



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE QUÍMICA

Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de formaldehído, acetaldehído y acroleína presentes en líquidos rellenables de cigarrillos electrónicos mediante HPLC-UV.

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

### QUIMICA

PRESENTA

**ANA KAREN NUÑEZ GARCÍA**

CIUDAD DE MÉXICO

2023





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Méndez Stivalet José Manuel

**VOCAL:** Profesor: García Carrillo Mario Alfredo

**SECRETARIO:** Profesor: Tapia Mendoza Everardo

**1er. SUPLENTE:** Profesor: Rosales César Miguel Ángel

**2° SUPLENTE:** Profesor: Ocaña Ríos Irán

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Laboratorio Nacional de Ciencias para la Investigación y Conservación del Patrimonio Cultural (LANCIC), Instituto de Química (IQ), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

**ASESOR DEL TEMA:**

---

M. en C. Everardo Tapia Mendoza

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

---

Q. Emilio Iturbe Nava

**SUSTENTANTE:**

---

Ana Karen Nuñez García

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Nacional Autónoma de México por su compromiso inquebrantable con la educación de calidad y la formación integral de sus estudiantes. Estudiar en la UNAM ha sido un honor y privilegio que ha transformado mi vida de maneras inimaginables.

Asimismo, deseo agradecer a la Facultad de Química por ofrecerme un entorno de aprendizaje enriquecedor y por contar con profesores dedicados y apasionados que me han inspirado y guiado a lo largo de mi carrera.

Además, al Instituto de Química por brindarme la oportunidad de llevar a cabo mi proyecto de tesis en sus instalaciones. El apoyo y los recursos que me proporcionaron fueron fundamentales para llevar a cabo mi investigación de manera exitosa.

No puedo dejar de mencionar el impacto positivo que las becas han tenido en mi trayectoria universitaria. Agradezco profundamente a la UNAM por su generosidad y apoyo constante.

Mi más sincero agradecimiento a la M. en C. Mayra León Santiago, el Q. Emilio Iturbe Nava y a la Dra. Marisol Reyes Lezama. Su conocimiento, apoyo inquebrantable y paciencia han sido fundamentales en mi proyecto de investigación y desarrollo académico. Sus orientaciones y consejos han sido un faro en mi camino hacia el éxito académico.

Y especialmente a mi asesor de tesis el M. en C. Everardo Tapia Mendoza, quien desempeño un papel fundamental en mi desarrollo como química y contribuyo significativamente a mi crecimiento personal. Su invaluable contribución a mi proyecto de tesis ha sido fundamental para mi éxito profesional.

Al M. en C. José Manuel Méndez Stivalet y al M. en C. Mario Alfredo García Carrillo, por su tiempo y dedicación. Sus contribuciones han sido elementales para el éxito de este proyecto.

Este documento se basa en datos provenientes del proyecto "Monitoreo del contenido de cigarros electrónicos: evidencia para apoyar su adecuada regulación", que fue posible gracias a la subvención (MEX-28-01) administrada por la Unión Internacional Contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias (The Union) y financiada por Bloomberg Philanthropies. El contenido de este estudio es responsabilidad de los autores y bajo ningún caso refleja el punto de vista de The Union o de Bloomberg Philanthropies.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mi familia, a mi mamá y especialmente a mi padre, Luis Manuel, que le agradezco de corazón por enseñarme a abordar cada desafío con amor, paciencia y compromiso en todo momento. Este logro está dedicado especialmente a ti, porque sin tu apoyo incondicional y amor, este éxito no habría sido posible.

Agradezco de corazón a mis amigos, quienes hicieron más llevadero este arduo camino. En especial, quiero expresar mi profundo agradecimiento a Lis, Roberto, Martín, Neri y Jonathan por su apoyo constante a lo largo de este trayecto. Que nuestra amistad perdure en cada momento de la vida.

A la persona a la que siempre le guardaré un inmenso amor y cariño, Ricardo. Decirte gracias jamás será suficiente para demostrarte cuánto valoro tu apoyo, especialmente en esta última etapa de la carrera. Tu presencia ha sido un regalo invaluable, y cada gesto de amor ha dejado una huella imborrable en mi corazón.

## ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AA	Acetaldehído
AA-DNFH	Acetaldehído-2,4-Dinitrofenilhidracina
ACN	Acetonitrilo
Acr	Acroleína
Acr-DNFH	Acroleína-2,4-Dinitrofenilhidracina
ag	attogrammo
ANOVA	Análisis de varianza
b	Ordenada al origen
CCAYAC	Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura
CDC	<i>Center for Disease Control and Prevention</i>
CG	Cromatografía de gases
CONAVE	Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica
CV	Coefficiente de variación
DNFH	2,4-Dinitrofenilhidracina
ECD	<i>Electron Capture Detector</i>
<i>e-cigs</i>	Cigarrillos electrónicos
<i>e-liquid</i>	Líquidos de vapeo
ENDS	<i>Electronic Nicotine Delivery Systems</i>
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EVALI	<i>E-cigarette or Vaping Associated Lung Injury</i>
FA	Formaldehído

FA-DNFH	Formaldehído-2,4-Dinitrofenilhidracina
fg	femtogramo
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Ácido carbónico
HCl (ac)	Ácido clorhídrico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IC	Intervalo de confianza
ICI	Intervalo de confianza inferior
ICS	Intervalo de confianza inferior superior
INSP	Instituto Nacional de Salud Pública
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
k'	Factor de capacidad
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
m	Pendiente
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Carbonato de sodio
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Sulfito de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio



$\text{NaSO}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Bisulfito de sodio formaldehído.
ng	Nanogramo
PFBHA	o- (2,3,4,5,6 – pentafluorobencil) - hidroxilamina
pg	Picogramo
ppm	Partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno
$R^2$	Coefficiente de determinación
$R_s$	Resolución entre dos picos
s	Desviación estándar muestral
S/N	Relación señal-ruido
t	t de Student
$t_0$	Tiempo muerto
$t_R$	Tiempo de retención
ua	Unidades de absorbancia
US EPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
$\bar{x}$	Promedio
$\alpha$	Selectividad
$\epsilon$	Error
$\epsilon^\circ$	Fuerza elutrópica
$\mu\text{g}$	microgramo
$\lambda$	Longitud de onda

# CONTENIDO

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS .....	5
CAPÍTULO 3: ANTECEDENTES .....	6
3.1 Presencia de formaldehído, acetaldehído y acroleína en los cigarrillos electrónicos.....	6
3.2 Cromatografía .....	7
3.2.1 Cromatografía de líquidos .....	8
3.3 Validación de métodos analíticos.....	15
3.3.1 Parámetros de validación .....	16
3.3.2 Selección de los parámetros de desempeño .....	17
CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA.....	19
4.1 Materiales y equipos .....	19
4.1.1 Reactivos y disolventes .....	19
4.1.2 Preparación de disoluciones.....	19
4.1.3 Equipos.....	22
4.1.4 Instrumentos y aparatos .....	22
4.2 Implementación del método analítico.....	23
4.2.1 Búsqueda del intervalo de trabajo .....	25
4.2.2 Preparación de muestra .....	28
4.3 Validación del método analítico.....	32
4.4 Análisis de muestras comerciales .....	35
CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	36
5.1 Implementación del método analítico.....	36
5.1.1 Búsqueda del intervalo de trabajo .....	42
5.1.2 Preparación de la muestra.....	44
5.2 Validación del método analítico.....	54
5.3 Declaración de validación .....	73
5.4 Análisis de muestras comerciales .....	74

CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES.....	80
CAPÍTULO 7: REFERENCIAS .....	81
CAPÍTULO 8: ANEXOS .....	89
8.1 Búsqueda del intervalo de trabajo: Prueba de hipótesis .....	89
8.2 Titulación de formaldehído con sulfito de sodio mediante potenciometría. ...	90
8.3 Linealidad del sistema: Análisis de varianza (ANOVA) .....	91
8.4 Cromatogramas complementarios asociados a la validación del método analítico.....	93

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Al igual que los cigarros convencionales, existen cigarrillos electrónicos (*e-cigs*), dispositivos para fumar que funcionan con una batería, la cual calienta un líquido y genera un aerosol. La introducción de estos dispositivos en 2003, bajo el argumento de ser una alternativa menos dañina para fumar, dio lugar a un rápido crecimiento en el mercado <sup>[1]</sup>. Esta tendencia se refleja en cifras como las de México, donde 975 mil personas entre los 12 y 65 años utilizan estos vapeadores, y cinco millones lo han usado en una ocasión <sup>[2]</sup>. Mientras que en países como Estados Unidos y Canadá el consumo de los *e-cigs* entre adolescentes durante el periodo de 2016 a 2019 aumentó del 11.3 % al 27.5 % y del 14.6 % al 29.4 % respectivamente. En Europa también se observó la misma tendencia, por ejemplo, en Italia, entre personas de 13 a 15 años aumentó del 7.4 % al 17.5 % en los años de 2014 a 2018 <sup>[3]</sup>.

El aerosol desprendido por el cigarrillo electrónico, posteriormente, es inhalado por el consumidor, hasta llegar a sus pulmones. El líquido, comúnmente conocido como *e-liquid*, usualmente es una mezcla compuesta mayormente de propilenglicol y/o glicerina, agua, nicotina (1 – 3) % y saborizantes (< 1 %) <sup>[4]</sup>

Independientemente del tipo y marca del *e-cig*, tienen cuatro componentes básicos <sup>[5]</sup>:

1. Batería
2. Cartucho para contener el líquido (*e-liquid*)
3. Cámara de vaporización o atomizador
4. Boquilla para inhalar

Parte de la gran problemática con los cigarrillos electrónicos se centra en los líquidos de relleno (*e-liquid*) ya que existen una gran diversidad de sabores y

aromas, incluyendo más de 1,500 olores exclusivos en los *e-liquids* que se comercializan con o sin nicotina, resultando en un gran atractivo para los niños y jóvenes. Los sabores recuerdan a opciones alimenticias populares entre los niños, tales como cereales y dulces, así como aquellos atractivos para adolescentes como cereza, frutos rojos, pastel de limón, mango, chocolate, etc [6]. En la figura 1, se presenta un ejemplo de empaque de cigarrillo electrónico que hacen referencia a productos alimenticios, con la intención de captar la atención de un público más joven.



**Figura 1.** Productos comerciales de cigarrillos electrónicos [7]

El aerosol del *e-cig* puede contener sustancias potencialmente dañinas como compuestos orgánicos volátiles, partículas finas, metales pesados como níquel, estaño, plomo, sustancias químicas cancerígenas, saborizantes como diacetilo (sustancia química vinculada a enfermedad grave de los pulmones) [8]. Estos compuestos podrían estar relacionados con casos de enfermedad pulmonar aguda grave.

En 2019, debido a la creciente popularidad y el uso frecuente de los cigarrillos electrónicos, se emitió una alerta epidemiológica a través del Comité Nacional para la Vigilancia Epidemiológica (CONAVE). Durante ese mismo año, se registraron 2,668 casos relacionados con el uso del cigarrillo electrónico o lesión pulmonar asociada a vapeo (EVALI) en los 50 estados de los Estados Unidos, junto con 60 muertes confirmadas en el Distrito de Columbia, Puerto Rico y las Islas Vírgenes. Ante esta situación, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos iniciaron una investigación de emergencia. En algunos

países, se ha observado que los adolescentes no fumadores que comienzan a utilizar dispositivos electrónicos para fumar (ENDS) tienen al menos el doble de probabilidad de comenzar a fumar cigarrillos convencionales más adelante en la vida. Además, la exposición a la cantidad de nicotina no controlada en estos productos conlleva a la adicción <sup>[9]</sup>.

El auge comercial de los cigarrillos electrónicos llevó a varios países a analizar químicamente los *e-liquids*, identificando sustancias tóxicas para el ser humano. Mientras Estados Unidos, Reino Unido y la Unión Europea comenzaron a establecer regulaciones en respuesta a casos de enfermedades pulmonares, México aún no ha tomado medidas en ese sentido <sup>[10]</sup>.

Conocer los componentes químicos de los líquidos saborizados es importante ya que puede dar una idea de la toxicidad de los aerosoles generados. Los resultados derivados del análisis de estos líquidos pueden desempeñar un papel educativo para los consumidores, al proporcionar información sobre los componentes utilizados. Además, dichos hallazgos tienen la capacidad de informar a las autoridades reguladoras, contribuyendo a establecer pautas para un etiquetado preciso y comprensible de los cigarrillos electrónicos.

Entre los compuestos presentes, aquellos con grupos carbonilo, como el formaldehído (FA) y acetaldehído (AA), incrementan el riesgo de padecer cáncer. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (US EPA) clasifican el formaldehído en el grupo 1, es decir, carcinógeno para humanos. Mientras que el IARC clasifica el acetaldehído en el grupo 2B, esto es como posible carcinógeno para humanos. La acroleína (Acr) es clasificada como grupo 3, indicando que actualmente no hay ninguna prueba de que cause cáncer a los humanos <sup>[11]</sup>; sin embargo, puede dañar el revestimiento de los pulmones y causar irritación en la cavidad nasal.

Con el propósito de evaluar el impacto de los cigarrillos electrónicos en la salud, resulta crucial desarrollar métodos analíticos precisos y veraces para detectar

compuestos carbonílicos. Estos compuestos suelen estar presentes en cantidades de trazas en los líquidos de vapeo, generando la necesidad de contar con métodos analíticos con bajos límites de detección y de cuantificación [12,13]. Además, este tipo de compuestos son relativamente difíciles de manipular debido a su volatilidad, inestabilidad térmica y su complicada manipulación para analizarlos directamente, por esta razón es necesario derivatizarlos. El método analítico más recurrente emplea cromatografía líquida de alta resolución acoplado con detector de ultravioleta (HPLC-UV), ya que el detector de UV proporciona una detección robusta, económica y un método de análisis simple usando la típica derivatización de estos aldehídos con 2,4-dinitrofenilhidracina (2,4-DNFH). Una ventaja del análisis con el detector de absorción UV-Visible es que presenta límites de detección del orden 1 pg – 1 ng, además que no provoca la destrucción de la muestra [14].

Por lo mencionado anteriormente, es sustancial desarrollar métodos analíticos confiables para detectar aldehídos presentes en los *e-liquids*. Por ello el presente trabajo se centra en la validación del método analítico para la cuantificación de formaldehído, acetaldehído y acroleína en los líquidos de relleno de cigarrillos electrónicos de circulación en el mercado mexicano.

## CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

1. Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de formaldehído, acetaldehído y acroleína en cigarrillos electrónicos (*e-liquid*) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado al detector de absorción en ultravioleta-visible (HPLC-UV/Vis).
2. Cuantificar el formaldehído, acetaldehído y acroleína presentes en muestras de *e-liquids* de manufactura mexicana proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).



## CAPÍTULO 3: ANTECEDENTES

### 3.1 *Presencia de formaldehído, acetaldehído y acroleína en los cigarrillos electrónicos*

El formaldehído con fórmula química  $\text{CH}_2\text{O}$ , es un compuesto volátil y muy inflamable. En su estado puro es un gas incoloro de olor fuerte e irritante. Comercialmente, se encuentra disponible en disoluciones acuosas o metanólicas, teniendo un líquido incoloro de olor penetrante y sofocante. Este compuesto puede causar irritación en la piel, los ojos, la nariz y la garganta. Mientras que la exposición a niveles elevados se ha asociado con ciertos tipos de cáncer <sup>[15,16]</sup>.

Por otro lado, el etanal o acetaldehído de fórmula  $\text{CH}_3\text{CHO}$ , es un líquido volátil e incoloro. La exposición a este compuesto, principalmente a través de la inhalación, puede ocasionar irritación de la piel, los ojos y el tracto respiratorio. A exposiciones de mayor concentración puede resultar en edema pulmonar y eritema <sup>[17,18]</sup>.

En cuanto a la acroleína, también conocida como 2-propenal y con la fórmula química  $\text{C}_3\text{H}_4\text{O}$ , es el aldehído insaturado más simple. Es un líquido incoloro o amarillo de olor desagradable. Su inhalación puede provocar lagrimeo de los ojos, ardor de la nariz, garganta, además de la reducción del ritmo respiratorio <sup>[19]</sup>.

En el contexto de los cigarrillos electrónicos, recientemente se ha sugerido que los sabores y materias primas empleados en los líquidos de vapeo son la principal fuente de los aldehídos mencionados anteriormente <sup>[20]</sup>.

Además, se ha visto que estos aldehídos se pueden generar *in situ* en la acción de “fumar”, por ejemplo, se ha observado que cuando la temperatura de vaporización del líquido de relleno oscila entre 100 °C y 350 °C, se puede provocar la formación de compuestos como la acroleína y el formaldehído. En el caso específico de la acroleína, su principal fuente es la oxidación de glicerina, mientras que, en el caso del formaldehído, la oxidación tanto del propilenglicol como de la glicerina juegan

un papel fundamental <sup>[21]</sup>. Otra fuente de estos aldehídos reside en la descomposición térmica del 2-metilbutiraldehído, el cual se utiliza para proporcionar sabor a chocolate <sup>[22]</sup>.

Por otra parte, el acetaldehído se puede generar debido a la degradación de moléculas aromáticas, que son abundantes en los *e-liquids* <sup>[23]</sup>. También se ha identificado de manera cualitativa que este aldehído se incorpora intencionadamente como agente saborizante <sup>[24]</sup>. Sin embargo, es relevante señalar que son escasos los estudios que lo mencionen específicamente como tal.

Los líquidos de vapeo contienen una amplia variedad de sustancias, en consecuencia, en la mayoría de los casos, se emplea la cromatografía para el análisis de estos *e-liquids*. Esta técnica tiene gran relevancia en la ciencia como en la industria.

### **3.2 Cromatografía**

De acuerdo con la IUPAC, la cromatografía es un método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales está en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra se mueve en dirección definida (fase móvil).

El proceso cromatográfico se fundamenta en las interacciones relativas entre las sustancias a separar, la fase móvil y estacionaria <sup>[25]</sup>. Ésta última retarda el desplazamiento de los componentes de la muestra, lo que resulta en que dichos componentes sean transportados por la fase móvil a distintas velocidades, logrando así su separación a lo largo del tiempo. Este tiempo es conocido como tiempo de retención. Cuando los tiempos de retención de los diversos componentes de una mezcla difieren entre sí, entonces los componentes se pueden separar mediante cromatografía.

Una forma de clasificar la cromatografía es por el estado de agregación de la fase móvil. Cuando la fase móvil es un gas, se denomina cromatografía de gases, mientras que cuando se trata de un líquido, se le nombra como cromatografía de líquidos.

### 3.2.1 Cromatografía de líquidos

En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que contiene la mezcla de solutos, esta fase fluye a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Esta técnica de separación se emplea en mezclas de productos poco o nada volátiles.

Los tipos de cromatografía de líquidos se clasifican comúnmente de acuerdo con su mecanismo de separación, como se muestra en la tabla 1 [26].

**Tabla 1.** Tipos de cromatografía de líquidos. Donde C es cromatografía

Nombre de la técnica	Fase estacionaria	Fase móvil	Mecanismo de separación
C. sólido-líquido	Sólido	Líquido	Adsorción
C. líquido-líquido	Líquido	Líquido	Partición/Reparto
C. intercambio iónico	Sólido	Líquido	Carga
C. de exclusión molecular	Gel poroso	Líquido	Tamaño molecular
C. afinidad	Gel	Líquido	Interacción específica
C. quiral	Sólido	Líquido	Interacción entre los dos enantiómeros y fase estacionaria.

El desarrollo del método analítico presentado en este trabajo se basa en la cromatografía de reparto. La distribución de un soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria se puede representar mediante el siguiente equilibrio:



Donde  $X_2$  es la concentración del analito en la fase estacionaria (FE), mientras que  $X_1$  es la concentración del analito en la fase móvil (FM).

El coeficiente de reparto se expresa de la siguiente forma:

$$K_d = \frac{[X_2]}{[X_1]}$$

Cabe mencionar que la cromatografía de partición puede ser de fase normal o fase reversa de acuerdo con la naturaleza de la fase móvil y fase estacionaria como se indica en la tabla 2.

**Tabla 2.** Tipos de cromatografía de partición

Cromatografía de reparto	Fase estacionaria	Fase móvil
Fase normal	Polar	No polar o baja polaridad
Fase reversa	No polar	Polar

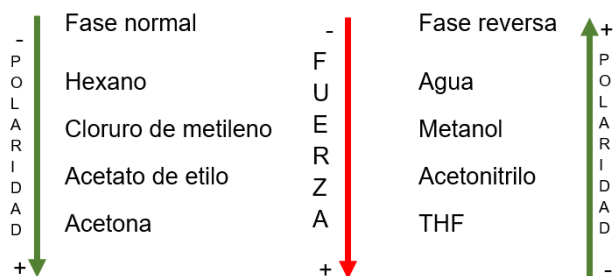
Adicionalmente, el análisis puede llevarse a cabo mediante elución isocrática o en gradiente. En el enfoque isocrático, se emplea un solo disolvente o una combinación de ellos, pero siempre manteniendo constante la composición a lo largo del proceso. Por otro lado, en la elución con gradiente se utilizan dos o más sistemas de disolventes que difieren en polaridad y durante el análisis se varía la proporción de estos disolventes de manera gradual. La aplicación de la elución en gradiente suele mejorar la eficiencia de la separación.

Un concepto importante por abordar es la fuerza de elución, fuerza eluyente o fuerza elutrópica ( $\epsilon^\circ$ ), la cual es una medida de energía de adsorción del disolvente

tomando como referencia el sistema pentano-sílice pura al que se asigna el valor de cero. Dicha fuerza indica la facilidad del disolvente para formar enlaces de hidrógeno con las moléculas que queremos extraer, la cual depende de su constante dieléctrica o de su momento dipolar [27]. Un eluyente débil no puede desplazar al analito, lo que hace que quede fuertemente retenido en la fase estacionaria. Un eluyente fuerte puede desplazar totalmente todas las moléculas de analito y transportarlas a través de la columna sin retenerlas [28].

En fase normal la fuerza de elución del disolvente incrementa con la polaridad de él, mientras que en fase reversa es inverso, es decir, la fuerza aumenta al disminuir la polaridad [29,30]. Además, es relevante señalar que, en fase reversa, el eluyente orgánico se incrementa de forma continua durante el análisis, es decir, la fuerza de elución aumenta de manera progresiva [31].

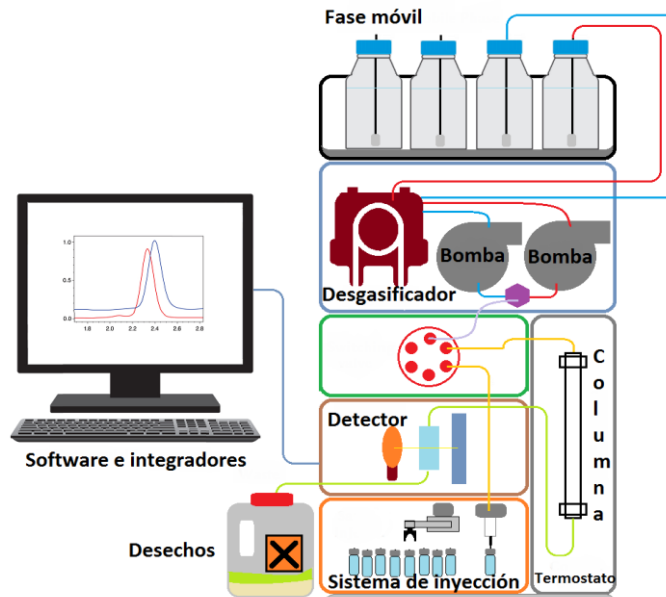
Los disolventes mostrados en la figura 2 son lo más empleados para cada tipo de fase.



**Figura 2.** Disolventes más empleados en fase normal y fase reversa.

### 3.2.1.1 Instrumentación

En la figura 3 se muestra una ilustración del equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).



**Figura 3.** Equipo de HPLC <sup>[32]</sup>

**a) Depósitos para la fase móvil (disolventes):** el depósito que mantiene la fase móvil a menudo consta simplemente de una botella de vidrio o politetrafluoroetileno (PTFE). Para bombear la fase móvil se emplean tubos de acero inoxidable. Los disolventes que se emplean deben tener características como <sup>[33]</sup>:

- Ser grado cromatográfico
- Baja viscosidad
- No volátil
- No deben corroer los tubos del sistema HPLC, las válvulas de la bomba y otras piezas que se encuentren en la ruta del flujo
- El analito debe ser soluble en la fase móvil, de lo contrario la muestra precipitará provocando la obstrucción en la entrada de la columna
- Deben filtrarse y desgasificarse
- Agua desionizada

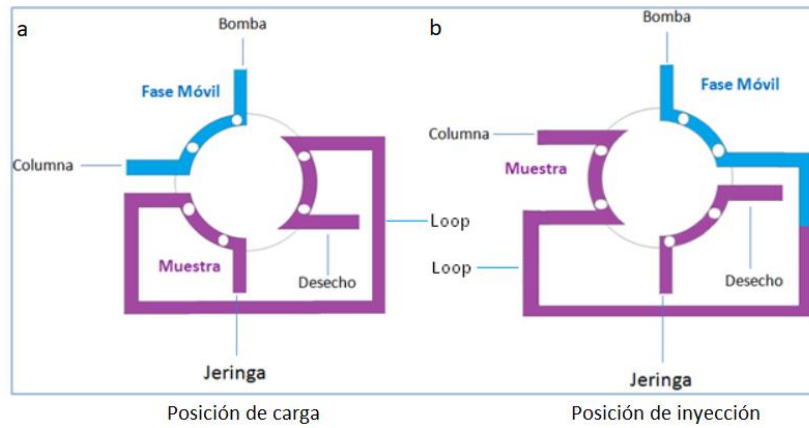
**b) Sistema de bombeo:** debido al tamaño de partícula de la columna (10 micras o inferior) se necesita una alta presión para bombear la fase móvil. Además, el flujo debe ser estable, constante y veraz.

Existen diferentes tipos de bombas en HPLC: de jeringa, de presión constante y de pistón. El 98 % de las veces se ocupan bombas de pistón en los equipos de HPLC modernos.

Las bombas de pistón permiten realizar análisis en modo isocrático y gradiente. Este tipo de bomba proporciona un flujo constante que es prácticamente independiente de las variaciones en la viscosidad de la fase móvil. Sin embargo, una desventaja es la presencia de un flujo con pulsaciones <sup>[34]</sup>.

**c) Inyector de muestra:** puede realizarse de manera manual o automática. El sistema de inyección automático permite que el proceso sea de manera veraz y precisa, motivo por el cual en la actualidad los inyectores manuales son raramente empleados. La inyección debe realizarse en un corto periodo de tiempo para perturbar lo menos posible el flujo de la fase móvil establecido en la columna y el detector. Los volúmenes por emplear deben ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 5  $\mu\text{L}$  para evitar el ensanchamiento de las bandas <sup>[35,36]</sup>.

Los equipos de HPLC tienen en su sistema de inyección un sistema de *loop* o bucle que funciona en dos posiciones (carga e inyección). En la posición de carga (figura 4 a) la fase móvil se dirige desde la bomba hacia la columna. El auto muestreador permite inyectar la cantidad que se necesite en el análisis, esta puede ser menor a la capacidad del *loop*. Finalmente, en la posición de inyección (figura 4 b) la fase móvil que viene de la bomba pasa por el *loop* y empuja la muestra hacia la columna <sup>[37]</sup>.

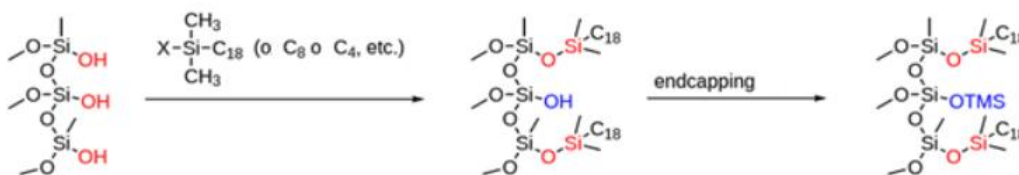


**Figura 4.** Sistema de inyección en HPLC <sup>[38]</sup>

**d) Columna:** Son tuberías de acero inoxidable que contienen el material de relleno cromatográfico necesario para realizar la separación. Existen diversos tipos de columnas de acuerdo con el mecanismo de separación que ocurre.

En la cromatografía de adsorción la columna puede contener como relleno sílica, alúmina o carbono mineral. Cuando la sílice es modificada con grupos no polares como hidrocarburos o fenilos se obtiene una fase reversa, si es modificada con grupos polares como nitrilos, alcoholes o aminas se habla de una fase normal <sup>[39]</sup>.

Cuando la sílice se funcionaliza, no todos los grupos silanol disponibles (grupos OH libres) en la superficie de la sílice reaccionan, por lo que los grupos residuales se “protegen” con cloruro de trimetilsilano a este proceso se le conoce como *endcapping*. Este proceso elimina las interacciones indeseables con los grupos OH de la superficie. La ecuación química del proceso de funcionalización y *endcapping* se muestra en la figura 5.



**Figura 5.** Proceso de funcionalización y *endcapping* de la sílice <sup>[40]</sup>



**e) Detector:** Posterior a la separación de los componentes en la columna, estos pasan al detector. La función del detector es registrar la respuesta de los analitos debido a sus propiedades fisicoquímicas, por ejemplo, la absorbancia. También existen detectores que responden al cambio de una propiedad de la fase móvil como el de índice de refracción. En la tabla 3 se indican los detectores más comunes empleados en HPLC.

**Tabla 3.** Características de los detectores de HPLC <sup>[14]</sup>

Detector	Selectividad	Límite de detección	Clasificación	Tipo de elución
Absorbancia	Existencia de dobles enlaces o electrones no apareados	1 pg – 1 ng	No destructivo Directo	Gradiente
Fluorescencia	Presencia de fluorescencia	10 fg-10 pg	No destructivo Directo	Gradiente
Índice de refracción	Universal	10 ng -1 μg	No destructivo Diferencial	Isocrática
Conductividad	Compuestos iónicos	500 pg- 1 ng	No destructivo Diferencial	Isocrática
Espectrometría de masas (HPLC-ESI-MS)	Universal	100 ag -1 ng	Destructivo	Gradiente

En ciertas ocasiones, es necesario generar un cambio en la estructura química del analito con el propósito de facilitar su aislamiento, separación o mejorar la detección de él. Este proceso se denomina derivatización y abarca una amplia gama de agentes derivatizantes destinados a generar o mejorar los límites de detección del analito. En HPLC, la derivatización puede llevarse a cabo antes del análisis cromatográfico (precolumna) o después de la separación de la columna, pero previo a la detección (postcolumna) <sup>[41-43]</sup>.

### **3.3 Validación de métodos analíticos**

Un método analítico es la aplicación de una técnica a fin de hallar un analito en una muestra específica.

De acuerdo con la ISO 9000, la validación de un método analítico es la confirmación a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específica prevista <sup>[44]</sup>.

Los laboratorios del todo el mundo están constantemente realizando mediciones, pruebas y exámenes. Los resultados obtenidos de estas actividades a menudo conllevan decisiones significativas. Por ejemplo, la confirmación de la presencia de sustancias prohibidas puede resultar en sanciones. De ahí la importancia de llevar a cabo una correcta medición y ser capaz de demostrar que el resultado es confiable.

Por lo anterior, la validación de métodos surge como una necesidad para los laboratorios de ensayo que buscan garantizar la calidad y confiabilidad de sus resultados. Además, también se contribuye a la toma de decisiones más fundamentadas en una variedad de campos, desde la seguridad alimentaria hasta la industria farmacéutica y la investigación científica. Con la validación de los métodos se facilita la comparación de resultados entre diferentes laboratorios y se promueve la confiabilidad de los datos en un ámbito más global.

El laboratorio debe validar cuando se trata de <sup>[45]</sup>:

- Métodos no normalizados
- Métodos diseñados/desarrollados por el laboratorio
- Métodos normalizados usados fuera de su ámbito de aplicación
- Métodos obtenidos de publicaciones científicas (*Journals*, tesis, etc)
- Ampliaciones o modificaciones de métodos normalizados

La validación de un método analítico implica evaluar una serie de parámetros, conocidos como para parámetros de validación.

### **3.3.1 Parámetros de validación**

Los parámetros de validación son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican el grado de calidad del método, incluyen [44,46,47].

- Selectividad o especificidad. – Capacidad del método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés.
- Límite de detección. – Concentración mínima del analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada.
- Límite de cuantificación. – Concentración mínima del analito que se puede determinar con precisión y veracidad aceptables.
- Intervalo de trabajo. – Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal.
- Linealidad. – Habilidad (dentro de un intervalo dado) para asegurar que los resultados obtenidos directamente, o por una transformación matemática, son proporcionales a la concentración del analito.
- Sensibilidad analítica. – Variación de la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio de la magnitud medida, por ejemplo, la concentración del analito.
- Veracidad. – Proximidad entre el valor obtenido empleando el método analítico y el valor de referencia.
- Precisión. – Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea. Se evalúa a tres niveles con el objetivo de obtener una estimación que refleje todas las fuentes de variación aleatoria que se

producirán en un solo o más laboratorios en condiciones de rutina (diferentes analistas, periodos de tiempo prolongados, etc.):

- Repetibilidad. – Es una medida de la variabilidad en los resultados cuando una medición se lleva a cabo por un solo analista utilizando el mismo equipo en un corto plazo de tiempo. A la vez se divide en:
  - Repetibilidad del sistema. –Proporciona información de la capacidad del sistema de medición para producir resultados consistentes cuando se repiten mediciones bajo las mismas condiciones experimentales.
  - Repetibilidad del método. – Permite demostrar la concordancia de los resultados al emplear el método analítico.
- Precisión intermedia. – Precisión de un método analítico, realizado en un mismo laboratorio por analistas diferentes y/o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.
- Reproducibilidad. – Precisión de un método analítico, expresada como la concordancia entre determinaciones independientes realizadas por diferentes laboratorios.
- Robustez. – Capacidad del método analítico para permanecer inalterado debido a pequeñas variaciones permitidas de los parámetros del método. Proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal.

### **3.3.2 Selección de los parámetros de desempeño**

No siempre es necesario evaluar todos los parámetros de desempeño durante una validación. La Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (CCAYAC), establece que los parámetros a evaluar en una validación dependen de la clasificación del método. Esta información se encuentra detallada en la tabla 4.

**Tabla 4.** *Parámetros de desempeño de acuerdo con el tipo de método.*

Parámetro de desempeño	Métodos normalizados			Métodos no normalizados
	Fisicoquímicos	Físicos		Fisicoquímicos
		Cuantitativos	Cualitativos	
Intervalo lineal y de trabajo	SI	NO	NO	SI
Límite de detección	SI	NO	SI	SI
Límite de cuantificación	SI	NO	NO	SI
Recuperación (Veracidad)	SI	NO	NO	SI
Sesgo	SI	NO	NO	SI
Repetibilidad	SI	SI	NO	SI
Reproducibilidad	SI	SI	NO	SI
Incertidumbre	SI	SI	NO	SI
Sensibilidad	NO	NO	NO	SI
Selectividad	NO	NO	SI	SI
Robustez	NO	NO	NO	SI

## CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA

### **4.1 Materiales y equipos**

#### **4.1.1 Reactivos y disolventes**

- Acetonitrilo TEDIA, grado LC-MS
- Acetonitrilo J.T.Baker, grado LC-MS
- Agua desionizada obtenida de un desionizador marca Millipore modelo WaterPro BT
- Etanol tecsiquim, grado LC
- Formaldehído-DNFH material de referencia Sigma-Aldrich
- Acetaldehído-DNFH material de referencia Sigma-Aldrich
- Acroleína-DNFH material de referencia Sigma-Aldrich
- Formaldehído Sigma-Aldrich reportado en etiqueta 37-38 % en medio acuoso, porcentaje determinado en este trabajo 41 %
- Sulfito de sodio Merck Millipore al > 99 %
- Ácido clorhídrico Sigma-Aldrich al 37 % m/m
- Ácido fórmico Sigma-Aldrich al 95 %
- Indicador azul de bromotimol
- Indicador naranja de metilo
- Glicerina Sigma-Aldrich al 83.5 - 89.5 %
- Propilenglicol Sigma-Aldrich de pureza  $\geq 99.5$  %
- 2,4-Dinitrofenilhidracina MERCK, pureza mínima 99 %

#### **4.1.2 Preparación de disoluciones**

Disolución a 50.00 ppm de FA-DNFH. – Se tomaron 500  $\mu$ L del respectivo material de referencia derivatizado de concentración 100 ppm y se llevó a un volumen final de 1.0 mL con ACN.

Disolución a 100.00 ppm de AA-DNFH. – Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del respectivo material de referencia derivatizado de concentración 500 ppm y se llevó a un volumen final de 1.0 mL con ACN.

Disolución a 100.00 ppm de Acr-DNFH. – Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del respectivo material de referencia derivatizado de concentración 500 ppm y se llevó a un volumen final de 1.0 mL con ACN.

Disolución a 10.00 ppm de los aldehídos-DNFH. – Se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de la disolución de 50.0 ppm de FA-DNFH y 100  $\mu\text{L}$  de cada disolución de 100 ppm de AA-DNFH y Acr-DNFH, y se llevó a un volumen final de 1.0 mL con ACN.

Disolución a 0.10 ppm de los aldehídos-DNFH. – De la disolución de 10.00 ppm de los aldehídos-DNFH se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de ésta y se llevó a un volumen final de 1.0 mL con ACN.

Disolución de DNFH a 0.32 mg/mL. – Se pesaron 16 mg de DNFH, se transfirieron cuantitativamente a un matraz volumétrico de 50.0 mL, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico y se alcanzó el volumen final con ACN.

Disolución de formaldehído libre a 2.20 mol/L. – Se tomó una alícuota de 4.0 mL de la disolución de formaldehído a 13.75 mol/L (41 % m/m) y se llevó a un volumen final de 25.0 mL con agua.

Disolución de formaldehído libre a 0.22 mol /L. – De la disolución de formaldehído libre a 2.20 mol/L se tomó una alícuota de 10.0 mL y se llevó a un volumen final de 100.0 mL con agua.

Disolución de formaldehído libre a 51.66 ppm. – Del reactivo de formaldehído al 41 % m/m se tomaron 12.6  $\mu\text{L}$  y se llevó a un volumen final de 100.0 mL con agua.

Disolución de formaldehído libre a 10.33 ppm. – De la disolución de formaldehído libre a 51.66 ppm se tomaron 2.0 mL y se llevaron a un volumen final de 10.0 mL con agua.

Disolución control de FA-DNFH a 0.1 ppm. – De la disolución de 50.00 ppm de FA-DNFH se tomaron 20  $\mu$ L y se llevó a un volumen final de 10.0 mL con ACN.

Placebo. – Se preparó una mezcla de propilenglicol:glicerina en una proporción 70:30. Para la preparación, se midieron 70 mL de propilenglicol y 30 mL de glicerina en una probeta de 100 mL, y luego se transfirió esta mezcla a un envase de plástico para su homogenización.

Placebo fortificado a 0.1 ppm. – Se pesaron aproximadamente 0.6 g de placebo en un matraz volumétrico de 1.0 mL, posteriormente se fortificó con 10  $\mu$ L de la disolución a 10.0 ppm de los aldehídos-DNFH y se llevó al volumen final con ACN.

Blanco de disolvente. – En un vial transparente de cromatografía se agregó aproximadamente 1 mL de ACN.

Blanco de proceso. – En un vial ámbar se pesaron 0.6 g de placebo, se agregaron 3 gotas de HCl al 37 % m/m y se dejó agitar 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 300  $\mu$ L de la disolución de DNFH a 0.32 mg/mL y se colocó en agitación por 30 minutos, finalmente se transfirió a un matraz de 1.0 mL y se llevó a la marca de aforo con ACN.

Blanco de reactivo de DNFH. – En un matraz volumétrico de 1.0 mL se añadieron 300  $\mu$ L de la disolución de DNFH a 0.32 mg/mL y se llevó al volumen final con ACN.

Blanco de placebo. – En un matraz volumétrico de 1.0 mL se pesaron 0.6 g de placebo y se llevó al volumen final con ACN.

Disolución de HCl 0.11 mol/L. – Se tomaron aproximadamente 4.2 mL de HCl al 37% m/m y se llevó a un volumen final de 500 mL con agua desionizada.

Disolución de KNO<sub>3</sub> a 1070 ppm. – Se pesaron 10.7 mg de KNO<sub>3</sub> y se llevó a un volumen final de 10.0 mL con una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (70:30).



Disolución KNO<sub>3</sub> a 107 ppm. – Se tomaron 100  $\mu$ L de la disolución de KNO<sub>3</sub> a 1070 ppm y se transfirió a un matraz volumétrico de 1.0 mL, el volumen final se alcanza con una mezcla de H<sub>2</sub>O:ACN (70:30).

### **4.1.3 Equipos**

Cromatógrafo de líquidos con automuestreador y detector de UV-Vis marca Agilent Technologies, 1260 Infinity. Software: MassHunter Workstation®.

### **4.1.4 Instrumentos y aparatos**

- Balanza analítica marca con capacidad de 220 g y exactitud de 0.1 mg, modelo AND GH-202.
- Bureta de 25.0 mL
- Matraces volumétricos de 1.0 mL
- Matraces volumétricos de 10.0 mL
- Matraces volumétricos de 5.0 mL
- Matraces volumétricos de 50.0 mL
- Matraces volumétricos de 2.0 mL
- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Micropipeta de 2 - 20  $\mu$ L
- Micropipeta de 10 - 100  $\mu$ L
- Micropipeta de 100- 1000  $\mu$ L
- Pipetas Pasteur
- Viales ámbar de 1.5 mL con tapón
- Viales transparentes de 1.5 mL con tapón
- Viales transparentes con tapón para derivatización 5.0 mL
- Viales transparentes con tapón para derivatización 1.5 mL
- Barras de agitación magnética
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 10 mL

## 4.2 Implementación del método analítico

Las condiciones cromatográficas empleadas en el presente trabajo se definieron tras una consulta bibliográfica de una serie de artículos [48-54]. Comparándolos entre ellos existen diferencias en la elección de la fase móvil, el tipo de elución, y en caso de la elución por gradiente las proporciones de los disolventes, así como la duración del tiempo de análisis; sin embargo, todos ellos comparten el tipo de columna (C18) y la longitud de onda de detección: 360 nm o 365 nm. Las fases móviles por emplear se tomaron en cuenta de acuerdo con los artículos “*Reduced solvent and reagent amounts: effect on carbonyl dinitrophenylhydrazone measurements at low concentrations, Anal. Methods, 2021, 13, 1976-1985*” y “*Aliphatic aldehydes: Method 2018, NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), 4ta edición, 2-10.*”

Como primera propuesta se implementaron las condiciones cromatográficas indicadas en la tabla 5. El programa de elución con gradiente se muestra en la tabla 6.

**Tabla 5.** Condiciones cromatográficas iniciales para la cuantificación de formaldehído-DNFH, acetaldehído-DNFH y acroleína-DNFH por HPLC-UV

Columna	C-18 3.0 mm × 100 mm, 3.5 μm
Temperatura de columna	30.0 °C
Volumen de inyección	5.0 μL
Fase móvil A	Agua
Fase móvil B	Acetonitrilo
Tipo de elución	Gradiente, el tiempo de programación se muestra en la tabla 6.
Velocidad de flujo	0.5 mL/min
Longitud de onda	365 nm

**Tabla 6.** Programa de elución con gradiente.

Tiempo (minutos)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0.00	70.0	30.0
2.00	70.0	30.0
6.00	50.0	50.0
12.00	0.0	100.0

Es importante aclarar que los aldehídos aquí empleados son estándares que se adquirieron ya derivatizados con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNFH).

Utilizando las condiciones detalladas en la tabla 5 y tabla 6, se realizó la inyección de la disolución 0.1 ppm de los aldehídos-DNFH.

Finalmente, con estas condiciones instrumentales se inyectó la disolución de  $\text{KNO}_3$  a 107 ppm para determinar el tiempo muerto. A partir del valor del tiempo muerto, se calcularon los parámetros cromatográficos, que incluyen el factor de capacidad ( $k'$ ), la selectividad ( $\alpha$ ), la resolución ( $R_s$ ) y la eficiencia ( $N$ ). Las ecuaciones matemáticas que representan estos parámetros se presentan a continuación:

- Factor de capacidad

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

Donde  $t_R$  es tiempo de retención y  $t_0$  el tiempo muerto.

- Selectividad

$$\alpha = \frac{t_{R_2} - t_0}{t_{R_1} - t_0} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

Donde  $t_{R_1}$  se refiere al tiempo de retención del analito que eluye antes que el segundo analito y que tiene como tiempo de retención  $t_{R_2}$ . O bien  $k'_1$  el factor de capacidad del primer soluto y  $k'_2$  el factor de capacidad del segundo soluto. Este parámetro se calcula para picos vecinos.

- Resolución

$$R_s = \frac{2(t_{R_2} - t_{R_1})}{W_{b1} + W_{b2}}$$

Donde  $W_{b1}$  se refiere al ancho de la base del analito que eluye antes que el segundo analito con  $W_{b2}$ . Los anchos de la base tienen unidades de tiempo. Este parámetro se calcula para picos vecinos.

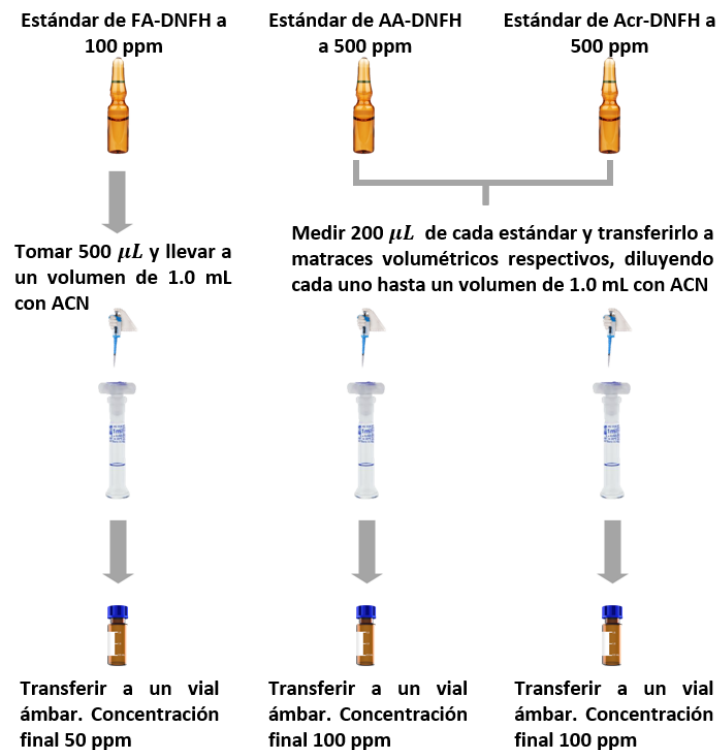
- Eficiencia

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2$$

#### **4.2.1 Búsqueda del intervalo de trabajo**

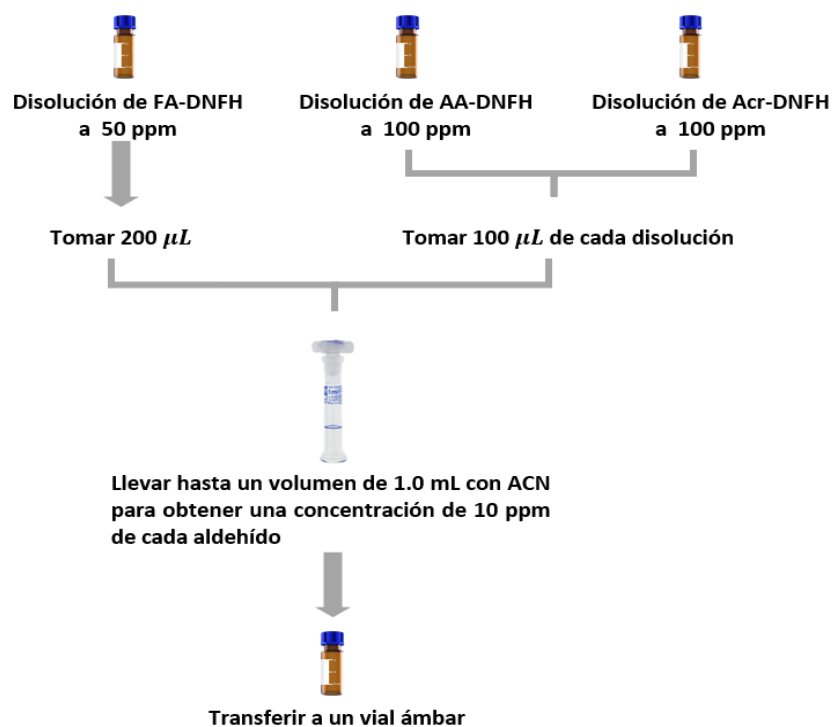
Como primera propuesta para el intervalo de trabajo se realizaron una serie de disoluciones que abarcan concentraciones de 0.005 ppm a 5.0 ppm para cada analito.

Para iniciar la construcción del intervalo, se procedió con la preparación de una serie de disoluciones. Para el formaldehído-DNFH, se inició preparando una disolución a 50 ppm, mientras que para el acetaldehído-DNFH y acroleína-DNFH, se realizaron disoluciones a partir de 100 ppm. El proceso de preparación de estas disoluciones (figura 6) se realizó a partir de los estándares adquiridos.



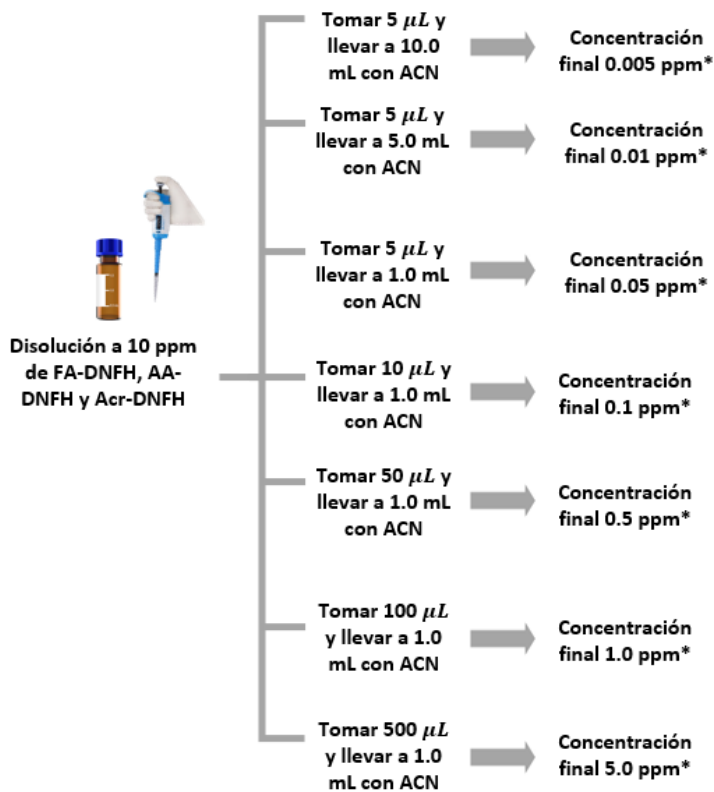
**Figura 6.** Metodología para la preparación de disoluciones de los aldehídos derivatizados a partir de los estándares.

De las disoluciones finales obtenidas siguiendo el procedimiento detallado en la figura 6, se preparó una nueva disolución en la que los tres aldehídos se encontraban a una concentración final de 10.0 ppm en un mismo matraz volumétrico. El procedimiento se encuentra ilustrado en la figura 7.



**Figura 7.** Metodología para la preparación de la disolución a 10.0 ppm que contiene FA-DNFH, AA-DNFH Y Acr-DNFH.

Finalmente, con la disolución a 10.0 ppm se realizaron las disoluciones necesarias para construir el intervalo de trabajo de cada aldehído derivatizado. El procedimiento se muestra en la figura 8.



\*Todas las disoluciones se transfieren a un vial ámbar para cromatografía

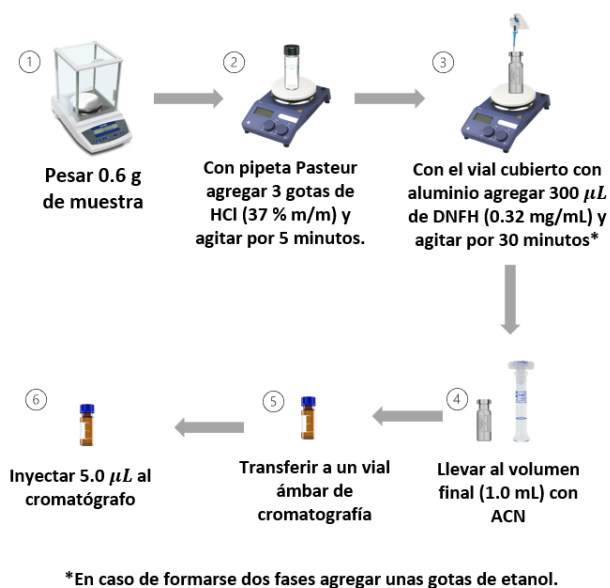
**Figura 8.** Preparación de las disoluciones para construir el intervalo de trabajo para los aldehídos derivatizados.

Los procedimientos descritos en las figuras 7 y 8 se realizaron por triplicado. Con los datos recolectados en este intervalo, se llevó a cabo en Excel® el análisis de regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados para cada uno de los analitos.

#### 4.2.2 Preparación de muestra

Para realizar la preparación de la muestra se consultó el artículo titulado “Determination of carbonyl compounds in electronic cigarette refill solutions and aerosols through liquid-phase dinitrophenyl hydrazine derivatization, *Environ Monit Assess.* 2018, 190(4), 1-11”.

La preparación de la muestra consistió prácticamente en pesar una cantidad definida del *e-liquid* y someter los analitos presentes en éste a una transformación química; se consideraron como factores de interés el tiempo y la temperatura de la reacción de derivatización. Se llevaron a cabo pruebas utilizando dos valores de tiempo: 30 minutos y 1 hora. Además, se evaluaron dos escenarios de temperatura: uno con calentamiento a 75°C y otro sin aplicar calentamiento. Las condiciones presentadas en la figura 9 representan las condiciones finales que se emplearon para la reacción de derivatización de los analitos presentes en las muestras comerciales de *e-liquids*.



**Figura 9.** Metodología para la preparación de muestras de *e-liquids*.

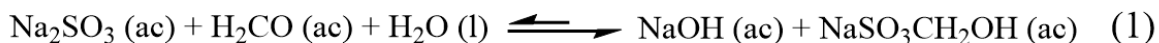
Se inyectó el blanco de reactivo de la DNFH utilizando las condiciones finales empleadas para la preparación de la muestra.

#### **4.2.2.1 Rendimiento de la reacción de derivatización**

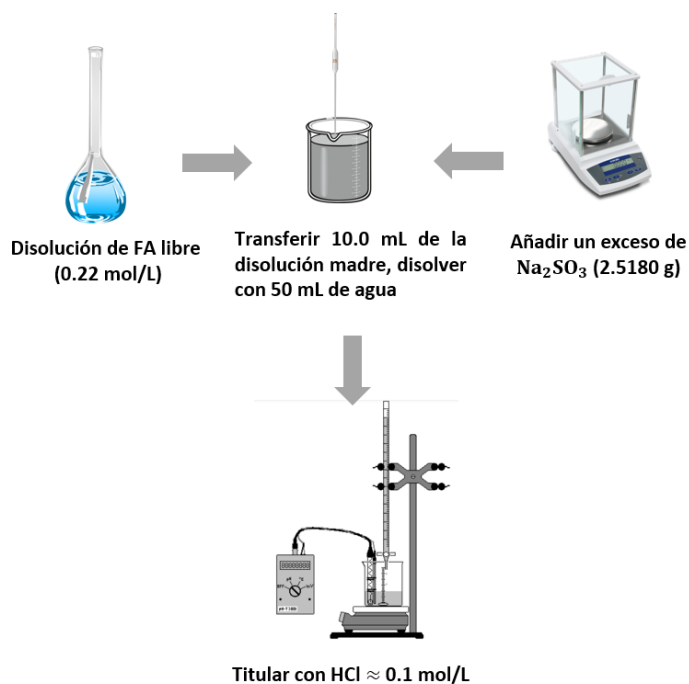
Antes de evaluar el rendimiento de la reacción de derivatización empleando formaldehído, fue necesario determinar su concentración. Este proceso se realizó



empleando una titulación indirecta mediante potenciometría, que implicó las ecuaciones químicas (1) y (2).



El proceso detallado se muestra en la figura 10.



**Figura 10.** Metodología para la determinación de la concentración de formaldehído mediante potenciometría.

Con los datos obtenidos de pH y el volumen agregado, se determinó el volumen utilizado para alcanzar el punto final, mediante el criterio de las derivadas.

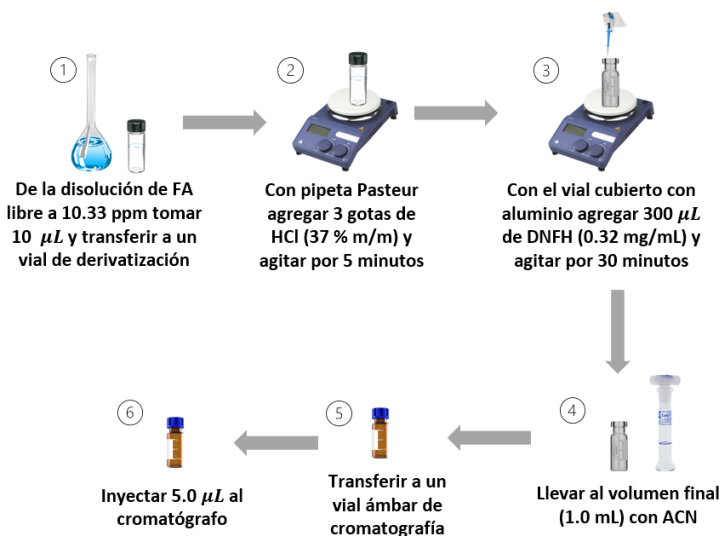
Seguido de la titulación de formaldehído se realizó la normalización del ácido clorhídrico. La normalización de este ácido se realizó mediante una titulación con indicador visual, empleando como patrón primario el carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), y naranja de metilo como indicador para detectar el punto final de la titulación. El

proceso de la normalización se realizó por triplicado. Los detalles completos de esta metodología se presentan en la figura 11.



**Figura 11.** Normalización del HCl empleado en la titulación de formaldehído.

Utilizando el volumen de ácido clorhídrico empleado para alcanzar el punto final de la normalización, se pudo determinar la concentración de él. Finalmente, con el valor de la concentración del ácido fue posible calcular la concentración del reactivo de formaldehído libre. Este mismo reactivo se empleó para determinar el rendimiento de la reacción de derivatización con la 2,4-dinitrofenilhidracina bajo las condiciones finales descritas en la figura 12. Este último procedimiento se realizó por triplicado.



**Figura 12.** Metodología para la derivatización de formaldehído.

Seguidamente de realizar por triplicado la reacción de derivatización con el formaldehído libre y la DNFH, se inyectó la disolución control de FA-DNFH a 0.1

ppm, el valor del área obtenido se utilizó como valor de referencia para obtener el rendimiento de la reacción de derivatización.

Los ensayos descritos con anterioridad permitieron establecer una metodología para el análisis cromatográfico y para la preparación de la muestra, así como establecer un intervalo de concentraciones en el cual la respuesta es lineal. Lo anterior hizo posible continuar con la validación del método analítico propuesto en este trabajo.

### **4.3 Validación del método analítico**

La metodología utilizada para la evaluación de los parámetros necesarios en la validación del método analítico empleado en el presente trabajo se presenta a continuación.

- a) Selectividad. – Se realizó la inyección de una serie de blancos:
  - i. Blanco de disolvente
  - ii. Blanco de reactivo
  - iii. Blanco de placebo
  - iv. Placebo fortificado
  - v. Blanco de proceso
  
- b) Repetibilidad del sistema. – Se efectuó por quintuplicado la inyección de la disolución a 0.1 ppm de los aldehídos-DNFH. Para este parámetro la disolución se preparó una única vez, y posteriormente se realizaron las inyecciones. Con las áreas obtenidas se evaluó el porcentaje del coeficiente de variación (% CV) de éstas, a través de la fórmula (3)

$$\% CV = \frac{s_y}{\bar{Y}} \times 100 \% \quad (3)$$

Donde  $s_y$  es la desviación estándar muestral y  $\bar{Y}$  el promedio

- c) Linealidad. – Con los datos obtenidos de la sección “4.2.1 búsqueda del intervalo de trabajo” se realizó el análisis estadístico por el método de mínimos cuadrados empleando Excel®.
- d) Veracidad. – Se inyectaron seis disoluciones del placebo fortificado a 0.1 ppm. Además, de la inyección de una disolución control a una concentración de 0.1 ppm de los aldehídos-DNFH. Con las áreas obtenidas tanto del placebo fortificado como de la disolución control se obtuvo el recobro a través de la ecuación (4). El cálculo para el recobro se realizó para cada analito obteniendo así 3 valores por cada disolución del placebo.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Área del analito en el placebo fortificado}}{\text{Área del analito en la disolución control}} \times 100 \% \quad (4)$$

Además, se calcularon para cada analito los intervalos de confianza superior e inferior para el promedio del porcentaje de recuperación con un nivel de confianza del 95 %. Las fórmulas que se emplearon se muestran en (5) y (6)

$$\text{ICS} = \overline{\% \text{ Recobro}} + \frac{t_{\text{crítica}} \times s_{\% \text{ recobro}}}{\sqrt{n}} \quad (5)$$

$$\text{ICI} = \overline{\% \text{ Recobro}} - \frac{t_{\text{crítica}} \times s_{\% \text{ recobro}}}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

Donde:

ICS: intervalo de confianza superior

ICI: intervalo de confianza inferior

$\overline{\% \text{ Recobro}}$ : promedio del porcentaje del recobro

$t_{\text{crítica}}$ : valor de la prueba de t de *student* a dos colas con 95 % de confianza y 5 grados de libertad. Se empleó la función INV.T.2C() de Excel®

$s_{\% \text{ recobro}}$ : desviación estándar del porcentaje de recuperación

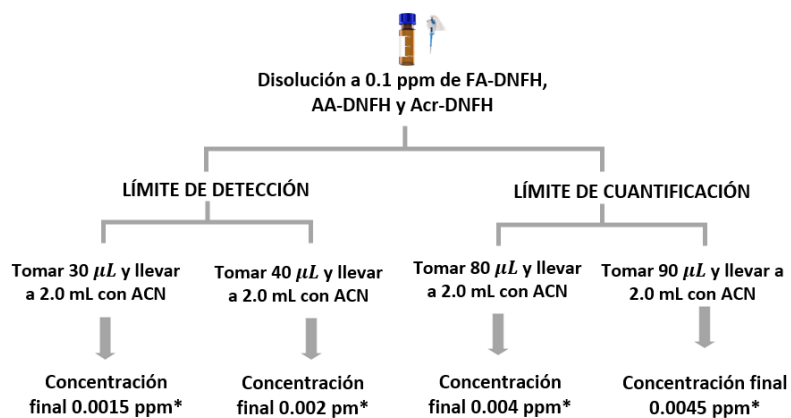
$\sqrt{n}$ : raíz cuadrada del número de ensayos realizados por cada analito.

Finalmente, mediante la fórmula (7) se obtuvo el sesgo para cada valor del % recobro

$$\text{Sesgo} = \text{valor obtenido} - \text{valor de referencia} \quad (7)$$

En este caso el valor de referencia es el 100 %

- e) Repetibilidad del método. – Aprovechando la experimentación del parámetro de veracidad se estimó el coeficiente de variación utilizando los resultados obtenidos del % recobro.
- f) Precisión intermedia. – Se inyectó en dos días distintos por triplicado y de manera independiente el placebo fortificado. De igual forma, se inyectó una disolución control a una concentración de 0.1 ppm de los aldehídos-DNFH. Con los resultados se calculó el % recobro para cada día, y luego se obtuvo el % CV global. Además, con los mismos datos del % recobro se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para conocer si el factor (día) tiene efecto medible sobre la variable dependiente (absorbancia).
- g) Límite de detección y límite de cuantificación. – Se prepararon disoluciones de concentración decreciente que contenían los tres aldehídos derivatizados. Para ello se partió de la preparación de una disolución a 0.1 ppm, la preparación de esta disolución fue realizada exactamente igual a lo descrito en las figuras 6,7 y 8 en la sección “4.2.1 *Búsqueda del intervalo de trabajo*”. A partir de la disolución a 0.1 ppm se realizaron una serie de diluciones como se muestra en la figura 13.



\*Todas las disoluciones se transfieren a un vial ámbar para cromatografía

**Figura 13.** Disoluciones de los aldehídos derivatizados para determinar el límite de detección y límite de cuantificación.

Posteriormente de la inyección de las disoluciones a 0.0015 ppm, 0.002 ppm, 0.004 ppm y 0.0045 ppm, descritas en la figura 13, se utilizó el software MassHunter Workstation® para determinar la relación señal-ruido (S/N) de cada analito en cada disolución.

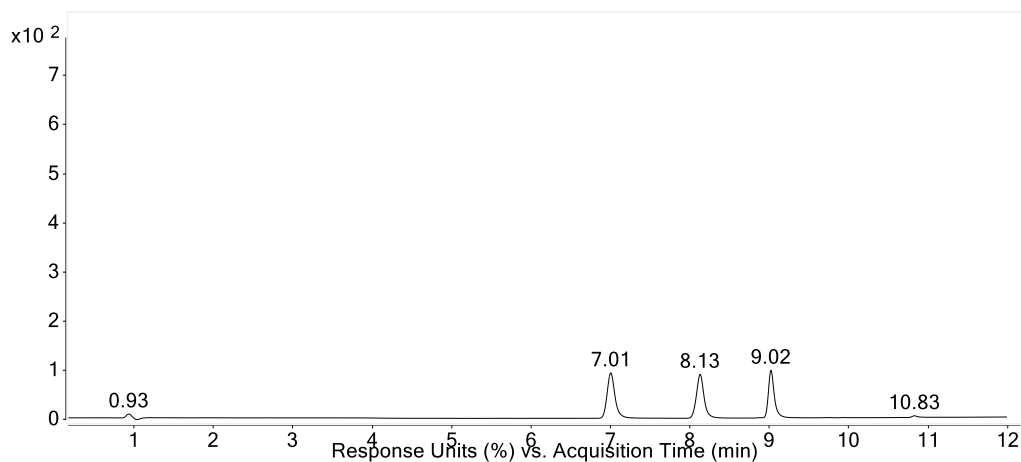
#### 4.4 Análisis de muestras comerciales

Se recibieron muestras de *e-liquids* sin conocimiento de su información de muestra para evitar el sesgo en el análisis. Al ya contar con un método analítico validado para la cuantificación de formaldehído, acetaldehído y acroleína presentes en los líquidos de vapeo se procedió al análisis de las muestras conforme el método propuesto en la sección “4.2.2 Preparación de la muestra”.

## CAPÍTULO 5: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Implementación del método analítico

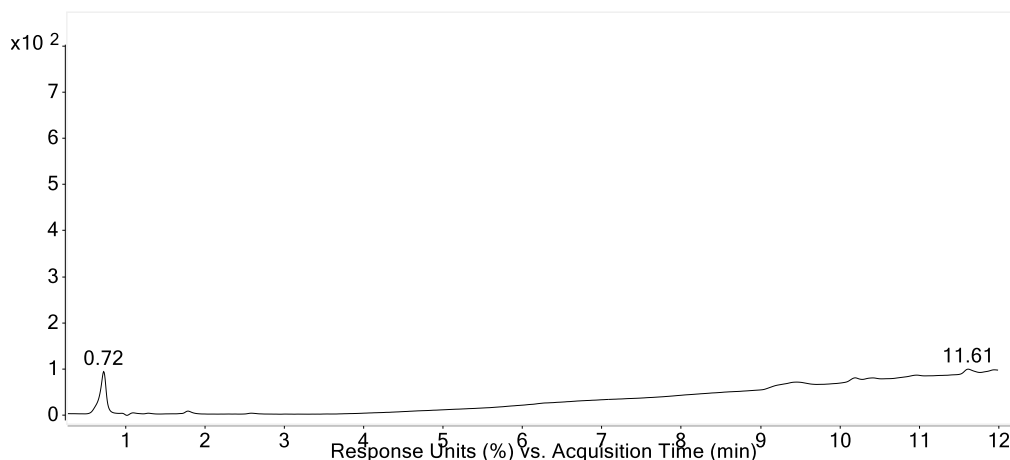
En la figura 14 se muestra el cromatograma obtenido de la inyección en el HPLC de la disolución de la mezcla de los aldehídos derivatizados a una concentración de 0.1 ppm mencionado en la sección “4.2 Implementación del método analítico”.



**Figura 14.** Cromatograma de los aldehídos derivatizados bajo las condiciones propuestas en implementación del método analítico.

El tiempo muerto es el tiempo que tarda en recorrer el sistema cromatográfico una especie que no es retenida en la columna. Es una variable esencial para determinar los parámetros cromatográficos. Para obtenerlo, se decidió emplear nitrato de potasio debido a que éste presenta transiciones electrónicas que permiten su detección mediante UV/Visible. Además, debido a su naturaleza como sal, no experimenta retención en la fase estacionaria.

En la figura 15, se presenta el cromatograma de la disolución empleada para la determinación del tiempo muerto. Con esto se estableció que el valor del tiempo fue de 0.72 minutos.



**Figura 15.** Cromatograma resultante de la inyección de la disolución de  $KNO_3$  empleada para determinar el tiempo muerto.

Una separación cromatográfica se considera exitosa cuando se cumplen con todos los parámetros cromatográficos: factor de capacidad, selectividad, resolución y eficiencia. Para obtenerlos, se requieren los tiempos de retención de cada analito. El tiempo de retención del formaldehído-DNFH fue de 7.01 minutos, mientras que para el acetaldehído-DNFH y la acroleína-DNFH fueron 8.13 minutos y 9.02 minutos, respectivamente. En la tabla 7 se muestran los resultados de cada uno de los parámetros cromatográficos calculados.

**Tabla 7.** Parámetros cromatográficos para cada aldehído

Parámetro	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH	Criterio de aceptación <sup>[55,56]</sup>
Factor de capacidad ( $k'$ )	8.74	10.29	11.53	$1 \leq k' \leq 10$
Selectividad ( $\alpha$ )	$\alpha_{FA/AA} = 1.18$ $\alpha_{AA/Acr} = 1.12$			$\alpha > 1$
Resolución ( $R_s$ )	$R_{sFA/AA} = 2.36$ $R_{sAA/Acr} = 2.07$			$R_s \geq 1.5$
Eficiencia (N)	3412.51	4787.46	8558.62	



A continuación, se presenta un ejemplo de cálculo para cada parámetro cromatográfico en relación con el formaldehído-DNFH. Los cálculos para el resto de los aldehídos se llevaron a cabo de manera similar.

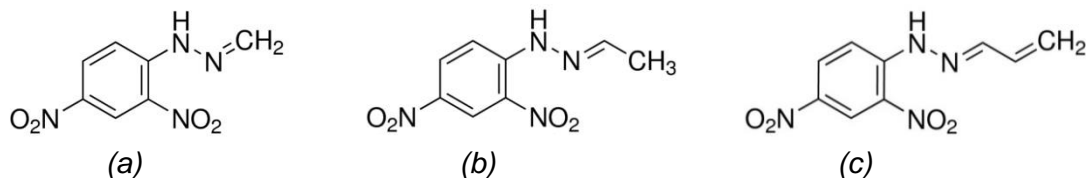
$$k' = \frac{7.01 \text{ min} - 0.72 \text{ min}}{0.72 \text{ min}} = 8.74$$

$$\alpha_{\text{FA/AA}} = \frac{(8.13 \text{ min} - 0.72 \text{ min})}{(7.01 \text{ min} - 0.72 \text{ min})} = 1.18$$

$$R_{\text{sFA/AA}} = \frac{2(8.13 \text{ min} - 7.01 \text{ min})}{0.48 \text{ min} + 0.47 \text{ min}} = 2.36$$

$$N = 16 \left( \frac{7.01 \text{ min}}{0.48 \text{ min}} \right)^2 = 3412.52$$

El factor de capacidad refleja la afinidad del analito por la fase estacionaria. Según los resultados de la tabla 7, se observa un aumento progresivo de la afinidad en el siguiente orden: FA-DNFH > AA-DNFH > Acr-DNFH. Este patrón observado era esperado debido al incremento en el número de carbonos en la cadena del aldehído, como se muestra en la figura 16. Conforme aumenta el tamaño de la cadena, la molécula se vuelve más hidrofóbica, lo que resulta en una interacción más pronunciada con la columna. Esta correlación en hidrofobicidad favorece una retención más prolongada y, en consecuencia, un mayor valor del factor de capacidad.



**Figura 16.** Estructura química (a) FA-DNFH, (b) AA-DNFH, (c) Acr-DNFH <sup>[57]</sup>.

Es deseable que este factor sea mayor a 1, ya que pueden existir solutos de elución temprana en la muestra, lo que afectaría la resolución de los picos cromatográficos de interés. Por otro lado, valores mayores a 10 indican que el tiempo de análisis es grande, caso que sucede con el AA-DNFH y Acr-DNFH donde ambos tienen valores mayores a 10; sin embargo, el tiempo de análisis también es consecuencia de las dimensiones de la columna. En el caso de esta columna, aunque el factor de capacidad de los analitos sea cercano a 10, el tiempo de análisis no se considera elevado.

La selectividad es un parámetro que indica la distinción entre dos picos contiguos. Al tener valores mayores de 1, se garantiza la ausencia de co-elución, es decir, se evita que dos o más compuestos tengan tiempos de retención idénticos y se dificulte la distinción entre picos. Al cumplir con el criterio se pueden distinguir claramente los máximos de cada pico, como se evidencia en la figura 14.

Al igual que la selectividad, la resolución se determina entre picos vecinos e indica la capacidad para separar los analitos de interés, permitiendo distinguir los dos picos a la base. Valores de resolución iguales a 1.5 permiten distinguir perfectamente las bases de cada analito, ya que el solapamiento es de tan solo del 0.3 %. En otras palabras, cuando se tengan valores  $\geq 1.5$  cada pico en el cromatograma corresponderá únicamente al analito que se esté analizando.

Los valores de la tabla 7 respecto a la resolución son mayores a 1.5, indicando que no existe solapamiento entre los picos. Esto asegura que el área bajo cada pico es exclusivamente atribuible al analito correspondiente, lo que permite su cuantificación.

En relación con el último parámetro cromatográfico, es importante destacar que un mayor número de platos (N) se traduce en una mayor eficiencia en la cromatografía, ya que indica un mayor número de equilibrios de reparto.

Al evaluar los valores registrados en la tabla 7, se puede concluir que la separación cromatográfica cumple con todos los parámetros requeridos y por lo tanto, las condiciones de separación y detección son adecuadas para el análisis de los aldehídos aquí presentes.

La elección de una fase reversa (C18) para la cromatografía es justificada por la polaridad de los analitos, a pesar de que los analitos interactúan con la columna mediante las cadenas de carbono de los aldehídos, su permanencia en la columna es limitada debido a su polaridad. Esto último resulta beneficioso por dos razones: acorta los tiempos de análisis y permite obtener cromatogramas más eficientes. La variación de polaridad entre los analitos posibilita su separación de ellos, facilitada por el uso de una fase móvil compatible. En esta instancia, se optó por la combinación de H<sub>2</sub>O:ACN. A medida que se realiza el análisis, se observa un aumento gradual en la proporción de ACN a lo largo del tiempo. Este incremento conlleva al aumento de la fuerza de elución, lo que favorece la elución de los analitos a través de la columna cromatográfica y así permitir la separación de los analitos mediante interacciones entre la fase móvil y la fase estacionaria.

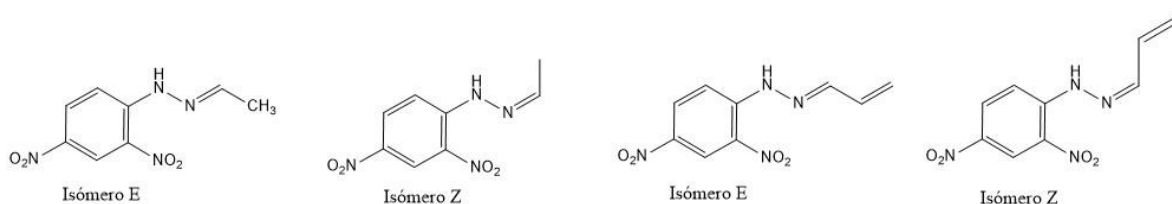
La elución por gradiente se emplea para modificar los tiempos de retención de los analitos, evitando que los componentes se eluyan demasiado lento, permitiendo que se logre a una separación más eficiente y controlada.

Como ya se mencionó anteriormente los aldehídos de interés en este trabajo deben someterse a un proceso de derivatización con la finalidad de ser detectados y ser estables, al estar derivatizado con un grupo cromóforo, se aprovecha esta propiedad para ser analizados mediante un detector de UV-Vis. Las longitudes de onda específicas para cada analito se detallan en la tabla 8 <sup>[58]</sup>.

**Tabla 8.** Longitud de onda con máxima absorbancia para los isómeros E y Z.

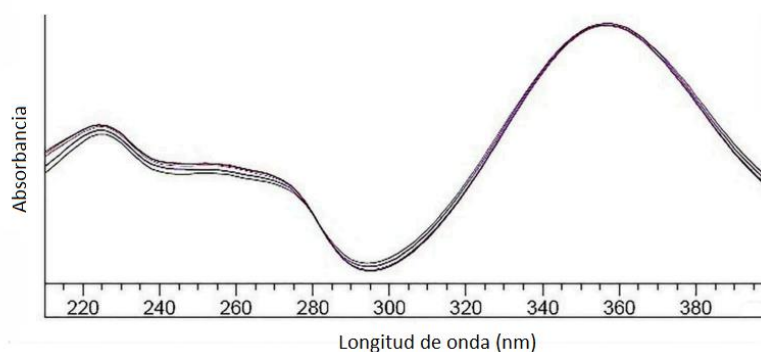
$\lambda$ (nm)	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH
	356	Isómero: E, 365 Z, 360	Isómero: E, 365 Z, 358

Las estructuras químicas para los isómeros E/Z del AA-DNFH y Acr-DNFH se muestran en la figura 17.



**Figura 17.** Estructura química de los isómeros E/Z para el acetaldheído-DNFH y acroleína-DNFH.

Sin embargo, la presencia de dicha isomería no implica un error al momento de cuantificar ya que la columna empleada no es quiral por lo que los isómeros no se separan y se cuantifican de manera conjunta. Además, aunque el máximo de absorbancia para el FA-DNFH es a 356 nm, se optó por emplear 365 nm debido a que, como se ilustra en la figura 18, esta elección se encuentra cercana al punto máximo del pico. Es relevante mencionar que los disolventes utilizados en la fase móvil no presentan absorción en esta longitud de onda.



**Figura 18.** Espectro UV del FA-DNFH <sup>[59]</sup>

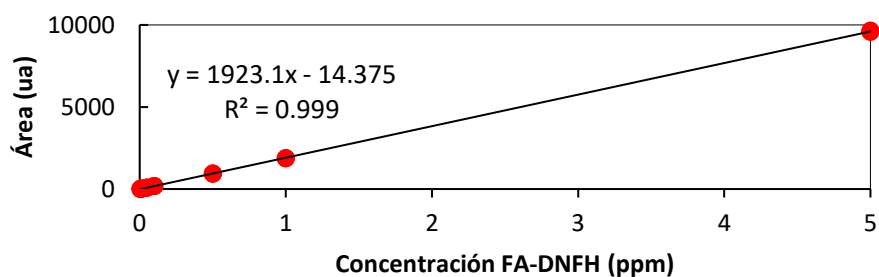
Por último, en cuanto a la temperatura, es importante mantenerla constante a lo largo de todos los análisis, con el propósito de prevenir cambios en los tiempos de retención, así como en la eficiencia cromatográfica. La temperatura que se

seleccionó fue aquella en la cual la evaporación del disolvente orgánico fuera despreciable.

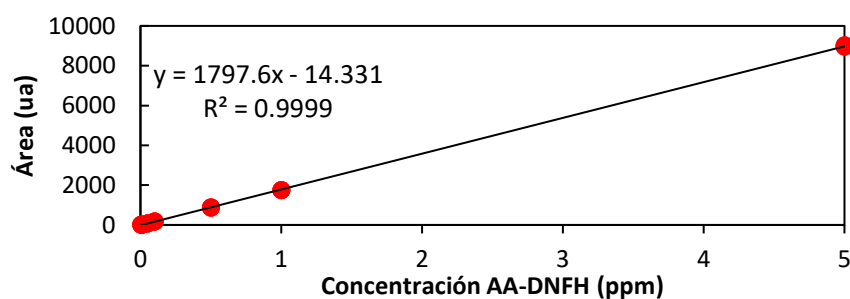
### 5.1.1 *Búsqueda del intervalo de trabajo*

Una vez que se contaron con las condiciones instrumentales adecuadas para la separación apropiada de los aldehídos, se procedió a buscar el intervalo de trabajo.

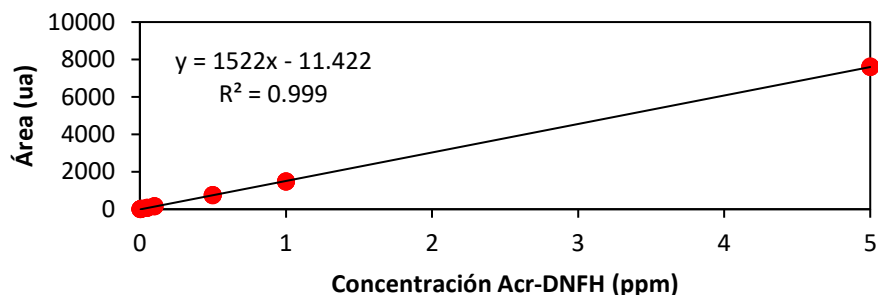
Con el objetivo de obtener el modelo matemático que reflejara el comportamiento de los datos experimentales en el intervalo de concentraciones estudiado, se realizó un análisis de datos por mínimos cuadrados para cada uno de los aldehídos derivatizados, empleando la herramienta de la hoja de cálculo Excel®. La regresión para el formaldehído-DNFH se muestra en la figura 19, mientras que para el acetaldehído-DNFH y acroleína-DNFH se muestran en la figura 20 y 21, respectivamente.



**Figura 19.** Regresión lineal con  $R^2$  y ecuación de la línea recta para FA-DNFH



**Figura 20.** Regresión lineal con  $R^2$  y ecuación de la línea recta para AA-DNFH



**Figura 21.** Regresión lineal con  $R^2$  y ecuación de la línea recta para Acr-DNFH

Para comprobar que los modelos matemáticos representan los datos experimentales se buscaron dos aspectos cruciales: primero, que los datos se ajustaran al modelo matemático y segundo la presencia de una correlación significativa entre las variables.

El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) puede tomar valores entre 0 y 1, valores más cercanos a uno indican que las variables independientes explican una mayor proporción de la variación de la variable dependiente. En este análisis, se obtuvieron valores de  $R^2$  superiores a 0.99 para todos los analitos, lo que indica que el modelo matemático explica los datos experimentales. Esto significa que, en este contexto, a medida que aumentó la concentración, la absorbancia también lo hizo.

Si bien  $R^2$  indica el grado de ajuste del modelo también se debe demostrar la existencia de una correlación significativa. Una correlación significativa indica la presencia de una relación entre dos variables. Para evaluar la significancia estadística de la correlación, se utiliza una prueba de hipótesis. En esta prueba, se plantean dos hipótesis: la hipótesis nula ( $H_0$ ) que sostiene que no existe correlación y la hipótesis alternativa ( $H_1$ ) que afirma sí existe correlación. El estadístico de prueba es la *t* de *student*, si  $t_{crítica} > t$  se rechaza la hipótesis nula, si esto no se cumple se acepta la hipótesis nula. En este caso, para todos los aldehídos se obtuvo que  $t_{crítica} > t$  por lo que la correlación es significativa. Los detalles de la prueba de hipótesis se muestran en el Anexo 8.1.

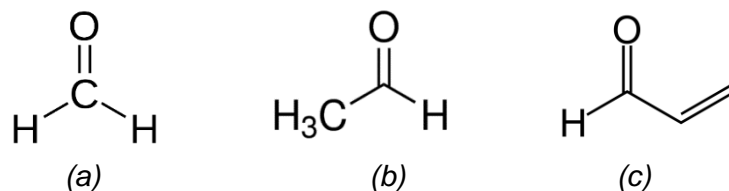
En conclusión, el modelo matemático representa los datos y existe una relación lineal y estadísticamente significativa entre la absorbancia y la concentración dentro del intervalo de concentraciones estudiado, que abarcó desde 0.005 ppm a 5.0 ppm. Dicho lo anterior, este intervalo de concentraciones fue empleado para la validación del método presentado en este trabajo.

### **5.1.2 Preparación de la muestra**

Las condiciones experimentales para la preparación de la muestra se estandarizaron únicamente para formaldehído, ya que era el único reactivo disponible. No fue posible incluir el acetaldehído y la acroleína en el estudio de la preparación de muestra debido a que estos dos aldehídos, junto con el formaldehído, se emplean en la síntesis de drogas [60-62].

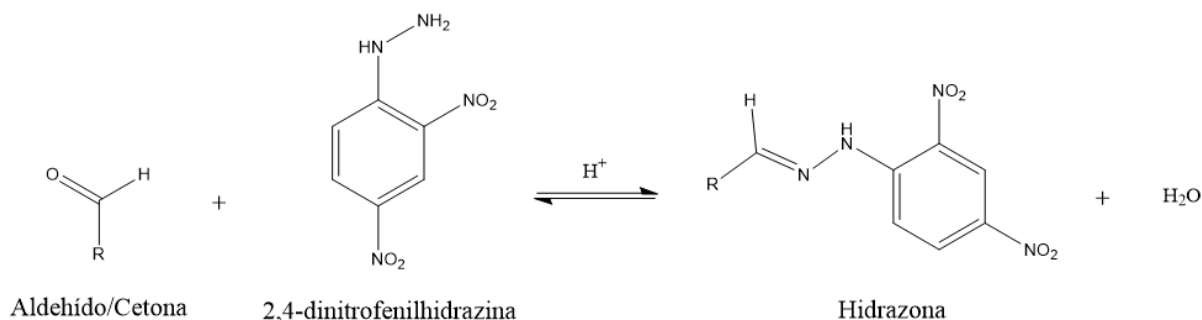
Sin embargo, es importante aclarar que las condiciones experimentales descritas en la sección “4.2.2 Preparación de la muestra” son aplicables para el acetaldehído y la acroleína. Esto debido a que en la reacción de derivatización con DNFH, el grupo funcional carbonilo (-CHO) del aldehído reacciona con el grupo amino (-NH<sub>2</sub>) de la DNFH para formar un producto derivado. Tanto el acetaldehído como la acroleína son aldehídos con grupos funcionales de carbonilo. La estructura química de estos compuestos es muy similar (figura 22), lo que indica una reactividad química análoga.

Para iniciar la reacción de derivatización es crucial la protonación del grupo carbonilo. En el caso de la acroleína se cuenta con dos sitios nucleofílicos que puede ser protonados: el doble enlace y el grupo carbonilo. Sin embargo, es altamente probable que la protonación ocurra en el átomo de oxígeno del grupo carbonilo, en lugar de en el doble enlace. Esto se debe a que el oxígeno es más nucleofílico debido a la presencia de electrones libres lo que lo hace más propenso a aceptar el protón en lugar de que el doble enlace forme un carbocatión. Lo que hace que el carbono quede con una carga parcial positiva ( $\delta^+$ ).



**Figura 22.** Estructuras químicas (a) formaldehído, (b) acetaldehído y (c) acroleína

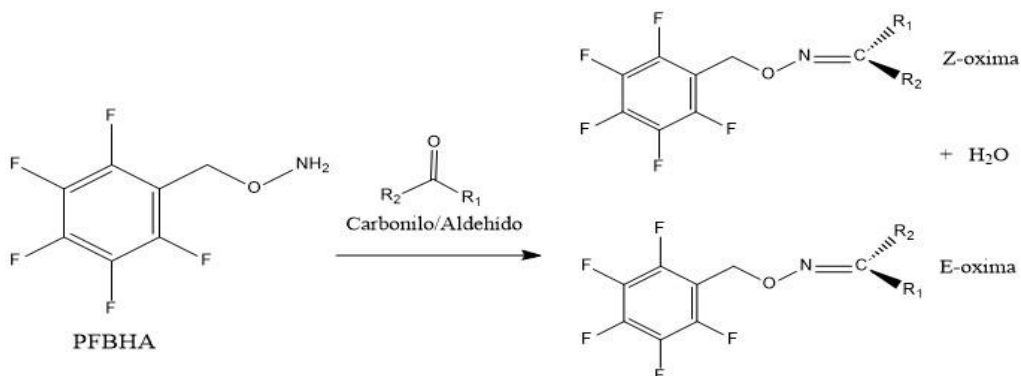
El agente derivatizante utilizado en el proceso de preparación de la muestra fue la 2,4-dinitrofenilhidracina; permitiendo así la detección mediante UV de estos aldehídos debido a la incorporación de un grupo cromóforo. Además, como ventaja adicional los productos resultantes de esta reacción, conocidos como hidrazonas, son derivados que tiene características de ser estables y no volátiles. Estas propiedades permiten de manera sencilla la detección y cuantificación de los aldehídos mediante cromatografía de líquidos acoplada a un detector UV-Vis. La ecuación química general que representa la reacción de derivatización con la DNFH se muestra en la figura 23.



**Figura 23.** Ecuación química de la reacción de derivatización de aldehídos con DNFH

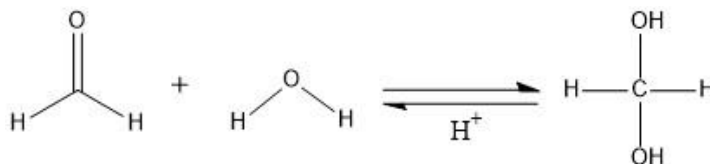
Aunque existen otras opciones para llevar a cabo la reacción de derivatización como el clorhidrato de *o*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)-hidroxilamina (PFBHA) donde se genera pentafluorobencil oxima, como se muestra en la figura 24. Los derivados son especialmente aptos para el análisis de GC/ECD, ya que los aldehídos producen oximas estables y volátiles a temperatura ambiente por la reacción con PFBHA [63], esta última característica no permite su cuantificación por cromatografía de líquidos.





**Figura 24.** Ecuación química de la reacción de derivatización de aldehídos con PFBHA.

Ahora bien, se consideró que el formaldehído se encontraba en su forma hidratada como se muestra en la figura 25, esto debido a que comercialmente se encuentra en disoluciones acuosas debido a que en su estado puro es un gas. Por esta razón, antes de llevar a cabo la reacción de derivatización con la DNFH, se realizó una reacción de deshidratación del formaldehído mediante la adición de HCl concentrado. Este paso fue crucial, ya que, si el formaldehído se encontraba en su forma hidratada, no permitiría el proceso de derivatización de manera completa.



**Figura 25.** Hidrato de formaldehído.

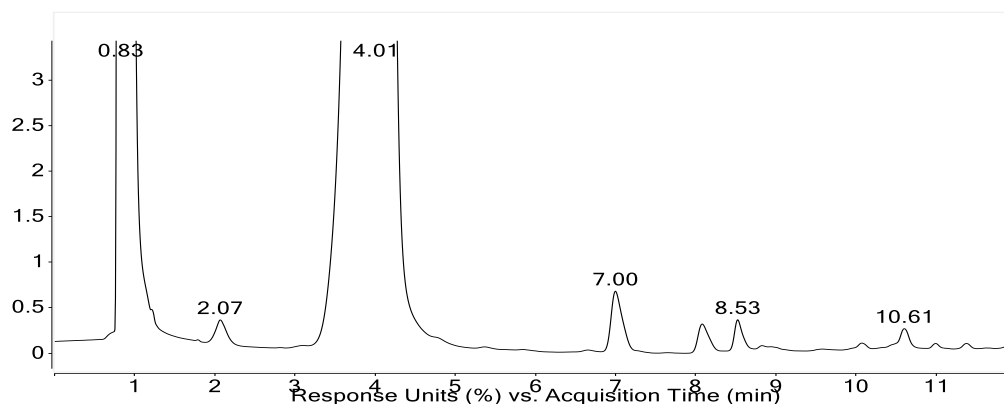
Se buscó encontrar las mejores condiciones para la reacción de derivatización realizando el proceso de agitación de dos maneras: 1 hora de agitación continua a 75 °C y 30 minutos de agitación a temperatura ambiente. En el experimento con calentamiento, se observó una disminución del área del pico correspondiente al formaldehído en comparación con el obtenido en el proceso de 30 minutos. Los resultados de estos dos ensayos se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Resultados de los experimentos para definir las condiciones de temperatura y tiempo de agitación en la reacción de derivatización del FA.

Condiciones experimentales	Calentamiento a 75 °C y una hora en agitación	Sin calentamiento y 30 minutos en agitación
Área FA-DNFH	58.27	105.39

La disminución del área en el experimento empleando calentamiento podría deberse a que el formaldehído ya estaba en su forma deshidratada, lo que facilitó su volatilización durante el proceso de calentamiento. Como la reacción no se llevó a cabo en un sistema completamente cerrado, parte del formaldehído se perdió en el momento en que se agregó el agente derivatizante, lo que se tradujo en una menor cantidad disponible para la derivatización y, por ende, una disminución en el área del pico de interés. Por esta razón, las condiciones finales para la preparación de la muestra fueron 30 minutos de agitación sin calentamiento. Esto no solo proporciona áreas más grandes, sino que también reduce significativamente el tiempo necesario para preparar la muestra.

El cromatograma resultante después de la reacción de derivatización del formaldehído, utilizando las condiciones finales se ilustra en la figura 26.

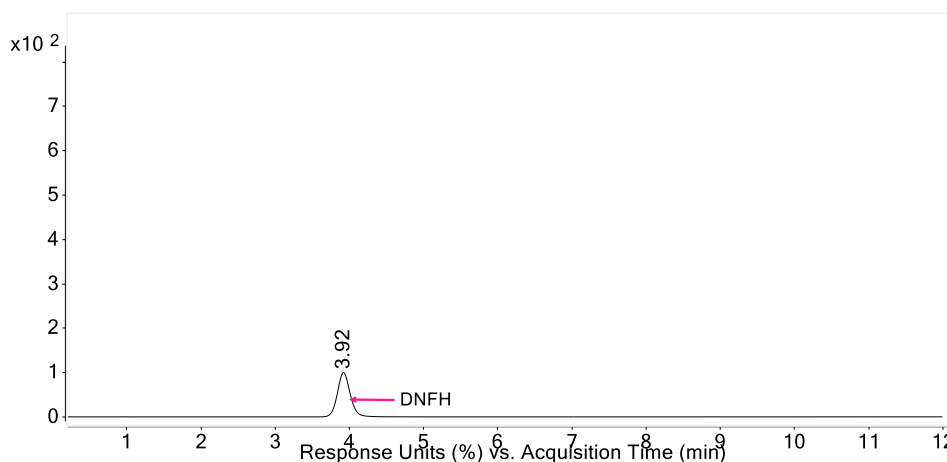


**Figura 26.** Cromatograma resultante de la reacción de derivatización de FA en agitación de 30 minutos a temperatura ambiente.

Comúnmente en todas las reacciones de derivatización, es esencial emplear un exceso del agente derivatizante para garantizar que la mayor cantidad posible del

analito reaccione. Con las condiciones finales establecidas se aseguró que lo anterior se cumpliría. Esto se muestra en la figura 26, donde se observa que el área del pico correspondiente a la DNFH (4.01 min) es considerablemente mayor que la del pico de interés.

Una vez definida la metodología de la preparación de la muestra, se corroboró que los reactivos empleados para la reacción de derivatización no interfirieran con la respuesta fisicoquímica de interés de los aldehídos derivatizados, esto puede demostrarse mediante la inyección del blanco de reactivo de la DNFH, mostrado en la figura 27.



**Figura 27.** Cromatograma resultante de la disolución del blanco de reactivo de DNFH.

En la figura 27, se puede observar claramente que el tiempo de retención ( $t_R = 3.92$  min) de la DNFH es considerablemente menor que los tiempos de retención de los analitos de interés. Esto resulta lógico ya que el DNFH presenta un momento dipolar mayor en comparación con las hidrazonas resultantes del proceso de derivatización ocasionando que su retención sea menor.

Esta diferencia en los tiempos de retención respalda la conclusión de que los reactivos empleados durante la preparación de la muestra no interfieren con los tiempos de retención de los aldehídos derivatizados de interés.

### **5.1.2.1 Rendimiento de la reacción de derivatización**

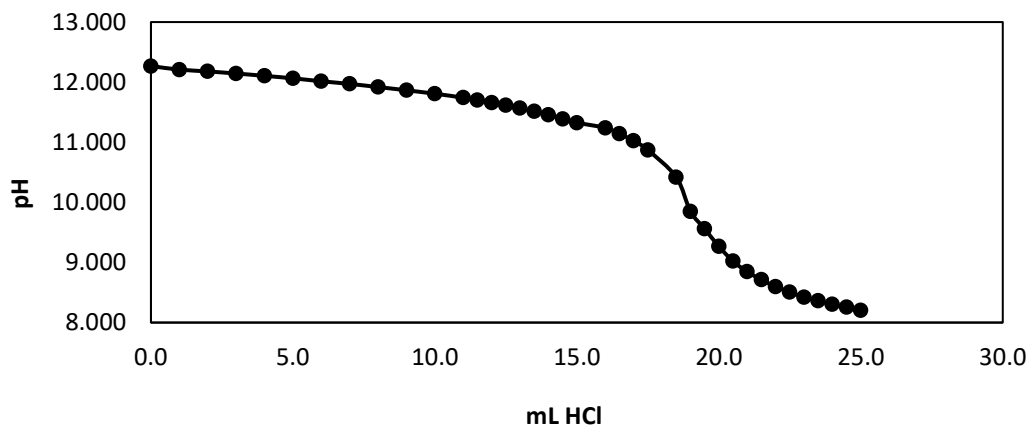
Al solo contar con el reactivo de formaldehído con una concentración desconocida, y sin opción a conseguir uno nuevo en ese momento, se decidió determinar su concentración. Esta determinación resultó de vital importancia, ya que era esencial conocer la concentración del formaldehído para calcular la concentración de la alícuota sujeta al proceso de derivatización.

El proceso de derivatización necesariamente se llevó a cabo utilizando el formaldehído en su forma libre. Esto se debió a que los aldehídos de interés presentes en la muestra comercial se encuentran de esta misma forma química. Al someter el formaldehído en su forma libre al proceso de derivatización, se pudo determinar el rendimiento de la reacción de derivatización al realizarlo bajo las condiciones finales detalladas en la sección “4.2.2 Preparación de la muestra”.

Para conocer la concentración de formaldehído se realizó una titulación indirecta: la reacción auxiliar se trata de una reacción redox entre el sulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ) y el formaldehído ( $\text{H}_2\text{CO}$ ). Mientras que, en la reacción de monitoreo analítico, el NaOH formado en la primera reacción se tituló utilizando HCl. De esta manera, la cantidad de HCl necesaria para neutralizar el NaOH generado proporcionó la información necesaria para calcular la concentración de formaldehído <sup>[64]</sup>.

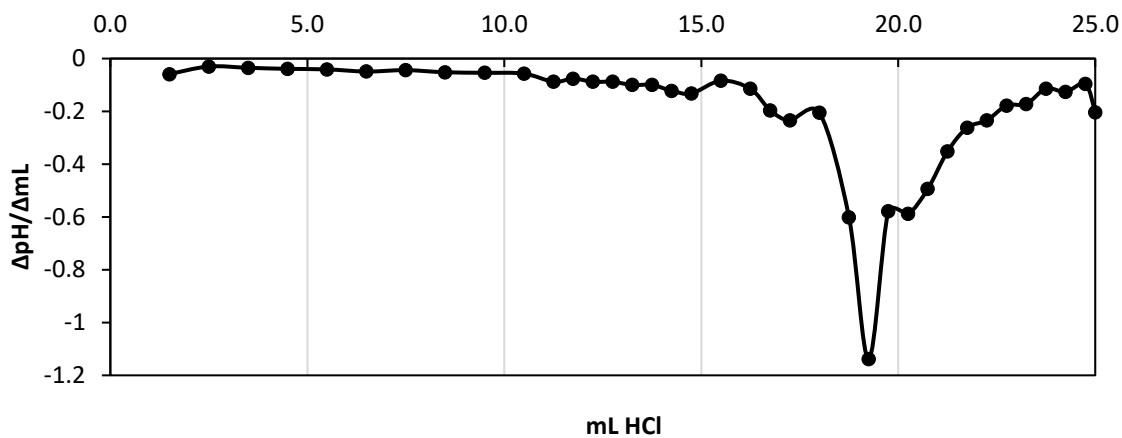
Aunque la reacción auxiliar posee una estequiometría definida y es cuantitativa, su cinética es lenta <sup>[65,66]</sup>. Por este motivo, se llevó a cabo la determinación del formaldehído mediante una titulación indirecta. En dicha titulación, la reacción de monitoreo exhibe una estequiometría definida, es cuantitativa y de cinética rápida.

Los resultados experimentales de la titulación potenciométrica se muestran en el Anexo 8.2. La representación gráfica de la curva de titulación se muestra en la figura 28.

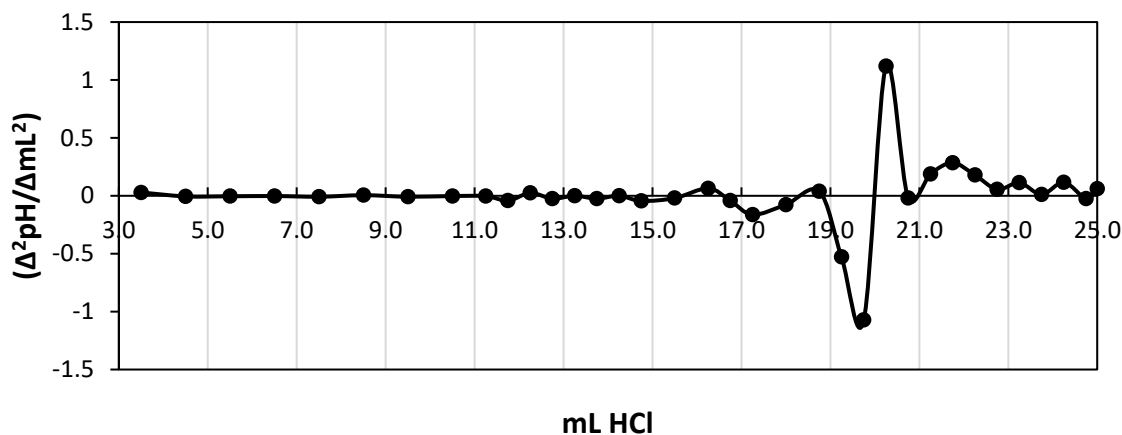


**Figura 28.** Titulación del formaldehído con HCl mediante potenciometría.

Para determinar el volumen del punto final, se aplicó el criterio de la primera (figura 29) y segunda derivada (figura 30).



**Figura 29.** Criterio de la primera derivada para calcular el volumen del punto final.



**Figura 30.** Criterio de la segunda derivada para calcular el volumen del punto final.

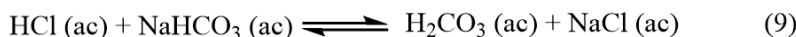
El volumen del punto final empleando el criterio de la primera derivada corresponde al mínimo de la curva, en este caso es 19.3 mL. Mientras que en el método basado en la segunda derivada para identificar volumen del punto final de la titulación se busca el valor que intercepte en cero en el eje de abscisas, resultando en 20.8 mL. En el caso de que los volúmenes obtenidos difieran, se calcula el promedio para conocer el volumen del punto final. Los pasos de este cálculo se muestran a continuación:

$$\frac{19.3 \text{ mL} + 20.8 \text{ mL}}{2} = 20.0 \text{ mL}$$

De esta manera, el volumen necesario de ácido clorhídrico para la titulación del formaldehído corresponde a 20.0 mL. Para determinar la concentración del formaldehído se determinó la concentración del HCl utilizado, ya que al tratarse de un patrón secundario su disolución debe estandarizarse empleando un patrón primario, en este caso el carbonato de sodio.

La normalización del ácido clorhídrico se llevó a cabo a través de una titulación colorimétrica, siendo las reacciones químicas representadas por las ecuaciones (8) y (9) las involucradas en el proceso. Ambas reacciones son de cinética rápida, estequiometría definida, pero solo la (9) es cuantitativa. Motivo por el cual se escogió

un indicador visual para el pH al equilibrio determinado por esta última ecuación química.



Los resultados de la normalización se muestran en la tabla 10.

**Tabla 10.** Resultados de la normalización de HCl con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

Ensayo	Masa Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (g)	Volumen HCl (mL)	Concentración HCl (mol/L)
1	0.1012	17.9	0.11
2	0.1018	17.8	0.11
3	0.1014	18.0	0.11
		promedio	0.11

El ejemplo del cálculo realizado para obtener la concentración del HCl se muestra a continuación:

$$0.1012 \text{ g de Na}_2\text{CO}_3 \times \frac{1 \text{ mol Na}_2\text{CO}_3}{105.99 \text{ g}} \times \frac{2 \text{ mol HCl}}{1 \text{ mol Na}_2\text{CO}_3} \times \frac{1}{0.0179 \text{ L}} = 0.11 \text{ mol HCl/L}$$

Al conocer la concentración del ácido clorhídrico se procedió a determinar la del formaldehído. El ejemplo del cálculo se muestra a continuación

$$20.0 \text{ mL} \times \frac{0.11 \text{ mol HCl}}{1000 \text{ mL dis}} \times \frac{1 \text{ mol NaOH}}{1 \text{ mol HCl}} \times \frac{1 \text{ mol FA}}{1 \text{ mol NaOH}} \times \frac{1}{0.01 \text{ L}} \times \frac{100.0 \text{ mL}}{10 \text{ mL}} \times \frac{25.0 \text{ mL}}{4 \text{ mL}} = 13.75 \text{ mol FA/L}$$

Finalmente, la concentración se expresó en unidades de % m/v, mismas unidades reportadas en el marbete. A continuación, se presenta el cálculo:

$$13.75 \frac{\text{mol FA}}{\text{L}} \times \frac{30.031 \text{ g FA}}{1 \text{ mol FA}} \times \frac{1 \text{ L}}{1000 \text{ mL}} \times 100 \% = 41 \% \text{ m/v}$$

Una vez determinada la concentración de formaldehído, se procedió a derivatizar una alícuota de esta disolución al 41 % m/v. La derivatización se realizó siguiendo la metodología descrita en la sección "4.2.2.1 Rendimiento de la reacción de

*derivatización*”. Considerando el volumen de la alícuota y asumiendo una reacción de derivatización completa, la concentración final antes de la inyección fue de 0.10 ppm.

Posterior a realizar el proceso de derivatización del formaldehído libre, se procedió a comparar los valores de las áreas obtenidas con el área de la disolución control de FA-DNFH a 0.1 ppm. Esta comparación es válida ya que, al emplear un estándar con trazabilidad metrológica, se conoce perfectamente su pureza y, en consecuencia, su respuesta fisicoquímica a la concentración establecida.

En la tabla 11 se muestran los resultados obtenidos para determinar el rendimiento de la reacción de derivatización del formaldehído con DNFH.

**Tabla 11.** Resultados del rendimiento de la reacción de derivatización del FA con DNFH.

Ensayo	Área FA-DNFH	% Rendimiento
Disolución control	170.33	
1	105.39	62
2	105.32	62
3	100.43	59
Promedio		<b>61</b>

El ejemplo de cálculo para obtener el rendimiento de la reacción se muestra a continuación:

$$\frac{105.39}{170.33} \times 100 \% = 62 \%$$

El promedio del porcentaje del rendimiento es del 61 %. Este aspecto es importante contemplarlo al momento de realizar la cuantificación de los aldehídos en las muestras. Por consiguiente, el rendimiento calculado se usó como un factor de corrección para determinar la concentración total de los aldehídos de interés en las muestras de *e-liquids*.



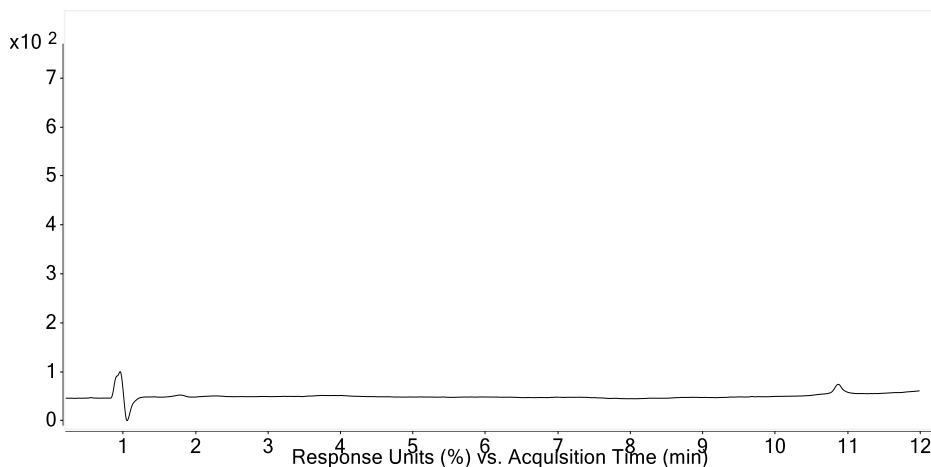
## 5.2 Validación del método analítico

### a) Selectividad

Es crucial determinar si el método es selectivo, dado que éste no evalúa directamente la concentración sino más bien una propiedad específica, en este contexto, la absorbancia. En consecuencia, al demostrar la selectividad del método, se garantiza que la propiedad medida sea exclusivamente atribuible al analito y no a alguna sustancia química o físicamente similar. Este parámetro es esencial para evitar cualquier sesgo en los resultados de la medición.

Con el propósito de evidenciar la selectividad se inyectaron una serie de disoluciones conocidas como blancos.

El cromatograma resultante de la inyección del blanco del disolvente se presenta en la figura 31. En este cromatograma, se observa que el disolvente no tiene respuesta fisicoquímica a la longitud de onda de trabajo, y que no contiene impurezas que puedan interferir con la respuesta de los analitos. Además, al inyectarlo, se confirma que el equipo cromatográfico está libre de interferencias.

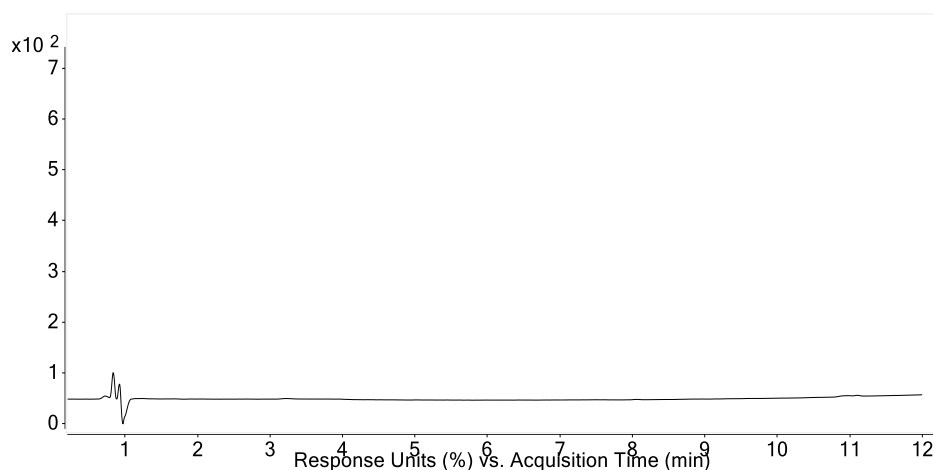


**Figura 31. Blanco de disolvente**

Es importante tener en cuenta que las muestras de *e-liquids* tienen como componente principal una mezcla de propilenglicol y glicerina, que puede variar en

sus proporciones, siendo la más común una relación de 70:30 de propilenglicol:glicerina. En este trabajo se preparó una disolución con estas proporciones de estos disolventes con la finalidad de simular el entorno químico de una muestra real. A esta disolución, que carece de analito, se le conoce como placebo o blanco de matriz. Por otro lado, en la sección “4.2.2 Preparación de la muestra” se definió una masa de 0.6 g de la muestra, misma masa que se empleó para la disolución del blanco del placebo. Es así como el blanco de placebo simula el entorno químico de la muestra y refleja el procedimiento de preparación de ésta.

Al inyectar el blanco de placebo y no tener respuesta fisicoquímica (figura 32) en las condiciones cromatográficas definidas para este método se confirma que en el proceso de preparación de la muestra los componentes mayoritarios no interfieren con la respuesta de los analitos de interés.

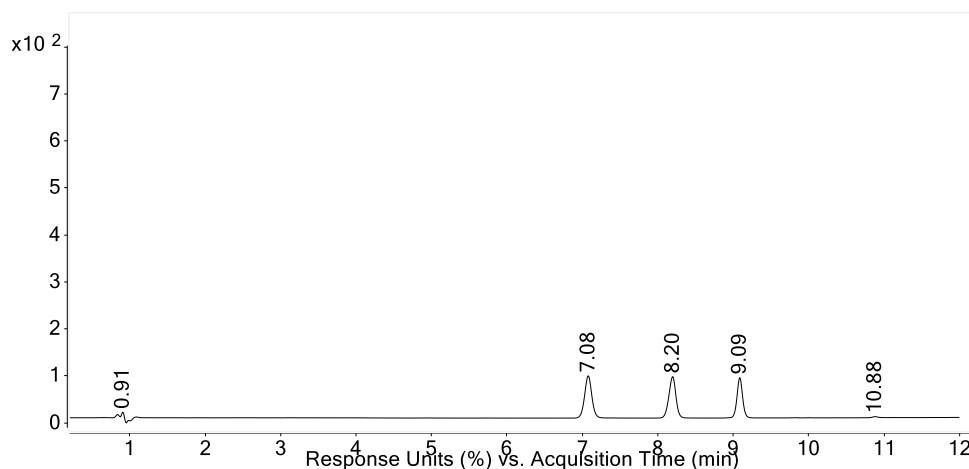


**Figura 32.** Blanco de placebo

Adicionalmente, en el proceso de preparación de la muestra, es necesario emplear un agente derivatizante (DNFH). Razón por la cual se debe asegurar que este compuesto no interfiera de ninguna manera con la respuesta fisicoquímica de los analitos al momento de la medición de la muestra. En la sección “5.1.2 Preparación de la muestra” el cromatograma de la figura 27 se muestra que la DNFH efectivamente no interfiere con los analitos.

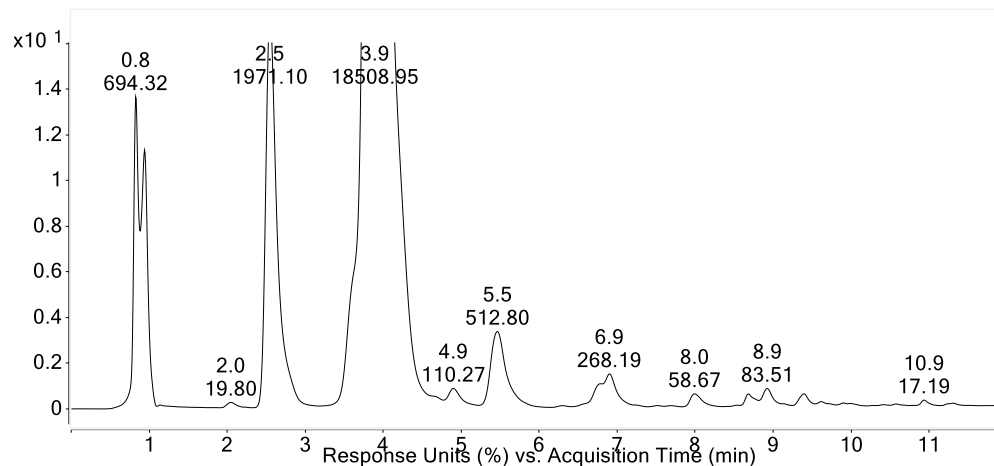
Una vez que se obtuvo evidencia objetiva de que los compuestos mayoritarios presentes en los *e-liquids*, así como el disolvente utilizado para preparar la muestra y que el agente derivatizante, no interfieren con los analitos, se procedió a realizar la inyección del placebo fortificado.

El cromatograma de la disolución del placebo fortificado se presenta en la figura 33. Con el placebo fortificado se tiene como propósito simular el comportamiento químico de los aldehídos en una muestra comercial. Al contrastar cromatogramas de la figura 33 y figura 14, se aprecia que los picos obtenidos tras la adición del placebo continúan manteniendo su resolución, eficiencia, selectividad, así como sus correspondientes tiempos de retención. Esto indica que el placebo no altera el comportamiento de los picos de los analitos.



**Figura 33.** Placebo fortificado.

Finalmente, con el objetivo de conocer si existía la posibilidad de introducir o generar interferencias a lo largo de todo el procedimiento de preparación de muestra y durante el análisis instrumental, se preparó un blanco de proceso. Este blanco de proceso consistió en emplear el método de análisis completo a una cantidad definida de placebo. El cromatograma de este blanco se muestra en la figura 34.



**Figura 34.** Blanco de proceso, en el cromatograma se muestra el tiempo de retención y el área.

En el cromatograma de la figura 34, se pueden observar señales en los tiempos de retención de los analitos de interés. Sin embargo, para abordar este problema, se decidió inyectar varios blancos de proceso. Al obtener áreas similares en todos los blancos de proceso realizados, se pudo concluir que en el proceso de preparación de muestra existen interferentes de manera constante. Gracias a este conocimiento, es posible determinar la respuesta del blanco de proceso y restar dichas áreas a los cromatogramas de las muestras, permitiendo así conocer la respuesta de los aldehídos de interés en los *e-liquids*.

Con toda la evidencia mostrada anteriormente, se concluye que el método es selectivo por lo que la respuesta analítica se debe únicamente a los aldehídos derivatizados de interés.

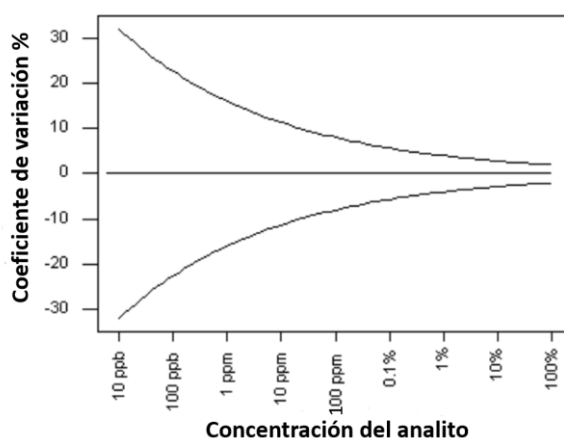
#### b) Repetibilidad del sistema

Para el parámetro de repetibilidad se analizó el coeficiente de variación (% CV) de la respuesta fisicoquímica. Al considerar el % CV, es importante introducir el concepto de la trompeta de Horwitz.

De acuerdo con la trompeta de Horwitz, la cual se muestra en la figura 35, el coeficiente de variación aumenta conforme disminuye la concentración del analito.

Una característica importante es que el comportamiento entre el coeficiente de variación y la concentración es independiente de la naturaleza del analito y del principio físico del método de medición [67].

Es fundamental tener en cuenta este comportamiento del coeficiente de variación debido a que los aldehídos que se desean cuantificar en el presente trabajo se encuentran en concentraciones a nivel traza, ya que como se mencionó anteriormente estos no son añadidos intencionalmente como saborizantes, sino que están presentes en la materia prima empleada para la fabricación de *e-liquids* o se generan como subproductos de degradación.



**Figura 35.** Trompeta de Horwitz [68]

El cambio en el % CV en función de la concentración se puede representar mediante la ecuación de Horwitz [69] (ecuación 10):

$$\% CV_p = C^{-0.15} \quad (10)$$

Donde C es la concentración del analito de manera adimensional, es decir Kg/Kg, mg/mg, etc., y % CV<sub>p</sub> es el coeficiente de variación predicho.

El objetivo de emplear la relación de Horwitz (HorRat), mostrada en la ecuación 11, es establecer el criterio de aceptación basado en el valor del % CV experimental de

la relación de Horwitz. Al aplicar esta ecuación, es fundamental tener en cuenta que, en condiciones de repetibilidad, los valores aceptables resultantes de aplicar la relación de Horwitz se encuentran entre 0.5 y 2, aunque no son límites absolutos. Valores < 0.5 pueden indicar promedio no reportados o excelente entrenamiento y experiencia; mientras que desviaciones > 2 pueden indicar no homogeneidad de las muestras, necesidad de mejorar el método o entrenamiento, operaciones bajo el límite de detección o un método no satisfactorio [70].

$$\text{HorRat} = \frac{\% \text{ CV experimental}}{\% \text{ CV}_p} \quad (11)$$

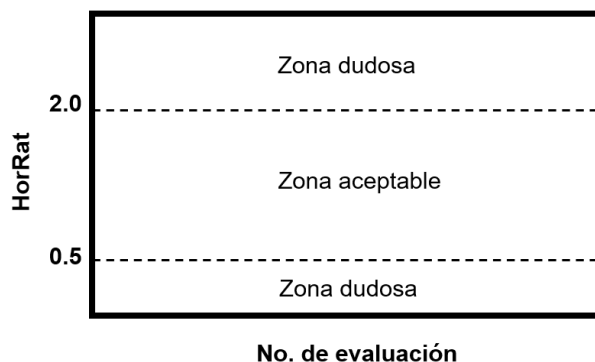
Para el parámetro de repetibilidad se realizó la inyección de una disolución de los aldehídos derivatizados a punto central, es decir, 0.10 ppm. Por lo que para obtener el coeficiente de variación predicho (% CV<sub>p</sub>) mediante la ecuación (10) este valor se transforma a mg/mg. Obteniendo un % CV<sub>p</sub>:

$$0.1 \text{ ppm} \equiv 1.27 \times 10^{-7}$$

$$\% \text{ CV}_p = (1.27 \times 10^{-7})^{-0.15}$$

$$\% \text{ CV}_p = 10.8$$

Posteriormente, se optó por utilizar un valor de 1.5 en la relación de Horwitz (ecuación 11) debido a que este valor se encuentra en un punto intermedio entre los límites inferior y superior de los valores aceptables de HorRat, según se muestra en la figura 36. Esto sugiere una aproximación equilibrada que busca mantener un nivel razonable sin estar en los extremos de la escala de aceptación.



**Figura 36.** Gráfico de control de HorRat <sup>[71]</sup>

Una vez que se definió el valor de HorRat, lo único que quedó por hacer fue calcular el % CV experimental. Para ello, se sustituyen los valores de HorRat y el % CV<sub>p</sub> en la ecuación 11, obteniendo:

$$1.5 = \frac{\% \text{ CV experimental}}{10.8}$$

$$\% \text{ CV experimental} = 1.5 \times 10.8 = 16 \%$$

En conclusión, el parámetro de repetibilidad del sistema tiene como criterio de aceptación un % CV ≤ 16 %.

Los resultados obtenidos para el presente parámetro se muestran en la tabla 12. Al tenerse valores del % CV ≤ 16 % se puede establecer que el sistema es repetible.

**Tabla 12.** Resultados de repetibilidad del sistema

	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH
% CV	3.0	3.0	3.2

c) Linealidad del sistema

Se ha confirmado que la respuesta del equipo en el intervalo de concentraciones, que va desde 0.005 ppm hasta 5.0 ppm es lineal, lo que llevó a la validación del modelo matemático en este mismo intervalo. Los criterios de aceptación del

presente trabajo se basan en la “*Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos*” y comprenden:

- $R^2 \geq 0.98$ ,
- El intervalo de confianza de la pendiente no debe incluir al cero
- No debe existir tendencia en el gráfico de residuales.

Se ha demostrado con anterioridad en el apartado “4.2.1 *Búsqueda del intervalo de trabajo*” que para todos los analitos se cumple el primer criterio de aceptación, recordando que esto indica que los datos se ajustan correctamente al modelo matemático.

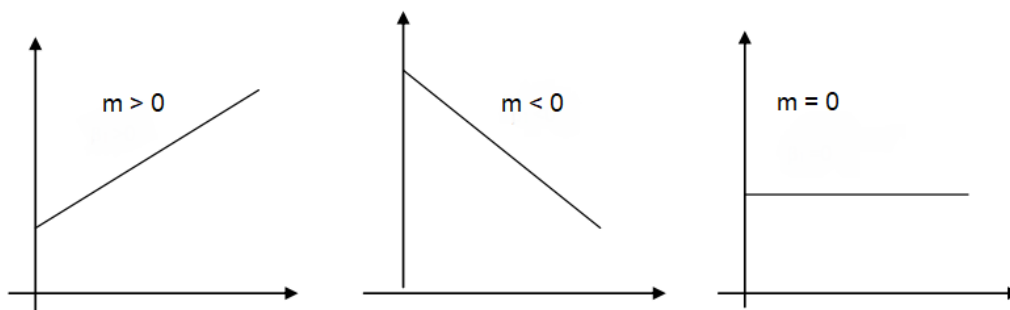
Para entender los dos criterios restantes se abordará algunos conceptos del modelo de regresión simple.

El modelo de regresión lineal simple puede ser representado como  $y = b + mx + \varepsilon$ , donde  $b$  y  $m$  son parámetros del modelo y  $\varepsilon$  es una variable aleatoria, llamada error, que explica la variabilidad en  $y$  que no se puede explicar con la relación lineal entre  $x$  y  $y$ .

Los errores,  $\varepsilon$ , se consideran variables aleatorias independientes distribuidas normalmente con media cero. Esto implica que el valor medio o valor esperado de  $y$  es igual a  $b + mx$ .

La ecuación de regresión lineal simple indica que el valor esperado de  $y$  es una función lineal de  $x$ . Si  $m = 0$  entonces  $y = b$ , y en este caso el valor medio no depende de  $x$  y se concluye que  $x$  y  $y$  no tienen relación lineal. Caso contrario, si  $m \neq 0$  entonces las dos variables se relacionan. Los distintos valores que puede tomar  $m$  se representan gráficamente en la figura 37 [72].





**Figura 37.** Valores posibles para la pendiente.

Evidentemente, siempre se busca que  $m \neq 0$ , y para propósitos de este estudio que  $m > 0$ , ya que como se sabe la absorbancia es directamente proporcional a la concentración.

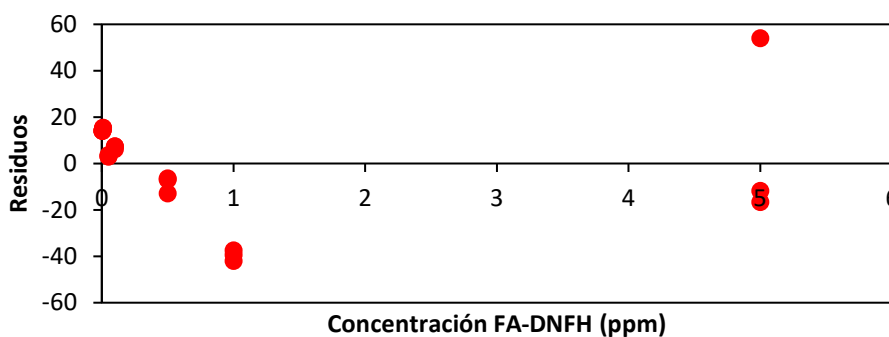
Para demostrar que las variables se relacionan, y que por lo tanto se tiene una regresión significativa se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) donde se obtuvieron los valores del estadístico F. Al igual que otras pruebas estadísticas, se tienen dos hipótesis, la nula ( $H_0$ ) y la alternativa ( $H_1$ ), su significado se muestra a continuación:

$$H_0: F < F_{\text{crítica}}, \quad \text{la regresión no es significativa}$$

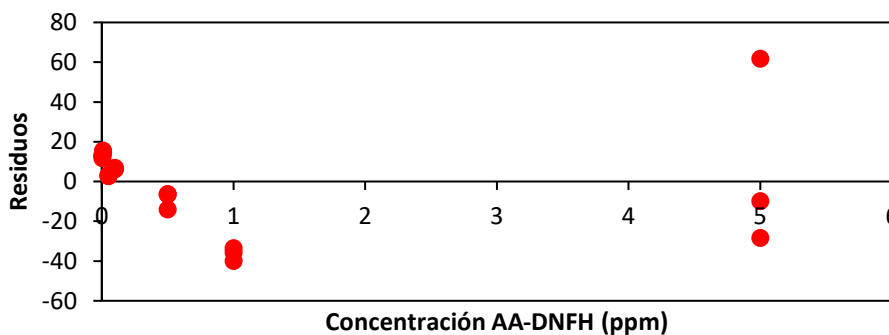
$$H_1: F > F_{\text{crítica}}, \quad \text{la regresión sí es significativa}$$

Para todos los aldehídos derivatizados se cumplió la hipótesis alternativa indicando que la regresión es significativa. Junto con el ANOVA, se obtiene para cada compuesto de interés el IC para la pendiente a un nivel de confianza del 95 %. Para todos los analitos se cumple que el intervalo de confianza (IC) no incluye el cero, esto es muy importante debido a que como se muestra en la figura 37 si  $m = 0$  entonces nunca observaría un cambio en la absorbancia sin importar lo que aumente la concentración, lo que brindaría nula información de la concentración de los aldehídos en las muestras de los *e-liquids*. Los resultados del estadístico F, así como el intervalo de confianza de la pendiente, se encuentran detallados en las tablas de ANOVA que se pueden consultar en el anexo 8.3.

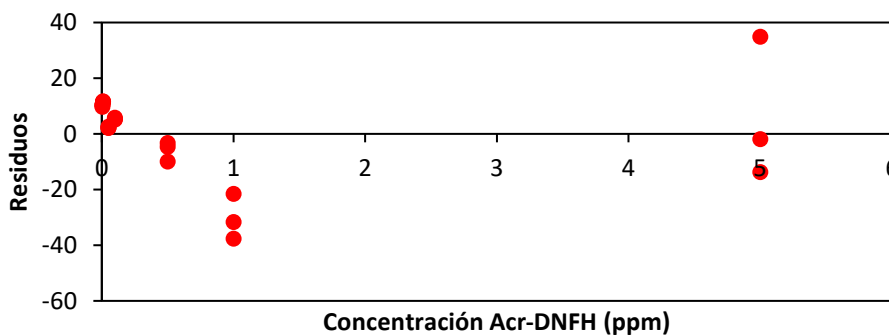
Finalmente, a continuación, se muestran los gráficos de residuales correspondientes al formaldehído-DNFH, acetaldehído-DNFH y acroleína-DNFH en la figura 38, 39 y 40, respectivamente.



**Figura 38.** Gráfico de residuales para FA-DNFH



**Figura 39.** Gráfico de residuales para AA-DNFH



**Figura 40.** Gráfico de residuales para Acr-DNFH

En todos los aldehídos derivatizados, se aprecia que no existe tendencia en los residuales, lo que sugiere que el modelo lineal está libre de error sistemático. Por lo tanto, el valor de  $\varepsilon$  es igual a cero, y cualquier sesgo que pueda surgir al emplear el modelo matemático será atribuido a la variabilidad aleatoria.

En síntesis, los modelos matemáticos obtenidos para cada analito cumplen con los criterios de aceptación, indicando que pueden ser empleados para la cuantificación de los aldehídos derivatizados con DNFH, ya que representan el comportamiento de los datos experimentales y son proporcionales a la concentración del analito.

A manera de resumen, los modelos matemáticos para cada analito se muestran en la tabla 13.

**Tabla 13.** Ecuación de la regresión lineal para cada aldehído.

	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH
Modelo matemático	$ua = 1923.15 \text{ [ppm]} - 14.38$	$ua = 1797.64 \text{ [ppm]} - 14.33$	$ua = 1521.99 \text{ [ppm]} - 11.42$

De acuerdo con la definición de la Guía de Eurachem, la sensibilidad analítica es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida. Para los aldehídos analizados en este trabajo la sensibilidad analítica de cada aldehído derivatizado fue de 1923.15 ua/ppm, 1797.64 ua/ppm y 1521.99 ua/ppm para FA-DNFH, AA-DNFH y Acr-DNFH, respectivamente.

#### d) Veracidad

La veracidad se relaciona con el error sistemático y normalmente se evalúa en términos de sesgo, dicho sesgo puede indicar deficiencias en la extracción o si existe la presencia de componentes que interfieran en la determinación del analito.

Se evaluó el parámetro inyectando una serie de placebos fortificados con una concentración de 0.10 ppm de los aldehídos derivatizados. Luego, se preparó una disolución a 0.10 ppm de los aldehídos-DNFH. Los resultados de esta disolución se

establecieron como los valores convencionalmente aceptados como verdaderos, ya que al analizar las disoluciones en ausencia de placebo, se conoce su respuesta fisicoquímica propia del analito. Lo anterior junto con la trazabilidad del material de referencia permitió realizar la comparación de los resultados de los placebos fortificados con el valor de referencia.

Las áreas de las disoluciones empleadas para evaluar este parámetro se muestran en la tabla 14.

**Tabla 14.** Resultados experimentales para evaluar veracidad.

Ensayo	Área FA-DNFH	Área AA-DNFH	Área Acr-DNFH
Solución control	192.20	181.62	140.80
1	190.12	180.12	140.16
2	193.49	184.30	142.94
3	189.10	180.40	140.29
4	188.89	180.46	139.68
5	192.10	183.34	142.25
6	188.65	179.58	139.17

Con los datos experimentales de la tabla 14, se obtuvo el sesgo y % de recuperación, así como los intervalos de confianza del % recuperación a un 95 % de confianza. Estos resultados se muestran en la tabla 15.

**Tabla 15. Resultados para el parámetro de veracidad.**

	% Recuperación FA-DNFH	% Recuperación AA-DNFH	% Recuperación Acr-DNFH	Sesgo FA- DNFH	Sesgo AA- DNFH	Sesgo Acr- DNFH
	98.92	99.17	99.55	-1.08	-0.83	-0.45
	100.67	101.48	101.52	0.57	1.48	1.52
	98.39	99.33	99.64	-1.61	-0.67	-0.36
	98.28	99.36	99.20	-1.72	-0.64	-0.80
	99.95	100.95	101.03	-0.05	0.95	1.03
	98.15	98.88	98.84	-1.85	-1.12	-1.16
Promedio	99.06	99.86	99.96			
Desviación estándar muestral (S)	1.03	1.07	1.07			
t crítica	2.57	2.57	2.57			
ICI	97.98	98.73	98.84			
ICS	100.14	100.99	101.08			

Como criterio de aceptación de acuerdo con la “*Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos*” el intervalo de confianza para el porcentaje de recuperación debe incluir el 100 % o bien que el promedio aritmético del % de recuperación se incluya en el intervalo 98-102 %.

El intervalo de confianza calculado incluye al 100 % para los tres aldehídos, lo que significa que el promedio de recuperación es estadísticamente equivalente al 100 %. El sesgo indica cuánto se aleja el mensurando del valor de referencia, que es el 100 %, ya sea por encima o por abajo. Es importante resaltar que al alcanzar una recuperación del 100 %, el sesgo no tiene relevancia significativa. Dado que se cumple con el criterio de aceptación, se puede afirmar que el método es veraz. Esto garantiza que, al aplicar el método analítico, se podrá asegurar que el valor numérico obtenido de dicho método será realmente la concentración del analito presente en la muestra.

e) Repetibilidad del método

El objetivo de este parámetro es verificar con evidencia objetiva que, al aplicar el método analítico bajo condiciones de repetibilidad, se obtendrán resultados consistentes. Para llevar a cabo esta evaluación, se calculó el coeficiente de variación del % recuperación utilizando los mismos datos obtenidos en el parámetro de veracidad. Los resultados se presentan en la tabla 16.

**Tabla 16.** Resultados de repetibilidad del método.

	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH
% CV	1.04	1.07	1.07

Previamente, el laboratorio estableció, a través de la relación de Horwitz un criterio de aceptación que requiere un  $\% CV \leq 16 \%$

El % CV para todos los analitos es menor al 16 %, por lo que el método es repetible.

f) Precisión intermedia

La evaluación de la precisión intermedia ofrece información sobre la variabilidad en los resultados cuando se realizan mediciones en un mismo laboratorio, pero bajo condiciones que son más variables que las condiciones de repetibilidad. Para este trabajo, se optó por evaluar la variabilidad de los resultados al aplicar el método en diferentes días. Esta decisión busca emular las condiciones más cercanas a la realidad, ya que las mediciones se realizan en periodos de tiempo diferentes.

Al igual que en el parámetro de veracidad, se realizó la inyección de una disolución control a 0.10 ppm de los aldehídos-DNFH, que sería el valor de referencia. Las áreas de las disoluciones empleadas para evaluar este parámetro se muestran en la tabla 17.

**Tabla 17.** Resultados experimentales para evaluar precisión intermedia.

Día 1			
Ensayo	Área FA-DNFH	Área AA-DNFH	Área Acr-DNFH
Solución control	188.49	178.02	138.34
1	188.79	180.61	140.55
2	192.10	183.34	142.25
3	193.49	184.30	142.94
Día 2			
4	193.24	184.1	142.31
5	178.56	169.47	131.21
6	172.58	164.82	127.52

Con los resultados de la tabla 17, se compararon las áreas de los placebos fortificados con el valor de referencia para obtener el % recuperación y finalmente obtener el coeficiente de variación global del % recuperación para cada analito. Además, con los resultados del % recuperación se realizó un estudio de análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En la tabla 18 muestra el valor del % CV global.

**Tabla 18.** Coeficiente de variación global para precisión intermedia

Día 1			
	% Recuperación FA-DNFH	% Recuperación AA-DNFH	% Recuperación Acr-DNFH
	100.159	101.455	101.598
	101.915	102.988	102.826
	102.653	103.528	103.325
Día 2			
	102.520	103.415	102.870
	94.732	95.197	94.846
	91.467	92.767	93.394
% CV global	4.75	4.71	4.48

De acuerdo con los datos presentados en la tabla 18, se observa que el % CV global calculado para cada analito es inferior al 16 %, que previamente se ha establecido como el criterio de aceptación. Esto sugiere que los resultados obtenidos de la metodología analítica implementadas en el LANCIC-IQ repetidas en diferentes días son parecidas entre sí.

En la tabla 19, 20 y 21, se presentan los resultados del análisis de varianza (ANOVA) de una vía para formaldehído-DNFH, acetaldehído-DNFH y acroleína-DNFH, respectivamente. Los resultados del ANOVA señalan que, para todos los aldehídos evaluados, el valor de la estadística F obtenido es menor que el valor crítico para F. Lo anterior indica que las medias son estadísticamente iguales, es decir, se acepta la hipótesis nula ( $H_0$ ). El significado de la hipótesis nula y la alternativa se muestra a continuación, donde  $\mu$  representa la media:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_k \text{ entonces } F < F_{\text{crítica}}$$

$$H_1: \text{no todas las medias son iguales entonces } F > F_{\text{crítica}}$$

En otras palabras, el resultado obtenido por el método analítico no cambiaría debido a realizarlo en días distintos. Se concluye que el método cumple con precisión intermedia.

**Tabla 19.** Análisis de varianza de una vía para FA-DNFH

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	42.7102164	1	42.7102164	2.52065888	0.18755682	7.70864742
Dentro de los grupos	67.7762735	4	16.9440684			
Total	110.48649	5				



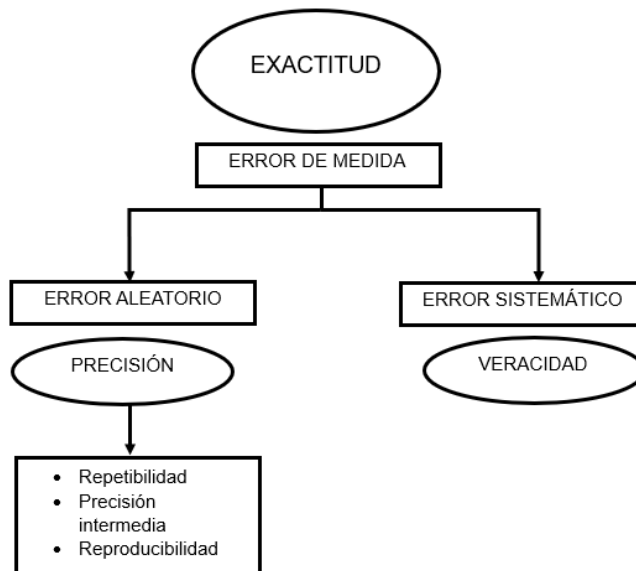
**Tabla 20. Análisis de varianza de una vía para AA-DNFH**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	45.8769286	1	45.8769286	2.84129731	0.16715029	7.70864742
Dentro de los grupos	64.5858895	4	16.1464724			
Total	110.462818	5				

**Tabla 21. Análisis de varianza de una vía para Acr-DNFH**

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	46.1447954	1	46.1447954	3.4388462	0.13728586	7.70864742
Dentro de los grupos	53.6747417	4	13.4186854			
Total	99.8195371	5				

Al realizar la validación de métodos analíticos, los parámetros de precisión y veracidad tratan de investigar la exactitud de los resultados evaluando los efectos sistemáticos y aleatorios. Por lo tanto, normalmente la exactitud se estudia como dos componentes “veracidad” y “precisión” [47], esta relación se muestra en la figura 41. Se ha demostrado que el método en cuestión exhibe tanto veracidad como precisión a dos niveles, lo que implica que las mediciones efectuadas mediante este método analítico estarán exentas de variación sistemática. En consecuencia, cualquier variación observada estará ligada únicamente a la aleatoriedad, por ende los resultados serán exactos.



**Figura 41.** Relación entre la exactitud y los tipos de error.

g) Límite de detección y límite de cuantificación

Para obtener el límite de detección y el límite de cuantificación, se siguió la indicación establecida en la “*Guía de validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos*”, que indica que se requiere una relación  $S/N = 3$  para el límite de detección, mientras que para el límite de cuantificación una relación de  $S/N = 10$ .

Según los datos de la tabla 22, se detectó la presencia de formaldehído-DNFH y acetaldehído-DNFH en los *e-liquids* cuando sus concentraciones fueron iguales a 0.0015 ppm, mientras que para la acroleína-DNFH, cuando las concentraciones superaban los 0.0015 ppm. Por otro lado, estos aldehídos fueron cuantificados con exactitud a partir de concentraciones mayores a 0.004 ppm.

**Tabla 22.** Relación S/N para determinar el LD y LC.

	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH
S/N (0.0015 ppm)	3.1	3.6	2.8
S/N (0.002 ppm)	5.8	5.9	5.2
S/N (0.004 ppm)	9.5	9.3	8.6
S/N (0.0045 ppm)	14.7	15.0	13.8

En términos de ng/mL de muestra, el LD y el LC para cada analito se muestra en la tabla 23.

**Tabla 23.** Resultados para el límite de detección y límite de cuantificación para FA-DNFH, AA-DNFH y Acr-DNFH.

	FA-DNFH	AA-DNFH	Acr-DNFH
LD (ng/mL de muestra)	6.00	6.00	LD > 6.0
LC (ng/mL de muestra)		LC > 16.0	

El ejemplo de cálculo para obtener al límite de detección del formaldehído derivatizado en términos de ng/mL de muestra se muestra a continuación:

$$\frac{0.0015 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} \times 2.0 \text{ mL} \times \frac{1}{0.5945 \text{ g placebo}} \times \frac{1.1889 \text{ g}}{\text{mL}} \times \frac{10^6 \text{ ng}}{1 \text{ mg}} = 5.99 \approx 6.00$$

El principal propósito del presente trabajo fue cuantificar los aldehídos previamente mencionados. Los resultados de la tabla 23, resaltan que es posible cuantificarlos cuando sus concentraciones son superiores a 16.00 ng/mL de muestra. Esto demuestra que el detector de UV/Vis tiene un bajo ruido por lo que el equipo puede diferenciar entre el ruido y una respuesta fisicoquímica debida al analito, incluso a bajas concentraciones. La capacidad de lograr límites de cuantificación tan bajos

tiene un potencial significativo para tener estándares de calidad rigurosos, lo que resulta fundamental en diversas aplicaciones analíticas y en el control de calidad.

### 5.3 Declaración de validación

<b>Método</b>	<b>Cuantificación de formaldehído, acetaldehído y acroleína mediante HPLC-UV en e-liquids, previa derivatización.</b>		
<b>Referencia</b>	Guía de validación de métodos analíticos. Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos.		
<b>Especificación de los requisitos</b>	Que cumplan todos los parámetros de validación en el intervalo de trabajo. Los criterios de aceptación son los mismos para todos los analitos.		
<b>Periodo de realización</b>	Noviembre 2022 – Agosto 2023		
<b>Validación del método analítico</b>			
<b>Parámetro de validación</b>	<b>Criterio de aceptación</b>	<b>Resultado</b>	<b>Veredicto</b>
Selectividad	Respuesta debida únicamente al analito de interés	Se da como evidencia un conjunto de cromatogramas	<b>Cumple</b>
Repetibilidad del sistema	% CV de la respuesta $\leq 16$ %	FA-DNFH: 3.0 % AA-DNFH: 3.0 % Acr-DNF: 3.2 %	<b>Cumple</b>
Linealidad	$R^2 \geq 0.98$ $y = mx + b$ (sin tendencia en residuales) IC(m) no incluye al cero	FA-DNFH ua = 1923.15 ppm – 14.38 ua $R^2 = 0.99$ AA-DNFH ua = 1797.64 ppm – 14.33 ua $R^2 = 0.99$ Acr-DNFH ua = 1521.99 ppm – 11.42 ua $R^2 = 0.99$	<b>Cumple</b>
Veracidad	Recobro 98 % - 102 % y que el IC incluya al 100%	FA-DNFH: 99.06 % AA-DNFH: 99.86 % Acr-DNF: 99.96 % Para todos los aldehídos se cumple que el IC contiene el 100 %	<b>Cumple</b>

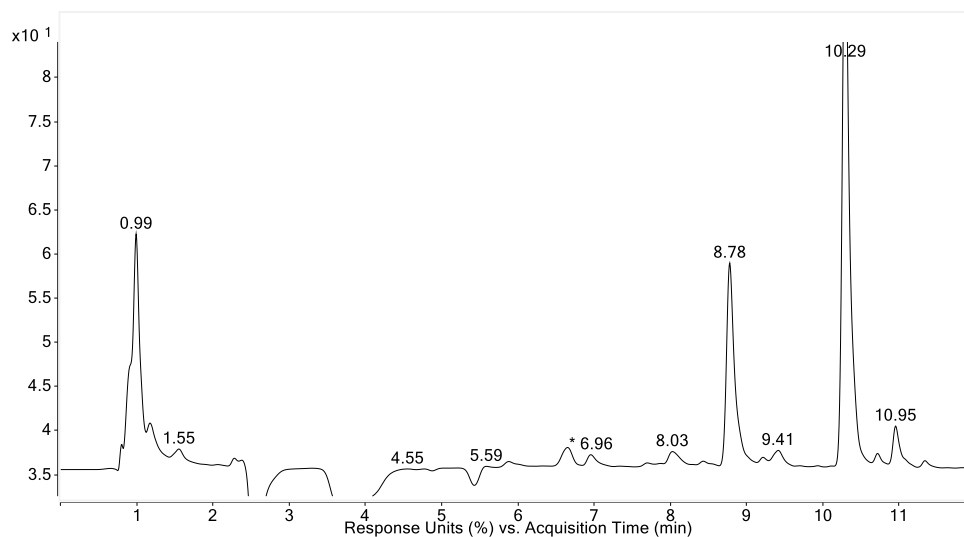
Repetibilidad del método	% CV de los recobros $\leq 16$ %	FA-DNFH: 1.04 % AA-DNFH: 1.07 % Acr-DNF: 1.07 %	Cumple
Precisión intermedia	% CV global $\leq 16$ % Factores no significativos	FA-DNFH: 4.75 % AA-DNFH: 4.71 % Acr-DNF: 4.48 % Sin factores significativos para todos los aldehídos.	Cumple
Sensibilidad analítica (ua/ppm)	Valor de m diferente de cero	FA-DNFH 1923.15 ua/ppm AA-DNFH 1797.64 ua/ppm Acr-DNFH 1521.99 ua/ppm	Cumple
Límite de detección (ng/mL de muestra)	Informativo (LD < LC)	FA-DNFH: 6.00 AA-DNFH: 6.00 Acr-DNF LD > 6.0	Cumple
Límite de cuantificación (ng/mL de muestra)	Informativo	Para todos los aldehídos LC > 16.0	Cumple
<b>Declaración de validación</b>			
El método es adecuado para su propósito			

Los cromatogramas resultantes de la validación del presente trabajo se encuentran en el anexo 8.4

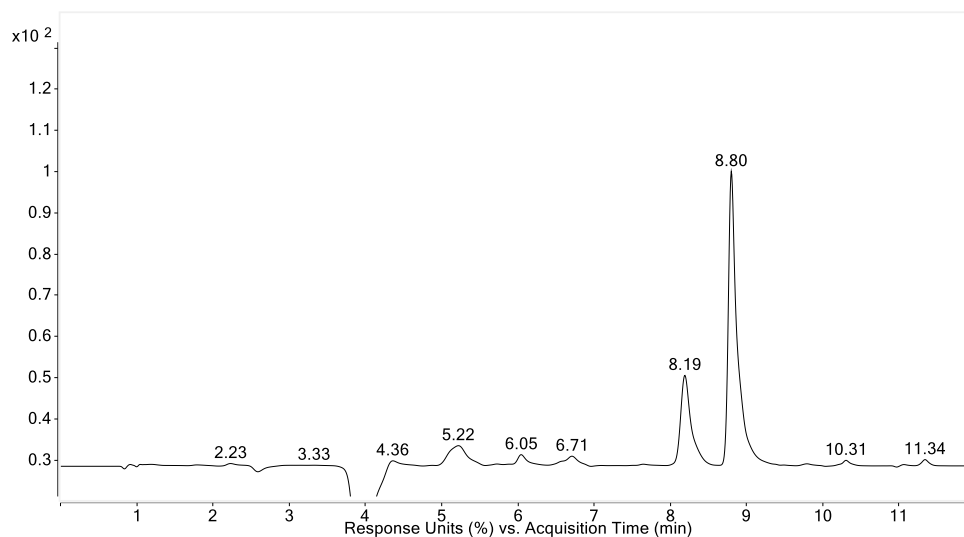
### **5.4 Análisis de muestras comerciales**

Con la metodología desarrollada y validada en el presente trabajo, se realizó el análisis de 20 muestras comerciales de *e-liquids* de origen mexicano, proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud Pública. Sin embargo, por cuestiones de confidencialidad del proyecto, solo se reportaron los resultados de dos de ellas. En las figuras 42 y 43 se pueden observar los cromatogramas resultantes del análisis de las muestras. Posteriormente, se procedió a interpolar las áreas de los cromatogramas utilizando los modelos matemáticos correspondientes,

lo que permitió obtener las concentraciones de los aldehídos presentes en *e-liquids*, los resultados se detallan en la tabla 24. Cabe recordar que para el análisis de los resultados se restó el área del blanco de proceso y que además se aplicó el factor de corrección del 61 % mencionada en el apartado “5.1.2.1 Rendimiento de la reacción de derivatización”.



**Figura 42.** Muestra “E-032” de *e-liquid*.



**Figura 43.** Muestra “A-029” de *e-liquid*.

**Tabla 24.** Resultados de la cuantificación de FA-DNFH, AA-DNFH y Acr-DNFH en muestras de *e-liquids*. ND = No detectable.

Muestra	FA-DNFH (ng/mL de muestra)	AA-DNFH (ng/mL de muestra)	Acr-DNFH (ng/mL de muestra)
E-032 *	128.20	230.78	ND
A-029 *	ND	6701.76	ND
E-032 +	210.16	378.33	ND
A-029 +	ND	10986.48	ND

\*Concentración considerando un rendimiento del 61 %

+Concentración aplicando el factor de corrección.

El ejemplo de cálculo para aplicar el factor de corrección se muestra a continuación:

$$\frac{128.20 \text{ ng mL}^{-1}}{61 \%} \times 100 \% = 210.16 \text{ ng/mL de muestra}$$

Algo importante a destacar es que las concentraciones reportadas en varios estudios donde cuantifican estos aldehídos en *e-liquids* principalmente de manufactura coreana y estadounidense van desde 100 ng/mL a 11500 ng/mL para el formaldehído, mientras que para el acetaldehído de 300 ng/mL a 1450 ng/mL, y finalmente para la acroleína de 20 ng/mL a 9550 ng/mL<sup>[11, 51]</sup>, estos resultados junto con los de tabla 24, hacen destacar la falta de regulación en el tipo de materia prima que se emplea en la fabricación de estos dispositivos. Esto mismo se ve reflejado en la tabla 24, donde la concentración de un mismo analito varía significativamente entre muestras. Es particularmente alarmante notar que los cigarrillos de manufactura mexicana presentan una concentración de acetaldehído que supera en más de 7 veces la concentración encontrada en los cigarrillos de otros países para este este mismo compuesto, siendo éste un posible carcinógeno.

En especial en Europa ya se empiezan a realizar algunas normas directrices nacionales sobre cigarrillos electrónicos y *e-liquids*, por ejemplo, en “The French standard XP D90-300-2” contiene los requerimientos para los *e-liquids*, donde se indica los siguientes límites para los siguientes compuestos <sup>[73]</sup>:

- Formaldehído (22000 ng/mL)
- Acetaldehído (200000 ng/mL)
- Acroleína (22000 ng/mL)

Considerando los límites previamente establecidos para cada tipo de aldehído y contrastándolos con las concentraciones registradas en cada muestra, se comprueba que ninguna de ellas sobrepasa los valores permitidos. No obstante, es crucial tener en cuenta la presencia de humectantes, como el propilenglicol y la glicerina, que constituyen más del 95 % del *e-liquid*. Estos componentes representan una fuente adicional de formaldehído y acroleína, lo que significa que las concentraciones de estos aldehídos en el vapor del cigarrillo pueden aumentar considerablemente. Esta situación implica un riesgo para la salud de los consumidores, especialmente para el grupo objetivo de este producto, que abarca a adolescentes y jóvenes.

Por otro lado, diversos estudios han evidenciado la aparición de tumores nasales, principalmente en ratas y ratones cuando son expuestos a niveles elevados de formaldehído a partir de 6 ppm (6000 ng/mL) en adelante. Incluso a concentraciones de 0.7 ppm (700 ng/mL), se han identificado la formación de aductos de DNA. Asimismo, concentraciones a partir de 0.5 ppm (500 ng/mL) provocan irritación en los ojos y las vías respiratorias <sup>[74]</sup>. Dado que el formaldehído es reconocido como un carcinógeno humano, es posible que no exista un nivel de exposición considerado seguro, lo que subraya la importancia de minimizar todo contacto con esta sustancia.

En lo que respecta al acetaldehído, se ha informado irritación ocular en pruebas con voluntarios humanos a concentraciones de 50 ppm (50000 ng/mL), y a niveles más altos, de 100000 - 2000000 ng/mL, se presentan síntomas de irritación de nariz o garganta. En el caso de ratas expuestas crónicamente a 750000 ng/mL o más durante un periodo de 2 años, se ha confirmado que esto resulta en cáncer de



mucosa nasal. Además, la exposición continua puede desencadenar irritación ocular persistente que provoca daños duraderos e incluso bronquitis [75].

Los análisis realizados para la acroleína revelan su marcada capacidad como irritante para las membranas mucosas, con posibilidad de generar irritaciones cutáneas a concentraciones elevadas. La inhalación de este compuesto puede generar diversos síntomas, como la irritación de nariz, garganta y pulmones, así como edema y hemorragia pulmonares, inclusive hasta la muerte en concentraciones considerables. Se reportó irritación nasal y de garganta, además de una reducción en la rapidez respiratoria en voluntarios expuestos a 0.3 ppm (300 ng/mL). Mientras tanto, en ratones se ha documentado casos de edema y hemorragia pulmonares para concentraciones que oscilan entre 2-5 ppm (2000-5000 ng/mL). En casos humanos expuestos a altas concentraciones, presentan síntomas análogos a los previamente mencionados, así como fiebre, disnea y cianosis [76].

Con los estudios previamente citados y considerando las concentraciones reportadas para las dos muestras analizadas en este trabajo, se puede concluir que estos aldehídos no representan un riesgo para la salud; sin embargo, es importante tener en cuenta otros factores que pueden afectar la cantidad presente de estos aldehídos en los cigarrillos electrónicos. La temperatura de calentamiento del *e-liquid*, la duración de la bocanada (*puff*) y la potencia de la batería son factores que al incrementarse favorecen la producción de estos aldehídos. Incluso hay artículos que mencionan que la proporción de glicerina y propilenglicol presente en el líquido de vapeo puede afectar la concentración de estos aldehídos en el vapor generado. En un estudio se probaron diferentes proporciones de propilenglicol y glicerina, para posteriormente producir el vapor a una temperatura de 191 °C, se observó que en el caso de la acroleína su concentración en el vapor incrementó cuando la proporción de glicerina también lo hizo, esto debido a que la principal fuente de este aldehído es la oxidación de la glicerina. Mientras que la concentración de formaldehído y acetaldehído incrementó cuando la proporción de propilenglicol fue

mayor debido a que este es más fácil de evaporizar en comparación con la glicerina provocando una mayor cantidad de aerosol [77, 78].

Se debe considerar que la falta de regulaciones para este producto implica que las concentraciones de formaldehído y acetaldehído en los cigarrillos electrónicos no estén estandarizadas (tabla 24), lo que hace que no se pueda garantizar que las concentraciones del formaldehído y acetaldehído estén siempre por debajo de los niveles de concentración que podrían causar daños a la salud.

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico, que implica la derivatización previa, para cuantificar formaldehído, acetaldehído y acroleína presentes en muestras de líquidos de vapeo (*e-liquids*) mediante HPLC-UV/Vis.
- El método analítico propuesto cumplió con todos los parámetros de validación por lo que puede ser empleado para su propósito.
- Mediante el método analítico validado en este estudio, se logró cuantificar, por primera vez en cigarrillos de manufactura mexicana, la presencia de formaldehído y acetaldehído en muestras de *e-liquids* proporcionadas por el INSP, en respuesta a su solicitud. Cabe destacar que en estas muestras no se detectó la presencia de acroleína.
- Las muestras proporcionadas por el INSP contienen una concentración de formaldehído y acetaldehído menor a la permisible en “The French standard XP D90-300-2”, por lo que las concentraciones de estos aldehídos no representan un riesgo para la salud; sin embargo, se debe considerar la aportación de formaldehído y acroleína debido al uso de humectantes como propilenglicol y glicerina. Además de factores como la temperatura de vaporización, proporción de los humectantes, potencia de la batería y duración de la bocanada.

## CAPÍTULO 7: REFERENCIAS

- [1] Gilman, L., (2004) Smoke: A Global History of Smoking. Reakiton Books.
- [2] Romero L., (2022) Utilización de vapeadores, problema de salud pública. Gaceta UNAM. <https://www.gaceta.unam.mx/utilizacion-de-vapeadores-problema-de-salud-publica/>
- [3] Peruga A., et. al., (2022) Consumo actual de cigarrillos electrónicos entre estudiantes de secundaria que nunca han fumado. Gac Sanit, 36 (5), 433-438. <https://doi.org/10.1016/j.gaceta.2022.01.004>
- [4] Medicine, N. A. O. S. E. A., Division, H. A. M., Practice, B. O. P. H. A. P. H., & Systems, C. O. T. R. O. T. H. E. O. E. N. D. (2018). Public health consequences of E-Cigarettes. National Academies Press.
- [5] Comisión Nacional Contras las Adicciones (s. f.). Cigarrillos electrónicos. gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/conadic/documentos/cigarrillos-electronicos>
- [6] Comisión Nacional contra las Adicciones (2019). Información técnica sobre los sistemas electrónicos de administración de nicotina (SEAN) y Similares sin nicotina (SSSN) popularmente conocidos como “cigarros electrónicos” o “vapers”.
- [7] Drip Fried Cream Cakes By Fryd” marketed by E Cigarette Empire LLC [Fotografía] <https://www.fda.gov/tobacco-products/ctp-newsroom/misleadingly-labeled-e-liquids-appeal-youth>
- [8] De Salud, S. (2019). 279. Emite Secretaría de Salud aviso epidemiológico por el uso de cigarrillos electrónicos o vapeo. gob.mx. <https://www.gob.mx/salud/prensa/279-emite-secretaria-de-salud-aviso-epidemiologico-por-el-uso-de-cigarrillos-electronicos-o-vapeo?idiom=es>
- [9] Los cigarrillos electrónicos son perjudiciales para la salud. (2020) Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/noticias/23-5-2020-cigarrillos-electronicos-son-perjudiciales-para-salud>

- [10] Lagunes D., (2022) La problemática en México con los cigarrillos electrónicos, un acercamiento desde la química analítica para el estudio de sus componentes. UNAM
- [11] Lee J., Patra J., Shin H., (2019) Analytical methods for determination of carbonyl compounds and nicotine in electronic No-Smoking aid refill solutions. Analytical Biochemistry, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113470>
- [12] Flora J., Wilkinson C., Wilkinson J., et. al. (2016) Method for determination of carbonyl compounds in e-cigarette aerosols. Journal of Chromatographic Science, 55 (2), 142-148, DOI: 10.1093/chromsci/bmw157
- [13] Papoušek R., Patj Z., Novakova P., et. al (2014) Determination of acrylamide and acrolein in smoke from tobacco and e-cigarettes. Chromatographia, 77, 1145-1151, DOI 10.1007/S10337-014-2729-2.
- [14] Locatelli, M., Melucci, D., Carlucci, G., & Locatelli, C. (2012). RECENT HPLC STRATEGIES TO IMPROVE SENSITIVITY AND SELECTIVITY FOR THE ANALYSIS OF COMPLEX MATRICES. Instrumentation Science & Technology, 40(2-3), 112-137. <https://doi.org/10.1080/10739149.2011.651668>
- [15] US EPA. (2021). Formaldehído <https://espanol.epa.gov/cai/formaldehido#:~:text=la%20salud%20humana-.Efectos%20del%20formaldeh%C3%ADdo%20en%20la%20salud.causar%20algunos%20tipos%20de%20c%C3%A1ncer.>
- [16] Formaldehído. (s.f.). <https://www.quimica.es/enciclopedia/Formaldeh%C3%ADdo.html>
- [17] Etanal. (s.f.). <https://www.quimica.es/enciclopedia/Etanal.html>
- [18] EPA. (s.f.) acetaldehyde. <https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-09/documents/acetaldehyde.pdf>
- [19] Agencia para Sustancia Tóxicas y el Registro de Enfermedad. (s.f.) ToxFAQs™- Acroleína (Acrolein). [https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts124.html#:~:text=La%20acrole%C3%ADna%20es%20un%20I%C3%ADquido,otras%20plantas%2C%20gasolina%20y%20petr%C3%B3leo.](https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts124.html#:~:text=La%20acrole%C3%ADna%20es%20un%20I%C3%ADquido,otras%20plantas%2C%20gasolina%20y%20petr%C3%B3leo.)

- [20] Gillman I., Pennington A., et. al., (2020) Determining the impact of flavored e-liquids on aldehydes production during vaping, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 112, DOI 10.1016/j.yrtph.2020.104588
- [21] Kulhánek, A., Baptistová, A. (2020). Chemical Composition of Electronic Cigarette E-Liquids: Overview of Current Evidence of Toxicity. *Adiktologie*, 20(3–4), 137–144; doi 10.35198/01-2020-002-0007
- [22] Khlystov, A., & Samburova, V. (2016). Flavoring Compounds Dominate Toxic Aldehyde Production during E-Cigarette Vaping. *Environmental Science & Technology*, 50(23), 13080–13085.
- [23] Detection of acrolein, formaldehyde and acetaldehyde in an e-liquid. *Ingé sciences*. <https://ingesciences.fr/en/opensciences/our-analyses/e-cigarette/acrolein-formaldehyde-acetaldehyde/>
- [24] Hashim, H., Shameli, N. K., Akhir, N. F. N. M., Salleh, N. H. M., Ismail, I. A., Hassan, M. R., Hara, N. H., Mohamad, N. E. N., & Mohamad, N. E. N. (2022). Identification of flavour chemicals and potentially harmful compounds in refill e-liquids sold in Malaysia. *Journal of Advanced Research in Applied Sciences and Engineering Technology*, 26(1), 15–22. <https://doi.org/10.37934/araset.26.1.1522>
- [25] Pássaro C., et. al., (2016) Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones.
- [26] Sgariglia., et. al., (2010) Cromatografía: conceptos y aplicaciones. Facultad de ciencias naturales.
- [27] Palango S., (2018). Desarrollo de un método analítico por espectrofotometría visible para determinar detergentes aniónicos en agua limpias y residuales. Universidad Central del Ecuador.
- [28] (s.f.). Apéndice: Nomenclatura de HPLC. Waters. <https://www.waters.com/nextgen/mx/es/education/primers/beginner-s-guide-to-liquid-chromatography/appendix-hplc-nomenclature.html>
- [29] Snyder L., Kirkland J., (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. WILEY

- [30] Dolan J., (2006). The Power of Mobile Phase Strength. LCGC North America, 24 (6), 570-578
- [31] Gradientes de exploración en cromatografía de líquidos preparativa. (s. f.). Waters. <https://www.waters.com/nextgen/mx/es/education/primers/preparative-liquid-chromatography-primer/scouting-gradients.html>
- [32] Instrumentación de la cromatografía de líquidos de alta resolución [Fotografía]. Recuperado de: <https://tech-publish.com/hplc-guide-history-definition-principle-types-instrumentation/>
- [33] Phenomenex (2023). Características del solvente de fase móvil. SCIENCE UNFILTERED. <https://phenomenex.blog/2023/05/25/los-solventes-de-fase-movil/>
- [34] Bayo A., Marco D., (2016). HPLC instrumental. Universidad Politécnica de Valencia.
- [35] Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. Universidad de Alicante. <https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8248/4/T4cromatliquid.pdf>
- [36] Suarez, D., Morales, Y., (2018). Principios básicos de la cromatografía de líquidos alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. Semilleros, 4(1),7-14.
- [37] Agilent Technologies. (2008) Inyectores automáticos preparativos y estándar. Agilent Serie 1200.
- [38] Inyectores en HPLC [Fotografía] <http://ailinxio.blogspot.com/2013/>
- [39] Cromatografía en Fase reversa (Estructura de proteínas). (s. f.). <https://sitios.quimica.unam.mx/departamento/proteinas/estructura/EPrpc.html>
- [40] Proceso de funcionalización y endcapping [Fotografía] <https://www.silicycle.com/articles/the-role-of-functionalized-silica-in-chromatography-and-organic-synthesis/>
- [41] Niwa M., (2019). Derivatization and Labeling Techniques. Encyclopedia of Analytical Science. Academic Press.
- [42] Poole C., (2017). Derivatization in liquid chromatography. Elsevier.

- [43] Rasmussen, H. T., & Huang, K. (2012). 8.7 Chromatographic Separations and Analysis: Chromatographic Separations and Analysis of Enantiomers. En Elsevier eBooks (pp. 96-114). <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-095167-6.00831-4>
- [44] Eurolab España. P.P. Morillas y colaboradores, (2016). Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados
- [45] Comisión de Control Analítico y ampliación de Cobertura. Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos (2011)
- [46] Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A.C, Guía de validación de métodos analíticos.
- [47] Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. CENAM.
- [48] Wang, T., Tong, H., Gong, Z., Sheng, L., Yang, J., & Liu, S. (2005). Determination of Volatile Carbonyl Compounds in Cigarette Smoke by LC-DAD. *Chromatographia*, 62(11–12), 631–636. <https://doi.org/10.1365/s10337-005-0675-8>
- [49] Famele, M., Ferranti, C., Abenavoli, C., Palleschi, L., Mancinelli, R., & Draisci, R. (2015). The Chemical Components of Electronic Cigarette Cartridges and Refill Fluids: Review of Analytical Methods. *Nicotine & Tobacco Research*, 17(3), 271–279. <https://doi.org/10.1093/ntr/ntu197>
- [50] Qu, Y., Kim, K., & Szulejko, J. E. (2018). The effect of flavor content in e-liquids on e-cigarette emissions of carbonyl compounds. *Environmental Research*, 166, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.013>
- [51] Lee, M. G., Szulejko, J. E., & Kim, K. (2018). Determination of carbonyl compounds in electronic cigarette refill solutions and aerosols through liquid-phase dinitrophenyl hydrazine derivatization. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(4). <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6553-2>



- [52] Lee, J., Patra, J. K., & Shin, H. (2020). Analytical methods for determination of carbonyl compounds and nicotine in electronic No-Smoking aid refill solutions. *Analytical Biochemistry*, 588, 113470. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.113470>
- [53] Zhiry, L. (2022). Analysis of eight carbonyl compounds in e-cigarette liquid using High-Performance Liquid Chromatography. SHIMADZU
- [54] (2018) Aliphatic aldehydes. NIOHS Manual of Analytical Methods (NMAM), <https://www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/2018.pdf>
- [55] Entradas, V. M. (2015). Resolución en las columnas cromatográficas. *Cienciadelux*. <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/2015/08/05/resolucion-en-las-columnas-cromatograficas/>
- [56] (s.f.) The Theory of HPLC. Chromatographic Parameters. CHROMacademy
- [57] Estructura química de FA-DNFH, AA-DNFH, Acr-DNFH [Fotografía]. <https://www.sigmaaldrich.com/MX/es>
- [58] Uchiyama, S., Ando, M., & Aoyagi, S. (2003). Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A*, 996(1–2), 95–102. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00542-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00542-9)
- [59] Espectro UV del FA-DNFH [Fotografía] Recuperado de: <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1479714>
- [60] Precursor chemicals in the table 1 and table II of the 1988 un convention and the limited international special surveillance list.
- [61] (2012). Drug Status Report: Acrolein [https://isomerdesign.com/Cdsa/HC/StatusDecisions/A-2013-00235%20-%20PDFs/NC-2-propenal%20\(acrolein\)-2010-04-13.pdf](https://isomerdesign.com/Cdsa/HC/StatusDecisions/A-2013-00235%20-%20PDFs/NC-2-propenal%20(acrolein)-2010-04-13.pdf)
- [62] International Narcotics Control Board (2018). Precursors and chemical frequently used in the illicit manufacture of narcotic and psychotropic substances.

- [63] Wei, Y., Wang, M., Liu, H., Niu, Y., Wang, S., Zhang, F., & Liu, H. (2019). Simultaneous determination of seven endogenous aldehydes in human blood by headspace gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1118–1119, 85–92.
- [64] Finkelde I., Waller R. (2020). Comparing methods of determining formalin concentration in fluid preservatives. *Collection Forum*, 34(1), 32-52
- [65] Taprab, N., & Sameenoi, Y. (2019). Rapid screening of formaldehyde in food using paper-based titration. *Analytica Chimica Acta*, 1069, 66–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.03.063>
- [66] International Standar ISO 2227 (1972). Formaldehyde solutions for industrial use – Determination of formaldehyde content.
- [67] Thompson, M. (2004) The amazing Horwitz function. *AMC Technical Brief* (17).
- [68] Trompeta de Horwitz [Fotografía] Recuperado de:  
<https://chemistry.stackexchange.com/questions/63780/what-exactly-is-the-horwitz-equation>
- [69] (2002). AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemicals Methods for Dietary Supplements and Botanicals.
- [70] Rivera, C., Rodriguez, M., (2010). Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayos NMX-EC-17025-IMNC-2006.
- [71] Gráfico de control de HorRat [Fotografía] Recuperado de:  
<https://bii.mx/documentos/horwitzCm10.pdf>
- [72] (s.f) Regresión y Correlación.  
[http://www2.uca.edu.sv/matematica/upload\\_w/file/REGRESION%20SIMPLE%20Y%20MULTIPLE.pdf](http://www2.uca.edu.sv/matematica/upload_w/file/REGRESION%20SIMPLE%20Y%20MULTIPLE.pdf)
- [73] (2019). E-cigarettes and e-liquids – Limits for chemical. Basis for discussion. ANEC Rasing standards for consumers.

- [74] (2019). Worker exposure to formaldehyde and formaldehyde releasers. ECHA.
- [75] (2009). Emergency and continuous exposure guidance levels for selected submarine contaminants: Volume 3. National Academies Press.
- [76] Faroon, O., Roney, N., Taylor, J., Ashizawa, A., Lumpkin, M., & Plewak, D. (2008). Acrolein health effects. *Toxicology and Industrial Health*, 24(7), 447–490  
<https://doi.org/10.1177/074823370809418>.
- [77] Li, Y., Burns, A., Tran, L., Abellar, K., Poindexter, M., Li, X., Madl, A., Pinkerton, K., & Nguyen, T. (s.f). Impact of e-liquid, coil temperature and puff topography on the aerosol chemistry of electronic cigarettes.
- [78] Sleiman, M., Logue, J. M., Montesinos, V. N., Russell, M., Litter, M. I., Gundel, L. A., & Destailats, H. (2016). Emissions from Electronic Cigarettes: Key Parameters Affecting the Release of Harmful Chemicals. *Environmental Science & Technology*, 50(17), 9644–9651.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b01741>

## CAPÍTULO 8: ANEXOS

### 8.1 Búsqueda del intervalo de trabajo: Prueba de hipótesis

Demostración de correlación significativa para FA-DNFH.

t critica <sup>a</sup>	654.77
t <sup>b</sup>	2.09

<sup>b</sup>  $t = \frac{|r|\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$ , donde r hace referencia al coeficiente de correlación, n las observaciones y r<sup>2</sup> el coeficiente de determinación.

<sup>a</sup> t<sub>crítica</sub>: valor de la prueba de t de *student* a dos colas con 95% de confianza y 19 grados de libertad. Se empleó la función INV.T.2C() de Excel®

Demostración de correlación significativa para AA-DNFH.

t critica	597.26
t	2.09

Demostración de correlación significativa para Acr-DNFH.

t critica	708.35
t	2.09

## **8.2 Titulación de formaldehído con sulfito de sodio mediante potenciometría.**

V agregado (mL)	pH	V agregado (mL)	pH
0.0	12.268	15.0	11.326
1.0	12.209	16.0	11.240
2.0	12.179	16.5	11.142
3.0	12.144	17.0	11.025
4.0	12.105	17.5	10.871
5.0	12.064	18.5	10.420
6.0	12.015	19.0	9.851
7.0	11.971	19.5	9.562
8.0	11.919	20.0	9.268
9.0	11.865	20.5	9.021
10.0	11.808	21.0	8.845
11.0	11.742	21.5	8.714
11.5	11.704	22.0	8.597
12.0	11.660	22.5	8.508
12.5	11.616	23.0	8.422
13.0	11.566	23.5	8.365
13.5	11.516	24.0	8.302
14.0	11.455	24.5	8.254
14.5	11.389	25.0	8.203

### 8.3 Linealidad del sistema: Análisis de varianza (ANOVA)

Resumen de los valores y parámetros obtenidos mediante el análisis de varianza de una vía para FA-DNFH.

Análisis de varianza						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	220984015	220984015	428719.844	7.92844E-43	
Residuos	19	9793.56646	515.4508662			
Total	20	220993809				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	IC Inferior 95%	IC Superior 95%
Intercepción (ua)	-14.375	5.68913	-2.52676	0.02055	-26.28254	-2.46759
Variable X 1 (ua/ppm)	1923.146	2.93715	654.76702	7.9284E-43	1916.99859	1929.29362

Resumen de los valores y parámetros obtenidos mediante el análisis de varianza de una vía para AA-DNFH.

Análisis de varianza						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	193081090	193081090	356714.304	4.54733E-42	
Residuos	19	10284.2546	541.276557			
Total	20	193091375				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	IC Inferior 95%	IC Superior 95%
Intercepción (ua)	-14.331	5.82991	-2.45817	0.02374	-26.53303	-2.12877
Variable X 1 (ua/ppm)	1797.636	3.00983	597.25564	4.5473E-42	1791.33621	1803.93549

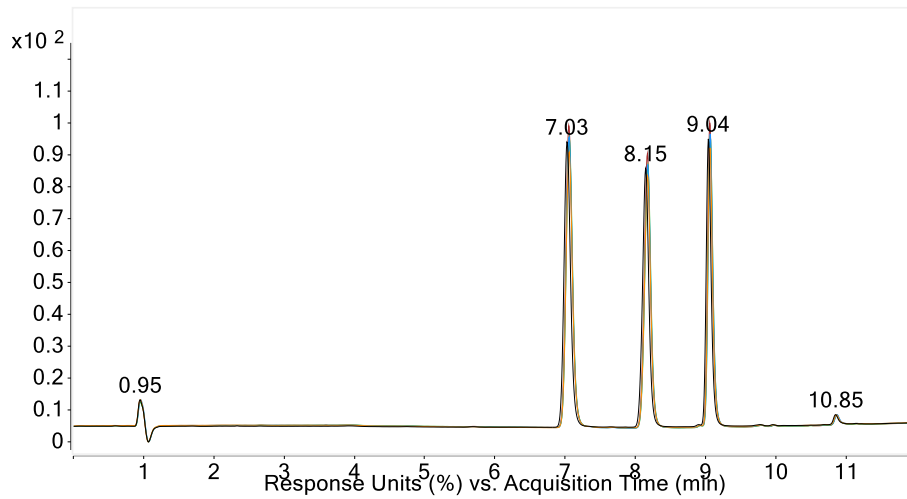
Resumen de los valores y parámetros obtenidos mediante el análisis de varianza de una vía para Acr-DNFH.

Análisis de varianza						
	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F	
Regresión	1	138408254	138408254	501771.329	1.7785E-43	
Residuos	19	5240.94679	275.839304			
Total	20	138413495				
	Coeficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad	IC Inferior 95%	IC Superior 95%
Intercepción (ua)	-11.422	4.16179	-2.74439	0.01289	-20.13231	-2.71087
Variable X 1 (ua/ppm)	1521.994	2.14862	708.35819	1.7785E-43	1517.49655	1526.49078

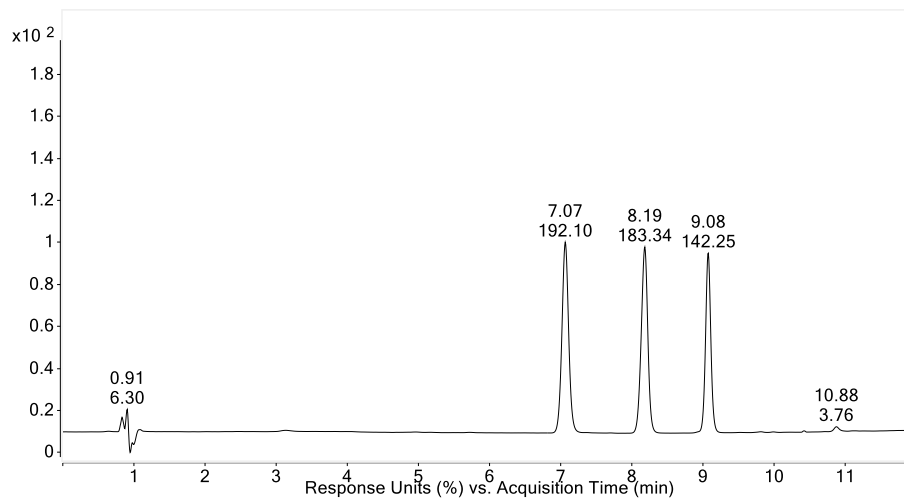
## 8.4 Cromatogramas complementarios asociados a la validación del método analítico.

### Repetibilidad del sistema

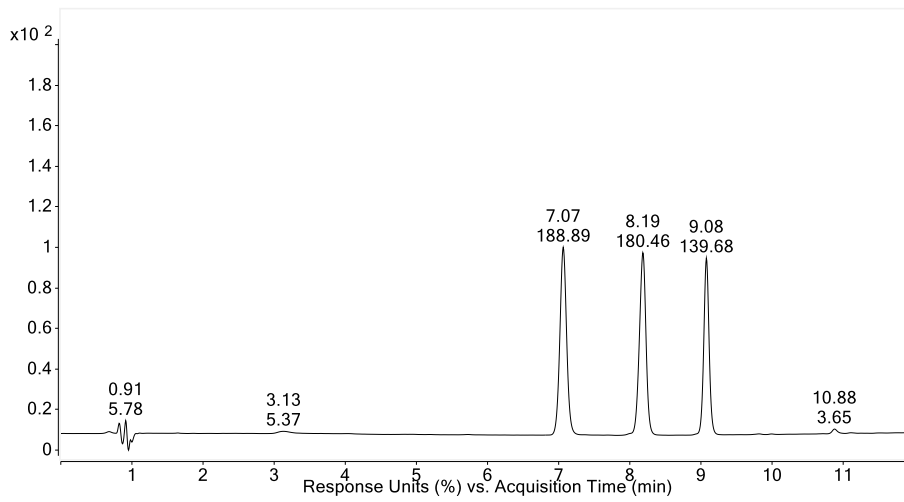
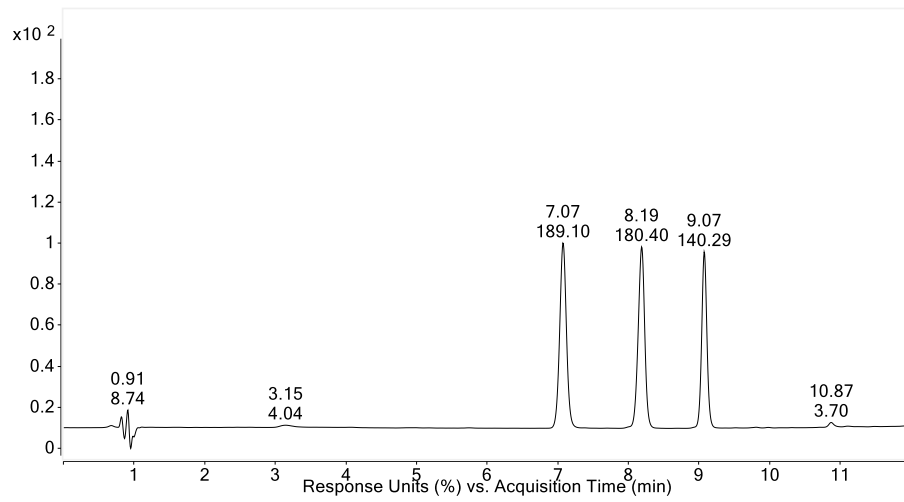
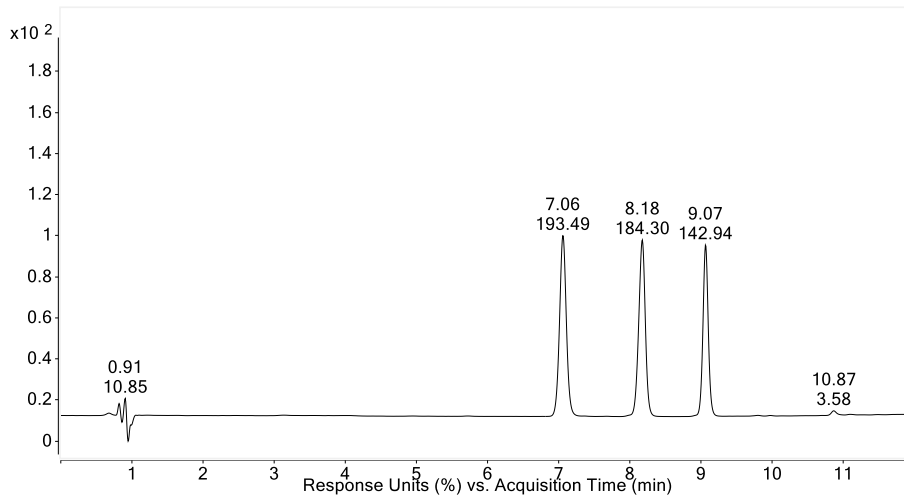
En la siguiente figura se superponen los cinco cromatogramas obtenidos a partir de la inyección por quintuplicado de la disolución a 0.1 ppm de los aldehídos-DNFH.

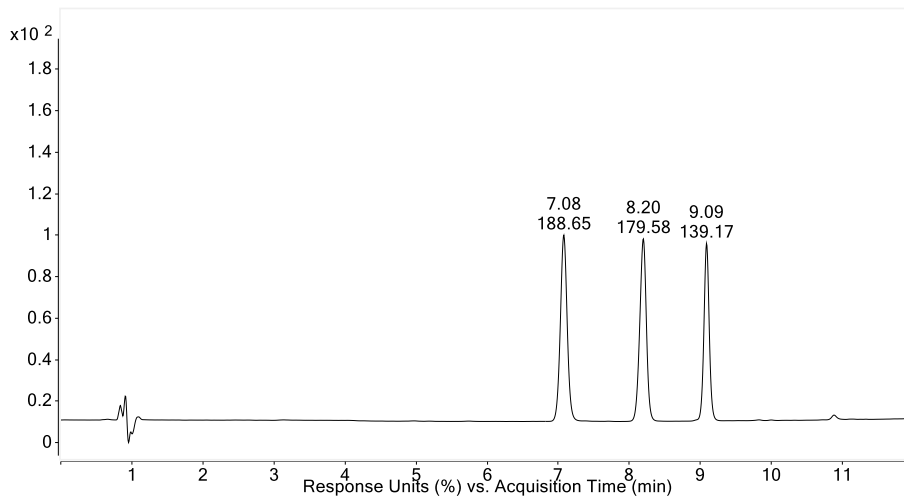
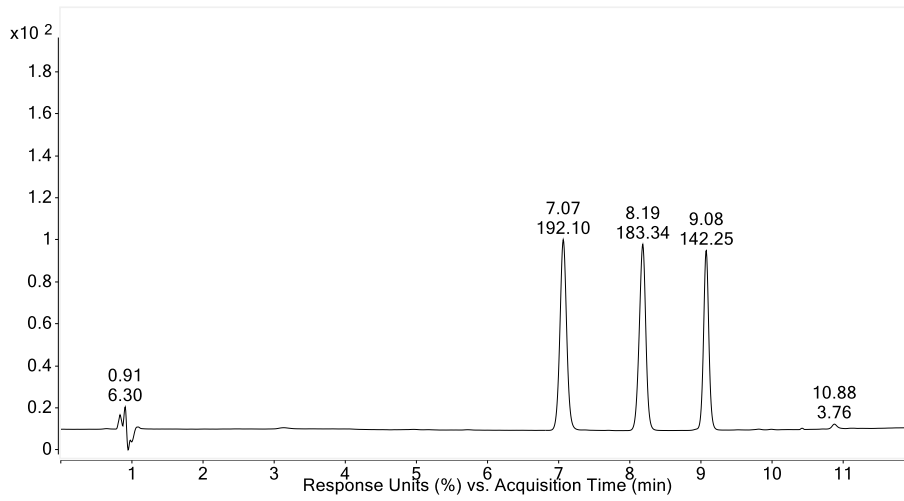


### Veracidad y repetibilidad del método: Placebo fortificado a 0.1 ppm

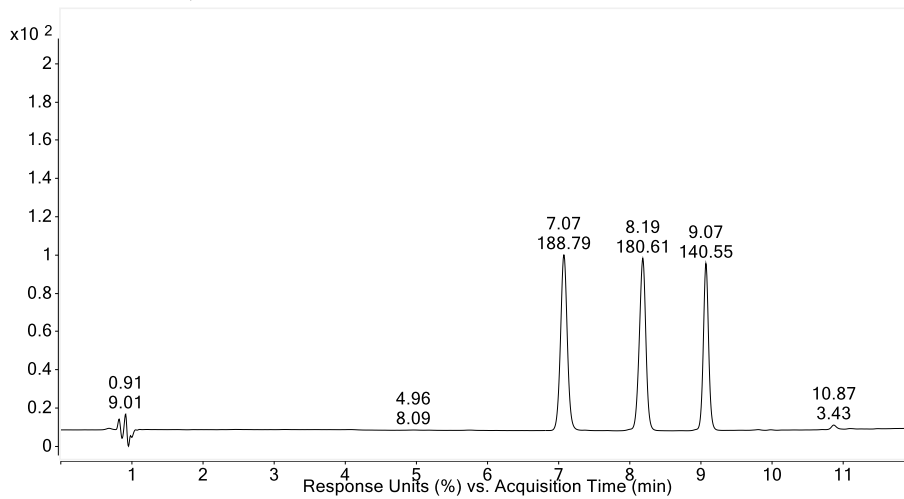


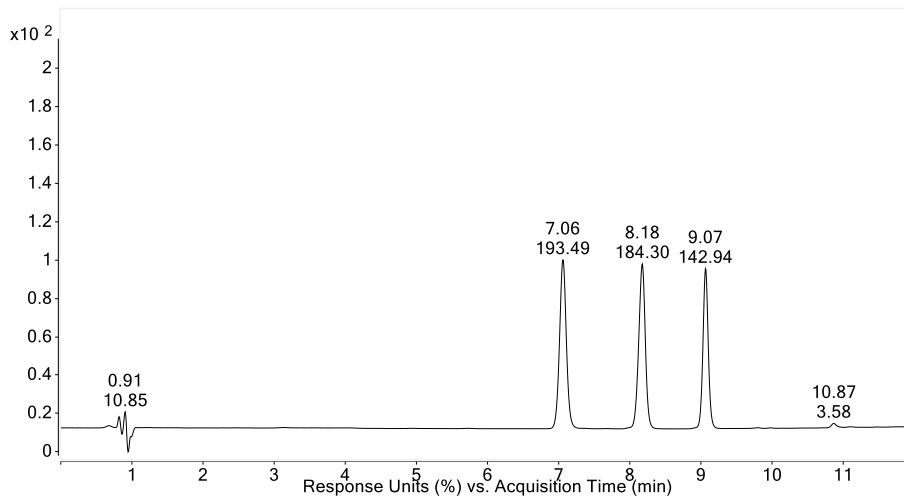
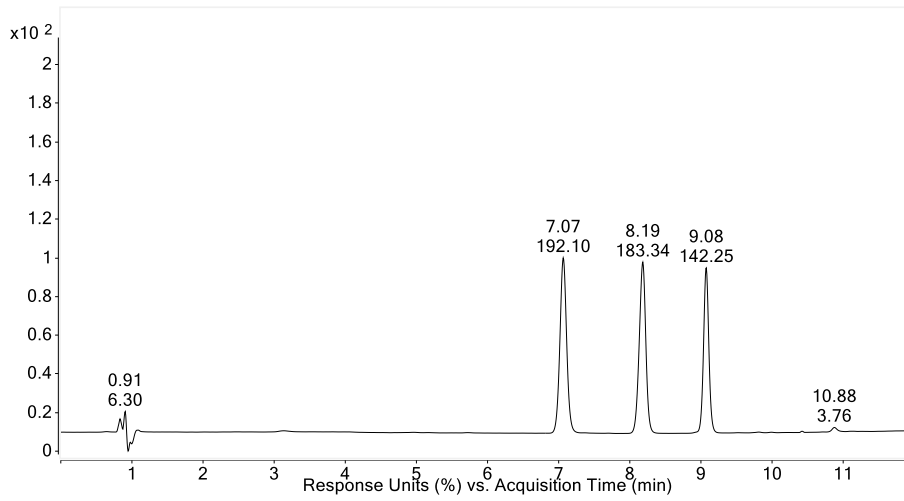






**Precisión intermedia; Día 1**





Día 2

