

DESARROLLO DE LA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS

4.1. INTRODUCCIÓN

La diversidad de los compuestos orgánicos volátiles (COVs), presentes tanto en ambientes rurales, urbanos e intramuros, permite una amplia variación en los rangos de polaridad, volatilidad y concentración.

Dentro de los COVs se incluyen los hidrocarburos alifáticos nC_2 - nC_{14} , hidrocarburos aromáticos (benceno-naftaleno), hidrocarburos aromáticos pesados, isopreno, monoterpenos, aldehídos (especialmente C_5 - C_{10}), cetonas, alcoholes, ácidos grasos, aminas, compuesto sulfurados, ésteres e hidrocarburos halogenados.

Actualmente, debido a la creciente importancia de los COVs, se han desarrollado métodos más rápidos y más económicos para el análisis de contaminantes orgánicos en el aire.

Las muestras de aire pueden ser tomadas en frascos o recipientes y transportadas al laboratorio para análisis. La utilización de este procedimiento, para determinaciones a nivel de trazas tiene el inconveniente del gran volumen de muestra necesario, con la consiguiente posibilidad de que se produzcan contaminaciones y fugas durante su transporte. Este método es más apropiado para muestras de elevada concentración.

Se suelen utilizar recipientes de acero inoxidable o bolsas inertes para tomar este tipo de muestras. Estos recipientes tienen generalmente un volumen de 1-32 l, pero el de 6 l es el más común (Woolfenden, 1987). Se realiza previamente una limpieza de éstos en el laboratorio, antes de ser transportados al sitio de muestreo. Allí se toma una muestra de aire. Para el análisis, se extrae una alícuota del volumen contenido en el recipiente, y se hace pasar a través de una trampa que concentra los compuestos de interés. Posteriormente, se aplica una corriente caliente de gas inerte a temperatura

alta que desorbe térmicamente los COVs y los transfiere a un sistema de cromatografía de gases para su análisis.

Los métodos de muestreo que toman un volumen completo de aire son apropiados para especies apolares (C_2 hasta $n-C_{10}$), pero no son adecuados para compuestos con puntos de ebullición altos o compuestos polares que pueden ser completamente perdidos o parcialmente recuperados del instrumento de muestreo. Esto constituye una limitación seria para este tipo de muestreadores, porque los compuestos polares, lábiles y menos volátiles están presentes en cantidades significativas en zonas urbanas e industriales (p.e., fenol, benzaldehído, ácido acético, aldehídos, MTBE)

Los COVs polares biogénicos como los monoterpenos, debido a su reactividad son difíciles de poder recuperar cuantitativamente de los recipientes de acero inoxidable o de las bolsas tipo Tedlar.

Otra alternativa es tomar directamente la muestra en un adsorbente sólido y analizarla en línea utilizando un método análogo de desorción térmica-cromatografía de gases (Aragón *et al.*, 2000)

Los métodos o técnicas de medición para flujos de COVs biogénicos más utilizados son:

- Métodos abiertos como:
 - 1) Aproximación por gradientes de concentración
 - 2) Trazadores
- Métodos de encerramiento:
 - 3) Cámara con flujo dinámico ("enclosure")

Las dos primeras son técnicas micrometeorológicas que determinan el flujo promedio de la vegetación que cubre un área superficial grande (10^5 m^2 o más) (Fehsenfeld *et al.*, 1992) y son utilizados para estudios en campo. El método de encerramiento, se utiliza tanto en campo como en el laboratorio.

El método del gradiente de concentración está basado en la teoría de la capa superficial a nivel micrometeorológico. Relaciona la medida del gradiente de concentración del compuesto (dC/dz) sobre una fuente uniforme e infinita junto con los gradientes de temperatura, velocidad del viento y la presión de vapor.

Los datos meteorológicos son utilizados para determinar la difusividad turbulenta (K_z). El flujo de un COV en particular se calcula a partir de las mediciones del perfil vertical de K_z y dC/dz hechas a diferentes alturas y sobre la cubierta del bosque.

La difusividad vertical se obtiene midiendo la velocidad vertical del viento y los perfiles de temperatura siguiendo los procedimientos sugeridos por Nieuwstadt (1978), Dyer (1974) y Benoit (1977).

Este método micrometeorológico da una estimación global de las emisiones para un área muy grande, reduciendo así los problemas de heterogeneidad de la muestra. Además posee la ventaja, a diferencia de los métodos de encerramiento, de que no perturba la vegetación (Tingey *et al.*, 1991). Sin embargo, presenta el inconveniente de que su puesta a punto es difícil, es exigente en cuanto a la localización y necesita sensores sumamente precisos (Lamb *et al.*, 1987).

El método de trazadores consiste en la simulación de la emisión de un bosque por medio de un trazador (p.e., hexafluoruro de azufre SF_6). Se miden los perfiles de concentración en la dirección del viento tanto del trazador como del compuesto (COV) de interés. El método asume que el trazador y el compuesto se dispersan de una forma similar.

Arnts *et al.* (1982) lo utilizaron para medir el flujo de α -pineno en un bosque. Lamb *et al.* (1986) obtuvieron resultados comparables en las mediciones realizadas con este método y el de encerramiento en un pequeño bosque de encinas.

El método de encerramiento con flujo dinámico ha sido utilizado por muchos investigadores, así como durante las campañas del proyecto BEMA (junio 1993 y mayo

1994). En este método se mide la emisión de una parte de la planta. Para la retención de la muestra es necesario el uso de un material adsorbente. A diferencia de los métodos meteorológicos, éste es un método simple, fácil de llevar a cabo y tiene la ventaja de poder medir individualmente diferentes especies. Puede ser utilizado tanto en campo como en laboratorio, donde se puede experimentar con diferentes condiciones ambientales controladas.

A pesar de lo anterior presenta desventajas, ya que el confinamiento físico a que es sometida la planta durante el encerramiento, puede perturbar su funcionamiento biológico normal y por lo tanto se pueden registrar flujos de emisión no representativos. Además, si estos datos van a ser utilizados en un inventario de emisiones, es necesario contar con factores de biomasa precisos para poder extrapolar la emisión de una rama individual a un bosque o una región (Fehsenfeld *et al.*, 1992).

En el presente trabajo de Tesis se ha utilizado el método de encerramiento dinámico para la medición de las emisiones de las especies estudiadas en campo, considerando las ventajas que presenta.

El análisis e identificación de los COVs muestreados se realizó por medio de la cromatografía de gases (GC) con detección selectiva de masas (MSD). Los compuestos han sido previamente retenidos en un adsorbente, para luego ser desorbidos térmicamente y preconcentrados en una trampa a baja temperatura en una unidad Automatizada de Desorción Térmica (ATD).

Las condiciones de optimización tanto del método de muestreo como el de análisis se describen en las siguientes secciones del presente capítulo.

4.2. MÉTODO DE TOMA DE MUESTRAS

4.2.1. Descripción del sitio de muestreo

Las mediciones de campo fueron realizadas en las lindes de un pequeño bosque cercano a las instalaciones del Instituto Politécnico del Campus de Terrassa (IPCT) perteneciente a la UPC, lo cual permitió realizar campañas frecuentes de medición y cubrir así un ciclo tanto diario como anual.

Dicho emplazamiento está localizado en la comarca del Vallès Occidental, en la mancomunidad de los municipios de Sabadell y Terrassa, a 270 m sobre el nivel del mar; el área es esencialmente plana y con una superficie de 4.5 ha. En esta región predomina el bosque mediterráneo (Región Forestal V; IEFC 1999).

Las especies existentes en dicho bosque son las que aparecen en la Tabla 4.1. La vegetación de este bosque es bastante representativa de la región mediterránea y en particular de Cataluña. Las tres primeras especies arbóreas mencionadas en dicha tabla (dos coníferas y una encina) representan aproximadamente el 50% de la cubierta vegetal presente en Cataluña (Boada, 1997).

El clima predominante es, por tanto, el mediterráneo, que se caracteriza por presentar una estación fría, pero suave (el invierno), y una estación cálida y seca (el verano), separadas por dos estaciones de transición, la primavera y el otoño que son muy inestables y lluviosas (Viñas y Baulies, 1995).

Existe poca influencia de emisiones antropogénicas a su alrededor (una vía con flujo vehicular medio localizada a 600 m de distancia).

Tabla 4.1. Especies vegetales identificadas existentes en el área de experimentación.

Nombre científico	Nombre común
Árboles	
<i>Pinus pinea</i>	Pino piñonero
<i>Pinus halepensis</i>	Pino carrasco
<i>Quercus ilex</i>	Encina
<i>Populus nigra</i>	Álamo negro
<i>Ulmus minor</i>	Olmo
<i>Platanus orientalis</i>	Platanero
<i>Pyrus malos</i>	Pera común
<i>Olea europaea</i>	Olivo
Matorrales	
<i>Robus sp.</i>	Zarzas
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero
<i>Cistus albidos</i>	Jara, Estepablanca

4.2.2. Técnica de encerramiento dinámico

Se construyó una cámara de encerramiento con flujo dinámico, como la que se muestra en la Figura 4.1, para medir los flujos de emisión a nivel de la rama.

El método de encerramiento utilizado está basado principalmente en las experiencias del Proyecto BEMA (BEMA 1993-1997), basadas también en las de otros autores reportados en la literatura (Winer *et al.*, 1983; Juuti *et al.*, 1990; Janson, 1992; Parusel *et al.*, 1993).

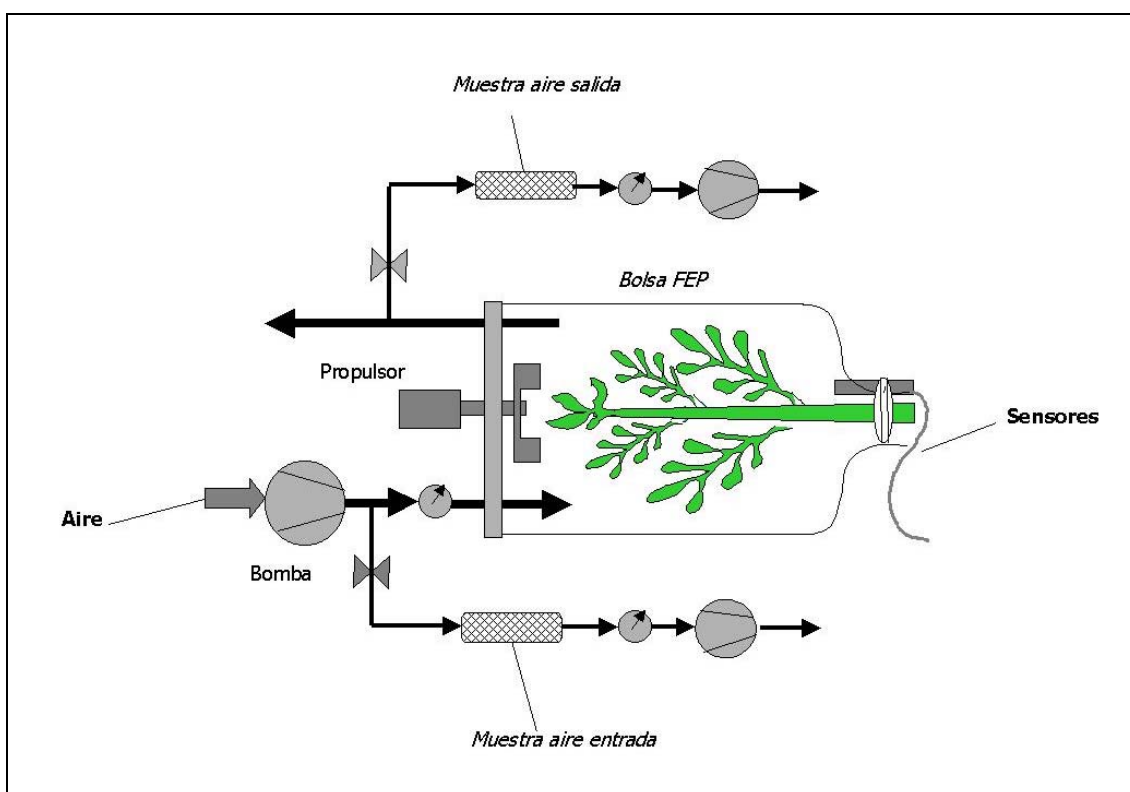


Figura 4.1. Cámara de encerramiento con flujo dinámico utilizada para la toma de muestra

La cámara consiste en general de un marco cilíndrico hecho de policarbonato transparente, cerrado en uno de sus extremos por una lámina circular que sirve de soporte a una bolsa de Teflon FEP. Estudios previos han demostrado que este material es químicamente inerte, totalmente transparente a la luz visible (en el rango de 300-900 nm) y a la radiación ultravioleta (Ennis *et al.*, 1990; Schäfer *et al.*, 1992; Kesselmeier *et al.*, 1993). El volumen de la cámara utilizada fue de 60 l (40 cm d.i. y 47 cm longitud).

Para la retención de la muestra se utilizaron tubos de acero inoxidable (Perkin-Elmer; 6.1 mm d.e. y 90 mm longitud) que fueron previamente rellenos con 200 mg de Tenax TA (60-80 mesh, 25 m² g⁻¹; Perkin-Elmer). Los tubos adsorbentes utilizados son como el que se muestra en la Figura 4.2.

Se utilizó un andamio de fácil acceso para colocar la cámara a la altura de la rama, la cámara fue colocada a diferentes alturas entre 1.5 y 5.5 m. El andamio se orientó de manera que no impidiera que todas las hojas de la rama en estudio tuvieran las condiciones óptimas de luz. El tamaño del andamio permitió espacio suficiente para colocar los instrumentos necesarios para controlar los parámetros dentro de la cámara.

El procedimiento de muestreo seguido para el desarrollo del presente trabajo de tesis ha sido el siguiente:

- a) El primer paso fue seleccionar la rama de la especie a muestrear, procurando que estuviera en buen estado físico. A continuación se encerró la rama seleccionada en la cámara con cuidado para no dañar las hojas.
- b) Se hizo pasar aire ambiente (sin filtrar) al interior de la cámara, para impulsar el aire exterior al interior del sistema se utilizó una bomba propulsora de membrana (KNF Neuberger Model 726 FTE) a un caudal constante de 12 l min^{-1} .
- c) El aire dentro de la cámara se homogeneizó mediante un ventilador de diseño especial para no crear excesiva turbulencia, y se colocaron los sensores de temperatura, humedad relativa y PAR.

La temperatura y la humedad relativa fueron medidas automáticamente por medio de una sonda combinada (Vaisala, 50Y). La sonda se colocó en el interior de la bolsa pero en el extremo sujeto a la rama y fue protegida exteriormente por un cilindro recubierto de papel de plata, para evitar que impacte la radiación solar.

El sensor para medir la PAR (Skye Instruments, SKP 215) se colocó en posición horizontal sobre la cámara en su parte exterior. Los datos de ambas sondas fueron almacenados en un datalogger con un tiempo de muestreo promedio de 5 min.

- d) Los tubos adsorbentes, antes y después del muestreo, fueron cerrados en ambos extremos con tapones de acero inoxidable (Swagelock®) con ferrula de teflón. Previo

al muestreo fueron acondicionados en el laboratorio (el procedimiento se muestra en el anexo). Una vez utilizados y antes de ser analizados se guardaron en tubos de vidrio con tapón de rosca. Se agregó al tubo sílica gel para evitar la humedad.

- e) Se dejó transcurrir una hora para tener la seguridad de que se alcanza un régimen estacionario en el interior de la cámara.
- f) Al cabo de ese tiempo se procedió a la toma de muestras. Esto se realizó en forma simultánea tanto en el aire de salida como en el aire de entrada. Para ello se colocaron dos tubos de adsorción, uno en la toma de salida del aire y otro en una derivación de la toma de entrada, conectados a sendas bombas captadoras de bajo caudal (ELF Escort).

Para tomar muestras duplicadas o réplicas, lo cual se hizo por lo menos una vez por día, se utilizó un adaptador en forma de tubo dual (Gemini Twin-port, MSA) el cual posee un ajuste de flujo independiente.

A las bombas se conectaron mangueras de Teflon (1/4" d.e.) por donde se hace pasar el aire a un flujo de 100 ml min^{-1} durante 30 minutos, de forma que los volúmenes de aire recogidos fueron de 3 litros aproximadamente. Los niveles de flujo fueron calibrados por medio de un flujómetro digital (Jour Digital).

- g) Los muestreos se repitieron a intervalos de 1-2 horas aproximadamente hasta la caída del sol.
- h) Al finalizar los muestreos del día, la rama se cortó para ser secada y pesada en el laboratorio. Sin embargo, algunas veces la rama no fue cortada el mismo día, sino días después (hasta 7 días), debido a que las condiciones meteorológicas impidieron la continuación del muestreo o que se deseaba confirmar resultados repitiendo el muestreo en la misma rama.

La variación de biomasa durante el tiempo transcurrido desde el día de muestreo hasta el día de corte de la rama se asumió que era despreciable. El secado de la rama y hojas se realizó en una estufa a 60 °C durante 48 horas.

- i) Los datos de temperatura, humedad relativa y PAR del interior de la cámara, junto con la fecha y hora de medida, se descargaron del datalogger a un PC (Campbell, CR10).

- j) Las condiciones meteorológicas ambientales (temperatura, humedad relativa, pluviometría, velocidad y dirección del viento) fueron medidas por medio de una torre meteorológica (Campbell, CR10) dichas variables exteriores fueron almacenadas en promedios de 30 minutos y volcados a un PC.

En nuestras condiciones en campo el tiempo de residencia aproximado fue de 5 minutos. El tiempo de residencia es el tiempo necesario para que se realice la renovación completa del aire dentro de la cámara; es igual a la relación entre el volumen de la cámara y el caudal de aire que entra en ella.

La vida media de la mayoría de los compuestos monoterpénicos no es mayor que este tiempo (Kesselmeier y Staudt, 1999). Además, otros autores han demostrado que las emisiones de algunos compuestos expuestos a concentraciones de ozono atmosférico no son influenciados significativamente (Juuti *et al.*, 1990; Steinbrecher *et al.*, 1994; Kesselmeier *et al.*, 1996).

4.3. DESARROLLO DEL MÉTODO DE DESORCIÓN TÉRMICA

4.3.1. Selección del adsorbente

El uso de materiales adsorbentes es comúnmente utilizado en el muestreo de compuestos orgánicos volátiles. La selección del adsorbente está basada en las

características del analito de interés, así como también en las condiciones de adsorción y desorción de los materiales adsorbentes.

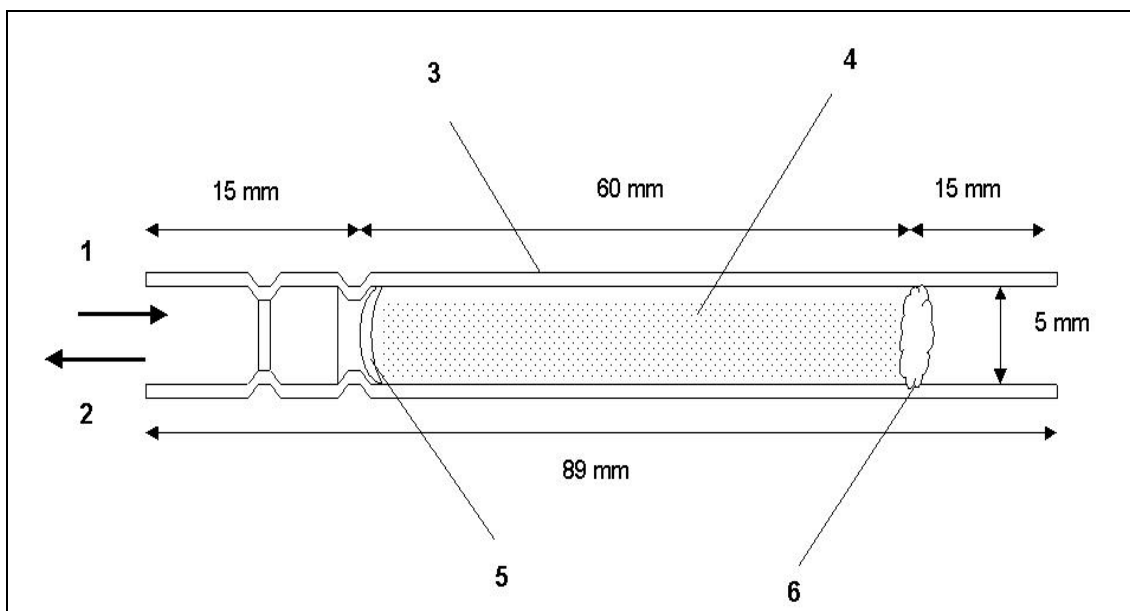


Figura 4.2. Tubo utilizado para la adsorción de los monoterpenos. 1) dirección del flujo durante la toma de muestra 2) dirección del flujo durante la desorción 3) tubo de acero inoxidable 4) material adsorbente 5) malla de retención de acero inoxidable (~100 mesh) 6) lana de vidrio

La capacidad de adsorción para algunos de estos materiales es conocida, por las especificaciones que brinda el fabricante (volúmenes de saturación). Sin embargo, existe poca información sobre la capacidad de desorción (Rothweiler *et al.*, 1991).

Los adsorbentes comerciales más utilizados en muestreo de aire son los siguientes:

- Polímeros porosos, como: Tenax TA, Tenax GR, Chromosorb, Porapak.
- Tamices moleculares de carbono: Carboxen, Carbosieve.
- Carbón grafito: Carbopack y Carbotrap.

En el presente trabajo se utilizó como adsorbente Tenax TA, el cual es uno de los adsorbentes más utilizados para la adsorción de compuestos orgánicos volátiles en aire (Calogirou *et al.*, 1997), como se muestra en la Tabla 4.2.

EL Tenax TA es un polímero poroso de óxido de 2,6-difenileno. Puede retener o atrapar compuestos volátiles y semivolátiles con un límite superior de temperatura de 350 °C.

Rothweiler *et al.* (1990), en un estudio para varios COVs, comparando las capacidades de adsorción y desorción térmica entre el Tenax TA y el Carbotrap, describen las ventajas que presenta el Tenax TA, como son: inerte con respecto a estos compuestos, hidrofóbico, estable (por encima de los 280 °C), se puede limpiar fácilmente calentándolo con una corriente de gas inerte. También es un adsorbente eficiente para retener COVB (p.e., para el α -pineno, se obtuvieron recuperaciones de 71.2 ± 18.8 %, para un volumen de 1 l).

Tabla 4.2. Recopilación bibliográfica sobre las condiciones empleadas para el muestreo de monoterpenos e isopreno procedentes de la vegetación.

Autor/es	Tipo de tubo (largo x d.i.; mm)	Adsorbente/s^a (mg)	Cámara V(l)	Caudal Entrada (l/min.)	Flujo Muestreo (ml/min.)	Tiempo Muestreo (min.)	COV^c analizado
Juuti <i>et al.</i> (1990)	Vidrio	Tenax GC	~ 450 ^c	45	~ 800	~ 2.0	MONO
Cochornoy <i>et al.</i> (1992)	Vidrio	Tenax GC Tenax GC + Carbosieve II	~ 450 ^c	60	~ 400	2.5	MONO ISO
Janson (1992)	Acero inoxidable (90 x 6.3)	Tenax TA (200)	7-10	4.0	100	30	MONO
Steinbrecher <i>et al.</i> (1994)	Vidrio (200 x 4)	Tenax TA (125) Csieve + Ctrap + CtrapC Csieve + Ctrap	^d		200	20	MONO ISO, MONO ISO, MONO
Kesselmeier <i>et al.</i> (1996)	Acero inoxidable Vidrio Vidrio	Tenax TA (200) Ctrap C (125) + Ctrap B + Csieve (125) Ctrap C(34) + Ctrap (170)	75	20-25	65	30	MONO ISO ISO, MONO
Street <i>et al.</i> (1997)	Acero inoxidable (90 x 2.9)	Tenax TA (200) + Ctrap (100)	12	6-8	100-150	20	ISO, MONO

^a Csieve: Carbosieve, Ctrap: Carbotrap

^b ISO: Isopreno, MONO:monoterpenos

^c Se encierra una planta de ~1 m de altura plantada en un macetero

^d Se utilizó un instrumento especial para simular una atmósfera estándar que contuviera a los compuestos

4.3.2. La técnica de desorción térmica

La desorción térmica consiste en la utilización de la temperatura y el flujo de un gas inerte para desorber los compuestos volátiles de matrices sólidas o líquidas, transfiriéndolas a un sistema analítico, generalmente un cromatógrafo de gases.

Como ya se explicó anteriormente, los compuestos monoterpénicos contenidos en el flujo de aire succionado de la cámara, fueron retenidos en el tubo adsorbente, relleno con Tenax TA.

Los tubos adsorbentes fueron llevados al laboratorio, los tapones tipo Swagelock® utilizados para transporte y almacenamiento del tubo, fueron reemplazados por otros de teflon PTFE, adecuados para el proceso de desorción.

Los tubos se colocaron sobre el carrusel automático que carga el tubo en el sistema. Cuando el tubo está en posición para ser desorbido, los tapones se retiran mediante un sistema neumático, y un movimiento mecánico carga el tubo en el horno donde se calienta a una temperatura de 280 °C durante 8 minutos con una corriente de helio como gas de arrastre a 50 ml min⁻¹.

El flujo de desorción se aplicó en dirección contraria al flujo en que fueron adsorbidos en el campo. Con la desorción en dirección contraria, se tiene una desorción más efectiva.

La desorción térmica de los compuestos se realizó en dos etapas con el fin de optimizar la resolución de los picos de los compuestos de interés.

Ya que generalmente los COVs se encuentran en el aire en concentraciones a nivel de trazas, muchas veces la sensibilidad de los métodos disponibles no es suficiente para

una determinación directa, por lo cual es necesario un paso preliminar de reconcentración (Aragón *et al.*, 2000).

Los compuestos desorbidos fueron reconcentrados antes de enviarlos a la columna cromatográfica utilizando una trampa a baja temperatura rellena con Tenax TA (20 mg), que ha sido también utilizado por otros autores (Staudt *et al.*, 2000; Street *et al.*, 1997; Larsen *et al.*, 1997; Kesselmeier *et al.*, 1997).

Esto se hizo por dos motivos: 1) para evitar el ensanchamiento de la banda de vapor y tener una mejor resolución de los picos, y 2) para disminuir el flujo de gas portador que llegará a la columna capilar.

El equipo de desorción térmica utilizado consta básicamente de:

- a) Una entrada de gas inerte (en nuestro caso se utilizó helio) que sirve como portador de la muestra desorbida.
- b) Un horno donde se calienta el tubo de adsorción y se provoca la desorción primaria
- c) Dos válvulas que permiten regular el flujo de gas antes de la trampa fría (divisor de entrada) y después de la trampa (divisor de salida).
- d) Una trampa donde atrapar, bajo estado de trampa fría (temperatura mínima), y desorber bajo estado de trampa caliente (temperatura máxima) la muestra reconcentrándola.
- e) Una línea de transferencia de la muestra al cromatógrafo de gases

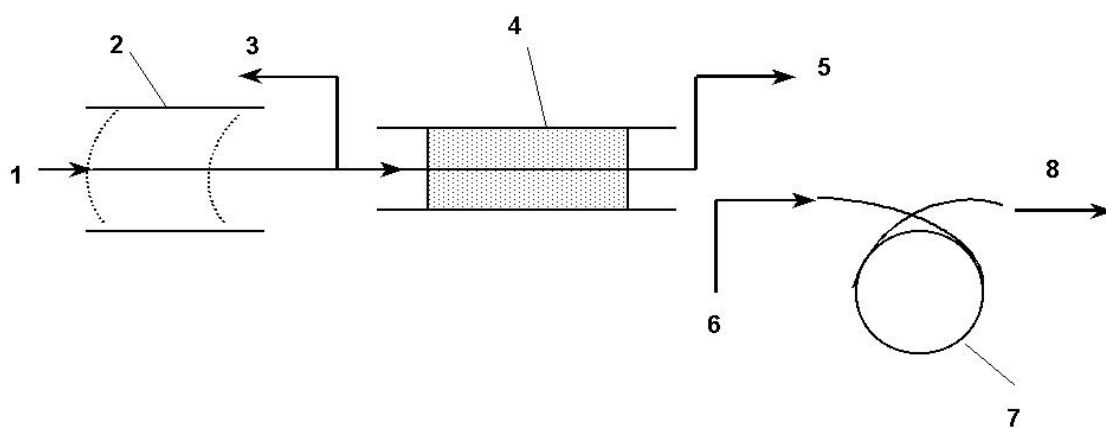
En la desorción primaria (Figura 4.3.A), el tubo adsorbente con Tenax TA y con los compuestos allí retenidos, se calienta hasta una temperatura de 280 °C. Los compuestos desorbidos son transportados por un flujo de helio hasta la trampa fría, rellena con Tenax TA (20 mg), que se encuentra a una temperatura mínima de -30 °C. Los compuestos son allí retenidos para ser reconcentrados criogénicamente. La cantidad de los compuestos desorbidos del tubo que llegará a la trampa fría se puede regular a través del divisor de entrada. En nuestro caso, como las concentraciones de los compuestos son bajas, no se hizo una división de flujo a la entrada, ya que lo que

se perseguía es que todos los compuestos desorbidos del cartucho llegaran a la trampa fría.

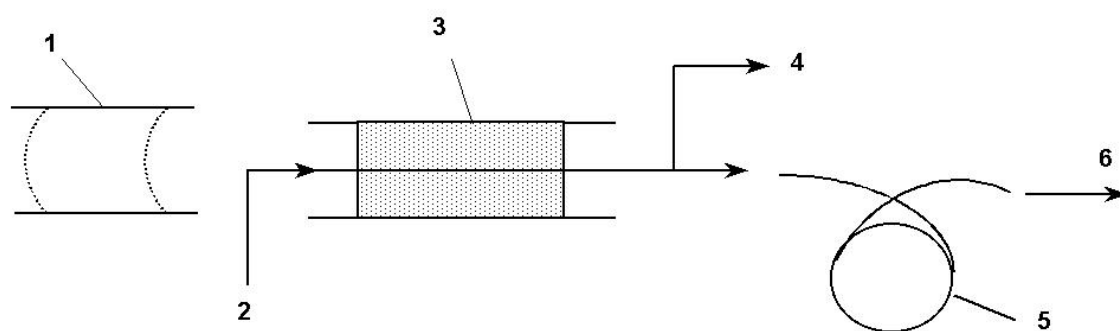
Finalizada la desorción primaria, comienza la desorción secundaria, que se representa en la Figura 4.3.B. En esta etapa la trampa fría se calentó rápidamente ($40\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$) hasta los 280°C . Los compuestos desorbidos fueron transferidos, en una pequeña banda de vapor hacia la columna cromatográfica, a través de una interfase capilar que se encontraba a una temperatura de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se hizo pasar por la trampa fría un flujo de 50 ml min^{-1} , ya que es recomendable utilizar un flujo de desorción mínimo de 10 ml min^{-1} para que haya una desorción efectiva de la trampa. Al tener este nivel de flujo en la trampa, fue necesario hacer uso del divisor de salida (5 ml min^{-1}), para disminuir la cantidad de flujo hacia la columna capilar, puesto que al tener una columna capilar de diámetro pequeño (0.2 mm d.i.), se determinó que el flujo de gas portador que puede pasar por la columna en condiciones optimizadas era de 0.5 ml min^{-1} .

La ventaja de los dos divisores del flujo de gas consiste en la posibilidad de tener un flujo alto de gas de desorción, tanto en el tubo como en la trampa. De este modo la desorción es más efectiva y rápida, y la banda de vapor de los compuestos desorbidos más concentrada. Además, así también se puede controlar la cantidad de los compuestos retenidos en el tubo de adsorción que llegan a la columna. Otra ventaja de los divisores de flujo, es la posibilidad de disminuir la cantidad de agua que llega a la trampa fría y a la columna.

A

1) Gas de arrastre, 2) Tubo caliente; 3) Divisor de entrada; 4) trampa fría; 5) flujo de desorción; 6) Gas de arrastre; 7) Columna GC; 8) Detector

B

1) Tubo adsorbente; 2) Gas de arrastre; 3) Trampa caliente; 4) Divisor de salida; 5) Columna GC; 6) Detector

Figura 4.3. Esquema de la etapas de desorción primaria (A) y secundaria (B)

Tabla 4.3. Condiciones optimas de trabajo para la etapa de desorción térmica

Trampa fría	20 mg Tenax TA (60/80 mesh; 25 m ² /g área superficial)
Desorción primaria	
Tiempo	8 min
Flujo	50 ml min ⁻¹
Divisor de entrada	0 ml min ⁻¹
Divisor de salida	5.0 ml min ⁻¹
Flujo gas arrastra	50 ml min ⁻¹
Temperatura trampa fría	
Mínima	-30 °C
Máxima	280 °C
Velocidad de calentamiento	40 °C s ⁻¹
Temperatura de la interfase	200 °C
Presión gas portador	11.5 psi

El objetivo principal durante la etapa de desorción primaria fue que se eluyeran el 100% de los compuestos de interés y retener el 100% de los compuestos que llegaran a la trampa fría. Y durante la desorción secundaria, eluir todos los compuestos retenidos en la trampa y transferirlos a la columna cromatográfica en el menor espacio y tiempo posible.

Se realizaron ensayos para optimizar las condiciones de desorción como son: el tiempo; la temperatura y el flujo durante la desorción primaria y secundaria; el flujo de gas en los divisores de entrada y salida; y el flujo de gas portador en la columna. Las condiciones optimas para la desorción térmica se resumen en la Tabla 4.3.

4.3.3. Capacidad del adsorbente utilizado

El objetivo principal de cualquier método o proceso de toma de muestra en aire, es obtener para cada especie muestreada, una cantidad que sea directamente proporcional al volumen de muestra tomado.

Además, un procedimiento apropiado de muestreo y análisis requiere que se estén evaluando periódicamente los parámetros más críticos involucrados.

Cuando se utilizan adsorbentes sólidos para retener compuestos presentes en el aire, es necesario conocer la capacidad del adsorbente, es decir el límite dentro del cual los compuestos pueden ser retenidos sin pérdida de muestra.

El volumen de saturación (VS) es un parámetro relacionado directamente con la capacidad del adsorbente. Se define como el volumen de gas que pasa a través del muestreador antes de que un compuesto dado empiece a eluir del adsorbente (Lövkivst y Jonsson, 1987).

El volumen de saturación, así como las pérdidas durante el proceso de toma de muestra, se determinaron mediante el siguiente ensayo:

- Doce tubos adsorbentes fueron colocados unidos cabeza con cola, de manera que formasen seis pares de tubos. La unión de los dos tubos en serie se debe hacer con material inerte, preferiblemente utilizando una unión del tipo Swagelok (1/4") con accesorios de Teflón PTFE. La parte inferior (cola) del primer tubo, que estaba conectado directamente a la salida de la cámara, estaba unido con la cabeza del segundo.
- El par de tubos en serie fue conectado a la bomba de muestreo. Se tomaron cuatro volúmenes diferentes de aire: 1, 2, 3, y 5 litros.

- El nivel de flujo de muestreo con la bomba de bajo caudal se mantuvo en 100 ml min⁻¹, y se varió el tiempo de muestreo en 10, 20, 30, y 50 min. Se tomó una réplica por cada volumen de aire muestreado.
- Ambos tubos, el primero y el segundo ("backup") fueron analizados mediante GC-MS en idénticas condiciones.

Se considera que si más del 5% de uno o más de los analitos de interés se observa en uno de los tubos secundarios, se ha alcanzado el volumen de saturación del adsorbente (Woolfenden, 1997; Bertoni y Tappa 1997)

Por lo tanto, se ha establecido que el volumen seguro de muestreo (VSM) es 2/3 (~66%) del volumen de saturación (Woolfenden, 1997).

Los resultados obtenidos de los ensayos realizados para determinar los volúmenes de saturación se muestran en la Tabla 4.4.

Para el *Pinus pinea* solamente el α -pineno presenta en una de las muestras saturación para un volumen de 3.0 l, mientras que para el resto de compuestos el volumen de saturación es superior a los 5.1 l. Se puede decir con estos resultados que el volumen seguro de muestreo (VSM) para el *Pinus pinea* es de 3.0 l.

En el *Quercus ilex* los resultados de los ensayos para determinar el volumen de saturación se presentan en la Tabla 4.5.

El volumen de saturación es ≥ 3 l para los compuestos α -pineno, β -pineno y camfeno. Para el sabineno y el limoneno $3.0 < VS \leq 3.5$, para el α -terpineno y el γ -terpineno $3.5 < VS \leq 5.1$ y $VS \geq 5.1$ para el mirceno, terpinoleno y α -terpineol.

El VSM teóricamente apropiado para medir en el *Quercus ilex* y evitar que se produzcan pérdida de compuestos sería 2.0 l. Sin embargo, con este volumen es muy

baja la concentración que se obtiene de los compuestos y solamente se detectan el 80% (8/10) de los compuestos que podrían ser atrapados a 3.0 l. Por dicho, motivo se optó por utilizar un volumen de muestreo de 3.0 l, tanto más sabiendo que los ensayos se realizaron en las condiciones de máxima emisión, durante los meses de agosto y septiembre.

Tabla 4.4. Determinación del volumen de saturación para el *Pinus pinea* los días 8-agosto-97 (1) y 10-septiembre-97 (2). Biomasa muestreada (1) = 38.73 y Biomasa (2) = 37.66 g.

Volumen	3.0 l ^a		3.75 l ^a		3.0 l ^b		3.75 l ^b		3.0 l		3.5 l		5.1 l	
	ng compuesto								ng compuesto					
Tubo	1 ^o	2 ^o	1 ^o	2 ^o	1 ^o	2 ^o	1 ^o	2 ^o	1 ^o	2 ^o	1 ^o	2 ^o	1 ^o	2 ^o
α -pineno	27.3	0.0	33.7	0.0	29.7	0.0	42.0	0.0	24.9	5.5	32.6	11.8	30.4	21.3
Sabineno	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	35.9	0.0	50.6	0.0	56.4	0.0
Mirceno	39.6	0.0	53.7	0.0	32.4	0.0	47.5	0.0	96.0	0.0	145.0	0.0	172.7	0.0
Limoneno	144.5	0.0	200.7	0.0	137.2	0.0	182.6	0.0	94.9	0.0	140.6	0.0	163.5	0.0
β -ocimeno	374.2	0.0	498.0	0.0	564.5	0.0	701.8	0.0	394.9	0.0	554.5	0.0	659.9	0.0
Linalol	397.0	0.0	536.1	0.0	503.6	0.0	679.6	0.0	753.6	0.0	1099.8	0.0	1343.1	0.0
α -terpineol	20.1	0.0	28.7	0.0	25.4	0.0	32.5	0.0	71.3	0.0	103.5	0.0	124.6	0.0

^a se tomó la muestra en forma simultánea (13:35-14:35 hora local)

^b se tomó la muestra en forma simultánea (15:00-15:30 hora local)

Tabla 4.6. Variación entre flujos y tiempos de muestreo para determinar si afectan la eficacia de adsorción del Tenax TA

Compuestos	Tiempo de muestreo a 100 ml min ⁻¹				Flujo de muestreo a 30 min		
	10 min.	20 min.	30 min.	50 min.	33.3 ml min ⁻¹	100 ml min ⁻¹	170 ml min ⁻¹
	ng compuesto				ng compuesto		
Pentafluorobenceno	266.0	229.0	205.0	159.0	301.0	232.0	147.7
Difluorobenceno	260.0	230.0	230.9	221.0	267.0	229.9	193.4
Clorobenceno-d ₅	235.0	230.0	199.3	201.0	242.0	208.5	209.3
1,4-diclorobenceno-d ₄	240.0	235.0	200.5	203.9	237.0	225.3	221.9

También se evaluó la eficacia de la adsorción del Tenax TA, comparando si hay diferencia en su capacidad de adsorción, ya sea variando el tiempo o el flujo de muestreo. Para ello se aplicó un procedimiento similar al utilizado para determinar el volumen de saturación. Con este fin se utilizó una muestra de concentración conocida, el estándar EPA 8260 IS Mix (Supelco) que contiene disueltos en metanol a los siguientes compuestos: Pentafluorobenceno, 1,4-difluorobenceno, d₅-Clorobenceno y 1,4-diclorobenceno-d₄.

Se añadió previamente al primer tubo de muestreo 1 µl (239 ng) de la mezcla, para evaluar si se producían pérdidas durante el proceso de muestreo, ya sea por el flujo o el tiempo de muestreo considerado. Se tomaron muestras de 1, 2, 3 y 5 l de aire de salida de la cámara de encerramiento, primero a un flujo de 100 ml min⁻¹ durante 10, 20, 30 y 50 minutos. Y posteriormente manteniendo fijo el tiempo de muestreo en 30 minutos y a 3 diferentes flujos 33.3, 100 y 170 ml min⁻¹.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 4.6. Se puede observar que variando el volumen de muestreo ya sea extendiendo el flujo o el tiempo no afectan significativamente la eficacia de adsorción del Tenax TA. Solamente se obtuvo

saturación a los 3.0 l para los compuestos más volátiles como el pentafluorobenceno y el 1,4-difluorobenceno.

4.4. ANÁLISIS Y DETECCIÓN MEDIANTE GC-MS

La cromatografía de gases (GC) combinada con un detector de ionización de llama (FID) o un detector selectivo de masas (MSD) es el método más adecuado para la determinación en muestras ambientales de compuestos orgánicos en concentraciones a nivel de trazas (Aragón *et al.*, 2000)

En el presente trabajo de Tesis, para la separación e identificación de los compuestos monoterpénicos se utilizó un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 II GC, con un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5971.

El cromatógrafo de gases fue conectado en línea con el equipo de desorción térmica, por lo cual el flujo de gas desorbido que contiene a los compuestos se transfirió en forma automática al GC-MS para la separación e identificación de los compuestos. El esquema del método DT-GC-MS se muestra en la Figura 4.4.

4.4.1. Separación cromatográfica de los monoterpenos

Se estudió la separación cromatográfica de los monoterpenos, utilizando disoluciones patrón que contenían algunos de los principales compuestos, que probablemente eran emitidos por las especies, de acuerdo con lo reportado por otros autores (Kesselemier *et al.*, 1996; Street *et al.*, 1997). Los compuestos seleccionados, así como sus estructuras químicas, masas moleculares y número de CAS se presentan en la Tabla 4.7.

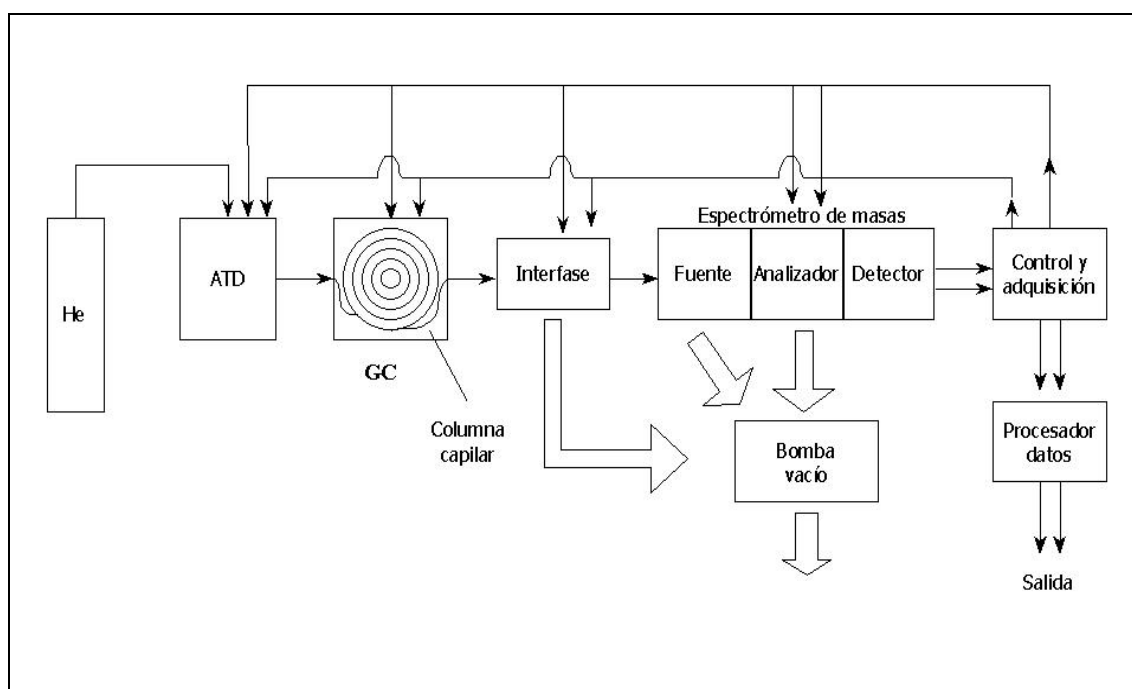


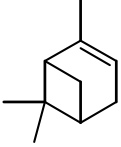
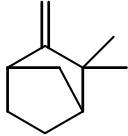
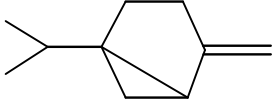
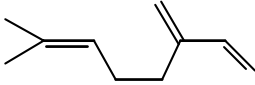
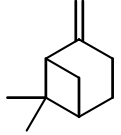
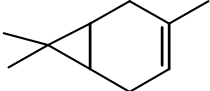
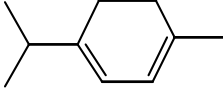
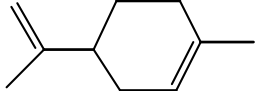
Figura 4.4. Esquema del sistema analítico utilizado ATD-GC/MSD para la separación e identificación de monoterpenos

Durante la primera etapa del estudio (mayo 1997- mayo 1998) la separación de los compuestos se realizó utilizando una columna capilar no polar la HP-1 (J &W, 25 m × 0.2 mm d.i.; 0.25 μm de fase estacionaria dimetilsiloxano). A partir del 22 mayo de 1998 debido a que se comenzó a estudiar los COVs antropogénicos dentro del mismo laboratorio, se cambió la columna HP-1 por una DB-5 (J &W Scientific, 50 m × 0.2 mm d.i.; 0.50 μm , 5% fenil 95% metil polisiloxano) también no polar pero con un mayor rango de aplicaciones que incluye los compuestos biogénicos y antropogénicos.

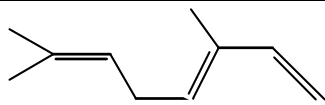
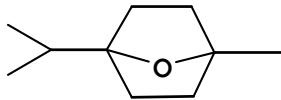
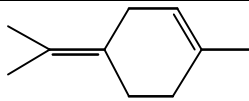
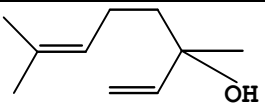
Para ambas columnas se llevó a cabo la optimización de las condiciones cromatográficas para la separación de los monoterpenos, preparando disoluciones patrón que contenían la mezcla de los compuestos.

El orden de elución de los compuestos se determinó con cada una de las columnas, optimizando las condiciones cromatográficas de separación de forma de obtener la máxima respuesta del detector y las mejores resoluciones posibles.

Tabla 4.7. Principales monoterpenos identificados y cuantificados en este trabajo

Nombre	Peso molecular	No. CAS	Estructura
α -Pinoeno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	80-56-8	
Camfeno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	79-92-5	
Sabineno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	3387-41-5	
Mirceno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	123-35-3	
β -Pinoeno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	127-91-3	
Δ^3 -Careno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	13466-78-9	
α -Terpineno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	99-86-5	
Limoneno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	138-86-3	

.....Continuación Tabla 4.7.

Nombre	Peso molecular	No. CAS	Estructura
<i>trans</i> - β -Ocimeno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	029714-87-2	
1,8-Cineol	154.25 (C ₁₀ H ₁₈ O)	470-82-6	
Terpinoleno	136.23 (C ₁₀ H ₁₆)	586-62-9	
Linalol	154.25 (C ₁₀ H ₁₈ O)	78-70-6	

Las condiciones cromatográficas óptimas para la separación se muestran en la Tabla 4.8.

Como patrón interno se utilizó un compuesto bencénico halogenado, el 2-clorobromobenceno (C₆H₄BrCl o BCB). Se seleccionó como patrón interno por sus propiedades adecuadas para poder eluir con los monoterpenos sin causar interferencia. Dicho compuesto eluye en la columna HP-1 entre el *trans*-óxido de linalol y el linalol, y en la columna DB-5 entre el *trans*-óxido de linalol y el α -terpineol.

Algunos compuestos cambian su orden de elución entre ambas columnas como es el caso del linalol y el β -pineno (ver Figuras 4.5 y 4.6). Pero el rango en tiempos de retención relativos no varió significativamente (0.655-1.15 y 0.712-1.145, respectivamente).

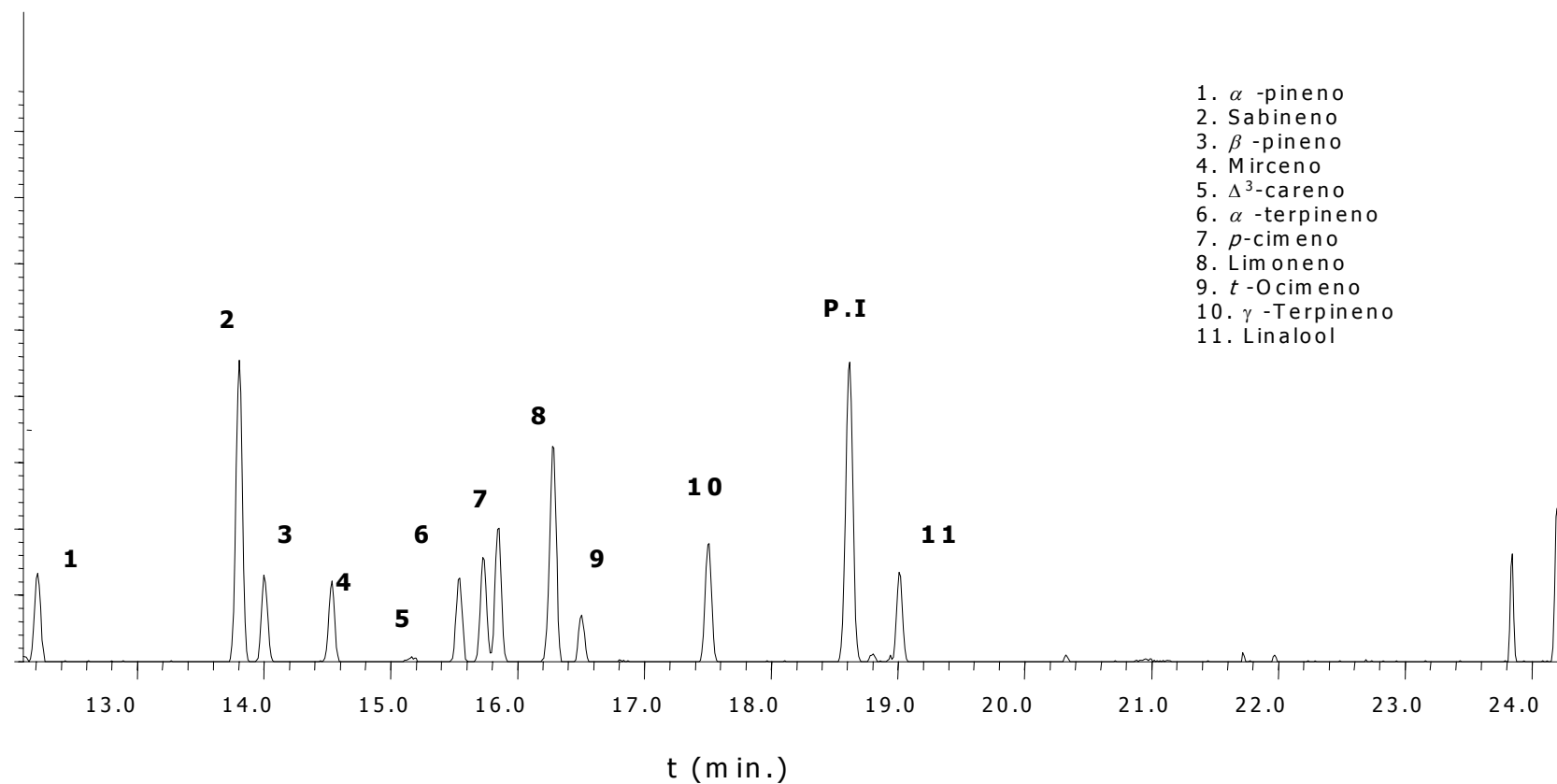


Figura 4.5. Cromatograma de la disolución patrón de monoterpenos. Los compuestos fueron separados con la columna HP-1

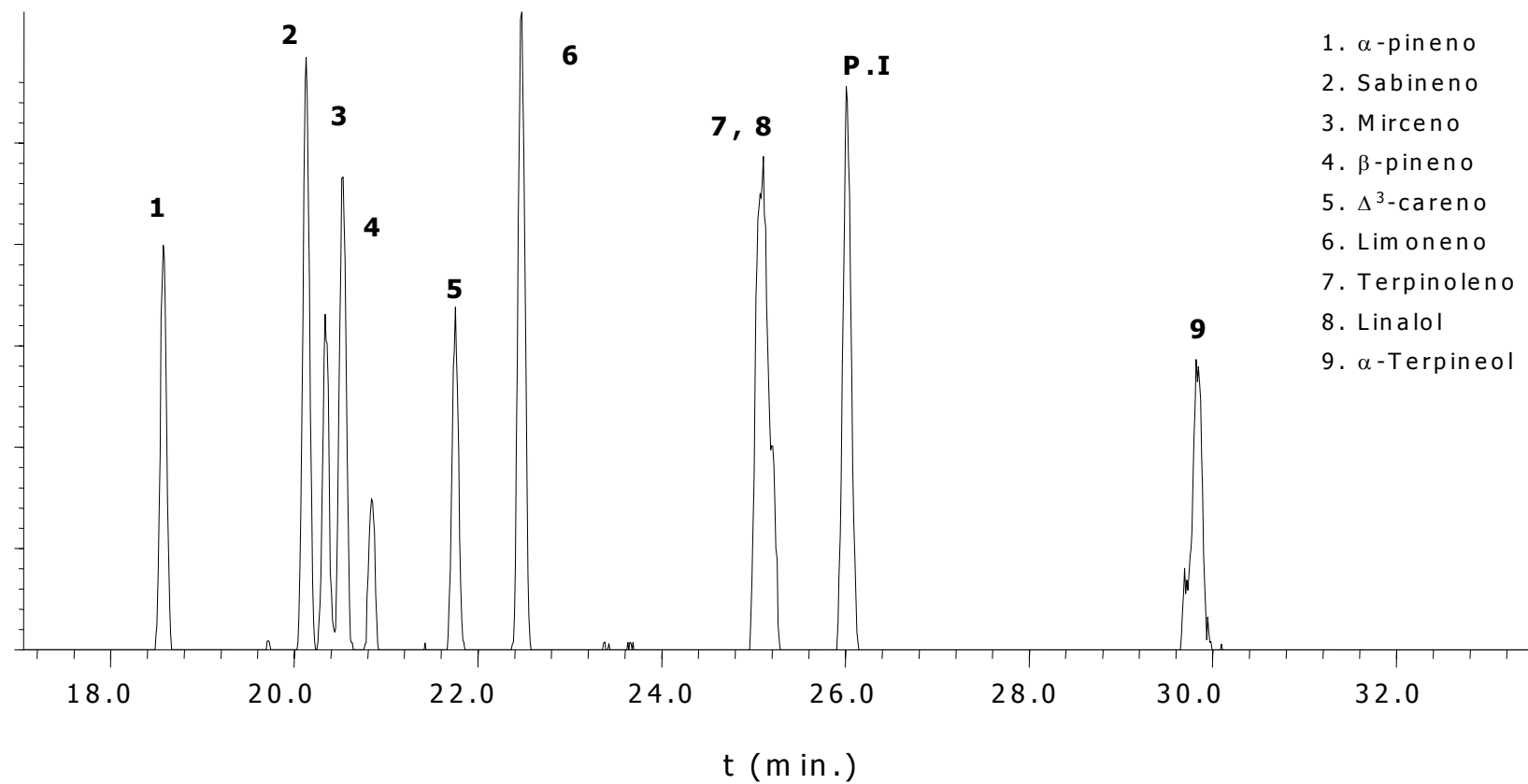


Figura 4.6. Cromatograma de la disolución patrón de monoterpenos. Los compuestos fueron separados con la columna DB-5

Tabla 4.8. Condiciones de trabajo para el sistema GC-MS con analizador cuadrupolar.Cromatografía de gases

Aparato: HP 5890 II GC

Columnas:

HP-1 de 25 m × 0.2 mm d.i.; 0.25 μm de espesor de fase estacionaria (Dimetilsiloxano)

40 °C durante 1 min, 20 °C/min hasta 65 °C, 5 min, 4 °C/min hasta 115 °C, 30 °C/min hasta 200 °C, 5 min

DB-5 de 50 m × 0.2 mm d.i.; 0.50 μm de espesor de fase estacionaria (5% fenil 95% metil polisiloxano)

40 °C durante 1 min, 20 °C/min hasta 100 °C, 5 min, 4 °C/min hasta 170 °C, 5 min, 10 °C/min hasta 200 °C, 10 min

Espectrometría de masas

Aparato: HP 5971

Ionización: Ionización electrónica. Energía de ionización 70 eV.

Temperatura interfase: 280 °C

Temperatura fuente: 200 °C

Calibrante: Perfluorotributilamina PTFBA (FC-43)

m/z : 69 (100%)^a, 219 (50%) y 502 (2.5%)

Modo de trabajo

Barrido completo (*full scan*).

Intervalo de masas: 40-250 u.m.a.

Velocidad scan: 1.2 scans/s

^a Proporción relativa

4.4.2. Identificación de los monoterpenos

Para la identificación de los compuestos, se creó una espectroteca donde se incluyen todos los compuestos de interés. Los espectros fueron creados a partir de patrones individuales, preparados con productos químicos de 99% de pureza como mínimo (TCI y Supelco). La identificación de los compuestos se complementó también con la espectroteca de la NIST/EPA (1990).

La identificación en forma cualitativa se hizo considerando:

- 1) Los tiempos de retención (t_R) de cada compuesto en la columna, así como los tiempos de retención relativos (TRR), que están relacionados con el tiempo de retención del patrón interno.
- 2) Los iones (m/z) característicos de cada monoterpeno, que se seleccionaron ya sea por ser el de mayor abundancia o por ser el ion molecular.

En la Tabla 4.9 se presentan los tiempos de retención (t_R) y los tiempos de retención relativos (TRR) de todos los compuestos estudiados utilizando ambas columnas capilares y en las condiciones óptimas de trabajo indicadas en la Tabla 4.8. También se presentan en esta misma tabla los iones característicos para cada compuesto.

La integración de los compuestos se hizo mediante el método de integración selectiva de iones utilizando el ion primario característico.

El criterio de decisión fue un grado de comparación $\geq 80\%$ entre el espectro del compuesto y el de referencia. Este grado de comparación es calculado mediante el algoritmo PBM ("Probability Based Matching") desarrollado por McLafferty (1993).

Tabla 4.9. Iones m/z característicos utilizados para la identificación de monoterpenos, tiempos de retención (t_R) y tiempos de retención relativos (TRR) al patrón interno obtenidos con las columnas capilares HP-1 y DB-5.

Compuesto	Ion m/z	HP-1		DB-5	
		t_R (min)	TRR	t_R (min)	TRR
α -Pineno	93 ^a , 92 ^b , 91, 77, 136	12.214	0.6566	18.574	0.7141
Camfeno	93 , 121, 79, 91	12.762	0.6861	19.360	0.7441
Sabineno	93 , 91, 77, 79, 136	13.826	0.7433	20.128	0.7738
Mirceno	93 , 69, 41, 79, 136	14.534	0.7813	20.339	0.7819
β -Pineno	93 , 69, 79, 121, 136	14.052	0.7554	20.530	0.7892
α -Felandreno	93 , 91, 77, 136	^c		21.436	0.8239
Δ^3 -Careno	93 , 91, 77, 121, 136	15.500	0.8320	21.755	0.8364
α -Terpineno	121 , 93, 136, 90, 77	15.706	0.8443	21.918	0.8424
Limoneno	68 , 93, 67, 79, 136	16.270	0.8747	22.474	0.8640
<i>trans</i> -Ocimeno	93 , 121, 136, 79, 105	16.984	0.9131	22.700	0.8726
1,8-Cineol	43 , 154, 93, 81	^c		22.799	0.8763
γ -Terpineno	93 , 91, 136, 121, 105	17.487	0.9401	23.662	0.9094
<i>Cis</i> -Oxido linalol	59 , 94, 43, 111	17.908	0.9628	24.349	0.9359
<i>trans</i> -Oxido linalol	59 , 94, 43, 111	18.515	0.9954	25.000	0.9609
Terpinoleno	121 , 93, 136, 91	18.769	1.0090	25.052	0.9632
Linalol	71 , 93, 41, 69, 43	19.207	1.0318	25.114	0.9654
α -Terpineol	59 , 93, 121, 136, 43	21.532	1.155	29.830	1.1467
Bromoclorobenceno (patrón interno)	192 , 190, 111, 75, 50	18.600	1.000	26.014	1.000

^a Ion primario característico

^b Iones secundarios

^c No se incluyó dentro de los patrones de calibración

4.4.3. Cuantificación de los monoterpenos

Se prepararon disoluciones patrón individuales de concentración elevada para cada uno de los compuestos (1000 ng/ μ l; ppm) que se utilizaron como patrones de referencia, para esto se dispuso de compuestos comerciales de alta pureza (99% como mínimo) (TCI y Supelco). Por dilución de estas se obtuvieron las disoluciones intermedias, y mediante la mezcla individual de estas últimas se prepararon las soluciones patrón de calibrado a diferentes niveles de concentración (cinco) que se utilizaron para los estudios de linealidad y calibración. Todas estas disoluciones fueron preparadas en metanol.

La calibración del sistema de detección se llevo a cabo determinando el intervalo de linealidad para los patrones de los compuestos en estudio. Esto se hizo mediante el método de calibración lineal con patrón interno, siendo este el 2-bromoclorobenceno (BCB). Se inyectó en forma manual 1 μ l de cada una de los niveles de concentración en un tubo adsorbente, junto con 1 μ l de la solución de BCB utilizada como patrón interno (288.2 ng/ μ l con la columna HP-1 y 303.82 ng/ μ l para la DB-5).

Se determinaron las curvas de calibrado para cada uno de los compuestos representando la relación área del pico del compuesto/área de patrón interno frente a la masa del compuesto, obteniéndose la función (recta de calibrado) que mejor se ajusta a los valores experimentales utilizando el método de mínimos cuadrados. Los cinco niveles de concentración utilizados fueron los mismos para ambas columnas (100-900 ng/ μ l).

Tabla 4.10. Parámetros de cuantificación para los monoterpenos utilizando la columna Hp-1. Los FRR están referidos al patrón interno.

Compuesto	FRR HP-1	FRR DB-5	Rango linealidad ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	r^2	Límite Detección ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
α -Pino	1.88	1.4	122.0-610.0	0.915	3.0
Camfeno	3.0	0.79	111.9-559.0	0.91	1.0
Sabineno	1.39	1.41	172.5-862.7	0.977	3.0
Mirceno	1.24	1.27	137.8-689.1	0.995	2.0
β -Pino	1.70	1.36	158.2-790.9	0.985	3.0
α -Felandreno	1.39	1.09	162.1-810.5	0.992	10.0
Δ^3 -Careno	1.78	1.44	106.6-533.1	0.95	3.0
α -Terpineno	1.66	1.12	128.8-644.0	0.923	1.0
Limoneno	1.24	1.17	181.4-907.0	0.972	1.0
<i>trans</i> -Ocimeno	0.99	0.30	98.7-493.5	0.956	7.0
1,8-Cineol	0.1	0.26	97.9-489.4	0.980	50.0
γ -Terpineno	1.77	1.30	154.9-774.5	0.92	1.0
<i>Cis</i> -Oxido linalol	1.27	0.71	67.05-335.3	0.951	7.5
Terpinoleno	2.35	1.15	132.4-662.0	0.934	3.0
Linalol	1.06	0.78	150.9-754.5	0.954	2.0
<i>trans</i> -Oxido linalol	1.32	0.72	67.05-335.3	0.950	7.5
α -Terpineol	1.27	0.93	154.87-774.4	0.93	3.0

Los rangos de linealidad son los puntos (nivel de concentración) que presentan valores similares de la pendiente y que por consiguiente se hallan alineados entre sí. Estos valores, junto con los coeficientes de correlación, y los límites de detección se presentan en la Tabla 4.10.

Los límites de detección se han calculado en base a una señal cuya altura es igual o superior a 2 veces la desviación estándar del ruido de fondo (RF) del sistema de detección.

La cuantificación se realizó comparando la respuesta cromatográfica (área) de cada compuesto con la del patrón interno.

Con las áreas integradas del compuesto para los diferentes niveles de concentración y del patrón interno, se calcularon los factores de respuesta para cada uno de ellos. Se calculó el Factor de Respuesta Relativo (FRR) al patrón interno, que se expresa de la forma siguiente:

$$FRR_{COV} = \frac{RF_{COV}}{RF_{BCB}} = \frac{A_{COV}^* / m_{COV}^*}{A_{BCB}^* / m_{BCB}^*} \quad [4.1]$$

donde RF_{COV} y RF_{BCB} son, respectivamente, los factores de respuesta del compuesto y del BCB en la mezcla de patrones, que a su vez se definen como la relación entre el área en el cromatograma (A^*) y la masa de patrón inyectada (m^*).

Además, para la cuantificación de las masas de los compuestos detectados se ha tenido en cuenta la variación de la sensibilidad del detector de masas a lo largo del tiempo, corrigiendo los valores de los FRR obtenidos por comparación de la respuesta de los distintos patrones de terpenos respecto a la del patrón interno, en la primera inyección de la mezcla de patrones.

La primera inyección de patrones con la columna HP-1 (J&W Scientific) ocurrió el día 20/5/97, que tomamos como base para el cálculo de los FRR. El día 22/5/98 se efectuó un cambio de columna por una DB-5 (J&W Scientific), por lo que se calcularon nuevos FRR, que se utilizaron para cuantificar las muestras a partir de esa fecha. Los FRR para ambas columnas se muestran en la Tabla 4.12.

La masa m de un compuesto detectado se ha calculado como sigue:

$$m_{COV} = \frac{A_{COV} m_{BCB}}{A_{BCB} (FRR_{COV} SF)} \quad [4.2]$$

donde A_{COV} y A_{BCB} son las respuestas (áreas) del compuesto y del BCB en la muestra analizada, m_{BCB} es la cantidad de BCB inyectado en la muestra, FRR_{COV} es el FRR del

compuesto (relación entre los factores de respuesta del compuesto y del BCB en la inyección de patrones en su día), y SF el factor de sensibilidad del equipo, tomándose igual a 1 en el momento de la inyección de patrones en su día.

A partir de la diferencia másica de los COVs a la salida y la entrada de la cámara, respectivamente, se han determinado los factores de emisión ($\mu\text{g/g/h}$) en base a la biomasa seca y el tiempo de emisión, según la siguiente expresión:

$$E = \left(\frac{m_2}{q_2} - \frac{m_1}{q_1} \right) \frac{Q}{M \cdot t} \quad [4.3]$$

donde E es el factor de emisión expresado como $(\mu\text{g de compuesto})(\text{g de biomasa foliar seca})^{-1}(\text{h})^{-1}$; m_2 y m_1 son la masa del compuesto en las muestras de aire de salida y de entrada (μg), respectivamente; q_2 y q_1 son los caudales de aire en las muestras de salida y de entrada (l min^{-1}); Q es el caudal de aire de entrada a la cámara (l min^{-1}); M es el peso de la biomasa foliar seca de la rama muestreada (g), y t es el tiempo de muestreo (h).

La ecuación [4.3] es dependiente de diversas variables experimentales, de forma que la incertidumbre asociada al factor de emisión calculado podemos definirla de la siguiente manera:

$$\Delta E = \sum_{i=1}^N \Delta x_i \delta E / \delta x_i \quad [4.4]$$

Donde N es el número de variables independientes, $\delta E / \delta x_i$ es la derivada parcial de la función que describe los niveles de emisión con respecto a cada variable x_i y Δx_i es la incertidumbre asociada a cada una de las variables.

Tabla 4.11. Incertidumbre asociada al nivel de emisión obtenido con la cámara de encerramiento.

x_i	x_i máxima	% error	Δx_i	$\delta E / \delta x_i$ ^b	Δx_i ($\delta E / \delta x_i$)	% Error respecto E
m_2 (μg)	2.873	0.15	43.09	0.00372	0.1603	15.35
m_1 (μg)	0.0656	0.15	0.0098	-0.00372	$-3.65 \cdot 10^{-5}$	3.50
q_2 (m^3/min)	0.0001	0.02	$2.0 \cdot 10^{-6}$	-106.75	$-2.135 \cdot 10^{-4}$	2.04
q_1 (m^3/min)	0.0001	0.02	$2.0 \cdot 10^{-6}$	2.437	$4.9 \cdot 10^{-6}$	0.047
F (m^3/min)	0.013	0.03846	0.0005	0.802	$4.01 \cdot 10^{-4}$	3.85
t (h)	0.5	0.033	0.0167	-20.857	-0.3483	2.33
M (g)	69.97	0.0048	0.033	-0.1490	0.0049	0.5
E teórico^a					Total	24.5 %
=1.0431					$\Delta E^c = 0.514$	

^a El nivel de emisión teórico se calculó sustituyendo los máximos valores x_i dentro de la ecuación [4.3].

^b Por cada x_i , $\delta E / \delta x_i$ es evaluado sustituyendo los valores x_i dentro de la ecuación [4.3] que ha sido parcialmente derivada con respecto a x_i .

^c El ΔE total es la suma de los errores de cada componente. El valor obtenido ($0.514 \mu\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$) representa el 49% del valor de E calculado.

En la Tabla 4.11 se listan cada uno de los elementos en la ecuación [4.3]. Los valores x_i mostrados son representativos de los valores encontrados en muestras de campo de bajas concentraciones. Los valores para (Δx_i) de cada una de las variables son estimadas de los valores obtenidos en campo. El error ($\Delta x_i \delta E / \delta x_i$) para cada variable es calculado y sumado para toda la función. Se obtuvo un resultado promedio sustituyendo los valores de x_i dentro de la ecuación [4.3].

El porcentaje de error de cada variable con respecto a su emisión teórica se presenta tabulado. La estimación global de la incertidumbre del método de encerramiento calculada en este estudio fue del 24.5 %.

4.5. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.5.1. Interferencias producidas en el adsorbente

Una de las limitaciones de los materiales adsorbentes es la formación de interferencias o impurezas. Estas interferencias pueden ser de dos tipos:

- 1) las que se producen durante el almacenamiento, y
- 2) las que se forman a partir del material adsorbente ya sea por efecto de la temperatura, o por reacción con el ozono troposférico (ozonólisis).

Las interferencias durante el almacenamiento fueron minimizadas, previo al muestreo, mediante un meticuloso proceso de acondicionamiento a las temperaturas adecuadas. El acondicionamiento se realizó tanto al preparar los tubos adsorbentes, y antes de cada muestreo. El método de acondicionamiento empleado en el presente trabajo es el que se muestra en el Anexo 1.

También, para verificar la eficiencia del acondicionamiento, se realizaron regularmente ensayos de blancos antes y después del muestreo. En el Anexo 1, se presentan dos cromatogramas, uno representa el análisis de un tubo blanco inmediatamente después de haber sido acondicionado (A) y el otro (B) después de haber estado almacenado 4 días cerrados con tapones tipo Swagelock®. Se pudo apreciar que después del acondicionamiento el tubo está bastante limpio, y después de 4 días se observan picos de origen antropogénico a muy bajas concentraciones que no pudieron ser cuantificados.

Lo anterior se puede comparar con lo encontrado por Cao y Hewitt (1994b), quienes estudiaron las interferencias en blancos de cuatro adsorbentes utilizados comúnmente en muestreo del aire: Tenax-TA, Tenax-GR, Carbotrap y Chromosorb 106. Reportaron que el desarrollo de interferencias en Tenax-TA y Tenax-GR eran mínimas; son más

agudas con el Carbotrap, especialmente para los compuestos $\leq C_5$, y son aún más severas con el Chromosorb 106, por lo cual este último no es apropiado para este tipo de muestras.

El aire del laboratorio fue también evaluado para detectar posibles interferencias. Se tomó aire del laboratorio utilizando la cámara de encerramiento. El procedimiento utilizado para la toma de muestra fue exactamente el mismo que el empleado en el campo. Los tubos se seleccionaron en forma aleatoria de un lote preparado y acondicionado previamente.

Según varios autores el Tenax TA puede reaccionar con el ozono atmosférico produciendo interferencias tales como el benzaldehído, acetofenona y una serie de aldehídos alifáticos (Pellizzari *et al.*, 1984; Ciccioli *et al.*, 1984; Calogirou *et al.*, 1996). Estas interferencias se pueden evitar cuando se utilizan columnas capilares de alta resolución donde estos compuestos pueden ser separados de los terpenos y terpenoides de interés.

En 1988 Jüttner demostró que el ozono presente en el aire de un bosque a una concentración aproximada de ~ 60 ppbv (partes por billón en volumen; 10^{-9} v/v) reaccionaba con los monoterpenos no saturados en las trampas de adsorción con Tenax TA, lo cual representaba una alteración significativa en el comportamiento de la emisión de terpenos estudiada.

Una manera de eliminar la interferencia del ozono en el muestreo de terpenos, es mediante el uso de catalizadores que eliminan el ozono del aire antes de que sea retenido en el adsorbente. Diferentes materiales han sido utilizados con este propósito como son: sulfito de sodio (Na_2SO_3) anhidro, tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$), yoduro de potasio (KI), carbonato de potasio (K_2CO_4) y dióxido de manganeso (MnO_2).

Sin embargo, es importante mencionar que en un ejercicio de intercalibración realizado por diferentes laboratorios participantes en el proyecto BEMA (1993-1994), utilizando cámaras ventiladas con o sin ozono, los niveles obtenidos entre los dos diferentes

grupos, utilizando Tenax TA como adsorbente, muestran que no existen diferencias significativas (Kesselmeier *et al.*, 1996).

En el presente trabajo, no se hizo ningún tratamiento tanto al aire de entrada como al de salida de la cámara, con el fin de reproducir al máximo las condiciones naturales en campo. Solamente se detectó la presencia de tolueno en algunas muestras, pero esto pudo también ser emitido por la misma planta como fue reportado por Heiden *et al.* (1999).

La eficacia de desorción fue también evaluada, tanto para estándares como para las muestras reales. Los ensayos consistieron en analizar nuevamente (tres veces) el tubo ya analizado que contenía la muestras reales, como también los patrones para verificar si quedaban compuestos retenidos en el tubo.

4.5.2. Recuperaciones

Se estudió la recuperación de los patrones en el sistema analítico, utilizando un nivel de concentración que contiene a los compuestos en el rango de 67.05 – 181.43 ng/μl (cis y trans-oxido linalol y limoneno, respectivamente) realizando cinco inyecciones de la mezcla en el respectivo tubo de adsorción. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.12.

Las recuperaciones están en el rango de 0.2–21.1 % (RSD) correspondientes al sabineno y al canfeno. Estos resultados son satisfactorios, teniendo en cuenta que se utilizaron estándares líquidos y se realizó una inyección manual de estos al sistema. Esto también implica una buena capacidad de retención y desorción del material adsorbente.

Tabla 4.12. Recuperaciones para la disolución patrón obtenidas con la columna DB-5

Compuesto	Conc. Añadida (ng/ μ l)	% Recuperación	Conc.^a Obtenida (ng/ μ l)	SD^b	% RSD
α -Pinoeno	122.02	96.2	117.3	7.2	6.1
Camfeno	111.88	100.6	112.6	23.8	21.1
Sabineno	172.54	106.8	184.2	0.3	0.2
Mirceno	137.81	82.5	113.8	5.9	5.2
β -Pinoeno	158.17	102.7	162.4	5.9	3.6
α -Felandreno	162.1	106.1	172.0	14.3	8.3
Δ^3 -Careno	106.62	98.7	105.3	1.3	1.2
α -Terpinoeno	128.8	100.0	128.8	9.6	7.4
Limoneno	181.43	99.0	179.6	3.4	1.9
1,8-Cineol	97.88	129.6	126.9	17.3	13.6
γ -Terpinoeno	154.98	98.7	153.0	11.6	7.6
<i>Cis</i> -Oxido linalol	67.05	106.0	71.0	7.7	10.9
<i>trans</i> -Oxido linalol	67.05	105.8	71.0	7.7	10.9
Terpinoleno	132.39	99.1	131.2	4.7	3.5
Linalol	150.86	100.4	151.5	0.1	0.0
α -Terpineol	154.87	107.3	166.2	2.4	1.4

^a La concentración obtenida se calculó con el patrón interno (BCB) y es el promedio de cinco (n=5) inyecciones de patrones correspondientes a un día (20-julio-98) de análisis.

^b La Desviación estándar se calculó con respecto a las concentraciones obtenidas (n= 5).

4.5.3. Optimización de la separación cromatográfica

Para evaluar las condiciones óptimas de separación se estudió la repetitividad y reproducibilidad de la inyección para ambas columnas.

Tabla 4.13. Repetitividad y reproducibilidad de la retención relativa (TRR) de los monoterpenos separados en la columna HP-1 (n= 7 inyecciones).

Compuesto	Repetitividad			Reproducibilidad		
	TRR (media)	SD	%RSD	TRR (media)	SD	%RSD
α -Pino	0.6566	0.0002	0.0379	0.6584	0.0016	0.2500
Camfeno	0.6861	0.0001	0.0184	0.6870	0.0008	0.1219
Sabineno	0.7433	0.0001	0.0132	0.7439	0.0006	0.0761
β -Pino	0.7554	0.0002	0.0278	0.7562	0.0008	0.1028
Mirceno	0.7813	0.0001	0.0078	0.7817	0.0004	0.0538
α -Terpineno	0.8443	0.0001	0.0098	0.8450	0.0007	0.0792
Limoneno	0.8747	0.0001	0.0067	0.8752	0.0005	0.0609
γ -Terpineno	0.9401	0.0001	0.0075	0.9407	0.0006	0.0627
Terpinoleno	1.0090	0.0001	0.0092	1.0096	0.0006	0.0570
Linalol	1.0318	0.0043	0.4213	1.0299	0.0016	0.1574
α -Terpineol	1.1576	0.0007	0.0588	1.1579	0.0006	0.0483

La repetitividad del método de separación se estudió utilizando el mismo equipo (misma sensibilidad) y las mismas condiciones analíticas. Para esto se inyectó siete (7) veces en las condiciones cromatográficas optimizadas, una disolución patrón que contiene a los compuestos en el rango de concentración de 42.1-3208.1 ng μl^{-1} (Columna HP-1; γ -terpineno-linalol, respectivamente) y 122.0-181.4 ng μl^{-1} (Columna DB-5; α -pino-limoneno, respectivamente). La repetitividad se estudió en base a las retenciones relativas (TRR) de los compuestos respecto al patrón interno 1,2-

bromoclorobenceno (BCB). Los resultados obtenidos para la columna HP-1 se presentan en la Tabla 4.13 y para la columna DB-5 en la Tabla 4.14.

Tabla 4.14. Repetitividad y reproducibilidad de la retención relativa (TRR) de los monoterpenos separados en la columna DB-5 (n= 7 inyecciones).

Compuesto	Repetitividad			Reproducibilidad		
	TRR (media)	SD	%RSD	TRR (media)	SD	%RSD
α -Pinoeno	0.7139	0.0007	0.0935	0.7141	0.0004	0.0616
Camfeno	0.7439	0.0000	0.0032	0.7441	0.0004	0.0539
Sabineno	0.7739	0.0006	0.0768	0.7738	0.0003	0.0411
Mirceno	0.7820	0.0004	0.0553	0.7819	0.0002	0.0277
β -pinoeno	0.7893	0.0006	0.0756	0.7892	0.0003	0.0435
α -felandreno	0.8236	0.0000	0.0049	0.8239	0.0006	0.0676
Δ^3 -careno	0.8365	0.0004	0.0428	0.8364	0.0002	0.0236
α -Terpinoeno	0.8423	0.0001	0.0124	0.8424	0.0003	0.0344
Limoneno	0.8639	0.0007	0.0859	0.8640	0.0004	0.0440
1,8-cineol	0.8763	0.0002	0.0202	0.8763	0.0001	0.0143
γ -Terpinoeno	0.9093	0.0001	0.0095	0.9094	0.0003	0.0341
<i>cis</i> -Oxido linalol	0.9356	0.0000	0.0021	0.9359	0.0005	0.0522
<i>trans</i> -Oxido linalol	0.9608	0.0004	0.0374	0.9609	0.0003	0.0267
Terpinoleno	0.9631	0.0007	0.0757	0.9632	0.0004	0.0388
Linalol	0.9658	0.0003	0.0277	0.9654	0.0005	0.0503
α -terpineol	1.1467	0.0004	0.0349	1.1467	0.0002	0.0175

Se puede observar que las desviaciones estándar relativas (% RSD) de las retenciones relativas en la columna HP-1 se encuentran entre 0.0067 y 0.42 %. Este porcentaje de error es aún menor utilizando la columna DB-5 los valores oscilan entre 0.0032 y 0.0935 %.

La reproducibilidad es el parámetro que expresa la variabilidad de los resultados de una serie de medidas utilizando las mismas condiciones experimentales durante días

no consecutivos (Huber, 1998). En nuestro caso la reproducibilidad se estudió durante tres días no consecutivos, con siete (7) inyecciones por día de la disolución patrón utilizada para el estudio de la repetitividad. Los resultados obtenidos para ambas columnas se presentan en las Tablas 4.13 y 4.14.

Si se comparan los resultados de la reproducibilidad con la repetitividad se observa un aumento en las desviaciones estándar relativas (% RSD), debido, fundamentalmente a las variaciones que se producen en las condiciones cromatográficas en cada experimento. Hallándose los valores de las desviaciones estándar relativas para el estudio de reproducibilidad entre los 0.05-0.25 % para al columna HP-1 y 0.014-0.062 % para la columna DB-5.

4.5.4. Optimización de la detección (MSD)

Se estudio la repetitividad y reproducibilidad con el detector selectivo de masas (MSD). Para ello se inyectó cinco veces una disolución patrón que contiene a los compuestos en el rango de concentración de 42.1-3208.1 ng μl^{-1} (Columna HP-1; γ -terpineno-linalol, respectivamente) y 122.0-181.4 ng μl^{-1} (Columna DB-5; α -pineno-limoneno, respectivamente) en las condiciones optimizadas para cada columna indicadas en la Tabla 4.8.

En la Tabla 4.15 se presentan los resultados obtenidos con la columna HP-1 en el estudio de repetitividad de 5 medidas en un mismo día y en el estudio de reproducibilidad de medidas realizadas en tres días no consecutivos. Para esto se midió el área relativa al patrón interno del pico cromatográfico de cada uno de los compuestos, expresando los resultados como media, desviación estándar (SD) y desviación estándar relativa en tanto por ciento (% RSD).

Tabla 4.15. Repetitividad y reproducibilidad de las áreas relativas al patrón interno (2-bromoclorobenceno) para cada uno de los compuestos monoterpénicos en la columna HP-1 (n= 5 inyecciones)

Compuesto	Area pico/ Area patrón interno					
	Repetitividad			Reproducibilidad		
	Media	SD	RSD (%)	Media	SD	RSD (%)
α -pineno	2.526	0.321	6.36	2.530	0.142	5.6
Camfeno	0.141	0.017	11.90	0.148	0.021	14.14
Sabineno	4.012	0.080	1.99	4.115	0.080	10.37
β -pineno	4.737	0.280	5.92	4.725	0.384	8.13
Mirceno	1.444	0.027	1.85	1.421	0.250	17.56
α -Terpineno	0.584	0.024	4.03	0.590	0.067	11.33
Limoneno	0.840	0.022	2.61	0.836	0.097	11.61
γ -Terpineno	1.039	0.044	4.24	1.071	0.171	15.93
Terpinoleno	0.321	0.009	2.91	0.331	0.061	18.34
Linalol	8.838	0.288	3.26	8.325	0.934	11.22
α -Terpineol	0.305	0.005	1.53	0.321	0.021	6.71

En los datos presentados en las tablas 4.14 y 4.15 se puede observar que las desviaciones estándar relativas obtenidas en el estudio de repetitividad para las áreas relativas oscilan entre 1.53-11.90 % (α -terpineol y camfeno, respectivamente) para la columna HP-1 y 0.04-21.11% (linalol y camfeno, respectivamente) para la columna DB-5. Estos valores se encuentran dentro del rango de los reportados por otros autores (König *et al.*, 1995; Peters *et al.*, 1994; Janson, 1992).

Los valores de reproducibilidad (% RSD) muestran una mayor dispersión, con valores en el rango de 5.6-18.34 % (α -pineno y terpinoleno, respectivamente) para la columna HP-1 y 5.8-27.4 % (γ -terpineno y 1,8-cineol, respectivamente) para la columna DB-5. Los valores de referencia que resume Woolfenden (1997) son típicamente en el rango de 5 % RSD para disoluciones al nivel de μg y del 10% RSD para disoluciones al nivel de ng.

Tabla 4.16. Repetitividad y reproducibilidad de las áreas relativas al patrón interno (2-bromoclorobenceno) para cada uno de los compuestos monoterpénicos en la columna DB-5 (n= 5 inyecciones).

Compuesto	Area pico/ Area patrón interno					
	Repetitividad			Reproducibilidad		
	Media	SD	RSD (%)	Media	SD	RSD (%)
α -pineno	0.5407	0.0332	6.13	0.5457	0.0446	8.18
Camfeno	0.2928	0.0618	21.11	0.2910	0.0515	17.71
Sabineno	0.8549	0.0016	0.19	0.8690	0.0826	9.51
Mirceno	0.4755	0.0247	5.20	0.4404	0.0556	12.62
β -pineno	0.7271	0.0263	3.61	0.7175	0.0686	9.56
α -felandreno	0.6172	0.0512	8.30	0.6205	0.0386	6.22
Δ^3 -careno	0.4990	0.0060	1.20	0.4735	0.0540	11.40
α -terpineno	0.4749	0.0353	7.44	0.4747	0.0338	7.12
Limoneno	0.6917	0.0131	1.89	0.6465	0.0847	13.10
1,8-cineol	0.4176	0.0569	13.61	0.3369	0.0922	27.36
γ -terpineno	0.6698	0.0506	7.55	0.6682	0.0388	5.80
<i>cis</i> -oxido linalol	0.1660	0.0181	10.89	0.1646	0.0110	6.66
<i>trans</i> -oxido linalol	0.1681	0.0184	10.92	0.1740	0.0129	7.42
Terpinoleno	0.4968	0.0176	3.55	0.4593	0.0677	14.74
Linalol	0.3890	0.0002	0.04	0.3772	0.0631	16.72
α -Terpineol	0.5088	0.0072	1.42	0.4355	0.0725	16.65

Estos niveles de dispersión sugieren que la precisión y exactitud del método empleado podría mejorarse mediante el uso de una inyección automatizada de estándares en estado gaseoso como han utilizado otros autores (Robert *et al.*, 1983; Riba *et al.*, 1985; Janson, 1992) en vez de la inyección manual de estándares líquidos que ha sido utilizada en el presente trabajo.

Desarrollo de la metodología de análisis	1
4.1. Introducción.....	1
4.2. Método de toma de muestras	5
4.2.1. Descripción del sitio de muestreo.....	5
4.2.2. Técnica de encerramiento dinámico	6
4.3. Desarrollo del Método de Desorción Térmica.....	10
4.3.1. Selección del adsorbente	10
4.3.2. La técnica de desorción térmica	14
4.3.3. Capacidad del adsorbente utilizado	19
4.4. Análisis y detección mediante GC-MS	25
4.4.1. Separación cromatográfica de los monoterpenos.....	25
4.4.2. Identificación de los monoterpenos	32
4.4.3. Cuantificación de los monoterpenos	34
4.5. Validación del método analítico	39
4.5.1. Interferencias producidas en el adsorbente.....	39
4.5.2. Recuperaciones.....	41
4.5.3. Optimización de la separación cromatográfica.....	43
4.5.4. Optimización de la detección (MSD)	45