

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE AIREACIÓN DINÁMICA PARA LA CAPTURA DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE *Capsicum* spp.

*JULIO CÉSAR VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ^A, JUAN CIBRIÁN-TOVAR^A, CLAUDIA HIDALGO-MORENO^B Y
TITO R. VÁSQUEZ-ROJAS

(Received November 2010; Accepted March 2011)

ABSTRACT

The Dynamic Method employed to collect *Capsicumm* spp. Volatiles using gas chromatography with mass selective detector for their quantitation was validated. The validation tests were conducted with seven previously described compounds in *Capsicum*’s volatiles (3-hexanone, 1-bromohexane, 2-ethyl-1-hexanol, 6-methyl-2-hepten-4-ol, p-xylene, D-limonene y 2-ethyl hexyl éster). The method exhibited good selectivity and linearity remained within the 2-120 mg mL⁻¹ range with correlation coefficients greater than 0.99 for each evaluated compound. The relative standard deviation of factor responses was less than 2%. The validation results show that the method is efficient for extracting volatile compounds with recoveries between 87-98% with R.S.D. less than 10% which is indicative of good accuracy. The standard uncertainty associated with each measurement ranged from 1.17 to 1.36 µg: the lowest related to 3-hexanone and the highest to 1-bromohexane. www.relaquim.com

Key words: Pepper’s volatiles, validation, dynamic aeration, *Anthonomus eugenii*.

RESUMEN

Se validó el método de aireación dinámica para la captura de volátiles de *Capsicum* spp usando cromatografía de gases acoplada a un detector selectivo de masas para su cuantificación. Las pruebas de validación se realizaron con siete compuestos previamente descritos como volátiles de *Capsicum*. (3-hexanona, 1-bromohexano, 2-etyl-1- hexanol, 6-metil-2-hepten-4-ol, p-xileno, D-limoneno y 2-etyl hexil éster). El método exhibió buena selectividad y la linealidad se mantuvo en el rango de 2-120 µg mL⁻¹, con coeficientes de correlación mayores de 0.99 para cada compuesto evaluado. La desviación estándar relativa de los factores de respuesta fue menor de 2%. Los resultados de la validación muestran que el método es capaz de extraer compuestos volátiles con recuperación de 87-98% y con DER menores de 10% lo cual indica una buena exactitud. La incertidumbre estándar asociada a cada medición estuvo en un rango de 1.17 a 1.36 µg: la más baja asociada a la 3-hexanona y la más alta a la del 1-bromohexano. www.relaquim.com

Palabras clave: Volátiles de chile, validación, aireación dinámica, *Anthonomus eugenii*. www.relaquim.com

Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Programa de Fitosanidad¹, Edafología², Estadística³. Carretera México- Texcoco km 36.5. CP. 56230, Montecillo, Texcoco, estado de México. *Tel: 01 (595) 95 1 15 80, 01 (595) 92 11 618, correo electrónico: velazquez@colpos.mx

INTRODUCCIÓN

La validación de métodos es una de las medidas universalmente reconocidas como necesarias dentro de un sistema de aseguramiento de la calidad (Thompson *et al.*, 2002). Por esta razón, los métodos analíticos deben validarse para demostrar que son adecuados para determinar analitos, en forma cuantitativa o cualitativa, en matrices de interés (Soboleva, 2004).

Los analitos de interés se pueden encontrar en cantidades pequeñas y en mezcla con una gran cantidad de materia orgánica que puede causar interferencias, motivo por el cual el proceso de análisis del compuesto de interés requiere de un estricto control de calidad (Segura, 1999). Para el aseguramiento del control de calidad se incluyen algunos índices como precisión, exactitud, linealidad, selectividad, repetibilidad y reproducibilidad (US EPA, 1996; Coy, 1999; Lehotay y Mastovska, 2005). El método de aireación dinámica (AD) o “dynamic headspace” se emplea, generalmente, en la extracción o captura de compuestos volátiles o semi-volátiles que las plantas liberan. Este sistema permite recolectar los compuestos liberados por la planta entera o por algunas estructuras, como yemas, flores o frutos (Smith, 1976; Nojima *et al.*, 2003; Calyecac-Cortero *et al.*, 2007). El uso de este método también ha permitido la captura de feromonas sexuales, de agregación u oviposición en insectos (Heath *et al.*, 2006). En muchos trabajos se demostró que los compuestos liberados por plantas intervienen en la interacción insecto-plantas, funcionando como señales químicas que guían a los insectos fitófagos hacia éstas (Bernays y Chapman, 1994; Angioy *et al.*, 2006). Sin embargo, hoy en día existen métodos modernos para la caracterización de volátiles, pero el método de AD se sigue usando debido a que nos permite recolectar la muestra para análisis químico y pruebas de comportamiento con el insecto.

Capsicum annuum L. (Solanaceae) libera cientos de compuestos en los diferentes estados fisiológicos pero, en especial, el aroma de sus frutos se considera un importante índice de calidad (Cremer y Eichner, 2000). En 2006, Osorio determinó la presencia de 56 compuestos volátiles en estructuras reproductivas, como yemas, flores y frutos en desarrollo, de plantas de chile (*C. annuum*) por AD y estableció la hipótesis de que algunos de estos volátiles median la interacción entre la planta y su principal insecto plaga, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Sin embargo, se carece de métodos validados para determinar la concentración de estos compuestos volátiles, así como evaluar la eficiencia del método en la captura de éstos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue validar el método de aireación dinámica, con algunos de los estándares identificados por Osorio (2006), para la determinación cuantitativa de los volátiles emitidos por estructuras de plantas de *Capsicum* spp.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estándares

Se usaron los siguientes estándares, 3-hexanona, 1-bromo hexano, 2-etil hexanol (Fluka), 6-metil-2-hepten-4-ol, p-xileno, D-limoneno y 2-etil hexil éster (Sigma-Aldrich®, Toluca, estado de México). El 6-metil-2-hepten-4-ol no se ha reportado en volátiles de chile, su uso en la validación fue como estándar interno. Los estándares se diluyeron en hexano, grado HPLC (Fermenton®), para preparar las disoluciones, para lo cual se consideró la pureza y la densidad de cada estándar. La pureza de cada estándar se determinó por cromatografía de gases y en todos fue mayor de 95 %. En la preparación de disoluciones se usó material calibrado y certificado, incluyendo frascos volumétricos de 1 mL clase A (Kimble Glass INC) y jeringas microlíticas (Hamilton®,

Reno, Nevada, USA). Por último, las disoluciones de cada estándar se aforaron a 1 mL, con hexano HPLC.

Aireación dinámica (AD)

El método consistió en cuatro reactores de vidrio con cuello esmerilado 29/42 de 21 cm de alto, 6 cm de diámetro interno y 500 mL de capacidad. Cada frasco contó con un tapón esmerilado (29/42), provisto de dos tubos de cristal a los cuales se les adaptó una manguera de Nalgene Premium (3/16" ID), libre de volátiles. La primera manguera se conectó a un tanque de aire comprimido extra seco, donde se colocó una pipeta Pasteur empacada con 0.2 mg de adsorbente (Tenax®, Bellefonte, PA, USA), de malla 60/80, que actuó como trampa para limpiar el aire que entró al sistema. La segunda manguera funcionó como salida de aire en donde se insertó otra pipeta Pasteur con Tenax® TA 60/80, que permitió la captura de los volátiles. El Tenax, junto con el carbón activado y la Silica gel, son los adsorbentes más utilizados en este tipo de metodologías, ya que atrapan una gran cantidad de compuestos volátiles (Lodge, 1996; Keith, 1996).

Captura de volátiles en muestras control

La captura de volátiles se realizó durante 6 h y consistió en colocar 500 μ L con una concentración de 50 μ g mL⁻¹ de la mezcla de todos los estándares mencionados anteriormente sobre una matriz sintética, la matriz fue papel filtro circular No.1, de 70 mm de diámetro (Advantec, Japan) sobre el cual se aplicó la mezcla de los siete estándares.

Inmediatamente, se introdujo la matriz dentro de cada frasco y éste se cerró. Se hizo pasar un flujo de aire de 200 mL min⁻¹, con la ayuda de un flujómetro (Gilmont®, Barrington, IL, USA), modelo GF-8341-1201. Los volátiles capturados en cada cartucho de Tenax se eluyeron con 3 mL de hexano, grado HPLC, en dirección al flujo de aire. Luego se redujo el volumen con un

flujo suave de nitrógeno, a un volumen final de 1 mL, el cual se colocó en viales color ámbar de 2 mL y se sellaron debidamente. Las muestras se almacenaron a 5 °C, hasta su análisis, que no fue mayor a 15 días. Se realizó un total de 12 repeticiones en tres fechas diferentes.

Captura de volátiles en flores de chile

Para evaluar la presencia y concentración de los siete estándares antes descritos, se recolectaron flores de chile jalapeño (Tampiqueño) y morrón (H 778), mantenidas en invernadero, se pesaron aproximadamente 30 gr de cada una en una balanza digital y se colocaron dentro de los reactores, la recolecta de volátiles se realizó de la misma forma que para matriz sintética. Se realizaron tres repeticiones para cada variedad y un blanco de método. A cada repetición se le adicionó 50 μ g/ml de 6-metil-2-hepten-4-ol para evaluar la eficiencia del método y posibles interacciones de la matriz. Se usó una prueba de *t* de student con $\alpha=0.05$ y 4 *gl* para muestras independientes para comparar la concentración de cada compuesto en ambas muestras.

Análisis cromatográfico

Las muestras obtenidas por AD se analizaron con un cromatógrafo de gases (CG) acoplado a un detector selectivo de masas (CG/MSD 6890/5973; Agilent, Palo Alto, CA, USA). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: la inyección manual, de 1 μ L de muestra en modo Splittles; la temperatura del puerto de inyección se mantuvo en 250 °C, y la temperatura del horno inició en 40 °C y se incrementó 15 °C min⁻¹, hasta llegar a 250 °C. Se usó una columna capilar HP-5ms (Agilent; Santa Clara, CA, USA), recubierta con una fase de fenil metil siloxano, de 0.250 μ m de espesor, 0.25 mm de diámetro interno y 30 m de longitud. Se utilizó helio como gas acarreador, con un flujo en la columna de 1 mL min⁻¹. El tiempo de análisis fue de

20 min. El MSD se operó en modo scan, en un rango de 30-550 uma. La interface se mantuvo a 280 °C, el detector y cuadropolo a 150 y 230 °C, respectivamente. La adquisición de datos fue en modo impacto electrónico, a 70 eV. Los iones de cuantificación y confirmación generados para cada compuesto se compararon con los de la biblioteca NIST 2002, para corroborar la identidad de cada uno.

Calibración

La calibración consistió en verificar que el CG/MDS cumpliera con los criterios internos de calibración especificados por el fabricante (Agilent Technology), al realizar la afinación con el estándar interno PFTBA (perfluorotributil amina). La calibración externa consistió en elaborar una curva de calibración con los estándares de referencia, en un rango de 100, 80, 50, 20, 10, 5 y 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En la preparación de la curva se consideró la pureza y la densidad de cada estándar.

Linealidad

El estudio de linealidad consistió en la inyección de las concentraciones utilizadas para la curva de calibración por triplicado. La regresión lineal se obtuvo de la respuesta de cada compuesto versus la concentración. En la prueba de linealidad se usó un nivel de significancia de 5% de acuerdo con los criterios de aceptación usados por Méndez-Antolín *et al.* (2008) y US EPA (1996); los cuales son: coeficiente de correlación (r^2) ≥ 0.99 y desviación estándar relativa de los factores de respuesta (DER_{fr}) $\leq 5\%$. Los factores de respuesta se definieron como (y/x), en donde (x) es la concentración y (y) la respuesta a dicha concentración; la desviación estándar relativa de la pendiente (DER_b) $\leq 2\%$, con $\text{DER}_b (\%) = (\text{S.D.}_b/b) \times 100$, donde b es el promedio de las tres pendientes y SD_b es la desviación estándar.

Repetibilidad

Se determinó la repetibilidad del método, con una serie de mediciones realizadas en un mismo día y mismas condiciones, utilizando como criterios de aceptación la desviación estándar relativa $\text{DER} \leq 15\%$ según los métodos de la Agencia de Protección al Ambiente (US EPA, 1996).

Precisión intermedia

La precisión intermedia se evaluó usando el mismo criterio anterior, variando únicamente el día de análisis de 12 muestras diferentes en tres fechas.

Exactitud

Ésta se evaluó a partir de muestras adicionadas a 50 $\mu\text{g/mL}$, con la mezcla de todos los estándares. Los resultados se registraron considerando los recobros a 100% y la desviación estándar. Se usó una prueba de t para muestras pareadas de dos colas, a 95%, para determinar si el recobro medio era diferente del 100% fortificado. La prueba de t se calculó usando la siguiente ecuación.

$$t_{\text{exp}} = |100 - \text{ec}| \sqrt{n} / \text{DER} \quad (1)$$

El valor obtenido de t_{exp} se comparó contra el valor de t_{tab} , con 95 % de confianza y $n-1$ grados de libertad (Méndez-Antolín *et al.*, 2008).

La incertidumbre estándar se calculó como la desviación estándar de la media

$$\mu(\text{Rec}) = \text{SD} \sqrt{n} \quad (2)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selectividad

Un método es selectivo si presenta la capacidad de determinar analitos particulares en mezclas o matrices, sin interferencia de otros componentes de comportamiento

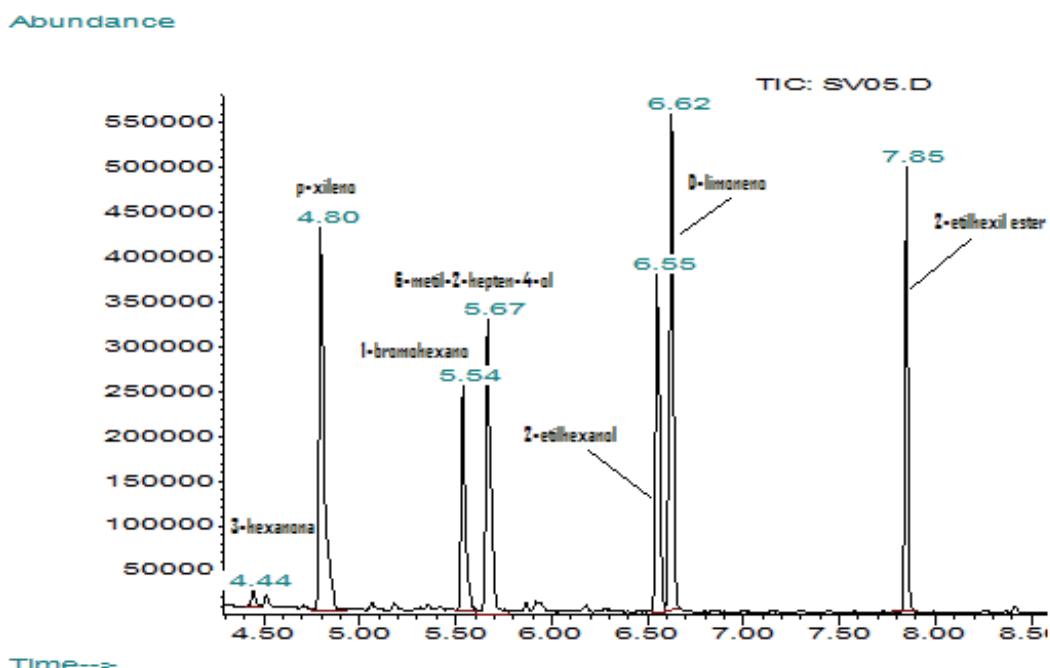


Figura 1. Cromatograma obtenido del análisis de la mezcla de estándares con sus respectivos tiempos de retención por CG/MSD.

similar (IUPAC, 2001; Lanças, 2004). Esta condición indica que el método instrumental utilizado en el presente trabajo es selectivo para los compuestos de interés, ya que no se observó la presencia de picos en la región de tiempos de retención de los compuestos analizados. En la Figura 1 se observa un cromatograma de la muestra analizada, en la cual se nota que no hubo interferencia en la determinación.

La cuantificación de un compuesto por CG/MSD se basa en la medición de iones derivados de una molécula en particular, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa/carga (m/z) (Hoffman y Strooban, 1999), por lo que la abundancia relativa de los iones generados es crucial para una buena identificación y cuantificación. Los iones de cada estándar, incluyendo iones de cuantificación y de confirmación se presentan en el Cuadro 1. Las abundancias relativas de cada ion se determinaron de acuerdo con los patrones generados por la biblioteca Nist v2002.

Cuadro 1. Selección de iones para la cuantificación de cada estándar.

Estándar	Ion de cuantificación (m/z)‡	Iones de confirmación (m/z)‡
3-hexanona	57	71, 100
p-xileno	91	106, 77, 65
1-bromohexano	135	55, 86
6-metil-2-hepten-4-ol	71	57, 95
2-ethyl hexanol	57	70, 85
D-limoneno	68	93, 67, 136
2-ethyl hexil éster	43	70, 57, 112

‡ = masa/carga generada para cada ion.

Estudio de linealidad

Los resultados obtenidos de la calibración se presentan en el Cuadro 2; en éste se observa que los siete compuestos usados mantuvieron una respuesta lineal en rangos de 2-120 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los coeficientes de correlación (r^2) fueron mayores de 0.99, cifra mínima significativa utilizada para fines de cuantificación (US EPA, 1996; Méndez-Antolín, 2008; Valente *et al.*, 2008).

La desviación estándar relativa de la pendiente obtenida para cada compuesto fue mayor de 2%; el valor más alto fue para la 3-hexanona (6.58), con lo cual no se cumple con los criterios usados por Mendez-Antolin *et al.* (2008). Estos valores altos pueden ser causados por el modo de inyección de la muestra, ya que en este trabajo la inyección fue manual y en el caso de Méndez-Antolín se hizo con un sistema automatizado. Los métodos EPA son menos rigurosos en estos criterios, llegando a aceptar desviaciones de 15% con inyecciones en modo automático (US EPA, 1996). Otro factor que puede contribuir a

tener una alta desviación es la presión de vapor (PV) de este compuesto, al respecto Olsen y Nielsen (2001) mencionan que compuestos orgánicos con PV > 10 Pa a 20 °C, se clasifican como volátiles y PV menores de 10 Pa como semi-volátiles. Los factores de respuesta obtenidos para cada compuesto se encuentran dentro de los criterios de aceptación de 5% y muestran una alta correlación entre la concentración del estándar y la respuesta obtenida para cada uno. De acuerdo con estos resultados, el método fue capaz de obtener respuestas proporcionales lineales a concentraciones bajas de cada estándar evaluado.

Cuadro 2. Estudio de linealidad del método de AD por cromatografía de gases masas.

Compuesto	r^2	DER _b	DER _{fr}	PM (g g mol ⁻¹)	tr (min)	PV (mmHg)
3-hexanona	0.99	6.58	2.61	100	6.69	13.9
p-xileno	0.99	5.85	2.20	106	10.57	6.48
1-bromohexano	0.99	3.97	2.79	164	13.54	> 10
6-metil-2-hepten-4-ol	0.99	5.16	2.27	132	6.71	0.19
2-etil-1-hexanol	0.99	1.70	1.95	130	16.05	0.2
D-limoneno	1.0	5.75	1.96	136	15.99	1.52
2-etil hexil éster	0.99	0.25	2.01	172	18.5	0.4

r^2 = coeficiente de correlación.

DER_b = desviación estándar relativa de la pendiente.

DER_{fr} = desviación estándar relativa de los factores de respuesta.

PM = peso molecular.

Tr = tiempo de retención de cada estándar.

La sensibilidad, evaluada como el cambio en la respuesta analítica dividida por el correspondiente cambio en la concentración de la curva estándar (FAO, 1998), fue diferente para cada compuesto. El que presentó menor sensibilidad fue 1-bromo hexano, en contraste con el p-xileno que fue el que tuvo la mayor respuesta cromatográfica.

En el Cuadro 3 se observan las concentraciones de cada estándar en cada punto de la curva de calibración, así como sus respectivos promedios de respuesta cromatográfica. Se observó una relación lineal

directa entre la respuesta analítica y el nivel de concentración, lo cual coincide con los criterios descritos por la FAO (1998), en su manual para validación de métodos analíticos para control de alimentos. Los valores de la desviación estándar relativa (DER) de cada punto de la curva fueron menores de 15% para cada estándar evaluado. El cambio de respuesta observado entre los diferentes compuestos depende de las propiedades químicas de cada uno de éstos y de su comportamiento dentro del MSD (Hoffman y Strooban, 1999).

Cuadro 3. Respuesta cromatográfica vs concentración de estándar.

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3-hexanona	p-xileno	1-bromohexano	D-limoneno			
	Promedio (m/z) \ddagger	DER \ddagger (%)	Promedio (m/z) \ddagger	DER \ddagger (%)	Promedio (m/z) \ddagger	DER \ddagger (%)	
2	450 885.73	7.98	1 193 591	4.16	176 759	3.6	593 213
5	1 301 775.33	2.28	3 385 579	1.68	472 002	2.0	1 593 448
10	2 802 578.63	1.11	6 478 622	1.91	987 301	0.6	3 324 004
20	6 018 364.6	4.04	13 285 157	2.75	2 122 834	2.3	6 853 777
50	17 613 686.9	2.86	43 956 800	1.95	6 489 632	3.4	18 869 162
80	23 955 473.6	5.11	60 767 208	4.27	9 117 149	4.9	24 681 696
100	32 255 673.6	4.81	79 646 726	6.32	12 917 674	7.6	30 083 575

\ddagger = desviación estándar relativa, \ddagger = maza/carga para cada compuesto generado por el impacto electrónico a 70 eV.

Cuadro 3. Respuesta cromatográfica vs concentración de estándar (continuación).

Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	6-metil-2-hepten-4-ol		2-etil-1-hexanol		2-etil hexil éster	
	Promedio (m/z) \ddagger	DER \ddagger (%)	Promedio (m/z) \ddagger	DER \ddagger (%)	Promedio (m/z) \ddagger	DER \ddagger (%)
2	1 051 658	3.3	764 429	1.9	682 898	2.1
5	2 846 393	6.0	2 227 932	4.5	1 911 608	3.5
10	6 225 641	1.2	4 224 329	3.3	3 535 831	1.6
20	13 139 599	2.9	8 526 848	2.4	6 826 660	2.7
50	39 754 594	2.6	26 144 578	0.6	13 786 550	3.9
80	51 581 329	5.4	34 889 768	3.5	23 953 055	3.3
100	71 598 900	7.5	41 350 674	4.6	27 918 103	5.4

\ddagger : Desviación estándar relativa, \ddagger : maza/carga para cada compuesto generado por el impacto electrónico a 70 eV.

En el Cuadro 4 se presenta la exactitud del método evaluado a un nivel de adición de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de todos los estándares, el que se comparó con el 100% de recobro y con los valores de t de student. Los recobros fluctuaron entre 86.21 a 99.99%, el valor más bajo fue 2-etil-1-hexanol y el más alto la 3-hexanona. De acuerdo con Hill (2000), los promedios de recuperación deben estar en el rango de 70 a 110% y la DER debe ser $\leq 20\%$. El porcentaje de recuperación puede variar, dependiendo del

número de pasos usados en la extracción y el análisis. En métodos que incluyen pasos como extracción, aislamiento, purificación y concentración, los recobros suelen ser bajos (FAO, 1998). El porcentaje de recobro en este trabajo para los siete estándares no fue diferente de 100% fortificado, cuando se compararon los valores de t_{exp} obtenidos contra los valores de t_{tab} ($gl = 2.2$, $n = 12$, $\alpha = 0.05$). La incertidumbre estándar asociada a cada medición se mantuvo en un rango de 1.17 a 1.35 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Cuadro 4. Exactitud del método para los estándares evaluados por AD.

Compuesto	Adición μg mL ⁻¹	Recobro (%)	Promedio μg mL ⁻¹	DER† (%)	t _{exp} ‡	Incertidumbre (μg)
3-hexanona	48.0	99.9	44.15	9.21	0.25	1.17
p-xileno	50.0	88.48	44.24	9.91	0.34	1.27
1-bromohexano	46.0	91.50	42.09	11.35	0.22	1.36
6-metil-2-hepten-4-ol	47.3	92.51	43.76	0.10	0.21	1.28
2-etil-1-hexanol	50.0	86.27	43.13	10.75	0.37	1.34
D-limoneno	48.5	92.81	45.01	10.37	0.20	1.35
2-etil hexil, éster	49.0	91.32	44.75	10.47	0.24	1.35

†: Desviación estándar relativa, ‡= t experimental obtenida, T tablas =2.2 con n=12, α=0.05.

En el cuadro 5 se presentan los resultados obtenidos de la captura de volátiles de flores de chile morrón y jalapeño, observándose que el 6-metil-2-hepten-4-ol se recupero con un 87.6 y 97.4 % respectivamente cuando se adiciono a 50 μg/mL. Esto nos indica que no existió interferencia de matriz además de una precisión del método. La concentración de cada compuestos entre ambas muestras no fue significativamente diferente cuando se realizo la prueba de t de student con α=0.05 y 4 gl, excepto para el caso del 2-etil hexil, éster para el cual el valor de t experimental obtenida fue mayor que t de tablas.

Cuadro 5. Volátiles en flores de chile morrón y jalapeño recolectados por AD.

Compuesto	Morrón μg mL ⁻¹	Jalapeño μg mL ⁻¹	t _{exp} ‡
3-hexanona	5.28±1.7	2.2±0.96	1.59
p-xileno	4.18±2.76	7.06±0.62	0.72
1-bromohexano	1.18±0.021	5.57±1.62	1.28
6-metil-2-hepten-4-ol	43.8±2.9	48.7±3.9	0.45
2-etil-1-hexanol	3.6±0.6	1.8±0.6	0.78
D-limoneno	1.46±0.41	3.67±0.48	0.78
2-etil hexil, éster	0.71±0.17	33.67±6.17	4.01

‡= t experimental obtenida, T tablas =2.1318 con n=6, α=0.05.

CONCLUSIONES

Es posible colectar volátiles de *Capsicum* spp. por el método de aireación dinámica. Este método demostró ser confiable en cada criterio analítico evaluado. El procedimiento usado en este estudio y el sistema usado, permitieron capturar los volátiles en un tiempo estimado de seis horas. Los promedios de recuperación obtenidos para cada estándar no son diferentes de los que se colocan inicialmente, lo cual da la confianza de que el método tiene buena precisión y exactitud y puede recomendarse para la colecta de volátiles en otras matrices de interés. En el desarrollo del método de recolección y análisis de volátiles, se

encontraron mas compuestos, sin embargo su identificación y concentración escapan a los objetivos iniciales de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la colaboración del Dr. Gonzalo Silva-Aguayo y al M. en C. Jorge Alvarado López por la revisión del manuscrito, así como también al CONACyT por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

BIBLIOGRAFIA

- Angioy, A. M., Desogus, A., Barbarossa, I. T., Anderson, P., Hansson, B.S. (2003) Extreme sensitivity in an olfactory system. *Chemical Senses* **28**: 279-284
- Bernays, E. A., Chapman, R. F. (1994) Host-Plant selection by phytophagous insects. Chapman and Hall, NY, USA pp 312
- Calyecac-Cortero, H.G., Cibrián-Tovar, J., Soto-Hernández, M., García-Velazco, R. (2007) Aislamiento e identificación de volátiles de *Physalis philadelphica* LAM. *Agrociencia* **41**: 337-346.
- Coy, G. A. (1999) Estandarización de métodos analíticos. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales. Bogotá. Col.
- Cremer, D.R., Eichner, K. (2000) Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annuum*) powder. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**: 2454-2460
- FAO (Food and Agriculture Organization). (1998) Validation of analytical methods for Food Control. A report of a joint FAO/IAEA Expert Consultation 2-4 December 1997. Vienne, Austria.
- Heath, R. R., Teal, P.E.A., Epsky, N.D., Dueben, B. D., Highth, S. D., Bloem, S., Carpenter, J. E., Weissling, T. J., Kendra, P. E., Cibrian-Tovar, J., Bloem, K. A. (2006) Pheromone-based attractant for male of *Cactoblastis cactorum* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environmental Entomology* **35** (6) : 1469-1476
- Hill, A. (2000) Quality control procedures for pesticide residues analysis-guidelines for residues monitoring in the European Union. 2nd Edition. European Commission, Athens, Greece pp. 30
- Hoffman, E., Strooban, V. (1999) Mass spectroscopy: principles and applications. 2nd Edition. John Wiley & Sons, LTD., ENG pp.1-8
- IUPAC. (2001) Selectivity in Analytical Chemistry. *Pure & Applied Chemistry* **73**: 1381-1386.
- Keith, L. H. (1996) Principles of environmental sampling: ACS Professional reference book. 2nd Edition. American Chemical Society, Washington, DC, USA pp. 412-418
- Lanças, F. M. (2004) Validação de métodos cromatográficos de análise – Métodos cromatográficos de análise. 6nd Edition. Rima Press, São Paulo p. 62
- Lehotay, S. J., Mastovska, K. (2005) Determination of pesticide residues. In Methods of analysis of food components and additives. Ötles, S. (Edition), Taylor & Francis. Boca Raton, FL, USA pp. 329-359
- Lodge, J. (1996) Methods of air sampling and analysis. 3nd Edition. Lewis Publishers, Inc. USA pp. 40-42
- Méndez-Antolín E., Balcinde-Quiñonez, Y., Gonzalez-Canavaciolo, V., Rodríguez-Cruz, E. (2008) Validation of analytical method for quality control of residual solvents (n-hexane and acetone) in D-002: New active ingredient from beeswax. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **47**: 646-650
- Nojima, S., Linn Jr. C., Roelofs, W. (2003) Identification of host fruit volatiles from flowering dogwood (*Cornus florida*) attractive to dogwood-origin *Rhagoletis pomonella* flies. *Journal*

- of *Chemical Ecology* **29**(10) : 2347-2357
- Olsen, E., Nielsen, F. (2001) Predicting vapor pressure of organic compounds from their chemical structure for classification according to the VOC-Directive and risk assessment in general. *Molecules* **6**: 370-378
- Osorio, C. J. (2006) Comportamiento y respuesta hacia atractantes de adultos del picudo de chile, *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México p. 57
- Segura, M. A. (1999) Técnicas para determinar residuos de plaguicidas. In Anaya, R. S., Romero, J. N. (eds). *Hortalizas: Plagas y enfermedades*. Trillas. México, D.F pp. 376-392
- Smith, P. (1976) The Chemotaxonomy of plants. Elsevier, NY, USA p. 313
- Soboleva, E., Ahad, K. Ambrus, A. (2004) Applicability of some mass spectrometric criteria for confirmation of pesticide residues. *The analyst*. **129** (11) : 1123-9
- Thompson, M., Ellison, S. L., Wood, R. (2002) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*. **74**: 835-855
- US EPA. (1996). Method 8000B, Determinative chromatographic separations. Resource recovery and conservation act (RCRA), US Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA p. 46
- Valente, L. A., Almeida, R. R., Rodrigues, J. M., Cunha, V. S., Campino, M. H., Figueroa, J. D. (2008) Development and validation of analytical methodology for the determination of volatile organic compounds for production and certification of reference material. Centro Nacional de Metrología, Queretaro pp. 1058-1-5