



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS

APLICACIÓN DE 1-NAFTILHIDRAZINA EN LA
DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE
ALDEHÍDOS GRASOS COMO INDICADORES DE
CALIDAD DE ALIMENTOS Y BIOMARCADORES
CLÍNICOS

Para obtener el grado de
Doctor en Química

PRESENTA

M. Q. JORGE LÓPEZ TÉLLEZ

DIRECTOR

Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

CO-DIRECTOR

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Comité tutorial

Dra. María Elena Páez Hernández

Dra. Irma Pérez Silva

Mineral de la Reforma, Hgo., México, Julio 2026



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences
Área Académica de Química

Mineral de la Reforma, Hidalgo a 17 de junio de 2026

Número de control: ICBI-AAQ/1248/2026

Asunto: Autorización de impresión tesis.

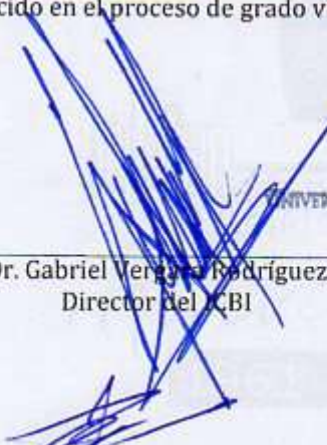
DRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR.

El Comité Tutorial del trabajo de tesis titulado "APLICACIÓN DE 1-NAFTILHIDRAZINA EN LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE ALDEHÍDOS GRASOS COMO INDICADORES DE CALIDAD DE ALIMENTOS Y BIOMARCADORES CLÍNICOS", realizado por el sustentante **Jorge López Téllez** con número de cuenta **319035** perteneciente al programa del **DOCTORADO EN QUÍMICA (tradicional)**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

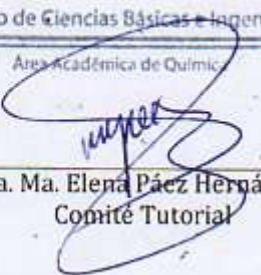

Dr. Gabriel Vergara Rodríguez
Director del ICBI


Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega
Director de tesis


Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
Codirector de tesis


Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química


Dra. Irma Pérez Silva
Comité Tutorial


Dra. Ma. Elena Pérez Hernández
Comité Tutorial

JCB/LAJ

"Amor, Orden y Progreso"



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo
Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 40088, 40087
aaq_icbi@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega y la co-dirección del Dr. José Antonio Rodríguez Ávila.

Agradezco a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca No. **843103** otorgada y al apoyo complementario de movilidad internacional otorgado en 2025.

Parte de este trabajo ha sido presentado en el:

XXII European Conference on Analytical Chemistry EUROANALYSIS (Barcelona, 2025), con el trabajo "Determination of aldehydes in edible oil samples employing 1-naphthalenyl hydrazine as derivatizing agent followed by HPLC-FLD."

XXXVIII Congreso Nacional de Química Analítica y XXVIII Simposio Estudiantil (Querétaro, 2026) con el trabajo "Desarrollo de una metodología para el análisis de aldehídos grasos en muestras de orina y plasma sanguíneo mediante extracción en fase sólida dispersiva seguida de HPLC-FLD"



Parte de este trabajo ha sido publicado:

Lopez-Tellez, J., Ibarra, I. S., Santos, E. M., Mondragon-Portocarrero, A. C., & Rodriguez, J. A. (2025). Aldehydes determination in edible oil samples employing 1-Naphthalenyl hydrazine as derivatizing agent followed by HPLC-FLD. *Microchemical Journal*, 213, 113658. DOI: 10.1016/j.microc.2025.113658

Lopez-Tellez, J., Rodriguez, J. A., Miranda, J. M., & Ibarra, I. S. (2026). Determination of fatty aldehydes in blood plasma and urine samples by dispersive solid-phase extraction followed by HPLC-FLD: evaluation as possible cancer biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1-14. DOI: 10.1007/s00216-026-06431-3

Santiago-Martinez, F. E., Rodriguez, J. A., Santos, E. M., Mondragon-Portocarrero, A. C., & **Lopez-Tellez, J.** (2026). Application of calcium alginate spheres modified with 2, 4-dinitrophenylhydrazine during the determination of fatty aldehydes in edible oils by HPLC-DAD. *Separations*, 13(2), 75. DOI: 10.3390/separations13020075

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme culminar esta etapa más y lograr mis metas.

A mis padres Clara Téllez e Ignacio López por todo el apoyo que me brindaron, su amor, por sus sacrificios, empeño, su enorme paciencia y todos sus regaños y consejos que me permitieron culminar esta etapa. Les agradezco por ser parte fundamental de la persona que hoy soy.

Al Dr. Israel Samuel Ibarra por aceptarme y aceptar formar parte de este trabajo, por su tiempo, paciencia, su amistad y consejos.

Al Dr. José Antonio Rodríguez, por todos sus consejos y enseñanzas. Le agradezco que después de tanto tiempo aun tenga paciencia, gracias por su confianza, su amistad y por todo el gran apoyo que me ha brindado. Estaré siempre agradecido.

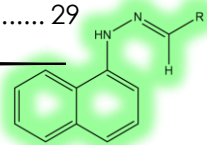
A Ariadna Lara por apoyarme y acompañarme, por hacerme una mejor persona, por su dedicación y tiempo. Gracias por todos los consejos y la paciencia.

A mis amigos y compañeros que me acompañaron durante todo este tiempo.

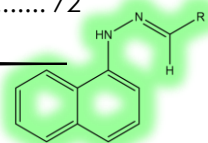
A la Dra. María Elena Páez y la Dra. Irma Pérez por sus consejos y su tiempo en la revisión de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

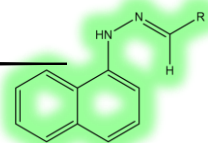
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS	IV
ÍNDICE DE TABLAS	VII
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES	3
1.1 Generalidades de los aldehídos.....	3
1.1.1 Clasificación de los aldehídos	4
1.1.2 Contenido de aldehídos en diferentes matrices.....	5
1.2 Técnicas instrumentales para la determinación de aldehídos	7
1.2.1 Técnicas espectrofotométricas	7
1.2.2 Técnicas electroquímicas	8
1.2.3 Métodos cromatográficos.....	9
1.2.3.1 Cromatografía de gases.....	10
1.2.3.2 Cromatografía de líquidos	11
1.3 Compuestos para la derivatización de aldehídos	14
1.4 Rutas de derivatización.....	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo general	20
2.2 Objetivos Específicos.....	20
3. CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA.....	22
3.1 Antecedentes.....	22
3.1.1 Generalidades de los aldehídos grasos.....	22
3.1.2 Mecanismo de reacción entre aldehídos e hidrazinas	22
3.1.3 Agentes derivatizantes fluorescentes	24
3.2 Metodología	29
3.2.1 Reactivos.....	29



3.2.2 Preparación de las hidrazonas	29
3.2.3 Caracterización de las hidrazonas	30
3.2.4 Análisis cromatográfico para la separación de las hidrazonas	30
3.3 Resultados	31
3.3.1 Caracterización mediante FTIR de las hidrazonas	31
3.3.2 Caracterización mediante RMN ¹ H de las hidrazonas.....	33
3.3.3 Caracterización mediante espectrofotometría UV-Vis y de fluorescencia de las hidrazonas.....	35
3.3.4 Separación cromatográfica de las hidrazonas	37
 4. DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES	 41
4.1 Antecedentes	41
4.1.1 Formación de aldehídos grasos en aceite vegetal	41
4.1.2 Tratamiento de muestras para la extracción de aldehídos	44
4.1.2.1 Extracción líquido-líquido.....	44
4.1.2.2 Microextracción líquido-líquido	45
4.1.2.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva	46
4.1.2.2 Microextracción en gota suspendida	47
4.2 Metodología	51
4.2.1 Condiciones cromatográficas para el análisis de aldehídos en muestras de aceite	51
4.2.2 Evaluación de la metodología de extracción-derivatización.....	51
4.2.3 Optimización de las condiciones derivatización de aldehídos	53
4.2.4 Validación de la metodología de determinación de aldehídos en muestras de aceite vegetal.....	53
4.2.5 Análisis de aldehídos en muestras de aceite vegetal	54
4.3 Resultados y discusiones	55
4.3.1 Evaluación de la metodología de extracción-derivatización.....	55
4.3.2 Optimización de las condiciones derivatización de aldehídos	57
4.3.3 Validación de la metodología de determinación de aldehídos en muestras de aceite vegetal comestible	62
4.3.4 Análisis de aldehídos en muestras de aceite vegetal	63
4.3.5 Comparación con otras metodologías	67
 5. DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	 70
5.1 Antecedentes	70
5.1.1 Biomarcadores	70
5.1.2 Aplicación de biomarcadores para cáncer	72



5.1.3 Formación de aldehídos en el organismo	73
5.1.3 Tratamiento de muestras para la extracción de aldehídos en muestras biológicas	74
5.1.3.1 Extracción en fase sólida (SPE)	75
5.1.3.2 Microextracción en fase sólida (SPME)	76
5.1.3.3 Extracción en fase sólida dispersiva (DSPE)	77
5.2 Metodología	80
5.2.1 Condiciones cromatográficas para el análisis de aldehídos en muestras biológicas	80
5.2.2 Selección del método de extracción/derivatización basado DSPE.	80
5.2.3 Optimización de las condiciones de extracción/derivatización basado en DSPE. .	83
5.2.4 Validación de la metodología de determinación de aldehídos en muestras de orina	84
5.2.5 Determinación de aldehídos en muestras biológicas	84
5.3 Discusión de resultados.....	86
5.3.1 Selección del método de extracción/derivatización basado DSPE.	86
5.3.2 Optimización de las condiciones de extracción-derivación de muestras de orina	89
5.3.3 Validación de la metodología de extracción-derivación para muestras de orina .	96
5.3.4 Determinación de aldehídos en muestras de orina.....	99
5.3.5 Análisis de aldehídos en muestras de plasma sanguíneo	102
5.3.6 Comparación con otras metodologías	105
6. CONCLUSIONES.....	108
REFERENCIAS	112
ANEXOS.....	128
Dictamen del Comité de Ética e Investigación ICSa	128



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de los aldehídos.	4
Figura 2	Principales técnicas de análisis instrumental empleadas en la determinación de aldehídos.	7
Figura 3	Compuestos empleados convencionalmente como agentes derivatizantes para la determinación de aldehídos	15
Figura 4	Rutas para la derivatización de aldehídos.	18
Figura 5	Mecanismo general de reacción entre aldehídos e hidrazonas.	24
Figura 6	Estructuras de compuestos fluorescentes empleados en la derivatización de aldehídos a) 4-N,N-dimetilamino-6-(4-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidrazina, b) N-metil-4-N,N-dimetilamino-6-(4'-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidrazina, c) 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-hidrazino-2,1,3-benzoxadiazol y d) 1,3,5,7-tetrametil-8-aminozida-difluoroboradiaza-s-indaceno.	25
Figura 7	Esquema de la reacción de derivatización entre NPH y los aldehídos pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal, b) hidrazonas obtenidas de la reacción de derivatización.	31
Figura 8	Espectros FTIR de a) hexanal b) NPH y c) hexanal-NPH	33
Figura 9	Espectros de RMN de ¹ H de a) hexanal, b) NPH y c) hexanal-NPH.	35
Figura 10	Espectros UV y de fluorescencia para el NPH e hidrazonas.	36
Figura 11	Perfiles cromatográficos a) separación de las hidrazonas con la columna C18, b) columna C8, c) gradiente empleando una columna C8.	38
Figura 12	Perfiles cromatográficos de la inyección individual de cada hidrazona.	39
Figura 13	Fragmentación de los principales ácidos grasos contenidos en alimentos para la formación de aldehídos.	43

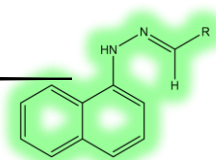


Figura 14	Representación de la extracción líquido-líquido convencional.	45
Figura 15	Representación de la microextracción líquido-líquido.	46
Figura 16	Representación de la microextracción líquido-líquido dispersiva.	47
Figura 17	Representación de la microextracción en gota suspendida a) espacio de cabeza b) inmersión directa.	49
Figura 18	Rutas evaluadas en la selección del método de extracción/derivatización basado LLME en muestras de aceite dopado con 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído.	52
Figura 19	Perfiles cromatográficos obtenidos para la evaluación de las modalidades de LLME-derivatización a) <i>in situ</i> , b) en la matriz analítica y c) en dos etapas.	56
Figura 20	Gráfico de Pareto del diseño factorial fraccionado 2^{5-2} para la selección de variables para la determinación de aldehídos en aceite.	59
Figura 21	Gráficos de superficie de las variables críticas. Valores constantes [NPH]= 156.0 μM ; Volumen de muestra= 3.0 mL; [HCl]= 100.0 mM; Temperatura= 60.0 $^{\circ}\text{C}$.	62
Figura 22	Contenido de aldehídos (Pentanal-Decanal) en cinco tipos aceite vegetal a diferentes tiempos de calentamiento.	65
Figura 23	Cromatogramas para la determinación de aldehídos en muestras de aceite de canola y cártamo (1 hora), muestras aceite de coco, soya y oliva (2 horas) calentadas a 100 $^{\circ}\text{C}$, y estándar de una muestra dopada con 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído (IS: Estándar interno, 1: Pentanal, 2: Hexanal, 3: Heptanal, 4: Octanal, 5: Nonanal, 6: Decanal).	66
Figura 24	Representación de la extracción SPE, 1) Acondicionamiento, 2) paso de la muestra, 3) lavado y 4) elución.	76
Figura 25	Representación de la SPME.	77
Figura 26	Representación de la DSPE.	78
Figura 27	Rutas evaluadas en la selección del método de extracción/derivatización basado DSPE en muestras de orina dopada con 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído.	83

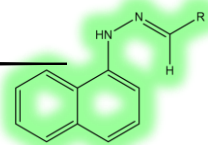
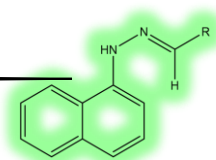
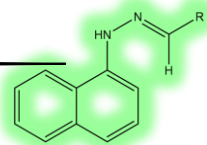


Figura 28	Perfiles cromatográficos obtenidos para la selección del método de extracción/derivatización basado DSPE en muestras de orina dopada con 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído a) derivatización directamente sobre el adsorbente b) extracción-derivatización en conjunto con solución de la muestra, c) derivatización en la matriz analítica y d) derivatización en dos etapas (C5, pentanal; C6, hexanal; C7, heptanal; C8, octanal; C9, nonanal; C10, decanal).	88
Figura 29	Diagrama de Pareto del diseño de Plackett-Burman obtenido para la evaluación del proceso de extracción-derivación de aldehídos contenidos en la orina ($t=2.131$).	92
Figura 30	Gráficos de superficie del diseño central compuesto para el proceso de extracción-derivación de aldehídos contenidos en orina. Valores constantes: [NPH]=600 μM ; [HCl]=75 mM; volumen de elución=3 mL.	95
Figura 31	Concentración promedio de los aldehídos en muestras de orina.	101
Figura 32	Biplot en un plano de las cargas de los dos primeros factores y puntuaciones de los dos nuevos factores en el plano bidimensional para el análisis de aldehídos en muestras de orina.	102
Figura 33	Concentración promedio de los aldehídos en muestras de plasma sanguíneo.	104
Figura 34	Perfiles cromatográficos obtenidos para la determinación de aldehídos: a) orina estándar dopada con 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído y 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de IS; b) muestra de orina de un paciente control; c) muestra de plasma sanguíneo de un paciente control (IS, estándar interno; C5, pentanal; C6, hexanal; C7, heptanal; C8, octanal; C9, nonanal; C10, decanal).	105



ÍNDICE DE TABLAS

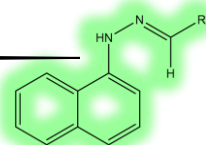
Tabla 1	Técnicas basadas en derivatizantes derivados de naftilo para la determinación de compuestos de interés.	27
Tabla 2	Matriz y resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-2} (n=2).	57
Tabla 3	Matriz y resultados del diseño Box-Behnken.	60
Tabla 4	ANOVA obtenido del diseño de experimentos Box-Behnken para la optimización del proceso de derivatización de aldehídos en muestras de aceite vegetal comestible.	61
Tabla 5	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado de aldehídos aceite vegetal comestible.	63
Tabla 6	Comparación de la metodología propuesta con otras metodologías para determinación de aldehídos en muestras de aceites vegetal comestible.	68
Tabla 7	Matriz y resultados del diseño de experimentos Plackett-Burman para el proceso de extracción-derivatización de aldehídos en muestras de orina.	90
Tabla 8	Matriz y resultados del diseño de experimentos central compuesto para el proceso de extracción-derivatización de aldehídos en muestras de orina.	93
Tabla 9	ANOVA obtenido del diseño de experimentos central compuesto para la optimización del proceso de derivatización de extracción-derivatización de aldehídos en muestras de orina.	94
Tabla 10	Parámetros analíticos de las líneas de calibrado de los aldehídos en muestras orina.	97
Tabla 11	Sensibilidades analíticas obtenidas de las líneas de calibrado para muestras de orina y plasma sanguíneo.	98
Tabla 12	Concentraciones de los aldehídos ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontradas en muestras de orina.	99
Tabla 13	Concentraciones de los aldehídos ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontradas en muestras de orina.	103
Tabla 14	Comparación de la metodología propuesta DSPE-HPLC-FLD para la determinación de aldehídos grasos en matrices biológicas con otras metodologías descritas en la literatura.	106



RESUMEN

Los aldehídos son compuestos ubicuos y de gran importancia en múltiples áreas. Se encuentran ampliamente distribuidos por lo que se han detectado y determinado en muestras de alimentos, biológicas y ambientales (Kishikawa et al., 2019). Dentro del organismo, pueden producirse mediante diversas reacciones oxidativas, como la peroxidación lipídica inducida por estrés oxidativo, la oxidación catalizada por enzimas. En los alimentos, se forman mediante diferentes vías de oxidación como subproductos en los procesos de maduración, deterioro y fermentación microbiana (El-Maghrabey et al., 2024).

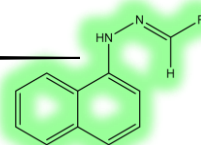
Estos compuestos son altamente reactivos y se asocia con propiedades citotóxicas, genotóxicas y neurotóxicas. En el organismo producen modificaciones de biomoléculas que afectan diversas funciones biológicas. En consecuencia, es necesario el análisis y determinación de los aldehídos en diferentes matrices siendo la cromatografía de líquidos de alta resolución la técnica de análisis instrumental más utilizada debido a su versatilidad, capacidad de análisis de múltiples analitos precisión y exactitud (Custodio-Mendoza et al., 2024). Además, se puede acoplar a una amplia variedad de sistemas de detección, tales como espectrometría de masas y detectores ultravioleta y fluorescencia (El-Maghrabey et al., 2024). No obstante, los aldehídos presentan limitantes para su análisis debido a que requieren de reacciones de derivatización para lograr su detección. Por otro lado, se encuentran en bajas concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$ a ng L^{-1}) y en matrices complejas, por lo cual, es necesario la aplicación de protocolos de preparación de muestra antes de su análisis, por lo que, diversos tratamientos de extracción en fase sólida y líquida se han empleado, (Kishikawa et al., 2019, Horká et al., 2022). Estas limitantes, siguen siendo un



RESUMEN

reto para la química analítica, razón por la cual, se siguen buscando agentes derivatizantes que cumplan con adecuada reactividad y cuantitatividad, además, que se puedan acoplar a métodos de extracción y técnicas de análisis instrumental.

Por lo tanto, el presente trabajo pretende integrar un proceso de extracción-derivatización empleando la 1-naftilhidrazina como agente derivatizante para la determinación de aldehídos en muestras de aceite vegetal comestible y biológicas (sangre y orina) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de fluorescencia.



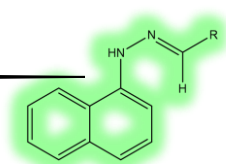
Antecedentes

1. ANTECEDENTES

1.1 Generalidades de los aldehídos

Los aldehídos al igual que los ácidos carboxílicos, ésteres, cetonas y otros derivados son compuestos que poseen en su estructura química un grupo carbonilo (carbono con enlace doble a oxígeno); sin embargo, el carbonilo de los aldehídos se encuentra unido al menos a un átomo de hidrógeno, lo que les permite tener alta reactividad (electrófilos), experimentando reacciones como oxidación, reducción y condensación (Martins da Silva et al., 2024). Los aldehídos pueden encontrarse en diferentes muestras como: ambientales, alimenticias y biológicas, por lo cual son reconocidos como contaminantes ambientales, indicadores de calidad o biomarcadores de enfermedades (Catalano et al., 2024, Martins da Silva et al., 2024).

Los aldehídos presentan propiedades genotóxicas, citotóxicas y mutagénicas atribuidas a su alta reactividad hacia diversas moléculas biológicas, lo que afecta e interrumpe procesos fisiológicos en los organismos provocando varios padecimientos, trastornos y enfermedades en los seres vivos (Catalano et al., 2024). Entre los padecimientos que se han descrito se encuentran: alergias, toxicidad pulmonar, hepática y embrionaria, diabetes, hipertensión, isquemia cerebral, múltiples tipos de cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Ahmed Laskar et al., 2019), siendo la inhalación e ingesta las principales rutas importantes de exposición a estos compuestos. Es por ello el sistema respiratorio y el corazón son los principales objetivos afectados por la toxicidad de los aldehídos (Sinharoy et al., 2019). La clasificación de los aldehídos más empleada es a partir de su estructura química, siendo tres los principales grupos: aromáticos, insaturados y saturados (Figura 1).



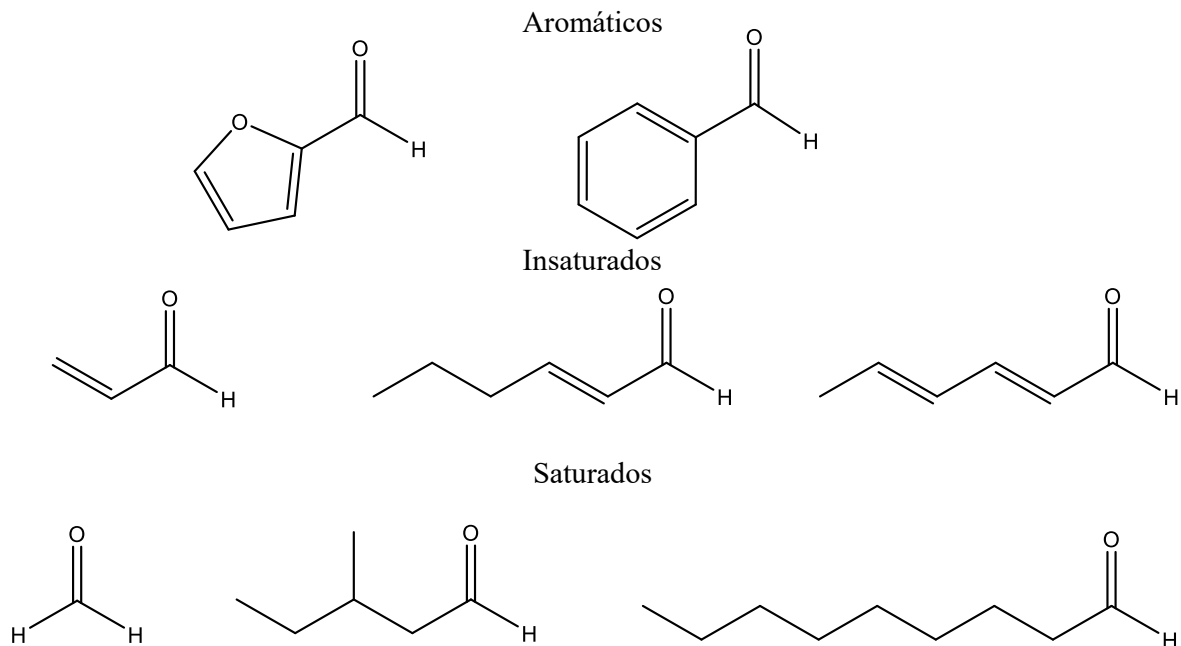
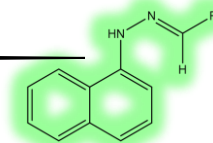


Figura 1. Clasificación de los aldehídos.

1.1.1 Clasificación de los aldehídos

Los aldehídos aromáticos son compuestos orgánicos cíclicos y planos que contienen electrones π deslocalizados y cumplen con la regla de Hückel. El benzaldehído y el furfural son los compuestos más representativos de esta clasificación, sin embargo, hay una amplia variedad de aldehídos aromáticos como cinamaldehído, cuminaldehído, anisaldehído y vainillina. Múltiples aldehídos aromáticos han demostrado actividad antimicrobiana hacia múltiples patógenos por lo que son empleados en el desarrollo de productos de cuidado personal y seguridad alimentaria (Chung et al., 2024, Neto et al., 2021, Yong et al., 2022). No obstante actualmente han sido restringidos en Europa y también se ha propuesto su eliminación debido a su alta toxicidad (Catalano et al., 2024).

Los aldehídos insaturados poseen en su estructura química enlaces dobles (carbono-carbono), algunos pueden ser α , β -insaturados

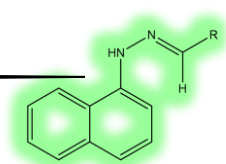


(monoinsaturados), polinsaturados o tener grupo -OH (hidroxialquenos) por lo que presenta una mayor reactividad y suele ser más perjudicial para la salud humana. La acroleína y el crotonaldehído son los principales aldehídos insaturados que mayor riesgo representan a la salud debido a que tienen capacidad carcinogénica, por lo cual, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el cáncer los clasificó dentro del Grupo 2A y 2B respectivamente (Marques et al., 2021).

Los aldehídos saturados son compuestos orgánicos que no poseen insaturaciones carbono-carbono y difieren entre sí en la longitud de la cadena carbonada, siendo el formaldehído el compuesto más simple que contiene unido al grupo carbonilo dos átomos de hidrógeno (Yuan et al., 2022). Dentro de los aldehídos saturados encontramos, aldehídos de cadena corta (formaldehído al butanal), aldehídos ramificados (3-metilbutanal), aldehídos de cadena larga también llamados aldehídos grasos (pentanal al undecanal) y dialdehídos como el malondialdehído y glutaraldehído (Kuykendall, 2010). Del mismo modo, los aldehídos saturados han sido descritos con múltiples efectos adversos para la salud humana dada su reactividad química (El-Maghrabey et al., 2021).

1.1.2 Contenido de aldehídos en diferentes matrices

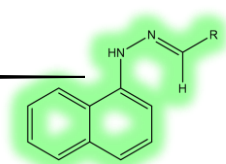
Considerando que existe una amplia gama de aldehídos su presencia ha sido descrita en múltiples matrices. En el ambiente se generan a partir de escapes industriales y de vehículos de combustión interna, de la combustión de cigarrillos, incendios forestales y emisiones de centrales eléctricas (O'Brien et al., 2005) por lo cual su presencia es detectada en el aire. Además, a pesar de que algunos aldehídos pueden presentar baja solubilidad en agua se han encontrado en cuerpos acuáticos (Basheer et al., 2010, Liu et al., 2010).



En matrices alimenticias los aldehídos han sido empleados como indicadores de calidad realizando un seguimiento de los niveles de concentración que se relaciona con el deterioro de los alimentos, debido a que provoca efectos negativos en el sabor y valores nutrimentales. Asimismo, una cantidad excesiva de consumo se considera nociva para la salud, porque son moléculas con elevada reactividad por lo cual pueden reaccionar con biomoléculas en el organismo. Se ha descrito su presencia en alimentos como: vegetales, carne, aceites, agua potable y bebidas alcohólicas (Douny et al., 2015, Kishikawa et al., 2019).

Por otro parte, en matrices biológicas, los diferentes aldehídos pueden ser (1) exógenos y (2) endógenos. Los exógenos son obtenidos a partir de la alimentación o mediante la inhalación en el ambiente, los endógenos son generados en el organismo mediante diferentes rutas metabólicas. Actualmente los aldehídos suelen ser relacionados como biomarcadores empleados para la predicción y el diagnóstico temprano de enfermedades, ya que el desarrollo de estas puede alterar los niveles de aldehído en el organismo, por lo cual, el análisis y determinación de estos compuestos en matrices biológicas se ha enfocado en muestras como: orina, plasma sanguíneo, sangre y aliento (El-Maghrabey et al., 2024).

Los aldehídos se encuentran en bajas concentraciones que van desde los $\mu\text{g L}^{-1}$ a los ng L^{-1} y normalmente las matrices suelen ser complejas debido a que contienen diferentes interferentes. Por lo anterior, resulta fundamental en diferentes campos como química analítica, ciencias ambientales, clínicas y la química de alimentos contar con técnicas de análisis instrumental eficaces para su determinación.



1.2 Técnicas instrumentales para la determinación de aldehídos

Las técnicas analíticas de análisis instrumental empleadas deben garantizar una adecuada sensibilidad y selectividad así como adecuada precisión y exactitud para la determinación de una amplia variedad de aldehídos, entre estas se destacan las espectroscópicas, electroquímicas y cromatográficas (Figura 2).

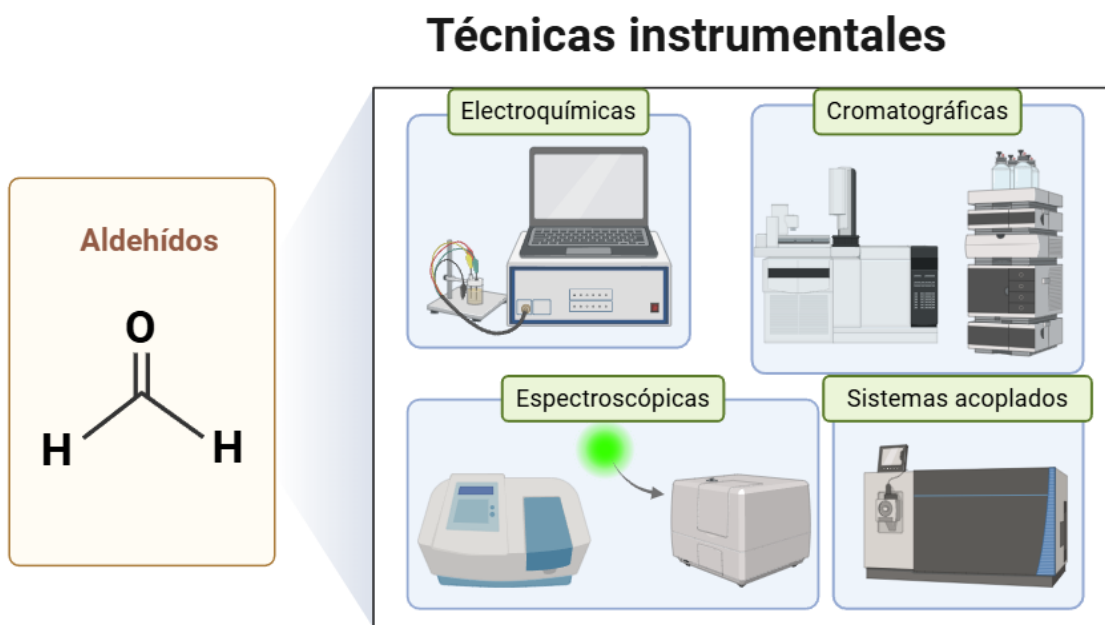
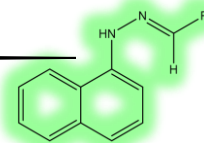


Figura 2. Principales técnicas de análisis instrumental empleadas en la determinación de aldehídos.

1.2.1 Técnicas espectrofotométricas

Los métodos basados en espectroscopia ultravioleta-visible (UV-Vis) miden la absorción de los compuestos al ser irradiados con un haz de luz a una longitud de onda específica. Los compuestos orgánicos deben tener en su estructura grupos cromóforos (estructuras con enlaces dobles conjugados) para observar la absorción en la región ultravioleta o visible. La cantidad de



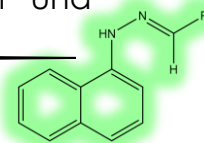
luz absorbida por un compuesto en solución es directamente proporcional a la concentración de la sustancia.

Entre las metodologías que se han desarrollado empleando métodos espectrofotométricos, se ha descrito la determinación del 5-hidroxiacetilfurfural en miel, mediante la reacción de derivatización del 5-hidroxiacetilfurfural y el reactivo de Seliwanoff (resorcinol-HCl) con detección a 485 nm (Besir et al., 2021). Otra metodología que se encuentra descrita está basada en la determinación de aldehídos α , β -monoinsaturados (trans-2-hexenal, trans-2-heptenal, trans-2-decenal hidroxi-2-hexenal y 4-hidroxi-2-nonenal) y α , β -diinsaturados (heptadienal y 2,4-decadienal) mediante derivatización con 2,4-dimetilpirrol con longitudes de onda de detección óptimas 580 y 680 nm. Sin embargo la metodología se centró solamente en la determinación en trans -2-hexenal y 2,4-heptadienal (Lui et al., 2026).

Generalmente, las metodologías que emplean técnicas UV-Vis presentan diferentes desventajas debido a que son afectadas con mayor frecuencia por la interferencia de otros compuestos dada la complejidad de la muestra; además, las concentraciones que alcanza no son adecuadas para sistemas donde se requieren límites de detección (LODs) en el intervalo de los ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$. Por otra parte, como alternativa también se han empleado técnicas fluorimétricas; estas se basan en que algunos compuestos que poseen grupos fluoróforos absorben luz ultravioleta y emiten esta energía instantáneamente en forma de luz de mayor longitud de onda. Estos métodos se ven limitados debido a que suelen aplicarse a el análisis monoanalito.

1.2.2 Técnicas electroquímicas

Las técnicas electroquímicas pueden proporcionar información analítica cuantitativa o semicuantitativa del contenido/concentración en una

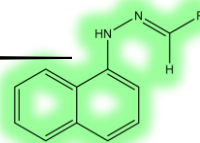


muestra del analito o los analitos de interés. Estas se basan en la detección de una propiedad eléctrica (resistencia, corriente y potencial), que se detectan y miden bajo diferentes principios, como potenciometría, voltamperometría e impedancia (Phogat et al., 2024). Son descritas como técnicas analíticas útiles con ventajas como alta sensibilidad, velocidad de análisis, minimización del consumo de solvente y muestra (Farghaly et al., 2014).

Se ha descrito un método para determinar el contenido de etanal, propanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y furfural en muestras de agua y zumo de naranja mediante derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina y detección por voltamperometría de onda cuadrada (Boumya et al., 2017a). Otra técnica descrita es la espectroscopia de impedancia electroquímica para la determinación de etanal, propanal, heptanal y hexanal con derivatización con 2,4-dinitrofenilhidrazina en muestras de agua, zumo de naranja y vinagre (Boumya et al., 2017b). También se desarrolló un método para determinar siringaldehído y vainillina en coñac y brandy mediante voltamperometría por diferencial de pulsos (Ziyatdinova et al., 2023). Del mismo modo, las metodologías electroquímicas presentan diferentes desventajas por la complejidad de la muestra y son limitadas para análisis multianalito.

1.2.3 Métodos cromatográficos

Los métodos que se desarrollan empleando técnicas cromatográficas se basan en la separación de los componentes contenidos en una muestra mediante un sistema que consiste en una fase estacionaria y una fase móvil. Las fases estacionarias empleadas en cromatografía pueden ser un líquido enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o



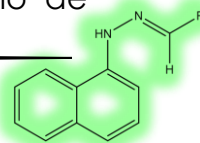
partículas sólidas empaquetadas dentro de una columna, mientras que las fases móviles usadas son un líquido o un gas (Skoog et al., 2020).

Los análisis de aldehídos mediante técnicas cromatográficas implican cromatografía de gases (GC por sus siglas en inglés) y cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés). Ambas técnicas son utilizadas en diferentes áreas para identificar, analizar o separar uno o varios analitos presente en una muestra. Presentan múltiples ventajas debido a su enorme versatilidad, capacidad de análisis multianalito, sensibilidad analítica así como una adecuada precisión. Además, pueden acoplarse con una amplia variedad de sistemas de detección, tales como espectrometría de masas (MS), ultravioleta (UV) y fluorescencia (FLD) para HPLC, y detección de captura de electrones, ionización de llama (FID), y MS en métodos por GC (El-Maghrabey et al., 2024).

1.2.3.1 Cromatografía de gases

La determinación empleando GC se realiza mediante la evaporación de la muestra donde los componentes se separan entre la fase móvil que es un gas y la fase estacionaria líquida o sólida retenida en una columna. La elución ocurre por el transporte de los analitos mediante la fase móvil inerte que no interactúa con los componentes de la muestra. La GC se clasifica en cromatografía gas-sólido y cromatografía gas-líquido dependiendo de si la fase estacionaria es un adsorbente sólido o una película que recubre la pared interna de la columna. Las fases estacionarias más utilizadas para la separación son: columnas con polisiloxanos con metilo o fenilo, y polietilenglicol con longitudes que van desde los 15 m hasta los 100 m (Skoog et al., 2020).

Cuando CG se combina con MS se puede realizar la determinación directa de aldehídos con alta volatilidad aplicando extracción de espacio de

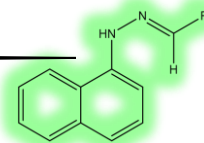


cabeza (Zhang et al., 2019). No obstante, se prefieren emplear la derivatización de los aldehídos para el desarrollo de las diferentes metodologías. A pesar de que GC puede acoplarse con diversos métodos de detección, como captura de electrones o FID son muy pocos los métodos que han sido descritos empleando estos sistemas (Khuhamar et al., 2008; Poole, 2013), prefiriendo MS como la detección más utilizada debido a la sensibilidad analítica que proporciona.

Dentro de los métodos que han sido desarrollado para la determinación de aldehídos, se encuentra el de Khuhamar et al. (2008) quienes desarrollo un método para el análisis de metilglioxal en suero de pacientes diabéticos empleando 1,2-diaminopropano como derivatizante y GC-FID. Por otra parte se encuentra descrita la determinación de formaldehído, etanal, propanal, butanal, pentanal, glioxal, benzaldehído, el 3-metilbenzaldehído, 2,5-dimetilbenzaldehído, 2-etilbenzaldehído y metilglioxal en muestras de agua potable mediante derivatización con o-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina y análisis mediante GC-MS (Serrano et al., 2013). Del mismo se encuentra descrita una metodología para el análisis de etanal, propanal, butanal, 3-metilbutanal y pentanal en muestras de aire mediante GC-FID.

1.2.3.2 Cromatografía de líquidos

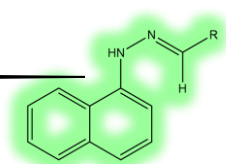
HPLC es la técnica cromatográfica de mayor versatilidad utilizada, debido a la facilidad para analizar y determinar múltiples compuestos que son térmicamente lábiles, semivolátiles, o no volátiles; además posee ventajas debidas a su elevada sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y capacidad de análisis multianalito. HPLC en comparación con GC no emplea un gas como fase móvil, sino utiliza un solvente líquido que arrastra directamente al analito a través de la columna cromatográfica a altas presiones y la fase móvil eluye al analito mediante interacciones específicas.



Esta técnica suele clasificarse con base en el mecanismo de separación y tipo de fase estacionaria (reparto, adsorción, intercambio iónico, exclusión molecular, afinidad y quiral) (Skoog et al., 2020). Siendo la cromatografía de reparto en fase inversa la modalidad aplicada en la determinación de aldehídos (Kishikawa et al., 2019). Las fases estacionarias comúnmente empleadas son columnas hidrofóbicas empacadas con partículas de tamaños de 3 a 10 μm de materiales como octilsilano (C8) u octadecilsilano (C18), las cuales permiten separar a los adecuadamente a los analitos de interés.

Los métodos diseñados para la determinación de aldehídos como HPLC pueden acoplarse a tres sistemas de detección: (1) UV-Vis, que es el sistema convencional y simple. Bajo esta modalidad algunos aldehídos aromáticos pueden determinarse sin derivatización (Loi et al., 2011), sin embargo, para cierto tipo de aldehídos es necesaria la derivatización, adicionando un grupo cromóforo que permite la detección.

Por otro lado también puede acoplarse a (2) MS. HPLC-MS se ha convertido en la principal técnica de análisis debido a la especificidad de detección y sensibilidad que se alcanza. De igual forma, dado que la eficiencia de ionización del analito influye en gran medida en la sensibilidad de los instrumentos, se requiere de la derivatización para mejorar la eficiencia de ionización de los aldehídos (Awad et al., 2015). El compuesto de derivatización para HPLC-MS debe poseer un grupo funcional ionizable. Posteriormente se debe seleccionar el modo de ionización apropiado (ionización química a presión atmosférica, desorción/ionización láser asistida por matriz o ionización por electrospray). A pesar de que HPLC-MS es considerado un método selectivo, es afectado por la matriz analítica teniendo influencia en la eficiencia de ionización de los analitos. Además,

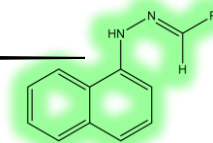


los instrumentos para MS son costosos lo que limita el alcance a los laboratorios de análisis convencionales.

Aunque los métodos basados en estos sistemas de detección son usados de manera convencional, presentan limitantes como la baja sensibilidad de la detección UV, y costos elevados de equipos de MS. En consecuencia, (3) la detección por fluorescencia es una alternativa viable, sensible y de mayor selectividad que la detección UV, y es comparable con técnicas HPLC-MS, sumado a que suele ser de menor costo. Del mismo modo se deben emplear diversas reacciones de derivatización para convertir aldehídos en compuesto altamente fluorescentes.

Entre las metodologías basadas en HPLC, ha sido descrita la determinación de malondialdehído, 4-hidroxi-2-hexenal y 4-hidroxi-2-nonenal en aceites vegetales mediante derivatización con 2,4- dinitrofenilhidrazina y HPLC acoplada a un detector de matriz de fotodiodos (Ma y Liu, 2017). Otro método que se encuentra descrito formaldehído, etanal, acroleína, propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal y benzaldehído empleando 2,4- dinitrofenilhidrazina como derivatizante y HPLC-MS como técnica de análisis (Gosetti et al., 2011). Además, se empleó HPLC-FLD y 1,3,5,7-tetrametil-8-aminozida-difluoroboradiaza-s-indaceno hidrazina como derivatizante para la determinación de aldehídos alifáticos (formaldehído, etanal, propanal, butanal, pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, undecanal y dodecanal) en muestras de suero.

Como se ha mencionado para lograr la determinación de aldehídos generalmente se debe realizar un proceso de derivatización, con la finalidad de lograr la detección independientemente de la técnica de análisis instrumental a emplear. Dado a que es un paso crítico han sido descrito diferentes agentes de derivatización.

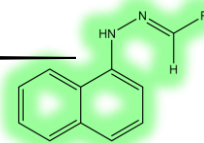


1.3 Compuestos para la derivatización de aldehídos

Los aldehídos contenidos en cualquiera que sea la matriz normalmente no poseen una fracción detectable en su estructura química ya sea un grupo cromóforo, fluoróforo o grupo ionizable estable; en consecuencia los hace inadecuados para su detección y determinación directa por sistemas cromatográficos, por lo cual, se requieren de reacciones químicas que permitan modificar estructuralmente a los aldehídos. Estas reacciones, sin importar el tipo, son conocida como “reacciones de derivatización analítica” (Temerdashev et al., 2024). La derivatización permite introducir una fracción detectable que mejora la sensibilidad y estabilidad cromatográfica, así como el comportamiento de retención en las fases estacionarias, obteniendo una resolución y precisión adecuadas (El-Maghrabey et al., 2018).

Bajo este concepto la selección de compuesto derivatizante es un paso crítico en la determinación de aldehídos, por lo cual el compuesto debe cumplir ciertas características: (a) los productos de derivatización deben ser estables, (b) los productos deben diferenciarse y separarse adecuadamente cuando se emplean técnicas de análisis instrumental y (c) la reacción debe ser cuantitativa (Vogel et al., 2000).

La selección del agente derivatizante depende de la técnica de análisis instrumental y la modalidad de detección empleada. Los diferentes agentes empleados en la determinación de aldehídos se pueden clasificar en tres grupos dependiendo el tipo de compuesto a emplear en (1) hidroxilaminas, (2) hidrazinas y (3) otros compuestos (Figura 3).



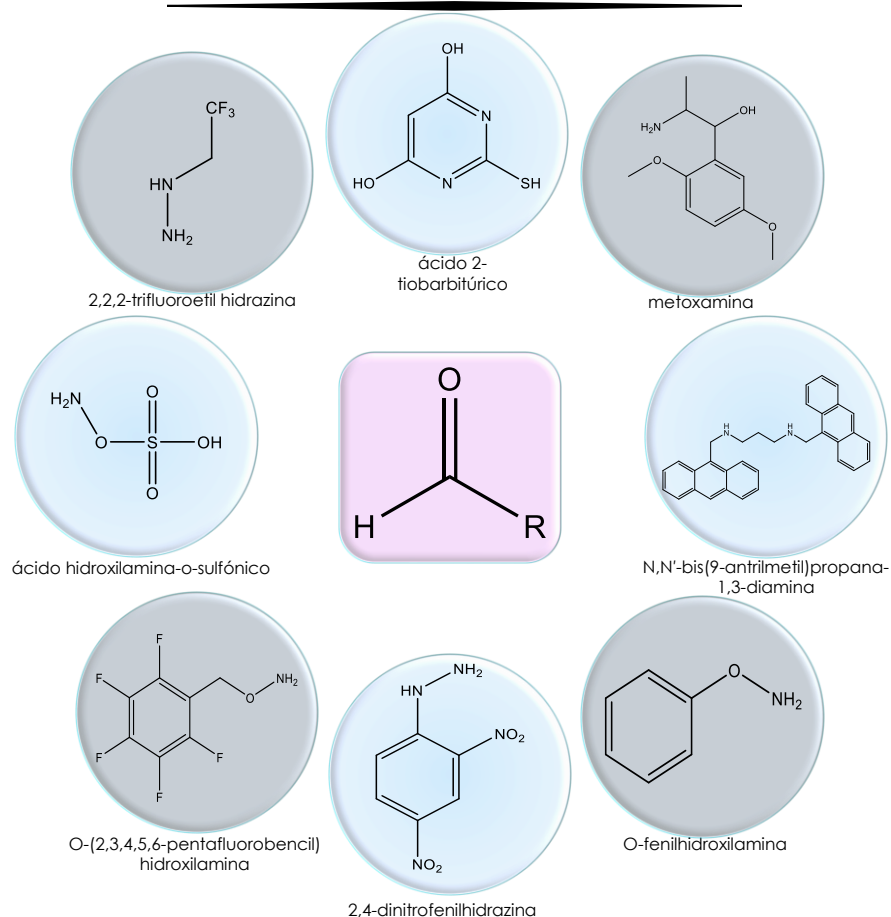
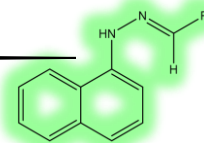


Figura 3. Compuestos empleados convencionalmente como agentes derivatizantes para la determinación de aldehídos

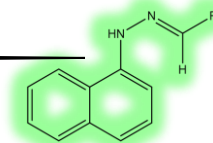
Las hidroxilaminas (RONH_2) son compuestos que reaccionan con moléculas que poseen en su estructura un grupo carbonilo (típicamente aldehídos y cetonas) para la formación de oximas (aldoxima y cetoxima, respectivamente). Esta reacción se conoce como oximación y se lleva a cabo en solventes con polaridad media, normalmente alcoholes (Chandran et al., 2024). La o-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina es el compuesto más utilizado como agente derivatizante para métodos basados en GC (Kishikawa et al., 2019). También se han empleado las siguientes hidroxilaminas para la derivatización de aldehídos: o-fenilhidroxilamina



(Troudt et al., 2022), ácido hidroxilamina-o-sulfónico (Quinn et al., 2016) y N-((1-fenil-1H-1,2,3-triazol-4-il) metil) hidroxilamina (Du et al., 2025).

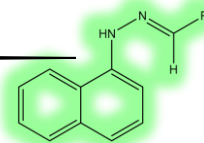
Las hidrazinas (RHNNH_2) son los compuestos más empleados como agentes derivatizantes, acoplándose a diferentes técnicas de análisis instrumental como electroforesis capilar, métodos UV, HPLC y GC. Las hidrazinas reaccionan con el grupo carbonilo de aldehídos y cetonas para formar las respectivas hidrazonas. La 2,4-dinitrofenilhidrazina es la hidrazina más utilizada para el análisis de aldehídos mediante HPLC-UV, HPLC-MS y GC-MS (Kishikawa et al., 2019; El-Maghrabey et al., 2024). Además, se ha implementado el ácido 4-hidrazinobenzoico (de Lima et al., 2018) y la benzohidrazida (Donegatti et al., 2017) para métodos basados en HPLC-UV, la 5-(dimetilamino)-1-naftalenosulfónico hidrazida (Tomono et al., 2015) y pentafluorofenilhidrazina (Gabbanini et al., 2015) para métodos HPLC-MS y el 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-hidrazino-2,1,3-benzoxadiazol (Ali et al., 2014) y 2-[2-(7H-dibenzo[a,g]carbazol-7-il)-etoxi]etilcarbonilhidrazina (You et al., 2009) para métodos HPLC-FLD.

Dado que algunas oximas e hidrazonas forman un enlace imina ($\text{C}=\text{N}$), a menudo exhiben isomería geométrica syn y anti o isómeros E y Z con diferentes proporciones que pueden poseer diferentes propiedades (Chandran et al., 2024). Esto es señalado como una limitante en la determinación de aldehídos empleando estos agentes. En consecuencia otros compuestos han surgido como alternativas para la derivatización de aldehídos. Así pueden formar imidazoles cuando se emplea el 1,2-di(2-furil)-1,2-etanodiona (Ali et al., 2013), también pueden emplearse diferentes aminas como el 1,2-diamino-4,5-dimetoxibenceno (Imazato et al., 2015) y 4-metoxi-o-fenilendiamina (Ojeda et al., 2014). Además, se ha empleado el ácido 1-pireneborónico (El-Maghrabey et al., 2018) y el ácido 2-tiobarbitúrico (Moselhy et al., 2013).



1.4 Rutas de derivatización

Los aldehídos están contenidos en diferentes matrices con diferentes interferentes y polaridades, por lo que es necesario implementar rutas que permitan su derivatización. Diferentes alternativas analíticas han sido desarrolladas como la derivatización *in situ* (Figura 4a), esta es la estrategia de derivatización más empleada debido a que disminuye el número de etapas al extraer-derivatizar a los aldehídos en un solo paso (Baghdady y Schug, 2016). El agente derivatizante se inmoviliza o se coloca en la fase extractante y posteriormente se pone en contacto con la matriz y los aldehídos, se extraen a la fase adsorbente/extractante y reaccionan con el agente derivatizante; esto disminuye la pérdida de analito, y aumenta la precisión de la metodología (Atapattu, 2023). Otra ruta (Figura 4b) que se ha explorado es la derivatización y extracción de los productos en dos etapas: el derivatizante se adiciona a la solución matriz donde se lleva la reacción y posteriormente se realiza la extracción de los productos ya derivatizados (Zhang et al., 2010). La última ruta que ha sido descrita es mediante el cambio en el medio de reacción donde los aldehídos se extraen de la matriz, posteriormente los aldehídos reaccionan con el agente derivatizante en el solvente adecuado (Figura 4c).



El diagrama ilustra tres estrategias de derivatización:

- a) Derivatización In situ:**
 - Extracción:** Se muestra la separación de la **Fase sólida** (conteniendo analitos) de la **Fase líquida** (conteniendo derivatizante).
 - Reacción en el adsorbente o extractante:** El analito (verde) reacciona con el derivatizante (azul) en la fase sólida, formando el producto derivatizado (verde-azul).
 - Recuperación del producto derivatizado:** El producto derivatizado se recupera de la fase sólida.
 - Elución:** El producto derivatizado se eluye de la fase sólida.
 - Separación de fases:** Se separa el producto derivatizado de la fase líquida.
- b) Derivatización en la matriz analítica:**
 - Reacción en la matriz:** El analito (verde) reacciona con el derivatizante (azul) directamente en la matriz analítica.
 - Extracción:** Se muestra la separación de la **Fase sólida** (conteniendo analitos) de la **Fase líquida** (conteniendo derivatizante).
 - Recuperación del producto derivatizado:** El producto derivatizado se recupera de la fase sólida.
 - Elución:** El producto derivatizado se eluye de la fase sólida.
 - Separación de fases:** Se separa el producto derivatizado de la fase líquida.
- c) Derivatización cambiando el medio de reacción:**
 - Extracción:** Se muestra la separación de la **Fase sólida** (conteniendo analitos) de la **Fase líquida** (conteniendo derivatizante).
 - Recuperación de los analitos:** Los analitos se recuperan de la fase sólida.
 - Reacción en el solvente orgánico:** Los analitos reaccionan con el derivatizante en un solvente orgánico.
 - Elución:** El producto derivatizado se eluye de la fase sólida.
 - Separación de fases:** Se separa el producto derivatizado de la fase líquida.

Legenda:

- ◆ Analito
- ✧ Derivatizante
- ✧ Producto

El presente trabajo propone el diseño de metodologías de derivatización para la determinación de aldehídos grasos en muestras de diferentes polaridades mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia.

OBJETIVOS

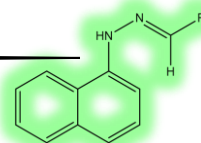
2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Desarrollar metodologías de derivatización empleando la 1-naftilhidrazina para la determinación de aldehídos grasos como indicadores de calidad alimenticia y biomarcadores, mediante cromatografía de líquidos de alta resolución con detección de fluorescencia.

2.2 Objetivos Específicos

- I. Caracterizar los productos de derivatización entre los aldehídos y la 1-naftilhidrazina mediante técnicas instrumentales.
- II. Diseñar y validar la metodología LLME-HPLC-FLD para la determinación de aldehídos grasos en aceites vegetales comestible.
- III. Diseñar y validar la metodología DSPE-HPLC-FLD para la determinación de aldehídos grasos en muestras biológicas.



Caracterización de la reacción de derivatización entre los aldehídos grasos y la 1-naftilhidrazina

3. CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

3.1 Antecedentes

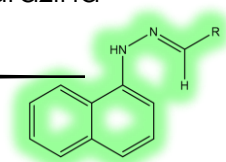
3.1.1 Generalidades de los aldehídos grasos

Los aldehídos grasos son compuestos generados a partir del metabolismo de ácidos grasos de cadena larga que pueden estar contenidos en los alimentos y en los seres vivos. Los principales aldehídos grasos formados son: 1) aldehídos insaturados (mono o poliinsaturados) y 2) aldehídos grasos saturados con cadenas media a larga que varían de 5 a 12 átomos de carbono (Rizzo, 2014). Ambos poseen efectos adversos para la salud, incluidos los mutagénicos (Catalano et al., 2024), genotóxicos (Zhao et al., 2025) y carcinogénicos (Ghavidel et al., 2025).

Dado que los aldehídos grasos son los primeros productos metabólicos generados a partir de los ácidos grasos, permiten dar un seguimiento en su metabolismo, por lo que son empleados como agentes en control de calidad de alimentos, biomarcadores para enfermedades o monitores ambientales dependiendo la matriz (Kishikawa et al., 2019). Los aldehídos alifáticos permiten un seguimiento adecuado, ya que los aldehídos insaturados poseen una mayor reactividad que les permite reaccionar con múltiples compuestos, lo genera diferentes errores al realizar un seguimiento metabólico.

3.1.2 Mecanismo de reacción entre aldehídos e hidrazinas

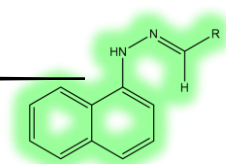
Generalmente el mecanismo de reacción entre los aldehídos e hidrazinas ocurre de la misma forma, independientemente de la hidrazina



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

seleccionada, La reacción forma un producto de deshidratación (perdida de una molécula de agua), denominada hidrazona. Las hidrazonas son un tipo de base de Schiff que contiene un enlace doble entre el átomo de carbono del carbonilo del aldehído y el nitrógeno terminal de la hidrazina. Son una base de Schiff más estable en comparación con la formada entre una amina, debido a que la hidrazona es menos susceptible a la hidrólisis para regenerar los productos de partida, por lo cual son los agentes derivatizantes más empleados.

La Figura 5 muestra el mecanismo general de reacción entre aldehídos e hidrazonas. El mecanismo de reacción de los aldehídos se lleva a cabo en solventes polares como el metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN) e incluso en agua porque permiten estabilizar intermediarios carga en las reacciones. La reacción implica dos etapas principales y debe ser catalizada por un medio ácido, la protonación del grupo carbonilo (electrófilo; Figura 5a) después, el nitrógeno terminal de la hidrazina (nucleófilo) ataca al carbonilo protonado para formar un intermedio tetraédrico neutro denominado carbinolamina. La transferencia de protones del átomo de nitrógeno al oxígeno, donde ocurre la deshidratación de la carbinolamina mediante la protonación del grupo OH; finalmente, la desprotonación del nitrógeno permite formar la hidrazona (Boumya et al., 2017a; Figura 5b).



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

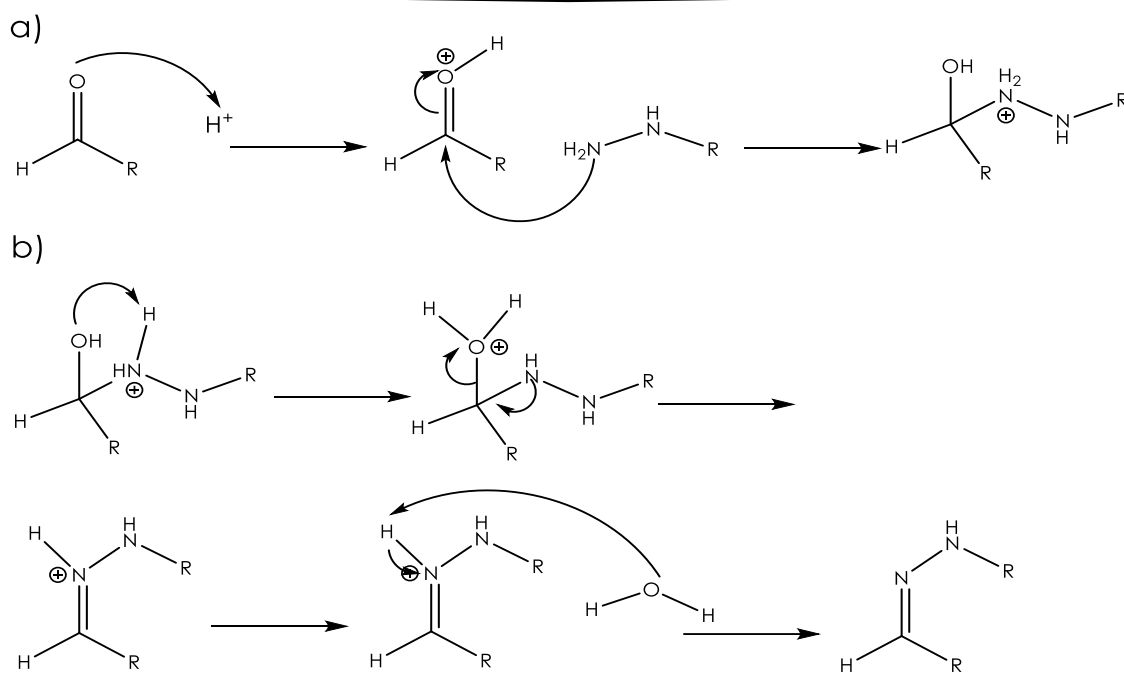
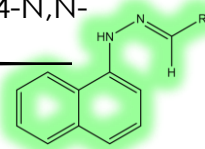


Figura 5. Mecanismo general de reacción entre aldehídos e hidrazonas.

3.1.3 Agentes derivatizantes fluorescentes

La 2,4-dinitrofenilhidrazina es el agente derivatizante comúnmente empleado en la determinación cualitativa y cuantitativa de aldehídos, no obstante, este compuesto presenta limitaciones, ya que las metodologías desarrolladas necesitan la adicción de un exceso del derivatizante por lo que el compuesto puede precipitar, limitando el factor de preconcentración (Zhang et al., 2025). Además, la presencia residual del exceso de agente derivatizante interfieren con la detección y separación instrumental por lo que la precisión y exactitud analíticas se ven comprometidas (Peng et al., 2026). Otra limitante está relacionada con los LODs obtenidos, debido a que cuando se acopla a sistemas de detección UV-Vis no logran alcanzar las concentraciones que se requieren.

En consecuencia ha emergido el uso de hidrazinas fluorescentes para la determinación de aldehídos. Compuestos fluorescentes incluyen la 4-N,N-



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

dimetilamino-6-(4-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidrazina (Figura 6a) y N metil-4-N,N-dimetilamino-6-(4'-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidrazina (Figura 6b; Kempter et al., 2002), 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-hidrazino-2,1,3-benzoxadiazol (Figura 6c; Imazato et al., 2014) y 1,3,5,7-tetrametil-8-aminozida-difluoroboradiaza-s-indaceno (Figura 6d; Xiong et al., 2010). Sin embargo, estos compuestos requieren procedimientos de síntesis complejos, además su sensibilidad o aplicabilidad a aldehídos grasos suele ser limitada por la baja polaridad de los productos derivatizados lo que complica su acoplamiento a sistemas de separación convencionales.

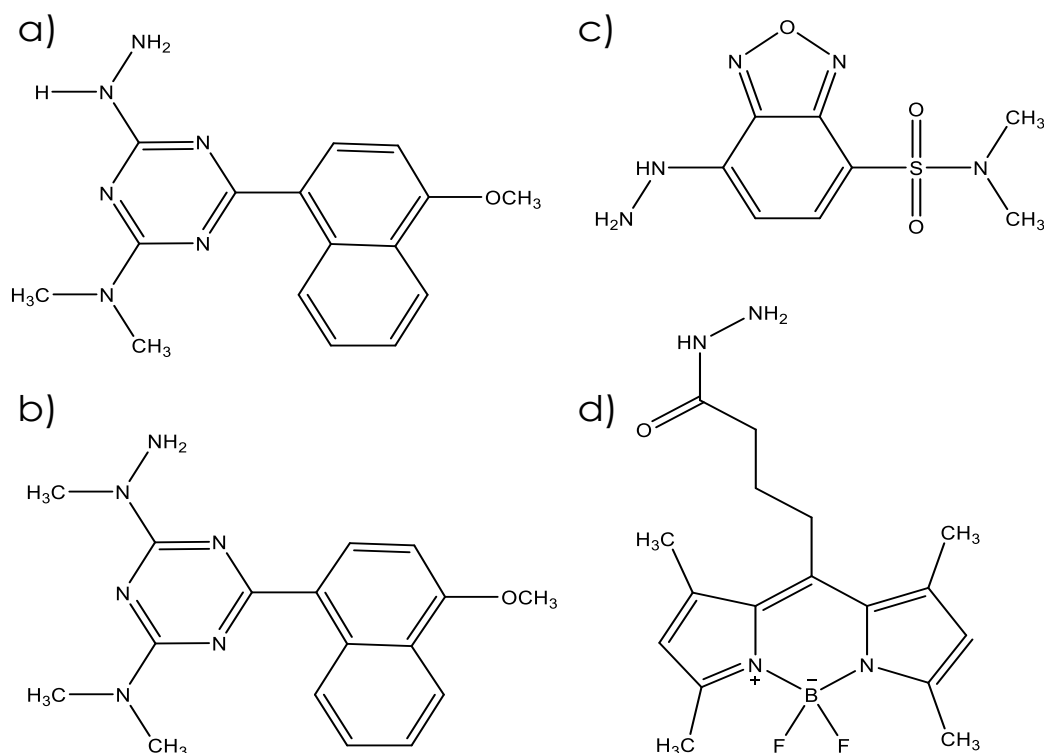
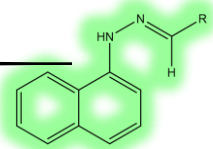
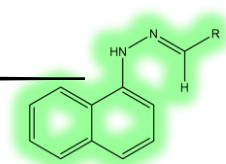


Figura 6. Estructuras de compuestos fluorescentes empleados en la derivatización de aldehídos a) 4-N,N-dimetilamino-6-(4-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidrazina, b) N-metil-4-N,N-dimetilamino-6-(4'-metoxi-1-naftil)-1,3,5-triazina-2-hidrazina, c) 4-(N,N-dimetilaminosulfonil)-7-hidrazino-2,1,3-benzoxadiazol y d) 1,3,5,7-tetrametil-8-aminozida-difluoroboradiaza-s-indaceno.



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

Recientemente, el uso de compuestos derivados de naftilo con estructuras menos compleja es una alternativa que ha sido planteada en técnicas de derivatización fluorescentes, permitiendo, su aplicación en analitos polares y no polares además poseen adecuada estabilidad química e intensidad de emisión fluorescente que mejora significativamente la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos. Por otro lado, al incorporar estructuras más sencillas, las reacciones de derivatización proceden con mayor eficacia y los productos de derivatización no suelen presentar inconvenientes cuando se acoplan con técnicas cromatográficas. La Tabla 1 presenta algunos ejemplos de uso de compuestos derivatizantes derivados de naftilo, estos métodos describen ser competentes y efectivos en el analito enfocado con bajos LODs, adecuada sensibilidad, precisión y exactitud.

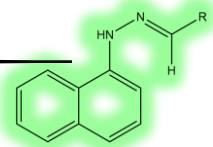


CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

Tabla 1. Técnicas basadas en derivatizantes derivados de naftilo para la determinación de compuestos de interés.

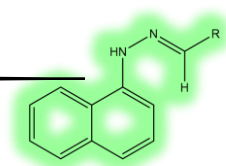
Analitos	Agente derivatizante	Método de determinación	LOD	Muestra	Referencia
Colesterol y sitosterol	Cloruro de acilo de naproxeno	HPLC-FLD	25 nM	Leche, Saliva y Orina	Lin et al. (2007)
Acrilamida	2-naftalenotiol	HPLC-FLD	129.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$	Papas fritas	Martínez et al. (2018)
Metanol, etanol, propanol y butanol	3-naftil-1-(4-trifluorometil)-5-(4-carboxifenil)-2-pirazolina	HPLC-FLD	0.6-1.8 μM	Chocolates y jarabe para la tos	Al-Sabahi et al. (2021)
Ácido málico	1-(1-naftil)etilamina	HPLC-UV	0.5 ng	Productos farmacéuticos	Mei et al. (2022)
Ácido L-aspartico, ácido γ -aminobutírico, ácido L-glutámico, clorhidrato de glicina, L-triptófano, diclorhidrato de histamina, L-tirosina y tiramina	Naftaleno-2,3-dicarboxaldehído	Espectroscopia de fluorescencia	No reportado	Soluciones estándar	Custodio-Gonzalez-Quevedo et al. (2023)
D-glucosona, 3-desoxiglucosona, glioxal, metilglioxal, diacetilo y pentano-2,3-diona	2,3-diaminaftaleno	HPLC-FLD	0.0022-0.0127 μM	Medicina tradicional china	Xu et al. (2023)
Putrescina, espermidina y espermina	4-dimetilamino-1-naftilo	HPLC-UV	0.1-0.3 μM	Cereales, legumbres, leche de soja, bebida de avena, zumo de naranja, vino tinto y células carcinogénicas	Chen et al. (2025a)
Espermidina y espermina	Isotiocianato de 4-dimetilamino-1-naftilo	HPLC-FLD	0.1 μM	Sangre	Chen et al. (2025b)

Por lo cual, es necesario evaluar agentes fluorescentes que contengan en su estructura el grupo naftilo para la derivatización de aldehídos grasos. En



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

este sentido, se destaca la 1-naftilhidrazina (NPH) como una potencial alternativa, debido a que es un reactivo poco explorado en el desarrollo de metodologías de derivatización para aldehídos grasos. Este compuesto estructuralmente posee el grupo hidrazino que proporciona una adecuada reactividad y selectividad a los compuestos de interés, además la baja complejidad estructural permitirá integrarse a un sistema de cromatografía de líquidos sumado a que el grupo naftilo permitirá su detección mediante fluorescencia.



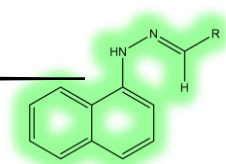
3.2 Metodología

3.2.1 Reactivos

Los aldehídos pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal, bromuro de potasio (KBr), cloroformo deuterado (CDCl_3), dimetilsulfóxido deuterado- d_6 y el Clorhidrato de 1-naftilhidrazina se obtuvieron por Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos). El MeOH, ACN, ácido clorhídrico (HCl) y ácido acético se obtuvieron por J.T. Baker (Phillipsburg, Nueva Jersey, Estados Unidos). La separación cromatográfica se realizó empleando una solución acuosa de ácido acético al 1% y MeOH. La solución acuosa de ácido acético al 1% se filtró utilizando una membrana de éster de celulosa mixta de 0.45 μm (Advantec MFS Dublin, California, Estados Unidos) y el MeOH se filtró utilizando un filtro Pall FP450 de difluoruro de polivinilideno de 0.45 μm (Pall Corporation, Port Washington, Nueva York, Estados Unidos).

3.2.2 Preparación de las hidrazonas

Las hidrazonas empleadas para la caracterización se obtuvieron a partir de NPH y los aldehídos grasos pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal. En un tubo de ensayo se hizo reaccionar 5 mL de una solución de ACN que contenía $5.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ de NPH y el aldehído correspondiente en una proporción molar 1:1 acidificado con HCl al 1.0% v/v. La mezcla se dejó reaccionar durante 1 h en un baño maría controlando la temperatura a 60°C . Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se dejó enfriar y se evaporó el solvente para obtener un sólido, que se utilizó para su caracterización.

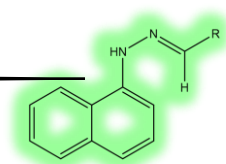


3.2.3 Caracterización de las hidrazonas

La caracterización estructural de las hidrazonas (aldehídos-NPH) obtenidas se llevó a cabo mediante espectroscopia infrarroja utilizando un espectrómetro Perkin Elmer modelo GX (Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) en un intervalo de $4000\text{--}600\text{ cm}^{-1}$ empleando pastillas de KBr. Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H empleando un espectrómetro Bruker de 400 MHz (Bruker, Billerica, Massachusetts, Estados Unidos) utilizando CDCl_3 y dimetilsulfóxido- d_6 como solventes. Los espectros ultravioleta-visible se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 40 (Perkin Elmer, Madrid, España). Los espectros de fluorescencia se obtuvieron utilizando un espectrofotómetro Perkin Elmer LS55 (Perkin Elmer, Madrid, España).

3.2.4 Análisis cromatográfico para la separación de las hidrazonas

El análisis cromatográfico se llevó a cabo mediante un instrumento HPLC Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent, Waldbronn, Alemania), equipado con una columna C18 Zorbax ODS ($250 \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$) y ZORBAX Eclipse XDB-C8 de ($150 \times 4.6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$). El equipo fue controlado por el software Agilent OpenLAB CBS (ChemStation Edition Versión A.01.05). La muestra se introdujo usando un bucle de inyección de $20\text{ }\mu\text{L}$. La detección fluorescente de los productos de derivatización se programó a 260.0 nm (excitación) y 380.0 nm (emisión).



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización mediante FTIR de las hidrazonas

Los espectros FTIR permiten observar los grupos funcionales presentes en un compuesto, lo que posibilita la detección de la formación de hidrazona al comparar los espectros de los aldehídos evaluados (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal) y el agente derivatizante (NPH). El esquema general de reacción (Figura 7a) así como los productos de derivatización (Figura 7b) obtenidos se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas.

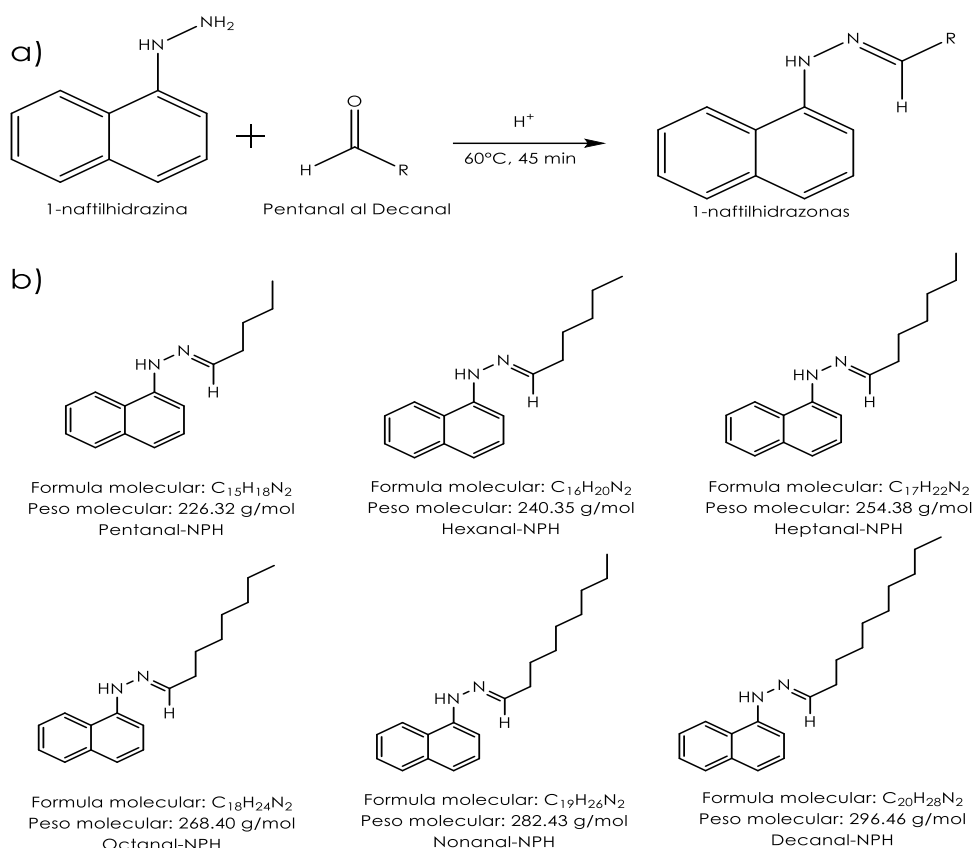
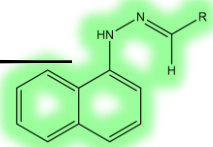
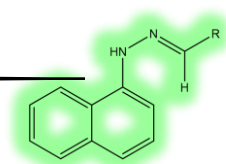


Figura 7. Esquema de la reacción de derivatización entre NPH y los aldehídos pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal, b) hidrazonas obtenidas de la reacción de derivatización.



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

Los espectros infrarrojos de los compuestos de partida y la hidrazona resultante se muestran en la Figura 8. Los seis aldehídos evaluados solo mostraron cambios en la longitud de la cadena alifática, por lo que los espectros FTIR son similares. La Figura 8a muestra el espectro FTIR del hexanal. Se observan las bandas características de los aldehídos: bandas a 3000-2850 cm^{-1} para vibraciones de estiramiento asimétricas y simétricas de metilenos y metilos ($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$,) presentes en la cadena alifática, a 2800-2600 cm^{-1} para el enlace perteneciente al hidrógeno unido al carbonilo característico de aldehídos $-(\text{O}=\text{C})-\text{H}$ (resonancia de Fermi), la banda a 1725 cm^{-1} para la vibración de estiramiento del enlace $-\text{C}=\text{O}$ (Dwivedi y Rai, 2009). El espectro FTIR del NPH (Figura 8b) muestra las bandas entre 3400-3000 cm^{-1} correspondientes a la vibración de estiramiento del enlace $-\text{N}-\text{H}$, entre 3000-2850 cm^{-1} las bandas de vibración de estiramiento asimétricas y simétricas del enlace $=\text{C}-\text{H}$ pertenecientes a los anillos aromáticos del naftaleno presente en la estructura, mientras que entre 1550-1650 cm^{-1} se observan las bandas correspondientes a la vibración de flexión del enlace $-\text{N}-\text{H}$, entre 1500-1400 cm^{-1} se observan las bandas de vibración de estiramiento del enlace $\text{C}=\text{C}$ de los anillo aromáticos del naftaleno, y entre 800-700 cm^{-1} a las bandas vibracionales de flexión fuera del plano del enlace $=\text{C}-\text{H}$ (Talebzadeh et al., 2017). Todas las hidrazonas obtenidas a partir de los aldehídos grasos con NPH mostraron perfiles espectroscópicos de FTIR similares, el espectro obtenido para el hexanal-NPH se muestra en la Figura 8c. El espectro muestra una combinación de algunas bandas de los compuestos de iniciales. Se observaron bandas de vibración de estiramiento asimétrico y simétrico para metilenos y metilos ($-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$,) en el intervalo de 3000-2850 cm^{-1} , pertenecientes a la cadena alifática, se observan bandas de vibración del enlace $-\text{C}=\text{N}$ en el intervalo de 1700-1600 cm^{-1} , bandas de vibración de flexión fuera del plano para el enlace $\text{C}=\text{C}$



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

perteneciente a los anillos aromáticos del naftaleno en el intervalo de 1500-1400 cm^{-1} , y bandas de flexión fuera del plano para el enlace $=\text{C}-\text{H}$ en el intervalo de 800-700 cm^{-1} . Realizando una comparación obtenidos entre los espectros FTIR de los productos iniciales y las hidrazonas, se observan que aparecen las bandas características de vibración $-\text{C}=\text{N}$ atribuidas a la formación de hidrazonas, mientras que las bandas características de aldehídos ($-(\text{O}=\text{C})-\text{H}$) y la banda de vibración de estiramiento $-\text{C}=\text{O}$ en 2800-2600 cm^{-1} y 1725 cm^{-1} respectivamente no se observaron en el espectro de hidrazona (Boumya et al., 2017).

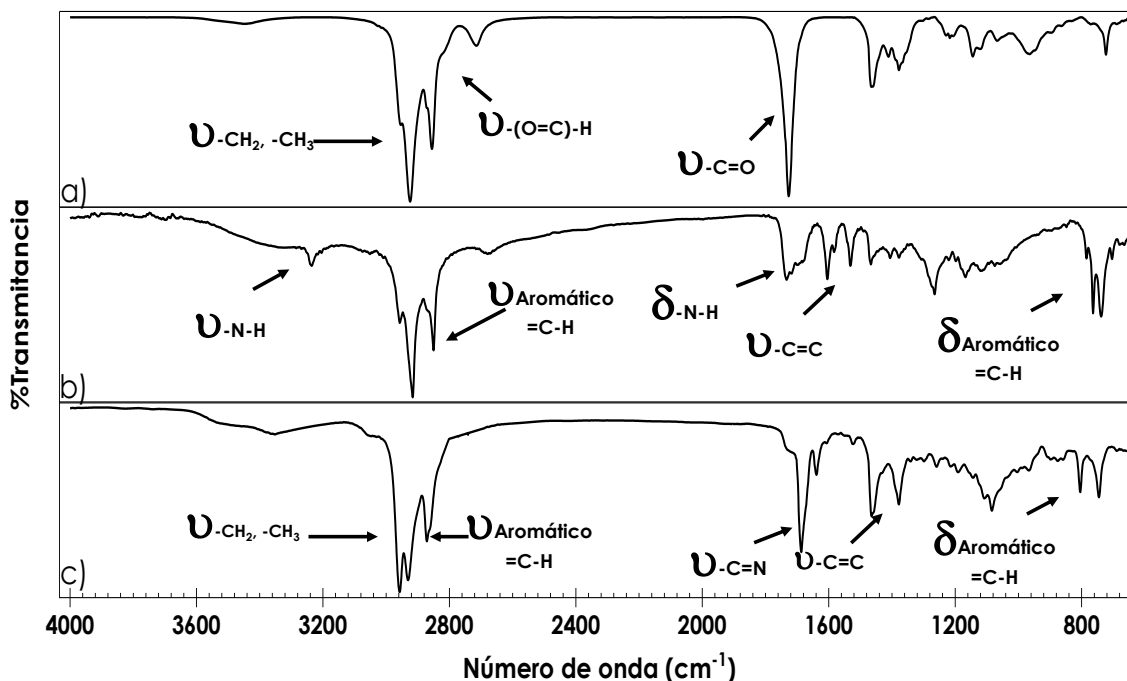
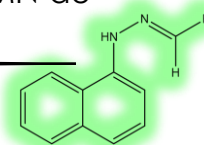


Figura 8. Espectros FTIR de a) hexanal b) NPH y c) hexanal-NPH

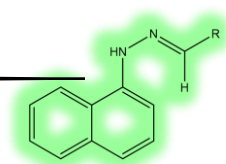
3.3.2 Caracterización mediante RMN ^1H de las hidrazonas

La caracterización estructural de las hidrazonas se complementó mediante el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN de ^1H) presentados en la Figura 9. Se muestra el espectro de RMN de



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

^1H del NPH, mientras que el hexanal y el hexanal-NPH se seleccionan como aldehídos e hidrazonas modelo porque exhibieron espectros con desplazamientos similares. El RMN de ^1H del hexanal (Figura 9a): (CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$) δ ppm: 9,72 (s, -CHO, 1H), 2,38 (m, -OHCCH₂, 2H), 1,59 (m, -CH₂, 2H), 1,28 (m, -CH₂, 4H) 0,85 (t, -CH₃, 3H). El espectro de RMN de ^1H el NPH (Figura 9b): (DMSO-d_6 , $T=25^\circ\text{C}$) δ ppm: 8.86 (s, -NH-N, 1H) 8.03 (t, anillo naftílico, 1H), 7.90 (t, anillo naftílico, 1H), 7.55 (dd, anillo naftílico, 1H), 7.45 (t, anillo naftílico, 3H), 6.98 (d, anillo naftílico, 1H). El espectro de RMN de ^1H de la hidrazona hexanal-NPH (Figura 9c): (CDCl_3 , $T=25^\circ\text{C}$) δ ppm: 9.05 (s-NH-N, 1H), 8.02 (t, anillo naftílico, 1H), 7.80 (t, anillo naftílico, 1H), 7.55 (dd, anillo naftílico, 1H), 7.40 (t, anillo naftílico, 3H), 7.31 (s-CHN, 1H), 7.24 (d, anillo naftílico, 1H), 2.74 (m, -NHCCH₂, 2H), 1.57 (m, -CH₂, 2H), 1.18 (m, -CH₂, 4H), 0.77 (t, -CH₃, 3H). Mediante una comparación de los espectros de RMN de ^1H de los productos inicial con las hidrazonas obtenidas, se observa que las hidrazonas sintetizadas presentan señales correspondientes a la cadena alifática (desplazamientos entre 0.77-1.57 ppm) y al anillo de naftaleno (desplazamientos entre 7.24-8.02 ppm), los que indica que ambos compuestos reaccionaron, además, la señal característica de los aldehídos (s, -CHO,), con un desplazamiento aproximado de 9.7 ppm, desaparece (Dugo et al., 2015). Por otro lado, se observa una nueva señal asociada al protón del enlace H-C=N alrededor de 7.3 ppm. Estas señales confirman la formación de la hidrazona correspondiente (Troud et al., 2022).



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

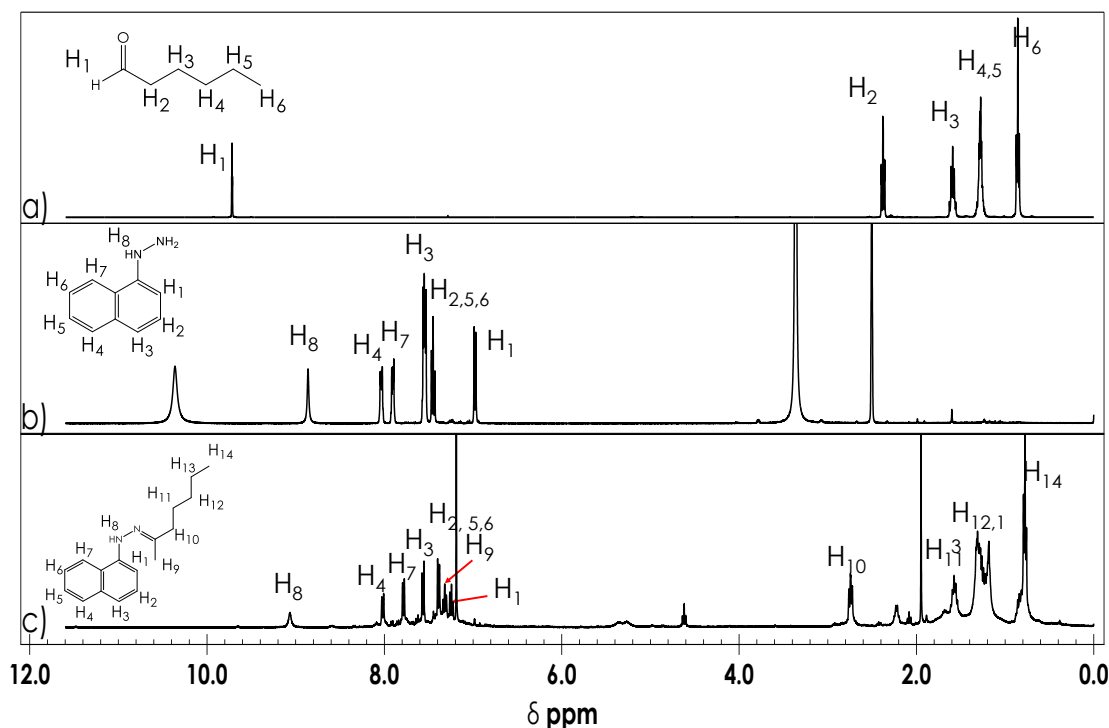
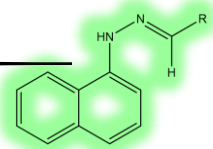


Figura 9. Espectros de RMN de ^1H de a) hexanal, b) NPH y c) hexanal-NPH.

3.3.3 Caracterización mediante espectrofotometría UV-Vis y de fluorescencia de las hidrazonas

La caracterización por espectroscopia se completó obteniendo los espectros ultravioleta-visible (UV-Vis) y los espectros de fluorescencia del agente derivatizante (NPH) y las hidrazonas empleando como solvente MeOH. El espectro UV-Vis del NPH presenta bandas de absorción características de derivados de naftaleno en 245, 255 y 320 nm presentando un máximo de absorción en 245 nm, mientras que los espectros UV-Vis de las hidrazonas presentan un desplazamiento bandas de 260 a 270 y 330 nm mostrando un efecto batocrómico en comparación con el producto inicial (Figura 10). Este efecto batocrómico se ha reportado como característico de los compuestos derivados del naftilo inducidos por la formación de naftilhidrazonas (Yan et al., 2019).



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

Por otro lado, los espectros de fluorescencia se obtuvieron utilizando longitudes de onda de excitación de 245 y 260 nm para NPH e hidrazonas, respectivamente. Los espectros de emisión mostraron un máximo a 325 para el derivatizante y 380 nm para las hidrazonas (Figura 10). Se observaron desplazamientos de Stokes (medidos por la distancia entre los picos de excitación y emisión) de 80 nm (NPH) y 120 nm (hidrazonas). Presentando mayores desplazamientos en los productos derivatizados. Desplazamientos de Stokes mayores a 100 nm mejoraron la sensibilidad y selectividad de la detección de fluorescencia (Chen et al., 2017b; Zhang et al., 2023).

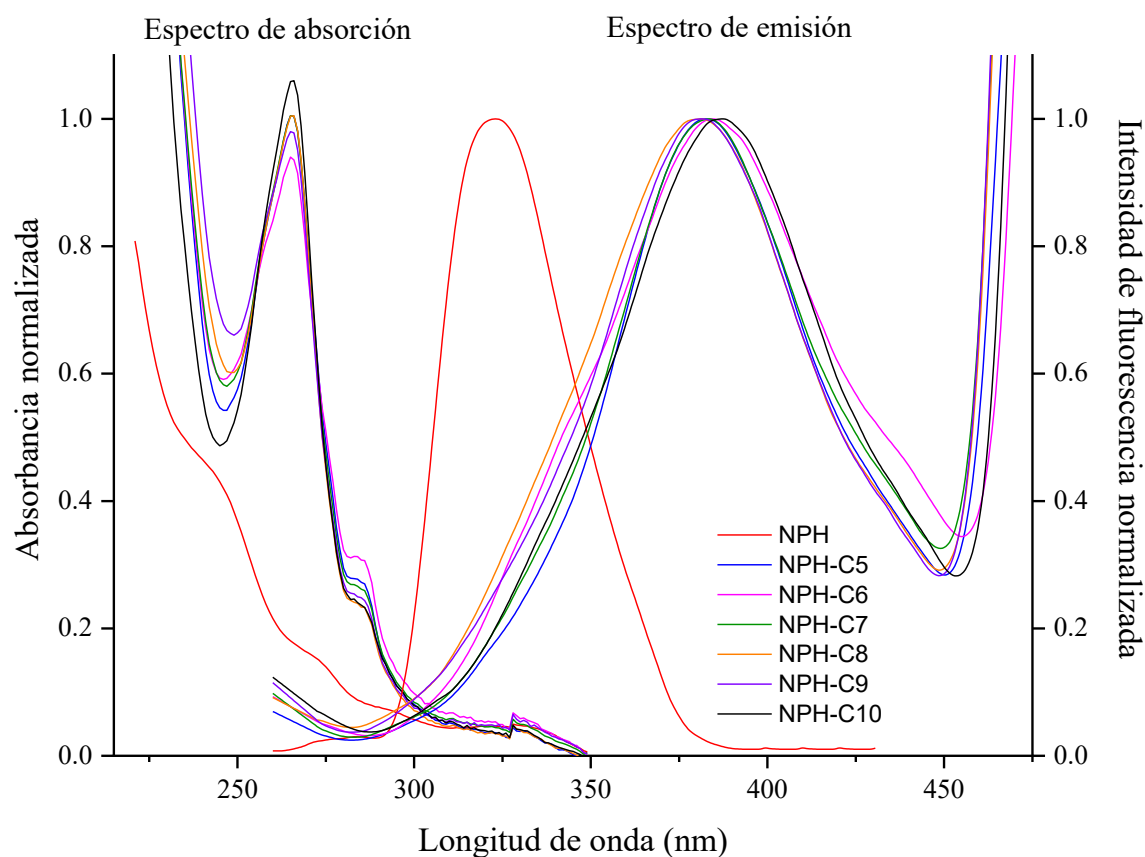
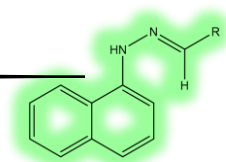


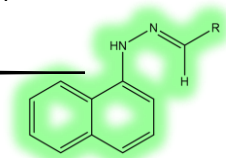
Figura 10. Espectros UV y de fluorescencia para el NPH e hidrazonas.



3.3.4 Separación cromatográfica de las hidrazonas

La separación de los aldehídos derivatizados se realizó empleando una solución estándar que contenía una concentración de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído en ACN. La reacción se colocó en las condiciones previamente descritas en el apartado 3.2.2. El producto derivatizado se reconstituye en 1 mL de MeOH. La separación se llevó a cabo evaluando dos columnas analíticas, una compuesta por octadecilsilano (C18) y otra basada por octilsilano (C8). La determinación se realizó mediante un detector de fluorescencia programado con una longitud de excitación 260 nm y una longitud de emisión de 380 nm.

En ambas columnas cromatográficas, la evaluación de la separación comenzó de manera isocrática en proporciones mayores a 60 % de MeOH por lo que el análisis de cada columna se evaluó en proporciones superiores. La columna C18 presentó una separación isocrática empleando 90% de MeOH y un flujo de 1.0 mL min^{-1} , con un tiempo de análisis de 45 minutos (Figura 11a). Se observó que a proporciones menores de MeOH el tiempo de análisis aumentaba, y las señales presentaban anchos de pico amplios porque al tener una mayor proporción de la solución de ácido acético al 1% la fase móvil era más polar por lo cual los analitos se reparten preferentemente a la fase estacionaria. La separación cromatográfica es adecuada con buena resolución entre las señales, no obstante el tiempo de análisis es extenso lo que podría resultar en una limitante. Por otra parte, la separación mediante la columna C8 empleando una proporción de 70% MeOH (Figura 11b) y un flujo de 1.0 mL min^{-1} permitía la separación de los analitos, mostrando que a medida que la cadena del aldehído aumentaba, la polaridad del compuesto derivatizado disminuye presentando señales más anchas para los aldehídos de cadena más larga, con un tiempo de



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

análisis alrededor de los 30 min. Dada las señales anchas y la separación de los aldehídos de cadena más larga se evaluaron diferentes gradientes con la finalidad de obtener picos más estrechos y así mejorar la sensibilidad y resolución los analitos (Figura 11C) obteniendo el siguiente gradiente de elución: A/B (25/75) durante 1 min, 75 a 100 % B de 1 a 14 min, 100 % B de 14 a 18 min, 100 a 75 % B de 18 a 24 min y A/B (25/75) de 24 a 26 min.

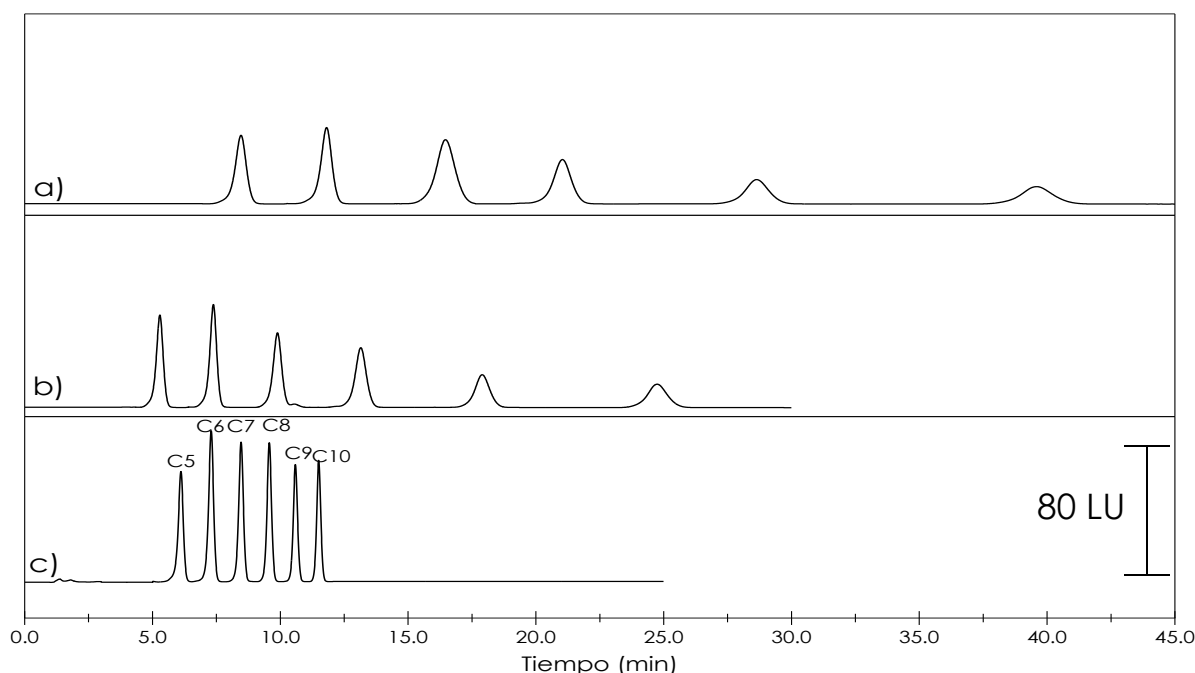
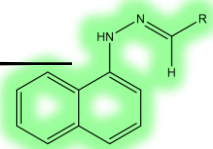


Figura 11. Perfiles cromatográficos a) separación de las hidrazonas con la columna C18, b) columna C8, c) gradiente empleando una columna C8.

Bajo estas condiciones de separación se realizó la inyección de cada aldehído derivatizado de manera individual, observando una sola señal analítica por cada aldehído siendo esto una ventaja para la metodología de derivatización, debido a que a pesar de no observarse mediante el análisis estructural se han descrito la formación de isómeros geométricos (E y Z) cuando se utilizan hidrazinas como agentes derivatizantes. Estos isómeros geométricos suelen generar dos señales cromatográficas para el mismo



CARACTERIZACIÓN DE LA REACCIÓN DE DERIVATIZACIÓN ENTRE LOS ALDEHÍDOS GRASOS Y LA 1-NAFTILHIDRAZINA

analito, lo que produce un impacto negativo en la sensibilidad y precisión de la metodología (Lin et al., 2009). Adicionalmente, otra ventaja que se puede destacar es que no se observa una señal atribuida al agente derivatizante, debido a que los productos derivatizados presentan longitudes de excitación y emisión distintas a las del NPH (Figura 12).

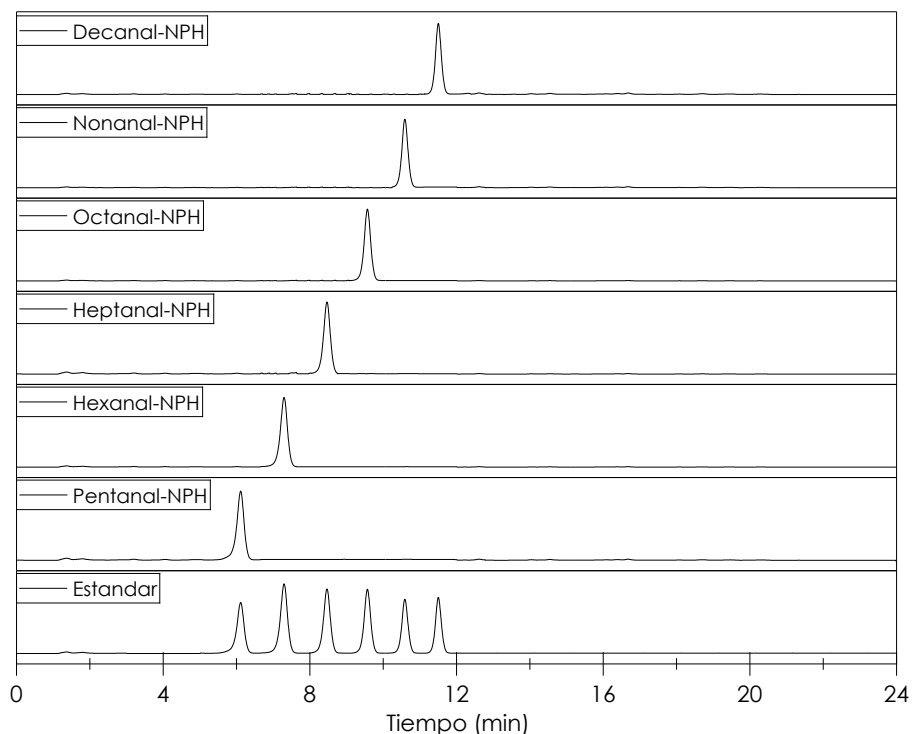
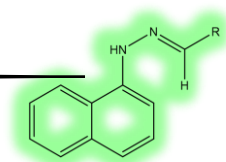


Figura 12. Perfiles cromatográficos de la inyección individual de cada hidrazona.

Cabe señalar que la optimización de las condiciones de separación se realizó empleando soluciones estándar preparadas en ACN por lo que las señales observadas corresponden únicamente a los analitos evaluados. A pesar de observar una adecuada resolución entre las señales, se debe evaluar nuevamente las condiciones cromatográficas al aplicarse en la matriz analítica, debido a que esta puede contener compuestos que coeluyan con las señales de interés lo que provocaría un error en el análisis.



Diseño de una metodología para el análisis de aldehídos grasos en aceites vegetales comestibles

4. DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

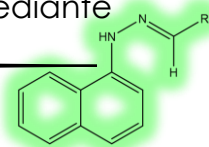
4.1 Antecedentes

Como se describió anteriormente los aldehídos son compuestos presentes en los alimentos, que se forman mediante diferentes rutas de degradación de vitaminas, carbohidratos, aminoácidos y lípidos por procesos de maduración, deterioro por almacenamiento, procesos térmicos y fermentación microbiana (El-Maghrabey et al., 2024).

Como se mencionó anteriormente, la formación de aldehídos provoca un deterioro en el sabor, olor, color, textura y apariencia, así como la disminución del valor nutricional (Ma et al., 2014). La presencia de los aldehídos ha sido descrita en muestras de alimentos como verduras enlatadas (Serrano et al., 2017), carnes (Gosetti et al., 2011), bebidas alcohólicas (de Lima et al., 2018), jugos (Abu-Bakar et al., 2014), fórmulas infantiles en polvo (Custodio-Mendoza et al., 2024) y especialmente en aceites vegetales comestibles (Kim et al., 2021). En alimentos, los aldehídos habitualmente se emplean como una medida de control de calidad y seguridad alimentaria (El-Maghrabey et al., 2024).

4.1.1 Formación de aldehídos grasos en aceite vegetal

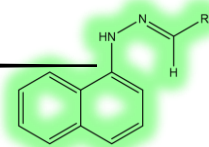
La formación de aldehídos (Figura 13) principalmente es descrita mediante la degradación de ácidos grasos de cadena largas, por lo que los aceites vegetales son los alimentos más propensos. Además, procesos de calentamiento producen un incremento de la degradación, provocando la formación de gran variedad de aldehídos (Zhang et al., 2024). Los lípidos de los alimentos son propensos a participar en reacciones en cadena mediante



la formación de radicales libres y degradación oxidativa debida a altas temperaturas en presencia de oxígeno. Se han descrito tres rutas para la oxidación de lípidos: autooxidación, fotooxidación y oxidación catalizada por enzimas (Zamuz et al., 2022).

La autooxidación es el proceso más importante de oxidación lipídica, es una reacción continua mediante radicales libres, generalmente es un proceso a partir de ácidos grasos provenientes de triacilglicéridos. Los ácidos grasos interactúan con moléculas oxígeno interactúan provocando la formación de productos de deterioro oxidativo (Domínguez et al., 2019). Este ocurre en tres etapas distintas: Iniciación, etapa donde aparecen radicales libres por su interacción con moléculas de oxígeno, propagación etapa en la que se multiplica los compuestos altamente reactivos y, terminación donde los compuestos reactivos se degradan o reaccionan entre sí para dar compuestos no reactivos (Barden & Decker et al., 2016). La fotooxidación es un mecanismo más rápido que la autooxidación. Este proceso ocurre con la formación hidroperóxidos en presencia de sensibilizadores como la luz (Wasowicz et al., 2004) y por último, la oxidación enzimática que del mismo modo que la fotooxidación, no emplea radicales libres sino mediante la formación de hidroperóxidos, siendo la principal enzima implicada es la lipoxigenasa (Domínguez et al., 2019).

En este sentido, estos mecanismos permiten la formación de una gran variedad de aldehídos, dependiendo de la composición de los ácidos grasos contenidos en la matriz alimenticia los que determinan el tipo de aldehído que se formará. La degradación de ácidos grasos n-3 (omega 3) generalmente son asociados con aldehídos de cadena más corta en comparación aldehídos obtenidos a partir de ácidos grasos n-6 (omega 6). (Nogueira et al., 2019), siendo los aldehídos pentanal al decanal,



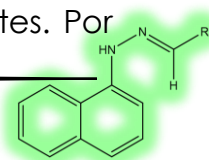


4.1.2 Tratamiento de muestras para la extracción de aldehídos

Las técnicas de pretratamiento para el análisis de aldehídos en alimentos se emplean para preconcentrar a los analitos y eliminar compuestos interferentes contenidos en la matriz analítica. Además permiten evitar el efecto matriz y mejorar los parámetros analíticos tales como sensibilidad analítica, selectividad, especificidad, precisión y exactitud. Dependiendo de la naturaleza de la matriz alimenticia se selecciona la técnica de pretratamiento. Las matrices de naturaleza polar normalmente suelen emplear tratamientos de muestras basados en extracción líquido-líquido (LLE por sus siglas en inglés) o extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés) (El-Maghrabey et al., 2024), mientras que para las matrices de naturaleza no polar se prefiere emplear técnicas basadas en LLE (Kishikawa et al., 2019). El análisis de aceites vegetales es de principal interés debido a que permite conocer su calidad y toxicidad al ser un alimento empleado en la cocción de múltiples alimentos.

4.1.2.1 Extracción líquido-líquido

Las técnicas de LLE se basan en el reparto de un compuesto(s) de interés que se encuentra contenido en una fase líquida a otra fase líquida inmiscible entre sí. Cuando la fase líquida que contiene al analito es polar se emplea un solvente orgánico no polar, mientras que si la fase líquida de interés es no polar se emplea un solvente orgánico polar. El reparto del analito de interés se basa en la diferencia de solubilidad en cada fase del sistema de LLE (Jiang et al., 2023). Ambas fases líquidas se mezclan empleando agitación, luego se detiene la agitación para permitir que las gotas formadas del extractante se unan y las fases líquidas se separen entre sí (Figura 14; Antony et al., 2021). A pesar de que la LLE es una técnica ampliamente empleada presenta una desventaja debido a su elevado consumo de solventes. Por



ello, surgieron alternativas de miniaturización de los sistemas de extracción enfocados en la reducción del volumen de muestras y extractantes tóxicos como: tetracloruro de carbono, cloroformo, diclorometano, benceno y tolueno (Campillo et al., 2020).

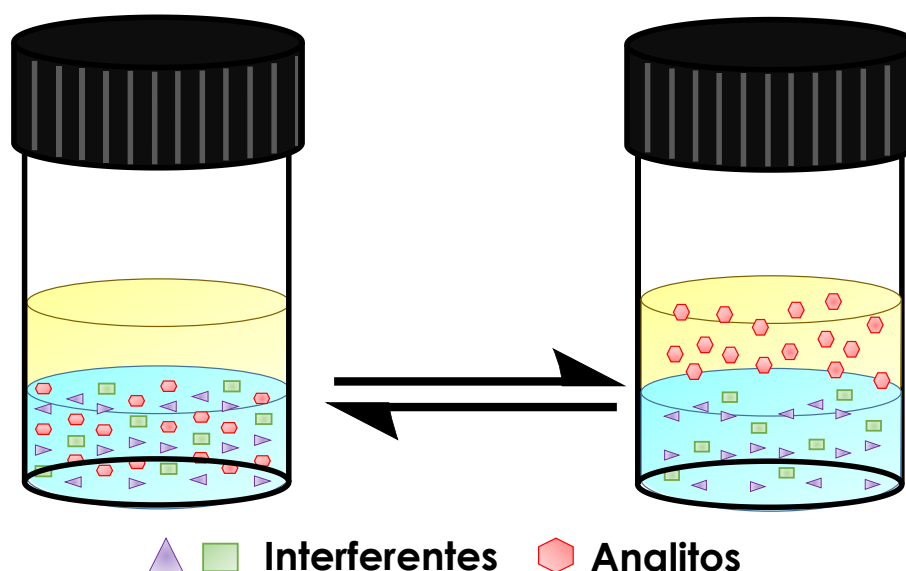
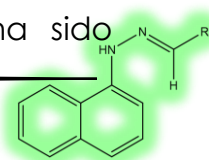


Figura 14. Representación de la extracción líquido-líquido convencional.

4.1.2.2 Microextracción líquido-líquido

La microextracción líquido-líquido (LLME por sus siglas en inglés; Figura 15) es un método de tratamiento de muestras miniaturizado de LLE. El procedimiento general de LLME emplea volúmenes de muestra que van desde 0.5 a los 25 mL (Kokosa, 2019) y volúmenes de extractante desde los 0.5 μ L a los 1000 μ L (López et al., 1998). La técnica de LLME comparada con la técnica convencional de LLE posee ventajas debido a que el consumo de solvente orgánico es disminuido significativamente, y posee elevados factores de preconcentración lo que mejora la sensibilidad analítica y obtener menores LODs (Jalili et al., 2020). Por lo cual LLME ha sido



ampliamente utilizado para la extracción de diferentes compuestos de diferentes matrices ambientales y biológicas y alimenticias (Jiang et al., 2023). La LLME es la metodología más empleada para la concentración de aldehídos en matrices polares como no polares debido a que son métodos de preparación de muestras sencillas, rápidos, sensibles y económicas.

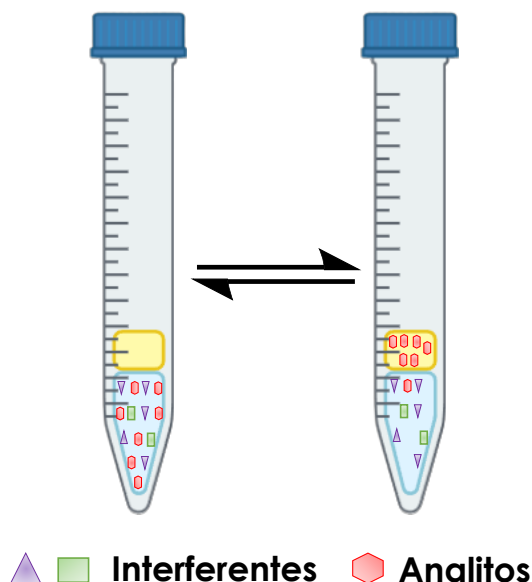
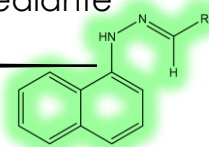


Figura 15. Representación de la microextracción líquido-líquido.

4.1.2.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva

La técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME por sus siglas en inglés; Figura 16) se describe como un sistema de solventes ternario. Consiste en la inyección rápida de una mezcla de un solvente de extracción (0.5-200 μL) disuelto en un solvente dispersante, sobre la muestra. El solvente de extracción es inmiscible en la muestra mientras que el solvente dispersante es soluble. Al realizar la inyección de la mezcla la solución se torna turbia debido a la formación una emulsión que proporciona una enorme superficie para una extracción rápida y eficiente. Finalmente, la fase de extracción se separa ya sea por gravedad o mediante



centrifugación (Rutkowska et al, 2019). El uso del solvente dispersante es la modalidad de la DLLME más empleada, sin embargo también se pueden combinar con otras técnicas para lograr la dispersión como el uso de vórtex, ultrasonido, y por microondas (Jayasinghe et al., 2022).

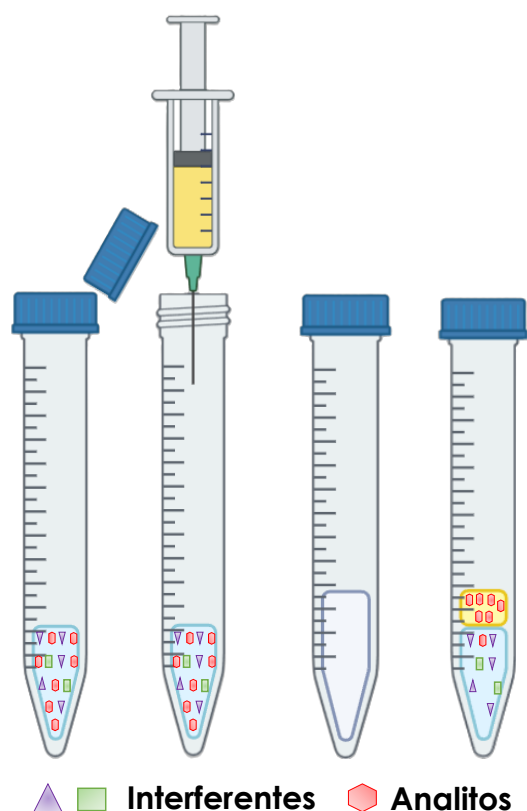
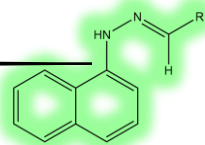


Figura 16. Representación de la microextracción líquido-líquido dispersiva.

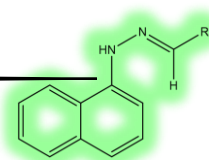
4.1.2.2 Microextracción en gota suspendida

La microextracción de gota suspendida (SDME por sus siglas en inglés; Figura 17) es una técnica de tratamiento de muestra. Como su nombre lo indica emplea una sola gota del solvente extractante, empleando un volumen de 1-10 μL , por lo que el solvente orgánico debe ser totalmente inmiscible para no generar pérdidas. Para realizar la extracción la gota se suspende en la punta de una jeringa. Esta técnica puede utilizarse en dos modalidades: a)



la gota suspendida del solvente extractante se coloca sobre la muestra (en el espacio de cabeza) sin tener contacto directo con la muestra; esta modalidad se emplea con especies con elevada volatilidad y b) la gota suspendida se sumerge directamente en la solución de la muestra; esta modalidad se denomina SDME por inmersión directa.

La técnica de tratamiento de muestras basadas en SDME son descritas como de bajo costo donde el consumo de solvente puede ser mucho menor en comparación con otras técnicas de LLME y que poseen un elevado factor de preconcentración; por lo anterior son ideales para muchas metodologías de análisis (Ramos, 2012). Sin embargo, la técnica SDME presenta múltiples desventajas, ya que el solvente empleado como extractante debe cumplir características de densidad y viscosidad que permitan su uso bajo esta modalidad por lo que se limitan muchos solventes convencionales, además la manipulación suele ser complicada debido a que tiene una gran dependencia sobre la agitación aplicada por lo que es difícil formar gotas estables (Rutkowska et al., 2019).



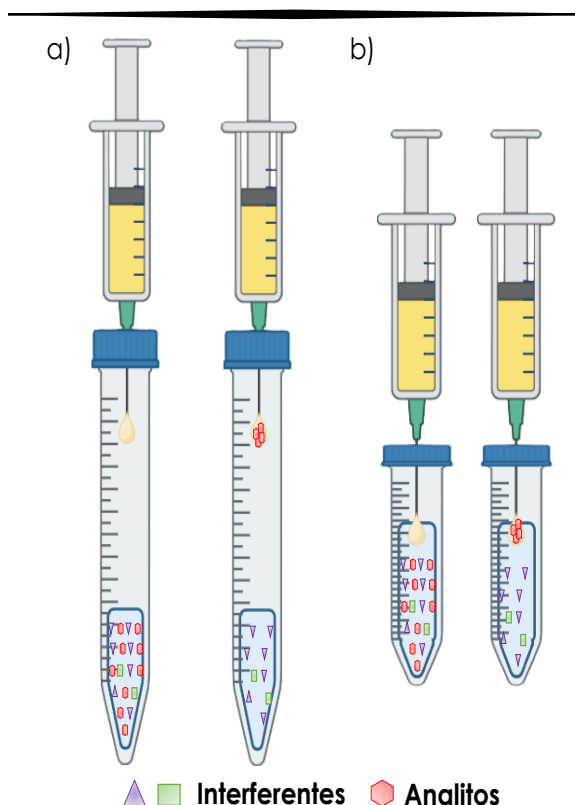
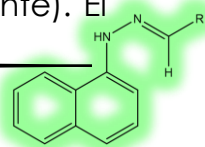


Figura 17. Representación de la microextracción en gota suspendida a) espacio de cabeza b) inmersión directa.

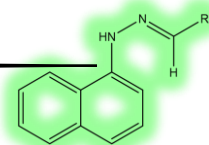
Entre las técnicas de pretratamiento de aceites vegetales, se encuentra descrita una metodología basada en LLE para la extracción de 4-hidroxinonenal contenido en 3 mL de aceite empleando como extractante 3 mL de ACN; posteriormente se toma una alícuota de 1 mL del extractante, y se derivatiza el aldehído con pentafluorofenilhidrazina para su análisis mediante HPLC-MS (Gabbanini et al., 2015). Otra metodología que ha sido descrita es la determinación benzaldehído, butanal y furfural en humo de cigarro y formulaciones inyectables. Las muestras fueron tratadas con la finalidad de llevar a un medio acuoso por lo que 10 mL de la solución muestra se derivatiza con 2,4-dinitrofenilhidrazina. Posteriormente se trata mediante DLLME donde se inyectan 600 μ L de etanol (solvente dispersante) que contenían 50 μ L de tetracloruro de carbono (solvente extractante). El



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

extractante se recupera, y se diluye hasta 500 μL con MeOH para su análisis mediante HPLC-UV (Tabrizi et al., 2013).

Por lo tanto, la determinación de aldehídos derivados de la oxidación lipídica en aceites vegetales comestibles presenta un desafío debido a sus propiedades tóxicas, bajas concentraciones y complejidad de la matriz. A pesar de que existen diversas metodologías persisten limitaciones relacionadas con la sensibilidad, selectividad, estabilidad de los derivados obtenidos para su análisis así como la complejidad del tratamiento de muestra. En este contexto, el empleo de 1-naftilhidrazina como agente derivatizante representa una alternativa viable para su aplicación en la determinación de aldehídos grasos contenidos en aceites vegetales mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia (HPLC-FLD)



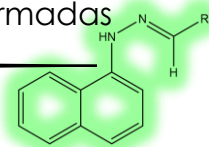
4.2 Metodología

4.2.1 Condiciones cromatográficas para el análisis de aldehídos en muestras de aceite

La separación cromatográfica del análisis de aldehídos derivatizados en aceite se realizó empleando una fase móvil compuesta por ácido acético acuoso al 1 % v/v (A) y metanol (B), utilizando el siguiente gradiente de elución: A/B (25/75) durante 1 min, 75 a 100 % B de 1 a 14 min, 100 % B de 14 a 18 min, 100 a 75 % B de 18 a 24 min y A/B (25/75) de 24 a 26 min. La fase móvil se filtró utilizando una membrana de 0.45 μm . El caudal fue constante a 1 mL min^{-1} y el volumen de inyección fue de 20 μL . El detector de fluorescencia se programó con la siguiente secuencia: 0.0 a 5.3 min con excitación a 265.0 nm y emisión a 290.0 nm (ibuprofeno; IS) y de 5.3 a 26.0 min con excitación a 260.0 nm y emisión a 380.0 nm (aldehídos derivatizados).

4.2.2 Evaluación de la metodología de extracción-derivatización

La estrategia de LLME de los aldehídos se evaluó mediante tres modalidades (Figura 18): a) Derivatización *in situ*, 1 mL de aceite mineral dopado con 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído se puso en contacto con 1 mL de una solución de NPH 100 μM y HCl 100 μM en ACN; la mezcla se agita empleando un vórtex durante 5 minutos y posteriormente separar las fases. La solución de ACN que extrajo a los aldehídos se coloca a reaccionar durante 30 min a 60°C; transcurrido el tiempo la solución se analiza mediante HPLC-FLD. b) La derivatización en la matriz analítica, por lo que se adicionó 10 μL de una solución de NPH de 1000 μM y 1000 μM de HCl en ACN sobre 1 mL de aceite mineral dopado con 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído. La mezcla se colocó a 60°C durante 30 min y posteriormente se extraen las hidrazonas formadas



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

adicionando 1 mL de ACN, la mezcla se agita empleando un vórtex durante 5 minutos y se analiza mediante HPLC-FLD. c) Cambio de medio de reacción, 1 mL de aceite mineral dopado con $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído se pone en contacto con 1 mL de ACN, la mezcla se agita empleando un vórtex durante 5 minutos, y se extraen los aldehídos. Se toma una porción de $500 \mu\text{L}$ de la fase de ACN y coloca a reaccionar con $500 \mu\text{L}$ una solución de NPH $200 \mu\text{M}$ y HCl $200 \mu\text{M}$ en ACN, se coloca a reaccionar durante 30 min a 60°C , transcurrido el tiempo la solución se analiza mediante HPLC-FLD.

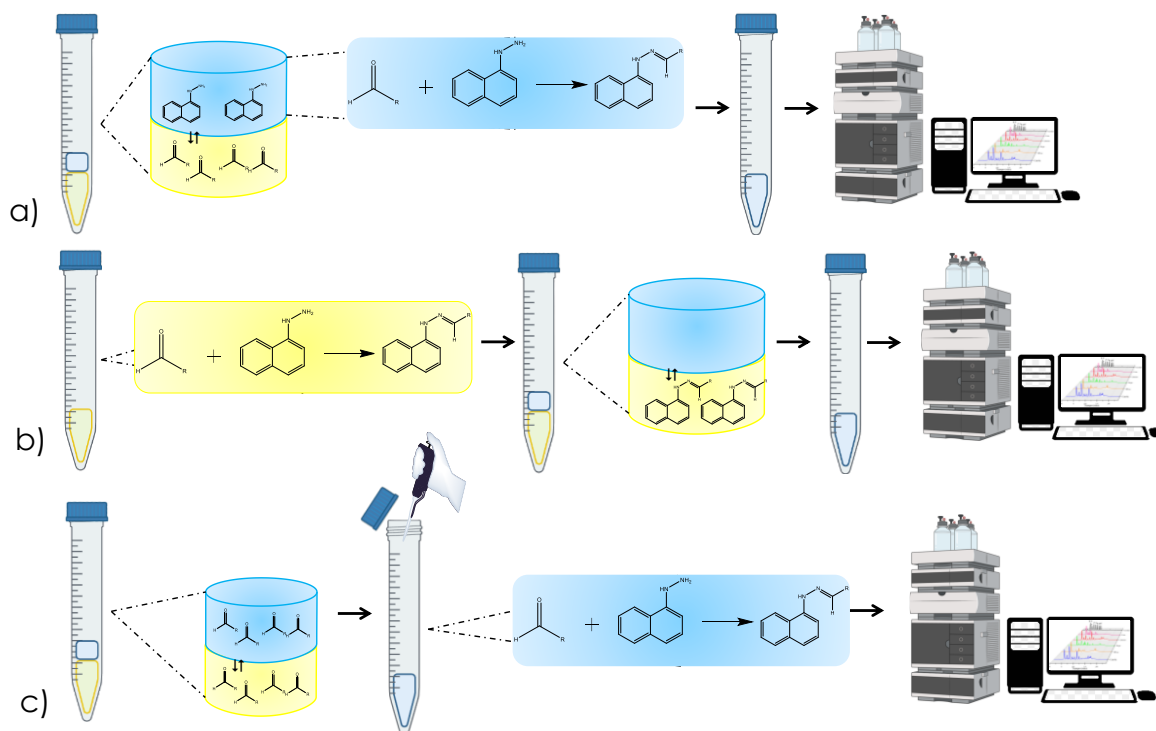
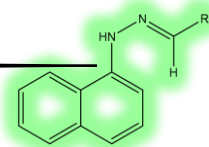


Figura 18. Rutas evaluadas en la selección del método de extracción/derivatización basado LLME en muestras de aceite dopado con $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído.

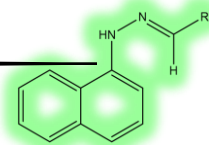


4.2.3 Optimización de las condiciones derivatización de aldehídos

Se realizó un diseño de experimentos factorial fraccionado 2^{5-2} para seleccionar y evaluar las variables críticas involucradas en el proceso de extracción-derivatización de los aldehídos. Como variables se evaluaron la concentración del derivatizante NPH ([NPH]; 78.0-156.0 μM), volumen de muestra (VM; 1.0-3.0 mL), temperatura de derivatización (TD; 40.0-60.0 $^{\circ}\text{C}$), concentración de HCl ([HCl]; 100.0-300.0 mM), y tiempo de reacción (TR; 15.0-45.0 min). Posteriormente, las variables críticas se optimizaron mediante un diseño de experimentos de superficie de respuesta Box Behnken (4 variables, de 27 experimentos). Las variables que no presentaron una contribución significativa se mantuvieron constante en el valor óptimo encontrado en el diseño factorial fraccionado 2^{5-2} . La concentración de los aldehídos y el estándar interno (ibuprofeno) fue 500.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 2000.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente, durante el proceso de optimización. El análisis de datos se realizó mediante el programa estadístico Minitab 21.

4.2.4 Validación de la metodología de determinación de aldehídos en muestras de aceite vegetal

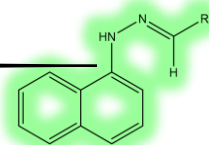
La metodología se validó según los criterios de la IUPAC (Currie, 1995). El procedimiento de validación incluyó la determinación de las líneas de calibrado, LODs y límites de cuantificación (LOQs), calculados como relaciones señal/ruido (S/N) de 3.29 y 10 respectivamente. La precisión se evaluó en términos intra e inter día (repetibilidad y reproducibilidad) mediante el análisis de muestras de aceite dopados en tres niveles de concentración (100, 200 y 300 $\mu\text{g L}^{-1}$), calculadas en términos de desviación estándar relativa (%RSD, $n=3$). La metodología se evaluó mediante ensayos de recuperación mediante el análisis de muestras de aceite dopado a tres



niveles de concentración (50, 250 y 450 $\mu\text{g L}^{-1}$) calculando la exactitud en términos de tanto por ciento de recuperación (% recuperación, $n=3$).

4.2.5 Análisis de aldehídos en muestras de aceite vegetal

La extracción de los aldehídos se realizó empleando 2.0 mL de solución estándar de aceite o muestra de aceite comestible, la muestra se coloca con 1.0 mL de acetonitrilo en un tubo de propileno, la mezcla se agita mecánicamente empleando un vórtex durante 5 min. Posteriormente los tubos se centrifugan durante 5 min a 2000 rpm. Se toman 500 μL de extracto de acetonitrilo y se colocan en un vial de 2.0 mL; al extracto se le adiciona 500 μL de una solución 298.8 μM de NPH y 148.4 mM HCl. La mezcla se calienta durante 45 min a 58 $^{\circ}\text{C}$. Transcurrido el tiempo de reacción la solución se evaporó empleando una bomba de aire y se reconstituyeron con 250.0 μL de MeOH para finalmente analizarse mediante HPLC-FLD. Las concentraciones de aldehídos se calculan mediante interpolación en la línea de calibrado.



4.3 Resultados y discusiones

4.3.1 Evaluación de la metodología de extracción-derivatización

La evaluación de las tres modalidades de extracción-derivatización mediante LLME permitió seleccionar la ruta de mayor efectividad. En la primera modalidad (Figura 19a) evaluada (derivatización *in situ*), el derivatizante se adiciona sobre el extractante, disminuyendo el número de etapas involucradas y mejorando los resultados. Bajo esta modalidad se logran observar las señales analíticas de las hidrazonas en los perfiles cromatográficos, mostrando que la extracción de los aldehídos procedía. La segunda modalidad (Figura 19b), la derivatización en la matriz analítica, y posterior extracción de las hidrazonas, no mostró señales al realizar su análisis cromatográfico, debido a que la polaridad de las hidrazonas disminuye provocando que el reparto se vea afectado, prefiriendo que los analitos derivatizados se queden en la matriz, o que la reacción no proceda en la matriz analítica. La tercera modalidad evaluada (Figura 19c) involucra dos etapas, los aldehídos son extraídos de la matriz analítica, lo que permite un cambio en el medio de reacción, y posterior a la extracción, se adiciona el NPH así como el medio ácido para la reacción, mediante esta modalidad se observan todas las señales cromatográficas de los analitos derivatizados. Comparando los perfiles cromatográficos de la primera y tercera modalidad que permiten la extracción-derivatización de los aldehídos en la matriz analítica se observa que esta última presenta áreas de pico mayores. El aumento de las señales se atribuye a que en esta modalidad no se adiciona el NPH ni el medio ácido al realizar la extracción, sino que estos componentes se agregan posterior a la extracción, por lo que no provocaría el reparto del derivatizante a la matriz, disminuyendo el rendimiento de derivatización. La

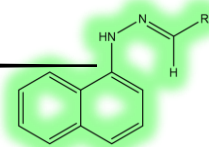


Figura 19 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos para la evaluación de las modalidades de LLME-derivatización de los aldehídos.

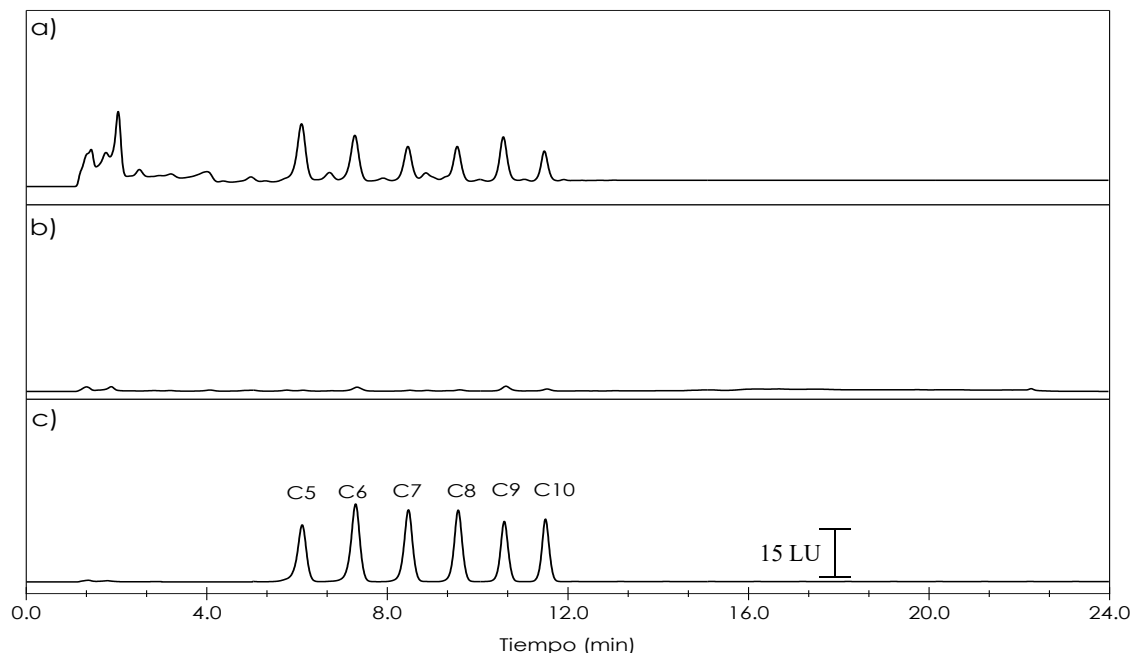
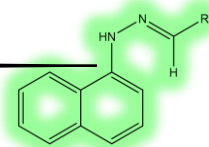


Figura 19. Perfiles cromatográficos obtenidos para la evaluación de las modalidades de LLME-derivatización a) *in situ*, b) en la matriz analítica y c) en dos etapas.

Evaluada la ruta de derivatización, se seleccionó el IS que sería empleado para la optimización, la selección se basó en encontrar compuestos que no se describan habitualmente en la matriz analítica ni que se generen por oxidación lipídica, por lo cual se evaluaron tres IS posibles: el ácido 1-naftalenacético, 2-naftalentiol e ibuprofeno. Los primeros dos compuestos al presentar una mayor polaridad eluyeron con tiempos de retención similares al tiempo muerto por lo que no era viables para incorporarse al sistema, caso contrario con el ibuprofeno que presentó un tiempo de retención diferente a los analitos y permitía seguir el proceso de manera adecuada, por lo cual fue seleccionado para llevar a cabo el análisis.

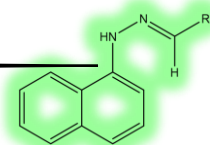


4.3.2 Optimización de las condiciones derivatización de aldehídos

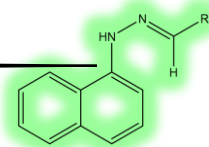
El proceso de derivatización de aldehídos empleando LLME en muestras de aceite vegetal es afectado por diferentes variables, por lo cual se aplicó un diseño factorial fraccionado 2^{5-2} , para evaluar las variables críticas ([NPH], VM, TD, [HCl], TR) y seleccionar aquellas que afectan significativamente el proceso y optimizarlas. Los niveles de los factores evaluados se seleccionaron acorde a intervalos que se encuentran descritos en la literatura (El-Maghrabey et al., 2024) y una evaluación previa. La variable de salida seleccionada fue la sumatoria de la relación área de pico de los aldehídos derivatizados/área de pico del IS, buscando maximizar la señal. Todos los experimentos se realizaron empleando muestras de aceite dopados con $500.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído. La matriz de diseño y los resultados obtenidos en cada experimento se presentan en la Tabla 2. Se eligió el aceite mineral como aceite blanco para la optimización de las condiciones del método y la validación debido a su alto contenido de hidrocarburos saturados (Grob K, et al., 2018), por lo que su composición reduce el error asociado con la presencia de aldehídos, debido a que se ha descrito la presencia de los aldehídos evaluados a pesar de emplear aceites comestibles frescos (Wang et al., 2020).

Tabla 2. Matriz y resultados del diseño factorial fraccionado 2^{5-2} (n=2).

Exp	VM (mL)	TD (°C)	[NPH] (μM)	RT (min)	[HCl] (mM)	Σ relación de áreas de pico (aldehído derivatizado:IS)	
1	1.0 (-1)	40 (-1)	78 (-1)	45 (+1)	300 (+1)	0.4053	0.4091
2	3.0 (+1)	40 (-1)	78 (-1)	15 (-1)	100 (-1)	2.9136	2.6088
3	1.0 (-1)	60 (+1)	78 (-1)	15 (-1)	300 (+1)	0.6087	0.6207
4	3.0 (+1)	60 (+1)	78 (-1)	45 (+1)	100 (-1)	5.5395	5.5856
5	1.0 (-1)	40 (-1)	156 (+1)	45 (+1)	100 (-1)	3.3884	2.8271
6	3.0 (+1)	40 (-1)	156 (+1)	15 (-1)	300 (+1)	1.5196	3.3814
7	1.0 (+1)	60 (+1)	156 (+1)	15 (-1)	100 (-1)	4.8086	4.8096
8	3.0 (+1)	60 (+1)	156 (+1)	45 (+1)	300 (+1)	3.5892	3.6077



La Figura 20 presenta el gráfico de Pareto (95 % intervalo de confianza) obtenido del diseño factorial fraccionado 2^{5-2} , donde se puede observar los efectos principales relacionado con la significancia de las variables. La contribución de las variables críticas es $[HCl]>TD>[NPH]>VM$, mientras el tiempo de reacción no presentó contribución significativa. La variable con mayor contribución es la $[HCl]$, que está relacionado con el mecanismo de formación de hidrazonas, debido a que implica la protonación del grupo carbonilo del aldehído seguido de un ataque nucleofílico de la hidrazina (Boumya et al., 2017a). La TD es otra variable fundamental porque usualmente el incremento de la temperatura es proporcional con la aceleración de la reacción, no obstante, incrementos drásticos o temperaturas elevadas puede generar la descomposición de los productos de derivatización (Zhang et al., 2010). La concentración del agente derivatizante es la tercera variable con mayor contribución debido a que normalmente un exceso de $[NPH]$ promueve la reacción con los analitos incluso en presencia de otros compuestos (Chen et al., 2018). No obstante, la adición de un exceso mayor al ideal provoca la derivatización secundaria, formando productos indeseados con el analito e interferir en el rendimiento (Atapattu & Temerdashev, 2023). El volumen de muestra presenta una correlación entre el estado de equilibrio de la fase aceptora que contiene el analito y la fase donadora (ACN), por lo tanto, en el equilibrio se distribuye el máximo número de moles de aldehídos que les permite reaccionar con el NPH (de Oliveira et al., 2021). Los valores que mejoran el proceso de derivatización fueron: $[HCl]=100.0$ mM; Temperatura: $60^{\circ}C$; $[NPH]=156.0$ μM ; $VM=3.0$ mL y $TD:45$ min.



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

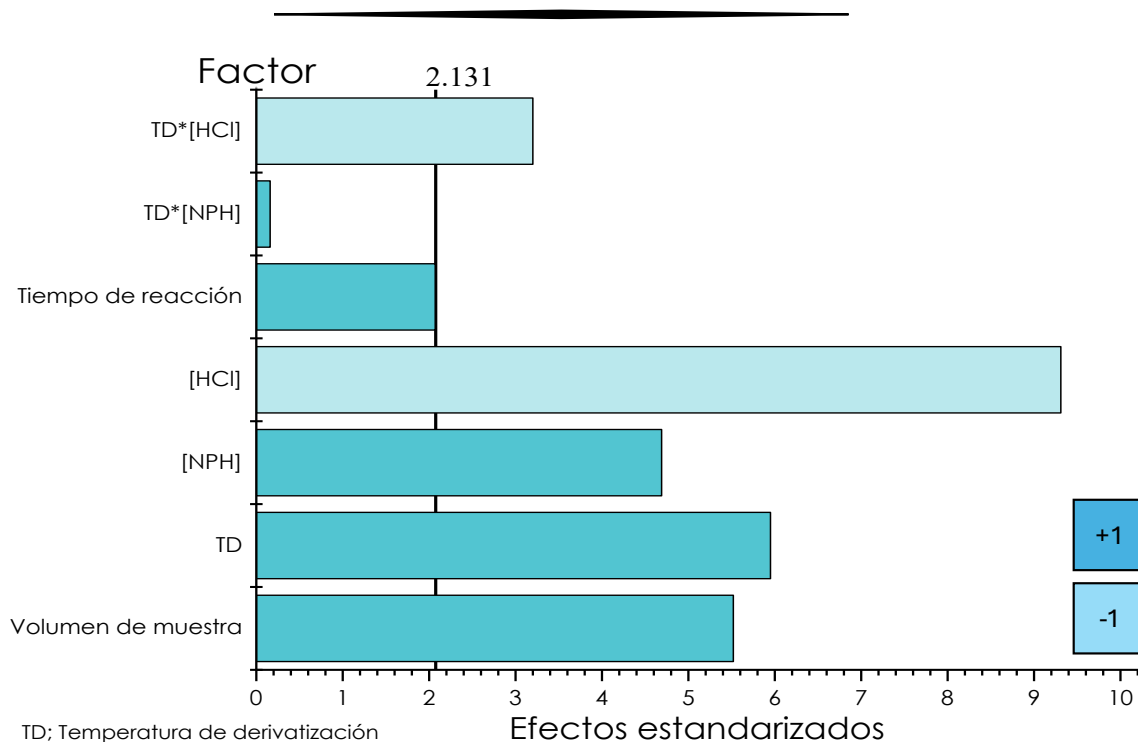
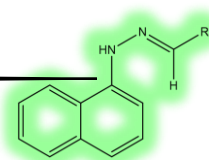


Figura 20. Gráfico de Pareto del diseño factorial fraccionado 2^{5-2} para la selección de variables para la determinación de aldehídos en aceite.

Las variables críticas se optimizaron mediante un diseño Box-Behnken, 4 variables ([HCl], TD, [NPH], VM) con 27 experimentos, mientras que el TR al no presentar contribución significativa de mantuvo constante en 45 minutos durante el diseño. Los experimentos se realizaron aleatoriamente para evitar el efecto de factores de ruido y reducir los errores sistemáticos. La matriz experimental y los resultados del diseño experimental se presentan en la Tabla 3. Los niveles de estos factores se establecieron en $-a$, -1 , 0 , $+1$ y $+a$, con $a = 1.68$. El valor central (0) se seleccionó en función del valor óptimo del diseño de Plackett-Burman.

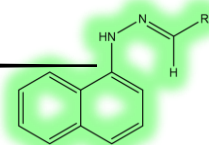


DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

Tabla 3. Matriz y resultados del diseño Box-Behnken.

Exp	VM (mL)	TD (°C)	[NPH] (μM)	[HCl] (mM)	Σ relación de áreas de pico (aldehído derivatizado:IS)
1	2 (-1)	50 (-1)	156 (0)	100 (0)	7.9392
2	4 (+1)	50 (-1)	156 (0)	100 (0)	3.3643
3	2 (-1)	70 (+1)	156 (0)	100 (0)	5.9979
4	4 (+1)	70 (+1)	156 (0)	100 (0)	3.8903
5	3 (0)	60 (0)	130 (-1)	50 (-1)	5.4430
6	3 (0)	60 (0)	182 (+1)	50 (-1)	2.4116
7	3 (0)	60 (0)	130 (-1)	150 (+1)	1.9479
8	3 (0)	60 (0)	182 (+1)	150 (+1)	1.2624
9	2 (-1)	60 (0)	156 (0)	50 (-1)	7.4340
10	4 (+1)	60 (0)	156 (0)	50 (-1)	5.3058
11	2 (-1)	60 (0)	156 (0)	150 (+1)	4.6643
12	4 (+1)	60 (0)	156 (0)	150 (+1)	2.0243
13	3 (0)	50 (-1)	130 (-1)	100 (0)	5.3991
14	3 (0)	70 (+1)	130 (-1)	100 (0)	3.6621
15	3 (0)	50 (-1)	182 (+1)	100 (0)	2.1110
16	3 (0)	70 (+1)	182 (+1)	100 (0)	1.9785
17	2 (-1)	60 (0)	130 (-1)	100 (0)	6.7314
18	4 (+1)	60 (0)	130 (-1)	100 (0)	3.5839
19	2 (-1)	60 (0)	182 (+1)	100 (0)	3.2777
20	4 (+1)	60 (0)	182 (+1)	100 (0)	2.6595
21	3 (0)	50 (-1)	156 (0)	50 (-1)	5.6168
22	3 (0)	70 (+1)	156 (0)	50 (-1)	5.6200
23	3 (0)	50 (-1)	156 (0)	150 (+1)	2.8496
24	3 (0)	70 (+1)	156 (0)	150 (+1)	1.8835
25	3 (0)	60 (0)	156 (0)	100 (0)	6.2572
26	3 (0)	60 (0)	156 (0)	100 (0)	6.0944
27	3 (0)	60 (0)	156 (0)	100 (0)	6.4661

La Tabla 4 presenta el análisis ANOVA obtenido del diseño Box-Behnken. Se puede observar que los factores lineales, cuadráticos de los términos representa una contribución significativa (valor $p < 0.05$). La falta de ajuste (valor $p > 0.05$) obtenida para el modelo representan adecuadamente las variables seleccionadas además, se obtuvo un $R^2_{\text{ajustado}} = 89.12\%$ por lo que los valores obtenidos permiten explicar el modelo de manera adecuada (de Oliveira et al., 2021).

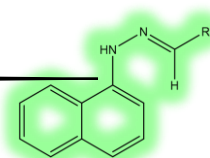


DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

Tabla 4. ANOVA obtenido del diseño de experimentos Box-Behnken para la optimización del proceso de derivatización de aldehídos en muestras de aceite vegetal comestible.

Fuente	Análisis de Varianza				
	GL	SC Ajuste.	MC Ajuste	Valor F	Valor p
Modelo	8.00	90.68	11.33	27.61	0.0001>
Lineal	4.00	59.68	14.92	36.34	0.0001>
Volumen muestra	1.00	19.29	19.29	47.00	0.0001>
Temperatura	1.00	1.50	1.50	3.66	0.0717
[NPH]	1.00	14.23	14.23	34.66	0.0001>
[HCl]	1.00	24.65	24.65	60.05	0.0001>
Cuadrado	4.00	31.00	7.75	18.88	0.0001>
Volumen muestra ²	1.00	0.03	0.03	0.07	0.8001
Temperatura ²	1.00	4.24	4.24	10.32	0.0048
[NPH] ²	1.00	24.01	24.01	58.50	0.0001>
[HCl] ²	1.00	10.05	10.05	24.47	0.0001>
Error	18.00	7.39	0.41		
Falta de ajuste	16.00	7.32	0.46	13.18	0.0727
Error puro	2.00	0.07	0.03		
Total	26.00	98.06			

Las variables [HCl], temperatura y [NPH] presentan un comportamiento cuadrático de la respuesta de salida mientras que el volumen de muestra presenta un comportamiento lineal, lo que puede observar en los gráficos de superficie obtenidos (Figura 21). Los valores óptimos de las variables críticas son: [NPH]=149.4 μ M, [HCl]=74.2 mM, temperatura= 58 °C y volumen de muestra= 2.0 mL. Las respuestas óptimas teóricas fueron 6.67 y 8.02 para el diseño factorial fraccionado y Box-Behnken respectivamente, mientras que los valores experimentales fueron 6.50 (%RSD=3.00) y 8.12 (%RSD=2.93) ambos con n=3. Esto demuestra que los valores predichos se ajustan adecuadamente sobre los valores experimentales obtenidos con una dispersión adecuada.



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

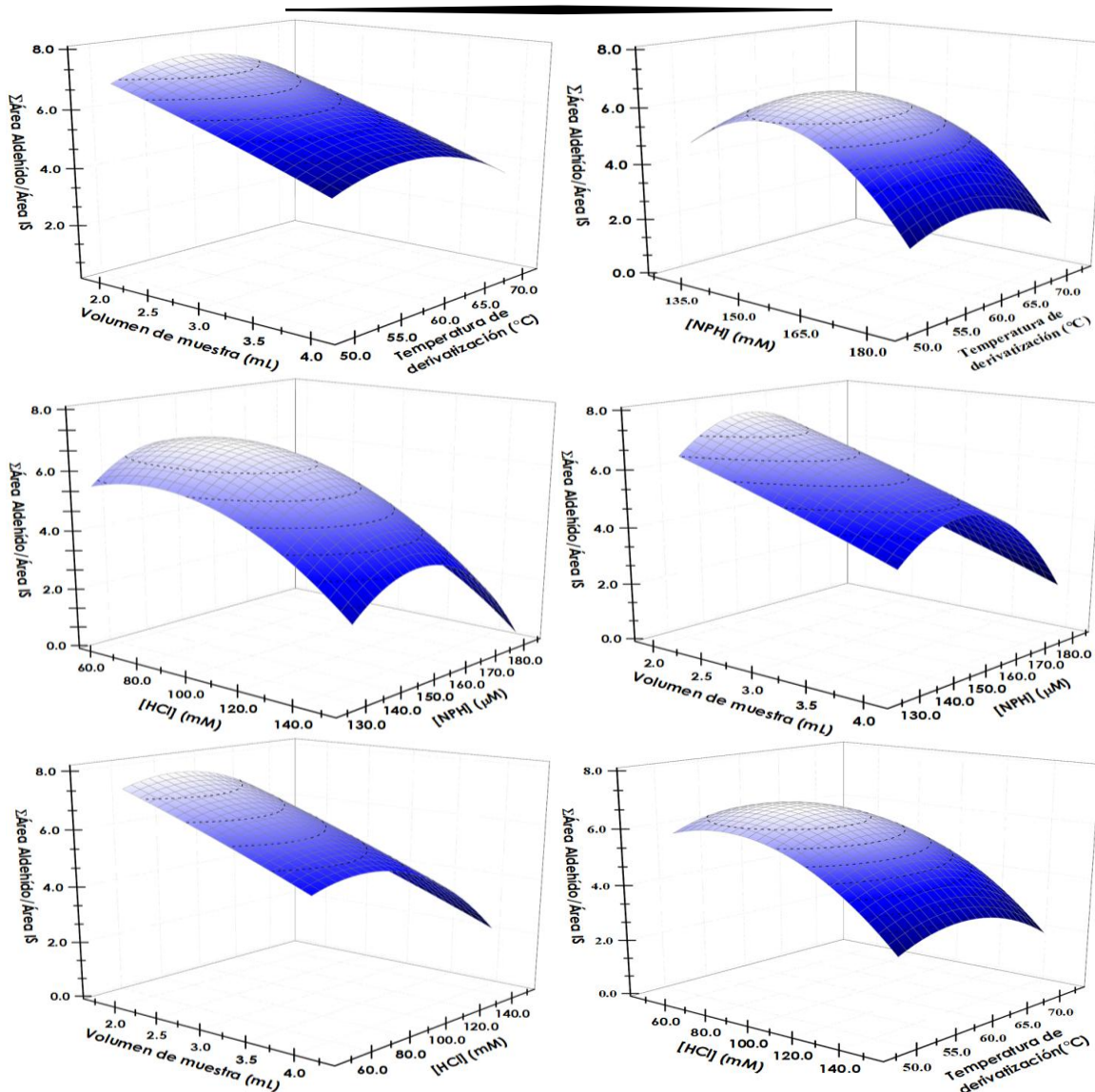
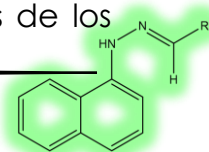


Figura 21. Gráficos de superficie de las variables críticas. Valores constantes [NPH]= 156.0 μM ; Volumen de muestra= 3.0 mL; [HCl]= 100.0 mM; Temperatura= 60.0 °C.

4.3.3 Validación de la metodología de determinación de aldehídos en muestras de aceite vegetal comestible

Se construyeron líneas de calibrado en aceite dopado para cada aldehído en el intervalo de 25-500 $\mu\text{g L}^{-1}$. El área de pico de los analitos fue medida por triplicado. Los valores de las intersecciones incluyen cero en todos los casos, lo cual es requerido en metodologías selectivas. Los valores de los



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

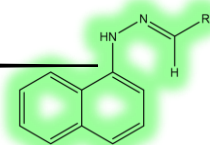
LODs obtenidos están en el intervalo de 4.0-6.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, calculados para una relación señal-ruido igual a 3.29. La precisión de la metodología fue estimada como repetitividad y reproducibilidad en términos de desviación estándar relativa (%RSD $n=3$) en tres niveles de concentración (100, 200, 300 $\mu\text{g L}^{-1}$). Los resultados en todos los casos fueron menores al 10% RSD, indicando una adecuada precisión de los resultados. La exactitud se evaluó mediante ensayos de recuperación de muestras de aceite enriquecidas. El tanto por ciento de recuperación se encontró en el intervalo de 92.57-109.68% con %RSD menores al 10% en los tres niveles evaluados (50, 250, 450 $\mu\text{g L}^{-1}$) observando una adecuada exactitud para la determinación de aldehídos (Tabla 5).

Tabla 5. Parámetros de regresión de las líneas de calibrado de aldehídos aceite vegetal comestible.

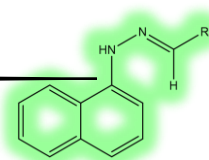
Parámetros analíticos			Pentanal	Hexanal	Heptanal	Octanal	Nonanal	Decanal
Coeficiente de determinación (r^2)			0.9999	0.9995	0.9995	0.9994	0.9992	0.9989
LOD $\mu\text{g L}^{-1}$			5.0	4.0	4.2	4.4	5.3	6.2
LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$			15.2	12.2	12.7	13.5	16.0	18.8
$b_1 \pm \delta b_1$			674.541 $\pm$ 7.071	1021.288 $\pm$ 8.868	844.268 $\pm$ 7.385	839.358 $\pm$ 6.522	653.711 $\pm$ 6.035	632.351 $\pm$ 8.136
$b_0 \pm \delta b_0$			-0.004 $\pm$ 0.007	-0.006 $\pm$ 0.011	-0.006 $\pm$ 0.008	0.003 $\pm$ 0.007	0.001 $\pm$ 0.006	-0.005 $\pm$ 0.009
Precisión (%RSD, $n=3$)	Intradía	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	5.72	6.09	6.31	5.73	6.47	6.44
		200 $\mu\text{g L}^{-1}$	4.56	3.94	4.15	5.28	4.50	5.17
		300 $\mu\text{g L}^{-1}$	3.29	3.10	3.50	4.07	4.71	3.97
	Interdía	100 $\mu\text{g L}^{-1}$	8.95	7.39	6.62	7.16	7.80	8.48
		200 $\mu\text{g L}^{-1}$	6.03	7.21	6.24	6.53	5.77	6.43
		300 $\mu\text{g L}^{-1}$	3.90	4.29	5.09	6.21	4.96	5.68
%Recuperación (%RSD, $n=3$)	50 $\mu\text{g L}^{-1}$		92.57 (8.70)	107.57 (9.00)	109.68 (6.96)	105.19 (8.06)	95.61 (6.91)	98.84 (7.01)
	250 $\mu\text{g L}^{-1}$		103.81 (2.95)	94.02 (3.44)	101.17 (2.98)	94.69 (3.95)	97.12 (4.28)	107.37 (5.02)
	450 $\mu\text{g L}^{-1}$		101.53 (4.06)	102.05 (3.47)	99.13 (4.67)	102.14 (5.76)	95.1 (6.02)	93.92 (5.17)

4.3.4 Análisis de aldehídos en muestras de aceite vegetal

Se determinó el contenido de aldehídos en 5 variedades de aceites vegetales comestibles frescos (canola, soya, oliva, cártamo y coco). Los ácidos grasos sufren descomposición oxidativa cuando son sometidos a



almacenamiento prolongados y calentamiento a altas temperaturas, esto produce olores y sabores desagradables en alimentos. Al mismo tiempo, los aldehídos que se generan en el proceso de oxidación han sido relacionados con afecciones tóxicas al consumidor (Katragadda et al, 2010). En consecuencia, la determinación del contenido de aldehídos en aceite comestible es necesaria para garantizar la calidad y seguridad en muestras frescas o después de procesos de cocción (Peng et al., 2017). Para esto último se realizó un seguimiento para la formación de los aldehídos empleando calentamiento a 100 °C mediante la evaluación continua por dos horas, analizando cada 30 minutos. Definiendo la apertura del envase donde están almacenados los aceites como el tiempo "0". La presencia de los 6 aldehídos solo se observó en el aceite canola con un contenido total de 382.01 $\mu\text{g L}^{-1}$, en el aceite de coco (120.82 $\mu\text{g L}^{-1}$) no se detectaron la presencia de octanal ni decanal, el aceite de cártamo (216.88 $\mu\text{g L}^{-1}$) no se detectó la presencia de octanal, mientras que para el aceite de soya y oliva no se detectó la presencia de ningún aldehído. La Figura 22 muestra el aumento del contenido de aldehídos respecto al tiempo de cada aceite evaluado; a partir de 30 min se detecta la formación de todos los aldehídos evaluados a excepción del aceite de oliva. El contenido máximo encontrado fue para el aceite de canola obteniendo una concentración total de 382.01 $\mu\text{g L}^{-1}$.



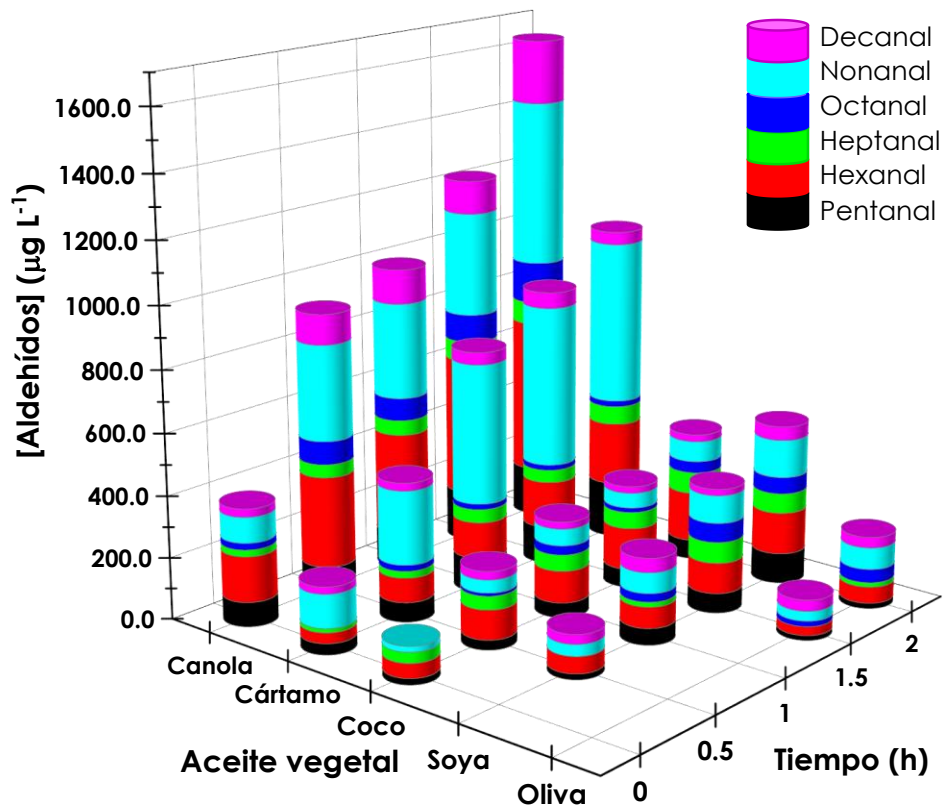
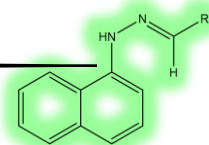


Figura 22. Contenido de aldehídos (Pentanal-Decanal) en cinco tipos aceite vegetal a diferentes tiempos de calentamiento.

Por otra parte se puede observar una variación en la concentración de aldehídos entre los diferentes tipos de aceite evaluados. La Figura 23 muestra los perfiles cromatográficos obtenidos para los 5 tipos de aceites evaluados. Se observa una mayor proporción del nonanal y hexanal en los aceites de canola, cártamo y soya, debido a la presencia de ácidos grasos insaturados (linoleico y oleico) que a la exposición al calor y transcurso del tiempo los enlaces C=C en los ácidos insaturados se oxidan y producen en mayor proporción estos aldehídos (Dominguez et al., 2019; Takhar et al., 2023). El aceite de coco presenta en mayor proporción de pentanal, hexanal y heptanal, esto relacionado con la presencia de ácidos grasos de cadenas cortas y que en procesos de cocción se han detectado en mayor



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

proporción la formación de estos aldehídos (Barlina et al., 2022). En el aceite de oliva se observa que la formación de aldehídos es mucho menor en comparación con los otros aceites evaluados, debido a presencia de componentes antioxidantes (compuestos fenólicos, tocoferoles y otros compuestos) que retrasa la degradación (Guclu et al., 2021).

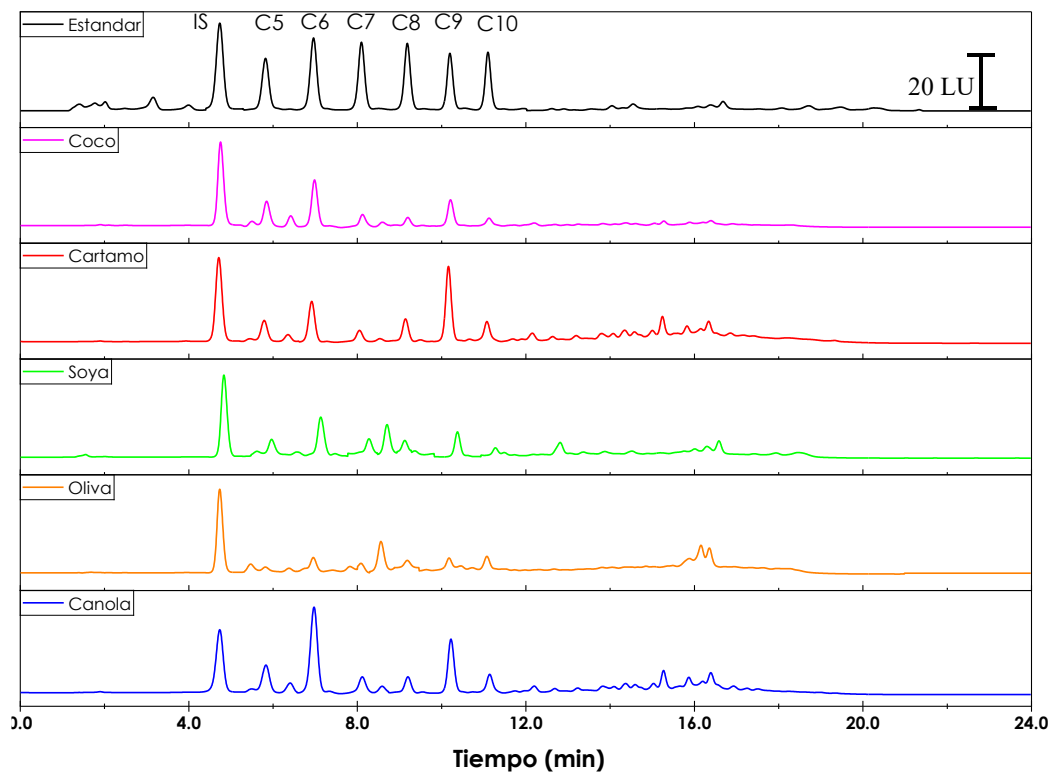
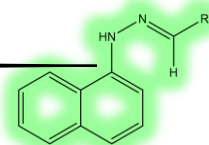
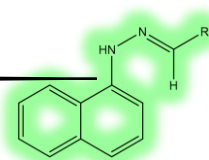


Figura 23. Cromatogramas para la determinación de aldehídos en muestras de aceite de canola y cártamo (1 hora), muestras aceite de coco, soya y oliva (2 horas) calentadas a 100 °C, y estándar de una muestra dopada con 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído (IS: Estándar interno, 1: Pentanal, 2: Hexanal, 3: Heptanal, 4: Octanal, 5: Nonanal, 6: Decanal).



4.3.5 Comparación con otras metodologías

La Tabla 6 presenta una comparación entre el método propuesto con otros métodos descritos en la literatura para la determinación de aldehídos en aceites vegetales comestibles. El método propuesto, basado en la extracción de los aldehídos grasos empleando ACN, seguido de su derivatización con la NPH y posterior análisis mediante HPLC-FLD, demostró ser competitiva. En comparación con métodos que utilizan reactivos convencionales, como la 2,4-dinitrofenilhidrazina y con otros agentes derivatizantes fluorescentes. Por otra parte es comparable hasta con sistemas basados con GC-MS o HPLC-MS logrando LODs similares para los analitos determinados. Además la detección por fluorescencia presenta un menor costo y es un sistema más sencillo en comparación con el sistema detección por MS. Por lo cual, el método propuesto resulta ser una alternativa analítica robusta, con adecuada sensibilidad analítica precisión y exactitud, permitiendo la cuantificación de los aldehídos grasos presentes en aceites vegetales en los intervalos de concentración descritos en la literatura.

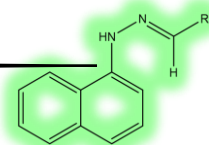


DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN ACEITES VEGETALES COMESTIBLES

Tabla 6. Comparación de la metodología propuesta con otras metodologías para determinación de aldehídos en muestras de aceites vegetal comestible.

Aldehídos	Agente derivatizante	Método de determinación	LOD $\mu\text{g L}^{-1}$	Referencia
Formaldehído, etanal, propanal, furfural, acroleína, benzaldehído, butanal	Ácido 4-hidrazinobenzoico	HPLC-UV/CE-DAD	5-170 350-450	de Lima et al. (2018)
Hexanal, heptanal, octanal, nonanal, decanal y undecanal	Di(pirrol-2-il)metanona	HPLC-FLD	6.4-12.4	Wang et al., (2020)
Malondialdehído, etanal, propanal, pentanal, formaldehído y acroleína	2,4-dinitrofenilhidrazina	GC-MS	50-100 ^a	Custodio-Mendoza et al. (2020)
Malondialdehído, acroleína, y 4-hidroxi-2-nonenal	2,4-dinitrofenilhidrazina	GC-MS	20-200	Custodio-Mendoza et al., (2022)
Etanal, Propanal, butanal y hexanal	2,4-dinitrofenilhidrazina	microchip CE	1000-3700	Dossi et al., (2008)
trans-2-butenal, trans-2-pentenal, trans-2-hexenal, trans-2-heptenal, trans-2-octenal, trans-2-nonenal, trans-2-decenal, y trans-2-undecenal	2-hidrazinopiridina y 2-hidrazino-5-metilpiridina	DCBI-MS/MS	30-180	Qin et al., (2025)
Malondialdehído, 4-hidroxi-2-hexenal y 4-hidroxi-2-nonenal	2,4-dinitrofenilhidrazina	HPLC-PAD	9-14	Ma y Liu, (2017)
Pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal	1-Naftilhidrazina	HPLC-FLD	4.0-6.2	Este trabajo

^a $\mu\text{g kg}^{-1}$, DCBI-MS/MS; Espectrometría de masas en tándem con ionización por haz de corona por desorción CE-DAD; Electroforesis capilar con detector de matriz de diodos, PAD; Detector de matriz de fotodiodos



Diseño de una metodología para el análisis de aldehídos grasos en muestras biológicas

5. DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

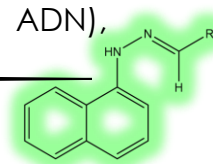
5.1 Antecedentes

5.1.1 Biomarcadores

Los biomarcadores se definen como alteraciones o perturbaciones de origen biológico que pueden ser medidos, evaluados y/o determinados. Su aplicación clínica abarca la predicción de enfermedades, diagnóstico, seguimiento terapéutico y pronóstico debido a que son indicadores de procesos fisiológicos normales o anormales, por lo que permiten diferenciar a un paciente afectado de un paciente sano (Henry y Hayes, 2012). Siendo su principal ventaja que pueden determinar de manera cualitativa y cuantitativa en diferentes muestras biológicas como sangre, orina, saliva, exhalaciones o tejidos (Ahmad et al., 2023).

Se clasifican acorde a su función en: biomarcadores de antecedente que identifican el riesgo de una enfermedad antes de su manifestación clínica; biomarcadores de cribado aquello que detectan la enfermedad subclínica; biomarcadores de diagnóstico, que confirman la enfermedad; biomarcadores de estadificación permiten conocer la gravedad de alguna enfermedad; y biomarcadores pronósticos, que predicen el progreso de una enfermedad o la respuesta al tratamiento (Shanmugam & Ravikumar, 2026).

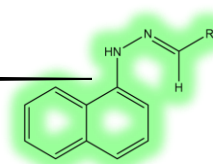
Por otra parte, los biomarcadores también pueden agruparse acorde a la naturaleza de la molécula. En este contexto se han desarrollado múltiples áreas que permite identificar, determinar y evaluar a los biomarcadores siendo estas la genómica (cambios en la secuencia de ADN),



transcriptómica (estudio del ARN, proteómica (estudio de la expresión de proteínas), metabolómica (estudio del perfil de moléculas pequeñas), y lipidómica (estudio de perfil lipídico) (Quezada et al., 2017).

Dentro de la metabolómica se han descrito diferentes compuestos de interés como ácidos grasos, alcoholes, aminas, aldehídos y cetonas (Jain, 2017). Estos son metabolitos que se han destacado por su simplicidad estructural en comparación con otro tipo de biomarcadores que suelen presentar estructuras moleculares complejas. Asimismo, diversos estudios han demostrado su aplicación en la identificación de enfermedades, incluyendo, insuficiencias cardíacas (Inai, 2022), cáncer (Kulasingham y Diamandis, 2008), enfermedades neurológicas (Dunckley et al., 2005), pulmonares (Jafari et al., 2019), renales (Sandelius et al., 2020), y gastrointestinales (Rondanelli et al., 2019).

Entre las diversas enfermedades donde la búsqueda y aplicación de biomarcadores ha incrementado es el cáncer, debido a su elevada mortalidad e incidencia a nivel mundial así como a la complejidad que caracteriza su diagnóstico y progresión. En este sentido los diferentes metabolitos generados han proporcionado una herramienta que permite un diagnóstico temprano (Taunk et al., 2025). No obstante, presentan un desafío crítico ya que la mayoría de los biomarcadores candidatos no cuentan la validación analítica adecuada, además los métodos para su determinación no suelen ser adecuados dada la complejidad de la matriz analítica y sus bajas concentraciones en las que se encuentran. Por otra parte los métodos desarrollados deben ser sensibles, específicos, fiables, reproducibles, precisos y exactos (Kim et al., 2026).

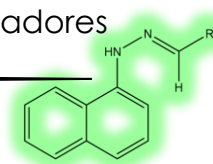


5.1.2 Aplicación de biomarcadores para cáncer

El cáncer una de las principales causas de muerte a nivel mundial, tan solo en 2024 se atribuyeron alrededor de 20.6 millones de nuevos casos de los cuales causo 9.8 millones de muertes (Sung et al., 2026). Esta enfermedad se caracteriza por un crecimiento sin control de células anormales que pierden su capacidad para morir (apoptosis) que se multiplican e invaden otras células de tejidos cercanos y puede llegar a invadir diferentes órganos dentro del organismo (metástasis). Este crecimiento ocurre debido a factores genéticas y moleculares que afectan los mecanismos normales de regulación del ciclo celular permitiendo que las células proliferen y evadan la apoptosis (Boire et al., 2024).

La vigilancia y el diagnóstico se realiza mediante tomografías computarizados, tomografía por emisión de positrones, resonancia magnética nuclear, y empleando biopsias, no obstante, presentan altas tasas de falsos positivos, elevados costos y suelen ser técnicas invasivas para por ello los biomarcadores son una alternativa ampliamente utilizada. Algunos ejemplos de estos son HER2/neu (receptor tirosina-proteína quinasa erbB-2) que se emplea en el diagnostico de cáncer de pulmón; el antígeno Prostático Específico (PSA, por sus siglas en inglés) es una proteína que se emplea en la detección de cáncer de próstata; el antígeno tumoral 125 (CA-125) es un antigénico empleado en cáncer de ovario, y el ADN tumoral circulante (ctDNA por sus siglas en inglés) que se emplea buscando ácidos nucleicos para el diagnóstico cáncer de colon.

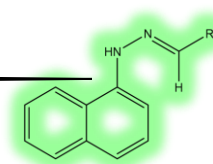
A pesar de estos biomarcadores actualmente se emplean en el diagnóstico de están enfermedad, su sensibilidad y especificidad son limitados, además de que la complejidad suele requerir de equipos costosos y procesos laboriosos. Por lo cual los aldehídos han surgido como biomarcadores



alternativos para el diagnóstico temprano de cáncer en específico de pulmón, ya que es el más frecuente con 2.6 millones de casos y con mayor mortalidad (Siegel et al., 2025). Diversos estudios han descrito que los perfiles específicos de aldehídos (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal) se ven afectados por procesos característicos de las células tumorales en el pulmón, lo que demuestra su potencial aplicación como biomarcadores (Sutaria et al., 2022). Sin embargo, su aplicación requiere de métodos estandarizados que permitan el análisis y cuantificación en las matrices biológicas en los niveles de concentración que se encuentran en el intervalo de los ng L^{-1} - $\mu\text{g L}^{-1}$, así como la selectividad, exactitud y precisión de la metodología deben ser adecuados (Kiejzik et al., 2025).

5.1.3 Formación de aldehídos en el organismo

Los aldehídos en el organismo pueden estar presentes debido a dos rutas, 1) exógena, que es debida a la ingesta de productos que contiene aldehídos y 2) endógena, relacionada con su formación en el organismo. Su generación puede ser mediante oxidación enzimática, donde diversas biomoléculas como proteínas, neurotransmisores y carbohidratos son metabolizadas por la enzima aldehído deshidrogenasa (Cagle et al., 2019), o mediante la peroxidación lipídica, caracterizado por la descomposición oxidativa de los lípidos siendo la principal fuente de aldehídos endógenos que van desde aldehídos de cadena larga, ramificados de cadena corta, insaturados y poliinsaturados (Ramana et al., 2013). Dado que la peroxidación lipídica es un proceso desencadenado por diversas especies reactivas de oxígeno (hidroxilo, alcoxilo y peroxilo) estos radicales sustraen hidrógenos y provocan fragmentaciones de los diferentes ácidos grasos poliinsaturados. Debido a que este mecanismo está regulado por la



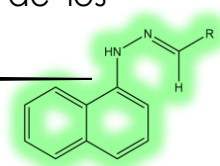
formación de radicales, se pueden obtener una gran variedad de aldehídos (Mortensen et al., 2023).

Por otra parte, cada grupo de aldehídos ha sido asociado con algún tipo de enfermedad y por ende pueden ser empleado como biomarcador. Los aldehídos grasos son los primeros aldehídos que se forman en la peroxidación lipídica (Müller-Wirtz et al., 2021) y han sido relacionados con diferentes tipos de cáncer destacando el cáncer de pulmón, por lo cual, la determinación de los aldehídos grasos desde el pentanal al decanal ha incrementado (Sutaria et al., 2022).

Algunos estudios mencionan cambios significativos en la concentración de los aldehídos en pacientes con cáncer en comparación de pacientes control sanos (Hopkinson y Schofield et al., 2018). Se ha descrito el aumento de ciertos aldehídos como el hexanal y heptanal en pacientes con cáncer atribuido a los cambios en la composición lipídica de la membrana celular así como al aumento del estrés oxidativo en las células tumorales. No obstante, en otros casos la concentración tiende a disminuir como caso del decanal, relacionado al consumo o absorción de las células cancerosas, o también se puede atribuir a una mayor actividad de procesos de oxidación favoreciendo la formación de los aldehídos de cadena corta (Sutaria et al., 2022).

5.1.3 Tratamiento de muestras para la extracción de aldehídos en muestras biológicas

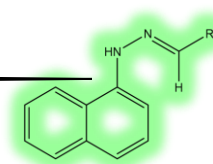
La determinación de aldehídos grasos contenidos en matrices biológicas ha estado limitada debido a que se encuentran en bajas concentraciones en el intervalo de los ng L^{-1} y $\mu\text{g L}^{-1}$. Del mismo modo como se mencionó anteriormente para otras matrices, es necesario la derivatización de los



aldehídos para lograr su detección. Además, la complejidad de las matrices biológicas es otra limitante, por lo que, es necesario la aplicación de protocolos de tratamiento de muestra antes de su análisis cuantitativo. Diversos tratamientos de extracción en fase sólida y líquida se han empleado, pero la extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) son las técnicas que han sido frecuentemente aplicadas (Kishikawa et al., 2019, Horká et al., 2022).

5.1.3.1 Extracción en fase sólida (SPE)

El desarrollo de la SPE surge debido a la necesidad de disminuir el uso de solventes organoclorados utilizados por metodologías basadas en LLE. La SPE permite limpiar la muestra y preconcentrar a los analitos de interés, para determinar a estos compuestos en niveles traza. La SPE se basa en la retención de los analitos de interés en una fase sólida o una fase líquida inmovilizada sobre un adsorbente sólido, el cual debe ser preferiblemente específico para mejorar la limpieza de la muestra. Posteriormente los analitos adsorbidos se eluyen empleando un solvente adecuado. El proceso general de preconcentración de los analitos mediante SPE consta de cuatro etapas básicas: acondicionamiento, extracción, lavado y elución (Figura 24). Dentro de las principales ventajas de la SPE están su rapidez, eficiencia y versatilidad (Kishikawa et al., 2019). La SPE ha permitido el análisis de aldehídos empleando principalmente cartuchos C₁₈, los cuales retienen compuestos no polares mediante la interacción hidrofóbica y permite la elución mediante solventes orgánicos como ACN o MeOH (Chevolleau et al., 2018)



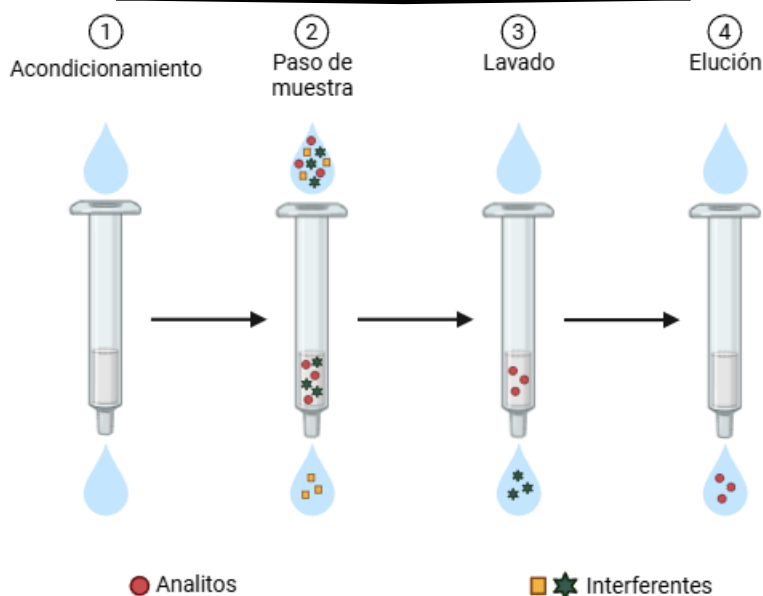
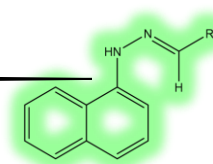


Figura 24. Representación de la extracción SPE, 1) Acondicionamiento, 2) paso de la muestra, 3) lavado y 4) elución.

5.1.3.2 Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPME se basa en el contacto de una pequeña fracción de la fase adsorbente, normalmente una fibra recubierta, el adsorbente cuando se ponen en contacto con muestra líquida o gaseosa retiene a los analitos de interés, posteriormente los analitos se eluyen. Cuando los analitos serán analizados mediante GC la elución puede ser térmica mientras cuando se emplean HPLC es mediante un solvente, el esquema de extracción se representa en la Figura 25. La SPME es una técnica rápida, sensible y simple en comparación a otras técnicas de extracción en fase sólida, además posee un elevado factor de preconcentración (Xia et al., 2019).



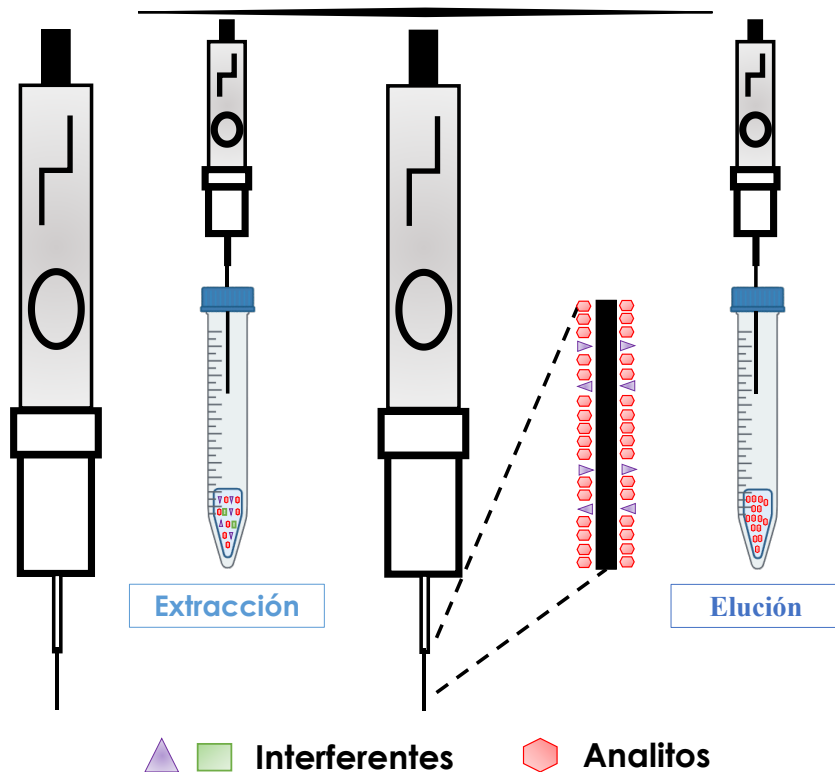
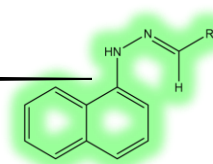


Figura 25. Representación de la SPME.

5.1.3.3 Extracción en fase sólida dispersiva (DSPE)

La DSPE se basa en la dispersión del adsorbente en la solución de la muestra que contiene a los analitos, la dispersión se realiza mediante agitación mecánica, esto favorece la extracción, debido a que el sólido empleado es de tamaño micrométrico se logra una mejor interacción sólido-analito. Los analitos retenidos en el adsorbente son eluidos de la fase sólida empleando un solvente, sin embargo, se requiere de procedimientos adicionales como filtración o centrifugación (Figura 26). La DSPE presenta diversas ventajas en comparación con las otras técnicas de extracción. Esta técnica de extracción permite obtener mejores LODs debido a una mayor área de contacto adsorbente-analito, además se describe como una técnica más ecológica que permite el reemplazo de sustancias orgánicas peligrosas, reducción de solventes y reactivos (Rosado et al., 2021).



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

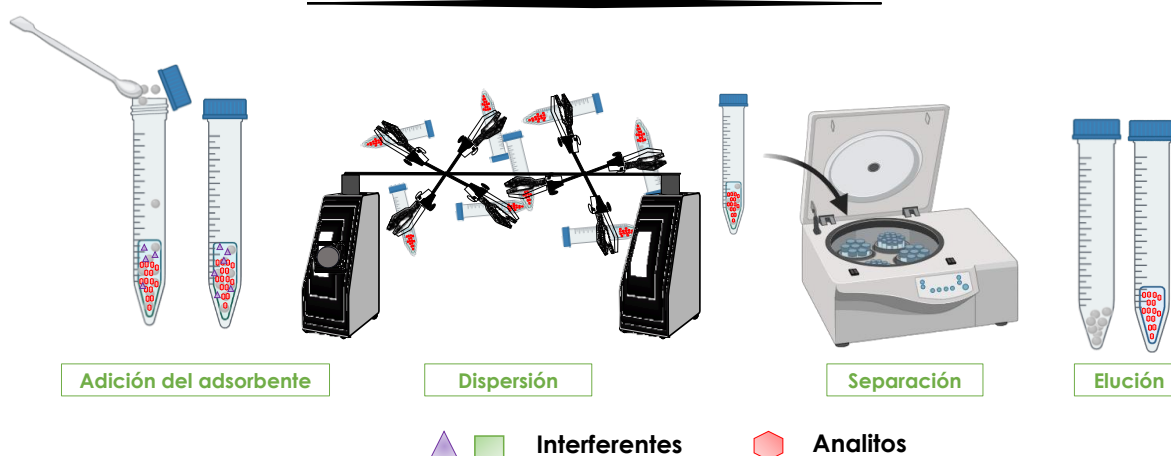
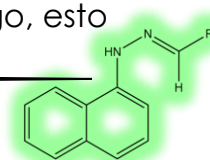


Figura 26. Representación de la DSPE.

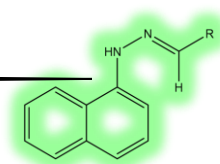
Se ha descrito una metodología para la determinación de 4-hidroxinonenal, acroleína y malondialdehído en muestras de orina, el método utiliza SPE con cartuchos de C₁₈ y dansilhidrazina como derivatizante (Hogard et al., 2017), los productos de derivatización se analizaron mediante HPLC-FLD obteniendo LODs en el intervalo de 6-200 nM. Otro método descrito analizó hexanal, heptanal, empleando como derivatizante clorhidrato de hidroxilamina y una fibra de SPME basada en un monolito de poli(ácido metacrílico -co -dimetacrilato de etilenglicol), el análisis se realizó analizaron mediante HPLC-MS obteniendo LODs de 9 a 15 nM (Chen et al., 2017). También se empleó una fibra SPME de triple fase comercial (Supelco) para la identificación de 2,5-dimetilbenzaldehído, 4-(1-metiletil)-benzaldehído y nonanal en muestras de orina mediante un GC-MS (Woollam et al., 2026).

En este sentido, es necesario el desarrollo de metodologías con alta sensibilidad, selectividad y reproducibilidad para la determinación de aldehídos grasos en matrices biológicas como: el plasma sanguíneo y orina. Dado a que son metabolitos que sufren alteraciones a partir de la proliferación del cáncer de pulmón, por ello podría fungir como posibles biomarcadores para el diagnóstico de esta enfermedad. Sin embargo, esto



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

es un desafío analítico debido a sus bajas concentraciones, la presencia de numerosos compuestos interferentes. Por lo cual, la aplicación de la DSPE en muestras de orina y plasma sanguíneo es una alternativa adecuada para el pretratamiento ya que permite preconcentrar a los analitos sumado a la derivatización de los aldehídos con NPH que demostró ser un agente adecuado al acoplarse con HPLC-FLD.



5.2 Metodología

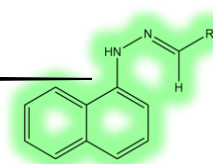
5.2.1 Condiciones cromatográficas para el análisis de aldehídos en muestras biológicas

La fase móvil para la separación cromatográfica se compuso de ácido acético acuoso al 1% v/v (A) y metanol (B) utilizando la siguiente gradiente de elución: 0 a 4 min A:B = 27:75; 4 a 13 min A:B de 25:75 a 5:95; 13 a 17 min A:B = 5:95, 17 a 20 min A:B de 5:95 a 25:75 y 20-22 min A:B = 25:75. La muestra se introdujo empleando un bucle de inyección de 20 μ L. La detección fluorescente de los productos de derivatización se programó a 260 nm (excitación) y 380 nm (emisión).

5.2.2 Selección del método de extracción/derivatización basado DSPE.

La DSPE empleó partículas de gel de sílice funcionalizadas con octilo con tamaño de partícula de 40-63 μ m (absorbente; Sigma-Aldrich). El absorbente se activan agregando 1 mL de ACN y la mezcla se agita mecánicamente durante 3 min empleando un vortex. La fase líquida se decanta del adsorbente después de centrifugar durante 3 min a 2500 rpm. Posteriormente se adiciona 1 mL de agua desionizada, la mezcla se agita durante 3 min y se centrifuga a 2500 rpm por 5 min, transcurrido el tiempo se retira la fase líquida (este paso de activación se retire dos veces). Para la extracción-derivatización de aldehídos en orina se evaluaron las siguientes rutas:

Derivatización *in situ*: Se disuelven 0.0019 g de NPH en 1 mL de metanol y se aforan a 10 mL con agua desionizada (1000 μ mol L⁻¹). La solución de NPH se agrega a 200 mg del absorbente (previamente activado), la mezcla se agita durante 10 min, posteriormente la mezcla se centrifuga, la fase líquida

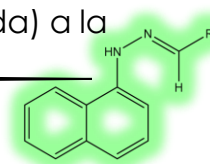


se desecha y el absorbente-NPH se emplean en la extracción-derivatización de los aldehídos.

a) 5 mL de orina dopada con $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído se diluyen a un volumen de 10 mL empleando agua desionizada. A la solución se adicionan 200 mg del adsorbente (C8-NPH) y se agita durante 30 min a temperatura ambiente, después la mezcla se centrifuga y se retira la fase líquida. El absorbente que contiene retenidos a los analitos y el NPH, se colocan en la estufa a 60°C durante 45 min. Posteriormente se adicionan 2 mL de MeOH al sólido y se agita por 5 min empleando un vortex. La mezcla se centrifuga y la fase líquida se evapora empleando una bomba de aire, el residuo se reconstituye con 1 mL de MeOH y se analiza mediante HPLC-FLD (Figura 27a).

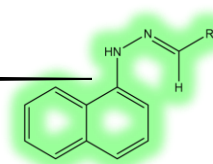
b) 5 mL de orina dopada con $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído se diluyen a un volumen de 10 mL empleando agua desionizada. A la solución se adicionan 200 mg del adsorbente (C8-NPH) y se agitan mecánicamente durante 45 min a temperatura 60°C , posteriormente la mezcla se centrifuga y se desecha la fase líquida. La elución se realiza con 2 mL de metanol agitando por 5 min empleando un vortex, posteriormente la mezcla se centrifuga, la solución se evapora empleando una bomba de aire, el residuo se reconstituye con 1 mL de MeOH y se analiza mediante HPLC-FLD (Figura 27b).

c) Derivatización en la matriz (Figura 27c): 5 mL de orina dopada con $100\ \mu\text{g L}^{-1}$ con cada aldehído se le adiciona 1 mL de NPH ($10\ \text{mmol L}^{-1}$) disuelto en metanol, se ajusta a $\text{pH}=4.0$ con una solución de HCl $1\ \text{mol L}^{-1}$ y se afora a 10 mL con agua desionizada. Posteriormente, la solución de orina se coloca a 60°C durante 45 min, transcurrido el tiempo de reacción se adicionan 200 mg del adsorbente (previamente activado con ACN/agua deionizada) a la



solución y se agita (30 min) a temperatura ambiente. La mezcla se centrifuga desechando la fase líquida. Los compuestos adsorbidos se eluyen con 2 mL de ACN agitando por 5 min empleando un vortex. La mezcla se centrifuga y la solución se evapora empleando una bomba de aire, el residuo se reconstituye con 1 mL de MeOH y se analiza mediante HPLC-FLD.

d) Extracción de los analitos sin derivatizar (Figura 27d): 5 mL de orina dopada con $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído se diluyen a un volumen de 10 mL empleando agua desionizada. A la solución se adicionan 200 mg del adsorbente (previamente activado). La mezcla se agita mecánicamente durante 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifuga reservando la fase sólida. Los aldehídos se eluyen con 2 mL de NPH (5 mmol L^{-1}) disuelto en ACN, la mezcla se agita durante 5 min empleando un vortex, después se centrifuga. El adsorbente se retira, la fase líquida se acidifica con 20 μL de HCl concentrado y se coloca la solución a 60°C durante 45 min. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se evapora empleando una bomba de aire, el residuo se reconstituye con 1 mL de MeOH y se analiza mediante HPLC-FLD.



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

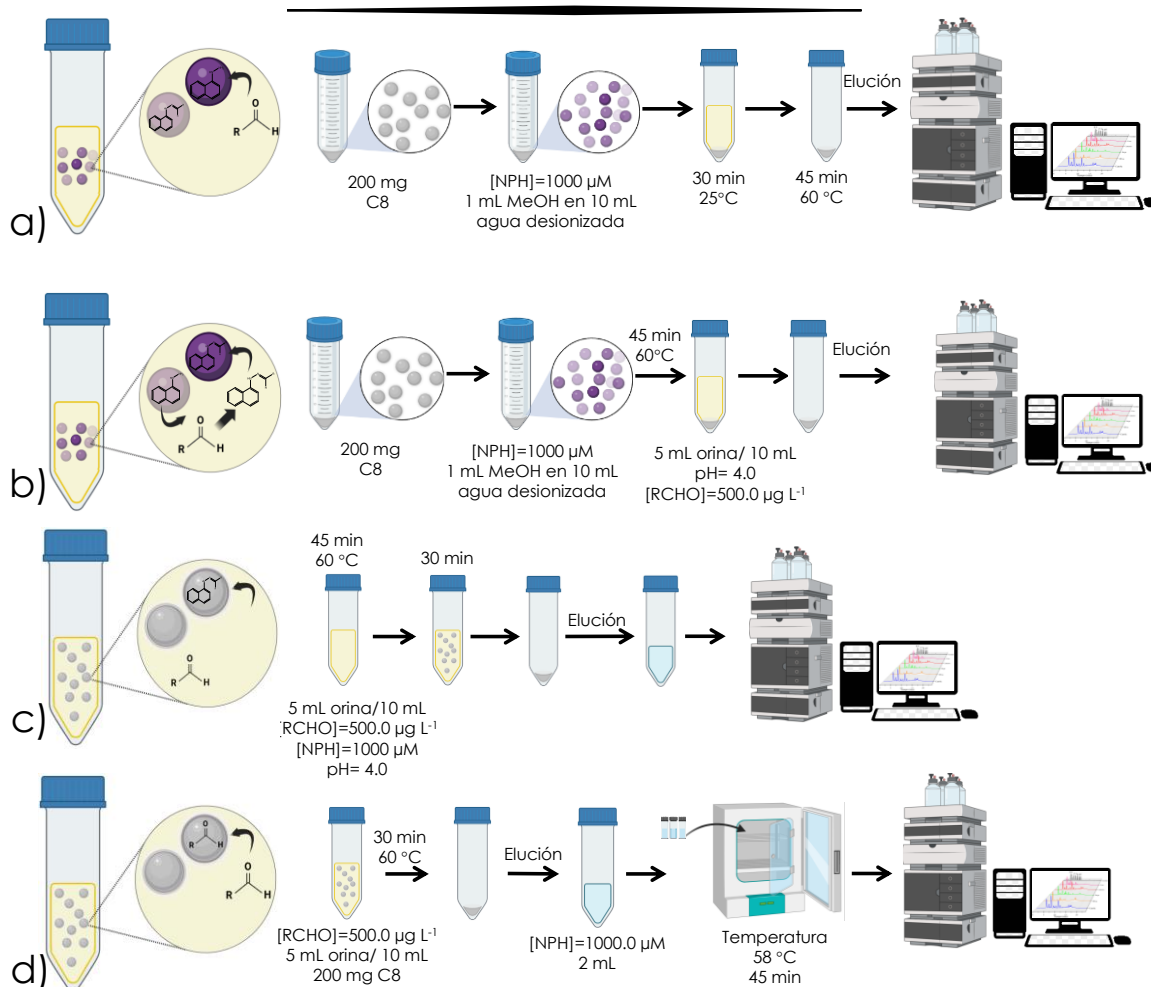
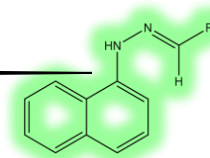


Figura 27. Rutas evaluadas en la selección del método de extracción/derivatización basado DSPE en muestras de orina dopada con 500 $\mu g L^{-1}$ de cada aldehído.

5.2.3 Optimización de las condiciones de extracción/derivatización basado en DSPE.

Se utilizó un diseño experimental de Plackett-Burman de 12 experimentos para seleccionar y evaluar las variables críticas involucradas en el proceso de extracción-derivación de aldehídos en muestras de orina. Se evaluaron las siguientes variables: cantidad de absorbente (50-200 mg), volumen de muestra de orina (VMO: 2-5 mL), pH de la muestra de orina (pH; 4-8), efecto



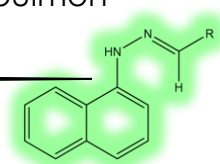
salino (%NaCl; 5-10%), tiempo de contacto (TC; 10-30 min), volumen de elución (VE; 1-3 mL), concentración de NPH ($[NPH]_0$; 200-600 μ M) y concentración de HCl ($[HCl]_0$; 75-150 mM). Posteriormente, las variables críticas se optimizaron mediante un diseño central compuesto. Las variables que no contribuyeron significativamente se mantuvieron constantes en el valor óptimo hallado en el diseño de Plackett-Burman. Todos los experimentos de los diseños se realizaron utilizando muestras de orina dopada con cada aldehído y estándar interno (IS; metil isobutil cetona) a concentraciones de 100 y 1000 μ g L⁻¹, respectivamente. El análisis de datos se realizó utilizando el software estadístico Minitab 21.

5.2.4 Validación de la metodología de determinación de aldehídos en muestras de orina

La metodología se validó según los criterios de la IUPAC (Currie, 1995). El procedimiento de validación incluyó la determinación de las líneas de calibrado, los LODs y LOQs, calculados como relaciones señal/ruido (S/N) de 3.29 y 10, respectivamente. La precisión se evaluó en términos intra e interdía (repetibilidad y reproducibilidad) mediante el análisis de réplicas de muestras de orina añadidas a tres niveles de concentración (10, 30 y 50 μ g L⁻¹), calculadas en términos de desviación estándar relativa (%RSD). La exactitud de la metodología se evaluó mediante ensayos de recuperación mediante el análisis de réplicas de muestras de orina añadidas a tres niveles de concentración (5, 25 y 45 μ g L⁻¹) informados como %recuperación.

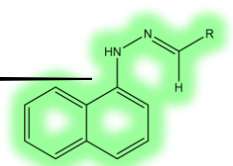
5.2.5 Determinación de aldehídos en muestras biológicas

Se recolectaron veinte muestras de pacientes, se tomó como muestra la primera orina de la mañana de cada voluntario: ocho pacientes (control); ocho pacientes fumadores; y cuatro pacientes con cáncer de pulmón



(doce mujeres y ocho hombres). Las muestras de orina se almacenaron en tubos de polipropileno de 50 mL y se mantuvieron a -20 °C hasta su análisis. Para evaluar el alcance de la metodología, se recolectaron ocho muestras de sangre humana en ayunas. Cuatro pacientes del grupo control y cuatro pacientes con cáncer de pulmón (cuatro mujeres y cuatro hombres). El estudio fue aprobado por el comité de bioética (Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; ICSa290/2025). Todos los voluntarios firmaron un formulario de consentimiento informado para participar en el estudio.

5 mL de una muestra de orina se ajustan a pH 8 y se añaden 0.5 g de NaCl. La muestra se afora a un volumen final de 10 mL con agua desionizada. La solución de orina se coloca en un tubo de polipropileno que contiene 200 mg del adsorbente previamente activado. La mezcla se agita mecánicamente durante 30 min a temperatura ambiente (25 °C). Después del tiempo de agitación, la mezcla se centrifuga a 2500 rpm durante 5 min. La fase líquida se retira y se lava tres veces con 2 mL de agua desionizada. La fase líquida se decanta del adsorbente después de centrifugar durante 5 min a 2500 rpm. Posteriormente, se añaden 4.7 mL de una solución de $[NPH]_O = 936 \mu M$ y $[HCl]_O = 88 mM$, preparada en ACN. La mezcla se agita durante 5 min y se centrifuga a 2500 rpm durante otros 5 min. La fase líquida se transfiere a un tubo de vidrio y se incuba a 60 °C durante 45 min para permitir la derivatización de los aldehídos. Transcurrido el tiempo de reacción, la solución se evapora empleando una bomba de aire, y el residuo se reconstituye con 250 μL de MeOH y se analiza mediante HPLC-FLD. Las concentraciones de los aldehídos se calcularon mediante interpolación en la curva de calibración. El análisis de las muestras de plasma sanguíneo se realiza utilizando el mismo tratamiento descrito para las muestras de orina.



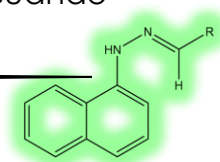
5.3 Discusión de resultados

5.3.1 Selección del método de extracción/derivatización basado DSPE.

La determinación de aldehídos se ha realizado en muestras biológicas como exhalaciones, orina, plasma y suero sanguíneo, siendo la orina la que se describe como la más sencilla entre las muestras biológicas debido a que resulta ser menos invasiva (El-Maghrabey et al., 2024). La derivatización *in situ* es de las técnicas más empleadas para extracción-derivatización de los aldehídos debido a que disminuye el número de etapas, en un solo paso (Baghdady y Schug, 2016).

La metodología a) explora uno de los mecanismos en los que se describe que los aldehídos reaccionan directamente sobre el adsorbente donde se encuentra inmovilizado el derivatizante, por lo cual en una primera etapa se realiza la extracción de los aldehídos y posteriormente se dejan reaccionar directamente sobre la superficie sólida, esto minimiza la pérdida de analito, y aumenta la precisión de la metodología (Atapattu, 2023). Sin embargo en el análisis cromatográfico (Figura 28a) se solo se observa la formación de los productos de los aldehídos nonanal y decanal, mientras que los otros 4 aldehídos no se observan. Esto se ha relacionado a que en la fase adsorbente no existe un medio adecuado donde se lleve la reacción o que las absorbente no extraiga a los aldehídos por una competencia con el derivatizante, por lo cual solamente se observan los aldehídos con menor polaridad.

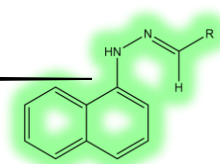
La estrategia b) presenta un principio similar, el paso de extracción-derivatización se realiza en conjunto con solución de la muestra. El NPH que se encuentra soportado sobre el adsorbente se reparte sobre la solución de la muestra y reacciona con los aldehídos, formando las hidrazonas, cuando



las hidrazonas se forman en la solución se vuelve a extraer al adsorbente (She et al., 2021). Bajo estas condiciones se observa la presencia de los seis productos de derivatización (Figura 28b).

La ruta c) donde la derivatización se lleva en la solución matriz, y posteriormente se realiza la extracción de las hidrazonas (Zhang et al., 2010), mostro un perfil cromatográfico (Figura 28c) en donde los productos derivatizados no se extraen, ya que no se observa ninguna señal de los productos por el elevado contenido de agua en el medio lo que genera la descomposición de los productos de derivatización.

Por otro lado, en la ruta d) el cambio en el medio de reacción se lleva a cabo en dos etapas 1) extracción de los aldehídos de la matriz analítica, 2) y posterior elución empleando el solvente adecuado, donde se lleva la etapa de derivatización es otra estrategia que ha sido empleada en la determinación de aldehídos (El-Maghrabey et al., 2024). Por lo que, los aldehídos se extraen de la solución de orina empleando el adsorbente, los analitos quedan retenidos y se eluyen empleando ACN que contenía el NPH y el medio ácido, posteriormente se colocaron a 60°C durante 45 min. Bajo esta estrategia se logran observar todas las señales de los analitos derivatizados, además las áreas de pico son mayores en comparación con las otras rutas evaluadas (Figura 28d).



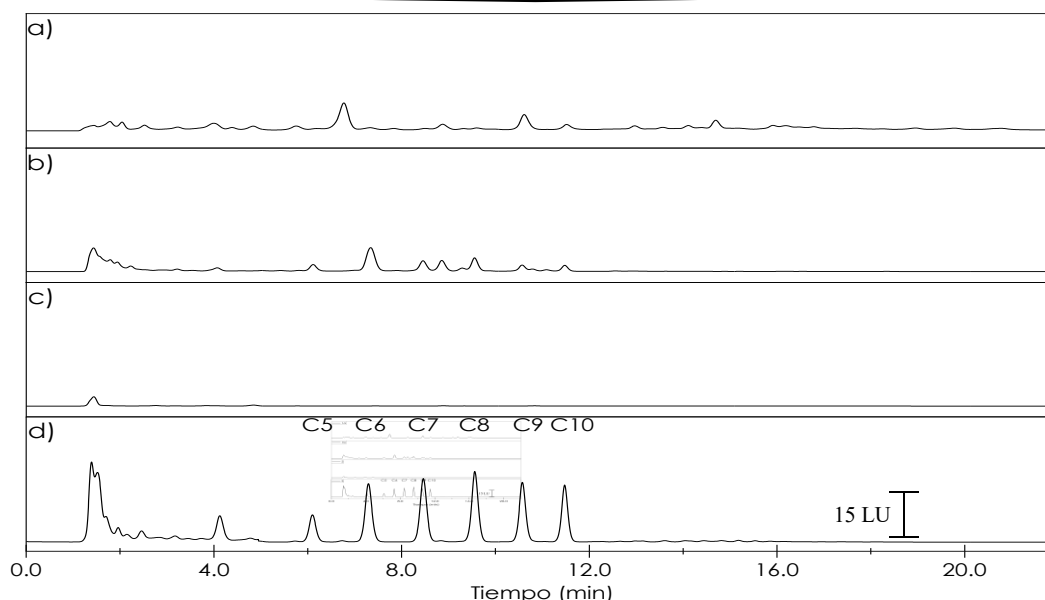
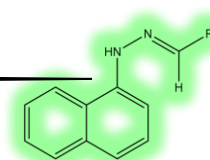


Figura 28. Perfiles cromatográficos obtenidos para la selección del método de extracción/derivatización basado DSPE en muestras de orina dopada con $500 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído a) derivatización directamente sobre el adsorbente b) extracción-derivatización en conjunto con solución de la muestra, c) derivatización en la matriz analítica y d) derivatización en dos etapas (C5, pentanal; C6, hexanal; C7, heptanal; C8, octanal; C9, nonanal; C10, decanal).

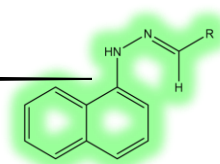
Posterior a la evaluación de la ruta de derivatización, se seleccionó el IS. Se evaluaron 4-clorobenzaldehído, 2-hidroxi-5-metoxibenzaldehído, benzofenona y metilisobutilcetona. El 4-clorobenzaldehído coelúa con el mismo tiempo de retención que el compuesto derivatizado de pentanal. Mientras que el 2-hidroxi-5-metoxibenzaldehído y la benzofenona no se observan bajo las condiciones cromatográficas. Posiblemente debido a un abatimiento de la señal de fluorescencia o un cambio en las longitudes de excitación o emisión. La metilisobutilcetona se pudo integrar al sistema aplicando cambios en el gradiente de separación cromatográfico seleccionando este compuesto como IS.



5.3.2 Optimización de las condiciones de extracción-derivación de muestras de orina

La DSPE permite la eliminación o reducción de compuestos interferentes contenidos en la matriz analítica, reteniendo el/los analito(s) de interés en la fase sólida, lo que posibilita su preconcentración. Generalmente, estas extracciones se ven afectadas por diversas variables como el pH, efecto salino, la cantidad de adsorbente, el volumen de la muestra, el tiempo de contacto entre el adsorbente y la solución de la matriz, y el volumen del solvente de elución. Además, al integrar un proceso de derivatización de aldehídos utilizando hidrazinas, deben considerarse los efectos de la concentración del agente derivatizante y del medio ácido sobre la reacción. En consecuencia, el uso del diseño experimental permite la identificación y evaluación de variables significativas, reduce los errores sistemáticos y establece condiciones óptimas para múltiples respuestas en un número muy limitado de experimentos (Candioti et al., 2014).

Se aplicó un diseño de Plackett-Burman de 12 experimentos para el análisis imparcial y la evaluación de la significancia de múltiples variables (Athanasiadis et al., 2024). La Tabla 7 muestra los niveles de cada factor de entrada evaluado. Los niveles de estos factores (bajo (-1) y alto (+1)) se seleccionaron de acuerdo con los intervalos descritos para la determinación de aldehídos (El-Maghrabey et al., 2024) y se complementaron con una evaluación univariable previa. La sumatoria de la relación entre el área del pico de los aldehídos derivatizados entre el área del pico del IS se utilizó como variable de salida del diseño, con el objetivo de maximizar la señal.



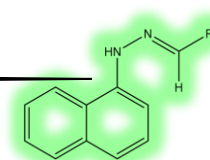
DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tabla 7. Matriz y resultados del diseño de experimentos Plackett-Burman para el proceso de extracción-derivatización de aldehídos en muestras de orina.

Exp	C8(mg)	VMO (mL)	TC (min)	%NaCl	pH	VE (mL)	[NPH] _o (μM)	[HCl] _o (mM)	Σ relación de áreas de pico (aldehído derivatizado:S)	
1	200 (+1)	2 (-1)	10 (-1)	5 (-1)	8 (+1)	3 (+1)	600 (+1)	75 (-1)	4.97	5.01
2	200 (+1)	5 (+1)	10 (-1)	10 (+1)	4 (-1)	1 (-1)	200 (-1)	15 (+1)	0.99	0.47
3	200 (+1)	5 (+1)	10 (-1)	10 (+1)	8 (+1)	1 (-1)	600 (+1)	75 (-1)	1.74	1.29
4	200 (+1)	2 (-1)	30 (+1)	10 (+1)	4 (-1)	3 (+1)	200 (-1)	75 (-1)	3.38	2.78
5	200 (+1)	2 (-1)	30 (+1)	5 (-1)	4 (-1)	1 (-1)	600 (+1)	150 (+1)	0.68	0.61
6	200 (+1)	5 (+1)	30 (+1)	5 (-1)	8 (+1)	3 (+1)	200 (-1)	150 (+1)	3.28	3.12
7	50 (-1)	5 (+1)	30 (+1)	10 (+1)	4 (-1)	3 (+1)	600 (+1)	75 (-1)	5.59	5.26
8	50 (-1)	2 (-1)	10 (-1)	10 (+1)	8 (+1)	3 (+1)	200 (-1)	150 (+1)	1.53	1.47
9	50 (-1)	2 (-1)	10 (-1)	5 (-1)	4 (-1)	1 (-1)	200 (-1)	75 (-1)	0.63	0.71
10	50 (-1)	5 (+1)	30 (+1)	5 (-1)	8 (+1)	1 (-1)	200 (-1)	75 (-1)	1.80	1.87
11	50 (-1)	5 (+1)	10 (-1)	5 (-1)	4 (-1)	3 (+1)	600 (+1)	150 (+1)	2.00	1.96
12	50 (-1)	2 (-1)	30 (+1)	10 (+1)	8 (+1)	1 (-1)	600 (+1)	150 (+1)	0.85	0.37

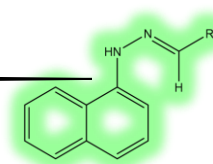
La Figura 29 muestra el diagrama de Pareto (intervalo de confianza del 95%) obtenido del diseño experimental de Plackett-Burman. Se pueden observar los efectos relacionados con la significancia de cada variable evaluada para el proceso de extracción-derivatización. El orden de contribución se presenta para el sistema evaluado fue: VE > [HCl]_o > [NPH]_o > TC > VMO > C8 > pH > %NaCl. No obstante, solo las variables VE, [HCl]_o y [NPH]_o presentaron contribuciones significativas en el proceso.

El volumen de elución es la variable con la mayor contribución debido a que en esta etapa, es necesario eluir la cantidad máxima de moles de aldehídos retenidos en el adsorbente. Por lo tanto, el ACN utilizado en la elución permite romper las interacciones formadas entre el adsorbente y los aldehídos, asegurando la disponibilidad de los aldehídos en el medio para la posteriormente derivatizarse. La concentración del medio ácido en un sistema de derivatización que emplea hidrazinas se ha identificado como el paso crítico en este tipo de reacción; el uso de HCl es particularmente significativo. El HCl proporciona los protones necesarios en el medio para protonar el oxígeno carbonílico del aldehído, permitiendo el ataque



nucleofílico por NPH (Boumya et al., 2017a). La concentración del agente derivatizante es la tercera variable más significativa. Un aumento de NPH se asocia con un cambio en la formación del producto, resultando en una mayor formación de la hidrazona correspondiente. Adicionalmente, un exceso de NPH asegura la reacción con los aldehídos grasos objetivo a pesar de la presencia de múltiples compuestos interferentes en la muestra (Chen et al., 2018). El diseño evaluado mostró que las variables con mayor impacto se relacionan con la etapa de derivatización.

Por otro lado, las variables tiempo de contacto, volumen de muestra de orina, cantidad de absorbente, pH de la muestra de orina y %NaCl que están relacionadas con el proceso de extracción, no presentaron una contribución significativa. De manera general estas variables están relacionadas, debido a que afectan el equilibrio entre el número de moles de aldehídos extraídos de la solución matriz al adsorbente (de Oliveira Silveira et al., 2021), los aldehídos grasos exhiben alta hidrofobicidad y por lo tanto queda retenidos en el adsorbente debido a que el C8 también posee alta hidrofobicidad (Chen et al., 2021). Por lo tanto, el equilibrio no se ve afectado significativamente por estas variables. Los valores óptimos obtenidos del diseño de Plackett-Burman son cantidad de absorbente=200 mg, volumen de muestra de orina=5 mL, pH de la muestra de orina=8, %NaCl=10, tiempo de contacto=30 min, volumen de elución=3 mL, $[NPH]_0=600\ \mu M$ y $[HCl]_0=75\ mM$.



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

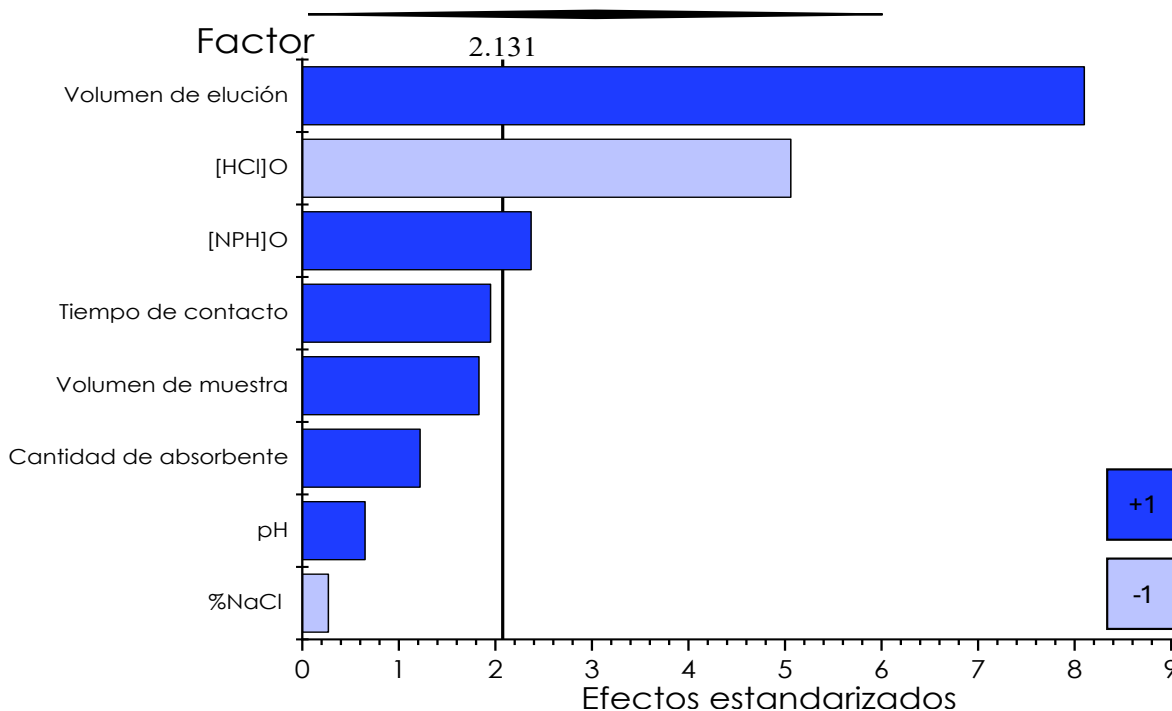
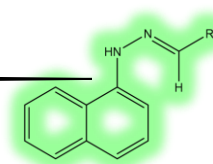


Figura 29. Diagrama de Pareto del diseño de Plackett-Burman obtenido para la evaluación del proceso de extracción-derivación de aldehídos contenidos en la orina ($t = 2.131$).

Seleccionadas las variables críticas (volumen de elución, $[HCl]_O$, $[NPH]_O$), se optimizaron mediante un diseño central compuesto con 3 variables y 20 experimentos. Las variables que no mostraron una contribución significativa se mantuvieron en el valor obtenido con el diseño de Plackett-Burman. Los experimentos se realizaron aleatoriamente para evitar el efecto de factores de ruido y reducir los errores sistemáticos. La Tabla 8 muestra los niveles de cada variable crítica evaluada con el diseño central compuesto. Los niveles de estos factores se establecieron en $-\alpha$, -1 , 0 , $+1$ y $+\alpha$, con $\alpha = 1.68$. El valor central (0) se seleccionó en función del valor óptimo obtenido del diseño de Plackett-Burman.



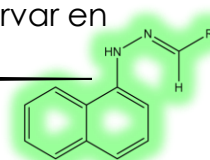
DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tabla 8. Matriz y resultados del diseño de experimentos central compuesto para el proceso de extracción-derivatización de aldehídos en muestras de orina.

Exp	Volumen de elución (mL)	[NPH] o (μ M)	[HCl] o (mM)	Σ relación de áreas de pico (aldehído derivatizado:IS)
1	3.0 (0)	600 (0)	75 (0)	5.31
2	2.0 (-1)	400(-1)	50(-1)	4.94
3	2.0 (-1)	800 (+1)	50(-1)	5.73
4	4.0 (+1)	400(-1)	100 (+1)	8.46
5	3.0 (0)	600 (0)	75 (0)	4.70
6	4.0 (+1)	400(-1)	50(-1)	6.07
7	4.0 (+1)	800 (+1)	50(-1)	6.83
8	3.0 (0)	600 (0)	75 (0)	5.15
9	3.0 (0)	264 (- α)	75 (0)	8.59
10	3.0 (0)	600 (0)	75 (0)	4.87
11	2.0 (-1)	800 (+1)	100 (+1)	7.72
12	3.0 (0)	936 (+ α)	75 (0)	9.02
13	3.0 (0)	600 (0)	75 (0)	5.53
14	4.7 (+ α)	600 (0)	75 (0)	9.77
15	3.0 (0)	600 (0)	33 (- α)	2.49
16	1.3 (- α)	600 (0)	75 (0)	6.97
17	4.0 (+1)	800 (+1)	100 (+1)	7.7
18	2.0(-1)	400(-1)	100 (+1)	6.82
19	3.0 (0)	600 (0)	117 (+ α)	4.06
20	3.0 (0)	600 (0)	75 (0)	5.16

El diseño central compuesto se ajustó en términos de modelos lineales y cuadráticos (valor $p < 0.05$), mientras que las interacciones se discriminaron para simplificar el modelo ya que no presentaron una contribución significativa. El valor de R^2 ajustado = 94.33 % permite que el modelo explique adecuadamente las variables (Ma et al., 2016), además se obtuvo un valor de R^2 predicho de 88.18 % que indica que el modelo es robusto y puede hacer predicciones para nuevas observaciones. La diferencia menor al 20% de los coeficientes muestra que las variables fueron seleccionadas apropiadamente (Candioti et al., 2014).

La contribución de las variables críticas fue consistente con el diseño de Plackett-Burman realizado previamente. Esto también se puede observar en



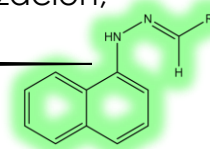
DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

el ANOVA obtenido para el diseño de experimentos (Tabla 9). El ANOVA muestra que los factores lineales, cuadráticos de los términos representa una contribución significativa con valores de $p < 0.05$, observando una mayor contribución del modelo cuadrático, además, la falta de ajuste con un valor de $p > 0.05$ nos indica que no es significativa y que el modelo se ajusta correctamente a los datos obtenidos por lo cual representa adecuadamente las variables seleccionadas.

Tabla 9. ANOVA obtenido del diseño de experimentos central compuesto para la optimización del proceso de derivatización de extracción-derivatización de aldehídos en muestras de orina.

Fuente	Análisis de Varianza				Valor p
	GL	SC Ajuste.	MC Ajuste	Valor F	
Modelo	6	62.369	10.395	53.67	<0.0001
Lineal	3	12.779	4.260	21.99	<0.0001
Volumen elución	1	5.376	5.376	27.75	<0.0001
[NPH]	1	0.428	0.428	2.21	0.161
[HCl]	1	6.975	6.975	36.01	<0.0001
Cuadrado	3	49.591	16.530	85.34	<0.0001
Volumen elución ²	1	18.101	18.101	93.45	<0.0001
[NPH] ²	1	23.360	23.360	120.60	<0.0001
[HCl] ²	1	6.704	6.704	34.61	<0.0001
Error	13	2.518	0.194		
Falta de ajuste	8	2.074	0.259	2.92	0.126
Error puro	5	0.444	0.089		
Total	19	64.887			

Los gráficos de superficie del diseño (Figura 30) muestran la relación entre las variables evaluadas y la respuesta salida. Se observa cómo las variables exhiben curvatura en los modelos por una contribución significativa. Los valores óptimos de las variables críticas del diseño central compuesto son [NPH]=936 μ M, [HCl]=88 mM y volumen de elución=4.7 mL. Bajo las condiciones obtenidas por el diseño, se comprobó la optimización,



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

obteniendo un valor experimental de 13.29 (%RSD=4.1, n=3), comparando el valor predicho por el modelo de 13.44 no se observa una diferencia estadísticamente significativa. Además, se observa un aumento en las señales analíticas obtenidas utilizando el diseño central compuesto en comparación con el valor obtenido utilizando el diseño de Plackett-Burman, lo que indica una optimización adecuada de las variables.

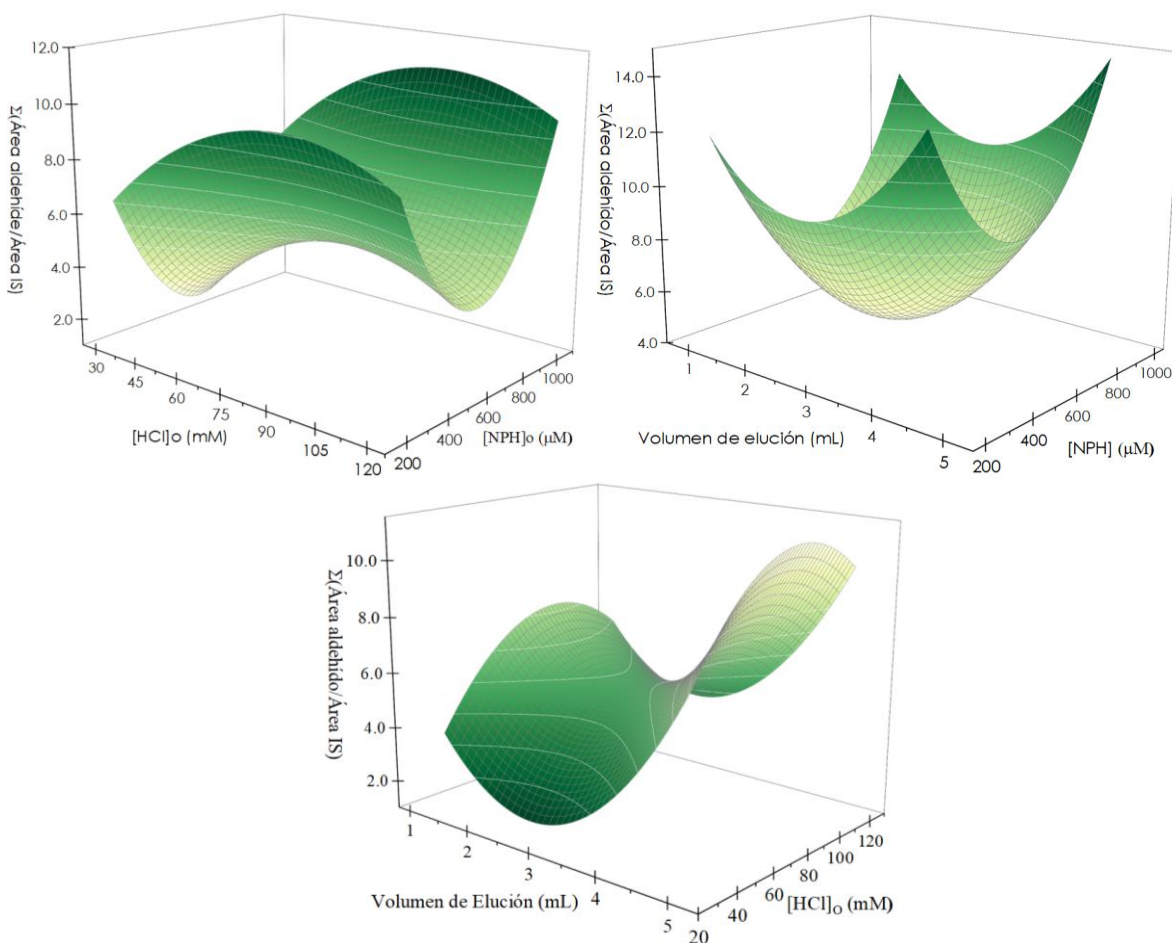
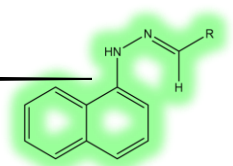
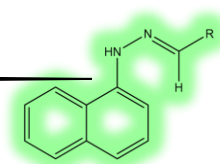


Figura 30. Gráficos de superficie del diseño central compuesto para el proceso de extracción-derivación de aldehídos contenidos en orina. Valores constantes: [NPH]=600 μ M; [HCl]=75 mM; volumen de elución=3 mL.



5.3.3 Validación de la metodología de extracción-derivación para muestras de orina

La curva de calibración se construyó mezclando 5 muestras de orina (5×50mL, excluyendo del análisis: 2 voluntarios de control, 2 fumadores y 1 paciente con cáncer) que no mostraron señales atribuidas a los aldehídos derivatizados de interés. La Tabla 10 presenta los parámetros analíticos de las líneas de calibrado que se construyeron para cada aldehído bajo condiciones óptimas de extracción-derivación en muestras de orina con intervalos de concentración de 3.2 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. El área del pico del aldehído se midió por triplicado. Se obtuvieron LODs y LOQs en intervalos de 0.55 a 0.80 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 1.68 a 2.44 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. El intervalo lineal obtenido, así como los LODs y LOQs para cada aldehído, permiten el análisis y la determinación de todos los aldehídos evaluados, ya que las concentraciones descritas en la literatura se encuentran en el intervalo de 5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ (El-Maghrabey et al., 2024), esto nos permite señalar el alcance que poseen la metodología. La sensibilidad analítica de los aldehídos aumentó proporcionalmente al aumento de la cadena alifática; esto se ha relacionado con una mayor afinidad de los analitos por la fase adsorbente a mayor hidrofobicidad.



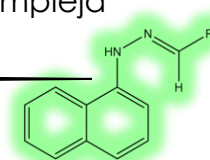
DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tabla 10. Parámetros analíticos de las líneas de calibrado de los aldehídos en muestras orina.

Parámetros analíticos			Pentanal	Hexanal	Heptanal	Octanal	Nonanal	Decanal
Coeficiente de determinación (r^2)			0.9995	0.9995	0.9996	0.9993	0.9997	0.9992
LOD $\mu\text{g L}^{-1}$			0.80	0.77	0.75	0.73	0.62	0.55
LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$			2.44	2.34	2.30	2.24	1.91	1.68
$b_1 \pm \delta b_1$			12.00 $\pm$ 0.09	16.71 $\pm$ 0.13	17.01 $\pm$ 0.13	18.23 $\pm$ 0.14	23.42 $\pm$ 0.15	24.25 $\pm$ 0.16
$b_0 \pm \delta b_0$			0.028 $\pm$ 0.004	0.093 $\pm$ 0.007	-0.034 $\pm$ 0.006	0.044 $\pm$ 0.006	0.198 $\pm$ 0.007	-0.083 $\pm$ 0.008
Precisión (%RSD, n=3)	Intradía	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	7.48	7.29	8.70	8.79	6.39	8.24
		30 $\mu\text{g L}^{-1}$	6.50	5.95	6.33	6.05	5.52	5.40
		50 $\mu\text{g L}^{-1}$	4.09	5.25	4.41	5.09	2.64	3.98
	Interdía	10 $\mu\text{g L}^{-1}$	8.11	9.16	9.25	9.42	7.88	9.82
		30 $\mu\text{g L}^{-1}$	7.29	6.45	7.97	8.45	6.32	6.92
		50 $\mu\text{g L}^{-1}$	5.69	6.59	7.79	6.90	5.88	6.75
%Recuperación (%RSD, n=3)	5 $\mu\text{g L}^{-1}$		110.03 (9.42)	99.27 (8.21)	105.49 (7.18)	106.55 (9.51)	104.27 (7.01)	107.04 (9.72)
	25 $\mu\text{g L}^{-1}$		104.66 (6.35)	98.54 (6.68)	90.97 (6.78)	95.57 (7.54)	100.84 (5.70)	93.19 (5.21)
	45 $\mu\text{g L}^{-1}$		103.47 (5.11)	100.55 (4.53)	95.57 (6.03)	99.62 (6.31)	104.25 (3.91)	102.22 (4.76)

La precisión y exactitud de la metodología propuesta para la determinación de aldehídos en muestras biológicas se presentan en la Tabla 10. El tanto por ciento de desviación estándar relativa (%RSD) fue menor a 10% en todas las concentraciones evaluadas para el análisis de precisión intradía e interdía. Mientras que la exactitud de la metodología se evaluó mediante ensayos de recuperación de muestras de orina dopadas en tres niveles de concentración, obteniendo tantos por ciento de recuperación en el intervalo de 90.97 a 110.03%, con %RSD menores del 10% en los tres niveles evaluados. Este intervalo de exactitud obtenido es aceptable, ya que para las concentraciones ultratrazas evaluadas, se permiten porcentajes de hasta 60-115% (González y Herrador, 2007). Los parámetros analíticos obtenidos indicaron una linealidad adecuada, alta sensibilidad y aplicabilidad del método para la cuantificación de aldehídos grasos en niveles traza en muestras de orina con precisión y exactitud adecuadas.

Para evaluar la robustez de la metodología, se construyó una curva de calibración mediante el método de adición estándar en una muestra de orina de un paciente con cáncer, la cual es descrita como más compleja



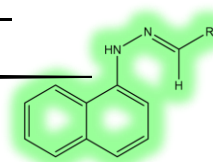
DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

en comparación con los otros grupos evaluados. Las sensibilidades analíticas obtenidas a partir de las líneas de calibrado directo y de adición estándar se compararon mediante la prueba t de Student para la comparación de dos pendientes de líneas de regresión, la comparación no mostró diferencias estadísticamente significativas ($t_{exp} < 2.23$, $\alpha=0.05$). Esto demuestra la aplicabilidad de la metodología (Tabla 11).

Por otro lado, para evaluar una posible extrapolación a otras matrices biológicas, se analizaron muestras de plasma sanguíneo. Se construyeron líneas de calibrado mediante soluciones de plasma sanguíneo dopadas con 3.2 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se emplearon las condiciones óptimas de extracción-derivatización obtenidas para las muestras de orina. Las sensibilidades analíticas se compararon mediante una prueba t de Student para la comparación de la sensibilidad analítica de dos líneas de regresión. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($t_{exp} < 2.23$, $\alpha=0.05$) entre las líneas obtenidas para las muestras de orina y plasma sanguíneo (Tabla 11). Por lo cual, las condiciones óptimas obtenidas en la optimización de las muestras de orina podrían aplicarse a muestras de plasma sanguíneo; no obstante, esto resulta como perspectiva, ya que sería necesaria una evaluación experimental más completa.

Tabla 11. Sensibilidades analíticas obtenidas de las líneas de calibrado para muestras de orina y plasma sanguíneo.

Aldehído	Sensibilidades analíticas		
	Calibración directa en orina	Calibración por adición patrón en orina	Calibración directa en plasma sanguíneo
Pentanal	12.00 $\pm$ 0.09	11.97 $\pm$ 0.06	11.88 $\pm$ 0.10
Hexanal	16.71 $\pm$ 0.13	16.80 $\pm$ 0.08	16.99 $\pm$ 0.19
Heptanal	17.01 $\pm$ 0.13	16.94 $\pm$ 0.08	16.76 $\pm$ 0.17
Octanal	18.23 $\pm$ 0.14	18.32 $\pm$ 0.10	18.50 $\pm$ 0.16
Nonanal	23.42 $\pm$ 0.15	23.56 $\pm$ 0.09	23.14 $\pm$ 0.20



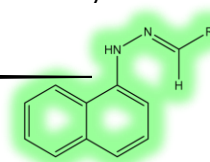
5.3.4 Determinación de aldehídos en muestras de orina

Se recolectaron un total de 20 muestras de orina, la muestra fue la primera orina de la mañana de cada voluntario: 8 pacientes control, 8 pacientes fumadores y 4 pacientes con cáncer de pulmón (12 mujeres y 8 hombres). La Tabla 12 presenta los aldehídos encontrados en las muestras de orina evaluadas. De los aldehídos grasos evaluados, hexanal y octanal fueron los únicos aldehídos presentes en todas las muestras de los tres grupos de pacientes, mientras que, pentanal, heptanal, nonanal y decanal estuvieron ausentes en algunas de las muestras.

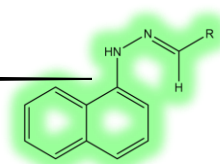
Tabla 12. Concentraciones de los aldehídos ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontradas en muestras de orina.

Paciente	Pentanal	Hexanal	Heptanal	Octanal	Nonanal	Decanal
Fumador 1	<LOQ	32.88	3.69	32.37	8.86	5.81
Fumador 2	<LOQ	8.48	<LOD	11.90	<LOQ	1.91
Fumador 3	16.27	28.99	<LOD	22.19	5.23	5.51
Fumador 4	<LOQ	9.78	<LOD	8.21	3.80	3.85
Fumador 5	<LOD	10.88	<LOQ	17.87	8.35	6.85
Fumador 6	<LOD	9.77	<LOD	8.99	<LOQ	<LOD
Fumador 7	<LOQ	42.05	5.13	33.33	<LOQ	<LOQ
Fumador 8	<LOD	22.04	<LOD	18.31	7.75	4.88
Control 1	9.79	22.31	<LOD	21.6	7.08	6.26
Control 2	<LOD	29.43	<LOQ	5.70	<LOD	<LOD
Control 3	19.76	24.21	<LOD	40.78	2.87	<LOD
Control 4	8.07	24.86	2.90	30.15	14.55	8.25
Control 5	<LOD	25.89	2.46	26.44	16.7	8.37
Control 6	<LOD	10.43	<LOD	10.84	7.15	4.98
Control 7	10.24	17.34	2.40	26.08	6.34	5.39
Control 8	14.79	28.04	4.54	38.44	10.71	10.72
Cáncer 1	<LOD	16.02	3.79	6.49	<LOD	<LOD
Cáncer 2	<LOD	23.63	4.19	5.27	<LOQ	<LOD
Cáncer 3	3.38	26.38	4.24	8.12	<LOD	<LOQ
Cáncer 4	2.93	29.67	4.92	6.12	<LOQ	<LOD

La Figura 31 presenta la concentración promedio obtenida para los tres grupos de pacientes evaluados. No se observaron diferencias entre los pacientes de control y los pacientes fumadores en los niveles de hexanal y



octanal, mientras que para pacientes con cáncer presentaban una disminución. Los niveles de pentanal en siete muestras de fumadores estuvieron por debajo del LOD y el LOQ, mientras que en algunas muestras de pacientes fumadores y con cáncer se encontraron concentraciones de mayores a $2.9 \mu\text{g L}^{-1}$. Los niveles de heptanal en pacientes con cáncer se mantuvieron dentro de un intervalo promedio de $4.3 \mu\text{g L}^{-1}$; mientras que diez muestras de fumadores y voluntarios de control estuvieron por debajo del LOD y LOQ. Por otro lado, las concentraciones obtenidas para nonanal y decanal en pacientes con cáncer se mantuvieron por debajo del LOD y LOQ, mientras que se obtuvieron concentraciones promedio de nonanal (4.2 y $8.2 \mu\text{g L}^{-1}$) y decanal (3.6 a $5.5 \mu\text{g L}^{-1}$) en pacientes fumadores y control, respectivamente. A pesar de que se observan algunas diferencias entre algunas muestras de los grupos evaluados, no se puede asociar ninguna evidencia que permita distinguir entre los grupos empleando los niveles de concentración. Las concentraciones encontradas en las muestras de orina son similares a las que han sido descritas en la literatura (Liu y Xu, 2017; Shi et al., 2025; Wei et al., 2019)



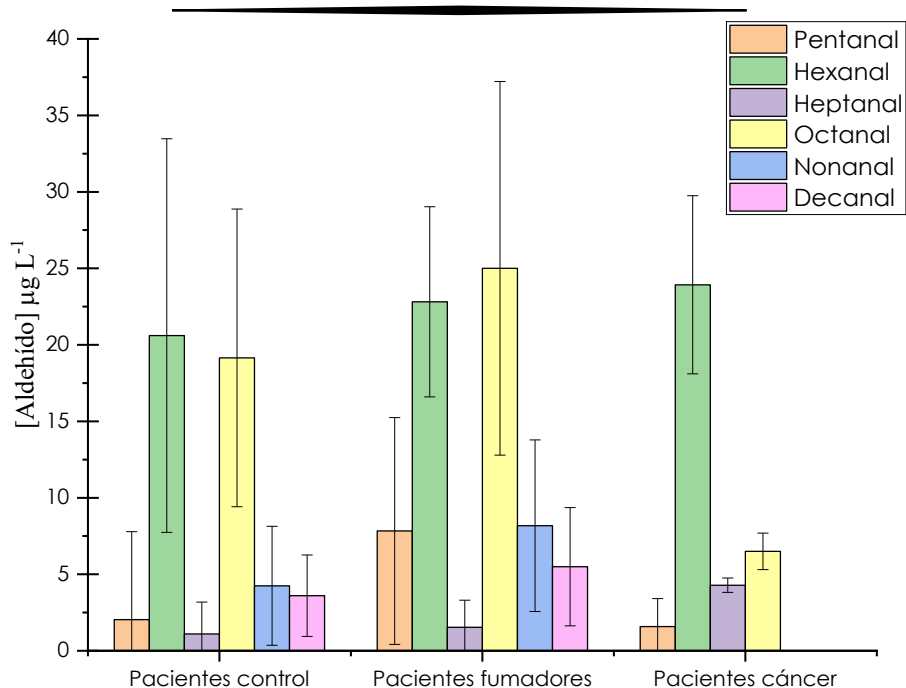
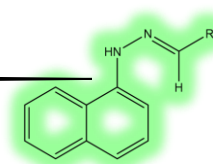


Figura 31. Concentración promedio de los aldehídos en muestras de orina.

Por lo cual, para evaluar si la concentración de los aldehídos grasos permitía distinguir entre los grupos de pacientes evaluados se aplicó un análisis de componentes principales a las 20 muestras evaluadas. El análisis de componentes principales no mostró una clara agrupación entre pacientes control y no fumadores. Sin embargo, se observó una agrupación que permitía distinguir las muestras de pacientes con cáncer. Además, el análisis mostró la influencia de las variables en el análisis de componentes principales (Figura 32). Se observó una relación entre la ausencia de nonanal y decanal en pacientes con cáncer, así como una relación entre las concentraciones de hexanal y heptanal, lo que explica el por qué múltiples estudios desarrollados para la determinación de aldehídos en muestras biológicas como biomarcadores se haya centrado en estos analitos (El-Maghrabey et al., 2024). A pesar de observar relación entre las concentraciones de los aldehídos en muestras de orina, es necesario complementar el análisis con un mayor número de muestras.



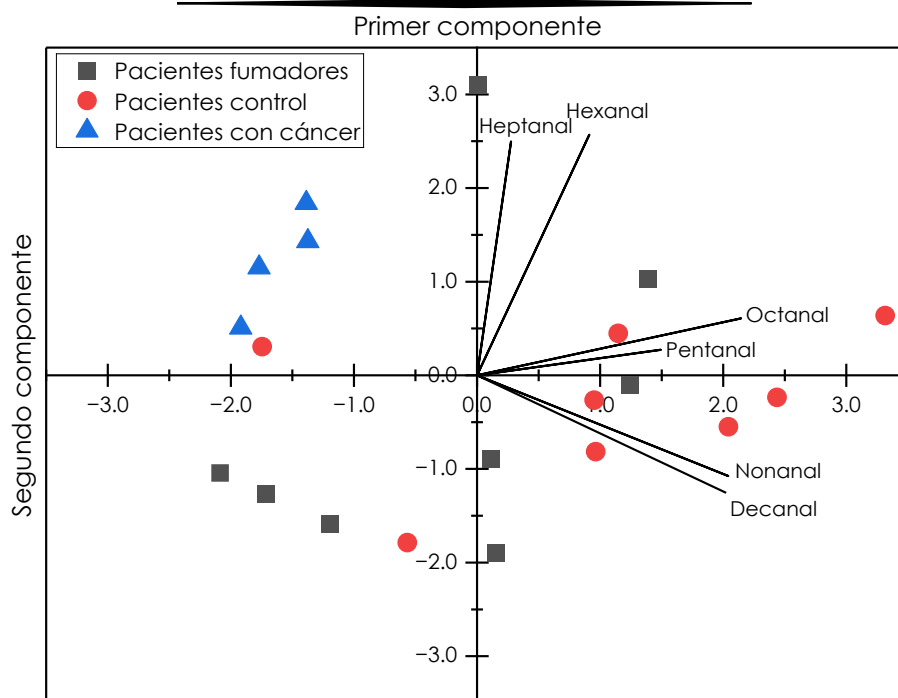
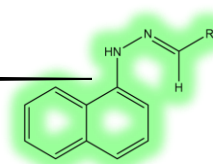


Figura 32. Biplot en un plano de las cargas de los dos primeros factores y puntuaciones de los dos nuevos factores en el plano bidimensional para el análisis de aldehídos en muestras de orina.

5.3.5 Análisis de aldehídos en muestras de plasma sanguíneo

Se analizaron ocho muestras de plasma sanguíneo (cuatro de pacientes control y cuatro de pacientes con cáncer de pulmón). La Tabla 13 muestra las concentraciones obtenidas para las muestras de plasma sanguíneo de los dos grupos evaluados. De los aldehídos grasos evaluados hexanal fue el único aldehído presentes en todas las muestras de los dos grupos de pacientes, mientras que, el pentanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal estuvieron ausentes en algunas de las muestras de ambos grupos, no obstante se observa una mayor ausencia de algunos aldehídos en muestras sanguíneas de pacientes con cáncer y la ausencia en todas las muestras de pacientes control del pentanal.

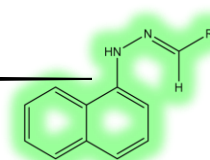


DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tabla 13. Concentraciones de los aldehídos ($\mu\text{g L}^{-1}$) encontradas en muestras de orina.

Paciente	Pentanal	Hexanal	Heptanal	Octanal	Nonanal	Decanal
Control 1	<LOD	45.72	3.68	12.53	7.75	4.39
Control 2	<LOQ	34.94	2.53	7.99	7.32	3.43
Control 3	<LOD	36.44	3.19	9.49	7.25	3.42
Control 4	<LOD	21.85	<LOD	3.82	4.81	<LOQ
Cáncer 1	<LOQ	5.21	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD
Cáncer 2	11.98	81.28	15.66	26.78	25.76	12.19
Cáncer 3	<LOD	8.04	<LOD	<LOD	2.05	<LOD
Cáncer 4	14.80	82.54	19.51	33.07	22.95	10.32

La Figura 33 muestra las concentraciones promedio obtenidas para los dos grupos evaluados. Los pacientes controles presentaron concentraciones promedio, para el pentanal las concentraciones fueron menores al LOD y LOQ, mientras que para el hexanal, heptanal, octanal, nonanal, y decanal se obtuvieron concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$) de 34.74, 2.35, 19.15, 3.62 y 2.81 respectivamente mientras que para los pacientes con cáncer se obtuvieron concentraciones ($\mu\text{g L}^{-1}$) promedio de 6.69 (pentanal), 44.27 (hexanal), 8.79 (heptanal), 6.5 (octanal), 17.47 (nonanal) y 5.62 (decanal). Comparando ambos grupos se observa un aumento en los niveles de concentración para casi todos los aldehídos en los pacientes con cáncer, la concentración de octanal es el único aldehído que disminuyó en comparación con los pacientes control.



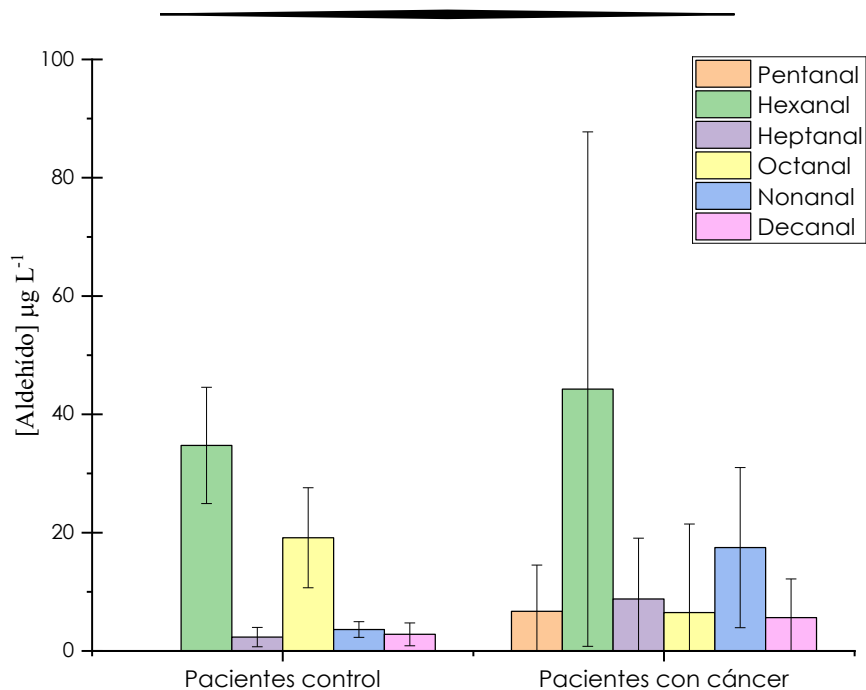
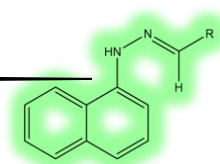


Figura 33. Concentración promedio de los aldehídos en muestras de plasma sanguíneo.

La Figura 34 presenta los perfiles cromatográficos obtenidos. Se muestra un estándar con una concentración de 25 µg L⁻¹ de cada aldehído (Figura 34a). La comparación de los perfiles cromatográficos revela otras señales analíticas para las muestras de orina (Figura 34b) y plasma sanguíneo (Figura 34c), atribuidas a otros aldehídos o cetonas que se extraen y derivatizan, aunque ninguna de estas señales interfiere con las señales de interés. Esto destaca la robustez de la separación analítica y la metodología de extracción y derivatización, así como su potencial aplicabilidad a un mayor perfil de aldehídos.



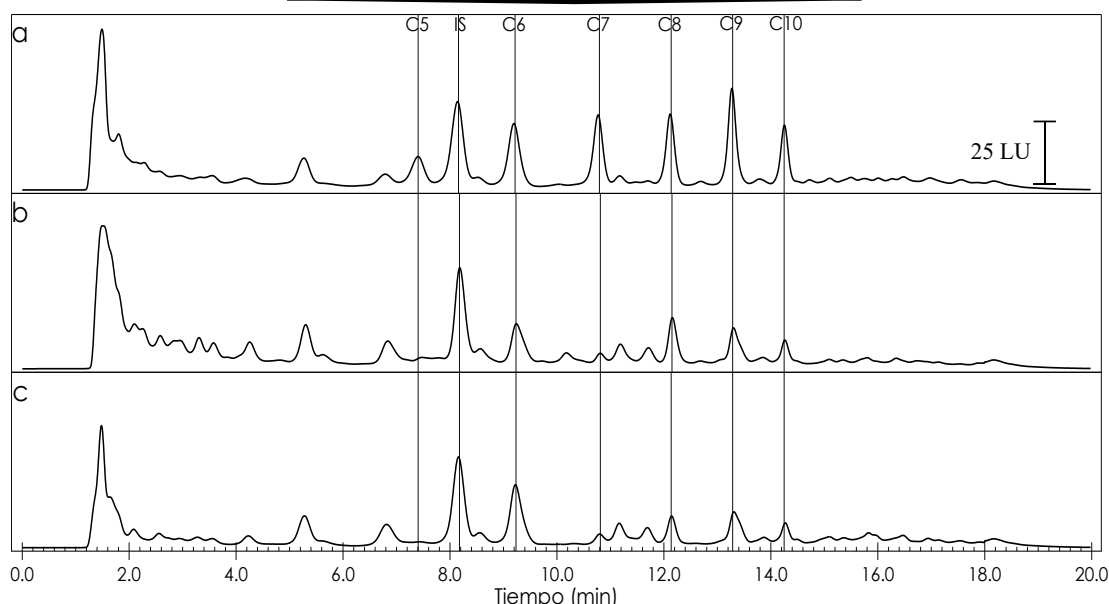
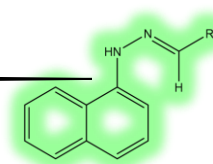


Figura 34. Perfiles cromatográficos obtenidos para la determinación de aldehídos: a) orina estándar dopada con $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada aldehído y $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de IS; b) muestra de orina de un paciente control; c) muestra de plasma sanguíneo de un paciente control (IS, estándar interno; C5, pentanal; C6, hexanal; C7, heptanal; C8, octanal; C9, nonanal; C10, decanal).

5.3.6 Comparación con otras metodologías

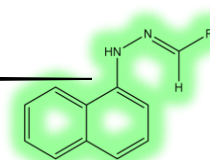
La Tabla 13 compara la metodología propuesta para la determinación de aldehídos en muestras biológicas con otras metodologías descritas en la literatura para aldehídos grasos. El método propuesto, basado en la extracción de aldehídos mediante partículas de gel de sílice funcionalizadas con octilo y su posterior derivatización con NPH, es competitivo con otras metodologías que emplean agentes derivatizantes convencionales, como la 2,4-dinitrofenilhidrazina y el clorhidrato de o-2,3,4,5,6-pentafluorobencilhidroxilamina. Por otro lado, una ventaja de la metodología propuesta es el menor coste del sistema de detección por fluorescencia en comparación con los sistemas acoplados a espectrometría de masas, obteniendo valores de LOD dentro de un intervalo similar para los aldehídos evaluados.



DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE ALDEHÍDOS GRASOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS

Tabla 14. Comparación de la metodología propuesta DSPE-HPLC-FLD para la determinación de aldehídos grasos en matrices biológicas con otras metodologías descritas en la literatura.

Aldehídos	Derivatizante	Método de determinación	LOD $\mu\text{g L}^{-1}$	Muestra	REF
Pentanal, hexanal y heptanal	Clorhidrato de o-2,3,4,5,6-pentafluorobencilhidroxilamina	GC-MS	0.40-0.86	Sangre	Wei et al. (2019)
Hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal	1,2-di(2-furil)-1,2-etanodiona	LC-FLD	0.03-0.06	Plasma sanguíneo	Ali et al. (2013)
Hexanal, heptanal, octanal y nonanal	9-fluorenilmetil carbazato	LC-FLD	0.17-0.24	Plasma sanguíneo	Shi et al. (2025)
Pentanal, hexanal, heptanal, octanal y nonanal	2,4-dinitrofenilhidrazina	LC-UV	0.92-3.04	Orina	Zhang et al. (2016)
Hexanal y heptanal	Hidrocloreto de hidroxilamina	LC-MS	1.50-1.03	Orina	Chen et al. (2017a)
Pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal	Haluro de 4-(2-(trimetilamonio) etoxi)bencenaminio	LC-MS	0.26-0.47	Orina	Eggink et al. (2008)
Pentanal, hexanal, heptanal, octanal y nonanal	2,4-dinitrofenilhidrazina	LC-UV	0.71-2.46	Orina	Liu y Xu (2017)
Pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal	1-naftilhidrazina	LC-FLD	0.55-0.80	Orina y plasma sanguíneo	Este trabajo

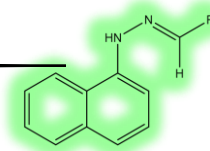


Conclusiones

6. CONCLUSIONES

Los aldehídos grasos evaluados (pentanal, hexanal, heptanal, octanal, nonanal y decanal) reaccionan con la 1-naftilhidrazina para la formación de las hidrazonas correspondientes. Las hidrazonas se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas, lo que permitió confirmar la formación de las hidrazonas. La espectroscopía IR permite identificar la banda del enlace -C=N ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) atribuida generalmente a la formación de la hidrazona además las bandas características de aldehídos -(O=C)-H y -C=O ($2800\text{-}2600\text{ cm}^{-1}$ y 1725 cm^{-1} respectivamente) no se observan en el espectro de las hidrazonas. Los espectros de RMN de ^1H de las hidrazonas permiten diferenciar la formación debido a que se observa una nueva señal asociada al protón del enlace H-C=N alrededor de 7.3 ppm y no se observa la señal característica del protón del aldehído en 9.7 ppm. Sumado a que se observan las señales correspondientes a la cadena alifática y al anillo de naftaleno dentro de la estructura de las hidrazonas.

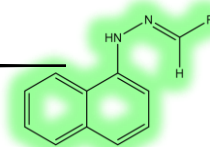
Por otra parte, los productos derivatizados presentan un desplazamiento batocrómico en comparación con el NPH, obteniendo para las hidrazonas máximos de absorción de 260 nm, y máximos de emisión en 380 nm, presentando desplazamientos de Stokes de 120 nm. Esto permite mejorar la sensibilidad y selectividad de la detección de fluorescencia, por lo que permite su integración a un sistema acoplado a HPLC. Los productos derivatizados se pueden separar adecuadamente mediante HPLC, confirmando la presencia de una única señal analítica atribuida a cada aldehído, además, dado que los productos derivatizados se excitan y emiten a longitudes de onda diferentes a las del NPH no se observa una señal atribuida al exceso de agente derivatizante dentro de los perfiles cromatográficos.



CONCLUSIONES

Los aldehídos grasos contenidos en aceite vegetal comestible (matriz no polar) pueden ser extraídos y derivatizados empleando dos etapas, (1) extracción a los aldehídos contenidos en el aceite mediante LLME, empleando como extractante acetonitrilo y (2) posterior derivatización con NPH. El uso de dos etapas permite maximizar la señal analítica. La metodología propuesta para la determinación de aldehídos grasos en el aceite se optimizó observando que las variables críticas son: [NPH] ($149.4 \mu\text{M}$), [HCl] (74.2 mM), temperatura de reacción (58°C) y volumen de muestra (2.0 mL), con un tiempo de reacción de 45 min . Se obtuvieron LODs en el intervalo de $4.0\text{-}6.2 \mu\text{g L}^{-1}$ en muestras de aceite comestible. Estos resultados son competitivos con otras metodologías descritas para la determinación de aldehídos grasos. La metodología permite la cuantificación del contenido total de aldehídos con adecuada precisión y exactitud.

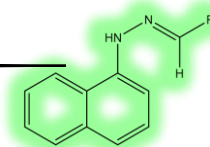
Por otra parte se desarrolló una metodología para la determinación de aldehídos asociados como biomarcadores de cáncer en muestras de biológicas (matriz polar). Se seleccionó una metodología que permite la extracción-derivatización de aldehídos que requiere dos etapas para maximizar las señales analíticas (1) extracción de los aldehídos mediante dSPE empleando como adsorbente, partículas de gel de sílice funcionalizadas con octilo y (2) la posterior elución y derivatización de los analitos con ACN. La metodología propuesta para la determinación de aldehídos grasos en la orina se optimizó, obteniendo como variables críticas [NPH]_o ($936 \mu\text{M}$), [HCl]_o (88 mM) y volumen de elución (4.7 mL) siendo estas variables enfocadas al proceso de elución y derivatización, mientras que variables como la cantidad adsorbente (200 mg) volumen de muestra de orina (5 mL) pH de la muestra de orina (8), %NaCl (10%), tiempo de contacto (30 min) no resultaron críticas en el proceso. La metodología presentó LODs en el intervalo de $0.55 \text{ a } 0.80 \mu\text{g L}^{-1}$ en muestras de orina. Asimismo, permitió



CONCLUSIONES

su aplicación en el análisis de aldehídos en muestras de orina de pacientes control, fumadores y con cáncer de pulmón esto demuestra su robustez además de ser competitivas con otras metodologías descritas en la literatura. El método propuesto es preciso y exacto, permitiendo la cuantificación del contenido de aldehídos de cadena larga. Adicionalmente como perspectiva, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el análisis de aldehídos en plasma sanguíneo.

Finalmente, se demostró que se pueden desarrollar metodologías para la determinación de aldehídos grasos contenidos tanto en matrices polares como en matrices no polares. Ambos métodos mostraron ventajas en comparación con otros métodos descritos en la literatura que emplean derivatizantes convencionales como: la 2,4-dinitrofenilhidrazina y la o-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil) hidroxilamina. Además, el sistema de detección por fluorescencia en comparación con los sistemas acoplados a espectrometría de masas es de menor costo, y permite obtener valores de LODs dentro de un intervalo similar para los aldehídos evaluados. Sumado a que el derivatizante no requiriendo síntesis complejas y no se observan interferencia debidas al exceso de agente derivatizante. Por lo tanto, el enfoque presentado puede ser una herramienta valiosa para el análisis exhaustivo de aldehídos, así como para la integración de otros aldehídos de interés.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

Ahmad, A., Imran, M., & Ahsan, H. (2023). Biomarkers as biomedical bioindicators: approaches and techniques for the detection, analysis, and validation of novel biomarkers of diseases. *Pharmaceutics*, 15(6), 1630.

Ahmed Laskar, A., & Younus, H. (2019). Aldehyde toxicity and metabolism: the role of aldehyde dehydrogenases in detoxification, drug resistance and carcinogenesis. *Drug metabolism reviews*, 51(1), 42-64.

Al-Sabahi, A., Al-Busafi, S., Varghese, B., Al-Kindy, S., & Suliman, F. (2021). Tuning a pyrazoline-based fluorogenic reagent, 3-naphthyl-1-(4-trifluoromethyl)-5-(4-carboxy phenyl)-2-pyrazoline for sensitive precolumn derivatization of aliphatic alcohols and trace analysis by RP-HPLC with fluorescence detection. *Biomedical Chromatography*, 35(9), e5134.

Ali, M. F. B., Kishikawa, N., Ohyama, K., Mohamed, H. A. M., Abdel-Wadood, H. M., Mahmoud, A. M., & Kuroda, N. (2014). Chromatographic determination of low-molecular mass unsaturated aliphatic aldehydes with peroxyoxalate chemiluminescence detection after fluorescence labeling with 4-(N, N-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2, 1, 3-benzoxadiazole. *Journal of Chromatography B*, 953, 147-152.

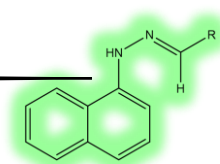
Ali, M. F. B., Kishikawa, N., Ohyama, K., Mohamed, H. A. M., Abdel-Wadood, H. M., Mohamed, A. M., & Kuroda, N. (2013). Chromatographic determination of aliphatic aldehydes in human serum after pre-column derivatization using 2, 2'-furil, a novel fluorogenic reagent. *Journal of Chromatography A*, 1300, 199-203.

Antony, F. M., Pal, D., & Wasewar, K. (2021). Separation of bio-products by liquid-liquid extraction. *Physical Sciences Reviews*, 6(4), 20180065.

Atapattu, S. N. (2023). Pollutant analysis applications of solid-phase analytical derivatizations. *Journal of Chromatography Open*, 3, 100080.

Atapattu, S. N., & Temerdashev, A. (2023). Recent advances in gas chromatography injection port derivatization in analytical method development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 168, 117334.

Athanasiadis, V., Chatzimitakos, T., Mantiniotou, M., Kalompatsios, D., Kotsou, K., Makrygiannis, I., & Lalas, S. I. (2024). Optimization of four different rosemary extraction techniques using Plackett-Burman design and comparison of their



antioxidant compounds. International Journal of Molecular Sciences, 25(14), 7708.

Awad, H., Khamis, M. M., & El-Aneed, A. (2015). Mass spectrometry, review of the basics: ionization. Applied spectroscopy reviews, 50(2), 158-175.

Baghdady, Y. Z., & Schug, K. A. (2016). Review of *in situ* derivatization techniques for enhanced bioanalysis using liquid chromatography with mass spectrometry. Journal of separation science, 39(1), 102-114.

Barden, L., & Decker, E. A. (2016). Lipid oxidation in low-moisture food: A review. Critical reviews in food science and nutrition, 56(15), 2467-2482.

Barlina, R., Dewandari, K. T., Mulyawanti, I., & Herawan, T. (2022). Chemistry and composition of coconut oil and its biological activities. In Multiple biological activities of unconventional seed oils (pp. 383-395). Academic Press.

Basheer, C., Pavagadhi, S., Yu, H., Balasubramanian, R., & Lee, H. K. (2010). Determination of aldehydes in rainwater using micro-solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1217(41), 6366-6372.

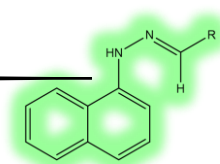
Besir, A., Yazici, F., Mortas, M., & Gul, O. (2021). A novel spectrophotometric method based on Seliwanoff test to determine 5-(hydroxymethyl) furfural (HMF) in honey: Development, in house validation and application. LWT, 139, 110602.

Boire, A., Burke, K., Cox, T. R., Guise, T., Jamal-Hanjani, M., Janowitz, T., & Sahai, E. (2024). Why do patients with cancer die?. Nature Reviews Cancer, 24(8), 578-589.

Boumya, W., Hammani, H., Laghrib, F., Lahrich, S., Farahi, A., Achak, M., & Mhammedi, M. E. (2017a). Electrochemical study of 2, 4-dinitrophenylhydrazine as derivatization reagent and aldehydes at carbon glassy electrode. Electroanalysis, 29(7), 1700-1711.

Boumya, W., Laghrib, F., Lahrich, S., Farahi, A., Achak, M., Bakasse, M., & El Mhammedi, M. A. (2017b). Electrochemical impedance spectroscopy measurements for determination of derivatized aldehydes in several matrices. Heliyon, 3(10) e00392.

Campillo, N., Gavazov, K., Viñas, P., Hagarova, I., & Andruch, V. (2020). Liquid-phase microextraction: update May 2016 to December 2018. Applied Spectroscopy Reviews, 55(4), 307-326.



Candioti, L. V., De Zan, M. M., Cámara, M. S., & Goicoechea, H. C. (2014). Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development. *Talanta*, 124, 123-138.

Catalano, A., Mariconda, A., D'Amato, A., Iacopetta, D., Ceramella, J., Marra, M., & Longo, P. (2024). Aldehydes: what we should know about them. *Organics*, 5(4), 395-428.

Chandran, N., Bose, K., Thekkantavida, A. C., Thomas, R. R., Anirudhan, K., Bindra, S., & Mathew, B. (2024). Oxime derivatives: a valid pharmacophore in medicinal chemistry. *Chemistry Select*, 9(27), e202401726.

Chen, D., Ding, J., Wu, M. K., Zhang, T. Y., Qi, C. B., & Feng, Y. Q. (2017a). A liquid chromatography–mass spectrometry method based on post column derivatization for automated analysis of urinary hexanal and heptanal. *Journal of Chromatography A*, 1493, 57-63.

Chen, L., Fu, Y. J., Fang, W. L., Guo, X. F., & Wang, H. (2018). Screening of a highly effective fluorescent derivatization reagent for carbonyl compounds and its application in HPLC with fluorescence detection. *Talanta*, 186, 221-228.

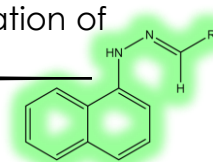
Chen, S., Li, H., & Hou, P. (2017b). A large stokes shift fluorescent probe for sensing of thiophenols based on imidazo [1, 5-a] pyridine in both aqueous medium and living cells. *Analytica Chimica Acta*, 993, 63-70.

Chen, W., Karde, V., Cheng, T. N., Ramli, S. S., & Heng, J. Y. (2021). Surface hydrophobicity: Effect of alkyl chain length and network homogeneity. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 15(1), 90-98.

Chen, W. R., Liao, F. Y., Li, C. Y., Weng, J. R., & Feng, C. H. (2025a). Quantification of polyamines in foods and cancer cells through rapid chemical derivatization and ice-bath-effervescence-assisted salting-out extraction followed by narrow-bore HPLC-UV analysis. *Microchemical Journal*, 116389.

Chen, W. R., Liao, F. Y., Lu, C. Y., Weng, J. R., & Feng, C. H. (2025b). Ice-bath-effervescence-assisted salting-out extraction combined with microwave-assisted derivatization for the detection of spermidine and spermine in whole blood. *Journal of Chromatography A*, 1747, 465807.

Chevolleau, S., Noguer-Meireles, M. H., Jouanin, I., Naud, N., Pierre, F., Guéraud, F., & Debrauwer, L. (2018). Development and validation of an ultra high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry method using selective derivatisation, for the quantification of



two reactive aldehydes produced by lipid peroxidation, HNE (4-hydroxy-2 (E)-nonenal) and HHE (4-hydroxy-2 (E)-hexenal) in faecal water. *Journal of Chromatography B*, 1083, 171-179.

Chung, F. Y., Lin, Y. Z., Huang, C. R., Huang, K. W., & Chen, Y. F. (2024). Crosslinking kiwifruit-derived DNA with natural aromatic aldehydes generates membranolytic antibacterial nanogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 255, 127947.

Currie, L. A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Pure and applied chemistry*, 67(10), 1699-1723.

Custodio-Mendoza, J. A., Aja-Macaya, J., Valente, I. M., Rodrigues, J. A., Almeida, P. J., Lorenzo, R. A., & Carro, A. M. (2020). Determination of malondialdehyde, acrolein and four other products of lipid peroxidation in edible oils by gas-diffusion microextraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1627, 461397.

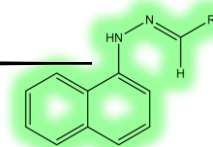
Custodio-Mendoza, J. A., Blanco, A. L., Ares-Fuentes, A. M., & Díaz, A. M. C. (2024). Green infant formula analysis: Optimizing headspace solid-phase microextraction of carbonyl compounds associated with lipid peroxidation using GC-MS and pentafluorophenylhydrazine derivatization. *Talanta*, 273, 125816.

Custodio-Mendoza, J. A., Caamaño-Fernandez, C., Lage, M. A., Almeida, P. J., Lorenzo, R. A., & Carro, A. M. (2022). GC-MS determination of malondialdehyde, acrolein, and 4-hydroxy-2-nonenal by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction in beverages. *Food Chemistry*, 384, 132530.

de Lima, L. F., Brandao, P. F., Donegatti, T. A., Ramos, R. M., Goncalves, L. M., Cardoso, A. A., & Rodrigues, J. A. (2018). 4-hydrazinobenzoic acid as a derivatizing agent for aldehyde analysis by HPLC-UV and CE-DAD. *Talanta*, 187, 113-119.

de Oliveira Silveira, G., Lourenco, F. R., Pego, A. M. F., Dos Santos, R. G., Rossi, G. N., Hallak, J. E., & Yonamine, M. (2021). Essential oil-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of N, N-dimethyltryptamine and β -carbolines in human plasma: A novel solvent-free alternative. *Talanta*, 225, 121976.

Domínguez, R., Pateiro, M., Gagaoua, M., Barba, F. J., Zhang, W., & Lorenzo, J. M. (2019). A comprehensive review on lipid oxidation in meat and meat products. *Antioxidants*, 8(10), 429.



Donegatti, T. A., Goncalves, L. M., & Pereira, E. A. (2017). Derivatizing assay for the determination of aldehydes using micellar electrokinetic chromatography. *Electrophoresis*, 38(7), 1068-1074.

Dossi, N., Susmel, S., Toniolo, R., Pizzariello, A., & Bontempelli, G. (2008). Simultaneous determination of derivatized light aldehydes by microchip electrophoresis with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 1207(1-2), 169-174.

Douny, C., Tihon, A., Bayonnet, P., Brose, F., Degand, G., Rozet, E., & Scippo, M. L. (2015). Validation of the analytical procedure for the determination of malondialdehyde and three other aldehydes in vegetable oil using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and application to linseed oil. *Food Analytical Methods*, 8(6), 1425-1435.

Du, C., Zhang, Y., Zhu, W., Liu, X., Liu, N., He, Z., & Hu, X. (2025). Development of a novel hydroxylamine-based stable isotope labeling reagent for profiling aldehyde metabolic biomarkers in diabetes using lc-ms/ms and machine learning. *Analytical Chemistry*, 97(41), 22817-22825.

Dugo, G., Rotondo, A., Mallamace, D., Cicero, N., Salvo, A., Rotondo, E., & Corsaro, C. (2015). Enhanced detection of aldehydes in extra-virgin olive oil by means of band selective NMR spectroscopy. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 420, 258-264.

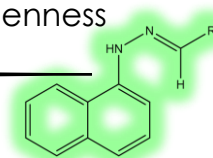
Dunckley, T., Coon, K. D., & Stephan, D. A. (2005). Discovery and development of biomarkers of neurological disease. *Drug discovery today*, 10(5), 326-334.

Dwivedi, Y., & Rai, S. B. (2009). Spectroscopic study of overtone and combination bands in aliphatic aldehydes. *Vibrational Spectroscopy*, 49(2), 278-283.

Eggink, M., Wijtman, M., Ekkebus, R., Lingeman, H., Esch, I. J. D., Kool, J., & Irt, H. (2008). Development of a selective ESI-MS derivatization reagent: synthesis and optimization for the analysis of aldehydes in biological mixtures. *Analytical chemistry*, 80(23), 9042-9051.

El-Maghrabey, M. H., El-Shaheny, R., El Hamd, M. A., Al-Khateeb, L. A., Kishikawa, N., & Kuroda, N. (2021). Aldehydes' sources, toxicity, environmental analysis, and control in food. In *Organic pollutants: toxicity and solutions* (pp. 117-151). Cham: Springer International Publishing.

El-Maghrabey, M. H., Hashem, H. M., El Hamd, M. A., El-Shaheny, R., Kishikawa, N., Kuroda, N., & Magdy, G. (2024). *Comprehensive greenness*



evaluation of the reported chromatographic methods for aldehydes determination as clinical biomarkers and food quality indicators. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 171, 117548.

El-Maghrabey, M., Mine, M., Kishikawa, N., Ohyama, K., & Kuroda, N. (2018). A novel dual labeling approach enables converting fluorescence labeling reagents into fluorogenic ones via introduction of purification tags. Application to determination of glyoxylic acid in serum. *Talanta*, 180, 323-328.

Farghaly, O. A., Hameed, R. A., & Abu-Nawwas, A. A. H. (2014). Analytical application using modern electrochemical techniques. *International Journal of Electrochemical Science*, 9(6), 3287-3318.

Gabbanini, S., Matera, R., Valvassori, A., & Valgimigli, L. (2015). Rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of 4-hydroxynonenal for the assessment of oxidative degradation and safety of vegetable oils. *Analytica Chimica Acta*, 869, 50-58.

Ghavidel, M. R., Heydari, M., & Ebrahimi, R. (2025). A green GC/FID engineering control to prevent carcinogenic exposure and chemical waste in petrochemical aldehyde monitoring. *Green Analytical Chemistry*, 100314.

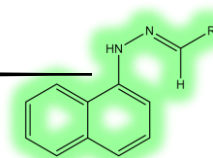
Gonzalez Quevedo, P., Rigby, E. L., Kearney, S., & Saylor, R. A. (2023). Optimized derivatization of primary amines with the fluorogenic reagent naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde toward reproducible quantitative analysis in biological systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(18), 4297-4306.

González, A. G., & Herrador, M. Á. (2007). A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26(3), 227-238.

Gosetti, F., Chiuminatto, U., Mazzucco, E., Robotti, E., Calabrese, G., Gennaro, M. C., & Marengo, E. (2011). Simultaneous determination of thirteen polycyclic aromatic hydrocarbons and twelve aldehydes in cooked food by an automated on-line solid phase extraction ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6308-6318.

Grob, K. (2018). Mineral oil hydrocarbons in food: A review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(9), 1845-1860.

Guclu, G., Kelebek, H., & Selli, S. (2021). Antioxidant activity in olive oils. In *Olives and olive oil in health and disease prevention* (pp. 313-325). Academic Press.



Henry, N. L., & Hayes, D. F. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular oncology*, 6(2), 140-146.

Hogard, M. L., Lunte, C. E., & Lunte, S. M. (2017). Detection of reactive aldehyde biomarkers in biological samples using solid-phase extraction pre-concentration and liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Methods*, 9(12), 1848-1854.

Hopkinson, R. J., & Schofield, C. J. (2018). Deciphering functions of intracellular formaldehyde: linking cancer and aldehyde metabolism. *Biochemistry*, 57(6), 904-906.

Horká, H., Šfastný, M., Bezdička, P., & Švarcová, S. (2022). Determination of methanol-derivatives in drying oils after metal oxide-based dispersive solid phase extraction/QuEChERS clean-up. *Journal of Chromatography A*, 1681, 463490.

Imazato, T., Kanematsu, M., Kishikawa, N., Ohyama, K., Hino, T., Ueki, Y., & Kuroda, N. (2015). Determination of acrolein in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column fluorogenic derivatization using 1, 2-diamino-4, 5-dimethoxybenzene. *Biomedical Chromatography*, 29(9), 1304-1308.

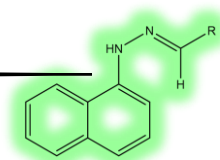
Imazato, T., Shiokawa, A., Kurose, Y., Katou, Y., Kishikawa, N., Ohyama, K., & Kuroda, N. (2014). Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in serum by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after pre-column derivatization using 4-(N, N-dimethylaminosulfonyl)-7-hydrazino-2, 1, 3-benzoxadiazole. *Biomedical Chromatography*, 28(6), 891-894.

Inai, K. (2022). Biomarkers for heart failure and prognostic prediction in patients with Fontan circulation. *Pediatrics International*, 64(1), e14983.

Jafari, M., Solhi, E., Tagi, S., Hasanzadeh, M., Jouyban-Gharamaleki, V., Jouyban, A., & Shadjou, N. (2019). Non-invasive quantification of malondialdehyde biomarker in human exhaled breath condensate using self-assembled organic-inorganic nanohybrid: A new platform for early diagnosis of lung disease. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 249-257.

Jain, K. K. (2017). Future of biomarkers. In *The Handbook of Biomarkers*. Humana Press, New York, NY. 733-738

Jalili, V., Barkhordari, A., & Ghiasvand, A. (2020). Liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Reviews in Analytical Chemistry*, 39(1), 1-19.



Jayasinghe, G. D. T. M., Jinadasa, B. K. K., Pohl, P., & Abdelkarim, A. (2022). Critical review on microextraction techniques used in determination of histamine in food samples. *Discover Food*, 2(1), 8.

Jiang, H., Yang, S., Tian, H., & Sun, B. (2023). Research progress in the use of liquid-liquid extraction for food flavour analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 132, 138-149.

Katragadda, H. R., Fullana, A., Sidhu, S., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2010). Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. *Food Chemistry*, 120(1), 59-65.

Kempton, C., Berkhoudt, T., Tolbøl, G. C., Egmos, K., & Karst, U. (2002). Air monitoring of aldehydes by use of hydrazine reagents with a triazine backbone. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 372(5), 639-643.

Khuawar, M. Y., Zardari, L. A., & Laghari, A. J. (2008). Capillary gas chromatographic determination of methylglyoxal from serum of diabetic patients by precolumn derivatization with 1, 2-diaminopropane. *Journal of Chromatography B*, 873(1), 15-19.

Kiejzik, R., Wasilewski, T., & Kamysz, W. (2025). Exhaled Aldehydes and Ketones as Biomarkers of Lung Cancer and Diabetes: Review of Sensor Technologies for Early Disease Diagnosis. *Biosensors*, 15(10), 668.

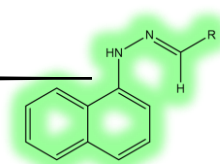
Kim, M. J., Lasalde-Ramírez, J. A., Heng, W., & Gao, W. (2026). Biomolecular profiling for noninvasive health monitoring. *Nature Biotechnology*, 44(6), 934-947.

Kishikawa, N., El-Maghrabey, M. H., & Kuroda, N. (2019). Chromatographic methods and sample pretreatment techniques for aldehydes determination in biological, food, and environmental samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 175, 112782.

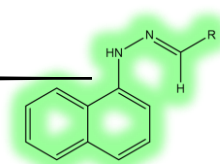
Kokosa, J. M. (2019). Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 238-247.

Kulasingam, V., & Diamandis, E. P. (2008). Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature clinical practice Oncology*, 5(10), 588-599.

Kuykendall, J. R. (2010). Aldehydes. *Comprehensive toxicology*, 291-330.



- Lin, Y. L., Wang, P. Y., Hsieh, L. L., Ku, K. H., Yeh, Y. T., & Wu, C. H. (2009). Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2, 4-dinitrophenylhydrazine derivatization. *Journal of Chromatography A*, 1216(36), 6377-6381.
- Lin, Y. T., Wu, S. S., & Wu, H. L. (2007). Highly sensitive analysis of cholesterol and sitosterol in foods and human biosamples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1156(1-2), 280-287.
- Liu, F., & Xu, H. (2017). Development of a novel polystyrene/metal-organic framework-199 electrospun nanofiber adsorbent for thin film microextraction of aldehydes in human urine. *Talanta*, 162, 261-267.
- Liu, Q., Liu, Y., Chen, S., & Liu, Q. (2010). Ionic liquid for single-drop microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determine carbonyl compounds in environmental waters. *Journal of Separation Science*, 33(15), 2376-2382.
- Liu, X., Zheng, Z., & Liu, Y. (2026). High throughput method for the determination of α , β -unsaturated aldehydes in edible oils: A UV-vis analysis. *Food Research International*, 118366.
- Loi, C. C., Boo, H. C., Mohammed, A. S., & Ariffin, A. A. (2011). A high performance liquid chromatography method for determination of furfural in crude palm oil. *Food Chemistry*, 128(1), 223-226.
- Ma, C., Ji, J., Tan, C., Chen, D., Luo, F., Wang, Y., & Chen, X. (2014). Headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography for the analysis of aldehydes in edible oils. *Talanta*, 120, 94-99.
- Ma, L., & Liu, G. (2017). Simultaneous analysis of malondialdehyde, 4-hydroxy-2-hexenal, and 4-hydroxy-2-nonenal in vegetable oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(51), 11320-11328.
- Ma, L., Wang, L., Tang, J., & Yang, Z. (2016). Optimization of arsenic extraction in rice samples by Plackett-Burman design and response surface methodology. *Food Chemistry*, 204, 283-288.
- Marques, M. M., Beland, F. A., Lachenmeier, D. W., Phillips, D. H., Chung, F. L., Dorman, D. C., & Guyton, K. Z. (2021). Carcinogenicity of acrolein, crotonaldehyde, and arecoline. *The Lancet Oncology*, 22(1), 19-20.



Martínez, E., Rodríguez, J. A., Bautista, M., Rangel-Vargas, E., & Santos, E. M. (2018). Use of 2-Naphthalenethiol for derivatization and determination of acrylamide in potato crisps by high-performance liquid chromatographic with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 11(6), 1636-1644.

Martins da Silva, F., Junior, J. J., & Hernandez Munoz, J. A. (2024). The chemistry of aldehydes and ketones in the synthesis of heterocycles-historical reactions with a new and green perspective. *Current Organic Chemistry*, 28(13), 1023-1045.

Mei, X., Lu, D., & Yan, X. (2022). Separation and determination of D-malic acid enantiomer by reversed-phase liquid chromatography after derivatization with (R)-1-(1-naphthyl) ethylamine. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58, e19247.

Mortensen, M. S., Ruiz, J., & Watts, J. L. (2023). Polyunsaturated fatty acids drive lipid peroxidation during ferroptosis. *Cells*, 12(5), 804.

Moselhy, H. F., Reid, R. G., Yousef, S., & Boyle, S. P. (2013). A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *Journal of Lipid Research*, 54(3), 852-858.

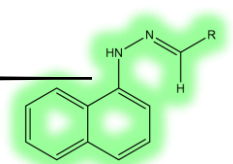
Neto, L. J. D. L., Ramos, A. G. B., Freitas, T. S. D., Barbosa, C. R. D. S., de Sousa Júnior, D. L., Siyadatpanah, A., & da Cunha, F. A. B. (2021). Evaluation of benzaldehyde as an antibiotic modulator and its toxic effect against *Drosophila melanogaster*. *Molecules*, 26(18), 5570.

Nogueira, M. S., Scolaro, B., Milne, G. L., & Castro, I. A. (2019). Oxidation products from omega-3 and omega-6 fatty acids during a simulated shelf life of edible oils. *LWT*, 101, 113-122.

O'Brien, P. J., Siraki, A. G., & Shangari, N. (2005). Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health. *Critical Reviews in Toxicology*, 35(7), 609-662.

Ojeda, A. G., Wrobel, K., Escobosa, A. R. C., Garay-Sevilla, M. E., & Wrobel, K. (2014). High-performance liquid chromatography determination of glyoxal, methylglyoxal, and diacetyl in urine using 4-methoxy-o-phenylenediamine as derivatizing reagent. *Analytical Biochemistry*, 449, 52-58.

Peng, C. Y., Lan, C. H., Lin, P. C., & Kuo, Y. C. (2017). Effects of cooking method, cooking oil, and food type on aldehyde emissions in cooking oil fumes. *Journal of hazardous materials*, 324, 160-167.



Peng, S., Wen, Y., Ming, Y., Huang, T., Xu, G., Yan, J., & Li, J. (2026). Molecularly imprinted polymers based enrichment and separation for trace analysis in capillary electrophoresis. *Talanta*, 297, 128549.

Phogat, P., Sharma, S., Jha, R., & Singh, S. (2024). Fundamentals of electrochemistry. In *Electrochemical Devices: Principles to Applications* (pp. 1-27). Singapore: Springer Nature Singapore.

Poole, C. F. (2013). Derivatization reactions for use with the electron-capture detector. *Journal of Chromatography A*, 1296, 15-24.

Qin, Y., Li, H., Luo, S., Tang, S., Zeng, H., Zhu, S., & Ma, M. (2025). Rapid determination of α , β -unsaturated aldehydes in vegetable oils by desorption corona beam ionization-tandem mass spectrometry based on a twin derivatization strategy. *Microchemical Journal*, 208, 112447.

Quezada, H., Guzmán-Ortiz, A. L., Díaz-Sánchez, H., Valle-Rios, R., & Aguirre-Hernández, J. (2017). Omics-based biomarkers: current status and potential use in the clinic. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 74(3), 219-226.

Ramana, K. V., Srivastava, S., & Singhal, S. S. (2013). Lipid peroxidation products in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 583438.

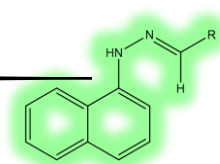
Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, 84-98.

Rondanelli, M., Perdoni, F., Infantino, V., Faliva, M. A., Peroni, G., Iannello, G., & Cocuzza, C. (2019). Volatile organic compounds as biomarkers of gastrointestinal diseases and nutritional status. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1-14.

Rosado, T., Barroso, M., Vieira, D. N., & Gallardo, E. (2021). Trends in microextraction approaches for handling human hair extracts-A review. *Analytica Chimica Acta*, 1185, 338792.

Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Sajid, M., & Andruch, V. (2019). Liquid-phase microextraction: A review of reviews. *Microchemical Journal*, 149, 103989.

Sandelius, Å., Basak, J., Hölttä, M., Sultana, S., Hyberg, G., Wilson, A., & Söderberg, M. (2020). Urinary kidney biomarker panel detects preclinical antisense oligonucleotide-induced tubular toxicity. *Toxicologic Pathology*, 48(8), 981-993.



Serrano, M., Gallego, M., & Silva, M. (2013). Static headspace gas chromatography–mass spectrometry for the one-step derivatisation and extraction of eleven aldehydes in drinking water. *Journal of Chromatography A*, 1307, 158-165.

Shanmugam, Y., & Ravikumar, L. (2026). Multi-omics biomarkers as emerging determinants in precision disease diagnosis and therapeutic monitoring. *Advances in Biomarker Sciences and Technology*.

She, X., Li, J., Zhu, J., Huang, T., & Li, Y. (2021). Magnetic solid phase extraction followed by in-situ derivatization with core-shell structured titanium dioxide coated ferrihydrous oxide microspheres for determination of alendronate in plasma. *Journal of Chromatography A*, 1637, 461809.

Shi, N., Wang, Y., Lv, M., Xia, X., Li, Z., Chen, D., & Zhang, J. (2025). A simplified one-pot derivatization/magnetic solid-phase extraction with integrated pH adjustment strategy coupled with liquid chromatography-fluorescence detection for fatty aldehyde analysis. *Journal of Chromatography A*, 1753, 465988.

Siegel, R. L., Kratzer, T. B., Giaquinto, A. N., Sung, H., & Jemal, A. (2025). *Cancer statistics, 2025*. *Ca*, 75(1), 10.

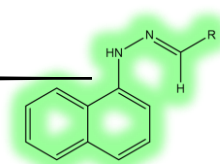
Sinharoy, P., McAllister, S. L., Vasu, M., & Gross, E. R. (2019). Environmental aldehyde sources and the health implications of exposure. *Aldehyde dehydrogenases: From alcohol metabolism to human health and precision medicine*, 35-52.

Skoog, D. A., West, D. M., & Holler, J. (2020). *Fundamentos de química analítica*. Volumen 2. Reverté.

Suh, J. H., Niu, Y. S., Hung, W. L., Ho, C. T., & Wang, Y. (2017). Lipidomic analysis for carbonyl species derived from fish oil using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 168, 31-42.

Sung, H., Filho, A. M., Laversanne, M., Ferlay, J., Siegel, R. L., Soerjomataram, I., & Bray, F. (2026). Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 76(4), e70090.

Sutaria, S. R., Gori, S. S., Morris, J. D., Xie, Z., Fu, X. A., & Nantz, M. H. (2022). Lipid peroxidation produces a diverse mixture of saturated and unsaturated aldehydes in exhaled breath that can serve as biomarkers of lung cancer-a review. *Metabolites*, 12(6), 561.



Tabrizi, A. B., & Abdollahi, A. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction for the high performance liquid chromatographic determination of aldehydes in cigarette smoke and injectable formulations. *Journal of Hazardous Materials*, 254, 390-396.

Takhar, M., Li, Y., Ditto, J. C., & Chan, A. W. (2023). Formation pathways of aldehydes from heated cooking oils. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 25(2), 165-175.

Talebzadeh, M., Sobhanardakani, S., & Zandipak, R. (2017). Effective adsorption of As (V) and V (V) ions from water samples using 2, 4-dinitrophenylhydrazine functionalized sodium dodecyl sulfate-coated magnetite nanoparticles. *Separation Science and Technology*, 52(4), 622-633.

Taunk, K., Jajula, S., Bhavsar, P. P., Choudhari, M., Bhanuse, S., Tamhankar, A., & Rapole, S. (2025). The prowess of metabolomics in cancer research: current trends, challenges and future perspectives. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 480(2), 693-720.

Temerdashev, A., Atapattu, S. N., & Feng, Y. Q. (2024). A tutorial on solid-phase analytical derivatization in sample preparation applications. *Journal of Chromatography Open*, 6, 100157.

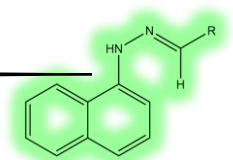
Tomono, S., Miyoshi, N., & Ohshima, H. (2015). Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS. *Journal of Chromatography B*, 988, 149-156.

Troudt, B. K., Vue, J. W., & Bühlmann, P. (2022). Comparison of the kinetics of aldehyde sensing by covalent bond formation with hydrazines and hydroxylamines. *Tetrahedron*, 119, 132852.

Vogel, M., Büldt, A., & Karst, U. (2000). Hydrazine reagents as derivatizing agents in environmental analysis—a critical review. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 366(8), 781-791.

Wang, L., Wang, J., Xu, J., Liu, S., Huang, S., Han, S., & Lv, M. (2020). Highly sensitive qualitative and quantitative detection of saturated fatty aldehydes in edible vegetable oils using a “turn-on” fluorescent probe by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1621, 461063.

Wasowicz, E., Gramza, A., Hes, M., Jelen, H., Korczak, J., Malecka, M., & Zawirska-Wojtasiak, R. (2004). Oxidation of lipids in food. *Polish journal of food and nutrition sciences*, 13(Spec. Issue 1).



Woollam, M., Eckerle, S., Schulz, E., Button, S., & Agarwal, M. (2026). Solid-Phase Microextraction for Urinary VOC Analysis Using Portable GC-MS: Method Development and Validation Against Benchtop Instrumentation. *Talanta*, 129329.

Wei, Y., Wang, M., Liu, H., Niu, Y., Wang, S., Zhang, F., & Liu, H. (2019). Simultaneous determination of seven endogenous aldehydes in human blood by headspace gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1118, 85-92.

Xiong, X. J., Wang, H., Rao, W. B., Guo, X. F., & Zhang, H. S. (2010). 1, 3, 5, 7-Tetramethyl-8-aminozide-difluoroboradiazas-indacene as a new fluorescent labeling reagent for the determination of aliphatic aldehydes in serum with high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217(1), 49-56.

Xu, Q., Yin, Y., Liu, Y., Ma, Q., Chen, X., & Zhao, J. (2023). Simultaneous determination of six α -dicarbonyl compounds in traditional Chinese medicines using high-performance liquid chromatography-fluorescence detector with pre-column derivatization. *Journal of Separation Science*, 46(19), 2300435.

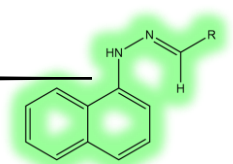
Yan, R., Wang, Z., Zhou, J., Gao, R., Liao, S., Yang, H., & Wang, F. (2019). Gold nanoparticle enriched by Q sepharose spheres for chemical reaction tandem SERS detection of malondialdehyde. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 281, 123-130.

Yong, K. J., Wu, T. Y., Lee, C. B. T. L., Lee, Z. J., Liu, Q., Jahim, J. M., & Zhang, L. (2022). Furfural production from biomass residues: Current technologies, challenges and future prospects. *Biomass and Bioenergy*, 161, 106458.

You, J., Yan, T., Zhao, H., Sun, Z., Xia, L., Suo, Y., & Li, Y. (2009). A sensitive fluorescence reagent for the determination of aldehydes from alcoholic beverage using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and mass spectrometric identification. *Analytica Chimica Acta*, 636(1), 95-104.

Yuan, C., Pu, J., Fu, D., Min, Y., Wang, L., & Liu, J. (2022). UV-vis spectroscopic detection of formaldehyde and its analogs: A convenient and sensitive methodology. *Journal of Hazardous Materials*, 438, 129457.

Zamuz, S., Bohrer, B. M., Campagnol, P. C. B., Domínguez, R., Pateiro, M., Santos, E. M., & Lorenzo, J. M. (2022). Lipid oxidation of animal fat. In *Food Lipids* (pp. 89-103). Academic Press.



Zhang, H., Hu, S., Song, D., & Xu, H. (2016). Polydopamine-sheathed electrospun nanofiber as adsorbent for determination of aldehydes metabolites in human urine. *Analytica Chimica Acta*, 943, 74-81.

Zhang, J., Li, R., Bei, Y., Xu, X. D., & Kang, W. (2023). Design of a large Stokes shift ratiometric fluorescent sensor with hypochlorite detection towards the potential application as invisible security ink. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 285, 121859.

Zhang, J., Zhang, H., Li, M., Zhang, D., Chu, Q., & Ye, J. (2010). A novel capillary electrophoretic method for determining methylglyoxal and glyoxal in urine and water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(31), 5124-5129.

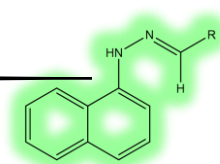
Zhang, W., Zhu, H., Xie, W., Du, C., Fang, X., Zhang, R., & Lin, Y. (2024). Highly sensitive analysis of fatty aldehydes in vegetable oils using a novel coumarin-based fluorescent probe by HPLC for quality control. *Microchemical Journal*, 205, 111180.

Zhang, X., Wang, R., Zhang, L., Wei, J., Ruan, Y., Wang, W., & Liu, J. (2019). Simultaneous determination of four aldehydes in gas phase of mainstream smoke by headspace gas chromatography-mass spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2019(1), 2105839.

Zhang, Y., Shang, X., Guo, J., Ao, L., Shen, C., Liu, M., & Deng, B. (2025). A computationally driven screening-construction-mechanism strategy of magnetic molecularly imprinted polymers for aliphatic aldehydes detection. *Food Chemistry*, 146974.

Zhao, M., Liu, Z., Zhang, W., Xia, G., Li, C., Rakariyatham, K., & Zhou, D. (2025). Advance in aldehydes derived from lipid oxidation: A review of the formation mechanism, attributable food thermal processing technology, analytical method and toxicological effect. *Food Research International*, 203, 115811.

Ziyatdinova, G., Antonova, T., & Davletshin, R. (2023). Voltammetric sensor based on the poly (p-aminobenzoic acid) for the simultaneous quantification of aromatic aldehydes as markers of Cognac and brandy quality. *Sensors*, 23(4), 2348.



Anexos

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo a 3 de marzo de 2025

Oficio Comité de Ética e Investigación ICSa «290» / 2025

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN.

Ibarra Ortega Israel Samuel

Investigador de la UAEH

Correo: israel_ibarra@uaeh.edu.mx

Alumno/Investigador externo: López Tellez Jorge

Correo: lo319035@uaeh.edu.mx

PRESENTE

Título del Proyecto: Determinación de aldehídos asociados como biomarcadores de cáncer.

Le informamos que su proyecto ha sido evaluado por el Comité de Ética e Investigación del Instituto de Ciencias de la Salud y el dictamen emitido respecto a su proyecto de investigación es:

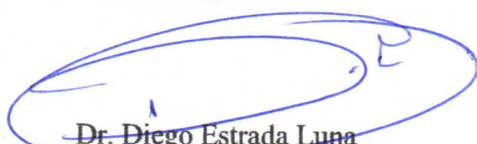
Decisión
«Aprobado»

Este protocolo tiene vigencia del 3 de marzo de 2025 al 3 de marzo de 2026.

En caso de requerir una ampliación del plazo, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité la solicitud del motivo junto con un reporte del progreso de avance de su proyecto, al menos 90 días antes de la fecha de término de su vigencia.

Le solicitamos atender las indicaciones realizadas por el revisor -si es el caso-, y enviar la versión corregida de su protocolo para una nueva evaluación, a más tardar 15 días naturales posteriores a la recepción de este documento.

Atentamente


Dr. Diego Estrada Luna
Presidente del Comité



Para la validación de este documento informe el siguiente código en la sección

Validador de Documentos del sitio web oficial del Comité: «430JLTSJQ»

<https://sites.google.com/view/comiteei-icsa/validador-de-documentos>