

**DISEÑO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS ESPECTROFLUOROMÉTRICO, PARA LA
DETERMINACIÓN DE ETANOL EN AIRE**

**DESIGN OF A SPECTROFLUOROMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION
OF ETHANOL IN AIR**

Rosa Alfaro Solís

rosalfaro27@gmail.com

Laboratorio de Química de la Atmósfera, LAQAT,
Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Juan Valdés González

juanvalde@gmail.com

Laboratorio de Química de la Atmósfera, LAQAT,
Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

José Pablo Sibaja Brenes

josepablosibaja@gmail.com

Laboratorio de Química de la Atmósfera, LAQAT,
Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Germain Esquivel Hernández

gesquiveher@gmail.com

Laboratorio de Química de la Atmósfera, LAQAT,
Escuela de Química, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica

Recibido el 11 de julio de 2012. Corregido el 15 de octubre de 2012. Aceptado el 2 de octubre de 2012.

RESUMEN: Se diseñó un método simple y rápido para la determinación de etanol en aire, se utilizó una espiral de vidrio refrigerada para el muestreo y un sistema de inyección por flujo, acoplado a una columna que contiene alcohol oxidasa, inmovilizada sobre perlas de vidrio y un sistema de detección por fluorescencia para el análisis. Se evaluaron y se fijaron la longitud de onda de excitación (310 nm) y la de emisión (410 nm), el flujo de la fase móvil (1,05 mL min⁻¹), la longitud del reactor (1,00 m), la longitud (7,00 cm) y el diámetro de la columna de vidrio que contenía la alcohol oxidasa (3,0 mm) y la concentración de la disolución de hidróxido de sodio (0,15 M). El método de análisis fue lineal de 1,00 µmol L⁻¹ a 5,00 µmol L⁻¹ de etanol. Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,995, una repetibilidad de 0,8 %, un límite de detección y de cuantificación de 0,350 µmol L⁻¹ y 0,670 µmol L⁻¹, respectivamente. La metodología se evaluó en campo. Las concentraciones de etanol en aire oscilaron entre 0,356 ± 0,001 mg/m³ y 1 200 ± 2 mg/m³. Estas concentraciones no superaron el límite máximo permitido de 1884 mg/m³ por la OSHA.

Palabras claves: Etanol en aire, alcohol oxidasa, inmovilización, compuesto orgánico volátil, inyección por flujo, administración de la salud y la seguridad ocupacional, OSHA.

ABSTRACT: A simple and rapid method for the determination of ethanol in air was designed, using a chilled glass spiral for sampling and a flow injection system coupled to a column containing alcohol oxidase, immobilized on glass beads and a fluorescence detection system for analysis. We evaluated the excitation wavelength (310 nm) and the emission wavelength (410 nm), the flow of the mobile phase (1,05 mL min⁻¹), the length of the reactor (1,00 m), the length (7,00 cm) and the diameter (3,0 mm) of glass column containing alcohol oxidase and the concentration of sodium hydroxide solution (0,15 M). The analytical method was linear from 1,00 µmol L⁻¹ to 5,00 µmol L⁻¹ ethanol. We obtained a correlation coefficient of 0,995, a repeatability of 0,8 %, a limit of detection and quantification of 0,350 µmol L⁻¹ and 0,670 µmol L⁻¹, respectively. The methodology was evaluated in field sampled and the ethanol concentrations in air ranged from 0,356 ± 0,001 mg/m³ and 1200 ±

2 mg/m³. These concentrations did not exceed the maximum allowable limit of 1884 mg/m³, according to OSHA.

Keywords: Ethanol in air, alcohol oxidase, immobilization, volatile organic compound, flow injection analysis, Occupational Safety and Health Administration; OSHA.

Los seres humanos dependen de su ambiente para satisfacer sus necesidades de supervivencia, de salud y de bienestar, de tal forma que las alteraciones en la atmósfera ocasionan grandes daños en la salud de las personas y en el planeta, en general. Durante el transcurso de la vida del ser humano, este no solo ha contribuido al deterioro de la biosfera y de la hidrosfera, sino también de la atmósfera, ya que con el creciente desarrollo industrial y con el uso masivo de los combustibles fósiles, se han expulsado una gran diversidad de materiales, considerados contaminantes del aire, como es el caso de los compuestos orgánicos volátiles (COV's). (Kiely, 1999; Monod et al., 2003).

El etanol es un compuesto orgánico volátil (COV), con propiedades fisicoquímicas que permiten utilizarlo como aditivo para oxigenar la gasolina, ya que provoca una combustión más completa, una mejor oxidación de los hidrocarburos y reduce las emisiones al aire de monóxido de carbono, de compuestos aromáticos y de compuestos orgánicos volátiles; pero aumenta las emisiones de aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y etanol sin quemar (Seinfeld y Pandis, 2006). Estas emisiones directas a la atmósfera entran a formar parte de los procesos de foto-oxidación y de las reacciones que ocurren con los radicales hidroxilo y con los óxidos de nitrógeno, en donde se producen, no solo aldehídos y ácidos carboxílicos, sino también ozono y el nitrato de peroxiacetilo, PAN, el cual es formado por la reacción entre el acetaldehído y el dióxido de nitrógeno y es cancerígeno. (Cardona, Sánchez, Montoya y Quintero, 2005; Montoya, Quintero, Sánchez y Cardona, 2006; Sánchez, Karnae y Kuruvilla, 2008).

La exposición biológica a los vapores de etanol ha sido evaluada, generalmente, en la sangre, donde las unidades utilizadas para reportar la concentración del alcohol son miligramos de

etanol por decilitro de sangre (mg dL^{-1}), sin embargo, existe muy poca información sobre las concentraciones del alcohol en el aire. Los experimentos realizados en seres humanos han demostrado que la sangre absorbe entre el 55 % y el 60 % de los vapores de etanol inhalados.

Los efectos del etanol sobre la salud de las personas se encuentran íntimamente ligados con el tiempo de exposición a sus vapores, de sus interacciones con el ambiente, así como con la edad, los rasgos genéticos y los hereditarios (Grumet, 2001).

Los riesgos asociados a la exposición del ser humano a concentraciones de etanol, cercanas al límite máximo permisible ($1000 \text{ ppm} = 1884 \text{ mg/m}^3$) en 8 horas de trabajo son (EPA, 1994; Mujica y Pérez, 2006):

- ✦ Mutaciones
- ✦ Daños al desarrollo del feto, en altas concentraciones
- ✦ Dolor de cabeza, náuseas, sensación de calor y mareo
- ✦ Irritación de la piel, de tal forma que el contacto repetido puede secarla, causando grietas, descamación y picazón
- ✦ Irritación en los ojos, la nariz, la boca y la garganta
- ✦ Daños en el hígado y en el sistema nervioso en concentraciones altas y repetidas

Según la Norma Oficial Mexicana NOM-076-SSA1-2002 y la Administración de la Salud y la Seguridad Ocupacional, por sus siglas en inglés OSHA, la exposición prolongada a concentraciones mayores que 1000 ppm no solo causa irritación de los ojos y de la nariz, dolor de cabeza, mareo, fatiga y narcosis, sino también, estupor y somnolencia y, a partir de 3300 ppm, es peligroso para la salud y la vida (Diario Oficial Mexicano, 2003).

Debido a lo antes expuesto y a que la capacidad de oxidación de los compuestos orgánicos volátiles oxigenados (COVO) en la troposfera es poco conocida, se requiere el diseño de métodos analíticos para su detección, tanto en fase gaseosa como en fase líquida. Con ello, se hace posible la determinación de su concentración en aire, para establecer controles técnicos y medidas sanitarias personales, que permitan proteger la salud humana.

METODOLOGÍA

El sistema de análisis se diseñó utilizando como guía los sistemas de inyección por flujo descritos por Taniai, Sukuragawa y Okutani (2001) y Valdés (1999) en sus investigaciones. Se efectuó la optimización de las condiciones de análisis, para ello se evaluaron las longitudes de onda de excitación y de emisión entre 250 nm y 500 nm, con un detector de fluorescencia Shimadzu, modelo RF-551, utilizando una disolución 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, que contenía el dímero del ácido p-hidroxifenilacético. Se optimizó el flujo del sistema de análisis, con la realización de 10 inyecciones repetidas del patrón de 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de etanol y variando el flujo entre 0,75 mL min^{-1} y 1,60 mL min^{-1} . La longitud del reactor helicoidal se determinó inyectando 10 veces un patrón de 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de etanol y variando la longitud del reactor de 0,00 m a 4,00 m. La longitud y el diámetro interno de la columna que contenía la alcohol oxidasa inmovilizada sobre perlas de vidrio se determinó inyectando 10 veces un patrón de 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de etanol y variando la longitud de la columna de 4,00 cm a 10,00 cm para la longitud, y de 2,00 mm a 3,00 mm para el diámetro. La concentración óptima de la disolución del hidróxido de sodio se determinó variando la concentración de 0,1 mol L^{-1} a 0,2 mol L^{-1} y midiendo constantemente el pH de la disolución resultante, hasta obtener un pH de 11,00. El volumen del lazo de inyección se escogió de acuerdo con lo recomendado por Schilling, Voigt, Tavares y Klockow (1999) y la temperatura de la columna con alcohol oxidasa, de acuerdo con lo recomendado por Büchs (2005).

Se evaluó la respuesta lineal del sistema de análisis, mediante criterios tales como la repetibilidad, el límite de detección y el límite de cuantificación del método. La linealidad se determinó inyectando 6 patrones de etanol en un ámbito de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, y la repetibilidad se obtuvo con la desviación estándar de 6 inyecciones de la disolución patrón de alcohol etílico 3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

El muestreo en campo se realizó en las instalaciones del Ingenio Taboga, el cual está ubicado en la provincia de Guanacaste a 10°20'59,14"N, 85°10'30,61"O y a una altura de 13 metros sobre el nivel del mar.

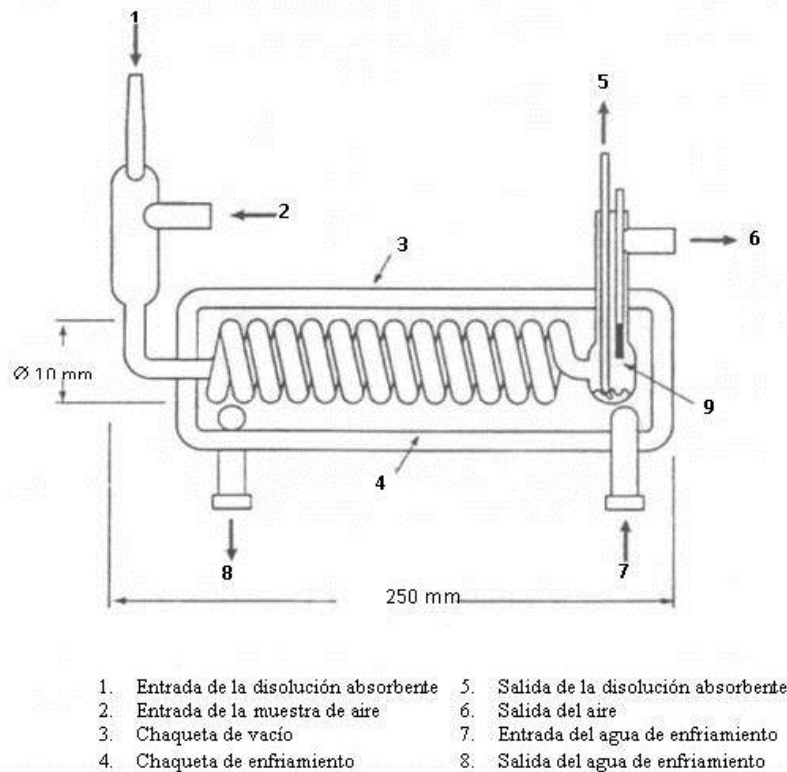


Figura 1. Esquema de la espiral de vidrio empleada para el muestreo de alcohol etílico en aire

Los muestreos de etanol en aire se realizaron utilizando el sistema descrito por Valverde (2009) y Morales (2004), el cual consiste en una espiral de vidrio de 25 cm de longitud, 20 cm de alto y 2,5 mm de diámetro interno (Figura 1). Las muestras se recolectaron en viales de polietileno de alta densidad de 25 mL, a los cuales se les midió la masa antes y después de la toma de la muestra. Estos viales se cerraron inmediatamente después de cada muestreo y, para su posterior análisis en el Laboratorio de Química de la Atmósfera de la Universidad Nacional, se almacenaron en un refrigerador a 4 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El sistema de inyección por flujo está constituido fundamentalmente por una bomba peristáltica (4), una válvula de inyección (6), dos cámaras de mezclas (8 y 9), un reactor enzimático (7), un detector de fluorescencia (13), un sistema de obtención de datos (14) y tres disoluciones. Las disoluciones están conformadas por la disolución de arrastre, constituida por un amortiguador de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, a pH 7,5 (1); una disolución de hidróxido de sodio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ (3) y una disolución reactivo, compuesta por el ácido *p*-hidroxifenilacético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, 250 U de peroxidasa y un amortiguador de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0 (2).

En la figura 2 se muestra una descripción de cada uno de los componentes y de los reactivos utilizados en el diseño del sistema de análisis de etanol, en el cual se utilizó alcohol oxidasa inmovilizada sobre perlas de vidrio (Alfaro, 2009).

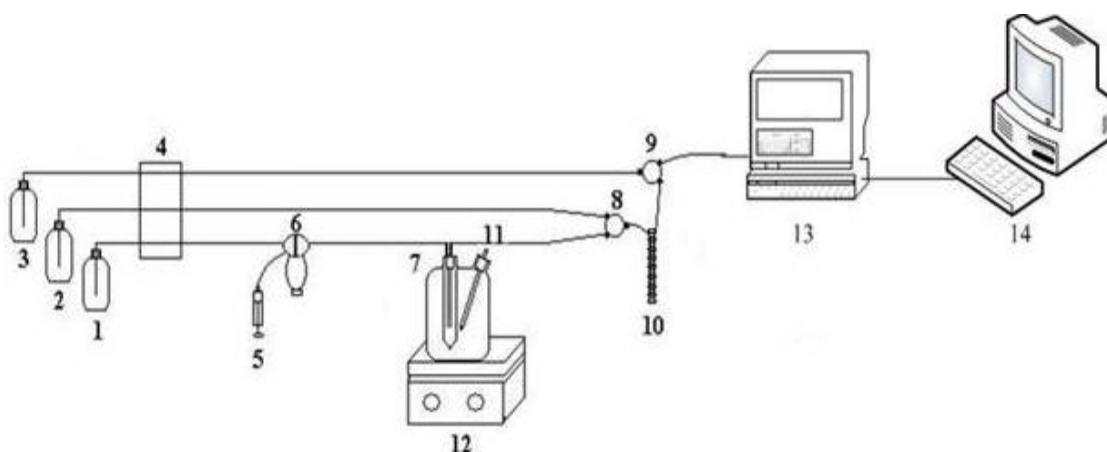


Figura 2. Esquema del sistema de inyección por flujo diseñado

En los espectros de excitación y de emisión obtenidos para el dímero del ácido *p*-hidroxifenilacético (Figura 3), se observa que este posee dos longitudes de onda máximas de excitación: la primera de ellas a 295 nm y la segunda a 415 nm. Lo mismo sucede con el espectro de emisión, en donde la primera longitud máxima se presenta a 310 nm y la segunda a 415 nm,

por lo tanto, para realizar las determinaciones se utilizó una longitud de onda de excitación de 310 nm y de emisión de 410 nm.

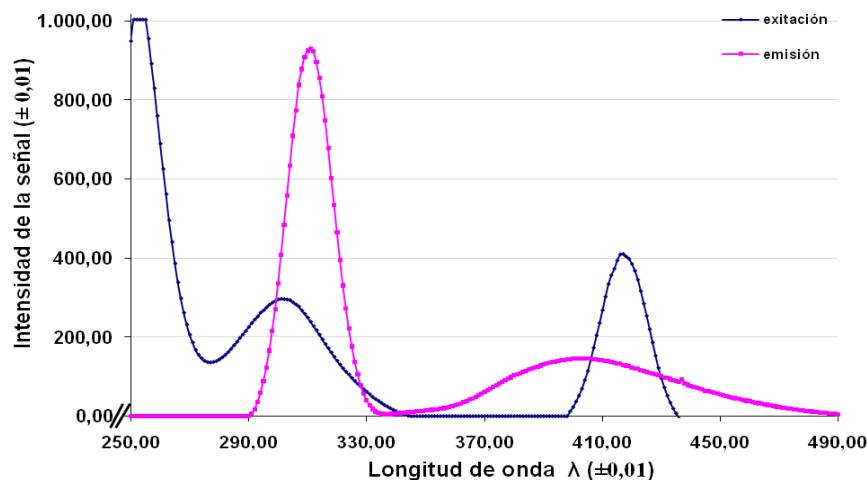


Figura 3. Espectros de excitación y de emisión del dímero del ácido p-hidroxifenilacético 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$

Se seleccionó un flujo de análisis de 1,05 mL min^{-1} , debido a que tal y como se muestra en la figura 4, al realizar las inyecciones del patrón de etanol 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$, variando el flujo, se encontró que el área del pico disminuye a flujos menores y mayores a 1,05 mL min^{-1} , debido a que a velocidades mayores que 1,05 mL min^{-1} , el analito no tiene suficiente tiempo de dispersarse y reaccionar, tanto en la columna de alcohol oxidasa, como en los reactores (Fletcher y Staden, 2003).

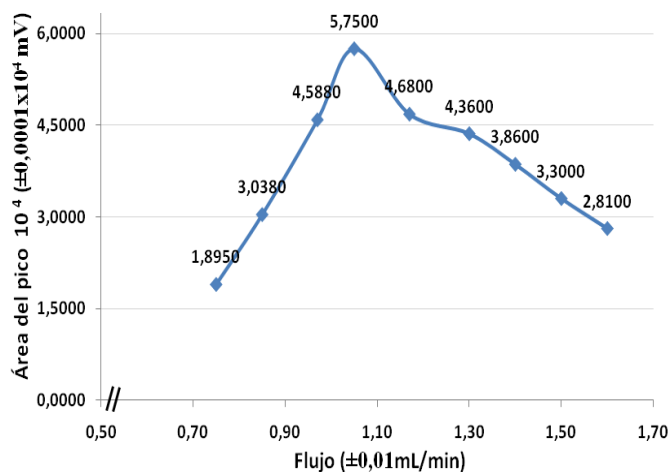


Figura 4. Determinación del flujo de análisis en el sistema de inyección por flujo

La Figura 5 muestra los resultados obtenidos al evaluar la longitud del reactor y se observa que la longitud óptima del reactor es de 1,00 m, debido a que con esta longitud se obtiene la mayor área de pico ($6,39 \times 10^4$ mV). Además, se observa que el área del pico disminuye cuando el sistema no está conectado al reactor (0,00 metros de longitud) y que, al utilizar reactores con longitudes superiores a 1,00 m, se produce una disminución significativa del área del pico, pues hay una mayor dilución del analito a través del sistema FIA (Fletcher y Staden, 2003). El largo óptimo se obtuvo a 7,00 cm, ya que a esta longitud se obtienen picos bien definidos, lo que indica que, para convertir en peróxido de hidrógeno las concentraciones de alcohol etílico presentes en el aire, la cantidad de enzima en la columna es óptima. Esta longitud coincide con la utilizada por Valdés (1999) en sus estudios y, además, se corrobora que a mayor longitud de la columna se produce una mayor dispersión del analito, por lo que se obtienen picos anchos y poco definidos,

mientras que con columnas de menor longitud que 7,00 cm no hay suficiente cantidad de enzima inmovilizada en la columna, para que el analito reaccione completamente.

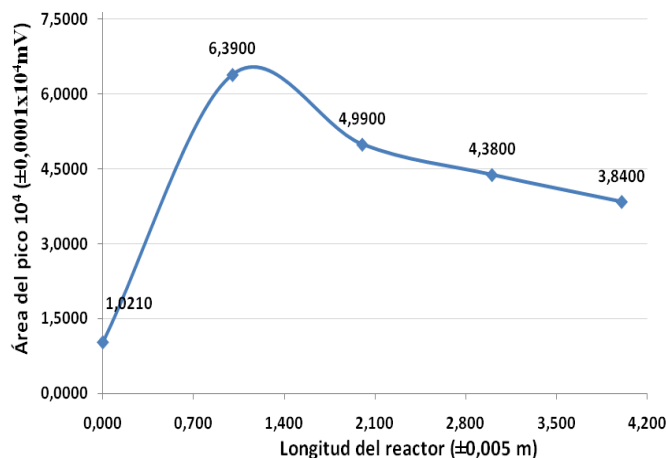


Figura 5. Determinación de la longitud del reactor

En la tabla 1 se observa que la columna que tiene 3,0 mm de diámetro genera una mayor producción de peróxido de hidrógeno, ya que el volumen de la columna es el doble y contiene una mayor cantidad de enzima, por lo que el área es mayor ($3,2700 \times 10^4$ mV).

El hidróxido de sodio se utiliza para asegurar que el pH de la disolución que contiene el dímero del ácido p-hidroxifenilacético sea mayor o igual a 11,00 y lograr así su máxima emisión. Se logró obtener un pH de 11,00 en la disolución que contenía el dímero, cuando se utilizó una disolución de hidróxido de sodio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$, lo que está de acuerdo con lo reportado en la bibliografía, ya que a pH menores que 11,00 se produce una disminución de la intensidad de la fluorescencia, en función del grado de disociación de dímero, mientras que a pH superiores a 11,00, ocurre disminución de la intensidad de emisión, lo cual se debe a la pérdida de la actividad

enzimática (peroxidasa), lo cual limita la formación del dímero (Sakuragawa, 1998).

Tabla 1

Volumen de la columna de alcohol oxidasa

Diámetro de la columna (± 0,5 mm)	Volumen de la columna (± 0,01 cm)	Área del pico (± 0,0001 mV)
2,0 mm	0,22	2,2300 x 10 ⁴
3,0 mm	0,49	3,2700 x 10 ⁴

El método diseñado es lineal en un ámbito de 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a 5,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 6). La curva presenta un coeficiente de correlación lineal de 0,995. Por otro lado se encontró que, al utilizar concentraciones mayores a 8,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de etanol, ocurre una disminución de la linealidad. El coeficiente de correlación lineal entre 1,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y 12,00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ fue de 0,933. Además, se observa que al aumentar la concentración de etanol, la curva comienza a presentar un comportamiento hiperbólico, lo que coincide con lo observado por Schilling et al. (2001), quienes utilizaron un sistema de permeación para obtener los patrones utilizados en la confección de la curva de calibración.

El porcentaje de desvío relativo obtenido para el método de análisis de etanol, utilizando un sistema de inyección por flujo y alcohol oxidasa inmovilizada sobre perlas de vidrio fue de 0,8 %, lo que indica que el método es preciso en las mismas condiciones de análisis, en un corto intervalo de tiempo.

El límite de detección y cuantificación promedio fue de 0,35 $\mu\text{mol L}^{-1}$ y de 0,67 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

En la tabla 2 se muestran las concentraciones de alcohol etílico obtenidas en cada uno de los puntos de muestreo.

La concentración promedio de alcohol etílico en los fermentadores (inicio del proceso) fue de $212,3 \pm 0,4 \text{ mg/m}^3$. La máxima concentración de alcohol etílico en este punto fue de $1\ 200 \pm 2 \text{ mg/m}^3$ a las 13:00 horas del 05 de abril del 2009, tal y como se observa en la figura 26, mientras que la menor concentración de alcohol etílico fue de $21,6 \pm 0,4 \text{ mg/m}^3$ a las 11:00 horas.

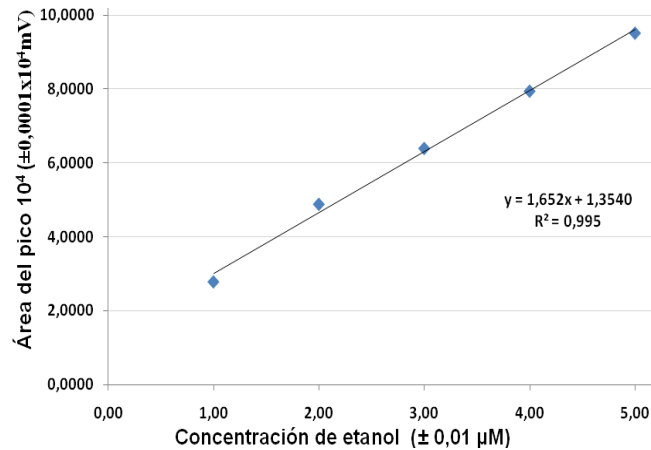


Figura 1. Curva de calibración para el análisis de etanol en aire

Tabla 2

Concentración promedio de etanol en cada uno de los puntos de muestreo, ubicados en el Ingenio Taboga

Sitio de muestreo	Concentración promedio de alcohol etílico en la muestra mg/m^3
Fermentadores	$212,3 \pm 0,4$
Condensadores	$19,02 \pm 0,03$
Entrada a la destilería	$20,62 \pm 0,04$
Laboratorio de destilería	$23,00 \pm 0,04$

LD = $0,23 \text{ mg/m}^3$; LC = $0,44 \text{ mg/m}^3$ *

Según la norma mexicana NOM-076-SSA1-[12], el límite máximo permisible de exposición a los vapores de etanol, en una jornada laboral de 8 horas, es de 1884 mg/m^3 (1000 ppmv). La concentración máxima de etanol medida en los fermentadores ($1200 \pm 2 \text{ mg/m}^3$) estuvo cercana al límite máximo permisible: si estas concentraciones se mantienen por periodos prolongados, se podrían percibir ligeros síntomas de envenenamiento. Hay que tomar en consideración que repetidas y frecuentes exposiciones a los vapores de alcohol etílico pueden causar daños en el hígado y afectar el sistema nervioso, por lo que, según esta norma, no es recomendable la exposición prolongada a concentraciones de etanol mayores que 942 mg/m^3 (la mitad del límite máximo 1884 mg/m^3).

En los condensadores, la concentración máxima y mínima de etanol fue de $42,39 \pm 0,07 \text{ mg/m}^3$ y $0,356 \pm 0,001 \text{ mg/m}^3$, respectivamente, a las 14:15 horas y 10:45 horas del 06 de abril del 2009. Estas concentraciones resultan muy bajas, si se comparan con el límite máximo permisible de exposición a los vapores de etanol.

En la entrada a la destilería se obtuvo una concentración promedio de etanol de $20,62 \pm 0,04 \text{ mg/m}^3$. En este punto, la máxima concentración del alcohol fue de $34,2 \pm 0,1 \text{ mg/m}^3$ a las 16:40 horas de 05 de abril del 2009 y la mínima de $9,99 \pm 0,02 \text{ mg/m}^3$, a las 19:30 horas del mismo día. En el laboratorio de destilería se obtuvo una concentración promedio de etanol de $23,00 \pm 0,04 \text{ mg/m}^3$. La máxima concentración de etanol en este punto fue de $44,6 \pm 0,1 \text{ mg/m}^3$, a las 17:00 horas del 06 de abril del 2009. Por otro lado, la menor concentración de etanol fue de $12,22 \pm 0,02 \text{ mg/m}^3$ a las 15:00 horas del mismo día.

CONCLUSIONES

La determinación analítica de etanol en el aire, con la utilización de una columna que contiene alcohol oxidasa inmovilizada sobre perlas de vidrio, acoplada a un detector de fluorescencia, es rápida, confiable y genera resultados con buena precisión.

La metodología propuesta es apta para muestrear y determinar las concentraciones de etanol en aire en ambiente laboral y externo, por lo que se puede utilizar en el control y vigilancia

de las emisiones de etanol al aire a nivel industrial y ayudar, así, a los entes estatales a elaborar una normativa nacional, que establezca las concentraciones máximas permitidas, para asegurar el bienestar de la población expuesta.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de la concentración de etanol en aire en industrias productoras y distribuidoras de etanol, tanto en ambiente interno como en ambiente externo, debido a que los vapores de etanol no solamente pueden afectar la salud del personal expuesto, sino que pueden ocasionar cambios en la atmósfera y producir compuestos aún más dañinos para la salud y el medio, como es el caso del acetaldehído y el PAN (nitrato de peroxiacetilo).

REFERENCIAS

- Alfaro, R. (2009). *Diseño de un sistema de muestreo y análisis espectrofluorométrico de etanol en aire, utilizando alcohol oxidasa inmovilizada sobre perlas de vidrio, en el ingenio Taboga*. (Tesis de Licenciatura). Escuela de Química. Universidad Nacional. Costa Rica.
- Büchs, J. (2005). *Development of immobilization and drying methods of enzymes on support particles for enzymatic gas-phase reactions [Desarrollo de un método de secado e inmovilización de enzimas sobre un soporte particulado, por medio de reacciones en fase gaseosa]*. (Tesis doctoral). Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen. Germany.
- Cardona, C., Sánchez, O., Montoya, M y Quintero, J. (2005). Simulación de los procesos de obtención de etanol a partir de caña de azúcar y maíz. Colombia. *Science Technology*. 28,187-192.
- Diario oficial Mexicano. (2003). *Proyecto de modificación de la norma oficial mexicana NOM-076-SSA1-1993. Salud ambiental que establece los requisitos sanitarios del proceso del etanol (alcohol etílico)*. México: Secretaria de Salud.

Environmental Protection Agency (EPA). (1994). Indoor Air Pollution: An Introduction for Health Professionals [Contaminación de aire interno: Una introducción para Profesionales de la Salud]. United States. 402-R-94-007.

Fletcher, P. y Staden, J. (2003). Determination of ethanol in distilled liquors using sequential injection analysis with spectrophotometric detection [Determinación de etanol en bebidas alcohólicas destiladas mediante análisis por inyección secuencial con detección espectrofotométrica]. *Analytica Chimica Acta*, 499, 123-128.

Grumet, J. (2001). Air quality health and economic impacts [Calidad del aire, salud e impactos económicos]. Northeast States for Coordinated Air Use Management (NESCAUM), Boston, United States. 2,1-58.

Kiely, G. (1999). *Contaminación atmosférica. Ingeniería ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión* (1^o ed.). España: Mc Graw Hill.

Monod, A., Bonnefoy, N., Kaluzny, P., Denis, I., Foster, P. y Carlier, P. (2003). Methods for sampling and analysis of tropospheric ethanol in gaseous and aqueous phases [Métodos para el muestreo y el análisis de etanol troposférico en fases gaseosa y acuosa]. *Chemosphere*, 52: 1307–1319.

Montoya, M., Quintero, J., Sánchez, O. y Cardona, C. (2006). Evaluación del impacto ambiental del proceso de obtención de alcohol carburante utilizando el algoritmo de reducción de residuos, Medellín Colombia. *Revista Facultad de Ingeniería de la Universidad de Antioquia*, 36: 85-95.

Morales, J. (2009). *Implementación de un sistema de muestreo y análisis para la determinación analítica de peróxido de hidrogeno en aire en dos zonas de Costa Rica*. (Tesis de Licenciatura). Escuela de Química. Universidad Nacional, Costa Rica.

Mujica, V. y Pérez, C. (2006). Determinación de emisiones de solventes volátiles en un laboratorio docente y de investigación de ingeniería química, Valencia. *Boletín de Malariología Salud Ambiental*. 46: 1.

Sakuragawa, A., Taniani, T. y Okutani, T. (1998). Fluorometric determination of microamounts of hydrogen peroxide with an immobilized enzyme prepared by coupling horseradish peroxidase

to chitosan beads [Determinación fluorométrica de micro concentraciones de peróxido de hidrógeno utilizando peroxidasa de rábano inmovilizada sobre perlas de quitosano]. *Analytica Chimica Acta*, 374, 191-200.

Sánchez, M., Karnae, S. y Kuruvilla, J. (2008). Source characterization of volatile organic compounds affecting the air quality in a coastal urban area of South Texas, Kingsville [Caracterización de compuestos orgánicos volátiles que afectan la calidad del aire en Kingsville, una zona costera urbana del sur de Texas]. *International Journal of environmental Researche and Public Health*.5: 130-138.

Schilling, M., Voigt, G., Tavares, T. y Klockow, D. (1999). An enzymatic-fluorimetric method for monitoring of ethanol in ambient air [Un método enzimático-fluorimétrico para el monitoreo de etanol en ambiente interno]. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 364, 100-105.

Seinfeld, J. y Pandis, S. (2006). *Atmospheric chemistry and physics. From air pollution to climate change [Química y Física Atmosférica. De la contaminación del aire hasta el cambio climático]*. (2^oed.). Wiley- Intersciencw, New York. pp. 286-287.

Taniai, T., Sukuragawa, A. y Okutani ,T. (2001). Fluorometric determination of ethanol in liquor samples by flow-injection analysis using an immobilized enzyme-reactor column with packing prepared by coupling alcohol oxidase and peroxidase onto chitosan beads [Determinación fluorométrica de etanol en las muestras de licor, por análisis de inyección de flujo, utilizando una columna empacada como reactor, el cual contiene la enzima inmovilizada por acoplamiento de la alcohol oxidasa y peroxidasa sobre perlas de quitosano]. *AOAC*. 5: 1475-1483.

Valdés, J. (1999). *Untersuchungen zur Anwendung immobilisierter Enzyme und Reagentien zur Probenahme und Bestimmung atmosphärischer Peroxide* [Estudios sobre el uso de enzimas inmovilizadas, reactivos para la toma de muestras y la determinación de peróxidos en la Atmósfera], (Tesis de Doctorado). Chemische Fakultaet. Dortmund Universitaet, Dortmund, Deutschland.

Valverde, J. (2004). *Sources and sinks of peroxides in the planetary boundary layer* [Fuentes y sumideros de peróxidos en la capa límite planetaria], (Tesis de Doctorado), Fachbereich Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg, Universitaet Mainz. Germany. p 204.