

# Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos



**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*



CIENCIAS AMBIENTALES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

**UNIVERSITAS**  
*Miguel Hernández*

Trabajo de Fin de Grado

Autora: Mar López Castell

Tutores: Nuria Galindo Corral y Eduardo Yubero Funes

Grado en Ciencias Ambientales

2021-2022

Departamento de Física Aplicada

Facultad de Ciencias Experimentales

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.



Quiero agradecer a mis tutores, Nuria Galindo y Eduardo Yubero, la ayuda proporcionada a la hora de realizar este trabajo, el tiempo empleado corrigiendo y revisando los manuscritos y sobre todo, quiero agradecerles la enorme paciencia que han tenido conmigo.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

**Resumen:**

El aerosol atmosférico está constituido por una suspensión de partículas sólidas y/o líquidas en el aire. Al conjunto de estas partículas, se le denomina con frecuencia materia particulada (PM). Principalmente existen tres categorías de sacáridos presentes en las partículas atmosféricas: azúcares, polialcoholes y anhidroazúcares. El interés por el estudio de estos azúcares se debe a que pueden utilizarse como marcadores para la identificación de fuentes de aerosoles atmosféricos. La idea principal de este trabajo es establecer cuál es el mejor método para poder medirlos mediante cromatografía iónica.

**Palabras clave:** Aerosol, partículas atmosféricas, sacáridos, tiempos de retención, áreas, anchuras.

**Abstract:**

The atmospheric aerosol is constituted by a suspension of solid and/or liquid particles in the air. All these particles are often called particulate matter (PM). There are mainly three categories of saccharides present in atmospheric particles: sugars, polyalcohols and anhydrosugars. Since they can be used as markers for the identification of sources of atmospheric aerosols there is a particular interest in the study of them. The main idea of this work is to establish the best method to measure them by ion chromatography.

**Keyword:** aerosol, atmospheric particles, saccharides, retention time, areas, width.

## Índice de contenidos

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>1.1. Aerosol atmosférico</b> .....	1
<b>1.2. Fuentes y composición química del aerosol atmosférico</b> .....	1
<b>1.3. Efectos de los aerosoles</b> .....	3
<b>1.4. Azúcares, anhidroazúcares y polialcoholes como trazadores de fuentes de partículas</b> .....	5
<b>1.5. Instrumentación utilizada para el análisis de carbohidratos</b> .....	8
<b>1.6. Análisis de carbohidratos por HPAEC-PAD</b> .....	9
<b>2. Objetivos</b> .....	13
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	14
<b>3.1. Material y equipos</b> .....	14
<b>3.2. Condiciones experimentales</b> .....	17
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	20
<b>4.1. Tiempos de retención</b> .....	20
<b>4.2. Área y anchura de los picos</b> .....	24
<b>5. Conclusiones y proyección futura</b> .....	28
<b>5.1 Conclusiones</b> .....	28
<b>5.2 Proyección futura</b> . .....	29
<b>6. Bibliografía</b> .....	31

## **1. Introducción**

### **1.1. Aerosol atmosférico**

El aerosol atmosférico está constituido por una suspensión de partículas sólidas y/o líquidas en el aire. Con frecuencia, se utiliza el término materia particulada (PM, del inglés Particulate Matter) para hacer referencia al conjunto de estas partículas. La PM puede clasificarse en función de su diámetro aerodinámico equivalente, que se define como el diámetro de una esfera de  $1 \text{ g/cm}^3$  de densidad, que tiene la misma velocidad de caída por acción de la gravedad en aire en calma que la partícula considerada, bajo las mismas condiciones de temperatura, presión y humedad relativa. Así, las partículas con un diámetro superior a  $2,5 \text{ }\mu\text{m}$  se clasifican como gruesas, aquellas con un diámetro menor de  $2,5 \text{ }\mu\text{m}$  como finas, y las de diámetro inferior a  $0,1 \text{ }\mu\text{m}$  como partículas ultrafinas. Las partículas muy pequeñas pueden permanecer suspendidas en la atmósfera durante largos periodos de tiempo, lo que les permite viajar distancias más largas. Estas partículas están asociadas con numerosos efectos sobre la salud ya que pueden alcanzar las partes más internas del sistema respiratorio. Las partículas mayores de  $10 \text{ }\mu\text{m}$ , por el contrario, sedimentan rápidamente y tienen menores efectos sobre la salud puesto que no atraviesan fácilmente las vías respiratorias superiores.

Según la Directiva 1999/30/CE, la Unión Europea define dos fracciones de tamaño (PM<sub>10</sub> y PM<sub>2,5</sub>) asociados a los problemas de salud. Se denomina fracción PM<sub>10</sub> al conjunto de partículas retenidas en un filtro tras pasar a través de un cabezal que las selecciona en función de su tamaño con una eficiencia de corte del 50% para partículas con un diámetro aerodinámico de  $10 \text{ }\mu\text{m}$ . La fracción PM<sub>2,5</sub> puede definirse de manera análoga, pero en este caso el cabezal tiene una eficiencia de corte del 50% para aquellas partículas con un diámetro aerodinámico de  $2,5 \text{ }\mu\text{m}$ . Desde esta perspectiva, las fracciones PM<sub>10</sub> y PM<sub>2,5</sub> hacen referencia a los tamaños de partícula que, una vez inhalados, pueden depositarse en los bronquios o llegar a los alvéolos pulmonares, respectivamente.

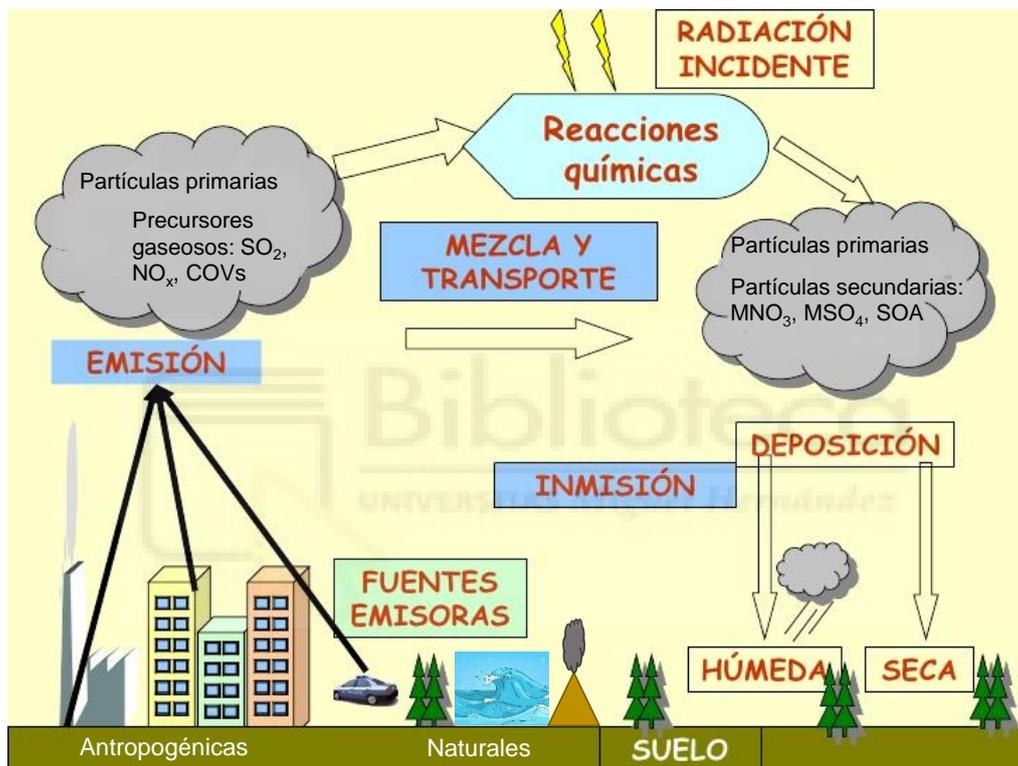
### **1.2. Fuentes y composición química del aerosol atmosférico**

Las partículas atmosféricas se pueden clasificar según su origen en primarias, si son emitidas directamente desde las fuentes, y secundarias, si se forman en la atmósfera por reacciones químicas a partir de precursores gaseosos. Las partículas primarias pueden ser emitidas tanto por fuentes naturales (resuspensión de polvo mineral procedente de la corteza terrestre, aerosol marino, incendios forestales naturales...), como antropogénicas (transporte, actividades industriales, quema de biomasa, producción de energía eléctrica...). Estas partículas están formadas principalmente por elementos marinos ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ...), componentes típicos de la

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

corteza terrestre (Ca, Si, Al, Fe...), compuestos orgánicos, carbono elemental y metales traza (Cu, Zn...).

En cuanto a las partículas secundarias, sus componentes mayoritarios son los nitratos y sulfatos, formados en la atmósfera por la oxidación fotoquímica de óxidos de nitrógeno y dióxido de azufre, respectivamente. También existen compuestos orgánicos secundarios, formados principalmente en procesos de oxidación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles que originan especies de menor volatilidad. La Fig. 1 muestra los procesos de formación y eliminación de partículas.



**Fig. 1.** Origen de las partículas atmosféricas primarias y secundarias. MNO<sub>3</sub> y MSO<sub>4</sub> representan la fórmula general de los nitratos y sulfatos, respectivamente. SOA: Aerosoles orgánicos secundarios.

Sin embargo, el origen de las partículas atmosféricas no solo condiciona su composición química, sino también su tamaño. Así, mientras las partículas primarias naturales, generadas en procesos de disgregación mecánica, presentan diámetros aerodinámicos superiores a 2,5 µm, las fuentes antropogénicas producen tanto partículas mayoritariamente gruesas (resuspensión de polvo de la calzada por el tráfico, desgaste de componentes de los vehículos, como frenos y neumáticos, etc.), como finas (sobre todo partículas de carbono elemental y compuestos orgánicos emitidos en procesos de combustión). Por lo que se refiere al tamaño de las partículas secundarias, éste depende del proceso de formación, aunque una proporción importante de estas partículas presenta diámetros aerodinámicos inferiores a 2,5 µm.

### **1.3. Efectos de los aerosoles**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que la contaminación del aire por materia particulada (PM) provoca aproximadamente 800.000 muertes prematuras cada año y se encuentra en la posición 13 del ranking de causas de mortalidad en el mundo (Anderson, 2011). Se estima que aproximadamente el 3% y el 5% de las muertes por enfermedades cardiopulmonares y cáncer de pulmón, respectivamente, son atribuibles a la materia particulada (WHO, 2013).

Diversos estudios (Kim et al., 2016) han demostrado que la exposición a la PM se asocia con problemas de salud, como enfermedades respiratorias, enfermedades cardiovasculares y disminución de la función pulmonar. Según el estudio realizado por Anderson (2011), la PM causa un empeoramiento de los síntomas respiratorios, un uso más frecuente de medicamentos y un aumento de la mortalidad. Además, desencadena estrés oxidativo pulmonar, y las células epiteliales de las vías respiratorias humanas expuestas a PM expresan citocinas inflamatorias. El estrés oxidativo generado provoca asma, neumonía y enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (Johnston et al., 2014; Yao et al., 2016). La exposición aguda a la PM también provoca cambios en la coagulación y la activación plaquetaria, lo que evidencia la relación entre PM y enfermedades de las arterias coronarias.

En conclusión, los efectos son más pronunciados para las enfermedades cardiovasculares, aunque hay efectos similares, de menor amplitud, en las enfermedades respiratorias. En general, la evidencia disponible sugiere una asociación causal entre la exposición a PM a largo y corto plazo y la morbilidad y mortalidad cardiovascular y respiratoria.

Además de los impactos en la salud, la PM también contribuye de manera importante a la reducción de la visibilidad. La visibilidad puede verse reducida por los niveles de partículas que producen diversas intensidades de turbidez. Las partículas finas de sulfato y nitrato son en gran parte responsables de esta reducción. También contribuyen a la reducción de la visibilidad los incendios forestales o fenómenos naturales como las tormentas de polvo que arrastran grandes cantidades de partículas y pueden llegar a producir accidentes aéreos. Por otro lado, la quema de biomasa es una fuente importante de contaminación del aire que también contribuye a la reducción de la visibilidad, pudiendo ocasionar graves problemas (Lee et al., 2017; Vallero, 2008). Los aerosoles emitidos por la quema de biomasa causan niebla en ubicaciones situadas a sotavento del lugar donde se produce la combustión (Koe et al., 2001; Heil et al., 2007; See et al., 2006), disminuyendo la visibilidad y amenazando la salud humana (Emmanuel, 2000; Kunii et al., 2002; Johnston et al., 2012; Mauderly and Chow, 2008; Crippa et al., 2016). Además de causar problemas en la calidad del aire, los aerosoles derivados de la quema de biomasa contienen

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

compuestos ricos en carbono, como el carbono negro (black carbon, BC) (Fujii et al., 2014), que pueden reducir la luz solar mediante procesos de absorción y dispersión.

El aerosol atmosférico también puede tener efectos sobre el clima. Las partículas presentes en la atmósfera pueden alterar de manera directa el balance radiativo del planeta, ya que son capaces de absorber y dispersar la radiación solar. Además, las partículas atmosféricas pueden influir indirectamente en el clima pues actúan como núcleos de condensación de nubes, cambiando sus propiedades físicas y ópticas (Grunthe et al., 2009; Koren et al., 2004; Roberts et al., 2002). Los efectos indirectos de los aerosoles sobre el clima son aún más complicados debido a los diversos tipos de nubes y condiciones meteorológicas en los océanos. (Sekiguchi et al., 2003; Lin et al., 2013; Wu et al., 2013; Grandey et al., 2016).

Por otra parte, las partículas pueden ser transportadas largas distancias y servir como vehículos a otros contaminantes ocasionando graves daños en los ecosistemas, ya que mediante mecanismos de transporte y precipitación los contaminantes se acumulan en el agua, en el suelo y en las plantas. Los efectos que se han observado en los ecosistemas terrestres son reducción de la fotosíntesis, cambios en la salinidad del suelo, pérdida de los minerales del suelo, alteración de los ciclos biogeoquímicos y reducción del crecimiento de las plantas, entre otros. Muchos de los efectos más importantes que tienen las partículas se presentan precisamente en el suelo, ya que alteran los procesos de flujo de energía y el ciclo de nutrientes, cambian la estructura del ecosistema, y afectan a su biodiversidad. La precipitación de partículas también ocasiona graves daños en los ecosistemas acuáticos puesto que contribuye a la acumulación de metales pesados. Además, las partículas juegan un importante papel en la lluvia ácida ocasionando daños a la vegetación, al suelo y especialmente al agua, ya que provocan la acidificación de los sistemas acuáticos (Vallero et al., 2008)

Así mismo, los aerosoles también afectan a los materiales de edificios y construcciones, provocando daños físicos y modificando su apariencia estética. Las partículas que se depositan en las superficies de los edificios y construcciones causan el ensuciamiento de los materiales de construcción y los monumentos históricos. Compuestos de la PM, especialmente el carbono orgánico y el carbono elemental, pueden promover reacciones químicas que deterioran los materiales y contribuyen al ennegrecimiento de los mismos. Otro aspecto importante es que las partículas depositadas sirven como fuente de crecimiento para colonias de microorganismos y afectan a diversos metales contribuyendo a su corrosión (Ghedini et al., 2000).

#### **1.4. Azúcares, anhidroazúcares y polialcoholes como trazadores de fuentes de partículas**

Investigaciones recientes han revelado que, además de numerosos compuestos orgánicos de baja polaridad, los compuestos que pertenecen a diversas clases de carbohidratos son componentes importantes del aerosol atmosférico ambiental. Los sacáridos son una clase principal de compuestos orgánicos que pueden representar entre un 0,7 y un 11% del carbono orgánico soluble en agua presente en las partículas atmosféricas (Nouara et al., 2019). El interés por el estudio de los compuestos orgánicos hidrosolubles, incluyendo los sacáridos, se debe a que pueden alterar las propiedades higroscópicas de las partículas y actúan como núcleos de condensación de nubes (Chan et al., 2008; Rosenørn et al., 2006; Tang et al., 2016; Taylor et al., 2017; Xiang et al., 2017). Además, se pueden utilizar como marcadores para la identificación de fuentes de aerosoles atmosféricos (Simoneit et al., 2004).

Los carbohidratos presentes en las partículas atmosféricas se originan a partir de diferentes tipos de fuentes. Principalmente existen tres categorías de sacáridos en la atmósfera: azúcares, polialcoholes y anhidroazúcares.

Los anhidroazúcares son los principales productos de la degradación térmica de los polisacáridos estructurales presentes en la biomasa. Dentro de este grupo, el levoglucosano deriva de la pirólisis de la celulosa, mientras que el galactosano y el manosano derivan de la pirólisis de la hemicelulosa (Simoneit et al., 1999). Algunos estudios muestran que la combustión de carbón también puede ser una fuente de levoglucosano (Fabbri et al., 2009; Yan et al., 2018). Los anhidroazúcares, especialmente el levoglucosano, son buenos trazadores de las fuentes de la quema de biomasa debido a su estabilidad atmosférica (Fraser y Lakshmanan, 2000; Simoneit et al., 1999).

Los azúcares primarios incluyen los monosacáridos glucosa, fructosa y xilosa, además de disacáridos como la sacarosa (Medeiros et al., 2006). Estos compuestos son emitidos en su gran mayoría por microorganismos, plantas y animales y, en menor medida, por hongos y por la quema de biomasa. La sacarosa ha sido considerada como marcador del polen, porque es el azúcar dominante en el floema de las plantas. Por otro lado, la glucosa es un carbohidrato soluble que se encuentra en la corteza de los árboles y en las hojas de las plantas. Los monosacáridos primarios surgen del carbono asimilado fotosintéticamente en plantas vasculares y son una fuente importante de carbono para otros organismos vivos.

Los hongos, líquenes y las bacterias producen polialcoholes, también conocidos como azúcares alcohólicos o alditoles, tales como el arabitol, manitol y sorbitol. Dentro de este grupo, los dos polialcoholes que han sido ampliamente estudiados son el arabitol y el manitol, ya que pueden ser utilizados para identificar la presencia de esporas de hongos en el aire y estimar su

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

contribución a la masa de partículas de aerosoles atmosféricos (Bauer et al., 2008; Gosselin et al., 2016). La Tabla 1 proporciona una lista de los sacáridos más importantes encontrados en aerosoles atmosféricos y sus fuentes más comunes.

La quema de biomasa es una fuente importante de contaminación del aire a escala local y global, teniendo efectos variables en la calidad del aire, en la salud humana y en el sistema climático. Por lo tanto, la identificación y caracterización de las fuentes de los aerosoles derivados de la quema de biomasa en el medio ambiente es crucial. Este fenómeno incluye incendios forestales, tala y quema de tierras forestales para uso agrícola, quema de residuos agrícolas y quema residencial de leña para cocinar y calentar.

Varios marcadores químicos, como el potasio soluble ( $K^+$ ) y los anhidroazúcares, han sido usados extensivamente para evaluar la contribución de la quema de biomasa a los niveles de aerosoles atmosféricos. Sin embargo, se ha demostrado que el potasio ( $K^+$ ) no sólo es emitido por la combustión de biomasa, sino que puede verse afectado por otras fuentes como los fuegos artificiales, resuspensión mineral del suelo, aerosol marino, quema de carbón, utilización de fertilizantes en agricultura, etc., lo que puede confundir la interpretación de los resultados (Cheng et al., 2013; Zhu et al., 2015). Debido a esto, varios marcadores moleculares orgánicos, como el levoglucosano y sus isómeros (manosano y galactosano), han sido reconocidos en los últimos años como trazadores más adecuados de esta fuente (Chen et al., 2018; Engling et al., 2009; Giannoni et al., 2012; Wan et al., 2017).

La aplicabilidad de cualquier trazador químico depende en gran medida de su estabilidad, es decir, de la reactividad química en el medio, y un trazador ideal debe ser químicamente inerte. Entre los anhidroazúcares mencionados, el levoglucosano resulta el más idóneo debido a su alta abundancia y mayor estabilidad en diferentes condiciones ambientales. De hecho, estudios previos han demostrado que el levoglucosano puede permanecer estable en la atmósfera aproximadamente diez días sin degradarse (Bhattarai et al., 2019). El principal mecanismo de eliminación del levoglucosano atmosférico es su oxidación con radicales hidroxilo (OH). Su tiempo de permanencia no sólo depende de las concentraciones de radicales OH, sino también de otros parámetros ambientales, como la temperatura o la humedad relativa. La vida media del levoglucosano aumenta al disminuir la temperatura e incrementarse la humedad relativa, ya que disminuye su velocidad de degradación (Hoffman et al., 2009; Lai et al., 2014).

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

**Tabla 1.** Carbohidratos habitualmente encontrados en aerosoles atmosféricos y sus fuentes (Caseiro et al., 2007).

Compuesto	Estructura	Fuente
<b>Azúcares</b>		
Glucosa		Hongos, líquenes, biota del suelo, quema de biomasa
Fructosa		Líquenes, biota del suelo
Sacarosa		Plantas, biota del suelo
<b>Anhidroazúcares</b>		
Levoglucosano (1,6-anhidro-β-D-glucopiranos)		Quema de biomasa
Manosano (1,6-anhidro-β-D-manopiranos)		Quema de biomasa
Galactosano (1,6-anhidro-β-D-galactopiranos)		Quema de biomasa
<b>Polialcoholes</b>		
Arabitol		Hongos, Líquenes
Xilitol		Maderas duras, biota del suelo
Manitol		Esporas, hongos, líquenes, biota del suelo
Sorbitol		Bacterias, líquenes, biota del suelo

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

La abundancia relativa de levoglucosano, galactosano y manosano en el humo procedente de la combustión de biomasa se ve significativamente afectada por el tipo de biomasa o biocombustible y por las condiciones de combustión. Por este motivo, los ratios entre las concentraciones máxicas de levoglucosano y sus isómeros se han utilizado en numerosos estudios para identificar el tipo de biomasa quemada (Maenhaut et al., 2012; Mkoma et al., 2013). Así, por ejemplo, se ha encontrado que los ratios Levoglucosano/Manosano producidos por la quema de maderas duras, como roble o arce (14–23,4), son muy superiores a los obtenidos cuando se queman maderas blandas, como las de especies coníferas (2,5–6,7) (Fine et al., 2004; Schmidl et al., 2008)

### **1.5. Instrumentación utilizada para el análisis de carbohidratos**

Se han hecho progresos significativos en los últimos años en lo que se refiere a los métodos de detección y cuantificación de azúcares, polialcoholes y anhidroazúcares en aerosoles, suelos, sedimentos, nieve y núcleos de hielo. Las técnicas más comúnmente utilizadas son cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector de aerosol cargado y cromatografía iónica de alta resolución con amperometría pulsada (HPAEC-PAD) (Janoszka y Czaplicka, 2019).

Las características químicas de los carbohidratos, como su polaridad y su falta de cromóforos, hacen que muchos métodos analíticos sean inefectivos o requieran un gran tiempo de preparación de muestras previo al análisis. La técnica más común y tradicional para la detección y cuantificación de estos compuestos es la cromatografía de gases acoplada con detección por espectrometría de masas (GC-MS), la cual tiene una buena resolución y sensibilidad cromatográfica. El proceso completo de este método implica la extracción con un disolvente orgánico (como metanol o diclorometano), eliminación del disolvente por evaporación a vacío, y derivatización de los compuestos antes del análisis debido a su carácter no volátil (Maenhaut et al., 2012; Wan et al., 2017). Por tanto, se trata de un método largo, laborioso y caro en cuanto a la preparación de muestras. Recientemente, se ha aplicado el método de desorción térmica acoplada con cromatografía de gases-espectrometría de masas (TD-GC-MS), que permite la derivatización *in situ*. Esta técnica reduce el tiempo de análisis, con la ventaja de que elimina el consumo de disolventes orgánicos (Sheesley et al., 2015).

La cromatografía líquida de alta resolución combinada con espectrometría de masas (HPLC-MS) o con detector de aerosol cargado se ha desarrollado y utilizado para la detección de carbohidratos (Janoszka y Czaplicka, 2019; Piot et al., 2012; Yttri et al., 2005). Este método no requiere ninguna derivatización y, por lo tanto, el tiempo de análisis es más corto que el requerido por el método tradicional (GC-MS). Además, esta técnica puede ser usada para la detección de niveles

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

extremadamente bajos de levoglucosano, del orden de  $\text{pg/m}^3$ . Por ejemplo, Zangrando et al. (2016) y Gambaro et al. (2008) determinaron niveles de levoglucosano de hasta  $4,1 \text{ pg/m}^3$  en aerosoles antárticos utilizando HPLC acoplada con espectrometría de masas con ionización por electroespray (HPLC-ESI/MS).

Sin embargo, en la actualidad, la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD) se ha convertido en la técnica cromatográfica más empleada para el análisis de carbohidratos. Esta técnica se describe con detalle en la siguiente sección.

### **1.6. Análisis de carbohidratos por HPAEC-PAD**

La cromatografía de intercambio iónico es una técnica que permite la separación de iones y moléculas polares basada en las propiedades de carga de las moléculas. La separación se produce gracias a los procesos de intercambio iónico que se establecen entre la fase móvil y los grupos de intercambio unidos al material de soporte que se encuentra dentro de la columna. La fase estacionaria consiste generalmente en una resina de poliestireno copolimerizado con divinilbenceno y modificada con grupos de intercambio iónico ácidos o básicos, dependiendo de si lo que se pretende separar son cationes o aniones, respectivamente. Cuando una muestra iónica atraviesa la columna analítica, los iones presentes se separan al interactuar con la fase estacionaria situada en su interior. Una vez separada, la muestra pasa a través de un detector, generalmente conductimétrico, donde se registra la señal. La concentración de los compuestos analizados se determina estableciendo una relación entre la concentración de una disolución conocida y la señal medida por el detector.

A principios de los años 80 se desarrolló una nueva metodología que permitió la aplicación de la cromatografía iónica al análisis de carbohidratos. Esta técnica fue el resultado de combinar la cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC) y la detección amperométrica pulsada (PAD). Se trata de un método que posee un amplio rango dinámico, límites de detección muy bajos (del orden de picomol) y una alta especificidad para carbohidratos (Cataldi et al., 2000). Por ello, este sistema se ha optimizado para detectar sacáridos en aerosoles, entre ellos marcadores específicos de la quema de biomasa como el levoglucosano, manosano y galactosano. Además, el uso de esta técnica para el análisis de carbohidratos en partículas atmosféricas tiene muchas ventajas sobre otros métodos, ya que el proceso de extracción acuosa es sencillo, no tóxico y no requiere etapas de evaporación/concentración y derivatización. Por todo ello, la preparación de muestras y el análisis mediante esta técnica es mucho más simple y menos cara que el análisis por medio de GC/MS.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

La HPAEC-PAD es una técnica muy selectiva y específica para azúcares por varias razones. En primer lugar, detecta solo aquellos compuestos que contienen grupos funcionales que son oxidables con el voltaje de detección empleado (en este caso, la sensibilidad para los carbohidratos es de órdenes de magnitud mayores que para otras clases de compuestos). Por otra parte, los componentes de la muestra neutros o catiónicos eluyen en el volumen vacío de la columna. Por lo tanto, incluso si tales especies son oxidables, generalmente no interfieren con el análisis de los carbohidratos de interés.

Es importante tener en cuenta que los carbohidratos son moléculas relativamente grandes y que, en muchos casos, presentan estructuras muy similares, por lo que su análisis requiere el uso de columnas de intercambio aniónico de alta capacidad. Generalmente, las columnas diseñadas para el análisis de carbohidratos consisten en una resina polimérica (normalmente divinilbenceno copolimerizado con poliestireno o etilvinilbenceno) funcionalizada con una amina cuaternaria. En cuanto a la fase móvil, se ha demostrado que el hidróxido de sodio es un eluyente adecuado en rangos de concentración que oscilan habitualmente entre 1 y 150 mM. Los iones hidroxilo cumplen dos funciones; por una parte, actúan como eluyente y, por otra, determinan el pH de la fase móvil (Weiss et al., 2016).

Para entender los mecanismos de intercambio iónico es necesario hacer referencia al concepto de pKa. El pKa es una magnitud que refleja la capacidad de disociación ácida de las moléculas en una solución acuosa. Un ácido será más fuerte cuanto menor es su pKa y una base es más fuerte cuanto mayor es su pKa. Los valores de pKa de los monosacáridos neutros (Tabla 2) muestran que los carbohidratos son ácidos débiles.

A pH alto estas moléculas están parcialmente ionizadas y, por lo tanto, pueden separarse mediante mecanismos de intercambio iónico. Es decir, la HPAEC aprovecha la naturaleza débilmente ácida de los carbohidratos para proporcionar separaciones altamente selectivas a pH alto utilizando una fase estacionaria de intercambio aniónico fuertemente básica.

**Tabla 2.** Constantes de disociación de algunos carbohidratos comunes en agua a 25° (Rohrer, 2004).

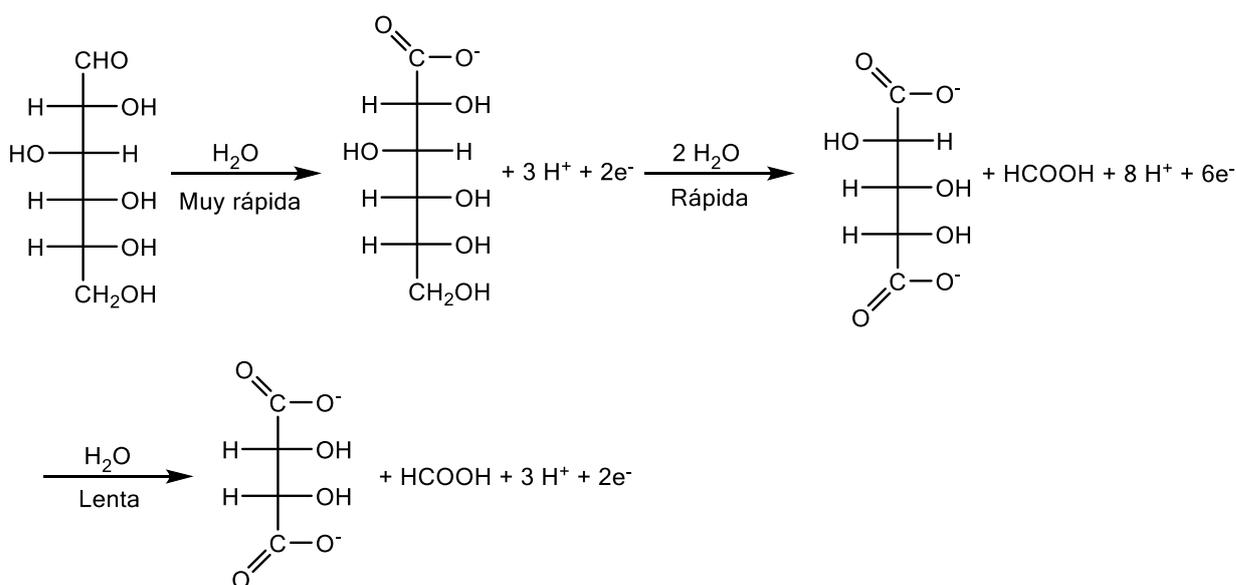
Compuesto	pKa
Fructosa	12,03
Manosa	12,08
Glucosa	12,28
Galactosa	12,39
Sorbitol	13,60

Por lo que se refiere a la detección amperométrica, esta se utiliza generalmente para el análisis de compuestos con valores de pKa por encima de 7 que, debido a su baja disociación, no se pueden

detectar por conductimetría. La técnica mide la corriente eléctrica generada cuando el analito es oxidado o reducido en el interior de una célula amperométrica, que consta de un electrodo de trabajo, un electrodo de referencia, y un electrodo auxiliar o contraelectrodo. La oxidación o reducción de los iones dependerá de la aplicación de un potencial entre el electrodo de trabajo y el electrodo auxiliar. Cuando una especie electroactiva pasa a través del detector, es parcialmente oxidada o reducida. Esta reacción produce una corriente que es proporcional a la concentración de analito y que puede ser representada como una señal cromatográfica (Weiss, 2016). La amperometría es una técnica de detección muy selectiva, ya que solo ciertos compuestos son capaces de sufrir reacciones redox bajo determinadas condiciones de pH y a un voltaje específico.

La detección amperométrica requiere que los productos de la oxidación o reducción de los analitos no precipiten sobre el electrodo de trabajo ya que, si la superficie del electrodo se contamina, la respuesta del detector se reduce. Este comportamiento es particularmente pronunciado en el caso de carbohidratos. Por tanto, para que la detección sea reproducible, es necesario mantener limpia y reactiva la superficie del electrodo de trabajo. En la detección amperométrica de pulsos (PAD), esto se consigue mediante la aplicación de una secuencia repetitiva de diferentes potenciales de trabajo (Islam et al., 2019).

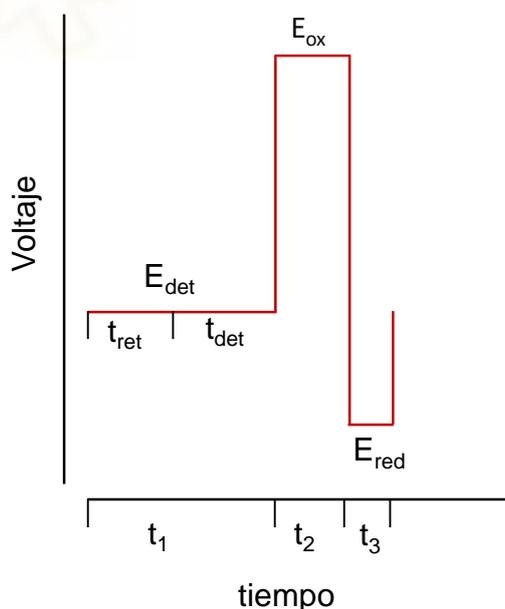
Para la detección de carbohidratos mediante esta técnica, se utiliza un electrodo de trabajo de oro. Los azúcares se oxidan en la superficie de este electrodo mediante la aplicación de un potencial positivo. Se ha propuesto que la oxidación de estos compuestos a pH básico es un proceso secuencial, tal y como se muestra en la Fig. 2 para la glucosa (Weiss, 2016). La corriente generada entre el electrodo de oro y el contraelectrodo es proporcional a la concentración de carbohidratos y, por lo tanto, estos se pueden detectar y cuantificar.



**Fig. 2.** Mecanismo de reacción para la oxidación de la glucosa sobre un electrodo de oro en condiciones alcalinas.

Como se ha comentado anteriormente, si se aplica un potencial constante al electrodo, los productos de oxidación ensucian gradualmente su superficie, lo que produce una pérdida de señal del analito. Para evitar la pérdida de señal, la superficie del electrodo se limpia mediante la aplicación de una serie de potenciales durante períodos de tiempo fijos después del potencial de detección. Al conjunto de potenciales aplicados se le denomina forma de onda (waveform). Los potenciales restantes limpian y restauran el electrodo para su posterior detección. Los valores óptimos para todos los parámetros de la forma de onda están determinados por la variación sistemática de un parámetro mientras se mantienen constantes los otros parámetros.

La PAD emplea una secuencia repetitiva de al menos tres potenciales (Corradini et al., 2012). La Fig. 3 muestra una waveform genérica de triple pulso diseñada para la detección de carbohidratos. La detección ocurre a un potencial constante  $E_1$ , que se aplica durante un tiempo  $t_1$ . La integración electrónica de la corriente se realiza durante el periodo  $t_{det}$ , tras un tiempo de retardo  $t_{ret}$  para permitir que la corriente resultante del cambio de potencial desde  $E_3$  al potencial inicial  $E_1$  decaiga a un valor casi nulo ( $t_1 = t_{ret} + t_{det}$ ). A continuación, el potencial del electrodo aumenta desde  $E_1$  a  $E_2$  (con  $E_2 \gg E_1$ ) durante un tiempo  $t_2$  para oxidar completamente las impurezas adsorbidas. Esta etapa de oxidación genera la formación de una fina capa de óxido en la superficie del electrodo. La aplicación sobre el electrodo de un voltaje fuertemente reductor ( $E_3 \ll E_1$ ) durante un periodo  $t_3$  convierte el óxido metálico de nuevo al metal noble, renovando la superficie del electrodo.



**Fig. 3.** Waveform cualitativa donde  $E_{det}$  es el potencial constante  $E_1$  aplicado durante un tiempo  $t_1$ ,  $E_{ox}$  representa el potencial  $E_2$  (oxidación completa en el electrodo de trabajo de oro) aplicado durante un tiempo  $t_2$  y  $E_{red}$  es el potencial negativo  $E_3$  aplicado durante un tiempo  $t_3$  para transformar el óxido metálico de nuevo en el metal noble.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

## **2. Objetivos**

El objetivo de este trabajo es establecer las condiciones de análisis más adecuadas para la determinación de sacáridos (azúcares, polialcoholes y anhidroazúcares) presentes en la materia particulada atmosférica mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución acoplada con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). Para ello, se evaluará el efecto de la concentración de KOH de la fase móvil sobre el tiempo de retención y la señal analítica de los compuestos estudiados. Las condiciones experimentales más idóneas serán aquellas que permitan analizar los compuestos de interés en el menor tiempo posible.

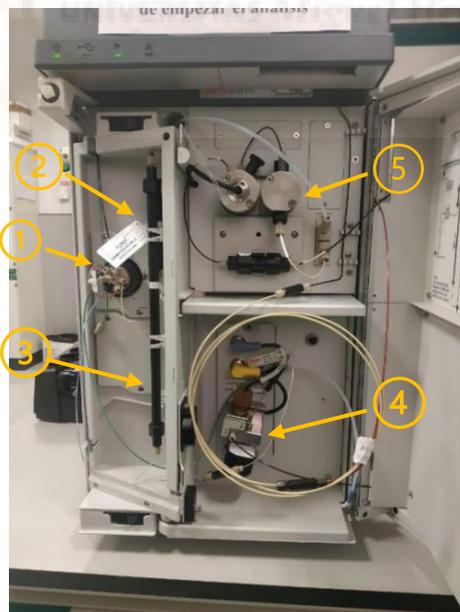


### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Material y equipos

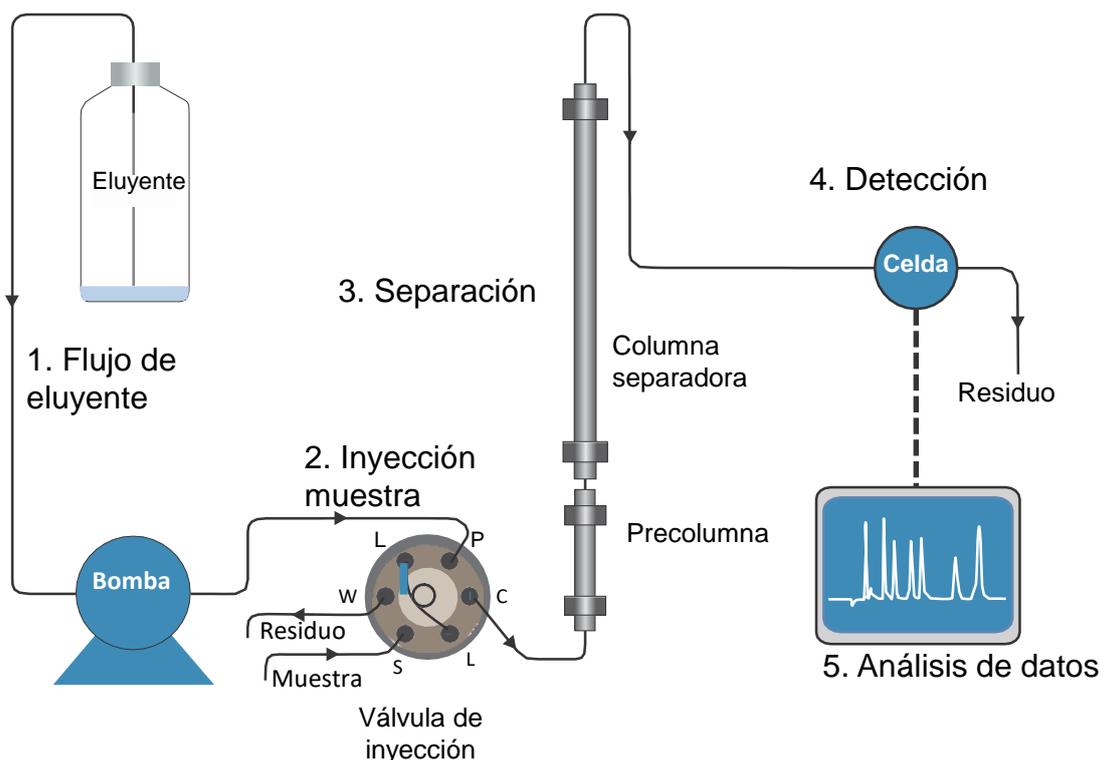
El material empleado durante este estudio para el análisis de carbohidratos se describe a continuación:

- *Patrones*: se prepararon dos patrones acuosos a partir de los compuestos puros comercialmente asequibles con calidad para análisis. El primero contenía únicamente arabitol con una concentración de 1 ppm. El segundo patrón, también con una concentración de 1 ppm, fue preparado a partir de glicerol, xilitol, fructosa, glucosa, sorbitol, manosano, galactosano y levoglucosano. El patrón de arabitol se preparó por separado debido a que este compuesto coeluye con el levoglucosano (es decir, tienen el mismo tiempo de retención). Para realizar todos los ensayos se utilizaron las mismas disoluciones de manera que los resultados no se vieran afectados por la variabilidad en la preparación de los patrones. Después de cada prueba, los patrones se almacenaron en la nevera para una mejor conservación y posterior uso.
- *Cromatógrafo iónico de alta resolución con detector amperométrico*: el análisis de carbohidratos se llevó a cabo por medio de un cromatógrafo Thermo Scientific Dionex™ Integrion con detector amperométrico (Fig. 4), acoplado con un generador de eluyente. El proceso analítico se describe en la Fig. 5.



**Fig. 4.** Cromatógrafo Thermo Fisher Scientific, modelo Dionex™. En la figura 4 se muestra: 1 válvula de inyección. 2 columna de separación. 3 precolumna. 4 detector. 5 bomba.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

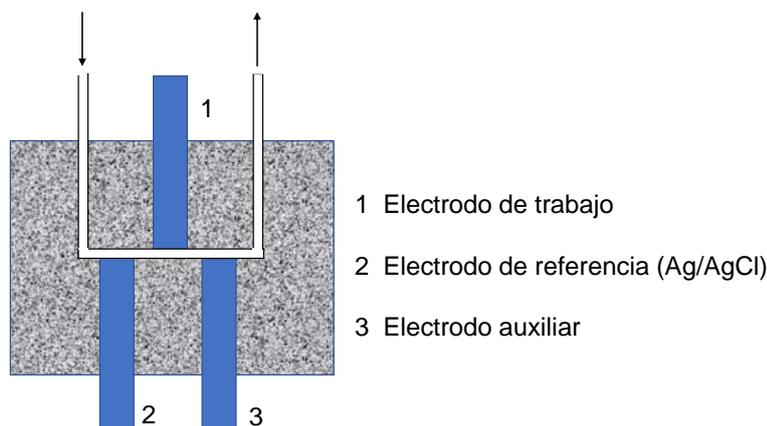


1. La bomba transporta el eluyente a través del sistema cromatográfico.
2. La muestra se carga en la válvula de inyección manualmente o con ayuda de un automuestreador. La bomba introduce el eluyente y la muestra en la columna. La precolumna elimina contaminantes que puedan deteriorar la columna.
3. A medida que el eluyente transporta la muestra a través de la columna los analitos son separados.
4. El detector amperométrico mide la corriente resultante de la oxidación o reducción de los componentes de la muestra.
5. El sistema de análisis de datos identifica los analitos en base a sus tiempos de retención y cuantifica cada uno de ellos integrando el área del pico.

**Fig. 5.** Proceso de análisis por cromatografía iónica.

El detector consiste en una celda de detección amperométrica con un diseño de capa fina formada por tres electrodos (Fig. 6): un electrodo de trabajo de oro, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar. El potencial de oxidación o reducción se aplica entre el electrodo de trabajo y el de referencia, mientras que la corriente generada por la reacción electroquímica fluirá desde el electrodo de trabajo hasta el electrodo auxiliar o contraelectrodo. En este caso, la celda electroquímica ED40 es una celda de flujo en miniatura con cuerpo de titanio (contraelectrodo) y un electrodo combinado de pH como electrodo de referencia. El electrodo combinado de pH integra en un solo cuerpo un electrodo de vidrio y un electrodo de referencia Ag/AgCl. Este electrodo monitoriza el pH del eluyente, mientras que la celda de Ag/AgCl actúa como electrodo de referencia.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.



**Fig. 6.** Esquema de la celda amperométrica.

Se utilizó un generador de eluyente de la marca Thermo Fisher Scientific, modelo Dionex™ RFC-30 Reagent-Free™ Controllers, con un cartucho generador de hidróxido de potasio (Dionex EGC III) que permite la producción de disoluciones de KOH de alta pureza con concentraciones máximas de 100 mM a partir de agua ultrapura. Este sistema aumenta la estabilidad inicial, la sensibilidad y la reproducibilidad de las medidas y, además, permite la elución en gradiente. La Fig. 7 ilustra el principio de operación del generador de eluyente con cartucho de KOH. El cartucho consiste en una cámara de generación de eluyente de alta presión y un depósito de electrolito iónico de  $K^+$  de baja presión. La cámara de generación de eluyente contiene un cátodo de platino perforado donde se forman los iones hidroxilo. El depósito de electrolito contiene un ánodo de platino y una disolución de ion  $K^+$ . La cámara de generación de eluyente está conectada al depósito de electrolito mediante un intercambiador de cationes que permite únicamente el paso de cationes del depósito de electrolito a la cámara de alta presión. Para generar el eluyente de KOH, el agua desionizada es bombeada a través de la cámara de generación de eluyente y se aplica una corriente continua entre el ánodo y el cátodo. Así, se produce la electrolisis del agua tanto en el ánodo como en el cátodo del dispositivo. Tal y como se muestra en la Fig. 7, el agua se oxida en el cátodo formando protones y se reduce en el ánodo generando aniones hidroxilo. A medida que se generan iones  $H^+$ , estos desplazan a los cationes  $K^+$  en el depósito de electrolito, los cuales migran a la cámara de generación de eluyente a través del conector de intercambio catiónico. Estos iones se combinan con los aniones  $OH^-$  generados en el cátodo para producir KOH. La concentración de KOH del eluyente está determinada por la corriente aplicada en el generador y por el flujo de agua que atraviesa la cámara de generación. Por tanto, una vez fijado el flujo de agua, el módulo controla la corriente aplicada para producir de forma precisa y reproducible la concentración de KOH deseada.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

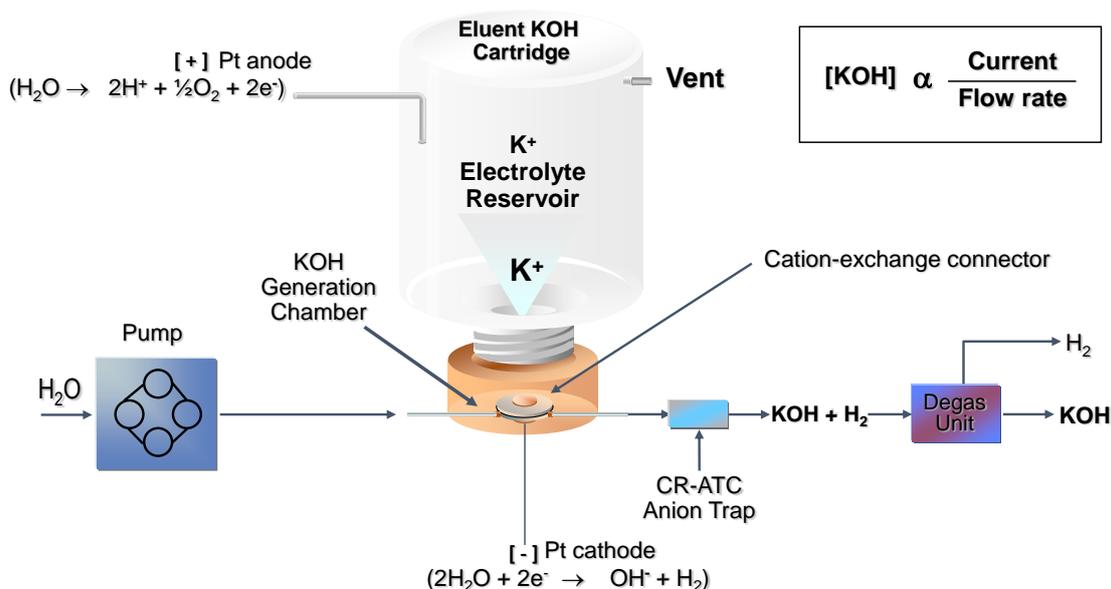


Fig. 7. Generación de eluyente de KOH.

La columna utilizada para la separación de carbohidratos fue la CarboPac PA10 (4 x 250 mm), especialmente diseñada para el análisis de monosacáridos. Esta columna de intercambio iónico está empaquetada con un sólido granular de 10 µm de diámetro (formado por etilvinilbenceno entrecruzado al 55% con divinilbenceno) aglomerado con una resina MicroBead™ funcionalizada con una amina cuaternaria.

Las muestras se inyectaron automáticamente en el sistema cromatográfico mediante un automuestreador de la marca Thermo Scientific Dionex, modelo AS-DV (Fig. 8).

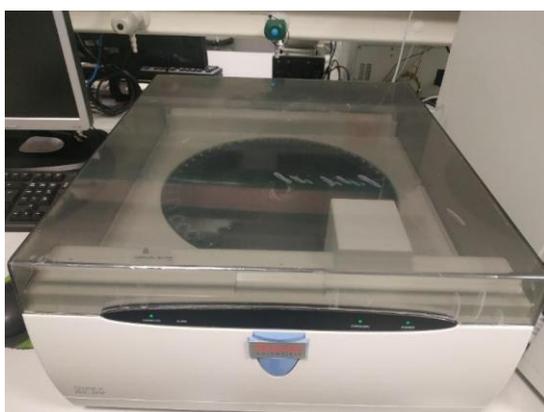


Fig. 8. Automuestreador Dionex modelo AS-DV.

### 3.2. Condiciones experimentales

Se utilizaron diferentes protocolos de análisis con el objetivo de conseguir la mejor separación de los analitos en el menor tiempo posible, manteniendo la reproducibilidad de las medidas. Por otro lado, y teniendo en cuenta que el pH puede afectar a la detección de los compuestos analizados,

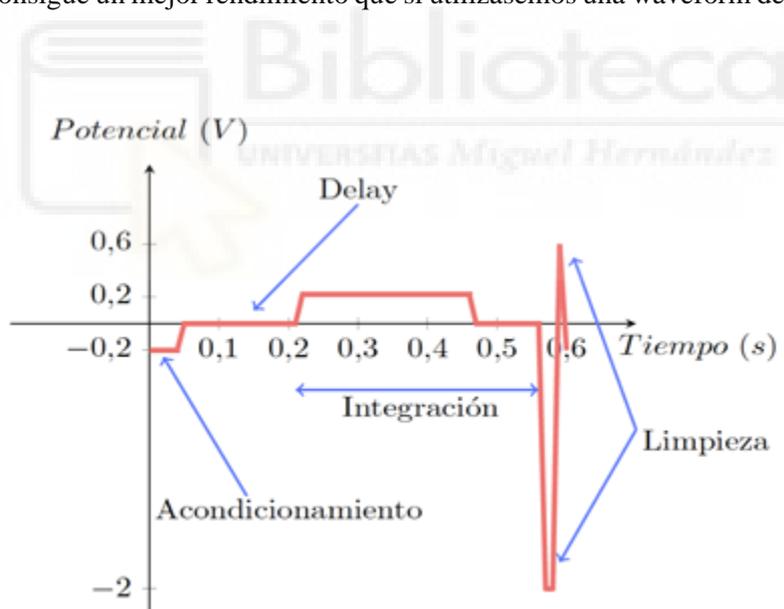
Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

se estudió la variación del área de los picos en función de la concentración de KOH del eluyente. El volumen de inyección fue en todos los casos de 25  $\mu\text{L}$ .

Los dos patrones de azúcares se analizaron por triplicado empleando distintos métodos. Las condiciones experimentales sujetas a variación en cada uno de ellos fueron las siguientes:

- La concentración inicial de KOH de la fase móvil o eluyente.
- La aplicación o no de un pico de concentración de KOH 100 mM tras la salida de la columna de los carbohidratos con menor tiempo de retención. En los primeros ensayos realizados se determinó que los tiempos de retención de glucosa y fructosa son muy superiores a los del resto de analitos, lo que afecta no solo al tiempo total de análisis de cada muestra, sino a la anchura de los picos. Por tanto, la aplicación del gradiente rápido de KOH 100 mM tenía como principal objetivo reducir dichos tiempos.
- El tiempo total de análisis.

Se utilizó una waveform de seis potenciales (Fig.9) que proporciona una señal de respuesta y una sensibilidad mayor que otros tipos de waveform. Respecto a la reproducibilidad, utilizando esta waveform se consigue un mejor rendimiento que si utilizásemos una waveform de tres o de cuatro potenciales.



**Fig. 9.** Waveform de seis potenciales. En esta waveform los potenciales tienen una duración menor, evitando así el desgaste del electrodo de oro.

Para cada una de las 6 concentraciones iniciales de KOH utilizadas se llevó a cabo el análisis isocrático de los patrones (es decir, manteniendo la misma concentración de fase móvil durante todo el proceso de elución). Además, se utilizaron protocolos de análisis en los que se aplicó un pico de concentración de KOH 100 mM a partir del minuto 10 con una duración de entre 1 y 4 minutos. El objetivo de la aplicación de este gradiente fue la de reducir los tiempos de retención

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

de los analitos que tardan más tiempo en recorrer la columna cromatográfica. Tras la aplicación de este pico, se volvió al valor inicial de concentración de KOH empleada en cada caso. Durante los últimos 14 minutos de cada análisis, se realizó una limpieza con KOH 100 mM durante 7 minutos (diferente al pico anterior), seguida de estabilización a la concentración inicial de KOH durante 7 minutos más. En la Tabla 3 se resumen las condiciones experimentales de los diferentes protocolos de análisis utilizados. Como se observa en la tabla, una reducción de la concentración del eluyente lleva asociada necesariamente un aumento del tiempo total del cromatograma para poder visualizar todos los analitos.

**Tabla 3.** Condiciones experimentales de los métodos de análisis empleados. \*Un tiempo de 0 min en este caso indica que el análisis se realizó en la modalidad isocrática; es decir, sin la introducción del pico intermedio.

Método	[KOH] <sub>inicial</sub> (mmol/L)	Duración del pico intermedio de KOH 100 mM (min)*	Tiempo total (min)
1	0,5	0	94
2	0,5	2	74
3	0,5	3	70
4	0,5	4	70
5	5	0	69
6	5	1	66
7	5	2	59
8	5	3	54
9	5	4	49
10	10	0	59
11	10	1	56
12	10	2	54
13	10	3	50
14	18	0	54
15	18	1	49
16	18	2	47
17	30	0	44
18	30	1	40
19	30	2	38
20	40	0	37
21	40	1	35

## **4. Resultados y discusión**

En este apartado se estudiará la influencia de las condiciones analíticas sobre los tiempos de retención y los valores de las áreas y anchuras de los picos de los compuestos de interés.

### **4.1. Tiempos de retención**

En cromatografía, el tiempo de retención de un compuesto se define como el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra y la aparición de la respuesta máxima, y es un parámetro clave en este tipo de análisis ya que permite identificar los componentes analizados. El valor de los tiempos de retención de los analitos condiciona, por un lado, el tiempo total requerido para cada análisis y, por otro, la resolución (es decir, la separación de dos componentes en una mezcla). En cromatografía iónica los tiempos de retención dependen, además del tipo de columna utilizada y del caudal de la fase móvil o eluyente, de la concentración de dicho eluyente. Así, es esperable que cuanto mayor sea la concentración de KOH de la fase móvil menores sean los tiempos de retención de los compuestos analizados. El aumento de la concentración del eluyente puede permitir, por tanto, reducir el tiempo total de análisis y la anchura de los picos ya que, cuanto mayor sea el tiempo de permanencia de un compuesto en la columna, más ancho será el pico representado en el cromatograma. Esto permitiría tener los picos de los analitos mucho más definidos; sin embargo, si la concentración de KOH es muy elevada se podría dificultar la separación de compuestos con tiempos de retención similares.

Los primeros ensayos se realizaron en modalidad isocrática utilizando como eluyente una disolución de KOH 0,5 mM (Fig. 10). Como puede observarse en el cromatograma, el tiempo de análisis requerido fue elevado y no se registró el pico correspondiente a la fructosa, probablemente debido a que en estas condiciones su tiempo de retención es muy elevado, lo que tiene como consecuencia un aumento de la anchura del mismo y que sea más dificultosa su identificación. También cabe la posibilidad de que la detección de la fructosa no pudiera llevarse a cabo adecuadamente al pH de trabajo.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

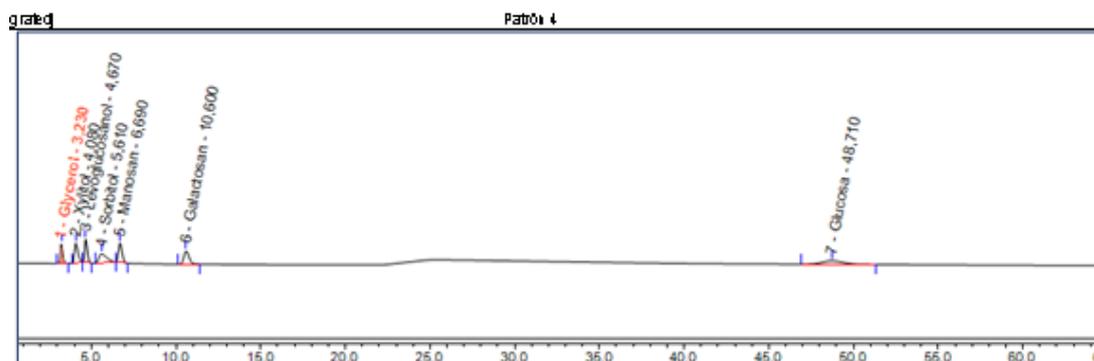
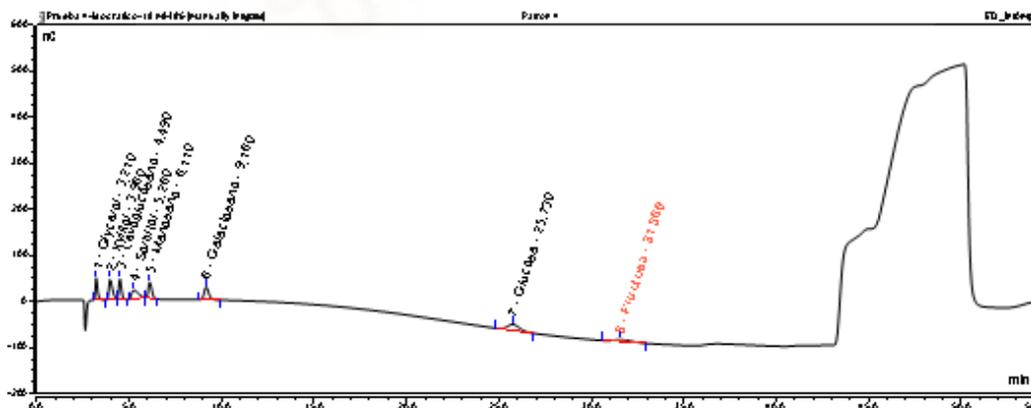
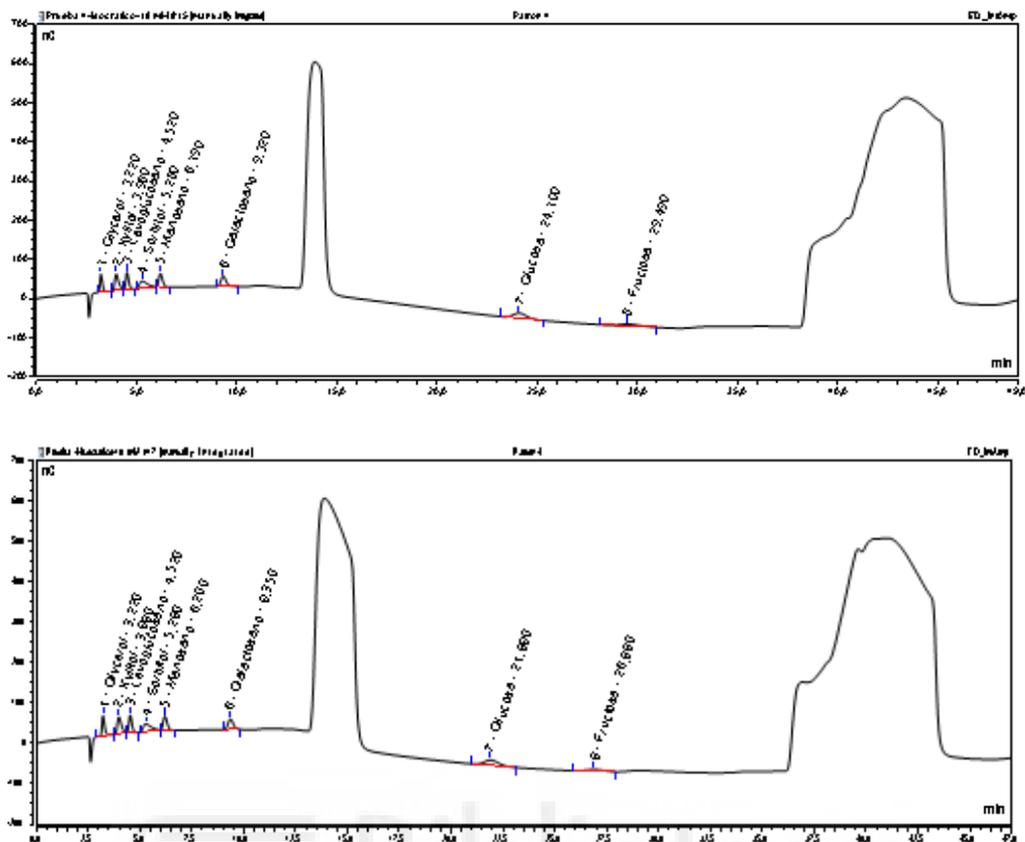


Fig.10. Ampliación del cromatograma obtenido mediante elución isocrática con KOH 0,5 mM.

Con el objetivo de reducir los tiempos de retención de la glucosa y la fructosa para mejorar la detección de este último compuesto y reducir el tiempo total de análisis, se decidió modificar el protocolo analítico a través de dos parámetros: (1) la aplicación de un gradiente rápido a partir del minuto 10 hasta alcanzar una concentración de KOH de 100 mM, manteniendo esta concentración durante un tiempo que osciló entre 1 y 4 minutos, y (2) un aumento progresivo de la concentración inicial del eluyente. En la Fig. 11 se muestran, a modo de ejemplo, los cromatogramas obtenidos con elución isocrática y con aplicación del gradiente para una concentración inicial de KOH de 18 mM.



Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.



**Fig. 11.** Cromatogramas obtenidos con una concentración inicial de KOH 18 mM con elución isocrática (arriba), aplicación del pico de concentración de KOH 100 mM durante 1 min (centro) y aplicación del pico de concentración de KOH 10 mM durante 2 min (abajo).

Los tiempos de retención de la glucosa y la fructosa para las diferentes condiciones de análisis utilizadas se presentan en la Tabla 4. Puede observarse que dichos tiempos variaron notablemente dependiendo de la concentración inicial de KOH y de la duración del gradiente. A medida que se incrementó la concentración inicial del eluyente, el tiempo de retención de ambos compuestos disminuyó progresivamente. Además, la aplicación de un pico de concentración de KOH 100 mM durante un tiempo mayor también contribuyó a reducir los tiempos de retención. Así, los valores más bajos, inferiores a 20 minutos, se obtuvieron para una concentración inicial de KOH de 40 mM y con una duración del gradiente de 1 minuto. En este caso no se consideró necesario aumentar esta duración debido a la disminución drástica de los tiempos de retención para la glucosa y la fructosa.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

**Tabla 4.** Tiempos de retención promedio obtenidos para la glucosa y la fructosa ( $\pm$  Desv. Est.). \*La ausencia del valor del tiempo de retención indica que el compuesto no se detectó o que el pico no pudo integrarse correctamente con las condiciones analíticas aplicadas. Esto puede deberse a que en estas condiciones su tiempo de retención es muy elevado, lo que tiene como consecuencia un aumento de la anchura de este y que sea más dificultosa su identificación. También puede deberse a que la detección de estos compuestos no pudiera llevarse a cabo adecuadamente al pH de trabajo.

[KOH] <sub>inicial</sub> (mmol/L)	Duración del pico de KOH 100 mM (min)	t <sub>R</sub> glucosa (min)*	t <sub>R</sub> fructosa (min)*
0,5	0	48,68 $\pm$ 0,10	-
0,5	2	39,26 $\pm$ 0,17	-
0,5	3	34,74 $\pm$ 0,21	-
0,5	4	30,00 $\pm$ 0,13	-
5	0	40,47 $\pm$ 0,00	-
5	1	37,63 $\pm$ 0,11	-
5	2	33,89 $\pm$ 0,03	-
5	3	30,03 $\pm$ 0,03	-
5	4	26,05 $\pm$ 0,03	-
10	0	31,74 $\pm$ 0,18	39,58 $\pm$ 0,20
10	1	28,46 $\pm$ 0,19	36,88 $\pm$ 0,17
10	2	25,44 $\pm$ 0,18	33,01 $\pm$ 0,10
10	3	22,57 $\pm$ 0,07	29,35 $\pm$ 0,18
18	0	26,03 $\pm$ 0,45	31,84 $\pm$ 0,43
18	1	24,05 $\pm$ 0,06	29,47 $\pm$ 0,05
18	2	21,99 $\pm$ 0,08	27,00 $\pm$ 0,09
30	0	20,73 $\pm$ 0,02	-
30	1	-	23,15 $\pm$ 0,11
30	2	-	21,73 $\pm$ 0,10
40	0	18,17 $\pm$ 0,05	20,86 $\pm$ 0,06
40	1	17,23 $\pm$ 0,01	19,87 $\pm$ 0,04

En la Tabla 5 se presentan los tiempos de retención del resto de compuestos estudiados, incluido el arabitol, que se analizó por separado debido a que coeluye con el levoglucosano.

**Tabla 5.** Valor medio y desviación estándar de los tiempos de retención obtenidos para cada compuesto en función de la concentración inicial del eluyente.

[KOH] (mmol/L)	t <sub>R</sub> (min)	Gli	Xil	Lev	Arab	Sorb	Man	Gal
0,5	Media	3,24	4,09	4,70	4,57	5,66	6,75	10,78
	Desv. Est	0,01	0,01	0,02	0,01	0,09	0,05	0,14
5	Media	3,24	4,08	4,69	4,57	5,57	6,69	10,55
	Desv. Est	0,01	0,01	0,02	0,01	0,03	0,06	0,13
10	Media	3,21	3,97	4,53	4,40	5,28	6,25	9,52
	Desv. Est	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,04	0,08
18	Media	3,22	3,98	4,52	4,41	5,28	6,19	9,32
	Desv. Est	0,00	0,01	0,02	0,00	0,02	0,06	0,12
30	Media	3,22	3,98	4,50	4,41	5,28	6,08	9,03

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

	Desv. Est	0,01	0,01	0,02	0,00	0,03	0,05	0,11
40	Media	3,21	3,97	4,44	4,40	5,22	5,90	8,61
	Desv. Est	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02

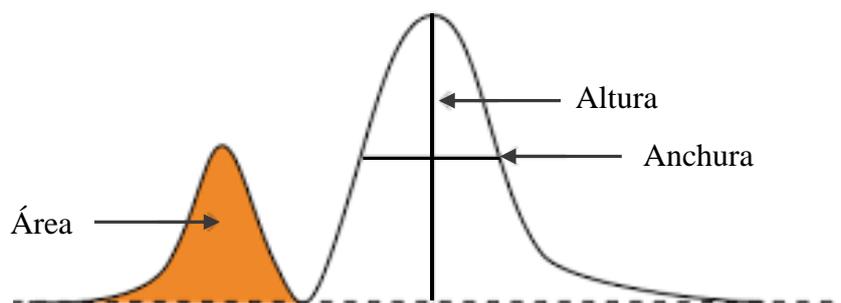
Los tiempos de retención de los compuestos que recorren la columna a mayor velocidad (glicerol xilitol, levoglucosano, arabitol y sorbitol) se vieron poco influenciados por la concentración inicial de eluyente. En cambio, en el caso del manosano, y particularmente del galactosano, se puede apreciar una disminución del tiempo de retención a medida que aumenta la concentración de KOH. En base a estos resultados, cabe destacar que ninguna de las condiciones de análisis ensayadas permitió mejorar la resolución de los compuestos con tiempos de retención más bajos y, por tanto, separar el arabitol y el levoglucosano. En el mejor de los casos, utilizando una concentración de eluyente de 0,5 mM, los picos lograron separarse 0,13 s. Este tiempo, teniendo en cuenta la anchura de los picos, es totalmente insuficiente para poder separarlos. Así, para resolver ambos compuestos sería necesario utilizar una columna analítica diferente. También es importante destacar la estabilidad de los tiempos de retención. Las desviaciones estándar de los mismos fueron siempre muy bajas.

#### 4.2. Área y anchura de los picos

En las técnicas cromatográficas, las áreas de los picos (Fig. 12) pueden integrarse y los datos obtenidos relacionarse con la concentración de cada componente en las muestras analizadas. El método más habitual consiste en realizar una calibración con estándares o patrones. Para ello, se preparan disoluciones de distinta concentración de los compuestos de interés. Una vez analizadas las disoluciones patrón, se representa gráficamente el área frente a la concentración de cada analito y se ajustan los valores a una recta. La ecuación de dicha recta (denominada recta de calibrado) permitirá determinar la concentración del analito en la muestra problema a partir del área del pico. Para algún analito la respuesta no tiene por qué ser lineal y el ajuste se hace a una función matemática más compleja.

Para realizar una separación cromatográfica óptima que permita separar adecuadamente los componentes de la muestra e integrar correctamente el área bajo cada pico, debe evitarse, en lo posible, el ensanchamiento de los mismos; es decir, lo deseable es obtener picos lo más agudos posible. Se define la altura del pico como la distancia entre el máximo del pico y su base. Por otro lado, la anchura es la longitud de la línea paralela a la base del pico al 50 % de su altura (Fig. 12).

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.



**Fig. 12.** Área y anchura de un pico cromatográfico.

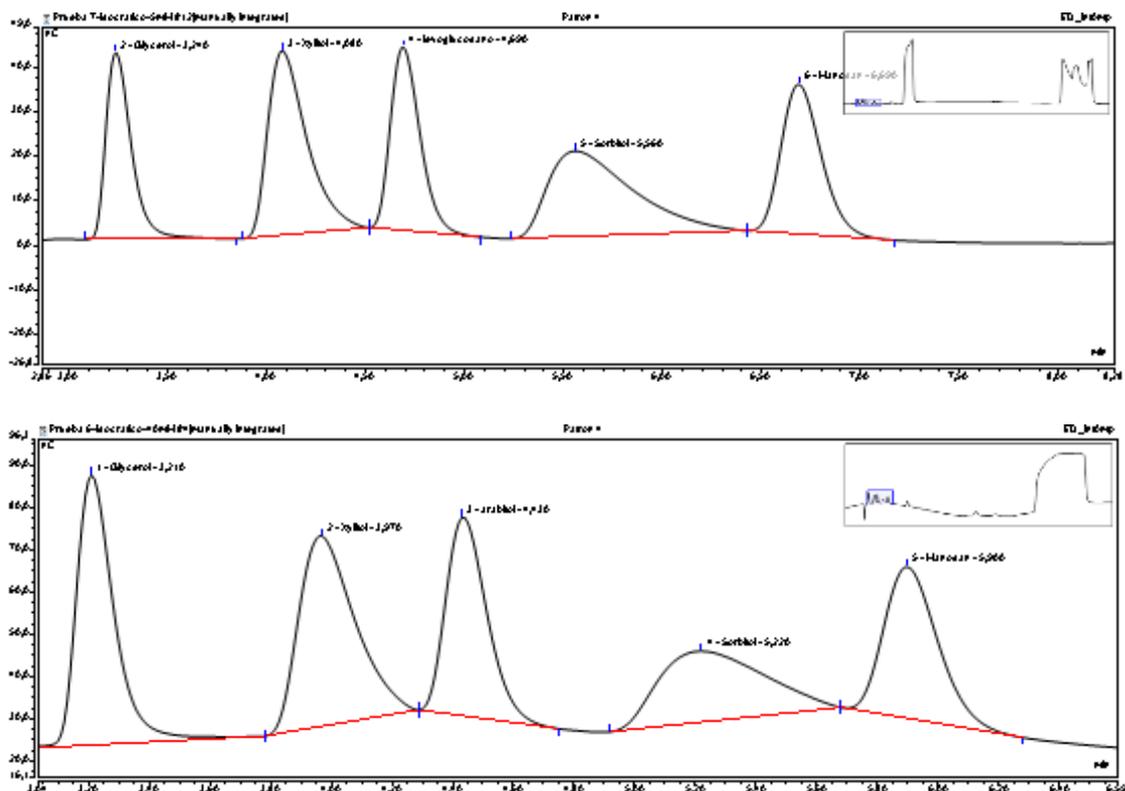
Para evaluar cómo afectan las condiciones de análisis a las áreas de los picos correspondientes a cada uno de los compuestos estudiados, en las Tablas 6 y 7 se muestra los valores de dichas áreas para cada uno de los protocolos analíticos empleados.

**Tabla 6.** Valor medio y desviación estándar de las áreas obtenidas para cada compuesto en función de la concentración del eluyente.

[KOH] (mmol/L)	Área	Gli	Xil	Lev	Arab	Sorb	Man	Gal
0,5	Media	3,72	6,12	5,47	6,90	6,14	6,17	5,71
	Desv. Est.	0,16	0,24	0,57	0,03	0,26	0,10	0,31
5	Media	6,26	9,54	7,12	9,58	9,53	7,96	8,06
	Desv. Est.	0,12	0,10	0,07	0,32	0,10	0,04	0,30
10	Media	6,32	9,39	7,04	9,71	9,03	7,72	8,13
	Desv. Est.	0,84	0,63	0,38	0,50	0,37	0,25	0,16
18	Media	7,02	9,41	7,06	10,36	8,49	7,61	8,20
	Desv. Est.	0,33	0,15	0,14	0,37	0,09	0,09	0,23
30	Media	8,22	9,60	7,36	10,99	7,63	7,58	8,39
	Desv. Est.	0,41	0,03	0,05	0,09	0,05	0,04	0,15
40	Media	8,75	9,59	7,34	10,92	6,80	7,40	8,56
	Desv. Est.	0,25	0,03	0,09	0,22	0,05	0,03	0,13

Como puede observarse en la Tabla 6, en general las áreas de los polialcoholes y anhidroazúcares analizados aumentaron al incrementarse la concentración del eluyente, aunque en la mayoría de los casos las variaciones fueron poco significativas a partir de una concentración de KOH 5 mM. Para el sorbitol y el manosano, en cambio, la tendencia no fue la misma. Esto se debe probablemente a que al incrementarse la concentración de la fase móvil la separación de ambos compuestos empeora ligeramente (Fig. 13).

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.



**Fig. 13.** Ampliación de los cromatogramas obtenidos para concentraciones de KOH de 5 mM (arriba) y 40 mM (abajo). Se observa que la integración del pico de sorbitol y manosa con respecto a la línea base es peor en el cromatograma inferior.

**Tabla 7.** Áreas de los picos de la glucosa y la fructosa ( $\pm$  Desv. Est.) en función de las condiciones de análisis. \*La ausencia del valor del área del pico indica que el compuesto no se detectó o que el pico no pudo integrarse correctamente con las condiciones analíticas aplicadas.

[KOH] <sub>inicial</sub> (mmol/L)	Duración del pico de KOH 100 mM (min)	Área glucosa*	Área fructosa*
0,5	0	6,80 $\pm$ 0,12	-
0,5	2	7,41 $\pm$ 0,12	-
0,5	3	7,68 $\pm$ 0,12	-
0,5	4	7,92 $\pm$ 0,09	-
5	0	9,97 $\pm$ 0,32	-
5	1	10,61 $\pm$ 0,22	-
5	2	11,00 $\pm$ 0,27	-
5	3	11,19 $\pm$ 0,08	-
5	4	10,88 $\pm$ 0,09	-
10	0	10,27 $\pm$ 0,18	3,92 $\pm$ 0,37
10	1	11,31 $\pm$ 0,36	4,16 $\pm$ 0,08
10	2	11,07 $\pm$ 0,16	4,75 $\pm$ 0,16
10	3	11,23 $\pm$ 0,03	5,32 $\pm$ 0,17
18	0	10,27 $\pm$ 0,12	4,77 $\pm$ 0,14
18	1	10,30 $\pm$ 0,36	5,22 $\pm$ 0,21
18	2	10,38 $\pm$ 0,17	4,12 $\pm$ 0,59
30	0	10,29 $\pm$ 0,28	-
30	1	-	6,47 $\pm$ 0,97
30	2	-	7,06 $\pm$ 0,76

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

40	0	10,78 ± 0,35	7,15 ± 1,09
40	1	10,41 ± 0,26	7,58 ± 0,60

En el caso de la glucosa y la fructosa la tendencia general fue similar a la encontrada para la mayoría de los compuestos estudiados; es decir, las áreas de los picos fueron mayores cuanto más elevada fue la concentración inicial del eluyente, lo que indica que el aumento del pH de la fase móvil mejora la detección de los analitos. Para la glucosa no se observó relación entre la duración del gradiente de KOH y la señal obtenida. Por lo que se refiere a la fructosa, aunque de forma general el área del pico aumentó al incrementarse la duración del gradiente, los resultados son poco concluyentes ya que las desviaciones estándar de las áreas fueron bastante elevadas.

La anchura de los picos cromatográficos afecta tanto a la resolución de los compuestos, como a la integración del área bajo cada pico. Con el objetivo de analizar la influencia de las condiciones analíticas en las anchuras de los picos, en las Tablas 8 y 9 se presentan los valores promedio correspondientes a cada uno de los componentes analizados. Puede observarse que para los compuestos con tiempos de retención bajos (Tabla 8) los valores de las anchuras apenas variaron con el aumento de la concentración de KOH. Por tanto, la pérdida de resolución entre sorbitol y manosano comentada anteriormente se debió sobre todo a que la diferencia en los tiempos de retención de ambos compuestos se redujo al aumentar la concentración del eluyente.

**Tabla 8.** Valor medio y desviación estándar de las anchuras de los picos obtenidos para cada compuesto en función del eluyente.

[KOH] (mmol/L)	Anchura (min)	Gli	Xil	Lev	Arab	Sorb	Man	Gal
0,5	Media	0,17	0,23	0,18	0,21	0,54	0,24	0,32
	Desv. Est.	0,04	0,00	0,02	0,02	0,01	0,00	0,01
5	Media	0,14	0,22	0,16	0,20	0,48	0,22	0,31
	Desv. Est.	0,00	0,02	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00
10	Media	0,13	0,20	0,15	0,18	0,43	0,21	0,28
	Desv. Est.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
18	Media	0,13	0,20	0,15	0,18	0,43	0,20	0,28
	Desv. Est.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
30	Media	0,13	0,20	0,15	0,19	0,43	0,20	0,27
	Desv. Est.	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00
40	Media	0,15	0,20	0,15	0,18	0,40	0,19	0,26
	Desv. Est.	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Los picos de la glucosa y la fructosa presentaron anchuras muy superiores a las del resto de compuesto analizados, tal como cabía esperar debido a sus elevados tiempos de retención. En este caso se observó una reducción progresiva de las anchuras de los picos a medida que aumentó la concentración del eluyente. Aunque la duración del gradiente contribuyó a reducir los tiempos de

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

retención de estos compuestos, no se observó una influencia significativa de este parámetro sobre las anchuras de los picos.

**Tabla 9.** Anchura ( $\pm$  Desv. Est.) de los picos obtenidos para la glucosa y la fructosa en función de las condiciones de análisis. \*La ausencia del valor de la anchura del pico indica que el compuesto no se detectó o que el pico no pudo integrarse correctamente con las condiciones analíticas aplicadas.

[KOH] <sub>inicial</sub> (mmol/L)	Duración del pico de KOH 100 mM (min)	Anchura glucosa*	Anchura fructosa*
0,5	0	1,36 $\pm$ 0,01	-
0,5	2	1,41 $\pm$ 0,01	-
0,5	3	1,47 $\pm$ 0,01	-
0,5	4	1,53 $\pm$ 0,01	-
5	0	1,11 $\pm$ 0,02	-
5	1	1,16 $\pm$ 0,02	-
5	2	1,20 $\pm$ 0,00	-
5	3	1,25 $\pm$ 0,01	-
5	4	1,26 $\pm$ 0,01	-
10	0	0,89 $\pm$ 0,01	-
10	1	0,90 $\pm$ 0,01	1,39 $\pm$ 0,00
10	2	0,91 $\pm$ 0,01	1,45 $\pm$ 0,03
10	3	0,94 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,03
18	0	0,72 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,02
18	1	0,74 $\pm$ 0,00	1,09 $\pm$ 0,01
18	2	0,75 $\pm$ 0,00	0,97 $\pm$ 0,06
30	0	0,57 $\pm$ 0,00	-
30	1	-	0,82 $\pm$ 0,03
30	2	-	0,90 $\pm$ 0,06
40	0	0,50 $\pm$ 0,01	0,70 $\pm$ 0,03
40	1	0,50 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 0,02

## 5. Conclusiones y proyección futura.

### 5.1 Conclusiones.

- Para glucosa y la fructosa los menores tiempos de retención se consiguen cuando la concentración inicial de KOH es 40mM y con un gradiente de duración de 1 minuto.
- Los tiempos de retención del glicerol xilitol, levoglucosano, arabitol y sorbitol se vieron poco influenciados por la concentración inicial de eluyente. En cambio, en el caso del manosano y del galactosano, se puede apreciar una disminución del tiempo de retención a medida que aumenta la concentración de KOH.
- Ninguna de las condiciones de análisis ensayadas permitió separar el arabitol y el levoglucosano. Solo se pudieron separar los picos 0,13 s utilizando una concentración de eluyente de 0,5 mM.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

- Las áreas de los compuestos glicerol, xilitol, levoglucosano, arabitol y galactosano aumentaron al incrementarse la concentración del eluyente. Aunque en la mayoría de los casos, las variaciones fueron poco significativas a partir de una concentración de KOH 5 mM.
- Al aumentar la concentración del eluyente, la separación del sorbitol y manosano empeora ligeramente debido a que la diferencia en los tiempos de retención de ambos compuestos se redujo.
- Las áreas de los picos de la glucosa y la fructosa fueron mayores cuanto más elevada fue la concentración inicial del eluyente
- No se observó relación entre la duración del gradiente de KOH y la señal obtenida para la glucosa. En cuanto a la fructosa, el área del pico aumentó al incrementarse la duración del gradiente. Estos resultados son poco concluyentes debido a que las desviaciones estándar de las áreas fueron bastante elevadas.
- Los valores de las anchuras del glicerol, xilitol, levoglucosano, arabitol, sorbitol, manosano y galactosano apenas variaron con el aumento de la concentración de KOH.
- Los picos de la glucosa y la fructosa presentaron anchuras muy superiores comparadas con el resto de los compuestos analizados. Conforme aumentó la concentración de eluyente se redujeron progresivamente las anchuras de los picos. En cambio, la duración del gradiente no tuvo una influencia significativa en este parámetro.

En función de los resultados obtenidos, el mejor método para la realización de los análisis sería aplicar una concentración inicial de 40mM y aumentar la duración del gradiente. De esta forma, se pueden reducir los tiempos de retención y la anchura de los picos. Además, estas condiciones son las ideales para obtener picos más definidos para los compuestos con menores tiempos de retención como son la glucosa y la fructosa. Para poder separar el arabitol y el levoglucosano sería necesario utilizar una columna analítica diferente a la utilizada en este estudio.

## **5.2 Proyección futura.**

Con el objetivo de complementar los resultados obtenidos en este estudio, podrían realizarse las siguientes labores:

Algunas ideas:

- Realizar más experimentos utilizando diferentes columnas analíticas a la utilizada en este trabajo para:
  - Poder separar mejor los picos de los compuestos arabitol y levoglucosano.
  - Observar si el uso de otras columnas analíticas nos permitiría obtener picos más definidos y un menor tiempo de retención para el resto de los compuestos.
  - Comprobar si con estas columnas se podría trabajar con menores concentraciones iniciales de eluyente y obtener los mismos resultados que los obtenidos en este estudio con una concentración inicial de 40mM.
- Analizar muestras de aerosol atmosférico en distintos emplazamientos y en distintas épocas del año para poder determinar cuales son los compuestos que aparecen (alcoholes, anhidroazúcares y azúcares y por lo tanto desarrollar un método específico para su detección. A partir de los resultados obtenidos determinar las posibles fuentes de estos compuestos (emisiones biogénicas, quema de biomasa, etc...).
- Valorar la posibilidad de realizar dos análisis con dos métodos distintos. Un primer análisis para la determinación de los alcoholes y los anhidroazúcares y un segundo que permita la determinación de los azúcares de forma mucho más rápida y con unos picos más definidos.

## 6. Bibliografía

Anderson, J., Thundiyil, J., Stolbach, A. (2012). Clearing the Air: A review of the effects of particulate matter air pollution on human health. *J. Med. Toxicol.* 8, 166-175.

Bhattacharai, H., Saikawa, E., Wan, X., Zhu, H., Ram, K., Gao, S., Kang, S., Zhang, Q., Zhang, Y., Wu, G., Wang, X., Kawamura, K., Fu, P., Cong, Z. (2019). Levoglucosan as a tracer of biomass burning: Recent progress and perspectives. *Atmos. Res.* 220, 20-33.

Caseiro, A., Marr, I., Claeys, M., Kasper-Giebl, A., Puxbaum, H., Pio, C. (2007). Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection. *J. Chromatogr A* 1171, 37-45.

Cataldi, T., Campa, C., De Benedetto, G. (2000). Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: The potential is still growing. *Fresenius J Anal. Chem.* 368, 739-758.

Chen, Y., Engling, G., He, K.-B., Duan, F.-K., Ma, Y.-L., Du, Z.-Y., Liu, J.-M., Zheng, M., Weber, R.J. (2013). Biomass burning contribution to Beijing aerosol. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 7765-7781.

Chen, H., Yin, S., Li, X., Wang, J., Zhang, R. (2018). Analyses of biomass burning contribution to aerosol in Zhengzhou during wheat harvest season in 2015. *Atmos. Res.* 207, 62-73.

Corradini, C., Cavazza, A., Bignardi, C. (2012). High-performance anion-exchange chromatography coupled with pulsed electrochemical detection as a powerful tool to evaluate carbohydrates of food interest: Principles and applications. *Int. J. Carbohydr. Chem.* 2012, 48764.

Fine, P.M., Cass, G.R., Simoneit, B.R. (2004). Chemical characterization of fine particle emissions from the wood stove combustion of prevalent United States tree species. *Environ. Eng. Sci.* 21, 705-721

Fraser, M.P., Lakshmanan, K. (2000). Using Levoglucosan as a molecular marker for the long-range transport of biomass combustion aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4560-4564.

Fabbri, D., Torri, C., Simoneit, B.R., Marynowski, L., Rushdi, A.I., Fabianska, M.J. (2009). Levoglucosan and other cellulose and ligning markers in emissions from burning of Miocene lignites. *Atmos. Environ.* 43, 2286-2295.

Gambaro, A., Zangrando, R., Gabrielli, P., Barbante, C., Cescon, P. (2008). Direct determination of Levoglucosan at the picogram per milliliter level in Antarctic ice by high – performance liquid

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

chromatography/ electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Chem.* 80, 1649-1655.

Ghedini, Nadia and Gobbi, G and Sabbioni, Cristina and Zappia, G. (2000). Determination of elemental and organic carbon on damaged stone monuments. *Atmospheric Environment*. 34. 4383-4391.

Gunthe, S., King, S., Rose, D., Chen, Q., Roldin, P., Farmer, D., Jimenez, J., Artaxo, P., Andreae, M., Martin, S. (2009). Cloud condensation nuclei in pristine tropical rainforest air of Amazonia: size-resolved measurements and modeling of atmospheric aerosol composition and CNN activity. *Atmos. Chem. Phys.* 9, 7551-7575.

Hoffmann, D., Tilgner, A., Iinuma, H. Herrmann, Y. (2009). Atmospheric stability of levoglucosan: a detailed laboratory and modeling study. *Env. Sci. and Tech.* 44, 694-699.

Islam, A. M., Mahbub, P., Nesterenko, P., Paull, B., Macka, M. (2019). Prospects of pulsed amperometric detection in flow-based analytical systems- A review. *Anal. Chem. Acta* 1052, 10-26.

Janoszka, K., Czaplicka, M. (2019). Methods for the determination of levoglucosan and other sugar anhydrides as biomass burning tracers in environmental samples – A review. *J. Sep. Sci.* 42, 319-329.

Johnston, F.H., Purdie, S., Jalaludin, B., Martin, K.L., Henderson, S.B, Morgan, G.G. (2014). Air pollution events from forest fires and emergency department attendances in Sydney, Australia 1996-2007: a case-crossover analysis. *Environ. Health* 13. Kim, K.H., Kabir, E., Kabir, S. (2015). A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* 74, 136-143.

Kim, K.N., Lim, Y.H., Bae, H.J. (2016). Long-term fine particulate matter exposure and major depressive disorder in a community-based urban cohort. *Environ Health Perspect* 124, 1547–1553.

Koren, I., Kaufman, Y.J., Remer, L.A., Martins, J.V. (2004). Measurement of the effect of Amazon smoke on inhibition of cloud formation. *Science* 303, 1342-1345.

Lai, C., Liu, Y., Ma, J., Ma, Q., He, H. (2014). Degradation kinetics of levoglucosan initiated by hydroxyl radical under different environmental conditions. *Atm. Env.* 91, 32-39.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

Lee, H., Rotem, Z., Bar-Or., Wang, C. (2017). Biomass burning aerosols and the low-visibility events in Southeast Asia. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 965-980.

Maenhaut, W., Vermeylen, R., Claeys, M., Vercauteren, J., Matheussen, C., Roekens, E. (2012). Assessment of the contribution from wood burning to the PM10 aerosol in Flanders, Belgium. *Sci. Total Environ.* 437, 226–236.

Mkoma, S., Kawamura, K., Fu, P. (2013), Contributions of biomass/biofuel burning to organic aerosols and particulate matter in Tanzania, East Africa, based on analyses of ionic species, organic and elemental carbon, Levoglucosan and mannosan. *Atmos. Chem. Phys.* 13, 10325-10338.

Nouara, A., Panagiotopoulos, C., Sempéré, R. (2019). Simultaneous determination of neutral sugars, alditols and anhydrosugars using anionexchange chromatography with pulsed amperometric detection: Application for marine and atmospheric samples. *Mar. Chem.* 213, 24-32.

Piot, C., Jaffrezou, J.L., Cozic, J., Pissot, N., El Haddad, I., Marchand, N., Besombes, J.L. (2012). Quantification of Levoglucosan and its isomers by high performance liquid chromatography-Electrospray Ionization tandem mass spectrometry and its application to atmospheric and soil samples. *Atmos. Meas. Tech.* 5, 141-148.

Rohrer, J. (2004). Analysis of Carbohydrates by High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAEPAD). Thermo Fisher Scientific, Technical Note 20.

Sheesley, R. J., Mieritz, M., DeMinter, J.T., Shelton, B.R., Schauer, J.J. (2015). Development of an in situ derivatization technique for rapid analysis of Levoglucosan and polar compounds in atmospheric organic aerosols. *Atmos. Environ.* 123, 251-255.

Simoneit, B.R.T., Schauer, J.J., Nolte, C.G., Oros, D.R., Elias, V.O., Fraser, M.P., Rogge, W.F., Cass, G.R. (1999). Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. *Atmos. Environ.* 33, 173–182.

Simoneit, B.R.T., Elias, V.O., Kobayashi, M., Kawamura, K., Rushdi, A.I., Medeiros P.M., Rogge, W.F., Didyk, B.M. (2004). Sugars – dominant water-soluble organic compounds in soils and characterization as tracers in atmospheric particulate matter. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5939-5949.

Determinación de sacáridos mediante cromatografía iónica para su aplicación al análisis de aerosoles atmosféricos.

Weiss, J. (2016). Handbook of ion chromatography, fourth edition. Wiley-VCH

WHO, W.H.O. (2013). Health effects of particulate matter. Policy implications for countries in Eastern Europe, Caucasus and Central Asia. International series of monographs on physics.

World Health Organization. (2013). Review of evidence on health aspects of air pollution-REVIHAAP Project. Technical Report.

Yan, C., Zheng, M., Sullivan, A.P., Shen, G., Chen, Y., Wang, S., Zhao, B., Cai, S., Desyaterik, Y., Li, X., Zhou, T., Gustafsson, O., Collet, J.L. (2018). Residential coal combustion as a source of Levoglucosan in China. *Environ. Sci. Technol.* 52, 1665-1674.

Yao, J., Eyamie, J., Henderson, S.B. (2016). Evaluation of a spatially resolved forest fire smoke model for population-based epidemiologic exposure assessment. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.* 26, 133-240.

Yttri, K.E., Dye, C., Slordal, L.H., Braahten, O.A. (2005). Quantification of monosaccharide anhydrides by liquid chromatography combined with mass spectrometry: application to aerosol samples from an urban and a suburban site influenced by small-scale wood burning. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 55, 1169-1177.

Zangrando, R., Barbaro, E., Vecchiato, M., Kehrwald, N.M., Barbante, C., Gambaro, A. (2016). Levoglucosan and phenols in Antarctic marine, coastal and plateau aerosols. *Sci. Total Environ.* 544, 606-616.

Zhu, C., Kawamura, K., Kunwar, B. (2015). Effect of biomass burning over the western North Pacific Rim: wintertime maxima of anhydrosugars in ambient aerosols from Okinawa. *Atmos. Chem. Phys.* 15, 1959-1973.