es habitual que cuando se escogen metodologías de HPLC para la determinación de las hidrazonas, con fase móvil acetonitrilo:agua, el eluyente preferido para la elución de los cartuchos es el acetonitrilo. En general, la eficacia del procedimiento de elución depende de [23]:

- El rango del tamaño de los analitos.
- La masa total de los analitos y del reactivo retenido en la fase sólida.
- El tiempo y la velocidad del muestreo.
- La temperatura y la humedad del muestreo.
- La reactividad química con el reactivo derivatizante.

Entre los distintos tipos de adsorbentes sólidos utilizados como soportes en los que se impregna la DNPH, se encuentran desde filtros de fibra de vidrio, a cartuchos con rellenos de fases sólidas constituidas por: gel de sílice, Chromosorb® P, Florisil®, Carbopack® B, XAD-2 y C-18 [8]. Cartuchos con algunos de estos rellenos están disponibles comercialmente, constituyendo una alternativa interesante por la comodidad que supone el evitar la preparación de los mismos, con los consiguientes problemas de reproducibilidad asociada a la uniformidad del relleno. Otra ventaja de los cartuchos comerciales es que están disponibles con diferentes tamaños de partículas, incluidos los que permiten obtener menores caídas de presión a través del cartucho y pueden ser más adecuados para el muestreo de aire utilizando bombas de aspiración personales que funcionan con pilas. Tanto en los cartuchos preparados en el laboratorio como en los adquiridos comercialmente, debe evitarse la presencia de impurezas de formaldehído y otros compuestos carbonílicos habituales en el aire

ambiente. Los dos tipos de cartuchos empaquetados comerciales más ampliamente utilizados son los de gel de sílice y los de C-18.

El gel de sílice obtenido con el grado de pureza adecuado consiste en pequeñas partículas que se funden entre sí mediante enlaces formados por puentes de siloxano, formando una matriz porosa con una elevada superficie específica. Este adsorbente, con grupos silanoles superficiales, es un material polar y presenta una elevada superficie de adsorción [6].

El otro tipo de adsorbente usado habitualmente es el constituido por C-18, un octadecilsilano enlazado a un sustrato de sílice, que posee carácter no polar asociado a la cadena hidrocarbonada, que puede conservar una cierta polaridad debida a la existencia de grupos hidroxilo libres en la superficie de la sílice que no hayan sido sustituidos en el proceso de silanización, y que, desde un punto de vista de su comportamiento químico, se debe considerar relativamente inerte [6]. Debido a estas cualidades, el C-18 se ha usado tradicionalmente como una trampa adsorbente para trazas orgánicas en muestras acuosas medioambientales a través de interacciones hidrofóbicas [6].

Existen diferentes trabajos que comparan los cartuchos de C-18 y de gel de sílice enlazados a la 2,4-dinitrofenilhidracina para la determinación de los niveles de formaldehído, acetaldehído, acetona, propionaldehído y butiraldehído en aire ambiente [24-27]. En estas comparaciones, las características más importantes entre estos tipos de adsorbentes son:

- En cuanto al nivel de impurezas asociado a los soportes sólidos constituidos por los rellenos impregnados con DNPH, suele ser inferior en el caso del gel de sílice. Los blancos obtenidos por lavado de los cartuchos muestran una mayor pureza del gel de sílice, con menores niveles de formaldehído y acetona, en comparación con los rellenos de C-18.
- Como luego comentaremos, uno de los problemas que presentan los cartuchos, como sistema de retención de compuestos carbonílicos, es la interferencia provocada por el ozono atmosférico. En muestras tomadas en ambos tipos de relleno, se ha observado la aparición de picos cromatográficos extraños cuando el ozono está presente durante la toma de muestra.

Aunque no existen grandes diferencias en los resultados obtenidos con cartuchos de

C-18 o de gel de sílice, estos últimos suelen ser los más utilizados. En general, la principal desventaja del uso de cartuchos con la DNPH enlazada, para la toma de muestra de compuestos carbonílicos presentes en muestras de aire, es la posible aparición de reacciones indeseables que implican la presencia de oxidantes y la matriz adsorbente [28], la DNPH [29] y/o especies formadas entre los compuestos carbonílicos y la DNPH [30].

Como alternativa a los cartuchos de muestreo preparados, que pueden adquirirse con la DNPH incorporada al relleno, la Norma UNE 77260-3 [19] indica la forma de prepararlos a partir de los cartuchos de gel de sílice de grado cromatográfico, disponibles comercialmente, por la adición a cada cartucho de disoluciones acidificadas de la DNPH.

Se ha comentado anteriormente que el ozono interfiere negativamente por reacción con la DNPH y sus derivados (hidrazonas) en el cartucho [30]. La intensidad de la interferencia depende de las variaciones temporales tanto del ozono como de los compuestos carbonílicos y de la duración del muestreo. La presencia de ozono en la muestra se deduce por la aparición de nuevos compuestos que presentan picos cromatográficos, en HPLC, con tiempos de retención inferiores a los de la hidrazona del formaldehído. Para evitar esta interferencia, la mejor solución es su eliminación antes de que la muestra de aire alcance el cartucho. Con tal finalidad, se suele incorporar al sistema de muestreo, justo antes del cartucho, una trampa de ozono. Existen trampas de ozono comerciales preparadas con cartuchos rellenos de 300 ó 500 mg de yoduro potásico granulado, que han demostrado ser efectivas en la eliminación de ozono, sin interferir en el muestreo de los compuestos carbonílicos [26].

La interferencia en aire limpio, cuando se necesitan períodos de muestreo largos, y en aire ambiente con niveles de ozono elevados, es más pronunciada. Los resultados [6] ponen de manifiesto que el cartucho de gel de sílice con una trampa de yoduro potásico es el sistema más adecuado para eliminar las interferencias positivas y negativas procedentes del ozono.

Recientemente, las interferencias provocadas por el ozono han sido investigadas, tanto con cartuchos con relleno de gel de sílice como de C-18 [25,26,31]. En los cartuchos C-18, los compuestos carbonílicos de cadena corta, entre C_1 y C_4 , no se ven afectados significativamente por el ozono durante el muestreo, pero se pueden generar muchos compuestos con más de 18 átomos de carbono, probablemente debido a reacciones entre el ozono y el adsorbente C-18. También se ha observado que el uso de cartuchos de gel de sílice,

en los que se ha enlazado DNPH, favorece la formación de una interferencia negativa en las concentraciones de compuestos carbonílicos, cuando el muestreo se realiza en presencia de una atmósfera con ozono. Sin embargo, esta interferencia no se observa cuando se usan cartuchos de C-18, por lo que algunos autores sugieren que el ozono podría reaccionar preferentemente con la matriz de C-18, de modo que el ataque del ozono más extenso sobre la DNPH y las hidrazonas, podría ser limitado, en comparación con lo que ocurriría en los cartuchos de gel de sílice.

Otros autores han estudiado estas interferencias sobre ambos soportes, observándose una interferencia procedente del ozono en el muestreo de carbonílicos incluso a bajos niveles de ozono [27,32]. Así por ejemplo, las hidrazonas de formaldehído y acetaldehído son atacadas por el ozono mientras que el derivado de la acetona no se ve afectado.

III.1.2. METODOLOGÍAS OFICIALES DE ANÁLISIS

La mayoría de las metodologías oficiales establecidas para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras gaseosas han sido desarrolladas por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos [6,9-12]. En general, se basan en la determinación de las hidrazonas en las que se convierten los compuestos carbonílicos al reaccionar con la 2,4-dinitrofenilhidracina, por HPLC-UV. A continuación se resumen las metodologías más significativas.

- *Método EPA TO-5: “Método para la determinación de aldehídos y cetonas en aire ambiente usando cromatografía líquida de alta resolución”* [9]. Aunque recomendado para el análisis de algunos compuestos carbonílicos, se refiere fundamentalmente a la determinación de formaldehído en aire ambiente. El procedimiento propuesto consiste en hacer pasar la muestra a través de un borboteador que contiene una disolución ácida del reactivo derivatizante 2,4-dinitrofenilhidracina e isooctano. El método se encuadra en la tendencia tradicional, que se mantuvo hasta la aparición de la extracción en fase sólida, de utilizar disoluciones absorbentes para retener componentes de las muestras en fase gas. Como se ha dicho anteriormente, las desventajas asociadas a estas metodologías y, en especial, las asociadas a la realización de muestreos en lugares remotos ha propiciado el que progresivamente se haya visto postergada por aquellas otras que emplean cartuchos con

sólidos adsorbentes. Para el formaldehído se pueden alcanzar límites de detección de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

- *Método TO-11A: “Método para la determinación de formaldehído en aire ambiente usando cartuchos adsorbentes, seguida de cromatografía líquida de alta resolución”* [6]. Consiste en una metodología de muestreo activa que modifica el procedimiento establecido en el Método TO-5, en el sentido de sustituir el empleo de borboteadores con disoluciones adsorbentes por cartuchos rellenos con un adsorbente impregnado con la DNPH. El método contempla la determinación de los siguientes compuestos: formaldehído, acetaldehído, acroleína, propionaldehído, acetona, crotonaldehído, 2-butanona, benzaldehído, valeraldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído. La mayoría de los compuestos carbonílicos, incluyendo el benzaldehído, son cuantificados eficazmente en concentraciones menores a $2 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Como ya se ha comentado anteriormente en este capítulo, entre los problemas que afectan a ambas metodologías, los más significativos se relacionan con la contaminación de la DNPH por productos de descomposición del reactivo o por derivados formados con algunos compuestos carbonílicos que, como sucede con el formaldehído y la acetona, pueden encontrarse habitualmente en el aire ambiente, incluida la atmósfera de los laboratorios [6,9]. Por otra parte, durante el muestreo ha de tenerse en cuenta que el ozono, a elevadas concentraciones, interfiere negativamente al reaccionar tanto con la DNPH como con los derivados formados sobre la superficie del adsorbente que constituye el relleno del cartucho.

- *Norma UNE 77260-3: “Aire interior. Parte 3. Determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos. Método de muestreo activo”* [19]. Es equivalente a la Norma Internacional ISO 16000-3:2001, que se basa, a su vez, en el método EPA TO-11A. La Norma se refiere a la determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos, tales como: acetaldehído, acetona, butiraldehído, crotonaldehído, isovaleraldehído, propionaldehído, *m*-tolualdehído, *o*-tolualdehído, *p*-tolualdehído y valeraldehído. El rango de concentraciones que en la Norma se considera adecuado para efectuar las determinaciones es el comprendido aproximadamente entre $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ y $1 \text{mg}/\text{m}^3$.

La metodología de muestreo propuesta, también se basa en la utilización de un sólido adsorbente que contiene el agente derivatizante. Los compuestos carbonílicos se captan haciendo pasar el aire a través del medio reactivo, con lo cual los compuestos carbonílicos se convierten en derivados con menor presión de vapor, que son retenidos más eficazmente por el captador y, en consecuencia, pueden analizarse con mayor facilidad. En general, las

hidrazonas formadas por reacción de los aldehídos y cetonas con la DNPH que recubre un adsorbente pueden recuperarse y medirse con gran sensibilidad, precisión y exactitud.

Aunque en la Norma UNE 77260-3 se recomiendan unas condiciones experimentales adecuadas para la determinación por HPLC de las hidrazonas formadas en el proceso de derivatización, se recomienda a los analistas que experimenten con su propio sistema cromatográfico para optimizar las condiciones de separación de los compuestos para sus necesidades analíticas particulares. Para efectuar la calibración de los sistemas de medida, los patrones se preparan en acetonitrilo a partir de disoluciones que contienen los compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH.

También son de interés los siguientes métodos:

- *Método EPA 0100: "Muestreo de formaldehído y otros compuestos carbonílicos en aire interior"* [10]; *Método EPA 0011: "Muestreo de aldehídos y cetonas en emisiones desde fuentes estacionarias"* [12] y el *Método 8315 A: "Determinación de compuestos carbonílicos por cromatografía líquida de alta resolución"* [11].

El método EPA 0100 nos proporciona un procedimiento para el muestreo de varios compuestos carbonílicos en aire interior, también basado en la toma de muestra y derivatización con cartuchos de gel de sílice recubiertos de 2,4-dinitrofenilhidracina. Con un fundamento similar, el Método EPA 0011 propone una metodología para la retención de compuestos carbonílicos presentes en muestras de aguas, suelos y residuos, así como de gases procedentes de fuentes de emisión estáticas. Ambos métodos pueden usarse en conjunción con el Método 8315A, en el que se establece una metodología para el análisis de las hidrazonas mediante HPLC.

Estas metodologías están diseñadas para la determinación, entre otros compuestos, de acetaldehído, acetona, acroleína, benzaldehído, butiraldehído, crotonaldehído, formaldehído, hexaldehído, valeraldehído, propionaldehído y *p*-tolualdehído. En el caso de las muestras gaseosas, el muestreo consiste en hacer pasar un volumen de aire por los cartuchos impregnados de DNPH mediante el uso de una bomba de muestreo, durante un período de tiempo y a una velocidad de muestreo prefijadas en función de la naturaleza de la muestra y de la concentración estimada de los compuestos carbonílicos presentes en las mismas. Para un volumen aproximado de 10 litros de aire, se consiguen límites de detección de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ para todos los compuestos carbonílicos indicados.

III.1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de la aceptación prácticamente generalizada del sistema de retención de compuestos carbonílicos presentes en muestras de aire, basado en la utilización de cartuchos rellenos con adsorbentes impregnados con 2,4-dinitrofenildracina, que actúa como agente derivatizante, la revisión bibliográfica realizada ha mostrado que dicho procedimiento está afectado por inconvenientes que ya han sido puestos de manifiesto por diversos autores y otros que, al menos potencialmente, pueden afectar a las características analíticas esenciales de la metodología.

En distintos trabajos, e incluso en Normas Oficiales, se destaca la contaminación de la DNPH y, en consecuencia, de los cartuchos y disoluciones que la contienen, con compuestos carbonílicos de bajo peso molecular como el formaldehído y la acetona, introduciéndose de esta manera una fuente potencial de errores. Por otra parte, durante el almacenamiento de las muestras recogidas en disoluciones absorbentes o sobre adsorbentes sólidos, pueden originarse transformaciones que afectan a la DNPH o a las hidrazonas formadas. Las impurezas originadas de esta forma, podrían coeluir en el sistema cromatográfico con hidrazonas representativas de aldehídos y cetonas presentes en las muestras e interferir las determinaciones analíticas.

En base a los antecedentes comentados, el primer objetivo que se ha pretendido alcanzar en este capítulo, ha consistido en conocer la magnitud de los problemas enunciados y la posibilidad de minimizarlos, especialmente cuando se utilizan cartuchos con fases sólidas impregnadas con DNPH como medio para retener los compuestos carbonílicos. En tal sentido, la alternativa de contraponer el uso de cartuchos preparados en condiciones controladas en el laboratorio a los cartuchos comerciales puede ser de interés.

En conjunción con los problemas que se acaban de enunciar, las interacciones entre los aldehídos y cetonas con la DNPH, presente en disoluciones absorbentes o retenida sobre soportes sólidos, están afectadas por un conjunto de variables que pueden afectar de forma considerable a la cinética de las reacciones y a la cuantitatividad de las mismas. Son escasos los datos que se encuentran en la bibliografía acerca de aspectos tan importantes como los comentados, por su incidencia en la precisión y exactitud de las determinaciones. En consecuencia, otros objetivos del trabajo se centrarán en el estudio de las reacciones de derivatización, tanto en disolución como en fase sólida, atendiendo a los factores que puedan

influir en el rendimiento de las mismas, tales como la concentración de ácido necesario para catalizar la reacción y el tiempo de reacción.

Al estudiar el comportamiento de las reacciones entre los aldehídos y cetonas con la DNPH, ha de tenerse en cuenta que el número de compuestos seleccionados: formaldehído, acetaldehído, acroleína, acetona, propionaldehído, crotonaldehído, 2-butanona, butiraldehído, benzaldehído, valeraldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído, es superior al que habitualmente se toma en consideración, por ser habituales en muestras de aire. En consecuencia, el comportamiento de las interacciones comentadas no se conoce para algunas de estas sustancias.

Un aspecto que llama la atención es el que se refiere a la calibración necesaria en los procesos de cuantificación. El procedimiento generalmente empleado, incluso en las metodologías oficiales, se basa en la utilización de patrones preparados a partir de disoluciones comerciales de las hidrazonas. De esta forma, se estarían comparando las señales cromatográficas obtenidas a partir de disoluciones cuyas concentraciones se establecen por pesada de las hidrazonas, previamente sintetizadas con las correspondientes a disoluciones en las que las hidrazonas se forman por derivatización. En estas reacciones, los compuestos carbonílicos, presentes en muestras gaseosas entran en contacto con la DNPH presente en una disolución absorbente o retenida sobre un soporte sólido, durante un período de tiempo necesariamente reducido e igual para todos los analitos. En estas condiciones, cualquier proceso que afecte a la falta de cuantitatividad de la reacción de derivatización de los distintos aldehídos y cetonas presentes en una muestra, puede provocar errores de consideración al proceder a su cuantificación.

Ante la hipótesis expuesta, un objetivo de indudable interés consistiría en establecer el rendimiento de los procesos de derivatización con la DNPH, previamente optimizados, de cada uno de los aldehídos y cetonas mencionados, tanto en disolución como en soporte sólido. En el supuesto de que nos encontremos, aunque sea parcialmente, ante reacciones cuya cuantitatividad sea escasa o que, por ejemplo, posean cinéticas lentas, que las hagan poco adecuadas para su utilización práctica, es evidente que deberían ensayarse otros procedimientos para preparar los patrones a utilizar en el proceso de calibración.

En atención a las consideraciones que se acaban de hacer, un objetivo de notable importancia, que debería ser abordado en este capítulo, consistiría en ensayar estrategias que

tengan en cuenta la preparación de patrones de calibración mediante metodologías que tomen en consideración el procedimiento empleado para la toma de muestra.

Puesto que los compuestos a determinar se encuentran en muestras gaseosas, entre las alternativas a ensayar se encontraría la preparación de patrones de calibración a partir de los aldehídos y cetonas presentes, en cantidades conocidas, en fase gas. Con tal finalidad, se procedería a la volatilización de disoluciones preparadas a partir de aldehídos y cetonas, cuya concentración se establecería por pesada o medida de un volumen conocido, de un producto comercial de pureza conocida y elevada. Los compuestos volatilizados se retendrían sobre un soporte sólido impregnado con DNPH. En este caso, la disolución patrón a emplear, se obtendría por elución de las hidrazonas formadas en la fase sólida. Otra alternativa consistiría en proceder a la volatilización de los compuestos carbonílicos en un recipiente de volumen conocido, para proceder luego a su derivatización por inyección de una disolución de la DNPH en el recipiente. Transcurrido el tiempo de reacción prefijado, la disolución así obtenida se tomaría como una disolución patrón de las respectivas hidrazonas.

Desde otro punto de vista, se podrían diseñar metodologías para la preparación de disoluciones patrón de los aldehídos y cetonas, adecuadas para proceder a construir las curvas de calibrado, en las que se tuvieran en cuenta las condiciones experimentales en las que se producen las reacciones de derivatización cuando tiene lugar la toma de muestra. Una alternativa a ensayar sería aquella en la que se preparan disoluciones con concentraciones conocidas de los aldehídos y cetonas, y a continuación se hacen reaccionar, en condiciones prefijadas, con una disolución de la DNPH. Otra posibilidad sería introducir en un cartucho, cuyo relleno se encuentre impregnado con la DNPH, volúmenes conocidos de la disolución que contiene cantidades conocidas de los aldehídos y cetonas, dejar transcurrir el tiempo de reacción previamente establecido y proceder a eluir con un disolvente adecuado, para obtener de esta forma una disolución patrón de las hidrazonas.

III.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

III.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES

La disolución patrón, Carbonyl DNPH Mix-1, que contiene las 13 hidrazonas de los compuestos carbonílicos disueltas en acetonitrilo, fue suministrada por AccuStandard Inc. (New Haven, USA). La concentración de cada uno de los compuestos carbonílicos derivatizados en esta disolución viene dada por el certificado de análisis y es de 20 mg/L, exceptuando el formaldehído con 40 mg/L. Para el estudio de las calibraciones, apartado III.3.4., se partió de la disolución patrón Carbonyl DNPH Mix-1 suministrada por Supelco y cuyas características vienen descritas en el apartado II.2.1.

Los compuestos carbonílicos individuales y el compuesto 2,4-dinitrofenilhidracina, usado como agente derivatizante, son los mismos que los descritos en el capítulo anterior, apartado II.2.1.

Los cartuchos comerciales de gel de sílice impregnados de DNPH, utilizados para el muestreo de los compuestos carbonílicos, fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, USA). Se emplearon dos tipos de cartuchos, unos para ambientes con bajas concentraciones, LpDNPH S-10 con 350 mg de relleno y 1 mg de DNPH, y otros para ambientes con altas concentraciones, LpDNPH H-30 con 1000 mg de relleno y 8.6 mg de DNPH.

El gel de sílice con tamaño de partícula de 60 Å de 230/400 mallas y con tamaño de partícula de 60 Å de 70/230 mallas fue suministrada por Aldrich (Madrid, España).

El ácido clorhídrico p.a. al 37% fue suministrado por Merck (Darmstadt, Alemania).

El acetonitrilo empleado es el descrito en el capítulo anterior, apartado II.2.1.

Los materiales utilizados para la obtención de humos han sido: cáscara de almendra (*Prunus dulcis*), acículas de pino canario y maderas de pino canario (*Pinus canariensis*) y de jara (*Cistus monspeliensis*). Estos materiales han sido recogidos directamente en sus lugares de origen y utilizados sin tratamiento alguno, excepto la adecuación de su tamaño a trozos pequeños para poder ser quemados en cápsulas de porcelana.

III.2.2. EQUIPOS

El baño termostático Precistern y la cinta calefactora eléctrica utilizados en los diferentes estudios fueron suministrados por Selecta (Barcelona, España).

Para centrifugar las muestras se utilizó una centrífuga modelo EBA 3S suministrada por Hettich Centrifuges (Beverly, MA, USA).

Las muestras de aire se tomaron mediante una bomba portátil de aire Bravo H, TCR Tecora (Milán, Italia), equipada con medidores de tiempo, volumen y flujo.

Los tubos colectores de gases de 250 y 1000 mL fueron suministrados por Supelco (Bellefonte, USA).

El sistema de HPLC empleado para hacer el estudio de las reacciones de derivatización es el descrito en el capítulo anterior, apartado II.2.2.

El equipo de HPLC usado para hacer las calibraciones fue un cromatógrafo líquido suministrado por Varian (Palo Alto, CA, USA) y equipado con un inyector automático ProStar 410, un sistema de gradiente de disolventes Prostar 230 y un detector de fotodiodos ProStar 330. El control del sistema cromatográfico y la adquisición y evaluación de los datos se realizó mediante el software Star 5.51 de Varian (Palo Alto, CA, USA). El sistema analítico empleado en este cromatógrafo es el descrito en el capítulo anterior, apartado II.2.2.

III.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Purificación y preparación de disoluciones de DNPH

El procedimiento para la purificación de la DNPH es el descrito en el capítulo anterior, apartado II.2.3.

Las disoluciones de DNPH se prepararon diariamente pesando los cristales purificados para obtener un 0.05% ó 0.1% (p/v), dependiendo de la experiencia, añadiendo HCl 0.1M para obtener un 5% (v/v) en la disolución final, y enrasando con acetonitrilo.

Preparación de las disoluciones patrón

Para elaborar las curvas de calibrado, se preparó un patrón por disolución de los compuestos carbonílicos individuales en acetonitrilo con la siguiente concentración: 922 mg/L de formaldehído, 1248 mg/L de acetaldehído, 1520 mg/L de acroleína, 1600 mg/L de acetona, 2050 mg/L de propionaldehído, 1785 mg/L de crotonaldehído, 1851 mg/L de 2-butanona, 1840 mg/L de butiraldehído, 2400 mg/L de benzaldehído, 2100 mg/L de valeraldehído, 2547 mg/L de *p*-tolualdehído y 2268 mg/L de hexaldehído. A partir de esta disolución madre, se preparó una intermedia por dilución 20 veces en acetonitrilo. Estas disoluciones se conservaron en la nevera a 4°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución en acetonitrilo de la disolución intermedia.

A partir de las disoluciones patrón DNPH-Mix 1, que contiene la mezcla de los compuestos carbonílicos derivatizados, se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución con acetonitrilo.

Preparación de los cartuchos de DNPH

Para el muestreo de los compuestos carbonílicos, se usaron los cartuchos comerciales LpDNPH H-30 y S-10 reutilizados. Los cartuchos se impregnaron con el agente derivatizante según la Norma UNE 77260-3 [19] y Pires y Carvalho [25]. Cada cartucho comercial LpDNPH H-30 se lavó con aproximadamente 10 mL de acetonitrilo y después se impregnó con 1.2 mL de una disolución en acetonitrilo que contiene un 0.7% (p/v) de DNPH y un 10% (v/v) de una disolución acuosa de HCl 0.1M. La cantidad final de DNPH que hay en el cartucho es similar a los cartuchos comerciales, en torno a 8.6 mg de DNPH/cartucho. Después, los cartuchos fueron secados con aire durante 60 segundos y posteriormente se conservaron protegidos de la luz y en nevera a 4°C hasta su uso. Se comprobó que estos cartuchos son eficaces en cuanto a la extracción de los compuestos carbonílicos y posterior derivatización al menos 1 mes desde su preparación. Para los cartuchos comerciales LpDNPH S-10 se siguió el mismo procedimiento, pero impregnándolos con 0.75 mL de una disolución en acetonitrilo que contiene un 0.1% (p/v) de DNPH y un 10% (v/v) de una disolución acuosa de HCl 0.1M. De esta manera, la cantidad final de DNPH en el cartucho estará en torno a 0.75 mg.

También se prepararon cartuchos similares a los comerciales LpDNPH S-10 usando 350 mg de gel de sílice comercial con dos tipos diferentes de tamaño de partícula y cartuchos similares a los comerciales LpDNPH H-30 con 1000 mg de gel de sílice pero sólo con tamaño de partícula gruesa. En ambos casos los cartuchos se impregnaron de igual forma a la descrita anteriormente para cada uno de ellos.

Procedimientos de calibración

Las experiencias realizadas con los cartuchos comerciales H-30 reutilizados consistieron en añadir sobre los mismos diferentes alícuotas de la disolución patrón de los compuestos carbonílicos en estudio. Los cartuchos se mantuvieron durante 1 hora en la nevera para posteriormente eluirlos con acetonitrilo hasta un volumen de 5 mL e inyectar una alícuota de esta disolución en el sistema cromatográfico.

Las experiencias realizadas con los tubos colectores de gases, de 250 ó 1000 mL dependiendo de la experiencia, consistieron en inyectar alícuotas de la disolución patrón de los compuestos carbonílicos en estudio en su interior y volatilizarlos mediante calentamiento del tubo con una cinta eléctrica a una temperatura de 58°C durante 9 minutos. Para la reacción de derivatización, se inyectaron en el tubo colector a través de un septum 5 ó 10 mL, dependiendo de la experiencia, de la disolución de DNPH. Esta disolución se mantuvo en el interior del tubo colector durante 30 minutos como tiempo de reacción. Finalmente, una alícuota de la disolución resultante fue inyectada en el sistema cromatográfico.

Validación de las metodologías de muestreo-calibración

Con objeto de obtener el humo procedente de la combustión de biomasa, cantidades pequeñas de biomasa en piezas menudas se quemaron en una cápsula de porcelana y, después de obtener la llama, ésta se extinguió pulverizando agua sobre ella.

Para validar la metodología que utiliza los tubos colectores frente a la que emplea los cartuchos de DNPH, el muestreo de humo se llevó a cabo en 2 tubos colectores de gases colocados en paralelo y unidos mediante una conducción de vidrio tipo T. Con objeto de conseguir un humo más homogéneo en ambos tubos, una columna (13 x 70 mm) rellena de

anillos Raschig de 0.3 pulgadas se coloca antes de la conexión tipo T, como se ilustra en la Figura III.2.

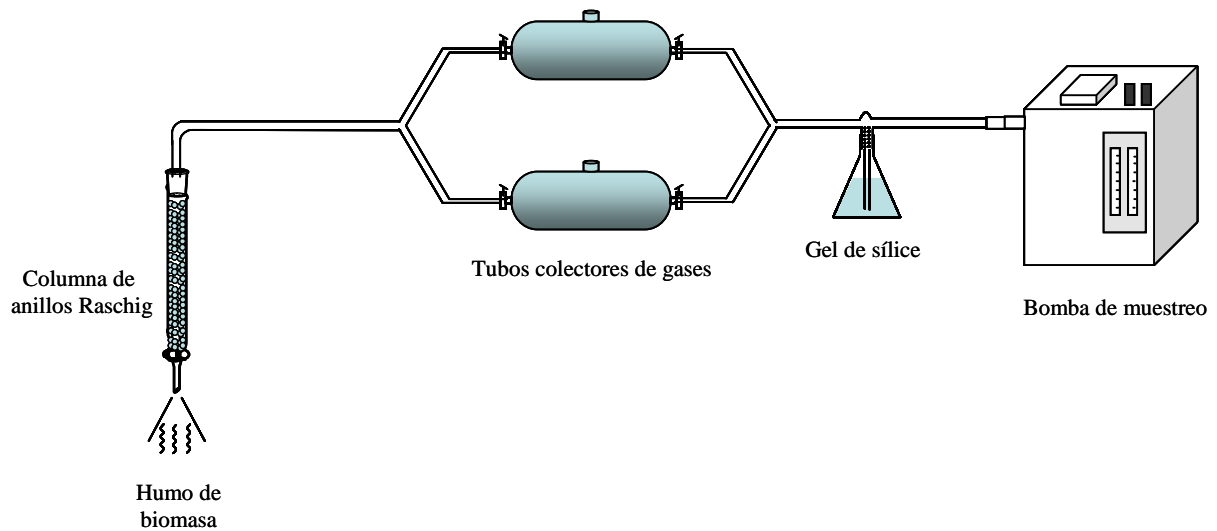


Figura III.2. Toma de muestra del humo procedente de la combustión de biomasa para el proceso de validación de las metodologías de muestreo-calibración.

La toma de muestra se ha llevado a cabo con una bomba de muestreo a un flujo constante de 2 L/min conectada a una trampa de gel de sílice y ésta a los tubos colectores de gases. Cuando ambos tubos están llenos de humo, las válvulas se cierran inmediatamente y los compuestos carbonílicos se analizan por las dos metodologías anteriormente descritas y cuyos dispositivos se muestran en la Figura III.3.

Las disoluciones de los compuestos carbonílicos derivatizados procedentes del humo obtenido por la metodología del tubo colector tuvieron que ser centrifugadas durante 5 minutos a 4000 rpm antes de proceder a su inyección en el sistema cromatográfico.

En la metodología de muestreo con cartuchos, una vez recogido el humo tras el muestreo, el tubo colector se calentó durante 10 minutos con una cinta eléctrica a unos 130°C, para evitar que el humo se condense, y se hizo pasar a través de los cartuchos con la bomba de muestreo a un flujo de 2 L/min durante 3 minutos, colocando una trampa de DNPH al inicio del montaje del sistema de muestreo. Un segundo cartucho en serie se empleó para verificar que los compuestos eran retenidos en el primer cartucho. Para asegurar que no quedaban restos de compuestos carbonílicos sin pasar al cartucho, se lavó el tubo colector con una disolución de DNPH al 0.05% (p/v) y se inyectó una alícuota en el sistema cromatográfico.

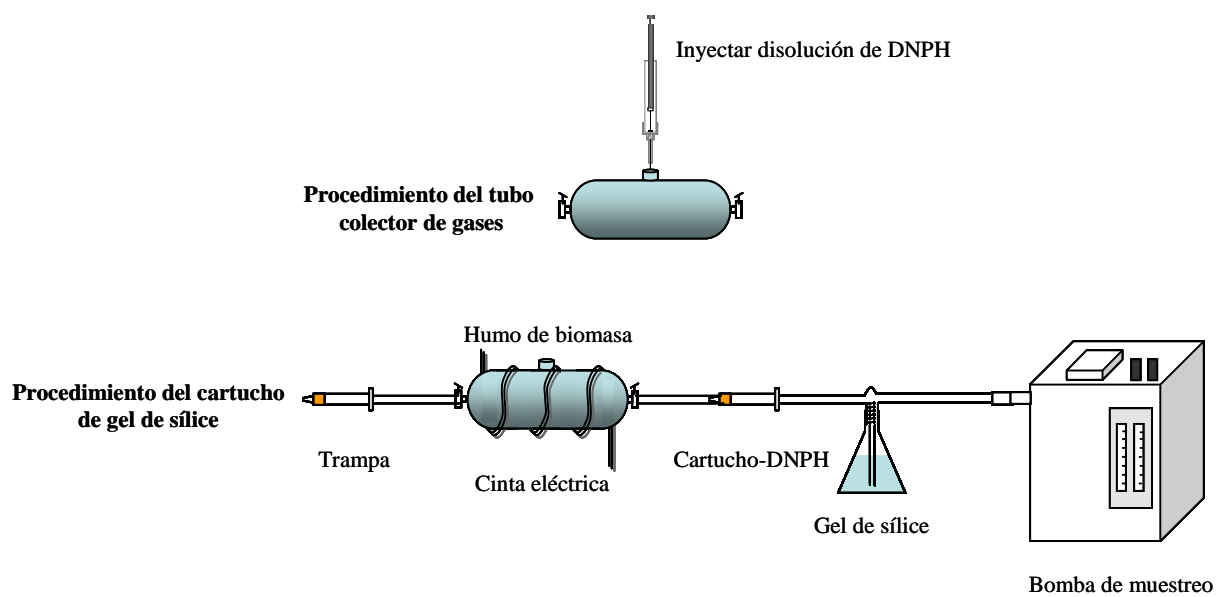


Figura III.3. Metodologías de muestreo-calibración utilizando tubos colectores de gases y cartuchos de gel de sílice impregnados con DNPH.

Análisis por HPLC-UV

El método de HPLC usado para la separación y detección de los compuestos carbonílicos derivatizados es el que está descrito en el capítulo anterior, apartado *II.2.3*.

III.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con anterioridad se ha puesto de manifiesto las ventajas que ofrece la determinación de compuestos carbonílicos basada en su reacción con la 2,4-dinitrofenilhidracina. Este proceso de derivatización ocurre tras una adición nucleofílica de la DNPH sobre el grupo carbonilo C=O de los aldehídos y/o cetonas en un medio ácido, necesario para catalizar la reacción [19].

Por otra parte, a partir del estudio comparativo realizado en el capítulo anterior entre las metodologías basadas en técnicas de HPLC-UV y de GC-MS, utilizables para la determinación de compuestos carbonílicos, se ha seleccionado la metodología basada en el uso de la cromatografía líquida de alta resolución. Los compuestos carbonílicos escogidos, para el estudio que se pretende realizar, son habituales en la bibliografía consultada [16,33,34]. Además, corresponden, en su mayoría, a componentes presentes en muestras de humo obtenidas por combustión de restos vegetales, como los utilizados en procesos de ahumado de alimentos en Canarias. En la Figura III.4 se muestra el cromatograma correspondiente a las hidrazonas obtenidas por derivatización con la DNPH de los aldehídos y cetonas presentes en una muestra de humo obtenida por combustión de acícula de pino. Al comparar este cromatograma con el obtenido a partir de una disolución en la que los derivados se obtienen a partir de un patrón de compuestos carbonílicos, se observa que la mayoría de los compuestos seleccionados se encuentran presentes en la muestra de humo analizada. Con relación a los compuestos utilizados en el capítulo anterior al comparar las metodologías de medida, no se ha incluido la metacroleína por no encontrarla disponible en presentaciones comerciales individuales.

En el capítulo anterior se han comentado los cromatogramas que se obtienen a partir de disoluciones patrón de las hidrazonas de los compuestos carbonílicos. Entre los aspectos más relevantes de los cromatogramas incluidos en la Figura III.4, destacaremos las señales que aparecen al comienzo de los mismos, correspondientes al exceso de la DNPH, y las debidas a las mezclas acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído que, como habíamos comentado, no se resuelven satisfactoriamente.

Como quiera que el fundamento de la metodología de análisis seleccionada consiste en la separación y cuantificación de las hidrazonas formadas por los aldehídos y cetonas con la DNPH, en este capítulo se establece, en primer lugar, la influencia de diferentes variables

experimentales en la reacción de derivatización, realizada en disolución y sobre soporte sólido, y posteriormente se procede a la validación de metodologías para construir curvas de calibrado asociadas a las metodologías de toma de muestra que se utilicen.

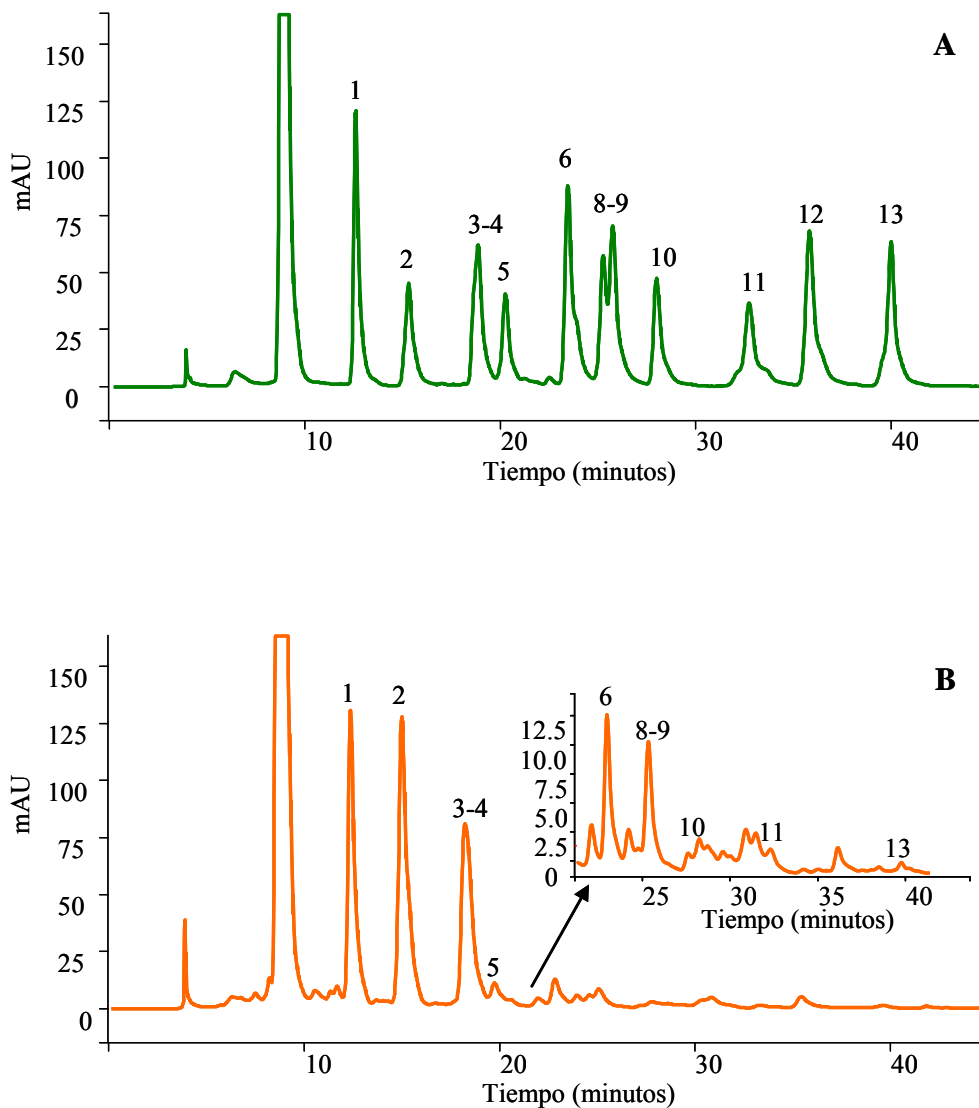


Figura III.4. Cromatogramas HPLC-UV de hidrazonas de compuestos carbonílicos obtenidas por derivatización con DNPH. **A:** A partir de una disolución patrón de los compuestos carbonílicos. **B:** A partir de una muestra de humo procedente de la combustión de acícula de pino. 1. For, 2. Ace, 3. Acr, 4. Acet, 5. Pro, 6. Cro, 8. Buta, 9. Buti, 10. Ben, 11. Val, 12. Tol y 13. Hex.

III.3.1. IMPUREZAS ASOCIADAS A LA 2,4-DINITROFENILHIDRACINA

Disoluciones de DNPH

Es conocido que las disoluciones de la 2,4-dinitrofenilhidracina preparadas a partir del producto comercial, se encuentran impurificadas por compuestos carbonílicos habituales en el aire [6,19]. Por tal motivo, en la Norma UNE 77260-3 [19], propuesta para la determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos en aire ambiente, se indica que es habitual la contaminación de la DNPH comercial por formaldehído, entre otros compuestos carbonílicos, y establece la necesidad de purificar el citado agente derivatizante mediante múltiples recristalizaciones en acetonitrilo. A título indicativo, la citada Norma admite como aceptable la existencia, en el producto recristalizado, de un nivel de la hidrazona del formaldehído inferior a 0.025 $\mu\text{g/mL}$, o un 0.02% en la fracción másica. Por otra parte, advierte que, si el nivel de impurezas en la DNPH no es aceptable para la aplicación prevista, se debe repetir la recristalización hasta obtener el nivel de impurezas adecuado para la finalidad propuesta.

Para conocer el nivel de impurezas de la DNPH disponible comercialmente, así como la estabilidad de las correspondientes disoluciones, se han realizado cromatogramas, en días sucesivos, de una disolución en acetonitrilo del producto comercial purificado mediante tres recristalizaciones. La disolución se prepara al 0.05% (p/v) de DNPH y 5% (v/v) en HCl 0.1M, que son las condiciones que se suelen recomendar en su utilización como reactivo derivatizante, y se conserva en nevera y protegida de la luz. En la Figura III.5 se encuentran los cromatogramas correspondientes a alícuotas de la disolución en observación, tomadas los días 1 y 10.

En las condiciones experimentales establecidas, el producto resultante de la recristalización origina señales intensas en el cromatograma, con tiempos de retención inferiores a los 11 - 12 minutos, que impedirían la cuantificación de cualquier analito que eluya con tiempos de retención comprendidos en esa zona. Los cromatogramas también muestran señales con tiempos de retención superiores a 11 - 12 minutos, que podrían corresponder a derivados formados por reacción de la DNPH con compuestos carbonílicos. En efecto, la comparación de estos cromatogramas con los correspondientes a disoluciones patrón comerciales de dichos derivados, pone de manifiesto la similitud de los tiempos de retención. Según se observa en la Figura III.5, aparecen varios picos bien definidos que

podrían corresponder a las hidrazonas del formaldehído, acetaldehído y acroleína + acetona y otros de menor intensidad en las proximidades de los picos atribuibles a los derivados del propionaldehído y de la 2-butanona, que pueden interferir en sus determinaciones. Estos picos deben corresponder a impurezas presentes en la DNPH comercial, cuya presencia no ha podido ser eliminada o, al menos, reducida hasta concentraciones suficientemente pequeñas durante las recristalizaciones.

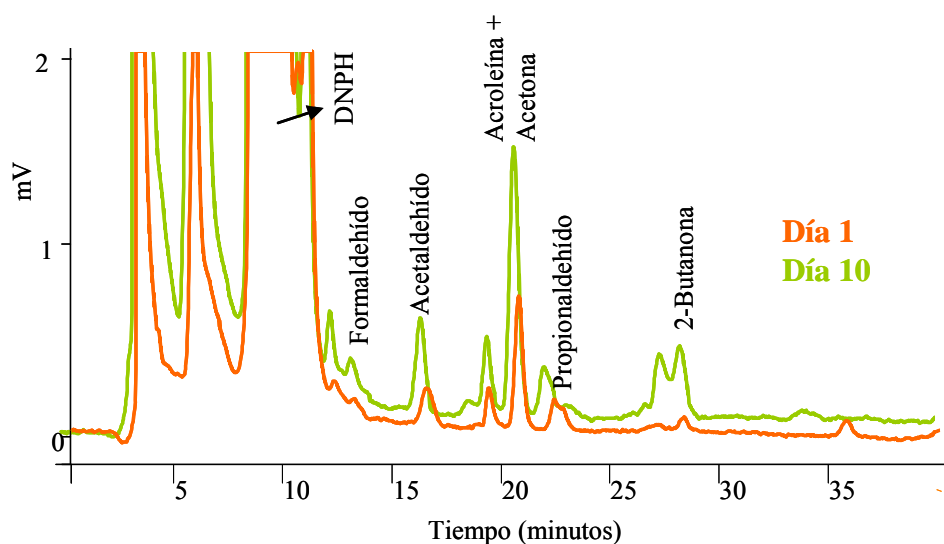


Figura III.5. Cromatogramas de disoluciones obtenidas a partir de la 2,4-dinitrofenilhidracina recristalizada, tomados los días 1 y 10 de su almacenamiento.

Según se observa en la citada figura, el cromatograma obtenido con una disolución de la DNPH, conservada durante 9 días en ausencia de luz y en nevera, muestra una cierta similitud con el anterior. No obstante, desde el punto de vista de la utilización de la DNPH como derivatizante, la disolución ha experimentado una evolución desfavorable a lo largo de su almacenamiento. No sólo se aprecia un ligero aumento de la intensidad de las señales cromatográficas ya comentadas, sino que además, se observan señales que no aparecían en el cromatograma con el que se compara, sobre todo en las proximidades del pico correspondiente al par acroleína + acetona que, en principio, deben corresponder a desdoblamientos asociados a la presencia de isómeros.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que, aparte de la posible contaminación por formaldehído comentada en la Norma UNE 77260-3, se observan señales que, en principio, pueden provocar interferencias en la determinación de ciertos compuestos

carbonílicos cuya presencia es posible en las muestras a analizar. También se ha puesto de manifiesto que la conservación de las disoluciones facilita la aparición en los cromatogramas de otras señales potencialmente interferentes. En consecuencia, aunque se ha comprobado que las disoluciones de la DNPH, en ausencia de luz y refrigeradas a 4°C, son estables durante una semana, en el desarrollo del presente trabajo se ha optado por prepararlas diariamente.

En relación con el tamaño de los picos cromatográficos asociados a las impurezas presentes en las disoluciones de DNPH, preparadas a partir del producto sólido comercial recristalizado, debe indicarse que los picos que podrían interferir en las determinaciones de acetaldehído y 2-butanona son de pequeña intensidad y, en consecuencia, sólo suponen errores significativos cuando las concentraciones de estos derivados en las muestras se encuentran en las proximidades de sus límites de detección. Aunque la señal correspondiente al par acroleína + acetona presenta una intensidad mayor, tampoco llega a superar el valor correspondiente al límite de detección del método. En atención a lo expuesto, adquiere una especial significación la necesidad de utilizar blancos que incluyan la disolución empleada de la DNPH, especialmente en la construcción de curvas de calibrado.

Soportes sólidos impregnados con DNPH

Para la determinación de compuestos carbonílicos presentes en muestras gaseosas, las distintas metodologías se basan en conseguir que los aldehídos y cetonas presentes en las mismas se pongan en contacto directo con la DNPH en el momento de la toma de muestra. Con tal finalidad, las disoluciones del reactivo derivatizante pueden disponerse en borboteadores o en cartuchos, que contienen un adsorbente sólido. En ambos casos, resulta de indudable interés establecer el nivel de impurezas asociado a la DNPH.

Conocida la presencia de restos de compuestos carbonílicos en las disoluciones de DNPH obtenidas a partir del producto recristalizado, se ha querido establecer el nivel de aldehídos y cetonas presentes, como impurezas, en los cartuchos que contienen la DNPH retenida sobre un adsorbente sólido. Entre los productos comercializados, los más habitualmente utilizados son cartuchos de extracción en fase sólida con soporte de gel sílice, impregnados con DNPH. Con fines comparativos, en este estudio se han utilizado:

- Cartuchos comerciales impregnados con DNPH, que identificaremos como S-10 y

H-30, y que contienen 350 ó 1000 mg de gel de sílice, respectivamente.

- Cartuchos reutilizados que se preparan a partir de los citados cartuchos comerciales, por lavado con acetonitrilo para eliminar la DNPH depositada originalmente sobre la sílice. Los cartuchos reutilizados emplean el mismo adsorbente que los cartuchos comerciales, pero la DNPH se le añade en el laboratorio de forma que la cantidad final de reactivo en el soporte sea de unos 8.6 ó 0.75 mg en los cartuchos H-30 o S-10, respectivamente. Después de introducir la disolución de DNPH, los cartuchos se secan con aire durante 60 segundos y posteriormente se conservan en nevera, protegidos de la luz, hasta su uso.
- Cartuchos preparados en el laboratorio a partir de dos tipos de gel de sílice: con tamaño de partícula fina, de 230/400 mallas, o con tamaño de partícula gruesa, de 70/230 mallas.

Al igual que sucede con la DNPH sólida comercializada, también los cartuchos impregnados con este reactivo contienen impurezas, entre las que se encuentran cantidades importantes de compuestos carbonílicos en forma de las correspondientes hidrazonas. En la Tabla III.1 se muestran las cantidades máximas de formaldehído, acetaldehído y acetona, que el fabricante admite para los cartuchos S-10 y H-30 utilizados en este trabajo.

Tabla III.1. Niveles máximos de impurezas de compuestos carbonílicos en cartuchos comerciales de DNPH.

Compuesto	S-10 (µg/cartucho)	H-30 (µg/cartucho)
Formaldehído	0.1	0.9
Acetaldehído	0.1	0.9
Acetona	0.5	4.3

Como se ha indicado anteriormente, a partir de los cartuchos comercializados, hemos preparado en el laboratorio una alternativa a los mismos, que hemos denominado cartuchos reutilizados. Las disoluciones obtenidas al lavar los cartuchos comerciales con acetonitrilo, se han sometido a análisis cromatográfico. La identificación y cuantificación de los picos

separados se ha realizado mediante curvas de calibrado obtenidas con disoluciones patrón preparadas a partir de la disolución comercial de las hidrazonas correspondientes a los compuestos carbonílicos derivatizados en los cartuchos. En la Tabla III.2 se han agrupado las cantidades de formaldehído, acetaldehído y acetona halladas por análisis de dichas disoluciones. También se han realizado experiencias similares con cartuchos reutilizados y con los preparados a partir de sílice comercial de diferentes tamaños de grano, utilizando cantidades de relleno y de la DNPH similares a las empleadas en cartuchos comerciales y reutilizados. Algunos resultados representativos se encuentran en dicha tabla, en la que se observa que la cantidad de impurezas presentes en los distintos tipos de cartuchos puede ser importante.

En dicha tabla aparece el contenido en acetona presente en los cartuchos a pesar de que, como se ha comentado con anterioridad, este compuesto coeluye con la acroleína cuando el análisis se efectúa mediante HPLC. La señal obtenida se ha asignado a la acetona después de comprobar mediante GC-MS que correspondía a la cetona y no al aldehído.

En atención a los resultados obtenidos, los cartuchos reutilizados pueden considerarse como preferibles, no sólo por ser equiparables o presentar en algún caso ventajas, en cuanto al nivel de impurezas, con respecto a los que se pueden adquirir comercialmente, sino por el ahorro económico que supone su utilización.

Tabla III.2. Impurezas de compuestos carbonílicos ($\mu\text{g}/\text{cartucho}$) presentes en cartuchos de gel de sílice impregnados con DNPH.

Compuesto	S-10 comercial	^a S-10 reutilizado	H-30 comercial	^b H-30 reutilizado
Formaldehído	*NC	0.01	0.03	0.05
Acetaldehído	0.14	0.21	0.50	0.51
Acetona	0.31	0.10	0.98	0.19

* No pudo ser cuantificado.

^a n = 4; ^b n = 6.

III.3.2. INTERACCIONES DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS CON LA DNPH

Derivatización en fase líquida

Influencia de la acidez del medio

La Norma UNE 77260-3 [19] ha puesto de manifiesto la necesidad de que la reacción de formación de las hidrazonas que los compuestos carbonílicos forman con la DNPH, ha de realizarse en medio ácido. Con tal finalidad, se han utilizado disoluciones de ácidos inorgánicos como HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ o HClO₄.

Con objeto de establecer la cantidad de ácido adecuada para que se produzca en condiciones óptimas la reacción de derivatización, se han preparado disoluciones que contenían DNPH al 0.05% (p/v) y una mezcla de los compuestos carbonílicos disueltos en acetonitrilo, a una concentración próxima a los 0.2 mg/L. A estas disoluciones se añaden diferentes cantidades de ácido clorhídrico, de forma que el porcentaje de fase acuosa con respecto a la orgánica se mantenga en un 5% (v/v). Alícuotas de cada una de las disoluciones resultantes se han inyectado en el sistema cromatográfico y las áreas de los picos representativos de cada uno de los aldehídos y cetonas utilizados en este estudio, se han representado frente a la concentración de HCl en las respectivas disoluciones.

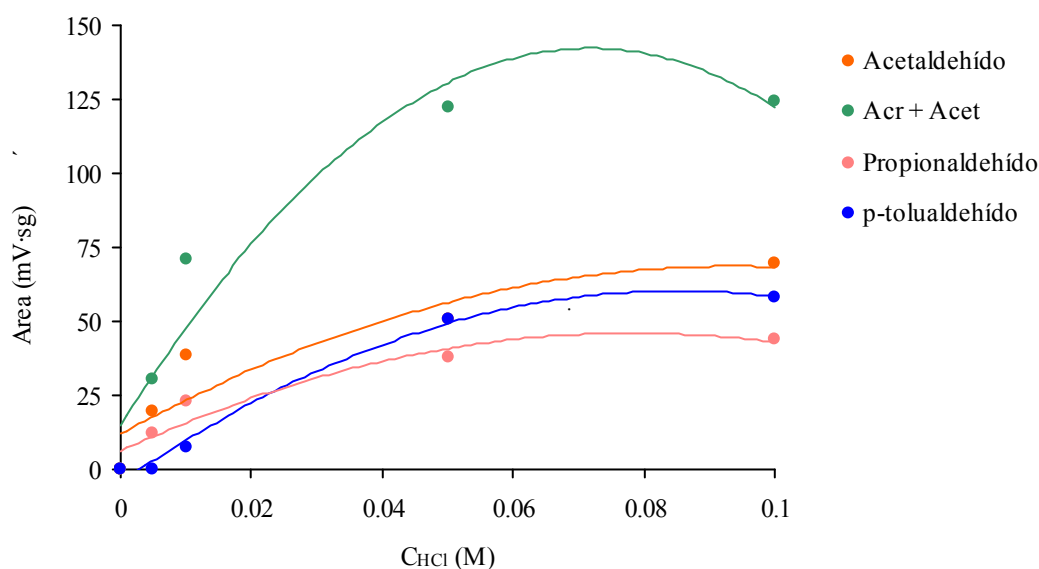


Figura III.6. Influencia de la concentración de HCl en la reacción de derivatización de los compuestos carbonílicos con DNPH.

En la Figura III.6 se han incluido los resultados obtenidos para algunos compuestos carbonílicos representativos. A partir de los mismos, se ha establecido que una concentración 0.1M de HCl puede resultar adecuada para las reacciones de derivatización de los aldehídos y cetonas seleccionados para este estudio.

Tiempo de reacción y reproducibilidad de las medidas

Establecidas las concentraciones de reactivos y la composición del medio adecuadas para efectuar la reacción de derivatización, se ha procedido a comprobar experimentalmente la influencia del tiempo de reacción en la formación de las hidrazonas correspondientes a los distintos compuestos carbonílicos estudiados. Con tal finalidad, se ha preparado una disolución que contenía los aldehídos y cetonas seleccionados, un exceso de DNPH, la concentración de HCl establecida en el apartado anterior, y la cantidad de agua y acetonitrilo necesarios para alcanzar la proporción indicada con anterioridad. De esta disolución, mantenida en nevera y en ausencia de luz, se toman alícuotas a diferentes tiempos y se inyectan en el sistema cromatográfico.

La evolución de la cantidad de cada una de las hidrazonas formadas, en función del tiempo de reacción, se estableció por comparación de las áreas de los picos cromatográficos representativos de los distintos compuestos carbonílicos, obtenidas al ir inyectando, a distintos tiempos, alícuotas de la disolución. Los resultados correspondientes a tiempos de reacción de 1, 4 y 9 horas se han agrupado en la Tabla III.3.

Puede observarse que, en general, las desviaciones estándar obtenidas presentan valores compatibles con reacciones que, en espacios de tiempo inferiores a una hora, puede considerarse que se completan. Sin embargo, las áreas de pico correspondientes a los pares acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído, presentan valores altos de la desviación estándar. Es posible que las diferencias considerables que aparecen en los valores de las áreas de pico puedan estar relacionadas con interacciones afectadas por los tiempos de reacción.

Ahora bien, las causas que motivan las diferencias que se observan para los dos pares de compuestos mencionados, no tienen que ser necesariamente las mismas. En el caso de la acroleína + acetona, las áreas obtenidas para los tiempos de reacción inferiores son similares entre sí, mientras que las originadas por las disoluciones analizadas después de 9 horas de su

preparación muestran un aumento importante, de forma que la desviación estándar entre ellas llega a ser de 21.3 mV·sg. Sin embargo, para el par 2-butanona + butiraldehído, el aumento del área de pico se produce para las disoluciones representativas de los tiempos iniciales y luego se estabiliza, aunque las diferencias son suficientemente importantes como para que la desviación estándar sea de 36.3 mV·sg.

Tabla III.3. Evolución temporal de las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a las hidrazonas de los compuestos carbonílicos formadas por reacción con DNPH.

Compuesto	Áreas de pico (mV·sg)				
	1 h	4 h	9 h	Media	* DS
Formaldehído	40.7	45.3	47.4	44.5	3.4
Acetaldehído	54.2	58.2	58.5	57.0	2.4
Acr + Acet	94.2	94.6	131.4	106.7	21.3
Propionaldehído	48.3	47.9	49.0	48.4	0.6
Crotonaldehído	57.4	56.0	55.4	56.3	1.0
Buta + Buti	110.2	174.3	172.0	152.2	36.3
Benzaldehído	64.7	64.9	63.0	64.2	1.0
Valeraldehído	66.8	59.9	68.3	65.0	4.5
<i>p</i> -tolualdehído	55.8	52.1	53.4	53.8	1.9
Hexaldehído	53.0	53.2	56.7	54.3	2.1

* Desviación estándar.

Al intentar justificar las elevadas desviaciones estándar asociadas a los dos pares de compuestos carbonílicos citados, una causa puede encontrarse en la escasa reproducibilidad de las medidas, asociada a la falta de definición de los picos. Por tal motivo, se realizaron experiencias en las que a lo largo de una semana se preparaba cada día, en las mismas condiciones experimentales previamente optimizadas, una disolución de las hidrazonas formadas por reacción entre cada uno de los compuestos carbonílicos y la DNPH.

La Tabla III.4 muestra resultados de las áreas medidas para los picos cromatográficos correspondientes a las distintas hidrazonas formadas, en las disoluciones representativas de tres días diferentes. Puede observarse que, de nuevo, las mayores desviaciones estándar corresponden a las áreas obtenidas para los pares acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído. De esta forma, podría corroborarse que la evolución temporal observada, para

las áreas correspondientes a las hidrazonas de los aldehídos y cetonas que forman parte de estos pares, no es un problema asociado a la cinética de las reacciones, sino que las diferencias en las áreas agrupadas en la Tabla III.3 responde a una falta de precisión de las medidas, asociada a la superposición de los picos representativos de los componentes de cada uno de los pares de compuestos.

No obstante, ante la posibilidad de que, al menos en algún caso, las diferencias observadas en las áreas de los picos de los pares acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído, estuviesen motivadas por transformaciones de los compuestos carbonílicos o de sus hidrazonas en las disoluciones que los contienen, se ha procurado disponer de información complementaria. En tal sentido, en los mismos cromatogramas obtenidos con objeto de evaluar la influencia del tiempo de reacción, se han medido los tiempos de retención asociados a cada pico cromatográfico. En general, las desviaciones estándar obtenidas son pequeñas, incluyendo las correspondientes a los tiempos de retención del par acroleína + acetona (DS = 0.10 min). Las mayores diferencias entre los tiempos de retención se obtienen para el par 2-butanona + butiraldehído, con valores que van disminuyendo desde los 25.6 min en la disolución recién preparada, a los 24.8 min que se obtienen cuando se inyecta la disolución en la que se han dejado transcurrir 9 horas desde su preparación.

Tabla III.4. Reproducibilidad del tamaño de los picos cromatográficos correspondientes a las hidrazonas formadas por reacción entre los compuestos carbonílicos y la DNPH.

Compuesto	Áreas de pico (mV·sg)				
	Día 1	Día 2	Día 3	Media	DS
Formaldehído	47.9	49.8	41.5	46.4	4.4
Acetaldehído	69.6	60.9	78.0	69.5	8.5
Acr + Acet	124.3	133.6	96.8	118.2	19.1
Propionaldehído	43.6	42.9	39.6	42.0	2.2
Crotonaldehído	68.9	73.9	71.4	71.4	2.5
Buta + Buti	138.0	95.6	89.9	107.8	26.3
Benzaldehído	66.3	68.2	61.8	65.4	3.2
Valeraldehído	70.1	72.3	55.0	65.8	9.4
<i>p</i> -tolualdehído	58.1	61.6	50.5	56.7	5.7
Hexaldehído	59.8	57.0	54.2	57.0	2.8

En atención a lo expuesto, y con objeto de establecer si el comportamiento observado para el par 2-butanona + butiraldehído coincidía con el de cada uno de los componentes considerados individualmente, se realizaron cromatogramas a 0, 30, 60 y 90 minutos, de disoluciones independientes, preparadas para obtener en una de ellas el derivado butiraldehído-DNPH, y en otra el correspondiente a la 2-butanona. Al observar la evolución de las señales cromatográficas, se pone de manifiesto que en el caso de la cetona lineal, la señal va aumentando progresivamente con el tiempo y comienza a estabilizarse después de dejar en reposo la disolución durante 60 minutos, mientras que el área representativa de la hidrazona del butiraldehído no evoluciona significativamente con el tiempo. A pesar de intentar mejorar la cinética de la reacción correspondiente a la formación de la hidrazona del butiraldehído, aumentando la temperatura de la disolución o verificando la reacción en presencia de ultrasonidos, no se consiguieron modificaciones importantes en los resultados.

Hasta ahora hemos centrado la atención en la evolución del comportamiento de las hidrazonas en función del tiempo de reacción a través de las modificaciones del tamaño de los picos cromatográficos. Ya se ha comentado que, al menos en el caso del par 2-butanona + butiraldehído, también se producen modificaciones del tiempo de retención cromatográfico. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la relativa complejidad de las reacciones de formación de las hidrazonas de los distintos aldehídos y cetonas con la DNPH. Por otra parte, junto a la necesidad de tener en cuenta los condicionantes comentados, debe contemplarse, desde un punto de vista analítico, las dificultades asociadas a la diferente velocidad de las reacciones, al menos de algunos derivados.

Por último, ha parecido oportuno establecer la evolución temporal de la estabilidad de las distintas hidrazonas. Con tal finalidad, una disolución que contiene los compuestos carbonílicos estudiados, a la que se añade exceso de la DNPH y las cantidades adecuadas de acetonitrilo y ácido clorhídrico, se ha conservado durante cuarenta y cinco días. Los cromatogramas que se han ido realizando a lo largo de ese tiempo, muestran la aparición de nuevas señales que podrían suponer interferencias considerables en las metodologías analíticas a utilizar para la determinación de los compuestos carbonílicos en estudio. Entre ellas, destacan la que aparece en las proximidades del pico correspondiente a la hidrazona del acetaldehído, otra entre las señales debidas al crotonaldehído y al par 2-butanona + butiraldehído, así como la que corresponde a un desdoblamiento del pico originado por la acroleína. En cualquier caso, a pesar del indudable interés de conocer las causas en la que se

fundamentan estos procesos y el delimitar su extensión, no se han emprendido nuevas experiencias en tal sentido por no estar contemplados dentro de los objetivos del presente trabajo. Ahora bien, con objeto de procurar evitar las manifestaciones de los procesos de degradación de los compuestos derivatizados o de las reacciones entre ellos, la preparación de las disoluciones de las hidrazonas a utilizar a lo largo del trabajo se realizaron en las condiciones indicadas y las medidas se realizaron entre 1 y 24 horas después de preparadas.

Tomando en consideración los resultados obtenidos, se han realizado experiencias encaminadas a establecer el grado de cuantitatividad de las reacciones estudiadas. Con tal finalidad, en condiciones experimentales adecuadas, se hacen reaccionar disoluciones de los compuestos carbonílicos con la disolución de la DNPH de forma que el reactivo derivatizante quede en exceso. La determinación de las hidrazonas formadas se realiza utilizando una curva de calibrado construida a partir de una disolución comercial de las mismas.

En la Tabla III.5 se han agrupado los resultados obtenidos, expresados como porcentajes de recuperaciones medias, y establecidos al relacionar la cantidad de los compuestos carbonílicos determinados con la cantidad de los mismos puesta en las disoluciones medidas.

Tabla III.5. Recuperaciones medias ($n = 4$) de las hidrazonas formadas por reacción en fase líquida.

Compuesto	R (%)
Formaldehído	76.3
Acetaldehído	69.9
Acr + Acet	54.5
Propionaldehído	48.9
Crotonaldehído	104.4
Buta + Buti	66.6
Benzaldehído	77.5
Valeraldehído	77.6
<i>p</i> -tolualdehído	86.6
Hexaldehído	70.3

Los resultados muestran que la reacción correspondiente al crotonaldehído puede considerarse cuantitativa, mientras que las recuperaciones medias correspondientes al propionaldehído y al par acroleína + acetona se sitúan en el entorno del 50%. Para los restantes aldehídos y cetonas las recuperaciones medias presentan valores comprendidos entre el 67 y el 87%.

Derivatización en fase sólida

Como se ha comentado, una alternativa para la toma de muestra de los compuestos carbonílicos presentes en el humo consiste en hacer pasar la muestra a través de un soporte sólido impregnado con la DNPH, y retenido en un cartucho de los habitualmente utilizados para la extracción en fase sólida. Con objeto de conocer la eficacia y características de los procesos de derivatización, se añaden a los cartuchos disoluciones de los compuestos carbonílicos, con concentraciones apropiadas, y se hace pasar a través del mismo una corriente de aire durante unos 20 minutos. Con esta forma de operar se pretende simular el proceso de muestreo de los humos, y contemplar la posible influencia de la acción de arrastre que el aire puede ejercer por la relativa volatilidad de los compuestos carbonílicos, o de sus hidrazonas, o por no encontrarse suficientemente retenidos en el soporte sólido, aunque es conocido que las hidrazonas formadas presentan presiones de vapor bajas. En otro orden de cosas, con objeto de poder evaluar el proceso de derivatización es necesario eluir las hidrazonas formadas en el cartucho. En consecuencia, las citadas experiencias también nos podrían suministrar información acerca de la eficacia del acetonitrilo como agente para la elución de los derivados de la DNPH formados y retenidos en la fase estacionaria.

En atención a lo expuesto, se procedió en primer lugar a evaluar el comportamiento de los cartuchos reutilizados como soporte en el que se produce el proceso de derivatización mediante el que se forman las hidrazonas representativas de los compuestos carbonílicos y, de forma conjunta, el comportamiento del acetonitrilo como eluyente de los derivados formados. Con tal finalidad, se añaden a los cartuchos seleccionados, en los que se ha depositado previamente la DNPH, alícuotas de una disolución con una concentración adecuada de los compuestos carbonílicos. Después de unos minutos se hacen pasar, por acción de la gravedad, acetonitrilo hasta alcanzar un volumen de 10 mL. Las recuperaciones obtenidas para los distintos compuestos carbonílicos, se establecen a partir de las concentraciones añadidas de

aldehídos y cetonas y de las obtenidas a partir de las curvas de calibrado construidas con una disolución patrón comercial de las hidrazonas. Los resultados obtenidos se han agrupado en la Tabla III. 6.

Tanto en el caso que estamos comentando, como al efectuar la derivatización en disolución de los compuestos carbonílicos con la DNPH, los rendimientos de las recuperaciones han sido calculadas a partir de las curvas de calibrado de las hidrazonas correspondientes a los compuestos carbonílicos, es decir, sin considerar los rendimientos de las reacciones de derivatización. A pesar de no tener en cuenta esta diferencia, los resultados obtenidos pueden considerarse bastante aceptables, con la excepción del correspondiente al propionaldehído.

Tabla III. 6. Recuperaciones medias de compuestos carbonílicos derivatizados en cartuchos reutilizados rellenos con gel de sílice impregnada con DNPH.

Compuesto	R (%)	
	Cartuchos H-30 (n = 2)	Cartuchos H-30 (n = 3)
	Sin paso de aire	Con paso de aire
Formaldehído	89.6	92.0
Acetaldehído	82.2	73.7
Acr + Acet	70.4	402.8
Propionaldehído	40.5	30.8
Crotonaldehído	84.7	85.8
Buta + Buti	81.9	79.4
Benzaldehído	80.6	86.5
Valeraldehído	90.3	80.7
<i>p</i> -tolualdehído	88.9	90.0
Hexaldehído	70.0	73.8

La toma de muestras de humo o, en general, de muestras gaseosas implica el paso de la misma a través del relleno. Ahora bien, conocida la presencia en la atmósfera del laboratorio de compuestos carbonílicos, antes de emprender las experiencias comentadas, se procedió a evaluar la influencia de las posibles interferencias atmosféricas. Con tal propósito, se realizaron ensayos en los que, después de añadir la correspondiente disolución de los

compuestos carbonílicos, se hacía pasar aire ambiente durante unos 20 minutos a través del cartucho seleccionado que, en todos los casos, había sido impregnado con disolución de DNPH. Posteriormente, estos cartuchos eran tratados con acetonitrilo con objeto de eluir las hidrazonas formadas y una alícuota de la disolución así obtenida se inyectaba, para su análisis, en el sistema cromatográfico.

Los resultados hallados al emplear distintos tipos de cartuchos pusieron de manifiesto que, además de las cantidades de compuestos carbonílicos asociados como impurezas al agente derivatizante, también son importantes las aportaciones procedentes de la atmósfera del laboratorio, aunque se tomen precauciones al respecto, evitando lugares en los que se manipulen compuestos carbonílicos. De especial significación ha resultado ser la cantidad de acetona, que sobrepasa considerablemente la retenida por la DNPH comercial. En menor extensión y cuando se utilizan cartuchos S-10, también se detecta la contaminación atmosférica por formaldehído y acetaldehído.

Los resultados obtenidos para las recuperaciones de compuestos carbonílicos contenidos en cartuchos H-30 a través de los que se hace pasar aire muestran recuperaciones superiores al 74% para casi todos los compuestos carbonílicos, si bien pueden estar influidas, aunque sea en proporciones pequeñas, por la contaminación aportada por los propios cartuchos y, de forma especial, por la contaminación asociada al aire del laboratorio, que puede contribuir con concentraciones importantes de acetona. Indudablemente, en los valores obtenidos para las recuperaciones puede influir negativamente la cuantitatividad de los procesos de derivatización, la eficacia que muestren los rellenos de los cartuchos para la retención de los compuestos carbonílicos y para oponerse a la elución de las hidrazonas por el acetonitrilo empleado como eluyente, mientras que a las desviaciones positivas contribuiría la contaminación que aporta la DNPH que impregna los rellenos de los cartuchos, además de los aldehídos y cetonas que puedan encontrarse en el aire ambiente del laboratorio, que interaccionan con la DNPH presente en los cartuchos cuando se hace pasar el aire a través de los mismos. En sentido contrario al comentado, destacan las bajas recuperaciones que se obtienen para el propionaldehído.

Al comparar los resultados obtenidos para las recuperaciones calculadas haciendo pasar o no aire a través de los cartuchos, se pone de manifiesto que, en general, la influencia de esta variable es escasa, excepto lógicamente en el caso de la acetona. Como quiera que esta circunstancia debe asociarse a que las experiencias se realizan en la atmósfera del laboratorio,

la contaminación por componentes de la atmósfera se verá considerablemente reducida en ambientes más limpios o en los que la muestra a analizar sea preponderante, como sería el caso de los humos.

Las experiencias realizadas al inyectar concentraciones conocidas de aldehídos y cetonas en los cartuchos muestran que el tiempo de reacción con la DNPH retenida en el soporte, no es una variable que ejerza una influencia importante en el proceso de derivatización. En efecto, en las señales medidas en los eluatos obtenidos después de prolongar el tiempo de contacto entre los compuestos carbonílicos y la DNPH, no se observan modificaciones significativas.

III.3.3. RETENCIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS PRESENTES EN FASE GAS

Como ya se ha comentado anteriormente, entre los compuestos carbonílicos presentes en muestras gaseosas que habitualmente reciben mayor atención, se encuentran los de menor peso molecular y, en especial, por su toxicidad y ubicuidad, el formaldehído. Las dos alternativas que pueden considerarse tradicionales para la toma de muestra de compuestos carbonílicos en aire, se basan en la utilización de borboteadores con disoluciones absorbentes y cartuchos de SPE con distintos rellenos, principalmente de gel de sílice y C-18, impregnados con algún reactivo derivatizante. Ahora bien, las respectivas metodologías se han aplicado fundamentalmente a compuestos carbonílicos frecuentes en aire ambiente, como los que acabamos de mencionar. En atención a los estudios precedentes, en este trabajo se han ensayado ambas posibilidades de toma de muestra. Con objeto de establecer las condiciones experimentales adecuadas, alícuotas de disoluciones de los compuestos carbonílicos se volatilizan y la fase gaseosa formada se hace pasar a través de una disolución de DNPH o a través de cartuchos de gel de sílice impregnados con DNPH.

En todo caso, ha de tomarse en consideración que, en el presente trabajo, el objetivo central implica la determinación de los compuestos carbonílicos en muestras de humo, entre cuyas características se encuentra el que presentan temperaturas habitualmente superiores a la temperatura ambiente. Por otra parte, también debe tenerse en cuenta que no sólo pretendemos determinar compuestos carbonílicos ligeros, sino derivados alifáticos y olefínicos de pesos moleculares superiores e, incluso, compuestos con anillos aromáticos.

Disoluciones absorbentes con DNPH

Es evidente el paralelismo existente entre las experiencias encaminadas a conocer las interacciones entre los compuestos carbonílicos y la DNPH, cuando ambos se encuentran en disolución, y las orientadas a la utilización de disoluciones de DNPH para la toma de muestra de aldehídos y cetonas presentes en muestras de aire o de humo. La diferencia fundamental radica en que ahora la interacción se produce entre los compuestos carbonílicos en fase gas y el agente derivatizante en disolución.

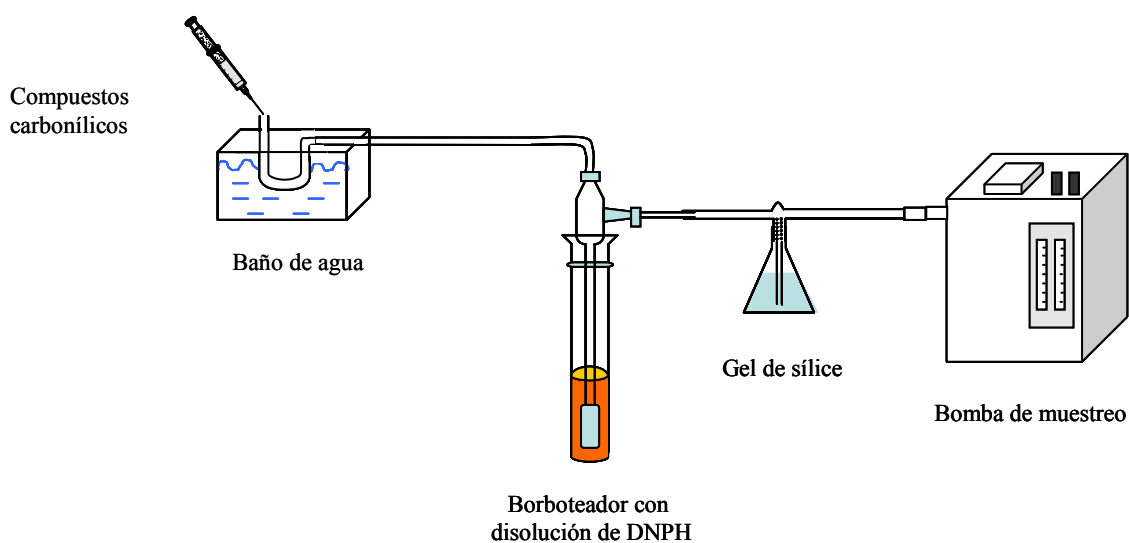


Figura III.7. Sistema de muestreo de compuestos carbonílicos con la utilización de una disolución absorbente de DNPH.

Para respetar que los analitos y la DNPH se encuentren en fases distintas hasta que interactúen, se ha diseñado el sistema de muestreo que se muestra en la Figura III.7, para ser usado en experiencias de laboratorio. Con objeto de conseguir una adecuada volatilización y transporte de los compuestos carbonílicos volatilizados a través del sistema, se coloca una alícuota de una disolución, que contiene una concentración intermedia de los compuestos carbonílicos, en el extremo de un tubo de vidrio en forma de U introducido en un baño de agua caliente, a una temperatura en torno a los 100°C. Al mismo tiempo, se pone en funcionamiento una bomba que impulsa la mezcla formada por aire y compuestos carbonílicos a lo largo del sistema, a un flujo controlado. La mezcla gaseosa se hace burbujear en un borboteador que contiene la disolución absorbente de DNPH. Entre esta disolución y la

bomba, se intercala un erlenmeyer que contiene gel de sílice para retener la humedad que pueda arrastrar la mezcla gaseosa. Después de transcurrir el tiempo prefijado de 20 minutos, una alícuota de la disolución presente en el borboteador se inyecta en el sistema cromatográfico para su análisis. La cuantificación se realiza mediante una curva de calibrado obtenida a partir de disoluciones patrón de las respectivas hidrazonas.

En las experiencias realizadas, la disolución absorbente introducida en el borboteador contiene un 0.5% (p/v) de la DNPH y un 5% (v/v) de una disolución de HCl 0.1M en acetonitrilo. Se han utilizado distintos tipos de borboteadores y volúmenes de absorbente de 25, 50 y 100 mL, con flujos comprendidos entre 1.2 y 2.0 L/min.

Tabla III.7. Recuperaciones (%) de compuestos carbonílicos en muestras de aire al ser retenidos en borboteadores con disolución de DNPH como absorbente.

Compuesto	$V_{\text{absorbente}} = 25 \text{ mL}$	$V_{\text{absorbente}} = 100 \text{ mL}$
	Flujo = 1.2 L/min	Flujo = 1.9 L/min
Formaldehído	82.6	81.0
Acetaldehído	62.9	68.0
Acr + Acet	71.6	54.6
Propionaldehído	43.9	53.3
Crotonaldehído	89.7	128.5
Buta + Buti	63.7	59.9
Benzaldehído	68.3	73.2
Valeraldehído	84.0	84.3
<i>p</i> -tolualdehído	64.6	71.1
Hexaldehído	67.9	66.5

En la Tabla III.7 se muestran dos ejemplos representativos de las recuperaciones obtenidas para cada uno de los compuestos carbonílicos, en experiencias con volúmenes de absorbente y flujos diferentes. Como se observa, no existen grandes diferencias entre las recuperaciones obtenidas en ambos sistemas, ni tampoco con las obtenidas en otras experiencias. Así mismo, al comparar con los resultados agrupados en la Tabla III.5 establecidos al hacer reaccionar disoluciones de los compuestos carbonílicos y de la DNPH, se observa que los resultados son concordantes.

Cartuchos con adsorbentes impregnados con DNPH

Como se ha comentado anteriormente, para la toma de muestra de compuestos carbonílicos presentes en aire ambiente, el sistema más utilizado consiste en hacer pasar la muestra a través de cartuchos de extracción en fase sólida, con distintos soportes impregnados con agentes derivatizantes. En atención al comportamiento comentado en el apartado anterior para la interacción entre los compuestos carbonílicos y la DNPH en fase sólida, ha parecido oportuno explorar la utilización de cartuchos de gel de sílice tratados con DNPH para la toma de muestras de compuestos carbonílicos contenidos en muestras gaseosas.

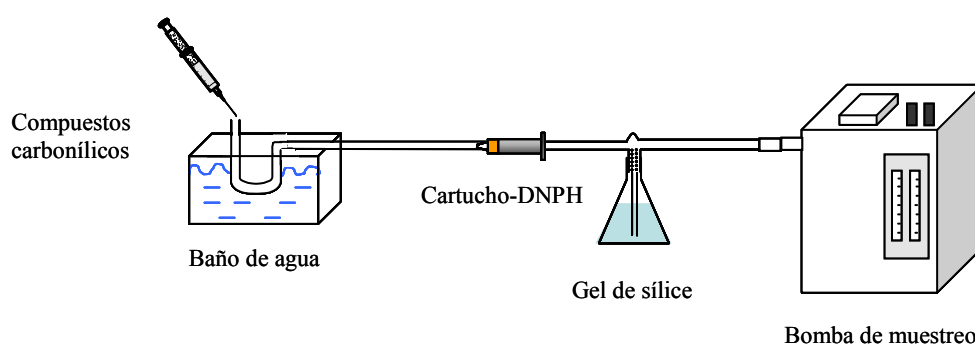


Figura III.8. Sistema de muestreo de compuestos carbonílicos usando cartuchos con gel de sílice impregnada con la DNPH.

El dispositivo utilizado para simular un proceso de muestreo y, al mismo tiempo, poder estudiar la influencia de determinadas variables, así como para establecer la eficacia del sistema de captación, ha consistido en volatilizar cantidades conocidas de los compuestos carbonílicos y hacerlos pasar a través de un cartucho reutilizado. El dispositivo, que se muestra en la Figura III.8 es similar al empleado al estudiar la toma de muestra en borboteadores. En un tubo con forma de U, se introduce una alícuota de la disolución patrón de compuestos carbonílicos en acetonitrilo. El tubo se sumerge en un baño de agua en torno a 100°C y los gases generados en el tubo son arrastrados mediante una bomba cuyo flujo es posible regular y mantener constante en el tiempo. El cartucho, que contiene gel de sílice impregnada con disolución de DNPH, se introduce en el recorrido del gas. Con objeto de evitar que la humedad pueda llegar a la bomba, se introduce una trampa de gel de sílice a continuación del cartucho.

En atención a los resultados obtenidos en apartados anteriores, se han seleccionado los cartuchos H-30 reutilizados para realizar las experiencias relacionadas con la retención de los compuestos carbonílicos en el proceso de toma de muestra. Por otra parte, una vez que se ha establecido que la atmósfera del laboratorio puede contener un grado de contaminación considerable, por formaldehído, acetaldehído y acetona, se optó por modificar el dispositivo de muestreo. Con objeto de eliminar o disminuir dicha contaminación hasta valores mínimos, se acopló a la entrada del tubo en U un cartucho similar al utilizado para la retención de los compuestos carbonílicos. De esta forma, el aire que entra en el sistema se pone en contacto con la DNPH antes de arrastrar a los analitos volatilizados.

Incluso después de introducir el cartucho adicional para evitar la contaminación procedente del aire ambiente, cuando se realizan experiencias en las que se retienen los compuestos carbonílicos previamente volatilizados, los cromatogramas correspondientes a las disoluciones obtenidas al eluir las hidrazonas formadas en el cartucho de retención, presentan picos que no se corresponden con los obtenidos en la experiencias realizadas al eluir las disoluciones patrón depositadas en el cartucho directamente. Entre ellos, destaca uno que se sitúa a continuación del propionaldehído que, al intentar identificarlo con la utilización de patrones de composición conocida, se comprueba que corresponde a la acroleína, y otro, próximo al crotonaldehído que interfiere en su cuantificación. En la bibliografía consultada [6,19], se advierte que la acroleína puede dar lugar a algunos picos indeseables, que pueden evitarse con una trampa de ozono. Por tal motivo, se introdujo otra modificación en el sistema diseñado para la toma de muestra. En el nuevo dispositivo, antes del tubo en U se introduce el cartucho encargado de eliminar las interferencias presentes en el aire ambiente y, además, una trampa de KI para evitar la acción del ozono. De esta forma, aparte de evitar las interferencias de los contaminantes, se elimina la señal que interfiere en la determinación del crotonaldehído, pero no la correspondiente a la acroleína como se ha puesto de manifiesto en ensayos en los que la acroleína se ha inyectado individualmente.

Con la utilización de un dispositivo instrumental como el representado en la Figura III.8, con las modificaciones indicadas, se han realizado las experiencias necesarias para establecer la eficacia de los cartuchos de gel de sílice impregnados con DNPH para retener los compuestos carbonílicos y del acetonitrilo para eluir las correspondientes hidrazonas. En tal sentido, aunque el fabricante recomiende utilizar un volumen de 10 mL de acetonitrilo para la elución, se ha comprobado que para los cartuchos H-30, preparados como se ha indicado

anteriormente, basta con 5 mL para la elución completa de las hidrazonas. Por otra parte, se hicieron experiencias en las que se colocaron dos cartuchos H-30 en serie y en las que se pudo comprobar que los compuestos carbonílicos volatilizados y arrastrados por el sistema, durante 20 minutos a flujos que pueden alcanzar los 2 L/min, quedaban retenidos en el primero de los cartuchos.

Las recuperaciones obtenidas al emplear cartuchos H-30 reutilizados en la toma de muestra, se han establecido a partir de las concentraciones de cada analito introducidas en el sistema y las determinadas en el eluato con acetonitrilo. Estas últimas se determinan a partir de curvas de calibrado obtenidas con disoluciones preparadas a partir de una disolución patrón de las hidrazonas. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla III.8.

Tabla III.8. Recuperaciones medias (n = 4) de los compuestos carbonílicos en fase gaseosa retenidos en cartuchos reutilizados de DNPH.

Compuestos	R (%)	DS
Formaldehído	64.0	2.7
Acetaldehído	54.4	0.8
Acr + Acet	19.2	2.0
Propionaldehído	29.8	1.7
Crotonaldehído	96.1	11.8
Buta + Buti	73.6	20.2
Benzaldehído	59.3	1.8
Valeraldehído	61.6	4.3
<i>p</i> -tolualdehído	69.5	2.7
Hexaldehído	58.1	0.9

Los resultados obtenidos muestran que, en general, las recuperaciones son algo inferiores a las obtenidas cuando se emplean, como sistema de muestreo, los borboteadores con disolución de la DNPH. Las diferencias más importantes se refieren a los compuestos de menor peso molecular que son, al mismo tiempo, los más ligeros. En consecuencia, puede pensarse que durante el proceso de volatilización y transporte de los compuestos carbonílicos se producen pérdidas de los mismos, o que el cartucho es poco eficiente para su retención.

III.3.4. METODOLOGÍAS DE TOMA DE MUESTRA Y CALIBRACIÓN

Con independencia del sistema que se utilice para la toma de muestra, es evidente la necesidad de disponer de metodologías de calibración apropiadas, que permitan la correcta transformación del tamaño de los picos cromatográficos correspondientes a las hidrazonas formadas, en concentraciones de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras. De aquí que, una vez estudiadas las reacciones de derivatización de los aldehídos y cetonas seleccionados, en distintas situaciones experimentales, se aborde en este apartado la implantación de metodologías de calibración que tengan en cuenta las conclusiones alcanzadas en los apartados anteriores y que sean congruentes con los métodos de toma de muestra a utilizar.

Como ya se comentó en la introducción, para determinar compuestos carbonílicos en aire, es habitual que se utilicen técnicas que consisten en hacer pasar la muestra a través de borboteadores que contienen disoluciones de DNPH. No obstante, las dificultades para utilizar esta metodología en lugares remotos, ha convertido a los cartuchos comerciales, rellenos de gel de sílice impregnados con DNPH, en una alternativa a tomar en consideración. Sin embargo, los resultados comentados ponen de manifiesto los importantes inconvenientes de las metodologías de muestreo basadas en la derivatización de los aldehídos y cetonas con DNPH. Las impurezas que presentan las disoluciones de DNPH y los cartuchos que incorporan el agente derivatizante, así como los bajos rendimientos de algunas reacciones de derivatización, por problemas de cuantitatividad o debido a que transcurren a velocidades excesivamente lentas, son inconvenientes que deben ser tomados en consideración. En todo caso, no parece recomendable la cuantificación de los compuestos carbonílicos basada en la utilización de patrones comerciales de las hidrazonas, como suele ser habitual, es decir, sin tener en cuenta los problemas asociados a los reactivos y a los procesos de derivatización.

Por los motivos expuestos, en este apartado se pretenden implantar nuevas metodologías de toma de muestra o introducir modificaciones en las tradicionalmente empleadas, al tiempo que se estudian sistemas de calibración apropiados para cada una de ellas y se establecen comparaciones. Se han ensayado los dos sistemas de muestreo cuyos fundamentos se resumen a continuación:

- Cartuchos de gel de sílice. Las muestras de humo se hacen pasar a través de cartuchos tipo H-30 reutilizados, con relleno de sílice impregnado con DNPH,

mediante una bomba con un flujo programado y constante, durante un tiempo prefijado. En este caso, la derivatización se produce en la fase sólida.

- Tubos colectores de gases. En este procedimiento, se deja que la muestra de humo atraviese el tubo colector, que posee un volumen determinado, durante el tiempo suficiente como para que se llene el interior del mismo. A continuación se cierran las llaves situadas en los extremos del tubo colector y se introduce, a través del septum situado en un orificio lateral, la disolución de DNPH. La derivatización se produciría por contacto directo entre los compuestos carbonílicos presentes en la muestra y la DNPH, en el interior del tubo.

Por otra parte, como se ha dicho anteriormente, la utilización de disoluciones comerciales de las hidrazonas de los compuestos carbonílicos para construir las curvas de calibrado, presenta inconvenientes que pueden llevar a cometer errores de consideración a la hora de cuantificar los analitos presentes en las muestras reales. En atención a las consideraciones realizadas, la concentración asignada a un componente de una disolución patrón comercial, no proporciona la misma señal cromatográfica que si una concentración igual del mismo analito fuese sometida a derivatización con DNPH, en fase líquida o sólida, de acuerdo con los procedimientos comentados en los apartados anteriores. En consecuencia, se han estudiado posibles alternativas para sustituir el procedimiento habitual de calibración basado en el uso de patrones comerciales, que tomen en consideración el sistema de toma de muestra y la matriz en la que se retienen y se derivatizan los compuestos carbonílicos.

En los apartados siguientes se comentan los resultados obtenidos al poner en práctica diferentes formas de obtener curvas de calibrado apropiadas para la cuantificación de compuestos carbonílicos en muestras de humo.

Curvas IA. Derivatización en el inyector automático

Para obtener este tipo de curvas, se colocan en distintos viales 1 mL de una disolución en acetonitrilo que contiene DNPH al 0.05% (p/v) y 5% (v/v) de una disolución acuosa HCl 0.1M. Una vez introducidos los viales en el inyector automático del cromatógrafo, éste se programa para introducir en cada uno de ellos volúmenes comprendidos entre 1 y 18 μ L de una disolución de compuestos carbonílicos de concentración conocida. Se dejan transcurrir 5

minutos y se procede a la inyección automática de alícuotas desde cada uno de los viales en el cromatógrafo.

La forma de preparar esta curva de calibrado es similar a la que se emplea en otras muchas metodologías analíticas, con la ventaja de preparar e inyectar las distintas disoluciones patrón con el empleo del inyector automático acoplado al equipo de HPLC. En este caso, se trata de disponer de una metodología sencilla y rápida, que utilice los mismos reactivos que se emplearían en la toma de muestra.

En la Tabla III.9 se muestran los parámetros de calidad asociados a este tipo de curva.

Tabla III.9. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado tipo IA.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(mg/L)	* $S_{y/x}$	R^2	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	664.7 \pm 7.9	5.4	0.999	0.05 - 0.81
Acetaldehído	234.4 \pm 3.6	3.3	0.999	0.06 - 1.10
Acr + Acet	107.6 \pm 1.4	3.2	0.999	0.16 - 2.76
Propionaldehído	110.3 \pm 1.5	2.4	0.999	0.10 - 1.81
Crotonaldehído	277.4 \pm 4.1	5.5	0.999	0.09 - 1.58
Buta + Buti	164.6 \pm 2.5	7.0	0.999	0.18 - 3.26
Benzaldehído	112.5 \pm 1.8	3.3	0.998	0.12 - 2.12
Valeraldehído	184.7 \pm 6.1	9.6	0.994	0.10 - 1.86
<i>p</i> -tolualdehído	202.2 \pm 2.7	5.1	0.999	0.13 - 2.25
Hexaldehído	220.4 \pm 3.4	5.7	0.999	0.11 - 2.00

* Desviación estándar residual.

Curvas TC. Derivatización en tubo colector

Para su construcción, se introducen en un tubo colector de gases, volúmenes conocidos de una disolución patrón que contiene los distintos compuestos carbonílicos. A continuación el recipiente se somete a temperaturas apropiadas para conseguir, al menos parcialmente, la volatilización de los aldehídos y cetonas. Finalmente, por un septum dispuesto en un orificio

lateral, se introduce la disolución de DNPH y se deja en reposo el sistema el tiempo necesario para que transcurra la reacción de derivatización. En las distintas experiencias realizadas, se han utilizado tubos colectores de 1 litro de capacidad, con orificios de entrada y salida dotados con llave. Para conseguir elevar la temperatura en el interior de los tubos se adapta a la superficie de los mismos, formando bucles, una cinta calefactora de 2.5 cm de ancho conectada a un reostato.

En atención al tipo de experiencia a realizar, es evidente que existen diferentes variables que pueden afectar a los resultados. Por tal motivo, se hizo un diseño factorial del tipo $2^3 + 2$ puntos centrales, en el que se incluyeron variables como la temperatura de calentamiento del tubo colector, el tiempo durante el que se aplica dicha temperatura o tiempo de volatilización y la concentración de DNPH en la disolución utilizada como derivatizante. Sin embargo, una vez comprobada la escasa variabilidad de los resultados obtenidos al modificar las variables experimentales, se consideró oportuno desistir en su aplicación. En consecuencia, el proceso de derivatización en el tubo colector se optimizó fijando algunas variables, como el tiempo de reacción, cuya influencia en el proceso tampoco es de gran significación.

La cinta calefactora utilizada ofrece la posibilidad de poder regular la potencia en un intervalo comprendido entre 0% y 100%. De esta forma, seleccionando la potencia es posible alcanzar distintas temperaturas, siempre que se mantenga durante un tiempo adecuado. En nuestras experiencias, con una potencia del 20% en 9 minutos, se alcanza una temperatura de 58°C en la superficie del tubo colector.

Conocida las características de la cinta calefactora, se procedió a estudiar la influencia del tiempo de volatilización de los compuestos carbonílicos en el rendimiento de las reacciones de derivatización. Con tal finalidad, se utilizaron disoluciones de dichos compuestos y de DNPH, similares a las utilizadas en los procesos de derivatización comentados en apartados anteriores. Los rendimientos obtenidos al aplicar distintas potencias en la cinta calefactora, no experimentan grandes variaciones. A potencias con las que se consiguen temperaturas en el entorno de los 60°C, se consiguen los mejores resultados en cuanto a rendimientos. En otro orden de cosas, estas temperaturas facilitarían que cuando se utilice el sistema para la toma de muestras reales de humo, no se produzca la condensación de los compuestos carbonílicos presentes en las mismas, pues la temperatura del humo en los puntos del ahumadero seleccionados para el ahumado de alimentos, suele encontrarse entre 40

y 50°C [35].

Para la construcción de las curvas de calibrado, se inyectaron en los distintos tubos colectores volúmenes que como máximo alcanzaron los 90 µL de una disolución patrón de los compuestos carbonílicos. Se fijó la potencia adecuada de la cinta calefactora para alcanzar una temperatura de 58-60°C en la superficie de los tubos colectores y se dejaron transcurrir 9 minutos. Posteriormente, se introdujeron, a través del septum, 5 mL de una disolución en acetonitrilo de DNPH al 0.05% (p/v) y 5% (v/v) de HCl 0.1M para conseguir la derivatización. El tiempo de reacción utilizado fue de 30 minutos. Finalmente, una alícuota es introducida en el sistema cromatográfico para su análisis.

Tabla III.10. Parámetros de calidad asociados a la curva de calibrado tipo TC.

Compuesto	Pendiente ± DS (mAU·sg)/(mg/L)	* S _{y/x}	R ²	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	654.9 ± 37.9	27.3	0.980	0.02 - 0.83
Acetaldehído	270.0 ± 5.1	4.9	0.998	0.03 - 1.12
Acr + Acet	177.2 ± 11.4	27.8	0.976	0.08 - 2.81
Propionaldehído	103.3 ± 3.9	6.3	0.991	0.05 - 1.85
Crotonaldehído	359.0 ± 6.3	8.8	0.998	0.04 - 1.61
Buta + Buti	232.1 ± 6.6	18.9	0.995	0.09 - 3.32
Benzaldehído	149.6 ± 4.5	8.4	0.995	0.06 - 2.16
Valeraldehído	201.5 ± 3.9	6.4	0.998	0.05 - 1.89
<i>p</i> -tolualdehído	237.7 ± 4.9	9.7	0.997	0.06 - 2.29
Hexaldehído	226.3 ± 5.5	9.7	0.996	0.06 - 2.04

* Desviación estándar residual.

Para obtener, con esta metodología, curvas de calibrado apropiadas para la determinación de compuestos carbonílicos derivatizados en forma de hidrazonas con la 2,4-dinitrofenilhidracina, se ha procurado simular unas condiciones similares a las que se verían sometidos los aldehídos y cetonas presentes en muestras gaseosas y, más concretamente en muestras de humo, al ser puestos en contacto con el reactivo derivatizante,

en un recipiente cerrado. Al mismo tiempo, el dispositivo descrito y todos los reactivos y disoluciones utilizados en la construcción de estas curvas de calibrado, son iguales a los que se utilizarían en la toma de muestra. En la Tabla III.10 se muestran los parámetros de calidad asociados a esta curva.

Curvas CL. Derivatización en cartucho a partir de compuestos carbonílicos en fase líquida

Como se ha puesto de manifiesto con anterioridad, es conocida la utilidad de los cartuchos de SPE rellenos con gel de sílice e impregnados con DNPH, para la toma de muestra de compuestos carbonílicos en aire ambiente. Por otra parte, hemos comentado algunas características de las interacciones entre la DNPH y los aldehídos y cetonas seleccionados para este estudio. Por tal motivo, ha parecido oportuno disponer de un procedimiento adecuado para la construcción de curvas de calibrado, basado en provocar la formación de las hidrazonas de los compuestos carbonílicos en el mismo tipo de cartucho utilizable para la toma de muestras. Es decir, preparar las curvas de calibrado teniendo en cuenta las impurezas debidas a los reactivos, la cuantitatividad y cinéticas asociadas a los procesos de derivatización y la eficacia del acetonitrilo como eluyente de los derivados formados y retenidos en el relleno del cartucho.

En atención a lo expuesto, se han inyectado en cartuchos H-30 reutilizados, después de impregnarlos con disolución de DNPH, como se indica en el desarrollo experimental, alícuotas de una disolución patrón de los compuestos carbonílicos que, en ningún caso, sobrepasaron los 90 μ L. Los cartuchos así preparados se mantuvieron en nevera durante tiempos próximos a 1 hora y posteriormente se eluyeron, por gravedad, con acetonitrilo, hasta alcanzar un volumen de 5 mL. Una alícuota de esta disolución se inyectó en el sistema cromatográfico para su análisis.

Los cartuchos reutilizados pueden conservarse, al menos durante un mes, en las condiciones expuestas. Por otra parte, los cartuchos reutilizables pueden ser empleados repetidas veces. En nuestro caso, se han empleado hasta 25 veces, con el consiguiente ahorro económico. En la Tabla III.11 se muestran los parámetros de calidad asociados a este tipo de curva.

Tabla III.11. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado tipo CL.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(mg/L)	* $S_{y/x}$	R^2	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	671.1 \pm 25.2	18.1	0.992	0.02 - 0.83
Acetaldehído	267.5 \pm 7.2	7.1	0.996	0.03 - 1.12
Acr + Acet	142.1 \pm 6.5	15.9	0.987	0.08 - 2.81
Propionaldehído	104.0 \pm 2.0	3.2	0.998	0.05 - 1.85
Crotonaldehído	302.5 \pm 16.8	23.3	0.982	0.04 - 1.61
Buta + Buti	277.7 \pm 10.1	29.0	0.992	0.09 - 3.32
Benzaldehído	136.7 \pm 2.9	5.5	0.997	0.06 - 2.16
Valeraldehído	201.7 \pm 5.7	6.5	0.995	0.05 - 1.89
<i>p</i> -tolualdehído	232.8 \pm 5.4	10.8	0.997	0.06 - 2.29
Hexaldehído	219.1 \pm 3.9	6.8	0.998	0.06 - 2.04

* Desviación estándar residual.

Curvas CG. Derivatización en cartucho a partir de compuestos carbonílicos en fase gas

En términos generales, al referirnos a la construcción de las curvas de calibrado tipo CL, se ha comentado la conveniencia de alcanzar una cierta similitud entre las metodologías utilizadas para construir las curvas y para la toma de muestra. En tal sentido, adquiere significación el considerar la forma física en la que se encuentran los analitos, cuando se pretenden analizar muestras de humo. El que los compuestos carbonílicos se encuentren inicialmente en fase líquida o en fase gas no tendría demasiada importancia, si las interacciones con el DNPH, presente en la fase sólida retenida en el cartucho, se produjeran con rendimientos similares. No obstante, ante la complejidad ya comentada de las reacciones de derivatización, ha parecido oportuno establecer experimentalmente curvas de calibrado similares a las CL, en las que los patrones de los compuestos carbonílicos sean volatilizados antes de interactuar con la DNPH presente en el cartucho.

El dispositivo utilizado en este caso es el mostrado en la Figura III.8, ya empleado en el estudio de las interacciones entre los compuestos carbonílicos en fase gas y la DNPH retenida en gel de sílice. Los volúmenes de las disoluciones de compuestos carbonílicos volatilizados no superaron, como en los casos anteriores, los 90 μL y la temperatura en el baño de agua en el que se introduce el tubo en U con los compuestos carbonílicos, se mantuvo entre 80 y 90°C. Después de calentar durante unos 5 minutos, con un septum tapando la entrada del tubo en U, se conecta la bomba y se sustituye el septum por una trampa de DNPH para evitar la contaminación por compuestos carbonílicos presentes en la atmósfera del laboratorio. La bomba se mantiene en funcionamiento durante 10 minutos y el flujo se regula a 2 L/min. Una vez finalizado el proceso, los cartuchos se eluyen con acetonitrilo hasta alcanzar un volumen de 5 mL y se inyecta la alícuota correspondiente en el sistema cromatográfico. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III.12.

Tabla III.12. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado tipo CG.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(mg/L)	* $S_{y/x}$	R^2	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	412.9 \pm 20.1	13.1	0.988	0.02 - 0.83
Acetaldehído	174.2 \pm 5.4	5.2	0.994	0.03 - 1.12
Acr + Acet	53.1 \pm 3.7	8.1	0.977	0.08 - 2.81
Propionaldehído	77.6 \pm 2.2	3.4	0.995	0.05 - 1.85
Crotonaldehído	227.1 \pm 8.2	8.9	0.994	0.04 - 1.61
Buta + Buti	213.6 \pm 14.4	41.5	0.973	0.09 - 3.32
Benzaldehído	119.0 \pm 2.6	5.0	0.997	0.06 - 2.16
Valeraldehído	217.9 \pm 9.9	16.1	0.988	0.05 - 1.89
<i>p</i> -tolualdehído	193.4 \pm 5.9	11.8	0.994	0.06 - 2.29
Hexaldehído	193.6 \pm 5.5	9.8	0.995	0.06 - 2.04

* Desviación estándar residual.

Curvas HC. Calibración con disoluciones comerciales de hidrazonas

Como se ha comentado con anterioridad, la forma más sencilla y habitualmente utilizada [19] para preparar las curvas de calibrado, consiste en emplear disoluciones patrón

comerciales de las hidrazonas. En este caso, es evidente que las disoluciones utilizadas y el proceso que se sigue para obtener las curvas de calibrado, no guardan relación alguna con los procedimientos y reactivos que intervienen en el proceso de toma de muestra y que, como hemos puesto de manifiesto, influyen considerablemente en la formación de los derivados que indirectamente permiten cuantificar los compuestos carbonílicos presentes en las muestras.

Para preparar estas curvas basta con diluir adecuadamente, con acetonitrilo, alícuotas del patrón comercializado como DNPH-Mix 1.

Los parámetros de calidad de las curvas de calibrado obtenidas se muestran en la Tabla III.13.

Tabla III.13. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado tipo HC.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(mg/L)	* $S_{y/x}$	R^2	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	874.1 \pm 7.4	25.4	0.999	0.10 - 4.00
Acetaldehído	693.7 \pm 6.5	11.2	0.999	0.05 - 2.00
Acr + Acet	532.7 \pm 8.0	27.6	0.999	0.10 - 4.00
Propionaldehído	429.3 \pm 3.8	6.6	0.999	0.05 - 2.00
Crotonaldehído	420.6 \pm 7.1	12.1	0.998	0.05 - 2.00
Buta + Buti	407.8 \pm 3.5	12.1	0.999	0.10 - 4.00
Benzaldehído	309.2 \pm 5.5	9.5	0.998	0.05 - 2.00
Valeraldehído	334.2 \pm 5.6	9.6	0.998	0.05 - 2.00
<i>p</i> -tolualdehído	263.1 \pm 5.0	8.6	0.998	0.05 - 2.00
Hexaldehído	300.2 \pm 4.5	7.7	0.999	0.05 - 2.00

* Desviación estándar residual.

III.3.5. COMPARACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRADO

Curvas establecidas a partir de hidrazonas comerciales o de hidrazonas obtenidas por derivatización

Los valores absolutos de las pendientes correspondientes a las curvas de calibrado obtenidas para cada uno de los compuestos carbonílicos, siguiendo las cinco metodologías que se acaban de comentar, se han representado en la Figura III.9.

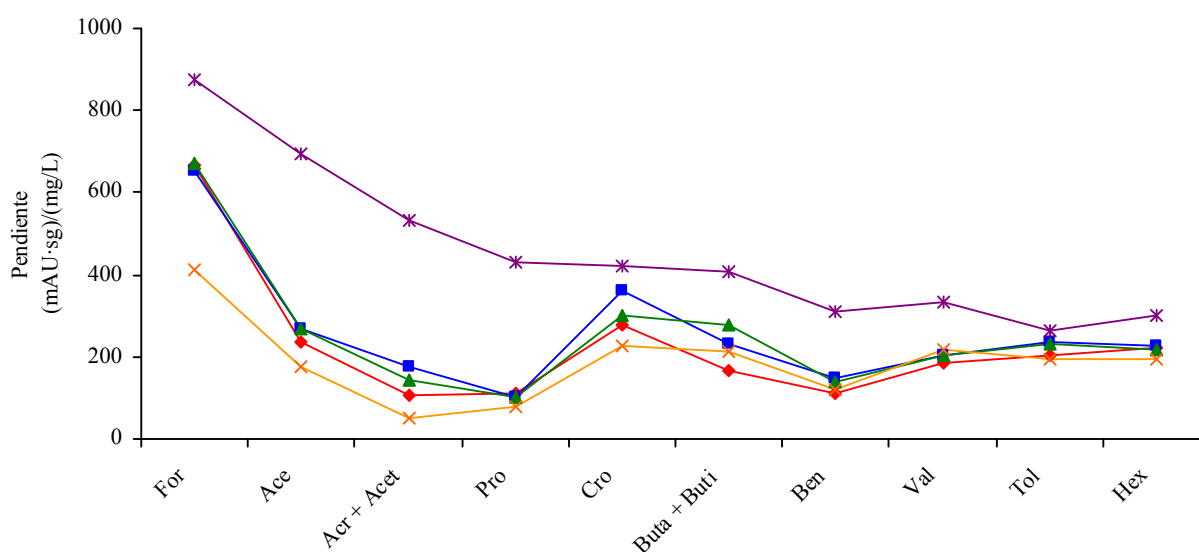


Figura III.9. Pendientes de las curvas de calibrado, obtenidas mediante distintas metodologías, correspondientes a compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH. IA(♦): Inyector automático, TC(■): Tubo colector, CL(▲): Cartucho-compuestos carbonílicos en disolución, CG(x): Cartucho-compuestos carbonílicos volatilizados, HC(*): Hidrazonas comerciales.

Es evidente que las pendientes obtenidas al utilizar los patrones comerciales de hidrazonas para construir la curva de calibrado, curva HC, son considerablemente diferentes a las restantes, no sólo en la secuencia de los valores correspondientes a las pendientes representativas de los distintos compuestos, sino en los valores absolutos de las mismas, que son bastante superiores al utilizar la metodología HC. Sólo en el caso del crotonaldehído y del *p*-tolualdehído las pendientes se aproximan a las obtenidas para los mismos compuestos por otras metodologías.

Para facilitar la comparación, se han normalizado los resultados obtenidos para las pendientes de todos los compuestos, por cada metodología, con respecto al propionaldehído.

La elección de este compuesto se debe a que la sensibilidad que corresponde al mismo es bastante uniforme en todas las metodologías y suele encontrarse entre las más bajas; las ordenadas en el origen de las correspondientes curvas de calibrado suelen ser las que más se aproximan a cero, y los valores de la desviación estándar residual de sus curvas de calibrado se encuentran, en general, entre los menores. Puesto que el sistema utilizado para las medidas analíticas se basa, en todos los casos, en la absorción de radiación de las respectivas hidrazonas en el detector del cromatógrafo, la utilización de valores normalizados puede facilitar, de forma considerable, la comparación entre las sensibilidades correspondientes a cada uno de los derivados, atendiendo a la metodología de derivatización.

Las representaciones gráficas de los valores normalizados de las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas por las metodologías que hacen uso de la derivatización en inyector automático (IA) o en tubo colector (TC), se encuentran en la Figura III.10.A, junto con las establecidas cuando las curvas de calibrado se realizan a partir de patrones comerciales de las hidrazonas (HC).

Las pendientes de las curvas de calibrado HC podrían considerarse que están condicionadas, de forma prioritaria, por la absorptividad molar de las respectivas hidrazonas que, en principio, no deben presentar valores muy dispares entre sí. Como se observa en la mencionada figura, dichas pendientes, o lo que es igual, las sensibilidades correspondientes a las determinaciones de los compuestos carbonílicos no presentan grandes diferencias. Los valores normalizados varían entre 0.6 y 2.0 es decir, que entre las sensibilidades extremas la relación es ligeramente superior a tres. Ahora bien, si se excluye al formaldehído y al acetaldehído, los valores extremos entre las pendientes normalizadas son 0.6 y 1.2.

Cuando se toman en consideración las otras dos curvas agrupadas en la Figura III.10.A, representativas de las curvas de calibrado IA y TC, obtenidas derivatizando los compuestos carbonílicos con disoluciones de la DNPH, las sensibilidades obtenidas también dependen de las absorptividades molares de las respectivas hidrazonas pero, además, y en esto se diferenciarían de las anteriores, las pendientes que se obtengan para las curvas de calibrado se encontrarán influenciadas por la cuantitatividad de los procesos de derivatización, así como por los errores de todo tipo asociados a dichos procesos. En consecuencia, es congruente que se obtengan no sólo pendientes menores, sino que sus valores relativos presenten una mayor variabilidad. En términos generales, se observa que el formaldehído sigue presentando la máxima sensibilidad, pero ahora supera en más de 5 veces la correspondiente al

propionaldehído, el acetaldehído sigue ocupando el segundo lugar, pero acompañado en este puesto por otros como el crotonaldehído, el par 2-butanona + butiraldehído, el valeraldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído, mientras que el par acroleína + acetona y el benzaldehído son, junto con el propionaldehído los que muestran menores sensibilidades relativas.

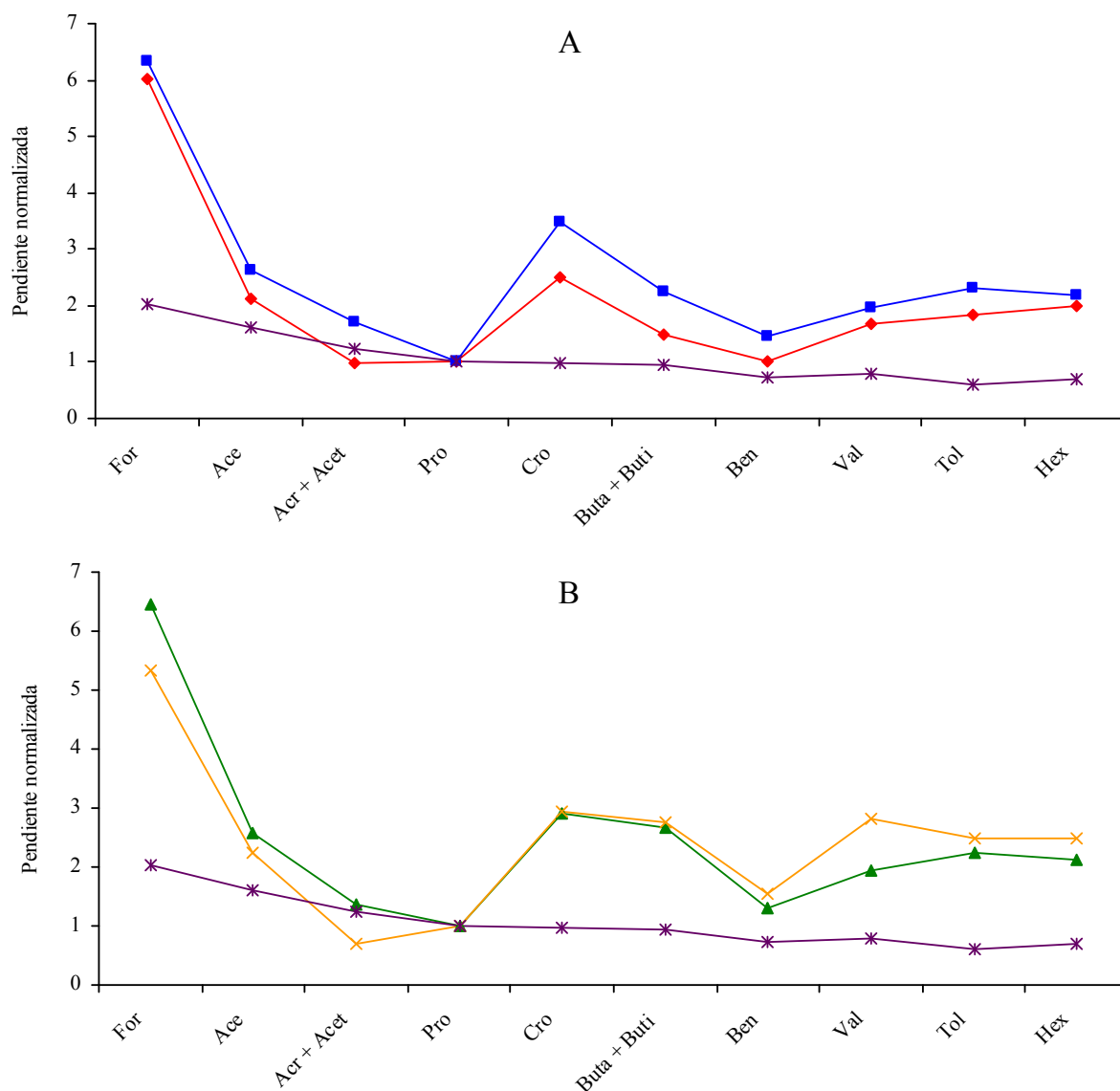


Figura III.10. Pendientes normalizadas de las curvas de calibrado correspondientes a los distintos compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH. **A.** Comparación de las metodologías IA (♦) y TC (■) con la HC (*). **B.** Comparación de las metodologías CL (▲) y CG (×) con la HC (*).

En la Figura III.10.B se encuentran las representaciones correspondientes a los valores normalizados, con respecto al propionaldehído, de las pendientes calculadas para las curvas de calibrado obtenidas cuando la derivatización se realiza en cartucho, a partir de los compuestos carbonílicos en disolución (CL) o previamente volatilizados (CG). A efectos

comparativos, también se han incluido en la citada figura las pendientes normalizadas correspondientes a las curvas de calibrado HC. Con relación a estas últimas, como ya se comentó para las curvas IA y TC, también se obtienen menores sensibilidades y mayor variabilidad entre ellas. Asimismo, se mantiene la composición de los grupos de compuestos que poseen sensibilidades máximas, mínimas e intermedias. Estas diferencias entre los resultados obtenidos por la metodología que, de forma convencional, utiliza disoluciones patrón de las hidrazonas y las que se estudian en este trabajo, deben asociarse a que en estas últimas las disoluciones patrón se obtienen después de que tengan lugar las reacciones de derivatización en cartucho y eluir las hidrazonas formadas, además de necesitar provocar, en el caso de la metodología CG, la volatilización de los compuestos carbonílicos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las curvas de calibrado necesarias para la determinación de compuestos carbonílicos por HPLC, después de ser derivatizados con la DNPH, se encuentran notablemente influenciadas por los procesos que concurren en las reacciones de derivatización, desde la presencia de impurezas en la DNPH o aportaciones provenientes de la contaminación atmosférica, a circunstancias que hacen que la formación de las hidrazonas progrese en mayor o menor extensión para unos u otros compuestos carbonílicos.

En atención a lo expuesto, entendemos que es poco recomendable la utilización generalizada de patrones comerciales de las hidrazonas correspondientes a los compuestos carbonílicos que se vayan a determinar. Parece más razonable y rigurosa la utilización de curvas de calibrado en las que las reacciones de formación de las hidrazonas, en concentraciones representativas de los aldehídos y cetonas a determinar, se produzcan en condiciones similares a las que van a ser sometidos los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de humo.

Para cuantificar las diferencias entre las sensibilidades obtenidas cuando se usan las curvas de calibrado HC y las correspondientes a las realizadas con las otras cuatro metodologías, se ha introducido el parámetro Relación de Pendientes (RP), que representa el cociente entre las pendientes establecidas por las metodologías en estudio y la basada en el empleo de hidrazonas comerciales. En la Tabla III.14 se han agrupado los valores obtenidos y puede observarse que en ningún caso se obtienen valores de RP superiores a 0.90. Es decir, las curvas obtenidas mediante las metodologías IA, TC, CL y CG que, según se ha comentado en el párrafo anterior, deben ser más representativas que las empleadas tradicionalmente,

presentan sensibilidades que como máximo alcanzan el 90% de las que se obtendrían si se usaran patrones comerciales. Sólo para algunos derivados, como el formaldehído, crotonaldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído, las curvas obtenidas mediante derivatización en TC o CL presentan pendientes que superan el 70% de las obtenidas con HC. Para los restantes aldehídos y cetonas se alcanzan valores considerablemente menores, incluso inferiores al 25% para el propionaldehído y el par acroleína + acetona.

Tabla III.14. Relaciones entre las pendientes (RP) de las distintas curvas de calibrado y las correspondientes obtenidas a partir de disoluciones patrón de las hidrazonas.

Compuesto	Valores de RP			
	Curvas IA	Curvas TC	Curvas CL	Curvas CG
Formaldehído	0.76	0.75	0.77	0.47
Acetaldehído	0.34	0.39	0.39	0.25
Acr + Acet	0.20	0.33	0.27	0.10
Propionaldehído	0.26	0.24	0.24	0.18
Crotonaldehído	0.66	0.85	0.72	0.54
Buta + Buti	0.40	0.57	0.68	0.52
Benzaldehído	0.36	0.48	0.44	0.38
Valeraldehído	0.55	0.60	0.60	0.65
<i>p</i> -tolualdehído	0.77	0.90	0.88	0.74
Hexaldehído	0.73	0.75	0.73	0.64

La falta de representatividad de las curvas de calibrado construidas a partir de patrones comerciales de hidrazonas motiva que las determinaciones basadas en las mismas puedan verse influidas de forma considerable, al menos para algunos compuestos carbonílicos. En consecuencia, parte de los resultados expuestos en apartados anteriores se encuentran afectados por esta circunstancia, especialmente los referidos a estudios de recuperación. En tales casos, siguen teniendo significado los comentarios y conclusiones que puedan hacerse al comparar, de forma relativa, procesos y metodologías, pero pierden significación los sustentados en datos absolutos.

Curvas obtenidas por derivatización

Según se ha comentado anteriormente, en un intento de disponer de curvas de calibrado en las que las hidrazonas correspondientes a los distintos compuestos carbonílicos se obtengan mediante procedimientos que sean similares a los que experimenten los aldehídos y cetonas presentes en las muestras de humo, se ha ensayado la utilización de cuatro tipos diferentes de curvas de calibrado. Dos en las que el agente derivatizante se utiliza en disolución, curvas IA y TC, y otras dos en las que la DNPH se encuentra impregnando el gel de sílice que se encuentra retenida en un cartucho, curvas CL y CG.

En las curvas IA, la formación de las hidrazonas viene condicionada por los problemas que afectan a la cuantitatividad de las reacciones: pH, temperatura, tiempo de reacción, etc. Las grandes ventajas de estas curvas se relacionan con la rapidez con la que se pueden construir, al usar tiempos de reacción pequeños y poder efectuar la derivatización en viales que al estar incorporados en el inyector automático de un sistema de HPLC, permiten la automatización del proceso. La preparación de las hidrazonas se encuentra sometida a procesos similares a los que experimentarían los compuestos carbonílicos retenidos en borboteadores mediante una disolución absorbente de la DNPH.

Las curvas TC se realizan en condiciones tales que las interacciones entre los compuestos carbonílicos y la DNPH tiene lugar cuando unos se encuentran en fase gas y la otra en fase líquida. En tal sentido, se simula el muestreo realizado en un tubo colector de gases. Pensando en las muestras de humo, estas curvas se realizan en condiciones tales que suponen una aproximación considerable a la realidad de las interacciones entre la muestra y una disolución absorbente del derivatizante. El principal inconveniente de la metodología utilizada se encuentra en la necesidad de tener que volatilizar los compuestos carbonílicos presentes en las disoluciones patrón que se utilicen para construir la curva de calibrado o, al menos, mantenerlos a una temperatura de unos 60°C.

Para construir las curvas CL, volúmenes adecuados de disoluciones de los compuestos carbonílicos, se introducen directamente en un cartucho con gel de sílice impregnada de la DNPH, y las hidrazonas formadas se eluyen por lavado con acetonitrilo. El procedimiento es sencillo y las curvas vienen condicionadas por todos los factores que pueden afectar las interacciones de los aldehídos y cetonas con la DNPH, así como por la disponibilidad de cartuchos y la eficacia del acetonitrilo como eluyente capaz de liberar las hidrazonas retenidas

en el soporte.

Las curvas que hemos denominado CG son, entre las ensayadas, las que pueden estar sujetas a mayores errores y a una complejidad superior en su construcción, sobre todo por la necesidad de volatilizar cuantitativamente los compuestos carbonílicos y transportarlos hasta el cartucho donde tiene lugar la derivatización y posterior elución. Ahora bien, precisamente por la forma en la que se provoca la interacción entre los compuestos a derivatizar y la DNPH, es la metodología que más se aproxima a la utilizada en la toma de muestras gaseosas en cartucho.

Además de las ventajas e inconvenientes que pueden presentar los cuatro tipos de curvas de calibrado que se acaban de comentar, en cuanto a su construcción experimental, al plantearse su utilización en el análisis de muestras reales, es necesario comparar los parámetros de calidad correspondientes a las mismas. En tal sentido, el parámetro a utilizar será la sensibilidad y en cuanto a la metodología, se compararán entre sí las que se construyen utilizando procesos de derivatización en disolución y, por otra parte, aquellas en las que las hidrazonas se forman en cartucho.

En la Figura III.11, se muestran las pendientes representativas de cada uno de los compuestos carbonílicos cuando las curvas de calibrado son las que hemos denominado IA y TC. Puede observarse que existe un evidente paralelismo entre las mismas, pero que excepto para el formaldehído, propionaldehído, valeraldehído y hexaldehído, a los que corresponden valores de sensibilidad próximos entre sí, para los restantes casos, las pendientes obtenidas cuando la derivatización se efectúa en tubo colector son superiores, con magnitudes que pueden superar en más de un 25% a las que se obtienen con las curvas IA. Como quiera que estas últimas están sujetas a menores condicionantes experimentales, la justificación de las diferencias entre pendientes debe asociarse a la utilización de tiempos de reacción cortos, que dificultarían la formación cuantitativa de algunas hidrazonas.

Al comparar las curvas CL y CG, para cuya construcción se utiliza la derivatización en cartucho, se observan también algunas desviaciones, como se pone de manifiesto en la Figura III.12, si bien en este caso las diferencias son, para algunos compuestos, considerablemente superiores a las observadas en la comparación anterior. Las menores pendientes obtenidas en las curvas construidas con la metodología CG pueden asociarse a las pérdidas que pueden producirse en los procesos de volatilización y transporte de los

compuestos carbonílicos. En tal sentido, puede observarse que las mayores diferencias correspondan a los compuestos más ligeros. No obstante, en otro sentido, también puede influir negativamente la falta de eficacia en el paso de los mismos desde la fase líquida a la fase gas.

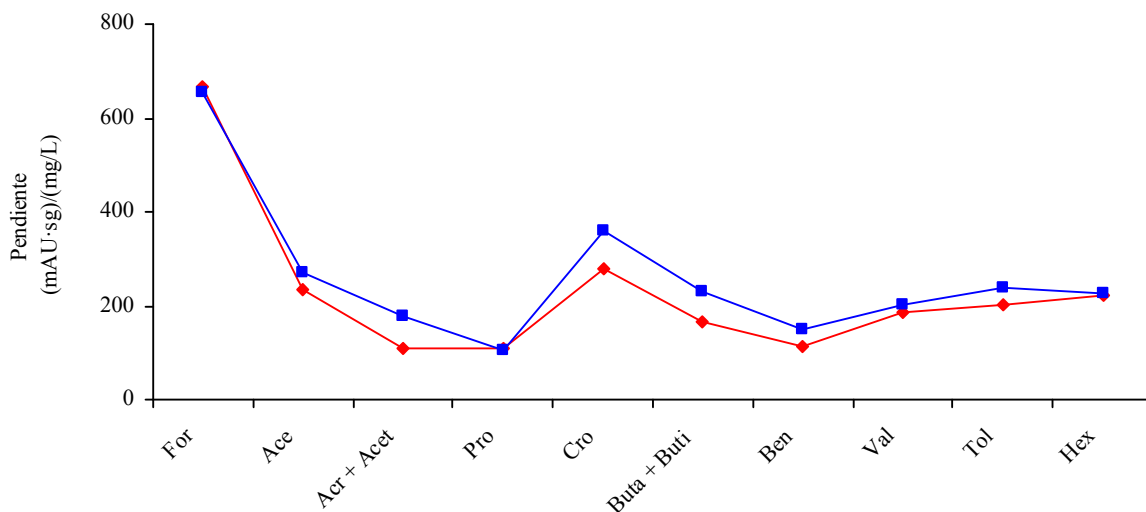


Figura III.11. Pendientes de las curvas de calibrado correspondientes a los compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH, en inyector automático, IA(♦) y en tubo colector, TC(■).

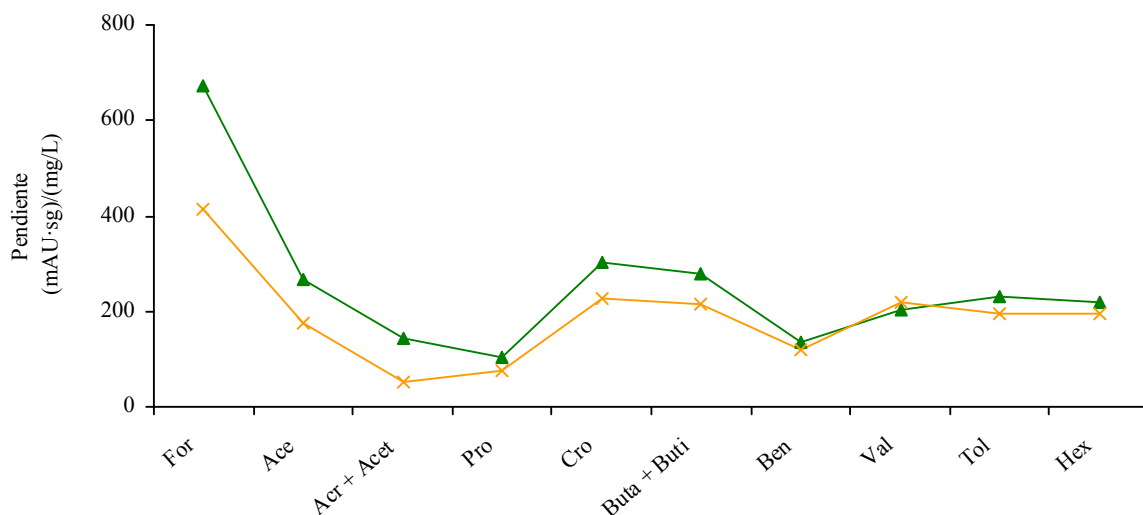


Figura III.12. Pendientes de las curvas de calibrado correspondientes a los compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH en cartucho, a partir de compuestos carbonílicos en disolución, CL(▲) o con previa volatilización de los compuestos carbonílicos, CG(x).

En general, al tomar en consideración los resultados correspondientes a las pendientes obtenidas mediante las metodologías CL y TC, se observa que existe una notable similitud entre ellas, como se observa al comparar los valores incluidos en la Tabla III.14. En atención a lo expuesto con anterioridad, estimamos que ambas pueden ser metodologías complementarias a usar en función del tipo de toma de muestra que se efectúe. En tal sentido, ha de tenerse en cuenta que los procesos de combustión pueden originarse a partir de diferentes combustibles, de forma controlada o incontrolada y en lugares y circunstancias variadas. En el caso de Canarias, el humo destinado al ahumado de alimentos suele obtenerse a partir de restos vegetales quemados de forma incontrolada. Con tal finalidad, pueden encontrarse sistemas de combustión tipo horno contruidos en instalaciones destinadas al ahumado, o pueden realizarse en el campo, en lugares donde el humo no moleste a otras actividades, con el empleo de dispositivos rudimentarios como bidones. En consecuencia, es de esperar que para muestras que, desde un punto de vista químico, guardan una cierta similitud tengan que utilizarse sistemas de muestreo diferentes.

Entre las metodologías propuestas en este trabajo, la basada en la utilización de cartuchos que contienen la DNPH impregnada al soporte de gel de sílice, sería la recomendada en lugares en los que pueda utilizarse una bomba apropiada para impulsar la muestra a través del sistema y que, al mismo tiempo, permita un control adecuado de tiempos/volúmenes o flujos. En este caso, no sólo se aprovecharía la comodidad que supone la utilización de los cartuchos, tanto para la toma de muestra como para el transporte, sino por la posibilidad, en caso necesario, de preconcentrar la muestra sin más que aumentar el tiempo de muestreo. En tal situación, recomendaríamos que las curvas de calibrado se realizaran siguiendo la metodología designada como CL, basada en la inyección directa de los patrones de los compuestos carbonílicos en el cartucho con la DNPH retenida por el gel de sílice.

En otros casos, como puede ser el de muestras que no necesiten preconcentración o que se produzcan en lugares en los que no sea utilizable una bomba, puede ser adecuado realizar la toma de muestra en tubos colectores. Este tipo de sistema de muestreo permite tomar un volumen prefijado de muestra, impuesto por el tamaño del tubo empleado, de forma manual, pues el humo puede hacerse pasar a través del mismo con cualquier sistema de succión o con tubos en los que se haya hecho vacío previamente. Cuando se emplee este sistema de toma de muestra, las curvas de calibrado deberían prepararse como se ha indicado mediante la metodología designada como TC.

En cualquier caso, una alternativa en la que se sacrifica la utilización de un sistema de calibración ajustado al de toma de muestra, por la posibilidad de disponer de curvas de calibrado construidas con suma rapidez, sería emplear la metodología identificada como IA, en la que los patrones de los compuestos carbonílicos se derivatizan en viales de un inyector acoplado al equipo de HPLC y se introducen automáticamente en el sistema analítico. Las pendientes de las curvas de calibrado que se obtienen son algo inferiores a las que se hallan al emplear las metodologías que usan TC y CL, pero las diferencias no son demasiado grandes, al menos para algunos compuestos carbonílicos.

Parámetros de calidad de las metodologías de calibración

En el apartado anterior se ha justificado la elección de dos metodologías alternativas para establecer las curvas de calibrado atendiendo al sistema de toma de muestra que se utilice para retener los compuestos carbonílicos presentes en muestras gaseosas. A continuación, se aporta información complementaria a la que se ha venido utilizando, referida a ambas metodologías.

Linealidad

Al estudiar las curvas de calibrado obtenidas al emplear las dos metodologías que recomendamos, basadas en provocar la interacción entre los compuestos carbonílicos y la DNPH en tubos colectores (TC) o en cartuchos de gel de sílice (CL), se han utilizado rangos de concentraciones cuyos valores extremos han estado comprendidos entre 0.02 - 0.83 mg/L y 0.09 - 3.32 mg/L, representativos del formaldehído y del par 2-butanona + butiraldehído, respectivamente, como puede observarse en las Tablas III.10 y III.11. Por otra parte, para las curvas de calibrado construidas para cada uno de compuestos carbonílicos utilizados, se obtuvieron valores de R^2 que oscilaron entre 0.976 y 0.998, con un valor medio de 0.992 y 0.993, para las curvas correspondientes a las metodologías TC y CL, respectivamente.

Con objeto de estudiar la aplicabilidad de las metodologías desarrolladas al análisis de muestras reales, se tomaron muestras de humo procedentes de la combustión de distintos materiales.

Tabla III.15. Parámetros de calidad obtenidos con curvas de calibrado tipo CL.

Compuesto	Pendiente (mAU·sg)/ (mg/L)	Precisión ^a (n = 3)	^b LD (mg/L)	R ²	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	689.2	10.8	0.08	0.999	0.02 - 28
Acetaldehído	259.2	5.2	0.08	0.996	0.03 - 37
Acr + Acet	155.7	3.7	0.34	0.997	0.08 - 95
Propionaldehído	116.3	9.4	0.09	0.995	0.05 - 62
Crotonaldehído	313.7	1.9	0.23	0.987	0.04 - 54
Buta + Buti	239.8	7.1	0.31	0.999	0.09 - 111
Benzaldehído	146.8	3.4	0.12	0.999	0.06 - 72
Valeraldehído	193.8	3.1	0.14	0.998	0.05 - 63
<i>p</i> -tolualdehído	233.8	4.8	0.14	0.999	0.06 - 76
Hexaldehído	223.3	4.8	0.09	0.999	0.06 - 68

^a n = número de repeticiones. ^b Límite de Detección = $3 \cdot S_{y/x} / \text{pendiente}$.

Tabla III.16. Parámetros de calidad obtenidos con curvas de calibrado tipo TC.

Compuesto	Pendiente (mAU·seg)/ (mg/L)	Precisión ^a (n = 3)	^b LD (mg/L)	R ²	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	706.4	8.9	0.13	0.999	0.02 - 55
Acetaldehído	292.3	5.2	0.05	0.999	0.03 - 75
Acr + Acet	168.7	13.7	0.47	0.999	0.08 - 187
Propionaldehído	111.5	1.7	0.18	0.999	0.05 - 123
Crotonaldehído	365.5	8.7	0.07	0.999	0.04 - 107
Buta + Buti	274.2	1.0	0.24	0.999	0.09 - 221
Benzaldehído	143.0	7.3	0.17	0.999	0.06 - 144
Valeraldehído	209.5	6.1	0.10	0.999	0.05 - 126
<i>p</i> -tolualdehído	241.0	7.9	0.12	0.999	0.06 - 153
Hexaldehído	242.1	7.8	0.13	0.999	0.06 - 156

^a n = número de repeticiones. ^b Límite de Detección = $3 \cdot S_{y/x} / \text{pendiente}$.

Las determinaciones de compuestos carbonílicos efectuadas en las mismas, puso de manifiesto que varios de los compuestos seleccionados presentaban concentraciones que superaban considerablemente la correspondiente a los patrones empleados al construir las curvas de calibrado. En consecuencia, se prepararon nuevas curvas de calibrado, que llamaremos ampliadas, cuyas características más significativas se agrupan en las Tablas III.15 y III.16. Las nuevas curvas, que contienen 12 niveles de concentración en el caso de la metodología TC, y 14 cuando se utiliza la CL, presentan valores de R^2 iguales a 0.999 en el 75% de los casos.

El factor limitante para aumentar el rango de concentraciones de las curvas de calibrado ha sido la cantidad de DNPH presente en el sistema de retención. En el caso de los cartuchos, se han empleado los H-30 reutilizados, es decir, los mismos que se utilizaron en los estudios anteriores, impregnados con igual cantidad de DNPH. Sin embargo, en el caso de los tubos colectores se puede variar, sin dificultades adicionales, la concentración de la disolución de DNPH utilizada, que ha llegado a ser del 0.5% (p/v), para asegurar un exceso adecuado del agente derivatizante.

Sensibilidad

Ya se han comentado anteriormente las sensibilidades individuales que corresponderían a cada uno de los compuestos carbonílicos determinados, utilizando las curvas de calibrado de rango corto. Al utilizar las nuevas curvas de calibrado, las pendientes obtenidas son similares a las halladas con anterioridad y, además, muy similares entre sí, con independencia de la metodología utilizada, como se refleja en la Figura III.13, en la que se han representado las pendientes que aparecen en las Tablas III.15 y 16. La relación entre las pendientes correspondientes a las curvas CL y TC oscila entre 0.96 y 1.16.

Límites de detección

Los límites de detección, calculados como tres veces la desviación estándar residual, dividida por la pendiente [36], se han agrupado en las Tablas III.15 y III.16. Como se observa en las citadas tablas, los valores se encuentran comprendidos entre 0.08 y 0.34 mg/L, cuando

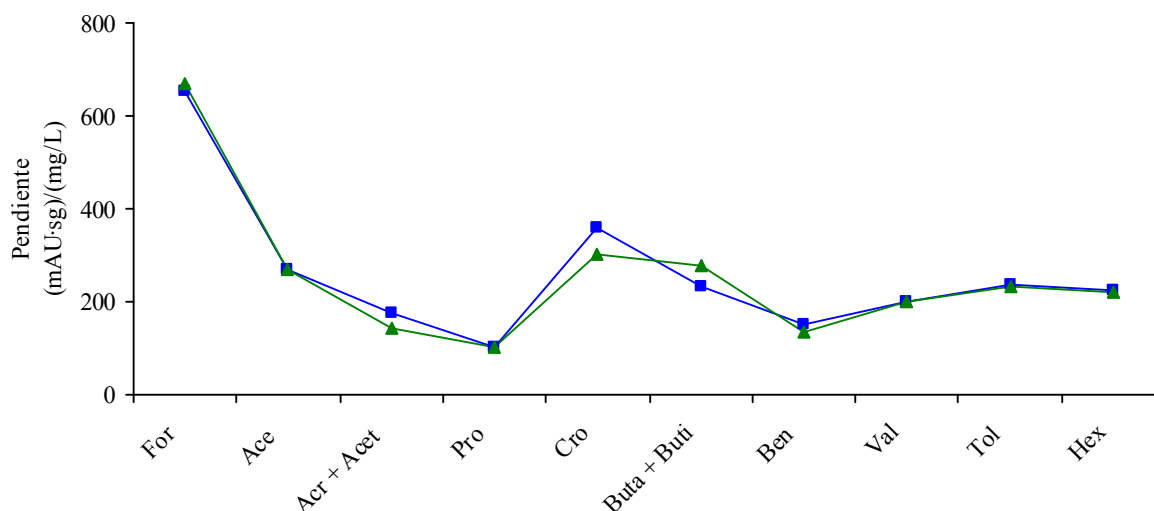


Figura III.13. Pendientes de las curvas de calibrado correspondientes a los compuestos carbonílicos derivatizados con DNPH, según las metodologías TC(■) y CL(▲).

se utiliza la metodología CL, que equivaldrían a 10 y 42.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente, si los referimos a una hipotética toma de muestra en la que el gas a analizar sea transportado por la bomba a través del cartucho, durante 20 minutos a un flujo de 2 L/min. Los valores extremos de los límites de detección para los distintos compuestos carbonílicos seleccionados pasan a ser de 0.05 y 0.47 mg/L, cuando las curvas a emplear son las preparadas en el tubo colector, valores que se convierten en 0.25 y 2.35 mg/m^3 , en el supuesto de referirnos a muestras tomadas en tubos colectores de 1 L de capacidad.

Precisión

Con las curvas de calibrado establecidas mediante los dos metodologías seleccionadas, se han realizado estudios de reproducibilidad. Con tal finalidad, se han establecido las desviaciones estándar relativas (DSR) correspondientes a tres determinaciones efectuadas con tres patrones que contienen niveles bajos, intermedios y altos de cada uno de los compuestos carbonílicos.

En las Tablas III.15 y III.16 se han agrupado las DSR (%) obtenidas para ensayos realizados con la misma concentración en las dos metodologías, aunque estas concentraciones corresponden al nivel superior en el caso de la metodología CL y al nivel intermedio en el

caso de la metodología TC. En general, salvo casos puntuales, se obtienen valores de DSR inferiores al 10%.

III.3.6. VALIDACIÓN DE METODOLOGÍAS

La validación de las metodologías propuestas presenta dificultades. Por una parte, no se dispone de materiales de referencia comercializados y no es posible utilizar estudios de recuperación, por no poder preparar matrices de humo que no contengan compuestos carbonílicos. Tampoco parece adecuado comparar los resultados obtenidos con las metodologías propuestas en este trabajo y los establecidos mediante metodologías oficiales, al no estar éstas diseñadas para la toma de muestras de humo y porque su utilidad se cuestiona en este trabajo. Por estos motivos, se ha optado por comparar entre sí las dos metodologías propuestas, basadas en la utilización de tubos colectores y cartuchos.

En el caso del humo obtenido tradicionalmente en las Islas Canarias para el ahumado del queso, la combustión de biomasa se realiza de forma incontrolada y, en consecuencia, el humo que se obtiene puede cambiar continuamente de composición. Desde un punto de vista práctico, los sistemas utilizados por los ganaderos para obtener humo y el escaso o nulo control que se hace de las variables experimentales, impiden mantener la composición cuantitativa del mismo en momentos sucesivos. En atención a estas circunstancias, y con objeto de poder disponer de muestras con un mismo contenido en compuestos carbonílicos y con una matriz similar, adecuadas para la comparación que pretendemos realizar, se ha utilizado el dispositivo que se muestra en la Figura III.2 del apartado de desarrollo experimental de este capítulo. El humo obtenido por combustión de restos vegetales, se hace pasar a través de una columna rellena con anillos Raschig, con objeto de mejorar la homogeneidad en la composición del mismo, antes de llenar de forma simultánea dos tubos colectores conectados a la conducción que transporta el humo mediante una conexión tipo T.

Para verificar la similitud de las dos muestras obtenidas con cada experiencia, los procesos de derivatización y cuantificación de los compuestos carbonílicos se realizan manteniendo las mismas condiciones experimentales, mediante la metodología TC. La comparación de resultados obtenidos para cada compuesto carbonílico, en cada una de las experiencias, se realiza mediante los respectivos errores absolutos. Los valores medios de los errores absolutos y los intervalos de las concentraciones halladas en el conjunto de

experiencias realizadas, se encuentran en la Tabla III.17, en la que sólo se incluyen los aldehídos y cetonas que se pudieron cuantificar en el humo utilizado tras la combustión de cáscara de almendra. Los resultados obtenidos muestran la similitud de la composición de las muestras recogidas simultáneamente en los dos tubos colectores. Por otra parte, la prueba *t* por parejas [36], aplicada al conjunto de las diferencias entre los errores absolutos obtenidos para cada compuesto carbonílico, pone de manifiesto que, con una probabilidad del 95%, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos.

Tabla III.17. Rangos de concentraciones encontradas (RC) y valores medios de los errores absolutos (EA) de los compuestos carbonílicos en las muestras de humo procedentes de la combustión de cáscara de almendra (n = 5) recogidas de manera simultánea.

Compuesto	RC (mg/m ³)	EA (mg/m ³)
Formaldehído	77 - 139	- 2
Acetaldehído	360 - 568	- 30
Acr + Acet	353 - 606	- 20
Propionaldehído	85 - 161	- 1
Crotonaldehído	20 - 41	- 3
Buta + Buti	43 - 84	2
Benzaldehído	3 - 10	1

Para comparar los resultados obtenidos por las dos metodologías de muestreo-calibración propuestas, se han obtenido pares de muestras de humo de maderas de pino y jara, así como de acículas de pino, en dos tubos colectores mediante el dispositivo descrito anteriormente. La muestra recogida en uno de ellos es analizada directamente, después de efectuar la correspondiente derivatización inyectando la DNPH a través del septum que contiene el tubo colector, mientras que la muestra recogida en el otro tubo colector es transferida a un cartucho impregnado con DNPH con la utilización de una bomba adecuada y utilizando el dispositivo que se muestra en la Figura III.3 del apartado de desarrollo experimental de este capítulo. En la Tabla III.18 se encuentran los resultados correspondientes a los valores medios de los errores absolutos obtenidos para cada par de resultados y el intervalo de las concentraciones halladas al analizar cada muestra.

La amplitud de los intervalos de concentraciones hallados en cada uno de los tipos de humo analizados, pone de manifiesto las variaciones en la composición de los humos, como consecuencia de la falta de control experimental de los procesos de combustión. Sin embargo, mediante las diferencias entre los resultados obtenidos para las parejas de muestras, se puede observar que ambos métodos de toma de muestra-calibración propuestos conducen a resultados equiparables. La prueba *t* por parejas [36], aplicada al conjunto de las diferencias obtenidas, revelan que, con una probabilidad del 95%, no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos. Para todos los compuestos carbonílicos, las diferencias entre los resultados obtenidos por las dos metodologías presentan valores que difieren entre sí, como máximo, a niveles de decenas de mg/m³. En todo caso, ha de tenerse en cuenta que la necesidad de transferir una de las muestras desde el tubo colector al cartucho introduce, sin duda, errores debidos a la falta de cuantitatividad del proceso. Es posible que ésta sea la causa de que los errores absolutos obtenidos presenten, en la mayoría de los casos, valores positivos.

Tabla III.18. Comparación de las concentraciones de compuestos carbonílicos en muestras de humo obtenidas usando las dos metodologías de calibración propuestas.

Compuesto	Acícula de pino (n = 3)		Madera de pino (n = 3)		Madera de jara (n = 3)	
	^a RC	^b EA	^a RC	^b EA	^a RC	^b EA
	Formaldehído	45 - 195	40	163 - 428	20	115 - 177
Acetaldehído	373 - 610	-16	132 - 301	4	114 - 189	17
Acr + Acet	453 - 613	84	269 - 619	97	146 - 235	46
Propionaldehído	51 - 108	17	30 - 54	8	32 - 43	0
Crotonaldehído	23 - 48	4	10 - 39	14	11 - 21	5
Buta + Buti	46 - 77	0	22 - 46	12	12 - 41	11
Benzaldehído	5 - 10	1	4 - 10	-2	ND	ND
Valeraldehído	5 - 12	4	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -tolualdehído	^c ND	ND	43 - 221	71	ND	ND
Hexaldehído	ND	ND	7 - 34	17	ND	ND

^a Rango de concentración (mg/m³).

^b Valor medio de los errores absolutos (mg/m³).

^c No detectado.

III.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] National Research Council. Committee on Aldehydes, Board of Toxicology and Environmental Hazards. Formaldehyde and Other Aldehydes, *National Academy Press*, Washington (1981).
- [2] World Health Organization Regional Office for Europe. Air Quality Guidelines for Europe, *WHO Regional Publications, European Series, No. 23*, Copenague (1987).
- [3] Kerns W.D., Pavkov K.L., Donofrio D.J., Gralla E.J, Swenberg J.A. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure. *Cancer Research*, **43**, 4382-4392 (1983).
- [4] Hibino M., Matsuda H., Sato T., Ose Y., Nagase H., Kito H. Generation of mutagenicity by ozonation of humic substances components. *Science of the Total Environment*, **116**, 1-13 (1992).
- [5] Pal R., Kim K.H. Review: Experimental choices for the determination of carbonyl compounds in air. *Journal of Separation Science*, **30**, 2708-2718 (2007).
- [6] Compendium Method TO-11A. Determination of formaldehyde in ambient air using adsorbent cartridge followed by high performance liquid chromatography (HPLC) [Active sampling methodology]. *US Environmental Protection Agency* (1999).
- [7] Winberry W.T.Jr., Forehand L., Murphy N.T., Ceroli A., Phinney B., Evans A. in Compendium of Methods EPA-600/4-90-010. Determination of formaldehyde and other aldehydes in indoor air using passive sampling device. *US Environmental Protection Agency* (1990).
- [8] Tejada, S.B. Evaluation of silica gel cartridges coated in situ with acidified 2,4-dinitrophenylhydrazine for sampling aldehydes and ketones in air. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **26**, 167-185 (1986).
- [9] Compendium Method TO-5. Determination of aldehydes and ketones in ambient air using high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environmental Protection Agency* (1999).
- [10] Method 0100. Sampling for formaldehyde and other carbonyl compounds in indoor air. *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [11] Method 8315A. Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography (HPLC). *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [12] Method 0011. Sampling for selected aldehyde and ketone emissions from stationary sources. *US Environmental Protection Agency* (1996).
- [13] Hedberg E., Kristensson A., Ohlsson M., Johansson C., Johansson P-A., Swietlicki E., Vesely V., Wideqvist U., Westerholm R. Chemical and physical characterization of emissions from birch wood combustion in a wood stove. *Atmospheric Environment*, **36**, 4823-4837 (2002).
- [14] Oliva-Teles M.T., Paíga P., Delerue-Matos C.M., Alvim-Ferraz M.C.M. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **467**, 97-103 (2002).

- [15] Michels J.J. Improved measurement of formaldehyde in water-soluble polymers by high-performance liquid chromatography coupled with post-column reaction detection. *Journal of Chromatography A*, **914**, 123-129 (2001).
- [16] McDonald J.D., Zielinska B., Fujita E.M., Sagebiel J.C., Chow J.C., Watson, J.G. Fine particle and gaseous emission rates from residential wood combustion. *Environmental Science and Technology*, **34**, 2080-2091 (2000).
- [17] Zhang J., Smith K.R. Emissions of carbonyl compounds from various cookstoves in China. *Environmental Science and Technology*, **33**, 2311-2320 (1999).
- [18] Nishikawa H., Sakai T. Derivatization and chromatographic determination of aldehydes in gaseous and air samples. *Journal of Chromatography A*, **710**, 159-165 (1995).
- [19] UNE-77260-3:2004. "Aire de interiores. Parte 3: Determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos. Método de muestreo activo". *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid (2004).
- [20] Grosjean, D., Fung, K. Collection efficiencies of cartridges and microimpingers for sampling of aldehydes in air as 2,4-dinitrophenylhydrazones. *Analytical Chemistry*, **54**, 1221-1224 (1982).
- [21] Fung, K., Grosjean, D. Determination of nanogram amounts of carbonyls as 2,4-dinitrophenylhydrazones by high-performance liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, **53**, 168-171 (1981).
- [22] Grosjean E., Grosjean D. Carbonyl collection efficiency of the DNPH-coated C18 cartridge in dry air and in humid air. *Environmental Science and Technology*, **30**, 859-863 (1996).
- [23] Vogel M., Büldt A., Karst U. Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis—a critical review. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **366**, 781-791 (2000).
- [24] García-Alonso S., Pérez-Pastor R.M. Use of C18 and silica-gel coated Sep-Pak cartridges for the determination of carbonyls in air by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **367**, 93-99 (1998).
- [25] Pires M., Carvalho L.R.F. An artifact in air carbonyls sampling using C18 DNPH-coated cartridge. *Analytica Chimica Acta*, **367**, 223-231 (1998).
- [26] Kleindienst T.E., Corse E.W., Blanchard F.T., Lonneman W.A. Evaluation of the performance of DNPH-coated silica gel and C18 cartridges in the measurement of formaldehyde in the presence and absence of ozone. *Environmental Science and Technology*, **32**, 124-130 (1998).
- [27] Sirju A.P., Shepson P.B. Laboratory and field investigation of the DNPH cartridge technique for the measurement of atmospheric carbonyl compounds. *Environmental Science and Technology*, **29**, 384-392 (1995).
- [28] Vairavamurthy A., Roberts J.M., Newman L. Methods for determination of low molecular weight carbonyl compounds in the atmosphere: a review. *Atmospheric Environment*, **26**, 1965-1993 (1992).
- [29] Lowe D.C., Schmidt U., Ehhalt D.H., Frischkorn C.G.B., Nurberg H.W. Determination of formaldehyde in clean air. *Environmental Science and Technology*, **15**, 819-823 (1981).

- [30] Arnts R.R., Tejada S.B. 2,4-dinitrophenylhydrazine-coated silica gel cartridge method for determination of formaldehyde in air: identification of an ozone interference. *Environmental Science and Technology*, **23**, 1428-1430 (1989).
- [31] Cotsaris E., Nicholson B.C. Low level determination of formaldehyde in water by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, **118**, 265-268 (1993).
- [32] Calogirou A., Duane M., Kotzias D., Lahaniati M., Larsen B.R. Polyphenylenesulfide, noxon®, an ozone scavenger for the analysis of oxygenated terpenes in air. *Atmospheric Environment*, **31**, 2741-2751 (1997).
- [33] Schauer J.J., Kleeman M.J., Cass G.R., Simoneit B.R.T. Measurement of emissions from air pollution sources. 3. C₁-C₂₉ organic compounds from fireplace combustion of wood. *Environmental Science and Technology*, **35**, 1716-1728 (2001).
- [34] Ingemarsson A., Nilsson U., Nilsson M., Pedersen J.R., Olsson J.O. Slow pyrolysis of spruce and pine samples studied with GC/MS and GC/FTIR/FID. *Chemosphere*, **36**, 2879-2889 (1998).
- [35] Conde F.J. Tesis Doctoral: “Características químicas de emisiones procedentes de la combustión de biomasa, utilizada en al ahumado de alimentos” *Universidad de La Laguna* (2008).
- [36] Miller J., Miller J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th Edition, *Pearson Education Limited, Publisher: Prentice Hall*, Inglaterra (2000).



Capítulo IV

*Determinación de compuestos carbonílicos mediante
SPME-HPLC*

IV.1. INTRODUCCIÓN

IV.1.1. FUNDAMENTO DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Generalidades

La microextracción en fase sólida es una técnica relativamente reciente introducida a principios de los años 90 por Lord y Pawliszyn [1]. La técnica se basa en el establecimiento de un equilibrio entre el analito y una fibra de sílice fundida cubierta con una fase estacionaria, que puede ser un polímero líquido o un adsorbente sólido, o una combinación de ambos. A continuación, el analito se desorbe de la fibra mediante un sistema de separación adecuado, generalmente acoplado a un equipo de cromatografía de gases, en cuyo caso la desorción se produce en el sistema de inyección, por acción de la temperatura.

Esta técnica se usa de forma cada vez más amplia en la etapa de tratamiento de la muestra, especialmente desde que a principios de los años noventa del pasado siglo se pudo disponer de las primeras fibras comerciales [2]. Las aplicaciones más comunes, limitadas por las propiedades de las fibras disponibles de forma comercial, se encuentran en el campo de los compuestos orgánicos en general, y en especial de los compuestos orgánicos volátiles, como los que constituyen el grupo de los BTEX, formado por el benceno, tolueno, etilbenceno y los xilenos, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, distintos constituyentes de aromas, etc. De forma progresiva, los campos de aplicación se han ido ampliando continuamente, incluyendo en la actualidad el análisis medioambiental, el clínico, el forense, el de alimentos y otros muchos, como ponen de manifiesto los numerosísimos artículos de investigación publicados en los que se utiliza la microextracción en fase sólida [3]. De forma simultánea, la técnica ha ido ganando una gran aceptación y se ha ampliado su uso a los laboratorios de análisis rutinarios y en aplicaciones industriales, sobre todo desde que existen en el mercado los sistemas automáticos de inyección con fibra, normalmente acoplados con módulos de separación que forman parte de equipos de cromatografía de gases.

La microextracción en fase sólida, por otra parte, presenta importantes ventajas con respecto a las técnicas que, de forma convencional, se han venido utilizando a lo largo de décadas para la extracción de compuestos orgánicos en muestras de distintos tipos, tales como la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida, de gran utilidad para compuestos semivolátiles y no volátiles, o la extracción con espacio en cabeza y la separación mediante

purga y trampa, para sustancias volátiles. Entre las ventajas de la SPME suelen destacarse las siguientes:

- La simplicidad de su funcionamiento, ya que se trata de una técnica muy simple, rápida, de fácil automatización, portátil y económica.
- No requiere de disolventes orgánicos, que generalmente son caros y, con frecuencia, perjudiciales para la salud y el medio ambiente.
- Requiere de un pequeño volumen de muestra.
- Además, cubre una amplia gama de posibilidades en cuanto a la toma de muestra, incluyendo la toma de muestra in situ, en distintos ambientes, entre los que se encuentran los realizados en campo, o lugares alejados de los laboratorios, tanto con muestras de naturaleza líquida como gaseosas.

Las desventajas con las que nos podemos encontrar en la utilización de la microextracción en fase sólida, son las relacionadas con la reproducibilidad, que en ocasiones es relativamente baja, con variaciones entre lotes de fibras, así como la falta de selectividad y sensibilidad frente a los procedimientos basados en la utilización de disolventes orgánicos. Sin embargo, la desventaja más importante es la que se refiere al rango de aplicabilidad, limitado por el pequeño número de fases estacionarias disponibles comercialmente. Las fibras a seleccionar se limitan a las que poseen recubrimientos de polidimetilsiloxano (PDMS), divinilbenzeno (DVB), poliacrilato (PA), carboxen (CAR), carbowax (CW) y polietilenglicol (PEG). Con la finalidad de aumentar el campo de las posibles aplicaciones, las fibras se fabrican con diferentes combinaciones de recubrimientos, espesores y ensamblajes.

Principios de la técnica

En la microextracción en fase sólida, una fase extractante pequeña, ensamblada a un soporte sólido, se coloca en contacto con la matriz de la muestra durante un período de tiempo predeterminado. Si el tiempo de exposición entre la matriz de la muestra y la fase extractante es lo suficientemente largo, se establece un equilibrio en el que los analitos se distribuyen entre ambas. Una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio, un mayor tiempo de exposición de la fibra no acumula más analitos. Con fines operativos, en su versión comercial,

una unidad de SPME consiste en una fibra de sílice fundida recubierta del material polimérico que constituye el adsorbente, que se protege, mientras no se usa, con una aguja de acero u otro material. La fibra va unida a un émbolo que permite mantenerla retraída o que salga al exterior. De esta forma, para un caso en el que el analito se encuentre en disolución, se atraviesa con la aguja, que contiene la fibra retraída, el septum que cierra el vial que contiene la muestra. A continuación se presiona el émbolo y la fibra entra en contacto con la disolución.

Aunque conserva aspectos comunes con la extracción en fase sólida, la SPME presenta características diferentes, entre las que destaca el volumen de la fase extractante, consecuencia de que entre los objetivos de la microextracción en fase sólida nunca se encuentra alcanzar una extracción exhaustiva, lo que simplifica sustancialmente el diseño de los sistemas de SPME. En la aproximación más tradicional de esta técnica, la que emplea fibras recubiertas, el transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hacia el recubrimiento comienza tan pronto como la fibra y la muestra se ponen en contacto. Generalmente, la extracción con SPME se considera que se ha completado cuando la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. De esta forma, en la práctica de la SPME, una vez alcanzado el equilibrio la cantidad extraída es constante, dentro del error experimental, y es independiente de la utilización de mayores tiempos de extracción. Al contrario, cuando la cinética de distribución es lenta, la extracción puede ser interrumpida antes de alcanzarse el equilibrio, aunque para obtener resultados reproducibles es necesario unas condiciones de agitación constantes y la elección cuidadosa del momento adecuado para detener la extracción [1].

Sólo se pueden conseguir extracciones completas de determinados analitos, para pequeños volúmenes de muestra, cuando las constantes de distribución de los mismos entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra son elevadas. Cuando el volumen de muestra es grande, la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de la muestra, por lo que en la práctica no habría necesidad de recoger un volumen de muestra concreto antes del análisis y la fibra se puede exponer directamente, por ejemplo al aire ambiente o al agua. La cantidad de analito extraída correspondería directamente a su concentración en la matriz, sin depender del volumen de la muestra.

La microextracción en fase sólida se ha considerado a menudo como otra forma de extracción en fase sólida o micro-SPE [1]. Aparte de las diferencias comentadas en cuanto al volumen de fase extractante, la extracción en fase sólida es una técnica cuya utilización implica, generalmente, tres etapas. La muestra se hace pasar inicialmente a través de una fase estacionaria activa, de forma que los analitos presentes en la muestra se extraigan exhaustivamente desde la matriz de la muestra al adsorbente sólido. En un segundo paso, no siempre necesario, los componentes no deseados que hayan quedado retenidos son separados selectivamente, al menos parcialmente, del adsorbente sólido mediante lavado con una disolución capaz de eluirlos, mientras que los analitos de interés quedan retenidos en la fase estacionaria. Por último, la disolución de lavado se sustituye por otra capaz de desorber los analitos de interés. El eluato resultante puede concentrarse entonces por evaporación hasta alcanzar un volumen prefijado. En la técnica de SPME, sin embargo, la extracción suele realizarse una vez alcanzado el equilibrio de distribución de los analitos entre la matriz y la microfibras, tal y como ya se ha comentado, y cuyas características facilitan la adsorción selectiva de los mismos en el recubrimiento. En un primer paso, la fibra recubierta se expone a la muestra y los analitos con una elevada afinidad por el adsorbente se extraen de manera selectiva. En un segundo paso, los analitos extraídos por la fibra se desorben en el instrumento analítico. Normalmente, no se lleva a cabo ningún paso de limpieza (clean-up). Por otra parte, la micro-SPE está más relacionada con la extracción en fase sólida, porque son técnicas de extracción total, pero con la diferencia de que con la micro-SPE se utiliza una cantidad de muestra reducida y un volumen de adsorbente también pequeño, de manera que una comparación de estas técnicas con SPME no resultaría adecuado.

IV.1.2. ASPECTOS PRÁCTICOS DE LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Métodos de extracción

Los tres tipos de muestreo que se utilizan con mayor frecuencia mediante la microextracción en fase sólida, se resumen a continuación:

Extracción directa

La fibra recubierta con el polímero seleccionado, se sumerge en la muestra y los

analitos son transportados directamente desde la matriz de la misma hasta la fase extractante. Para facilitar el proceso de transferencia de masa, es decir, para transportar los analitos desde el seno de la disolución a las proximidades de la fibra, se requiere someter la muestra a agitación. Para muestras gaseosas, la convección natural es suficiente para facilitar un rápido equilibrio. Para matrices acuosas, se requieren técnicas más eficaces de agitación, tales como un flujo rápido de la muestra, movimiento del vial, ultrasonidos u otras [4,5].

Extracción en espacio en cabeza

En este caso, los analitos necesitan ser transportados a través de la fase gas antes de que puedan alcanzar el recubrimiento. Esta modificación sirve principalmente para proteger la fibra recubierta. Los compuestos con masas moleculares altas que, en general, poseen presiones de vapor bajas, y otras interferencias no volátiles presentes en la matriz de la muestra, como puede ser la materia húmica o las proteínas, pueden originar daños importantes en las fibras.

Este modo de extracción también permite modificar la matriz sin dañar a la fibra, como puede suceder, por ejemplo, con un cambio de pH. Las cantidades de analito extraídas en el recubrimiento, cuando se usa muestreo directo o en espacio en cabeza, son idénticas, siempre que el volumen de muestra y del espacio en cabeza gaseoso sea el mismo. Esto se debe al hecho de que la concentración en el equilibrio es independiente de la localización de la fibra en el sistema muestra/espacio en cabeza [1].

Extracción con fibras protegidas con membranas

El principal propósito que se persigue al proteger la fibra con una membrana es establecer una barrera que impida algún tipo de daño a la fibra, como sucede, por ejemplo, cuando se usa el modo de espacio en cabeza al analizar muestras muy sucias. Esta membrana es ventajosa para la determinación de analitos que tienen volatilidades demasiado bajas para usar el espacio en cabeza, con lo cual la fibra ha de ponerse en contacto directo con la muestra. Además, el material de la membrana puede añadir un cierto grado de selectividad al proceso de extracción [1].

Influencia de parámetros experimentales en la extracción

En SPME, la cantidad de analito extraído por la fibra puede venir influenciada por factores como: características del recubrimiento, temperatura y tiempo del proceso de extracción, adición de sales o disolventes orgánicos a la muestra, modificación del pH, agitación y volumen de la muestra. Los efectos de la matriz y la introducción de un paso de derivatización también pueden afectar a la extracción de analitos en SPME [6].

Recubrimiento de las fibras

La eficacia del proceso de extracción depende de la constante de distribución del analito entre el recubrimiento de la fibra y la matriz de la muestra. En la Tabla IV.1 se han agrupado algunas características y usos habituales de los principales recubrimientos de fibras disponibles comercialmente, que pueden servir como orientación al seleccionar un sistema de microextracción en fase sólida adecuado para una aplicación concreta.

La naturaleza química de los analitos determina el tipo de polímero utilizado en la extracción. No obstante, la selección del recubrimiento se basa principalmente en la polaridad y en la volatilidad de los compuestos. Como primera consideración, la regla “similar disuelve a similar” se puede aplicar a recubrimientos poliméricos. Por otra parte, la constante de distribución de los analitos y el grosor del recubrimiento influye en la sensibilidad del método. Por tanto, la elección del recubrimiento es un paso crucial a la hora de desarrollar un método por SPME.

Tiempo de extracción

Para optimizar el análisis mediante SPME, se debe permitir que el analito alcance el equilibrio entre la muestra y el recubrimiento de la fibra. El tiempo de equilibrio se define como el tiempo después del cual la cantidad de analito extraído permanece constante, por lo que se corresponde con la cantidad de analito extraído en un tiempo infinito.

Debido a que la SPME es un proceso basado en equilibrios de distribución, en el tiempo de equilibrio se deberá extraer la mayor cantidad de analito. Agitando la muestra se

reduce el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio, debido que así se favorece la difusión de los analitos hacia la fibra. Los compuestos con bajas constantes de distribución tienen tiempos de equilibrio elevados, por lo que para estos compuestos se suele seleccionar un tiempo de extracción menor que el tiempo de equilibrio. En este caso, el tiempo de exposición debe ser controlado muy bien para asegurar unos datos reproducibles, tal y como se comentó con anterioridad [6].

Tabla IV.1. Uso, propiedades y aplicaciones de los principales recubrimientos de fibras comercialmente disponibles.

Recubrimiento de fibra	Grosor (μm)	Uso recomendado	Aplicaciones
Polidimetilsiloxano, (PDMS)	100/30/7	GC/HPLC	Compuestos orgánicos no polares: COVs, HAPs, BTEX y pesticidas organoclorados
Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno, (PDMS/DVB)	65 60	GC HPLC	COVs, aminas aromáticas e hidrocarburos aromáticos
Poliacrilato, (PA)	85	GC/HPLC	Compuestos orgánicos polares: triazinas, fenoles y pesticidas organofosforados
Carboxen/Polidimetilsiloxano, (CAR/PDMS)	75/85	GC	Hidrocarburos y COVs
Carbowax/Divinilbenceno, (CW/DVB)	65/70	GC	Compuestos orgánicos polares: alcoholes, cetonas y compuestos nitroaromáticos
Carbowax/Templated resin, (CW/TPR)	50	HPLC	Surfactantes aniónicos y aminas aromáticas
Divinilbenceno/Carboxen/PDMS, (DVB/CAR/PDMS)	50/30	GC	Compuestos de amplio rango de polaridades, C_3 y C_{20}

Los inyectores automáticos de muestra pueden reproducir el tiempo de extracción de manera muy reproducible y, en consecuencia, la precisión de la determinación del analito puede ser entonces muy buena, incluso cuando en el sistema no se haya alcanzado el equilibrio. No obstante, esto requiere que las condiciones de transferencia de masa y la temperatura se mantengan constantes durante todo el experimento. Desgraciadamente, a día

de hoy, estos inyectores automáticos solamente están disponibles para acoplarse a cromatógrafos de gases, no existiendo por el momento inyectores automáticos de SPME para cromatografía líquida.

Temperatura de extracción

Este parámetro tiene dos efectos contrapuestos en el proceso de SPME. Por una parte, un incremento de la temperatura durante la extracción favorece la difusión de los analitos hacia la fibra. Así, la temperatura ayuda a la transferencia de los analitos hacia la superficie de la fibra en la extracción en espacio en cabeza. Ahora bien, en sentido contrario, los incrementos de temperatura producen, en general, un efecto de reducción de la constante de distribución de los analitos [6].

Volumen de muestra

El volumen de la muestra es un parámetro importante, que debe ser optimizado en SPME, porque está directamente relacionado con la sensibilidad del método. El volumen de la muestra es mucho mayor que el volumen de la fibra, y la cantidad de analito extraída es solamente proporcional al coeficiente de partición, a la concentración de la muestra y al volumen de la fibra [7].

En el modo de espacio en cabeza, los analitos están distribuidos entre la matriz de la muestra, el recubrimiento de la fibra y el volumen de espacio en cabeza, que debe ser pequeño para concentrar los analitos antes de que se difundan hacia el recubrimiento de la fibra. Si el volumen del espacio en cabeza es muy grande, la sensibilidad se reduce considerablemente [8].

Modificación del pH y adición de sales

Una forma de incrementar la cantidad de los analitos retenidos en el recubrimiento de la fibra viene dada por un ajuste de pH. El pH de la muestra se puede ajustar a aquellos valores en los cuales se obtenga la forma neutra en la extracción de analitos ácidos o básicos.

Numerosos estudios han demostrado que por la adición de una sal, normalmente en forma de cloruro, la retención de los analitos en el recubrimiento de la fibra se suele mejorar. Este efecto no es general y depende de la polaridad del analito, la concentración de la sal y la naturaleza de la matriz de la muestra [6].

Adición de disolventes orgánicos

Aunque no se ha investigado en profundidad, es un hecho experimental conocido que la presencia de disolventes orgánicos en muestras acuosas, suele provocar un descenso en la cantidad de analito extraído [9]. Por otra parte, agua o disolventes orgánicos se añaden para extraer los analitos desde la matriz, como en el caso de aceites, y favorecer la difusión desde la muestra hacia el recubrimiento de la fibra [7]. Sin embargo, la presencia de disolventes orgánicos podría contribuir a mejorar la afinidad de determinados analitos por la fase líquida en la que se encuentran disueltos, dificultándose de esta manera su paso al recubrimiento polimérico de la fibra.

Agitación de la muestra

Como ya hemos comentado, al agitar la muestra se favorece la difusión de los analitos hacia el recubrimiento de la fibra y se reduce el tiempo de extracción, tanto en la extracción directa como en la de espacio en cabeza. La agitación magnética es el tipo de agitación más usado, aunque otras técnicas de agitación alternativas, como la agitación por ultrasonidos, también han demostrado ser útiles para mejorar los tiempos de extracción [6].

Efecto de la matriz

Algunos autores han investigado los efectos de la matriz en la eficiencia de la extracción de analitos [10]. La materia orgánica presente en muestras acuosas reales, como ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, puede reducir la cantidad de analito extraído, debido a la interacción entre la materia orgánica disuelta y los analitos.

Desorción. Influencia de parámetros experimentales

En el fundamento de la utilización analítica de la microextracción en fase sólida, se encuentra el paso del analito extraído por la fibra a una fase gas o líquida, que lo arrastra a un dispositivo de medida analítico. Es el proceso de desorción que, como se deduce a partir de lo comentado, impide el establecimiento de un equilibrio entre el analito presente en la fibra y el que se encuentra en la fase de arrastre. Tradicionalmente, la desorción se ha realizado por desorción térmica en el inyector de un cromatógrafo de gases [1,11]. Sin embargo, también puede realizarse por elución con disolventes apropiados o en una interfaz acoplada a un cromatógrafo líquido [1,3].

En la desorción térmica, la aguja que protege a la microfibras se introduce en el inyector del cromatógrafo de gases, manualmente o haciendo uso de un inyector automático. Posteriormente, se expone la fibra a la acción de la temperatura a la que se programe el inyector, para que se produzca la desorción de los analitos y el arrastre de los mismos por el gas portador a la columna cromatográfica. Bajo estas circunstancias, la desorción de los analitos desde la fibra es bastante rápida, no sólo porque los recubrimientos son delgados, sino porque a las elevadas temperaturas que alcanza el inyector se produce un descenso dramático en la constante de distribución recubrimiento/gas y aumentan los coeficientes de difusión. Por otra parte, el proceso se ve favorecido por la circulación continua del gas por el interior del inyector.

La desorción térmica ha sido la más utilizada en microextracción en fase sólida [1] aunque no puede utilizarse para compuestos termolábiles o no volátiles. Por tal motivo, han surgido, como alternativa, técnicas de desorción basadas en la utilización de disolventes [1]. En este caso, la fibra se sumerge en un volumen reducido del disolvente que provoca la solubilización de los analitos retenidos previamente, proceso que suele favorecerse mediante agitación y con el uso de temperaturas moderadamente altas.

Para satisfacer la necesidad de lograr determinaciones de analitos no volátiles y térmicamente lábiles, haciendo uso de la microextracción en fase sólida, muchos de los esfuerzos se han centrado en diseñar interfaces utilizables en combinación con técnicas de separación en fase líquida [1]. En la actualidad ya se dispone comercialmente de interfaces acoplables a un cromatógrafo líquido de alta resolución, análoga en su fundamento a un loop tradicional del sistema de inyección. Una interfaz típica de SPME-HPLC consiste en una

cámara de desorción hecha a medida y una válvula de inyección con seis puertos. La cámara de desorción se coloca en la posición en la cual normalmente está el loop de inyección. Cuando la válvula de inyección está en la posición de “carga”, permite introducir la fibra en la cámara de desorción a presión ambiente. También permite la introducción de un disolvente de desorción en la cámara si es diferente a la fase móvil. La válvula entonces se cambia a la posición “inyectar” para transferir los analitos desorbidos hacia la columna.

La desorción se lleva a cabo en la interfaz y el volumen de desorción es similar a un loop de inyección típico. En la Figura IV.1 se observa una interfaz SPME-HPLC en las posiciones de carga e inyección.

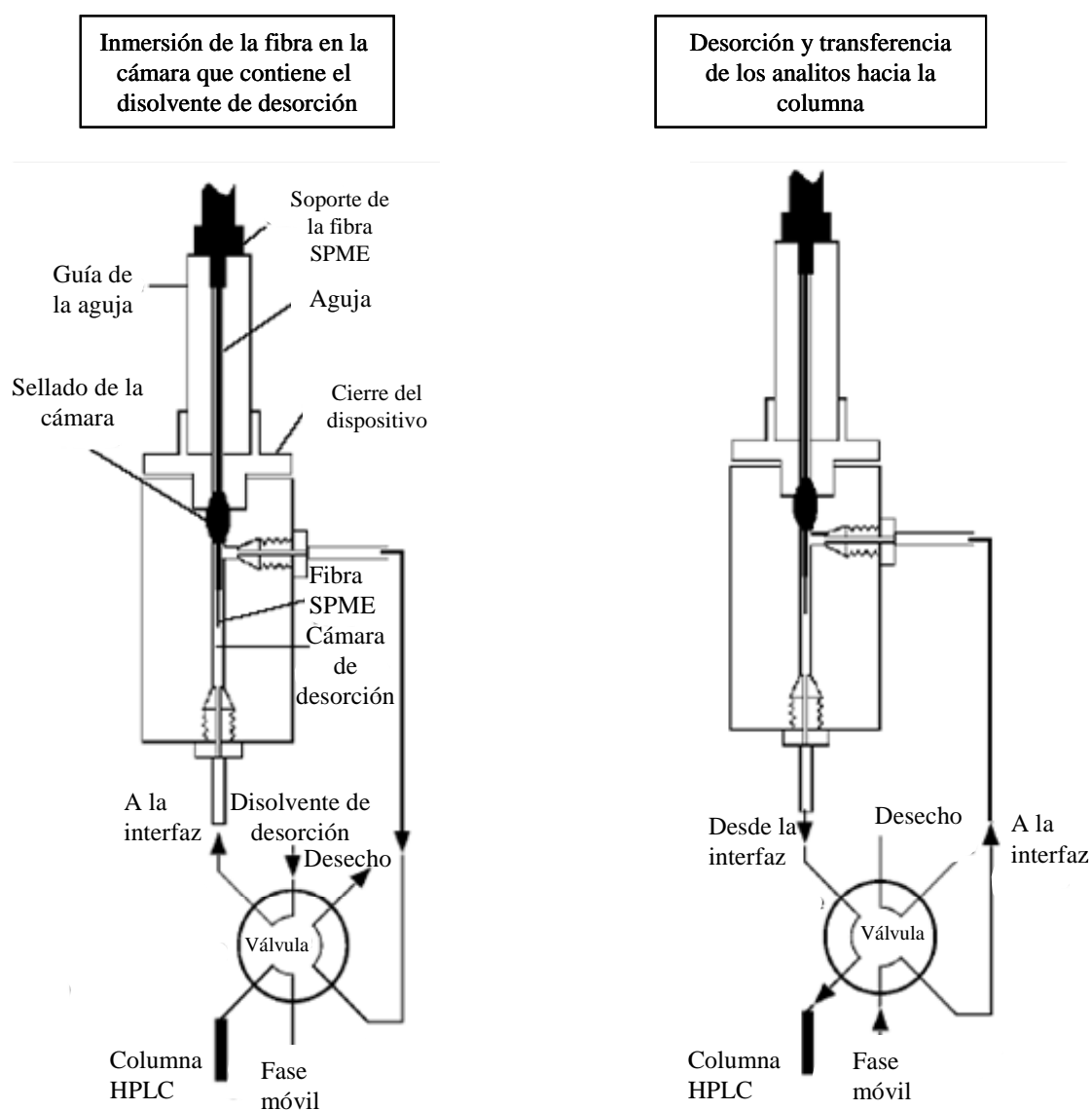


Figura IV.1. Esquema de la interfaz del sistema SPME-HPLC.

La interfaz empleada en los sistemas de cromatografía líquida poseen una gran analogía con el sistema utilizado en cromatografía de gases, así el volumen de la cámara de desorción debe ser minimizado para incrementar la velocidad lineal de los disolventes de desorción, que normalmente en HPLC suelen ser la fase móvil.

Así mismo, el tiempo y la temperatura de desorción también han de ser optimizados ya que hay compuestos que pueden permanecer retenidos en el recubrimiento de la fibra y aparecer en los siguientes análisis (efecto memoria). La utilización de tiempos de desorción elevados puede ayudar a reducir este efecto.

En el caso del acoplamiento SPME-HPLC, hay dos modos de desorción: estática y dinámica. En el modo estático, la desorción de los analitos extraídos por la fibra se realiza en el interior de la cámara con el disolvente apropiado y manteniendo la fibra en su interior durante el tiempo necesario para completar dicha desorción. Posteriormente los analitos desorbidos son inyectados al sistema cromatográfico. Cuando se opera en la forma dinámica, la fibra con los analitos extraídos se sumerge en la cámara de desorción mientras se hace pasar un flujo del eluyente cromatográfico, que hará las veces de disolvente de desorción, y que arrastrará los analitos desorbidos al sistema cromatográfico.

Derivatización

En las metodologías de separación, la derivatización se usa para mejorar las propiedades cromatográficas y/o la sensibilidad de la detección.

La mayoría de las aplicaciones publicadas de la SPME que hacen uso de la derivatización, se basan en el aumento de la recuperación de los analitos a determinar [11]. Sólo en pocos trabajos se introducen procesos de derivatización para mejorar la separación, selectividad o sensibilidad [11], centrandose su atención en el tratamiento de compuestos polares y convertirlos, de esta manera, en derivados más fácilmente extraíbles, más estables térmicamente, más volátiles o que presenten un mejor comportamiento cromatográfico. En estos casos, la derivatización precede al muestreo mediante SPME. Se lleva a cabo en la matriz de la muestra y, en consecuencia, es potencialmente susceptible a las reacciones e interferencias que ocurren en disolución. La derivatización en fase sólida, en la superficie de

la microfibra, ha surgido como una manera de disminuir los problemas asociados a estas interferencias y al número adicional de pasos asociados con la derivatización clásica [12].

En la técnica de SPME se pueden llevar a cabo las derivatizaciones de diferentes modos [11]:

- Derivatización en la matriz de la muestra o derivatización en el puerto de inyección.
- Derivatización en la fibra de SPME.

Derivatización en la matriz de la muestra o derivatización en el puerto de inyección

La derivatización en la matriz de la muestra es el procedimiento más empleado. En un gran número de aplicaciones, la meta principal es obtener derivados más volátiles de los analitos polares presentes en disoluciones acuosas [11].

La determinación directa de compuestos carbonílicos de bajo peso molecular es complicada debido a sus altas reactividades, polaridades y volatilidades. La derivatización se ha usado para superar estas dificultades transformándolos en sustancias más estables. El reactivo más frecuente elegido para la derivatización de compuestos carbonílicos en la matriz de la muestra ha sido el *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA) [11].

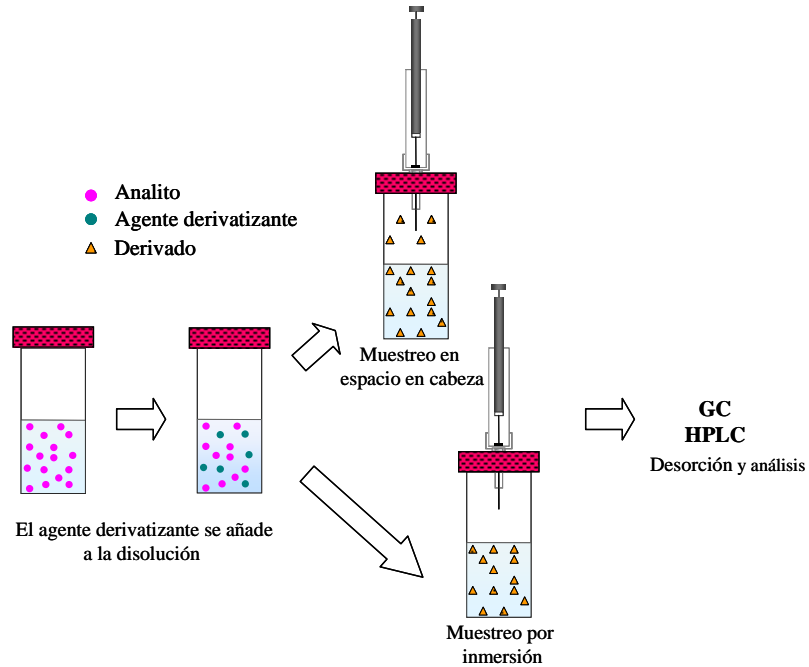
Así por ejemplo, Bao y col. [13] han usado PFBHA para la derivatización de compuestos carbonílicos en muestras de agua, seguida de una extracción con la utilización de SPME (inmersión o espacio en cabeza) y análisis por GC, con límites de detección que oscilan entre 6 y 200 ng/L para 23 compuestos carbonílicos, utilizando un volumen de muestra de 4 mL.

Wardencki y col. [14] comparan la LLE y SPME por inmersión, con el propósito de aislar los derivados que los compuestos carbonílicos forman al agregar PFBHA a diferentes bebidas alcohólicas.

Otro tipo de derivatización que se puede llevar a cabo es la que tiene lugar en el puerto de inyección, tanto en un cromatógrafo de gases como en un cromatógrafo líquido, aunque se trata del procedimiento menos empleado. Lord y Pawliszyn [15] introdujeron el uso de pares

iónicos para convertir largas cadenas de ácidos grasos en sus metil ésteres volátiles mediante la derivatización en el inyector de un cromatógrafo de gases [16-18].

1



2

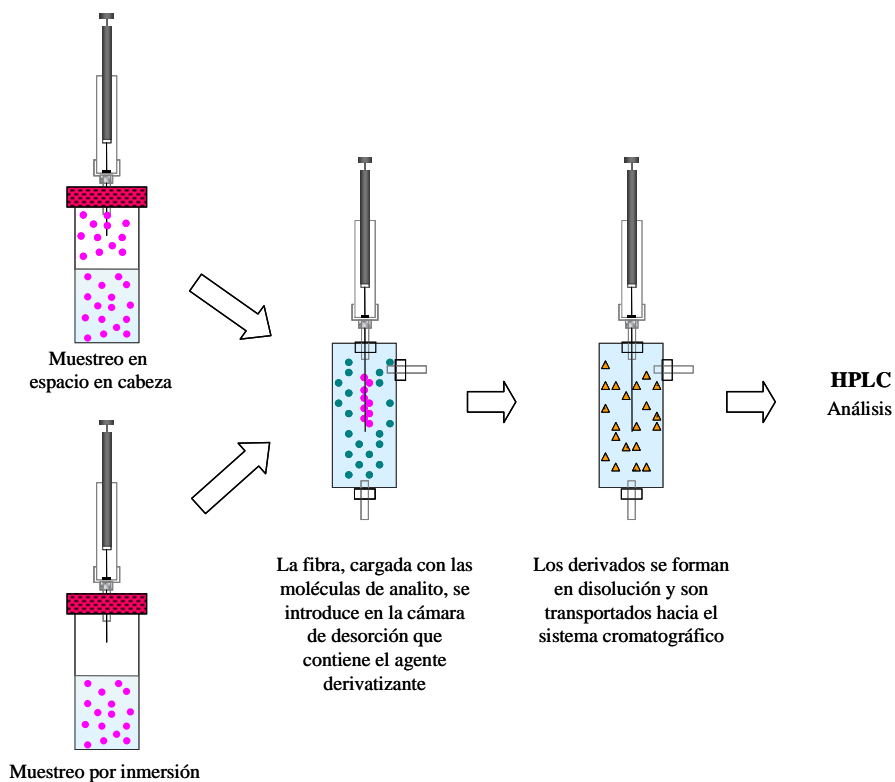


Figura IV.2. Derivatización en la matriz de la muestra (1) y en el puerto de inyección de un cromatógrafo líquido (2).

La derivatización también puede ocurrir en la cámara de desorción de un cromatógrafo líquido, previamente llenada con el agente derivatizante y una vez hayan sido extraídos los analitos sobre la fibra. Así, Aranda y Burk han determinado surfactantes mediante la derivatización con 1-naftoil cloruro en la cámara de desorción o interfaz SPME-HPLC [19].

En la Figura IV.2 se puede observar, de forma esquemática, los procedimientos de derivatización comentados.

Derivatización en la fibra de SPME

Para la obtención de derivados, haciendo uso de SPME, una de las metodologías utilizadas consiste en realizar la extracción de los analitos en la microfibra, mediante inmersión o espacio en cabeza, y exponerla a los vapores del reactivo derivatizante, como el trabajo realizado por Sng y Ng [20].

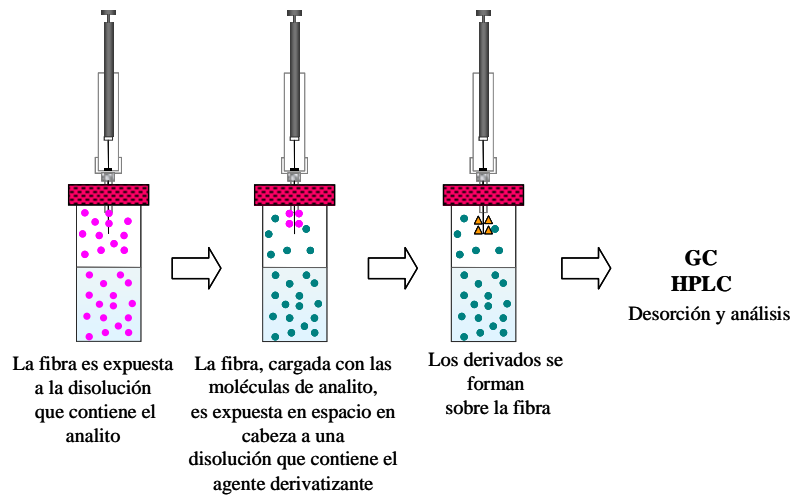
Otro de los procedimientos de derivatización utilizados se basa en incorporar el reactivo derivatizante a la fibra antes de efectuar la toma de muestra. En este caso, se necesita de un reactivo derivatizante no muy volátil, de forma que no abandone la fibra antes de que el muestreo de los analitos haya finalizado. Una manera común de impregnar el reactivo sobre la fibra de SPME es exponiéndola a los vapores del reactivo. Otra alternativa consiste en sumergir la fibra en un disolvente volátil en el que se ha disuelto el reactivo. La mayoría de los reactivos usados para el muestreo y derivatización simultáneas contienen el radical pentafluoro y se usan junto con un detector de captura electrónica para obtener una alta sensibilidad [11].

El mayor número de aplicaciones de este tipo de derivatización se han llevado a cabo en la determinación de compuestos carbonílicos. Así por ejemplo, Koziel y col. [21] han determinado formaldehído en aire interior por derivatización en la fibra. Para ello, usan fibras de PDMS-DVB impregnadas con PFBHA. Mediante este método, se pueden medir concentraciones de formaldehído entre 10 y 380 $\mu\text{g/L}$, resultados concordantes con los obtenidos mediante el método convencional usado por el Instituto Nacional Americano para la Salud Profesional [11]. El método de SPME se encontró que era más ventajoso debido a su exactitud, sensibilidad, costo-eficacia y velocidad. Otro ejemplo es el de Reisen y col. [22], que emplean una fibra PDMS-DVB impregnada con PFBHA para obtener las oximas

correspondientes a los compuestos hidroxicarbonílicos, que se forman en la atmósfera por la reacción del radical OH^\bullet con compuestos volátiles emitidos por la vegetación.

En la Figura IV.3, se pueden observar, de forma esquemática, los procedimientos de derivatización que se acaban de citar.

1



2

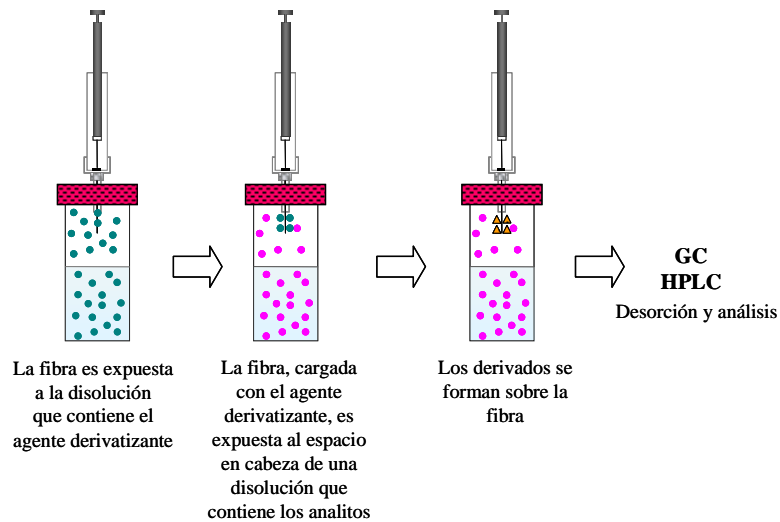


Figura IV.3. Derivatización sobre la fibra de SPME después (1) y durante el muestreo (2).

Aplicaciones

La microextracción en fase sólida es muy efectiva para aplicarla a métodos de screening debido a su rapidez y facilidad de uso.

Al tratarse de un método de equilibrio, las extracciones raramente son cuantitativas, por lo que las condiciones de extracción, tanto para las disoluciones estándar como para las muestras, deberían mantenerse estrictamente bajo condiciones reproducibles. De esta forma, es posible realizar análisis cuantitativos utilizando una calibración interna o externa. Para matrices más complejas se recomienda un método de adiciones estándar.

Las aplicaciones de SPME incluyen análisis toxicológicos y farmacológicos de fluidos biológicos, el análisis de aditivos en alimentos y bebidas, análisis de pesticidas y otros contaminantes en suelos, muestras medioambientales, etc. [23,24].

Aunque esta técnica se aplica generalmente al análisis de compuestos orgánicos, también se puede utilizar para extraer compuestos inorgánicos.

Algunos autores [25] han desarrollado un método para determinar contaminantes orgánicos en matrices gaseosas, preparando mezclas de patrones con el uso de un sistema apropiado para la generación dinámica de gases, a la par que se evalúa cómo la temperatura y la humedad afectan a las respuestas correspondientes a los distintos compuestos.

Cuando es posible determinar los coeficientes de reparto, no es imprescindible la preparación de patrones para cuantificar los analitos. Así por ejemplo, se han determinado, con tal finalidad, los coeficientes de distribución de compuestos carbonílicos entre fibras CAR/PDMS y el aire [26]. La dependencia de la cantidad extraída con la temperatura se determina evaluando la expresión teórica que describe el coeficiente de reparto a cualquier temperatura para cada par fibra-analito [7].

En algunos trabajos se han determinado compuestos carbonílicos en distintas matrices, usando el agente derivatizante *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina para impregnar diferentes tipos de fibras comerciales, bien mediante la técnica de espacio en cabeza o bien con inmersión directa de la fibra en la disolución de la muestra, para formar las oximas de los compuestos carbonílicos correspondientes en el recubrimiento de la fibra. En general, la desorción se lleva a cabo en el inyector de un cromatógrafo de gases. Así, se han determinado compuestos carbonílicos en aceite, sangre, orina, bebidas alcohólicas, agua, agua de mar y

aire [27-38]. Además, también se han hecho intentos de impregnar la fibra con DNPH para extraer aldehídos y cetonas mediante la técnica de espacio en cabeza y la posterior desorción en el inyector de un cromatógrafo de gases, con menos éxito debido a la aparición de picos extraños [39].

IV.1.3. ALTERNATIVAS A LA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA CONVENCIONAL

Microextracción en una gota

Recientemente, se han ido introduciendo técnicas alternativas a las variantes comentadas de la SPME. La microextracción en una gota (SDME) [40,41] implica la extracción de contaminantes orgánicos en espacio en cabeza, o en una disolución de la muestra, en una microgota, generalmente de unos pocos microlitros, de un disolvente orgánico aceptor, inmisible con el agua, que se suspende en la punta de una microjeringa. A diferencia de las fibras, las gotas pueden renovarse en cada extracción y no están sujetas a la desventaja que presentan las fibras de SPME, en cuanto a la limitada disponibilidad comercial de recubrimientos de distinta naturaleza, mientras que existe una amplia variedad de disolventes y agentes de retención.

Se ha investigado la aplicación de esta técnica en la extracción de aldehídos en una gota de disolvente orgánico que contiene 2,4,6-triclorofenilhidracina [42] y 2,4-dinitrofenilhidracina como agente derivatizante [43].

Microextracción en fase líquida

El uso de una fibra con cavidades de polipropileno poroso conectada en el extremo de una microjeringa puede servir como interfase entre dos fases líquidas, una que actúa como donadora y otra como aceptora. El polipropileno se usa de forma habitual porque es un material ampliamente compatible con un amplio rango de disolventes orgánicos. Esta técnica [44], que puede considerarse como una ampliación de la técnica de SDME, se conoce con el nombre de microextracción en fase líquida (LPME). De forma ilustrativa, la membrana

porosa impregnada con un disolvente orgánico inmiscible con el agua, se intercala entre dos fases acuosas.

La técnica puede considerarse como una combinación de la extracción líquido-líquido y de la difusión a través de membranas. Los analitos presentes en la muestra o disolución dadora, que se encuentran en formas químicas acordes con las características de la disolución, son extraídos a la fase orgánica y difunden a través de la membrana, siendo reextraídos desde la fase acuosa aceptora. Evidentemente, las fases acuosas dadora y aceptora han de proporcionar características a los analitos que les hagan más o menos afines por la fase orgánica. Es una situación apropiada para compuestos que puedan presentar distintas formas ácido-base. En general, el pH de las disoluciones dadora y aceptora, el tipo de membrana y el disolvente orgánico son variables a optimizar en cada caso. La posibilidad de utilizar volúmenes menores de la fase constituida por el medio aceptor favorece, en ocasiones, un aumento de la sensibilidad. También, la técnica puede estar menos afectada por el efecto memoria (carry-over) que la SPME.

Extracción con barras agitadoras adsorbentes

La cantidad de analito extraída en SPME es proporcional al volumen de la fase extractante y, por tanto, la sensibilidad de un método puede mejorar aumentando el volumen de esta fase. Este objetivo se puede alcanzar mediante un aumento del espesor del recubrimiento, tanto como soporte en una fibra, o cubriendo el espesor de diferentes soportes usando un método del multifibras que, a su vez, pueden actuar como barras utilizables en sistemas de agitación magnéticos [3]. Sin embargo, las metodologías basadas en estos principios requieren un mayor tiempo de equilibrio, porque la velocidad de la extracción se controla por la difusión desde la matriz que contiene la muestra a través de la capa límite de la fase extractiva. En general, se considera que esta técnica denominada SBSE tiene mayores ventajas con respecto a la SPME en cuanto a sensibilidad y exactitud para determinaciones a nivel traza en matrices complejas, como en las determinaciones de pesticidas organofosforados en la miel [45].

Microextracción en una capa delgada

Otra aproximación, para obtener volúmenes mayores de fase extractiva, consiste en extender el área de la superficie del polímero que se ha hecho usando membranas en lugar de fibras recubiertas. El uso de una membrana delgada tiene la ventaja de que mejora la eficacia de extracción y por tanto puede lograrse una alta sensibilidad sin alcanzar tiempos de equilibrio demasiado elevados, como puede ocurrir cuando se usan las barras agitadoras adsorbentes [3,46,47].

IV.1.4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La microextracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases ha sido aplicada extensivamente a la determinación, principalmente, de compuestos volátiles. Sin embargo, la SPME acoplada a HPLC, de desarrollo más reciente, resulta más adecuada para la determinación de compuestos semivolátiles o no volátiles. Además, muchas aplicaciones se han desarrollado en los últimos años, lo que indica el creciente interés por esta técnica.

La aplicación de SPME al análisis de muestras de aire es reciente dado que entraña dificultades importantes como, por ejemplo, la preparación de patrones a utilizar en los procesos de calibración y la obtención de resultados reproducibles, ya que la calibración y el muestreo deben realizarse a la misma temperatura.

En los capítulos anteriores se ha puesto de manifiesto el interés que ofrece la determinación de compuestos carbonílicos mediante la separación y detección con HPLC-UV de sus derivados con la 2,4-dinitrofenilhidracina. Por otra parte, se ha demostrado que la formación de las hidrazonas correspondientes a los distintos aldehídos y cetonas, no ocurre siempre con la misma eficacia, con lo cual la toma de muestra y derivatización ha de realizarse en condiciones experimentales similares a las utilizadas en el proceso de calibración, o viceversa. Con estas limitaciones, hemos propuesto en el capítulo anterior la posible utilización de dos sistemas de toma de muestra. Uno en el que la toma de muestra y derivatización se realiza en cartuchos que contienen un adsorbente en el que se retiene la DNPH, y otro en el que ambos procesos ocurren en el interior de un tubo colector de gases, en el que una disolución del agente derivatizante se introduce a través de un septum para que reaccione con los compuestos carbonílicos presentes inicialmente en fase gas.

Ante las dificultades comentadas en relación con las determinaciones propuestas, el objetivo de este capítulo se centra en el desarrollo de una nueva metodología que, utilizando como sistema de medida la HPLC-UV, sea utilizable en la toma de la muestra y para el tratamiento de la misma antes de su inyección en el sistema cromatográfico. En principio, se trataría de utilizar las ventajas y simplicidad de la técnica de microextracción en fase sólida para trasladar la muestra al inyector del cromatógrafo.

Para efectuar la medida de los compuestos carbonílicos mediante HPLC-UV, es necesario proceder a su derivatización con DNPH. En tal sentido deberá seleccionarse el sistema para convertir los aldehídos y cetonas en sus correspondientes hidrazonas. Como quiera que la metodología sería utilizable para muestras de humo, es decir, en las que los analitos se encuentran en fase gas, podrían emplearse procedimientos en los que la derivatización se efectúe sobre la fibra en la que previamente se impregne la DNPH y se haga pasar sobre ella la muestra, o bien, retener los analitos en la microfibra que posteriormente se pondría en contacto con una disolución de DNPH.

Sin embargo, parece lógico que se aproveche la posibilidad de utilizar una interfaz SPME-HPLC, en la que la derivatización tendría lugar en su interior. En consecuencia, tendrían que establecerse, en primer lugar, las condiciones experimentales apropiadas para la adsorción en la microfibra de los analitos presentes en la muestra de humo. La necesidad de que la muestra y la fibra permanezcan en contacto un determinado tiempo obligaría a recoger la muestra en un recipiente adecuado, en el que entrarían en contacto los analitos con la fibra. Por otra parte, trasladada la muestra a la interfaz, es de esperar que la derivatización se tenga que realizar mediante un procedimiento estático, de manera que los analitos tengan tiempo de desorberse y puedan reaccionar con la DNPH presente en la disolución introducida en la cámara que sustituye el loop del inyector.

IV.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IV.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Los compuestos carbonílicos empleados en este estudio son los mismos que los descritos en el apartado *II.2.1*.

Los compuestos carbonílicos individuales y el compuesto 2,4-dinitrofenilhidracina, usado como agente derivatizante, están descritos en el apartado *II.2.1*.

Los disolventes empleados en la preparación de las disoluciones y en el análisis cromatográfico vienen descritos en el apartado *II.2.1*.

Para el muestreo de los compuestos carbonílicos, se usaron los cartuchos H-30 comerciales reutilizados cuyas características y preparación se describieron en los apartados *III.2.1* y *III.2.3*, respectivamente.

Las experiencias de SPME se desarrollaron con un soporte para SPME suministrado por Supelco (Bellefonte, USA). Las fibras empleadas fueron Carbowax/Templated Resin (CW/TPR) de 50 μm de espesor, Poliacrilato (PA) de 85 μm , Polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm y Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno (PDMS/DVB) de 60 μm , todas ellas suministradas por Supelco (Bellefonte, USA). Previamente al análisis, las fibras se acondicionan sumergiéndolas en acetonitrilo durante 5 minutos a temperatura ambiente y agitando con una barra magnética a 400 rpm.

El material empleado para la obtención de humo viene descrito en el apartado *III.2.1*.

IV.2.2. EQUIPOS

El equipo de HPLC usado para hacer las experiencias fue un cromatógrafo líquido suministrado por Varian (Palo Alto, CA, USA) y equipado con un sistema de gradiente de disolventes Prostar 230 y un detector de fotodiodos ProStar 330. El control y la adquisición y evaluación de los datos del cromatógrafo se realizó mediante el software Star 5.51 de Varian (Palo Alto, CA, USA). El sistema analítico empleado en este cromatógrafo es el descrito en el apartado *II.2.2*.

La interfaz SPME-HPLC suministrada por Supelco (Bellefonte, USA) y equipada con una cámara de desorción o loop de 60 μL y una válvula de inyección Rheodyne, se utilizó para introducir en el cromatógrafo líquido los compuestos retenidos en las fibras.

Para calentar los viales se utilizó un termostato de bloque metálico TEMBLOC para 18 tubos de 16 mm de diámetro suministrado por Selecta (Barcelona, España).

Para calentar los recipientes de 0.5 ó 1 L se empleó el baño termostático descrito en el apartado *III.2.2*.

La placa agitadora modelo RCT Basic fue suministrada por IKA[®] Werke (Staufen, Alemania).

Los equipos y el material necesarios para llevar a cabo los muestreos del humo procedente de la combustión de biomasa son los mismos que los descritos en el apartado *III.2.2*.

Para el tratamiento estadístico de los datos y los diseños experimentales, se usó el software Statgraphics Plus para Windows versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA).

IV.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Preparación de las disoluciones patrón y de la DNPH

Para realizar las experiencias hechas con los compuestos carbonílicos disueltos en acetonitrilo, se parte de la disolución madre con las concentraciones descritas en el apartado *III.2.3*. A partir de esta disolución, se preparó una intermedia por dilución 2 veces en acetonitrilo, que se conserva en nevera a 4°C, y desde la que se prepararon diariamente las disoluciones de trabajo.

Las disoluciones de DNPH se prepararon diariamente de forma similar a la descrita en el apartado *III.2.3*.

Para realizar las experiencias con mezclas de los compuestos carbonílicos comerciales, se prepara la mezcla con 60 μL de cada uno de los compuestos, excepto el formaldehído con

20 μL de la disolución acuosa comercial, el crotonaldehído y el hexaldehído con 30 μL cada uno, el *p*-tolualdehído con 5 μL y 100 μL de una disolución en acetonitrilo de 50 mg/mL de benzaldehído.

Procedimiento de extracción y desorción de los compuestos carbonílicos

Procedimiento de extracción

La extracción de los compuestos carbonílicos se ha llevado a cabo con dos procedimientos diferentes. En el primero de ellos, se añaden alícuotas de 10 μL de la disolución intermedia de los analitos disueltos en acetonitrilo, y de diluciones de ésta, en un vial de 4 mL cerrado con una tapa que contiene un septum por donde se introduce una fibra de CW/TPR de 50 μm de espesor, o la correspondiente a la experiencia realizada. Este vial se coloca en el termostato de bloque metálico a una temperatura de 50°C, o a la utilizada en las diferentes experiencias, y la fibra se introduce directamente en el la fase gas obtenida donde permanece durante un tiempo de 15 minutos, o el que corresponda con la experiencia a realizar.

En el segundo procedimiento, se parte de la mezcla de los compuestos carbonílicos comerciales. Alícuotas entre 2 y 10 μL de esta mezcla se colocan en botellas de 1 ó 0.5 L de capacidad, según la experiencia, cerradas con una tapa y que contiene un septum por donde se introduce la fibra de CW/TPR de 50 μm de espesor. Estas botellas se termostatan en el baño de agua a 23°C, o a la temperatura utilizada en las diferentes experiencias, durante 25 minutos, o el tiempo que corresponda con la experiencia a realizar, al mismo tiempo que se introduce la fibra en la fase gas obtenida.

Procedimiento de desorción

Después de la extracción, la fibra se retrae del vial o de la botella y se introduce directamente en la cámara de desorción de la interfaz SPME-HPLC donde tiene lugar la derivatización. La cámara o loop de 60 μL , se llena previamente con una disolución del reactivo derivatizante con una concentración de 0.075% (p/v) de DNPH, o la correspondiente a cada una de las experiencias realizadas, y 5% (v/v) de HCl 0.1M. La fibra se mantiene en la

cámara de desorción y en contacto con la disolución de DNPH durante 25 minutos, o durante el tiempo necesario para realizar cada una de las experiencias. Transcurrido el tiempo de derivatización, la válvula de inyección de la interfaz, que había permanecido en la posición de carga, se pasa a la posición de inyección para que se transfieran los compuestos carbonílicos derivatizados hacia la columna del sistema cromatográfico. La válvula se vuelve a colocar en la posición de carga transcurridos 2 minutos, o después del tiempo necesario para realizar cada una de las experiencias.

Procedimiento de muestreo del humo proveniente de la combustión de biomasa

El sistema de muestreo es el que se representa en la Figura IV.4, similar al mostrado en el apartado III.2.3. Los compuestos carbonílicos, presentes en el humo proveniente de la combustión de acículas de pino, se recogen en un tubo colector de gases de 250 mL, haciendo pasar el humo impulsado por la bomba de muestreo.

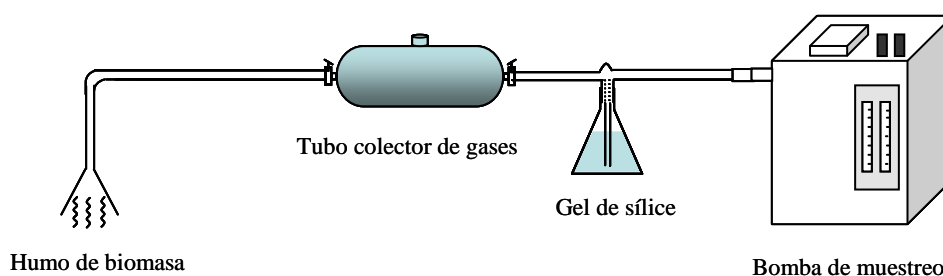


Figura IV.4. Sistema de muestreo del humo proveniente de la combustión de biomasa para la validación de la metodología SPME-HPLC.

Una vez que el tubo colector se llena con el humo muestreado, se cierran las llaves y se coloca en un baño de agua a una temperatura de 23°C, a continuación, se introduce la fibra de SPME CW-TPR en el interior del tubo colector a través del septum, y los volátiles se extraen sobre la fibra durante 25 minutos. Después de este tiempo, se retrae la fibra y se introduce en la cámara de desorción del sistema cromatográfico. En la Figura IV.5 se muestra el esquema del sistema de extracción.

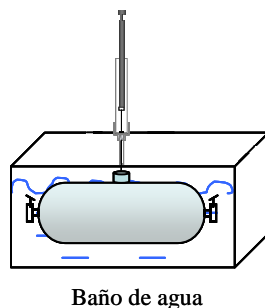


Figura IV.5. Sistema de extracción de los compuestos carbonílicos mediante la metodología con microfibra.

El humo muestreado, que aún permanece en el tubo colector, se calienta con una cinta eléctrica a unos 100°C durante 10 minutos, para evitar su condensación, y se hace pasar a través de los cartuchos impregnados de DNPH para formar las hidrazonas derivadas de los compuestos carbonílicos. A continuación, los cartuchos se eluyen con acetonitrilo, hasta alcanzar un volumen de 5 mL, y se inyecta una alícuota de esta disolución en la cámara de desorción del sistema cromatográfico. En la Figura IV.6 se muestra el esquema del sistema de extracción.

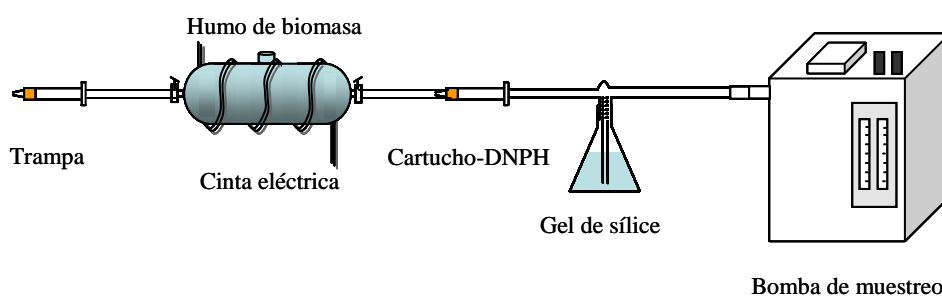


Figura IV.6. Sistema de extracción de los compuestos carbonílicos mediante la metodología con cartucho.

Análisis por HPLC-UV

El método de HPLC usado para la separación y detección de los compuestos carbonílicos derivatizados es el que está descrito en el apartado II.2.3.

IV.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En atención a los objetivos planteados, el desarrollo experimental de este capítulo se centrará en el diseño de una metodología analítica basada en la extracción mediante SPME de los compuestos carbonílicos presentes en muestras de humo, su posterior derivatización con la DNPH en una interfaz SPME-HPLC y terminar con la separación y cuantificación de dichos compuestos mediante HPLC-UV.

La microextracción en fase sólida puede usarse tanto para muestras acuosas como para muestras gaseosas. En ambos casos, hay un reparto de los analitos entre la fase estacionaria y la matriz en la que se encuentran. En nuestro caso, en los equilibrios que se establezcan, intervendrán los compuestos carbonílicos presentes en el humo y la fase polimérica que recubre la microfibras. En consecuencia, el coeficiente de reparto K_{fs} vendrá expresado, para cualquiera de los analitos, por la relación entre las concentraciones del mismo en la fase estacionaria y en la fase gaseosa:

$$K_{fs} = C_f / C_s$$

donde C_f representa la concentración de analito en la fase estacionaria y C_s es la concentración de analito en la fase gaseosa.

Por otra parte, la cantidad de analito en la fase estacionaria vendrá dada por [48]:

$$n_f = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot V_s \cdot C_{in}}{K_{fs} \cdot V_f + V_s}$$

en la que V_f es el volumen de la fase estacionaria, V_s es el volumen de muestra y C_{in} la concentración inicial del analito en la muestra. El volumen de la fase gaseosa se puede considerar mucho mayor que el volumen que presenta la fase estacionaria, con lo cual la ecuación anterior queda reducida a la siguiente expresión:

$$n_f = K_{fs} \cdot V_f \cdot C_{in}$$

Cabe destacar que:

- La concentración de analito en la fibra aumenta con el tiempo de contacto entre la muestra y la fibra. En general, este aumento debe ser rápido al principio, para ir

disminuyendo luego, de forma progresiva, la velocidad de reparto, hasta alcanzar el equilibrio después de transcurrir un cierto tiempo, que se conoce como tiempo de equilibrio.

- La cantidad de analito retenida debe guardar relación con el espesor de la fase estacionaria, por lo que, entre la cantidad de analito a extraer y el tiempo de equilibrio debe establecerse una solución de compromiso, basada en el empleo de un grosor óptimo de recubrimiento de la fibra.
- Para analitos con bajos valores de los coeficientes de reparto, el tiempo de equilibrio puede ser muy largo, incluso cuando se agitan las muestras. Para evitar este inconveniente, pueden utilizarse tiempos de muestreo inferiores al tiempo de equilibrio, basándonos en que entre la cantidad de analito retenida en la fibra y su concentración inicial en la muestra existe una relación lineal, aunque no se haya alcanzado el tiempo de equilibrio. De esta forma, si los límites de detección requeridos para un analito determinado no son demasiado bajos, pueden disminuirse los tiempos de extracción, siempre que el muestreo se realice en condiciones controladas de temperatura y agitación. Evidentemente, en esta situación, para conseguir precisiones aceptables, se debe ser especialmente cuidadoso con el control de las variables experimentales.

IV.3.1. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN

Los procesos implicados en la SPME, cuyos fundamentos se acaban de exponer, requieren optimizar un conjunto de variables, entre las que se encuentra el tipo de fibra a utilizar, para poder obtener resultados reproducibles que conduzcan a determinaciones con una sensibilidad apropiada al problema analítico que se pretenda resolver. En cuanto a las fibras, las posibilidades de elección quedan reducidas, en la mayoría de los casos, a las que se encuentran comercializadas, cuyo número es reducido, tanto en lo que se refiere a la naturaleza del recubrimiento como a su espesor. Una vez que la fibra se pone en contacto con la muestra gaseosa, dos variables que son especialmente críticas por su relación con el equilibrio de reparto, son la temperatura y el tiempo en que permanezcan en contacto la fase estacionaria y la fase gaseosa.

Selección de la fibra apropiada

Las características de la fibra empleada pueden afectar al comportamiento de retención de los analitos de la muestra. Por tanto, antes de intentar establecer los tiempos de equilibrio asociados a la extracción de cada compuesto carbonílico, se han realizado experiencias encaminadas a seleccionar la fibra que proporcione mejores resultados, entre aquellas que presentan recubrimientos con las características que se encuentran descritas en el apartado de desarrollo experimental. Con tal finalidad se han seguido los siguientes criterios: compatibilidad de la fibra con la fase móvil del cromatógrafo líquido, número de analitos de interés extraídos con la fibra en estudio e intensidad de la señal analítica generada por los aldehídos y cetonas extraídos con la fibra.

Se estudió la capacidad de extracción de los analitos en cuatro tipos de fibra diferentes: CW/TPR, PA, PDMS/DVB y PDMS, es decir, todos los posibles recubrimientos disponibles comercialmente para ser utilizados en HPLC.

La fibra de poliacrilato fue descartada desde un principio debido a su incompatibilidad con el acetonitrilo. A los pocos minutos de estar en contacto la fibra y el disolvente, se observa la desaparición del recubrimiento de la misma.

Para establecer el comportamiento de las restantes fibras, se comparan las respuestas, expresadas como áreas de pico, del sistema cromatográfico al someter una disolución de los compuestos carbonílicos a las distintas fibras de SPME. El procedimiento experimental seguido consta de una etapa de extracción en fase gaseosa en la que las distintas fibras se introducen durante 15 minutos en un vial de 4 mL, mantenido a una temperatura de 50°C, y que contiene una alícuota de 10 µL de una disolución en acetonitrilo de los compuestos carbonílicos. La etapa de desorción se realiza en la interfaz del equipo cromatográfico, que previamente se ha llenado con una disolución del agente derivatizante. Se deja en contacto la fibra con una disolución 0.017% (p/v) de DNPH y 1.7% (v/v) de HCl 0.1M en acetonitrilo, durante un tiempo de 10 minutos, para que tenga lugar la formación de las hidrazonas de los distintos compuestos carbonílicos en estudio. La Figura IV.7 muestra las áreas obtenidas, para cada uno de los analitos, en las condiciones mencionadas. Con cada fibra se han realizado cuatro experiencias y en la figura se ha representado el valor medio obtenido \pm la desviación estándar.

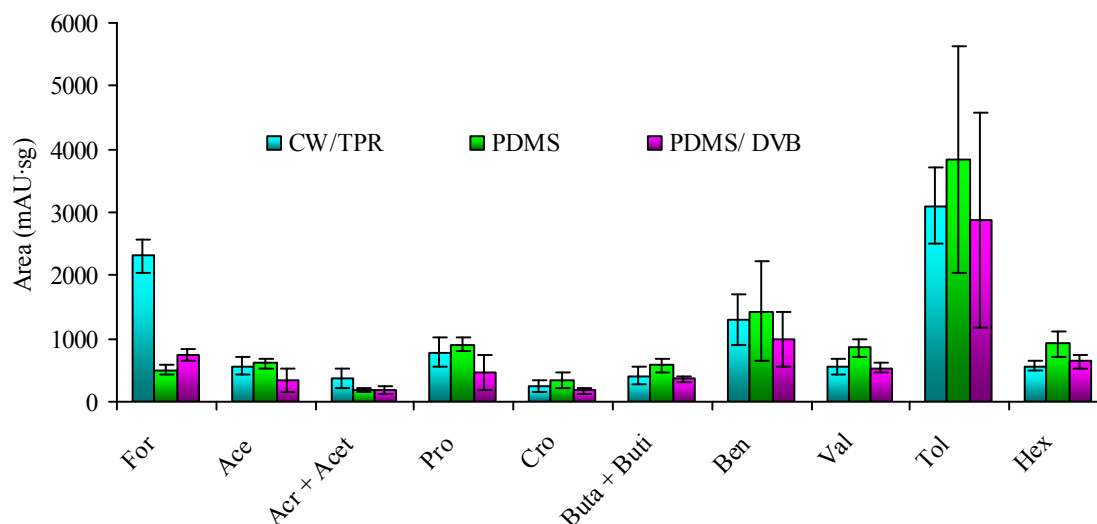


Figura IV.7. Comparación de la eficiencia de extracción obtenida con tres fibras comerciales diferentes.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las tres fibras se muestran eficaces para extraer todos los compuestos carbonílicos, y que no existen, en general, grandes diferencias en las áreas obtenidas para un compuesto mediante cada una de las fibras. La fibra de PDMS muestra la mayor eficiencia de extracción para la mayor parte de los compuestos. Sin embargo, con la de CW/TPR se obtienen resultados mayores para compuestos de bajo peso molecular, especialmente para el formaldehído, que suelen estar presentes en cualquier muestra de humo, y a los que se suele prestar máxima atención como contaminantes del aire, incluidas muestras representativas de atmósferas interiores. Con la fibra PDMS/DVB se obtienen resultados intermedios a los mostrados para las otras dos fibras y, además, presenta un inconveniente importante asociado a la tendencia que muestra este soporte para retener, de forma irreversible, el agente derivatizante. En atención a lo expuesto, se seleccionó la fibra CW/TPR como más adecuada para la extracción de los compuestos carbonílicos presentes en muestras gaseosas, para su posterior desorción y derivatización en una interfaz SPME-HPLC.

Influencia de la temperatura

Puesto que la microextracción en fase sólida es un proceso de equilibrio entre la matriz de la muestra y la fase estacionaria polimérica de la fibra, es necesario determinar la temperatura a la que se va a realizar la extracción ya que ésta puede afectar a dicho equilibrio.

La temperatura de extracción puede determinar la cantidad de analito extraído por las fibras y, por lo tanto, condicionar la sensibilidad del método.

Para estudiar la influencia de la temperatura de extracción, una alícuota de 10 μL de una disolución de los compuestos carbonílicos en acetonitrilo, se introduce en un vial de 4 mL de capacidad, colocado en un termostato adecuado para este tipo de recipiente, y se introduce la fibra en el espacio en cabeza durante 15 minutos. La experiencia se repite a diferentes temperaturas. En cada una de ellas, una vez transcurrida la extracción, la fibra se introduce en la interfaz del sistema cromatográfico, que contiene una disolución en acetonitrilo de DNPH al 0.017% (p/v) y de HCl 0.1M al 1.7% (v/v), y se deja que transcurra un tiempo para la reacción de derivatización de 10 minutos para, a continuación, dejar fluir fase móvil durante 2 minutos, tiempo suficiente para transferir los analitos hasta la columna del sistema cromatográfico.

En el estudio realizado se han utilizado tres temperaturas: 35, 50 y 75°C. Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos carbonílicos seleccionados, en las distintas experiencias, se muestran en la Figura IV.8.

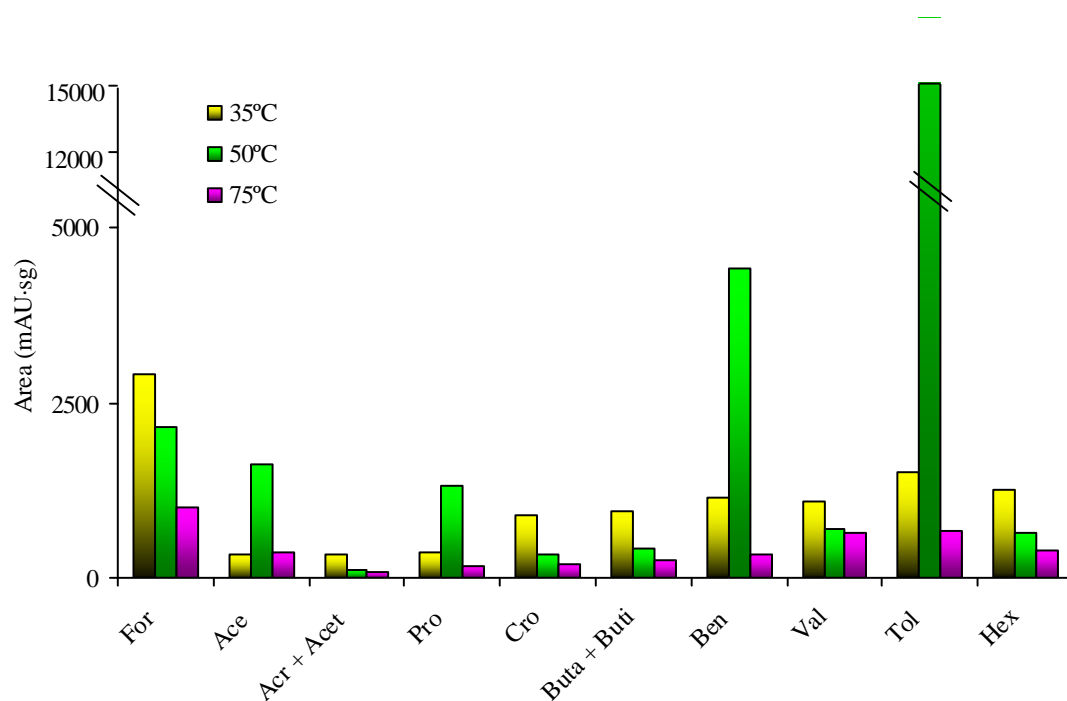


Figura IV.8. Influencia de la temperatura en la extracción de los compuestos carbonílicos.

Para todos los compuestos carbonílicos, los mayores resultados se obtienen cuando el proceso de extracción se realiza a temperaturas de 35°C o de 50°C. La utilización de temperaturas superiores no favorece a ninguno de los aldehídos y cetonas estudiados. En principio, un aumento de la temperatura en la disolución que contiene los compuestos carbonílicos podría favorecer el paso de los mismos desde la matriz a la fibra. Sin embargo, al alcanzarse valores suficientemente altos, podría producirse la desorción de los analitos inicialmente retenidos en el recubrimiento de la fibra. Es decir, que la temperatura en el interior del vial debe ser la adecuada para volatilizar los analitos presentes en la disolución, pero sin favorecer la desorción una vez que han sido retenidos en la fibra.

Los resultados agrupados en la Figura IV.8 muestran que la extracción de los aldehídos aromáticos se ve considerablemente favorecida cuando se usan temperaturas de 50°C. A esta temperatura también se obtienen mayores recuperaciones para el acetaldehído y el propionaldehído.

En los restantes casos, las eficacias obtenidas alcanzan valores superiores cuando las experiencias se realizan a 35°C. Ahora bien, para estos compuestos, las señales cromatográficas obtenidas al repetir las experiencias a 50°C también presentan valores considerables. En atención a lo expuesto, y como solución de compromiso, se ha seleccionado una temperatura de 50°C como apropiada para efectuar los procesos de extracción de compuestos carbonílicos mediante SPME.

Tiempo de extracción

Una vez seleccionada la fibra de CW-TPR por los resultados que proporcionan en la extracción de los compuestos carbonílicos y después de elegir la temperatura más adecuada para realizar la extracción, se ha planificado un conjunto de experiencias encaminadas a optimizar el tiempo de extracción o a definir los perfiles de extracción que se obtienen en función del tiempo, para proceder, a partir de los mismos, a la elección de un tiempo de extracción apropiado para el conjunto de los compuestos carbonílicos.

Con tal finalidad, se ha utilizado un procedimiento experimental similar al empleado en la experiencia anterior. La fibra se pone en contacto con la fase gaseosa formada por una alícuota de una disolución de los compuestos carbonílicos disueltos en acetonitrilo, se fija la temperatura a 50°C y se mantiene la fibra en el interior del vial durante diferentes tiempos.

Los perfiles correspondientes a los distintos compuestos carbonílicos, en función del tiempo de extracción, se establecieron por medida de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en cada experiencia, en función del tiempo de exposición.

La Figura IV.9 muestra los perfiles de extracción, para algunos compuestos carbonílicos considerados como representativos, haciendo uso de la fibra de CW-TPR. Los resultados, obtenidos por duplicado, muestran que los equilibrios dependen del compuesto extraído y que la magnitud de la señal cromatográfica puede variar significativamente para los distintos compuestos carbonílicos. Sin embargo, los tiempos necesarios para alcanzar los equilibrios suelen oscilar, para la mayoría de los aldehídos y cetonas estudiados, entre 10 y 20 minutos.

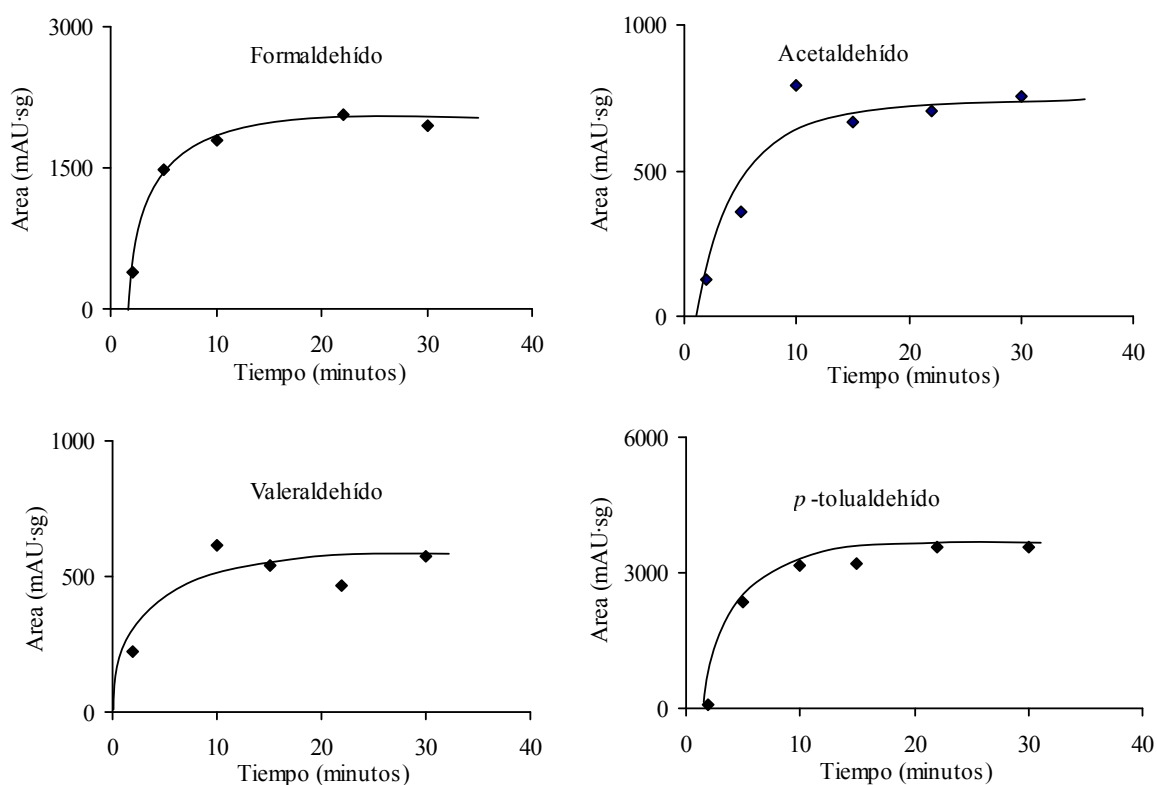


Figura IV.9. Perfiles de tiempo de extracción para los compuestos carbonílicos.

Como se ha comentado con anterioridad, es posible utilizar tiempos de extracción inferiores a los que son necesarios para alcanzar los equilibrios, en base a que existe una relación lineal entre la cantidad de analito retenida en la fibra y su concentración inicial en la muestra. Esta posibilidad permite acortar el tiempo de análisis, seleccionando el tiempo de

extracción atendiendo a los límites de detección requeridos para el análisis de los analitos que se consideren. Ahora bien, puesto que, en el caso que nos ocupa, los tiempos necesarios para alcanzar los equilibrios son asumibles en el conjunto del proceso analítico, no se ha considerado oportuno utilizar tiempos inferiores, fijando un tiempo de extracción para experiencias posteriores de 15 minutos.

IV.3.2. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE DESORCIÓN-DERIVATIZACIÓN

En la metodología analítica que pretendemos establecer, después de la extracción parcial de los analitos contenidos en la muestra por la fibra seleccionada, el siguiente paso engloba las etapas de desorción y derivatización de los analitos. Estos procesos, que tienen lugar en la interfaz acoplada al equipo de HPLC en el lugar que habitualmente ocupa la válvula de inyección, requieren del control de un conjunto de variables experimentales cuyas magnitudes pretendemos optimizar en este apartado.

El método tradicional de experimentación consiste en variar cada vez un solo factor. A partir de unas condiciones iniciales preestablecidas, se realizan experimentos en los que todos los factores se mantienen constantes excepto el que se está estudiando. De este modo, la variación de la respuesta se puede atribuir al cambio experimentado por el factor que se modifica, y por tanto, revela el efecto del mismo sobre el proceso. Esta estrategia experimental presenta inconvenientes importantes cuando existe interacción entre factores, situación que se presenta muy a menudo en Química Analítica. Cuando existen tales interacciones, el método tradicional:

- No informa sobre la forma de interactuar con los otros factores, o cómo estas interacciones afectan a la respuesta.
- No proporciona la posición del factor que pueda considerarse óptima.

Los inconvenientes del método tradicional proceden de variar un factor cada vez. La solución, por lo tanto, debe consistir en variar simultáneamente, al realizar un nuevo experimento, más de un factor. El diseño que se realice con tal finalidad debe proporcionar el marco matemático adecuado para cambiar todos los factores de forma simultánea y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos.

El diseño experimental [49] se puede definir como una metodología basada en herramientas matemáticas y estadísticas cuyo objetivo es ayudar a:

- Seleccionar la estrategia experimental óptima que permita obtener la información buscada con el mínimo coste en tiempo y recursos.
- Evaluar los resultados experimentales obtenidos, garantizando la máxima fiabilidad en las conclusiones que se obtengan.

Las situaciones en las que se puede aplicar un diseño experimental son muy numerosas. De forma general, se aplica a sistemas en los cuales se observan una o más variables experimentales dependientes o respuestas (Y) cuyo valor depende de una o más variables independientes (X) controlables, llamadas factores. Las respuestas, además, pueden estar influidas por otras variables que no son controladas por el experimentador.

Es frecuente realizar la experimentación en diversas etapas de forma secuencial. En cada etapa, las series de experimentos se agrupan en bloques denominados matrices de experimentos. La selección de una matriz u otra depende del objetivo de cada etapa y de otras características como naturaleza del problema, información que se desea obtener, número de factores e interacciones que se deben estudiar, validez estadística y efectividad de cada diseño, etc.

Una vez que se han identificado los factores más importantes, el siguiente paso suele ser el estudio cuantitativo de sus efectos sobre la respuesta y sus interacciones. Para este propósito se pueden utilizar los diseños factoriales completos a dos niveles 2^k y los factoriales fraccionados 2^{k-r} , entre otros. Estos últimos contemplan un número menor de experimentos que los diseños factoriales completos, a costa de no obtener ciertas informaciones que a priori se consideran irrelevantes.

El último objetivo de la investigación suele ser la optimización de una o varias respuestas en un proceso. Es decir, conocer qué valores de los factores proporcionan respuestas con la calidad deseada. Estos valores se pueden conocer mediante el cálculo de un modelo matemático, denominado superficie de respuesta, que relaciona los factores más relevantes con las respuestas.

El proceso de desorción es extremadamente importante en SPME-HPLC, debiendo optimizarse el modo de desorción, estático o dinámico, y el disolvente usado. En nuestro

estudio se utilizó un modo de desorción estático, ya que nuestro objetivo no se limitaba en extraer los analitos retenidos en la superficie de la fibra e inyectarlos en cabeza de la columna analítica, sino que, además, pretendíamos conseguir la reacción de los mismos con el agente derivatizante, y sabemos que estas reacciones no ocurren de forma instantánea. El procedimiento a seguir requiere llenar la cámara de desorción con una disolución de la DNPH y sumergir la fibra en la misma, durante un tiempo determinado (tiempo de inmersión o tiempo de reacción), cambiar la válvula desde la posición de carga a la posición de inyectar para que la fase móvil vaya arrastrando el contenido de la cámara hacia la columna cromatográfica durante un tiempo prefijado (tiempo de desorción) y, por último, volver a colocar la válvula en la posición de carga.

Atendiendo a lo expuesto, y una vez seleccionadas las condiciones óptimas de temperatura y tiempo de extracción haciendo el estudio de estas dos variables por separado, se sometieron a optimización las siguientes variables:

- Concentración de agente derivatizante en la disolución que se introduce en la cámara de desorción
- Tiempo de inmersión de la fibra en dicha cámara, y
- Tiempo de desorción

con objeto de obtener recuperaciones que conduzcan a señales analíticas de sensibilidad suficiente, para poder realizar la determinación de cada uno de los compuestos carbonílicos seleccionados a las concentraciones habituales en las muestras de humo.

Un diseño previo de screening no fue necesario para establecer los rangos de las variables estudiadas, ya que pruebas iniciales nos suministraron información previa acerca del orden de magnitud entre los que oscilaban los valores de las variables en estudio. Para la obtención de una superficie de respuesta representativa del proceso de desorción-derivatización en la interfaz SPME-HPLC, se utilizó un diseño factorial completo de dos niveles, 2^3 , del tipo Box-Behnken, que da lugar a 15 experiencias.

Los factores estudiados, su codificación, así como los valores máximos y mínimos utilizados en el diseño, se muestran en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2. Niveles de los factores en el diseño experimental.

Factor	Clave	Menor (-)	Mayor (+)
Tiempo de reacción, min	A	10	50
Concentración DNPH, % (p/v)	B	0.017	0.100
Tiempo desorción, min	C	1	6

La Tabla IV.3 muestra la matriz del diseño experimental obtenida.

Tabla IV.3. Matriz del diseño experimental.

Experiencia	Tiempo de reacción (min)	Concentración agente derivatizante (% p/v)	Tiempo de desorción (min)
1	30	0.0585	3.5
2	10	0.0585	1
3	30	0.1	6
4	10	0.0585	6
5	30	0.017	6
6	30	0.1	1
7	30	0.017	1
8	30	0.0585	3.5
9	50	0.017	3.5
10	10	0.1	3.5
11	10	0.017	3.5
12	50	0.0585	6
13	50	0.0585	1
14	50	0.1	3.5
15	30	0.0585	3.5

Los efectos de los factores principales, mostrados en la Figura IV.10, y las cartas de Pareto ponen de manifiesto que el tiempo de reacción tiene un efecto positivo en la respuesta de todos los compuestos carbonílicos, siendo el factor de mayor influencia en los casos del formaldehído y del benzaldehído, y aportando una influencia significativa en los restantes casos, excepto para el valeraldehído. En cuanto a la concentración del agente derivatizante, es un parámetro que también ejerce un efecto positivo para todos los compuestos hasta alcanzar

una respuesta máxima a un valor dado de concentración a partir de la cual se produce una estabilización, o incluso un descenso de la señal analítica, al incrementar su valor. Entre las variables estudiadas, la concentración de la DNPH en el proceso estudiado es la que ejerce la mayor influencia en las señales analíticas correspondientes a todos los compuestos carbonílicos, excepto el formaldehído y el benzaldehído. En cuanto al tiempo de desorción, también ejerce un efecto positivo de escasa significación en compuestos como el formaldehído e insignificante para el resto de los compuestos carbonílicos.

Son escasas las interacciones entre las variables comentadas que ejerzan una influencia considerable en los procesos estudiados. Sólo la que corresponde a la concentración del agente derivatizante y el tiempo de reacción presenta un efecto significativo y positivo en la señal asociada a algunos compuestos, como: formaldehído, acroleína + acetona, crotonaldehído y 2-butanona + butiraldehído. Además de la anterior, la interacción entre la concentración de la DNPH y el tiempo de desorción es significativa en el caso del formaldehído.

La Figura IV.11 muestra las superficies de respuesta para cada uno de los compuestos del estudio. Como acaba de comentarse, el tiempo de desorción es, entre las tres variables seleccionadas para ser optimizadas, la que ejerce menor influencia en las recuperaciones obtenidas, incluso en el caso del formaldehído, único compuesto para el que su influencia puede considerarse significativa. En consecuencia, para las experiencias posteriores, se ha elegido un valor intermedio, dos minutos, dentro del rango de tiempos estudiado.

Las superficies de respuesta representadas en la citada Figura IV.11 corresponden a las obtenidas con un tiempo de desorción de 3.5 minutos y permiten seleccionar valores óptimos para las otras dos variables en estudio. En cuanto al tiempo de reacción, el comportamiento es, en general, similar para la mayoría de los aldehídos y cetonas. Las recuperaciones suelen aumentar progresivamente al prolongarse el tiempo de contacto entre la fibra y la disolución que contiene el reactivo derivatizante. La variación es prácticamente lineal hasta tiempos de 25 - 30 minutos, para tender asintóticamente hacia un valor máximo a tiempos superiores. En atención a los comentarios realizados, teniendo en cuenta la sensibilidad de las metodologías en relación con los contenidos en compuestos carbonílicos de las muestras objeto de análisis y con objeto de no alargar excesivamente los tiempos de análisis, se ha escogido un tiempo de 25 minutos como tiempo de reacción para conseguir una adecuada derivatización de los compuestos carbonílicos en la interfaz SPME-HPLC.

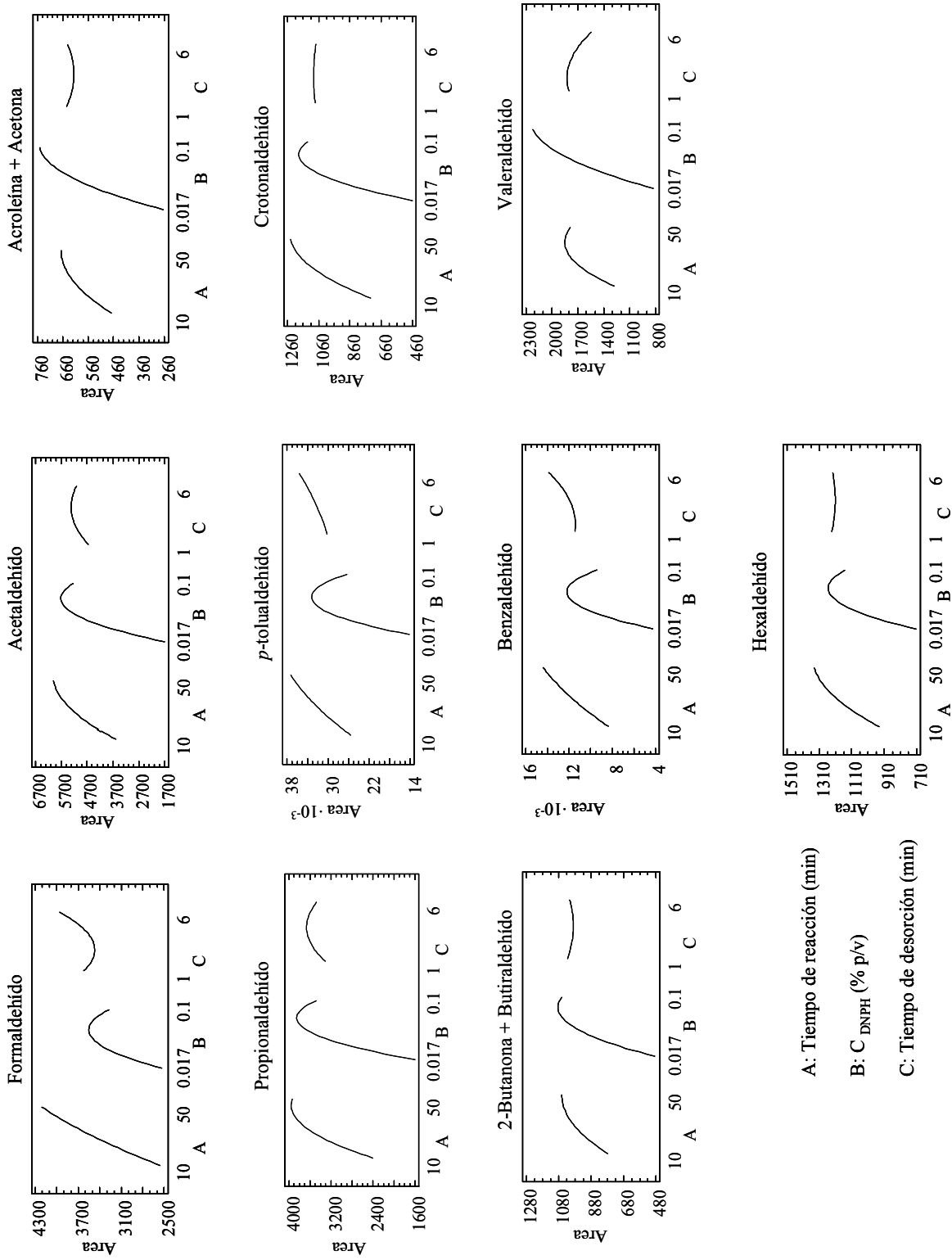


Figura IV.10. Efectos de los factores principales para los distintos compuestos carbonílicos.

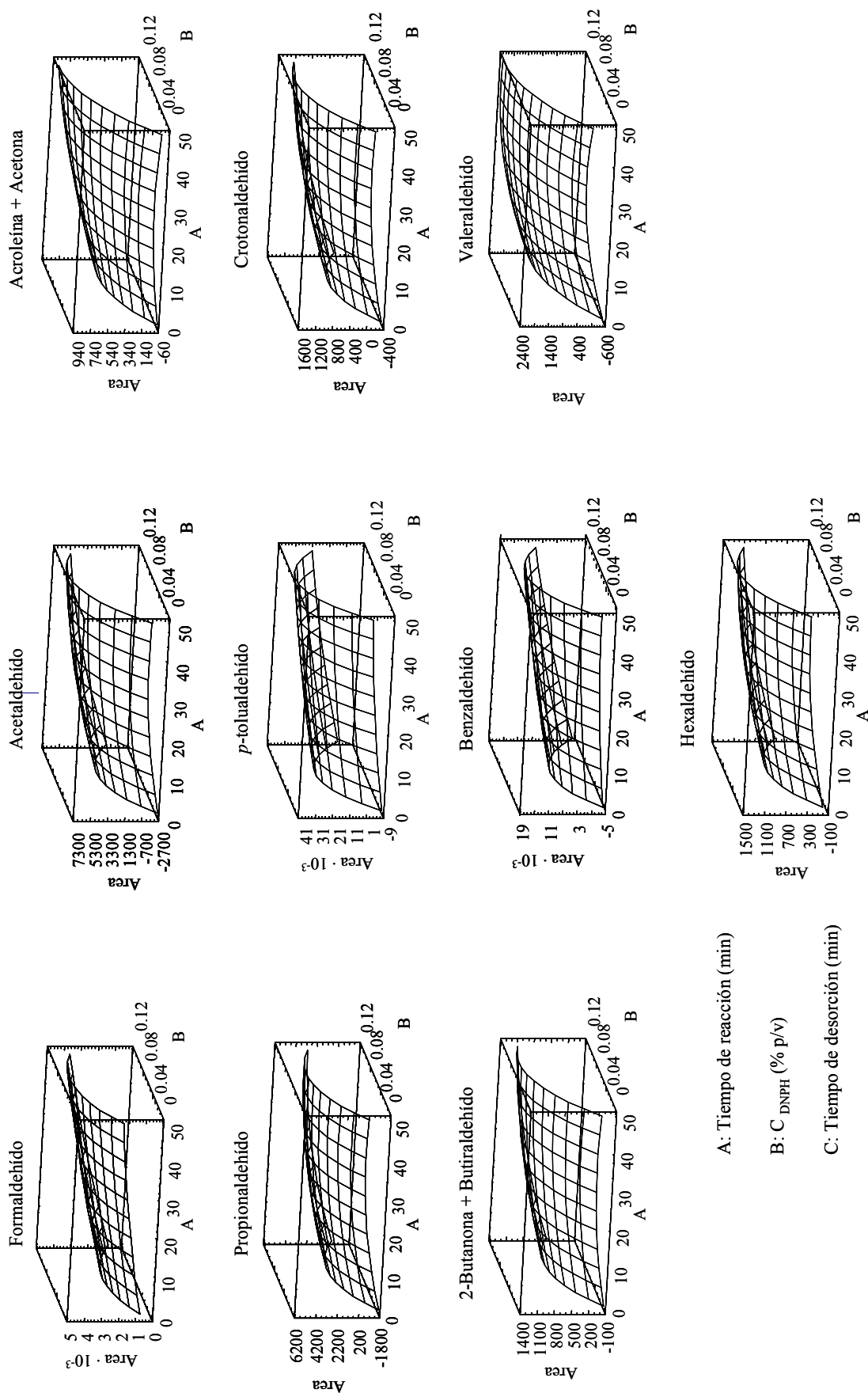


Figura IV.11. Superficies de respuesta para los compuestos carbonílicos para un tiempo de desorción (C) de 3.5 min.

Por último, se ha establecido la concentración de DNPH necesaria para alcanzar una derivatización óptima. Los requerimientos de los distintos compuestos carbonílicos son similares, observándose máximas señales cromatográficas, en la mayoría de los casos, cuando se utilizan disoluciones de la 2,4-dinitrofenilhidracina con concentraciones comprendidas entre 0.04 y 0.08% (p/v). Sólo el *p*-tolualdehído y el par acroleína + acetona requieren de concentraciones de DNPH ligeramente superiores para alcanzar valores máximos de recuperación. Para las determinaciones en muestras reales, se recomiendan utilizar, para el proceso de derivatización, disoluciones con una concentración de 0.075% (p/v) de la DNPH.

Una vez seleccionados los valores óptimos de las variables que afectan a los procesos de extracción y de desorción-derivatización, se tomaron en consideración determinados aspectos que, aunque no están incluidos directamente en estas dos etapas o procesos, pueden afectar de forma significativa a la calidad de los resultados. Entre ellos, se comprobó la influencia del tiempo transcurrido desde que se produce la extracción de los analitos presentes en la muestra, hasta que se introduce la fibra en la cámara de desorción, que suele denominarse tiempo de espera. Los resultados, obtenidos al utilizar distintos valores de esta variable, pusieron de manifiesto que las recuperaciones obtenidas disminuyen considerablemente al aumentar el tiempo de espera. Es decir, que la desorción de los compuestos carbonílicos retenidos en la fibra se produce con relativa facilidad. Para evitar que se produzcan pérdidas significativas, ha de transcurrir el menor tiempo posible desde que se produce la extracción de los analitos y se trasladan a la interfaz del sistema cromatográfico.

Por otra parte, en el proceso de desorción, se ha de considerar la existencia de compuestos que pueden permanecer retenidos en el recubrimiento de la fibra después del proceso de desorción y que, en consecuencia, pueden aparecer en posteriores análisis (efecto memoria o carry-over). Puede llegar a ser un problema de consideración cuando la concentración del analito en la muestra que se va a analizar a continuación sea muy baja, con lo cual dicho efecto puede producir una interferencia importante en la recuperación.

Para determinar el posible efecto memoria de los compuestos carbonílicos, utilizando la fibra CW-TPR, se efectuó un estudio consistente en establecer las posibles retenciones en la cámara de desorción y en la fibra. Por un lado, se comprobó que, después de un proceso de derivatización-inyección de compuestos carbonílicos, es necesario lavar la cámara al menos cuatro veces con acetonitrilo para que dejen de observarse señales en los cromatogramas. Por otra parte, después de utilizar las fibras para la extracción de compuestos carbonílicos, deben

limpiarse con acetonitrilo, introduciéndolas en un vial sometido a agitación de 400 rpm, al menos durante 5 minutos.

IV.3.3. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS MEDIANTE SPME-HPLC. PARÁMETROS DE CALIDAD

Una vez optimizadas las variables de operación que influyen directamente en los procesos de extracción de los compuestos carbonílicos por la fibra seleccionada y su posterior desorción-derivatización e inyección en el sistema cromatográfico, procede establecer las principales características asociadas a la metodología para la cuantificación de aldehídos y cetonas presentes en fase gas.

Es conocido que uno de los principales problemas asociados a las determinaciones que incluyen una etapa de microextracción en fase sólida, es la disponibilidad de patrones que permitan la obtención de curvas de calibrado representativas, en relación con la composición y características de las muestras a analizar. Puesto que, en principio, la metodología a desarrollar se orienta a la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de humo, se ha optado por desarrollar un procedimiento en el que el proceso de microextracción se realice en fase gas.

En atención a las experiencias realizadas en los apartados anteriores, las condiciones a utilizar, para establecer los parámetros de calidad, consisten en el empleo de tiempos de extracción de 15 minutos, en una fase gas obtenida por tratamiento a 50°C de una disolución en acetonitrilo de los compuestos carbonílicos, mientras que la posterior desorción-derivatización se realiza en la interfaz del sistema cromatográfico, llena con una disolución de DNPH al 0.075% (p/v), en la que se sumerge la fibra, empleando tiempos de reacción y de desorción de 25 minutos y 2 minutos, respectivamente. La extracción se realiza en un vial de 4 mL en el que se introducen 10 µL de disoluciones en acetonitrilo, cada una de las cuales contiene concentraciones conocidas de los distintos aldehídos y cetonas.

En la Tabla IV.4 se han agrupado parámetros representativos de la regresión obtenida al construir las curvas de calibrado. En general, se observa una buena linealidad en los rangos de concentración empleados, con coeficientes de determinación que oscilan entre 0.931 y 0.994, excepto para el crotonaldehído con un coeficiente de 0.870.

Tabla IV.4. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado de los compuestos carbonílicos obtenidas mediante la metodología SPME-HPLC.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(g/m ³)	* S _{y/x}	R ²	Rango de concentración (g/m ³)
Formaldehído	1882.9 \pm 112.2	93.6	0.986	0.15 - 1.15
Acetaldehído	1722.2 \pm 204.1	230.4	0.946	0.21 - 1.56
Acr + Acet	30.9 \pm 4.8	8.2	0.931	0.52 - 3.90
Propionaldehído	463.3 \pm 35.7	65.5	0.988	0.34 - 2.56
Crotonaldehído	182.7 \pm 34.7	56.1	0.870	0.30 - 2.23
Buta + Buti	117.8 \pm 18.0	54.0	0.933	0.61 - 4.61
Benzaldehído	2753.7 \pm 121.4	261.2	0.994	0.40 - 3.00
Valeraldehído	412.5 \pm 46.8	88.8	0.951	0.35 - 2.62
<i>p</i> -tolualdehído	7401.0 \pm 518.0	1183.6	0.945	0.42 - 3.18
Hexaldehído	355.2 \pm 21.2	43.4	0.986	0.38 - 2.83

* Desviación estándar residual.

Los pequeños valores de sensibilidad obtenidos para la mayoría de los compuestos carbonílicos con la metodología empleada, pueden estar motivados por el efecto solubilizante del acetonitrilo, presente en fase gas por volatilización a partir de las disoluciones que contienen los analitos, que podría afectar negativamente a la retención de los aldehídos y cetonas en la microfibra. Por tal motivo, se realizaron experiencias similares a las anteriores pero sustituyendo el acetonitrilo, disolvente empleado para preparar las disoluciones patrón de los compuestos carbonílicos, por otros como el agua o con menor punto de ebullición como el diclorometano y el etanol. Los resultados obtenidos muestran que por esta vía pueden conseguirse, en algunos casos, mejoras considerables. Así, cuando el disolvente es agua a 25 - 50°C, las señales obtenidas para los compuestos de mayor peso molecular son entre 1 y 3.5 veces superiores a las que se alcanzan a partir de los patrones disueltos en acetonitrilo a temperaturas similares, mientras que para los más ligeros se obtienen señales inferiores. Si el disolvente es diclorometano y la temperatura a la que se realiza la extracción es 25 - 50°C, las señales cromatográficas que se obtienen son, en general, superiores a las observadas al emplear acetonitrilo como disolvente, aunque sólo en algunos casos, como las correspondientes al formaldehído, 2-butanona + butiraldehído, benzaldehído y hexaldehído,

los aumentos que se producen significan multiplicar la señal por valores comprendidos entre 3 y 13 veces.

Los resultados comentados ponen de manifiesto que la elección de un disolvente adecuado puede mejorar los resultados, a pesar de que la sensibilidad del método sigue siendo baja para algunos compuestos. Ante esta situación, se optó por ensayar la preparación de las curvas de calibrado sin la presencia, en la atmósfera donde se introduce la fibra, de disolventes que puedan dificultar la retención por la microfibra de los analitos a extraer. Con tal finalidad, se ensayó la utilización directa de los aldehídos y cetonas adquiridos comercialmente, sin preparar previamente disoluciones de los mismos. Desde un punto de vista práctico, la forma de proceder ha consistido en depositar algunos microlitros de mezclas de analitos puros y someterlos a volatilización en un volumen suficientemente grande como para alcanzar concentraciones adecuadas en la fase gas, en la que se produce la microextracción. Ahora bien, al modificar la naturaleza de la matriz en la que se encuentran los analitos, es necesario proceder de nuevo a la optimización de la temperatura y el tiempo de extracción, con la fibra seleccionada, antes de establecer los parámetros de calidad de la metodología analítica para la determinación de aldehídos y cetonas. Al ser independientes de la forma de proceder al efectuar la extracción, no es necesario volver a optimizar los procesos de derivatización y de desorción.

Procediendo de forma similar a la utilizada para los procesos de extracción en los que se parte de disoluciones de los compuestos carbonílicos en acetonitrilo, se han establecido los perfiles correspondientes a los tiempos de extracción, por medida de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos para cada analito en función del tiempo de exposición. Alícuotas de 2 μ L de mezclas de aldehídos y cetonas, preparadas a partir de los respectivos productos comerciales, se introducen en recipientes de 0.5 L. Para conseguir atmósferas con los analitos volatilizados, los recipientes se sumergen en un baño termostático, y se introduce la fibra durante 15 minutos. Transcurrido este tiempo, se retrae la fibra y se introduce en la interfaz del sistema cromatográfico que contiene una disolución de DNPH al 0.05% (p/v), se deja que transcurra un tiempo de reacción de 10 minutos, para, a continuación, desorber los analitos y transferirlos hacia el sistema cromatográfico durante 2 minutos. Las recuperaciones obtenidas a diferentes temperaturas se muestran en la Figura IV.12.

En general, las extracciones de los compuestos carbonílicos estudiados, incluidos los de mayor peso molecular, se ven favorecidas a las temperaturas inferiores ensayadas: 23 ó

33°C, disminuyendo de forma considerable al aumentar la temperatura. Con fines prácticos se ha seleccionado, por comodidad, la temperatura de 23°C.

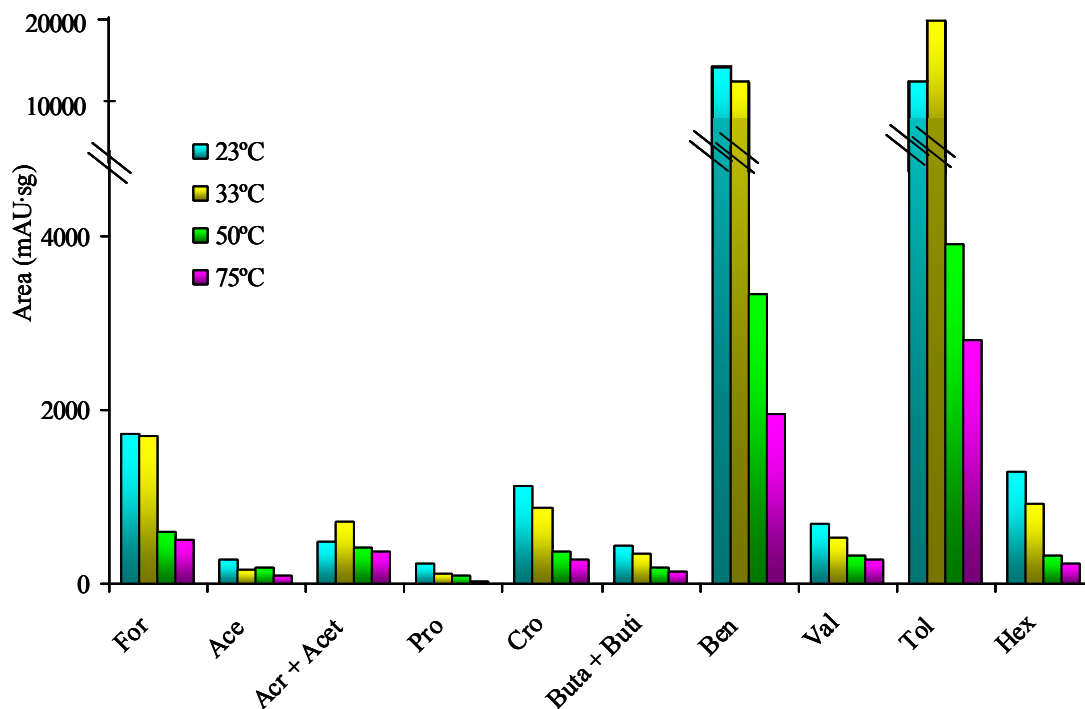


Figura IV.12. Influencia de la temperatura de extracción de los compuestos carbonílicos sin dilución.

En cuanto a los perfiles de extracción, establecidos en función del tiempo que permanece introducida en la fase gas la fibra de CW-TPR, los resultados obtenidos para algunos de los compuestos carbonílicos, representados en la Figura IV.13, muestran que no existen grandes diferencias en el comportamiento de los distintos aldehídos y cetonas. Los tiempos de equilibrio para la mayoría de los compuestos carbonílicos en estudio se alcanzan antes de los 25 minutos, tiempo que ha sido seleccionado como óptimo para realizar las extracciones.

Las condiciones experimentales, que se acaban de establecer para realizar los procesos de extracción, se utilizaron para preparar las curvas de calibrado correspondientes a cada uno de los compuestos carbonílicos seleccionados. Los distintos niveles de concentración en la fase gas sometida a microextracción se consiguieron inyectando volúmenes comprendidos entre 2 y 10 μL en un recipiente de 1 L. Los parámetros asociados a las curvas de calibrado

realizadas por duplicado y obtenidas en las condiciones óptimas establecidas para los procesos de extracción y desorción-derivatización se han agrupado en Tabla IV.5.

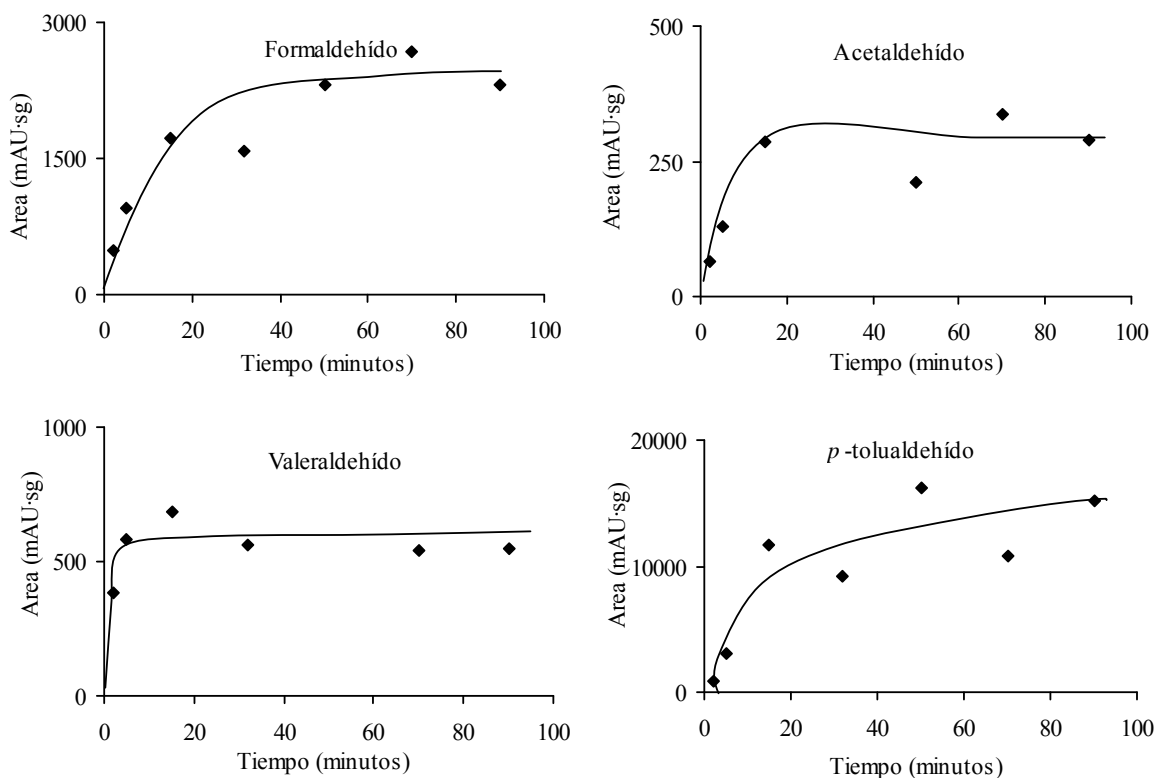


Figura IV.13. Perfiles de tiempo de extracción de los compuestos carbonílicos volatilizados y preparados a partir de la mezcla de productos comerciales.

Con respecto al procedimiento utilizado anteriormente para preparar las curvas de calibrado, la obtención de fases gaseosas mediante la volatilización directa de compuestos carbonílicos comerciales, sin emplear disolventes para su preparación, permite obtener sensibilidades considerablemente superiores. Los valores para las pendientes son, en este caso, entre 4.5 y 47 veces superiores, poniéndose de manifiesto, al mismo tiempo, diferencias importantes entre las sensibilidades correspondientes a los distintos compuestos. Destacan los elevados valores que se obtienen para los dos aldehídos aromáticos, el benzaldehído y el *p*-tolualdehído, y, en sentido contrario, las asociadas a los pares en los que aparece alguna cetona. Sin duda, estas diferencias deben estar relacionadas con la distinta afinidad de la fibra por los distintos analitos.

Tabla IV.5. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado obtenidas por volatilización directa de los compuestos carbonílicos comerciales, sin solubilizarlos en disolventes.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(g/m ³)	* S _{y/x}	DSR (%)	LD (mg/m ³)	R ²	Rango de concentración (g/m ³)
Formaldehído	53303.1 \pm 4035.8	333.9	15.3	4.3	0.956	0.02 - 0.09
Acetaldehído	19383.5 \pm 2553.1	1645.8	17.1	37.2	0.876	0.14 - 0.68
Acr + Acet	690.1 \pm 50.0	71.1	12.2	132.6	0.959	0.28 - 1.42
Propionaldehído	15317.8 \pm 2321.7	1548.1	19.2	28.7	0.825	0.14 - 0.70
Crotonaldehído	6194.1 \pm 427.3	167.9	14.9	19.3	0.959	0.07 - 0.37
Buta + Buti	906.0 \pm 42.4	63.1	10.7	20.5	0.981	0.28 - 1.42
Benzaldehído	77132.9 \pm 3174.0	217.7	15.6	0.1	0.987	0.01 - 0.07
Valeraldehído	1839.8 \pm 79.6	59.1	12.4	12.8	0.983	0.14 - 0.70
<i>p</i> -tolualdehído	345986.8 \pm 20572.6	1437.8	14.6	0.5	0.972	0.01 - 0.07
Hexaldehído	6266.7 \pm 356.9	120.3	15.8	15.6	0.972	0.07 - 0.35

* Desviación estándar residual.

En general, se observa una linealidad aceptable en los rangos de concentración estudiados, con coeficientes de determinación superiores a 0.96, excepto para el acetaldehído y el propionaldehído, para los que se obtienen valores de R² de 0.876 y 0.825, respectivamente. Sin embargo, los valores obtenidos al establecer las desviaciones estándar residual muestran, en general, valores relativamente altos, no sólo para los dos compuestos citados, sino para *p*-tolualdehído y, en menor escala, para otros compuestos carbonílicos, como el formaldehído.

Los límites de detección se calcularon, según las recomendaciones de la IUPAC, como la concentración cuya señal corresponde a la media del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco. Así, los límites de detección calculados oscilan entre 0.15 mg/m³ para el benzaldehído y 133 mg/m³ para el par acroleína + acetona.

El estudio de la repetitividad, para el procedimiento completo de extracción-desorción-derivatización, se llevó a cabo haciendo en un mismo día 6 repeticiones consecutivas de una concentración intermedia del rango estudiado. Los valores obtenidos,

expresados mediante la desviación estándar relativa, oscilaron entre un 10.7 y un 19.2% para el par 2-butanona + butiraldehído y el propionaldehído respectivamente.

IV.3.4. APROXIMACIÓN A LA VALIDACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS MEDIANTE SPME-HPLC

Son muchos los factores experimentales que aportan un cierto grado de dificultad a la implantación y utilización de las metodologías analíticas empleadas para la determinación de compuestos volátiles o semivolátiles en muestras gaseosas. Entre ellos, destacan los relacionados con la toma y tratamiento de la muestra, así como con la calibración, especialmente por la carencia de patrones y materiales de referencia certificados y por la necesidad de concatenar distintas etapas del proceso analítico.

La metodología desarrollada en los apartados anteriores, consta de dos etapas esenciales:

- Extracción, que viene caracterizada porque los analitos, en fase gaseosa, deben permanecer confinados en un recipiente, durante un cierto tiempo y a una temperatura determinada, y en contacto con la microfibra. Las variables: naturaleza de la fibra, tiempo y temperatura de extracción, establecidas para la calibración, también deben respetarse al proceder al análisis de muestras reales.
- Desorción-derivatización. Son procesos que ocurren simultáneamente en la interfaz SPME-HPLC y que, como hemos visto, se encuentran afectados por diversas variables. Es evidente que tanto al efectuar la calibración, como en las determinaciones que implican muestras reales, las condiciones experimentales que afectan a estos procesos deben ser contempladas de igual forma.

Es difícil la validación de metodologías como la establecida, no sólo por la inexistencia de materiales de referencia adecuados, sino por la dificultad de conseguir muestras similares, como es el caso del humo, que puedan ser analizadas por metodologías diferentes, la que se pretende validar y la que sirve como referencia. En el caso de las muestras de humo, en las que se centra la atención de esta tesis, se ha creído oportuno realizar experiencias encaminadas a alcanzar un cierto grado de validación mediante la comparación de los resultados que se obtienen en el análisis de muestras de humo, utilizando la

metodología basada en el empleo de SPME, que acabamos de establecer, y otra que haga uso de cartuchos rellenos con un soporte de sílice impregnado de un agente derivatizante apropiado para aldehídos y cetonas, como la DNPH. Esta última metodología guarda una cierta similitud con la designada por las siglas CG en el capítulo anterior y con la recomendada en la Norma UNE 7726-3 para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de aire [50], que también hacen uso de cartuchos de SPE para la retención y derivatización de los compuestos carbonílicos.

Al pretender, en el contexto de la tesis, comparar las citadas metodologías para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de humo, el primer obstáculo a solventar radica en poder disponer de muestras equivalentes entre sí, que puedan ser sometidas de forma independiente a los tratamientos implicados en cada una de las metodologías. Por otra parte, en atención a la experiencia adquirida en el capítulo anterior, la muestra y los patrones que se empleen en la calibración asociada a cualquiera de las dos metodologías, deben tratarse de forma similar, al menos en lo que se refiere a la volatilización de los analitos, a su derivatización y su posterior análisis.

En las determinaciones de aldehídos y cetonas contenidos en el humo, obtenido a partir de la combustión de residuos vegetales, mediante la metodología basada en la utilización de la SPME, la toma de muestras se realizaría haciendo pasar el humo, mediante una bomba, a través de un tubo colector de gases en el que se introduce, a continuación, la fibra a través de un septum. La muestra se mantiene a una determinada temperatura para conseguir que los analitos se encuentren en fase gas y en equilibrio con la porción de los mismos retenidos por la fibra.

En otro orden de cosas, con anterioridad se ha comentado que la técnica con la que se efectúa la combustión de los materiales vegetales conduce a la formación de humo con una composición que varía continuamente. Por lo tanto, se ha optado por procurar que la muestra empleada para un análisis mediante SPME-HPLC sea utilizada también al aplicar la metodología de referencia. Para ello, el proceso de microextracción se realizaría en el tubo colector de gases que contiene la muestra y, una vez concluida esta etapa, se haría circular aire a través del tubo colector, a un flujo conocido y durante un tiempo determinado, de forma que el humo contenido en el citado colector sea transferido al cartucho donde se produce la derivatización de los analitos. De esta forma, si se supone que los compuestos carbonílicos retenidos en la fibra constituyen una fracción despreciable con respecto al total presente en la

muestra y si se supone que la transferencia desde el tubo colector al cartucho es cuantitativa, podría admitirse que la muestra en contacto con la fibra y la que es retenida en el cartucho deben dar lugar a resultados con una composición similar.

En principio, es más difícil conseguir que el proceso de calibración a utilizar en cada metodología respete las condiciones experimentales en las que se realiza la toma de muestra. Al referirnos a la metodología que utiliza la microextracción en fase sólida, comentamos que la construcción de las curvas de calibrado a partir de la volatilización directa de los compuestos carbonílicos comerciales, llevados a una determinada temperatura, sin solubilización previa en disolventes, introduce ventajas importantes, al menos para alcanzar mejores sensibilidades y para evitar la interferencia que supone la presencia en fase gas del disolvente utilizado para solubilizar los patrones. Ahora bien, no es posible emplear esta forma de preparar la fase gaseosa de los patrones que luego han de ser transferidos a un cartucho para su retención y derivatización. Ha de tenerse en cuenta que en SPME-HPLC la fracción de los analitos transferidos al sistema analítico es sólo la que retiene la fibra cuando se volatiliza cada uno de los patrones. Sin embargo, si se transfiriera el total de la fase gas que permanece en el interior del tubo colector, la cantidad de los analitos que llegarían al cartucho sobrepasaría la capacidad de carga de los mismos, es decir, se produciría rápidamente su saturación, incluso con volúmenes de patrones inferiores a 1 μL .

En atención a lo expuesto, y una vez establecido el procedimiento para la toma de muestras de humo y para su transferencia al cartucho donde tiene lugar la derivatización, para la preparación de los patrones a utilizar en la curva de calibrado, hemos de disponer de un sistema diferente al que se acaba de comentar. La alternativa ha consistido en cambiar la mezcla de compuestos carbonílicos comerciales por una disolución de los mismos en acetonitrilo, es decir, preparar disoluciones patrón de los aldehídos y cetonas a partir de volúmenes conocidos de los respectivos preparados comerciales, y proceder luego a su solubilización en un volumen prefijado del mencionado disolvente. De esta forma, pueden conseguirse condiciones experimentales en las que las alícuotas de disolución patrón intermedia, introducidas en el tubo colector, puedan volatilizarse y transferirse al cartucho de forma cuantitativa y en concentraciones adecuadas. Teniendo en cuenta estas consideraciones, las curvas de calibrado se prepararon a partir de alícuotas, que oscilaron entre 2 y 100 μL , de la disolución patrón intermedia en acetonitrilo y que, una vez inyectados en un tubo colector de gases, se sometieron durante 10 minutos a unos 100°C con la utilización de una cinta

calefactora que rodea al tubo colector. Una vez que la disolución se ha volatilizado, se hace circular aire por el interior del recipiente durante 1 minuto a un flujo de 2 L/min de forma que la fase gas sea transferida, según se indica en la Figura IV.6, al cartucho de gel de sílice que contiene el reactivo derivatizante. En la Tabla IV.6 se han agrupado parámetros de calidad obtenidos a partir de curvas de calibrado construidas de la forma que se acaba de indicar.

Tabla IV.6. Parámetros de calidad asociados a las curvas de calibrado obtenidas por retención y derivatización de patrones en fase gas sobre cartuchos comerciales reutilizados.

Compuesto	Pendiente \pm DS (mAU·sg)/(mg/m ³)	S _{y/x}	R ²	Rango de concentración (mg/m ³)
Formaldehído	145.8 \pm 2.3	41.0	0.998	0.4 - 18.4
Acetaldehído	131.8 \pm 3.0	71.1	0.997	0.5 - 25.0
Acr + Acet	48.6 \pm 1.4	61.8	0.997	1.2 - 62.4
Propionaldehído	26.8 \pm 0.6	21.8	0.998	0.8 - 41.0
Crotonaldehído	74.7 \pm 0.6	19.5	0.999	0.7 - 35.7
Buta + Buti	53.5 \pm 1.4	97.8	0.996	1.5 - 73.8
Benzaldehído	29.1 \pm 0.5	24.1	0.998	1.0 - 48.0
Valeraldehído	47.1 \pm 1.2	48.5	0.996	0.8 - 42.0
p-tolualdehído	33.1 \pm 0.8	40.6	0.996	1.0 - 51.0
Hexaldehído	44.7 \pm 0.5	21.9	0.999	0.9 - 45.4

* Desviación estándar residual.

Al comparar los resultados obtenidos con los agrupados en la Tabla IV.5, se pone de manifiesto que las curvas de calibrado obtenidas para la metodología basada en la transferencia de los patrones de aldehídos y cetonas a los cartuchos donde se derivatizan, presentan, en general, mejor linealidad, menores errores en las medidas y mayor sensibilidad para los distintos derivados.

Con objeto de comparar los resultados obtenidos por las dos metodologías de toma de muestra y análisis que se han propuesto, se sometieron a combustión distintas porciones de acícula de pino y se recogió el humo producido en un tubo colector, que forma parte de un sistema de muestreo como el que se representa en la Figura IV.4. Una vez que se llena el tubo

colector, se realiza el proceso de extracción de los analitos según la metodología de SPME y, a continuación, se hace pasar el contenido del tubo colector a través del cartucho de gel de sílice impregnado de DNPH.

Los resultados obtenidos, para cada compuesto, al analizar por ambas metodologías cuatro muestras diferentes de humo, se encuentran en la Tabla IV.7. Al observar la columna en la que aparecen los rangos de concentración, es decir, los valores extremos obtenidos en las cuatro determinaciones realizadas con cada metodología, se observa la falta de reproducibilidad de las muestras, intrínseca a la forma de producirse el humo.

Tabla IV.7. Rangos de concentraciones encontradas (RC) y valores medios de los errores absolutos (EA) de los compuestos carbonílicos en las muestras de humo procedentes de la combustión de acícula de pino (n = 4) usando las dos metodologías de calibración propuestas.

Compuesto	RC (mg/m ³)		EA (mg/m ³)	Concentraciones medianas (mg/m ³)	
	SPME	Cartucho		SPME	Cartucho
Formaldehído	80 - 128	26 - 74	59	120	55
Acetaldehído	47 - 67	113 - 184	-102	49	161
Acr + Acet	1298 - 2586	194 - 306	1450	1433	226
Propionaldehído	* ND	20 - 38	-	ND	24
Crotonaldehído	33 - 35	16 - 32	11	34	22
Buta + Buti	81 - 146	38 - 58	60	94	40
Benzaldehído	3 - 4	4 - 11	-3	4	6
Valeraldehído	ND	5 - 8	-	ND	6
<i>p</i> -tolualdehído	ND	ND	-	ND	ND
Hexaldehído	ND	ND	-	ND	ND

* No detectado.

Por otra parte, al comparar las concentraciones medianas obtenidas con cada metodología, se observan resultados en los que existen diferencias notables, destacando, entre otros, los correspondientes a los pares acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído. Posiblemente, las diferencias se deban a que, como se ha comentado en capítulos anteriores, las interacciones de algunos compuestos con la DNPH difieren de forma considerable según

se realice en disolución, como sucede en la metodología que utiliza SPME, o en fase sólida, como ocurre cuando la derivatización se efectúa en cartucho. Además, con estos pares, la cuantificación viene afectada por la incertidumbre asociada a que la relación de concentraciones en los patrones y en las muestras difícilmente coincide.

Para conocer si las diferencias entre los restantes resultados son o no significativas, se ha usado la prueba estadística t por parejas [51]. Para ello, se adopta la hipótesis nula, consistente en admitir que no existen diferencias significativas entre las concentraciones obtenidas para las dos metodologías y probar si la media de las diferencias difiere significativamente de cero.

En la Tabla IV.7 también se han incluido los valores medios de los errores absolutos obtenidos para cada par de resultados. La aplicación de la citada prueba a las diferencias obtenidas revela que hay un 95% de probabilidad de que existan diferencias significativas entre los valores obtenidos para los compuestos; formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído. Sin embargo, los resultados obtenidos en las determinaciones de crotonaldehído y benzaldehído, efectuadas con ambas metodologías, se pueden considerar similares entre sí.

Entre las causas que pueden motivar las diferencias entre algunos de los resultados obtenidos, se pueden encontrar los siguientes:

- Pérdida de analitos por volatilización desde la microfibra, durante el paso de la misma desde el lugar en el que se realiza la extracción a la interfaz en la que se provoca la desorción-derivatización. En efecto, estas pérdidas, que afectan más a unos analitos que a otros, se han comprobado que deben tomarse en consideración y, en consecuencia, es aconsejable que dicha transferencia se realice de forma inmediata.
- Presencia de materia particulada en las muestras de humo. En la extracción con la fibra las partículas podrían adsorberse en la misma, mientras que, dependiendo de sus tamaños, pueden no ser transportada eficazmente al cartucho. Además, la reactividad de los compuestos carbonílicos podría ser diferente, según que las partículas adheridas a la fibra sean introducidas en la disolución que contiene el agente derivatizante, o que sean depositados sobre la superficie del soporte en el que se ha impregnado la DNPH.

- Posible pérdida de analitos en el proceso de transferencia de los mismos desde el tubo colector al cartucho mediante arrastre con corriente de aire, por distintos motivos, entre los que se encontraría el posible descenso de la temperatura, que afectaría a los analitos en función de su mayor o menor volatilidad.

IV.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lord H., Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A*, **885**, 153-193 (2000).
- [2] Pawliszyn J. Method and device for solid phase microextraction. *United States Patent* 5691206 (1997).
- [3] Dietz C., Sanz J., Cámara C. Recent developments in solid-phase microextraction coatings and related techniques. *Journal of Chromatography A*, **1103**, 183-192 (2006).
- [4] Chai M., Pawliszyn J. Analysis of environmental air samples by solid-phase microextraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, **29**, 693-701 (1995).
- [5] Motlagh S., Pawliszyn J. On-line monitoring of flowing samples using solid phase microextraction-gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **284**, 265-273 (1993).
- [6] Peñalver A., Pocurull E., Borrull F., Marcé R.M. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, **18**, 557-568 (1999).
- [7] Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice. *Wiley-VCH Inc.* Nueva York (1997).
- [8] Page B.D., Lacroix G. Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A*, **757**, 173-182 (1997).
- [9] Eisert R., Levsen K. Determination of pesticides in aqueous samples by solid-phase microextraction in-line coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **6**, 1119-1130 (1995).
- [10] Valor I., Moltoè J.C., Apraiz D., Font G. Matrix effects on solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from water. *Journal of Chromatography A*, **767**, 195-203 (1997).
- [11] Stashenko E.E., Martínez J.R. Derivatization and solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, **23**, 553-561 (2004).
- [12] Rosenfeld J.M. Solid-phase analytical derivatization: enhancement of sensitivity and selectivity of analysis. *Journal of Chromatography A*, **843**, 19-27 (1999).
- [13] Bao M.L., Pantani F., Griffini O., Burrini D., Santianni D., Barbieri K. Determination of carbonyl compounds in water by derivatization–solid-phase microextraction and gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, **809**, 75-87 (1998).
- [14] Wardencki W., Orlita J., Namieśnik J. Comparison of extraction techniques for gas chromatographic determination of volatile carbonyl compounds in alcohols. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **369**, 661-665 (2001).
- [15] Lord H.L., Pawliszyn J. Method optimization for the analysis of amphetamines in urine by solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, **69**, 3899-3906 (1997).
- [16] Field J.A., Miller D.J., Field T.M., Hawthorne S.B., Giger W. Quantitative determination of sulfonated aliphatic and aromatic surfactants in sewage sludge by

- ion-pair/supercritical fluid extraction and derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **64**, 3161-3167 (1992).
- [17] Field J.A., Field T.M., Poiger T., Giger W. Determination of secondary alkane sulfonates in sewage wastewaters by solid-phase extraction and injection-port derivatization gas chromatography/mass spectrometry. *Environmental Science and Technology*, **28**, 497-503 (1994).
- [18] Krueger C.J., Field J.A. In-vial C18 empore disk elution coupled with injection port derivatization for the quantitative determination of linear alkylbenzenesulfonates by GC-FID. *Analytical Chemistry*, **67**, 3363-3366 (1995).
- [19] Aranda R., Burk R.C. Determination of a non-ionic surfactant by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography and on-line derivatization. *Journal of Chromatography A*, **829**, 401-406 (1998).
- [20] Sng M.T., Ng W.F. In-situ derivatisation of degradation products of chemical warfare agents in water by solid-phase microextraction and gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, **832**, 173-182 (1999).
- [21] Koziel J., Hnoah J., Pawliszyn J. Field sampling and determination of formaldehyde in indoor air with solid-phase microextraction and on-fiber derivatization. *Environmental Science and Technology*, **35**, 1481-1486 (2001).
- [22] Reisen F., Aschmann S.M., Atkinson R., Arey J. Hydroxyaldehyde products from hydroxyl radical reactions of z-3-hexen-1-ol and 2-methyl-3-buten-2-ol quantified by SPME and API-MS. *Environmental Science and Technology*, **37**, 4664-4671 (2003).
- [23] Ouyang G., Pawliszyn J. SPME in environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**, 1059-1073 (2006).
- [24] Risticvic S., Niri V.H., Vuckovic D., Pawliszyn J. Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**, 781-795 (2009).
- [25] Namieśnik J., Gorlo D., Wolska L., Zygmunt B. Analysis of selected gaseous organic micro-pollutants in air by means of solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Calibration Problems*, **26**, 170-174 (1998).
- [26] Isidorov V., Purzynska A., Modzelewska A., Serowiecka M. Distribution coefficients of aliphatic alcohols, carbonyl compounds and esters between air and Carboxen/polydimethylsiloxane fiber coating. *Analytica Chimica Acta*, **560**, 103-109 (2006).
- [27] Jiménez A., Beltrán G., Aguilera M.P. Application of solid-phase microextraction to the analysis of volatile compounds in virgin olive oils. *Journal of Chromatography A*, **1028**, 321-324 (2004).
- [28] Deng C., Li N., Zhang X. Development of headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for determination of hexanal and heptanal in human blood. *Journal of Chromatography B*, **813**, 47-52 (2004).
- [29] Deng C., Zhang X., Li N. Investigation of volatile biomarkers in lung cancer blood using solid-phase microextraction and capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, **808**, 269-277 (2004).
- [30] Luo X.P., Yazdanpanah M., Bhooi N., Lehotay D.C. Determination of aldehydes and other lipid peroxidation products in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry*, **228**, 294-298 (1995).

- [31] Wardencki W., Sowinski P., Curylo J. Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, **984**, 89-96 (2003).
- [32] Sowinski P., Wardencki W., Partyka M. Development and evaluation of headspace gas chromatography method for the analysis of carbonyl compounds in spirits and vodkas. *Analytica Chimica Acta*, **539**, 17-22 (2005).
- [33] Carlton W.K., Gump B., Fugelsang K., Hasson A.S. Monitoring acetaldehyde concentrations during micro-oxygenation of red wine by headspace solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 5620-5625 (2007).
- [34] Tsai S-W., Chang C-M. Analysis of aldehydes in water by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Journal of Chromatography A*, **1015**, 143-150 (2003).
- [35] Hudson E.D., Okuda K., Ariya P.A. Determination of acetone in seawater using derivatization solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **388**, 1275-1282 (2007).
- [36] Tsai S-W., Chang T-A. Time-weighted average sampling of airborne *n*-valeraldehyde by a solid-phase microextraction device. *Journal of Chromatography A*, **954**, 191-198 (2002).
- [37] Martos P.A., Pawliszyn J. Time-weighted average sampling with solid-phase microextraction device: Implications for enhanced personal exposure monitoring to airborne pollutants. *Analytical Chemistry*, **71**, 1513-1520 (1999).
- [38] Jacek A.K., Japheth N., Janusz P. Field sampling and determination of formaldehyde in indoor air with solid-phase microextraction and on-fiber derivatization. *Environmental Science and Technology*, **35**, 1481-1486 (2001).
- [39] Martos P.A., Pawliszyn J. Sampling and determination of formaldehyde using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization. *Analytical Chemistry*, **70**, 2311-2320 (1998).
- [40] Liu H., Dasgupta P.K. Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Analytical Chemistry*, **68**, 1817-1821 (1996).
- [41] Jeannot M.A., Cantwell F.F. Solvent microextraction into a single drop. *Analytical Chemistry*, **68**, 2236-2240 (1996).
- [42] Fiamegos Y.C., Stalikas C.D. Theoretical analysis and experimental evaluation of headspace in-drop derivatisation single-drop microextraction using aldehydes as model analytes. *Analytica Chimica Acta*, **599**, 76-83 (2007).
- [43] Pillai A.K.K.V., Gautam K., Jain A., Verma K.K. Headspace in-drop derivatization of carbonyl compounds for their analysis by high-performance liquid chromatography-diode array detection. *Analytica Chimica Acta*, **632**, 208-215 (2009).
- [44] Psillakis E., Kalogerakis N. Developments in liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 565-574 (2003).
- [45] Blasco C., Fernández M., Picó Y., Font G. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1030**, 77-85 (2004).

- [46] Qin Z., Bragg L., Ouyang G., Pawliszyn J. Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions. *Journal of Chromatography A*, **1196-1197**, 89-95 (2008).
- [47] Bruheim I., Liu X., Pawliszyn J. Thin-film microextraction. *Analytical Chemistry*, **75**, 1002-1010 (2003).
- [48] Prosen H., Zupancic-Kralj L. Solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, **18**, 272-282 (1999).
- [49] Montgomery Douglas C. Diseño y análisis de experimentos. *Grupo Editorial Iberoamérica* (1991).
- [50] UNE-77260-3:2004, “Aire de interiores. Parte 3: Determinación de formaldehído y otros compuestos carbonílicos. Método de muestreo activo” *Asociación Española de Normalización y Certificación*, Madrid (2004).
- [51] Miller J., Miller J. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 4th Edition, *Pearson Education Limited, Publisher: Prentice Hall*, Inglaterra (2000).



Capítulo V

*Compuestos carbonílicos en el humo utilizado para el
ahumado de alimentos*

V.1. INTRODUCCIÓN

Mediante procesos complejos, como la fotosíntesis, los vegetales producen numerosos productos entre los que se encuentran los hidratos de carbono, que son necesarios para que las plantas sobrevivan y crezcan. Los hidratos de carbono más importantes y conocidos son los azúcares, el almidón y la celulosa, siendo los más sencillos los azúcares simples o monosacáridos, los cuales contienen un grupo aldehído o cetona. La unión de moléculas de monosacáridos puede conducir a la formación de polisacáridos, polímeros entre los que se encuentran la celulosa y la hemicelulosa que son los principales elementos estructurales de las plantas. En el caso concreto de la celulosa, su estructura está formada por entre 100 y 200 unidades de monosacáridos, siendo esencial, entre ellos, la glucosa.

Los monosacáridos más frecuentes, la glucosa y fructosa, son un aldehído y una cetona, respectivamente, con seis átomos de carbono, que pueden encontrarse como estructuras lineales. Sin embargo, también pueden transformarse en estructuras cíclicas de seis y cinco miembros, respectivamente, como se muestra en el esquema de la Figura V.1.

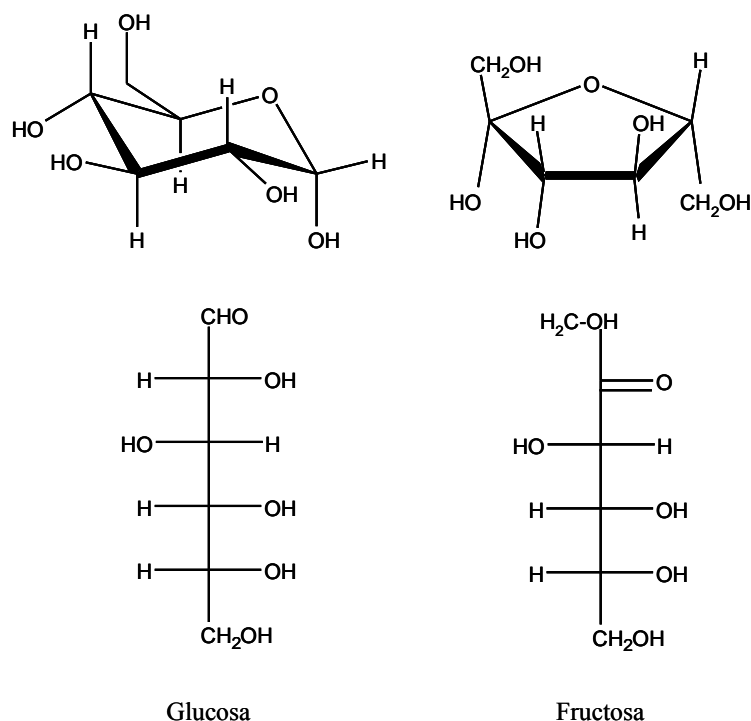


Figura V.1. Estructuras cíclicas y lineales de la glucosa y de la fructosa.

La complejidad de las emisiones procedentes de la quema de vegetación comienza por la diversidad de los componentes de los árboles. La celulosa, que es el mayor de los constituyentes, significa alrededor del 50% en peso de la madera. Como se ha dicho, consiste en una gran cadena de polímeros compuesta de unidades de glucosa. La lignina, que tiene una estructura molecular mucho más compleja que la celulosa, supone entre el 23 y el 33% en las maderas blandas, entre un 16 y un 25% en las maderas duras y más de un 65% en las maderas muertas. La hemicelulosa pertenece a la familia de los polisacáridos y constituye entre un 15 y un 30% de la madera, dependiendo de la especie [1-6].

Aunque la composición de los restos procedentes de distintas especies vegetales presenta similitudes considerables, en cuanto a los componentes químicos presentes, al ser sometidos a combustión, otros muchos factores influyen de forma considerable en la composición de los gases y de la materia particulada que constituyen el humo y la llama [7]. El tamaño de los fragmentos y su humedad o el contenido de oxígeno y la temperatura que se alcanza durante la combustión, son variables que influyen de forma considerable en las emisiones [7]. Al calentar la madera ocurren distintos tipos de reacciones: hidrólisis, oxidación, deshidratación etc. [8]. En el caso de la celulosa, a temperaturas $< 300^{\circ}\text{C}$ se producen procesos de descomposición incluyendo la despolimerización y fragmentación que conducen a la formación de cadenas hidrocarbonadas, mientras que a temperaturas superiores la rotura de enlaces facilita la formación de productos volátiles, entre los que se encuentran aldehídos y cetonas [9-12].

V.1.1. COMPUESTOS CARBONÍLICOS PRODUCIDOS EN LA COMBUSTIÓN DE RESTOS VEGETALES

Muchos de los estudios relacionados con la presencia de compuestos carbonílicos se refieren a su presencia en aires interiores [13,14], asociados al humo de tabaco [15,16] o a las emisiones procedentes de materiales sintéticos utilizados para la fabricación de muebles y objetos destinados a distintos usos en cuya fabricación se han empleado adhesivos, tintes, resinas, etc. [17].

Sin embargo, resulta evidente que, en atención a la finalidad de este capítulo, los antecedentes más importantes serían los relacionados con la combustión de restos vegetales. No conocemos estudios sobre la presencia de compuestos carbonílicos en los procesos de

combustión de biomasa relacionados, específicamente, con la utilización del humo en el ahumado de alimentos. No obstante, la combustión de la madera domina la contaminación del aire, ejerciendo una influencia considerable en el clima y efectos perjudiciales en la salud, existiendo numerosos estudios relacionados sobre todo con la pirólisis y con la combustión de la madera, que aportan información acerca del humo que se obtiene [18-21]. Sin embargo, son poco conocidos los procesos químicos que controlan dichos fenómenos, a pesar de que los datos obtenidos en tal sentido serían de gran utilidad para el desarrollo de modelos de interés medioambiental y del clima.

La combustión de la madera es una de las fuentes dominantes de la contaminación del aire en el mundo [22-24]. Aparte de los fuegos accidentales o provocados en importantes masas forestales, comunes en todo el mundo, también la eliminación de restos vegetales provocan efectos negativos importantes en el medio ambiente [25]. En otro orden de cosas, millones de personas dependen de combustibles sólidos como fuente primaria de energía doméstica. Esta situación se extiende desde países con elevado grado de desarrollo, como Suecia, hasta otros, principalmente en África y Asia, en los que constituyen combustibles habituales para la cocción de alimentos y calefacción, utilizando sistemas que, en muchos casos, son muy poco eficaces en cuanto al aprovechamiento de la biomasa, y de los que se liberan contaminantes potenciales del aire como: materia particulada, monóxido de carbono, benceno, 1,3-butadieno, aldehídos, HAPs y muchos otros compuestos orgánicos tóxicos [26,18-21].

Ya hemos comentado que la composición de las emisiones procedentes de la combustión de la madera dependen de numerosos factores relacionados con el tipo de madera, dura o blanda, variedad y características, como el tamaño de las porciones sometidas a combustión y el grado de humedad, así como con el lugar o dispositivo en el que se realiza la combustión, que condiciona entre otros parámetros el contacto combustible-comburente, o la proporción entre ambos.

En atención a lo expuesto, es habitual que se presente una considerable variabilidad en los contenidos de compuestos carbonílicos presentes en el humo, incluso cuando las muestras procedan de un mismo tipo de material [20,21,27-33]. Al referirnos a antecedentes bibliográficos, acerca de la presencia de aldehídos y cetonas en muestras de humo que tienen su origen en la combustión de restos vegetales, sólo vamos a referirnos a algunos ejemplos representativos, correspondientes a estudios relacionados con procesos de combustión en

condiciones equivalentes a las que se utilizan para la calefacción doméstica [34,35], y a casos puntuales en los que se provoca la combustión de un tipo de vegetal específico, como sucede con el incienso, utilizado principalmente en templos y hogares en China e India, en rituales rutinarios diarios [36-39]. También nos referiremos a datos obtenidos mediante estudios efectuados con procesos de pirólisis, cuyas conclusiones estimamos de interés al realizarse en condiciones que permiten actuar sobre las variables experimentales que controlan el proceso de destrucción de los vegetales por el calor [29].

Compuestos carbonílicos producidos por pirólisis de madera

Entre los factores que influyen en la composición química de las muestras de humo y, por tanto, en sus características organolépticas, la temperatura del proceso es uno de los más importantes [40,41]. No obstante, los resultados obtenidos en varios estudios realizados para establecer la influencia de esta variable en la composición del humo, han sido contradictorios.

Por otra parte, con independencia del rendimiento en cuanto al nivel de concentraciones totales en los componentes del humo, algunos autores [41] han aportado información a partir de la que se puede concluir que las mejores características organolépticas de los humos se obtienen cuando la temperatura de transformación de la madera es de 400°C. No obstante, ha de tenerse en cuenta que el proceso pirolítico no ocurre a una temperatura constante y que, como es conocido, durante la degradación térmica de la madera se produce un proceso endotérmico de liberación de agua (120 - 150°C) y reacciones exotérmicas de degradación, a diferentes temperaturas, de la hemicelulosa (200 - 250°C), celulosa (280 - 320°C) y lignina (400°C) [42].

Al someter a pirólisis muestras de serrín de brotes de viña [42], se demuestra que el contenido de los compuestos que contribuyen al aroma de los humos, es altamente dependiente de la temperatura máxima que se alcance en el proceso de generación del humo, estableciendo que a 500°C se obtiene un rendimiento óptimo del total de compuestos, y que el valor más adecuado de la temperatura depende, entre otros factores, de la naturaleza de la madera. Además, la temperatura de combustión tiene una influencia diferente en la liberación de componentes pertenecientes a distintas familias, encontrándose los compuestos carbonílicos entre los más afectados por la temperatura de pirólisis.

Durante la pirólisis de distintos tipos de madera, se forma una amplia distribución de compuestos orgánicos oxigenados, entre los que destacan: aldehídos, ácidos, cetonas, furanos y fenoles metoxilados. Sin embargo, la composición del humo depende considerablemente de la naturaleza de la madera [43]. Así, al comparar los cromatogramas de muestras de humo obtenidas por pirólisis de ocho especies diferentes de abedul con estudios realizados con maderas de pino y otras, se pone de manifiesto que a partir de abedul se forman cantidades significativamente mayores de compuestos con pesos moleculares comprendidos entre 60 - 130 uma, mientras que si se utilizan coníferas, se obtienen más picos cromatográficos para compuestos con un peso molecular por encima de 200 uma.

Las emisiones de compuestos orgánicos producidos por pirólisis de muestras de madera de distinto tipo son, en general, muy complejas. Estudios realizados con la utilización de madera de abeto y pino [29], ponen de manifiesto que la distribución exacta de los compuestos producidos es dependiente de condiciones experimentales, como el tamaño de partícula, temperatura y tiempo. Aunque estas dependencias han sido demostradas también en otros trabajos [44], en la pirólisis de abeto y pino se han encontrado, además, que existen diferencias que pueden estar relacionadas con la naturaleza de los materiales comparados, aunque pueden estar motivadas por las condiciones experimentales en las que se realizan las experiencias.

En cuanto a la naturaleza de los compuestos liberados por pirólisis a 550°C de madera de distintas variedades de pino y abeto, se ha puesto de manifiesto que se liberan grandes cantidades de compuestos orgánicos oxigenados: aldehídos, ácidos, cetonas y fenoles metoxilados [29]. De acuerdo con el análisis específico de aldehídos, la cantidad de formaldehído es alrededor de un factor de 2 - 3 veces mayor que la cantidad de acetaldehído.

La elevada cantidad de aldehídos y cetonas tóxicos hallados en todas las muestras, tanto de abetos como de pino, demuestra la importancia de los problemas asociados a la incompleta combustión de biomasa y que estos compuestos orgánicos oxigenados merecen más atención en la valoración del impacto del humo en la atmósfera [29].

Compuestos carbonílicos producidos por combustión de madera

Como se ha comentado anteriormente, sólo nos referiremos a datos representativos de

estudios realizados en relación con la presencia de aldehídos y cetonas en muestras de humo que tienen su origen en la combustión de restos vegetales, en hogares domésticos o recintos cerrados.

Haciendo uso de madera de árboles de pino, una conífera, y de árboles de hoja caduca, como el roble y el eucalipto, se han determinado el balance de masas y los contenidos individuales de compuestos orgánicos volátiles, compuestos orgánicos semivolátiles y compuestos en fase particulada, producidos en la combustión de madera en chimeneas residenciales [30].

En la combustión de madera de pino, de los 14.9 g/kg de compuestos orgánicos identificados, 4.1 g/kg corresponden a aldehídos alifáticos. Como muestran los resultados agrupados en la Tabla V.1, los mayores contribuyentes a la fase gas de las emisiones de compuestos orgánicos, son los aldehídos alifáticos, que alcanzan hasta el 27.5% de los compuestos orgánicos identificados, mientras que las cetonas alifáticas se aproximan al 6.5%. Cuando la madera de pino es sustituida por madera de roble o eucalipto, como combustible, las aportaciones de aldehídos y cetonas alifáticas a la fase gas del humo se reducen considerablemente.

Tabla V.1. Contenidos totales de aldehídos y cetonas alifáticas en la fase gas procedentes de la combustión de maderas de distinto tipo [30].

Material	Aldehídos alifáticos (g/kg)	Cetonas alifáticas (g/kg)
Pino	4.10	0.96
Roble	2.05	0.58
Eucalipto	2.65	-

Las concentraciones halladas para los compuestos carbonílicos, considerados individualmente, se encuentran en la Tabla V.2. En general, los compuestos carbonílicos de bajo peso molecular, como el glioxal, acetona, formaldehído y acetaldehído, son los compuestos carbonílicos que se emiten en mayores concentraciones. Estos compuestos proceden mayoritariamente de la descomposición por combustión de la celulosa [45].

Aunque con concentraciones considerablemente diferentes, los compuestos

carbonílicos mayoritarios en los gases producidos en la combustión de los tres tipos de madera mencionados suelen coincidir. El acetaldehído es el componente mayoritario, seguido del formaldehído, con concentraciones comprendidas entre 0.6 y 1.7 g/kg de madera quemada. Entre los derivados con concentraciones ligeramente inferiores se encuentran compuestos con dos grupos carbonílicos, como el glioxal y metilglioxal, y cetonas alifáticas, como la acetona. En un tercer grupo, se situarían otros aldehídos alifáticos y olefínicos, como hexaldehído, heptaldehído, propionaldehído y crotonaldehído, así como la 2-butanona. En general, para los distintos derivados analizados, las menores concentraciones suelen corresponder a los aldehídos y cetonas aromáticas.

Tabla V.2. Contenidos (mg/kg) de aldehídos y cetonas alifáticas en la fase gas procedentes de la combustión de maderas de distinto tipo [30].

Compuesto	Material		
	Pino	Roble	Eucalipto
Formaldehído	1165	759	599
Acetaldehído	1704	823	1021
Acroleína	63	44	56
Acetona	749	462	79
Propionaldehído	255	153	155
Crotonaldehído	276	177	198
2-Butanona	215	115	77
Butiraldehído	96	62	31
Benzaldehído	49	16	21
<i>p</i> -tolualdehído	12	-	27
Hexaldehído	418	90	189
Heptaldehído	419	77	626
Glioxal	670	439	616
Metilglioxal	943	321	520

Como ejemplo de combustión de restos vegetales en recintos interiores, el incienso es quemado de forma rutinaria en domicilios, templos, dependencias comerciales, etc., en los países asiáticos. En un estudio encaminado a identificar las especies carbonílicas mayoritarias procedentes de la combustión de incienso y presentes en una habitación de 30 m² [39], se

encontró que entre los aldehídos y cetonas formados, el formaldehído era el más abundante, suponiendo un 57% del total de compuestos carbonílicos, seguido en orden decreciente por el acetaldehído y la acroleína con una contribución media del 9%. En cuanto a las concentraciones halladas, la correspondiente al formaldehído es 103 ppbv, seguido de metilglioxal, 2-furfural, acetaldehído y acroleína, con concentraciones comprendidas entre 14.1 y 16.8 ppbv, siendo el benzaldehído y el glioxal los que presentan menores concentraciones, con valores de 5.8 y 7.7 ppbv, respectivamente.

Existen una gran variedad de formulaciones para obtener incienso, resultantes de la mezcla de distintas variedades vegetales. Lee y Lin [34] han comparado, en cuanto a los contenidos de compuestos carbonílicos, los resultados obtenidos en las emisiones procedentes de la combustión, en una cámara a través de la que se hace pasar un flujo controlado de aire limpio, de polvo de incienso obtenido a partir de quince variedades vegetales diferentes y bambú molido. En el humo formado encuentran formaldehído, acetaldehído, acroleína, propionaldehído y butiraldehído. La cantidad de aldehídos alifáticos, y principalmente de formaldehído, aumenta cuando el incienso se mezcla con bambú, demostrando que este último es una fuente mayor de aldehídos alifáticos.

Los contenidos totales de aldehídos, obtenidos a partir de los quince materiales vegetales utilizados para obtener el polvo de incienso, varían entre 3.0 y 11.1 mg/g de material quemado. Para los aldehídos individuales, los rangos de concentración hallados son; 0.1 a 7.3 mg/g para el formaldehído, 0.9 a 2.7 mg/g para el acetaldehído, 1.0 a 2.3 mg/g para la acroleína, 0.2 a 0.8 mg/g para el propionaldehído y 0.1 a 1.7 mg/g para el butiraldehído. Por otra parte, en un estudio realizado para comparar la naturaleza y cantidad de contaminantes emitidos al aire por tres tipos diferentes de incienso [36], se ha establecido la presencia en el humo de los compuestos que se incluyen a continuación, cuyas concentraciones están comprendidas en el intervalo incluido entre paréntesis: formaldehído (0.55 - 1.26 mg/g), acetaldehído (0.69 - 0.94 mg/g), acetona (0.68 - 0.82 mg/g), acroleína (0.05 - 1.23 mg/g), propionaldehído (0.07 - 0.71 mg/g), metacroleína (0.10 - 0.23 mg/g), butiraldehído (0.07 - 0.34 mg/g) y valeraldehído (ND - 0.15 mg/g); poniéndose de manifiesto notables diferencias en las concentraciones e incluso en la secuencia de las mismas, en función del tipo de material.

En una cámara similar a la utilizada para establecer el contenido de compuestos carbonílicos en la fase gas, se han realizado estudios orientados a establecer las características

y la composición de la materia particulada formada en la combustión de incienso [38], estableciéndose que la distribución por tamaños de las partículas y las concentraciones dependen de las condiciones en las que el incienso es quemado. Por otra parte, también la concentración de partículas aumenta con la humedad relativa en la cámara de combustión y, para la mayoría de las variedades de incienso utilizadas, el diámetro máximo y el área máxima de las partículas aumenta con la humedad relativa.

Dicho estudio pone de manifiesto que la cantidad de aldehídos alifáticos hallados en las partículas depende del tamaño de las partículas y, además, que la acroleína, formaldehído y acetaldehído son adsorbidos predominantemente en partículas, especialmente en las de tamaño: 2.1 y 4.7 μm . Los resultados obtenidos muestran que la relación entre la fracción de masa de aldehído y el tamaño de las partículas varía con el tipo de incienso. La abundancia de aldehídos adsorbidos en las partículas sigue el siguiente orden: acroleína, formaldehído y acetaldehído. Sin embargo, en la fase gaseosa el formaldehído es también el compuesto predominante.

V.1.2. TRATAMIENTO DE DATOS

Una de las características de muchos trabajos con base analítica es el que aportan una gran cantidad de datos. Es consecuencia, por ejemplo, de la introducción en los laboratorios de metodologías de medida que utilizan técnicas de automatización y computarización, o de la necesidad de obtener información representativa de muestras complejas con una heterogeneidad considerable en su composición, que obliga a analizar un número elevado de muestras en las que se determina una variedad importante de analitos. En el trabajo que nos ocupa, al utilizar seis materiales distintos como combustibles para obtener el humo y al tener que efectuar un elevado número de procesos de combustión con cada material para asegurar la representatividad de los resultados y cuantificar 12 aldehídos y cetonas en cada muestra de humo, se generan centenares de datos de concentraciones.

Ahora bien, sabemos que, en ocasiones, disponer de un gran volumen de datos no garantiza el obtener respuestas adecuadas a los problemas planteados. Obtener muchos datos no es sinónimo de poseer información representativa. Debemos interpretarlos y colocarlos en el contexto adecuado para convertirlos en información útil para el usuario. Con tal finalidad ha surgido la Quimiometría.

En términos globales, la palabra Quimiometría quiere resumir un concepto que engloba la medida en química y, por tanto, guarda una estrecha relación con la práctica de Química Analítica. La Quimiometría trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos, más o menos complejos, en información. La Quimiometría utiliza métodos de origen matemático, estadístico y otros, procedentes del campo de la lógica formal, para conseguir sus fines. Por todo ello, la Quimiometría se sitúa en un campo interdisciplinar. Aunque sus métodos y herramientas provienen de otras disciplinas, los fines de la Quimiometría están ligados a la química y su éxito depende de los problemas químicos que sea capaz de resolver.

Ante un problema analítico como el referido al tratamiento de los datos obtenidos en las determinaciones de compuestos carbonílicos en las muestras de humo, nos puede interesar conocer:

- Si todo el conjunto de muestras es homogéneo o no y, en el caso que no lo sea, si existe alguna muestra particular, discrepante (outlier), o conjunto de muestras que se diferencien del resto.
- Si encontramos muestras características, es conveniente conocer cuáles de los parámetros analizados o variables son distintos del resto de las muestras.
- También interesa saber si la información contenida en alguna de las variables es suplementaria del resto de variables y, por tanto, si realizamos demasiado trabajo analítico, con el consiguiente gasto innecesario en tiempo y reactivos.

Este tipo de información se obtiene aplicando una serie de técnicas quimiométricas que se han denominado genéricamente como técnicas de reconocimiento de modelos, de formas, de pautas, etc. Concretamente, se aplican técnicas de agrupación o análisis de cluster y técnicas de representación. Estas últimas, tienen por finalidad representar cada una de las muestras u objetos, no en el espacio multidimensional de las variables medidas, sino en un espacio reducido que sea, como máximo, tridimensional. El secreto, claro está, consiste en trasladar la máxima información contenida en el espacio multidimensional original al espacio de dimensionalidad reducida. De la misma forma que una buena foto –que es bidimensional– conserva la información tridimensional de los aspectos retratados, las técnicas de representación han de hacer lo mismo con espacios de dimensionalidad elevada. De hecho, la capacidad de combinar adecuadamente las variables medidas, para formar otras nuevas

—denominadas variables latentes o factores— que contengan la información original, forma el núcleo de numerosas técnicas quimiométricas. Con ello se consigue extraer y representar información útil de un conjunto de datos multidimensionales (multivariante en lenguaje quimiométrico) que, sin duda, contiene la información original pero de forma muy poco transparente y accesible.

Finalmente, también en este campo, nos podría interesar conocer si alguna muestra nueva, obtenida en otro momento, o procedente de un combustible cuyo origen se desconoce, es parecida o no a las analizadas anteriormente. Las técnicas a aplicar ahora son las técnicas de clasificación y algunos métodos de este campo, como el Análisis Discriminante Lineal o el método SIMCA (soft independent modeling of class analogy), han adquirido cierta popularidad.

Siguiendo con el problema analítico anterior, supongamos ahora que nuestro interés se centra en relacionar la composición de las muestras con su origen. El objetivo que ahora se persigue es relacionar la matriz de datos formada por variables descriptoras de cada una de las muestras u objetos con otra matriz que contenga otro tipo de variables que describan el origen de las mismas.

La relación entre matrices se establece mediante una ecuación o modelo matemático. Como quiera que no suelen existir modelos que relacionen ambos tipos de matrices, es habitual que se construyan modelos ‘*ad hoc*’ que se adaptan a la estructura de los datos. Siendo así, es extremadamente importante que estos modelos sean válidos en el campo de trabajo establecido. La validación de los modelos es pues una etapa fundamental y nunca debe obviarse en Quimiometría.

Podemos estar interesados en dos tipos de informaciones que proporciona la parte determinista de los modelos. Por un lado en el valor de los coeficientes, que expresan la importancia de la relación entre las variables y, en muchos casos, explican el comportamiento de la variación existente en los datos. Sin embargo, con frecuencia, estamos interesados en el carácter predictivo de los modelos. El conjunto de técnicas que se utilizan para esta finalidad recibe el nombre de regresión multivariante. Entre ellas destacan algunas como la Regresión mediante Componentes Principales (PCR).

Un problema que aparece en el análisis multivariante es que el volumen bruto de los datos puede dificultar el reconocimiento de pautas y relaciones. Por tanto, el objetivo de

muchos métodos del análisis multivariante es la reducción de datos. Como se ha dicho anteriormente, con frecuencia se presenta cierta correlación entre las variables, de manera que algo de información resulta redundante. El análisis de componentes principales es una técnica para reducir la cantidad de datos cuando está presente la correlación.

En la base de esta técnica se encuentra la generación de un nuevo conjunto de variables, a partir de las variables originales, de manera que la primera componente principal recoge la mayor parte de la variación que hay en el conjunto de datos, la segunda recoge la siguiente mayor parte de la variación y así sucesivamente. Por consiguiente, cuando haya correlación significativa, el número de componentes principales útiles es mucho menor que el número de variables originales. De esta forma, en el trabajo quimiométrico a realizar, se intenta identificar un pequeño número de factores que explique la mayor parte de la varianza aportada por un número mayor de variables manifiestas. De esta forma, puede considerarse que el análisis de componentes principales es una técnica estadística que se basa en establecer variables, que habitualmente se conocen como componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales que describen cada muestra.

La información obtenida mediante el análisis de componentes principales, permite establecer tendencias acerca del agrupamiento de las muestras y sobre el peso relativo de las variables representadas por las concentraciones de los compuestos carbonílicos seleccionados. Ahora bien, la información obtenida puede ser poco concluyente, por lo que es conveniente optar por técnicas complementarias.

Los métodos comentados y sus variantes, ayudan a establecer si los objetos forman grupos, incluso cuando no se sabe a priori si existe dicha tendencia. Al contrario de dichos métodos, conocidos como métodos de reconocimiento de pautas no supervisados, existen otros, conocidos como de reconocimiento de pautas supervisados, en los que mediante un conjunto de objetos cuya pertenencia a un grupo es conocida, se obtiene una regla o modelo que luego se utiliza para asignar nuevos objetos desconocidos al grupo correcto. Estaríamos en el caso, por ejemplo, del análisis discriminante lineal, en el que se trata de encontrar una función que sea combinación de las variables originales, de forma que las n medidas originales realizadas para cada objeto se combinan en un único valor de la función. Los coeficientes de los términos que definen la función discriminante reflejarán las diferencias entre los grupos, de manera que los objetos incluidos en un mismo grupo tendrán valores similares de la función [46-48].

V.1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha indicado en la Introducción General de la tesis, uno de los objetivos centrales es contribuir a la caracterización química de las muestras de humo utilizadas habitualmente en Canarias para el ahumado de alimentos. Entre las familias de compuestos que contribuyen a proporcionar propiedades organolépticas y antimicrobianas al humo, aunque también pueden aportar un cierto grado de toxicidad, se encuentran los compuestos carbonílicos.

En el desarrollo del trabajo hemos de tener en cuenta:

- Que en islas con tradición en las prácticas de ahumado del queso de cabra, como La Palma, La Gomera y El Hierro, se utilizan restos vegetales de distinta naturaleza como combustibles para obtener el humo necesario. Con objeto de obtener información, que pueda considerarse representativa, en la realización de este trabajo se han tomado en consideración seis tipos de materiales: maderas de pino, jara y brezo, acículas de pino, pencas de tunera seca y cáscaras de almendra.
- Que, en atención al conocimiento disponible acerca de la composición del humo obtenido en la combustión de biomasa vegetal, para establecer el contenido de compuestos carbonílicos en el humo obtenido a partir de los distintos combustibles, se han seleccionado un conjunto de aldehídos y cetonas entre los que se encuentran los siguientes: formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona, propionaldehído, crotonaldehído, 2-butanona + butiraldehído, benzaldehído, valeraldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído.
- Que la composición en compuestos carbonílicos de las muestras de humo, no sólo depende de la naturaleza del material empleado como combustible, sino de las condiciones en que se realiza la combustión y del dispositivo empleado. Por otra parte, entre los condicionantes impuestos por la naturaleza de la información analítica que queremos aportar, se encuentra el respetar la tradición artesanal en el ahumado del queso en Canarias, consistente en realizar la combustión en condiciones no controladas. En consecuencia, para conseguir resultados que puedan garantizar una cierta representatividad, es necesario analizar un alto número de muestras de humo.

Atendiendo a la finalidad principal del capítulo y de las consideraciones que se acaban de realizar, con el trabajo a efectuar esperamos no sólo conseguir una adecuada caracterización de los distintos tipos de humo, en cuanto a su contenido en compuestos carbonílicos, sino que estos datos permitan diferenciar entre muestras de humo, atendiendo a la naturaleza de los restos vegetales utilizados como combustibles. De esta forma, podría disponerse de una información valiosa, no sólo para una adecuada selección de los materiales que podrían aportar mejores características a los productos ahumados, sino para ir estableciendo las bases para que en un futuro, más o menos próximo, se pueda identificar el material de procedencia de distintas muestras de humo, es decir, la naturaleza de los restos vegetales empleados para el ahumado de un alimento, con las consiguientes repercusiones en la posible identificación de fraudes comerciales o de apoyo a las Denominaciones de Origen de productos ahumados.

V.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

V.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Los compuestos carbonílicos empleados en este estudio son los mismos que los descritos en el apartado II.2.1.

Los compuestos carbonílicos individuales y el compuesto 2,4-dinitrofenilhidracina, usado como agente derivatizante, están descritos en el apartado II.2.1.

Los disolventes empleados en la preparación de las disoluciones y en el análisis cromatográfico vienen descritos en el apartado II.2.1.

Los materiales utilizados para la obtención de humos han sido: maderas de pino canario (*Pinus canariensis*), jara (*Cistus monspeliensis*) y brezo (*Erica arborea*), acícula de pino canario, penca de tunera (*Opuntia ficus indica*) y cáscara de almendra (*Prunus dulcis*), Figura V.2. Estos materiales han sido recogidos directamente en sus lugares de origen y utilizados sin tratamiento alguno, excepto la adecuación de su tamaño a trozos pequeños para poder ser quemados en cápsulas de porcelana.

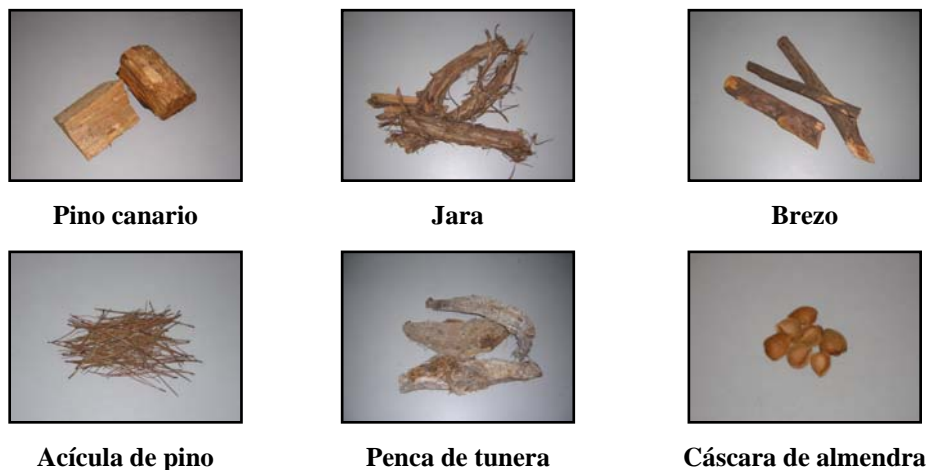


Figura V.2. Materiales vegetales utilizados como combustibles para la obtención de humo en los procesos de ahumado de quesos canarios.

V.2.2. EQUIPOS

Los equipos y el material necesarios para llevar a cabo los muestreos del humo

procedente de la combustión de biomasa son los mismos que los descritos en el apartado *III.2.2*.

El sistema de HPLC empleado para analizar las muestras de humo es el que se describe en el apartado *III.2.2*, para el estudio de las calibraciones.

Para el tratamiento estadístico de los datos, se usaron los softwares Statgraphics plus para Windows V. 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA) y SPSS V. 15.0 (SPSS Inc., Chicago, USA).

V.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Preparación de las disoluciones patrón y de la DNPH

Para preparar las disoluciones patrón de la curva de calibración se parte de las disoluciones madre e intermedia descritas en el apartado *III.2.3*.

Las disoluciones de DNPH se prepararon diariamente de igual forma a la descrita en el apartado *III.2.3*.

Procedimientos de calibración

El procedimiento de calibración se llevó a cabo mediante la derivatización, en tubos colectores de gases, de los compuestos carbonílicos en estado gaseoso según el procedimiento descrito en el apartado *III.2.3*. El desarrollo y los parámetros de calidad de este procedimiento, denominado calibrado tipo TC, se describen en los apartados *III.3.4* y *III.3.5*.

Muestreo del humo

Con objeto de obtener el humo procedente de la combustión de biomasa, cantidades pequeñas de los materiales vegetales, en piezas menudas, se quemaron en una cápsula de porcelana y después de obtener la llama, ésta se extinguió pulverizando agua sobre ella.

El sistema de muestreo es el que se representa en la Figura IV.4. El humo procedente de la combustión de biomasa se recoge en un tubo colector de gases de 250 mL con ayuda de una bomba de muestreo.

Una vez que el tubo colector se llena con el humo muestreado, se cierran las llaves y la temperatura se mantiene con una cinta eléctrica a unos 58 - 60°C durante 9 minutos, como se muestra en la Figura V.3. Para la reacción de derivatización, se inyectaron en el tubo colector, a través de un septum, 10 mL de una disolución de DNPH que contenía un 0.5% (p/v) y un 5% (v/v) de HCl 0.1M. Esta disolución se mantuvo en el interior del tubo colector durante 30 minutos como tiempo de reacción. La disolución resultante con los compuestos carbonílicos derivatizados tuvo que ser centrifugada durante 5 minutos a 4000 rpm y, finalmente, una alícuota de la misma fue inyectada en el sistema cromatográfico para su análisis.

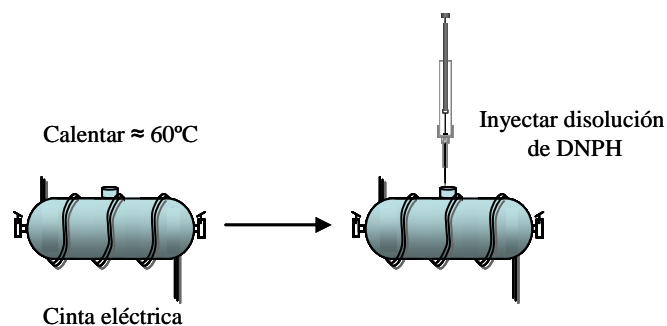


Figura V.3. Procedimiento para la derivatización de los compuestos carbonílicos presentes en muestras de humo procedente de la combustión de biomasa.

Análisis por HPLC-UV

El método de HPLC usado para la separación y detección de los compuestos carbonílicos derivatizados es el que está descrito en el apartado II.2.3.

V.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El contenido en compuestos carbonílicos en el humo producido por combustión incompleta de restos vegetales, se ha establecido en un total de ochenta y tres muestras; 14 de madera de pino, 14 de acícula de pino, 12 de madera de jara, 13 de madera de brezo, 12 de penca de tunera y 18 de cáscara de almendra. Para las determinaciones, se han utilizado procedimientos analíticos establecidos en el capítulo *III*, basados en la determinación por HPLC de las hidrazonas formadas al reaccionar los compuestos carbonílicos con la 2,4-dinitrofenilhidracina en medio ácido. El humo procedente de la combustión incompleta de los materiales se recoge en un tubo colector de gases de volumen conocido, en el que se realiza la reacción de derivatización. Con objeto de compensar de alguna manera los problemas asociados a la cinética y cuantitatividad de las reacciones de derivatización, que hemos comentado con anterioridad, los patrones de compuestos carbonílicos son sometidos a derivatización en condiciones experimentales similares a las empleadas para las muestras, es decir, siguiendo la metodología designada como TC en el capítulo *III*.

Como se acaba de comentar, entre los dos sistemas propuestos en el capítulo *III* para la toma de muestra, se ha seleccionado el que se basa en el uso de tubos colectores. La elección se fundamenta en la flexibilidad de este sistema para ser utilizado en diferentes lugares y situaciones. En el caso que nos ocupa, los ganaderos que emplean procesos artesanales de ahumado, suelen proceder a la quema de los restos vegetales en lugares aislados donde, en ocasiones, ni siquiera se dispone de electricidad. En esta situación, la utilización de cartuchos rellenos de fases estacionarias impregnadas con DNPH, alternativa habitual como sistema de toma de muestra, ofrece más inconvenientes que los tubos colectores.

Los compuestos carbonílicos a determinar se han escogido en base a experiencias previas. Los patrones utilizados en las determinaciones corresponden a derivados que se encuentran con frecuencia en muestras de humo. Se ha seleccionado un grupo de aldehídos alifáticos: formaldehído, acetaldehído, propionaldehído, butiraldehído, valeraldehído y hexaldehído, dos aldehídos olefínicos: acroleína y crotonaldehído, dos aldehídos aromáticos, benzaldehído y *p*-tolualdehído y dos cetonas: acetona y 2-butanona. Cromatogramas realizados con muestras reales de humo evidencian que, al menos, el 80% de los compuestos carbonílicos seleccionados son habituales en la composición de los mismos. En otro orden de

cosas, ya hemos comentado que la metodología optimizada no proporciona una resolución adecuada para las mezclas acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído que, en consecuencia, se determinarán como mezclas.

Con objeto de evaluar la sistemática a utilizar en el tratamiento de los resultados, se ha comparado, en términos estadísticos, la función de distribución de los resultados obtenidos con la teórica. En general, los resultados obtenidos ponen de manifiesto que las concentraciones correspondientes a cada uno de compuestos carbonílicos, en las muestras de humo procedentes de la combustión de cada tipo de material, no siguen una distribución normal, a un nivel de significación del 95%. Por consiguiente, se han utilizado métodos no paramétricos o de distribución libre en el tratamiento estadístico de los resultados. Como ejemplo, indicaremos que, en los grupos de datos que se tratan a continuación, se ha utilizado la mediana como medida de la tendencia central.

V.3.1. CONTENIDO DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN LOS HUMOS

En las muestras de humo analizadas, las concentraciones de los compuestos carbonílicos tomados en consideración varían en un intervalo que supera los mil mg/m³. Para un mismo derivado las diferencias son importantes, no sólo en el humo procedente de la combustión de distintos tipos de restos vegetales, sino incluso entre muestras obtenidas a partir de porciones diferentes de un mismo tipo de material, como comentaremos más adelante.

En las Tablas V.3A y V.3B se encuentra la concentración mediana, así como los valores mínimos y máximos de las concentraciones, establecidas para cada uno de los compuestos carbonílicos analizados en las muestras de humo procedentes de la combustión de los seis tipos de materiales empleados como combustibles. Al agrupar los distintos compuestos en estas tablas, se ha tenido en cuenta que entre los componentes cuantificados se pueden diferenciar dos grupos. En la Tabla V.3A, se han incluido aquellos aldehídos y cetonas cuyos contenidos en los humos procedentes de todos los materiales, considerados individualmente, representan un porcentaje que supera el cinco por ciento del total de los compuestos carbonílicos determinados en las muestras de humo, excepto algún caso puntual. Los restantes se encuentran en la Tabla V.3B.

Tabla V.3A. Concentraciones de compuestos carbonílicos mayoritarios en muestras de humo obtenidas por combustión de restos vegetales.

Compuesto	Material	Concentración (mg/m ³)		
		Mediana	Mínima	Máxima
For	Pino (n = 14)	416.9	99.7	1074.6
	Acícula de pino (n = 12)	50.3	22.3	225.4
	Jara (n = 12)	501.0	231.8	784.0
	Brezo (n = 13)	205.3	130.5	321.3
	Cáscara de almendra (n = 18)	119.0	77.3	185.3
	Penca de tunera (n = 12)	247.9	83.9	328.0
Ace	Pino	466.4	182.5	632.4
	Acícula de pino	484.1	51.3	804.9
	Jara	702.2	394.7	1185.0
	Brezo	481.4	196.3	931.0
	Cáscara de almendra	416.2	326.9	768.4
	Penca de tunera	1110.4	776.9	1679.8
Acr + Acet	Pino	756.1	361.7	1085.4
	Acícula de pino	364.4	73.7	623.0
	Jara	540.0	238.2	945.5
	Brezo	433.2	245.2	997.1
	Cáscara de almendra	425.6	300.5	743.3
	Penca de tunera	973.2	699.2	1790.9
Pro	Pino	121.4	43.7	186.4
	Acícula de pino	93.1	9.1	153.6
	Jara	125.1	68.9	190.3
	Brezo	98.3	57.9	252.7
	Cáscara de almendra	105.6	83.8	176.4
	Penca de tunera	303.4	219.1	367.6

Tabla V.3B. Concentraciones de compuestos carbonílicos minoritarios en muestras de humo obtenidas por combustión de restos vegetales.

Compuesto	Material	Concentración (mg/m ³)		
		Mediana	Mínima	Máxima
Cro	Pino	29.2	12.1	88.8
	Acícula de pino	28.5	4.9	65.0
	Jara	74.6	32.4	115.1
	Brezo	42.3	18.1	82.5
	Cáscara de almendra	32.9	18.1	41.5
	Penca de tunera	42.2	23.7	65.0
Buta + Buti	Pino	79.3	23.9	144.4
	Acícula de pino	44.9	11.0	73.3
	Jara	89.0	55.4	150.3
	Brezo	62.4	37.7	117.9
	Cáscara de almendra	62.1	43.5	138.5
	Penca de tunera	148.0	105.0	242.3
Ben	Pino	7.3	ND	18.6
	Acícula de pino	5.8	1.1	21.7
	Jara	3.7	ND	17.1
	Brezo	4.0	1.2	25.0
	Cáscara de almendra	4.4	ND	9.7
	Penca de tunera	ND	ND	3.4
Val	Pino	ND	ND	ND
	Acícula de pino	8.5	1.9	12.7
	Jara	7.8	5.5	13.6
	Brezo	3.0	ND	7.8
	Cáscara de almendra	3.0	ND	6.4
	Penca de tunera	30.3	20.6	45.1
Tol	Pino	248.0	25.3	800.9
	Acícula de pino	ND	ND	ND
	Jara	ND	ND	ND
	Brezo	ND	ND	ND
	Cáscara de almendra	ND	ND	ND
	Penca de tunera	ND	ND	ND
Hex	Pino	62.9	12.1	194.0
	Acícula de pino	1.9	ND	3.3
	Jara	ND	ND	ND
	Brezo	ND	ND	ND
	Cáscara de almendra	ND	ND	ND
	Penca de tunera	ND	ND	4.2

Composición global

En la Figura V.4 se han representado las medianas correspondientes a los contenidos totales de los compuestos carbonílicos cuantificados en el humo procedente de la combustión de los distintos materiales vegetales utilizados como combustibles en este trabajo. Para la obtención de las mismas, se ha hecho uso de los contenidos totales hallados, para cada una de las muestras de humo, por suma de las concentraciones establecidas para cada uno de los aldehídos y cetonas analizados.

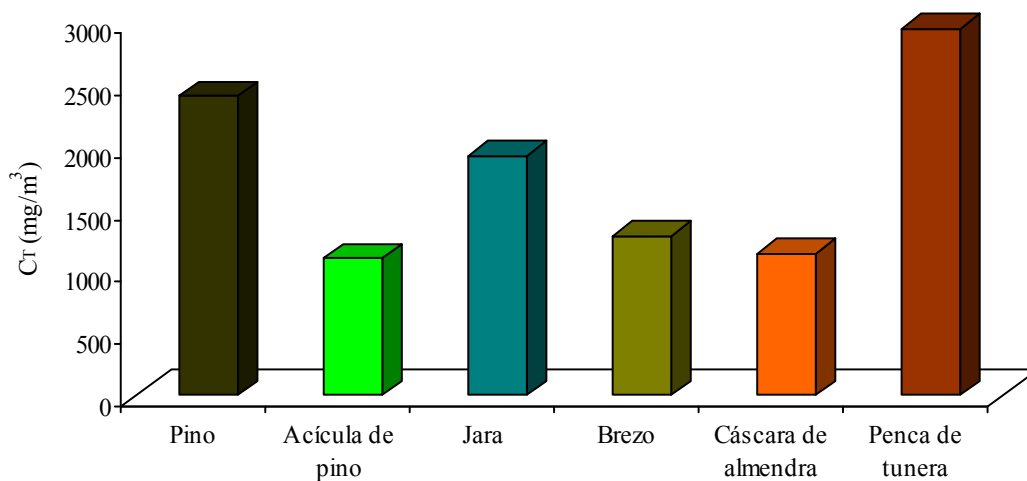


Figura V.4. Medianas representativas de las concentraciones totales de compuestos carbonílicos (C_T) presentes en los humos procedentes de la combustión de materiales vegetales.

Puede observarse que los contenidos totales de compuestos carbonílicos en el humo procedente de las maderas de pino y jara, así como de penca de tunera, son considerablemente superiores a los restantes. Cuando se usan estos materiales como combustibles, las medianas representativas de los contenidos totales de compuestos carbonílicos, alcanzan valores próximos a 2405, 1925 y 2944 mg/m^3 , respectivamente, mientras que los humos obtenidos a partir de la acícula de pino y de la cáscara de almendra presentan concentraciones inferiores, cercanas a 1097 y 1137 mg/m^3 , respectivamente. La mediana obtenida para el humo procedente de la madera de brezo es de unos 1280 mg/m^3 , ligeramente superior a la obtenida para los humos que se acaban de señalar, pero bastante menor que la representativa de los citados en primer lugar. En términos generales, puede diferenciarse entre materiales que proporcionan cantidades mayoritarias de compuestos carbonílicos: madera de pino y jara, penca de tunera, y otros como acícula de pino, madera de brezo y cáscara de almendra que, en

la combustión, liberan concentraciones menores de aldehídos y cetonas, aproximadamente la mitad de las emitidas por los primeros.

Con objeto de complementar la información aportada por los resultados expuestos, se ha realizado un estudio comparativo de resultados, con la utilización de gráficos del tipo “caja y bigotes”, como el que se muestra en la Figura V.5. En este tipo de gráfico, un esquema con forma de caja resume la información correspondiente a una o varias variables numéricas. La citada figura es representativa de los resultados obtenidos al sumar las concentraciones obtenidas para cada compuesto en el humo procedente de un material concreto, y muestra, para cada tipo de humo, la mediana de las concentraciones totales de compuestos carbonílicos, los cuartiles (25 - 75%), sus valores extremos (bigotes) y los posibles valores anómalos (outliers). Además de la información correspondiente a los resultados hallados para los contenidos totales de compuestos carbonílicos, en los humos representativos de los seis materiales utilizados como combustibles, el gráfico pone de manifiesto que los datos presentan una importante variabilidad y asimetría.

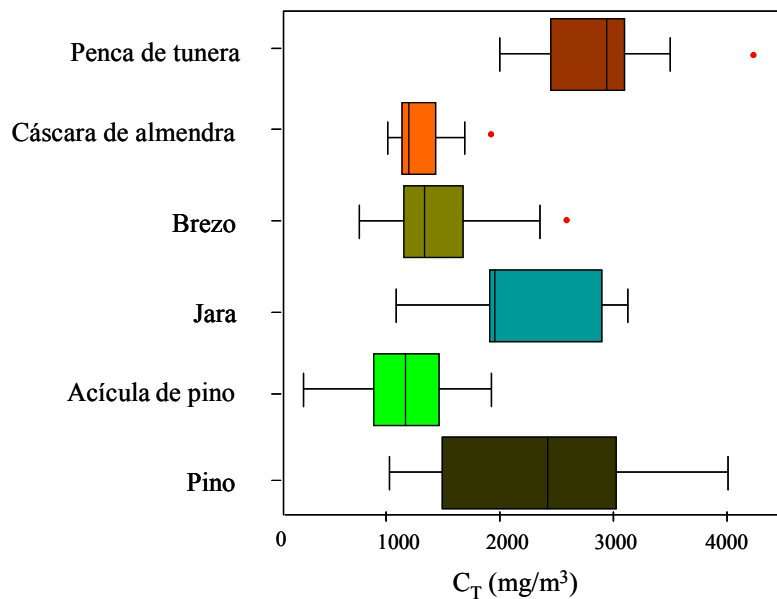


Figura V.5. Representación de tipo “caja y bigotes” para el contenido de compuestos carbonílicos presentes en el humo procedente de la combustión de restos vegetales de distinta naturaleza.

Al tomar en consideración la Figura V.5, se observa que, de forma prácticamente general, los datos representados se distribuyen de forma no simétrica en torno al valor de la

mediana, hecho que confirma la oportunidad de aplicar consideraciones de estadística no paramétrica en el tratamiento de los resultados. En general, la mediana representativa de cada grupo de resultados presenta valores que, en la mayoría de los casos, se encuentran en el cuartil inferior.

Por otra parte, la citada figura también pone de manifiesto la gran variabilidad existente entre los contenidos totales de compuestos carbonílicos en las muestras de humo procedentes de una misma fuente. La dispersión de resultados es especialmente importante en el caso del humo de madera de pino, con un intervalo intercuartílico de unos 1584 mg/m³. En sentido contrario, la menor dispersión corresponde a los resultados obtenidos para las muestras de humo procedentes de la combustión de cáscara de almendra, con un recorrido intercuartílico de 306 mg/m³. En general, la mayor variabilidad de resultados corresponde a los humos procedentes de los materiales que presentan mayores contenidos en compuestos carbonílicos, aunque no existe una relación directa entre la variabilidad y la concentración total representada por las respectivas medianas.

En atención a los valores de las medianas, se establece que el contenido total de compuestos carbonílicos de los humos disminuye, según el material usado como combustible, en el siguiente orden: penca de tunera > madera de pino > madera de jara > madera de brezo > cáscara de almendra > acícula de pino. Ahora bien, como se ha comentado anteriormente, los resultados correspondientes a las muestras individuales de un mismo material, nos indican que, incluso para un mismo tipo de humo, existe una variabilidad en las concentraciones que, en la mayoría de los casos, es importante. Esta dispersión de resultados se debe al escaso control que se puede imponer en las variables que controlan los procesos de combustión. En consecuencia, no se deben realizar generalizaciones en cuanto a la posibilidad de clasificar o diferenciar humos producidos por la combustión de restos vegetales diferentes, atendiendo únicamente al contenido total en compuestos carbonílicos. Sólo en casos extremos, como sucede con el humo procedente de restos de penca de tunera y de cáscara de almendra, la diferencia entre contenidos totales de compuestos carbonílicos es significativa, incluso teniendo en cuenta los valores extremos de concentración.

Ante la importante dispersión de los resultados, se ha recurrido a establecer, mediante consideraciones estadísticas, si existen diferencias significativas entre valores representativos de los grupos de resultados. Como quiera que, en general, las desviaciones estándar de dichos grupos difieren considerablemente y, además, los datos no siguen una distribución normal, se

ha utilizado el test de Kruskal-Wallis, apropiado para la comparación entre medianas. Los resultados obtenidos muestran que, a un nivel de confianza del 95%, las medianas representativas del humo obtenido a partir de las maderas de pino y de jara no presentan diferencias significativas, igual que sucede con las correspondientes a las muestras de acícula de pino, madera de brezo y cáscara de almendra, consideradas dos a dos.

Si la comparación se realiza entre intervalos intercuartílicos, los resultados son similares y es posible diferenciar el humo obtenido por combustión de penca de tunera y los emitidos a partir de cáscara de almendra, madera de brezo y acícula de pino, aunque no entre estos tres últimos. Por el contrario, entre el humo obtenido por combustión de penca de tunera y los emitidos por las maderas de pino y jara, no existen diferencias significativas.

Además, también es posible diferenciar entre los humos procedentes de la cáscara de almendra, acícula de pino y madera de brezo con respecto a los procedentes de la madera de jara y de pino.

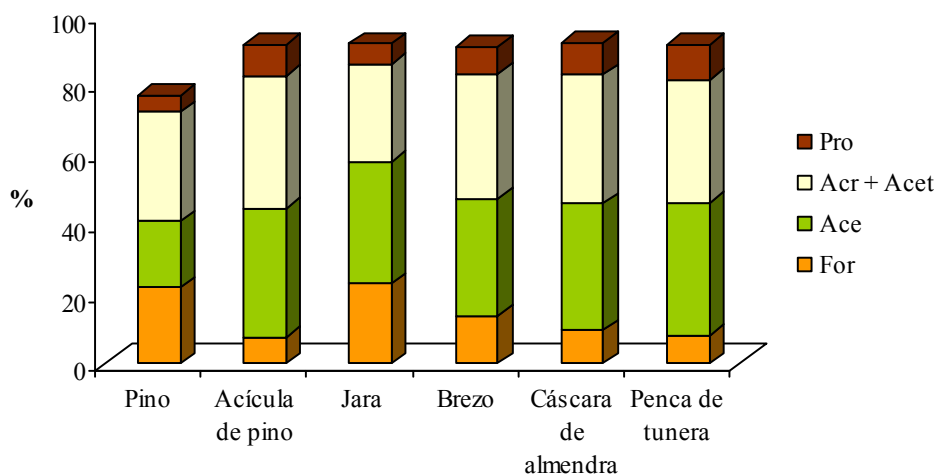
Componentes individuales

Los datos agrupados en la Tabla V.3A muestran que los compuestos carbonílicos más abundantes en los humos estudiados son: formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona y propionaldehído. La representación en la Figura V.6A de las medianas de los porcentajes acumulados de cada uno de estos compuestos respecto al total, en cada uno de los tipos de humo, pone de manifiesto que la aportación de estos aldehídos y cetonas al contenido total de compuestos carbonílicos varía entre el 90.7 y el 91.8% en los humos obtenidos por combustión de acícula de pino, maderas de jara y brezo, cáscara de almendra y penca de tunera, mientras que en el humo de madera de pino la aportación conjunta de los compuestos citados es de un 76.7%. Estos resultados podrían indicar que, en las condiciones en las que se realiza la combustión, los procesos de fraccionamiento molecular de los componentes presentes en los restos vegetales conducen a la formación preferente de los derivados con menor número de átomos de carbono, tanto de los aldehídos alifáticos y olefínicos, como de las cetonas.

Entre los componentes que hemos denominado minoritarios, el *p*-tolualdehído sólo se ha detectado en las muestras de humo de madera de pino, y el hexaldehído supone un

porcentaje inferior al 0.2% o no ha sido detectado en los distintos tipos de humos, excepto en el obtenido a partir de madera de pino. Para los restantes componentes minoritarios, como muestra la Figura V.6B, el crotonaldehído y la mezcla 2-butanona + butiraldehído suponen, en los distintos tipos de humo, entre un 5.2 y un 8.1%, porcentajes considerablemente superiores a los aportados por el benzaldehído y valeraldehído.

A



B

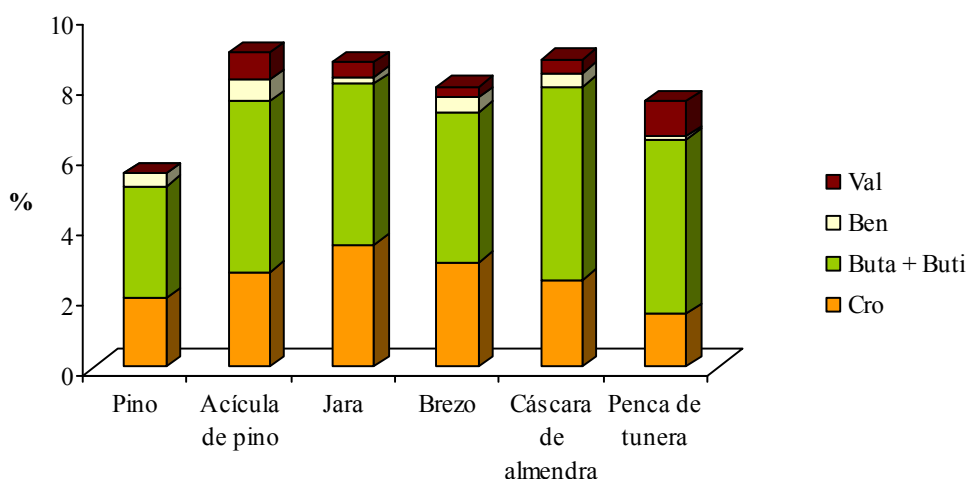


Figura V.6. Medianas de los porcentajes de aldehídos y cetonas en los humos procedentes de la combustión de restos vegetales. A: Componentes mayoritarios. B: Componentes minoritarios.

El caso del humo de la madera de pino es singular. Es el único para el que la mediana del porcentaje de formaldehído en el humo es mayor que la de acetaldehído, aunque las diferencias más significativas se encuentran en los contenidos de *p*-tolualdehído y, en menor proporción, de hexaldehído, que suponen un total de un 15%.

En general, los compuestos carbonílicos predominantes en las muestras de humo analizadas son el acetaldehído y la mezcla formada por la acroleína y la acetona. Esta última es mayoritaria en las muestras procedentes de la combustión de madera de pino, mientras que el acetaldehído presenta mayor porcentaje en las muestras procedentes de madera de jara. En el humo procedente de los restantes materiales, ambos componentes muestran porcentajes similares.

En orden decreciente de concentraciones, los lugares tercero y cuarto los ocupan el formaldehído y el propionaldehído. Sólo en las muestras de humo procedentes de la combustión de restos de penca de tunera y de acícula de pino son mayores los porcentajes del propionaldehído. En los restantes tipos de humo, el porcentaje en formaldehído es superior, como sucede en las muestras de humo obtenidas a partir de maderas de pino, de brezo o de jara, mientras que en las muestras de humo de cáscara de almendra ambos aldehídos se encuentran en porcentajes próximos entre sí. Los lugares quinto y sexto son ocupados por la mezcla 2-butanona + butiraldehído y por el crotonaldehído. Entre los restantes aldehídos y cetonas considerados, el benzaldehído y valeraldehído son componentes minoritarios de los humos que, en algunas de las muestras, no se han podido cuantificar, mientras que el *p*-tolualdehído y hexaldehído no se han detectado en el humo emitido por materiales como las maderas de jara y brezo o la cáscara de almendra, a los niveles de concentración que se pueden alcanzar con la metodología analítica utilizada.

Son escasos los resultados existentes en la bibliografía en cuanto al contenido de compuestos carbonílicos en muestras de humo obtenidas mediante procesos de combustión de materiales vegetales. En el humo procedente de la combustión de madera de pino, roble y eucalipto en hogares, tal como se indicó en la Tabla V.2, Schauer y col. [30] han establecido que, en el caso de la madera de pino, el acetaldehído es el componente mayoritario (1704 mg/Kg pino quemado), seguido del formaldehído (1165 mg/Kg), acetona (749 mg/Kg), hexaldehído (418 mg/Kg) y crotonaldehído (276 mg/Kg). También se han publicado datos acerca del contenido de estos compuestos en el humo procedente de la combustión de madera de abedul. Entre ellos, cabe destacar que los aldehídos más abundantes son, como en el caso

anterior, el formaldehído (400 mg/Kg) y el acetaldehído (73 mg/Kg) [31]. Además de la naturaleza de la biomasa, el sistema utilizado para la combustión y las condiciones en las que ésta se realiza, así como las condiciones ambientales, pueden tener una influencia importante en la composición del humo. Así se ha establecido al medir la concentración de compuestos carbonílicos en el humo de distintos tipos de incienso, durante y después de la combustión en una cámara. En las muestras analizadas, tal y como se comentó en la introducción de este capítulo, los niveles de acetaldehído, acetona y propionaldehído alcanzan sus valores máximos después de que el incienso se ha extinguido, mientras que los de formaldehído, butiraldehído y valeraldehído son mayores durante la combustión [36].

De igual forma que para el contenido total de compuestos carbonílicos, en las muestras de humo consideradas en este estudio, también se han realizado representaciones tipo “caja y bigotes”, para cada uno de los componentes individuales analizados. Los resultados agrupados en la Figura V.7 muestran, en la mayoría de los casos, una considerable asimetría en los valores de las medianas. Así mismo, se pone de manifiesto una considerable dispersión de los resultados obtenidos para un analito determinado en muestras de humo procedentes de la combustión de un mismo material.

En términos absolutos, se observa una mayor dispersión de resultados en las muestras de humo de maderas de pino y jara, mientras que los menores intervalos intercuartílicos corresponden a las muestras obtenidas a partir de madera de brezo y de cáscara de almendra. Al comparar el tamaño de los intervalos intercuartílicos, se evidencia que la mayor variabilidad de resultados corresponde a los compuestos que, en general, presentan mayores concentraciones, el acetaldehído y la mezcla acroleína + acetona.

Si los resultados obtenidos para los intervalos intercuartílicos de cada compuesto, en los distintos materiales, se refieren a las respectivas medianas, se observa que los mayores valores relativos se obtienen con las muestras de humo procedentes de la combustión de madera de pino y de acícula de pino. En estos materiales, los intervalos intercuartílicos representan, en promedio, más de un 60% del valor de la mediana. Sin embargo, en las muestras de humo representativas de la penca de tunera, cáscara de almendra y madera de brezo, dicha relación no llega al 40%.

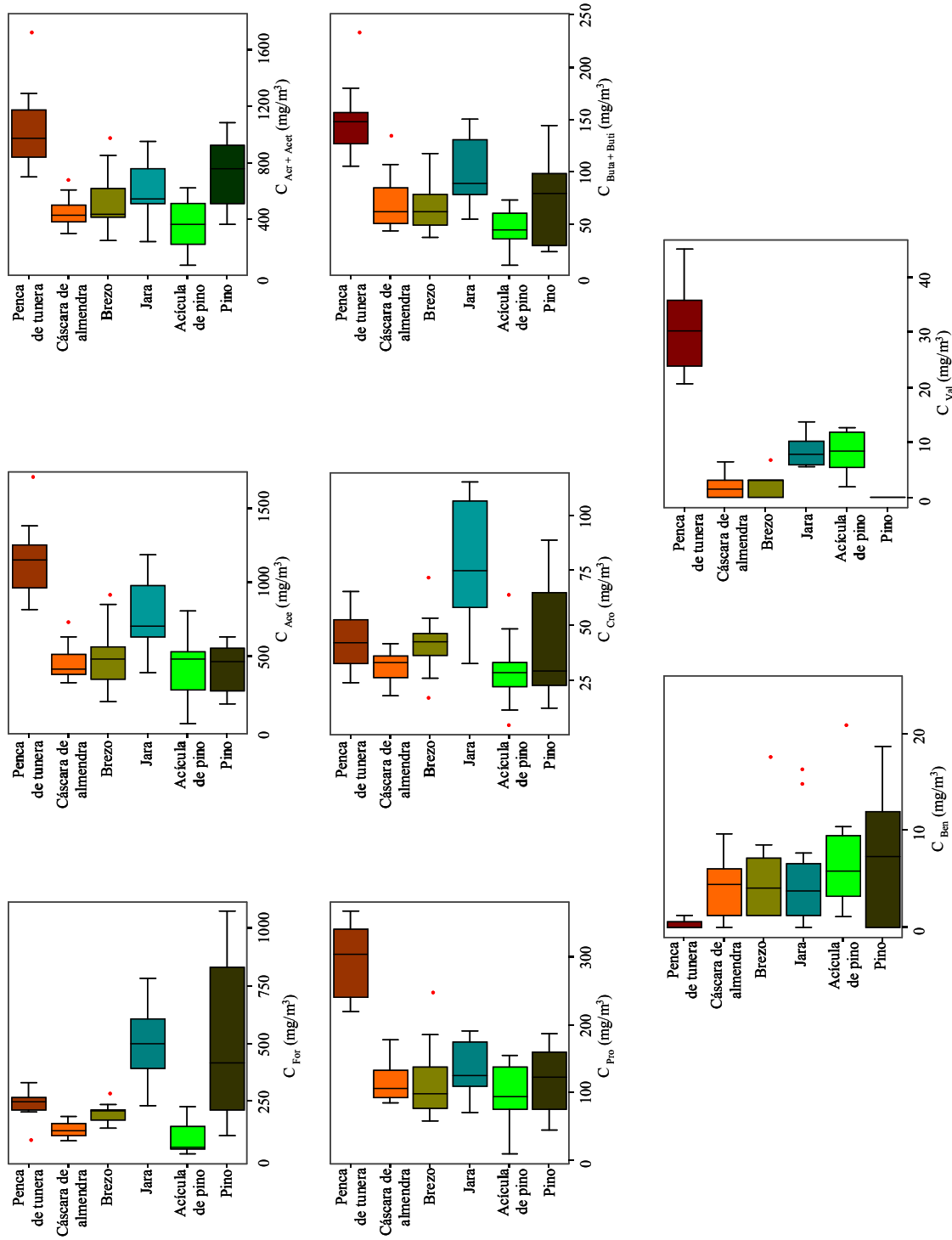


Figura V.7. Representación de tipo “caja y bigotes” para los compuestos carbonílicos presentes en el humo procedente de la combustión de restos vegetales de distinta naturaleza.

V.3.2. CORRELACIONES ENTRE CONTENIDOS DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN LOS HUMOS

Ante la disparidad comentada en los resultados obtenidos al establecer las concentraciones de compuestos carbonílicos en el humo procedente de los procesos de combustión de los seis materiales vegetales seleccionados, y con objeto de intentar establecer comparaciones y generalizar comportamientos referidos a las emisiones de compuestos carbonílicos, se ha realizado un estudio de correlaciones entre las concentraciones de los distintos aldehídos y cetonas presentes en las muestras de humo analizadas. En las Tablas V.4A y V.4B se han agrupado los resultados correspondientes a las correlaciones de Spearman (R_{Sp}) obtenidas al comparar las concentraciones de cada uno de los componentes analizados y la concentración total de compuestos carbonílicos, en las distintas muestras de humo representativas de cada uno de los materiales.

En dicha tabla sólo se han incluido los datos correspondientes a aquellas correlaciones en las que $R_{Sp} \geq 0.80$ o $P \leq 0.05$. Puede observarse que, en la mayoría de los casos, se obtienen correlaciones elevadas. Compuestos como el benzaldehído y valeraldehído se encuentran entre aquellos para los que, en la mayoría de las muestras de humo, las correlaciones muestran valores de $R_{Sp} < 0.80$, posiblemente porque, al tratarse de componentes minoritarios, los errores experimentales asociados a su determinación tienen en estos casos mayor incidencia. No obstante, también ha de tenerse en cuenta que, como se ha dicho con anterioridad, la formación de aldehídos y cetonas en el humo obtenido en los procesos de combustión depende de numerosos factores sobre los que no se ejerce control alguno. En consecuencia, es posible que la ruptura de las moléculas presentes en los materiales vegetales sometidos a combustión y las transformaciones que ocurren con intervención de los productos formados, a partir de las que se originan los distintos aldehídos y cetonas, no siempre ocurren a través de las mismas vías ni en iguales proporciones.

El formaldehído y acetaldehído se encuentran entre los aldehídos y cetonas mayoritarios que muestran, en algunos materiales, coeficientes de correlación inferiores a 0.80. Estos derivados son, con frecuencia, los compuestos carbonílicos que más interés despiertan por su presencia en aires interiores y en el aire ambiente, por sus elevadas concentraciones relativas en los humos y por los efectos nocivos que pueden provocar.

Tabla V.4A. Correlaciones encontradas entre las concentraciones de los diferentes compuestos carbonílicos mayoritarios y el contenido total en el humo procedente de cada uno de los materiales.

Compuesto	Material	Correlación Spearman	
		R _{Sp}	P
For	Pino (n = 14)	0.943	0.0007
	Acícula de pino (n = 12)	0.807	0.0036
	Jara (n = 12)	0.895	0.0030
	Brezo (n = 13)	^a -	-
	Cáscara de almendra (n = 18)	-	-
	Penca de tunera (n = 12)	-	-
Ace	Pino	-	-
	Acícula de pino	0.850	0.0022
	Jara	0.902	0.0028
	Brezo	0.983	0.0007
	Cáscara de almendra	0.959	0.0001
	Penca de tunera	0.874	0.0037
Acr + Acet	Pino	-	-
	Acícula de pino	0.864	0.0018
	Jara	0.832	0.0058
	Brezo	0.993	0.0007
	Cáscara de almendra	0.903	0.0002
	Penca de tunera	0.972	0.0013
Pro	Pino	-	-
	Acícula de pino	-	-
	Jara	0.839	0.0054
	Brezo	0.972	0.0008
	Cáscara de almendra	0.884	0.0003
	Penca de tunera	0.902	0.0028

^a Correlaciones con R_{Sp} ≤ 0.80 o P ≥ 0.05.

Tabla V.4B. Correlaciones encontradas entre las concentraciones de los diferentes compuestos carbonílicos minoritarios y el contenido total en el humo procedente de cada uno de los materiales.

Compuesto	Material	Correlación Spearman	
		R _{Sp}	P
Cro	Pino	0.899	0.0012
	Acícula de pino	0.943	0.0007
	Jara	0.909	0.0026
	Brezo	0.863	0.0028
	Cáscara de almendra	0.853	0.0004
	Penca de tunera	0.930	0.0020
Buta + Buti	Pino	0.903	0.0011
	Acícula de pino	^a -	-
	Jara	0.944	0.0017
	Brezo	0.874	0.0025
	Cáscara de almendra	-	-
	Penca de tunera	-	-
Ben	Pino	-	-
	Acícula de pino	0.868	0.0017
	Jara	-	-
	Brezo	-	-
	Cáscara de almendra	-	-
	Penca de tunera	-	-
Val	Pino	^b ND	ND
	Acícula de pino	0.881	0.0015
	Jara	-	-
	Brezo	-	-
	Cáscara de almendra	-	-
	Penca de tunera	-	-

^a Correlaciones con R_{Sp} ≤ 0.80 o P ≥ 0.05.

^b No detectado.

Por otra parte, también deben jugar un papel importante en la formación de ácidos orgánicos y de otros aldehídos y cetonas que forman parte de la composición del humo, pues constituyen productos finales en la degradación térmica de los biopolímeros de celulosa, hemicelulosa y lignina que constituyen los restos vegetales y, a su vez, intervienen en reacciones de oxidación-reducción y en procesos de recombinación a través de los que se forman componentes de mayor peso molecular.

Sin embargo, cuando ambos compuestos se consideran conjuntamente y se establecen las correlaciones entre el contenido total de compuestos carbonílicos, en cada una de las muestras de humo, y la suma de concentraciones de formaldehído y acetaldehído en cada muestra, se obtienen correlaciones caracterizadas por los parámetros incluidos en la Tabla V.5. En todos los casos destacan los elevados coeficientes de correlación de Spearman obtenidos. Las pendientes ponen de manifiesto que la suma de contenidos conjuntos de formaldehído y acetaldehído, representan entre el 44% y el 58% del contenido total de los compuestos carbonílicos presentes en los distintos tipos de humo.

Tabla V.5. Correlaciones de Spearman entre la concentración total de los compuestos carbonílicos analizados y la suma de concentraciones de formaldehído y acetaldehído en el humo obtenido por combustión de distintos materiales.

Material	R _{Sp}	P	Pendientes Carbonílicos Totales/([For + Ace])
Pino	0.982	0.0000	2.26
Acícula de Pino	0.969	0.0005	1.78
Jara	0.965	0.0014	1.71
Brezo	0.994	0.0006	2.13
Cáscara de almendra	0.922	0.0001	2.10
Penca de tunera	0.923	0.0022	2.25

A partir de los resultados obtenidos, se puede establecer que durante la combustión de distintos tipos de materiales vegetales se producen emisiones de formaldehído y acetaldehído que, en conjunto, se encuentran poco influidas por las variables experimentales, incluida la naturaleza de los materiales. Sin embargo, al considerar individualmente ambos aldehídos, como antes se ha comentado, se obtienen, para algunos materiales, bajas correlaciones. Como

casos extremos, puede hacerse referencia a las correlaciones entre los contenidos de formaldehído y el total de compuestos carbonílicos en los humos de cáscara de almendra y penca de tunera, con valores de R_{Sp} de 0.441 y 0.538, respectivamente.

En atención a los resultados obtenidos, se han representado las concentraciones totales de compuestos carbonílicos en las 83 muestras analizadas, frente a la suma de concentraciones de formaldehído y acetaldehído en los humos. La Figura V.8 muestra la magnífica correlación ($R_{Sp} = 0.97$) que existe entre ambos parámetros. La pendiente de la recta (1.96) pone de manifiesto que, para el conjunto de las muestras de humo, el contenido medio de la suma de concentraciones de formaldehído y acetaldehído representa prácticamente la mitad (51.0%) de todos los compuestos carbonílicos analizados.

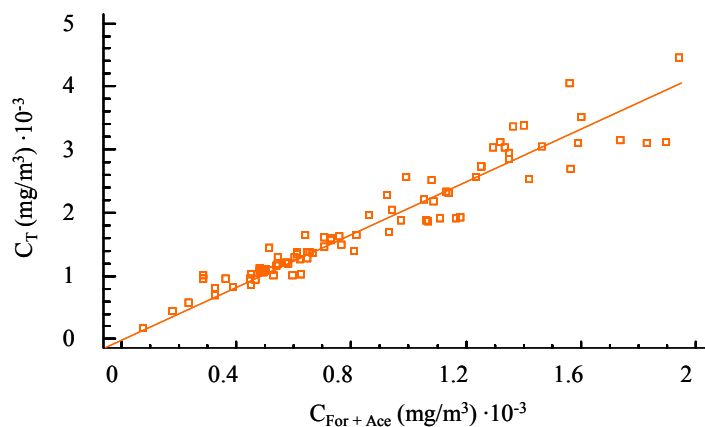


Figura V.8. Relación entre el contenido total de compuestos carbonílicos y la suma de concentraciones de formaldehído y acetaldehído, en todas las muestras de humo analizadas.

Los resultados comentados evidencian que, al considerar de forma independiente las concentraciones de formaldehído y acetaldehído, originadas por descomposición térmica de los biopolímeros que constituyen los restos vegetales sometidos a combustión, sólo en algunos casos se obtienen correlaciones altas con el contenido total de compuestos carbonílicos. Sin embargo, en cualquiera de los tipos de humo o en el conjunto de las muestras, con independencia de su procedencia, el contenido total de compuestos carbonílicos y la suma de los contenidos de ambos aldehídos, en cada una de las muestras, presentan una elevada correlación. Por otra parte, la suma de las concentraciones de estos dos aldehídos en las muestras de humo representa, de forma aproximada, la mitad del contenido de los

compuestos carbonílicos seleccionados en este trabajo.

Las correlaciones obtenidas permiten establecer tendencias en el comportamiento de los procesos de combustión de biomasa, en cuanto a la emisión de distintos tipos de compuestos. En principio, los resultados obtenidos pueden considerarse compatibles con la hipótesis de que al menos los aldehídos de mayor peso molecular tienen su origen en recombinaciones producidas a partir de las moléculas más sencillas de formaldehído y/o acetaldehído. Podría admitirse una situación en la que, durante la combustión, las moléculas presentes en los componentes de los residuos vegetales experimentan procesos de fraccionamiento que conducen preferentemente a restos moleculares de bajo peso molecular. De forma parcial, estos se recombinarían posteriormente, por distintas rutas, para originar los compuestos de mayor peso molecular.

V.3.3. PERFILES DE DISTRIBUCIÓN Y PARÁMETROS INDICADORES

En los apartados anteriores nos hemos referido a los contenidos de compuestos carbonílicos presentes en las muestras de humo representativas de los seis tipos de materiales usados como combustibles. Así mismo, se han comentado posibles relaciones lineales entre componentes de los humos, encaminadas a intentar establecer tendencias en el comportamiento de los procesos de combustión. En otro orden de cosas, puede resultar de interés establecer criterios que permitan diferenciar entre humos procedentes de distintos materiales, en base a las diferencias en el contenido de determinados compuestos o entre relaciones de compuestos específicos. Con tal finalidad se han comparado distintos tipos de perfiles de distribución.

Perfiles de distribución

Hemos comentado que son numerosas las variables que influyen en la composición del humo obtenido por combustión de un determinado tipo de material, desde las relacionadas con la naturaleza del material, a las que representan características del mismo (tamaño de los fragmentos sometidos a combustión o grado de maduración y de humedad), o a las que dependen del proceso y que se relacionan, sobre todo, con el contenido de aire. Al no controlarse adecuadamente estas variables, las muestras de humo obtenidas para un material

determinado pueden presentar una gran variabilidad en cuanto a las concentraciones correspondientes a la mayoría de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de humo, aunque procedan de un mismo material. Por tal motivo, no es aconsejable intentar establecer comparaciones que se basen en valores absolutos de concentraciones. No obstante, en la Figura V.9 se han representado los perfiles correspondientes a las medianas de las concentraciones de los compuestos carbonílicos que hemos clasificado como mayoritarios y minoritarios.

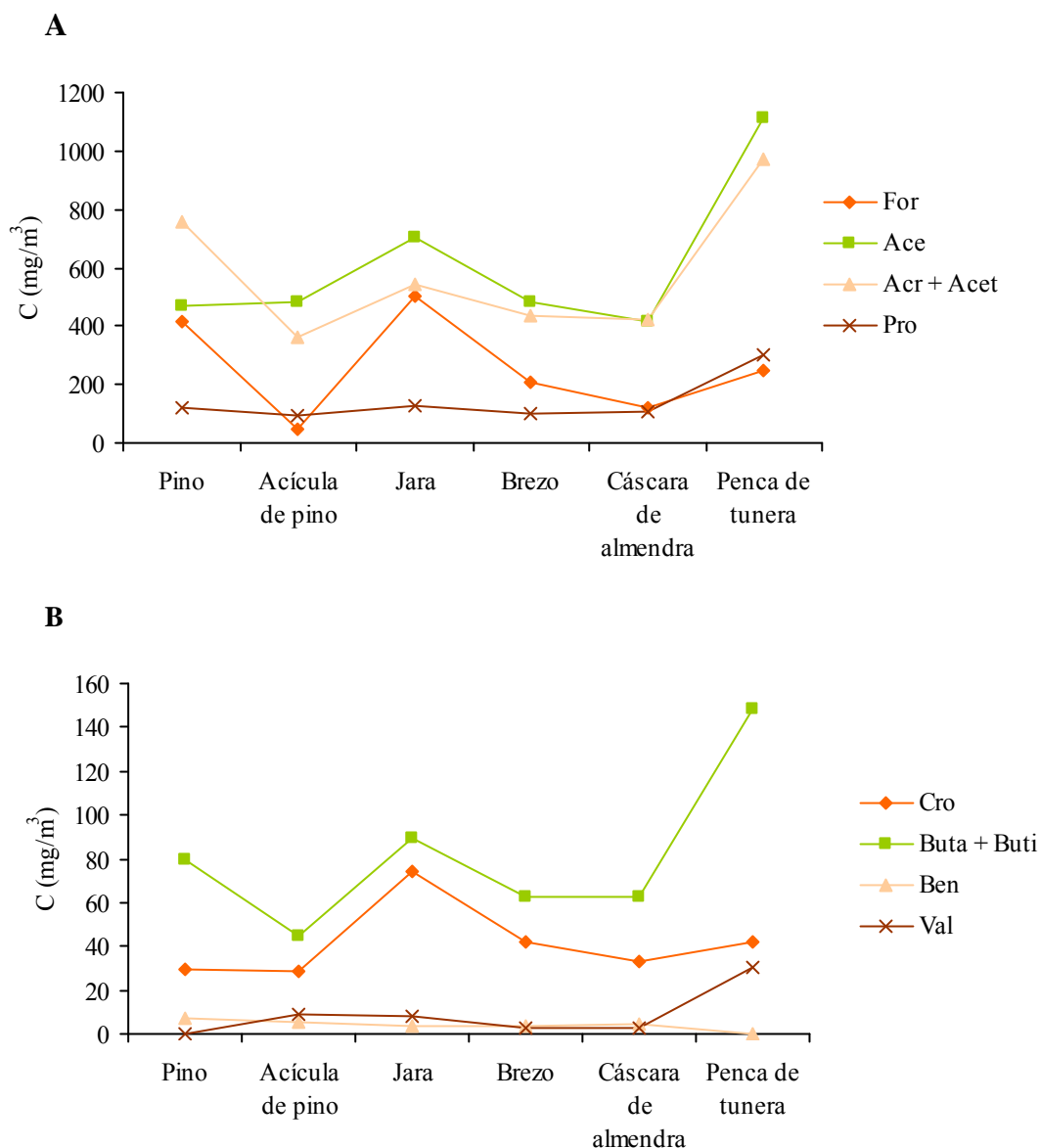


Figura V.9. Concentraciones medianas de compuestos carbonílicos mayoritarios (A) y minoritarios (B) en muestras de humo procedentes de la combustión de distintos materiales vegetales.

La citada figura muestra que existe una similitud considerable en las concentraciones de benzaldehído en todas las muestras representativas de los distintos materiales. Una situación similar se observa para el propionaldehído y valeraldehído, aunque en el humo de penca de tunera, estos aldehídos se encuentran en concentraciones superiores a las presentes en otros materiales. Para los restantes aldehídos y cetonas, las concentraciones presentan valores que pueden ser considerablemente diferentes en los distintos materiales, aunque el perfil de distribución de los mismos es similar entre los humos de unos y otros materiales.

Parámetros indicadores

En atención a lo expuesto anteriormente, una alternativa habitual al uso de valores absolutos de concentraciones, es el empleo de valores porcentuales entre el contenido de un compuesto y la suma de todos los establecidos para los distintos componentes presentes en una determinada muestra. Los porcentajes así obtenidos pueden resultar adecuados cuando se trata de establecer comparaciones entre muestras de un mismo material. Sin embargo, si la finalidad consiste en resaltar diferencias entre materiales, como sucede en el caso que nos ocupa, suele resultar más adecuado el uso de las medianas de los porcentajes de cada uno de los compuestos representativas de un conjunto de muestras de humo de un determinado material.

En la Figura V.10, se han representado las medianas de los porcentajes correspondientes a los contenidos de los distintos compuestos carbonílicos determinados en las muestras de humo, atendiendo a los materiales empleados como combustibles. El *p*-tolualdehído y el hexaldehído se encuentran presentes, en porcentajes importantes, en las muestras de humo procedentes de madera de pino, a las que aportan un 12.0% y un 2.6% del contenido total en compuestos carbonílicos, respectivamente. Ahora bien, en los restantes materiales su contribución es insignificante, motivo por el que han sido excluidos en los estudios realizados en este apartado.

En dicha figura se puede observar que, al igual que sucede cuando se representan las medianas de las concentraciones, las diferencias más importantes entre materiales se establecen a través de las contribuciones de formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona, crotonaldehído o 2-butanona + butiraldehído, aparte del hexaldehído y *p*-tolualdehído que, en consonancia con lo indicado anteriormente, constituyen un caso aparte en cuanto a la

caracterización/diferenciación del humo procedente de la madera de pino. Sin embargo, en el caso de los compuestos minoritarios, aunque las diferencias son evidentes, no suelen representar valores superiores a dos o tres unidades porcentuales.

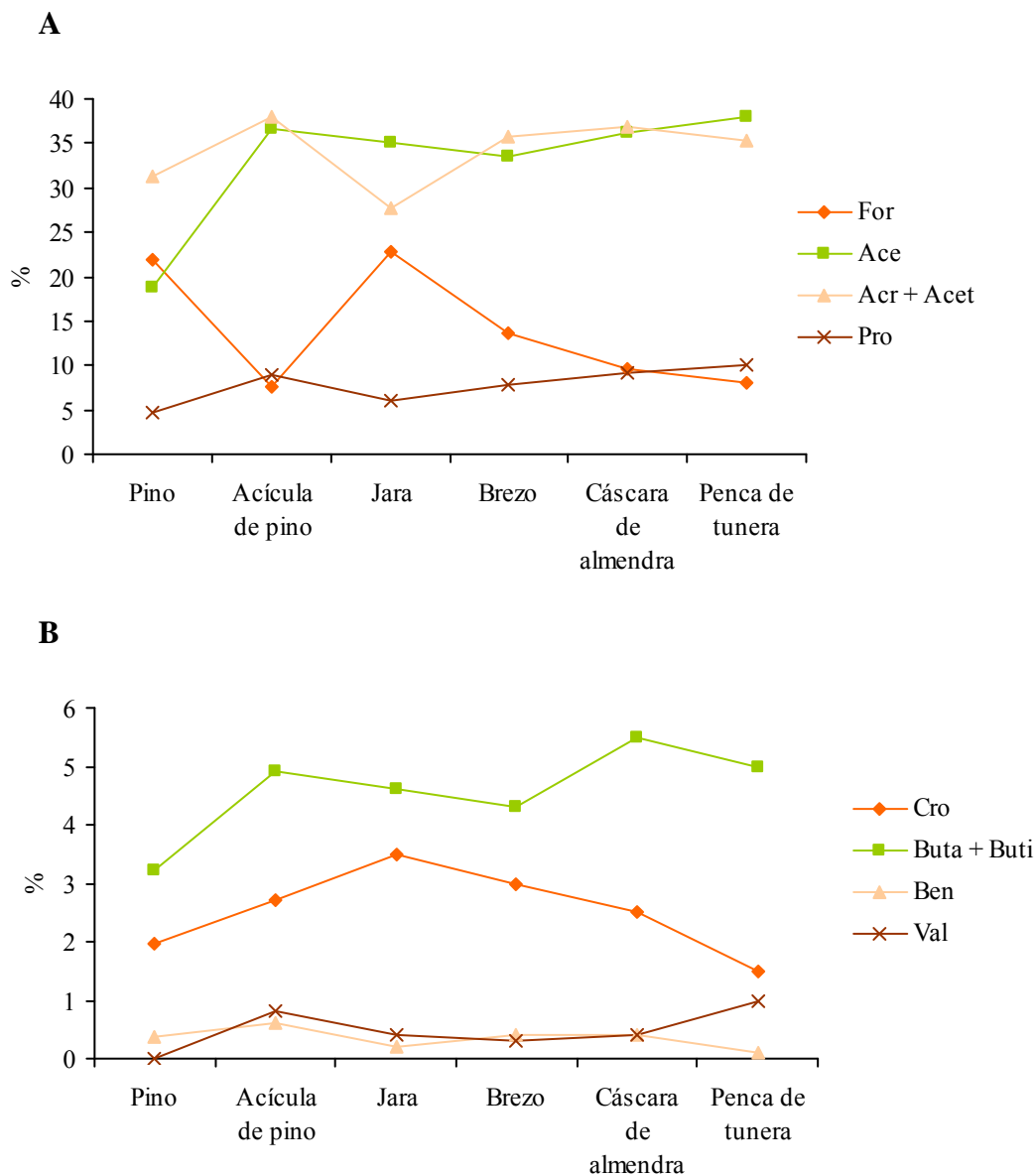


Figura V.10. Contribuciones, expresadas en porcentajes, de distintos compuestos carbonílicos, mayoritarios (A) y minoritarios (B), a la composición del humo procedente de la combustión de distintos materiales vegetales.

Los resultados muestran que, principalmente, el formaldehído y el acetaldehído pueden constituir potenciales compuestos indicadores a utilizar en la diferenciación entre muestras de humo procedente de distintos materiales. Así, el formaldehído está presente en el humo de madera de pino y de jara en porcentajes del 21.9 y 22.8%, respectivamente,

considerablemente superiores al 13.6% que corresponde al humo de madera de brezo que le sigue en contenido. El porcentaje de acetaldehído permitiría diferenciar el humo de madera de pino, que representa un 18.9% del total de los compuestos carbonílicos presentes en el humo de dicho material, mientras que para los restantes materiales los porcentajes oscilan entre un 33.5 y un 38.0%.

Para establecer diferencias o similitudes acerca de las fuentes de procedencia de las muestras de humo, otra alternativa podría consistir en utilizar concentraciones normalizadas de los compuestos analizados frente a determinados componentes, seleccionados en función de que permitan obtener relaciones que presenten diferencias significativas en distintos materiales. Como ejemplo de la utilidad de estos parámetros, se han establecido las concentraciones normalizadas de distintos compuestos carbonílicos frente al formaldehído (R_{for}), propionaldehído (R_{pro}) y crotonaldehído (R_{cro}). Como compuestos de referencia no se han utilizado aquellos que, como sucede con el benzaldehído, no han sido cuantificados en todas las muestras correspondientes a los distintos materiales, para evitar la obtención de concentraciones normalizadas que carecen de significación real. En general, tampoco se han empleado compuestos que aparecen en bajas concentraciones, por conducir a relaciones que estarían más sujetas a errores.

En la Figura V.11 se han representado las medianas de los valores normalizados de las concentraciones de distintos compuestos carbonílicos frente a la concentración de formaldehído.

Puede observarse que los valores de R_{for} de la mayoría de los compuestos presentan diferencias poco significativas entre ellos y, en consecuencia, son poco adecuados para establecer diferencias entre las muestras de humo. Sin embargo, las relaciones obtenidas para el acetaldehído y para la mezcla acroleína + acetona, presentan diferencias que podrían ser adecuadas para distinguir entre muestras de humo procedentes de distintos materiales. Con objeto de visualizar estas diferencias, en la Figura V.12, se encuentran las variaciones de R_{for} en función del tipo de material del que proceden las muestras de humo.

Los valores de R_{for} correspondientes al acetaldehído ($R_{\text{for, Ace}}$) y a la mezcla acroleína + acetona ($R_{\text{for, Acr + Acet}}$), pueden ser adecuados para diferenciar entre las muestras de humo procedentes de acícula de pino [$(R_{\text{for, Ace}}) = 4.8$; $(R_{\text{for, Acr + Acet}}) = 4.2$] o de restos de penca de tunera [$(R_{\text{for, Ace}}) = 4.7$; $(R_{\text{for, Acr + Acet}}) = 4.0$], de las representativas de los

restantes materiales para los que R_{for} toma valores que, en algunos casos, son muy inferiores. Para el humo obtenido por combustión de cáscara de almendra [$(R_{for}, Ace) = 3.7$; $(R_{for}, Acr + Acet) = 3.9$] y de madera de brezo [$(R_{for}, Ace) = 2.6$; $(R_{for}, Acr + Acet) = 2.6$], los R_{for} muestran valores intermedios pero diferenciados, que pueden convertirse en índices a utilizar para la caracterización de estas muestras.

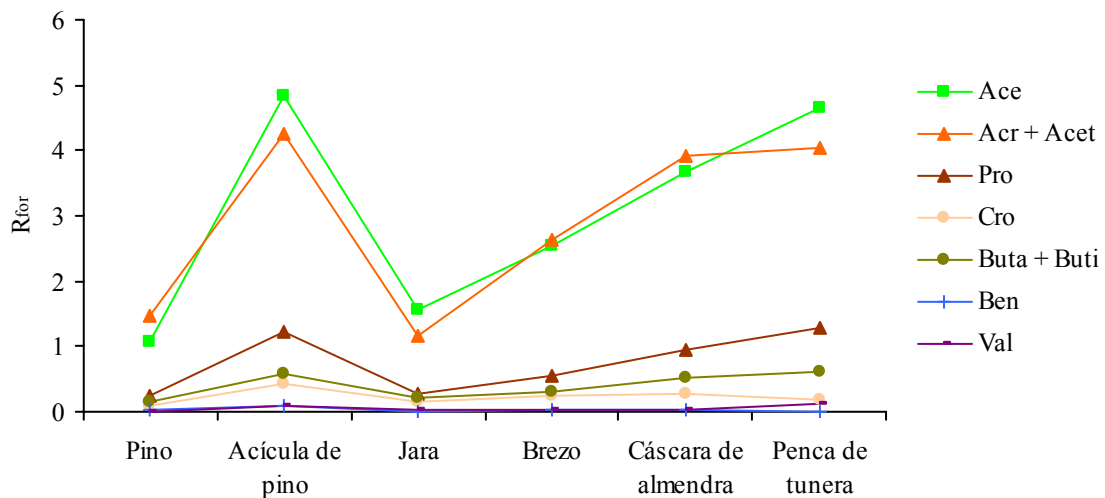


Figura V.11. Mediana de las concentraciones normalizadas con respecto al formaldehído de los compuestos carbonílicos presentes en humos originados en la combustión de restos vegetales.

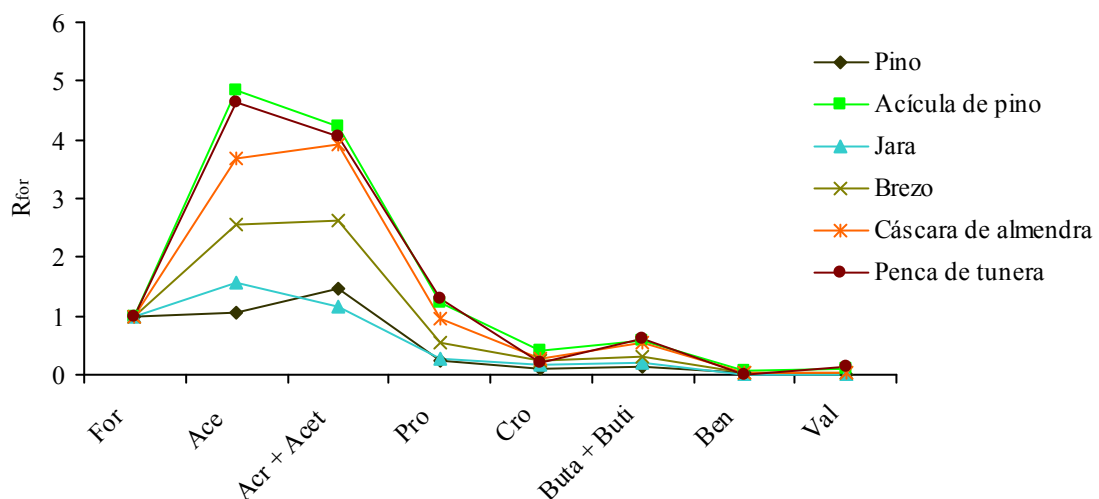


Figura V.12. Mediana de las concentraciones normalizadas con respecto al formaldehído representativas de los distintos tipos de humo considerados en este trabajo.

Las medianas de las concentraciones normalizadas de los aldehídos y cetonas presentes en las muestras de humo en estudio, frente al propionaldehído, se han representado en la Figura V.13.

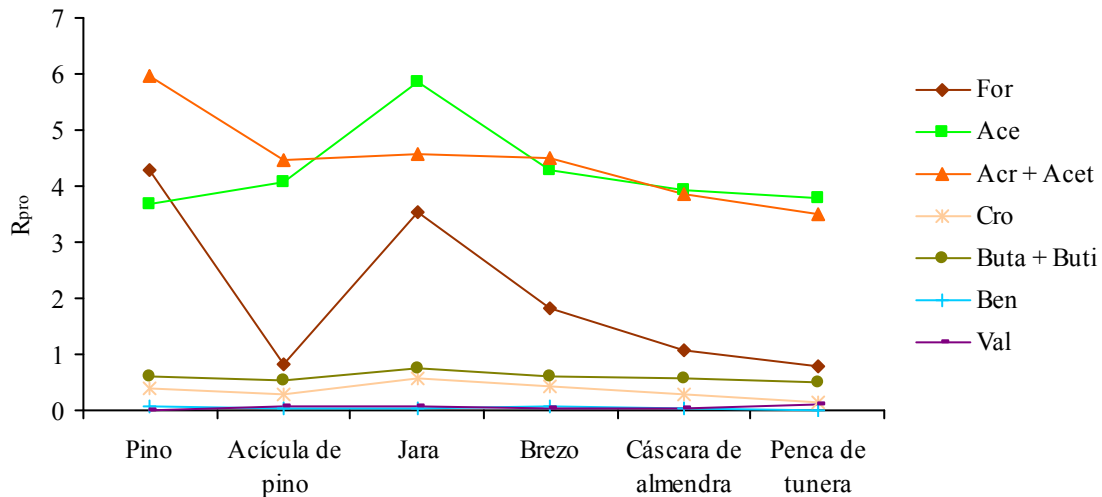


Figura V.13. Medianas de las concentraciones normalizadas, en relación al propionaldehído, correspondientes a las muestras de humo obtenidas por combustión de restos vegetales.

Entre las relaciones que presentan diferencias significativas en muestras representativas de distintos materiales, se encuentran las correspondientes al formaldehído, acetaldehído y la mezcla acroleína + acetona. Los valores correspondientes a los R_{pro} de estos componentes, en los seis tipos de humo, se han agrupado en la Tabla V.6.

De forma aislada, o preferentemente junto con otros índices, las relaciones que, en principio, podrían ser útiles para diferenciar entre muestras de humo serían de forma preferente: (R_{pro} , For) para los humos de madera de pino y de jara; (R_{pro} , Ace) para las muestras procedentes de la combustión de madera de jara y (R_{pro} , Acr + Acet) para el humo obtenido por combustión de madera de pino, aunque en los dos últimos casos, las diferencias entre las relaciones indicadas y las restantes pueden resultar insuficientes. Las diferencias entre valores de R_{pro} adquieren significación cuando se transforman en relaciones entre concentraciones. Así los R_{pro} correspondientes al formaldehído en los humos de madera de jara y brezo difieren en 2.0 unidades, que corresponden a un intervalo de concentraciones de unos 300 mg/m^3 , equivalentes a una diferencia del 40% en el contenido de formaldehído en las muestras de humo de madera de jara y brezo.

Tabla V.6. Mediana de concentraciones normalizadas con referencia al propionaldehído de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de humo procedentes de la combustión de distintos combustibles vegetales.

Material	R _{pro}		
	For	Ace	Acr + Acet
Pino	4.3	3.7	6.0
Acícula de Pino	0.8	4.1	4.5
Jara	3.6	5.8	4.6
Brezo	1.8	4.3	4.5
Cáscara de Almendra	1.1	3.9	3.8
Penca de tunera	0.8	3.8	3.5

Las medianas de las concentraciones normalizadas de los aldehídos y cetonas presentes en las muestras de humo en estudio, frente al crotonaldehído, se han representado en la Figura V.14, y en la Tabla V.7 se han agrupado los valores de dicha relación para los distintos compuestos carbonílicos y muestras empleadas en este trabajo.

Entre los valores incluidos en la mencionada Tabla V.7, se han resaltado los que pueden ser considerados de mayor utilidad en la caracterización de las muestras de humo. Entre ellos, encontramos la relación entre el formaldehído y el crotonaldehído correspondiente a las muestras de humo en las que el combustible ha sido la madera de pino, y las correspondientes al acetaldehído, acroleína + acetona y propionaldehído, para las emisiones de humo procedentes de la combustión de restos de penca de tunera.

Los resultados que se acaban de exponer ponen de manifiesto que, a partir de las concentraciones establecidas para los distintos aldehídos y cetonas presentes en el humo, pueden derivarse parámetros de considerable utilidad para diferenciar entre distintos tipos de humo, atendiendo a la naturaleza de los materiales empleados como combustibles. Sin embargo, cuando pretendemos establecer diferencias entre muestras reales, en base a las medianas de los parámetros establecidos, el éxito que se alcanza es escaso. De nuevo, nos encontramos con obstáculos derivados de la gran dispersión de los resultados correspondientes a muestras representativas de un mismo tipo de material, como se ha

comentado con anterioridad. En efecto, al intentar utilizar los porcentajes y relaciones normalizadas que se acaban de establecer, se obtienen resultados que muestran la escasa capacidad discriminadora de los mismos, o más concretamente, de los valores asignados a dichos parámetros como representativos de un determinado tipo de humo.

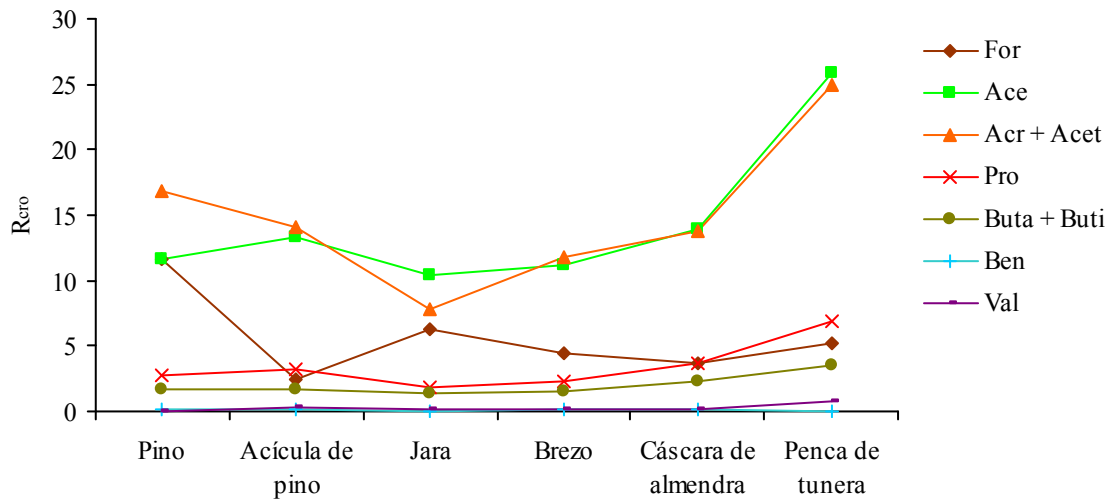


Figura V.14. Mediana de las concentraciones normalizadas de los compuestos carbonílicos frente al crotonaldehído para los humos obtenidos por combustión de los diferentes restos vegetales.

Tabla V.7. Mediana de las concentraciones normalizadas con respecto al crotonaldehído de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de humo.

Material	R _{cro}						
	For	Ace	Acr + Acet	Pro	Buta + Buti	Ben	Val
Pino	11.6	11.7	16.9	2.8	1.6	0.2	0.0
Acícula de Pino	2.4	13.3	14.1	3.3	1.8	0.2	0.3
Jara	6.3	10.4	7.8	1.8	1.3	0.1	0.1
Brezo	4.4	11.2	11.8	2.3	1.6	0.1	0.1
Cáscara de Almendra	3.7	13.9	13.7	3.6	2.2	0.2	0.1
Penca de tunera	5.3	25.9	25.0	6.9	3.5	0.1	0.7

No obstante, se ha ensayado la posibilidad de utilizar los porcentajes y relaciones normalizadas escogidos anteriormente como parámetros indicadores que pudiesen resultar representativos, modificando en algunos casos, de forma empírica, valores paramétricos adecuados para alcanzar el objetivo propuesto. En la Tabla V.8 se ha incluido esta información y los porcentajes de muestras de cada material que quedan correctamente clasificadas, al comparar los resultados correspondientes a las 83 muestras de humo analizadas en este trabajo con los distintos valores paramétricos. Se han resaltado los casos en los que los valores paramétricos establecidos se cumplen en la mayoría de las muestras de humo de un determinado material.

Entre los parámetros escogidos, se encuentran algunos que pueden considerarse prácticamente específicos para un determinado tipo de humo y que, en consecuencia, podrían permitir la identificación de cualquier muestra de humo que provenga de la combustión de un material concreto. Así sucede con los porcentajes de *p*-tolualdehído y hexaldehído en relación con el humo procedente de la combustión de madera de pino. También existen parámetros, como las relaciones normalizadas del acetaldehído con respecto al formaldehído ($R_{\text{for, Ace}}$) y al propionaldehído ($R_{\text{pro, Ace}}$), con valores paramétricos: < 1 y < 3 , respectivamente, que pueden considerarse específicos para un tipo de humo, en estos casos el de madera de pino, pero que no garantizan la identificación de la totalidad de las muestras de dicho tipo de humo.

Los valores paramétricos de otro conjunto de parámetros indicadores, pueden ser cumplidos por la totalidad de las muestras procedentes de la combustión de un material concreto, pero también lo satisfacen un número más o menos grande de muestras procedentes de otros materiales. Estaríamos ante valores paramétricos cuyo cumplimiento es condición necesaria para clasificar correctamente a un determinado humo, pero que no resulta suficiente. Serían los casos correspondientes a: $\text{Ace (\%)} < 28$, para el humo de madera de pino; $\text{Val (\%)} > 0.5$, para el de cáscara de almendra; $R_{\text{for, Ace}} < 2.5$ para los de maderas de pino o jara; $R_{\text{pro, For}} > 2$, para el humo obtenido a partir de madera de jara; y los $R_{\text{cro, Ace}} > 20$ y $R_{\text{cro, Acr}} + \text{Acet} > 17.5$ correspondientes al humo de penca de tunera.

El resto de los parámetros indicadores y valores paramétricos incluidos en la Tabla V.8, se cumplen para un conjunto más o menos amplio de muestras de un número reducido de materiales. Deben considerarse como adecuados para complementar la información obtenida a partir de otros parámetros, pero su cumplimiento no constituye condición necesaria ni suficiente para identificar el material de cuya combustión se produce una muestra de humo.

Tabla V.8. Parámetros indicadores utilizables para diferenciar entre muestras de humo atendiendo a sus fuentes de emisión.

Parámetro	Valores paramétricos	Material					
		Pino	Acícula de Pino	Jara	Brezo	Cáscara de Almendra	Penca de tunera
For (%)	< 10	0	79	0	0	55	75
	> 20	50	0	75	0	0	0
Ace (%)	< 28	100	0	67	0	0	0
	> 40	0	36	0	0	0	17
Tol (%)	> 2	100	0	0	0	0	0
Hex (%)	> 1	100	0	0	0	0	0
Val (%)	> 0.5	0	93	0	0	100	0
R _{for} , Ace	< 1	50	0	0	0	0	0
	< 2.5	100	14	100	46	0	0
	> 5	0	50	0	0	42	11
R _{for} , Acr + Acet	< 1.5	50	0	92	0	0	0
	> 4	14	64	0	0	50	43
R _{pro} , For	> 2	79	21	100	38	0	0
	< 1	0	64	0	0	50	75
R _{pro} , Ace	< 3	36	0	0	0	0	0
	> 6	0	7	50	0	0	0
R _{pro} , Acr + Acet	> 5.5	86	7	8	8	0	0
R _{cro} , For	> 7.5	86	0	8	0	5	17
R _{cro} , Ace	> 20	7	14	0	0	5	100
R _{cro} , Acr + Acet	> 17.5	43	0	0	0	10	100
R _{cro} , Pro	> 6	14	7	0	0	0	75

Contemplada la Tabla V.8 desde la óptica de la naturaleza de los materiales, se observa la abundancia de parámetros que pueden ser utilizados para la identificación del humo procedente de la madera de pino. Desde los que hemos catalogado como específicos [Tol (%) y Hex (%)], a otros como Ace (%) < 28 y $R_{for}, Ace < 2.5$, cuyo cumplimiento comparte con las muestras procedentes de la combustión de madera de jara. La mayoría de las muestras de humo de madera de pino, también se caracterizarán por presentar valores de $R_{pro}, For > 2$; de $R_{pro}, Acr + Acet > 5.5$ y de $R_{cro}, For > 7.5$.

Para la mayoría de los tipos de humo considerados, no se han establecido parámetros indicadores específicos, aunque se caracterizan por satisfacer determinados valores paramétricos. Es la situación que se plantearía al intentar identificar las muestras de humo que tienen su origen en la madera de jara [$R_{for}, Ace < 2.5$ y $R_{pro}, For > 2$], en la cáscara de almendra [Val (%) > 0.5] y en la penca de tunera [$R_{cro}, Ace > 20$ y $R_{cro}, Acr + Acet > 17.5$]. En todos estos casos, la información adicional aportada por otros parámetros incluidos en la mencionada tabla podría ser suficiente para identificar con un elevado grado de certeza la naturaleza de dichas muestras.

No se han hallado parámetros indicadores con valores paramétricos que cumplan la generalidad de las muestras de humo procedentes de acícula de pino. Sin embargo, la mayoría de las mismas cumplen con determinados requisitos como los incluidos a continuación: porcentajes de formaldehído inferiores al 10% y porcentajes de valeraldehído superiores al 0.5%; relaciones normalizadas de acroleína + acetona, con respecto al formaldehído, superiores a 4 y relaciones normalizadas de formaldehído, con respecto, al propionaldehído inferiores a la unidad.

Quizás, las mayores dificultades en cuanto a la identificación de las muestras de humo mediante la utilización de valores paramétricos, se encuentren con las procedentes de la combustión de madera de brezo. Para las mismas, quizás el signo de identidad más importante sea el no cumplir con los valores paramétricos establecidos. De hecho, la identificación de estas muestras podría producirse en algunos casos por exclusión de las restantes.

Por último, también resulta de interés poder establecer si la presencia de determinados compuestos carbonílicos en ambientes concretos, o asociados a determinados objetos o productos, obedece a causas naturales o si tienen una procedencia antropogénica. En tal sentido, diversos autores [49,50] han propuesto la utilización de relaciones entre

concentraciones de compuestos carbonílicos como estimación de la procedencia de los mismos en el aire ambiente. Con tal finalidad, se han establecido las relaciones entre las concentraciones de formaldehído y de acetaldehído, así como las acetaldehído y propionaldehído, en las muestras de humo consideradas en este trabajo. Las medianas de los valores hallados se encuentran en la Tabla V.9.

Se ha propuesto la relación formaldehído/acetaldehído para establecer si, en un determinado ambiente, la presencia de determinados compuestos carbonílicos es debida a causas biogénicas o si tienen su origen en actividades humanas. Valores bajos de esta relación, comprendidos entre 1 y 2, han sido propuestos como representativos de humos procedentes de áreas urbanas. A medida que este valor va aumentando, estaríamos ante muestras en las que las aportaciones antropogénicas ceden relevancia ante las emisiones directas. Valores en torno a 10 indicarían una procedencia biogénica, asimilada a áreas rurales, de los compuestos carbonílicos [49,50].

Tabla V.9. Medianas de las relaciones entre las concentraciones de compuestos carbonílicos encontrados en el humo.

Material	Concentración	Concentración
	For/Ace	Ace/Pro
Pino	0.9	3.8
Acícula de pino	0.1	5.2
Cáscara de almendra	0.3	3.9
Penca de tunera	0.2	3.6
Brezo	0.4	4.9
Jara	0.7	5.6

Los resultados obtenidos para las relaciones entre formaldehído y acetaldehído en los distintos tipos de humo, incluidas en la tabla anterior, no parecen ser concluyentes para diferenciar entre el humo procedente de los distintos tipos de materiales de biomasa estudiados. Sin embargo, los valores obtenidos para dicha relación son congruentes con la utilidad de la misma para establecer la procedencia antropogénica o natural de ambientes afectados por el humo de restos vegetales.

Otra relación utilizable para informar acerca de la procedencia de emisiones gaseosas, es la correspondiente a las concentraciones de acetaldehído y propionaldehído, ya que se ha indicado que posiblemente este último derivado sólo tiene procedencia antropogénica. Su detección en el aire ambiente o la obtención de valores bajos para dicha relación, serían datos que indicarían una aportación antropogénica del acetaldehído y, por supuesto, del propionaldehído [49,50].

V.3.4. ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Hemos comentado con anterioridad la importancia que puede tener, tanto desde un punto de vista medioambiental como para la caracterización de alimentos ahumados, el poder establecer, mediante datos analíticos, la naturaleza, o mejor, el origen, de una muestra de humo. En tal sentido, en el apartado anterior se ha estudiado la posibilidad de establecer parámetros indicadores y valores paramétricos cuya consideración permitiese alcanzar una adecuada identificación de las muestras de humo obtenidas por combustión de distintos tipos de restos vegetales.

Es evidente que la vía explorada anteriormente conduce a resultados que permiten intuir la posibilidad de diferenciar entre las muestras de humo seleccionadas. No obstante, el procedimiento a seguir para establecer los parámetros indicadores y los valores paramétricos incluidos en la Tabla V.8, básicamente de carácter empírico, resulta tedioso y, además, no explora todas las posibilidades, ni garantiza la obtención de los mejores resultados. Por otra parte, se ha puesto en evidencia que, en distintos supuestos, sería necesario recurrir a la combinación de diferentes parámetros indicadores, con lo cual aumentarían las dificultades asociadas a la utilización de dicho procedimiento. En tal sentido, el análisis multivariante puede suponer una ayuda considerable con objeto utilizar criterios objetivos que permitan establecer el origen de una muestra de humo, a partir de sus contenidos en compuestos carbonílicos, y resultados más rigurosos cuando se pretenda diferenciar entre muestras de humo que procedan de la combustión de materiales vegetales diferentes.

Es conocido que los métodos estadísticos multivariantes se caracterizan por permitir analizar simultáneamente un conjunto importante de datos analíticos, situación que los métodos uni y bidimensionales no abordan de forma apropiada, y suministrar información que permita tomar decisiones basadas en el conjunto de la información disponible. En este trabajo

utilizaremos métodos de dependencia, como es el análisis discriminante, y métodos de interdependencia, entre los que se utilizarán el análisis de componentes principales y el análisis factorial.

A partir de los datos disponibles, con los fines indicados anteriormente, se ha formado una matriz de trabajo 83 x 10, en la que las 83 muestras constituyen las filas de la matriz y las columnas son las 10 variables que corresponden a los contenidos de formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona, propionaldehído, crotonaldehído, 2-butanona + butiraldehído, benzaldehído, valeraldehído, *p*-tolualdehído y hexaldehído, en las muestras de humo.

Con objeto de prevenir la influencia excesiva que pueden ejercer aquellos resultados que presentan valores alejados de la tendencia central, se realizó un pretratamiento de los datos consistente en la estandarización de los mismos C_{Eij} , de acuerdo con la siguiente expresión:

$$C_{Eij} = (C_{ij} - \overline{C_j}) / S_j$$

en la que S representa la desviación estándar, i cada uno de los compuestos y j cada uno de los materiales empleados en el estudio. Para los analitos cuya concentración no se ha podido establecer en alguna muestra, con el procedimiento analítico empleado, se ha utilizado el criterio de considerar un valor cero para su concentración, mientras que para aquellos compuestos detectados pero en concentraciones que se encuentran por debajo del límite de cuantificación, se ha empleado como valor de concentración el correspondiente a su límite de detección.

Análisis de componentes principales

En análisis multivariante, el tratamiento conjunto de todos los datos puede dificultar en ocasiones el establecimiento de relaciones o de tendencias. Por otra parte, sucede con frecuencia, como en nuestro caso, que entre las variables existe una cierta correlación y, en consecuencia, el análisis simultáneo del conjunto de datos disponibles nos puede llevar a obtener información redundante. En estas circunstancias, puede ser conveniente reducir la matriz de trabajo. El análisis de componentes principales es una técnica estadística que se

basa en establecer variables como las indicadas, que habitualmente se conocen como componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales que describen cada muestra.

A partir de las concentraciones de las variables utilizadas en este estudio, se han establecido los autovalores o valores propios correspondientes a los componentes principales que corresponden a las diez variables seleccionadas. Estos valores que, como es sabido, representan la cantidad de la varianza total que es explicada por el componente considerado, se encuentran en la Tabla V.10. Además, en dicha tabla, también se ha incluido la proporción de varianza explicada por cada uno de los componentes principales y la varianza acumulada.

Tabla V.10. Coeficientes y varianzas asociadas a los componentes principales.

Componente número	Valores propios	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
1	4.799	47.99	47.99
2	2.994	29.94	77.93
3	1.057	10.57	88.50
4	0.664	6.64	95.14
5	0.198	1.98	97.12
6	0.105	1.05	98.17
7	0.069	0.69	98.86
8	0.055	0.55	99.41
9	0.032	0.32	99.73
10	0.027	0.27	100.00

Los resultados incluidos en la Tabla V.10 nos facilitan la elección del número de componentes principales a seleccionar en el análisis de datos a realizar. Aunque no existen reglas definidas en cuanto al número de componentes que se deben utilizar, dos criterios fundamentales a tener en cuenta en los análisis mediante componentes principales son, por una parte, utilizar un número mínimo de variables y, por otro, que sean suficientes para explicar un elevado porcentaje de la varianza acumulada. En atención a los valores incluidos en la Tabla V.10, parece razonable utilizar los cuatro primeros componentes principales, con los que se explica el 95.1% de la varianza. Podría añadirse un quinto componente, pero sólo

aumentaríamos en un 2.0% la varianza explicada o, al contrario, quedarnos con tres componentes, pero ya reduciríamos en un 6.6% el porcentaje de varianza. En la Tabla V.11, incluida a continuación, se han agrupado los coeficientes que nos permitirían establecer las ecuaciones correspondientes a los cuatro componentes principales.

Tabla V.11. Coeficientes correspondientes a los componentes principales.

Variable	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
Ace	0.421	-0.177	-0.149	0.039
Acr + Acet	0.426	0.009	0.091	-0.156
Ben	0.018	0.278	-0.657	-0.682
Cro	0.313	0.198	-0.485	0.465
For	0.252	0.436	-0.070	0.344
Hex	0.104	0.507	0.358	-0.142
Buta + Buti	0.436	-0.061	0.069	0.075
Tol	0.088	0.515	0.348	-0.178
Pro	0.410	-0.182	0.144	-0.209
Val	0.320	-0.321	0.151	-0.270

En este caso, vemos que en el primer componente principal, CP1, los compuestos de mayor peso son acetaldehído, acroleína + acetona, 2-butanona + butiraldehído y propionaldehído, mientras que es casi nulo con *p*-tolualdehído y benzaldehído. En cuanto al segundo componente principal, CP2, las variables de mayor peso son hexaldehído y *p*-tolualdehído. Por último, CP3 y CP4 tienen en el benzaldehído la variable de mayor peso, aunque para ambos, el crotonaldehído es una variable también importante.

La Figura V.15 nos muestra los resultados correspondientes a los pesos de los dos primeros componentes principales (CP1 y CP2), obtenidos a partir de las variables utilizadas para la caracterización de las muestras de humo, que representa la contribución de cada variable a la formación del componente principal.

Puede observarse que las variables que mayor peso ejercen, en sentido positivo, sobre el componente principal 1 son: acroleína + acetona, 2-butanona + butiraldehído, acetaldehído y propionaldehído. Con respecto al CP2, las variables más influyentes son el *p*-tolualdehído y

hexaldehído, ambas en sentido positivo, mientras que el valeraldehído es la más influyente en sentido negativo. El resto de los compuestos tienen una menor contribución a los componentes principales 1 y 2. También se puede observar una asociación entre el *p*-tolualdehído y el hexaldehído, que son los componentes con mayor contribución al CP2, y entre la acroleína + acetona, 2-butanona + butiraldehído, acetaldehído y propionaldehído, que muestran los mayores coeficientes en el CP1. Como luego se comentará, estas asociaciones pueden estar relacionadas con características de los compuestos, como la volatilidad, que son importantes a la hora de justificar su mayor o menor presencia en las muestras de humo.

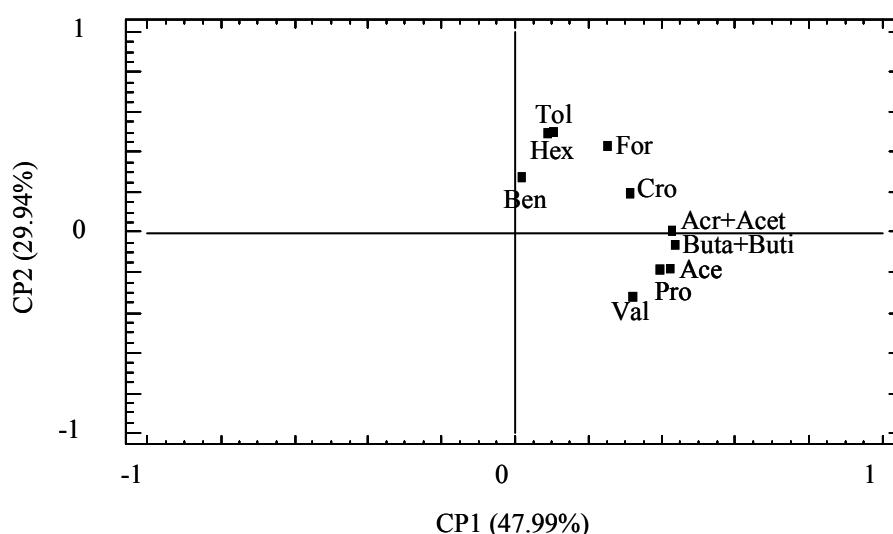


Figura V.15. Gráfico de los pesos proyectados en el espacio CP1 frente a CP2.

Como complemento a lo anterior, en la Figura V.16 se muestra el gráfico conocido como de los scores, que representa la proyección de las muestras de humo obtenidas a partir de los seis tipos de materiales empleados como combustibles, contemplando las diez variables citadas anteriormente, sobre el espacio de los dos primeros componentes principales. Mediante este gráfico puede observarse la tendencia, en cuanto a formar agrupaciones, de los distintos tipos de muestras, facilitando establecer la variabilidad de las observaciones y si existe alguna que se encuentre representada por valores que se alejen considerablemente de los ejes representativos de cada uno de los dos componentes principales seleccionados. En la figura, se observa que hay una gran dispersión con respecto al primer componente, mientras que con respecto al CP2 la mayoría de las observaciones se sitúan en las proximidades de los

valores centrales, a excepción de las muestras de humo de madera de pino y de penca de tunera.

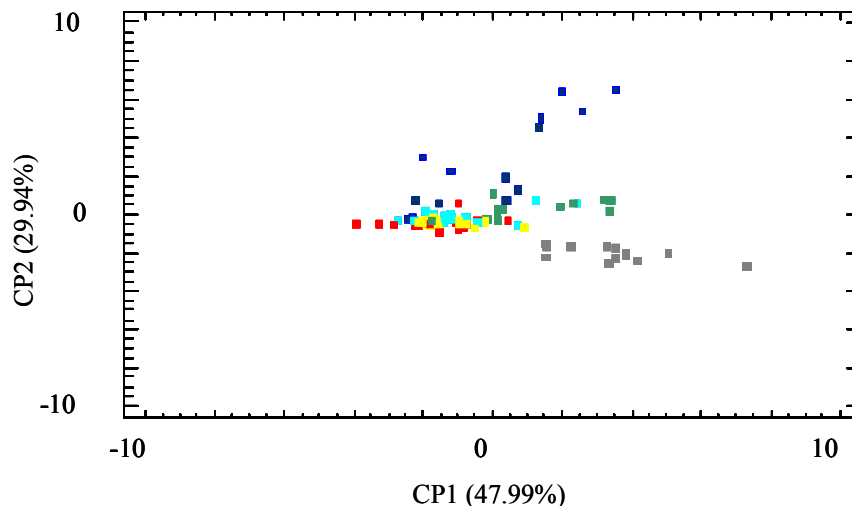


Figura V.16. Gráfico de los scores de las muestras de humo proyectadas en el espacio de CP1 frente a CP2 (■ Acícula de pino, ■ Brezo, ■ Cáscara de almendra, ■ Pino, ■ Jara, ■ Penca de tunera).

En relación con la agrupación de las muestras de humo, atendiendo a la naturaleza de los materiales utilizados como combustibles, se observa una tendencia considerable a la agrupación homogénea de las muestras de humo obtenidas a partir maderas de brezo y jara, acícula de pino y cáscara de almendra. En sentido contrario, las muestras correspondientes a los humos de madera de pino y de penca de tunera muestran una gran dispersión, al tiempo que los resultados representativos de esta última parecen mostrar unas características muy diferenciadas.

Por su complementariedad con el gráfico de scores, en el análisis de componentes principales se utiliza en ocasiones otro tipo de gráfico conocido como biplot, en el que se proyectan simultáneamente variables y muestras sobre el nuevo espacio de componentes principales. En el presente caso, este gráfico revela que los compuestos: *p*-tolualdehído, hexaldehído y formaldehído, son los que más influyen sobre las muestras de humo de madera de pino; los pares acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído sobre las muestras obtenidas a partir madera de jara y el valeraldehído sobre las muestras de humo correspondientes a la penca de tunera.

La información obtenida mediante el análisis de componentes principales, permite establecer tendencias acerca del agrupamiento de las muestras y sobre el peso relativo de las variables representadas por las concentraciones de los compuestos carbonílicos seleccionados. Ahora bien, la información obtenida es poco concluyente, por lo que se ha optado por realizar un análisis de factores.

Análisis de factores

El análisis de componentes principales y el análisis de factores están muy relacionados. Se puede considerar el segundo como una etapa del primero o considerar como técnicas diferentes. Como ya hemos señalado, el análisis de componentes principales trata de hallar componentes que sucesivamente expliquen la mayor parte de la varianza total. Por su parte, el análisis factorial busca factores que expliquen la mayor parte de la varianza común. Es decir, mientras que el análisis de componentes principales busca hallar combinaciones lineales de las variables originales, que expliquen la mayor parte de la variación total, el análisis factorial pretende hallar un nuevo conjunto de variables, menor en número que las variables originales, que exprese lo que es común a esas variables. El análisis factorial supone que existe un factor común subyacente a todas las variables.

Tabla V.12. Coeficientes de las variables en cada uno de los componentes después de una rotación Varimax.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
Ace	0.895	-0.153	0.379	0.020
Acr + Acet	0.872	0.263	0.254	0.051
Ben	-0.090	0.155	0.157	0.970
Cro	0.319	0.120	0.909	0.191
For	0.148	0.662	0.700	0.080
Hex	-0.014	0.976	0.112	0.079
Buta + Buti	0.882	0.127	0.360	-0.095
Tol	-0.044	0.979	0.087	0.108
Pro	0.974	0.013	0.073	-0.049
Val	0.896	-0.217	-0.124	-0.091

La Tabla V.12 muestra los coeficientes que afectan a cada una de las variables, al establecer las ecuaciones que permiten estimar los factores comunes, después de que se haya realizado una rotación Varimax. Puede observarse que en el primer factor las variables con mayor peso son: propionaldehído, valeraldehído, acetaldehído, así como los pares acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído. En el segundo factor, el *p*-tolualdehído junto con el hexaldehído son las variables con mayor peso. Para el tercer y cuarto factor, el crotonaldehído y el benzaldehído, respectivamente, son las variables con mayor influencia.

Los resultados anteriores, referidos a los tres primeros factores, se pueden observar en la gráfica siguiente, que muestra los pesos de las variables en 3 dimensiones después de una rotación Varimax:

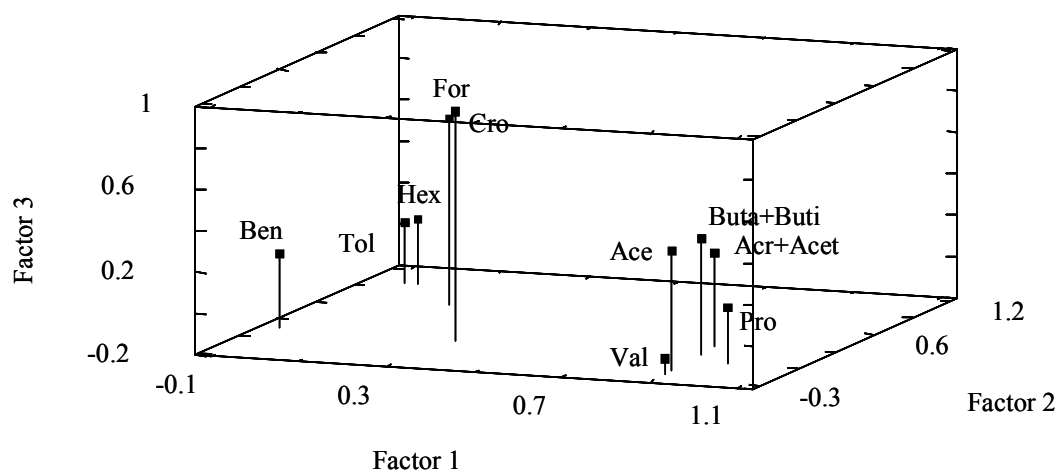


Figura V.17. Gráfico de los pesos en 3D después de la rotación Varimax.

El primer factor reúne a todos los aldehídos lineales seleccionados que poseen cinco o menos átomos de carbono en su molécula, es decir, aquellos que, entre los seleccionados, poseen menores pesos moleculares. En general todos estos compuestos carbonílicos poseen puntos de ebullición inferiores a 80°C, excepto el valeraldehído con 103°C. Constituye una excepción el formaldehído, el aldehído lineal más ligero, aunque se trata de un compuesto que a temperatura ambiente se encuentra en estado gaseoso. Así mismo, entre las variables que ejercen una influencia importante en el primer factor, también se encuentran las cetonas: acetona y 2-butanona, y el aldehído olefínico de menor peso molecular, la acroleína. Estos últimos compuestos también poseen puntos de ebullición inferiores a 80°C. En consecuencia, el primer factor podría ser el que, en términos generales, agrupa los aldehídos y cetonas que a

temperatura ambiente poseen una volatilidad considerable o son semivolátiles.

El aldehído lineal más pesado entre los seleccionados, el hexaldehído, y uno de los dos aldehídos aromáticos considerados, el *p*-tolualdehído, son los que mayor peso ejercen sobre el segundo factor, mientras que el otro aldehído aromático analizado en las muestras de humo, el benzaldehído, aporta el mayor coeficiente en el cuarto factor. Todos estos compuestos poseen puntos de ebullición que superan los 130°C. El crotonaldehído, aldehído olefinico con un punto de ebullición ligeramente superior a 100°C, similar al que muestra el valeraldehído, es el componente que ejerce mayor peso en el tercer factor. En función del punto de ebullición, podríamos diferenciar dos grandes grupos de compuestos, el constituido por los derivados volátiles o semivolátiles, que se agrupan en el primer factor, y los poco volátiles, que se reparten en los restantes factores. El valeraldehído, con estructura lineal, y el crotonaldehído, de carácter olefinico, son los aldehídos que pueden considerarse como compuestos de transición entre los mencionados grupos.

El gran número de factores que condicionan la composición cuantitativa de las muestras de humo, la complejidad de los procesos de degradación térmica de los combustibles y las características químicas y físicas de los aldehídos y cetonas considerados, en función de la temperatura, humedad, contenido en aire, etc., dificultan considerablemente el establecer relaciones entre la agrupación de variables y la composición en celulosa, hemicelulosa o lignina, de los restos vegetales sometidos a combustión. En cualquier caso, es posible que, tal como hemos comentado anteriormente, la volatilidad de los componentes puede condicionar de forma decisiva la composición de las muestras.

Análisis discriminante lineal

Con este método se pretende encontrar una función discriminante por combinación lineal de variables que, en nuestro caso, son los ocho compuestos individuales y las dos mezclas binarias, representados por las concentraciones halladas en cada una de las muestras de humo, de manera que las muestras procedentes de la combustión de un material determinado deberán presentar valores similares de dicha función, mientras que los procedentes de otros materiales conducirán a valores de la misma suficientemente diferentes. Obtendremos así, una función discriminante que nos permitirá diferenciar entre grupos de variables. En consecuencia, el análisis discriminante lineal podría ser adecuado para intentar

identificar las características que definen a los seis tipos de humos utilizados en este trabajo, a partir de la información suministrada por los compuestos carbonílicos analizados, así como, determinar los derivados que más contribuyen a diferenciar entre los distintos tipos de humos.

Para la realización del análisis discriminante, se ha utilizado el conjunto de las variables independientes, previamente normalizadas, como antes se ha comentado. Con objeto de establecer si las asignaciones a grupos son correctas, se ha seguido el método de validación cruzada. En la Tabla V.13 se muestran algunos parámetros representativos de las funciones discriminantes obtenidas. Se observa que cinco funciones explican el 100% de la varianza de discriminación. Ahora bien, la quinta función sólo es significativa a un nivel de confianza superior al 79.0% y con un valor de correlación muy bajo. Sin embargo, las cuatro primeras funciones son estadísticamente significativas a un nivel de confianza superior a 99.9% y, en conjunto, suman un porcentaje de varianza del 99.4%. El mayor nivel de significación y las correlaciones que presentan valores superiores a 0.90, corresponden a las dos primeras funciones que explican, por si solas, el 82.9% de la varianza de discriminación.

Tabla V.13. Características de las funciones discriminantes obtenidas.

Función discriminante	Autovalor	% Varianza	% Acumulado	Correlación canónica	Nivel de significación, P
1	10.8	53.2	53.2	0.957	< 0.001
2	6.0	29.6	82.9	0.926	< 0.001
3	2.5	12.2	95.1	0.844	< 0.001
4	0.9	4.3	99.4	0.683	< 0.001
5	0.1	0.6	100.0	0.328	0.210

Por otra parte, en la Tabla V.14 se han agrupado los coeficientes de correlación correspondientes a las 4 primeras funciones, es decir, de las funciones que presentan mayor capacidad discriminante y que, de alguna manera, incluyen la contribución de los distintos compuestos carbonílicos cuando se pretende diferenciar entre muestras de humo atendiendo a los diferentes materiales utilizados para realizar la combustión. La primera función discrimina en función de los compuestos valeraldehído y acetaldehído, mientras que en la segunda función no se observa un patrón claro de separación. Los compuestos formaldehído, *p*-tolualdehído, hexaldehído y crotonaldehído son los responsables de clasificar a los

materiales en la tercera función. La cuarta función, cuyo poder discriminante no es muy alto, parece estar relacionada con los analitos 2-butanona + butiraldehído, propionaldehído y benzaldehído.

Tabla V.14. Matriz estructura de las funciones discriminantes.
Correlaciones intra-grupo combinadas entre las variables discriminantes y las funciones discriminantes canónicas tipificadas.

Variables	Función discriminante			
	1	2	3	4
Val	*0.806	-0.069	-0.136	0.056
Ace	*0.350	-0.139	0.170	-0.316
For	-0.012	0.016	*0.705	-0.113
Tol	-0.101	0.387	*0.485	0.030
Hex	-0.088	0.363	*0.447	0.046
Cro	0.035	-0.216	*0.432	-0.096
Buta + Buti	0.291	-0.039	0.197	*-0.490
Pro	0.429	0.052	0.034	*-0.453
Ben	-0.107	0.018	0.052	*0.229
Acr + Acet	0.263	0.124	0.287	-0.358

* Mayor correlación absoluta entre cada variable y cualquier función discriminante.

En la Figura V.18 se muestra la clasificación de las muestras de humo en base a las dos primeras funciones discriminantes. Se puede observar que los seis grupos representativos de las muestras correspondientes a los seis tipos de materiales empleados como combustibles, aparecen bien clasificados en la mayoría de los casos. La discriminación de las muestras obtenidas a partir de madera de pino, de madera de jara y de penca de tunera, es completa, entre ellas y con las restantes. También se consigue la separación de las muestras de acícula de pino y cáscara de almendra, aunque no sea de una forma tan nítida como la alcanzada para las muestras representativas de los materiales citados anteriormente. La mayor dificultad corresponde a la discriminación de las muestras de humo obtenidas a partir de la madera de brezo. Los resultados correspondientes a las muestras de humo procedentes de quemar este

material presentan un elevado grado de solapamiento con las representativas de la cáscara de almendra y, en menor proporción, con las obtenidas a partir de acícula de pino. Los resultados obtenidos son concordantes con los que puedan obtenerse mediante la utilización de los parámetros indicadores comentados anteriormente, aunque es evidente la mejor definición que puede alcanzarse con el empleo de métodos de análisis discriminante.

El éxito del análisis discriminante lineal, al distribuir correctamente en grupos o asignar a un grupo determinado un objeto, puede verificarse de varias formas. Uno de los métodos habituales es el conocido como validación cruzada, en el que se establece la función discriminante tomando en consideración (n-1) objetos y, a continuación, se verifica si la función asigna correctamente al objeto omitido. El procedimiento se repite una vez para cada objeto y se establece nuevamente el nivel de éxito alcanzado.

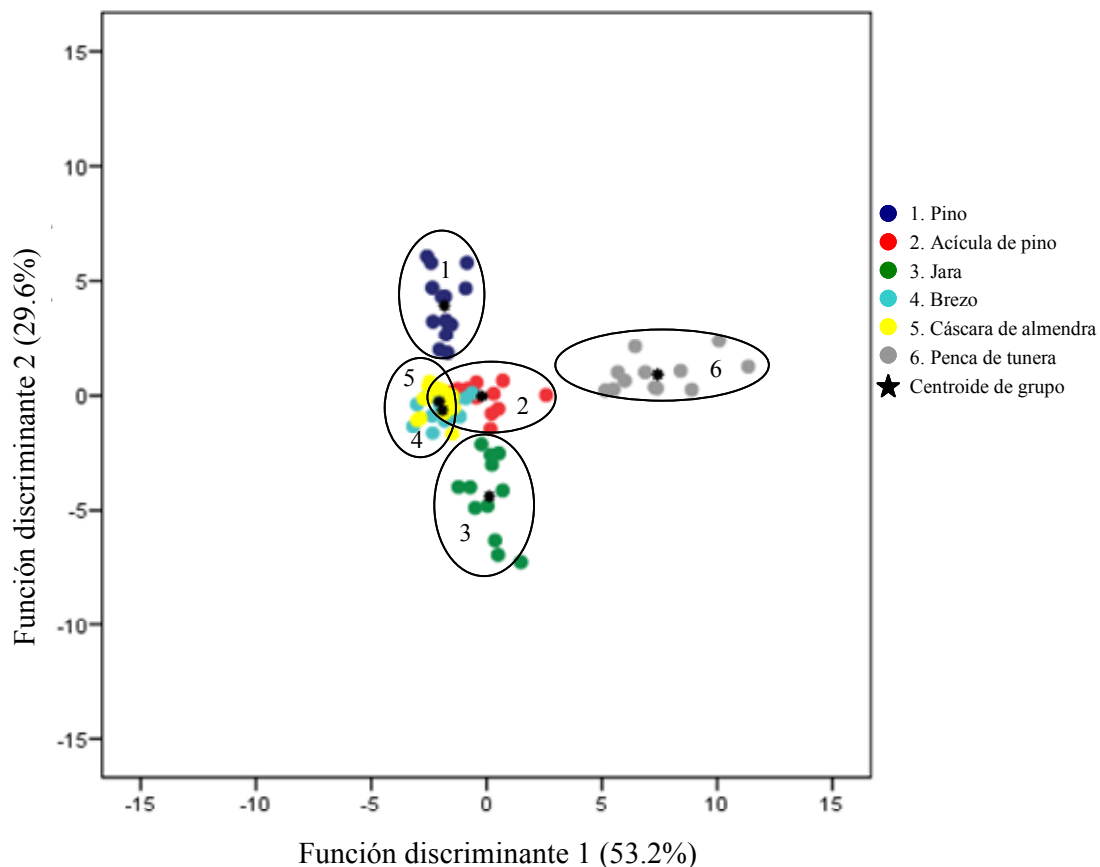


Figura V.18. Clasificación de las muestras de humos producidas por la combustión de los 6 materiales sobre las dos primeras funciones discriminantes.

La Tabla V.15 muestra la clasificación obtenida utilizando todas las muestras de humo analizadas, con el empleo del procedimiento de validación cruzada. Como se observa, el procedimiento de clasificación ha funcionado correctamente en un 92% de los casos agrupados originales y un 83% si el procedimiento seguido en la evaluación de la eficiencia ha sido el de la validación cruzada.

Tabla V.15. Resultados de la clasificación.

Material original	Grupo de pertenencia pronosticado (%)					
	Pino	Acícula de pino	Jara	Brezo	Cáscara de almendra	Penca de tunera
Original	Pino	100	0	0	0	0
	Acícula de pino	0	100	0	0	0
	Jara	0	8.3	91.7	0	0
	Brezo	0	0	0	100	0
	Cáscara de almendra	0	0	0	33.3	66.7
	Penca de tunera	0	0	0	0	100
Validación cruzada	Pino	85.7	0	0	7.1	7.1
	Acícula de pino	0	92.9	0	7.1	0
	Jara	0	8.3	91.7	0	0
	Brezo	0	0	0	76.9	23.1
	Cáscara de almendra	0	0	0	38.9	61.1
	Penca de tunera	0	0	0	0	100

V.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Azcón-Bieto J., Talón M. Fundamentos de fisiología vegetal, *Mc-Graw Hill (Ed)*, Madrid (2000).
- [2] Coll J.B., Rodrigo G.N., García B.S., Tamés R.S. Fisiología vegetal, *Pirámide (Ed)*, Madrid (2001).
- [3] Sun R.C., Sun X.F. Fractional and structural characterization of hemicelluloses isolated by alkali and alkaline peroxide from barley straw. *Carbohydrate Polymers*, **49**, 415-423 (2002).
- [4] Chaikumpollert O., Methacanon P., Suchiva K. Structural elucidation of hemicelluloses from Vetiver grass. *Carbohydrate Polymers*, **57**, 191-196 (2004).
- [5] Nimz H. Beech lignin-proposal of a constitutional scheme. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, **13**, 313-321 (1974).
- [6] Holtzaple M.T. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, *R. Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler (Eds)*, Academic Press, Vol 4, Londres, San Diego (1993).
- [7] Clifford M.N., Storey R.M., Ahmad J.I. Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition, *R. Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler (Eds)*, Academic Press, Vol 6, Londres, San Diego (1993).
- [8] Roberts A.F. A review of kinetics data for the pyrolysis of wood and related substances. *Combustion and Flame*, **14**, 261-272 (1970).
- [9] Demirbas A. Combustion characteristics of different biomass fuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, **30**, 219-230 (2004).
- [10] Simoneit B.R.T. Biomass burning - A review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Applied Geochemistry*, **17**, 129-162 (2002).
- [11] Zheng G., Kozinski J.A. Thermal events occurring during the combustion of biomass residue. *Fuel*, **79**, 181-192 (2000).
- [12] Paris O., Zollfrank C., Zickler G.A. Decomposition and carbonisation of wood biopolymers - a microstructural study of softwood pyrolysis. *Carbon*, **43**, 53-66 (2005).
- [13] Feng Y., Wen S., Wang X., Sheng G., He Q., Tang J., Fu J. Indoor and outdoor carbonyl compounds in the hotel ballrooms in Guangzhou, China. *Atmospheric Environment*, **38**, 103-112 (2004).
- [14] Sandner F., Dott W., Hollender J. Sensitive indoor air monitoring of formaldehyde and other carbonyl compounds using the 2,4-dinitrophenylhydrazine method. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, **203**, 275-279 (2001).
- [15] Dong J.Z., Moldoveanu S.C. Gas chromatography-mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, **1027**, 25-35 (2004).
- [16] Baek S.O., Jenkins R.A. Characterization of trace organic compounds associated with aged and diluted sidestream tobacco smoke in a controlled atmosphere—volatile

- organic compounds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmospheric Environment*, **38**, 6583-6599 (2004).
- [17] Oliva-Teles M.T., Paíga P., Delerue-Matos C.M., Alvim-Ferraz M.C.M. Determination of free formaldehyde in foundry resins as its 2,4-dinitrophenylhydrazone by liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **467**, 97-103 (2002).
- [18] Hays M.D., Fine P.M., Geron C.D., Kleeman M.J., Gullett B.K. Open burning of agricultural biomass: Physical and chemical properties of particle-phase emissions. *Atmospheric Environment*, **39**, 6747-6764 (2005).
- [19] Oros D.R., Simoneit B.R.T. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 1. Temperate climate conifers. *Applied Geochemistry*, **16**, 1513-1544 (2001).
- [20] Oros D.R., Simoneit B.R.T. Identification and emission factors of molecular tracers in organic aerosols from biomass burning Part 2. Deciduous trees. *Applied Geochemistry*, **16**, 1545-1565 (2001).
- [21] Lemieux P.M., Lutes C.C., Santoianni D.A. Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Progress in Energy and Combustion Science*, **30**, 1-32 (2004).
- [22] Barrefors G., Petersson G. Volatile hydrocarbons from domestic wood burning. *Chemosphere*, **30**, 1551-1556 (1995).
- [23] Moeller M., Randahl T., Alfheim I., Schjodager J. Mutagenic activity and PAH-analysis of airborne particles from a woodheating community in Norway. *Environment International*, **11**, 189-195 (1985).
- [24] Standley L.J., Simoneit B.R.T. Preliminary correlation of organic molecular tracers in residential wood smoke with the source of fuel. *Atmospheric Environment*, **24**, 67-73 (1990).
- [25] Yara C., De Almeida D., Radler F. Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. *Atmospheric Environment*, **36**, 3009-3019 (2002).
- [26] Johansson L.S., Leckner B., Gustavsson L., Cooper D., Tullin C., Potter A. Emission characteristics of modern and old-type residential boilers fired with wood logs and wood pellets. *Atmospheric Environment*, **38**, 4183-4195 (2004).
- [27] McDonald J.D., Zielinska B., Fujita E.M., Sagebiel J.C., Chow J.C., Watson J.G. Fine particle and gaseous emission rates from residential wood combustion. *Environmental Science and Technology*, **34**, 2080-2091 (2000).
- [28] Sanders E.B., Goldsmith A.I., Seeman J.I. A model that distinguishes the pyrolysis of D-glucose, D-fructose, and sucrose from that of cellulose. Application to the understanding of cigarette smoke formation. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **66**, 29-50 (2003).
- [29] Ingemarsson A., Nilsson U., Nilsson M., Pedersen J.R., Olsson J.O. Slow pyrolysis of spruce and pine samples studied with GC/MS and GC/FTIR/FID. *Chemosphere*, **36**, 2879-2889 (1998).

- [30] Schauer J.J., Kleeman M.J., Cass G.R., Simoneit B.R.T. Measurement of emissions from air pollution sources. 3. C1-C29 Organic compounds from fireplace combustion of wood. *Environmental Science and Technology*, **35**, 1716-1728 (2001).
- [31] Hedberg E., Kristensson A., Ohlsson M., Johansson C., Johansson P.A., Swietlicki E., Vesely V., Wideqvist U., Westerholm R. Chemical and physical characterization of emissions from birch wood combustion in a wood stove. *Atmospheric Environment*, **36**, 4823-4837 (2002).
- [32] Poligné I., Collignan A., Trystram G. Characterization of traditional processing of pork meat into boucané. *Meat Science*, **59**, 377-389 (2001).
- [33] Kataoka H., Kondo T., Sumida A. Gas chromatographic determination of aldehydes in combustion smoke samples. *Analytica Chimica Acta*, **358**, 269-275 (1998).
- [34] Lee R.S., Lin J.M. Gaseous aliphatic aldehydes in smoke from burning raw materials of chinese joss sticks. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **57**, 361-366 (1996).
- [35] Gustafson P., Barregard L., Strandberg B., Sällsten G. The impact of domestic wood burning on personal, indoor and outdoor levels of 1,3-butadiene, benzene, formaldehyde and acetaldehyde. *Journal of Environmental Monitoring*, **9**, 23-32 (2007).
- [36] Lee S.C., Wang B. Characteristics of emissions of air pollutants from burning of incense in a large environmental chamber. *Atmospheric Environment*, **38**, 941-951 (2004).
- [37] Lin J.M., Wang L.H. Gaseous aliphatic aldehydes in Chinese incense smoke. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**, 374-381 (1994).
- [38] Lin J.M., Tang C.S. Characterization and aliphatic aldehyde content of particulates in chinese incense smoke. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **53**, 895-901 (1994).
- [39] Ho S.S.H., Yu J.Z. Concentrations of formaldehyde and other carbonyls in environments affected by incense burning. *Journal of Environmental Monitoring*, **4**, 728-733 (2002).
- [40] Maga J.A. Smoke in Food Processing, *CRC Press, Boca Raton, Florida* (1988).
- [41] Girard J.P. Tecnología de la Carne y de los Productos Cárnicos, *Acribia (Ed)*, Zaragoza (1991).
- [42] Guillén M.D., Ibargoitia M.L. Relationships between the maximum temperature reached in the smoke generation processes from vitis vinifera L. shoot sawdust and composition of the aqueous smoke flavoring preparations obtained. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1302-1307 (1996).
- [43] Nilsson M., Ingemarsson A., Pedersen J.R., Olsson J.O. Slow pyrolysis of birch (betula) studied with GC/MS and GC/FTIR/FID. *Chemosphere*, **38**, 1469-1479 (1999).
- [44] Williams P.T., Besler S. The influence of temperature and heating rate on the slow pyrolysis of biomass. *Renewable Energy*, **7**, 233-250 (1996).
- [45] Rowell R. The Chemistry of Solid Wood. Advances in Chemistry. *American Chemical Society (Ed)*, Washington (1984).
- [46] Ramos G.R., Álvarez-Coque M.C.G. Quimiometría, *Síntesis S.A. (Ed)*, Madrid (2001).

- [47] Breretan R.G. Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant, Wiley (Ed), Inglaterra (2003).
- [48] Montgomery D.C. Introduction to Statistical Quality Control, 3rd Edition, Wiley (Ed), Canada (1997).
- [49] Shepson P.B., Hastie D.R., Schiff H.I., Polizzi M., Bottenheim J.W., Anlauf K., Mackay G.I., Karecki D.R. Atmospheric concentrations and temporal variations of C1– C3 carbonyl compounds at two rural sites in central Ontario. *Atmospheric Environment*, **25**, 2001 (1991).
- [50] Grosjean D. Formaldehyde and other carbonyls in Los Angeles ambient air. *Environmental Science and Technology*, **16**, 254-262 (1982).



Capítulo VI

*Determinación de compuestos carbonílicos en
muestras de queso*

VI.1. INTRODUCCIÓN

En atención a los objetivos planteados en este trabajo, en los capítulos anteriores se ha centrado la atención en la caracterización de muestras de humo y se han desarrollado metodologías analíticas adecuadas a tal finalidad, cuya implantación ha estado condicionada, de alguna manera, por la naturaleza de la muestra. Por otra parte, se ha hecho alusión al potencial interés del queso ahumado. Al referirnos al mismo como muestra objeto de análisis, hemos de considerar que nos encontramos ante un alimento que posee unas características que evolucionan a lo largo de su maduración y que, en un momento determinado, se expone a la acción del humo, con lo cual adquiere unas propiedades organolépticas que el consumidor espera encontrar cuando consume el producto. Las características de los compuestos carbonílicos comentadas anteriormente y, en especial, las relacionadas con su contribución al flavor del queso y con su toxicidad, justifican el interés que pueda existir por la determinación de este tipo de analitos en muestras de queso ahumado.

Aunque los analitos objeto de atención sean, al menos en parte, similares a los considerados anteriormente, la naturaleza de la matriz en la que se encuentran obliga a introducir modificaciones en las metodologías analíticas. Si bien los cambios necesarios en la etapa de medida son de escasa relevancia y la toma de muestra no impone los condicionantes que hemos encontrado en las muestras de humo, el tratamiento de la muestra se complica de forma considerable por el elevado contenido en grasa que suelen presentar las muestras de queso. Ahora bien, con frecuencia, la naturaleza de los problemas sobre los que se quiere informar y, por consiguiente, la finalidad de los resultados analíticos, condiciona la metodología a utilizar a lo largo de las etapas experimentales del proceso analítico. En el caso que nos ocupa, la información acerca de la potencial relación entre los contenidos de compuestos carbonílicos en los quesos y la naturaleza de los mismos, se procura alcanzar, como luego comentaremos, sin necesidad de conseguir la disolución total de la muestra.

VI.1.1. COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL QUESO

Según se comentó en la Introducción General, los compuestos carbonílicos forman parte de los componentes que, de forma natural, podemos encontrar en el queso. Durante la maduración se producen transformaciones de los productos originados en los procesos de

glucólisis, lipólisis y proteólisis [1], que son, en gran parte, responsables de los cambios de textura, del sabor y olor de los quesos. Entre las sustancias químicas formadas se encuentran ácidos grasos, alcoholes, metilcetonas, aldehídos, lactonas y ésteres [2,3], que juegan un papel importante en el contenido global de los constituyentes del flavor. Por otra parte, ya hemos comentado que en el humo pueden encontrarse cantidades importantes de compuestos carbonílicos que interactúan con el queso durante el proceso de ahumado.

Diferentes aldehídos y cetonas han sido determinados en quesos sin ahumar. Entre los primeros se encuentran aldehídos alifáticos saturados y aldehídos aromáticos, que pueden proceder tanto de ácidos carboxílicos como de aminoácidos, siendo los más importantes el hexanal, nonanal, decanal, undecanal y dodecanal, aunque también ha sido descrita la presencia de alquil-derivados como el 2-metilbutanal y el 3-metilbutanal [4-6]. Estos compuestos se han encontrado, en su mayoría, en cantidades traza desde la primera semana de maduración en la corteza de algunos quesos. Aunque es relativamente frecuente que no se detecte la presencia de aldehídos insaturados, se ha descrito la presencia de acroleína en queso Manchego [5,6]. Entre los aldehídos aromáticos, se ha establecido la presencia de algunos como: benzaldehído, hidroxibenzaldehído y bencenoacetaldehído, que son componentes comunes en los quesos.

Los aldehídos suelen originarse a partir de aminoácidos libres presentes en el queso, según puede observarse en la Figura I.4, incluida en la Introducción General de esta tesis, mediante procesos de transaminación o de descarboxilación. Estas reacciones son simples y pueden ocurrir sin catálisis enzimática durante la maduración [7]. Los aldehídos pueden considerarse como compuestos transitorios en los quesos, puesto que se transforman, con cierta rapidez, en alcoholes o en los correspondientes ácidos [8-11]. Así, por ejemplo, el acetaldehído puede derivar de la treonina con la ayuda de la aldolasa treonina. Esta reacción ocurre con la participación de bacterias lácticas y en ella se produce la ruptura de la treonina para formar acetaldehído y glicina. Algunas bacterias lácticas pueden producir también acetaldehído a partir de glucosa [10,11]. La biosíntesis del benzaldehído no es bien conocida, pero puede ser originada por una α -oxidación del fenilacetaldehído o por una β -oxidación del ácido cinámico [12]. Sin embargo, se ha establecido que el acetaldehído, propionaldehído y aldehídos de cadena ramificada aumentan su concentración, de forma considerable, durante la maduración del queso Zamorano [13].

El número de cetonas que pueden encontrarse en los distintos tipos de queso también

es amplio, destacando, principalmente en los quesos azules, la presencia de un grupo constituido por algunas metilcetonas [14-17]. En quesos tipo Camembert y otros, las metilcetonas encontradas son, con diferencia, los compuestos más abundantes, siendo la 2-heptanona y la 2-nonanona las que suelen hallarse en mayores concentraciones, pudiendo decirse, incluso, que sus contenidos son desproporcionados, considerando la cantidad de los ácidos octanoico y decanoico presentes en la grasa de la leche. De hecho, el principal ácido graso en la misma es el ácido palmítico (C₁₆). De esta forma, puede decirse, en general, que los ácidos grasos correspondientes, probablemente no sean los únicos precursores de las metilcetonas presentes en los quesos.

Las cantidades de 2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona aumentan de manera regular durante la maduración del queso. Por su parte, las metilcetonas con cadenas que contienen un número par de átomos de carbono, excepto la 2-butanona, aparecen más tarde durante la maduración y no están nunca presentes en grandes cantidades, excepto en quesos muy maduros, que son también apropiados para metilcetonas no saturadas [2]. En quesos Camembert hechos con leche cruda, se han hallado un mayor número de cetonas con número impar de átomos de carbono, así como de metilcetonas ramificadas [2]. Otras cetonas como la acetona, también se ha detectado en quesos Camembert jóvenes [18], pero solamente en cantidades traza en los quesos maduros, y Moinas y col. [19] identificaron por primera vez propiofenona y 2-nonenona, en cantidades traza.

En este tipo de quesos, todas las metilcetonas están presentes desde el octavo día de la maduración progresiva. En 1973, estos mismos autores [18] identificaron 2-butanona y 2-pentanona solamente en quesos Camembert jóvenes, tendiendo estas cetonas a desaparecer durante la maduración, mientras que, al contrario, se producía un incremento en la concentración de 2-nonanona durante la maduración de los quesos jóvenes y se mantenía estable la de 2-heptanona.

En la formación de las metilcetonas durante la maduración de los quesos azules, son muy importantes los hongos, siendo sus precursores los ácidos grasos, según se indica en la Figura I.6, que se encuentra en la Introducción General de esta tesis. Para los microorganismos, la ruta metabólica allí incluida representa una vía de detoxificación de los ácidos grasos, que sólo necesita de una molécula de coenzima A. Pero la completa degradación necesita de dos moléculas, permitiendo un reciclado más rápido del cofactor [9]. A bajas concentraciones, los ácidos grasos son completamente oxidados a CO₂, y se forman

cantidades pequeñas de metilcetonas. La β -oxidación es un proceso particularmente importante como ruta metabólica, porque el 60% de los compuestos carbonílicos producidos por la acción de algunos hongos son metilcetonas [20]. En tal sentido, algunos hongos, como *Penicillium camemberti*, *Penicilium roqueforti*, *Geotricum candidum*, pueden provocar la formación de metilcetonas, especialmente: 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona y 2-undecanona, durante la maduración de distintos quesos [2].

En quesos españoles, se ha descrito la presencia de la 2-butanona, 2-pentanona y 2-heptanona en queso Zamorano [13], además de otras cetonas como el diacetilo. En quesos de La Serena, las cetonas halladas en mayor cantidad son la 2-butanona y 2-propanona [21,22] y en el queso Castellano, la 2-butanona y la 2,3-butanodiona [23]. También se han detectado otras cetonas como: 3-buten-2-ona, 4-metil-2-pentanona y 3-metil-2-pentanona, aunque en concentraciones muy bajas. En queso Manchego, se han detectado 2-pentanona y 2-heptanona como cetonas principales [24], mientras que 2-heptanona y 2-nonanona, son más representativas de quesos madurados con mohos [25].

También se ha descrito la presencia de otras cetonas en distintos tipos de quesos. Entre ellas, se encuentran las metilcetonas con número par de átomos de carbono: 2-butanona, 2-hexanona, 2-octanona y 2-decanona, así como la acetoína, diacetilo, acetofenona y propiofenona [26]. En general la presencia de estas cetonas en los quesos no se produce de forma generalizada y, cuando se detectan, suelen presentarse en concentraciones pequeñas.

En otro orden de cosas, muchos factores pueden condicionar las aportaciones de distintos aldehídos y cetonas al flavor de los quesos. Entre ellos, el tiempo de maduración debe constituir una variable importante. En estudios realizados para conocer la evolución temporal de las metilcetonas presentes en el extracto graso de los quesos, se ha establecido que su formación es bastante lenta pero constante [27]. Así mismo, al estudiar la diferencia en el contenido de cetonas en queso fresco y curado, se han encontrado en el queso fresco cetonas, como la 2,3-butanodiona, 2-pentanona y acetoína, probablemente producidas por un agente precursor, mientras que en el curado, destaca la presencia de acetona, 2-butanona, 2-heptanona y 2-nonanona [28].

Por otra parte, también se han detectado en quesos ahumados, un grupo de cetonas cíclicas, que suelen ser componentes típicos de los humos [29], entre las que suelen destacarse, como más importantes, las metil, dimetil y trimetil ciclopentanonas, que se han

podido detectar en la región interna del queso. Las dicetonas cíclicas procedentes del humo también se han podido detectar a niveles traza en el interior del queso. Por otra parte, se ha establecido la presencia de un número importante de cetonas aromáticas, la mayoría de ellas procedentes del humo, en la región exterior de los quesos. En cualquier caso, se estima que sólo aquellas cetonas que se encuentran en cantidades importantes en el humo podrán ser detectadas en la masa interior del queso [29]. No obstante, otras, como la vainillina, que es un componente típico del humo [30], es frecuente que no se detecte, al menos, en la región interior del queso ahumado.

Entre los aldehídos y cetonas más abundantes que se obtienen en la combustión de los materiales habituales en Canarias para obtener humo, destacan los siguientes: formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona y propionaldehído, suponiendo las aportaciones de estos aldehídos y cetonas al contenido total de compuestos carbonílicos entre el 90.7 y el 91.8% en los humos obtenidos por combustión de acícula de pino, maderas de jara y brezo, cáscara de almendra y penca de tunera. Ahora bien, en las distintas muestras de humo también se han cuantificado otros aldehídos y cetonas, algunos como el crotonaldehído, la mezcla 2-butanona + butiraldehído, el benzaldehído y el valeraldehído en los distintos tipos de humo, mientras que otros sólo se pueden determinar en el humo correspondiente a la combustión de materiales concretos, como sucede con el *p*-tolualdehído y el hexaldehído en las muestras de humo de madera pino. En consecuencia, según las previsiones comunes en la bibliografía, estos aldehídos y cetonas, y sobre todo los citados al comienzo del párrafo, son candidatos a formar parte de la corteza y posiblemente también de la masa comestible de los quesos ahumados en Canarias.

VI.1.2. METODOLOGÍAS ANALÍTICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS

En capítulos anteriores, se han tomado en consideración distintos aspectos relacionados con las metodologías analíticas para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de humo. Al cambiar ahora de matriz, siguen siendo válidas las consideraciones efectuadas en etapas esenciales del proceso analítico, como la derivatización de los analitos y el tratamiento y medida de las hidrazonas representativas de los aldehídos y cetonas a analizar. En consecuencia, al afrontar la determinación de los citados analitos en

muestras de queso, hemos de tomar en consideración que, en general, la información a obtener, relacionada con el flavor de los quesos, se suele obtener a partir de las fracciones volátil y grasa de los mismos y que, en consecuencia, al referirnos en este capítulo a metodologías analíticas, la atención debe centrarse preferentemente en la extracción de los analitos contenidos en las muestras.

Técnicas de extracción. Fracción volátil

En atención a la finalidad del trabajo, en el que se plantea la necesidad de realizar determinaciones analíticas relacionadas con los componentes del queso que intervienen en su flavor, resulta de especial interés el análisis de compuestos volátiles formados durante su maduración. En tal sentido, debe recordarse que, en este alimento, la mayoría de dichos componentes están presentes a nivel de trazas y requieren del aislamiento y concentración para proceder posteriormente a su análisis.

Un gran número de estudios relacionados con el flavor de los alimentos, se han llevado a cabo con la utilización de la cromatografía de gases, en conjunción con detectores basados en la ionización con llama o en la espectrometría de masas, con objeto de poder identificar y cuantificar los compuestos volátiles presentes en los alimentos objeto de análisis. Sin embargo, el análisis de componentes químicos no es suficiente para determinar los perfiles del aroma, porque no todos los compuestos son olorosos y, además, porque la contribución de los mismos al flavor no está directamente relacionado con su abundancia. En ese sentido, el análisis por cromatografía de gases en combinación con técnicas olfatométricas, puede ser una herramienta útil para establecer la naturaleza de los principales componentes activos, dentro de la mezcla compleja de sustancias que forman parte del aroma más o menos característico de un alimento dado.

Mediante análisis por cromatografía de gases-olfatometría, se ha establecido que, entre el gran número de compuestos volátiles que pueden estar presentes en el queso, sólo un número reducido de los mismos contribuyen, de forma significativa, a su flavor [31]. Es más, estos pocos componentes olorosos parecen depender bastante más del método de extracción usado que del propio tipo de queso en sí mismo, por lo menos desde un punto de vista cualitativo. Las principales diferencias que caracterizan las distintas variedades de queso, a través del análisis de componentes volátiles, probablemente están mucho más relacionadas

por las diferencias cuantitativas. En general, como apuntan Bosset y Gauch [32], el flavor del queso parece no depender de la concentración de un determinado compuesto en particular, pero sí de la proporción en la que se encuentren todos los componentes presentes. Esta conclusión apoya la teoría de equilibrio de los componentes enunciada por Kosikowski y Mocquot [33] para el queso Cheddar.

Recientes investigaciones han demostrado que son posibles análisis, en tiempos cortos, de las fracciones volátiles de distintas muestras, por medio de la espectrometría de masas. Así, el acoplamiento directo de un espectrómetro de masas con técnicas de extracción, tales como microextracción en fase sólida-espectrometría de masas [34-36], espacio en cabeza dinámico-espectrometría de masas [37-40] y espacio en cabeza estático-espectrometría de masas [41-43], permiten obtener las huellas dactilares de las muestras analizadas con o sin preconcentración de los componentes volátiles. Debido a su rapidez y a su bajo coste, estos métodos no separativos, en el sentido tradicional del término, pero que realmente se basan en una extracción gas-sólido, pueden usarse para clasificar o para estudiar características de calidad de un producto y, de hecho, se usan a menudo para el análisis de los productos derivados de la leche [44-48].

La extracción por espacio en cabeza tiene numerosas ventajas con respecto a otras técnicas, debido a que suele reducir considerablemente el tiempo que ordinariamente debe invertirse en la preparación de la muestra, puede facilitar aumentos de sensibilidad en las metodologías analíticas y limita los riesgos relacionados con el empleo de disolventes orgánicos [49].

Entre las técnicas de espacio en cabeza mayoritariamente empleadas se encuentra la microextracción en fase sólida; técnica relativamente reciente que se ha empleado para detectar compuestos volátiles, que ya ha sido aplicada en muestras de queso [36,50-52], y a la que se ha hecho referencia en el capítulo *IV*, al referirnos a las determinaciones de compuestos carbonílicos en muestras de humo. En condiciones óptimas, se pueden extraer compuestos de una cierta volatilidad [36], incluidos algunos ácidos grasos [53], lo que limita su aplicación a un rango relativamente estrecho de compuestos.

Debe señalarse, además, que los trabajos encontrados para determinar compuestos carbonílicos en la fracción volátil en el queso, mediante la técnica de microextracción en fase sólida, se centran fundamentalmente en la realización de determinaciones cualitativas,

analizando diferentes partes de las muestras de queso, o bien se ocupan de la evolución temporal de dichos compuestos, en distintos estados de maduración del mismo.

La técnica de purga y trampa se ha aplicado con éxito al análisis del aroma del queso, pero se requiere de un equipo específico. Además, este tipo de técnicas no son fácilmente automatizables, impidiendo un amplio abanico de aplicaciones. Por el contrario, el análisis del aroma por SPME puede realizarse con un bajo coste y con un equipamiento relativamente simple. La técnica de SPME puede automatizarse y es un método rápido para determinar la concentración de compuestos en el aroma de un queso sin necesidad del empleo de disolventes, mediante cromatografía de gases [52].

Fracción grasa

El flavor del queso es una mezcla de muchos compuestos volátiles, la mayoría procedentes del proceso de maduración al que haya estado sometido el queso. En general, los compuestos volátiles son bastante lipofílicos por lo que, al menos una parte importante de los mismos, se disuelven en la fracción grasa original del queso o se enlazan a las proteínas. En consecuencia, la determinación de estos compuestos también puede aportar una información importante al referirnos al flavor de los quesos, pues la liberación o retención selectiva de los aromas, en el transcurso de la masticación, depende tanto de la volatilidad de los constituyentes del aroma, como de la textura, de la que una parte fundamental es el contenido en grasa.

El primer paso para la determinación de los componentes del flavor asociado a la fracción grasa de los quesos, consiste en su extracción desde la matriz [54]. La extracción con disolventes, que es un método rápido y simple, ha sido usada con esta finalidad por diferentes investigadores [1,27,54-57]. La principal desventaja de este método de extracción es la baja concentración de compuestos en el extracto. Por otra parte, estas técnicas son generalmente rápidas y eficientes, pero deberían ser aplicadas a muestras con bajo contenido en grasa, para evitar las dificultades que las matrices grasas pueden introducir en el tratamiento de las muestras antes de su análisis.

Ante la dificultad de esta etapa, recientemente se ha introducido una metodología basada en que la mayoría de los compuestos presentes en la fracción grasa de los quesos se

disuelven, al menos parcialmente, en acetonitrilo y que, al mismo tiempo, muchos de ellos son componentes del flavor en los quesos [54]. De esta forma, el hecho experimental de mayor significación, ha consistido en la introducción del acetonitrilo como agente extractante. A las cualidades comentadas de este disolvente, se une la de poseer un bajo poder disolvente frente a los triglicéridos. De esta forma, la utilización de acetonitrilo para extraer componentes del flavor presentes en el queso, permite obtener disoluciones relativamente concentradas de los compuestos de interés y, al mismo tiempo, con bajas concentraciones de triglicéridos, proteínas y sales procedentes de la matriz del queso. Este extracto podría analizarse directamente para su inyección en cromatografía líquida o gaseosa [27], mientras que la matriz insoluble del queso puede ser descartada.

Según otros autores, la fracción soluble en agua de los quesos contiene los componentes que mayoritariamente contribuyen al flavor [58]. Esta fracción contiene aminoácidos, péptidos, sales minerales, ácido láctico, lactosa y compuestos volátiles. Aunque una parte de los compuestos volátiles se disuelven en la grasa, o se conjugan con sustancias insolubles, parece que aquellos que están presentes en la fracción soluble en agua podrían jugar un importante papel en el flavor del queso.

Se han detectado metilcetonas, con siete, nueve y once átomos de carbono, en extracciones realizadas con acetonitrilo, en muestras de determinados quesos con diferentes estados de maduración, utilizando como técnica analítica GC-MS [27]. También en la fracción soluble en agua se han detectado acetaldehído, benzaldehído, butiraldehído, valeraldehído, hexaldehído, heptaldehído, nonaldehído, crotonaldehído, metacroleína, acetona, 2-butanona, 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona [55].

Los antecedentes bibliográficos ponen de manifiesto que, en general, puede admitirse que la información acerca de los componentes con mayor incidencia en el olor del queso, serían los que poseen una volatilidad considerable, mientras que al sabor deben contribuir en mayor extensión los componentes solubilizados en la fracción grasa. De aquí que, en este capítulo, se centre la atención en la determinación de compuestos carbonílicos presentes en la fracción volátil y en la fracción grasa de los quesos, entendida como el extracto en acetonitrilo.

Un aspecto importante a considerar en los estudios relacionados con el extracto grasa de los quesos, es la dificultad para conseguir la cuantificación de los componentes presentes

en los mismos. Para la metodología basada en la utilización del acetonitrilo como agente extractante, Alewijn y col. [27] han propuesto un procedimiento matemático, en el que se determina la masa total de cualquier componente individual en el queso, mediante la utilización de coeficientes de distribución, calculados mediante extracciones sucesivas. El proceso de extracción se considera como una extracción simple entre dos fases, de forma que cada compuesto se distribuye entre el acetonitrilo y el residuo constituido por grasa, agua, proteínas, etc. Sin embargo, los mismos autores indican que la cuantificación sólo es posible para compuestos presentes a altas concentraciones, suficientes para hacer posible la determinación de una constante de distribución con ciertas garantías.

VI.1.3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En atención a los antecedentes bibliográficos, distintos aldehídos y cetonas pueden estar presentes en los quesos. El ahumado de este producto, con independencia de proporcionar características beneficiosas, relacionadas, sobre todo, con su actividad como bactericida, supone en la actualidad una aportación significativa a sus características organolépticas. En tal sentido adquiere significación la contribución que los compuestos carbonílicos pueden efectuar, sobre todo, para configurar las características del queso relacionadas con el sistema gustativo-olfativo. Como quiera que estas características están, a su vez, relacionadas con el proceso de maduración de los quesos y con el sistema de ahumado, se puede afirmar que la determinación de compuestos carbonílicos, y de otros analitos, como fenoles o ácidos carboxílicos, en muestras de queso ahumado, puede proporcionar información de sumo interés relacionada con las características organolépticas de los quesos de una determinada Denominación de Origen, detectar fraudes en los procesos de ahumado, etc.

Para afrontar el problema analítico planteado en el párrafo anterior, cabe la posibilidad de efectuar la determinación del contenido total de los compuestos carbonílicos presentes en muestras de queso. Ahora bien, es conocida la dificultad que entraña este tipo de análisis, sobre todo porque implica la solubilización total de la muestra. La presencia de altos contenidos de grasa en las mismas, no sólo dificulta su puesta en disolución, sino que afecta de forma significativa a las etapas de tratamiento de la muestra y análisis.

Por otra parte, los antecedentes comentados, ponen de manifiesto que si el problema planteado está relacionado con las características organolépticas de los quesos y, en concreto, con aquellas más estrechamente relacionadas con el olor y sabor de los mismos, no es imprescindible proceder a un análisis del contenido total de los compuestos carbonílicos en las muestras, sino que puede resultar de mayor interés conocer la presencia de dichos compuestos en lo que hemos llamado la fracción volátil y el extracto graso de los quesos entendido como fracción separada al tratar la muestra con acetonitrilo. Como se ha comentado con anterioridad, las propiedades organolépticas complementarias son el resultado de las contribuciones de componentes volátiles de los quesos que, en su mayor parte, se forman durante el proceso de maduración y de otras sustancias, presumiblemente derivados de la grasa, que se originan en la interfase agua/proteína/grasa y entre las que se encuentran: ácidos grasos, alcoholes, metilcetonas, aldehídos, fenoles, lactonas y ésteres. Además, en el caso de los quesos ahumados, tendrían que tomarse en consideración los componentes del humo que pueden interactuar con la capa superficial de los quesos y difundir hacia el interior de los mismos.

En cuanto a las determinaciones analíticas de los componentes de la fracción volátil, ya hemos comentado las ventajas e inconvenientes de las distintas técnicas que se han venido desarrollando para conseguir su separación de la muestra. En cuanto a la técnica analítica de medida, las determinaciones se han efectuado, en general, mediante cromatografía de gases, con o sin derivatización previa de los compuestos carbonílicos extraídos de la muestra, y con la utilización de distintos sistemas de detección incluida, en los últimos años, la espectrometría de masas. Esta técnica aporta grandes ventajas cuando se pretende establecer la presencia de componentes de distintas familias de compuestos, pero la sensibilidad con la que se determinan algunos compuestos, como es el caso de los aldehídos y cetonas, es escasa, sobre todo si, como suele suceder habitualmente, no se procede a la derivatización de los mismos, para facilitar la obtención de información cualitativa. No obstante, en general, las determinaciones suelen centrarse en un número reducido de aldehídos y cetonas, entre otros motivos porque, como hemos dicho, estos compuestos no suelen presentarse en grandes concentraciones en las muestras de queso y, por otra parte, porque la sensibilidad de las metodologías empleadas es baja.

Ante la situación expuesta y, en atención a la experiencia adquirida en capítulos anteriores, ha parecido de interés afrontar el análisis de las fracciones volátiles de muestras de

queso utilizando como técnica de medida la cromatografía líquida de alta resolución y derivatizando previamente los analitos con la 2,4-dinitrofenilhidracina, con objeto de aumentar la sensibilidad de las determinaciones y, al mismo tiempo, intentar aumentar el número de aldehídos y cetonas que se puedan determinar. Por otra parte, se debe resolver la problemática asociada a la extracción de los componentes presentes en la fracción a analizar y su traslado al sistema cromatográfico, incluyendo la etapa de derivatización. En tal sentido ha parecido de interés emplear, como sistema de extracción, la microextracción en fase sólida, no sólo por su interés como técnica extractiva, sino por la posibilidad que nos ofrece de utilizar una interfaz, que sustituye el loop de un equipo de HPLC, en la que tiene lugar la formación con la DNPH de las hidrazonas de los aldehídos y cetonas extraídos.

La aplicación de la determinación de compuestos carbonílicos presentes en la fracción volátil de los quesos, exige optimizar las variables relacionadas con los procedimientos experimentales asociados al proceso de extracción de los compuestos carbonílicos presentes en la fracción volátil, entre los que se encuentran la elección de la fibra a utilizar en la SPME, tiempo de equilibrio, etc. Además, también tendrán que optimizarse los procesos de desorción y derivatización que ocurren en la interfaz SPME-HPLC.

Según los comentarios efectuados con anterioridad, también resulta de interés la determinación de los compuestos carbonílicos presentes en el extracto graso de los quesos. En este caso, si nos atenemos a los antecedentes bibliográficos comentados, al plantearnos la separación de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de queso, parece oportuno aprovechar las ventajas que ofrece la extracción con acetonitrilo. Esta decisión también va acompañada por el interés que presenta el poder utilizar técnicas de HPLC para la etapa de análisis, con la consiguiente mejora en sensibilidad, con respecto a las obtenidas mediante GC. A las ventajas de la utilización del acetonitrilo como extractante se une el que forma parte de la fase móvil utilizada, por lo que la compatibilidad muestra-fase móvil resulta garantizada. También en este caso, la utilización de esta metodología exige la optimización de parámetros experimentales como los relacionados con la separación de los compuestos carbonílicos presentes inicialmente en la matriz de queso, con la insolubilización de las grasas y la derivatización de los analitos.

Como en el caso de las determinaciones a efectuar en las fracciones volátiles, no se dispone de metodologías apropiadas para la cuantificación de los aldehídos y cetonas presentes en los extractos grasos, en conexión con las respectivas muestras de queso. En tal

sentido un objetivo importante de este trabajo será el desarrollo de una metodología, que permita sustituir el procedimiento matemático basado en el cálculo de constantes de distribución, al que nos hemos referido anteriormente, para la cuantificación de los aldehídos y cetonas presentes en los extractos grasos.

En cuanto a los analitos contemplados en los estudios a realizar en las muestras representativas de la fracción volátil y del extracto graso, se ha tenido en cuenta que, además de los compuestos habitualmente presentes en las muestras de humo, ya contemplados en los estudios realizados en los capítulos anteriores, durante los procesos que ocurren a lo largo de la maduración de los quesos se producen compuestos carbonílicos, como las metilcetonas de cinco, siete y nueve átomos de carbono, además de aldehídos superiores. En consecuencia, las metodologías cromatográficas desarrolladas en los capítulos anteriores, han de adaptarse para incluir estos aldehídos y cetonas.

VI.2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

VI.2.1. REACTIVOS Y MATERIALES

Los compuestos carbonílicos empleados en este estudio son los utilizados a lo largo de todo el desarrollo de esta tesis, y descritos en el apartado *II.2.1*, que se han ampliado con los nuevos compuestos: 14. 2-pentanona (Penta), 15. 2,3-butanodiona (Bio), 16. 2-heptanona (Hepta), 17. heptaldehído (Hep), 18. octaldehído (Oct), 19. 2-nonanona (Nona) y 20. nonaldehído (Non), suministrados por Dr. Ehrenstorfer GMBH (Augsburg, Alemania).

El compuesto 2,4-dinitrofenilhidracina, usado como agente derivatizante, y los reactivos y disolventes empleados en la preparación de las disoluciones y en el análisis cromatográfico vienen descritos en los apartados *II.2.1* y *III.2.1*.

Las experiencias de SPME se desarrollaron con el soporte y las fibras descritas en el apartado *IV.2.1*.

Tabla VI.I. Naturaleza y características generales de las muestras de quesos utilizados.

Código	Características de los quesos			
	Denominación	Tipo de leche	Estado de maduración	Otras características
M1	Manchego	Oveja	Curado	
M2	Manchego	Cabra, Vaca y Oveja	Curado	
M3	Manchego	Oveja	Semicurado	
M4	Gruyere	Vaca		
M5	Palmero	Cabra	Fresco	Ahumado
M6	Palmero	Cabra	Semicurado	Ahumado
M7	Cabrales	Cabra, Vaca y Oveja		Azul
M8	Azul danés	Vaca		Azul
M9	Roquefort	Oveja		Azul
M10	Majorero	Cabra y Oveja	Fresco	Ahumado
M11	Tenerife	Cabra	Fresco	
M12	Gorgonzola	Vaca		Azul
M13	Azul cremoso	Vaca		Azul
M14	Majorero	Cabra y Oveja	Fresco	

Los quesos analizados se adquirieron en distintos comercios y son los que se muestran en la Tabla VI.1, junto con algunas de sus características de interés comercial. Las muestras permanecieron en el congelador hasta su análisis.

VI.2.2. EQUIPOS

Las características del equipo de HPLC y de la interfaz SPME-HPLC son las que se describieron en el apartado IV.2.2. El sistema analítico empleado en este cromatógrafo es el descrito en el apartado II.2.2.

Para calentar y agitar las muestras de queso se empleó una placa modelo RCT Basic suministrada por IKA[®] Werke (Staufen, Alemania) y para centrifugarlas se utilizó una centrífuga modelo EBA 3S suministrada por Hettich Centrifuges (Beverly, MA, USA).

Para el tratamiento estadístico de los datos, se usó el software Statgraphics plus para Windows versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., Rockville, USA).

VI.2.3. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

Para la preparación diaria de las disoluciones de DNPH se siguió un procedimiento similar al descrito en el apartado III.2.3.

Preparación de las disoluciones patrón

Para elaborar las curvas de calibrado, se preparó una disolución patrón de los nuevos compuestos carbonílicos en acetonitrilo con la siguiente concentración: 400 mg/L de heptaldehído, 328 mg/L de octaldehído, 320 mg/L de 2-pentanona, 328 mg/L de 2-heptanona, 332 mg/L de 2-nonanona, 664 mg/L de nonaldehído y 394 mg/L de 2,3-butanodiona. Esta disolución se conserva en la nevera a 4°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución en acetonitrilo de esta disolución y de la disolución intermedia del resto de los compuestos carbonílicos descrita en el apartado III.2.3.

Procedimiento para determinar los compuestos carbonílicos en el extracto graso de los quesos

Los procedimientos analíticos de extracción de los compuestos carbonílicos en el extracto graso y en la fracción volátil de los quesos se realizaron directamente sobre muestras que contenían estos compuestos carbonílicos.

Proceso de extracción

3 gramos de queso previamente congelado y rallado se colocan en un vial de 10 mL y se le añaden 2.5 mL de acetonitrilo, o el volumen necesario para cada experimentación. A continuación, se coloca el vial en una placa calefactora a 50°C, o a la temperatura utilizada en las diferentes experiencias, con una agitación constante de 500 rpm, durante 10 minutos, o el tiempo que corresponda con la experiencia a realizar. Se trasvasa el contenido del vial a un tubo de centrifuga y se centrifuga durante 10 minutos a 4500 rpm. Se recoge el sobrenadante que se congela, al menos durante 1 hora, para poder separar las trazas de grasa que hayan podido quedar disueltas.

Proceso de derivatización

A una alícuota de la disolución sobrenadante del extracto se le añade una disolución de DNPH al 0.45% (p/v) en HCl 0.1M al 30% (v/v) en una proporción extracto:DNPH igual a 5:1. El tiempo óptimo para que transcurra la reacción de derivatización fue de 120 minutos manteniéndola a una temperatura de 50°C. Una alícuota de la disolución resultante es sometida al análisis por HPLC-UV.

Procedimiento para determinar los compuestos carbonílicos en la fracción volátil de los quesos

Proceso de extracción

8 gramos de queso, previamente congelado y rallado, se colocan en un vial de 30 mL y

se someten a agitación constante de 500 rpm y a temperatura ambiente durante un tiempo de equilibrio de 24 horas. Transcurrido este tiempo, los viales se calientan a 25°C, o a la temperatura utilizada en las diferentes experiencias, durante 60 minutos, o el tiempo que corresponda con la experiencia a realizar, al mismo tiempo que la fibra Carbowax/Templated Resin (CW/TPR) de 50 µm de espesor se introduce en el espacio en cabeza obtenido.

Proceso de desorción

Después de la extracción, la fibra se retrae del vial y se introduce directamente en la cámara de desorción de la interfaz SPME-HPLC donde tiene lugar la derivatización. La cámara o loop de 60 µl, se llena previamente con una disolución del reactivo derivatizante con una concentración de 0.075% (p/v) de DNPH y 5% (v/v) de HCl 0.1M. La fibra se pone en contacto con esta disolución durante 25 minutos. Transcurrido el tiempo de derivatización, la válvula de inyección de la interfaz, que había permanecido en la posición de carga, se pasa a la posición de inyectar para que se transfieran los analitos hacia la columna del sistema cromatográfico. La válvula se vuelve a colocar en la posición de carga transcurridos 2 minutos. Este procedimiento de desorción es el que se optimizó en el capítulo IV.

Análisis por HPLC-UV

El método de HPLC usado para la separación y detección de los compuestos carbonílicos derivatizados consistió en un gradiente de elución con el detector de fotodiodos operando a 360 nm. La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo y agua al 55% de acetonitrilo que se aumentó mediante un gradiente lineal hasta el 66% en 21.7 minutos, manteniendo luego este porcentaje durante 6.6 minutos, posteriormente se somete a otro gradiente lineal hasta el 75% de acetonitrilo en 5 minutos y se mantuvo luego este porcentaje durante 8.7 minutos, para terminar con un nuevo gradiente lineal hasta alcanzar un 100% de acetonitrilo en 15 minutos. La velocidad del flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 µL.

VI.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.3.1. INTRODUCCIÓN

Con frecuencia, la naturaleza de los problemas sobre los que se quiere informar y, por consiguiente, la finalidad de los resultados analíticos, condiciona la metodología a utilizar a lo largo de las etapas experimentales del proceso analítico. Al referirnos al queso ahumado como muestra objeto de análisis, hemos de considerar que nos encontramos ante un alimento que posee unas características que evolucionan a lo largo de su maduración, y que, en un momento determinado, se expone a la acción del humo, con lo cual adquiere unas propiedades organolépticas que el consumidor espera encontrar cuando consume el producto.

Entre los problemas analíticos relacionados con el queso ahumado y con las demandas de los consumidores, se encuentran aquellos que tratan de aportar información acerca de la composición de los mismos, en cuanto a componentes que contribuyen al sabor y al olor de los mismos. En tal sentido, en este capítulo se prestará atención a la presencia en el queso ahumado de compuestos carbonílicos, originados de forma natural como consecuencia de transformaciones bioquímicas, o por su presencia en el humo, originados por combustión de restos vegetales, como se ha comentado en el capítulo anterior.

En una primera aproximación, podría pensarse en proceder a la determinación total de compuestos carbonílicos presentes en muestras de quesos ahumados. Sin embargo, podría ser de mayor utilidad, para poder comparar entre muestras o para incidir en aspectos tecnológicos o metodológicos de los procesos de elaboración del queso o de su ahumado, disponer de resultados que nos permitan conocer, de forma diferenciada, la naturaleza de los compuestos y las concentraciones de los mismos que influyen de manera preferente, aunque no selectiva, en el olor o en el sabor.

Los antecedentes bibliográficos ponen de manifiesto que, en general, puede admitirse que la información acerca de los componentes con mayor incidencia en el aroma del queso serían los que poseen una volatilidad considerable, mientras que al sabor deben contribuir en mayor extensión los componentes solubilizados en la fracción grasa. De aquí que, en este capítulo, se centre la atención en la determinación de compuestos carbonílicos presentes en la fracción volátil y en la fracción grasa de los quesos, entendida como el extracto en acetoneitrilo. De esta forma, además de procurar una información de utilidad, desde un punto

de vista alimentario, se evitan los tratamientos de la muestra basados en la solubilización total de la misma y posterior análisis que, además de proporcionarnos una información de menor importancia relativa, implican procesos complejos y laboriosos en el laboratorio, que frecuentemente provocan pérdidas importantes de analitos.

Adaptación de la metodología de análisis

En los capítulos anteriores se han establecido metodologías para la toma de muestra y determinación de aldehídos y cetonas presentes en muestras de humo. Al extender el campo de análisis a compuestos carbonílicos que pueden estar presentes en el queso, es necesario tomar en consideración analitos que no se habían tenido en cuenta hasta ahora. En tal sentido, atendiendo a información bibliográfica, la relación de 12 compuestos carbonílicos que hasta ahora hemos venido considerando, se ha ampliado con la 2-pentanona, 2,3-butanodiona, 2-heptanona, heptaldehído, octaldehído, 2-nonanona y nonaldehído que, en distintos estudios [27, 55], se les incluye como compuestos relacionados con el olor y sabor de los quesos.

Para la identificación y cuantificación del total de los compuestos carbonílicos, es decir, de los utilizados en la caracterización de los distintos tipos de humo y de los previsiblemente presentes en el queso de forma natural, se ha recurrido a la metodología utilizada en los capítulos anteriores, basada en separación por HPLC de las hidrazonas formadas por reacción de los compuestos carbonílicos con la 2,4-dinitrofenilhidracina y posterior detección ultravioleta. Después de la optimización del proceso de separación, se obtienen cromatogramas como el incluido en la Figura VI.1, representativo de una disolución patrón de los 19 aldehídos y cetonas seleccionados inicialmente para el estudio. En la Tabla VI.2 se muestra la asignación de los picos cromatográficos y los respectivos tiempos de retención.

Con la metodología cromatográfica establecida se consiguen tiempos de análisis relativamente grandes, de una hora aproximadamente, y resoluciones que, en general, son satisfactorias. En capítulos anteriores se ha comentado que las mezclas acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído no se resuelven de forma adecuada y, en consecuencia, se han de determinar como mezclas. A pesar de ampliar a 19 el número de compuestos a separar, se observa que, con las excepciones antes comentadas, la metodología proporciona resoluciones

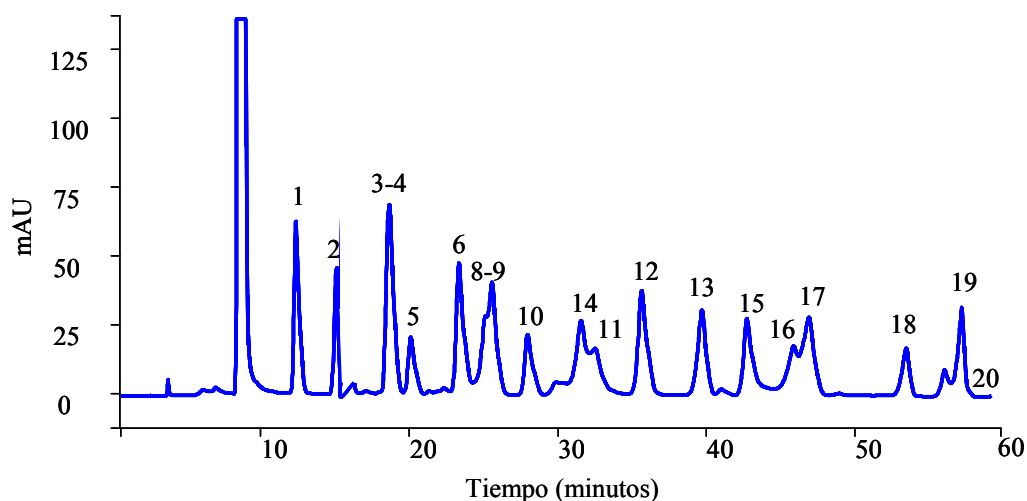


Figura VI.1. Cromatograma de HPLC-UV de hidrazonas de compuestos carbonílicos obtenidos por derivatización con DNPH. Para la identificación de los picos consultar la Tabla VI.2.

Tabla VI.2. Tiempos de retención de las hidrazonas de los compuestos carbonílicos separadas por HPLC.

Compuesto	^a t_r (min) (DS)
1. Formaldehído	12.40 (0.15)
2. Acetaldehído	15.20 (0.15)
3-4. Acr + Acet	18.77 (0.15)
5. Propionaldehído	20.24 (0.13)
6. Crotonaldehído	23.55 (0.12)
8-9. Buta + Buti	25.81 (0.11)
10. Benzaldehído	28.26 (0.11)
14. 2-Pentanona	31.95 (0.13)
11. Valeraldehído	32.94 (0.14)
12. <i>p</i> -tolualdehído	36.12 (0.16)
13. Hexaldehído	40.23 (0.15)
15. 2,3-Butanodiona	43.33 (0.20)
16. 2-Heptanona	46.55 (0.22)
17. Heptaldehído	47.62 (0.23)
18. Octaldehído	54.20 (0.18)
19. 2-Nonanona	58.03 (0.21)
20. Nonaldehído	58.44 (0.23)

^a Media de 6 determinaciones.

aceptables, excepto para los pares constituidos por las hidrazonas de la 2-pentanona y del valeraldehído, así como las de la 2-heptanona y del heptaldehído, para los cuales se obtienen valores de resolución de 0.7. No obstante, la buena definición de los picos cromatográficos hace posible que estos cuatro compuestos carbonílicos se puedan cuantificar de forma independiente. En cualquier caso debe indicarse que, al introducir los nuevos compuestos, el tiempo de análisis aumenta y, además, es necesario modificar la última etapa de gradiente con objeto de conseguir una adecuada separación de los mismos.

Por otro lado, se ha descrito [59-61] que en la cuantificación de algunos compuestos carbonílicos, como la 2-pentanona, 2,3-butanodiona, 2-heptanona y 2-nonanona, utilizando la separación por HPLC de las hidrazonas que originan con la DNPH, pueden presentarse dificultades asociadas a la obtención de cromatogramas en los que estos compuestos aparecen representados por dos picos, que corresponden a las formas isoméricas *sin* y *anti* de los mismos. Generalmente, el isómero *anti* está presente como la forma principal, mientras que el *sin* representa sólo un pequeño porcentaje dependiendo de la acidez de la muestra, entre otros factores. En las experiencias realizadas por nosotros, se confirmó la información expuesta. Los cromatogramas realizados muestran la presencia de las dos formas isoméricas de los compuestos carbonílicos mencionados anteriormente. Como quiera que una de ellas predomina claramente sobre la otra, el pico correspondiente al isómero mayoritario es el que se ha utilizado para la cuantificación.

En el capítulo *III* se ha puesto de manifiesto que las interacciones de la DNPH con los compuestos carbonílicos se encuentran influenciadas por procesos que afectan a aspectos esenciales de las metodologías analíticas, como son los relacionados con la cinética y cuantitatividad de las reacciones. En consecuencia, al igual que se hizo con los aldehídos y cetonas que se seleccionaron para los estudios relacionados con la composición del humo, también se ha querido establecer el comportamiento de las cuatro cetonas y de los tres aldehídos introducidos por su previsible presencia en los quesos, frente al agente derivatizante empleado para facilitar su determinación analítica por HPLC.

Siguiendo un procedimiento experimental similar al utilizado en el apartado *III.3.2*, se ha establecido la influencia del tiempo de reacción en la formación de las hidrazonas correspondientes a los mencionados compuestos carbonílicos. Con tal finalidad, se han preparado disoluciones de los distintos aldehídos y cetonas en acetonitrilo, que contenían un 5% (v/v) de una disolución acuosa de HCl 0.1M y un exceso de DNPH. Para los distintos

compuestos carbonílicos se han utilizado concentraciones de unos 3 mg/L, excepto en el caso del nonaldehído para el que se utilizó una concentración doble, por la baja señal cromatográfica que presenta su hidrazona. Las disoluciones así preparadas se conservan en ausencia de luz, inyectándose alícuotas de la mismas, a diferentes tiempos, en el sistema cromatográfico.

La evolución de la cantidad de cada una de las hidrazonas formadas, en función del tiempo de reacción, se estableció por comparación de las áreas de los picos cromatográficos representativos de los distintos compuestos carbonílicos. La Figura VI.2 muestra la variación de las señales obtenidas en los cromatogramas correspondientes a los aldehídos y cetonas no estudiados previamente.

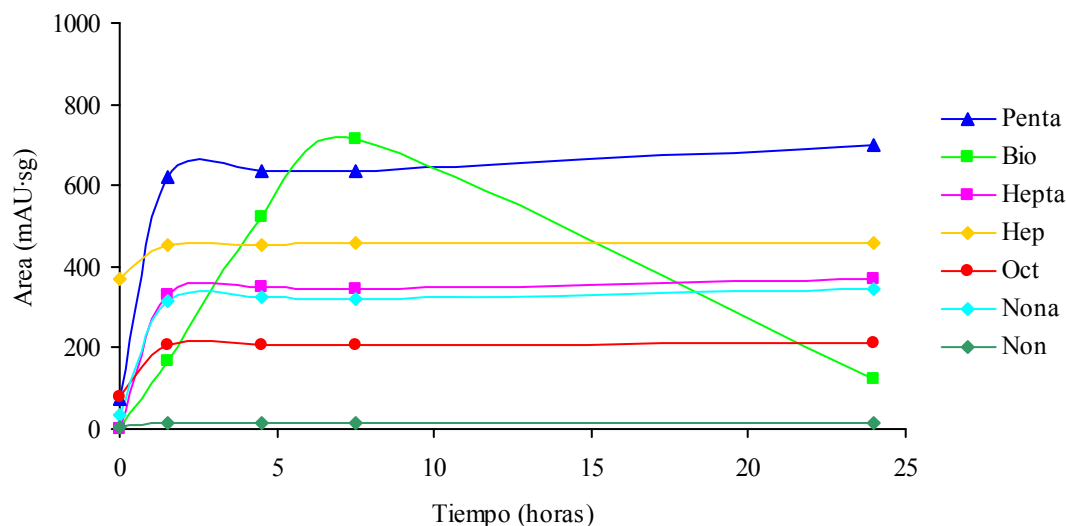


Figura VI.2. Influencia del tiempo en la reacción de derivatización de los compuestos carbonílicos a temperatura ambiente.

Los resultados obtenidos muestran que las reacciones con la DNPH, de la mayoría de los compuestos carbonílicos ahora estudiados, presentan un comportamiento similar a los obtenidos para los aldehídos y cetonas considerados anteriormente. En las condiciones utilizadas, son necesarios, en general, tiempos de reacción de 1.5 horas o superiores para que la formación de las respectivas hidrazonas se complete. La única excepción importante la constituye la 2,3-butanodiona, cuyos cromatogramas muestran picos con áreas que crecen al ir aumentando el tiempo de reacción en las disoluciones en las que se produce su

derivatización con la DNPH, hasta alcanzar valores máximos para las disoluciones en las que el tiempo transcurrido desde su preparación alcanza las 6 - 7 horas, produciéndose luego un descenso progresivo de las señales cromatográficas. En principio, puede estimarse que la hidrazona correspondiente a la 2,3-butanodiona presenta un comportamiento diferente a los restantes derivados estudiados, tanto por la lentitud de la cinética de formación, como por su aparente inestabilidad.

En atención al comportamiento comentado, la 2,3-butanodiona no ha sido incluida en los estudios que se comentan a continuación, especialmente porque, para obtener señales cromatográficas de suficiente intensidad, necesitaríamos alargar considerablemente el tiempo necesario para conseguir la derivatización del conjunto de compuestos carbonílicos. Además, los resultados obtenidos al proceder a su cuantificación estarían afectados por la incertidumbre adicional aportada por la falta de estabilidad de sus disoluciones. Tampoco se ha tomado en consideración el nonaldehído, cuya hidrazona se caracteriza por mostrar una señal cromatográfica considerablemente inferior a las de los restantes compuestos carbonílicos.

VI.3.2. DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL EXTRACTO GRASO DE QUESOS

Es conocido que el olor y sabor de los quesos se origina por transformaciones microbiológicas, enzimáticas y químicas. La ruptura, durante la maduración, de proteínas, grasas y otros componentes de la leche, origina una serie de compuestos volátiles y no volátiles que pueden contribuir de una manera considerable a proporcionar al queso unas características organolépticas determinadas.

Entre los compuestos que contribuyen en mayor extensión al sabor de los quesos, se encuentran algunos compuestos químicos derivados de la grasa de la leche, como ácidos, cetonas, aldehídos, lactosas y ésteres. No existen metodologías analíticas disponibles para la determinación de todos los componentes formados a partir de la grasa. Ahora bien, se estima que los derivados grasos de alto peso molecular no son importantes por su contribución al sabor total del queso, siendo, en tal sentido, mucho más interesantes los compuestos de bajo peso molecular formados durante la maduración del queso.

Para la determinación de los compuestos más ligeros, una etapa de suma importancia en el proceso analítico es la separación de los mismos del resto de la matriz, antes de proceder a su posterior medida. Entre las numerosas técnicas ensayadas, la extracción con disolventes ha sido estudiada por diferentes autores [1,27,54-57]. En general, los métodos desarrollados son muy simples y rápidos, aunque muestran algunas desventajas, como las relativamente bajas eficiencias de extracción que muestran algunos compuestos, y las dificultades existentes para diferenciar en cromatografía de gases, técnica analítica usada de forma preferente, los picos correspondientes a los compuestos muy volátiles, pues se solapan con los originados por el disolvente de extracción. En todo caso, ha de tenerse en cuenta que la comparación de los extractos grasos de los quesos dependerá, al menos en términos relativos, de la técnica de separación utilizada.

Algunos de los problemas asociados a la obtención de recuperaciones pequeñas se resuelven empleando acetonitrilo como disolvente que, además, permite obtener una disolución con concentraciones reducidas de componentes como triglicéridos y proteínas que, desde un punto de vista analítico, pueden aportar dificultades considerables en la etapa de medida. Por otra parte, los problemas relacionados por la superposición de picos de analitos y del disolvente, al usar GC, podrían resolverse con la utilización de cromatografía líquida.

En atención a lo expuesto, en este apartado se procederá a establecer una metodología analítica adecuada para la determinación de aldehídos y cetonas en muestras de queso con objeto de aportar información acerca de componentes que contribuyen a sus características organolépticas y, principalmente, a su sabor. Dicha metodología se basará en la obtención del extracto graso de las muestras de queso en acetonitrilo, derivatización de los compuestos carbonílicos con DNPH y determinación mediante HPLC de las hidrazonas originadas.

Aparte de aportar continuidad al trabajo que hemos realizado, en relación con la determinación de aldehídos y cetonas en muestras de humo, la metodología que se pretende establecer puede aportar una considerable selectividad y sensibilidad, basada en las características ya comentadas de los derivados que forman los compuestos carbonílicos con la DNPH. Sin duda, una ventaja adicional del método se encuentra en que el disolvente a emplear para obtener el proceso de extracción, es el mismo que se recomienda como solubilizante en la reacción de derivatización de los analitos con la DNPH. Como desventaja, puede indicarse que supone una limitación con respecto a las determinaciones efectuadas mediante cromatografía de gases usando espectrometría de masas como técnica de detección,

en cuanto a la información analítica que se puede obtener de otros componentes presentes en las muestras de queso.

Optimización del proceso de extracción

En un intento de poder disponer de una metodología sencilla y rápida, los primeros ensayos realizados se orientaron a unificar, en una misma etapa experimental, los procesos de extracción de los aldehídos y cetonas presentes en las muestras de queso y de derivatización de los mismos con la DNPH, aprovechando que, como se ha dicho anteriormente, en ambos procesos el disolvente extractante/solubilizante es el acetonitrilo. En tal sentido, las muestras de queso, después de congeladas, para conseguir una mayor rigidez y dureza, se rallaban y se ponían en contacto con una disolución del agente derivatizante en acetonitrilo.

Los cromatogramas obtenidos pusieron de manifiesto la aparición de picos de pequeño tamaño, o la inexistencia de los mismos, para un número considerable de hidrazonas, especialmente para las representativas de los compuestos carbonílicos menos volátiles. Estos resultados llevaron a pensar que en el proceso de extracción se producía una considerable solubilización de la grasa presente en la muestra de queso y que los compuestos carbonílicos, en general, pero preferentemente los más hidrofóbicos, quedarían retenidos en la grasa, viéndose dificultada, en consecuencia, la formación de sus hidrazonas. Así mismo, también la solubilización en la grasa de los productos resultantes del proceso de derivatización, podría contribuir a explicar las bajas recuperaciones obtenidas.

Para evitar, en lo posible, los problemas asociados a la presencia de grasa en el extracto, se intentó eliminar una parte considerable de la misma, antes de provocar la reacción con la DNPH. Con tal finalidad, se procedió, en primer lugar, a efectuar la extracción con acetonitrilo de la muestra de queso rallada y, con posterioridad, se sometió el extracto a temperaturas suficientemente bajas como para conseguir la insolubilización, por congelación, de la grasa. La disolución en contacto con los grumos de grasa se separaba y, una vez devuelta a temperatura ambiente, se trataba con una disolución de la 2,4-dinitrofenilhidracina en medio ácido, para provocar la correspondiente derivatización de los aldehídos y cetonas presentes.

El procedimiento experimental que se acaba de comentar, consistente en realizar de forma independiente las etapas de extracción y derivatización de los compuestos carbonílicos,

introduciendo entre ambas la separación mecánica de una parte importante de la grasa solubilizada por el acetonitrilo, mejora considerablemente las señales analíticas obtenidas, al aumentar la concentración de las hidrazonas presentes en la disolución a introducir en el cromatógrafo. Es evidente, que las diferencias en los resultados obtenidos con esta forma de proceder y cuando las dos etapas se realizan simultáneamente, sin la eliminación parcial de la grasa, debe obedecer a un comportamiento distinto de los compuestos carbonílicos y de sus hidrazonas en cuanto a la solubilización en acetonitrilo. En principio, los resultados parecen indicar que al aumentar el contenido en grasa, se dificulta considerablemente la presencia de los compuestos derivatizados en el extracto de acetonitrilo.

Con la metodología indicada, no se pretende establecer el contenido total de los aldehídos y cetonas presentes en las muestras de queso, sino informar acerca de la presencia de determinados derivados y/o de las proporciones relativas de los mismos, para poder establecer comparaciones relacionadas con el sabor de quesos diferentes o de quesos en distintos estados de maduración.

En atención a lo expuesto en la introducción a este apartado, el proceso experimental a seguir para obtener el extracto graso en acetonitrilo, representativo de las muestras de queso, consiste en colocar en un vial una cantidad determinada de queso, previamente congelado y rallado, junto con un volumen determinado de acetonitrilo y, a continuación, se somete el conjunto a agitación constante, durante un tiempo adecuado, manteniendo la temperatura a un valor prefijado en una placa calefactora. Transcurrido el proceso, se somete a congelación el extracto durante al menos una hora, para proceder a continuación a retirar la grasa separada en forma de grumos de color amarillento. Una alícuota de la disolución obtenida, y después del proceso de derivatización, se introduce en el sistema cromatográfico.

En consideración con el procedimiento experimental indicado, para la optimización del proceso de extracción, se ha realizado un diseño experimental en el que se han estudiado las siguientes variables: temperatura y tiempo de extracción, así como la relación entre el volumen de acetonitrilo añadido y la cantidad de muestra de queso utilizada (relación V/M). En relación con esta última variable, en todas las experiencias se han empleado porciones de 3 gramos de queso rallado, al tiempo que se modificaba el volumen de acetonitrilo añadido. Con objeto de evitar el efecto en la concentración por la diferencia de volúmenes de acetonitrilo utilizados en los distintos experimentos, una alícuota proporcional del extracto obtenido en cada caso se diluyó con acetonitrilo a 500 μ L.

Para establecer los valores óptimos de las variables seleccionadas, se ha utilizado un diseño factorial completo de dos niveles, 2^3 + estrella, del tipo composición central centrado en las caras, que da lugar a 16 experiencias. Las variables estudiadas y su codificación, así como los valores máximos y mínimos utilizados en el diseño, se muestran en la Tabla VI.3. Para establecer los rangos de las variables estudiadas no fue necesario un diseño previo de screening, optándose por establecerlos mediante un número reducido de experiencias previas.

Tabla VI.3. Niveles de los factores en el diseño experimental.

Factor	Clave	Menor (-)	Mayor (+)
Relación V/M, mL/g	A	0.5	1.3
Tiempo de extracción, min	B	10	120
Temperatura de extracción, °C	C	25	75

La Tabla VI.4 muestra la matriz del diseño experimental. El listado de las experiencias del diseño factorial representa el orden aleatorio estadístico con el que se llevaron a cabo. La respuesta considerada ha sido el área de los picos cromatográficos correspondientes a las hidrazonas de los compuestos carbonílicos que han proporcionado señales identificables. Ha de tenerse en cuenta que al utilizar muestras reales, el número, la naturaleza y la concentración de los aldehídos y cetonas sometidas al proceso de extracción, vienen impuestos por la muestra. En atención a determinaciones previas realizadas con muestras representativas de quesos, al efectuar la optimización del proceso de extracción, los derivados tomados en consideración han quedado reducidos a los siguientes: acetaldehído, acroleína + acetona, propionaldehído, crotonaldehído, 2-butanona + butiraldehído, benzaldehído, 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona.

La influencia de los factores principales considerados, relación entre volumen de acetonitrilo y peso de muestra y tiempo y temperatura de extracción, se han agrupado en la Figura VI.3, en la que se han incluido las cetonas y pares de compuestos que contienen alguna cetona, y en la Figura VI.4, que se refiere sólo a aldehídos. A su vez, las correspondientes cartas de Pareto aparecen representadas en la Figura VI.5 y VI.6.

Al observar la influencia de la relación V/M, se ponen de manifiesto comportamientos diferentes en la extracción de distintos componentes de la muestra. Este factor es el de mayor

Tabla VI.4. Matriz del diseño experimental.

Experiencia	Relación V/M (mL/g)	Tiempo de extracción (min)	Temperatura de extracción (°C)
1	0.92	65	50
2	0.92	10	50
3	0.50	65	50
4	1.33	120	25
5	1.33	10	75
6	0.50	10	75
7	1.33	120	75
8	0.50	10	25
9	0.50	120	25
10	0.92	65	50
11	1.33	65	50
12	0.92	120	50
13	0.92	65	25
14	0.92	65	75
15	1.33	10	25
16	0.50	120	75

importancia en la extracción del acetaldehído y la 2-nonanona, siendo su influencia significativa a un nivel del 95% y positiva. En el caso de la 2-pentanona, el efecto es de menor importancia, aunque significativo, y negativo. Sin embargo, en la extracción de los restantes aldehídos y cetonas, la modificación del volumen de extractante no afecta de manera significativa a los procesos de extracción.

El tiempo durante el que se mantiene la agitación del conjunto acetonitrilo-muestra de queso, no afecta de la misma manera a los distintos procesos de extracción. En la mayoría de los casos, al modificar esta variable entre 10 y 120 minutos, el área de los picos cromatográficos de los aldehídos y cetonas pasan por un mínimo. En efecto, en las Figuras VI.3 y VI.4 se observa que el efecto del tiempo en la extracción de todas las cetonas, excepto la 2-nonanona, del acetaldehído y de los pares de compuestos que contienen una cetona, viene representado por una línea cóncava. Para el resto de compuestos, principalmente aldehídos,

las curvas de extracción correspondientes son convexas, o muestran un ascenso continuado de las áreas de pico medidas al aumentar el tiempo de extracción. Ahora bien, al observar las cartas de Pareto, se constata que este efecto sólo es significativo, al 95%, para la 2-pentanona, para el par 2-butanona + butiraldehído y para el benzaldehído.

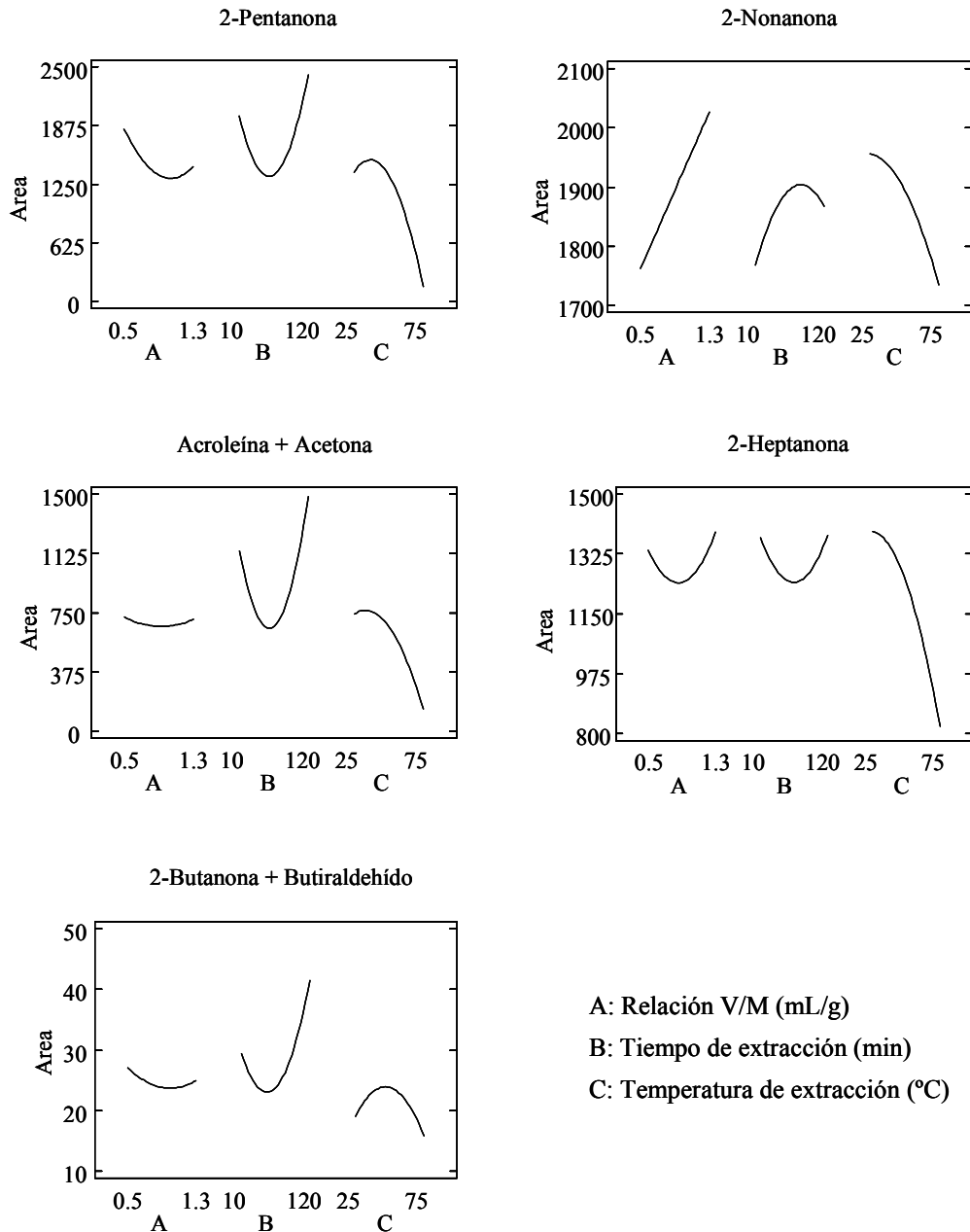


Figura VI.3. Efectos de los factores principales para las cetonas.

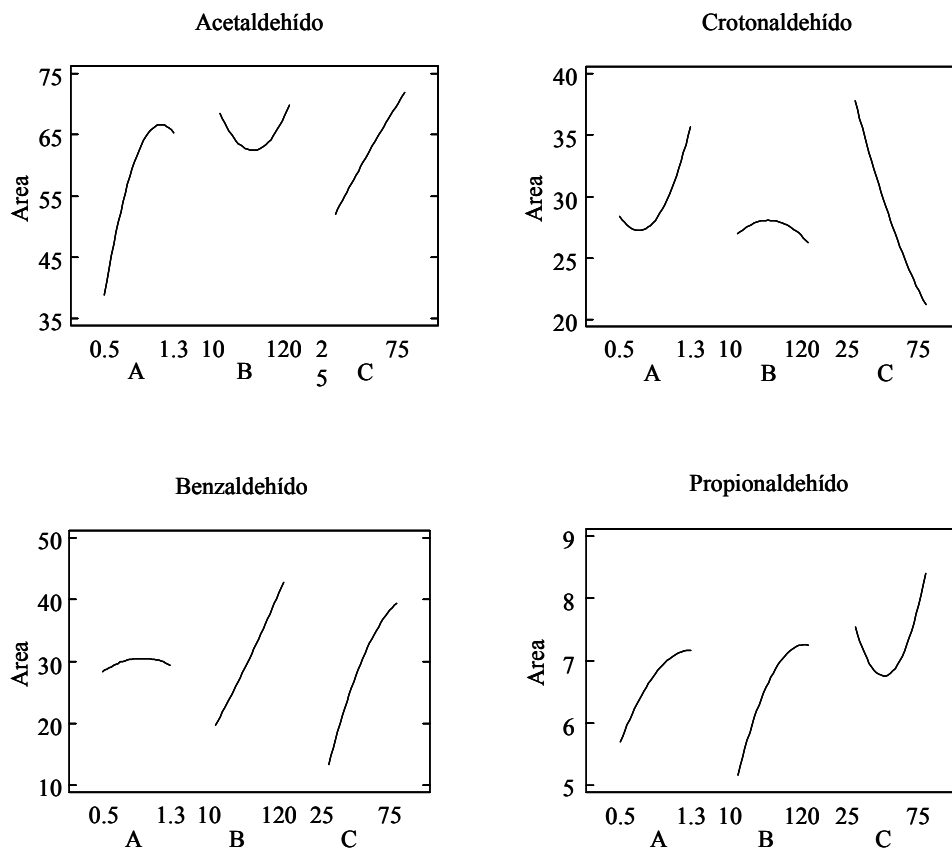


Figura VI.4. Efectos de los factores principales para los aldehídos.

También la influencia de la temperatura sobre la eficacia de la extracción es diferente para unos compuestos carbonílicos y otros. Para la mayor parte de los aldehídos y cetonas, al modificar la temperatura entre 25 y 75°C, la señal cromatográfica desciende de forma considerable, sobre todo para temperaturas superiores a 30 - 40°C. Sin embargo, en el intervalo de temperatura más bajo, las eficacias de extracción aumentan ligeramente, al hacerlo la temperatura, o se mantienen prácticamente constantes. Sólo el acetaldehído, benzaldehído y propionaldehído, muestran un comportamiento diferente.

En atención a los resultados comentados, podemos concluir que, entre las variables seleccionadas para optimizar la obtención del extracto graso correspondientes a muestras de queso, con acetonitrilo como agente extractante, la temperatura a la que se realiza el proceso es la que afecta, de manera significativa, a la eficacia de la extracción de un mayor número de aldehídos y cetonas. El efecto es negativo en el caso de la 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona, crotonaldehído y acroleína + acetona, mientras que en la extracción del

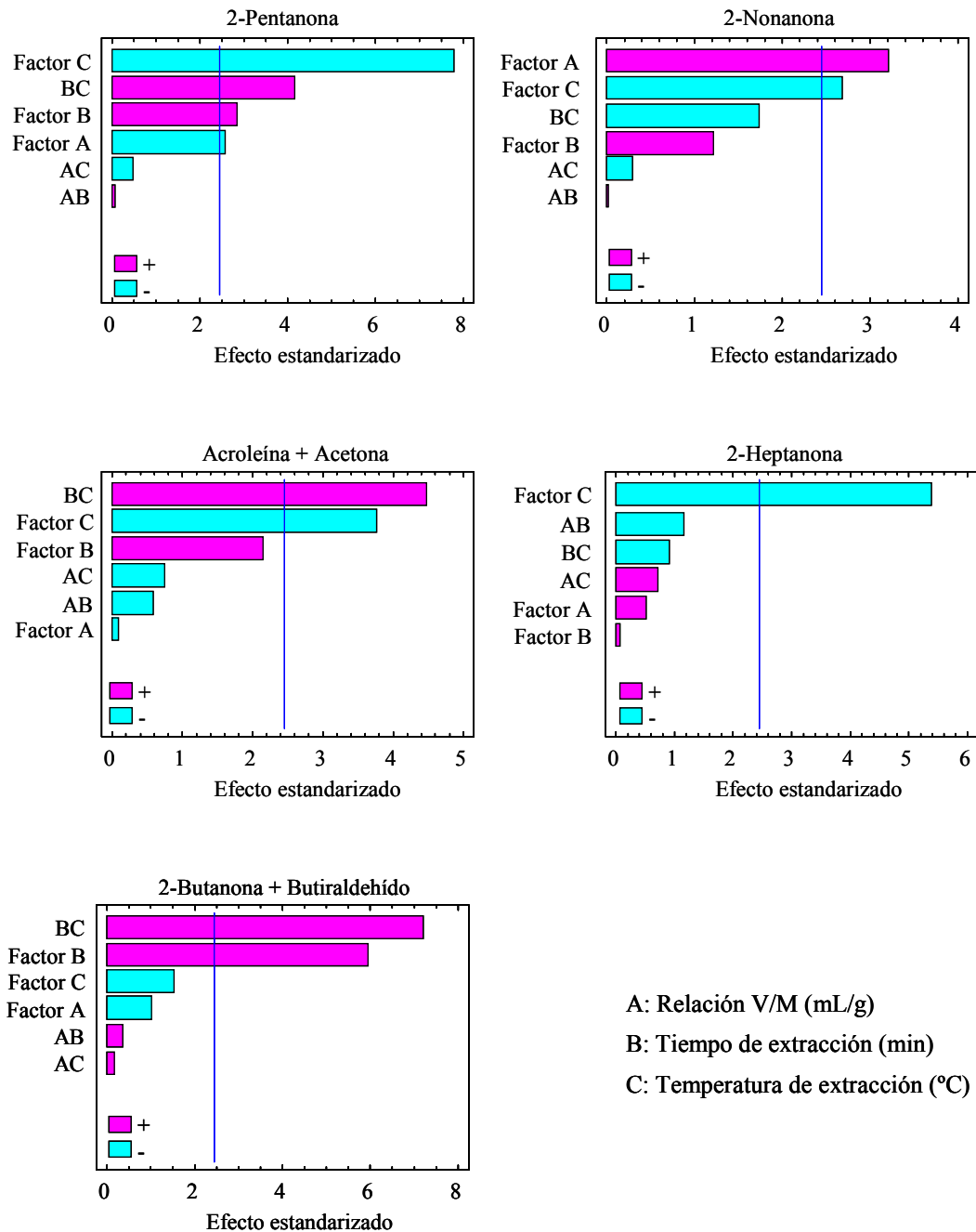


Figura VI.5. Cartas de Pareto de efectos estandarizados de las cetonas encontradas en una muestra real de queso.

acetaldehído y benzaldehído, el efecto de la temperatura es positivo. Para el propionaldehído y para el par 2-butanona + butiraldehído, el efecto de la temperatura sobre el proceso de extracción no es significativo. En consideración al distinto comportamiento comentado para los diferentes aldehídos y cetonas, se ha seleccionado una temperatura intermedia de 50°C, como temperatura óptima para efectuar la preparación del extracto graso. Al utilizar

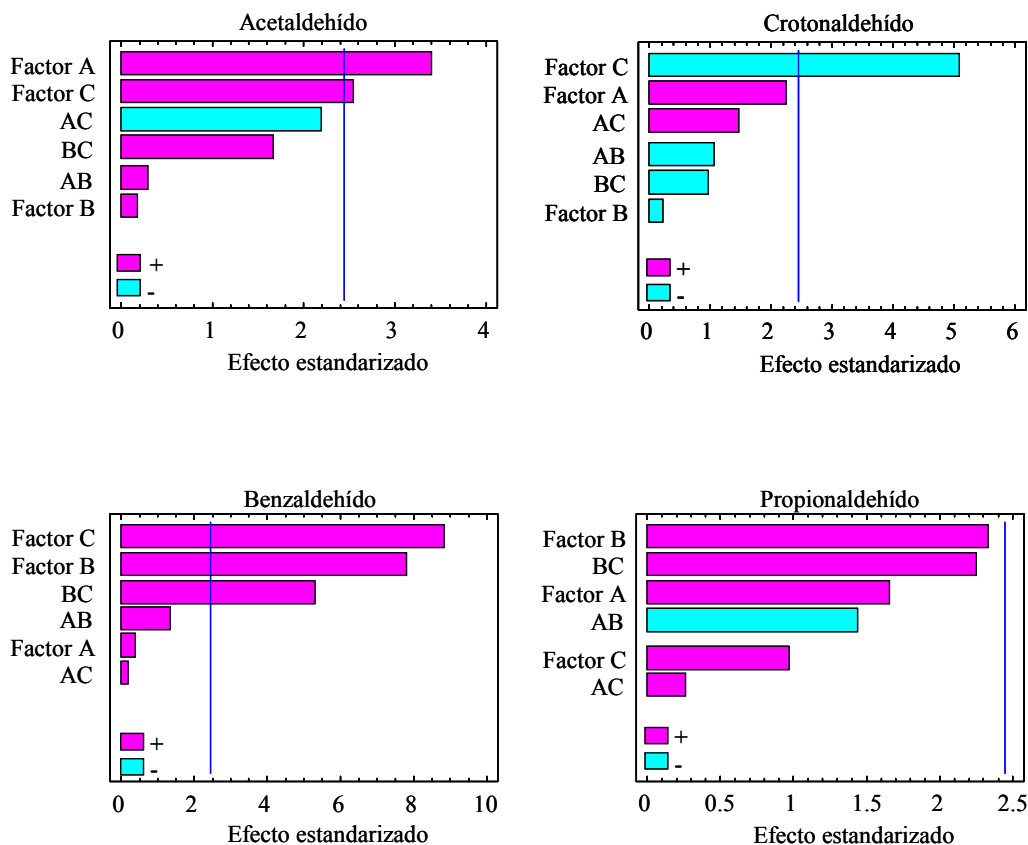


Figura VI.6. Cartas de Pareto de efectos estandarizados de los aldehídos encontrados en una muestra real de queso.

temperaturas superiores a la ambiental, introducimos una operación que necesita control experimental y que consume tiempo, pero se favorece de forma considerable la extracción de acetaldehído y benzaldehído, mientras que no se perjudica en gran medida la extracción de los restantes aldehídos y cetonas.

La relación V/M y el tiempo de extracción, son variables que afectan de forma significativa a la eficacia de la extracción de un menor número de compuestos. El tiempo de extracción adquiere significación al 95% en el proceso de transferencia de la 2-pentanona, 2-butanona + butiraldehído y benzaldehído. Para estos compuestos, al aumentar el tiempo de extracción se ve favorecido el paso de estos compuestos al extracto de acetonitrilo desde la muestra de queso. Esta conclusión es válida para todo el intervalo de valores del tiempo de extracción en el caso del benzaldehído. Sin embargo, al observar la extracción de la 2-pentanona y del par 2-butanona + butiraldehído, se observa que a unos 60 - 70 minutos la eficacia es mínima. Al decidir sobre el tiempo de extracción a utilizar en el procedimiento

experimental que se pretende recomendar, se ha optado por escoger un valor de 10 minutos, aunque la eficacia de la extracción sería máxima a tiempos de 120 minutos o superiores. Esta última sería la opción a emplear cuando el objetivo se centre en conseguir valores máximos de las señales analíticas. Al seleccionar un tiempo de extracción de unos 10 minutos, se consigue un ahorro importante del tiempo de extracción, aunque con una pérdida media aproximada de un 45% de la señal analítica, para los tres compuestos considerados. Para compuestos como la 2-nonanona y 2-heptanona, la pérdida de señal no supera el 10%, mientras que, en el otro extremo, para el propionaldehído se sobrepasa el 50%, aunque, en este caso, la variación absoluta del área medida es pequeña.

Como se dijo anteriormente, también la relación V/M es una variable que afecta, de forma significativa, a la extracción de un número reducido de compuestos, entre los que se encontrarían dos cetonas, 2-pentanona y 2-nonanona, y el acetaldehído, compuestos que, por otra parte, se encuentran entre los que pasan en mayor cantidad desde la muestra de queso a la disolución de acetonitrilo. En todo caso, puesto que la influencia de esta variable es, en la mayoría de los casos, poco importante y, además, en aquellos pocos en los que adquiere mayor significación, la influencia en la eficacia es de diferente signo, se ha optado por escoger una relación V/M intermedia, correspondiente a un volumen de 2.5 mL de acetonitrilo que, por otra parte, es el adecuado para una manipulación experimental cómoda.

En atención a lo expuesto, contemplada globalmente la influencia de las variables experimentales en la obtención del extracto graso de las muestras de queso, la temperatura es la variable que mayor influencia ejerce en el tamaño de los picos cromatográficos representativos de los aldehídos y cetonas presentes en el extracto graso, o lo que es lo mismo, en la eficacia de los correspondientes procesos de extracción. Por otra parte, la única interacción entre variables que resulta ser estadísticamente significativa es la que tiene lugar entre la temperatura y el tiempo de extracción. Los compuestos principalmente afectados son la 2-pentanona, acroleína + acetona, 2-butanona + butiraldehído y benzaldehído.

La superficie de respuesta correspondiente al acetaldehído, representada en la Figura VI.7, pone de manifiesto que las respuestas máximas se obtienen cuando, de forma simultánea, se utilizan valores elevados de tiempos y temperaturas de extracción. Este comportamiento es similar al que muestra el benzaldehído. Sin embargo, en el caso del crotonaldehído, compartido con otros compuestos como la 2-nonanona, la superficie de

respuesta, también representada en la Figura VI.7, pone de manifiesto que los tiempos de extracción altos deben combinarse con temperaturas bajas para obtener las mayores señales.

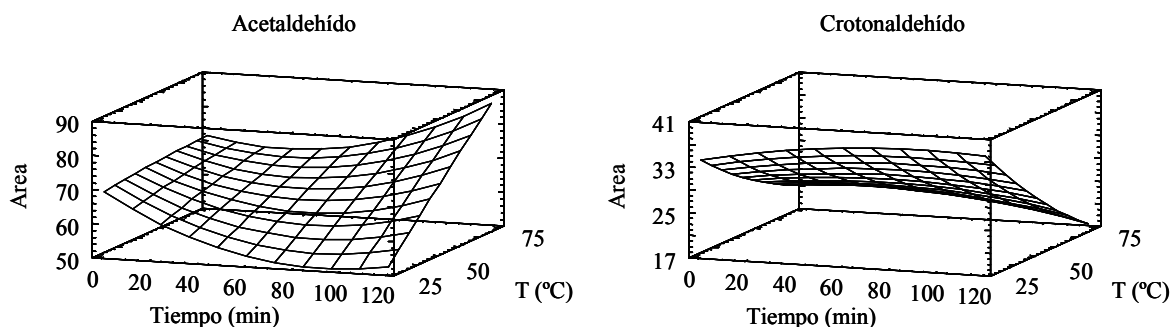


Figura VI.7. Superficies de respuesta obtenidas para un volumen de acetonitrilo de 2.75 mL.

Un comportamiento diferente se muestra en las superficies de respuesta del par 2-butanona + butiraldehído y de la 2-pentanona, incluidas en la Figura VI.8. En ambos casos, las respuestas analíticas más elevadas corresponden a valores extremos, grandes o pequeños, del tiempo de extracción, siempre que la temperatura de extracción utilizada presente valores intermedios entre los utilizados en las experiencias, es decir, entre 40°C y 50°C. Los comportamientos comentados también son representativos del par acroleína + acetona o de la 2-heptanona.

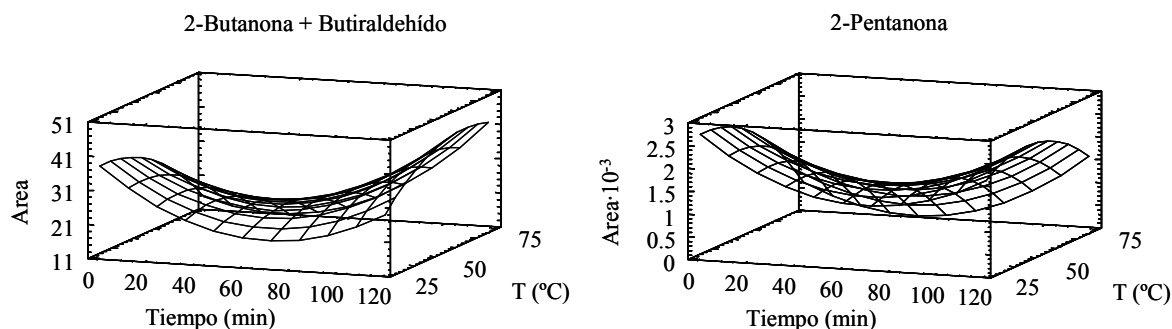


Figura VI.8. Superficies de respuesta obtenidas para un volumen de acetonitrilo de 2.75 mL.

En atención a las consideraciones realizadas en los párrafos anteriores, se ha creído oportuno seleccionar unas condiciones de trabajo intermedias para cada una de las variables, como las que se relacionan a continuación: volumen de acetonitrilo, 2.5 mL; peso de muestra, 3 gramos; tiempo de extracción, 10 minutos y temperatura de extracción, 50°C. Es evidente

que en aquellos casos en los que la información a obtener, a partir del extracto graso de la muestra de queso, se relacione con compuestos específicos, el diseño experimental realizado permitiría escoger unas condiciones experimentales óptimas para preparar el extracto, que podrían ser sustancialmente diferentes a las seleccionadas en este trabajo.

Por último, por su interés en cuanto a la planificación de los trabajos relacionados con las determinaciones de aldehídos y cetonas en muestras de extracto graso de queso, se ha querido establecer la posible conservación de los mismos. Con muestras obtenidas utilizando las condiciones experimentales establecidas anteriormente, se ha comprobado que los extractos son estables, al menos durante 6 días, si se mantienen en congelador, a -20°C .

Derivatización de compuestos carbonílicos en el extracto graso

Con anterioridad se ha estudiado la interacción de un número considerable de aldehídos y cetonas con la 2,4-dinitrofenilhidracina, como base de metodologías para la determinación de dichos compuestos en muestras de humo. Las condiciones experimentales empleadas permitían modificar la acidez del medio, el contenido en acetonitrilo o las concentraciones de los compuestos carbonílicos y de agente derivatizante. Ahora bien, en el caso que nos ocupa, en el proceso de derivatización se parte de una disolución de los aldehídos y cetonas junto con un determinado contenido en grasa, que constituyen lo que hemos llamado el extracto graso. En consecuencia, las concentraciones de analitos y de grasa, así como el volumen de acetonitrilo una vez que se ha optimizado el proceso de extracción, nos vienen impuestos. Asimismo, la naturaleza de los aldehídos y cetonas a considerar se corresponden con los presentes en la muestra de queso utilizada, entre los seleccionados inicialmente, a concentraciones adecuadas para ser detectados: acetaldehído, acroleína + acetona, propionaldehído, crotonaldehído, 2-butanona + butiraldehído, benzaldehído, 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona.

Para conseguir la derivatización de estos compuestos, se ha procurado emplear una disolución de la DNPH en HCl más concentrada que en los capítulos anteriores, con objeto de evitar diluciones innecesarias del extracto graso. En consecuencia, para la derivatización se ha utilizado una disolución con un 0.45% (p/v) de DNPH y un 30% (v/v) de HCl 0.1M, y una relación entre disolución derivatizante y extracto graso igual a 1:5.

En los estudios realizados con anterioridad, se ha prestado especial atención a la cinética y cuantitatividad de las reacciones. En consecuencia, la toma en consideración de parámetros como el tiempo de reacción y los estudios de recuperación adquieren una importancia considerable. Ahora bien, con objeto de acercarnos en la medida de lo posible a comportamientos reales, los estudios relacionados con las interacciones entre compuestos carbonílicos y la DNPH se han realizado con la utilización de muestras de extracto graso obtenidas en las condiciones experimentales establecidas en el apartado anterior. Por lo tanto, como quiera que los mismos ya contienen los compuestos carbonílicos originados en el proceso de maduración del queso, no se han planteado, al menos inicialmente, estudios de recuperación. Sin embargo, el tiempo de reacción sigue siendo una variable de interés incuestionable, cuando se pretende optimizar el proceso de derivatización. Además, en atención a la competencia que puede establecerse entre las fases agua-acetonitrilo, por una parte, y la fase grasa, por otra, a la hora de solubilizar los aldehídos y cetonas y/o sus hidrazonas, se ha introducido, como variable a evaluar, la temperatura a la que tiene lugar la reacción de derivatización.

Siguiendo un procedimiento clásico de optimización de variables, considerándolas de forma independiente, se ha querido establecer, en primer lugar, la influencia de la temperatura. Así, disoluciones que contenían la misma cantidad de extracto graso y de disolución derivatizante, se mantuvieron con agitación constante, durante 30 minutos, al tiempo que se sometía a cada una de ellas a una temperatura diferente. Los resultados obtenidos al establecer el área de un conjunto de compuestos representativos, en cada una de las disoluciones, se encuentran en la Figura VI.9. Se puede observar que con temperaturas de reacción próximas a unos 50°C, o superiores, se alcanzan valores máximos para las áreas de los picos cromatográficos, que consideramos representativas de las concentraciones de las hidrazonas formadas en el proceso de derivatización.

Los resultados representados en la figura que se acaba de comentar, ponen de manifiesto que, aún a temperaturas bajas, correspondientes a disoluciones refrigeradas, las reacciones de derivatización tienen lugar en una extensión considerable, que puede suponer hasta un 40 - 50% de las concentraciones que se obtienen a temperaturas iguales o superiores a 50°C.

Por otra parte, también se han estudiado, durante tiempos comprendidos entre 0 y 24 horas, las disoluciones utilizadas al establecer la temperatura de reacción, manteniéndolas a

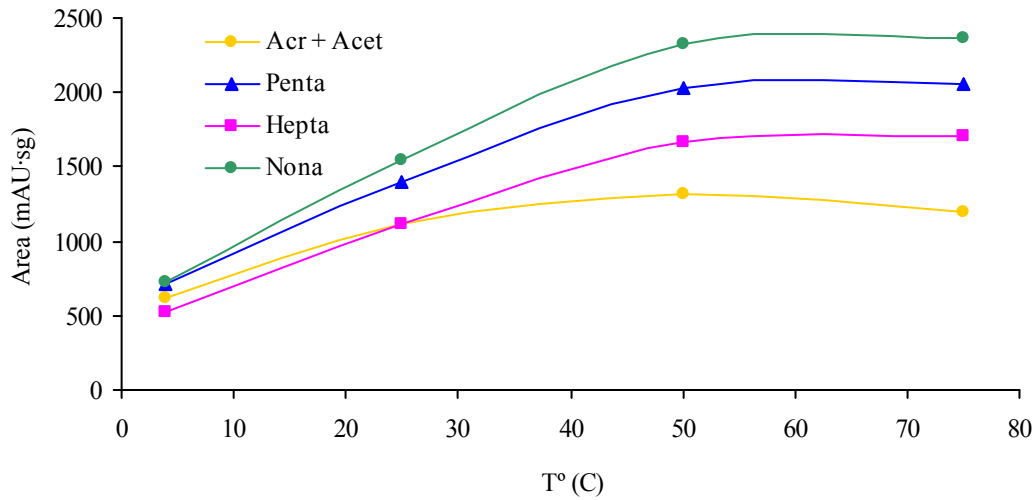


Figura VI.9. Influencia de la temperatura en la reacción de derivatización en una muestra real de queso. Tiempo de reacción: 30 minutos.

una temperatura de 50°C. En la Figura VI.10 se muestran los resultados obtenidos para estas experiencias. Puede observarse que el tiempo de reacción ejerce una influencia considerable en las reacciones de derivatización. Las disoluciones en las que han transcurrido tiempos inferiores a 100 - 120 minutos, proporcionan áreas en los picos cromatográficos que aumentan rápidamente con el tiempo de reacción. Sin embargo, para tiempos superiores, las reacciones no progresan de forma significativa.

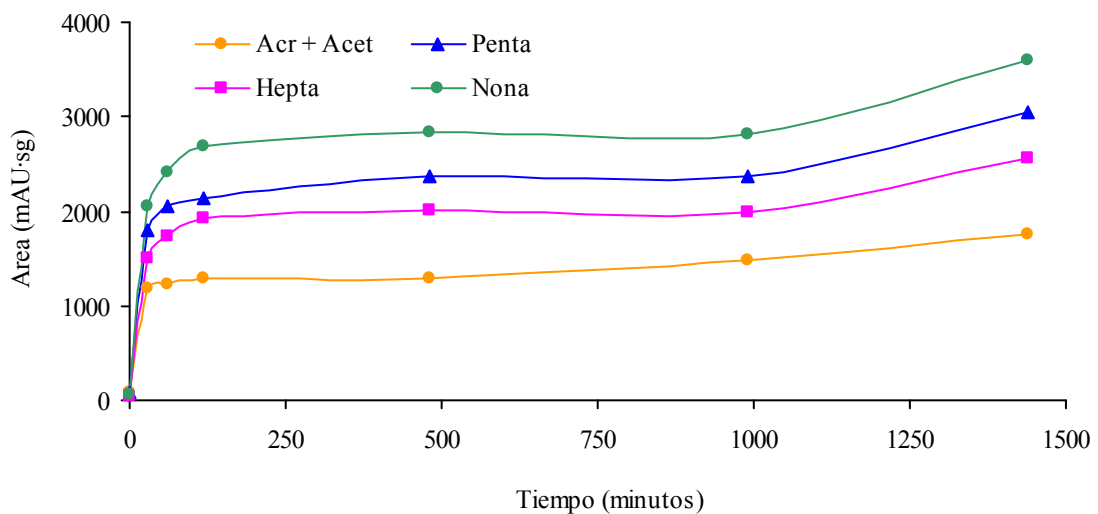


Figura VI.10. Influencia del tiempo en la reacción de derivatización en una muestra real de queso. Temperatura: 50°C.

Si las disoluciones de los extractos grasos se mantienen a una temperatura constante de 4°C, el perfil de variación de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en función del tiempo de reacción, es similar al que se obtiene cuando la temperatura es de 50°C. No obstante, la Figura VI.11, en la que se muestran los resultados obtenidos en dichas experiencias, pone de manifiesto que, entre los valores absolutos de áreas de pico existen diferencias importantes. Por una parte, se observa que para conseguir una estabilización en la cantidad de las hidrazonas formadas, han de transcurrir casi 500 minutos. Por otra parte, las áreas que se alcanzan después de este tiempo son mayores, en todos los casos, que las obtenidas cuando las reacciones de derivatización ocurren a temperaturas altas. Estos aumentos de área pueden estar asociados a una mayor cuantitatividad de las reacciones, cuando se producen a baja temperatura durante un período de tiempo largo, aunque también pueden asociarse a una menor volatilización de los aldehídos y cetonas a derivatizar.

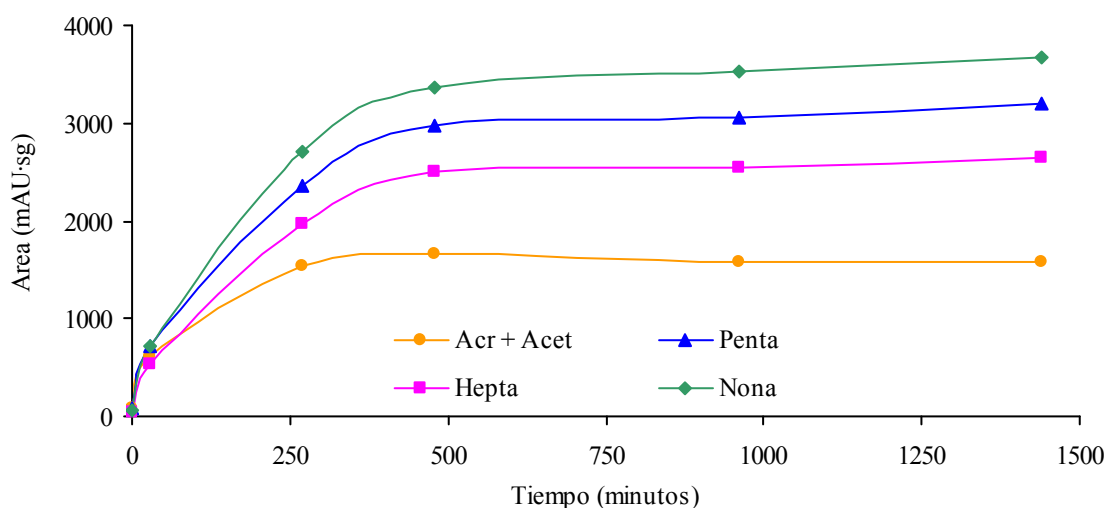


Figura VI.11. Influencia del tiempo en la reacción de derivatización en una muestra real de queso. Temperatura: 4°C.

En cuanto a la selección de las mejores condiciones experimentales para realizar las reacciones de derivatización de los aldehídos y cetonas contenidos en el extracto graso, una vez fijadas las disoluciones a utilizar, el tiempo de reacción puede establecerse en unas 2 horas cuando la temperatura de reacción es de unos 50°C. Cuando se desee priorizar una mayor cuantitatividad de la reacción de derivatización, ha de alargarse el tiempo de reacción hasta unas 8 horas y mantener la temperatura a valores próximos a 4°C, una situación que

sería compatible con una organización del trabajo de laboratorio en la que, por ejemplo, las disoluciones a derivatizar se conserven en frigorífico durante una noche.

Estudios de recuperación

Con fines prácticos, es importante conocer la cuantitatividad de las extracciones de aldehídos y cetonas en las muestras de extracto graso obtenidas a partir de muestras reales de queso. Ante la dificultad de disponer de matrices exentas de aldehídos y cetonas que pudiesen ser aditivadas, los estudios de recuperación realizados se han basado en efectuar extracciones sucesivas en una misma muestra. De esta forma, después de un determinado número de procesos de extracción, la señal cromatográfica de los distintos compuestos carbonílicos presentes originalmente en la muestra de queso, alcanza valores en el entorno de los límites de detección. Consideraremos que, en ese momento, se ha alcanzado la extracción total y que la suma de las señales obtenidas para cada compuesto, en los cromatogramas representativos de las sucesivas extracciones, es equivalente a la señal que correspondería a la concentración total del aldehído o cetona considerada.

Los estudios de recuperación se han realizado en dos tipos de muestras representativas de quesos semigrasos, con contenidos en grasa comprendidos entre el 30 y el 40%, y diferentes cantidades en compuestos carbonílicos: un queso Azul Roquefort, representativo de muestras con un alto contenido en metilcetonas, y un queso Manchego curado, con contenidos inferiores en estos compuestos.

Las experiencias realizadas muestran que, en general, después de realizar cuatro extracciones sucesivas, en las condiciones experimentales indicadas anteriormente, se observa que los compuestos carbonílicos presentes en la muestra original, prácticamente, han sido extraídos en su totalidad. En la Figura VI.12 se han representado los tamaños de los picos cromatográficos correspondientes a los compuestos más representativos, en cada una de las recuperaciones efectuadas, después de ser extraídos y derivatizados. Puede observarse que, en general, las diferencias entre las áreas de los picos representativos de la tercera y cuarta extracción son pequeñas, en términos relativos, y, en todo caso, considerablemente inferiores a las obtenidas a partir de los compuestos recuperados en las dos primeras extracciones.

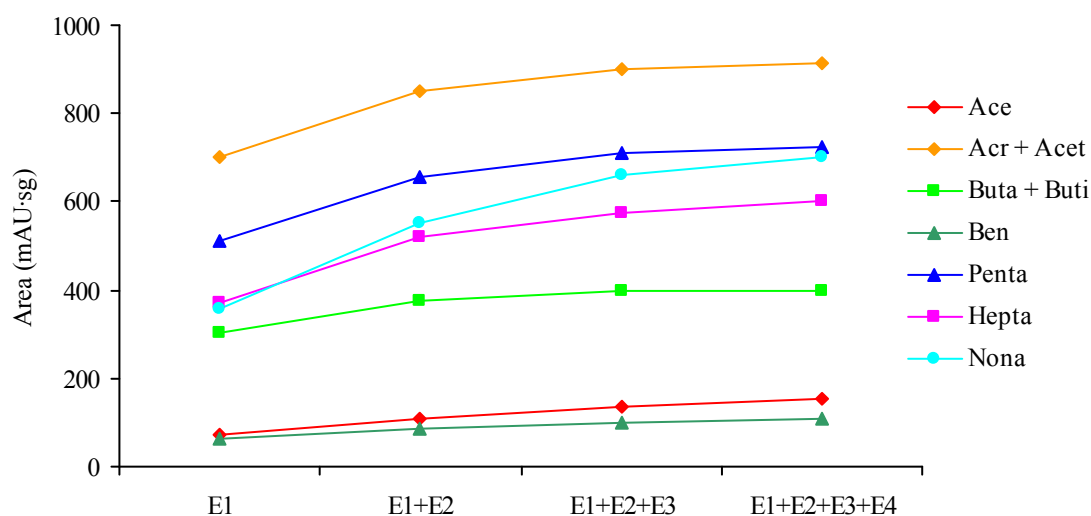


Figura VI.12. Recuperaciones acumuladas de aldehídos y cetonas, al efectuar cuatro extracciones sucesivas en una muestra de queso Manchego.

Por otra parte, los porcentajes de recuperación agrupados en la Tabla VI.5 muestran la similitud de comportamientos entre los resultados correspondientes a los dos tipos de queso. Incluso, al comparar entre compuestos carbonílicos, se observan comportamientos similares. En términos porcentuales, la eficacia asociada a compuestos como el acetaldehído, benzaldehído y 2-nonanona se reparte más uniformemente entre las cuatro extracciones.

Tabla VI.5. Porcentaje de compuestos carbonílicos extraídos mediante extracciones consecutivas.

Compuesto	Manchego				Roquefort			
	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)	E4 (%)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)	E4 (%)
Acetaldehído	45.1	25.1	17.4	12.4	42.9	26.1	18.6	12.5
Acr + Acet	76.7	16.3	5.2	1.8	77.0	18.6	3.5	0.8
Buta + Buti	76.3	18.3	5.4	0.0	79.4	14.9	4.2	1.5
Benzaldehído	57.9	22.3	14.4	5.4	45.5	32.9	14.0	7.5
2-Pentanona	70.4	20.1	7.2	2.2	70.5	23.2	5.1	1.2
2-Heptanona	62.1	24.5	9.5	3.9	58.3	29.7	9.4	2.7
2-Nonanona	50.6	27.7	15.5	6.3	46.2	33.6	14.5	5.6

Con fines prácticos, es importante destacar las elevadas recuperaciones que, en general, se alcanzan en las primeras extracciones. En la Figura VI.13 se muestran los resultados correspondientes a los porcentajes de recuperación que se obtienen al efectuar dos extracciones. Se observa que, en general, existe una similitud importante en los resultados representativos de los dos tipos de queso y, además, que los porcentajes de recuperación obtenidos son elevados. Los menores porcentajes de extracción, prácticamente de un 70%, se obtienen para el acetaldehído. Le siguen, en orden creciente, los correspondientes al benzaldehído y a la 2-nonanona, que se sitúan en las proximidades del 80%. En atención a estos resultados, se puede indicar que para la cuantificación de compuestos carbonílicos en extractos grasos de queso, basta con efectuar dos extracciones con acetonitrilo, en las condiciones experimentales establecidas en apartados anteriores. De esta forma se obtienen porcentajes de recuperación próximos o superiores al 90%, para compuestos como 2-heptanona, 2-pentanona, acroleína + acetona y 2-butanona + butiraldehído, y porcentajes cercanos al 70% o al 80%, para los compuestos citados anteriormente.

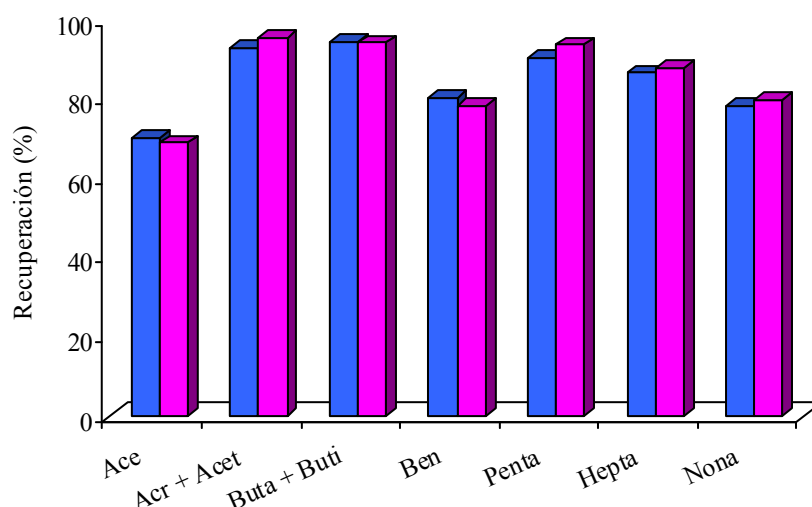


Figura VI.13. Recuperaciones obtenidas en dos extracciones, para compuestos carbonílicos contenidos en muestras de queso Manchego ■ y Roquefort ■.

Cuantificación

En los apartados anteriores, se han procurado definir unas condiciones óptimas para la extracción y derivatización de los compuestos carbonílicos procedentes de muestras de queso.

Sin embargo, no se ha establecido una metodología adecuada para la cuantificación de los aldehídos y cetonas extraídos. Al tomar en consideración este aspecto, se ha de prestar atención a la dificultad que puede suponer la complejidad de la matriz, constituida por una disolución en acetonitrilo en la que, a pesar de haber eliminado una parte importante de la grasa original, pueden quedar porciones significativas de la misma. Este hecho, puede condicionar la preparación de curvas de calibrado representativas.

Con la finalidad de establecer las condiciones experimentales adecuadas para preparar las curvas de calibrado, se han realizado distintas experiencias previas, encaminadas a comprobar y comparar las relaciones existentes entre la señal cromatográfica y la concentración de compuestos carbonílicos presentes en los extractos. Para los distintos aldehídos y cetonas, se obtienen relaciones lineales cuando se miden las áreas de los picos cromatográficos correspondientes a los derivados obtenidos de los extractos preparados a partir de distintas cantidades de queso con el mismo volumen de acetonitrilo y de los preparados a partir de la misma cantidad de queso con distintos volúmenes de acetonitrilo. También se alcanzan relaciones lineales cuando se han utilizado diferentes volúmenes de un extracto de una muestra de queso aditivados con una misma alícuota de una disolución patrón de los compuestos carbonílicos seleccionados y posteriormente derivatizados.

Una vez que se ha comprobado que la derivatización de los compuestos carbonílicos con la DNPH proporciona cantidades de hidrazonas proporcionales a la concentración de los mismos, en diferentes condiciones experimentales, se han realizado experiencias encaminadas a construir curvas de calibrado, a partir de:

- Disoluciones preparadas a partir del extracto graso obtenido de un queso semigraso, con un contenido intermedio en metilcetonas, que se aditivan con diferentes alícuotas de una disolución patrón de compuestos carbonílicos.
- Disoluciones preparadas a partir del extracto graso obtenido de un queso semigraso, con un alto contenido en metilcetonas, aditivadas con diferentes alícuotas de una disolución patrón de compuestos carbonílicos.
- Disoluciones patrón de compuestos carbonílicos en acetonitrilo, es decir, sin la presencia de grasa.

Las curvas de calibrado obtenidas a partir de los tres tipos de disoluciones indicadas serán identificadas tomando en consideración que las mismas no se preparen a partir del extracto graso (curvas SG), que contengan contenidos intermedios (curvas MCI) o altos (curvas MCA) de metilcetonas. En otro orden de cosas, en las curvas construidas con las disoluciones preparadas a partir de extractos grasos, se ha comprobado que el orden de adición de los reactivos, que intervienen en la reacción principal de derivatización, los compuestos carbonílicos y la DNPH, ejerce una influencia importante en el rendimiento de tales reacciones. Las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas para los distintos aldehídos y cetonas son considerablemente superiores cuando el reactivo derivatizante se añade en último lugar. Es posible que la eficacia de la reacción de derivatización disminuya si en el momento de incorporar los compuestos carbonílicos se encuentran con la DNPH asociada a la grasa presente en el extracto.

En la Tabla VI.6 se han agrupado datos representativos de las tres curvas de calibrado obtenidas. Los valores de la desviación estándar residual, $S_{y/x}$, muestran que las desviaciones de la linealidad, entre las relaciones de las señales cromatográficas y las concentraciones de los compuestos carbonílicos, son, en general, aceptables. Por otra parte, se observa que en la mayoría de los casos, las pendientes de las rectas guardan una considerable similitud. En la Tabla VI.6 se han excluido los datos correspondientes a la 2-nonanona. En los extractos grasos que constituyen las matrices de las disoluciones utilizadas para construir la curva MCA, las concentraciones de esta cetona son considerablemente superiores a las añadidas en los procesos de aditivación, con lo cual se obtienen curvas de calibrado escasamente significativas.

Con objeto de comparar las curvas de calibrado obtenidas, en la Figura VI.14 se han representado las relaciones (R) entre las pendientes de cada una de las curvas de calibrado obtenidas a partir de extractos grasos (curvas MCI y MCA), y las obtenidas a partir de disoluciones patrón de los compuestos carbonílicos en acetonitrilo (curvas SG).

Excepto para la 2-pentanona, los resultados obtenidos muestran una similitud entre las pendientes correspondientes a las curvas de calibrado MCI y SG, para las que se obtienen valores de R comprendidos entre 0.90 y 1.15, con un valor medio de 0.99. También existe una considerable similitud entre las curvas MCA y SG, salvo para los casos puntuales de la 2-heptanona y el octaldehído para los que parecen existir diferencias considerables.

Tabla VI.6. Parámetros de calidad representativos de las diferentes curvas de calibrado.

Compuesto	SG		MCI		MCA	
	Pendiente (mAU·sg)/(mg/L)	S _{y/x}	Pendiente (mAU·sg)/(mg/L)	S _{y/x}	Pendiente (mAU·sg)/(mg/L)	S _{y/x}
Formaldehído	680.1	23.4	612.3	39.2	660.7	67.0
Acetaldehído	337.3	26.1	388.3	21.0	361.9	46.0
Acr + Acet	315.3	44.9	293.0	49.3	244.4	48.2
Propionaldehído	130.3	11.6	124.0	10.5	101.0	24.8
Crotonaldehído	399.3	49.0	411.2	41.2	293.2	47.2
Buta + Buti	229.3	21.2	234.1	42.4	244.1	24.3
Benzaldehído	141.0	11.2	141.6	21.6	144.1	26.2
2-Pentanona	110.9	30.1	145.2	9.0	79.2	55.0
Valeraldehído	138.0	10.6	135.1	16.7	129.4	43.8
<i>p</i> -tolualdehído	253.2	23.8	246.3	38.8	249.8	42.3
Hexaldehído	226.0	19.7	228.9	29.5	234.3	32.7
2-Heptanona	105.6	27.0	105.1	4.7	39.9	67.8
Heptaldehído	135.4	41.0	127.4	15.2	118.4	13.8
Octaldehído	68.8	10.1	67.9	1.6	40.0	21.6
Nonaldehído	113.5	19.8	88.3	6.2		

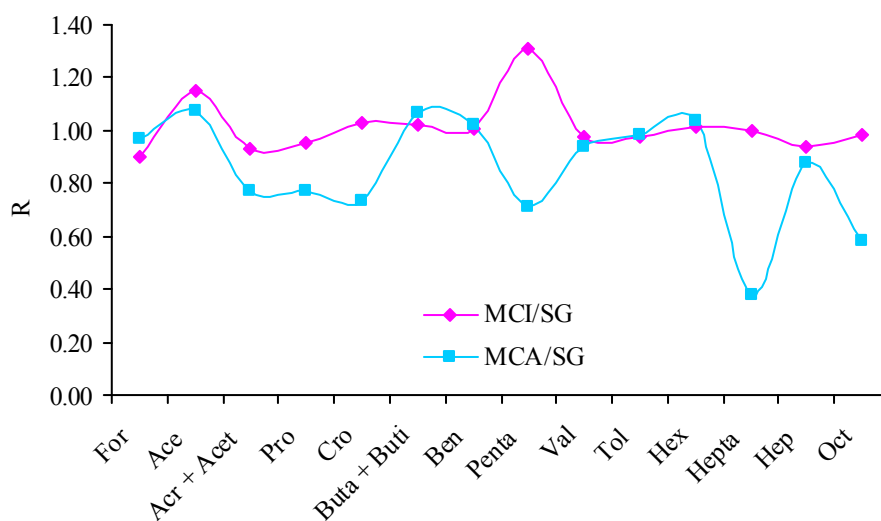


Figura VI.14. Relaciones entre las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas a partir de disoluciones de extractos grasos aditivados (MCI y MCA) y las correspondientes a disoluciones de los compuestos carbonílicos en acetonitrilo (SG).

En los tres casos mencionados, estaríamos ante compuestos que se caracterizan por presentar curvas de calibrado cuyas pendientes están entre las más bajas. El octaldehído es, entre los compuestos considerados, el que presenta una menor sensibilidad. Las pendientes de las curvas de calibrado disminuyen, en general, al aumentar el peso molecular de los compuestos carbonílicos. En el caso de la 2-pentanona y 2-heptanona, la menor pendiente de la curva MCA se debe al alto contenido en metilcetonas que suelen presentar los quesos azules. En efecto, las ordenadas en el origen de las curvas MCA correspondientes a la 2-pentanona y 2-heptanona, presentan señales que representan el 72% y el 97%, respectivamente, de las señales cromatográficas que se obtienen a partir de extractos grasos aditivados con 3 mg/L de las respectivas cetonas. En consecuencia, puede considerarse que los valores de R, alejados de la unidad, que se obtienen al considerar las curvas de calibrado de los compuestos citados, no deben asociarse al mayor o menor contenido en metilcetonas del extracto que constituye la matriz, sino a que la forma de preparar las curvas de calibrado no es adecuada para estos compuestos, por la alta concentración de las muestras sin aditivar.

Los resultados comentados permiten establecer la similitud de las curvas de calibrado obtenidas a partir de disoluciones patrón de los aldehídos y cetonas disueltos en acetonitrilo y las que se construyen con extractos grasos. En consecuencia, por comodidad, rapidez y

versatilidad, la cuantificación de compuestos carbonílicos en los extractos grasos de quesos se realizará con la utilización de curvas de calibrado que no tengan en cuenta la matriz de las muestras, es decir, con disoluciones de los analitos en acetonitrilo. En la Tabla VI.7, se encuentran parámetros de calidad de la metodología. Ha de tenerse en cuenta que, en la Tabla VI.6 se han incluido las pendientes y valores de $S_{y/x}$ de las distintas curvas de calibrado.

Los límites de cuantificación (LQ), incluidos en la Tabla VI.7, se han calculado para el proceso completo, es decir, para la muestra de queso. Para ello se ha empleado la definición de la IUPAC, que considera el LQ como la concentración correspondiente a la señal obtenida mediante la media de un blanco más 10 veces su desviación estándar.

Tabla VI.7. Parámetros de calidad asociados a la curva de calibrado.

Compuesto	* LQ ($\mu\text{g/Kg}$)	R^2	Rango de concentración (mg/L)
Formaldehído	13.6	0.998	0.20 - 2.25
Acetaldehído	48.8	0.993	0.27 - 3.05
Acr + Acet	67.9	0.996	0.68 - 7.63
Propionaldehído	39.7	0.997	0.45 - 5.01
Crotonaldehído	64.2	0.978	0.39 - 4.37
Buta + Buti	19.3	0.999	0.81 - 9.03
Benzaldehído	59.2	0.998	0.53 - 5.87
2-Pentanona	38.0	0.994	0.78 - 8.70
Valeraldehído	46.6	0.998	0.46 - 5.14
<i>p</i> -tolualdehído	40.0	0.998	0.56 - 6.23
Hexaldehído	18.4	0.997	0.50 - 5.55
2-Heptanona	189.7	0.977	0.80 - 8.91
Heptaldehído	249.4	0.992	0.97 - 10.87
Octaldehído	176.9	0.997	0.80 - 8.91
2-Nonanona	6.7	0.995	0.81 - 9.02

* Límite de cuantificación.

La precisión de la metodología, expresada como repetitividad, se ha establecido para el proceso completo, es decir, para las etapas de extracción, derivatización y medida. Con tal

finalidad se realizaron siete experiencias a partir de una misma muestra de queso, sin aditar los extractos. Como ya se comentó anteriormente, los compuestos carbonílicos detectados en los extractos fueron: acetaldehído, acroleína + acetona, 2-butanona + butiraldehído, benzaldehído, 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona, y sus desviaciones estándar relativas variaron entre un 9% para el acetaldehído y un 25% para el par de compuestos acroleína + acetona.

VI.3.3. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE QUESOS

En atención a los objetivos planteados, en este apartado se centrará la atención en la determinación de aldehídos y cetonas presentes en la fracción volátil del queso. Para ello, se utilizará una metodología analítica basada en la medida por HPLC de los compuestos carbonílicos previamente derivatizados con la DNPH en una interfaz SPME-HPLC. Con tal finalidad, son utilizables las condiciones experimentales establecidas en el capítulo IV, para los procesos de desorción-derivatización que se optimizaron para las determinaciones efectuadas con muestras de humo. En consecuencia, al plantearnos las determinaciones en muestras de queso, debemos establecer los valores más adecuados para las variables que regulan la extracción de los aldehídos y cetonas presentes en este tipo de matriz.

Como se indicó en la introducción al capítulo, la SPME se encuentra entre las técnicas empleadas con éxito en los estudios relacionados con la presencia de compuestos carbonílicos en la fracción volátil del queso, con la ventaja adicional de poder establecer la presencia de otros componentes de la misma, especialmente si se utiliza GC-MS como técnica de separación-identificación. Sin embargo, con esta metodología las sensibilidades obtenidas son relativamente pequeñas y, en consecuencia, sólo se consigue detectar un número reducido de los compuestos carbonílicos presentes en dicha fracción y, por tanto, pueden pasar inadvertidos componentes importantes del aroma del queso. Sin embargo, es de esperar que con una metodología en la que los analitos se convierten en sus respectivas hidrazonas y en la que la determinación se efectúa mediante HPLC-UV, puedan determinarse con mayor sensibilidad los compuestos carbonílicos presentes en dichas muestras.

En atención a la eficacia demostrada en la extracción de aldehídos y cetonas en muestras de humo, según las experiencias comentadas en el capítulo IV, para la extracción de

los compuestos carbonílicos presentes en la fracción volátil del queso, mediante microextracción en fase sólida, debe resultar adecuada la fibra CW/TPR. En cuanto a las variables experimentales que afectan de forma considerable a los procesos que regulan el equilibrio de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase estacionaria polimérica de la fibra, es necesario fijar valores adecuados para el tiempo que cada uno de los aldehídos y cetonas necesitan para alcanzar el equilibrio, y para la temperatura a la que debe mantenerse el medio.

Para establecer los valores óptimos de las citadas variables, se han utilizado muestras de queso de 8 gramos, previamente congelado y rallado, en viales de 30 mL, condiciones similares a las empleadas habitualmente en trabajos basados en la utilización de técnicas de espacio en cabeza para el estudio de la fracción volátil en muestras de queso [52,62-64]. Las experiencias realizadas a temperatura ambiente pusieron de manifiesto que se necesitan tiempos de equilibrio de 24 horas, durante los que la muestra se mantiene sometida a una agitación constante, para obtener valores máximos de la señal cromatográfica representativa de los aldehídos y cetonas extraídos con la fibra.

En atención a lo expuesto, con muestras de queso como las indicadas, y siguiendo un procedimiento experimental similar, se procedió a establecer los tiempos y las temperaturas de extracción que proporcionan valores óptimos en los respectivos procesos de microextracción.

Con tal finalidad, se utilizó un diseño factorial de dos niveles, 2^2 , del tipo screening, que da lugar a 4 experiencias. Los factores estudiados, su codificación, así como los valores máximos y mínimos utilizados en el diseño, se muestran en la Tabla VI.8. Puesto que, en las experiencias previas realizadas se comprobó que se necesitaba un tiempo excesivo para completar el equilibrio de extracción, se optó por fijar, en el diseño experimental, un tiempo de extracción máximo de una hora.

Tabla VI.8. Niveles de los factores en el diseño experimental.

Factor	Clave	Menor (-)	Mayor (+)
Tiempo de extracción, min	A	10	60
Temperatura de extracción, °C	B	25	75

En la Tabla VI.9 se encuentra la matriz obtenida para el diseño experimental.

Tabla VI.9. Matriz del diseño experimental.

Experiencia	Tiempo de extracción (min)	Temperatura de extracción (°C)
1	60	75
2	10	25
3	60	25
4	10	75

Las cartas de Pareto representadas en la Figura VI.15 muestran la importancia de los efectos principales y sus interacciones. En las mismas se pone de manifiesto que, para los compuestos más volátiles, el tiempo de extracción es el factor más importante y tiene un efecto positivo en la extracción, mientras que la temperatura es una variable que ejerce un efecto negativo y menos importante. Es probable que nos encontremos ante aldehídos y cetonas que, por su volatilidad, pasan fácilmente a la fase gas, sin necesitar de temperaturas altas.

En el caso de la 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona, componentes importantes y mayoritarios de algunos tipos de quesos, la variable con mayor influencia en el proceso de extracción es la temperatura, con un efecto negativo. Posiblemente, en los equilibrios de distribución de estas cetonas, de igual forma que con los aldehídos aunque con menor intensidad, los aumentos de temperatura que, por un lado, favorecen el paso de las mismas desde la muestra de queso al espacio en cabeza, dificultan, por otra parte, la retención de las mismas en la fibra facilitando el proceso de desorción. Además, con respecto a los dos factores considerados, la interacción entre ambos presenta, en algunos casos, un efecto de magnitud considerable, intermedio entre los factores individuales y, en general, negativo.

En atención a los resultados obtenidos y con objeto de disponer de unas condiciones de operación que faciliten el trabajo experimental, se han seleccionado, como condiciones adecuadas para la extracción de los aldehídos y cetonas en la fracción volátil de los quesos, la temperatura más baja y el tiempo de extracción más alto entre los ensayados, 25°C y 60 minutos, respectivamente.

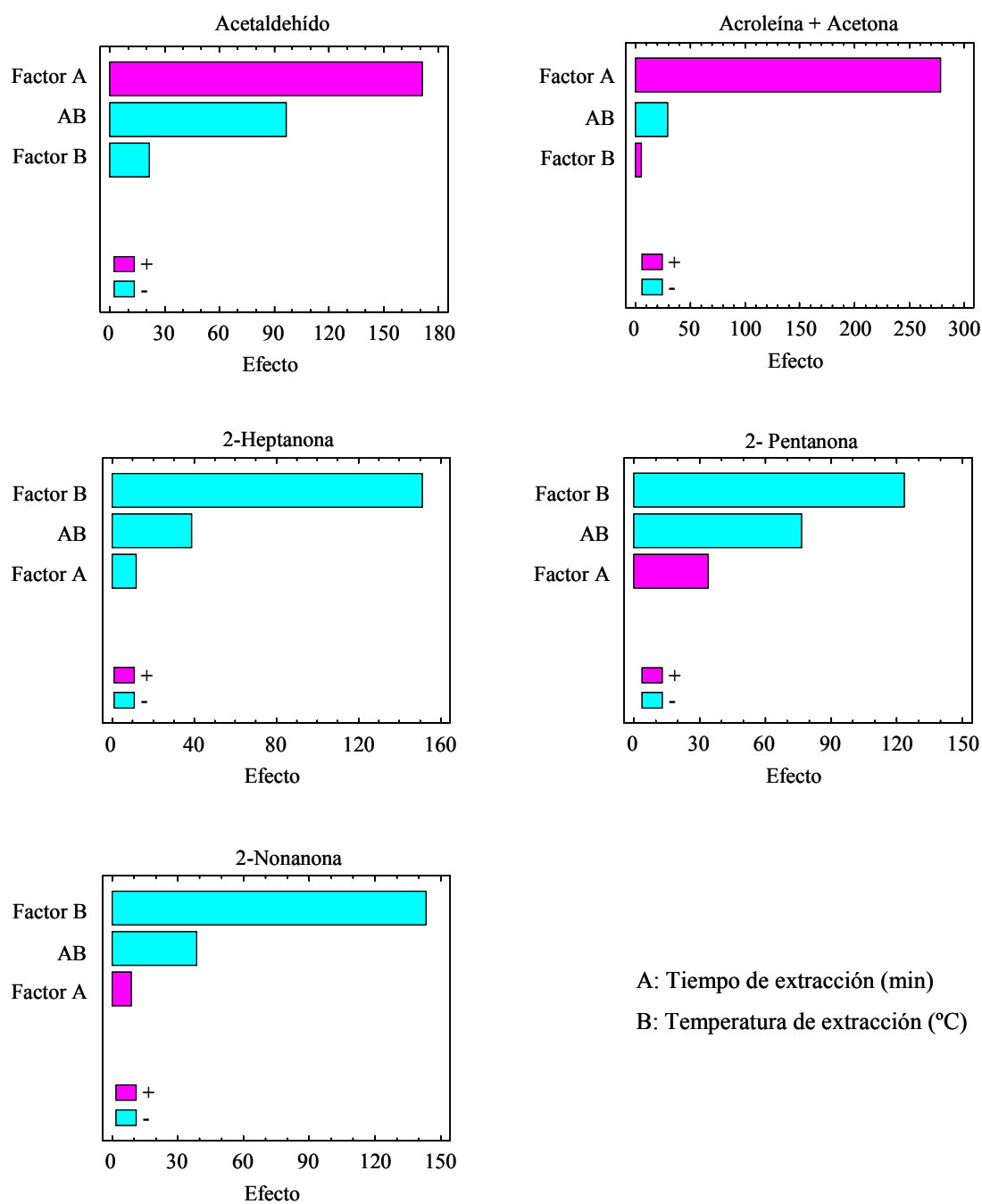


Figura VI.15. Cartas de Pareto de efectos para los compuestos carbonílicos mayoritarios encontrados en una muestra real de queso.

Una vez efectuada la extracción de los compuestos carbonílicos, la derivatización y desorción de los mismos se ha llevado a cabo en la interfaz SPME-HPLC, en las condiciones experimentales establecidas en el capítulo IV.

VI.3.4. COMPUESTOS CARBONÍLICOS EN EL EXTRACTO GRASO Y EN LA FRACCIÓN VOLÁTIL DE QUESOS COMERCIALES

En este apartado se muestran y comparan los resultados obtenidos, al aplicar las metodologías desarrolladas para la determinación de compuestos carbonílicos, en muestras de extractos grasos (EG) y fracciones volátiles (FV) de quesos. Los quesos seleccionados para el estudio difieren entre sí, al menos, en algunas de las siguientes características: tipo de leche y tecnología utilizada en su preparación, estado de maduración o tratamientos a los que han sido sometidos.

Las finalidades principales, que se pretenden alcanzar con este trabajo, se orientan a comprobar la viabilidad de las metodologías analíticas desarrolladas y al establecimiento de la mayor o menor cantidad y calidad de la información que puede suministrar la naturaleza y concentración de los compuestos carbonílicos determinados, en los dos tipos de muestra asociadas a los quesos seleccionados, es decir, al extracto graso y a la fracción volátil de cada uno. Asimismo, se pretende utilizar dicha información para establecer parámetros o criterios que permitan diferenciar entre tipos de queso diferentes, en función de las características señaladas anteriormente.

En la Tabla VI.I, se han agrupado los catorce tipos de quesos utilizados para obtener los diferentes extractos grasos y fracciones volátiles a analizar. En la misma se incluyen también algunas características generales de interés comercial.

Contenidos totales en la fracción volátil y en el extracto graso

Siguiendo el procedimiento experimental indicado con anterioridad, los cromatogramas obtenidos al someter las muestras a análisis por HPLC, son semejantes al representado en la Figura VI.16, correspondiente al extracto graso y fracción volátil de una muestra de queso ahumado. El cromatograma es típico de los que se obtienen con muestras que han sido sometidas a derivatización con DNPH, pudiendo observarse que el número de picos representativos de los compuestos carbonílicos, y su tamaño, son similares para ambas fracciones de la muestra, para este tipo de queso.

Los resultados obtenidos al someter a análisis diez muestras representativas de los quesos comerciales seleccionados se han agrupado en las Tablas VI.10 y VI.11, para los

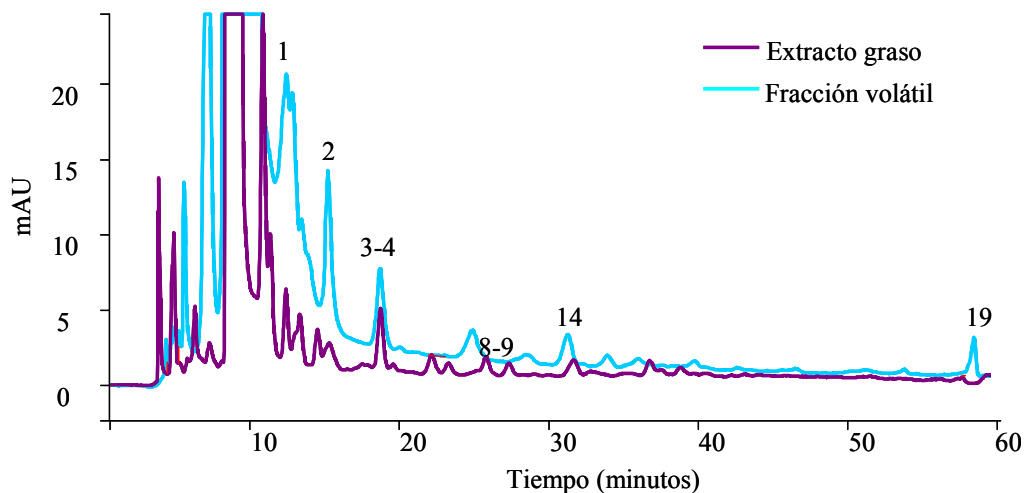


Figura VI.16. Cromatograma obtenido mediante HPLC-UV, correspondiente a la fracción volátil y al extracto graso de una muestra comercial de queso ahumado.

extractos grasos y fracciones volátiles, respectivamente. En dichas tablas, los resultados se expresan como áreas de los picos cromatográficos obtenidos. De esta forma, se pretenden respetar las señales representativas de los procedimientos de extracción empleados, sin transformar los tamaños de los picos en concentraciones, con objeto de evitar la influencia que pueda ejercer en los resultados los diferentes sistemas de calibración que se utilizan como parte de los procedimientos analíticos asociados a la técnica empleada para la obtención de los extractos.

Tabla VI.10. Tamaño de los picos cromatográficos de los compuestos carbonílicos identificados en muestras de los extractos grasos de quesos comerciales.

Compuesto	Áreas de pico (mAU·sg)									
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
For					76	48				29
Ace	74	103	29	89	67	110	264	157	207	272
Acr + Acet	984	101	59	167	97	42	1233	16979	14479	72
Buta + Buti	321	35	1548	47	52	27	59	67	146	
Ben	69	35	27				61	20	36	21
Penta	827	377	72	53	41	22	185	2741	4158	28
Hepta	569	167					310	1316	5595	23
Nona	475	138	23				771	1490	2577	51

En las citadas tablas, sólo se han incluido los analitos que originan picos cromatográficos suficientemente intensos como para ser utilizables analíticamente y, además, que se hayan encontrado en tres o más de las muestras de los extractos grasos o de las fracciones volátiles analizadas.

Tabla VI.11. Tamaño de los picos cromatográficos de los compuestos carbonílicos identificados en muestras de las fracciones volátiles de quesos comerciales.

Compuesto	Áreas de pico (mAU·sg)									
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
For		203	333	213	245	162	138	307	210	323
Ace	46	171	115	264	245	150	133	241	235	305
Acr + Acet		139	96	116	168	118	157	507	671	146
Buta + Buti		79	91	59	98	70	75	72	76	69
Ben		24								
Pen	58	95	55	91	85	64	75	745	832	103
Hepta							78	604	665	
Nona		47	30	40	54	24	250	516	427	55

Con objeto de establecer comparaciones entre los contenidos de compuestos carbonílicos presentes en la fracción volátil y en el extracto graso de las muestras de quesos, se ha optado por expresarlos como la suma de las áreas de cada uno de los picos cromatográficos representativos. En la Figura VI.17, se han representado dichos contenidos y, además, las relaciones ($R = EG/FV$) entre los contenidos de aldehídos y cetonas en los extractos grasos y en las fracciones volátiles de las mismas muestras. Se puede observar que, en cuatro de los quesos analizados, los contenidos totales de compuestos carbonílicos son superiores en las muestras representativas de las fracciones volátiles, para las que se calculan valores de las relaciones iguales o inferiores a 0.5. Los contenidos en ambas fracciones son inferiores a los establecidos en las restantes muestras de queso y similares entre sí. En las muestras representativas de los otros seis quesos, los contenidos de compuestos carbonílicos en los extractos grasos superan los correspondientes a las respectivas fracciones volátiles. Así mismo, en estas muestras parecen diferenciarse dos grupos de quesos, uno en el que las relaciones de contenidos presentan valores comprendidos entre 1 y 3.5, y otro, en los que dicha relación supera valores de 7, con independencia de M1, cuyo contenido en la fracción

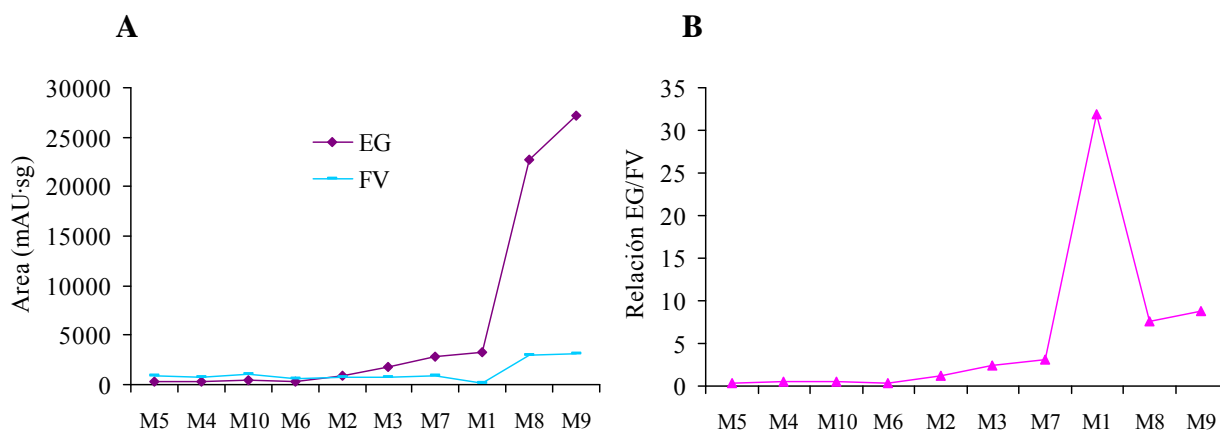


Figura VI.17. Contenidos totales (A) de compuestos carbonílicos en los extractos grasos (EG) y en las fracciones volátiles (FV) de muestras de quesos comerciales y relación entre dichos contenidos (B).

volátil puede ser anómalo.

A partir de los contenidos totales de compuestos carbonílicos en los extractos grasos y en las fracciones volátiles de las muestras de quesos, pueden establecerse comparaciones de interés. Así, entre las muestras analizadas, las tres que corresponden a quesos ahumados (M5, M6 y M10), se encuentran entre las que presentan valores de R inferiores a la unidad, es decir, que de confirmarse las conclusiones obtenidas, podría añadirse a las características de los quesos ahumados, la de proporcionar fracciones volátiles que contienen mayor contenido en compuestos carbonílicos que los respectivos extractos grasos.

En la Figura VI.18 se ha representado el porcentaje de la suma de los contenidos de formaldehído y acetaldehído en el extracto graso y en la fracción volátil de las muestras de quesos comerciales. Como se ha comentado con anterioridad, estos dos aldehídos se pueden considerar como los más importantes desde una perspectiva toxicológica y medioambiental, al tiempo que son, entre los aldehídos y cetonas seleccionados para este estudio, los componentes más volátiles. En la citada figura se observa que las tres muestras de quesos elaborados con leche de cabra (M5, M6 y M10) que, además, han sido sometidas a ahumado, son las que presentan porcentajes de estos aldehídos más próximos entre sí, en el extracto graso y en la fracción volátil.

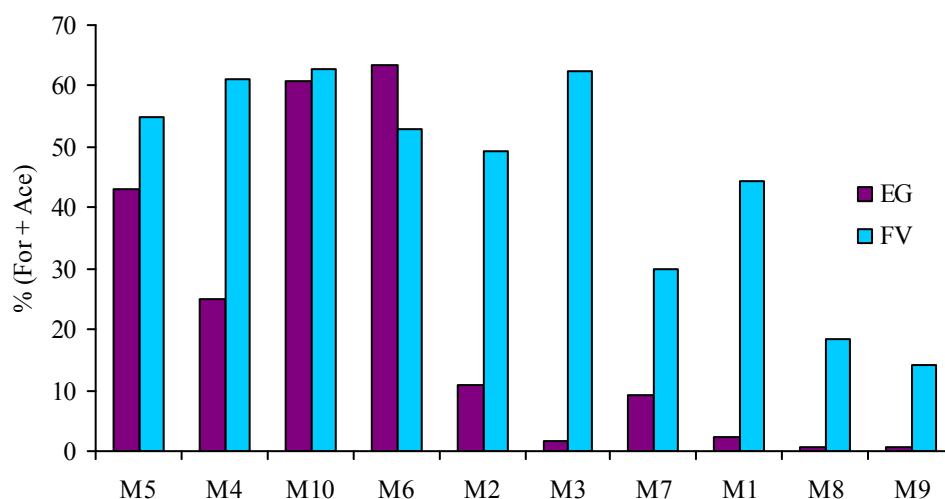


Figura VI.18. Porcentajes de la suma de contenidos de formaldehído y acetaldéhído en extractos grasos y fracciones volátiles de muestras de quesos comerciales.

En general, se observa una gran variabilidad en el contenido de compuestos carbonílicos hallados en los extractos grasos de las muestras, con valores para las áreas de los picos cromatográficos comprendidos entre 300 y 27000 (mAU·sg), mientras que el rango de valores se acorta considerablemente para las áreas correspondientes a los picos representativos de las fracciones volátiles. En la Figura VI.17A se pone de manifiesto que estas últimas son similares en siete de las diez muestras.

Contenidos en el extracto graso. Caracterización de muestras de queso

A partir de los resultados que se acaban de comentar, puede suponerse que, en general, cuando se pretenda disponer de parámetros que permitan diferenciar entre tipos de quesos, los contenidos de aldehídos y cetonas en el extracto graso de los quesos nos proporcionarán una información de mayor significación que la suministrada a partir de los contenidos en las respectivas fracciones volátiles.

Con objeto de explorar la posibilidad de obtener información que pueda ser de utilidad para diferenciar entre muestras de queso, a partir de la determinación de los contenidos en aldehídos y cetonas en el extracto graso, se ha procedido a establecer la concentración de un

conjunto de diecisiete compuestos carbonílicos, en los extractos grasos de catorce muestras de quesos comerciales. En la Tabla VI.12, se han agrupado los resultados obtenidos para los compuestos considerados más representativos, en atención a la magnitud de las concentraciones y a la frecuencia con la que se han podido cuantificar cada uno de los compuestos carbonílicos en las muestras.

Como se pone de manifiesto en los datos agrupados en la Tabla VI.12, los compuestos carbonílicos presentes en concentraciones que puedan considerarse significativas, en las muestras del extracto graso de los quesos, son relativamente escasos. Por otra parte, las concentraciones totales de estos compuestos son muy variables, alcanzando valores que oscilan entre 1.5 mg/kg, en los extractos representativos de las dos muestras de queso Palmero (M5 y M6), y los más de 210 mg/kg hallados en los extractos correspondientes a los quesos Azul cremoso (M13) y Roquefort (M9).

Entre los catorce tipos de quesos seleccionados, se observan diferencias considerables, no sólo en el contenido total de compuestos carbonílicos presentes en los respectivos extractos grasos, sino en los perfiles de distribución de los distintos aldehídos y cetonas. Al respecto, destacan tres componentes: 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona, incluidas con frecuencia entre las metilcetonas características de los quesos azules, cuyas concentraciones permiten diferenciar tres grupos de muestras:

- 1. Constituido por las dos muestras de queso Palmero (M5 y M6), en las que no se detectan la 2-heptanona y 2-nonanona, siendo muy pequeña la concentración total de la 2-pentanona, 0.14 y 0.30 mg/kg, así como del total de compuestos carbonílicos, como se acaba de indicar.
- 2. Constituido por aquellas muestras que, al contrario de las anteriores, presentan altos contenidos en las tres cetonas mencionadas. Entre estas muestras, se encuentran las correspondientes a los quesos azules (M7, M8, M9, M12 y M13) y las de quesos curados (M1 y M2).
- 3. Constituido por las cinco muestras restantes, que incluirían los quesos frescos (M10, M11 y M14) y semicurado (M3), además de la muestra de queso Gruyere (M4). En general, los contenidos totales de compuestos carbonílicos y de las tres cetonas citadas, en los extractos grasos, presentan valores intermedios a los que caracterizan a los grupos anteriores.

Tabla VI.12. Contenido de compuestos carbonílicos en el extracto graso de quesos comerciales.

Compuesto	Concentraciones (mg/Kg)													
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14
For	* NQ	0.02	0.02	0.02	0.10	0.07	0.01	NQ	NQ	0.04	0.05	0.01	NQ	0.05
Ace	0.46	0.63	0.21	0.55	0.42	0.66	1.53	0.93	1.21	1.57	0.55	2.48	1.44	4.54
Acr + Acet	3.43	0.37	0.23	0.60	0.36	0.17	4.30	58.91	50.24	0.27	0.19	1.39	80.03	0.27
Buta + Buti	1.47	0.14	7.19	0.20	0.22	0.10	0.25	0.29	0.66	NQ	NQ	0.06	0.55	NQ
Ben	0.85	0.46	0.37	NQ	NQ	0.20	0.76	0.29	0.47	0.30	0.26	0.36	0.29	3.53
Penta	7.32	3.31	0.59	0.41	0.30	0.14	1.59	24.37	37.00	0.19	0.11	1.61	54.58	0.65
Hepta	8.38	2.63	0.47	0.43	NQ	NQ	4.67	19.07	80.25	0.58	0.57	4.80	49.93	1.32
Nona	8.19	2.30	0.30	0.11	NQ	NQ	13.35	25.89	44.87	0.79	0.64	5.04	46.09	2.24

* No cuantificado.

En relación con el segundo grupo de muestras, en la Figura VI.19(A) se ponen de manifiesto los perfiles de distribución de los compuestos carbonílicos cuantificados en los extractos grasos de tres de los quesos azules: Azul danés (M8), Roquefort (M9) y Azul cremoso (M13), que se diferencian del resto por presentar unas concentraciones de 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona muy superiores. Esta característica de los quesos azules, puesta ahora de manifiesto a través de la composición de los extractos grasos, ha sido destacada por diferentes autores [1,27,54] en otros tipos de análisis.

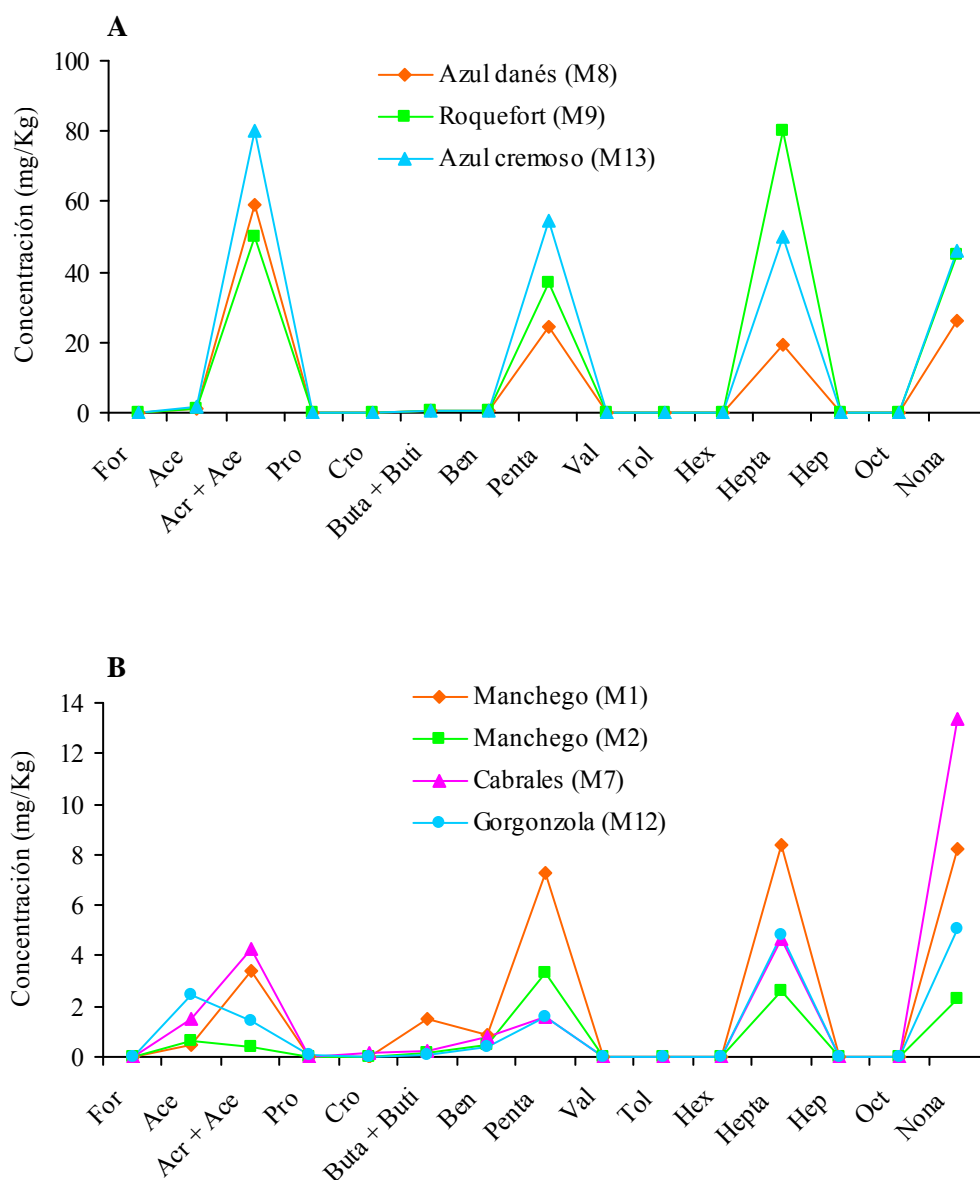


Figura VI.19. Concentraciones de compuestos carbonílicos en el extracto graso de muestras de quesos azules y quesos curados.

En la figura indicada también se muestra que el contenido en acroleína + acetona es tan elevado como los de las cetonas mencionadas, e igual de representativo para las muestras de extractos grasos de los quesos azules citados. Entre los componentes mencionados se alcanzan porcentajes superiores al 98%, sobre el total de compuestos carbonílicos, en los extractos grasos de las tres muestras consideradas.

En la Figura VI.19(B) se encuentra una representación similar a la anterior, pero referida a cuatro muestras distintas. Dos corresponden a quesos azules: Cabrales (M7) y Gorgonzola (M12), mientras que las otras dos lo son de quesos curados: Manchego (M1) y Manchego (M2). En términos generales, se observa que las concentraciones en los compuestos más representativos son considerablemente inferiores en estas muestras. Sin embargo, los perfiles de distribución para los componentes comentados en la Figura VI.19(A): 2-pentanona, 2-heptanona, 2-nonanona y acroleína + acetona, son similares para las muestras incluidas en ambas figuras. No obstante, aparecen algunas diferencias, como las correspondientes a las concentraciones de acetaldehído y de 2-butanona + butiraldehído, en las muestras representativas de los quesos Gorgonzola y Manchego curado.

También muestran perfiles de distribución similares entre sí, en los contenidos en compuestos carbonílicos presentes en los extractos grasos, las tres muestras representativas de los quesos frescos de cabra, incluidos en este estudio. En la Figura VI.20 se puede observar,

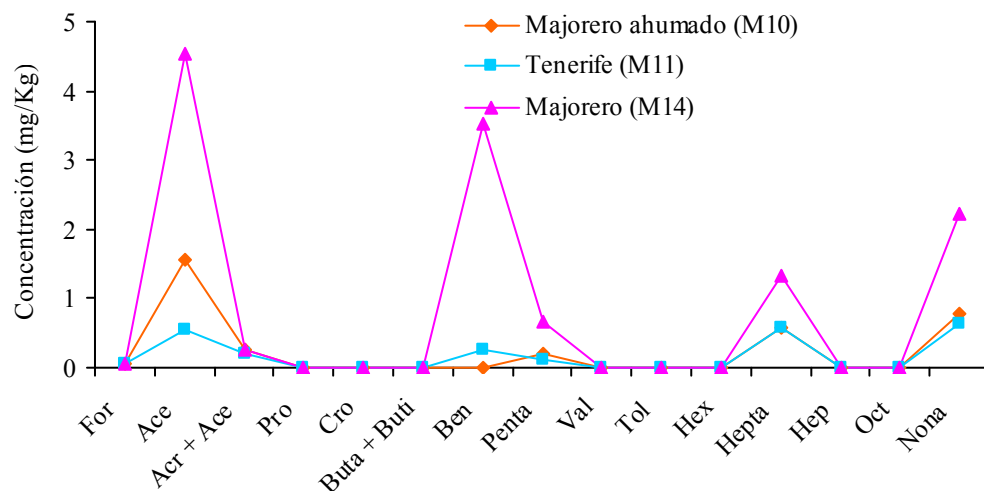


Figura VI.20. Concentraciones de compuestos carbonílicos en extractos grasos de muestras de queso fresco de cabra.

además, que junto con la 2-heptanona y 2-nonanona y, en menor proporción, la 2-pentanona, ya mencionadas en los casos anteriores, en estas muestras también se encuentran, como componentes mayoritarios, el acetaldehído y benzaldehído, a diferencia de lo que sucede para la mayoría de los quesos azules y curados.

Por último, las muestras de quesos Manchego semicurado (M3) y Gruyere (M4), presentan perfiles diferentes a las consideradas hasta ahora. Sin embargo, si se exceptúa la concentración de 2-butanona + butiraldehído correspondiente a la muestra de queso Manchego semicurado, que puede ser anómala, ambas muestras presentarían perfiles similares entre sí.

VI.4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Alewijn M., Sliwinski E.L., Wouters J.T.M. A fast and simple method for quantitative determination of fat-derived medium and low-volatile compounds in cheese. *International Dairy Journal*, **13**, 733-741 (2003).
- [2] Molimard P., Spinnler H.E. Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheeses origins and properties. *Journal of Dairy Science*, **79**, 169-184 (1996).
- [3] Mc Sweeney P.L.H, Sousa M.J. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening. *Lait*, **80**, 293-324 (2000).
- [4] Moio L., Addeo F. Grana Padano cheese aroma. *Journal of Dairy Research*, **65**, 317-333 (1998).
- [5] Fernández-García E., Carbonell M., Núñez M. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese, 1. Comparison of raw and pasteurised milk cheese. *Journal of Dairy Research*, **69**, 579-593 (2002).
- [6] Fernández-García E., Serrano C., Núñez M. Volatile fraction and sensory characteristics of Manchego cheese 2. Seasonal variation. *Journal of Dairy Research*, **69**, 595-604 (2002).
- [7] Keeney M., Day E.A. Probable role of the Strecker degradation of amino acids in development of cheese flavour. *Journal of Dairy Science*, **40**, 874-876 (1957).
- [8] Dunn H.C., Lindsay R.C. Evaluation of the role of microbial Strecker-derived aroma compounds in unclean-type flavors of Cheddar cheese. *Journal of Dairy Science*, **68**, 2859-2874 (1985).
- [9] Kinsella J.E., Hwang D. Biosynthesis of flavors by *Penicillium-Roqueforti*. *Biotechnology and Bioengineering*, **18**, 927-938 (1976).
- [10] Lees G.J., Jago G.R. Role of acetaldehyde in metabolism - Review 1. Enzymes catalyzing reactions involving acetaldehyde. *Journal of Dairy Science*, **61**, 1205-1215 (1978).
- [11] Lees G.J., Jago G.R. Role of acetaldehyde in metabolism - Review 2. Metabolism of acetaldehyde in cultured dairy-products. *Journal of Dairy Science*, **61**, 1216-1224 (1978).
- [12] Casey J., Dobb R. Microbial routes to aromatic-aldehydes. *Enzyme and Microbial Technology*, **14**, 739-747 (1992).
- [13] Fernández-García E., Carbonell M., Gaya P., Núñez M. Evolution of the volatile components of ewes raw milk Zamorano cheese. Seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 701-711 (2004).
- [14] Dartey C.K., Kinsella J.E. Rate of formation of methyl ketones during Blue cheese ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **19**, 771-774 (1971).
- [15] Day E.A., Anderson D.F. Cheese flavor - Gas Chromatographic and Mass Spectral identification of natural components of aroma fraction of Blue cheese. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **13**, 2-4 (1965).

- [16] Hawke J.C. Reviews of progress of dairy science. Section D. Dairy chemistry. Formation and metabolism of methyl ketones and related compounds. *Journal of Dairy Research*, **33**, 225-243, (1966).
- [17] Schwartz D.P., Parks O.W. Methyl ketones in Camembert cheese. *Journal of Dairy Science*, **46**, 1136-1139 (1963).
- [18] Moinas M., Groux M., Horman I. La flaveur des fromages. I. - Une méthodologie nouvelle d'isolement de constituants volatils application au Roquefort et au Camembert. *Lait*, **53**, 601-609 (1973).
- [19] Moinas M., Groux M., Horman I. La flaveur des fromages. III. - Mise en evidence de quelques constituants mineurs de l'arôme du Camembert. *Lait*, **55**, 414-417 (1975).
- [20] Okumura J., Kinsella J.E. Methyl ketone formation by *Penicillium-Camemberti* in model systems. *Journal of Dairy Science*, **68**, 11-15 (1985).
- [21] Carbonell M., Núñez M., Fernández-García E. Evolution of the volatile components of ewes raw milk La Serena cheese during ripening. Correlation with flavour characteristics. *Lait*, **82**, 683-698 (2002).
- [22] Carbonell M., Núñez M., Fernández-García E. Seasonal variation of volatile compounds in ewes raw milk La Serena cheese. *Lait*, **82**, 699-711 (2002).
- [23] Fernández-García E., Gaya P., Medina M., Núñez M. Evolution of the volatile components of raw ewes' milk Castellano cheese: seasonal variation. *International Dairy Journal*, **14**, 39-46 (2004).
- [24] Martínez-Castro I., Sanz J., Amigo L., Ramos M., Martínez-Alvarez P. Volatile compounds of Manchego cheese. *Journal of Dairy Research*, **58**, 239-246 (1991).
- [25] Sable S., Cottenceau G. Current knowledge of soft cheeses flavor and related compounds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **47**, 4825-4836 (1999).
- [26] Hall G., Andersson J. Volatile fat oxidation-products .1. Determination of odor thresholds and odor intensity functions by dynamic olfactometry. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **16**, 354-361 (1983).
- [27] Alewijn M., Sliwinski E.L., Wouters J.T.M. Production of fat-derived (flavour) compounds during the ripening of Gouda cheese. *International Dairy Journal*, **15**, 733-740 (2005).
- [28] Bintsis T., Robinson R.K. A study of the effects of adjunct cultures on the aroma compounds of Feta-type cheese. *Food Chemistry*, **88**, 435-441 (2004).
- [29] Guillen M.D., Ibargoitia M.L. Volatile components of aqueous liquid smokes *Vitis vinifera* L shoots and *Fagus sylvatica* L wood. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **72**, 104-110 (1996).
- [30] Guillen M.D., Ibargoitia M.L. New components with potential antioxidant and organoleptic properties, detected for the first time in liquid smoke flavoring preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **46**, 1276-1285 (1998).
- [31] Curioni P.M.G., Bosset J.O. Review: Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. *International Dairy Journal*, **12**, 959-984 (2002).

- [32] Bosset J.O., Gauch R. Comparison of the volatile flavour compounds of six European “AOC” cheeses by using a new dynamic headspace GC-MS method. *International Dairy Journal*, **3**, 359-377 (1993).
- [33] Kosikowski F.V., Mocquot G. Le mode de formation de la saveur du fromage. *Progrès de la technologie du fromage. Etudes agricoles de la FAO, n° 38. Organisation des Nations Unies par l’Alimentation et l’Agriculture*, Roma (1958).
- [34] Marsili R.T. SPME–MS–MVA as an electronic nose for the study of off-flavors in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 648-654 (1999).
- [35] Pérès C., Viallon C., Berdagué J.L. Solid phase microextraction– mass spectrometry: a new approach to rapid characterization of cheeses. *Proceedings of the 15th International Conference on Mass Spectrometry*, Barcelona (2000).
- [36] Pérès C., Viallon C., Berdagué J.L. Solid phase microextraction–mass spectrometry: new approach to rapid characterization of cheeses. *Analytical Chemistry*, **73**, 1030-1036 (2001).
- [37] Berdagué J.L., Vernat G., Rossi V. Caractérisation instrumentale de la qualité des matières premières et des aliments par analyses des composés volatils. *Viandes et Produits Carnés*, **14**, 135-138 (1993).
- [38] Berdagué J.L., Viallon C., Kondjoyan N., Denoyer C., Thonat C. Les composés volatils fournissent la signature du produit. *Viandes et Produits Carnés*, **19**, 78-80 (1998).
- [39] Vernat G., Berdagué J.L. Dynamic headspace-mass spectrometry (DHS–MS): a new approach to real-time characterization of food products. *Proceedings of the Symposium on Bioflavour’95*, Dijon (1995).
- [40] Schaller E., Zenhäusern S., Zesiger T., Bosset J.O., Escher F. Use of preconcentration technique applied to MS-based “electronic nose”. *Analisis*, **28**, 743-749 (2000).
- [41] Dittmann B., Nitz S., Horner G. A new chemical sensor on a mass spectrometric basis. *Advances in Food Sciences*, **20**, 115-121 (1998).
- [42] Dittmann B., Nitz S. Strategies for the development of reliable QA/ QC methods when working with mass spectrometry-based chemosensory systems. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **69**, 253-257 (2000).
- [43] Dittmann B., Zimmermann B., Engelen C., Jany G., Nitz S. Use of the MS-sensor to discriminate between different dosages of garlic flavoring in tomato sauce. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**, 2887-2892 (2000).
- [44] Fernández-García E. Use of headspace sampling in the quantitative analysis of artisanal Spanish cheese aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 1833-1839 (1996).
- [45] Gallois A., Langlois D. New results in the volatile odorous compounds of French cheeses. *Lait*, **70**, 89-106 (1990).
- [46] Ulberth F. Headspace gas chromatographic estimation of some yogurt volatiles. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **74**, 630-634 (1991).
- [47] Christensen K.R., Reineccius G.A. Gas chromatographic analysis of volatile sulfur compounds from heated milk using static headspace sampling. *Journal of Dairy Science*, **75**, 2098-2104 (1992).

- [48] Kubickova J., Grosch W. Evaluation of potent odorants of Camembert cheese by dilution and concentration techniques. *International Dairy Journal*, **7**, 65-70 (1997).
- [49] Bosset J.O., Gauch R., Mariaca R., Klein B. Comparison of the various sample treatments for the analysis of volatile compounds by GC-MS: Application to the Swiss Emmental cheese. *Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittelchemie und Hygiene*, **86**, 672-698 (1995).
- [50] Chiofalo B., Zumbo A., Costa R., Liotta L., Mondello L., Dugo P., Chiofalo V. Characterization of Maltese goat milk cheese flavour using SPME-GC/MS. *South African Journal of Animal Science*, **34**, 176-180 (2004).
- [51] Verzera A., Ziino M., Condurso C., Romeo V., Zappala M. Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for rapid characterisation of semi-hard cheeses. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **380**, 930-936 (2004).
- [52] Frank D.C., Owen C.M., Patterson J. Solid phase microextraction (SPME) combined with gas-chromatography and olfactometry-mass spectrometry for characterization of cheese aroma compounds. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, **37**, 139-154 (2004).
- [53] Tomaino R.M., Parker J.D., Larick D.K. Analysis of free fatty acids in whey products by solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**, 3993-3998 (2001).
- [54] Mariaca R., Bosset J.O. Instrumental analysis of volatile (flavour) compounds in milk and dairy products. *Lait*, **77**, 13-40 (1997).
- [55] Engels W.J.M., Dekker R., Jong C., Neeter R., Visser S.A. Comparative study of volatile compounds in the water-soluble fraction of various types of ripened cheese. *International Dairy Journal*, **7**, 255-263 (1997).
- [56] García Falcón S., González Amigo S., Lage Yusty M.A., López de Alda Villaizán M.J., Simal Lozano J. Determination of Benzo[a]pyrene in smoking-flavour agents (water-soluble liquid smoke) by second derivative constant-wavelength synchronous spectrofluorimetry. *Talanta*, **43**, 659-664 (1996).
- [57] Taborda G., Molina E., Martínez-Castro I., Ramos M., Amigo L. Composition of the water-soluble fraction of different cheeses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 270-276 (2003).
- [58] Salles C., Septier C., Roudot-Algaron F., Guillot M., Etikvant P.X. Sensory and chemical analysis of fractions obtained by gel permeation of water-soluble Comté cheese extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**, 1659-1668 (1995).
- [59] Dong J-Z., Moldoveanu S.C. Gas chromatography–mass spectrometry of carbonyl compounds in cigarette mainstream smoke after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography A*, **1027**, 25-35 (2004).
- [60] Uchiyama S., Ando M., Aoyagi S. Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, **996**, 95-102 (2003).
- [61] Uchiyama S., Kaneko T., Tokunaga H., Ando M., Otsubo Y. Acid-catalyzed isomerization and decomposition of ketone-2,4-dinitrophenylhydrazones. *Analytica Chimica Acta*, **605**, 198-204 (2007).

-
- [62] Guillén M.D., Ibargoitia M.L., Sopelana P, Palencia G. Components detected by headspace-solid phase microextraction in artisanal fresh goat's cheese smoked using dry prickly pear (*Opuntia ficus indica*). *Lait*, **84**, 385-397 (2004).
- [63] Ziino M., Conduurso C., Romeo V., Giuffrida D., Verzera A. Characterization of Provola dei Nebrodi, a typical Sicilian cheese, by volatiles analysis using SPME-GC/MS. *International Dairy Journal*, **15**, 585-593 (2005).
- [64] Carpino S., Mallia S., La Terra S., Melilli C., Licitra G., Acree T.E., Barbano D.M., Van Soest P.J. Composition and aroma compounds of Ragusano cheese: Native pasture and total mixed rations. *Journal of Dairy Science*, **87**, 816-830 (2004).



Resumen y Conclusiones

RESUMEN Y CONCLUSIONES

En este apartado se resume el trabajo efectuado y recogido en cada uno de los capítulos de la presente tesis, atendiendo al plan de trabajo esbozado desde un principio, en consideración a las finalidades y objetivos propuestos. De esta forma, se pretende ofrecer una visión global acerca del mismo, al tiempo que se exponen las conclusiones que se consideran más relevantes. Con objeto de organizar los contenidos, los comentarios se han agrupado en los siguientes apartados:

1. Selección de una técnica analítica para la medida de compuestos carbonílicos.
 2. Estrategias para la toma de muestra y calibración, en relación con la cuantificación de compuestos carbonílicos en muestras de humo.
 3. Utilización del acoplamiento SPME-HPLC para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de humo.
 4. Contenido de aldehídos y cetonas en muestras de humo.
 5. Diferenciación entre muestras de humo, atendiendo al tipo de resto vegetal utilizado para su obtención.
 6. Determinación de compuestos carbonílicos en el extracto graso de los quesos.
 7. Determinación de compuestos carbonílicos en la fracción volátil de los quesos.
 8. Compuestos carbonílicos en muestras comerciales de queso.
-
1. Los antecedentes bibliográficos ponen de manifiesto que la solución a problemas analíticos, asimilables a los planteados en esta tesis, requieren de la utilización de técnicas cromatográficas para la separación y determinación de los compuestos carbonílicos previamente derivatizados. Seleccionada la 2,4-dinitrofenilhidracina como reactivo para transformar los aldehídos y cetonas objeto de análisis en sus correspondientes hidrazonas, se ha procedido a comparar dos metodologías, probablemente las más ampliamente utilizadas para la medida de estos analitos, como son HPLC-UV y GC-MS. Con tal finalidad, ambos métodos se han sometido a validación, siguiendo requerimientos de las

normas ISO, mediante la determinación de parámetros de calidad: linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud. Así mismo, ante la importancia del conocimiento de la incertidumbre asociada a una metodología, como parte esencial de una determinación cuantitativa, se ha calculado, mediante una aproximación bottom-up, la incertidumbre asociada con la medida de la muestra y del proceso de calibración en HPLC-UV y GC-MS.

Los resultados obtenidos, para la determinación de trece aldehídos y cetonas, muestran que los valores medios de las concentraciones establecidas día a día, medidas con HPLC-UV, presentan los siguientes valores de precisión y exactitud: DSR < 7.8% y ER < 8.3%, mientras que para las realizadas con GC-MS serían: DSR < 20% y ER < 7.3%, respectivamente. En cuanto a los límites de detección, los valores medios obtenidos por HPLC-UV oscilan entre 0.018 y 0.077 mg/L, mientras que con GC-MS se obtienen valores próximos entre sí, para la mayoría de los compuestos analizados, comprendidos entre 0.050 y 0.062 mg/L, excepto en el caso del formaldehído, para el que se ha establecido un valor de 0.116 mg/L. Por último, el cálculo de las incertidumbres expandidas, para un nivel bajo de concentraciones, muestra, en general, valores inferiores en las determinaciones mediante HPLC-UV.

En atención a los resultados obtenidos en el estudio comparativo realizado, y aunque ambas metodologías de medida permiten obtener valores de concentración que no presentan diferencias significativas entre sí, se ha seleccionado la HPLC-UV para las determinaciones de aldehídos y cetonas a efectuar en la presente tesis.

2. Es habitual que el humo necesario para el ahumado artesanal del queso en las Islas Canarias se obtenga por combustión incontrolada de restos vegetales. En consecuencia, las muestras de humo se caracterizan por su falta de reproducibilidad y homogeneidad. Al pretender disponer de metodologías adecuadas para identificar y cuantificar los compuestos carbonílicos presentes en las mismas, una primera opción para la toma de muestra es recurrir a métodos avalados por regulaciones oficiales, como los propuestos por la EPA o recogidos en normas UNE para la determinación de aldehídos y cetonas en muestras de aire.

Ahora bien, en el transcurso de nuestro trabajo, se ha puesto de manifiesto la falta de cuantitatividad de algunas reacciones de derivatización de ciertos aldehídos y cetonas con DNPH, aparte de cinéticas de reacción inadecuadas en otras. Además, las disoluciones de la 2,4-dinitrofenilhidracina suelen encontrarse contaminadas por impurezas procedentes del producto comercialmente disponible o por la atmósfera del laboratorio que interfieren en las determinaciones. En consecuencia, en la toma de muestra, que se debe realizar de forma simultánea con la derivatización de los aldehídos y cetonas presentes en las muestras, debe tenerse en cuenta las circunstancias comentadas. Por otra parte, como experimentalmente hemos puesto en evidencia, no es recomendable, para la construcción de curvas de calibrado, la preparación de las correspondientes disoluciones patrón a partir de preparados comerciales de las respectivas hidrazonas, tal como se propone en las metodologías oficiales citadas.

Por los motivos expuestos, se proponen dos sistemas alternativos para la toma de muestras de humo procedentes de la combustión de biomasa, en orden a establecer el contenido de aldehídos y cetonas en las mismas. Uno de los sistemas se basa en preparar las hidrazonas en un tubo colector de gases, en el que se introduce la muestra o los patrones de calibración, a unos 60°C, al tiempo que se inyecta la disolución de DNPH a través de un septum. El otro sistema se basa en hacer pasar la muestra de humo a través de un cartucho relleno con gel de sílice impregnada con DNPH, como se recomienda en las normativas EPA y UNE, pero los patrones de las hidrazonas a utilizar en la calibración, en lugar de obtenerlos a partir de las respectivas disoluciones comerciales, se preparan en cartuchos similares a los empleados en la toma de muestra y se eluyen con acetonitrilo.

Las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas por ambas metodologías difieren entre un 10% y un 90% de las halladas cuando se emplean disoluciones patrón comerciales de las hidrazonas. Las metodologías propuestas presentan precisiones similares entre sí con valores comprendidos entre 1.0 y 13.7%. Los límites de detección referidos a una toma de muestra en cartucho, durante 20 minutos a un flujo de 2 L/min, varían entre 10 y 42.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mientras que los obtenidos mediante la recolección con tubos colectores de 1 L de capacidad oscilan entre 0.25 y 2.35 mg/m^3 .

Ambos sistemas de muestreo pueden considerarse complementarios. El basado en la utilización de tubos colectores presenta la ventaja de poder tomar la muestra y derivatizarla en el lugar en que se origina, para ser transportada posteriormente al

laboratorio. La utilización del sistema que hace uso de cartuchos rellenos, necesita de una bomba que impulse la muestra a través del sistema de muestreo y que permita establecer el volumen de aire en el que se encuentra la muestra de humo, pero tiene, como ventajas, la facilidad de uso y el permitir la preconcentración de las muestras.

3. Algunas de las dificultades que afectan a las metodologías comentadas anteriormente, pueden encontrar solución con el empleo de la microextracción en fase sólida, con objeto de facilitar el traslado de los analitos desde la muestra al sistema de medida. La metodología desarrollada en este trabajo consta de dos etapas esenciales. En la primera se procede a la extracción de los aldehídos y cetonas presentes en las muestras de humo. Con tal finalidad, la muestra se introduce en un recipiente de volumen conocido y se pone en contacto con la fibra seleccionada, durante un cierto tiempo y a una temperatura determinada. La segunda etapa, de desorción-derivatización, ocurre en una interfaz SPME-HPLC que ocupa el lugar que tradicionalmente corresponde al loop del cromatógrafo. En ella, los analitos retenidos previamente en la fibra se ponen en contacto con una disolución de DNPH. Las hidrazonas formadas se inyectan posteriormente en la columna analítica del sistema cromatográfico.

Son numerosas las variables a optimizar para disponer de una metodología adecuada a los problemas planteados. En la etapa de extracción, la naturaleza de la fibra, el tiempo y la temperatura se han seleccionado mediante procedimientos experimentales convencionales, mientras que para la etapa de desorción-derivatización, la concentración de derivatizante y los tiempos de reacción y desorción se han optimizado con la utilización de un diseño factorial.

La carencia de materiales de referencia adecuados al tipo de muestra en consideración, la naturaleza de éstas y las características de la microextracción en fase sólida dificultan el proceso de calibración. Después de ensayar diferentes formas de volatilizar los compuestos carbonílicos, para proceder a su retención por la fibra, se desestimó la utilización, con tal finalidad, de disoluciones de los mismos, pues al producirse la volatilización simultánea del disolvente utilizado, disminuye la eficacia del proceso de retención de los aldehídos y cetonas en la fibra. Por tal motivo, en el procedimiento de calibración propuesto, se parte directamente de preparados comerciales de los compuestos

carbonílicos y no de disoluciones de los mismos. Esta forma de proceder impone limitaciones, especialmente en relación con los volúmenes de analito y el del recipiente en que se provoca la volatilización, que no siempre son fáciles de combinar. Con este tipo de calibración, se consiguen sensibilidades considerablemente superiores a las que se alcanzan cuando se parte de disoluciones patrón de los analitos. Los límites de detección alcanzados, para los distintos aldehídos y cetonas, se encuentran en el intervalo comprendido entre 0.15 y 133 mg/m³.

La metodología establecida ha sido prácticamente imposible de validar. Ante la carencia de materiales de referencia o de muestras de humo patrón, se ha optado por comparar los resultados obtenidos al analizar una misma muestra de humo mediante la metodología a validar y otra tomada como referencia. Al no ser posible generar dos muestras de humo independientes, pero con composiciones similares, se optó por efectuar la microextracción en una muestra contenida en un tubo colector de gases, procediendo luego a transferir el contenido del tubo a un cartucho relleno con gel de sílice impregnada con DNPH. De esta forma, una vez retenidos los aldehídos y cetonas presentes en la muestra, es posible proceder a su cuantificación. Los resultados obtenidos por las dos metodologías no presentan, para unos pocos compuestos carbonílicos, diferencias significativas. Sin embargo, para otros se obtienen resultados considerablemente distintos, seguramente por errores sistemáticos asociados al tratamiento de la muestra en el proceso de validación.

4. Con la utilización de las metodologías analíticas establecidas y/o validadas en este trabajo, se ha procedido a la determinación del contenido de compuestos carbonílicos presentes en el humo producido, por combustión incompleta, a partir de un total de ochenta y tres muestras de restos vegetales, habituales como combustibles para el ahumado de queso en las Islas Canarias: maderas de pino, jara y brezo, acícula de pino, cáscara de almendra y penca de tunera.

Los resultados obtenidos muestran que, para un mismo aldehído o cetona, las diferencias en los contenidos son importantes, no sólo en el humo procedente de la combustión de distintos tipos de restos vegetales, sino incluso entre muestras obtenidas a partir de porciones diferentes de un mismo tipo de material. En general, los materiales que proporcionan cantidades mayoritarias de compuestos carbonílicos son la madera de pino,

madera de jara y penca de tunera. Por otra parte, se observa una gran variabilidad en los resultados, correspondiendo la mayor dispersión a los representativos de muestras procedentes de los materiales que proporcionan humo con contenidos más altos en compuestos carbonílicos, alcanzando valores de unos 1600 mg/m^3 para el humo de madera de pino, mientras que para las muestras procedentes de la combustión de cáscara de almendra, el recorrido intercuartílico no supera los 300 mg/m^3 . Esta dispersión de resultados se debe, al menos en parte, al escaso control que se puede ejercer en las variables que controlan los procesos de combustión referidos.

Los compuestos carbonílicos más abundantes en los humos estudiados son: formaldehído, acetaldehído, acroleína + acetona y propionaldehído, que suponen una aportación al contenido total de compuestos carbonílicos que varía entre el 90.7% y el 91.8% en los humos obtenidos por combustión de acícula de pino, maderas de jara y brezo, cáscara de almendra y penca de tunera. Estos resultados podrían indicar que, en las condiciones en las que se realiza la combustión, los procesos de fraccionamiento molecular de los componentes presentes en los restos vegetales conducen a la formación preferente de los derivados con menor número de átomos de carbono.

La ruptura de las moléculas presentes en los materiales vegetales sometidos a combustión y las transformaciones que ocurren con intervención de los productos formados en dicho proceso, no siempre ocurren a través de las mismas vías. Tampoco los aldehídos y cetonas obtenidos al quemar restos vegetales se producen en iguales proporciones. En consecuencia, las correlaciones entre componentes individuales suelen ser poco significativas. Sin embargo, cuando derivados tan importantes como el formaldehído y acetaldehído se consideran conjuntamente, la correlación con el contenido total de compuestos carbonílicos, en las muestras de humo representativas de cualquiera de los materiales usados como combustibles, presenta valores de correlación de Spearman superiores a 0.92. En general, las correlaciones halladas, permiten establecer tendencias en el comportamiento de los procesos de combustión de biomasa, en cuanto a la emisión de distintos tipos de compuestos. En principio, los resultados obtenidos pueden considerarse compatibles con la hipótesis de que, al menos los aldehídos de mayor peso molecular, tienen su origen en recombinaciones producidas a partir de las moléculas más sencillas, de formaldehído y/o acetaldehído.

5. Desde puntos de vista medioambientales y alimentarios, es importante conocer la composición del humo que afecta a las personas, los materiales y ecosistemas, o que ha de proporcionar determinadas características organolépticas a los alimentos. También es de interés disponer de criterios, basados en parámetros químicos, que permitan diferenciar entre humos atendiendo a la naturaleza de los materiales empleados como combustibles e, incluso, que permitan obtener conclusiones válidas para reconocer el material utilizado en el ahumado de un determinado alimento. En tal sentido, una alternativa habitual al uso de valores absolutos de concentraciones consiste en el empleo de valores porcentuales o el establecimiento de relaciones entre las medianas de las concentraciones de determinados compuestos.

Entre los parámetros establecidos, se encuentran algunos que pueden considerarse prácticamente específicos para un determinado tipo de humo, como sucede con los porcentajes de *p*-tolualdehído [(Tol (%))] y hexaldehído [(Hex (%))] en relación con el humo procedente de la combustión de madera de pino. También existen parámetros, como las relaciones normalizadas del acetaldehído con respecto al formaldehído ($R_{\text{for, Ace}}$) y al propionaldehído ($R_{\text{pro, Ace}}$), con valores paramétricos < 1 y < 3 , respectivamente, que pueden considerarse específicos para un tipo de humo, en estos casos el de madera de pino, pero que no garantizan la identificación de la totalidad de las muestras de dicho tipo de humo.

Otro conjunto de parámetros indicadores, además de ser satisfechos por la totalidad de las muestras procedentes de la combustión de un material concreto, también los cumplen un número relativamente importante de muestras procedentes de otro u otros materiales. Estaríamos ante valores paramétricos cuyo cumplimiento es condición necesaria para clasificar correctamente a un determinado humo, pero que no resulta suficiente. Serían los casos correspondientes a $\text{Ace (\%)} < 28$, para el humo de madera de pino; $\text{Val (\%)} > 0.5$, para el de cáscara de almendra; $R_{\text{for, Ace}} < 2.5$, para los de maderas de pino o jara; $R_{\text{pro, For}} > 2$, para el humo obtenido a partir de madera de jara; y los $R_{\text{cro, Ace}} > 20$ y $R_{\text{cro, Acr}} + \text{Acet} > 17.5$, para el humo de penca de tunera. Por último, algunos parámetros deben considerarse como adecuados para complementar la información obtenida a partir de otras relaciones, pero su cumplimiento no constituye condición necesaria ni suficiente para identificar el material a partir de cuya combustión se produjo una determinada muestra de humo.

No se han hallado parámetros indicadores con valores que cumplan la generalidad de las muestras de humo procedentes de acícula de pino, aunque la mayoría de las mismas cumplen con el requisito de que los porcentajes de formaldehído y valeraldehído sean inferiores al 10% y 0.5%, respectivamente. Quizás, las mayores dificultades en cuanto a la identificación de las muestras de humo mediante la utilización de valores paramétricos, se encuentren con las procedentes de la combustión de madera de brezo.

Aunque el establecimiento empírico de parámetros indicadores puede conducir a resultados de interés, resulta un procedimiento tedioso y, además, no explora todas las posibilidades, ni garantiza la obtención de los mejores resultados. En tal sentido, el análisis multivariante puede suponer una ayuda considerable con objeto de utilizar criterios objetivos que permitan establecer el origen de una muestra de humo, y resultados más rigurosos cuando se pretenda diferenciar entre muestras de humo que procedan de la combustión de materiales vegetales diferentes, a partir de sus contenidos en compuestos carbonílicos.

En efecto, mediante análisis discriminante lineal se ha puesto de manifiesto que la discriminación de las muestras obtenidas a partir de madera de pino, de madera de jara y de penca de tunera, es completa, entre ellas y con las restantes. Aunque de forma menos nítida, también se consigue la separación de las muestras de acícula de pino y cáscara de almendra. En general, los resultados obtenidos son concordantes con los que pueden obtenerse mediante la utilización de los parámetros indicadores, aunque es evidente la mejor definición que puede alcanzarse con el empleo de métodos de análisis discriminante. La validación del procedimiento ha puesto de manifiesto que, para el conjunto de las ochenta y tres muestras de humo analizadas, el procedimiento de clasificación de muestras ha funcionado correctamente en el 92% de los casos agrupados originalmente.

6. Para obtener información representativa acerca de los compuestos carbonílicos presentes en el queso, ahumado o no, en relación con su aportación a las características organolépticas de los mismos y a su evolución a lo largo del proceso de maduración, se han establecido metodologías analíticas apropiadas para su determinación en las

fracciones volátil y grasa del queso, consideradas como representativas de los componentes con mayor incidencia en el olor y el sabor del queso, respectivamente.

Para las determinaciones a efectuar en la fracción grasa, la metodología se basa en la obtención del extracto en acetonitrilo de las muestras de queso, derivatización de los compuestos carbonílicos con DNPH y determinación mediante HPLC de las hidrazonas originadas. Algunas de las ventajas asociadas a la misma son: proporcionar recuperaciones elevadas en el proceso de extracción, poder disponer de disoluciones con bajos contenidos de triglicéridos y proteínas, facilitar la obtención de una considerable selectividad y sensibilidad e introducir, en la etapa de tratamiento de la muestra, el mismo disolvente que se recomienda como solubilizante en la reacción de derivatización de los analitos con la DNPH.

Con objeto de establecer los valores óptimos de las variables con mayor influencia en el proceso de extracción, se ha utilizado un diseño factorial completo de dos niveles, $2^3 +$ estrella, del tipo composición central centrado en las caras. Entre las variables experimentales consideradas, la temperatura utilizada en la obtención del extracto graso es la que mayor influencia ejerce en la eficacia de los correspondientes procesos de extracción. Por otra parte, la única interacción entre variables que resulta ser estadísticamente significativa, es la que tiene lugar entre la temperatura y el tiempo de extracción. Para algunos compuestos, las respuestas máximas se obtienen cuando, de forma simultánea, se utilizan valores elevados de estas dos variables, aunque para otros, los tiempos de extracción altos deben combinarse con temperaturas bajas, para obtener las mayores señales. Por otra parte, la relación V/M, entre el volumen de acetonitrilo añadido y la cantidad de muestra de queso, es una variable que sólo afecta, de forma significativa, a la extracción de un número reducido de compuestos. En atención a los diferentes comportamientos de los distintos compuestos carbonílicos, para preparar los extractos grasos de los quesos, se ha estimado oportuno seleccionar unas condiciones de trabajo consistentes en emplear volúmenes de acetonitrilo de 2.5 mL, 3 g de muestra, 10 minutos y 50°C como tiempo y temperatura de extracción, valores que pueden considerarse intermedios entre los más adecuados para los distintos analitos.

Ante las características especiales que presenta la matriz, la metodología a utilizar para la determinación de los compuestos carbonílicos en los extractos grasos, también requiere optimización del proceso de derivatización. Para esta nueva situación, se ha establecido

que unas condiciones apropiadas para la reacción entre los aldehídos y cetonas y la DNPH, incluiría la utilización de tiempos de reacción de unas 2 horas cuando la temperatura de reacción es de unos 50°C. Sin embargo, cuando se desee priorizar una mayor cuantitatividad de la reacción de derivatización, ha de alargarse el tiempo de reacción hasta unas 8 horas y mantener la temperatura a valores próximos a 4°C. En las condiciones experimentales establecidas, son necesarias cuatro extracciones sucesivas para aproximarse a una extracción total de los compuestos carbonílicos presentes en las muestras de queso. Sin embargo, con sólo dos extracciones se obtienen porcentajes de recuperación próximos o superiores al 90%, para un número importante de compuestos, mientras que para los restantes se alcanzan porcentajes cercanos al 70% - 80%.

En la actualidad, para proceder a la cuantificación de los compuestos carbonílicos presentes en los extractos grasos de quesos, es necesario recurrir a la utilización de un procedimiento matemático que implica el establecimiento de constantes de distribución de los analitos. Como alternativa, hemos ensayado distintas posibilidades, consistentes en la utilización de diferentes tipos de disoluciones patrón. Ante la similitud de las curvas de calibrado obtenidas a partir de extractos grasos o de disoluciones patrón en acetonitrilo, se han seleccionado, por comodidad, rapidez y versatilidad, las construidas sin tener en cuenta la matriz de las muestras.

7. Tradicionalmente, se ha admitido que la composición de la fracción volátil de los quesos puede aportar información de interés, en relación con sus características organolépticas y de los procesos que ocurren en la maduración de los mismos. Las metodologías analíticas establecidas con tal finalidad, basadas en la extracción mediante técnicas de espacio en cabeza, dinámicas o estáticas, y medida de las señales cromatográficas obtenidas mediante GC-MS, presentan algunas limitaciones. En este trabajo, se ha desarrollado una nueva metodología basada en la medida por HPLC de los compuestos carbonílicos previamente derivatizados con la DNPH, en una interfaz SPME-HPLC. Con la utilización de esta nueva técnica de medida es posible cuantificar un número considerable de los aldehídos y cetonas presentes en las fracciones volátiles de los quesos y, además, se consiguen alcanzar sensibilidades superiores a las alcanzadas mediante GC-MS. Por otra parte, al no estar condicionados por la información extraída únicamente de la comparación del tamaño

de los picos cromatográficos, se abren nuevas perspectivas en la interpretación de los resultados.

Establecidas con anterioridad las condiciones adecuadas para la determinación de aldehídos y cetonas mediante SPME-HPLC, sólo ha sido necesario optimizar el tiempo y la temperatura de extracción, asociados al equilibrio de los analitos entre la fracción volátil y la fibra, para lo que se ha utilizado un diseño factorial de dos niveles, 2^2 , del tipo screening.

Para los compuestos más volátiles, el tiempo de extracción es el factor más importante y tiene un efecto positivo en el proceso, mientras que la temperatura es una variable que ejerce un efecto negativo y menos importante. En el caso de la 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona, componentes importantes y mayoritarios de algunos tipos de quesos, la variable con mayor influencia en el proceso de extracción es la temperatura, con un efecto negativo. Posiblemente, en los equilibrios de distribución, los aumentos de temperatura que, por un lado, favorecen el paso de los compuestos carbonílicos desde la muestra de queso al espacio en cabeza, dificultan, por otra parte, la retención de los mismos en la fibra, facilitando el proceso de desorción.

8. Con la utilización de las metodologías que se acaban de comentar, desarrolladas para la determinación de compuestos carbonílicos en muestras de extractos grasos (EG) y fracciones volátiles (FV) de quesos, hemos comprobado la utilidad de dichas metodologías para las determinaciones en muestras de distintos tipos de queso, que pueden ser de utilidad como parámetros o criterios que permitan establecer diferencias entre ellos, en función de las características relacionadas con su elaboración o estado de maduración.

De confirmarse las tendencias observadas en nuestro trabajo, a partir de la relación entre los contenidos totales de compuestos carbonílicos en la fracción volátil y el extracto graso de un queso, pueden extraerse algunas generalizaciones. Así, podría establecerse que los quesos ahumados proporcionan fracciones volátiles que contienen mayor contenido en compuestos carbonílicos que los respectivos extractos grasos. Así mismo, los quesos elaborados con leche de vaca o con mezclas de vaca y oveja, y que no han sido sometidos a ahumado, presentan porcentajes conjuntos para el total de formaldehído y acetaldehído,

que son considerablemente superiores en la fracción volátil con respecto al extracto graso, mientras que en los quesos de cabra, y ahumados, dicho porcentaje es similar en la fracción volátil y en el extracto graso.

En general, a partir de la composición de los extractos grasos, puede obtenerse información de mayor significación que a partir de la fracción volátil. Así, puede indicarse que determinados quesos azules se caracterizan por presentar elevados contenidos de 2-pentanona, 2-heptanona y 2-nonanona, en su extracto graso. Esta característica de los quesos azules, puesta ahora de manifiesto a través de la cuantificación de dichos compuestos en los extractos grasos mediante HPLC, ha sido destacada por diferentes autores. Ahora bien, a la característica citada, debe añadirse el que en las citadas muestras, el contenido en acroleína + acetona debe considerarse igual de característico que los anteriores. La suma de las concentraciones de los componentes mencionados, suponen porcentajes superiores al 98%, sobre el total de compuestos carbonílicos, en los extractos grasos de las muestras consideradas.

Otras muestras de quesos azules y de quesos curados presentan perfiles de distribución, para los aldehídos y cetonas en los extractos grasos, asimilables a los comentados, aunque las concentraciones individuales de los componentes mencionados son considerablemente inferiores. En las tres muestras representativas de los quesos frescos de cabra, junto con la 2-heptanona y 2-pentanona y, en menor proporción, la 2-pentanona, también aparecen, como componentes mayoritarios, el acetaldehído y benzaldehído, a diferencia de lo que sucede para la mayoría de los quesos azules y curados. Las muestras de queso Palmero presentan un comportamiento peculiar, al ser las únicas en las que no se detectan la 2-heptanona y 2-nonanona.

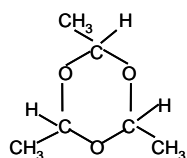
PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES A CONGRESOS

El desarrollo de la presente tesis ha originado la publicación de los siguientes artículos y aportaciones a diferentes congresos internacionales:

- Delgado B., Ayala J.H., González V., Afonso A.M. Estimation of uncertainty in the analysis of carbonyl compounds by HPLC-UV using DNPH derivatization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, **31**, 361-381 (2008).
- Delgado B., Budilová J., Ayala J.H., Afonso A.M., González V. Determination of carbonyl compounds in smoke samples: strategies for sampling and standardization. *Journal of Environmental Monitoring*, **11**, 1043-1050 (2009).
- Determination of carbonyl compounds in biomass smoke by HPLC and GC-MS using DNPH derivatization. *Euroanalysis XIII*, Salamanca (2004).
- Measurement of uncertainty in the determination of carbonyl compounds present in biomass smoke by HPLC-UV and GC-MS using DNPH derivatization. *11^{as} Jornadas de Análisis Instrumental*, Barcelona (2005).
- Determination of carbonyl compounds after on-line derivatization with DNPH in the SPME-HPLC interface. *12th Symposium on Sample Handling for Environmental and Biological Analysis*, Zaragoza (2006).
- Carbonyl compounds from biomass smoke. Determination by derivatization with DNPH-SPE and HPLC-UV. *6th ANQUE International Congress of Chemistry "Chemistry and Sustainable Development"*, Tenerife (2006).
- Determinación de compuestos carbonílicos en el extracto graso de quesos. *XIV Reunión Nacional de la Sociedad Española de Química Analítica*, Mallorca (2007).
- Determination of carbonyl compounds in smoke from incomplete combustion of different kinds of biomass. *IX International Symposium on Analytical Methodology in the Environmental Field*, Mallorca (2007).
- Metodología para la determinación de compuestos carbonílicos en el extracto graso de quesos. *World Cheese Awards 2009*, Las Palmas de Gran Canaria (2009).

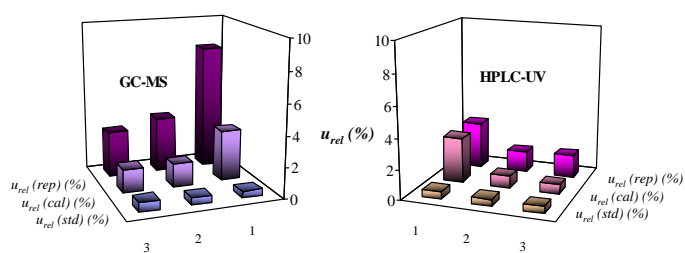
Fe de erratas

- En la página 11, la estructura correcta del paraldehído es:



Paraldehído

- En la página 130, la Figura II.11 completa es:



- En la página 184, en la línea 11 del primer párrafo, donde dice butiraldehído, debe decir 2-butanona.
- En la página 265, en la línea 5 del primer párrafo, donde dice *p*-tolualdehído, debe decir valeraldehído.
- En la página 394, en la Tabla VI.6, donde dice nonaldehído, debe decir 2-nonanona.