



PONTIFICIA **UNIVERSIDAD CATÓLICA** DEL PERÚ

Esta obra ha sido publicada bajo la licencia Creative Commons
Reconocimiento-No comercial-Compartir bajo la misma licencia 2.5 Perú.

Para ver una copia de dicha licencia, visite
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

ANÁLISIS DE EMISIONES DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES DE ORIGEN BIOGÉNICO (BVOCs) EN BOSQUE TROPICAL AMAZÓNICO

Tesis para optar el Título de Licenciado en Química, que presenta el bachiller:

Fabian Limonchi Tamamoto

ASESOR: Eric Gabriel Cosio Caravasi

Lima, junio del 2010

RESUMEN

En la presente investigación se buscó implementar un sistema de monitoreo y análisis de compuestos orgánicos volátiles biogénicos (BVOCs) en campo, que permita la caracterización de su perfil de emisión, así como la cuantificación de los BVOCs presentes. La importancia de este estudio se centra en que estas emisiones pueden ser utilizadas, a largo plazo, como un indicador rápido del estado fisiológico del bosque, y del posible cambio en la biodiversidad de éste. Entre los compuestos elegidos para el monitoreo se encuentran principalmente los terpenoides, pues son los principales BVOCs emitidos por bosques tropicales.

En la primera etapa de este trabajo, se diseñó un sistema de captura de volátiles que permitió la caracterización y cuantificación de estos en escala de laboratorio. El método empleado fue la extracción gas-sólido. Se aplicaron dos distintas matrices para este fin: Porapak Q y Carbograph. Para realizar la captura de volátiles en las matrices, se utilizó un sistema de captura dinámico, mediante el uso de bombas volumétricas de muestreo. Los análisis de estas muestras fueron realizados mediante cromatografía de gases, utilizando para ellos dos distintos equipos: cromatógrafo de gases equipado con detector por ionización de llama (GC/FID), y uno equipado con un detector selectivo de masas (GC/MS).

En la segunda etapa, y partir de los resultados obtenidos en la etapa anterior, se estableció un sistema de monitoreo en campo, empleando la metodología de captura y análisis ya establecida. El trabajo de campo fue realizado en la Reserva Nacional Tambopata, en la provincia de Puerto Maldonado. Se establecieron dos periodos de monitoreo en campo. En el primero de ellos se utilizó Porapak Q y en el segundo Carbograph.

Aplicando la metodología planteada, en la primera parte del trabajo, se pudo determinar una cuantificación para BVOCs en laboratorio, definiendo incluso los límites de detección y la recuperación para cada tipo de matriz. En la segunda etapa, en el trabajo de campo, no se pudo establecer un perfil de emisiones de BVOCs adecuado que pudiese ser utilizado como un indicador de los cambios en el bosque, posiblemente por la baja concentración de BVOCs en las zona y altura que se realizó el monitoreo, además de limitaciones instrumentales. Finalmente se establecieron parámetros a seguir para alcanzar los objetivos en una nueva investigación.

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : Análisis de emisiones de compuestos orgánicos volátiles de origen biogénico (BVOCs) en bosque tropical amazónico.

ÁREA : Química Bioanalítica

ASESOR : Dr. Eric Gabriel Cosio Caravasi

ALUMNO : Fabian Limonchi Tamamoto

CÓDIGO : 20027080.6.12

FECHA : 5 de noviembre de 2009

NUMERO : 164

DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

Los bosques tropicales son de gran importancia para la biodiversidad y el ciclo global del carbono. Debido a ello, existe considerable interés por el estudio de los impactos del actual cambio climático y la actividad humana sobre estos ecosistemas. El bosque tropical más extenso es el amazónico y equivale al 45% de la totalidad de bosques tropicales en el mundo. En él se almacena aproximadamente el 30% del carbono presente en la vegetación terrestre, además de albergar la mayor diversidad de especies vegetales del planeta.

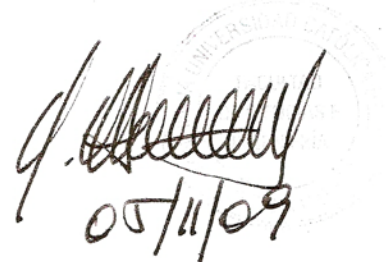
Ante el incremento en las temperaturas ambientales promedio a nivel mundial, se han venido conduciendo numerosas investigaciones sobre de la manera en la que esto puede afectar el ciclo fotosintético de las plantas y, con ello, el balance entre fijación, almacenamiento y reemisión del carbono por parte de la vegetación. Tradicionalmente, se han realizado estudios basados en la observación de las características físicas de los ecosistemas. Estos estudios, sin embargo, sólo proporcionan información sobre el almacenamiento neto, y sólo indirectamente sobre la dinámica de los otros procesos.

Una alternativa para ver aspectos dinámicos es el monitoreo de la emisión de compuestos orgánicos biogénicos volátiles (BVOCs) por parte de las especies vegetales que lo conforman. El monitoreo continuo de BVOCs en un área representativa de bosque permitiría obtener su perfil de emisiones, el cual podría utilizarse para identificar indicadores de estrés fisiológico y evaluar alteraciones en la biodiversidad. El objetivo de esta tesis es el desarrollo de un método de análisis de BVOCs en bosque amazónico. El método a desarrollar deberá incluir un sistema adecuado de captura de volátiles en campo y su posterior análisis en laboratorio. Para esta investigación se utilizarán técnicas de monitoreo ambiental y análisis cromatográficos que permitan una identificación de los perfiles de emisión.

FIRMA DEL ASESOR:

FIRMA DEL COORDINADOR:

Máximo: 100 páginas





...If I had a rocket launcher... o al menos un machete...

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo.

Al Dr. Eric Cosio, por su asesoría y apoyo a lo largo de esta investigación. Gracias por la confianza que depositó en mí.

A la Dirección de Gestión de la Investigación de la Pontificia Universidad Católica del Perú, por el financiamiento de gran parte de esta investigación.

Al Dr. Axel Mithofer, Dr. Jürgen Kesselmeier, Günther Schebeske, y muy especialmente al Dr. Stefan Bartram, del Instituto Max Planck, por su amplia colaboración y aportes en el desarrollo de este trabajo. Gracias Stefan por tu ayuda, asesoría, paciencia y amistad.

Al albergue Explorer's Inn, por las facilidades prestadas para el uso de sus instalaciones. Gracias al grupo de personas que integran el staff de trabajadores del EI y al staff de Naturalistas Residentes por su apoyo en los trabajos de campo, y por su amistad.

A mi familia y amigos, por estar siempre presentes, en mis buenos y malos momentos. A quienes me aguantaron con mi buen y mal humor! Muchas gracias!

...A ese cuento de hadas y fantasías q muchos llamamos laboratorio... que alguna vez fue habitado por un ogro, una rubia, una bruja, un sargento, un gorgojo y un picuro rosa....a todos ellos gracias, muchas gracias por aportar tanto a que siga viviendo inmerso en esa historia...

ABREVIATURAS

Acetil CoA	Acetil coenzima A
BVOCs	Compuestos orgánicos volátiles biogénicos
DMAPP	Dimetil alil pirofosfato
EPC	Control electrónico de presión
FID	Detector por ionización de llama
GPP	Geranil pirofosfato
GPS	Sistema de posicionamiento global
GC/FID	Cromatografía de gases con detector por ionización de llama
GC/MS	Cromatografía de gases con detector de masas.
HR	Humedad relativa
MPI	Instituto Max Planck, Alemania
IPP	Isopentenil pirofosfato
IR	Índice de retención
IRL	Índice de retención lineal
MSD	Detector selectivo de masas
PTFE	Politetrafluoroetileno
PUCP	Pontificia Universidad Católica del Perú
RNT	Reserva Nacional Tambopata
RTL	Tiempo de retención asegurado
TD	Desorción térmica

1. TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	10
2.1 Materiales	10
2.1.1 Reactivos y solventes	10
2.1.2 Materiales	11
2.1.3 Instrumentos	12
2.2 Métodos	14
2.2.1 Cromatografía de gases	14
2.2.1.1 Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC/FID)	14
2.2.1.2 Cromatografía de gases con detector de masas (GC/MS)	14
2.2.2 Sistema separativo	15
2.2.3 Sistema de calibración mediante inyección directa	15
2.2.4 Activación y acondicionamiento de matriz Porapak Q y Carbograph	16
2.2.5 Comparación entre empaques de matriz	17
2.2.6 Determinación de recuperación de volátiles en cartucho con Porapak Q	17
2.2.7 Comparación entre sistemas de elución para Carbograph 1	19
2.2.8 Determinación de recuperación de volátiles en cartuchos con Carbograph 1	21
2.2.9 Control de Estabilidad de compuestos en matriz	22

2.2.10 Control de saturación de matriz por humedad relativa (HR)	23
2.2.11 Captura de volátiles en campo y análisis vía cromatografía de gases	24
2.2.12 Control de temperatura y humedad relativa en campo	25
3. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	26
3.1 Caracterización de volátiles	26
3.2 Cuantificación de volátiles utilizando un sistema de captura por arrastre o dinámico	28
3.2.1 Cuantificación por inyección directa en GC/FID	28
3.2.2 Determinación de la recuperación de volátiles de cartuchos con Porapak Q	30
3.2.3 Cuantificación por inyección directa en GC/MS	33
3.2.4 Determinación de la recuperación de volátiles de cartuchos con Carbograph	37
3.3 Factores que influyen en la determinación y cuantificación de volátiles	47
3.3.1 Control de estabilidad de volátiles a lo largo del tiempo	47
3.3.2 Control de la saturación de la matriz por humedad	49
3.4 Cuantificación de volátiles en bosque	53
3.4.1 Periodo 2008 – Matriz Porapak Q	55
3.4.2 Periodo 2009 – Matriz Carbograph	63
4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	72

5. CONCLUSIONES

84

5. BIBLIOGRAFÍA

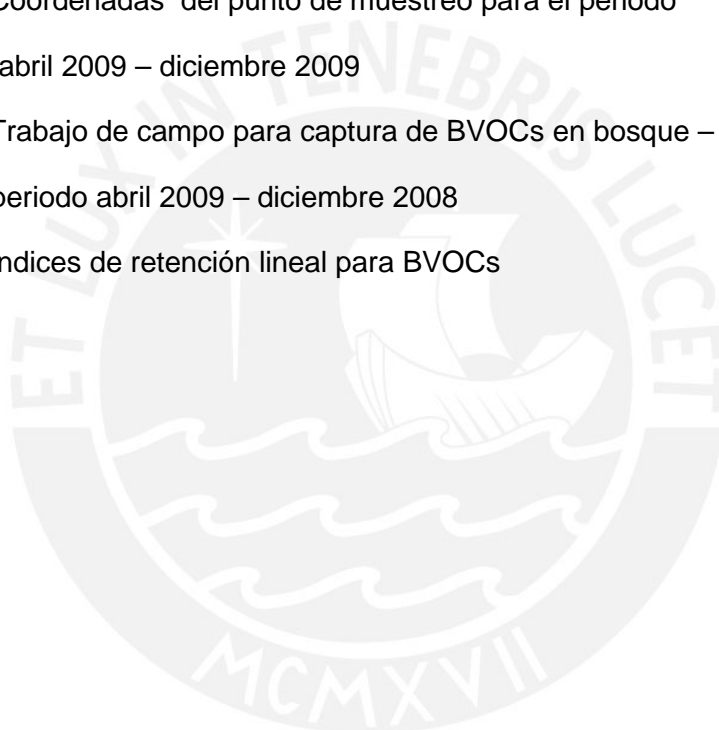
86



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización de volátiles de interés vía GC/FID	26
Tabla 2. Caracterización de volátiles de interés vía GC/MS	27
Tabla 3. Recuperación de α -pineno en Porapak Q	31
Tabla 4. Recuperación de β -pineno en Porapak Q	31
Tabla 5. Recuperación de octanal en Porapak Q	31
Tabla 6. Recuperación de p-cimeno en Porapak Q	32
Tabla 7. Recuperación de r-limoneno en Porapak Q	32
Tabla 8. Recuperación de linalool en Porapak Q	32
Tabla 9. Recuperación de solvente luego de la elución del cartucho "cónico modificado" a distintas velocidades	38
Tabla 10. Recuperación de <i>trans</i> -2-hexenal en Carbograph 1	40
Tabla 11. Recuperación de <i>trans</i> -2-hexen-1-ol en Carbograph 1	41
Tabla 12. Recuperación de α -pineno en Carbograph 1	41
Tabla 13. Recuperación de canfeno en Carbograph 1	41
Tabla 14. Recuperación de β -pineno en Carbograph 1	42
Tabla 15. Recuperación de mirceno en Carbograph 1	42
Tabla 16. Recuperación de octanal en Carbograph 1	42
Tabla 17. Recuperación de p-cimeno en Carbograph 1	43
Tabla 18. Recuperación de r-limoneno en Carbograph 1	43
Tabla 19. Recuperación de linalool en Carbograph 1	43
Tabla 20. Recuperación de citronelal en Carbograph 1	44
Tabla 21. Recuperación de α -terpineol en Carbograph 1	44
Tabla 22. Recuperación de citronelol en Carbograph 1	44

Tabla 23. Recuperación de geraniol en Carbograph 1	45
Tabla 24. Recuperación de 4-metoxibenzaldehído en Carbograph 1	45
Tabla 25. Recuperación de citral en Carbograph 1	45
Tabla 26. Coordenadas de los puntos de muestreo para el periodo marzo 2008 – diciembre 2008.	55
Tabla 27. Trabajo de campo para captura de BVOCs en bosque – periodo marzo 2008 – diciembre 2008	56
Tabla 28. Coordenadas del punto de muestreo para el periodo abril 2009 – diciembre 2009	63
Tabla 29. Trabajo de campo para captura de BVOCs en bosque – periodo abril 2009 – diciembre 2008	65
Tabla 30. Índices de retención lineal para BVOCs	74



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Algunos terpenoides característicos emitidos por plantas	4
Figura 2. Ruta biosintética del isopreno y monoterpenos	6
Figura 3. Cartuchos de vidrio para empacado de matriz	16
Figura 4. Sistema de captura de volátiles por método de arrastre	18
Figura 5. Ensamble cartucho/teflón/vial	19
Figura 6. Secuencia del sistema de elución por reflujo criogénico	20
Figura 7. Sistema de captura de volátiles por método de arrastre	22
Figura 8. Sistema dinámico de captura de volátiles en campo	24
Figura 9. Curvas de calibración para cada compuesto de interés utilizando GC/FID	29
Figura 10. Recuperación promedio de monoterpenos a partir de cartuchos Porapak Q (100 mg) por elución con solvente diclorometano	33
Figura 11. Curvas de calibración para cada compuesto de interés utilizando GC/MS	34
Figura 12. Experimento de eluciones sucesivas	39
Figura 13. Recuperación promedio en porcentaje de estándares a partir de cartuchos de Carbograph 1 (100 mg) por elución con diclorometano	46
Figura 14. Variación en la estabilidad de los compuestos volátiles en cartuchos de Carbograph 1 almacenados a -20°C	48
Figura 15. Recuperación de compuestos volátiles en matriz Porapak Q dependiendo de la exposición a HR	50

Figura 16. Recuperación de compuestos volátiles en matriz Carbograph 1 dependiendo de la exposición a HR	51
Figura 17. Cromatogramas representativos para análisis de volátiles ante la prueba de saturación por humedad	52
Figura 18. Mapa de localización del área de estudio en la Reserva Nacional Tambopata	54
Figura 19. Cromatogramas representativos de muestras de bosque, 29 de marzo de 2008	56
Figura 20. Concentración de BVOCs capturados en campo utilizando 100 mg de matriz Porapak Q	57
Figura 21. Cromatograma de volátiles capturados en el mes de octubre de 2008	58
Figura 22. Árbol seleccionado para toma de muestras luego de su caída	59
Figura 23. Cromatograma de volátiles capturados en el mes de diciembre de 2008	60
Figura 24. Descarga de datos del sensor de temperatura y humedad en campo	61
Figura 25. Condiciones climáticas en zona de estudio	62
Figura 26. Instalación del nuevo sistema de muestreo de BVOCs	64
Figura 27. Caseta para monitoreo de condiciones climáticas	65
Figura 28. Captura de BVOCs en campo utilizando Carbograph 1	67
Figura 29. Cromatogramas de volátiles capturados en el mes de abril de 2009 analizados vía GC/MS	68

Figura 30. Cromatogramas de volátiles representativos para los monitoreos entre mayo y diciembre de 2009	70
Figura 31. Condiciones climáticas en zona de estudio	71
Figura 32. Difusores Radiello® para muestreo pasivo	76



1. INTRODUCCIÓN

Los bosques tropicales presentan una gran importancia para la biodiversidad mundial y el ciclo global del carbono. Debido a ello, se ha generado un gran interés por el estudio de los impactos sobre estos ecosistemas causados por el actual cambio climático y la actividad humana. La importancia de estos bosques se centra principalmente en que albergan a la mayor variedad de árboles y especies vegetales en general del planeta, y de esta forma genera una fuerte influencia en los ciclos biogeoquímicos, como el ciclo hídrico o el ciclo del carbono. En estos bosques se almacena cerca del 40% del carbono terrestre (Malhi y col., 2002; Vieira y col., 2005).

El bosque tropical más extenso del mundo está ubicado en la Amazonía, y equivale aproximadamente al 45% de bosques tropicales del mundo. Abarca en toda su extensión una gran variedad de climas, topografía, geografía y estructuras de bosque. En el bosque tropical amazónico se fija aproximadamente 30% del carbono presente en vegetación terrestre. Además, participa en el ciclaje de 20% del agua fresca de la Tierra (Malhi y col., 2002; Vieira y col., 2005).

Si bien la dinámica sucesional en bosques tropicales tiende a ser más rápida que en bosques templados, dentro de la Amazonía se encuentran numerosos bosques antiguos en donde residen árboles maduros, los cuales representan los principales reservorios de biomasa en los ecosistemas naturales. La amplia vegetación de estas regiones mantiene un importante intercambio de gases con la atmósfera. Por esta razón, los bosques tropicales, y en particular el amazónico, cumplen un rol trascendental en los ciclos globales del agua y del carbono, de gran importancia para la vida en el planeta. La pérdida de los bosques, su posible intercambio por otro tipo de vegetación, como tierras de cultivo y/o pastoreo, e incluso pequeños cambios en la estructura y/o funcionamiento de estos, pueden traer consigo grandes consecuencias sobre la biodiversidad, cambios en los ciclos hidrológicos y de carbono, y en el clima en general (Malhi y col., 2002; Vieira y col., 2005).

A nivel mundial, los ecosistemas silvestres están sufriendo cambios severos debido a una variedad de actividades y procesos antropogénicos. De acuerdo a estudios realizados en las últimas décadas, los bosques están experimentando cambios en su estructura debido a variaciones en las condiciones ambientales a nivel global, regidas por factores como la creciente concentración de dióxido de carbono atmosférico, variación en precipitaciones, incremento anual progresivo de la

temperatura y la radiación solar. Todas estas alteraciones pueden afectar el ciclo fotosintético de las plantas, así como alterar el balance de almacenamiento, producción y aprovechamiento del carbono por parte de la vegetación (Malhi y col., 2002; Phillips y col., 2004; Clark, 2007).

En respuesta a los cambios climáticos, los bosques tropicales sufren una serie de modificaciones en su dinámica y biodiversidad. Estudios realizados a largo plazo indican que la velocidad de producción de árboles es mayor a la velocidad de mortalidad. Además, se observa un aumento en la biomasa presente en bosque, correspondiente a la aceleración en el crecimiento de los árboles en promedio (Malhi y col., 2002; Clark, 2007). Al aumentar las velocidades de producción y de crecimiento de las especies, se ocasionan perturbaciones en el ecosistema, y se ve favorecida la aparición de especies de madera más ligera, sobre aquellas de crecimiento más lento y con madera más densa, pues son las primeras las que pueden adaptarse con mayor facilidad a los cambios climáticos (Malhi y col., 2002; Phillips y col., 2004).

Los cambios en la composición de los bosques tropicales originan alteraciones en las actividades relacionadas a estos espacios, puesto que afectan a las especies animales que dependían de los árboles antiguos para su reproducción y supervivencia. También pueden tener consecuencias económicas y sociales, en el caso de que las especies vegetales que están siendo desplazadas tengan mayor valor comercial que las emergentes (Malhi y col., 2002; Phillips y col., 2004).

Los árboles de menor masa, o la vegetación más ligera presente, disminuyen la capacidad de almacenar carbono en los bosques y, como consecuencia de sus ciclos de vida más cortos, aceleran la ciclación del carbono en estas áreas. Se ha encontrado que los árboles ligeros favorecidos con las variaciones climáticas son principalmente lianas, según lo indican estudios llevados a cabo en la selva Amazónica (Clark, 2007). Las lianas son árboles trepadores leñosos, que actúan como parásitos estructurales de los árboles de mayor masa. Utilizan a estos para trepar, desde el suelo, hasta el techo o copa del bosque para conseguir el máximo de luz posible para poder llevar a cabo sus procesos biológicos.

La biomasa correspondiente a las lianas en el bosque es pequeña pero tiene la capacidad de suprimir la biomasa de los árboles grandes considerablemente. Al colonizar de manera desigual a los diferentes tipos de árboles, las lianas tienden a

alterar su balance competitivo, suprimiendo la regeneración de las especies más afectadas (Phillips y col., 2004; Phillips y col., 2005).

El estudio de los cambios en la composición de los bosques tropicales y en la dinámica en la producción y mortalidad que estos encierran ha sido realizado siguiendo diversas metodologías que se basan principalmente en observar las características físicas de los ecosistemas (Mahli y col., 2002). La problemática de estos estudios radica en que deben realizarse en grandes extensiones de terrenos y por períodos prolongados, de tal forma que se puedan establecer patrones y distinguir cambios en la composición y la dinámica de los bosques. Luego de observar los cambios físicos en la vegetación, tales como el diámetro y la altura de los árboles, estos deben ser relacionados con los parámetros ambientales registrados (temperatura, niveles de CO₂, etc.).

Compuestos orgánicos volátiles biogénicos (BVOCs)

Una alternativa para el estudio de los cambios en bosques tropicales es el monitoreo de la emisión de compuestos orgánicos volátiles biogénicos (BVOCs) por parte de las especies vegetales. Estos BVOCs fitogénicos son metabolitos secundarios o intermediarios del metabolismo primario de las plantas, cuya producción depende del organismo de origen, para quien por lo general desempeñan funciones relacionadas con la interacción de la planta con su entorno, primordialmente aplicadas a mecanismos de defensa contra herbívoros y patógenos, atracción de polinizadores, dispersores de semillas y otras actividades involucradas en la comunicación planta-planta, en su entorno biológico y físico (Dudareva y col., 2004; Peñuelas & Llusià, 2004; Dudareva & Pichersky, 2008).

Los BVOCs son compuestos con bajos puntos de ebullición y altas presiones de vapor, lo que les permite pasar a fase gaseosa a la temperatura normal de crecimiento de la planta y difundir hacia la atmósfera (Peñuelas & Llusià, 2003). La producción de BVOCs por parte de las plantas se da en diferentes tejidos de estas y por medio de distintos procesos fisiológicos. Es un proceso constante y la emisión se da como resultado de su inherente volatilidad. Sin embargo, se ve favorecida la síntesis de aquellos compuestos que desempeñan roles de comunicación y defensa para la planta, cuando ésta lo requiere. La emisión de BVOCs constituye el 90% de compuestos orgánicos emitidos naturalmente a la atmósfera anualmente (excluyendo al metano) (James y col., 2002; Kuhn y col., 2004).

El patrón de compuestos volátiles liberados por los tejidos de las plantas es generado a través de diversas vías metabólicas (Lerdau y col., 1997; Dudareva y col., 2004). Se conocen alrededor de 30000 BVOCs (Peñuelas & Llusià, 2004), entre los que se encuentran distintos alcanos, alquenos, carbonilos, alcoholes ésteres, éteres, ácidos, y principalmente terpenoides (isopreno y monoterpenos). (Kesselmeier & Staud, 1999).

Se conoce como terpenoides a compuestos orgánicos de origen biogénico, cuyas estructuras están divididas en unidades de isopreno (cinco carbonos). Dentro de los terpenoides tenemos monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) (ver Figura 1). Entre sus características estructurales se observa que la gran mayoría de estos son hidrocarburos insaturados, con uno o más dobles enlaces $C=C$, y es debido a esto que los terpenoides pueden reaccionar con un gran número de constituyentes de la atmósfera (ozono, óxidos de nitrógeno, radicales hidroxilo, entre otros). El isopreno y los monoterpenos son los de mayor importancia en la química atmosférica debido a su mayor volatilidad, lo que les permite ser los compuestos predominantemente emitidos por las plantas (Calogirou y col., 1998; Kesselmeier & Staud, 1999).

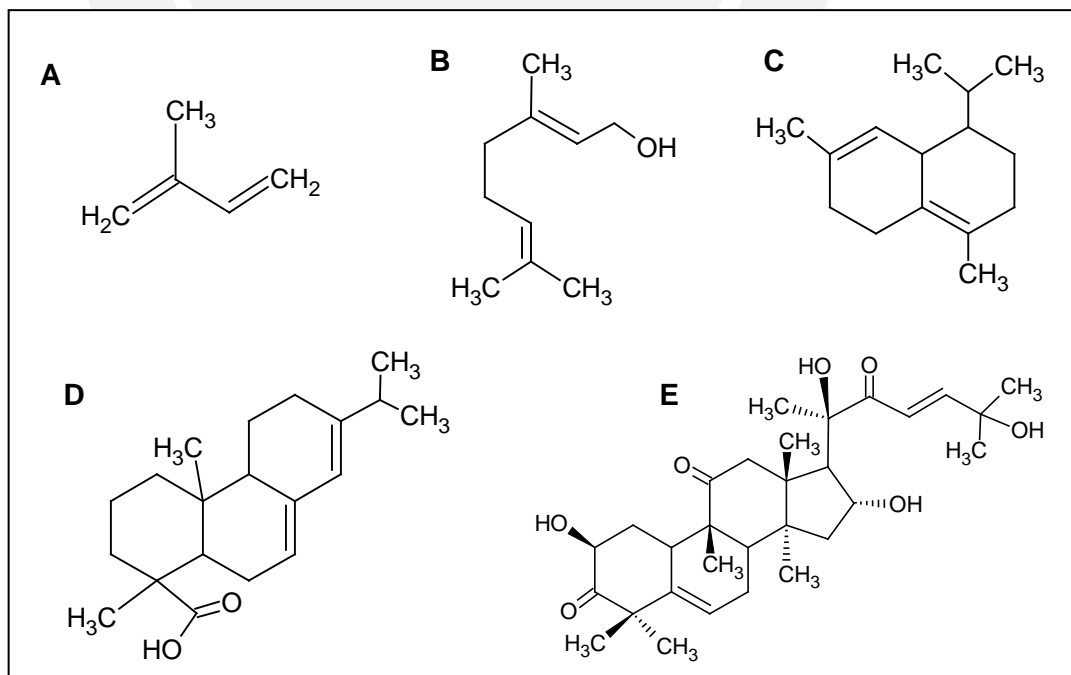


Figura 1. Algunos terpenoides característicos emitidos por plantas. (A) isopreno, (B) monoterpene, (C) sesquiterpene, (D) diterpene, (E) triterpene.

La emisión de isopreno requiere de su biosíntesis *de novo*, esto debido a que es producido en los cloroplastos pero no es almacenado, es decir que, en cuanto es producido, difunde a través de la planta y es emitido (Lerdau y col., 1997). Por el contrario, la emisión de monoterpenos, en la mayoría de los casos, se da desde almacenes al interior de la planta, como canales resiníferos y otras estructuras. Luego de su producción, los monoterpenos son secretados en estructuras especiales, del tipo ductos o canales, lo que ayuda a su pérdida dispersiva en la hoja y hacia la atmósfera. Las estructuras de almacenamiento varían según la taxonomía de la propia planta (Lerdau y col., 1997; Sharkey & Yeh, 2001).

El isopreno es producido como un paso previo de la ruta del ácido mevalónico en los cloroplastos, donde dos moléculas de acetil coenzima A (acetil CoA) son convertidas en isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP). El DMAPP elimina el grupo pirofosfato vía la isopreno sintasa dando como producto al isopreno. Debido a que no hay un mecanismo de almacenamiento del isopreno, este es emitido y, por tanto, el rango de emisión es igual al rango de biosíntesis (Lerdau y col., 1997; Sharkey & Yeh, 2001) (ver Figura 2)

Los monoterpenos, como los demás terpenoides, son producidos a partir de IPP y DMAPP, mediante una adición del tipo cabeza a cola para formar geranyl pirofosfato (GPP). Un paso previo a la formación de los monoterpenos es la eliminación del grupo pirofosfato por GPP, promovido por una monoterpeno ciclasa, como se puede observar en la Figura 2 (Lerdau y col. 1997).

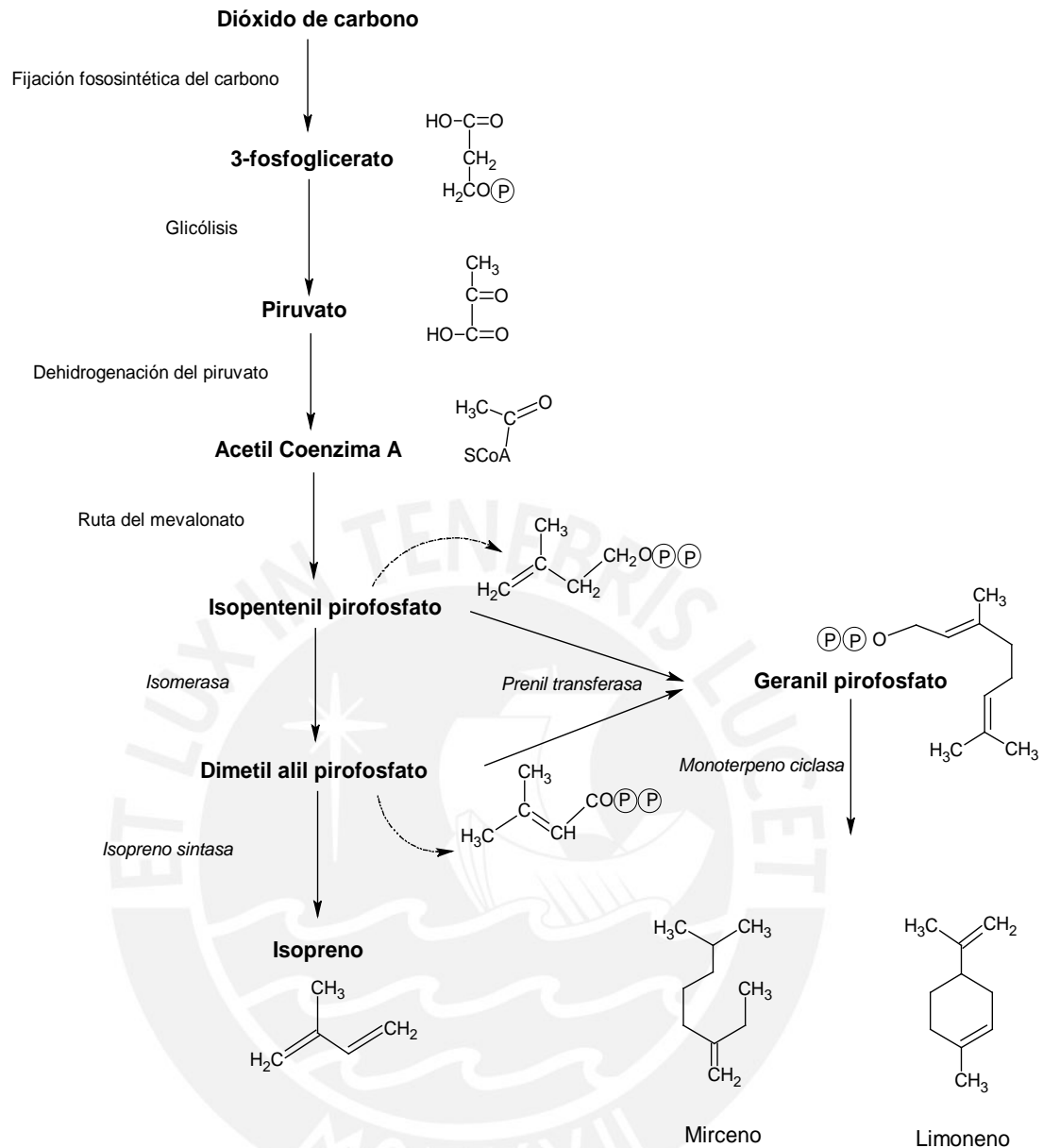


Figura 2. Ruta biosintética del isopreno y monoterpenos. Modificado de Lerdaу col. 1997.

Existen factores que influyen en la emisión y producción de los BVOCs, tales como la etapa de desarrollo de la planta, el estrés biótico y abiótico, la temperatura y la intensidad de luz. Muchos estudios sobre la emisión de isopreno muestran su dependencia de la temperatura y de la luz, debido a la relación que existe entre la emisión y la biosíntesis fotosintética (Arneث y col., 2008; Kesselmeier & Staud, 1999).

La emisión de monoterpenos desde sus “almacenes” en las plantas, está condicionada a la temperatura, ya que esta tiene una influencia individual en la presión de vapor de cada monoterpeno presente (Kuhn y col., 2004). Anteriormente no se realizaba una correlación de dependencia entre la emisión de monoterpenos y la intensidad de la luz, nuevos estudios demuestran que las emisiones de monoterpenos son también dependientes de la luz (Arneth y col., 2008; Dindorf y col., 2006).

Un estudio de los perfiles de volátiles correspondientes a diferentes especies vegetales dentro de un bosque, implica hacer un seguimiento a largo plazo de las emisiones, tanto en diferentes momentos del día como durante períodos largos de tiempo y en diferentes estaciones del año. Las variaciones en los factores climáticos involucrados en los ciclos circadianos y estacionales pueden influir en los perfiles y es necesario reconocer el grado en que estos se ven afectados con respecto al tiempo (Arneth y col., 2008; Pichersky y col., 2006; Saxton y col., 2007; Wilske y col., 2007).

Dependiendo de la especie, la producción acumulación y/o emisión de los BVOCs puede responder específicamente a los cambios ambientales. Estos últimos producen alteraciones, tanto en la velocidad de síntesis como en las características físico-químicas de los compuestos, al verse alteradas las condiciones normales de temperatura e intensidad luminosa (Peñuelas & Llusà, 2003).

Durante los procesos fotosintéticos, el aumento de temperatura actúa de forma positiva sobre la fijación del carbono atmosférico, pero únicamente hasta un valor límite, punto a partir del cual la fijación del carbono se ve disminuida y, como consecuencia, la velocidad de los procesos fotosintéticos también. Por el contrario, la actividad sintética de BVOCs se ve favorecida con el paulatino incremento de temperatura luego de este punto límite. La producción y emisión de BVOCs se ve también influenciada por la cantidad de luz recibida, siguiendo el mismo comportamiento que el proceso dependiente de temperatura (Peñuelas & Llusà, 2003; Lerdau & Slobodkin, 2002).

En un bosque, las emisiones de volátiles son fotogénicas casi en su totalidad, por lo que puede considerarse que las variaciones en la composición de especies vegetales y en su estado fisiológico se verán reflejadas en la composición de la mezcla de BVOCs en la atmósfera bajo y sobre las copas del bosque. Por tanto, los perfiles de volátiles constituyen un parámetro de naturaleza química, aplicable al

estudio de los bosques tropicales para la evaluación de la biodiversidad y como indicador de estado fisiológico (Saxton y col., 2007).

Se asume que los bosques tropicales son la mayor fuente de emisiones de BVOCs fitogénicos del mundo, sobre todo el bosque tropical amazónico (Greenberg y col, 2004). Una forma de estudiar el estrés fisiológico y el cambio en la biodiversidad en bosques tropicales es mediante el monitoreo de la emisión de BVOCs. Variaciones en la vegetación presente en el bosque, ya sea por factores climáticos, geológicos o antropogénicos, se verán reflejadas en la variación del perfil de emisión de los BVOCs.

La presente investigación tomó como base el monitoreo de BVOCs en la Reserva Nacional Tambopata (RNT), dentro de una zona de bosque de tierra firme, no inundable, seleccionada por su representatividad. La RNT está ubicada en un área de bosque tropical amazónico, aproximadamente a 60 km al sur de la ciudad de Puerto Maldonado, en el Departamento de Madre de Dios. La zona seleccionada para el estudio se caracterizó por tener suelos de buen drenaje y una variedad de vegetación relativamente reducida, constituida principalmente por árboles de madera dura acompañados por un alto número de lianas (Phillips y col., 2004).

Este trabajo tiene como objetivo principal implementar un sistema de monitoreo en el área delimitada dentro de la RNT, que permita una caracterización del perfil de emisión de BVOCs y la cuantificación de estos, principalmente de terpenoides. Los resultados generados a largo plazo se podrán utilizar como un indicador del estado fisiológico del bosque.

En la primera parte de este trabajo, se diseñó un sistema de captura de volátiles que permitió la caracterización y cuantificación de estos. El método empleado fue la extracción en fase sólida de volátiles capturados mediante un muestreo dinámico, utilizando bombas de muestreo volumétrico. En el empleo de este sistema para la captura de volátiles, se utilizó dos matrices distintas, Porapak Q y Carbograph, siendo la primera una matriz polimérica de polietilvinilbenceno entrecruzado, y la segunda una matriz de carbono grafito poroso.

Todos los volátiles trabajados en la etapa de laboratorio fueron analizados por técnicas de cromatografía de gases, empleando distintos detectores para ello. Tanto para Porapak Q como para Carbograph, los resultados de la cuantificación de los volátiles a nivel laboratorio fueron positivos. A partir de estos resultados es que

se estableció un monitoreo en campo, empleando el mismo sistema de cuantificación.

Se establecieron dos periodos de monitoreo en campo. En el primero de ellos se utilizó la matriz Porapak Q y en el segundo Carbograph.

La metodología empleada y los resultados mostrados, servirán como base para futuras investigaciones. A partir de los resultados mostrados en esta investigación, se propondrá introducir variantes en el monitoreo y procesamiento de cada muestra con el fin de alcanzar nuevos objetivos.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Reactivos y solventes

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico, salvo que se indique lo contrario.

Aldrich (Missouri, Estados Unidos de América)

- 4 – Metoxibenzaldehído, 98%
- (1S)-(-)- β -Pineno, 99%
- α -Pineno, 98%
- Canfeno, 95%
- Geraniol, 98%
- Linalool, 97%
- Octil aldehído, 99%
- p – Cimeno, 99%
- *Trans* – 2 – hexen – 1 – ol, 96%
- *Trans* – 2 – hexenal, 98%

J.T. Baker (New Jersey, Estados Unidos de América)

- Acetonitrilo, grado HPLC

Merck (Darmstadt, Alemania)

- α -Terpineol
- Citral
- Citronelal
- Citronelol
- Mirceno
- Diclorometano, grado HPLC
- Éter dietílico

Praxair (Callao, Perú)

- Nitrógeno gas

Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos de América)

- (R)-(+)-Limoneno, 97%

2.1.2 Materiales

Agilent Technologies (California, Estados Unidos de América)

- Columna HP-5ms para cromatógrafo de gases (30 m de longitud; 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μ m espesor) con fase estacionaria 5% fenil y 95% polidimetilsiloxano
- Insertos de vidrio para vial, volumen de 100 μ L
- Lana de vidrio (grado para análisis de pesticida)
- Vial transparente con tope para tapa rosca de 12 mm, volumen de 2 mL con tapa rosca con fondo de teflón (PTFE).

Laboratori Analitici di Ricerca Associati s.r.l. (Roma, Italia)

- Carbograph 1, 20/40
- Carbograph 5, 20/40

Pontificia Universidad Católica del Perú, Taller de Vidrio (Lima, Perú)

- Cartucho de vidrio con fritado a 15 mm para cargar matriz (8 cm de longitud; 5 mm de diámetro externo y 3 mm de diámetro interno)

SCK Inc. (Pennsylvania, Estados Unidos de América)

- Bolsa de muestreo de fluoruro de polivinilo de 3 L con válvula de polipropileno, modelo 232-03

Sigma-Aldrich (Missouri, Estados Unidos de América)

- Tubería de Tygon

Supelco (Pennsylvania, Estados Unidos de América)

- Lana de vidrio grado pesticida
- Porapak Q, 50/80
- Vial transparente con tope para tapa rosca de 12 mm, volumen de 2 mL, con tapa rosca con fondo de teflón (PTFE)

Zebron, Phenomenex (California, Estados Unidos de América)

- Columna ZB-5ms para cromatógrafo de gases (30 m de longitud; 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m espesor) con fase estacionaria 5% fenil y 95% polidimetilsiloxano

2.1.3 Instrumentos

Agilent Technologies (California, Estados Unidos de América)

- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II acoplado a detector de masas MSD 5971A
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II equipado con detector de ionización de llama
- Inyector automático Hewlett Packard 7673
- Software GC ChemStation, G1034C versión C.03.00
- Software GC ChemStation, versión Rev. A. 10.02 [1757]

Bios International Corporation (New Jersey, Estados Unidos de América)

- Calibrador de flujo de aire DryCal DC-Lite

Garmin Ltd. (Kansas, Estados Unidos de América)

- Equipo de Sistema de Posicionamiento Global (GPS) GPSmap 60CSx
- Software MapSource, versión 6.13.7

Hamilton Company (Nevada, Estados Unidos de América)

- Jeringa de 25 μ L modelo Gastight 1702
- Jeringa de 50 μ L modelo Gastight 1705
- Jeringa de 100 μ L modelo Gastight 1710
- Jeringa de 250 μ L modelo Gastight 1725
- Jeringa de 1 mL modelo Gastight 1001
- Jeringa de 2,5 mL modelo Gastight 1002

Hanna Instruments (Rhode Island, Estados Unidos de América)

- Termómetro electrónico modelo E1Th WP

Ika-Works (Carolina del Norte, Estados Unidos de América)

- Vórtex de agitación MS1

Omega Engineering, Inc. (Connecticut, Estados Unidos de América)

- Sensor registrador de datos de temperatura y humedad OM-62
- Software Omega Logger Interface Program, versión 1.21

Pierce (Illinois, Estados Unidos de América)

- Bloque termostatzado con módulo de agitación modelo Reacti-Therm

SCK Inc. (Pennsylvania, Estados Unidos de América)

- Bomba volumétrica de muestreo AirLite Sampler Model 110-100

VWR (Pennsylvania, Estados Unidos de América)

- Bloque termostatzado analógico 949311

2.2 Métodos

2.2.1 Cromatografía de Gases

2.2.1.1 Cromatografía de gases con detector por ionización de llama (GC/FID)

Las muestras de volátiles obtenidas, tanto en laboratorio como en campo, hasta el mes de abril de 2009 fueron analizadas utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Series II, equipado con un detector por ionización de llama (FID) y una columna HP-5ms, de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase estacionaria, cuya composición fue de 5% fenil y 95% polidimetilsiloxano. Se utilizó un sistema de inyección manual y helio como gas portador.

El volumen de cada muestra inyectada fue de 1 μL . La inyección se realizó en modo de división de flujo con relación de 20:1, temperatura de inyector de 250°C y de detector de 300°C. El flujo inicial del gas portador fue de 2,5mL/min.

El programa utilizado tuvo una duración de 33 minutos. La temperatura inicial fue de 40°C y se mantuvo durante 3 minutos. Después de este tiempo se inició un gradiente de temperatura de 8°C/min hasta 240°C. Finalmente se mantuvo a 240°C durante 5 minutos.

2.2.1.2 Cromatografía de gases con detector de masas (GC/MS)

A partir de abril de 2009 se contó con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5890 Series II acoplado a un detector de masas Hewlett Packard modelo 5971A. Las muestras de volátiles desde entonces fueron analizadas en dicho cromatógrafo, que estaba equipado con una columna ZB5-ms, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno, 0,25 μm de espesor de fase estacionaria, cuya composición fue de 5% fenil y 95% polidimetilsiloxano. Se utilizó un sistema de inyección automática, mediante el auto muestreador Hewlett Packard 7673, utilizando helio como gas portador.

El volumen de cada muestra inyectada fue de 1 μL . La inyección se realizó en modo de división de flujo con relación de 20:1, temperatura de inyector de 250°C y de interfase de detector en 280°C. El flujo de gas portador fue de 0,9 mL/min.

El programa utilizado tuvo una duración de 30,5 minutos. La temperatura inicial fue de 40°C y se mantuvo durante 3 minutos. Después de este tiempo se inició un gradiente de temperatura de 8°C/min hasta 260°C. Finalmente se mantuvo a 260°C durante 3 minutos.

2.2.2 Sistema separativo

Se prepararon soluciones, con concentración conocida, de compuestos de interés para observar su separación y tiempo de retención en el cromatógrafo de gases. Cada solución preparada fue de 1 mL y se utilizó diclorometano como solvente.

Los compuestos de interés utilizados fueron:

4-metoxibenzaldehído, canfeno, p-cimeno, citral, citronelal, citronelol, geraniol, (R)-(+)-limoneno, linalool, mirceno, octanal, α -pineno, (1S)-(-)- β -pineno, α -terpineol, *trans*-2-hexen-1-ol, *trans*-2-hexenal. Adicionalmente, a las soluciones de estándares individuales se prepararon soluciones, a distintas concentraciones, con una mezcla de todos estos compuestos.

Para preparar las soluciones se partió, en cada caso, de 5 μ L de un estándar el cual fue diluido con diclorometano completando un volumen de 1 mL. Todos los volúmenes fueron medidos con micro jeringa. A partir de cada solución madre se realizaron diluciones sucesivas para obtener soluciones de menor concentración. Cada solución se preparó por triplicado.

Finalmente se procedió a analizar cada solución en el cromatógrafo de gases según se explica en la sección 2.2.1.1 y 2.2.1.2.

2.2.3 Sistema de calibración mediante inyección directa

Se prepararon soluciones, de concentración conocida, de compuestos de interés. Cada solución preparada fue de 1,5 mL y se prepararon siguiendo un método de diluciones sucesivas para obtener distintas concentraciones.

Los compuestos de interés utilizados fueron los mismos utilizados en la sección 2.2.2.

Se analizó cada solución en el cromatógrafo de gases según lo descrito en las secciones 2.2.1.1 y 2.2.1.2. Cada determinación se realizó por triplicado.

2.2.4 Activación y acondicionamiento de matriz Porapak Q y Carbograph 1

Cada matriz fue empacada en cartuchos de vidrio. Se contó con dos tipos de cartuchos. El primero de ellos, cartucho “fritado”, fue fabricado en el Taller de Vidrio de la Pontificia Universidad Católica del Perú (PUCP). Las dimensiones de estos cartuchos fueron: 8 cm de longitud, 5 mm de diámetro externo y 3 mm de diámetro interno; con un fritado a 15 mm. El segundo tipo de cartucho, “cónico modificado”, se fabricó a partir de la modificación de pipetas Pasteur descartables de 9 pulgadas, las dimensiones del cartucho resultante fueron 6,5 cm de largo, 6 mm de diámetro externo, 5 mm de diámetro interno, y un adelgazamiento en la parte inferior que reduce el diámetro externo hasta 3mm (ver Figura 3).

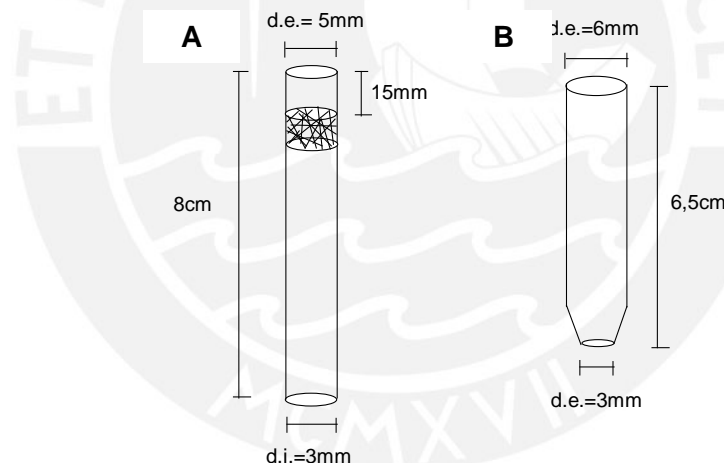


Figura 3. Cartuchos de vidrio para empacado de matriz. (A) Cartucho “fritado”, fabricado en el Taller de vidrio de la PUCP. (B) Cartucho “cónico modificado”, modificación hecha a partir de una pipeta Pasteur de 9”.

Para Porapak Q, se empacó cada cartucho de vidrio con 100 ± 5 mg de matriz, utilizando lana de vidrio para terminar el empaque. Se acondicionó cada cartucho con 1 mL de acetonitrilo y se activó la matriz en un bloque termostático a una temperatura de 130°C durante 2 horas bajo flujo de nitrógeno. Los cartuchos se

almacenaron colocándolos en grupos de 3 dentro de tubos de vidrio y cerrándolos bajo flujo de nitrógeno.

En el caso de Carbograph 1, de igual manera, se empacó cada cartucho de vidrio con 100 ± 5 mg con matriz Carbograph 1, y se utilizó lana de vidrio para terminar el empaque. Se acondicionó cada cartucho con 1 mL de diclorometano y se activó la matriz en un bloque termostático a una temperatura de 160°C durante 1 hora bajo flujo de nitrógeno. Los cartuchos se almacenaron colocándolos en grupos de 3 dentro de tubos de vidrio y cerrándolos bajo flujo de nitrógeno.

2.2.5 Comparación entre empaques de matriz

Se empacaron 100 ± 5 mg de matriz Carbograph 1 en ambos tipos de cartucho de vidrio (cartucho “fritado” y “cónico modificado”). Cada tipo de cartucho se empacó por triplicado.

Cada uno de los cartuchos fue sometido a una prueba de flujo de aire. Para ello, se conectó a un extremo del cartucho una bomba de muestreo y al otro extremo un calibrador de flujo. Se midió el flujo de aire a través de cada tipo de empaque durante un lapso de 3 minutos. Se repitió el procedimiento con cartuchos empacados con matriz Porapak Q.

2.2.6 Determinación de recuperación de volátiles en cartucho con Porapak Q

Para obtener un parámetro de recuperación de volátiles en el cartucho con Porapak Q, se realizó un experimento de captura y elución de compuestos de interés. Este experimento fue repetido a distintas concentraciones, por triplicado, y se le denominó experimento de recuperación. Los resultados fueron comparados con los obtenidos para la curva de calibración para determinar el porcentaje de recuperación de cada compuesto.

Se utilizó un sistema de captura de volátiles por arrastre (muestreo dinámico) en cartucho con Porapak Q. Se colocó un tubo de vidrio de 11 cm de largo y 1 cm de diámetro externo dentro de un bloque termostático calentado a 40°C . Se recubrió el interior del tubo de vidrio con una cantidad conocida de una mezcla de los compuestos de interés y se armó el sistema de captura por arrastre (Figura 4). La

captura se realizó a una velocidad de 200 mL/min, durante 15 minutos. Para el experimento de recuperación, se tomaron cinco puntos, cada uno de ellos por triplicado. Para las soluciones se utilizaron mezclas de cinco compuestos de interés mencionados en la sección 2.2.2.

Cada cartucho se eluyó con 1 mL de éter dietílico, forzando la elución con gas nitrógeno. La solución etérea fue evaporada a sequedad, mediante flujo de gas nitrógeno a temperatura ambiente, y los volátiles presentes fueron redisolueltos en 0,5 mL de diclorometano. La solución se analizó por cromatografía de gases como se indica en la sección 2.2.1.1. inmediatamente después de su elución. Se prefiere para la elución éter dietílico frente al diclorometano dada la mayor volatilidad del primero, lo que permitió evaporar el solvente y concentrar la muestra sin perder una cantidad considerable de compuestos volátiles de interés.



Figura 4. Sistema de captura de volátiles por método de arrastre. Un tubo de vidrio recubierto en su interior con una cantidad definida de una mezcla de estándares fue colocado dentro de un bloque termostatzado a 40°C (centro), éste fue conectado a un cartucho de vidrio con Porapak Q, en donde se capturaron los volátiles con ayuda de una bomba de muestreo (izquierda). Para evitar la contaminación externa se utilizó nitrógeno como gas portador, contenido en una bolsa de muestreo (derecha).

2.2.7 Comparación entre sistemas de elución para Carbograph 1

Se empacaron triplicados de matriz Carbograph 1 en cartuchos de vidrio del tipo “cónico modificado”.

Se comparó el sistema de elución por centrifugación con el sistema vía reflujo criogénico.

Para el sistema de elución por centrifugación, se conectó un cartucho con un vial de 2 mL a través de un tubo de teflón (ver Figura 5). Se colocó el sistema dentro de una centrífuga y se realizaron pruebas de elución utilizando la centrífuga hasta alcanzar velocidades de 2000, 3000, 4000 y 5000 rpm. En cada prueba se utilizaron 400 μ L de diclorometano y se determinó la recuperación de volumen en cada caso. Cada prueba se realizó por triplicado.



Figura 5. Ensamble cartucho/teflón/vial. Se conectó un cartucho “cónico modificado” a un vial de 2mL a través de un tubo conector de teflón para eluir con 400 μ L de solvente. Este sistema se utilizó tanto para los experimentos de elución por centrifugación como por reflujo criogénico.

Para el sistema de elución por reflujo criogénico, se conectó, de igual forma, un cartucho de vidrio con un vial de 2 mL a través de un tubo de teflón. Se colocaron 400 μ L de diclorometano en el cartucho para la elución. Se sumergió el vial en nitrógeno líquido hasta observar que el solvente se movilizaba y pasaba a través de la matriz. Para producir el reflujo, se retiró el vial del nitrógeno líquido y se calentó ligeramente con los dedos. El proceso de elución/reflujo se repitió tres veces más. Se registró el volumen recuperado en cada caso. Se realizó cada prueba por triplicado. Ver Figura 6.

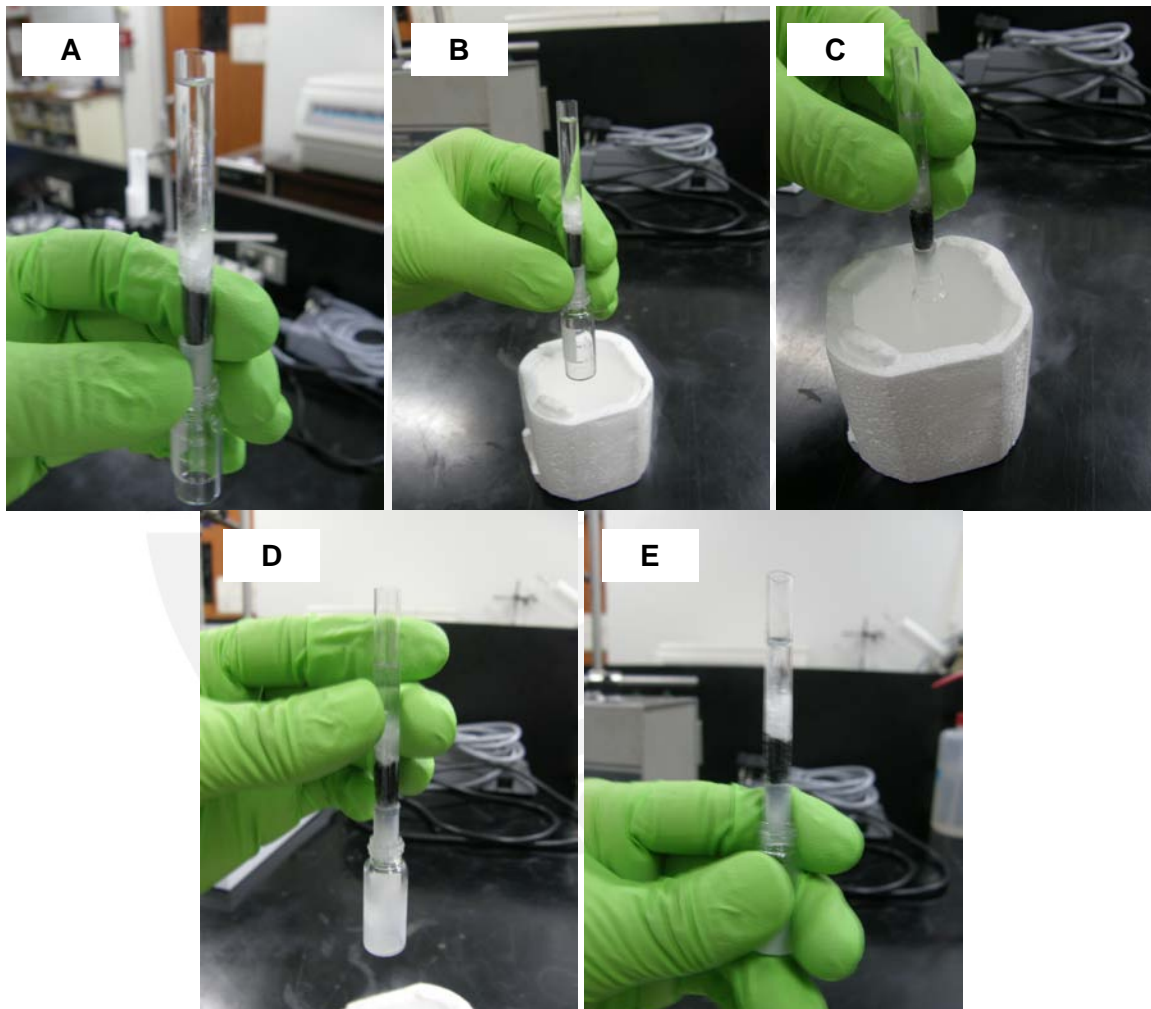


Figura 6. Secuencia del sistema de elución por reflujo criogénico. Se utilizó el ensamble cartucho/teflón/vial. (A) Cartucho con 400 μ L de solvente. (B) Se acercó el vial al nitrógeno líquido. (C) Se sumergió el vial en nitrógeno líquido para iniciar la elución. (D) Se retiró del nitrógeno y se observó que el solvente ingresó a la matriz. (E) Finalmente, se calentó ligeramente con las manos el vial y el solvente subió a través del cartucho y quedó listo para el reflujo.

2.2.8 Determinación de recuperación de volátiles en cartuchos con Carbograph 1

Se utilizó un sistema de captura de volátiles por arrastre (muestreo dinámico) en cartucho con Carbograph 1. Se colocaron dos tubos de vidrio de 11 cm de largo y 1 cm de diámetro externo dentro de un bloque termostatzado a 40°C. Se recubrió el interior de cada uno de los tubos con una cantidad conocida de una mezcla de estándares, y se armó el sistema de captura por arrastre (Figura 7). La captura se realizó a una velocidad de 300 mL/min, durante 10 minutos.

Con el fin de optimizar el sistema de elución y obtener la más alta recuperación posible del cartucho, se realizó un experimento de eluciones sucesivas. Se realizó una captura de una mezcla de 16 volátiles, consignados en la sección 2.2.2, de una misma concentración conocida. En total se capturaron 4 muestras por triplicado. Cada triplicado fue eluido respectivamente de la siguiente manera:

- 1ra muestra: 1 elución
- 2da muestra: 1 elución + 1 re-elución
- 3era muestra: 1 elución + 2 re-eluciones
- 4ta muestra: 1 elución + 3 re-eluciones

Se considera una re-elución cuando se reutiliza el solvente con el que se eluyó una primera vez la matriz con volátiles para eluir nuevamente el mismo cartucho.

Se realizaron re-eluciones sucesivas para observar el momento en el cual se alcanzó un equilibrio de absorción de compuestos volátiles en la matriz, en el cual los volátiles pueden ser reabsorbidos a la matriz en lugar de ser eluidos por el solvente. Se prefirió este sistema frente al método de eluir la matriz con un solvente nuevo cada vez para minimizar el volumen de solvente, pues se consideró que el trabajo se realizaría a concentraciones de volátiles muy bajas.

Se utilizaron para la elución 400 μ L de diclorometano. De este modo, se pudo determinar cuál era el sistema de elución más efectivo.

Para el experimento de recuperación, se tomaron cinco puntos por triplicado. Para las soluciones, se utilizaron mezclas de dieciséis compuestos de interés mencionados en la sección 2.2.2.

Finalmente, cada solución se analizó por cromatografía de gases como se indica en la sección 2.2.1.2.



Figura 7. Sistema de captura de volátiles por método de arrastre. Dos tubos de vidrio recubiertos en su interior con una cantidad definida de una mezcla de estándares fueron colocados dentro de un bloque termostatzado a 40°C (centro), cada uno fue conectado un cartucho de vidrio con Carbograph 1, en donde se capturaron los volátiles con ayuda de bombas de muestreo (laterales). Para evitar contaminación externa se utilizó nitrógeno como gas portador, contenido este último en bolsas de muestreo (arriba y esquina inferior derecha)

2.2.9 Control de estabilidad de compuestos en matriz

De la misma forma como se indica en la sección 2.2.8, se realizó la captura de una mezcla de estándares en cinco grupos de cartuchos con Carbograph 1. En todos los cartuchos se capturó la misma cantidad de la mezcla. Cada grupo fue almacenado a una temperatura de -20°C, dentro de tubos de vidrio sellados, para su posterior procesamiento y análisis según se indica en las secciones 2.2.8 y 2.2.1.2. Cada grupo estuvo compuesto por tres cartuchos.

Cada triplicado fue almacenado durante lapsos de tiempo según como se indica:

- 1er grupo: 1 día
- 2do grupo: 3 días
- 3er grupo: 7 días
- 4to grupo: 10 días
- 5to grupo: 20 días

2.2.10 Control de saturación de matriz por humedad relativa (HR)

Se produjo condiciones de temperatura y humedad controlada dentro de una incubadora. La humedad relativa en promedio fue de 87% y la temperatura fue de 27°C. Dentro de la incubadora se realizaron capturas, en grupos de tres cartuchos, de una mezcla de 16 estándares de concentración conocida. Cada grupo se capturó de la siguiente forma:

- 1er grupo: 3 L de aire en presencia de la mezcla de estándares, bajo las condiciones de HR y T mencionadas
- 2do grupo: 1 L de aire bajo las condiciones de HR y T mencionadas + 3 L de aire en presencia de la mezcla de estándares
- 3er grupo: 3 L de aire bajo las condiciones de HR y T mencionadas + 3 L de aire en presencia de la mezcla de estándares

El control se produjo tanto para Porapak Q como para Carborgraph 1.

Finalmente se procesó cada cartucho como se describe en las secciones 2.2.6 y 2.2.8, según fue el caso.

2.2.11 Captura de volátiles en campo y análisis vía cromatografía de gases.

Para la captura de volátiles en campo se seleccionó una zona de bosque alto en la Reserva Nacional Tambopata. La zona de trabajo fue demarcada mediante un sistema de posicionamiento global (GPS). Se seleccionaron arboles en los cuales se pudo instalar un sistema de poleas para colocar el sistema de captura dinámico a una altura adecuada.

Se transportaron a la zona de estudio cartuchos de vidrio con matriz Porapak Q activados y empacados como se indica en la sección 2.2.4. Se tomaron muestras, por triplicado, de aire a una altura de 6 m, evitando que los cartuchos se dirijan hacia el árbol soporte.



Figura 8. Sistema dinámico de captura de volátiles en campo. (A) Sistema montado en árbol mediante poleas a una altura de 6 m. (B) Detalle del sistema de captura, tres bombas de muestreo equipadas cada una con un cartucho de vidrio con matriz Porapak Q. Nótese que la orientación de los cartuchos fue en dirección opuesta al tronco.

Cada bomba de muestreo fue regulada a un flujo de 200 mL/min y cada cartucho capturó 5 L de aire. Al terminar el muestreo se almacenó cada juego de triplicados

dentro de un tubo de vidrio y se les selló. Se guardaron los cartuchos a 8°C hasta su traslado a Lima, el cual se realizó dentro de un contenedor enfriado con hielo. Cada cartucho fue procesado y analizado por cromatografía de gases de la manera descrita en la sección 2.2.6.

De igual forma, en una segunda etapa del trabajo de campo, se transportaron hasta una nueva zona de trabajo cartuchos de matriz Carbograph 1, acondicionados y activados como se explica en la sección 2.2.4. Se tomaron muestras, por triplicado, de aire a una altura de 6 m, tomando cuidado que los cartuchos se orientaran a una dirección opuesta al tronco. Cada cartucho capturó 10 L de aire a una velocidad de 350 mL/min. Al final de cada muestreo, se guardó el triplicado en un tubo de vidrio y se selló con una cinta de teflón hasta su traslado a Lima. Tanto el almacenaje como el traslado de estas muestras se realizó a temperatura ambiente. En el laboratorio, se procesó y analizó cada cartucho según se explica en la sección 2.2.8.

2.2.12 Control de temperatura y humedad relativa en campo

Durante todo el periodo de investigación en campo, se mantuvieron dos sensores de temperatura y humedad relativa de la marca Omega Engineering, modelo OM-62, en la zona de trabajo. Estos sensores fueron programados, utilizando el software Omega Logger Interface Program, versión 1.21, para monitorear las condiciones ambientales en lapsos de 15 minutos. Se utilizó el mismo software para descargar los datos registrados.

3. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

En la siguiente sección se presenta el trabajo experimental realizado en laboratorio, así como su posterior aplicación en el trabajo de campo. Adicionalmente se presenta el detalle de los resultados obtenidos en cada caso.

3.1. Caracterización de volátiles

La aplicación del sistema separativo descrito en la sección 2.2.2, resultó en una adecuada resolución para cada uno de los compuestos de interés. En primer lugar se realizó la caracterización mediante GC/FID (sección 2.2.1.1), y se obtuvo la distribución mostrada en la tabla 1. En este caso, se inyectó en el GC/FID 1 μ L de una solución que contenía once estándares de BVOCs en diclorometano.

Tabla 1. Caracterización de volátiles de interés vía GC/FID. Los tiempos de retención están expresados en minutos y son característicos para cada estándar inyectado individualmente.

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
<i>Trans</i> -2-hexenal	5,087
<i>Trans</i> -2-hexen-1-ol	5,485
α -Pino	7,070
Canfeno	7,422
(1S)-(-)- β -Pino	8,065
Octanal	8,741
p-Cimeno	9,215
(R)-(+)-Limoneno	9,293
Linalool	10,900
Geraniol	14,021
4-Metoxibenzaldehido	14,072

Luego, se realizó la separación vía GC/MS (sección 2.2.1.2). Los resultados se muestran en la tabla 2. Si bien para el sistema separativo vía GC/FID se utilizaron once estándares de monoterpenos y aldehídos de cadena corta, para el sistema separativo vía GC/MS se utilizaron 16 estándares del mismo tipo. Se observó una mejor separación de los compuestos para el sistema GC/MS, a pesar de que en ambos casos se utilizó el mismo tipo de columna. Se profundizará en este punto en la discusión de resultados.

Tabla 2. Caracterización de volátiles de interés vía GC/MS. Los tiempos de retención están expresados en minutos y son característicos para cada estándar inyectado individualmente

Compuesto	Tiempo de Retención (min)
<i>Trans</i> -2-hexenal	6,07
<i>Trans</i> -2-hexen-1-ol	6,39
α -Pino	7,85
Canfeno	8,27
(1S)-(-)- β -Pino	8,92
Mirceno	9,20
Octanal	9,56
p-Cimeno	10,03
(R)-(+)-Limoneno	10,11
Linalool	11,69
Citronelal	12,76
α -Terpineol	13,71
Citronelol	14,26
Geraniol	14,73
4-Metoxibenzaldehido	14,93
Citral	15,08

3.2. Cuantificación de volátiles utilizando un sistema de captura por arrastre o dinámico

3.2.1. Cuantificación por inyección directa en GC/FID

Para determinar la respuesta cuantitativa de cada estándar en el GC/FID, se realizó, en primer lugar, una calibración de estándares vía inyección directa de cada uno de los compuestos a estudiar. Estas curvas de calibración fueron realizadas para seis compuestos de interés: β -pineno, r-limoneno, α -pineno, linalool, octanal, p-cimeno, seleccionados debido a considerarse compuestos presentes en las emisiones de volátiles en bosque amazónico (Greenberg y col, 2004; Kesselmeier y col., 2000; Wilske y col., 2007). Fueron preparadas soluciones con concentraciones de 0,400; 0,200; 0,100; 0,050; 0,020; 0,010 $\mu\text{mol/mL}$, utilizando como solvente diclorometano, mediante diluciones sucesivas. Cada determinación de las diluciones se analizó por triplicado. Las soluciones fueron analizadas por cromatografía de gases según sección 2.2.1.1 (ver Figura 9).

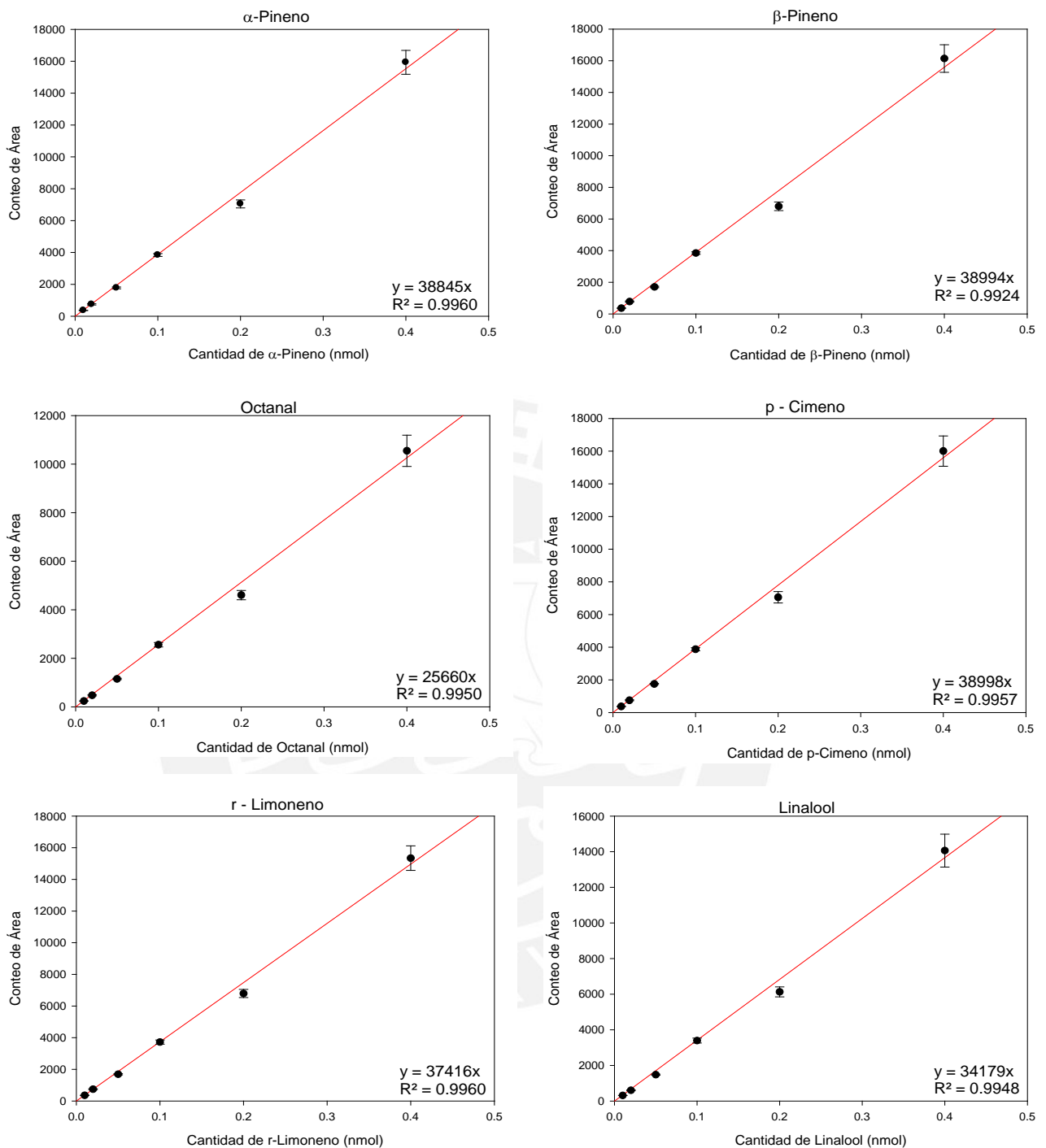


Figura 9. Curvas de calibración para cada compuesto de interés utilizando GC/FID. Los puntos en cada recta equivalen a la cantidad de estándar en nmol vs conteo de área. Se incluye en cada caso el factor r^2 y la ecuación de la recta. Cada punto de las curvas es un promedio de los resultados obtenidos con su respectivo error estándar ($n=3$).

Se obtuvo una buena linealidad en todos los casos, y además un coeficiente de regresión bastante cercano a uno. Se observó también un ligero aumento en la magnitud del error estándar según como aumentaba la concentración de cada compuesto. Esta cuantificación, vía inyección directa, fue utilizada como base para los estudios realizados en el periodo comprendido entre el mes de marzo de 2008 y marzo de 2009, periodo en el cual se trabajó con el GC/FID como analizador y Porapak Q como matriz sólida para muestreo por arrastre o dinámico.

3.2.2. Determinación de la recuperación de volátiles de cartuchos con Porapak Q

Al realizar el experimento para definir el tipo de cartucho a utilizar en el empaque de matrices, se observó que, ante la carga de 100 mg de Porapak Q en el cartucho “fritado” el flujo de aire máximo que pudo alcanzar la bomba de muestreo dinámico fue de 200 ± 3 mL/min. Por otro lado, cuando se cargó 100 mg de la misma matriz en el cartucho “cónico modificado” el flujo de aire máximo alcanzado fue de 360 ± 2 mL/min. El flujo de aire fue uno de los factores que se consideraron para decidir el tipo de empaque, pero no fue el único. Para la matriz Porapak Q, se decidió trabajar con el cartucho “fritado” por razones que se explicarán detenidamente en la discusión de resultados.

Para determinar la recuperación de volátiles de cada cartucho de matriz Porapak Q, se realizaron experimentos de captura y elución en laboratorio, como se indica en la sección 2.2.6. Se trabajó con las mismas concentraciones utilizadas para el sistema de calibración por inyección directa. De este modo, se pudo comparar directamente la respuesta del cromatógrafo, en unidades de conteo de área. La temperatura de trabajo en el bloque termostático, 40°C , permitió volatilizar todos los compuestos de interés, en el periodo de tiempo usado para la determinación. Se realizó la captura de 3 L de aire a un flujo de bomba de muestreo de 200 mL/min para cada cartucho.

El volumen de muestra ingresado al cromatógrafo, tanto para la calibración por inyección directa como para el sistema de recuperación, fue de 1 μL de muestra, por lo que se espera que se ingrese al GC/FID triplicados secuenciales de 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,4 nmol de cada estándar a analizar. Ver tablas 3-8.

Tabla 3. Recuperación de α -pineno en Porapak Q

Cantidad ingresada al GC/FID (nmol)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación
0,02	742,26	391,01	52,68
0,05	1774,88	673,84	37,97
0,10	3839,42	1340,39	34,91
0,20	7048,58	2525,08	35,82
0,40	15932,90	4618,60	28,99
Recuperación promedio			38,07 \pm 3,94

Tabla 4. Recuperación de β -pineno en Porapak Q

Cantidad ingresada al GC/FID (nmol)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación
0,02	780,69	406,01	52,01
0,05	1704,74	740,29	43,43
0,10	3846,46	1505,60	39,14
0,20	6800,85	2819,62	41,46
0,40	16141,50	5290,05	32,77
Recuperación promedio			41,76 \pm 3,13

Tabla 5. Recuperación de octanal en Porapak Q

Cantidad ingresada al GC/FID (nmol)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación
0,02	476,92	261,32	54,79
0,05	1149,45	559,61	48,69
0,10	2557,59	1155,47	45,18
0,20	4603,15	2137,97	46,45
0,40	10549,46	4010,47	38,02
Recuperación promedio			46,62 \pm 2,71

Tabla 6. Recuperación de p-cimeno en Porapak Q

Cantidad ingresada al GC/FID (nmol)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación
0,02	751,35	449,33	59,80
0,05	1750,72	873,34	49,88
0,10	3874,65	1823,52	47,06
0,20	7055,71	3376,56	47,86
0,40	16003,97	6431,42	40,19
Recuperación promedio			48,96 ± 3,16

Tabla 7. Recuperación de r-limoneno en Porapak Q

Cantidad ingresada al GC/FID (nmol)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación
0,02	744,74	435,22	58,44
0,05	1687,21	819,49	48,57
0,10	3720,90	1711,99	46,01
0,20	6790,98	3185,45	46,91
0,40	15341,37	6077,87	39,62
Recuperación promedio			47,91 ± 3,04

Tabla 8. Recuperación de linalool en Porapak Q

Cantidad ingresada al GC/FID (nmol)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación
0,02	601,01	535,92	89,17
0,05	1478,37	1061,95	71,83
0,10	3395,72	2127,27	62,65
0,20	6130,64	4013,71	65,47
0,40	14063,13	7539,10	53,61
Recuperación promedio			68,55 ± 5,93

Con el objeto de utilizar los resultados de los experimentos de recuperación como base para la cuantificación de lo que fue capturado en el trabajo de campo, se promedió el porcentaje de recuperación en cada caso para obtener un estimado de lo realmente observado en las capturas en bosque. Los valores de recuperación se encontraban entre 38% para α -pineno, y 68% para linalool (ver Figura 10).

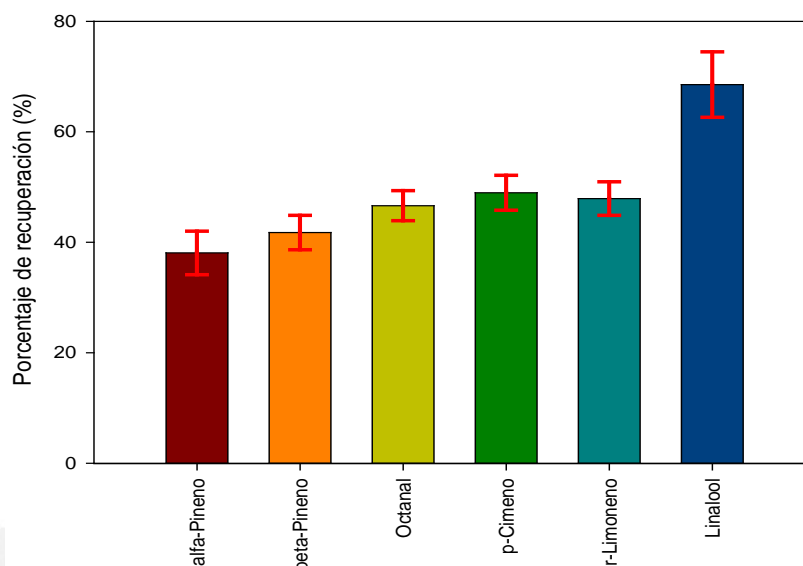


Figura 10. Recuperación promedio de monoterpenos a partir de cartuchos Porapak Q (100 mg) por elución con solvente diclorometano. De los datos obtenidos en las tablas 3-8 se calculó el promedio de cinco experimentos independientes en los cuales para cada estándar se utilizó secuencialmente inyección de 0,02; 0,05; 0,10; 0,20; 0,4 nmol, cada uno por triplicado. Las barras representan el error estándar.

3.2.3. Cuantificación por inyección directa en GC/MS

De igual forma como se procedió para evaluar la respuesta cuantitativa de cada estándar en el GC/FID, se realizaron inyecciones directas de estándares en el GC/MS. En este caso, las curvas de calibración se realizaron para dieciséis compuestos de interés: 4-metoxibenzaldehído, canfeno, p-cimeno, citral, citronelal, citronelol, geraniol, (R)-(+)-limoneno, linalool, mirceno, octanal, α -pineno, (1S)-(-)- β -pineno, α -terpineol, *trans*-2-hexen-1-ol, *trans*-2-hexenal, monoterpenos en su mayoría, además de aldehídos de cadena corta. Se prepararon soluciones con concentraciones de 1, 5, 10, 20, 40 $\mu\text{g/mL}$ utilizando diclorometano como solvente. Las soluciones fueron preparadas por triplicado y mediante diluciones sucesivas. Cada solución de estándar fue analizada vía GC/MS como se indica en la sección 2.2.1.2. Ver Figura 11.

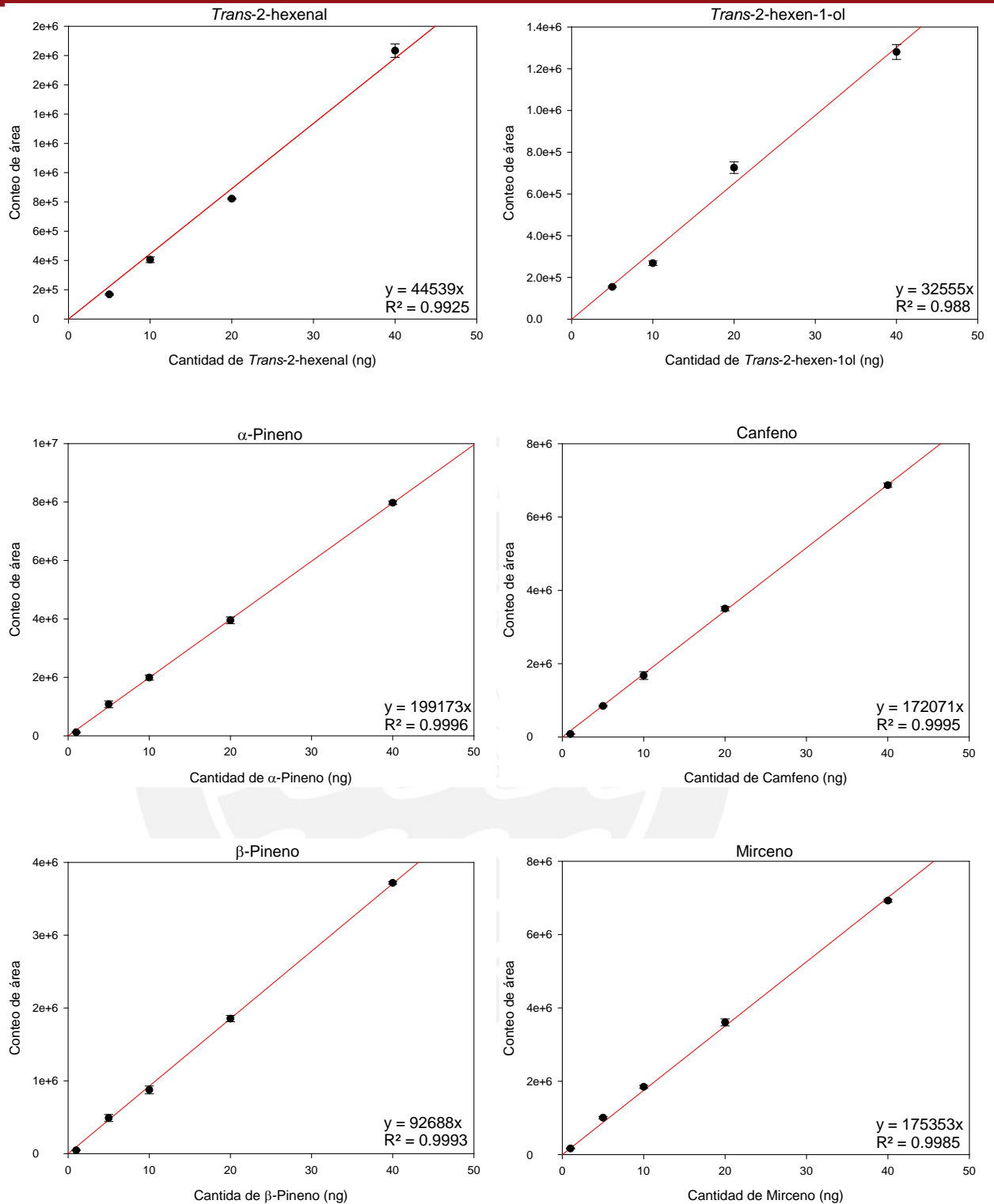


Figura 11. Curvas de calibración para cada compuesto de interés utilizando GC/MS. Los puntos en cada recta equivalen a la cantidad de estándar en ng vs conteo de área. Se incluye en cada caso el factor r^2 y la ecuación de la recta. Cada punto de las curvas es un promedio de los resultados obtenidos con su respectivo error estándar (n=3).

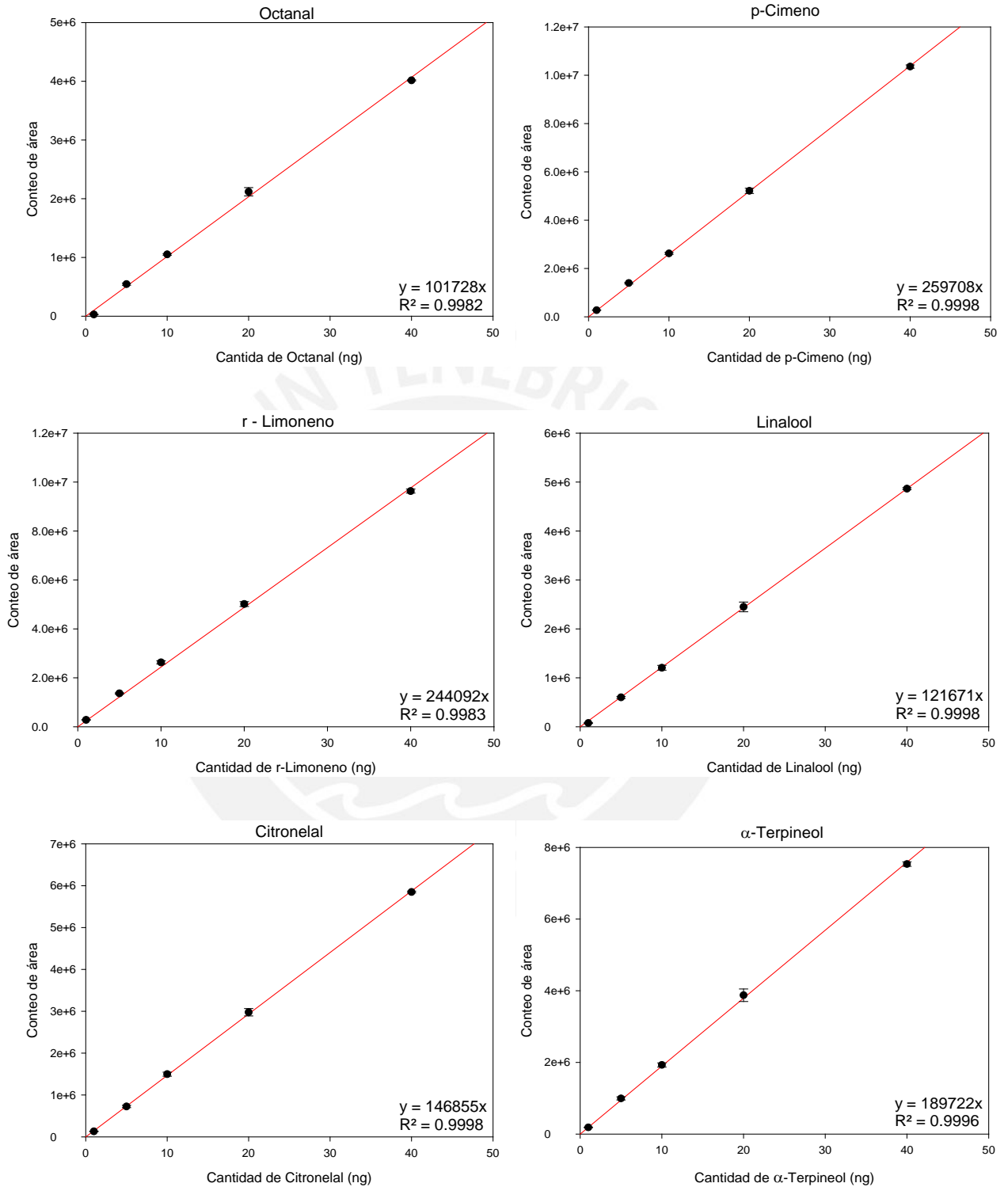


Figura 11. Continuación

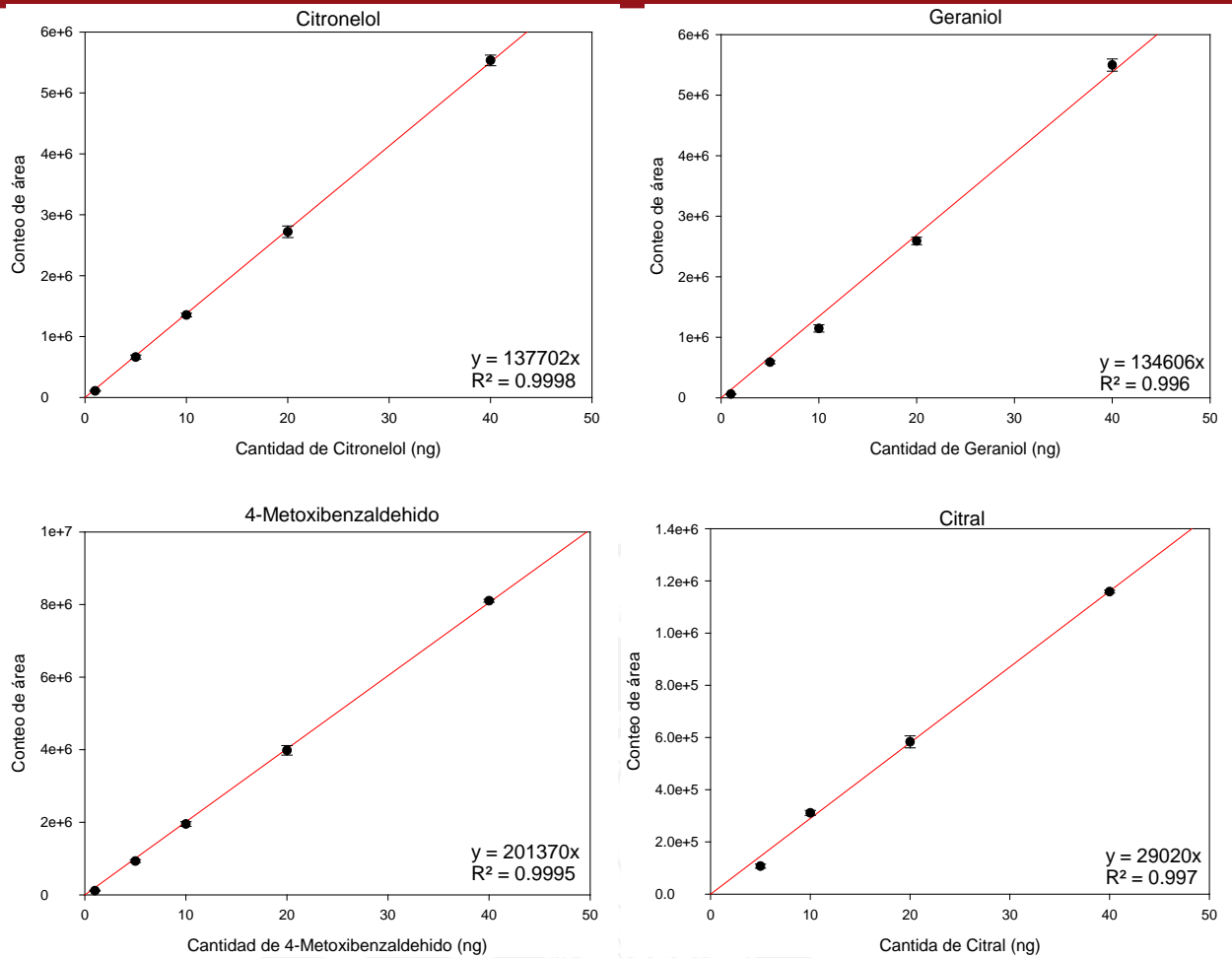


Figura 11. Continuación

La cuantificación fue utilizada como base para los estudios realizados en la segunda etapa del proyecto, comprendida entre el mes de abril de 2009 y diciembre de 2009. En este periodo, se trabajó con GC/MS como sistema de análisis y Carbograph como matriz sólida para muestreo por arrastre o dinámico. En todos los casos, se inyectaron al GC/MS muestras de cinco concentraciones distintas para realizar la calibración, sin embargo se observó que en tres de las curvas solo se presentan cuatro concentraciones. Esto se debió al límite de detección del analizador, se profundizará en la discusión.

3.2.4. Determinación de la recuperación de volátiles de cartuchos con Carbograph

Para poder determinar la recuperación de compuestos a partir de la extracción de fase sólida vía elución por solvente, se diseñó un experimento de captura de compuestos de interés y su posterior elución con diclorometano como solvente.

En primer lugar, se decidió el tipo de cartucho que se utilizaría para empacar la matriz Carbograph 1. Se empacaron dos cartuchos, por triplicado, con 100 mg de Carbograph 1, el primero utilizando el cartucho “fritado” y el segundo utilizando el cartucho “cónico modificado”. Se realizaron pruebas de flujo utilizando bombas de muestreo y un calibrador de flujo volumétrico. Se observó que para el cartucho “fritado” se pudo obtener, como máximo, flujo de 180 ± 3 mL/min, mientras que para el cartucho “cónico modificado” se obtuvo flujo de 360 ± 4 mL/min. En este caso, el análisis fue realizado, como ya se indicó, por triplicado pero adicionalmente cada grupo fue estudiado con tres bombas de muestreo del mismo modelo y marca. A partir de los resultados obtenidos se decidió trabajar con el cartucho “cónico modificado” para el empaque de la matriz Carbograph 1.

Luego se determinó el mejor sistema de elución para el cartucho “cónico modificado”. El experimento consistió en registrar la recuperación del solvente luego que este eluyera de la matriz. Se tomó en consideración el mayor volumen de solvente recuperado. Además se tomó en cuenta la reproducibilidad de cada elución.

En primer lugar se realizaron las pruebas con el sistema de elución vía centrífuga. Se conectó un cartucho “cónico modificado”, que contenía 100 mg de matriz Carbograph 1, a un vial de 2 mL a través de un tubo de teflón. Al cartucho se le inyectaron 400 μ L de diclorometano. Como se indicó en la sección 2.2.7, se procedió a realizar eluciones de los cartuchos, por triplicado, y se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 9.

Tabla 9. Recuperación de solvente luego de la elución del cartucho “cónico modificado” a distintas velocidades. Cada experimento de recuperación fue realizado por triplicado y a temperatura ambiente.

Velocidad de centrifugado (rpm)	Volumen recuperado (μL)	Tiempo (s)
2000	240 \pm 8	12,33 \pm 0,22
3000	300 \pm 10	22,54 \pm 0,28
4000	350 \pm 10	40,64 \pm 0,33
5000	280 \pm 7	96,35 \pm 0,59

Se observó que la mejor recuperación se da para la elución realizada a 4000 rpm, aunque se observa una pérdida de aproximadamente 50 μL de solvente, que pudo deberse a evaporación del mismo, dado la alta volatilidad del diclorometano, potenciada además por la amplia superficie de contacto que tiene el solvente sobre la lana de vidrio que se utilizó para sellar los extremos de cada cartucho. Se presume que esta misma razón es la causante de que a la velocidad más alta, 5000 rpm, la pérdida sea aun mayor. Además, debido a que este experimento se realizó a temperatura ambiente se pudo esperar que mientras aumentaba la velocidad de la centrífuga todo el sistema se calentara gradualmente, lo que pudo ocasionar también pérdida por evaporación.

A continuación, se realizó el experimento de recuperación por reflujo criogénico. Se armó el sistema, como se indica en la sección 2.2.7 y se agregaron 400 μL del solvente. El proceso de elución/reflujo es controlado utilizando el nitrógeno líquido, sin embargo, no se pudo obtener reproducibilidad en el experimento. Los resultados observados fueron tan variables como: 300, 150 y 230 μL . Además se observó un problema de manejo operacional del reflujo del solvente, por lo cual se decidió no utilizar este sistema. La reproducibilidad de este tipo de elución depende en gran medida de la persona que aplica la técnica.

Luego de observar los resultados obtenidos para las pruebas para optar por el tipo de empaque, en cartuchos “cónico modificado”, por ser el más adecuado, y por el sistema de elución vía centrífuga, se realizó un experimento para determinar cuántas eluciones eran necesarias para extraer la mayor cantidad de compuestos de la matriz Carbograph 1. Se utilizó el sistema de captura de volátiles por arrastre (muestreo dinámico) para cartucho de Carbograph 1, como se indica en la sección 2.2.8. Se trabajó con una mezcla de dieciséis estándares, los mismos citados en la sección 2.2.2 para el sistema separativo, a una concentración de 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Para

cada experimento, se colocaron 50 μL de esta mezcla de estándares dentro del tubo de vidrio del sistema de captura y se selló el sistema con la bolsa de muestreo. Los resultados se reportan la Figura 12.

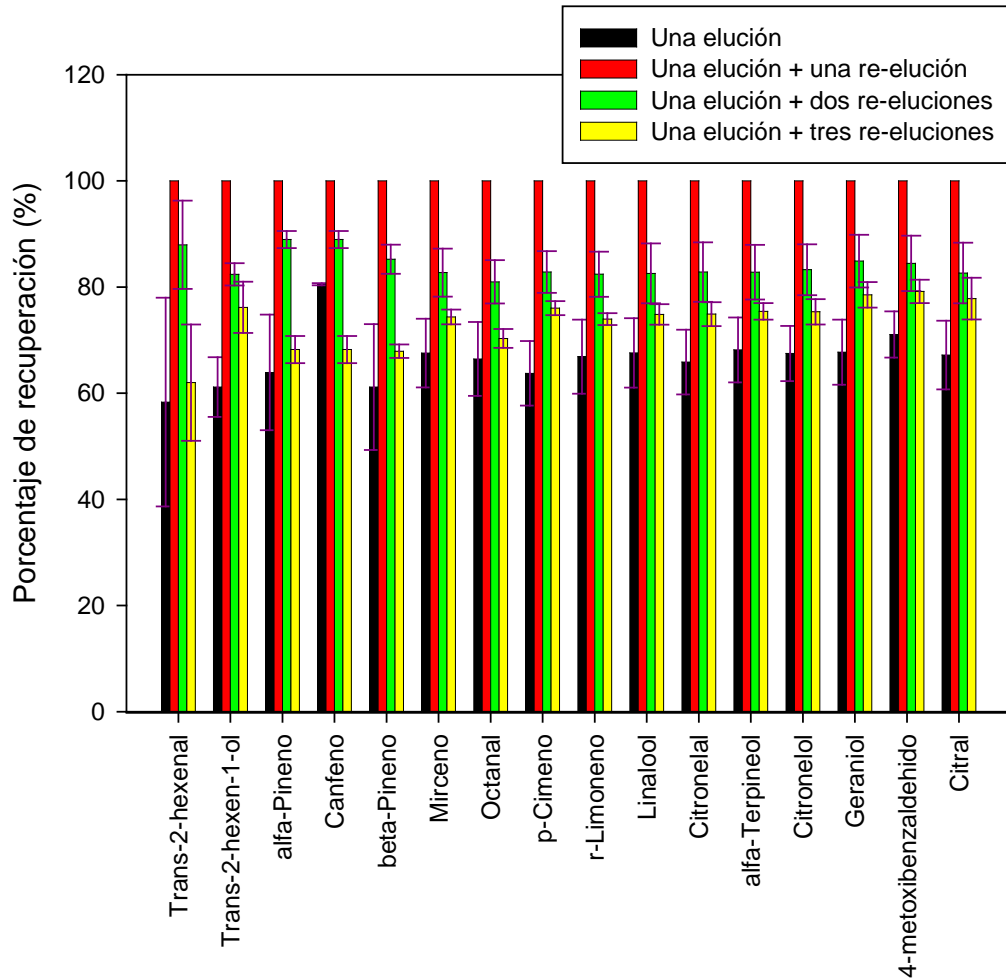


Figura 12. Experimento de eluciones sucesivas. Se observan los resultados obtenidos para una sola elución con solvente (negro), una elución y una re-elución (rojo), una elución y dos re-eluciones (verde), una elución y tres re-eluciones (amarillo). En cada caso, la elución inicial fue realizada con 400 μL de diclorometano, y en cada re-elución se utilizó la totalidad del solvente que eluyó una primera vez la matriz. Los resultados muestran que, en todos los casos el mejor método de elución es el segundo, una elución inicial más una re-elución. Se consideró al segundo caso, una elución más una re-elución (en rojo), como 100% debido a sus mejores resultados, y a partir de esta base se calcularon los demás porcentajes.

Los resultados demostraron que el método más efectivo para eluir los compuestos de la matriz Carbograph 1 fue el de una elución más 1 re-elución. En todos los casos se esperaba que en cada cartucho quedaran retenidos 12 µg de cada estándar, por lo que para cada solución resultante se esperaba una concentración de 30 µg/mL. Cada experimento fue realizado por triplicado.

Luego de determinar el sistema de elución, se procedió a determinar la recuperación de volátiles de cada cartucho de matriz Carbograph 1. Cada elución representa una posible pérdida del compuesto al ser procesado. Se realizaron experimentos de captura y elución en laboratorio como se muestra en la sección 2.2.8. Los experimentos fueron realizados utilizando una mezcla de dieciséis estándares, reportados en la sección 2.2.2, a cinco concentraciones distintas, las mismas que se utilizaron para la determinación de la respuesta cuantitativa vía inyección directa al GC/MS, 1, 5, 10, 20, 40 µg/mL, de modo tal que pueden ser comparadas directamente las respuestas en el cromatógrafo ante la cantidad de estándar ingresada.

Cada mezcla de estándares capturada en los cartuchos de Carbograph 1 fue procesada con 400 µL de diclorometano, eluyendo de la forma ya indicada. Cada inyección al GC/MS fue de 1 µL de muestra, por lo que se espera que en cada caso ingrese al cromatógrafo 1, 5, 10, 20, y 40 ng. Cada punto del experimento de recuperación fue realizado por triplicado.

Los resultados fueron comparados con los obtenidos vía inyección directa, ver tablas 10-25.

Tabla 10. Recuperación de *trans*-2-hexenal en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
5	167959,33	66428,33	39,55
10	404784,67	230436,33	56,93
20	821446,00	564110,67	68,67
40	1833214,33	1269146,33	69,23
Recuperación promedio			58,60 ± 6,95

Tabla 11. Recuperación de *trans*-2-hexen-1-ol en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
5	154859,00	69940,67	45,16
10	268517,00	239227,00	89,09
20	725993,33	457513,33	63,02
40	1280018,67	1063494,33	83,08
Recuperación promedio			70,09 ± 10,01

Tabla 12. Recuperación de α -pineno en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	118619,67	19038,50	16,05
5	1075720,00	401674,00	37,34
10	1990881,33	1043760,67	52,43
20	3952269,00	2416028,67	61,13
40	7974758,00	5077137,00	63,67
Recuperación promedio			46,12 ± 8,82

Tabla 13. Recuperación de canfeno en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
5	845376,00	337172,00	39,88
10	1677047,00	891878,00	53,18
20	3500436,67	2816242,00	80,45
40	6868363,33	5799079,67	84,43
Recuperación promedio			64,49 ± 10,75

Tabla 14. Recuperación de β -pineno en Carboxograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
5	489204,33	172113,67	35,18
10	874992,67	492106,67	56,24
20	1854520,67	1169917,33	63,08
40	3718073,33	2468259,33	66,39
Recuperación promedio			55,22 \pm 7,01

Tabla 15. Recuperación de mirceno en Carboxograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	167047,67	44839,00	26,84
5	1006259,67	433046,33	43,04
10	1847661,33	1030734,33	55,79
20	3605560,33	2290866,00	63,54
40	6925333,33	4706978,67	67,97
Recuperación promedio			51,43 \pm 7,46

Tabla 16. Recuperación de octanal en Carboxograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	28865,00	25811,50	89,42
5	544989,67	185063,33	33,96
10	1051939,67	504264,33	47,94
20	2119112,00	1185909,00	55,96
40	4015469,00	2543211,33	63,34
Recuperación promedio			58,12 \pm 9,22

Tabla 17. Recuperación de p-cimeno en Carboglyph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	274340,67	87096,00	31,75
5	1395676,33	602241,33	43,15
10	2623631,67	1296515,33	49,42
20	5214194,00	2806509,67	53,82
40	10359162,33	5978829,33	57,72
Recuperación promedio			47,17 ± 4,55

Tabla 18. Recuperación de r-limoneno en Carboglyph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	280618,67	140899,00	50,21
5	1361832,67	752618,00	55,27
10	2631228,67	1566382,00	59,53
20	5013364,33	3231018,67	64,45
40	9631773,00	6658416,33	69,13
Recuperación promedio			59,72 ± 3,33

Tabla 19. Recuperación de linalool en Carboglyph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	75232,67	33958,50	45,14
5	599566,33	298761,33	49,83
10	1204850,33	720948,00	59,84
20	2449199,00	1647515,33	67,27
40	4864171,00	3488535,00	71,72
Recuperación promedio			58,76 ± 5,03

Tabla 20. Recuperación de citronelal en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	130553,67	33229,00	25,45
5	725814,33	354484,67	48,84
10	1497983,67	828642,67	55,32
20	2977207,00	1844991,00	61,97
40	5848273,33	3881984,00	66,38
Recuperación promedio			51,59 ± 7,18

Tabla 21. Recuperación de α -terpineol en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	185265,00	71507,00	38,60
5	994998,67	494450,00	49,69
10	1928631,67	1125012,67	58,33
20	3875048,67	2466758,67	63,66
40	7535034,67	5143895,33	68,27
Recuperación promedio			55,71 ± 5,28

Tabla 22. Recuperación de citronelol en Carbograph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	108372,00	27095,00	25,00
5	663141,00	316502,33	47,73
10	1353946,00	761383,00	56,23
20	2720753,33	1898677,67	69,78
40	5534389,00	4201023,33	75,91
Recuperación promedio			54,93 ± 8,97

Tabla 23. Recuperación de geraniol en Carbowgraph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
5	587915,00	181076,33	30,80
10	1146448,33	602170,00	52,52
20	2590815,00	1545872,67	59,67
40	5497243,00	3619932,67	65,85
Recuperación promedio			52,21 ± 7,64

Tabla 24. Recuperación de 4-metoxibenzaldehído en Carbowgraph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
1	115062,00	64253,50	55,84
5	930307,33	301105,67	32,37
10	1952579,33	691272,00	35,40
20	3982465,67	1663771,00	41,78
40	8104294,00	3567217,33	44,02
Recuperación promedio			41,88 ± 4,07

Tabla 25. Recuperación de citral en Carbowgraph 1

Cantidad ingresada al GC/MS (ng)	Conteo de Área: Inyección directa de estándar	Conteo de Área: Experimento de recuperación en cartucho	Porcentaje de recuperación (%)
5	107407,67	30294,33	28,21
10	311116,00	81709,33	26,26
20	583519,00	250538,33	42,94
40	1158699,33	592492,67	51,13
Recuperación promedio			37,13 ± 5,97

Al analizar los resultados del experimento de recuperación en cartucho para cada estándar, si bien se utilizaron inyecciones a partir de 1 ng por estándar, para *trans*-2-hexenal, *trans*-2-hexen-1-ol, canfeno, β -pineno, geraniol y citral, se observó de

que las curvas de recuperación se dieron a partir de 5 ng debido al límite de detección propio de cada compuesto para el análisis vía GC/MS.

Para utilizar los resultados de los experimentos de recuperación como referencia para la cuantificación de lo que fue capturado en el trabajo de campo, se promedió el porcentaje de recuperación para cada estándar, y de esta forma se obtuvo un estimado de lo observado en las capturas en bosque. Ver Figura 13.

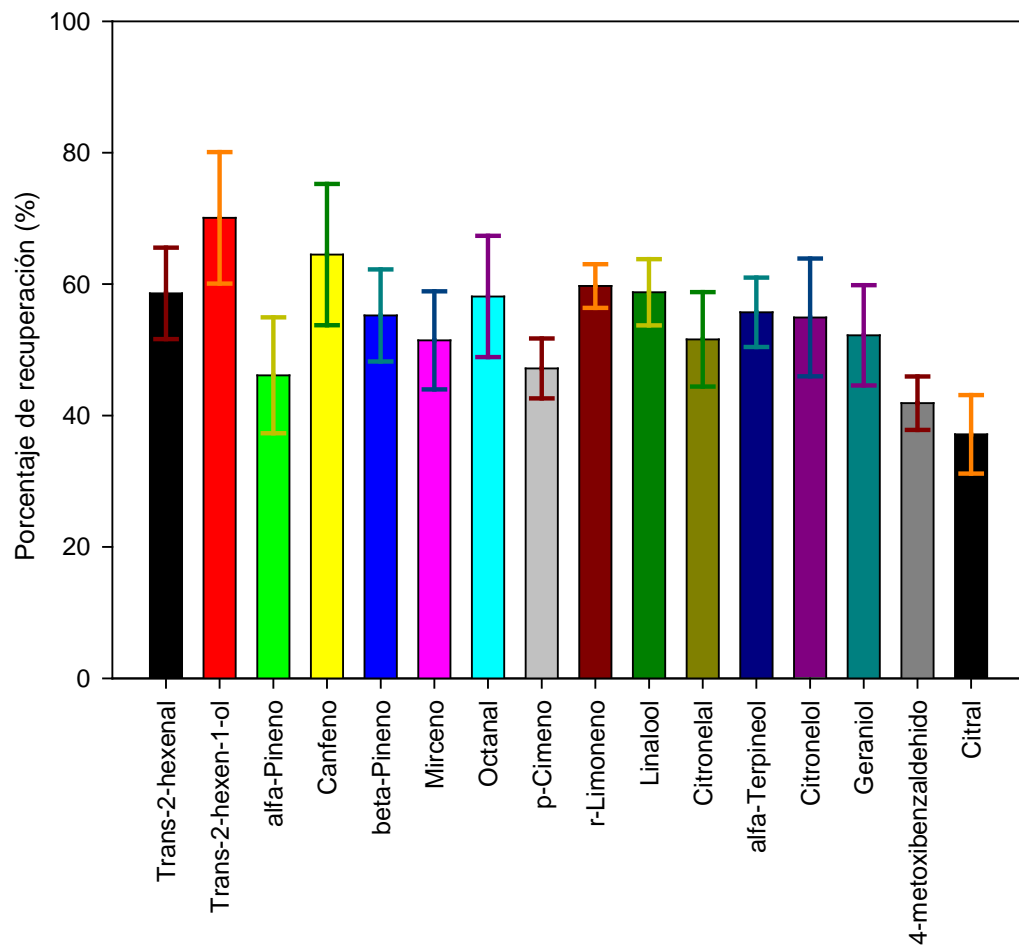


Figura 13. Recuperación promedio en porcentaje de estándares a partir de cartuchos de Carboxograph 1 (100 mg) por elución con diclorometano. De los datos obtenidos en las tablas 10-25 se calculó el promedio de cinco experimentos independientes en los cuales para cada estándar se utilizó secuencialmente inyección de 1, 5, 10, 20, 40 ng, cada uno por triplicado. Barras representan el error estándar.

Los dieciséis estándares fueron: *trans*-2-hexenal (58,60%); *trans*-2-hexen-1-ol (70,09%); α -pineno (46,12%); canfeno (64,49%); β -pineno (55,22%); mirceno (51,43%); octanal (58,12%); *p*-cimeno (47,17%); *r*-limoneno (59,72%); linalool (58,76%); citronelal (51,59%); α -terpineol (55,71%); citronelol (54,93%); geraniol (52,21%); 4-metoxibenzaldehído (41,88%); citral (37,13%).

3.3. Factores que influyen en la determinación y cuantificación de volátiles

3.3.1. Control de estabilidad de volátiles a lo largo del tiempo

Los compuestos fueron, además, sometidos a controles de estabilidad en la matriz a lo largo del tiempo, dado que este es considerado un factor de pérdida en la cuantificación. Se realizó la captura de una mezcla de dieciséis estándares en cartuchos que contenían 100 mg de matriz Carboxograph 1, de la forma como se indica en la sección 2.2.9.

Para cada muestreo se capturaron 30 μ L de una solución de concentración 200 μ g/mL para cada estándar. En total se realizaron capturas en quince cartuchos. Se almacenaron los cartuchos a una temperatura de -20°C en tubos de vidrio, separándolos en grupos de tres, de modo tal que cada grupo fue almacenado durante uno, tres, siete, diez y veinte días.

Cada grupo fue procesado con solvente y analizado por cromatografía de gases de la misma forma como se indica en las secciones 2.2.8 y 2.2.1.2. Luego de ser procesada cada muestra se debió obtener una concentración de 15 μ g/mL para cada estándar.

En la Figura 14 se muestran los resultados obtenidos para el control de estabilidad para cada compuesto estudiado.

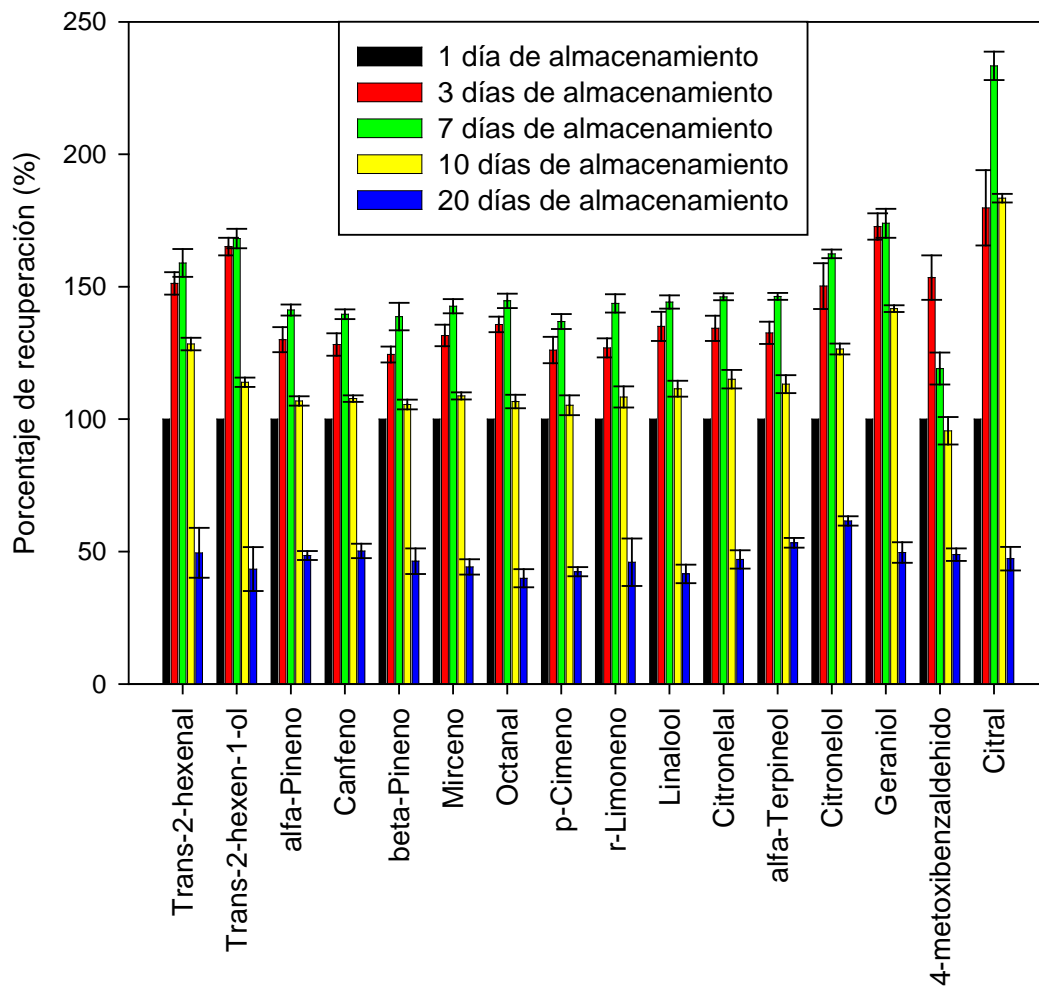


Figura 14. Variación en la estabilidad de los compuestos volátiles en cartuchos de Carbowgraph 1 almacenados a -20°C . Se observan los resultados obtenidos para un día (negro), tres días (rojo), siete días (verde), diez días (amarillo), y veinte días (azul). Los resultados representan la abundancia de cada compuesto. Todos los resultados están expresados en porcentaje, tomando como 100% los resultados obtenidos para lo observado luego de analizar las muestras con un día de almacenamiento (negro), cuyos resultados fueron equivalentes al experimento de recuperación.

Los resultados mostrados, reflejaron un comportamiento distinto al esperado. Se observó que luego de un día de almacenamiento, la cantidad de cada compuesto coincidió con los resultados obtenidos para el experimento de recuperación, por lo que se considera una recuperación del 100%, con lo cual se comprobó que luego

de un día de mantenerse en el congelador la muestra no sufre degradación ni pérdida.

Luego de procesar las muestras que estuvieron almacenadas durante tres días, se observó un aumento significativo de la señal otorgada por el GC/MS, lo que indicó que se obtuvo una mayor recuperación del cartucho, equivalente a valores que oscilaron entre 179 y 124%.

El análisis realizado a las muestras almacenadas durante siete días, se observó una señal aun mayor que el caso anterior, con lo que la muestra no mostró degradación, sino que por el contrario, presentó un aumento de concentración de los compuestos, comportamiento que se consideró anómalo. Las señales observadas fueron equivalentes a valores entre 233 y 119%.

Los resultados obtenidos para las muestras almacenadas durante diez días, mostraron, en su gran mayoría, que aun la señal era mayor que la observada en las muestras almacenadas un día, aunque si se observó una disminución con respecto a lo monitoreado para la muestra almacenada durante siete días. Se considera entonces que hubo pérdida de compuestos. Los valores estuvieron entre 183 y 95%.

Finalmente, luego de mantener almacenadas muestras durante veinte días, se observó una pronunciada disminución de la señal para cada compuesto. La disminución por pérdida de cada compuesto mostró valores menores a los obtenidos para las muestras almacenadas un día. Los resultados variaron entre 61 y 39%, con respecto al experimento de recuperación.

Se presume que los resultados observados para las muestras almacenadas tres, siete y diez días, que muestran un aumento en la señal, se debieron a la cinética de liberación del estándar con respecto de la matriz. La matriz porosa adsorbió en sus cavidades los compuestos capturados, y estos permanecieron unidos a la matriz, dejando, incluso luego de la elución con solvente según el caso, un remanente de los compuestos adsorbidos en la matriz. Con el paso de los días la matriz fue liberando de sus cavidades los compuestos con mayor facilidad.

3.3.2. Control de la saturación de la matriz por humedad.

Debido a que la zona de estudio se trata de bosque amazónico, en el cual los valores de HR son en promedio altos, se realizaron pruebas de laboratorio para observar la saturación por humedad de las matrices utilizadas. Como se explica en

la sección 2.2.10, se realizó la volatilización y captura de una mezcla de dieciséis estándares en cartuchos que contenían matriz Porapak Q o Carbograph 1, 100 mg de matriz para cada caso.

En total fueron realizadas capturas en 9 cartuchos de cada matriz. Para la volatilización se colocaron, en cada muestreo, 10 μL de una solución 200 $\mu\text{g/mL}$, que al ser procesada para análisis debió dar como resultado una solución 5 $\mu\text{g/mL}$. El experimento se realizó bajo condiciones controladas dentro de una incubadora, manteniendo una temperatura promedio de 27°C y HR de 87%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 15 y en la Figura 16.

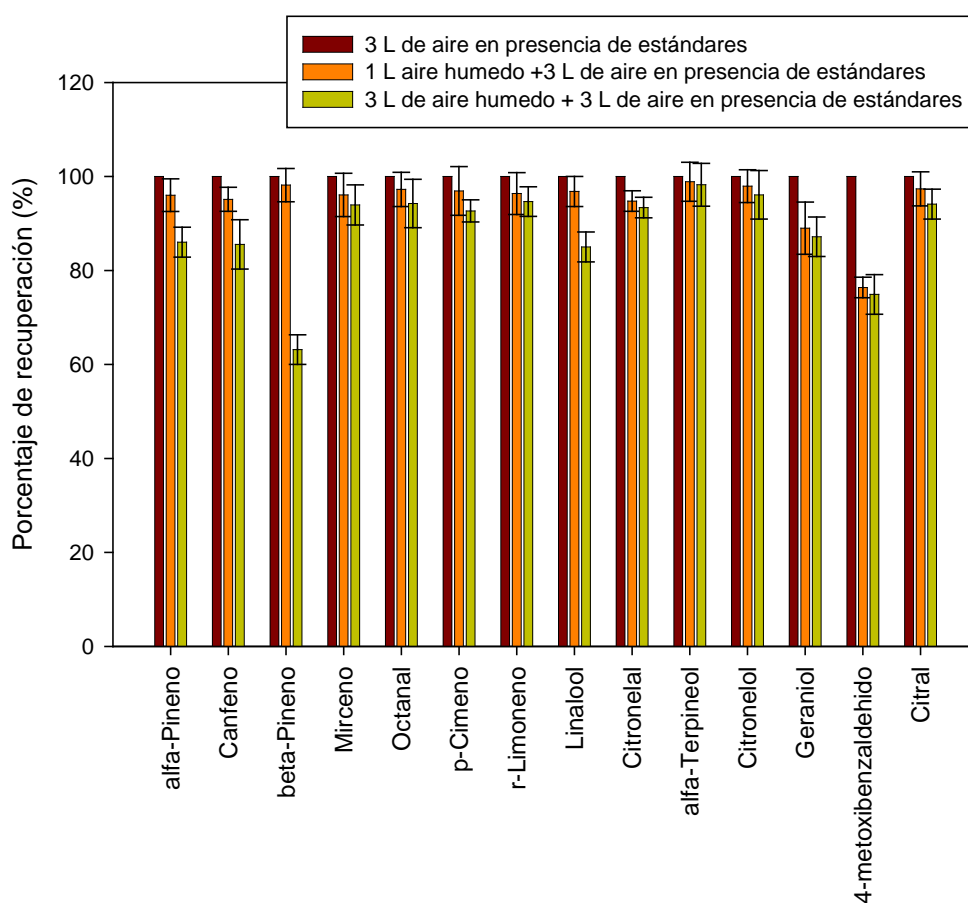


Figura 15. Recuperación de compuestos volátiles en matriz Porapak Q dependiendo de la exposición a HR. Se observan los resultados obtenidos para la captura directa de la mezcla de estándares (marrón), captura directa de la mezcla luego de haber capturado un litro de humedad (anaranjado), y captura directa de la mezcla luego de haber capturado tres litros de humedad (verde). Los resultados representan la abundancia de cada compuesto. Todos los resultados están expresados en porcentaje, tomando como 100% los resultados obtenidos para la captura directa (marrón).

La Figura 15 muestra que se obtuvo una disminución en la abundancia de cada compuesto conforme se aumentó la saturación de humedad en cada cartucho. Sin embargo, los resultados no fueron concluyentes en todos los casos para afirmar que el motivo de la disminución de la abundancia de cada compuesto sea causado por la HR presente en el medio. No se pudo afirmar entonces que la matriz Porapak Q sufra saturación por humedad y que sea esta la causa que impida una correcta absorción de compuestos volátiles en la matriz.

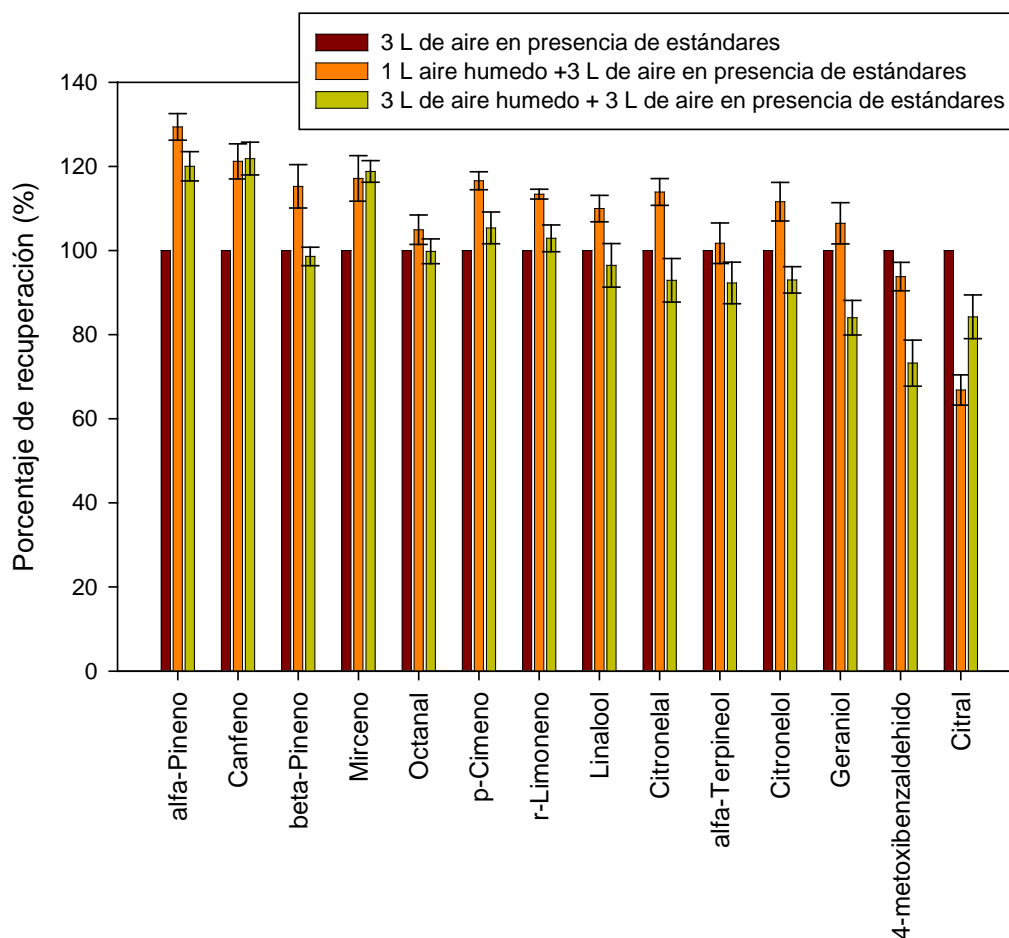


Figura 16. Recuperación de compuestos volátiles en matriz Carbograph 1 dependiendo de la exposición a HR. Se observan los resultados obtenidos para la captura directa de la mezcla de estándares (marrón), captura directa de la mezcla luego de haber capturado un litro de humedad (anaranjado), y captura directa de la mezcla luego de haber capturado tres litros de humedad (verde). Los resultados representan la abundancia de cada compuesto. Todos los resultados están expresados en porcentaje, tomando como 100% los resultados obtenidos para la captura directa (marrón).

Se observa en la Figura 16 que, no hay una tendencia definida al aumentar la humedad a la que se expone la matriz. Ni aumenta ni disminuye consistentemente la abundancia de cada compuesto. De esta forma se pudo estimar que el Carbograph 1 se mantuvo libre de problemas de saturación a causa de la humedad.

A pesar que los resultados observados no fueron concluyentes, de forma tal que pudiese compararse las respuestas ante humedad entre cada una de las matrices, se pudo aprovechar los cromatogramas, obtenidos luego de los análisis, para juzgar cual de las matrices mantuvo un mejor comportamiento frente a las condiciones de trabajo y metodología de procesamiento (ver Figura 17).

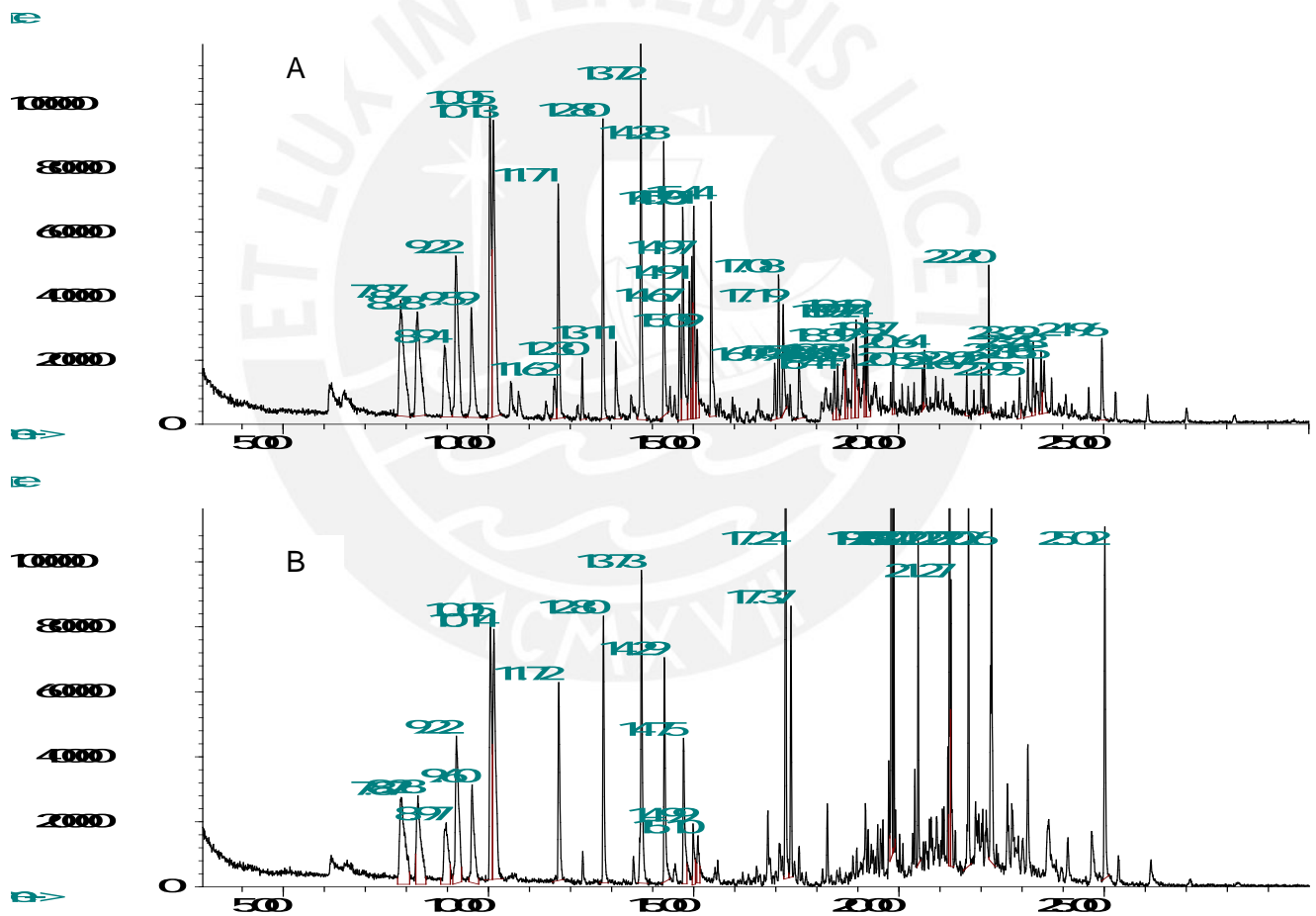


Figura 17. Cromatogramas representativos para análisis de volátiles ante la prueba de saturación por humedad. Los cromatogramas muestran la elución de la matriz Porapak Q (A) y Carbograph 1 (B).

En el cromatograma (B), en el que se utilizó Carbograph 1 como matriz, presentó dentro del área de interés, señales definidas y sin interferencia de otras, que no fueron producto de los compuestos estándar (zona entre 6 y 15 minutos). El cromatograma (A), presentó otras señales además de la producida por los estándares. Adicionalmente, tanto para (A) como para (B), se observaron señales representativas fuera de la zona de interés. Sin embargo, aun en esa zona, el análisis vía GC/MS muestra un cromatograma mejor definido para (B).

Las señales extras de uno frente al otro, pudieron deberse a la mejor estabilidad de Carbograph frente a solventes pues se trata de una matriz basada en carbón gráfico, comparándolo con el Porapak Q, que al ser un polímero pudo degradarse debido a esta interacción. Se consideró, en este sentido, que Carbograph 1 es una mejor matriz para trabajar bajo las condiciones de humedad y metodología vía elución por solvente.

3.4 Cuantificación de volátiles en bosque

El lugar de muestreo de volátiles se ubicó en la Reserva Nacional Tambopata, provincia de Tambopata, departamento de Madre de Dios. La zona se caracteriza por ser bosque alto no inundable (ver Figura 18).

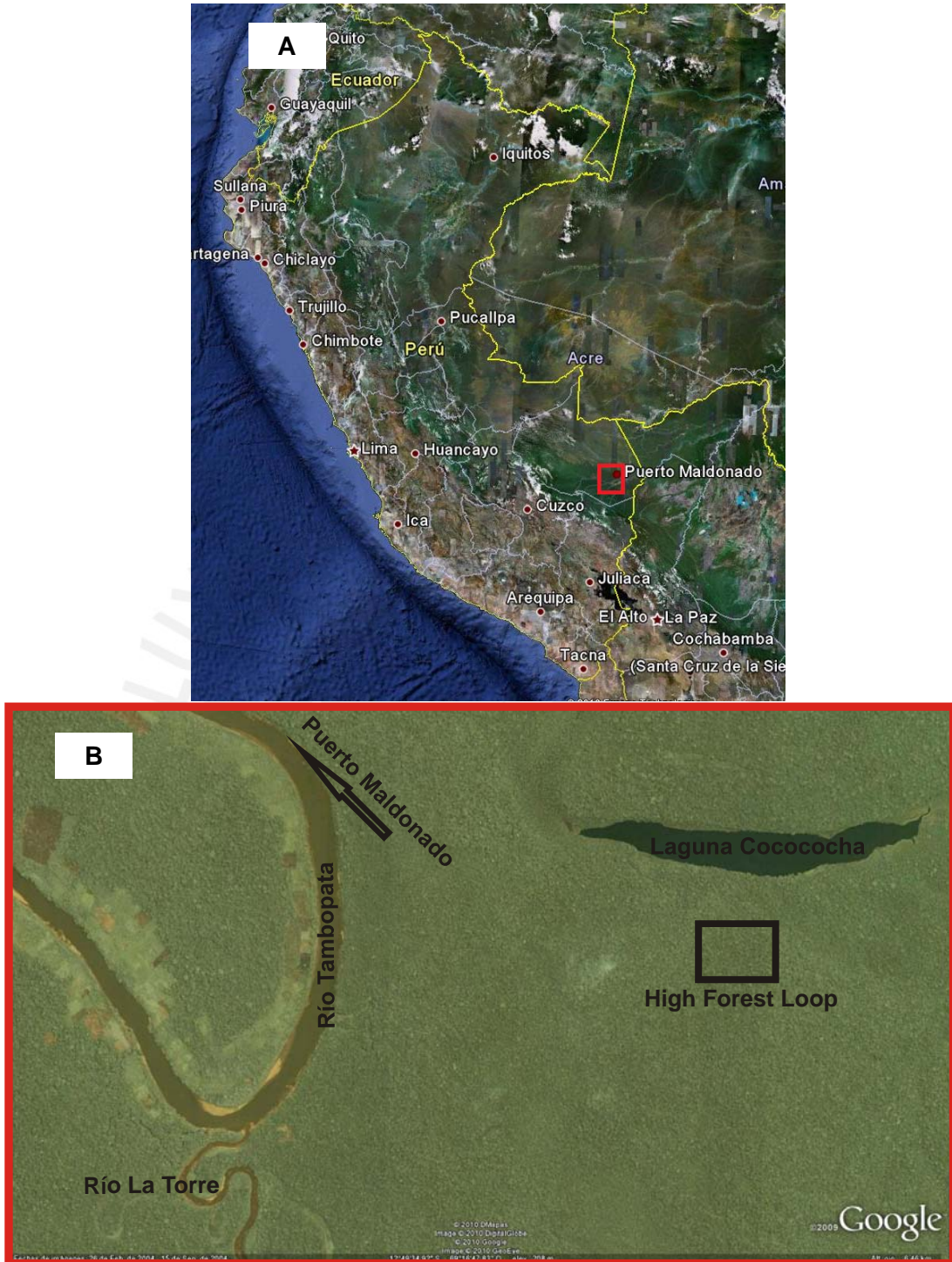


Figura 18. Mapa de localización del área de estudio en la Reserva Nacional Tambopata. (A) Ubicación del área de estudio en el mapa del Perú enmarcado en rojo. (B) Ampliación de la ubicación en el mapa. Enmarcado en negro, detalle de la localización de High Forest Loop, área específica para colección de muestras. Imágenes satelitales obtenidas de Google Earth.

3.4.1. Periodo 2008 – Matriz Porapak Q

En una primera etapa, el muestreo se efectuó utilizando Porapak Q, como matriz de captura. Los puntos de muestreo estuvieron ubicados en una trocha delimitada para investigación, conocido como High Forest Loop. Las coordenadas se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Coordenadas de los puntos de muestreo para el periodo marzo 2008 – diciembre 2008.

1	S12 49.495	W69 15.707	altitud 211 m
2	S12 49.480	W69 15.701	altitud 210 m
3	S12 49.456	W69 15.700	altitud 211 m
4	S12 49.494	W69 15.736	altitud 210 m
5	S12 49.478	W69 15.742	altitud 210 m
6	S12 49.453	W69 15.746	altitud 209 m

Como se indica en la sección 2.2.11, se seleccionaron árboles a los cuales se les pudo instalar un sistema de poleas, el cual sirvió para el montaje de los equipos de muestreo de BVOCs y de los sensores de monitoreo de temperatura y humedad.

La captura de BVOCs, su procesamiento y posterior análisis se realizó como se indica en la sección 2.2.11. o utilizado fue el dinámico.

Esta matriz y esta zona fueron utilizadas para los monitoreos realizados los meses de marzo, mayo, junio, agosto, octubre y diciembre del año 2008 (ver tabla 27). Entre los meses de marzo y agosto se pudieron identificar seis BVOCs presentes en las emisiones de bosque y que coincidieron con estándares trabajados en el laboratorio. Estos compuestos fueron: α -pineno, β -pineno, octanal, p-cimeno, r-limoneno y linalool (ver Figura 19)

Tabla 27. Trabajo de campo para captura de BVOCs en bosque – periodo marzo 2008 – diciembre 2008.

Monitoreo	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	Temperatura (°C)
1	28/03/08 – 29/03/08	09:00 – 12:00	25 – 30
2	03/05/08 – 04/05/08	09:00 – 12:30	20 – 21
3	06/06/08 – 07/06/08	09:30 – 13:00	16 – 18
4	16/08/08 – 17/08/08	09:30 – 13:45	22 – 23
5	15/10/08 – 17/10/08	09:00 – 14:00	25 – 31
6	04/12/08	09:00 – 12:00	nr

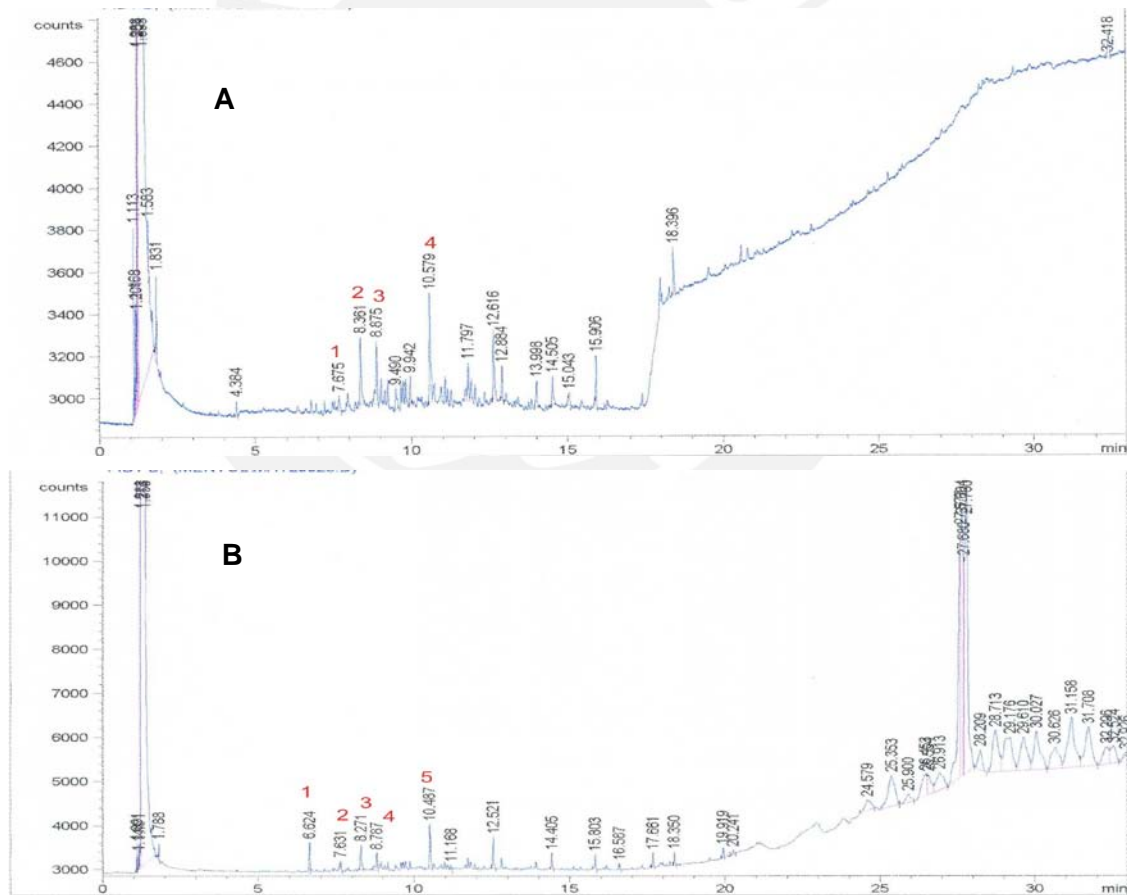


Figura 19. Cromatogramas representativos de muestras de bosque, 29 de marzo de 2008. (A) (1) β -pineno, (2) Octanal, (3) r-limoneno, (4) Linalol. (B) (1) α -pineno, (2) β -pineno, (3) Octanal, (4) p-cimeno, (5) Linalol.

De las capturas de BVOCs, realizadas con este sistema y en esta zona, se obtuvieron los resultados reportados en la Figura 20.

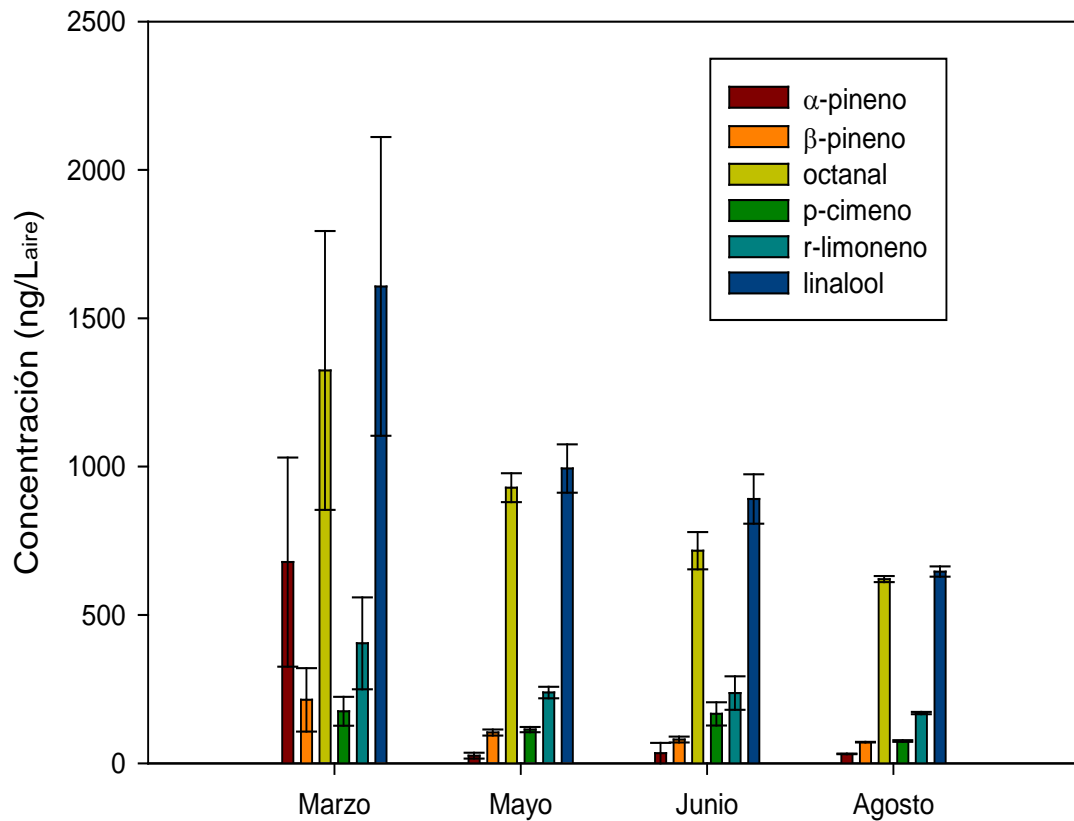


Figura 20. Concentración de BVOCs capturados en campo utilizando 100 mg de matriz Porapak Q. Se representan las variaciones de emisiones en los meses de marzo, mayo, junio y agosto, para los compuestos α-pineno (marrón), β-pineno (anaranjado), octanal (verde claro), p-cimeno (verde oscuro), r-limoneno (celeste), linalool (azul). Los valores están expresados en concentración de ng de compuesto por cada litro de aire capturado. Las barras expresan el error estándar.

En la Figura 20 se observa cómo es que variaron las emisiones de BVOCs durante los distintos meses. Estos seis compuestos fueron identificados utilizando estándares internos mediante el sistema separativo explicado en la sección 2.2.2.

Las muestras de campo colectadas en los meses de octubre y diciembre no mostraron, contrario a lo observado en los meses anteriores, señal alguna producida debido a los BVOCs analizados. En el mes de octubre se realizaron 12 muestreos por triplicado, sin embargo luego de procesar cada muestra y ser analizada, no se pudo observar señal que indique la presencia de BVOCs (ver Figura 21).

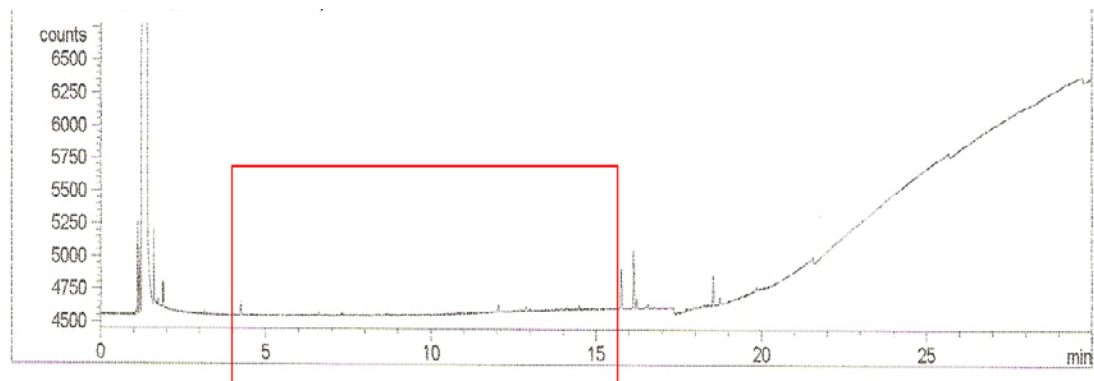


Figura 21. Cromatograma de volátiles capturados en el mes de octubre de 2008. Zona de interés donde se observarían señales de BVOCs enmarcado en rojo. No se observaron valores detectables para volátiles en campo.

En el mes de diciembre, la colección de muestras pudo realizarse únicamente un día. Al llegar a la zona de muestreo se observó que en uno de los principales puntos de captura de volátiles, el árbol sostén había colapsado (ver Figura 22). Se tuvo que re-establecer el muestreo en otro árbol con sistema de poleas adecuado.



Figura 22. Árbol seleccionado para toma de muestras luego de su caída. Izquierda, enmarcado en rojo: árbol quebrado a una altura de 2,5 m. Derecha, enmarcado en amarillo: detalle de la caja de muestreo con sensores de temperatura y humedad encontrado en el suelo con parte del árbol caído.

El análisis de las muestras colectadas en diciembre, mostraron el mismo comportamiento observado para las muestras del mes de octubre. En el análisis no se observaron señales producidas por la identificación de BVOCs (ver Figura 23).

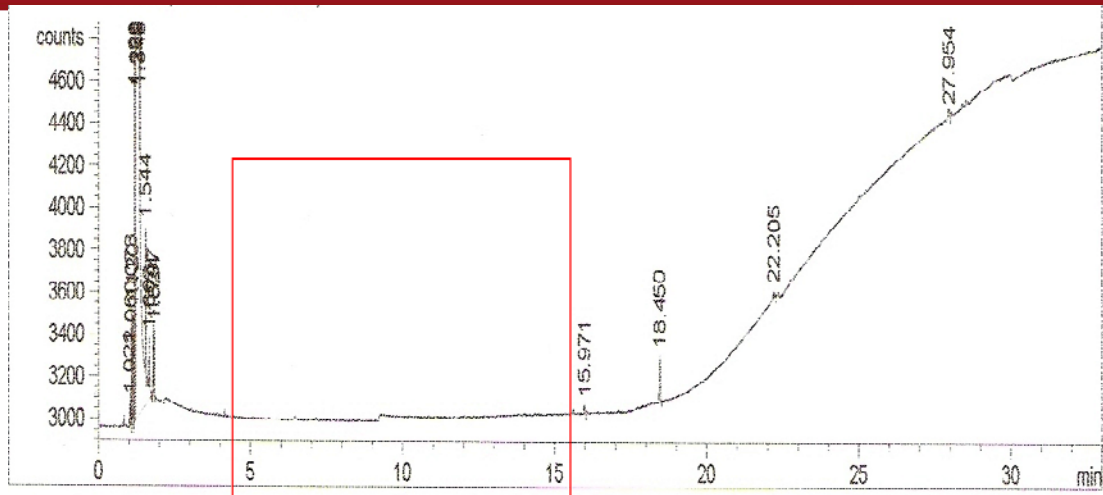


Figura 23. Cromatograma de volátiles capturados en el mes de diciembre de 2008. Zona de interés donde se observarían señales de BVOCs enmarcado en rojo. El análisis del cromatograma mostró que no hubo señales detectables para dicho muestreo en campo.

A lo largo de esta etapa de trabajo además, se monitoreó la temperatura y la humedad de la zona de estudio. Los sensores fueron ubicados en los puntos mencionados en la tabla 26, a una altura de 6 metros y por medio del sistema de poleas ya mencionado.

Durante cada visita a la zona de estudio, los sensores eran desmontados y los datos eran descargados a una computadora (ver Figura 24). De este modo se mantuvo un registro amplio de temperatura y humedad a lo largo del año 2008, entre los meses de abril y noviembre (ver Figura 25).



Figura 24. Descarga de datos del sensor de temperatura y humedad en campo. Se transportó al área de monitoreo una computadora para descargar directamente en campo los datos obtenidos por los sensores, enmarcado en rojo, de esta manera los sensores pudieron mantenerse en el área de estudio permanentemente.

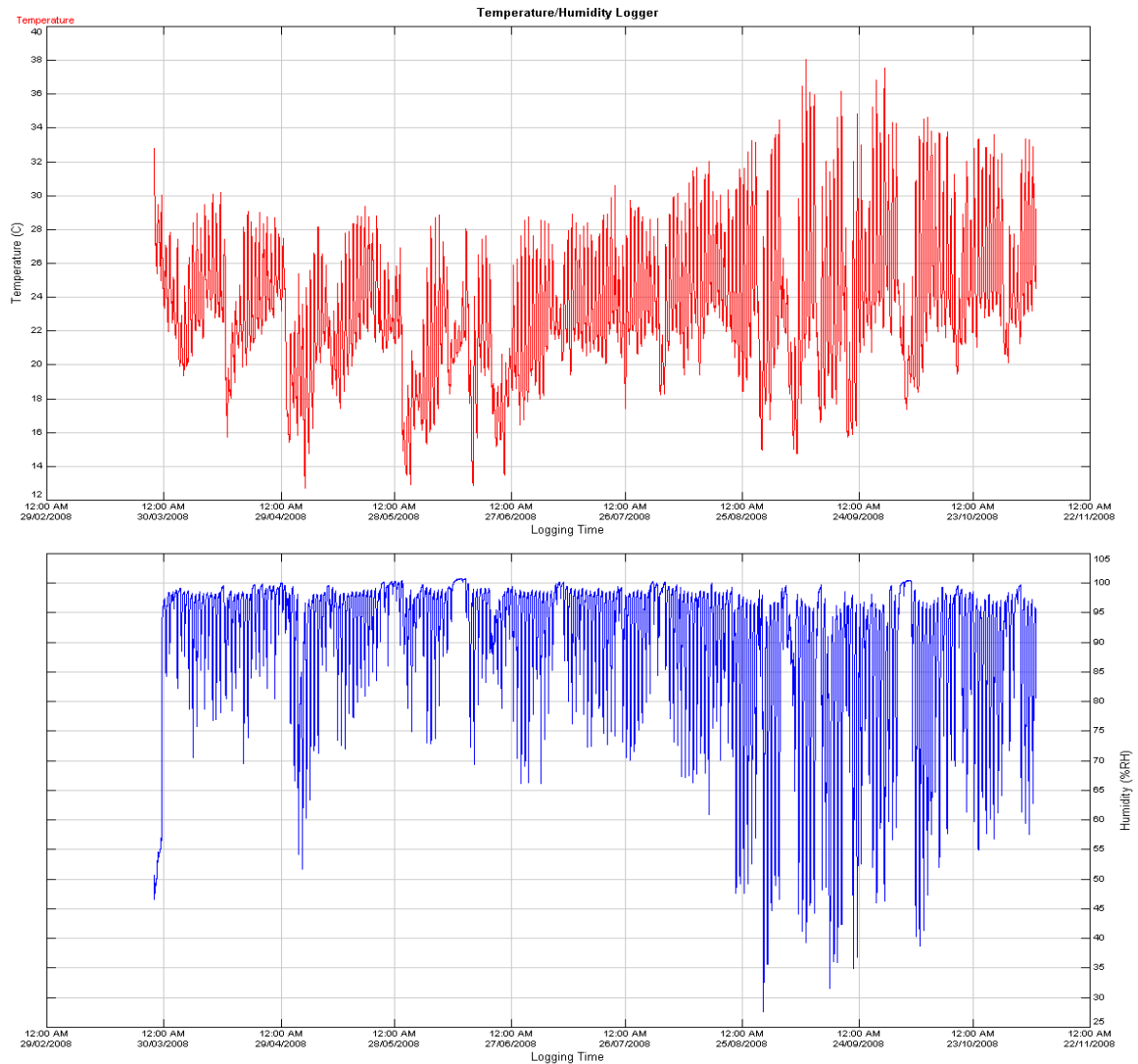


Figura 25. Condiciones climáticas en zona de estudio. Se mantuvo el monitoreo de temperatura (panel superior) y humedad (panel inferior) entre los meses de abril y noviembre del año 2008.

Durante esta temporada de colección de muestras, se observó que hubo al menos seis fenómenos conocidos como friajes, los cuales son fenómenos meteorológicos que consisten en el cambio repentino de las corrientes de vientos, lo que provoca que masas de aire frío, provenientes de la costa sur argentina, invadan las zonas tropicales y subtropicales de la zona sur de la Amazonía. Estos fenómenos se dan generalmente en temporada seca, entre los meses de mayo y setiembre. Durante estos fenómenos, la temperatura del bosque disminuye muy por debajo de su promedio, llegando a ser menor a 10°C, durante periodos de entre 3 y 6 días (Doan, 2004; Garreaud, 1999). Como era de esperarse, las temperaturas más altas en promedio se dan alrededor de las 11:00 y 14:00 horas.

Con respecto a la humedad, se pudo apreciar que la HR promedio en el bosque fue de alrededor de 95%. Aun así, se observaron temporadas muy secas, en las que se llegó en promedio hasta 35% de HR, aunque estos se daban solo en periodos de entre 10 y 18 horas aproximadamente.

3.4.2. Periodo 2009 – Matriz Carbograph

En el mes de abril de 2009, se reinició el trabajo de campo en la Reserva Nacional Tambopata, para lo cual se estableció una nueva zona de monitoreo, cuyas coordenadas se muestran en la tabla 28

Tabla 28. Coordenadas del punto de muestreo para el periodo abril 2009 – diciembre 2009.

S12 49.17,7 W69 15.42,7 altitud 236 m

Se instaló un nuevo sistema para elevar los equipos de muestreo en un árbol de tornillo, *Cedrelinga catenaeformis*, especie arbórea perteneciente a la familia de las leguminosas, que alcanza a medir entre 30 y 50 m de altura y un diámetro medio de entre 60 y 180 cm. El árbol fue localizado en las coordenadas mencionadas en la tabla 28. Fueron fijadas armellas metálicas al árbol, y a través de estas se fijó un cable acerado que sirvió como sistema de elevación hasta una altura de 6 m (ver Figura 26).



Figura 26. Instalación del nuevo sistema de muestreo de BVOCs. Izquierda: árbol sostén del sistema soporte con la escalera para el montaje. Derecha: detalle de armella fijada al tronco del árbol sostén y cable acerado de color verde.

Para el monitoreo de la temperatura y humedad se construyó una caseta con material plástico, de forma tal que los sensores pudieran cumplir su función a una altura adecuada, al mismo tiempo que permanecían cubiertos del contacto directo con la lluvia (ver Figura 27).



Figura 27. Caseta para monitoreo de condiciones climáticas. Izquierda: armazón principal construido de material plástico. Derecha: armazón principal cubierto con material plástico y sensor instalado montado en árbol sostén. La cubierta de plástico sirvió para proteger los sensores del exterior, especialmente de agua de lluvias.

En total, en el periodo comprendido entre abril 2009 y diciembre 2009, se realizaron cinco viajes a la Reserva Nacional Tambopata para coleccionar muestras en la zona de estudio. El muestreo fue realizado en los meses de abril, mayo, junio, noviembre y diciembre (ver tabla 29).

Tabla 29. Trabajo de campo para captura de BVOCs en bosque – periodo abril 2009 – diciembre 2008.

Monitoreo	Fecha de muestreo	Hora de muestreo	Temperatura (°C)
1	02/04/09 – 04/04/09	09:30 – 13:30	27 – 29
2	01/05/09 – 02/05/09	09:45 – 12:30	26 – 28
3	27/06/09 – 30/06/09	10:55 – 17:00	22 – 28
4	25/11/09 – 27/11/09	10:30 – 13:45	25 – 28
5	11/12/09 – 14/12/09	09:00 – 17:00	21 – 29

Durante esta etapa de monitoreo se utilizó como matriz de captura principalmente Carbograph 1. Además se tomaron muestras en cartuchos que contenían, un sistema tándem cuyo contenido fue de Carbograph 1 y Carbograph 5. Cada cartucho contenía 100 mg de matriz en total, ya sea 100 mg de Carbograph 1, o cuando fue el caso 50 mg de Carbograph 1 y 50 mg de Carbograph 5.

En el mes de abril, luego de instalado el sistema de monitoreo, se inició el muestreo. Se llevaron a la zona de muestreo tres tipos de cartuchos. El primero de ellos fue cartuchos con 100 mg de Carbograph 1, empacado en cartucho “cónico modificado”.

El segundo tipo fueron cartuchos metálicos proporcionados por el Instituto Max Planck en Mainz, Alemania (MPI). Estos cartuchos contenían un sistema de empaque tipo “tándem” que contenían 50 mg de Carbograph 1 y 50 mg de Carbograph 5. Este tipo de cartucho fue proporcionado por el MPI como apoyo a nuestra investigación, de modo tal que luego de realizar la captura de BVOCs, fueron enviados los cartuchos de vuelta al MPI para su análisis por GC/MS vía desorción térmica de cartuchos.

El tercer tipo, fueron cartuchos que contenían matriz Porapak Q. Debido a que los últimos dos muestreos de BVOCs en otra zona de la Reserva (octubre 2008 y diciembre 2008), no mostraron resultados positivos con esta matriz, se empacaron cartuchos con 100 mg de Porapak Q para monitorear y observar su validez en la nueva zona de muestreo.

Todas las tomas de muestra se realizaron por triplicado, utilizando tres bombas volumétricas idénticas y calibradas a una misma velocidad (ver Figura 28). A partir de este monitoreo y en adelante, se capturaron 10 L de aire en cada ocasión, como se indica en la sección 2.2.11.



Figura 28. Captura de BVOCs en campo utilizando Carbograph 1. El monitoreo se realizó a una altura de 6 m mediante un sistema de elevación por cables. Los cartuchos fueron orientados en dirección contraria al árbol sostén.

Luego de terminada la sesión de captura, los cartuchos de vidrio fueron almacenados en contenedores de vidrio y sellados con cinta de teflón. Los cartuchos metálicos tenían su propio sistema de sellado individual, que incluía un sello final de teflón.

Las muestras de BVOCs capturadas en campo fueron luego procesadas y analizadas en el laboratorio según como se indica en las secciones 2.2.1.2 y 2.2.8. Al obtener los resultados para las muestras capturadas con Carbograph 1 y Porapak Q, se observó que no hubo señales producidas por BVOCs. En ningún caso se encontró coincidencia con los estándares internos, identificados en la sección 3.1 (ver tabla 2). Las señales adicionales observadas para ambas matrices, no fueron registradas como BVOCs por las bibliotecas de compuestos del GC/MS (ver Figura 29).

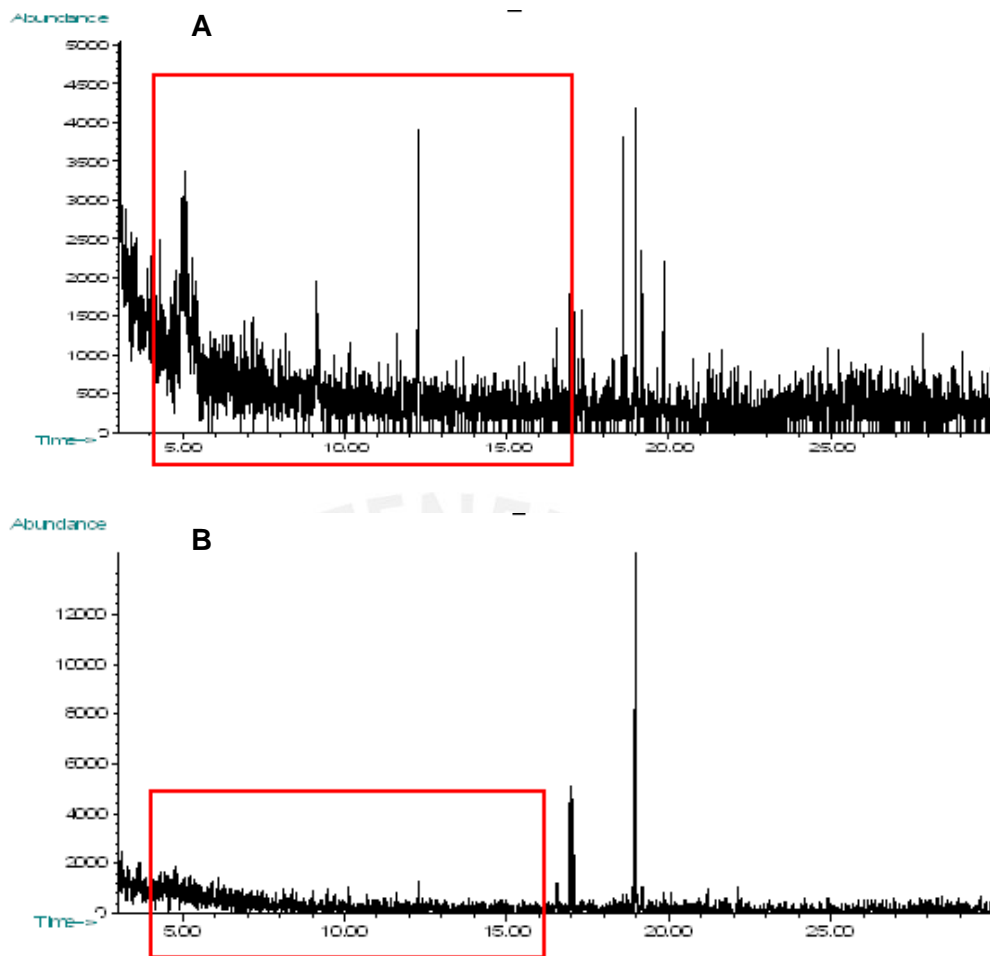


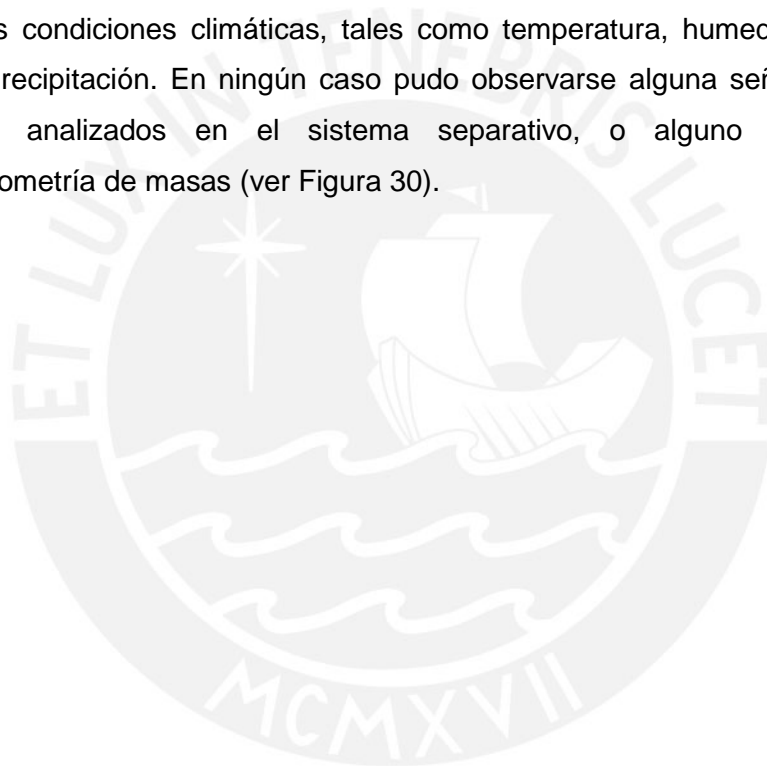
Figura 29. Cromatogramas de volátiles capturados en el mes de abril de 2009 analizados vía GC/MS. (A) Cromatograma producido luego de analizar la captura con matriz Carbograph 1. (B) Cromatograma producido luego de analizar la captura con matriz Porapak Q. (A) y (B) representan muestras de una misma fecha. Zona de interés donde se observarían señales de BVOCs enmarcada en rojo. No fueron observadas señales de BVOCs detectables.

Luego de obtener los resultados para el mes de abril, y observar que, tanto para la matriz Porapak Q y Carbograph, no hubo señales con resultados positivos, y dado que para Porapak Q ya se registraban antecedentes negativos, se decidió dejar de lado esta última y se trató de enfocar en optimizar el monitoreo con la matriz Carbograph 1.

Los cartuchos metálicos fueron enviados para su análisis a los laboratorios del MPI en Mainz. Luego de analizadas las muestras, se envió un reporte con los resultados

obtenidos según un análisis via GC/MS. Fueron reportados nueve monoterpenos, de los cuales seis habían sido utilizados en el sistema separativo en la sección 2.2.2. Estos seis monoterpenos fueron: α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, p-cimeno, limoneno. Además el análisis del MPI identificó α -felandreno, α -terpineno y γ -terpineno.

En los siguientes monitoreos, durante los meses de mayo, junio, noviembre y diciembre, se trabajó únicamente con cartuchos “cónico modificado” con 100 mg de Carbograph 1. El sistema de captura fue el mismo, utilizando bombas volumétricas, a una altura de 6 m del suelo y capturando 10 L de aire por cada cartucho, aunque se fueron variando las horas de muestreo. Además se capturaron volátiles bajo distintas condiciones climáticas, tales como temperatura, humedad relativa, brillo solar, precipitación. En ningún caso pudo observarse alguna señal producida por BVOCs analizados en el sistema separativo, o alguno identificable por espectrometría de masas (ver Figura 30).



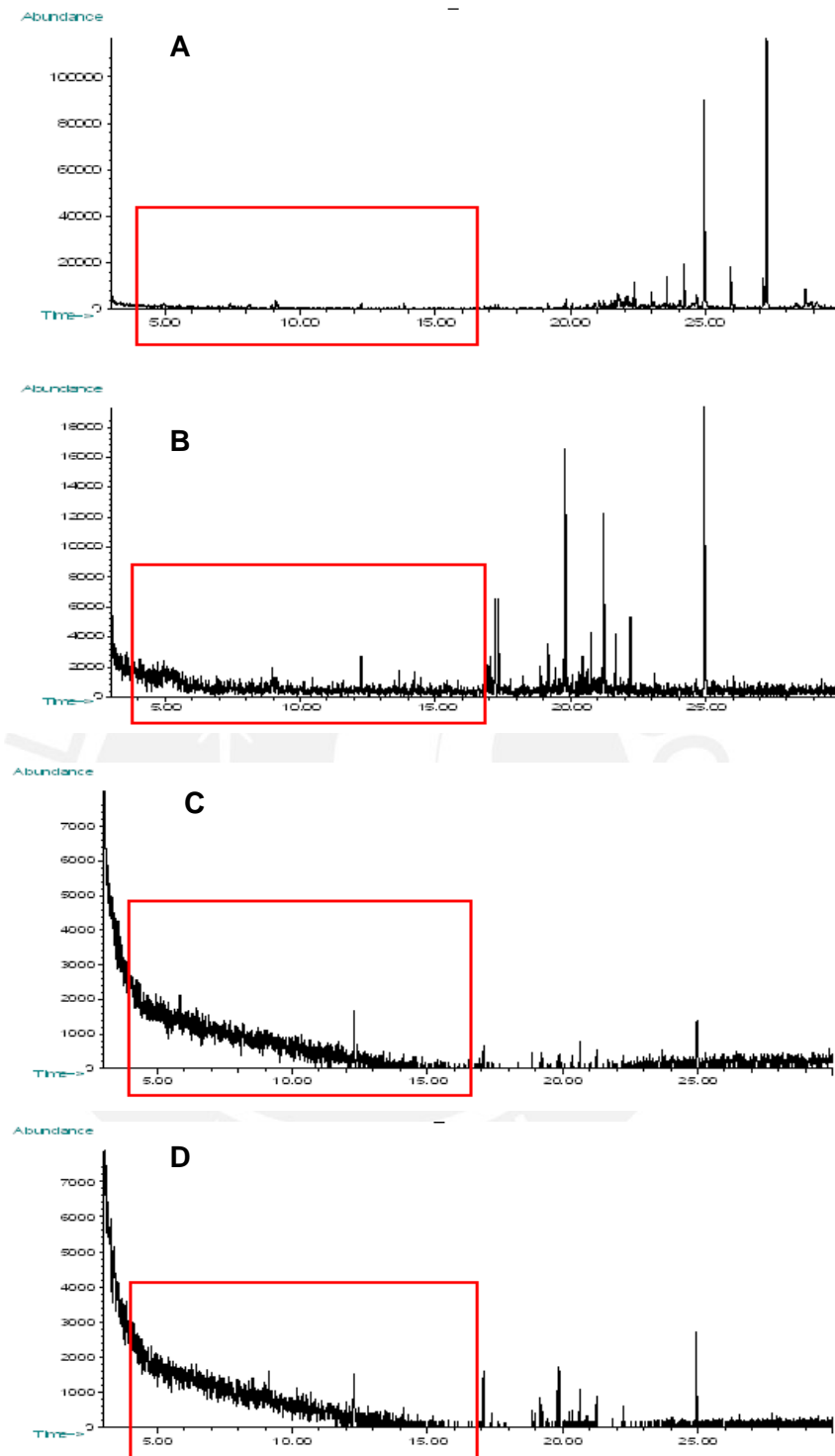


Figura 30. Cromatogramas de volátiles representativos para los monitoreos entre mayo y diciembre de 2009. (A) mayo, (B) junio, (C) noviembre, (D) diciembre. Zona de interés donde se observarían señales de BVOCs enmarcada en rojo. No fueron observadas señales de BVOCs detectables.

Durante esta etapa de trabajo también, se monitoreó la temperatura y la humedad de la zona de estudio. Los sensores fueron ubicados en el mismo punto utilizado para la captura de volátiles. La intención fue la de mantener un registro continuo de las condiciones climáticas de temperatura y humedad. En la Figura 31 se muestran datos de temperatura y humedad para los meses de mayo y junio del año 2009, etapa en la cual se realizaron los monitoreos 2 y 3 del segundo periodo de estudio.

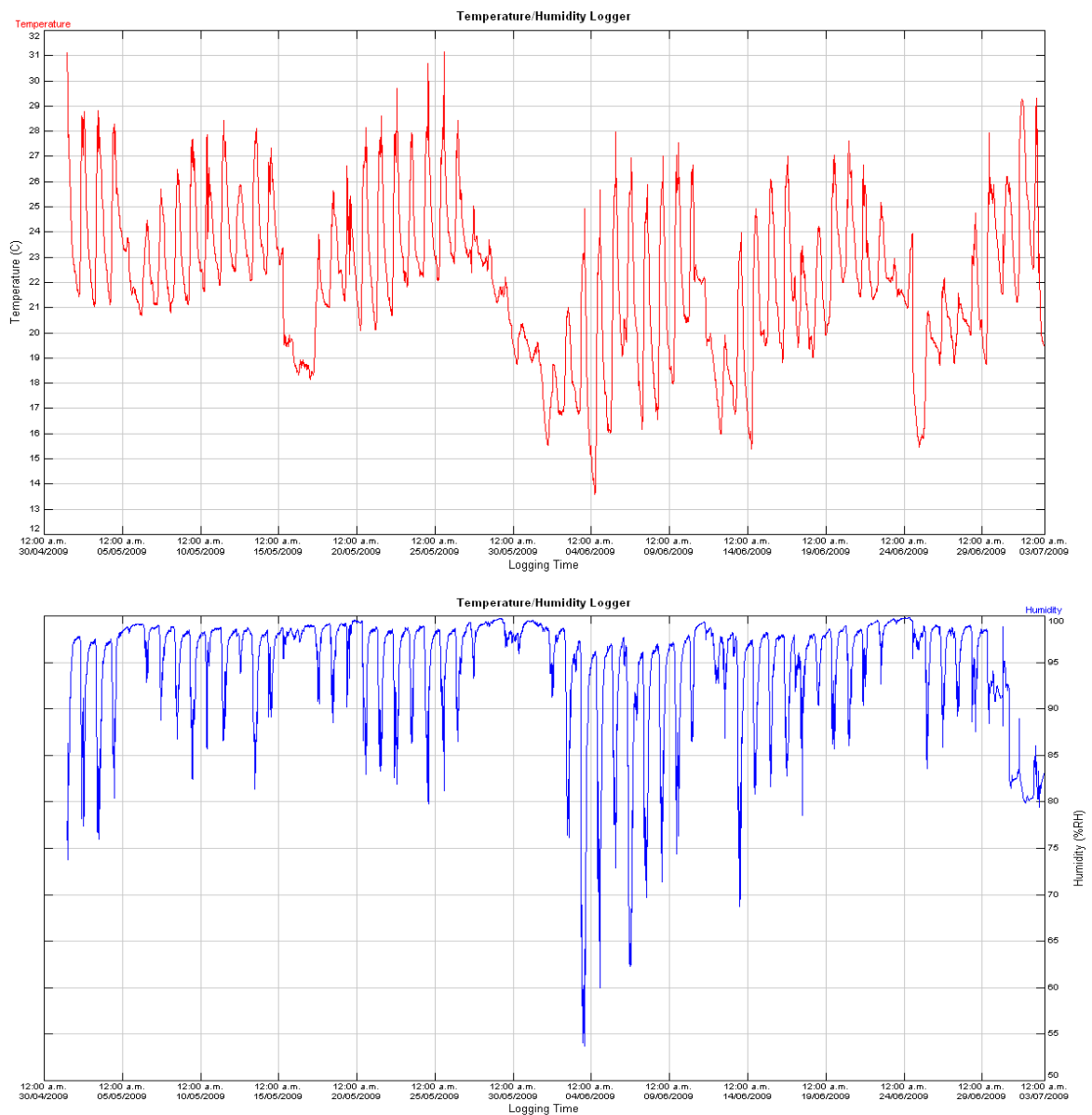


Figura 31. Condiciones climáticas en zona de estudio. Se muestra el monitoreo de temperatura (panel superior) y humedad (panel inferior) para los meses de mayo y junio del año 2009.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El trabajo se dividió en dos partes principales: 1) el diseño de un método adecuado para la cuantificación de volátiles, utilizando un sistema de captura y extracción de una matriz en fase sólida; 2) implementar un sistema de monitoreo de volátiles a nivel de campo y que permita obtener un perfil de volátiles y la cuantificación de la emisión. Además, la investigación fue llevada a cabo en dos periodos, marzo 2008 – diciembre 2008 y enero 2009 – diciembre 2009, en los cuales se trabajaron distintas variantes del mismo monitoreo.

Los volátiles de interés fueron identificados como compuestos orgánicos volátiles biogénicos (BVOCs), y entre ellos principalmente terpenoides y aldehídos de cadena corta.

Previo al paso de la cuantificación, se observaron los BVOCs de interés por cromatografía gaseosa para caracterizar el perfil de elución. Se utilizaron dos sistemas distintos, GC/FID y GC/MS.

Los resultados obtenidos para GC/MS, mostraron una mejor separación con respecto a los obtenidos vía GC/FID. A pesar que se contaba en ambos casos con un mismo tipo de columna, la mejor separación se debió a las condiciones de trabajo y al tipo de programa de temperatura utilizado para GC/MS.

Como es conocido, al aumentar la temperatura del horno en un GC, la viscosidad del gas portador aumenta, lo que ocasiona un menor flujo de gas portador a través de la columna, y esto se ve reflejado en una separación de analitos menos efectiva. El detector selectivo de masas (MSD), que se encuentra acoplado al GC/MS, necesita para operar correctamente un flujo de gas portador constante, por lo que el equipo GC/MS esta equipado con un control electrónico de presión (EPC), que compensa, con cambios de presión, la velocidad de flujo al aumentar la viscosidad del gas. El equipo de GC/FID que se utilizó no contaba con este EPC, por lo cual al trabajar con un gradiente de temperatura, la velocidad final del gas portador fue disminuyendo. Además el MSD tiene una mejor sensibilidad y un límite de detección menor con respecto al FID.

Sin embargo, la falta de EPC no descalifica los resultados obtenidos en el GC/FID. Al trabajar con cromatógrafos distintos se debe de buscar una estandarización para la validación de resultados, en nuestro caso para comprobar si los resultados en el GC/FID pueden ser equivalentes a los obtenidos en el GC/MS.

La necesidad de expresar los resultados cromatográficos, dados en tiempo de retención, como valores estandarizados para cada compuesto, se reflejó en la aplicación de los llamados “índices de retención” (IR). Los IR son valores propuestos para expresar el comportamiento de los compuestos de interés con respecto a una escala estandarizada mediante el uso de sustancias estándares conocidas (d' Acampora y col., 2008).

Para este trabajo, se utilizó como sustancias estándares conocidas alcanos alifáticos. Se corrieron series de alcanos C8-C20, en ambos cromatógrafos, y dado que en ambos casos se utilizó programas de temperatura con gradiente, se aplicó la ecuación propuesta por van den Dool y Kratz (ver ecuación 1) para el cálculo de los IR, también conocidos como índices de retención lineal (IRL) (d' Acampora y col., 2008). Si se hubiese trabajado con un programa isotérmico, se utilizaría la ecuación propuesta por Kavátz para el cálculo de los IR (d' Acampora y col., 2008). Los valores para los IRL se presentan en la tabla 30.

Ecuación 1. Ecuación propuesta por van den Dool y Kratz para el cálculo de índices de retención lineal.

$$I^T = 100 \left[z + \frac{(t_{R_i}^T - t_{R_z}^T)}{(t_{R_{(z+1)}}^T - t_{R_z}^T)} \right]$$

Donde: t_R^T es el tiempo de retención de un compuesto dentro de un análisis por GC con gradiente de temperatura.

z y z+1 son n-alquenos con z y z+1 número de carbonos respectivamente.

Tabla 30. Índices de retención lineal para BVOCs.

Compuesto	Tiempo de Retención (min) en GC/FID	Tiempo de Retención (min) en GC/MS	IRL en GC/FID	IRL en GC/MS	Punto de Ebullición (°C)
<i>Trans</i> -2-hexenal	5,087	6,07	850,36	858,80	149
<i>Trans</i> -2-hexen-1-ol	5,485	6,39	867,32	872,53	158
α -Pino	7,070	7,85	934,15	934,60	155-156
Canfeno	7,422	8,27	948,85	952,32	159-160
(1S)-(-)- β -Pino	8,065	8,92	975,70	979,75	165-167
Mirceno	--	9,20	--	991,56	167
Octanal	8,741	9,56	1004,23	1007,24	171
p-Cimeno	9,215	10,03	1025,56	1028,51	177
(R)-(+)-Limoneno	9,293	10,11	1029,07	1032,13	176-177
Linalool	10,900	11,69	1101,52	1103,88	196
Citronelal	--	12,76	--	1155,83	208
α -Terpineol	--	13,71	--	1202,11	215
Citronelol	--	14,26	--	1231,05	225
Geraniol	14,021	14,73	1258,29	1255,79	231
4-Metoxibenzaldehido	14,072	14,93	1260,98	1266,32	248
Citral	--	15,08	--	1274,21	229

En la tabla 30 se observa cómo, a pesar de tener tiempos de retención distintos, debido a las diferentes condiciones de temperatura, flujo de gas portador y detector, los IRL son equivalentes, lo que demuestra que los resultados fueron válidos.

Una alternativa a los IRL, es el tiempo de retención asegurado (RTL) de Agilent Technologies. El RTL consiste en el emparejamiento del tiempo de retención de un compuesto determinado, en un equipo Agilent con respecto a cualquier otro equipado con una columna de GC equivalente. Para realizar este emparejamiento de tiempos de retención, el equipo realiza un ajuste en la presión de entrada del gas portador, de modo tal que pueda realizar el emparejamiento esperado. Los RTL requieren de una calibración previa, utilizando el componente a asegurar e ingresándolo al GC variando la presión de entrada del gas portador. A diferencia de los IRL, para los cuales es necesario un cálculo matemático para determinar un

índice de retención, los RTL realizan variaciones en la presión de entrada para emparejar los tiempos de retención, al pasar de un equipo a otro (Agilent Technologies, 2008).

Además de los compuestos mencionados, uno de los BVOCs de mayor emisión, no solo en el bosque tropical sino en la gran mayoría de bosques, es el isopreno (Arneeth y col., 2008; Kesselmeier y col., 2000; Ulman y col., 2007). Sin embargo, en la presente investigación no fue observado.

El análisis de isopreno precisa de demandas instrumentales muy elaboradas. Las técnicas normalmente utilizadas para monitorear y analizar el isopreno involucran el procesamiento de cartuchos de adsorción mediante un equipo de desorción térmica (TD), usualmente equipado con enfoque criogénico. Además, para su análisis se utilizan cromatógrafos capaces de alcanzar temperaturas inferiores a la temperatura ambiente, y que adicionalmente están equipados con columnas de al menos 60 m de largo y de una fase estacionaria de mayor espesor (Ciccioli y col. 1992; Greenberg y col., 1999; Greenberg y col., 2004).

Si bien el isopreno es un indicador válido para observar el estado fisiológico de los bosques, los monoterpenos se presentan como una mejor opción para nuestro estudio, pues se presentan como más variados indicadores. Si bien la variedad de árboles dentro de la zona de estudio es reducida, ésta permite aun así una gama mixta de emisiones de monoterpenos, los cuales serán emitidos cambiando su perfil y cantidad de emisión según la especie. La variedad de monoterpenos presentes puede ser utilizado como un indicador de la biodiversidad presente en la zona. Además los monoterpenos necesitan de una menor complejidad instrumental para su análisis. Es debido a estos factores, y contemplando los objetivos de la presente investigación, que se dejó de lado el estudio del isopreno.

Luego de haber identificado los compuestos a estudiar, se trabajó en el diseño experimental para la cuantificación de volátiles. En esta etapa se tuvieron distintas consideraciones: calibración por inyección directa, sistema de muestreo, tipo de matriz, tipo de cartucho para el empaque de la matriz, matriz de captura, sistema de elución, análisis de las muestras.

Tanto para el primero, como para el segundo periodo de la investigación, se utilizó un sistema de calibración por inyección directa. Se inyectaron soluciones de BVOCs, de concentración conocida, de manera que se pudo obtener una base sobre la cual observar el comportamiento de los BVOCs al ser capturados y

procesados. Los resultados obtenidos para los análisis realizados en GC/FID y GC/MS mostraron una calibración adecuada, además de los posibles límites de detección. Esto último se manifestó sobre todo para el GC/MS, en el cual se ingresaron concentraciones menores que en el GC/FID. En las curvas de calibración de algunos BVOCs no pudo cuantificarse el menor valor (1 $\mu\text{g/mL}$) debido a estar por debajo del límite de detección. El comportamiento de cada compuesto durante el análisis es único, y depende de su peso molecular, presión de vapor, punto de ebullición y su afinidad con la columna.

Durante toda la investigación se decidió trabajar utilizando un sistema de muestreo activo. Se utilizaron bombas de muestreo volumétrico cuya función fue la de succionar aire a través de los cartuchos, de forma tal que los compuestos de interés quedasen atrapados en la matriz para su posterior análisis. El sistema de monitoreo pasivo (ver Figura 32) fue descartado con anterioridad, debido al prolongado tiempo de muestreo que se necesita. Este tipo de sistema solo sirve para otorgar una “figura” del día completo, más no puede ser utilizado para observar un ciclo circadiano no estacional, es decir no permitiría observar las distintas emisiones que varían a lo largo del día.



Figura 32. Difusores Radiello® para muestreo pasivo. Dentro de cada difusor (tubo blanco) se encuentra empacada la matriz de adsorción. Para el muestreo pasivo, o difusivo es necesario mantener los muestreadores en campo durante un largo periodo, lo que no permitiría observar los cambios de emisión a lo largo del día.

Para la aplicación del muestreo activo en la primera etapa, se utilizó la matriz Porapak Q empacada en el cartucho “fritado”. Este cartucho, de fabricación local,

fue fabricado tomando como base los cartuchos para desorción térmica de la marca Atas GL, cartuchos especialmente diseñados para ser utilizados en el equipo de desorción térmica Optic 3, del mismo fabricante. Para la decisión de utilizar este tipo de cartuchos, se evaluaron dos factores: la velocidad de flujo máximo alcanzado utilizando las bombas de muestreo y, la posibilidad del análisis de las muestras de campo en un equipo TD Optic 3, perteneciente al MPI. Finalmente, a pesar de obtener un mejor flujo utilizando cartuchos “cónico modificado”, se eligió el cartucho “fritado” para el empaque de la matriz, este presentó una velocidad de flujo considerada aún adecuada.

Para los experimentos de eficacia de captura y recuperación, se utilizó un sistema de volatilización en tubo a 40 °C, esto para asegurar una total volatilización de los compuestos a capturar en la matriz (ver Figura 4). Además para evitar contaminación externa se utilizó nitrógeno como gas portador. Cabe destacar que la activación y acondicionamiento de la matriz Porapak Q se realizó limpiando la matriz con acetonitrilo y colocando luego los cartuchos a una temperatura de 130 °C bajo flujo de nitrógeno. Se utilizó esta temperatura, relativamente baja, para evitar la degradación de la matriz, la cual empieza a degradarse a partir de los 150 °C (Krumperman, 1972). En este periodo, se observó una tendencia que mostró que, en general, la concentración de lo recuperado de cada estándar iba en aumento conforme era mayor su punto de ebullición. En efecto, esto era de esperarse debido a que el procesamiento de estas muestras involucró una etapa intermedia de “evaporación a sequedad” luego de la elución de cada cartucho. La tendencia en aumentar la concentración conforme aumentaba el punto de ebullición de cada compuesto, reflejó la distinta volatilidad de uno frente a otro (ver tabla 30).

Para la cuantificación en el segundo periodo de la investigación, se utilizó la matriz Carbograph, matriz en base a carbono grafito poroso. El cambio de matriz en este periodo, se debió principalmente a los variados resultados obtenidos para los últimos muestreos del primer periodo (octubre y diciembre 2008) con la matriz Porapak Q. Las matrices de carbono grafito son de uso muy difundido en el monitoreo de BVOCs (Ulman y col., 2007; Wilske y col., 2007) y es por eso que cuando se decidió cambiar de matriz se eligió Carbograph.

En el caso de esta matriz el empaque escogido fue el del cartucho “cónico modificado”. En este periodo se decidió enfocar la investigación en encontrar un sistema de cuantificación adecuado utilizando la elución por solventes, dejando de lado la posibilidad de la aplicación de un equipo de TD para este periodo. El

cartucho “cónico modificado” permitió un mejor flujo de aire a través de la matriz, es por este motivo que se eligió pues permitió disminuir el tiempo de muestreo para la captura de volátiles para un volumen determinado.

Para el procesamiento de cada cartucho, se realizaron pruebas de elución por centrífuga y por reflujo criogénico, siendo el mejor sistema el primero pues permitió la mejor reproducibilidad en los experimentos.

Al seleccionar la elución vía centrífuga, además se comprobó, mediante la captura de una cantidad de estándares de BVOCs, que el número de eluciones necesarias con un mismo solvente para extraer la mayor cantidad de BVOCs fue de dos. Se presume pues que con una sola elución los compuestos quedan aun en gran medida retenidos en la matriz. Cuando se aplicaron las re-eluciones sucesivas a partir de tres se observó una disminución en la concentración de volátiles observados, esto quiere decir que se alcanzó un equilibrio en el cual la matriz retiene los volátiles eluidos previamente. El determinar que solo se necesitaban de dos eluciones (una elución + una re-elución), ayudó a acelerar el procesamiento de cada cartucho luego de la captura de volátiles.

De igual forma que en el primer periodo, en el segundo también se utilizó un sistema de volatilización en tubo a 40 °C (ver Figura 7). En este caso el acondicionamiento de la matriz Carbograph se realizó limpiando la matriz con diclorometano y colocando luego los cartuchos a una temperatura de 160 °C bajo flujo de nitrógeno. Para el caso del Carbograph no se necesita tener cuidado con las altas temperaturas, pues debido a su naturaleza de grafito la matriz es muy estable ya que para alcanzar su estructura la matriz fue tratada a temperaturas de alrededor de 3000 °C (Mastragiaco y col., 2002).

Se observó, en ambos periodos que la cuantificación de volátiles pudo ser llevada a cabo en el laboratorio, obteniéndose para ambos casos una relación de recuperación con lo que se podría cuantificar lo que se obtuviera en la segunda parte de cada periodo, la cuantificación de los volátiles capturados en campo. De esta forma quedaron implementados los sistemas de cuantificación de BVOCs utilizando matriz Porapak Q y Carbograph.

En la segunda parte de la investigación se llevó la investigación a campo. Para poder desarrollar la cuantificación se debió evaluar y desarrollar adecuadamente parámetros de monitoreo, como el volumen de aire capturado, la altura a la que se ubicó el monitoreo, y sobre todo el lugar de monitoreo.

A lo largo de toda la investigación, se decidió montar el sistema de muestreo en distintos puntos del bosque, tratando de mantener constante la altura de monitoreo lo mas elevado posible. Se estandarizó entonces el monitoreo a una altura de 6 m. Con esto se minimizaron las capturas de emisiones de volátiles por parte de plantas menores y de fauna terrestre, pues lo que se buscó fue la captura de emisiones de bosque a nivel de dosel.

Con la misma intención de buscar la captura de emisiones de bosque, los cartuchos siempre fueron orientados en dirección contraria al árbol sostén del sistema de captura de volátiles. Si bien es muy probable que la mayor cantidad de BVOCs capturados sean emitidos por cada árbol sostén, la intención fue minimizar este efecto.

En la búsqueda de poder obtener un perfil que pueda ser característico a distintas épocas del año y que refleje la estacionalidad de las concentraciones de volátiles emitidos, se realizaron capturas de BVOCs a lo largo del año y en distintas condiciones ambientales. Es así que en total fueron realizados diez viajes de monitoreo en distintas épocas del año, con lo cual se cubrió el monitoreo en temporadas secas, temporadas de lluvia, con condiciones de nubosidad, de brillo solar, de bajas y de altas temperaturas. Para poder comparar las emisiones con las condiciones climáticas, se realizaron registros de temperatura y humedad relativa durante los periodos de captura de volátiles.

En los primeros meses del monitoreo, empleando la matriz Porapak Q y un volumen de captura de 5 L de aire, se observaron resultados cuantificables para seis BVOCs. Durante los meses de marzo, mayo, junio y agosto, se pudo observar una variación en la emisión de los compuestos α -pineno, β -pineno, octanal, p-cimeno, r-limoneno y linalool. Además se observó una marcada tendencia a la disminución de lo capturado en promedio en cada mes.

Si bien es difícil generalizar el comportamiento de la emisión de terpenoides en un bosque tropical, como el Amazónico, se puede decir que la variación de las emisiones según la etapa estacional (seca o lluviosa), no es únicamente dependiente de la temperatura y de la intensidad de luz, sino que puede verse influenciada por otros distintos factores fisiológicos y ambientales (Kuhn y col., 2004). En nuestro caso, se observó que a lo largo del tiempo de monitoreo, la tendencia a la disminución de la concentración de lo capturado en campo puede ser asociado a una disminución en la temperatura promedio en los días de monitoreo.

En el mes de marzo, mes de mayor emisión, la temperatura promedio mientras se realizaba el monitoreo de BVOCs fue de 28°C, mientras que para el mes de mayo fue de 20-21°C. En mayor medida se observó que para el mes de junio descendió hasta los 16-18°C (este monitoreo fue realizado luego de los días más intensos de un fenómeno de friaje). En el mes de agosto se elevó ligeramente a 22°C, aun así fue considerablemente menor que lo registrado para el mes de marzo.

Sumado al factor de la disminución de la temperatura promedio, otro factor que pudo contribuir a la disminución en las emisiones de BVOCs, fue la variación de los puntos de muestreo en el bosque, así como el cambio en la vegetación. En el área se detectó que muchos de los árboles habían entrado a un proceso de descomposición, lo que fue variando la morfología del bosque circundante.

Para los meses de octubre y diciembre, aun con Porapak Q, los resultados de la captura de BVOCs fueron totalmente distintos a lo anteriormente mostrado. En cada caso, luego de procesadas y analizadas las muestras en el laboratorio, se observó que los cromatogramas no presentaron señales producto de los BVOCs. Debido a los cambios fisiológicos y en la morfología del bosque, en esta etapa del primer periodo de investigación, se tuvo que cambiar continuamente los puntos de muestreo. Se puede asociar la falta de señales detectables de BVOCs al cambio en la fisionomía del bosque circundante. En los primeros meses de estudio se realizó cada monitoreo en zonas de bosque más cerrado y con nivel de dosel relativamente más bajo. Para los últimos casos, se caracterizaba por ser un bosque más abierto y de altura de dosel mayor, esto pudo reflejarse en la menor emisión, al punto de estar por debajo de los límites de detección. Adicionalmente, se pudo descartar que esta falta de señal se debiera a la falla de alguna de las bombas de muestreo, pues no es solo una la que funcionaba, sino que fueron tres bombas que capturaron volátiles en simultáneo.

Debido al deterioro de la zona y a los resultados observados, se procedió a cambiar distintas variables en el monitoreo. En primer lugar se cambió de zona de muestreo. A partir del mes de abril del año 2009 (segundo periodo de la investigación) el lugar de monitoreo fue movido (ver tabla 28).

Además del cambio de zona de monitoreo, a recomendación del Dr. Jürgen Kesselmeier del MPI, se cambió la matriz de captura de BVOCs y el volumen de aire capturado, de 6 a 10 L. La nueva matriz escogida fue Carbograph. Aun así, para el primer monitoreo del segundo periodo, se realizaron capturas de BVOCs

tanto con la nueva matriz, Carbograph 1, como con Porapak Q, para de este modo descartar que la falta de BVOCs en los últimos dos muestreos se debiera únicamente a la localización del sistema de captura. Al procesar y analizar lo capturado en bosque, tanto para Carbograph 1 como con Porapak Q los resultados nuevamente no mostraron señales detectables para BVOCs, a pesar que se contaba con un equipo de GC/MS, con mayor sensibilidad con respecto del GC/FID (ver Figura 29).

Adicionalmente a estos cartuchos, se contó con cartuchos del MPI, cada uno de los cuales contenía un sistema tándem de dos matrices, Carbograph 1 y Carbograph 5. La diferencia de estas dos matrices radica en la superficie específica para captura que tienen gracias a su porosidad. Mientras que la superficie específica para Carbograph 1 es de $100 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$, para Carbograph 5 es de $560 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (Mastrogiacomo y col., 2002). Esta diferencia de superficie se ve reflejada en el mayor poder de captura del Carbograph 5. Los cartuchos del MPI estaban especialmente diseñados para ingresar a un equipo de TD.

Los cartuchos del MPI fueron utilizados de la misma forma que los anteriormente mencionados, capturando 10 L de aire con las bombas de muestreo volumétrico, a una altura de 6 m. Luego del muestreo, fueron enviados al MPI para su análisis, procesándolos con un equipo de TD. En este caso los análisis evidenciaron la presencia de nueve distintos monoterpenos, además de otros BVOCs. Los resultados obtenidos en el MPI, descartaron definitivamente que se tratase de un problema con alguna de las bombas de muestreo, pues en estos casos si hubo detección de BVOCs.

Los resultados obtenidos para los siguientes monitoreos con la matriz Cabograph 1: mayo, junio, noviembre y diciembre de 2009, no mostraron señales detectables producto de BVOCs (ver Figura 30).

Un factor a evaluar dados los resultados, fue la estabilidad de los compuestos en la matriz. Los resultados obtenidos para los experimentos de estabilidad, sin embargo, descartan esta posibilidad, pues los BVOCs, según se demostró, tienen un tiempo de vida en cartucho lo suficientemente extenso para capturar en bosque, almacenar en frío, procesar y analizar luego en el laboratorio (ver Figura 14).

Se consideró además, dada la alta humedad relativa presente en la zona de estudio, que las matrices pudieron sufrir saturación por humedad. Sin embargo, los

resultados mostrados para los experimentos de saturación por humedad, no mostraron efectos significativos que llevaran a concluir esto (ver Figuras 16 y 17).

Al observar el grueso de resultados, incluyendo el reporte de resultados positivos para lo analizado en los laboratorios del MPI con los cartuchos de sistema tándem desorbidos térmicamente, y los resultados negativos producto de lo procesado vía elución con solvente, se pudo presumir que en el área de estudio hay presencia de BVOCs, aunque en cantidades no lo suficientemente elevadas para estar por encima de nuestro límite de detección.

Una posibilidad de que las cantidades observadas sean sumamente bajas, pudo depender de la altura del muestreo. Como ya se mencionó, el monitoreo fue realizado a una altura de 6 m, fijando el sistema a un árbol de tornillo (*Cedrelinga catenaeformis*) de entre 25-30 m de alto. Además el bosque circundante estaba compuesto, en su mayoría, por árboles en promedio altos, entre 15 y 20 m, y que presentaba una buena circulación de viento. Para obtener una concentración mayor de BVOCs en cada muestra sería necesario elevar el monitoreo por sobre el dosel de bosque. Debido a que la mayoría de las emisiones de BVOCs, principalmente isopreno y monoterpenos, se realizan a través de las hojas de los árboles (Lerdau y col., 1997) y dada la gran volatilidad de estos compuestos y su tendencia a difundir, se espera que al monitorear por encima del nivel de dosel, la concentración de BVOCs observada sea mucho mayor. La gran mayoría de reportes que existen acerca de emisiones de BVOCs, realizan el monitoreo a una altura por sobre el dosel de bosque. El empleo de torres de monitoreo (Holzinger y col., 2005) e incluso sistemas de captura mediante el empleo de la elevación utilizando globos aerostáticos (Greenberg y col., 2005; Kesselmeier y col., 2000) ha sido documentado.

Además, la matriz Carbograph 5, por su mayor superficie específica, permite la captura de volátiles que no pueden ser retenidos en Carbograph 1. El sistema tándem surge como una gran alternativa. Es necesario, sin embargo, cumplir con los requerimientos instrumentales de un equipo de desorción térmica para su empleo.

Al comparar ambas técnicas, desorción térmica y elución por solvente, en nuestro caso se pudo apreciar que lo analizado por TD posee una concentración de analito 400 veces mayor. Al procesar vía solvente un cartucho de muestra, este es eluido con 400 μL de solvente, para luego ingresar al GC/MS únicamente 1 μL de la

muestra, mientras que al utilizar un TD la totalidad del analito puede ser introducida directamente al cromatógrafo.

Finalmente, se puede afirmar que en la presente investigación se pudo montar sistemas de cuantificación de volátiles en laboratorio, mediante la extracción de fase sólida vía la elución con solvente, incluso llegándose a identificar sus límites de detección y empleando dos matrices de captura distintas y dos analizadores equivalentes. Sin embargo, esta cuantificación no pudo ser establecida y estandarizada en el trabajo de campo, presumiblemente por la baja concentración en la emisión de BVOCs en el área escogida para el estudio.



5. CONCLUSIONES

Se determinó que los sistemas de muestreo dinámico o de captura por arrastre, son métodos cuantitativos adecuados para la detección de volátiles en el laboratorio y en campo. Sin embargo, si bien el sistema de procesamiento de muestras vía elución por solvente demostró ser válido para los análisis en laboratorio, no lo fue así para el trabajo de campo, presumiblemente debido a la baja concentración de volátiles en la zona de monitoreo elegida.

Las matrices Porapak Q y Carbograph pueden ser utilizadas para el monitoreo en campo, sin embargo se prefiere la matriz Carbograph pues presenta mejores condiciones de estabilidad térmica, lo que facilita su correcta activación y acondicionamiento previo al monitoreo. Además, otorga la posibilidad de realizar análisis vía desorción térmica sin tener como posibilidad su descomposición por elevadas temperaturas, lo que si sucedería con el Porapak Q.

En la zona de muestreo delimitada para el trabajo de campo, sí se encuentra una emisión de BVOCs, aunque en bajas cantidades. Debido a esto, las emisiones son identificables mediante el uso de otras técnicas de análisis (desorción térmica directa del cartucho).

La ausencia de BVOCs en las muestras de campo, se pudo deber a su baja concentración a la altura en la que se realizó el muestreo en la zona seleccionada. El contenido de compuestos presentes en las muestras procesadas se encontraría en cantidades por debajo de los límites de detección de nuestros analizadores. Para obtener, en cada muestreo, concentraciones mayores de BVOCs, sería necesario realizar monitoreos por sobre el nivel de dosel.

Dados los resultados, se recomienda para la continuación de este proyecto:

- Que el monitoreo sea realizado a una altura que se encuentre a o supere la altura del dosel del bosque. Una alternativa es el uso de una torre de monitoreo dentro de la zona de estudio.
- Implementar un equipo de desorción térmica para los análisis de las muestras de campo, de esta manera se podría maximizar la concentración de volátiles detectables.
- Realizar capturas de volátiles empleando cartuchos empacados con matrices Carbograph 1 y Carbograph 5 (o equivalentes) empacadas en un

cartucho mediante un sistema tándem, que permita tener ambas fases sólidas como superficie de captura.

- Implementar un equipo de cromatografía de gases equipado con un detector de masas con una mayor sensibilidad, lo que se reflejaría en menores límites de detección.



6. BIBLIOGRAFÍA

d' Acampora, B.; Bicchi, C.; Dugo, P.; Rubiolo, P.; Dugo, G.; Mondello, L. (2008). Linear retention indices in gas chromatographic analysis: a review. *Flavor and Fragrance Journal*, **23**, 297-314.

Agilent Technologies (2008). Retention time locking with the MSD Productivity ChemStation.

Arneth, A.; Schurgers, G.; Hickler, T.; Miller, P. (2008). Effects of species composition, land surface cover, CO₂ concentration and climate on isoprene emissions from European forests. *Plant Biology*, **10**, 150-162.

Calogirou, A.; Larsen, B.; Kotzias, D. (1999). Gas-Phase terpene oxidation products: a review. *Atmospheric Environment*, **33**, 1423-1439.

Ciccioli, P.; Cecinato, A.; Brancaleoni, E.; Frattoni, M. (1992). Use of carbon adsorption traps combined with high resolution Gas Chromatograph – Mass Spectrometry for the analysis of polar and non-polar C₄-C₁₄ hydrocarbons involved in photochemical smog formation. *Journal of High Resolution Chromatography*, **15**, 75-84.

Clark, D. (2007). Detecting Tropical Forests' Responses to Global Climatic and Atmospheric Change: Current Challenges and a Way Forward. *Biotropica*, **39**, 4-19.

Dindorf, T.; Kuhn, U.; Ganzeveld, L.; Schebeske, G.; Ciccioli, P.; Holzke, C.; Köble, R.; Seufert, G.; Kesselmeier, J. (2006). Significant light temperature dependent monoterpene emissions from European beech (*Fagus sylvatica* L.) and their potential impact on the European volatile organic compound budget. *Journal of Geophysical Research*, **111**, 1-15.

Doan, T. (2004). Extreme weather events and the vertical microhabitat of the rain forest anurans. *Journal of Herpetology*, **38**, 422-425.

Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, **135**, 1893-1902

Dudareva, N.; Pichersky, E. (2008). Metabolic engineering of plant volatiles. *Biotechnology*, **19**, 1-9.

Garreaud, R. (1999). Cold air incursions over subtropical and tropical South America: a numerical case study. *Monthly Weather Review*, **127**, 2823-2853.

Greenberg, J.; Guenther, A.; Zimmerman, P.; Baugh, W.; Geron, C.; Davis, K.; Helmig, D.; Klinger, L. (1999). Tethered balloon measurements of biogenic VOCs in the atmospheric boundary layer. *Atmospheric Environment*, **33**, 855-867.

Greenberg, J.; Guenther, A.; Pétron, G.; Wiedinmyer, C.; Vega, O.; Gatti, L.; Tota, J.; Fische, G. (2004). Biogenic VOC emissions from forested Amazonian landscapes. *Global Change Biology*, **10**, 651-662.

Holzinger, R.; Lee, A.; Paw, K.; Goldstein, A. (2005). Observations of oxidation products above a forest imply biogenic emissions of very reactive compounds. *Atmospheric Chemistry and Physics*, **5**, 67-75.

Kesselmeier, J.; Staudt, M. (1999). Biogenic volatile organic compounds (VOC): an overview on emission, physiology and ecology. *Journal of Atmospheric Chemistry*, **33**, 23-88.

Kesselmeier, J.; Kuhn, U.; Wolf, A.; Andreae, M.; Ciccioli, P.; Brancaleoni, E.; Frattoni, M.; Guenther, A.; Greenberg, J.; De Castro Vasconcellos, P.; Telles de Oliva, T.; Tavares, T.; Artaxo, P. (2000). Atmospheric volatile organic compounds (VOC) at a remote tropical forest site in central Amazonia. *Atmospheric Environment*, **34**, 4063-4072.

Krumperman, P. (1972). Erroneous peaks from Porapak-Q traps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **20**, 909.

Kuhn, U.; Rottengberger, S.; Biesenthal, T.; Wolf, A.; Schebeske, G.; Ciccioli, P.; Brancaleoni, E.; Frattoni, M.; Tavares, T.M.; Kesselmeier, J. (2004). Seasonal differences in isoprene and light-dependent monoterpene emission by Amazonian tree species. *Global Change Biology*, **10**, 663-682.

Lerdau, M.; Guenther, A.; Monson, R. (1997). Plant production and emission of volatile organic compounds. *BioScience*, **47**, 373-383.

Malhi, Y.; Phillips, O.; Lloyd, J.; Baker, T.; Wright, J.; Almeida, S.; Arroyo, L.; Frederiksen, T.; Grace, J.; Higuchi, N.; Killeen, T.; Laurance, W.; Leão, C.; Lewis, S.; Meir, P.; Monteagudo, A.; Neill, D.; Núñez, P.; Panfil, S.; Patiño, S.; Pitman, N.; Quesada, C.; Rudas-LI., A; Salomão, R.; Saleska, S.; Silva, N.; Silveira, M.; Sombroek, W.; Valencia, R.; Vásquez, R.; Vieira, I.; Vinceti, B. (2002). An international network to monitor the structure, composition and dynamics of amazonian forests (RAINFOR). *Journal of Vegetation Science*, **13**, 439-450.

Mahli, Y.; Phillips, O. (2004). Tropical forests and global atmospheric change: a synthesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London*, **359**, 549-555.

Mastriagiaco, A.; Ottaviani, M.; Pierini, E.; Cangioti, M.; Mauro, M.; Mangani, F. (2002). Comparison of chemical and physical properties of carbon blacks for sampling and analysis of environmental pollutants. *Chromatographia*, **55**, 345-348

Peñuelas, J.; Llusà, J. (2003). BVOCs: plant defense against climate warming? *Trends in Plant Science*, **8**, 105-108.

Phillips, O.; Baker, T.; Arroyo, L.; Higuchi, N.; Killeen, T.; Laurance, W.; Lewis, S.; Lloyd, J.; Mahli, Y.; Monteagudo, A.; Neill, D.; Núñez, P.; Silva, J.; Terborgh, J.; Vásquez, R.; Alexiades, M.; Almeida, S.; Brown, S.; Chave, J.; Comiskey, J.; Czimczik, C.; Di Fiore, A.; Erwin, T.; Klueber, C.; Laurance, S.; Nascimento, H.; Olivier, J.; Palacios, W.; Patiño, S.; Pitman, N.; Quesada, C.; Saldias, M.; Torres, A.; Vinceti, B. (2004). Pattern and process in amazon tree turnover, 1971-2001. *Philosophical Transactions of the Royal Society. London*, **359**, 381-407

Phillips, O.; Vasquez, R.; Monteagudo, A.; Baker, T.; Núñez, P. (2005). Large lianas as hyperdynamic elements of the tropical forest canopy. *Ecology*, **86**, 1250-1258

Pichersky, E.; Noel, J.; Dudareva, N. (2006). Biosynthesis of plant volatiles; nature's diversity and ingenuity. *Science*, **311**, 808-811.

Saxton, J.; Lewis, A.; Kettlewell, J.; Ozel, M.; Gogus, F.; Boni Y.; Korogone, S.; Serça, D. (2007). Isoprene and monoterpene emissions from secondary forest in northern Benin. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions*, **7**, 4981-5012

Sharkey, T.; Yeh, S. (2001). Isoprene emission from plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **52**, 407-436

Ulman, M.; Bielawska, K.; Lozowicka, B.; Heimann, M.; Kesselmeier, J.; Schebeske, G.; Katrynski, K.; Chilmoczyk, Z. (2007). Determination of volatile organic compounds (VOCs) in the atmosphere over central Siberian forest and southern part of European Taiga in Russia. *Analytical Chemistry*, **52**, 435-451.

Vieira, S.; Trumbore, S.; Camargo, P.; Selhorst, D.; Chambers, J.; Higuchi, N.; Martinelli, L. (2005). Slow growth rates of Amazonian trees: consequences for carbon cycling. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA*, **102**, 18502-18507

Wilske, B.; Cao, K.; Schebeske, G.; Chen, J.; Wang, A.; Kesselmeier, J. (2007). Isoprenoid emissions of trees in a tropical rainforest in Xishuangbanna, SW China. *Atmospheric Environment*, **41**, 3748-3757