



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA



APLICACIONES DEL ESPACIO DE CABEZA DINÁMICO AL ANÁLISIS FARMACEÚTICO

MANUEL FERNÁNDEZ RANDO

FACULTAD DE FARMACIA – UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

**TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA**

**APLICACIONES DEL ESPACIO DE CABEZA DINÁMICO
AL ANÁLISIS FARMACEÚTICO**

MANUEL FERNÁNDEZ RANDO

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Fecha de presentación: 7 de Julio de 2017

Departamento de Química Analítica

Tutoras: M^a Teresa Montaña González y M^a Teresa Morales Millán

Trabajo de revisión bibliográfica

ÍNDICE	Pág.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. Compuestos volátiles	3
2.1.1. Importancia del análisis de los compuestos volátiles	4
2.1.2. Problemática del análisis de los compuestos volátiles	5
2.2 Preparación de la muestras para el análisis de compuestos volátiles	7
3. OBJETIVOS	9
4. METODOLOGÍA	10
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	11
5.1. Espacio de cabeza dinámico	11
5.2. Aplicaciones	14
5.2.1. Aplicaciones del espacio de cabeza dinámico en alimentos	14
5.2.2. Aplicaciones del espacio de cabeza dinámico en medioambiente	19
5.2.3. Otras aplicaciones del espacio de cabeza dinámico relacionadas con el análisis farmacéutico	22
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	27

1. RESUMEN

Se denomina espacio de cabeza dinámico a la técnica que engloba el proceso de adsorción de compuestos volátiles a través de una trampa para su posterior desorción e introducción en un cromatógrafo para su separación. Esta revisión bibliográfica se centra en diversos aspectos, desde los más generales, como la explicación de los compuestos volátiles y la dificultad de su análisis, hasta las aplicaciones más novedosas de esta técnica. En esta última cuestión se basa la mayor parte del trabajo. En primer lugar, se tratan algunos aspectos generales de los compuestos volátiles, continuando con la importancia de su estudio. Se describen las principales técnicas de preparación de la muestra para el análisis de los compuestos volátiles incluyendo los métodos extractivos y los métodos destilativos. Por último, la parte más relevante del trabajo son las aplicaciones de la técnica de espacio de cabeza dinámico en distintos sectores del análisis farmacéutico, especialmente en el área de Medioambiente, Ciencia y Tecnología de Alimentos y Ciencias de la Salud. Para ello se ha realizado una búsqueda de las aplicaciones más habituales en los últimos 25 años. Estas aplicaciones han sido agrupadas para obtener una visión general de la técnica.

PALABRAS CLAVES

Compuestos volátiles, espacio de cabeza dinámico, alimentos, medio ambiente, análisis farmacéutico.

ABSTRACT

Dynamic headspace is called the technique which includes the process of adsorption the volatile compounds through a trap for its subsequent desorption and introduction in a chromatograph for its separation. This review focuses on several aspects, from the most general, such as the explanation of volatile compounds and the difficulty of their analysis, to the most innovative applications of this technique. This work mainly focuses on the last questions, First, some general ideas of volatile compounds and the importance in study. On the other hand, the main techniques of sample preparation of the volatile compounds are described including the extraction and the distillation

methods. Finally, the most relevant part of the work is the application of dynamic headspace in the different pharmaceutical sectors, especially in the area of Environment, Food Science and Technology and Health Sciences. A bibliography search has been made of the most common applications in the last 25 years. These applications have been grouped for an overview of the technique.

KEYWORDS

Volatile compounds, dynamic headspace, food, environment, pharmaceutical analysis.

2. INTRODUCCIÓN

El proceso analítico consta de una serie de etapas que están encaminadas a relacionar la muestra objeto de análisis con los resultados (Valcárcel, 1999). Cuando se determinan analitos que se encuentran en las muestras en cantidades muy bajas, especialmente cuando se trata de muestras con matrices complejas, tales como alimentos, muestras biológicas, medioambientales, etc. se hace necesaria la utilización de procedimientos que permitan el aislamiento del analito de la matriz de la muestra, para evitar la presencia de posibles sustancias interferentes.

Asimismo, en muchos casos se hace necesaria una etapa de preconcentración o enriquecimiento del analito para aumentar su concentración en la fracción que será posteriormente analizada, consiguiendo de esta forma mejorar la sensibilidad del procedimiento.

Estos dos procesos que mejoran la selectividad y la sensibilidad del proceso se llevan a cabo mediante diferentes técnicas de separación no cromatográficas. La unión de este tipo de técnicas a un proceso cromatográfico posterior permite la determinación de un número alto de analitos en muestras complejas en un único análisis (Valcárcel, 1999; Compañó y Rios, 2002).

2.1 Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son un tipo particular de analitos que tienen un papel importante en el mundo actual debido a sus beneficios relacionados con el olor de los alimentos y con algunos extractos naturales que son utilizados con fin medicinal, por otro lado desde un punto de vista medio ambiental se encuentran los contaminantes que puede provocar graves daños en el ser humano.

Son compuestos orgánicos que están formados mayoritariamente por carbono y heteroátomos como oxígeno, flúor, cloro, bromo, azufre o nitrógeno, que influyen en su volatilidad. Tienen un punto de ebullición y fusión que oscila entre 50°C y 260°C (Guenther, 1995), y que presentan a 20° C una presión de vapor de alrededor de 0,01 kPas.

Dentro del grupo de compuestos volátiles hay distintos tipos de compuesto químicos entre los que se encuentran los hidrocarburos alifáticos y aromáticos y otros compuestos como aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, alcoholes y terpenos.

2.1.1 Importancia del análisis de los compuestos volátiles

El estudio de los compuestos volátiles es fundamental desde diferentes puntos de vista, dependiendo del tipo de muestra donde se encuentren.

Dentro del área de medio ambiente, los volátiles son frecuentemente analitos objeto de estudio para la resolución de problemas medioambientales actuales, tales como los siguientes:

- Efectos tóxicos o cancerígenos en la salud humana. Muchos compuestos volátiles tienen efectos sobre la salud por vía inhalatoria produciendo por ejemplo, efecto narcótico. Los más importantes son los que tienen efecto cancerígeno como el benceno y 1,3-butadieno (Mucke, 2000), que además son agentes inductores de leucemia, también se destacan los hidrocarburos policíclicos aromáticos que son potencialmente cancerígenos y mutagénicos (Ho y Lee, 2002).
- Formación fotoquímica de ozono troposférico. Los compuestos volátiles con óxido de nitrógeno y en presencia de luz solar producen ozono (Atkinson et al., 1997), que es un contaminante secundario perjudicial para el ser humano, pero además es perjudicial para los cultivos y la vegetación sobre los que ejerce un efecto fitotóxico (Krupa y Manning, 1988).
- Agotamiento del ozono estratosférico. Una parte de los compuestos volátiles tienen una gran estabilidad química y por ello puede alcanzar la estratosfera, si estos compuestos contiene cloro o bromo en su composición, los procesos de fotólisis estratosférica y la destrucción a cargo del radical hidroxilo puede producir la liberación de compuestos que produzcan la destrucción del ozono (Derwent et al., 1996).

En el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos los compuestos volátiles son

compuestos minoritarios de gran importancia en la calidad de los alimentos ya que son responsables de su olor y flavor. Todos los alimentos, tanto de origen animal como vegetal, contienen una amplia y diversa cantidad de compuestos volátiles que pueden tener diferente naturaleza química, por ejemplo algunos compuestos volátiles como el guayacol o la 2,3,5-trimetilpirazina son fundamentales en el aroma de alimentos como el café. La determinación de los compuestos volátiles en alimentos se hace necesaria con distintos objetivos:

- Para evaluar la calidad de distintos alimentos como, por ejemplo, el vino, el aceite, el café o la oleorresina del pimentón (Guadayol et al., 1997; Schilling et al, 2010).
- Para estudiar la presencia de contaminantes o de compuestos de alteración de los alimentos.
- Para estudiar la posible migración de compuestos desde los envases a los alimentos.

Dentro del área de Ciencias de la Salud estos compuestos también tienen importancia desde un punto de vista analítico y de diagnóstico:

- Pueden encontrarse formando parte de distintas formulaciones, como principios activos o como excipientes, caso de los aceites esenciales o el alcohol.
- Pueden ser analitos objeto de estudio en análisis clínicos o toxicológicos, como es el caso de la determinación de acetaldehído, acetona o alcohol en sangre o en orina.
- Algunos compuestos volátiles como el citronelol o el linalol son utilizados como repelentes de insectos, lo que es utilizado en la industria farmacéutica, siendo el principal medio natural frente a los insectos (Steenhuisen et al., 2012)

2.1.2 Problemática del análisis de los compuestos volátiles

Uno de los mayores problemas en el análisis de compuestos volátiles es la contaminación que puede ser diversa:

- Entre los principales contaminantes que se presenta en el análisis de los

compuestos volátiles están los septum de silicona que se utilizan en los inyectores de cromatógrafos de gases, muchos autores para evitar esta contaminación utilizan un septum Merlín en sustitución del de silicona (Kierkegaard et al., 2013) estos septum están formados por compuestos a base de fluorocarbono resistentes a elevadas temperaturas, por lo que no aportan compuestos volátiles al análisis.

- Se produce contaminación en las etapas de pre-tratamiento y extracción de muestra, puesto que podemos encontrar compuestos volátiles tanto en el aire del laboratorio como en los reactivos y materiales, provocando fallos en la cuantificación de estos compuestos.
- Se ha observado una contaminación importante de compuestos volátiles en el agua utilizada como blanco en algunos ensayos como patrón de calibración (Sparham et al., 2008).
- Un inconveniente muy común suele ser la toma de muestra, pues en muchas ocasiones se hace casi imposible excluir a los contaminantes, debido a que en los lugares donde se toma, hay presencia de compuestos volátiles que no interesan en el estudio y que puede dar lugar a complicaciones en el posterior análisis. Además en algunas ocasiones es muy complicado preparar una muestra blanca artificial que simule bien la matriz analizada (Bletsou et al., 2013).

Por otro lado en el análisis de los compuestos volátiles suelen aparecer problemas relacionados con la gran cantidad de familias diferentes de compuestos, lo que dificulta su análisis.

Otro problema muy frecuente en el análisis de estos compuestos es que a menudo se encuentran a muy baja concentración, lo que dificulta mucho su determinación y provoca que sea necesaria una etapa de pre-concentración.

En el caso concreto de los compuestos volátiles que se encuentran en alimentos o en extractos naturales se ha detectado que no existe una correlación directa entre el aroma y la concentración de los distintos compuestos volátiles, pues el umbral de detección es muy variable.

Por último, puede producirse la formación de artefactos, lo que hay que evitar a toda costa, pues pueden dar lugar a resultados erróneos, ya que esto, puede producir fallos en la cuantificación y falsos positivos.

2.2 Preparación de muestras para el análisis de compuestos volátiles

La preparación de la muestras es uno de los pasos más importantes en la cadena de análisis de compuestos volátiles, por ello esta etapa puede ocupar entre el 60% y el 80% del tiempo de análisis de estos compuestos, del grado de éxito de esta etapa depende factores importantes como la sensibilidad y la especificidad, el coste, la reproducibilidad, la robustez de la técnica y por último la eficacia de recuperación.

La preparación de muestra consiste en obtener un extracto con analitos idealmente libres de otros componentes de la matriz o interferencias incompatibles con el equipo de análisis y a una concentración adecuada para la identificación, la fase más determinante es la extracción que depende de muchos factores:

- a) La naturaleza de la matriz, que es fundamental y depende del origen, estado de agregación, homogeneidad, estabilidad y representatividad.
- b) Las características del analito como su volatilidad, polaridad, reactividad, termoestabilidad y como se encuentra distribuido en la matriz.
- c) La finalidad del análisis que puede ser cualitativo o cuantitativo.
- d) La premura del análisis.

Los métodos de extracción más destacados:

- Los métodos destilativos se basan en las diferencias de las propiedades físico químicas entre el analito a aislar y los componentes de la matriz, la fracción buscada podría ser desde la que se destila, como el remanente. Hay distintos métodos para realizar destilaciones entre los que destacan arrastre en corriente de vapor, hidrodestilación y destilación a presión reducida (Flotron et al., 2003).
- Los métodos extractivos se basan en la diferencia de solubilidad en los disolventes o de su capacidad de adsorción o absorción sobre un

disolvente o un adsorbente. Entre los métodos más destacados están la extracción con fluido supercrítico que tiene un alto coste, la extracción más utilizada hoy en día que es la extracción con disolvente acelerada (Zuloagan et al., 1998) y por último la extracción que supuso una revolución que fue la microextracción en fase sólida que en los últimos años ha sufrido un crecimiento sin paragon sobretodo en análisis de compuestos biológicos, ambientales y forenses.

- Los métodos de espacio de cabeza se dividen en espacio de cabeza dinámico y en espacio de cabeza estático. El espacio de cabeza estático es una técnica que se utiliza para hacer análisis de compuestos que se encuentran en concentraciones altas y que no necesitan una pre-concentración, algunos ejemplos de utilización de esta técnica son la determinación de disolventes residuales en fármacos, análisis de bebidas o cuantificación de trihalometanos en agua potable (Kolb et al, 1996). En el caso de que la concentración de analitos sea muy baja se requiere un aislamiento y un enriquecimiento, para estas muestras el muestreo se suele hacer con la técnica de espacio de cabeza dinámico. La utilización de esta técnica de espacio de cabeza para la extracción de compuestos volátiles tiene sus ventajas desde el punto de vista analítico, debido a que de esta manera podemos eliminar muchas interferencias y aumentar la concentración del analito.

3. OBJETIVOS

El principal objetivo de este trabajo es evaluar las diferentes aplicaciones de la técnica del espacio de cabeza dinámico en el análisis farmacéutico.

Para alcanzar este objetivo será necesario alcanzar varios objetivos parciales:

1. Aportar nociones básicas sobre los compuestos volátiles y la importancia de su análisis.
2. Conocer la problemática del análisis de los compuestos volátiles.
3. Conocer la técnica de espacio de cabeza dinámico.
4. Realizar una amplia revisión bibliográfica sobre las aplicaciones de la técnica, buscando trabajos donde se aprecie la evolución de la técnica a lo largo de los últimos años.

4. METODOLOGÍA

Para la elaboración de la revisión bibliográfica se ha realizado una búsqueda de información en diferentes libros, informes científicos, bases de datos, artículos científicos y otros trabajos publicados como tesis doctorales.

En primer lugar se ha buscado en la base de datos PubMed, artículos en Español para adquirir una primera visión, para ello se realizaron búsquedas utilizando las siguientes palabras claves 'análisis volátiles' 'problemática volátiles' 'compuestos volátiles' y 'volátiles composición'. La información obtenida fue muy útil para obtener una visión global sobre las técnicas utilizadas para el análisis de compuestos volátiles y además con esta búsqueda se pudo obtener información sobre el problema e importancia del análisis de compuestos volátiles en nuestra sociedad.

En segundo lugar se hizo una búsqueda en inglés con el objetivo de obtener trabajos que hablarán concretamente de la técnica que interesa que es el espacio de cabeza dinámico, para ello se utilizaron las siguientes palabras claves 'dynamic DHS' 'volatile organic compounds' y 'DHS volatile', obteniéndose información de cómo y para qué se utiliza la técnica de DHS.

Para la búsqueda de trabajos en los que se recogen aplicaciones de la técnica en la que se basa el trabajo se usó la base de datos Scopus, para ello se utilizaron las siguientes palabras claves 'DHS dynamic volatile' 'DHS dynamic food' 'DHS dynamic drug' 'DHS dynamic environment', con los trabajos encontrados se elaboró la parte de resultados y discusión.

De los artículos encontrados se seleccionaron algunos de ellos basándose en la forma de utilización de la técnica o por su aplicación novedosa, realizándose un resumen en cada una de las áreas.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Espacio de cabeza dinámico

La técnica de espacio de cabeza dinámico que fue introducida por Swinnerton et al. en 1962, se basa en arrastrar los volátiles de la muestra, sometida a una temperatura adecuada, con un gas inerte a un flujo controlado y pasarlo a través de una trampa donde quedan retenidos para ser desorbidos e inyectados en el cromatógrafo para su posterior separación (Figura 1) (Morales et al., 1992). En esta técnica se puede diferenciar entre la técnica de espacio de cabeza dinámico propiamente dicho que se basa en barrer la superficie de la muestra sometida a agitación con el gas inerte y por otro lado la que se conoce como técnica de arrastre y atrape (purgue and trap) que se basa en hacer borbotear gas a través de la muestra y presenta dos variantes, una que se hace en circuito abierto pasando el gas por la muestra y la trampa y otra que se hace en circuito cerrado, en la cual se recicla el gas.

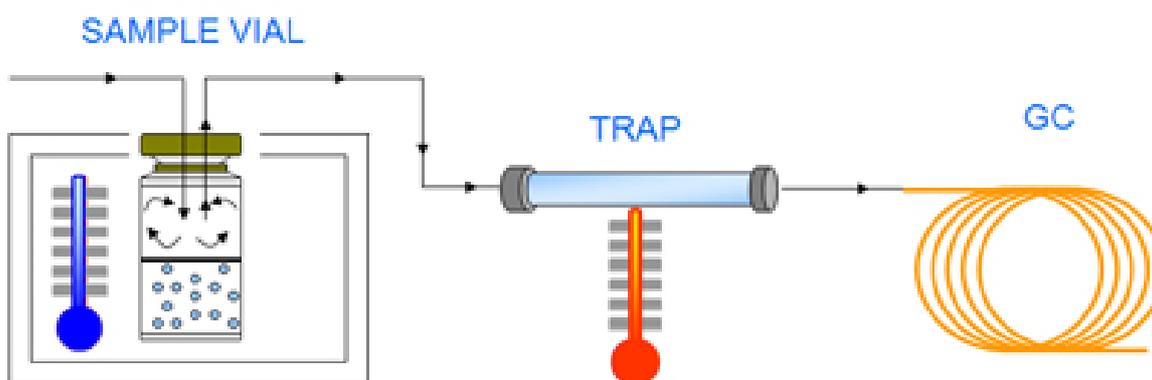


Figura 1. Esquema del funcionamiento de la técnica de espacio de cabeza dinámico.

Los tres factores fundamentales que influyen en el método son temperatura, tiempo y flujo de arrastre. Tanto el tiempo como el flujo de arrastre deben tenerse previstos con anterioridad y no deben ser demasiado bajos, pues, pueden provocar un arrastre defectuoso, ni tampoco deben ser demasiado altos, pues provocar pérdidas de volátiles. La temperatura está determinada por el tipo de compuesto a analizar, si se utiliza temperaturas alrededor de 60°C los volátiles que se obtiene son los que está presentes realmente en la muestra en el momento del análisis. Si por el contrario se usan temperaturas altas de alrededor de 160°C pueden aparecer compuestos volátiles que

provenzan de la degradación térmica de compuestos volátiles, en este último caso las cantidades recuperadas son mayores y el análisis se puede realizar con más facilidad.

En este método suele ser necesaria una concentración debido a que suele haber una cantidad reducida de compuestos volátiles. Esta etapa se realiza mediante el uso de (Morales et al., 1992):

- Las trampas de material adsorbente, constituidas por un tubo de vidrio o acero inoxidable, que contienen en su interior un material adsorbente, así cuando el gas, con compuestos volátiles, pasa pueden retenerse. Existen trampas adsorbentes de distintos materiales:
 - a) Los más utilizados son el carbón activo (Figura 2) y los materiales grafitizados que presentan varias características importantes entre las que destaca que posee una gran superficie específica y alta capacidad de adsorción, por lo que son muy convenientes para desorción de disolventes, sin embargo, no son utilizados en la desorción térmica, debido a que sería necesaria temperaturas muy elevadas para obtener una desorción cuantitativa, porque los compuestos son retenidos muy fuertemente en su superficie (Drozd y Novak, 1979). Otro inconveniente de estas trampas es que presentan alta afinidad por el agua.



Figura 2. Imagen de trampas de carbon activo.

- b) La serie Tenax (Figura 3) presenta un conjunto de ventajas que son muy útiles en la desorción de sustratos a temperaturas de hasta 350° C sin aparición de artefactos, debido a que presentan estabilidad térmica. Este es el polímero más utilizado debido a que se puede utilizar para sustancias con un punto de ebullición medio o alto y además retiene poca cantidad de agua.



Figura 3. Imagen de una trampa de la serie Tenax.

- c) La serie Porapak se caracteriza por tener menor capacidad de adsorción que el carbón activo, pero mayor que el Tenax, además presentan menor estabilidad térmica.
- d) La serie Amberlite tiene un inconveniente que es su baja estabilidad térmica, debido a esto, es utilizada para desorciones con disolventes.
- e) También hay otros materiales adsorbentes, entre los que destacan el Ostion, SP-1 O Spheron.
- Las trampas criogénicas (Figura 4) que están formadas por una columna o tubo capilar que se enfría a temperatura muy baja, para ello normalmente utiliza nitrógeno líquido, de esta forma los compuestos se condensan dentro de la columna, la desorción se realiza con un flujo de gas inerte pasado a una temperatura elevada. Existen diferentes formas de realizar la desorción (Morales et al., 1992):

- a) En la desorción con disolventes se utiliza un disolvente orgánico en una pequeña cantidad, para que así el coeficiente de reparto este a favor del disolvente, es importante que la cantidad de disolvente sea la adecuada, debido a que si se utiliza más disolvente del necesario, obtendríamos los volátiles muy diluidos y si se añade menos disolvente del adecuado se podría dar lugar a una desorción incompleta.
- b) La desorción térmica se basa en calentar la trampa a una temperatura elevada y a continuación pasarle gas inerte en sentido contrario del que se realizó la adsorción, esta técnica es muy usada, a pesar de tener inconvenientes, entre los que destaca que la muestra solo puede ser inyectada una sola vez y en una dirección y si hay que repetir la inyección hay que repetir todo el proceso.



Figura 4. Imagen de una trampa criogénica.

5.2 Aplicaciones

Las aplicaciones de la técnica de espacio de cabeza dinámico en el análisis farmacéutico son muy numerosas y se aplican a diversos compuestos volátiles, dentro de las distintas áreas destacamos:

5.2.1 Aplicaciones del espacio de cabeza dinámico en alimentos

Se ha llevado a cabo una recopilación de algunos artículos experimentales sobre las aplicaciones de la técnicas de espacio de cabeza dinámico relacionada con los alimentos,

con ellos se ha realizado una tabla (Tabla 1), para evidenciar el desarrollo de esta técnica a lo largo de los últimos años.

Tabla 1. Relación de diferentes trabajos experimentales donde se ha usado la técnica de espacio de cabeza dinámica (DHS) relacionada con los alimentos.

Muestra	Analitos	Preparación de muestra	Técnica	Aplicación	Referencia
Aceite de oliva virgen de distintas variedades	Hexanal, E-2-hexenal, Z-3-hexenal, acetato de hexilo, acetato de 3-hexenilo, E-2-hexenol, etc.	DHS, trampa Tenax TA, desorción térmica con reatrape criogénico (Chrompack)	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Desarrollo de un método analítico para caracterizar los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen	Morales et al., 1994
Oleoresina del pimentón	1,3 dimetilbenceno, tetrametilpirazina, geranilacetona, β ciclocitral, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción con disolvente (hexano)	Cromatografía de gases de alta resolución-espectrometría de masas	Evaluar la calidad de la oleoresina del pimentón africano	Guadayol et al., 1997
Tapones de corcho para el vino	Ácido acético, decanal, terpenos, etc.	DHS, trampa capilar Supelco, desorción cehrompack	Espectrometría de masas	Análisis rápido de la calidad de los tapones de corcho	Boudaoud y Eveleigh, 2003
Aceite de oliva virgen	Ácido acético, hexanal, hexanol, guayacol, etc.	DHS, con trampa Tenax y Carbotrap 300, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Determinación rápida de los compuestos volátiles relacionados con la calidad del aceite de oliva virgen	Kanavouras et al., 2005
Aceites de oliva virgen de distintos países	Butan2-ona, acetato de butilo, etanol, etil benceno, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases	Clasificación de los aceites de olivas vírgenes analizados	Luna et al., 2006
Salchichas italianas de distinto origen	3 metilbutanal, 6 canfeno, disulfuro de metilo, etc.	DHS con trampa Tenax TA, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Caracterizar distintos tipos de salchichas italianas	Bianchi et al., 2007

Aceite de fritura	Undecanal, decanal, etc.	DHS, Tekmar instruments	Cromatografía de gases	Determinar la calidad del aceite después de varias frituras	Romano et al., 2009
Tomate enlatado expuesto a contaminación microbiana	Etanol, 3 metil 1 butanol, sulfuro de dimetilo, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Relación de los cambios organolépticos con riesgo para la salud	Concina et al., 2009
Lomo de distintos corderos, alimentados con distintas dietas, asado	2 metilbutanal, hexanal, octanal, etc.	DHS, trampa Lichrolut EN,	Cromatografía de gases	Relación del sabor de la carne con la dieta del animal	Resconi et al., 2010
Aceite de oliva, palma y girasol de fritura	2,4 E,E decadienal, n butil pirrol, etc.	DHS, tekmar instruments	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Determinar la calidad de los distintos aceites de fritura	Romano et al., 2012
Distintas emulsiones de fosfolípidos marinos	3 metil 2 pentanal, benzaldheido, piridina, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases	Determinar la calidad de las distintas emulsiones dependiendo del origen	Lu et al., 2012
Extractos de pasta	3 metilbutanal, 2,3 butadiona, ácido acético, éter etílico, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases, oftalmometría, espectrometría de masas	Caracterizar los distintos tipos de pastas que proceden de levaduras	Lin et al., 2014
Café elaborado	Furano, metilfurano, pentanol, furfunal, cumarina.	3 DHS, trampa Tenax, trampa Shincarbon X, Carbotrap B y Carbotrap X, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Caracterizar los distintos compuestos volátiles que influyen en el olor del café elaborado	Ochiai et al., 2014
Aceite de algas	Hexanal, 2-decanal, ácido fórmico, ácido acético, etc.	DHS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Determinar los compuestos que provocan un sabor desagradable en el aceite.	Chen et al., 2016

Extractos de algas pardas de Islandia	Tocoferol, fenoles, acetona, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Determinar la modificación de los extractos de algas al añadirle una emulsión	Karadag et al., 2017
--	-----------------------------------	--------------------------------------	--	---	----------------------

Como se puede observar en la Tabla 1, la técnica de espacio de cabeza dinámico es muy utilizada acoplada con la cromatografía de gases debido a los buenos resultados que dan estas técnicas cuando se usan acopladas. Por otro lado se puede apreciar que dentro de la técnica, es más frecuente el uso de la trampa de Tenax, utilizando desorción térmica, esto se explica debido a la estabilidad térmica de la trampa y a que no producen artefactos durante la desorción. Por último se puede observar que los compuestos volátiles de interés en los alimentos son de una naturaleza muy variada, desde aldehídos hasta terpenos, lo que indica lo complejo que es el análisis de estos compuestos.

Para comprender mejor la aplicación de la técnica de espacio de cabeza dinámico, se ha resumido uno de los trabajos, que utiliza esta técnica de una manera muy peculiar pues acopla tres análisis de espacio de cabeza individualizados.

En este trabajo se analizan los compuestos volátiles presentes en café elaborado (Ochiai et al., 2014), con el fin de determinar los compuestos responsables del aroma de este producto.

En el trabajo se usó una secuencia de espacios de cabeza dinámicos, para comenzar el análisis, a continuación se realizó una desorción térmica y se analizaron los compuestos por cromatografía de gases y espectrometría de masas.

En primer lugar se transfirió un vial de espacio de cabeza con muestra acuosa a 10°C a un módulo de espacio de cabeza dinámico a 25 °C, donde se incubó durante 5 min, a continuación se hizo una primera purga con 150 ml de gas nitrógeno con un caudal de 50 ml/min y se atraparon a 30°C en la primera trampa que estaba formada por Shincarbon X, Carbotrap B y Carbotrap X, posteriormente se transportó la trampa a una malla para almacenarla y hacer la desorción. En segundo lugar se hizo una segunda purga con 650 ml de gas nitrógeno y se atraparon los volátiles en una segunda trampa

de la misma composición que la primera y esto se almacena en la malla. Por último se realizó una tercera purga para la que se utilizó una trampa de Tenax TA y se elevó la temperatura del vial a 80°C, utilizándose para la purga 3L de gas nitrógeno con un caudal de 100 ml/min, esta también se llevó a la malla para hacer la desorción (Figura 5).

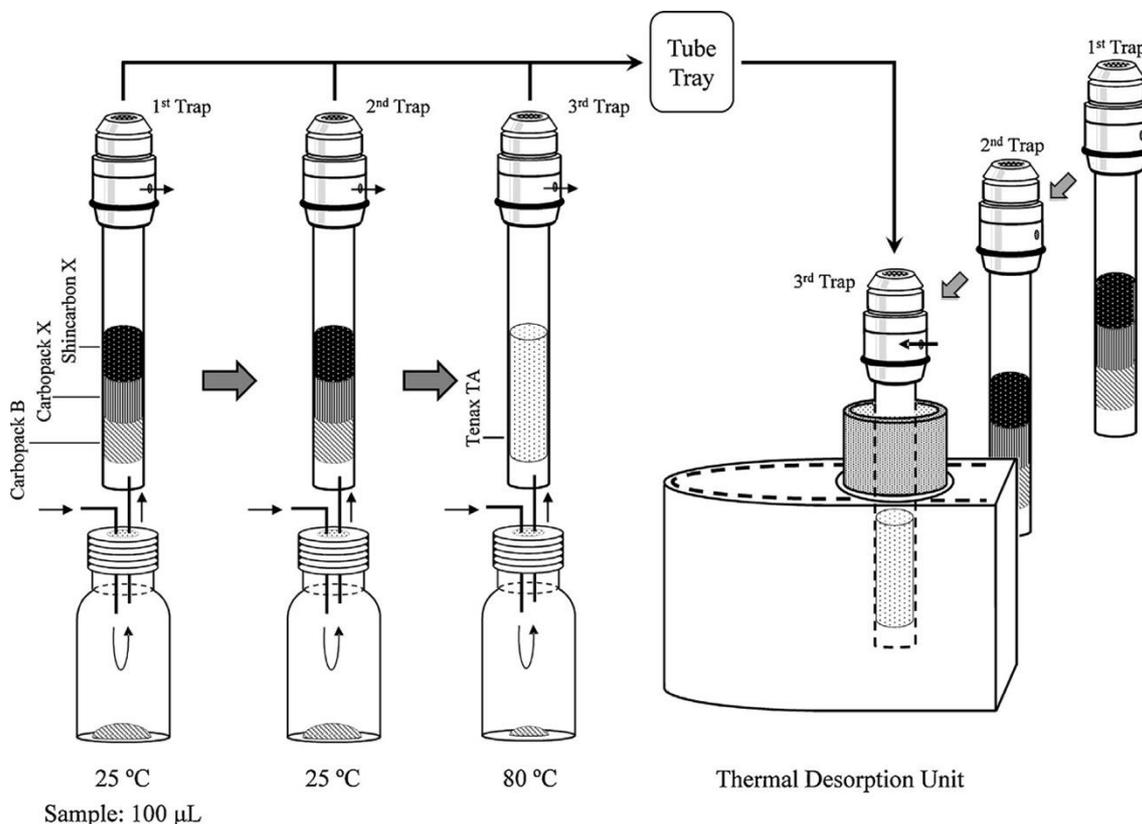


Figura 5. Esquema del proceso de espacio de cabeza dinámico utilizado en el trabajo.

La desorción térmica fue desde los 30°C a los 720°C utilizando un flujo de desorción de 50 ml/min durante 3 min. Se utilizaron dos procedimientos diferentes de desorción térmica. En el primero los compuestos son desorbidos en orden inverso al muestreo DHS en una desorción térmica múltiple. En la segunda se realizó una desorción térmica individual de cada trampa analizándose mediante cromatografía de gases y espectrómetro de masas.

En este trabajo se puede apreciar que se usan dos técnicas de espacio de cabeza dinámico simple utilizando una trampa de carbono para ello, y se hizo un espacio de cabeza dinámico de evaporación completa con el fin de obtener la máxima información de compuestos volátiles en la muestra, pues la recuperación en el caso de

la primera trampa es de un 95% en compuestos como acetaldehído, furano o metilfurano, en el caso de la segunda trampa se mejoró la recuperación de los siguientes compuestos: butanal 2,3-butanodiona, pentanal, pirrol 1-hexanol y damascenona. Pero con la última trampa se mejoraron los resultados de otros compuestos como el 2,5-dimetil pirazina, furfural, guayacol, cumarina, decanoato de etilo. Por todo esto se realiza el análisis de volátiles por multimétodos, debido a que en el aroma del café están implicados muchos compuestos volátiles de distintas naturalezas y con un único método es muy complicado determinarlos todos.

5.2.2 Aplicaciones del espacio de cabeza dinámico en medioambiente

Se ha realizado una relación de artículos experimentales relacionados con la técnica de interés y el medio ambiente (Tabla 2), con el fin de observar el desarrollo de la técnica en los últimos años.

Tabla 2. Relación de artículos experimentales donde se ha usado la técnica de espacio de cabeza dinámico (DHS) relacionada con el medio ambiente.

Muestra	Analitos	Preparación de Muestra	Técnica	Aplicación	Referencia
Aire de salas limpias	Siloxanos, ftalatos, fosfatos, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Evaluar la calidad y las impurezas del aire de una sala limpia	Fujimoto et al., 1997
Agua potable y agua residual	Éter metil terc-butílico	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Espectrometría de movilidad iónica	Evaluar la presencia de este aditivo de la gasolina en la muestra	Pozzi et al., 2004
Productos tipo aerosol con uso domestico	Linalol, 1-butanol, etanol, xileno, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrometría de masas	Evaluar la formación de compuestos volátiles que produzcan una contaminación del aire y perjudique a la salud humana	Tanaka-kagawa et al., 2008
Humo del tabaco	Compuestos azufrados, nitrilos, nitratos, etc.	DHS, trampa Tenax,	Cromatografía de gases	Evaluar la composición de compuestos	Brokl et al, 2013

		desorción térmica		volátiles en el humo del tabaco	
Caucho neumático después de la recuperación	Dióxido de azufre, acetona, butanona, benceno, etc.	DHS, desorción térmica,	Cromatografía de gases- espectrometría de masas	Evaluar la formación de nuevos compuestos orgánicos volátiles durante la extrusión	Gagol et al., 2015
Extractos de la producción de asfalto de petróleo	Acetaldehído, propionaldehído, acrilato de metilo, acetato de etilo, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases- espectrometría de masas	Evaluar el lodo activado utilizado en el tratamiento de aguas residuales de refinería	Boczka et al., 2016

Como se puede observar en la Tabla 2, la técnica de espacio de cabeza dinámico en el caso del medio ambiente no es tan utilizada como en otras ramas del análisis farmacéutico. Además al igual que en las aplicaciones de los alimentos, la trampa más utilizada es la trampa de Tenax, junto con la desorción térmica. Por último, los compuestos volátiles con interés para el estudio en el medio ambiente son muy diferentes al resto de los compuestos de interés en otras aplicaciones, esto se debe a que en el análisis del medio ambiente se buscan contaminantes.

Se ha resumido uno de los trabajos sobre la aplicación de la técnica de espacio de cabeza dinámico relacionada con el medio ambiente, que presenta la característica de ser un análisis sobre uno de los contaminantes volátiles más cotidianos para la salud humana, con el fin de entender mejor la aplicación.

En el trabajo se ha analizado el humo del tabaco (Brokl et al, 2013) con el objetivo de determinar la composición en compuestos volátiles de este contaminante, para ello se utilizó una máquina de fumar rotativa que reproduce las condiciones de fumar, la muestra se recogió con almohadillas de fibra de vidrio Cambridge de 44 mm, estas muestras se almacenaron durante 10 min a 60° C, para posteriormente introducir las en una trampa Tenax TA, con un volumen de nitrógeno líquido de 150 ml con un flujo de purga de 25 ml/min, el tubo se desorbió térmicamente con una desorción térmica desde

30°C a 280°C, los compuestos desorbidos fueron tratados a -20°C con nitrógeno líquido, para después calentarlo hasta 280°C a una velocidad de 12°C/min, los analitos, se transfirieron a la cromatografía de gases con una relación de separación de 1:10.

Posteriormente se analizaron utilizando cromatografía de gases donde se obtuvieron sobre 7000 compuestos volátiles diferentes (Tabla 4) lo que demuestra la buena eficacia de la técnica.

Tabla 3. Relación de compuestos identificados por la técnica de espacio de cabeza dinámico agrupados por número de ellos identificados.

Clase de compuestos	Número total de volátiles identificados
Alcanos	70
Alquenos	122
Alquinos	31
Hidrocarburos alicíclicos	170
Aromáticos monocíclicos	122
Alcoholes	300
Aldehídos	101
Cetonas	385
Ácidos carboxílicos	70
Aminoácidos	13
Ésteres	206
Éteres	215
Nitrilos	96
Amidas	48
Aminas acíclicas	86
Imidas	28
Nitrofenoles	14
Oxazolinas y ozaxinas	17
Compuestos derivados del azufre	98
Compuestos halogenados	139

Observando la Tabla 3 se puede apreciar el gran número de compuestos volátiles identificados en el humo del tabaco y a diferencia de los otros trabajos analizados se destaca que entre los compuestos identificados no hay compuestos de naturaleza terpénica. Por otro lado, se puede apreciar como aparecen en el humo del tabaco un gran número de sustancias contaminantes del medio ambiente como los compuestos

derivados del azufre o los nitrilos, lo que permite observar la contaminación que existe por parte de un simple cigarro.

5.2.3 Otras aplicaciones del espacio de cabeza dinámico relacionado con el análisis farmacéutico

Se han agrupado las aplicaciones no relacionadas con los alimentos ni el medio ambiente (Tabla 4) con el fin de evaluar el desarrollo de esta técnica en otros campos en los últimos años.

Tabla 4. Relación de artículos experimentales donde se ha usado la técnica de espacio de cabeza dinámico (DHS).

Muestra	Analito	Preparación de muestra	Técnica	Aplicación	Referencia
Flores de gardenia fresca	Lanolol, farneseno, cis 3 hexeniltiglato, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción con disolvente (éter)	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Análisis rápido de los compuestos volátiles existentes en la flor de gardenia fresca	Liu y Gao, 2000
Corteza de taheboo	4 metoxi-benzaldhido, metoxifenol, 1,6 octadienol, etc.	DHS, trampa Tenax y desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Caracterizar los compuestos volátiles presentes en el taheboo	Park et al., 2004
Parches de sudor en región para-axilar y del pezón de la madre durante el embarazo y después del parto	1 dodecanol, isocurmerol, miristato de isopropilo, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Evaluar la importancia de los compuestos volátiles en la comunicación olfativa entre la madre y el hijo	Vaglio, 2010
Orina humana	Metanotiol, disulfuro de dimetilo, acetona, vitispirano, mentol, etc.	DHS, trampa de carboxil-polimetil-siloxano, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Evaluar el potencial de estos metabolitos en el diagnóstico temprano del cáncer	Silva et al., 2011

Extractos de propóleos de distintas regiones de China	Ácido acético, eucaliptol, D limoneno, etanol, etc.	DHS, trampa Tenax, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas y olfatometría	Diferenciar el propóleo de distintas regiones de China	Cheng et al., 2013
Aceites esenciales y extractos de espacios del género <i>Thymus</i>	β pineno, sabineno, canfeno, limoneno, etc.	DHS, DANI Instrumens, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Clasificar las distintas especies por su olor y flavor	Teixeira y Rodrigues, 2014
Extracto de 4 plantas aromáticas (salvia, lavanda, romero y cardamomo)	α pineno, canfeno, limoneno, eucaliptol, etc.	DHS, Tenax TA, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Cuantificar los monoterpenos en plantas aromáticas	Omar et al., 2016
Extracto de la fragancia <i>O. majorana</i>	Sabineno, mirceno, limoneno, etc.	DHS, DANI Instruments, desorción térmica	Cromatografía de gases-espectrofotometría de masas	Evaluar los perfiles de liberación y olor con el tiempo	Costa et al., 2016
Extracto de la flores de distintas especies del género <i>Passiflora</i>	Citronelal, citronelol, benzaldehído, octano, etc.	DHS, trampa Porapak Q, desorción con disolvente (Hexano y acetato de etilo)	Cromatografía de gases	Caracterizar los compuestos volátiles involucrados en el olor de las distintas especies del género <i>Passiflora</i>	Montero et al., 2016

Como se observa en la Tabla 4, la técnica de espacio de cabeza dinámico tiene mucha utilidad en otros ámbitos del análisis farmacéuticos, desde el diagnóstico de algunas enfermedades como el cáncer, hasta el análisis botánico para diferenciar entre distintas especies de un mismo género. Cabe destacar que al igual que en los casos anteriores la trampa más usada es la trampa de Tenax, junto con desorción térmica. Por último en estas aplicaciones vemos la variedad en la naturaleza de los compuestos volátiles de interés en el análisis.

Para entender mejor la aplicación de la técnica de espacio de cabeza dinámico en relación con el análisis farmacéutico, se ha resumido de entre todos los trabajos, un trabajo experimental, que cuenta con la peculiaridad de que usa una trampa y una técnica de desorción distinta al resto de trabajos,

El trabajo es sobre el análisis del extracto de especies del género *Passiflora*, que se han cultivado en Brasil (Montero et al., 2016), con el fin de describir su composición química y olfativa.

El extracto de cada especie se recogió usando la técnica de espacio de cabeza dinámico, usando para ello trampas de vidrio con un diámetro externo de 6 mm y un diámetro interno de 3 mm con una longitud de 1500 mm, dentro de ellas había un adsorbente denominado Porapak Q. Antes de realizar el muestreo las trampas se habían lavado con 10 ml de etanol, 10 ml de diclorometano y 10 ml de hexano y se guardaron a 170º C, en un horno, durante 8 horas.

A continuación, una flor de la especie de interés fue introducida en un embudo de vidrio cubierto con una bolsa de polivinilo y los compuestos volátiles de la planta fueron capturados durante 1 hora a través de la planta, usando una bomba de vacío portátil, posteriormente se hizo la desorción utilizando una mezcla de disolventes formada por hexano y acetato de etilo a partes iguales, se recogieron los disolventes y se almacenaron en un congelador para su posterior análisis a través de una cromatografía de gases, se hizo lo mismo para las distintas especies de plantas.

Se obtuvieron unos resultados que permitieron diferenciar las especies por sus compuestos volátiles. Los compuestos volátiles encontrados (Tabla 5) se podrían agrupar según su naturaleza en: compuestos alifáticos, bencenoides y fenilpropanoides, y monoterpenos.

Tabla 5. Agrupación de compuestos volátiles detectados en orden de mayor a menor concentración en las flores de distintas especies de *Passiflora*.

Compuestos alifáticos	Bencenoides y fenilpropanoides	Monoterpenos
2 metil 3 pentanona	Benzaldheído	Mirceno
Heptano	Alcohol bencilico	Limoneno
Metil isobutil cetona	Fenil etil alcohol	Eucaliptol
2,5 dimetil-1,2-hexano	4 etil benzaldeheido	Cis-oscimeno
Acetato de isobutilo	1,4-dimetoxibenceno	Trans-oscimeno
Acetato de alilo	3,4- dimetilacetofenona	Linalol
2 hexanona	Trans-metil cinamato	citronelal
Octano	1,3,5-trimetoxi-benceno	Nerol
3-hexil-hidroperoxido	Benzoato de prenilo	Citronelol
3-penten-2-ol	Benciltiglato	Iso-geraniol
Acetato de butilo	4-metil-2,6-di-tert-butilfenol	Geraniol
4-metil-octano	2-feniletiltiglato	Geranial
Decano	-	Metil geraniato
2,4-dimetil-decano	-	-
Undecano	-	-

Se puede observar en la Tabla 5 que por esta técnica de espacio de cabeza dinámico se pueden detectar compuestos de distinta naturaleza, desde compuestos alifáticos hasta terpenos. Lo que demuestra la importancia de estos compuestos en el olor y en las propiedades de las plantas de la especie analizada, ya que se utiliza en la industria farmacéutico como relajante y es muy utilizada como un remedio natural frente al insomnio.

6. CONCLUSIONES

1. Los compuestos volátiles son muy importantes en el análisis farmacéutico entre otras cosas por su influencia en el olor y flavor de los alimentos, por su presencia como contaminantes del medio ambiente y por su uso en pruebas diagnósticas de algunas enfermedades.
2. El análisis de estos compuestos es complejo debido a varios factores como son:
 - A. La aparición de sustancias contaminantes.
 - B. La baja concentración a la que se encuentran estos compuestos.
 - C. La formación de artefactos.
 - D. La variedad de familias de compuestos volátiles que pueden aparecer en una muestra.
3. La técnica de espacio de cabeza dinámico es compleja, pero muy útil para el análisis de compuestos volátiles debido a que soluciona los problemas más comunes en el análisis de estos.
4. Las aplicaciones de la técnica de espacio de cabeza dinámico en el análisis farmacéutico son muy variadas y han ido evolucionando a lo largo de los últimos años, en los primeros años se usaba desorción con disolvente, mientras que en los últimos años en la mayoría de los casos se usa desorción térmica .

7. BIBLIOGRAFÍA

Atkinson R, Baulch DL, Cox RA, Hampson Jr. RF, Kerr JA, Rossi MJ, et al. Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: Supplement VI: IUPAC subcommittee on gas kinetic data evaluation for atmospheric chemistry. *J Phys Chem.* 1997; 26(6): 1329-1499.

Bianchi F, Cantoni C, Careri M, Chiesa L, Musci M, Pinna A. Characterization of the aromatic profile for the authentication and differentiation of typical Italian dry-sausages. *Talanta.* 2007; 72(4): 1552-1563.

Bletsou AA, Hanafi AH, Dasenaki ME, Thomaidis NS. Development of Specific LC-ESI-MS/MS Methods to Determine Bifenthrin, Lufenuron, and Iprodione Residue Levels in Green Beans, Peas, and Chili Peppers Under Egyptian Field Conditions. *Food Anal Methods.* 2013; 6(4): 1099-1112

Boczkaj G, Makoś P, Przyjazny A. Application of dynamic headspace and gas chromatography coupled to mass spectrometry (DHS-GC-MS) for the determination of oxygenated volatile organic compounds in refinery effluents. *Anal Methods.* 2016; 8(17): 3570-3577.

Boudaoud N, Eveleigh L. A new approach to the characterization of volatile signatures of cork wine stoppers. *J Agric Food Chem.* 2003; 51(6): 1530-1533.

Brokl M, Bishop L, Wright CG, Liu C, McAdam K, Focant J-. Analysis of mainstream tobacco smoke particulate phase using comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2013; 36(6): 1037-1044.

Chen X-, Chen Y-, Wang J-, Guo J, Yin S-, Yang X-. Phytosterol structured algae oil nanoemulsions and powders: Improving antioxidant and flavor properties. *Food Funct.* 2016; 7(9): 3694-3702.

Cheng H, Qin ZH, Guo XF, Hu XS, Wu JH. Geographical origin identification of propolis using GC-MS and electronic nose combined with principal component analysis. *Food Res Int.* 2013; 51(2): 813-822.

Compañó R, Ríos A. Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Madrid: Editorial Síntesis, S.A.; 2002.

Concina I, Falasconi M, Gobbi E, Bianchi F, Musci M, Mattarozzi M, et al. Early detection of microbial contamination in processed tomatoes by electronic nose. *Food Control*. 2009; 20(10): 873-880.

Costa P, Velasco CV, Loureiro JM, Rodrigues AE. Effect of cosmetic matrices on the release and odour profiles of the supercritical CO₂ extract of *Origanum majorana* L. *Int J Cosmet Sci*. 2016; 38(4): 364-374.

Derwent RG, Jenkin ME, Saunders SM. Photochemical ozone creation potentials for a large number of reactive hydrocarbons under European conditions. *Atmos Environ*. 1996; 30(2): 181-199.

Drozd J, Novák J. Headspace gas analysis by gas chromatography. *J Chromatogr A*. 1979; 165(2): 141-165.

Flotron V, Houessou J, Bosio A, Delteil C, Bermond A, Camel V. Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using microwave-assisted solvent extraction: Comparison with other extraction methods. *J Chromatogr A*. 2003; 999(1-2): 175-184.

Fujimoto T, Takeda K, Nonaka T, Taira T, Sado, M. Evaluation of contaminants in cleanroom atmosphere and on silicon wafer surface (II) organic compounds contaminants. *Conference Proceedings - Annual Semiconductor Pure Water and Chemicals Conference*. Santa Clara, CA, USA; 1997; 2: 157-166.

Gągol M, Boczkaj G, Haponiuk J, Formela K. Investigation of volatile low molecular weight compounds formed during continuous reclaiming of ground tire rubber. *Polym Degradation Stab*. 2015; 119: 113-120.

Guadayol JM, Baquero T, Caixach J. Application of headspace techniques to the extraction of volatile organic compounds from paprika oleoresin. *Grasas Aceites*. 1997; 48(1): 1-5.

Guenther A. A global model of natural volatile organic compound emissions. *Journal of Geophysical Research*. 1995; 100(D5): 8873-8892.

Ho KF, Lee SC. Identification of atmospheric volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and carbonyl compounds in Hong Kong. *Sci Total Environ*. 2002; 289(1-3): 145-158.

Kanavouras A, Kiritsakis A, Hernandez RJ. Comparative study on volatile analysis of extra virgin olive oil by dynamic headspace and solid phase micro-extraction. *Food Chem*. 2005; 90(1-2): 69-79.

Karadağ A, Hermund DB, Jensen LHS, Andersen U, Jónsdóttir R, Kristinsson HG, et al. Oxidative stability and microstructure of 5% fish-oil-enriched granola bars added natural antioxidants derived from brown alga *Fucus vesiculosus*. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2017; 119(4).

Kierkegaard A, McLachlan MS. Determination of linear and cyclic volatile methylsiloxanes in air at a regional background site in Sweden. *Atmos Environ*. 2013; 80: 322-329.

Kolb B, Zwick G, Auer M. A Water Trap for Static Cryo-Headspace Gas Chromatography. *HRC J High Resol Chromatogr*. 1996; 19(1) :37-42.

Krupa SV, Manning WJ. Atmospheric ozone: Formation and effects on vegetation. *Environ Pollut*. 1988; 50(1-2): 101-137.

Lin M, Liu X, Xu Q, Song H, Li P, Yao J. Aroma-active components of yeast extract pastes with a basic and characteristic meaty flavour. *J Sci Food Agric*. 2014; 94(5): 882-889.

Liu BZ, Gao Y. Analysis of headspace constituents of Gardenia flower by GC/MS with solid-phase microextraction and dynamic headspace sampling. *Se Pu*. 2000; 18(5): 452-455.

Lu FSH, Nielsen NS, Baron CP, Jacobsen C. Oxidative degradation and non-enzymatic browning due to the interaction between oxidised lipids and primary amine groups in different marine PL emulsions. *Food Chem*. 2012; 135(4): 2887-2896.

Luna G, Morales MT, Aparicio R. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chem.* 2006; 98(2): 243-252.

Montero DAV, Marques MOM, Meletti LMM, Van Kampen MH, Polozzi SC. Floral scent of brazilian Passiflora: Five species analysed by dynamic headspace. *Anais Acad Bras Cienc.* 2016; 88(3): 1191-1200.

Morales MT, Aparicio R, Gutierrez F. Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles de aceites vegetales. *Grasas Aceites.* 1992; 43: 164-173.

Morales MT, Aparicio R, Rios JJ. Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volatiles in virgin olive oil. *J Chromatogr A.* 1994; 668: 455-462.

Mucke H-. Ambient air quality programmes for health impact assessment in the WHO European region. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2000; 51(2): 257-264.

Ochiai N, Tsunokawa J, Sasamoto K, Hoffmann A. Multi-volatile method for aroma analysis using sequential dynamic headspace sampling with an application to brewed coffee. *J Chromatogr A.* 2014; 1371: 65-73.

Omar J, Olivares M, Alonso I, Vallejo A, Aizpurua-Olaizola O, Etxebarria N. Quantitative Analysis of Bioactive Compounds from Aromatic Plants by Means of Dynamic Headspace Extraction and Multiple Headspace Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J Food Sci.* 2016; 81(4): C867-C873.

Park B-, Lee K-, Takeoka GR. Comparison of three sample preparation methods on the recovery of volatiles from taheebo (*Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC). *Flavour Fragrance J.* 2004; 19(4): 287-292.

Pozzi R, Pinelli F, Bocchini P, Galletti GC. Rapid determination of methyl tert-butyl ether using dynamic headspace/ion mobility spectrometry. *Anal Chim Acta.* 2004; 504(2): 313-317.

Resconi VC, Campo MM, Montossi F, Ferreira V, Sañudo C, Escudero A. Relationship between odour-active compounds and flavour perception in meat from lambs fed different diets. *Meat Sci.* 2010; 85(4): 700-706.

Romano R, Giordano A, Paduano A, Sacchi R, Musso SS. Evaluation of frying oil subjected to prolonged thermal treatment: Volatile Organic Compounds (VOC) analysis by DHS-HRGC-MS and ¹H-NMR spectroscopy. *Chem Eng Trans.* 2009; 17: 873-878.

Romano R, Le Grottaglie L, Manzo N, Giordano A, Vitiello S, Santini A. Comparison of frying performance of olive oil, bifractionated palm oil and sunflower oil. *Prog Nutr.* 2012; 14(3): 199-218.

Schilling B, Kaiser R, Natsch A, Gautschi M. Investigation of odors in the fragrance industry. *Chemoecology.* 2010; 20(2): 135-147.

Silva CL, Passos M, Cmara JS. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br J Cancer.* 2011; 105(12): 1894-1904.

Sparham C, Van Egmond R, O'Connor S, Hastie C, Whelan M, Kanda R, et al. Determination of decamethylcyclopentasiloxane in river water and final effluent by headspace gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2008; 1212(1-2): 124-129.

Steenhuisen S-, Raguso RA, Johnson SD. Floral scent in bird- and beetle-pollinated Protea species (Proteaceae): Chemistry, emission rates and function. *Phytochemistry.* 2012; 84: 78-87.

Swinerton JW, Linnenbom VJ, Cheek CH. Determination of dissolved gases in aqueous solutions by gas chromatography. *Anal Chem.* 1962; 34(4): 483-485.

Tanaka-Kagawa T, Jinno H, Obama T, Nishimura T, Tokunaga H. Volatile organic compounds emitted from spray-type household products. *Bull Natl Inst Health Sci.* 2008; (126): 88-92.

Teixeira MA, Rodrigues AE. Coupled extraction and dynamic headspace techniques for the characterization of essential oil and aroma fingerprint of *Thymus* species. *Ind Eng Chem Res.* 2014; 53(23): 9875-9882.

Vaglio S. Volatile signals during pregnancy. *Vitam Horm.* 2010; 83(C): 289-304.

Valcárcel M. *Principios de Química Analítica*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, S.A.; 1999.

Zuloaga O, Etxebarria N, Fernández LA, Madariaga JM. Comparison of accelerated solvent extraction with microwave-assisted extraction and Soxhlet for the extraction of chlorinated biphenyls in soil samples. *TrAC Trends Anal Chem.* 1998; 17(10): 642-647.