

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

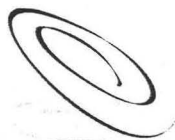
**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE
CARBOFURANO Y 7-FENOLCARBOFURANO EN TEJIDO BIOLÓGICO
MEDIANTE UN SISTEMA DE PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS
CROMATOGRÁFICO EN LÍNEA.**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PRESENTA

I.Q.I. DIANA MACÍAS MENDOZA



**Ciencias
Químicas**

TUTOR: LUZ ELENA VERA ÁVILA

2005

m345081



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

<i>Presidente</i>	<i>Dra. Guadalupe Albarrán Sánchez</i>
<i>Vocal</i>	<i>Dr. Rafael Navarro González</i>
<i>Secretario</i>	<i>Dra. Martha Patricia García Camacho</i>
<i>Primer suplente</i>	<i>Dra. Evangelina Camacho Frías</i>
<i>Segundo suplente</i>	<i>Dra. Adriana Morales Pérez</i>

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Luz Elena Vera Ávila.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Macías Mendoza
Deana

FECHA: 08-Jun-05

FIRMA: [Firma]

Agradecimientos

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila: Por su asesoría y paciencia durante el desarrollo del presente trabajo, sobre todo, por su apoyo y confianza al permitirme realizar este proyecto.

A la M. en C. Rosario Covarrubias: Por su invaluable ayuda y el regalo de su amistad.

Al Dr. Eduardo Barzana: Por las facilidades para que la Secretaría Administrativa de la Facultad de Química de la UNAM me brindara el apoyo económico necesario para el término de mis estudios, ello, a través del Subproyecto de Analítica para la División de Estudios de Posgrado.

Al Médico J. Gustavo Velásquez Ramírez del Hospital General de Subzona No. 4 del IMSS de Tecomán, Colima: Por facilitar las muestras para el desarrollo del método.

Un agradecimiento muy especial a las mujeres que, sin saberlo, colaboraron de manera sustancial en este proyecto.

A la DGEP, por el complemento otorgado.

Dedico este trabajo:

A mis padres: Hermelinda Mendoza Aranda y Miguel Ángel Macías Menchaca (q.e.p.d.), con amor.

A mis hermanos: Isabel, Miguel Ángel, Anita, María de Jesús y Fernando, gracias por su apoyo.

A mis sobrinas Alejandra y Gabriela, las quiero y a mi cuñado Gerardo, con mucho aprecio.

A Oscar: gracias por siempre, (t.q.m.)

INDICE GENERAL

Resumen	1
Abstract	3
I. Introducción	5
II. Objetivos	9
III. Generalidades y antecedentes	10
3.1 Cáncer	10
Fisiología del cuello uterino	11
Cáncer cervicouterino	12
Riesgos de cáncer por exposición a pesticidas	13
3.2 Plaguicidas	15
Carbamatos	17
Carbofurano	21
Características generales y propiedades fisicoquímicas	21
Metabolismo	22
Métodos analíticos para la determinación de carbofurano	24
3.3 Extracción en fase sólida	28
Etapas de la EFS	29
Volumen de fuga	30
Adsorbentes	32
Sílices modificadas	32
Carbón grafitizado	32
Adsorbentes poliméricos	33
Inmunoadsorbentes	34
Polímeros impresos molecularmente	36
Selección de los disolventes	37
Modos de la EFS	38
En línea	38
Fuera de línea	39
IV. Parte experimental	40
4.1 Equipo	40
4.2 Columnas	41
4.3 Materiales, disolventes y reactivos	41
4.4 Muestras	42
4.5 Calibración del rizo del inyector	42
4.6 Determinación del volumen de carga de la precolumna	43
4.7 Pruebas para la obtención del extracto en la muestra	43
4.8 Optimización del lavado de la precolumna	44
4.9 Metodología establecida	45

V.	Resultados y discusión	48
5.1	Condiciones cromatográficas	48
5.2	Evaluación del sistema en línea	52
5.3	Tratamiento de la muestra y desarrollo del método analítico	55
5.4	Evaluación del método analítico	65
5.5	Aplicación del método	70
VI.	Conclusiones	75
VII	Anexo 1	77
VII.	Bibliografía	79

INDICE DE FIGURAS

3.1	Secuencia de las etapas típicas de la EFS	29
3.2	Curva de análisis frontal	31
3.3	Etapas de la EFS empleando inmunoadsorbentes	36
3.4	Proceso de impresión molecular	37
3.5	Acoplamiento en línea para la EFS	38
4.1	Esquema del sistema en línea EFS-CL	40
5.1	Separación cromatográfica del carbofurano y 7-fenol carbofurano en el sistema en línea	49
5.2a	Separación cromatográfica de carbofurano y 3 de sus metabolitos mediante gradiente de elución (1)	51
5.2b	Separación cromatográfica de carbofurano y 3 de sus metabolitos mediante gradiente de elución (1)	52
5.3	Cromatograma de un extracto en ACN de un tejido blanco	56
5.4	Cromatograma que muestra la optimización del medio utilizado para reconstituir el extracto evaporado previo a su carga en la precolumna ..	58
5.5a-b	Cromatograma que muestra la optimización del lavado de la precolumna	59
5.5c	Cromatograma que muestra la optimización del lavado de la precolumna	60
5.6	Efecto de la adición de ácido fórmico al extracto y el lavado de la precolumna sobre el perfil cromatográfico	62
5.7	Cromatogramas obtenidos a partir de una inyección de estándares y muestras de tejido fortificadas y sin fortificar	64
5.8	Cromatogramas obtenidos del análisis de algunas muestras de tejido Epitelial	71

INDICE DE TABLAS

4.1	Resumen de las condiciones experimentales empleadas durante el desarrollo del método	46
5.1	Linealidad del sistema en línea para el carbofurano	54
5.2	Análisis estadístico de la ordenada al origen y la pendiente de la ecuación cantidad analizada vs cantidad cargada	55
5.3	Estudio de la repetibilidad del método	65
5.4	Análisis estadístico de la exactitud del método en la determinación de carbofurano y 7-fenol carbofurano en muestras de tejido biológico	66
5.5	Intervalos de confianza de la cantidad de plaguicida recuperada en el análisis de muestras fortificadas con 54 ng de cada compuesto	66
5.6	Límites de detección del método para el análisis de carbofurano y 7-fenol carbofurano en muestras de tejido biológico	68
5.7	Análisis de muestras de tejido blanco dopadas con diferentes cantidades de los analitos	69
5.8	Datos de las muestras analizadas	70
5.9	Cuantificación del 7-fenol carbofurano en muestras de tejido cervical	73

RESUMEN

En el presente trabajo, se describe el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de un carbamato de amplio uso en México (Carbofurano) y su principal metabolito (7-fenolcarbofurano) en una matriz biológica de gran complejidad, como lo es el tejido epitelial del cuello cervicouterino.

Como primer paso, se establecieron las condiciones de separación y detección de los compuestos de interés, así como las condiciones para su extracción en fase sólida (EFS) a partir de una solución acuosa. Estos estudios permitieron diseñar un sistema en línea, acoplando la precolumna de EFS (fase reversa polimérica PLRP-S) a la columna analítica (fase reversa C-18) de un cromatógrafo de líquidos con detector UV.

Posteriormente se trabajó en el tratamiento de la muestra utilizando algunos tejidos blanco (no contaminados con el pesticida) fortificados con los analitos en estudio. Los numerosos ensayos realizados en esta etapa permitieron establecer el protocolo experimental finalmente adoptado para el análisis de la matriz biológica:

La muestra, cortada en pequeños trozos, se somete a sonicación en metanol para extraer solamente la fracción polar. El extracto se reduce hasta 1 mL con corriente de N₂, se añade un pequeño volumen de ácido fórmico, con lo cual algunos interferentes son eliminados por precipitación en el medio ácido. El filtrado se diluye con agua hasta 25 mL y se carga en la precolumna de EFS; en esta etapa los compuestos más polares eluyen de la precolumna quedando retenidos los compuestos de polaridad media, incluyendo los analitos. La precolumna se lava sucesivamente con agua-acetonitrilo (5%), solución acuosa amoniacal a pH 11 y de nuevo la mezcla agua-acetonitrilo (5%), con estos lavados continúan eliminándose los compuestos de mayor polaridad y aquellos que se ionizan en medio básico. Finalmente, la precolumna se eluye en línea con la columna analítica mediante una fase móvil acetonitrilo - HClO₄ (0.01M) 18:82 (v/v) a flujo 1 mL/min; la detección se realiza en el UV a 280 nm.

La evaluación del método se realizó con muestras de tejido blanco (250 mg) fortificadas con carbofurano y 7-fenolcarbofurano a 0.22 ng/mg. La recuperación promedio de los analitos fue superior al 90% con un coeficiente de variación de 12%. El límite de detección del método para ambos compuestos fue de 20 ng (cantidad absoluta detectable en el tejido), lo que equivale a una concentración de 0.08 ng/mg.

Este método se aplicó en el análisis de tres muestras de tejido epitelial provenientes de mujeres campesinas expuestas al pesticida. Se detectó la posible presencia del metabolito en dos de las muestras, una de ellas provenía de una mujer con cáncer in situ (68 ng/g del metabolito) y la otra de una mujer que no presentaba anomalías desde el punto de vista clínico (279 ng/g del metabolito). Estos preocupantes resultados tendrían que ser confirmados por una técnica alterna que corrobore la identidad del pico atribuido al 7-fenolcarbofurano.

ABSTRACT

This work describes the development of an analytical methodology for the determination of a carbamate (Carbofuran), widely used in Mexico and its main metabolite in humans (7-phenolcarbofuran) in a complex biological matrix: the cervical-uterine epithelial tissue.

The first stage of this research was focused on the separation and detection of the compounds of interest, as well as the determination of adequate conditions for their solid phase extraction (SPE) from aqueous solutions. An on-line preconcentration - analysis system was designed by coupling a polymeric reverse SPE precolumn (PLRP-S) to the analytical column (C-18 reverse- phase) of a liquid chromatograph with UV detector.

Next, sample pretreatment was optimized using blank tissue samples (not contaminated with the pesticide) spiked with the studied compounds. The numerous assays performed at this time led to the establishment of the finally adopted experimental protocol for the analysis of the biological matrix:

The sample is cut to small pieces and submitted to sonication in methanol in order to only extract the polar fraction. The extract is reduced to 1 ml with a gentle N₂ stream, a small formic acid aliquot is added and the resulting suspension is filtered; in this way, some impurities are eliminated by precipitation. The filtrate is then diluted to 25 ml with water and loaded in the SPE precolumn; at this stage, the most polar compounds breakthrough from the precolumn and only the medium polarity compounds, including the analytes, remain adsorbed on the packing.

Next, the precolumn is successively rinsed with a water-acetonitrile (5%, v/v) mixture, an aqueous ammonia solution at pH 11, and again the water-acetonitrile mixture, under this strong washing, additional polar impurities and compounds that become ionized in basic media are eliminated. Finally the precolumn coupled to the

analytical column is on-line eluted with an acetonitrile - HClO₄ (0.01M) 18:82 (v/v) mobile phase at a flow rate of 1 ml/min; detection is carried out at 280 nm.

The method performance was evaluated from the analysis of blank tissue samples (250 mg) spiked with carbofuran and 7-phenolcarbofuran at 0.22 ng/mg. The mean analyte recoveries were higher than 90% with variation coefficients of 12%. The method detection limit for both compounds was 20 ng (absolute detectable amount in tissue samples), which is equivalent to a concentration of 0.08 ng/mg.

Application to the analysis of three epithelial tissue samples from country women that were exposed to the pesticide, revealed the possible presence of the metabolite in two samples, one of them came from a woman with an in situ cancer (68 ng/g of metabolite) and the other was from a woman with no apparent anomalies from the clinical viewpoint (279 ng/g of metabolite). The troubling results need confirmation from an alternative technique in order to corroborate the identity of the peak attributed to 7-phenolcarbofuran.

I. INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas son un grupo muy diverso de sustancias químicas que de acuerdo a su aplicación se clasifican como insecticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, moluscocidas y rodenticidas. Actualmente se conocen aproximadamente seiscientos ingredientes activos que se combinan entre sí y con los llamados ingredientes inertes para dar una amplia oferta de mezclas comerciales con muy diferentes usos y aplicaciones domésticas y agrícolas.

Los plaguicidas son muy importantes en cuanto a la mejora de la producción agrícola y al control de enfermedades. Sin embargo, su uso constante a gran escala ocasiona daños a corto y a largo plazo en la salud de la población expuesta directa o indirectamente (efectos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos, etc). También son bien conocidos los problemas ambientales que ocasionan, como la contaminación del suelo y del agua de lagos y ríos. Además, muchos de ellos presentan una gran capacidad de acumulación en los organismos vivos, provocando que su concentración aumente progresivamente a lo largo de las cadenas tróficas, fenómeno conocido como bioamplificación.

Los daños ocasionados por estos compuestos a la salud humana son un hecho bien documentado durante los últimos treinta años, sin embargo, sus consecuencias reales empiezan a entrecruzarse ahora en que más de una generación ha sufrido ese acoso medio ambiental. Esto puede deberse, particularmente, a que la mayoría de los datos se han obtenido de los estudios realizados en casos de intoxicación de personas expuestas, en tanto que los datos por exposición a largo plazo son relativamente escasos. Las consecuencias de la exposición a plaguicidas sobre el desarrollo y la funcionalidad de diferentes órganos y sistemas no es bien conocida, pero abarca desde alteraciones neurológicas, reproductivas, endocrinas o inmunológicas, hasta fracasos funcionales y alteraciones importantes del comportamiento.

Poco a poco se ha ido conociendo la toxicidad crónica de los plaguicidas sobre la vida animal y la salud humana. En los últimos años se han realizado progresos debido

a que la atención se ha centrado principalmente en el estudio del efecto de plaguicidas de gran uso como el DDT (diclorodifeniltricloroetano) sobre la población general. La exposición crónica al DDT y la acumulación en tejido graso de sus metabolitos se ha intentado relacionar, sin demasiado éxito, con el incremento de casos de cáncer de mama^{1, 2}. Los resultados de estos trabajos son muy dispares. Algunos de los estudios han asignado un papel al DDT en el riesgo de cáncer de mama, mientras que la mayor parte de los trabajos han fallado en el establecimiento de tal asociación. En otros casos el riesgo de enfermedades tumorales se ha asociado con la presencia de otros pesticidas distintos del DDT, como es el caso del dieldrín o el mirex³.

Desgraciadamente, estos trabajos se han limitado a tipificar la exposición humana a uno, o unos pocos, compuestos químicos a los que se les ha atribuido toda la sospecha en la asociación compuesto químico - cáncer y no se ha tomado muy en cuenta la infinidad de compuestos químicos con características similares a los que esos individuos han estado expuestos.

Por otro lado, además del cáncer de mama, es bien sabido que el cáncer cervicouterino es una de las principales causas de mortandad en México. Sin embargo, se podría asegurar que si las investigaciones en las que se pretende asociar el cáncer de mama con la exposición prolongada a ciertos plaguicidas organoclorados apenas comienzan y por lo tanto son escasas, los trabajos que podrían arrojar información sobre el desarrollo de cáncer cervicouterino por exposición a plaguicidas son nulos. Entonces, si se toman en cuenta las grandes cantidades de plaguicidas empleadas en los cultivos a nivel nacional y, como ya se mencionó, el hecho de que el cáncer cervicouterino es una de las principales causas de muerte en el país, no resultaría descabellado el relacionar el desarrollo de este tipo de cáncer con la exposición prolongada a un determinado tipo de plaguicidas.

Es de nuestro conocimiento que en algunas regiones del suroeste del país se han venido incrementando los casos de cáncer cervicouterino, llegando a desarrollarse

esta enfermedad aún en mujeres menores de edad sin actividad sexual. En estas regiones, una de las actividades principales es el cultivo de cítricos, lo que conlleva al uso masivo de insecticidas para evitar la proliferación de insectos y proteger al fruto de su ataque. Uno de los insecticidas más empleados en esta región es el carbofurano, por lo cual resulta de sumo interés contar con un método analítico que permita verificar si este compuesto o alguno de sus metabolitos se encuentra presente en el tejido cervical de las mujeres afectadas.

Hasta ahora, la información sobre métodos analíticos desarrollados para determinar contaminantes orgánicos, entre estos el carbofurano, en muestras biológicas, se ha enfocado principalmente al análisis de frutas, vegetales, fluidos biológicos como plasma y orina e incluso tejidos animales; sin embargo, hasta el momento los trabajos referentes al desarrollo de metodologías para determinar plaguicidas en tejidos de origen humano son aún escasos. Para nuestro caso en particular, los trabajos en los que se determina carbofurano o alguno de sus metabolitos en muestras de tejido provenientes del cuello uterino, son nulos.

Por otro lado, en la gran mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de algún compuesto en matrices biológicas, la etapa de preparación de muestra previa al análisis cromatográfico consiste en una extracción en fase sólida (EFS), cuyo fin puede ser preconcentrar el o los analitos en estudio o bien, para eliminar las impurezas provenientes de la matriz. Es importante también destacar que en la mayoría de estos trabajos la EFS se realiza empleando cartuchos empacados con el adsorbente que se considera adecuado, es decir, la EFS se realiza fuera de línea. Cuando se trata de determinar carbamatos, como es el caso del carbofurano, los procedimientos reportados se basan generalmente en una separación por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), esto es debido a que estos compuestos se descomponen a alta temperatura, por lo que no pueden ser analizados directamente por cromatografía de gases. Las formas de detección más empleadas son UV, fluorescencia y los diferentes modos de la espectrometría de masas, entre otros.

Por tanto, la finalidad de esta investigación fue desarrollar un método que permita detectar y cuantificar la posible presencia de trazas de carbofurano o alguno de sus metabolitos en muestras de tejido de epitelio cervical provenientes de mujeres expuestas a este plaguicida. Para ello, se decidió emplear la EFS como método para aislar los solutos de interés, CLAR como técnica de separación y UV para la detección. Finalmente, al desconocer si los compuestos estaban presentes o no en las muestras y en qué nivel de concentración, se decidió realizar la EFS en línea, con el fin de asegurar que los compuestos de interés serían cuantificados en su totalidad.

El procedimiento finalmente establecido consta de tres grandes etapas. La primera esta avocada al pretratamiento de la muestra, en donde, mediante una extracción con un disolvente de polaridad adecuada y algunas otras operaciones, se obtiene un extracto concentrado y semipurificado del tejido. En la segunda etapa, el extracto anterior diluido en agua es reconcentrado en una pequeña precolumna y purificado en mayor grado mediante una serie de lavados que permiten eliminar una gran parte de las interferencias de la matriz. Finalmente, la tercera etapa consiste en la transferencia total del extracto purificado a la columna analítica para su separación cromatográfica y detección UV. Los criterios de recuperación de los analitos, sensibilidad y selectividad guiaron la optimización de condiciones a lo largo de las tres etapas, aunque en determinados puntos fue necesario establecer compromisos entre las tres variables dada la complejidad de la muestra.

Una vez que este método se aplique en series de muestras de mujeres expuestas y muestras control se podría, a partir de los resultados, establecer la posible relación entre la exposición prolongada al plaguicida y el desarrollo de cáncer cervicouterino como un primer paso para inducir la búsqueda de soluciones a este agudo problema.

II. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Desarrollar y validar un método analítico basado en la EFS acoplada en línea con un sistema de CLAR para determinar carbofurano y alguno o algunos de sus productos de degradación en muestras de tejido cervical humano.

Objetivos particulares:

- Establecer las condiciones cromatográficas que permitan la adecuada transferencia, separación y detección de los carbamatos en estudio en el sistema en línea: precolumna de EFS + columna analítica.
- Desarrollar condiciones experimentales adecuadas para la extracción cuantitativa de los analitos a partir de las muestras reales, buscando reducir al máximo la presencia de interferentes de matriz en el extracto.
- Optimizar las condiciones de carga y lavado del extracto de la muestra en la precolumna de EFS, para eliminar la mayor cantidad de impurezas sin pérdida de los analitos.
- Aplicar el método desarrollado en muestras provenientes de mujeres expuestas a los pesticidas.

III. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

3.1 Cáncer

La palabra cáncer designa de manera genérica a una serie de enfermedades que se originan en distintas estirpes celulares somáticas, tales como las células epiteliales (carcinomas), las células que generan a las sanguíneas (leucemias), y los que ocurren en los tejidos de soporte (sarcomas). Un rasgo común de las células cancerosas es que tienen alterados los mecanismos normales de división celular ⁴.

Ciertos factores son capaces de provocar un cáncer en una proporción de los individuos expuestos a ellos. Entre éstos se encuentran herencia, virus, las radiaciones ionizantes, los productos químicos, las alteraciones inmunológicas. Dada la naturaleza de esta investigación, se profundizará principalmente en el riesgo de cáncer debido a la exposición a productos químicos ⁴.

El empleo de productos químicos sintéticos en las prácticas agrícolas se incrementó notablemente a partir de la segunda Guerra Mundial. Aunada al uso de fertilizantes, la utilización de plaguicidas fue la responsable de la revolución verde, al permitir la erradicación de plagas para los cultivos con valor alimenticio. Su empleo también ha permitido el control de insectos responsables de epidemias severas, como la malaria y ciertas encefalitis. Sin embargo, su uso indiscriminado ha provocado graves desórdenes ecológicos en el planeta. En los años setenta se reconoció el daño que provoca la utilización a gran escala de estos productos químicos, no sólo en el ambiente sino en la salud pública, lo que ocasionó que en EUA y en otros países se promulgaran leyes que regulan la producción, distribución y uso de agroquímicos ⁴.

El riesgo de muerte por cáncer en la población agrícola es superior a la población general para algunas localizaciones tumorales como los tumores cerebrales, el cáncer de pulmón, ovario y próstata, los sarcomas de partes blandas y algunos tipos específicos de leucemia. No obstante esta tendencia, la mayor dificultad se ha encontrado a la hora de establecer una relación de causalidad entre la exposición

a un compuesto químico determinado y el riesgo de padecimiento de cáncer. Estos inconvenientes son aún mayores cuando los epidemiólogos se enfrentan a la falta de información en la clasificación de la población expuesta que, por ejemplo, impide identificar la actividad laboral de la mujer trabajadora a través de los registros de defunción³.

- **Cáncer Cervicouterino**

Fisiología del cuello uterino

El cuello uterino es la abertura del útero, un órgano hueco en forma de pera donde se desarrolla el feto, y lo conecta con la vagina (canal de nacimiento). El material principal de que está formado es un tejido fibroso, aunque existen fibras musculares lisas en proporción variable. El cuello uterino está dividido en dos capas epiteliales: epitelio estratificado y epitelio cilíndrico, entre ambos hay un grueso estroma, el cual, según estudios realizados es rico en agua, colágena, elastina, glucosa, aminoglucanos, proteoglucanos, ácido hialurónico, dermatansulfato y en menor proporción fibronectina⁵.

Las secreciones de la mucosa cervical tienen características definidas que varían durante el curso del ciclo menstrual, así como durante el embarazo. Esta actividad alcanza su punto culminante antes o en el momento de la ovulación.

El pH de la secreción cervical es de 7 – 8 en la mitad del ciclo comparado con un pH 4.5 a comienzos o al final del ciclo. Existe también un incremento en el contenido acuoso que varía del 92 – 94% hasta un 97 – 98% durante la ovulación. También durante la fase de la ovulación existe una concentración máxima de carbohidratos, fosfolípidos, colesterol y aminoácidos. El moco cervical contiene sustancias libres reductoras en todas las fases, pero tienden a disminuir de concentración en la mitad del ciclo. Los carbohidratos aparecen principalmente en forma de azúcares simples libres (glucosa, maltosa) y polisacáridos neutros parecidos a los álcalis que contienen galactosa y glucosalina^{5,6}.

Cáncer cervicouterino

El cáncer cervicouterino es una enfermedad en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del cuello uterino.

El cáncer cervicouterino suele crecer lentamente. Antes de que se encuentren células cancerosas en el cuello uterino, sus tejidos experimentan cambios y empiezan a aparecer células anormales (proceso conocido como displasia), las cuales pueden detectarse mediante la prueba del Papanicolau. Posteriormente las células cancerosas comienzan a crecer y se diseminan con mayor profundidad en el cuello uterino y las áreas circundantes.

Como en general la enfermedad es asintomática, deberán realizarse una serie de pruebas para detectarla. La primera de ellas es, como se mencionó anteriormente, el Papanicolau, el cual consiste en un exudado para recolectar las células. Si se encuentran células anormales, se deberá extraer una muestra de tejido (biopsia); la cantidad de tejido puede variar desde una porción pequeña hasta una cantidad mayor, la cual generalmente es en forma de cono (conización) ⁷.

Una vez que el cáncer ha sido detectado, se realizan más pruebas para saber si se ha diseminado a otras partes del cuerpo. Este procedimiento se conoce como clasificación por etapas y es necesario para aplicar el tratamiento adecuado, el cual puede ir de una sencilla cirugía hasta los tratamientos de radio y quimioterapia.

- ❖ *Etapa 0 ó carcinoma in situ:* Es el cáncer en su etapa inicial, las células anormales se encuentran sólo en la primera capa de células que recubre el cuello uterino, aún no invaden sus tejidos más profundos.

- ❖ *Etapa I:* El cáncer afecta ya los tejidos más profundos del cuello uterino, sin embargo aún no se disemina en los alrededores.

- ❖ *Etapa II:* El cáncer se ha extendido a regiones cercanas, pero aún se encuentra en la región pélvica.
- ❖ *Etapa III:* El cáncer ha invadido toda la región pélvica. Las células cancerosas también pueden haber llegado a la parte inferior de la vagina y además bloquear los tubos que conectan los riñones a la vejiga (uréteres).
- ❖ *Etapa IV:* El cáncer se ha diseminado a otras partes del cuerpo.

La causa precisa, como ocurre en la mayoría de los cánceres, es desconocida. Sin embargo, se cree que los siguientes factores incrementan el riesgo ⁸:

- ✓ Tener una vida sexual activa precoz (antes de los 18 años)
- ✓ Tener múltiples compañeros sexuales
- ✓ Haber tenido herpes o verrugas genitales
- ✓ Fumar durante mucho tiempo
- ✓ Tener displasia cervical (anomalías en el tamaño, forma y número de células cervicales).

Como se mencionó anteriormente, aún no puede establecerse una relación directa entre la exposición a ciertos productos químicos y el desarrollo de cualquier tipo de cáncer, sin embargo, tampoco es posible descartar del todo esta posibilidad.

Riesgos de cáncer por exposición a plaguicidas

La inducción de cáncer provocado por la exposición crónica a sustancias químicas fue originalmente descrita por Percival Pott en 1775, quien descubrió la aparición de cáncer de escroto en algunas personas que se dedicaban a limpiar chimeneas. El médico inglés estableció la inducción de tumores por exposición a agentes cancerígenos (hollín), propuso la prevención por medio de la reducción a la exposición y comprobó la sensibilidad individual, ya que no todos los deshollinadores

desarrollaban cáncer de escroto. A principios del siglo XX se hicieron experimentos con animales de laboratorio, los cuales demostraron que el alquitrán, que contiene grandes cantidades de hidrocarburos aromáticos policíclicos, genera tumores. Asimismo se demostró que otro grupo de compuestos, las aminas aromáticas, producen cáncer de vejiga. Otros compuestos con gran potencia carcinogénica fueron descubiertos durante los experimentos realizados para provocar cáncer experimentalmente, como ocurrió con las diferentes nitrosaminas ⁴.

Aunque los plaguicidas suelen ser selectivos para el organismo que combaten, también son nocivos (aunque en menor grado) para otras especies. En el hombre son tóxicos tanto por envenenamiento accidental agudo, como por exposiciones crónicas. Por ejemplo, en los trabajadores expuestos ocupacionalmente durante la producción o durante el trabajo en el campo, los riesgos son mayores debido a la manipulación inapropiada del producto y a la falta de medidas de protección. Sin embargo, en el mundo moderno todos los seres humanos estamos expuestos a la acción de plaguicidas, ya que existen residuos de éstos en los alimentos que a diario ingerimos.

La característica más importante de los carcinógenos químicos es que al llegar al tejido blanco reaccionan con receptores específicos y dejan una *huella* duradera en éstos, de manera que una sola dosis puede alterar a largo plazo algunas células. Las dosis sucesivas se suman a los efectos iniciales, provocando la multiplicación desordenada de las células y el desarrollo de un tumor.

En años recientes, la exposición a contaminantes ambientales está bajo sospecha como una causa potencial de cáncer de mama y del notable incremento de las tasas de incidencia (aparición anual de nuevos casos) de cáncer de mama en diversos países del mundo. En especial, los plaguicidas organoclorados, tales como el DDT, y los bifenilos policlorados (PCBs) son considerados de alto riesgo.

Un estudio recientemente realizado en un hospital de Bélgica estableció una probable relación entre la exposición a plaguicidas y el cáncer de seno. En esta investigación participaron 159 mujeres con cáncer de seno. Se les tomaron muestras

para medir los niveles en sangre de 2 pesticidas, diclorodifeniltricloroetano (DDT) y hexaclorobenceno (HCB). Luego los resultados fueron comparados con los de 250 pacientes que no padecían esa enfermedad. Los resultados demostraron que los niveles de los compuestos analizados fueron mayores en las mujeres con cáncer de seno que en aquellas sin la enfermedad. Este estudio mostró que existe una asociación importante entre la exposición a plaguicidas y el cáncer de seno, pero los resultados aun no son concluyentes acerca de que este riesgo por sí sólo baste para provocar la enfermedad ^{1,2}.

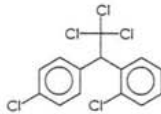
3.2 PLAGUICIDAS

El término *plaguicida* se usa para indicar cualquier sustancia o mezcla de sustancias usada para prevenir, destruir o controlar cualquier tipo de plaga capaz de atacar los cultivos y también para eliminar los insectos causantes de enfermedades. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte.

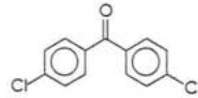
Los plaguicidas se clasifican en una gran variedad de formas, entre las principales se encuentra la clasificación según los organismos que controlan: **insecticidas** (insectos), **herbicidas** (malezas o plantas nocivas), **fungicidas** (hongos), **nematicidas** (nemátodos), **acaricidas** (ácaros), **rodenticidas** (roedores), **moluscocidas** (caracoles) ^{9,10}.

Otra clasificación es de acuerdo a su estructura química, entre los grupos más importantes se encuentran los organoclorados, organofosforados, triazinas, herbicidas ácidos, sustituidos de urea y carbamatos. Algunos ejemplos y características de cada grupo se describen a continuación ^{9,10}:

- **Organoclorados:** Durante un tiempo fueron utilizados extensamente como insecticidas, esterilizantes y herbicidas. Son extremadamente tóxicos para organismos vivos. Actualmente el uso de la mayoría de los plaguicidas organoclorados está prohibido o limitado.

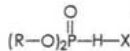


·DDT (diclorodifeniltricloroetano)

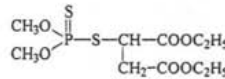


DCBP (diclorobenzofenona)

- **Organofosforados:** Se desarrollaron principalmente para reemplazar a los organoclorados debido a la alta toxicidad y persistencia de estos últimos. Son ésteres, amidas o tioles derivados de los ácidos fosfórico o fosfónico. Según el grupo funcional pueden dividirse en fosfatos, fosfonatos, fosforotioatos, fosforoditionatos, fosforotiolatos y fosforoamidatos.

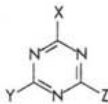


Estructura general del grupo fosfonato.

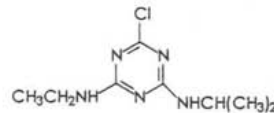


Malatión

- **Triazinas:** Son de los herbicidas más empleados en agricultura y se aplican tanto en cultivos en crecimiento como directamente en el suelo, debido a esto son de los más intensamente monitoreados.



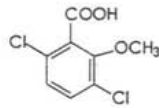
Estructura general



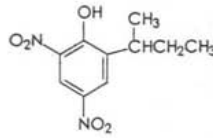
Atrazina

- **Herbicidas ácidos:** Son ampliamente utilizados para el control de plantas nocivas y otra vegetación. Son relativamente baratos y muy potentes aun a

bajas concentraciones. Son derivados de grupos funcionales ácidos incluyendo fenol, ácido benzoico, ácidos acético, propanoico y butanoico.

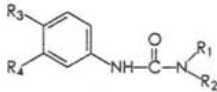


Dicamba

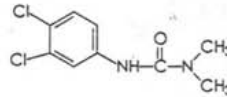


Dinoserb

- **Sustituidos de la urea:** Se usan principalmente para el control de plantas nocivas y sus residuos pueden permanecer por varios meses después de su aplicación.



Estructura general de una fenilurea



Diurón

Otro grupo, es el de los *carbamatos*, el cual será descrito en detalle por ser el tema de esta investigación.

CARBAMATOS

Los carbamatos son sustancias orgánicas de síntesis conformadas por un átomo de nitrógeno unido a un grupo lábil, el ácido carbámico. Éste tiene un efecto neurotóxico que, en dosis elevadas conlleva a la muerte. Sus características principales son su alta toxicidad, su baja estabilidad química y su nula acumulación en los tejidos, característica que los posiciona en ventaja con respecto a los organoclorados de baja degradabilidad y gran acumulación.

Como ya se mencionó, los carbamatos corresponden en su mayor parte a derivados del ácido carbámico. Esta familia de plaguicidas está registrada para su uso en varios cultivos en Sudamérica, Europa y Estados Unidos. Debido a su amplio espectro de actividad biológica, los carbamatos pueden ser usados como

insecticidas, fungicidas, nematocidas y moluscocidas. Se sospecha que algunos pudieran ser carcinógenos o mutagénicos. Estos plaguicidas actúan principalmente como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa y se han reportado varios efectos adversos ¹¹.

En la función normal del sistema nervioso, la sustancia neurotransmisora acetilcolina es liberada de una célula nerviosa terminal, se difunde a través de la hendidura sináptica y transmite un impulso nervioso a un receptor colinérgico específico. Para finalizar la estimulación y restaurar la sensibilidad del receptor a un nuevo transmisor, la acetilcolina en el receptor debe eliminarse continuamente; esta función se cumple vía la acetilcolinesterasa, la cual hidroliza la acetilcolina a colina y ácido acético. De esta manera, la colina puede regresar a la membrana presináptica y ser reutilizada en la síntesis de la acetilcolina. Por inhibición de la acetilcolinesterasa, los carbamatos favorecen la acumulación de la acetilcolina en las uniones colinérgicas¹².

La alta concentración de acetilcolina en las uniones nerviosas colinérgicas del músculo liso y células glandulares causa contracciones musculares y secreción respectivamente. En las uniones musculares esqueléticas, el exceso de acetilcolina puede producir excitación (espasmos musculares). Las concentraciones elevadas de acetilcolina en el cerebro pueden causar alteraciones sensoriales, falta de coordinación y depresión en la función motora (aunque raras veces causan convulsiones).

Los carbamatos N-metilo ingresan a los mamíferos por inhalación, ingestión y algunos penetran por la piel, aunque esta última tiende a ser la ruta menos tóxica. Los carbamatos N-metilo son hidrolizados enzimáticamente por el hígado y los productos de degradación se excretan por los riñones y el hígado. A pesar de que no penetran eficazmente al sistema nervioso central, la depresión respiratoria, combinada con edema pulmonar es la causa común de muerte en el envenenamiento con estos compuestos ¹³.

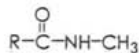
Estudios de laboratorio mostraron que los primeros síntomas de envenenamiento suelen ocurrir entre los primeros 15 – 30 minutos después de la administración oral y pueden estar acompañados de salivación excesiva, respiración irregular, lagrimación, náuseas, vómito y en algunas ocasiones taquicardia. En la mayoría de los casos, estos síntomas son seguidos por violentos movimientos intestinales asociados con debilidad muscular y espasmos que pueden evolucionar hasta convertirse en convulsiones ¹².

En general, los carbamatos presentan baja persistencia en el ambiente, son relativamente solubles en agua, moderadamente solubles en benceno y tolueno y solubles en metanol y acetona. No se acumulan en el organismo; su biotransformación se realiza a través de tres mecanismos: hidrólisis, oxidación y conjugación. La eliminación se realiza principalmente por vía urinaria ¹⁴.

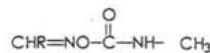
Desde su introducción en los 50's, los carbamatos han sido ampliamente usados en una gran variedad de cultivos y han cobrado gran importancia en el campo de control de plagas ¹⁵. Por estas razones y debido a la persistencia de los pesticidas organoclorados y la toxicidad de los organofosforados, los carbamatos ofrecen una alternativa viable ya que, como se mencionó, son menos persistentes en el medio ambiente y provocan efectos menos tóxicos en los mamíferos.

Los carbamatos presentan actividad como insecticida, fungicida o herbicida y ésta se relaciona principalmente con su estructura molecular ⁹:

- ❖ *Insecticidas*: Presentan una parte N – sustituida y generalmente una función éster aromática o una función oxima.

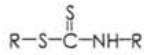


Aril N – metilcarbamato

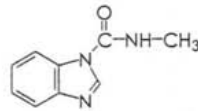


Oxima N – metilcarbamato

- ❖ **Fungicidas:** Pueden tener cualquiera de los grupos benzimidazolil éster, pirimidil éster o (bis)ditiocarbamato.

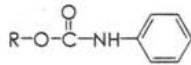


Ditiocarbamato

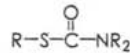


Benzimidazol carbamato

- ❖ **Herbicidas:** Son principalmente N – alquil o N – ariltiocarbamatos



N – feniltiocarbamato



N – alquiltiocarbamato

Los productos de degradación son generalmente derivados oxidados o alcoholes formados por la saponificación del grupo carbámico.

Anteriormente se pensaba que debido a que los carbamatos eran lábiles y no persistían en el ambiente, no era necesario su análisis. Esta falta de interés puede ser también resultado de que en esos monitoreos no eran detectados, debido principalmente a la falta de sensibilidad de los métodos analíticos empleados. Sin embargo, la situación ha cambiado ya que se han desarrollado métodos de análisis suficientemente sensibles para llegar a un nivel de detección de ppb (ng/mL) y por tanto la presencia de estos pesticidas, principalmente en corrientes de agua, puede ser considerada como asunto de salud pública ¹⁶.

Los plaguicidas del tipo carbamato son térmicamente lábiles y tienden a descomponerse durante un análisis por cromatografía de gases. Los N-metilcarbamato son particularmente sensibles al calor y se descomponen en fenol y metilisocianato, según la siguiente reacción ¹⁷:



Degradación de los N-metilcarbamatos en fenol y metilisocianato

Esta tendencia a la descomposición térmica dificulta el análisis de varios carbamatos directamente por CG. Por esta razón, se han desarrollado numerosos métodos que aplican la cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica, siendo de las más empleadas la CLAR con detección UV.

Otro punto importante es que, a pesar de la baja persistencia de los carbamatos, la formación de productos de degradación en plantas, suelo y agua es también importante desde el punto de vista ambiental, debido a que en algunos casos la toxicidad y polaridad de éstos puede ser mayor que la del compuesto principal. Sin embargo, la información sobre metodologías analíticas para estos derivados a muy bajos niveles de concentración es escasa en comparación con la existente para el compuesto del que derivan ¹⁸.

Los compuestos sobre los que se centra esta investigación son el carbofurano y algunos de sus productos de degradación: 7-fenolcarbofurano, 3-ceto-7-fenolcarbofurano, 3-cetocarbofurano y 3-hidroxicarbofurano.

Carbofurano

Características generales y propiedades fisicoquímicas

El nombre químico del carbofurano es *2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil N-metilcarbamato*. También se conoce con los siguientes nombres comerciales: Brifur, Crisfuran, Cristofuran, Curaterr (Bayer), Furadan (FMC Agroquímica de México), Pillarfuran y Yaltox. Presenta la siguiente estructura química:



Carbofurano

Fue desarrollado en los 60's e introducido en 1967 como insecticida y nematocida para su uso en una gran variedad de cultivos tales como maíz, arroz, alfalfa, algodón, trigo, avena, cacahuate, caña de azúcar, calabaza, melón, pepino, sandía, chile, fresa, sorgo, tabaco, soya, papa, plátano y vid.

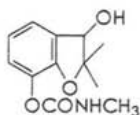
El carbofurano tiene la fórmula empírica $C_{12}H_{13}NO_3$ y su peso molecular es de 221.26 g/mol. Es un sólido blanco con un punto de fusión de 153 – 154 °C, su presión de vapor (mm Hg) es de 2×10^{-5} a 33 °C y 1.1×10^{-4} a 50 °C. Es menos estable en medio alcalino que en medio ácido y se degrada a temperaturas superiores a 130 °C ¹².

El carbofurano es un N-metilcarbamato empleado como insecticida, nematocida y acaricida. Su toxicidad es debida, principalmente, a que actúa como un inhibidor de la acetilcolinesterasa, cuyos efectos ya fueron mencionados. Por otro lado, aunque su biotransformación es muy lenta, no provoca efectos acumulativos en las personas expuestas, sin embargo, hasta el momento, no hay suficiente evidencia para descartar su carcinogenicidad o mutagenicidad.

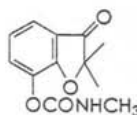
Metabolismo

Los estudios que se han realizado hasta la fecha acerca del metabolismo de este compuesto indican que puede degradarse por dos caminos ¹⁹:

- Vía oxidación del carbono 3 para producir los derivados 3-hidroxi y 3-ceto:

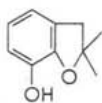


3-hidroxicarbofurano

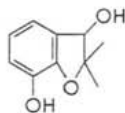


3-cetocarbofurano

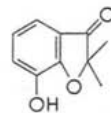
- Por ruptura hidrolítica del éster carbamato para dar los metabolitos 7-hidroxi.



7-fenolcarbofurano



3-hidroxi-7-fenolcarbofurano



3-ceto-7-fenolcarbofurano

La formación de estos productos pudo comprobarse a partir de estudios realizados en animales de distintas especies, entre ellos ratas tratadas oralmente con dosis sencillas. Los resultados indican que los metabolitos mayoritarios en orina fueron 3-hidroxicarbofurano (14%), 3-cetocarbofurano (48%), 7-fenol-carbofurano (20%) y 3-hidroxi-7-fenolcarbofurano (1.4%), solo por mencionar algún ejemplo, ya que los productos de degradación que se obtengan dependerán de las condiciones de reacción que se presenten ¹⁹. Otros estudios revelan que el metabolito mayoritario encontrado en la orina de humanos sometidos a administración oral o dérmica fue el 7-fenolcarbofurano ¹².

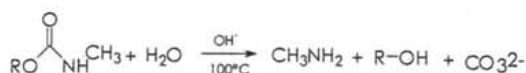
Se han realizado varios estudios sobre la degradación del carbofurano principalmente en agua, suelo y plantas.

El principal camino de degradación del carbofurano en suelo (aerobio) fue por hidroxilación y oxidación en el carbono 3, resultando 3-hidroxicarbofurano y 3-cetocarbofurano. El tiempo de vida media del carbofurano fue calculado en 320 días en condiciones ácidas y 150 días en condiciones alcalinas. En condiciones anaerobias en sedimentos de agua, los estudios revelan que más del 50% del carbofurano fue convertido a 7-fenol, el cual también fue el producto mayoritario de la degradación anaerobia en agua, donde el tiempo de vida media fue de 120 días ¹⁹.

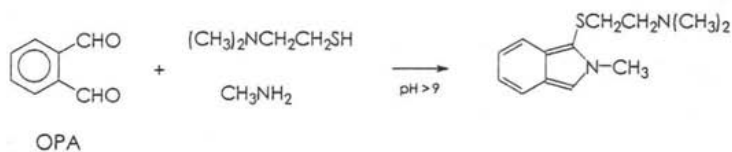
Métodos analíticos para determinación de carbofurano

En la actualidad existe una gran cantidad y variedad de métodos reportados para la determinación de carbofurano y sus metabolitos en matrices ambientales, principalmente agua ²⁰⁻²⁶; éstos incluyen determinaciones tanto para residuos individuales así como multiresiduos. También pueden encontrarse trabajos que reportan su determinación en matrices de origen biológico como frutas, vegetales y aún en fluidos biológicos como la orina, estos se describen más adelante. Sin embargo, los estudios hasta ahora realizados en muestras de tejido humano son muy escasos.

Entre los métodos oficiales para determinación de carbamatos en muestras de agua se encuentra el EPA 531.1^{14, 16}. Este método emplea la CLAR y un detector de fluorescencia de alta sensibilidad y consiste en la separación de los carbamatos mediante una fase reversa seguida por una reacción de derivatización postcolumna usando *orto*-ftaldialdehído (OPA) para su detección. Esta reacción se lleva a cabo en dos pasos. Primero, se produce la hidrólisis de los carbamatos por medio de una base fuerte (NaOH) a 100 °C; en esta primera etapa se producen un alcohol, carbonato y metilamina:



En el segundo paso, a pH básico, la metilamina reacciona con el OPA y el nucleófilo tioflor (2-mercaptoetanol) para formar el derivado altamente fluorescente 1-metil-2-alkilthioindol. El derivado fluorescente puede ser detectado a concentraciones bajas si se utiliza una longitud de onda de excitación de 330 nm y de 450 nm para la emisión:



Este método ofrece las siguientes ventajas:

- Alta sensibilidad: límites de detección de 0.1 – 0.5 ng (0.2 – 1 ng/mL en agua)
- Selectividad (especificidad): solo se detectan los N-metilcarbamatos y N-metilcarbamoiloximo que reaccionan con OPA bajo las condiciones de reacción especificadas.
- Preparación mínima de la muestra: solo se requiere filtrar la muestra.
- Posibilidad de automatización completa del análisis con la adición de un automuestreador.

Este método se ha empleado para la determinación simultánea de carbaril, carbofurano, metiocarb y algunos de sus metabolitos en pepinos y fresas²⁷, con el objetivo de realizar un análisis comparativo entre los resultados arrojados por CLAR y los obtenidos por una técnica inmunológica (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay). Las etapas incluyeron el tratamiento de la muestra, la determinación por ELISA y la determinación por CLAR. La preparación de muestra consistió de una extracción líquido-líquido en varios pasos empleando diversos disolventes y por último una etapa de limpieza con cartuchos para EFS. Algunos extractos se diluyeron en una solución acuosa ácida, no pasaron a través de los cartuchos y la determinación sólo se realizó por ELISA. En tanto que los extractos a los que se les aplicó la EFS como etapa de limpieza se analizaron por ambas técnicas para realizar la comparación.

La separación analítica de los solutos se realizó en una columna analítica de fase reversa (C₁₈, 4µm, 150 x 3.9 mm D.I.), a una temperatura de 30 °C, flujo 1.5 ml/min y un volumen de inyección de 400 µL. Se empleó un gradiente ternario H₂O/MeOH/ACN. Una vez separados, los analitos pasaron a la etapa de derivatización, tal y como se describió anteriormente, para posteriormente ser detectados como derivados fluorescentes utilizando longitudes de onda de 339 nm y 445 nm para excitación y emisión respectivamente.

De los resultados obtenidos se concluye que hay una buena correlación entre ambas técnicas; los recobros van del 60 al 90% por ELISA y del 50 al 90% por CLAR, con coeficientes de variación del 2.1 al 25.4%. Otro dato importante es que en las muestras en las que no se llevó a cabo la EFS y fueron analizadas por ELISA, también se obtuvieron recobros y coeficientes de variación similares a los antes mencionados, con la ventaja de que se evita el paso de los analitos por el cartucho y por consiguiente se reduce el tiempo de análisis. En este trabajo son evidentes las ventajas del desarrollo de anticuerpos específicos y su aplicación para la determinación de un compuesto en particular o una familia de compuestos.

Cabe mencionar que el análisis por ELISA se había realizado anteriormente para determinar carbofurano en jugos de fruta²⁸, la muestra fue utilizada sin pretratamiento y los recobros fueron del 107 al 115% con coeficientes de variación debajo del 15%. Sin embargo, el método no resultó lo suficientemente sensible para detectar niveles del orden de 0.1 ng/mL, establecidos por la legislación Europea.

Otro método reportado para determinación de multiresiduos (aldicarb, carbaril, carbofurano, metomil y propoxur)²⁹ en frutas y vegetales tuvo por objetivo comparar diferentes procedimientos de limpieza empleando EFS fuera de línea. Se utilizaron columnas de vidrio empacadas con diferentes adsorbentes: sílica gel, alúmina y florisil, y cartuchos: C₈, C₁₈, CN, sílica y NH₂. La determinación se realizó por CLAR en una columna C₁₈ (125 x 4 mm D.I.), isocrático ACN/H₂O (30:70), flujo 1 ml/min y detección UV a 195 nm. Los autores concluyen que la mayoría de los adsorbentes ofrece buenos resultados en cuanto al recobro, sin embargo los cartuchos ofrecen ventajas adicionales como la reducción en los tiempos de análisis y la facilidad en su manejo.

Entre los métodos reportados para análisis de fluidos biológicos (orina), hay dos que involucran la determinación de carbofurano, aldicarb y algunos de sus metabolitos (3-hidroxicarbofurano en el caso del carbofurano)^{18, 30}, ambos emplean EFS fuera de línea.

Uno de ellos, realiza dos etapas de EFS empleando primero un cartucho con carbón grafitizado; posteriormente, el eluato obtenido del primer cartucho se pasa a través de un segundo cartucho empacado con sílice modificada NH_2 . El segundo eluato fue transferido a un sistema CL/UV para su separación y detección. La separación se realizó en una columna C_{18} (100 x 3mm D.I.) mediante un gradiente ternario $\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}/\text{MeOH}$ a un flujo de 1 ml/min y detección UV a 210 nm. Posteriormente, las fracciones colectadas, pasaron a un sistema LC-ES/MS (acoplamiento cromatografía de líquidos/espectrometría de masas con electrospray) para la confirmación de los analitos. De este trabajo se concluye que la EFS es una excelente alternativa para aislar a los analitos de sus impurezas y, obviamente, la LC-ES/MS es un método más sensible y reproducible, además que presenta menos interferencias que la CL-UV. Se utilizaron muestras reales provenientes de trabajadores expuestos a los pesticidas sin que se detectaran los pesticidas estudiados en ningún caso.

En el segundo trabajo se combinaron un sistema de EFS fuera de línea y un sistema en línea. La muestra se sometió a una limpieza preliminar en un cartucho empacado con carbón grafitizado y posteriormente el extracto diluido fue introducido al sistema en línea. El objetivo de esta segunda etapa, además de proporcionar una limpieza adicional, fue el de poder introducir todo el extracto de la muestra en el sistema de análisis para alcanzar una mayor sensibilidad. El sistema en línea consistió de una precolumna (30 x 4.6 mm D.I.) y una columna analítica (100 x 3 mm D.I.) empacadas con fase reversa C_{18} de 5 μm , acopladas mediante una válvula de conmutación. Para la elución de los solutos se utilizó un gradiente binario $\text{ACN}/\text{H}_2\text{O}$ y detección UV a 210 nm. El método se aplicó a muestras reales provenientes de personas expuestas sin que se detectara ninguno de los pesticidas. La conclusión es que se desarrolló un método altamente sensible y prácticamente libre de impureza gracias a que hubo una etapa de EFS previa.

En los métodos descritos anteriormente, la mayoría emplea la EFS fuera de línea, es decir, utilizando cartuchos empacados con el adsorbente adecuado. Sin embargo también se han desarrollado metodologías que utilizan EFS en línea^{31,32}, es decir, una

precolumna empacada acoplada a la columna analítica. Ambos modos se describen más adelante, sin embargo, puede adelantarse que una de las grandes ventajas que presenta la EFS en línea, es que la manipulación de la muestra se minimiza y el acoplamiento precolumna – columna analítica permite la transferencia de toda la muestra o extracto y por consiguiente la cuantificación total de los analitos presentes en ella.

Por otro lado, aunque las ventajas del método EPA 531.1 son obvias y su aplicación sería de gran utilidad en este trabajo, presenta la gran desventaja de que los derivados fenólicos del carbofurano no serían detectados, debido precisamente a la falta del grupo carbámico. Por ello, se decidió que para la determinación del carbofurano y sus metabolitos en tejidos biológicos era necesario incluir una etapa de pretratamiento de muestra basada en la EFS para tratar de eliminar al máximo las impurezas de matriz; al mismo tiempo, el sistema EFS debía estar acoplado en línea al sistema cromatográfico para cuantificar en su totalidad los analitos presentes.

A continuación se describen en detalle las características de la técnica de EFS.

3.3 EXTRACCION EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica de preparación de muestra basada en los mecanismos de separación de la cromatografía de líquidos³³⁻³⁹.

La EFS consiste en la transferencia del analito de interés de una fase líquida a los sitios activos de una fase sólida (adsorbente), la cual puede estar empacada en columnas (precolumnas) o cartuchos, o bien distribuida en la superficie de discos de extracción. La retención se logra por interacciones fuertes pero reversibles entre el analito y la superficie del adsorbente. Las interacciones típicas son hidrofóbicas, polares (puente de hidrógeno y fuerzas dipolo – dipolo) o interacciones de intercambio iónico.

La EFS puede emplearse como un método de limpieza de la muestra, en el cual el analito queda retenido y las impurezas eliminadas. También se emplea como una etapa de preconcentración de muestra (enriquecimiento de trazas); si es el caso, entonces se requerirá el tratamiento de un mayor volumen de muestra que permita la retención de una mayor cantidad de analito.

Etapas de la EFS

La EFS ha sido ampliamente empleada para el tratamiento de muestras acuosas utilizando un adsorbente apolar. En este caso, la EFS se realiza básicamente en cuatro etapas que se describen a continuación (caso del sistema fuera de línea):

1. Activación del adsorbente con 3 - 5 ml de metanol o acetonitrilo y acondicionamiento con el mismo volumen de agua.
2. Aplicación de la muestra acuosa, quedando retenidos los analitos de interés mientras el agua se percola a través de la precolumna o cartucho.
3. Una etapa de limpieza en la cual se remueven algunas impurezas que pudieran haber quedado atrapadas con los analitos. Por ejemplo, se aplican algunos ml de una solución acuosa a pH diferente del de la muestra o bien agua con una cantidad pequeña de modificador orgánico.
4. En la última etapa, el adsorbente es secado por varios minutos a vacío y posteriormente los analitos se eluyen con un volumen pequeño de disolvente orgánico.

Los pasos anteriores se muestran en la figura 3.1:

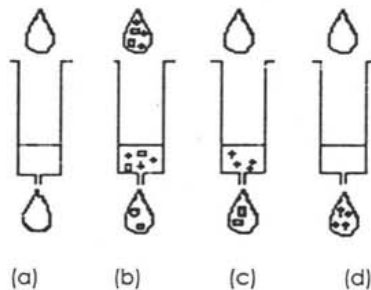


Fig. 3.1 Secuencia de las etapas típicas de la EFS: (a) preparación del adsorbente, (b) aplicación de la muestra, (c) limpieza y (d) elución de los analitos concentrados.

Para que estos pasos se lleven a cabo exitosamente debe considerarse la optimización de los siguientes parámetros:

- ❖ Volumen de muestra (determinado por el volumen de fuga del analito)
- ❖ Adsorbente
- ❖ Disolventes (lavado y elución)

En general, en las etapas de extracción y el lavado, el analito debe ser atraído más fuertemente por el adsorbente (retención) y durante la elución, el analito debe tener mayor afinidad por el disolvente.

Volumen de fuga

En muestras ambientales, la concentración del analito es generalmente baja por lo que el tipo y cantidad de adsorbente que se requiere para aislar el suficiente analito para su adecuada determinación es indicado por el volumen de fuga de dicho compuesto.

La fuga se define como el punto en que una cantidad detectable de analito empieza a eluir de la precolumna o cartucho durante la etapa de aplicación de muestra. Usualmente se considera como el punto correspondiente a 1% de la altura total del frente de migración del soluto. El volumen de muestra percolada asociado a dicho punto se denomina volumen de fuga.

En general hay principalmente dos causas que originan la fuga prematura en una cromatografía frontal. Primero, la capacidad de retención del adsorbente es sobrepasada debido a una alta concentración del analito o bien, de los componentes de la matriz adsorbidos. En segundo lugar, el adsorbente puede no tener la adecuada retención para los analitos.

El volumen de fuga se establece a partir de una curva de análisis frontal como la que se representa en la figura 3.2:

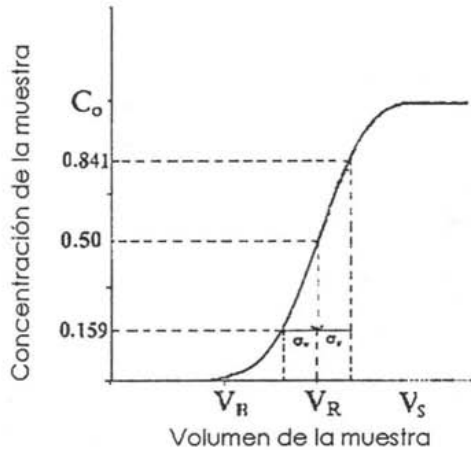


Fig. 3.2 Curva de Análisis Frontal

Donde V_B es el volumen de fuga, V_R el volumen cromatográfico de elución, V_S el volumen de muestra que corresponde a la máxima cantidad de analito aislada (volumen máximo) y C_0 es la concentración del analito en la muestra.

Los recobros en EFS dependen del volumen percolado (V_P) y del valor del volumen de fuga (V_B), el cual está relacionado a su vez con el volumen de retención cromatográfico en agua o el disolvente que sea aplicado (V_R), la cinética del proceso adsorción – desorción y la naturaleza y cantidad del adsorbente.

Cuando los recobros son muy bajos, la única opción es incrementar V_B o V_R lo cual puede lograrse incrementando la cantidad de adsorbente o cambiando a otro adsorbente que mejore la retención de los solutos de interés.

Adsorbentes ³⁴

La selección del adsorbente está determinada principalmente por las características fisicoquímicas del analito, particularmente por su polaridad. Por ello, para llevar a cabo una EFS, es necesario conocer los distintos adsorbentes que hay actualmente a disposición.

Sílices modificadas

Los adsorbentes de sílice enlazada más empleados para el tratamiento de muestras acuosas son octil (C₈), octadecil (C₁₈), etil (C₂), butil (C₄) y cianopropil (CN). Con este tipo de muestras, todos se comportan como adsorbentes de fase reversa. La interacción entre la cadena enlazada y la parte hidrocarbonada de la molécula del analito es debida principalmente a efectos hidrofóbicos a los que se suman fuerzas atractivas débiles de dispersión (Fuerzas de London). La sílice enlazada más ampliamente utilizada en análisis ambiental es la C₁₈ debido a que su capacidad de retención de compuestos polares es más alta que otras sílices.

Sin embargo, estos adsorbentes presentan algunas limitaciones químicas como un reducido intervalo de estabilidad respecto al pH, debido a la hidrólisis de las cadenas enlazadas en medio muy ácido (pH < 1) y a la solubilidad de la sílice en medios básicos. Además, su selectividad es relativamente pobre.

Carbón grafitizado

El carbón grafitizado se obtiene cuando se calienta el carbón negro a 2700 - 3000°C en una atmósfera inerte. Es esencialmente un adsorbente no específico y no poroso con un área superficial de alrededor de 100 m²/g. A causa de la presencia de cargas químicas positivas en su superficie, puede ser considerado un adsorbente de fase reversa o bien un intercambiador aniónico.

Se ha demostrado que la mayoría de los compuestos orgánicos se retienen más fuertemente en un carbón grafitizado que en una C_{18} , sin embargo, algunas veces la retención llega a ser tan fuerte que es irreversible. Otra desventaja es que su estabilidad mecánica es baja y en algunos estudios se ha comprobado que los volúmenes de fuga son más bajos para el carbón grafitizado que para los adsorbentes poliméricos.

Adsorbentes poliméricos

Los adsorbentes poliméricos más ampliamente utilizados son los copolímeros de estireno-divinilbenceno (PS-DVB), los cuales presentan una superficie altamente hidrofóbica. Las resinas PS-DVB superan algunas limitaciones de las sílices enlazadas, ya que son estables en un amplio intervalo de pH, lo que proporciona una mayor flexibilidad para el desarrollo de los métodos analíticos.

Las resinas PS-DVB tienen un mayor poder de retención que las sílices enlazadas particularmente para compuestos polares, ya que su superficie hidrofóbica contiene un gran número de sitios aromáticos activos los cuales permiten interacciones del tipo $\pi - \pi$ con analitos insaturados.

Las resinas XAD (Rohm and Hass) han sido extensamente empleadas para extraer una gran variedad de contaminantes orgánicos de agua. XAD-1, XAD-2 y XAD-4 son resinas de PS-DVB que presentan un carácter altamente hidrofóbico. XAD-7 y XAD-8 son resinas de ésteres acrílicos con una alta afinidad por solutos polares. Las XAD's basadas en PS-DVB presentan algunas desventajas que incluyen la falta de selectividad, bajos volúmenes de fuga para compuestos muy polares y baja velocidad de transferencia de masa.

Otros copolímero de PS-DVB ampliamente utilizado es la resina PLRP-S (Polymer Laboratorios). Ha sido empleada en la extracción de contaminantes orgánicos tales como compuestos fenólicos y pesticidas de aguas naturales. Se ha demostrado que es más eficiente que una C_{18} para la preconcentración de estos analitos. La PLRP-S

presenta las mismas desventaja que las XAD's en lo que se refiere a falta de selectividad y bajos volúmenes de fuga para compuestos muy polares. Sin embargo, dado que este adsorbente se comercializa en diámetros de partícula más pequeños y regulares, es posible preparar columnas de extracción mucho más eficientes donde la muestra puede ser percolada a altas velocidades de flujo.

En años recientes se han venido desarrollando resinas modificadas que se han empleado exitosamente en la EFS de compuestos polares de agua. La introducción de diferentes grupos funcionales polares tales como acetil, hidroximetil, benzoil y o-carboxibenzoil dan como resultado una excelente hidrofiliidad y proporcionan recobros más altos que sus análogas no modificadas. Este comportamiento se atribuye a un incremento en la polaridad de la superficie lo que permite a la muestra acuosa establecer un mejor contacto con la superficie de la resina.

Inmunoadsorbentes

El principal problema encontrado en EFS es la falta de adsorbentes selectivos, ya que en varios casos, como lo es el tratamiento de muestras biológicas, las interferencias de matriz son difíciles de eliminar. Lo anterior conduce a que la etapa de preparación de muestra se vuelva extremadamente laboriosa para lograr la detección de los analitos de interés.

Desde finales de los 90's se han desarrollado nuevos adsorbentes que involucran interacciones reversibles y selectivas antígeno-anticuerpo. Estos materiales, llamados inmunoadsorbentes (IAs), son altamente específicos y, en principio, solo retienen a un compuesto o a un grupo de compuestos estructuralmente relacionados. El uso de los IAs da como resultado que la extracción, enriquecimiento de trazas y limpieza se complete en una etapa, ya que se obtienen extractos libres de sustancias interferentes.

Los grandes progresos de la última década en el área de inmunología han hecho teóricamente posible la producción de anticuerpos prácticamente contra cualquier

sustancia. Esto ha permitido ampliar el campo de aplicación de la Cromatografía de Bioafinidad hacia diversas áreas y en particular al área ambiental.

Los inmunoabsorbentes se obtienen por inmovilización física o química de un anticuerpo en un soporte apropiado. El soporte ideal para un adsorbente de inmunoespecificidad es rígido y poroso, de tal forma que las velocidades de flujo de la muestra puedan ser altas, además debe ser hidrofílico para prevenir interacciones no específicas con los analitos y la matriz de la muestra. En el caso de los IAs preparados por anclaje químico del anticuerpo, el soporte debe proveer grupos funcionales adecuados para el acoplamiento de la biomolécula.

Las interacciones antígeno-anticuerpo involucran fuerzas de atracción iónica, puente de hidrógeno, atracción hidrofóbica y Van der Waals. Adicionalmente, puesto que la forma de los sitios receptores del anticuerpo es complementaria a la de la molécula de antígeno, los efectos estéricos son muy importantes y contribuyen a la fuerza total y a la selectividad de la interacción.

Así, la formación del complejo antígeno – anticuerpo también puede ser afectada por la composición química de la muestra (particularmente pH y fuerza iónica) ya que ésta puede inducir cambios en la configuración tridimensional de la biomolécula.

Actualmente hay muy pocos inmunoabsorbentes disponibles comercialmente, así que el número de compuestos que pueden ser analizados es limitado. Más aún, la preparación de los anticuerpos tarda varios meses y no siempre es exitosa, lo que ocasiona que el costo de una EFS sea alto si se compara con los sistemas convencionales.

Los pasos que sigue una EFS en la que se emplean inmunoabsorbentes se ilustran en la figura 3.3.

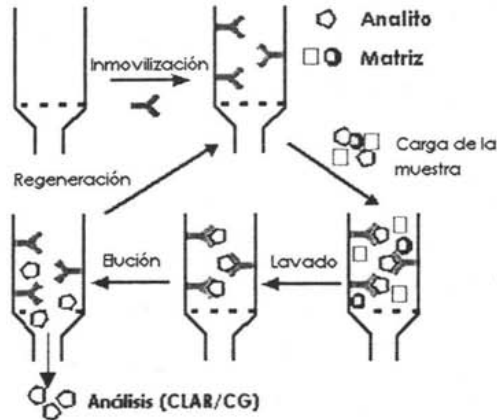


Fig 3.3 Esquema que muestra las etapas de la EFS empleando inmunoabsorbentes

Polímeros impresos molecularmente

Una tecnología emergente denominada impresión molecular, permite la preparación de polímeros sintéticos altamente estables que poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo. Los sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímero son complementarios al analito en la forma y posición de los grupos funcionales. Los polímeros impresos molecularmente (PIMs) se sintetizan haciendo polimerizar un monómero funcional y un entrecruzador en presencia de una molécula plantilla. Después de remover esta molécula, el polímero puede ser usado como un medio selectivo enlazante para el analito (plantilla) o compuestos relacionados estructuralmente. El mecanismo por el cual estos polímeros enlazan específicamente a la plantilla se atribuye a la disposición de grupos funcionales del monómero en un arreglo específico dentro del polímero, que corresponde espacialmente a los grupos funcionales de la plantilla, y a la presencia de cavidades *ad hoc* para esta molécula.

Los PIMs se comparan favorablemente a los inmunoabsorbentes, principalmente con respecto a su facilidad, costo, tiempo y reproducibilidad de preparación, capacidad de carga de muestra y duración del material. Sin embargo, para ampliar

su uso, el número y variedad de compuestos imprimibles necesita extenderse y deben resolverse los problemas relacionados con la heterogeneidad de los sitios y la muy baja velocidad de transferencia de masa en estos materiales. La figura 3.4 muestra el proceso de impresión molecular.

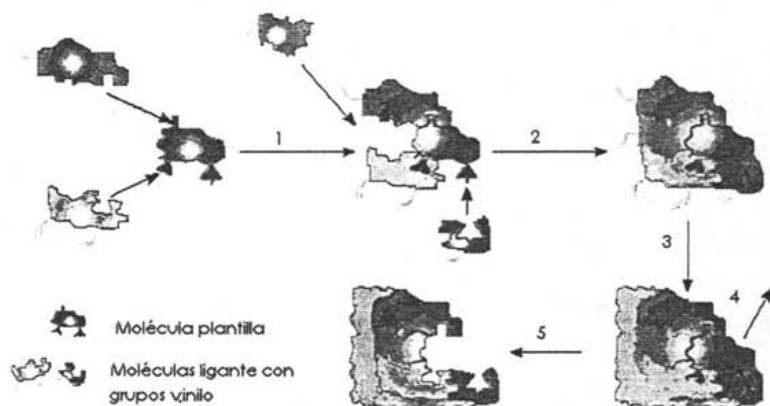


Fig. 3.4 Representación esquemática del proceso de impresión molecular: (1), (2) ensamble de las moléculas plantilla y ligante, (3) Incorporación del complejo plantilla-ligante a la matriz del polímero, (4) remoción de la molécula plantilla, (5) formación de la cavidad

Selección de los disolventes

Durante las etapas de lavado y elución de los analitos, la selección del disolvente juega un papel muy importante, ya que durante la etapa de lavado no debe haber pérdida del o los solutos de interés y durante la elución la remoción de éstos debe ser completa.

La etapa de lavado tiene como finalidad eliminar las impurezas que llegan a retenerse junto con los analitos. Para este fin, suele emplearse agua o un buffer, sin embargo, de esta forma solo se eliminan sales, compuestos muy polares y algunos compuestos ionizables. Por ello es recomendable emplear una pequeña cantidad controlada de disolvente orgánico en la solución. Así se lograrán eliminar algunas de las impurezas medianamente hidrofóbicas sin que haya pérdida del analito.

En la etapa de elución se colecta el analito en la menor cantidad de disolvente posible. Para este fin se emplea un disolvente fuerte, sin embargo, también puede emplearse un disolvente no tan fuerte pero que permita la elución del analito sin que se remuevan las impurezas que pudieran estar más fuertemente retenidas.

Modos de la EFS

La EFS puede realizarse en línea y fuera de línea.

➤ En línea

Este modo involucra la transferencia directa de los analitos adsorbidos en la precolumna a la columna analítica por medio de la fase móvil, ayudándose para ello de una válvula de conmutación. En este procedimiento se evita la manipulación de la muestra entre las etapas de preconcentración y análisis, así los riesgos de pérdida y contaminación disminuyen y la reproducibilidad y límites de detección son mejores. Además, existe la posibilidad de automatización. Un ejemplo de una EFS en línea se ilustra en la figura 3.5.

Posiciones de la válvula de conmutación

— Posición de carga. Se llevan a cabo el acondicionamiento, la aplicación de la muestra y el lavado

— Posición de inyección, aquí los analitos eluyen de la precolumna hacia la columna analítica

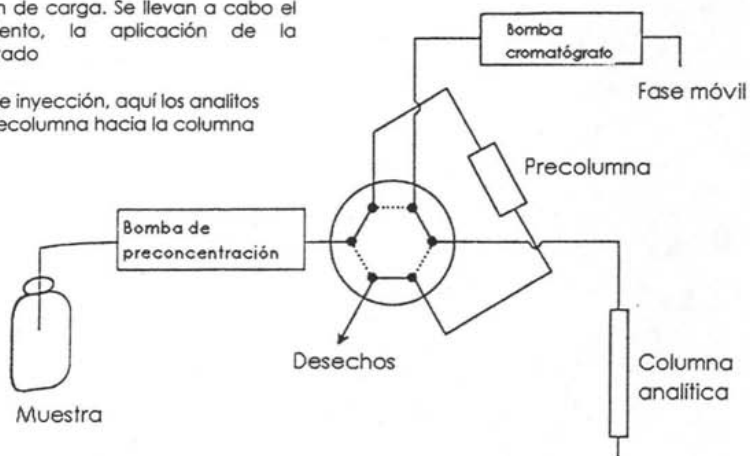


Fig. 3.5 Acoplamiento en línea para la EFS

➤ *Fuera de línea*

La preparación de la muestra se realiza completamente separada del sistema cromatográfico. La muestra se percola a través del adsorbente donde el analito queda retenido para su posterior elución y análisis. Los dispositivos más empleados para la EFS fuera de línea son el cartucho y los discos de extracción. La percolación de la muestra y los disolventes puede facilitarse mediante el uso del vacío.

La EFS fuera de línea puede emplearse para el análisis de muestras complejas ya que es más flexible y el extracto puede ser analizado por varias técnicas. Otra ventaja es el hecho de que durante un muestreo en campo, los cartuchos ofrecen una mayor facilidad de transporte y almacenamiento.

Los pasos que ilustran la EFS fuera de línea mediante el uso de cartuchos se observan en la figura 3.1.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos Lab Alliance con capacidad para gradiente de elución binario, equipado con dos bombas, mezclador, válvula de inyección con rizo (calibrado en el laboratorio) de 27 μL , detector UV de longitud de onda variable y sistema de adquisición de datos Data Ally 2000 versión 2.09.
- Potenciómetro (Corning, modelo 220) con electrodo combinado de vidrio calomel (Cole Palmer, modelo 60648).
- Baño de ultrasonido (Sonicor, modelo SC-100).
- Sistema de filtración de vidrio (Millipore, modelo OM 027) con membranas de Nylon 66 de 47 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro.
- Purificador y desionizador de agua Nanopure (Barnstead Thermolyne, modelo 04747).
- Balanza analítica (Ohaus)
- Sistema para empacado de columnas a alta presión (Haskel, modelo 29426)
- Para el montaje del sistema de extracción en fase sólida (EFS) acoplado en línea al cromatógrafo se empleó una bomba isocrática Eldex y una válvula de conmutación de seis puertos (Fig. 4.1).

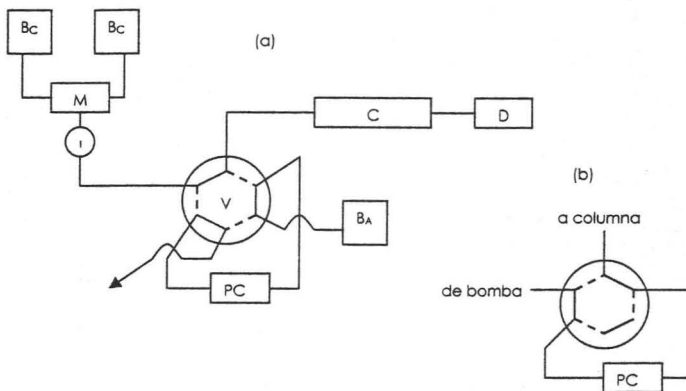


Fig. 4.1 Esquema del sistema en línea EFS-CL. Bc: bomba del cromatógrafo, M: mezclador, I: inyector, V: válvula de conmutación, BA: bomba auxiliar, PC: precolumna de EFS, C: columna analítica, D: detector UV. El esquema (a) muestra el sistema en la posición de carga de la precolumna. El esquema (b) muestra el camino que sigue la fase móvil en la posición inyección de la válvula de conmutación.

4.2 Columnas

Columnas analíticas (fase reversa):

Columna empacada en el laboratorio (150 x 4.6 mm DI) Spherisorb ODS-2 (Phase Separations), 5 μm

Columna comercial (150 x 4.6 mm DI) Thermo Hypersil – Keystone ODS, 5 μm

Precolumna:

Precolumna de EFS (20 x 2 mm DI) empacada con fase reversa polimérica de estireno divinilbenceno PLRP-S de 5 μm .

4.3 Materiales, disolventes y reactivos

Filtros desechables para muestras (Lida) con membrana de PTFE, 13 mm de diámetro, 0.45 μm de tamaño de poro.

Micropipetas de volumen variable con intervalo de 5 – 50 μL , 50 – 200 μL (Scorex, modelo DST-100C).

Jeringa de 100 μL para cromatógrafo de líquidos (Hamilton 80665).

Metanol grado HPLC (Omnisolv de EM)

Acetonitrilo grado HPLC (Chromanorm de Prolabo)

Agua grado reactivo tipo I

HCOOH concentrado (Baker)

HClO₄ 69% (Baker)

NH₄OH 28.4% (Baker)

NaOH, lentejas, 99% (Baker)

Carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 99% (Chem Service)

7-fenolcarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol) 99% (Chem Service)

3-hidroxicarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-hidroxi-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 98% (Chem Service)

3-cetocarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-oxo-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 99% (Chem Service)

3-ceto-7-fenolcarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-oxo-7-benzofurool) 99% (Chem Service)

Soluciones empleadas:

Soluciones 0.01M y 0.05M de HClO₄

Solución 0.01M de NH₄OH

Solución 0.1M de NaOH

Soluciones patrón de carbofurano y sus metabolitos en acetonitrilo (1000 mg/L).

Las soluciones estándar de trabajo se prepararon tomando alícuotas apropiadas de las soluciones patrón y diluyendo con metanol. Todas las soluciones de los pesticidas fueron guardadas en frascos de vidrio ámbar y almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 Muestras

Tejidos de epitelio cervical conservados en congelación (-20°C) hasta su análisis. Las muestras fueron facilitadas por el Hospital General de Subzona No. 4 del IMSS, Tecomán, Colima. Varias muestras de tejido blanco (provenientes de personas no expuestas a los pesticidas) fueron cortadas en trozos pequeños y mezclados homogéneamente. Se tomaron porciones equivalentes a la masa de una muestra típica (250 mg), algunas sin fortificar y otras fortificadas con carbofurano y su metabolito 7-fenol carbofurano, para desarrollar y optimizar a partir de ellas el método analítico. La fortificación de las muestras se realizó adicionando una cantidad conocida de solución estándar de cada analito. Las muestras así tratadas se dejaron en reposo por un periodo de 12 horas para asegurar que los compuestos se absorbieran en el tejido.

4.5 Calibración del rizo del inyector

Para evaluar correctamente la recuperación de los analitos eluidos de la precolumna, fue necesario calibrar el rizo del inyector. La calibración se realizó mediante una valoración ácido – base.

Con el inyector y la válvula de conmutación en la posición de carga (ver fig. 4.1) se desconectó la columna analítica y se colocó un vaso de precipitados de 100 mL a la salida del tubo. El rizo del inyector se llenó completamente con una solución de HClO_4 5.27N, la cual fue valorada previamente con una solución de NaOH 0.1N, cuya normalidad fue determinada a su vez con biftalato de potasio empleando fenolftaleína como indicador. Posteriormente, se rotó el inyector a la posición de inyección y, por medio de agua grado reactivo enviada por una de las bombas del cromatógrafo, se desalojó el ácido del rizo. El paso de agua a través del rizo se

mantuvo hasta recuperar aproximadamente 50 mL en el vaso de precipitados. Esta solución fue valorada con la misma solución de NaOH 0.1N. La determinación descrita se realizó por triplicado obteniendo un volumen del rizo de 27 μ L. (27 \pm 0.2)

4.6 Determinación del volumen de carga en la precolumna.

Para evaluar la retención de los analitos en la precolumna polimérica, ésta se cargó mediante la bomba auxiliar (Fig. 4.1) con diferentes volúmenes (entre 5 y 100 mL) de soluciones de carbofurano en HClO₄ 0.01 M en medio acuoso.

Las soluciones fueron preparadas de manera que el volumen cargado contuviera siempre la misma cantidad de carbofurano (135 ng). Después de cada carga, la precolumna se conectó en línea con la columna analítica (rotando la válvula de conmutación a la posición inyección) y el soluto retenido fue eluido mediante una fase móvil ACN – H₂O de composición adecuada para obtener un tiempo de retención aproximadamente de 10 min.

Las áreas de los picos obtenidos se compararon para determinar si había fuga del carbofurano al aumentar el volumen de carga en el intervalo estudiado. Posteriormente, se realizó un estudio similar con los metabolitos del carbofurano (cada uno por separado), probando únicamente un volumen de carga de 50 mL y comparando el pico obtenido con el de un estándar inyectado.

4.7 Pruebas para obtención del extracto de la muestra.

Se probaron como disolventes de extracción el MeOH y el ACN. A las muestras de tejidos fortificados y sin fortificar se les añadió un volumen de 5 mL del disolvente orgánico y se sometieron a ultrasonido por 45 min en un recipiente cerrado. Al término de este tiempo la solución se decantó y el tejido se lavó varias veces con alícuotas del mismo disolvente. El líquido total obtenido se evaporó probando diferentes medios (vacío, baño maría a 60 ° y corriente suave de N₂), hasta reducir el volumen a aproximadamente 1 mL. Posteriormente se filtró, ensayando tanto filtros

desechables para muestras como el sistema de filtración Millipore, con membrana de Nylon 66. El retenido se lavó con una alícuota de disolvente orgánico (1 mL) y varias porciones de agua (acidificadas y sin acidificar) hasta un volumen final de entre 30 – 35 mL.

Finalmente, la solución resultante se cargó en la precolumna de EFS y se analizó por cromatografía de líquidos en el sistema en línea.

A medida que se iba refinando el pretratamiento de la muestra, para algunas de las condiciones ensayadas se preparó un testigo (5 mL de disolvente orgánico fortificado con carbofurano y 7-fenol carbofurano), el cual fue sometido a un tratamiento idéntico al del tejido con el objeto de determinar posibles pérdidas de los analitos durante los diferentes pasos del procesamiento.

4.8 Optimización del lavado de la precolumna.

Los primeros cromatogramas obtenidos al analizar extractos de tejido cargados en la precolumna mostraron que se requerían pasos adicionales de limpieza, pues la señal de la matriz de la muestra era tan grande que no permitía detectar los analitos. Se optó por realizar lavados adicionales de la precolumna, ya cargada, con diferentes soluciones. Se ensayaron soluciones acuosas ácidas y básicas, así como mezclas agua-disolvente orgánico en diferentes proporciones. Al igual que en la sección anterior, cada ensayo realizado fue seguido por un experimento testigo, para saber si el lavado propuesto provocaba fuga de los analitos retenidos en la precolumna. El experimento testigo consistió en cargar la precolumna con una cantidad conocida de carbofurano y 7-fenol carbofurano en solución acuosa, someterla al mismo lavado que la muestra y eluirla en línea para cuantificar los analitos.

4.9 Metodología establecida.

Los numerosos experimentos realizados, descritos en las secciones anteriores, se resumen en en la tabla 4.1. A partir de los resultados obtenidos en estos ensayos, se diseñaron las condiciones finales o definitivas para el análisis de carbofurano y su principal metabolito, 7-fenolcarbofurano, en muestras de tejido epitelial. Con fines de comparación, estas condiciones se muestran en la última columna de la tabla 4.1.

La metodología establecida se describe a continuación:

La muestra de tejido, cortada en trozos muy pequeños se somete a sonicación en metanol por 45 minutos para extraer solamente la fracción polar. El extracto se reduce por evaporación en corriente de N₂ hasta aproximadamente 1 mL, finalmente se adicionan 250 µL de ácido fórmico concentrado y 1 mL de agua.

La solución obtenida anteriormente se filtra en el sistema Millipore y la membrana se lava con 1 ml más de MeOH y con varias fracciones de agua hasta un volumen aproximado de 30 mL, con lo que se obtiene una solución aproximadamente al 7 % de MeOH.

La solución se percola a través de la precolumna empacada con fase reversa polimérica PLRP-S y colocada en una válvula de conmutación; esta última se encuentra insertada entre el inyector y la columna analítica (fase reversa C-18) del sistema cromatográfico. Posteriormente, la precolumna se somete a una serie de lavados sucesivos, primero con 5 mL de una mezcla de agua-ACN 5%, seguida por 2 mL de una solución de NH₄OH 0.01 M ajustada a pH 11 con NaOH 0.1M y de nuevo con 5 mL más de la mezcla agua-ACN 5%. La carga y los lavados de la precolumna se realizan a flujo de 1 mL/min por medio de una bomba auxiliar (ver figura 4.1).

Finalmente, mediante la rotación de la válvula de conmutación, la precolumna se acopla en línea con la columna analítica y la muestra es transferida por la fase móvil para ser separada y analizada en el sistema cromatográfico.

Las condiciones cromatográficas son:

- ❖ Columna (150 x 4.6 mm D.I.) empacada con fase reversa, C-18, Hypersil ODS, de 5 µm.
- ❖ Fase móvil (isocrática) ACN-HClO₄ 0.05 M 18:82 (v/v), flujo 1 mL/min.
- ❖ Detección UV a 280 nm.

La tabla 4.1 presenta el resumen de las condiciones experimentales aplicadas.

Tabla 4.1

Resumen de las condiciones experimentales empleadas durante el desarrollo del método.

Etapa del método	Pruebas preliminares Analitos solos	Pruebas preliminares Analitos + matriz	Condiciones finales
Condiciones cromatograficas			
Columna	Columna empacada 150 x 4.6 mm D.I., ODS-2 Spherisorb, 5 µm	Columna empacada 150 x 4.6 mm D.I., ODS-2 Spherisorb, 5 µm Columna comercial 150 x 4.6 mm D.I. Thermo Hypersil, ODS 5 µm	Columna comercial 150 x 4.6 mm D.I. Thermo Hypersil, ODS 5 µm
Flujo	1 mL/min	1 mL/min	1 mL/min
λ	210 nm	210 nm, 280 nm	280 nm
f.m.	- ACN:H ₂ O (25:75) - MeOH:H ₂ O (30:70) - ACN:HClO ₄ 0.01 M (25:75)	- ACN:HClO ₄ 0.01 M (25:75) - Gradiente: f.m. A: ACN: HClO ₄ 0.01 M (5:95) f.m. B: ACN 100% - Diferentes conc. de ácido en la f.m. - ACN:HClO ₄ 0.05 M (18:82)	ACN:HClO ₄ 0.05 M (18:82)

Tabla 4.1

Resumen de las condiciones experimentales empleadas durante el desarrollo del método (cont).

Extracción en Fase Sólida			
Acondicionamiento de la precolumna	10 ml ACN + 10 ml HClO ₄ 0.01M	10ml ACN + 10 ml H ₂ O	10ml ACN + 10 ml H ₂ O
Solución de carga	25 ml HClO ₄ 0.01 M	- 25 ml HClO ₄ 0.01 M - 25 ml solución acuosa 4% ACN - ± 30 ml solución ≈ 7% MeOH	± 30 ml solución ≈ 7% MeOH
Lavados	Solución acuosa 2% ACN	- Solución acuosa 4% ACN + NH ₄ OH 0.01M pH 9.2 + H ₂ O - Solución acuosa 5% ACN + NH ₄ OH 0.01M (pH 11) + Solución acuosa 5% ACN	Solución acuosa 5% ACN + NH ₄ OH 0.01M (pH 11) + Solución acuosa 5% ACN
Tratamiento de la muestra			
Disolvente de extracción	ACN	- ACN - MeOH	MeOH
Ultrasonido	45 min	45 min	45 min
Evaporación	Vacío	- Baño maría 60°C - Corriente suave N ₂	Corriente suave N ₂
Filtración	Filtro para muestras	- Filtro para muestras - Sistema Millipore	Sistema Millipore
Tratamiento del extracto	Ninguno	- Ninguno - 250 µL ácido fórmico conc.	250 µL ácido fórmico conc.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El problema planteado impone severos requerimientos al método analítico a desarrollar debido a la limitada disponibilidad de muestra (una biopsia de tejido cervical pequeña), a la muy baja cantidad esperada de los compuestos de interés en dicha muestra y a la complejidad de la matriz.

Para alcanzar una alta sensibilidad se optó por trabajar con un sistema en línea para que todo el extracto de la muestra, una vez purificado, pudiera ser enviado al sistema cromatográfico para su análisis.

Por otra parte, para extraer cuantitativamente los compuestos de interés y eliminar al máximo las posibles interferencias, se realizaron numerosos ensayos para:

1. Optimizar las condiciones de extracción de los compuestos a partir de la matriz
2. Encontrar las condiciones adecuadas para la carga del extracto en una precolumna de EFS.
3. Diseñar una serie de lavados para purificar el extracto cargado.
4. Transferir eficiente y cuantitativamente el extracto purificado al sistema cromatográfico.
5. Separar adecuadamente los compuestos y encontrar el mejor compromiso entre selectividad y sensibilidad para la detección.

5.1 Condiciones cromatográficas

Los compuestos inicialmente contemplados para este estudio fueron el carbofurano y sus metabolitos 7-fenol carbofurano, 3-hidroxicarbofurano y 3-ceto-7-fenol carbofurano. Entre ellos, el par más difícil de separar (de acuerdo con reportes de la literatura) es carbofurano y 7-fenol carbofurano; estos dos compuestos son además los más hidrofóbicos y, por tanto, los más retenidos en una columna de fase reversa. El metabolito 7-fenol carbofurano es de gran importancia en este trabajo puesto que se considera como el principal producto de degradación del compuesto

principal en humanos¹². Por ello, los estudios preliminares de optimización de la separación cromatográfica se enfocaron en este par.

Inicialmente, se inyectó una solución ACN-H₂O 1:1 (v/v) de una mezcla estándar de los dos solutos al sistema precolumna-columna en línea utilizando diversas fases móviles (mezclas ACN-H₂O, MeOH-H₂O, ACN-MeOH-H₂O, con y sin adición de ácido). Los mejores resultados se obtuvieron con una mezcla ACN-HClO₄ 0.01M 25:75 (v/v). El cromatograma correspondiente se muestra en la figura 5.1; en estas condiciones los tiempos de retención fueron 12.6 min para el 7-fenol carbofurano y 14 min para el carbofurano. Como puede observarse, los picos son relativamente anchos y un poco coleados debido al acoplamiento de dos fases estacionarias diferentes.

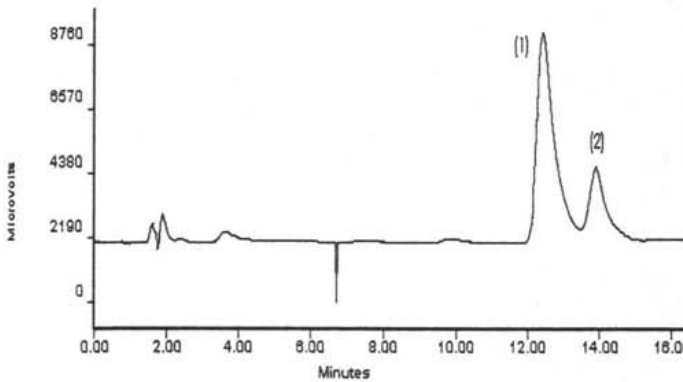


Fig. 5.1 Separación del carbofurano y 7-fenol carbofurano en el sistema en línea. Precolumna (20 x 2 mm DI) empacada con fase reversa polimérica PLRP-S, 5 μ m; columna analítica (150 x 4.6 mm DI) empacada con fase químicamente unida C-18, Spherisorb ODS-2, 5 μ m. Fase móvil ACN-HClO₄ 0.01M 25:75 (v/v), flujo 1 ml/min. Detección UV a 210 nm. Solutos (1) 7-fenol carbofurano, (2) carbofurano; cantidad inyectada 135 ng.

Aunque el volumen de la precolumna es muy pequeño (~ 0.06 cm³) comparado con el de la columna analítica (~ 2.28 cm³) su efecto en la retención de los solutos es considerable debido a la fase estacionaria polimérica que contiene. Es bien sabido que las fases estireno-divinilbenceno son más hidrofóbicas que las fases químicamente unidas C-18 por la gran área hidrocarbonada de las primeras que les

confiere un mayor poder de retención. Además, en el caso presente, se deben considerar interacciones adicionales $\pi - \pi$ entre los núcleos aromáticos del polímero y el anillo bencénico de los analitos. Por otra parte, el ensanchamiento de los picos, al combinar precolumna y columna analítica, no solo es debido a cuestiones de volúmenes muertos y/o eficiencia de las columnas, sino es principalmente resultado de la transferencia de los solutos desde una fase con alto poder de retención (PLRP-S) hacia una fase menos retentiva (C-18).

El efecto benéfico del HClO_4 no tiene que ver directamente con los solutos puesto que éstos no presentan propiedades ácido-base. Es posible que el medio ácido propicie una disminución de las interacciones entre los silanoles residuales de la fase C-18 y los grupos polares de los analitos (el grupo amida del carbofurano y el grupo OH del metabolito 7-fenol).

La fase móvil isocrática ACN- HClO_4 0.01M 25:75 (v/v), permitió una adecuada separación de los cuatro compuestos en estudio (carbofurano y los tres metabolitos). Sin embargo, con el objeto de obtener picos más finos se decidió poner a punto una separación por gradiente de elución. El programa de gradiente que dio resultados satisfactorios fue el siguiente (Gradiente 1):

Fase A: ACN- HClO_4 0.05 M 5:95 (v/v)
Fase B: ACN

t (min)	0	5	30	> 40
% B	0	0	35	35

En estas condiciones se obtuvieron los siguientes tiempos de retención (t_r):

Compuesto	Tiempo de retención (min)
3-hidroxicarbofurano	20.9
3-ceto-7-fenolcarbofurano	23.9
7-fenolcarbofurano	28.5
Carbofurano	29.4

En la figura 5.2a se muestra el cromatograma obtenido.

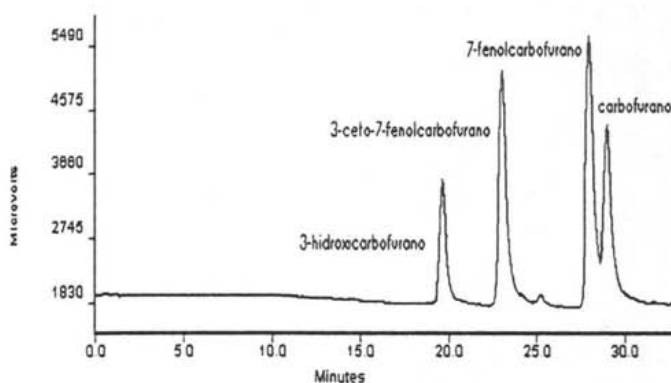


Fig. 5.2a Separación cromatográfica de carbofurano y tres de sus metabolitos mediante el gradiente de elución (1). Inyección directa en el sistema en línea. Cantidad inyectada 270 ng. Detección UV 280 nm. Otras condiciones como en la fig. 5.1.

Para algunos ensayos se utilizó un programa de gradiente más lento con el objeto de mejorar la resolución entre el carbofurano y el 7-fenol carbofurano (Gradiente 2):

t (min)	0	5	30	> 40
% B	0	0	25	25

Las fases A y B fueron las mismas que en el gradiente anterior. Con este programa los tiempos de retención de los dos últimos picos fueron 31.8 min para el 7-fenolcarbofurano y 33.5 para el carbofurano.

La figura 5.2b muestra el cromatograma obtenido al emplear el gradiente (2)

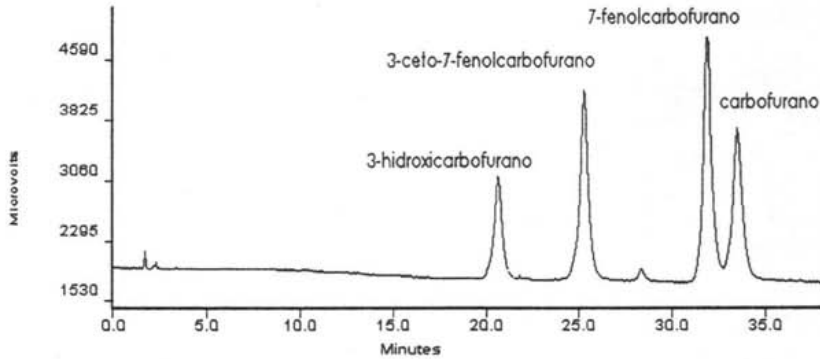


Fig. 5.2b Separación cromatográfica de carbofurano y tres de sus metabolitos mediante el gradiente de elución (2). Inyección directa en el sistema en línea. Cantidad inyectada 270 ng. Detección UV 280 nm. Otras condiciones como en la fig. 5.1.

5.2 Evaluación del sistema en línea

Una vez puestas a punto las condiciones cromatográficas, se procedió a evaluar el sistema en línea. Para determinar el volumen de fuga del carbofurano en la precolumna, se prefirió utilizar el método basado en cargas sucesivas de una pequeña cantidad constante del analito disuelto en volúmenes crecientes de solución acuosa.

Inicialmente se carga un volumen pequeño de solución (5 ml) para asegurar que no se produzca fuga del compuesto; el área del pico obtenido al eluir la precolumna en línea con la columna analítica sirve de referencia para las cargas posteriores con mayores volúmenes. El volumen de carga a partir del cual se observa una disminución en el área del pico obtenido es un indicador de que se ha rebasado el volumen de fuga. Este método tiene la ventaja de que se realiza en condiciones similares a las que se utilizarán después para el análisis de las muestras reales.

Por contraste, el método basado en la obtención del frente de migración del soluto sólo requiere de un experimento de análisis frontal, en el cual la precolumna se conecta directamente al detector y el volumen de fuga corresponde al volumen de inicio de la curva ascendente del frente.

Sin embargo, en este caso es necesario percolar una solución mucho más concentrada del analito (del orden de $\mu\text{g/mL}$) para poder detectar el frente, ya que el efluente de la precolumna tendrá al máximo (una vez que emerge el frente) la misma concentración del analito que el influente. Dado que el volumen de fuga depende de la concentración del compuesto en el influente⁴⁰, es obvio que este método no es representativo de una muestra real, en la cual se esperan muy bajas concentraciones del pesticida (del orden de ng/mL).

Los ensayos realizados mostraron que el volumen de fuga del carbofurano en la precolumna es mayor de 100 ml en las condiciones empleadas (135 ng de soluto en HClO_4 0.01M).

No se continuó la carga de volúmenes mayores puesto que, en nuestro caso, la muestra a percolar es el extracto del tejido diluido en agua, sólo lo suficientemente para reducir a niveles adecuados la concentración del disolvente orgánico. Por esta misma razón únicamente se probó un volumen de carga de 50 ml para los metabolitos del carbofurano. La comparación del área de los picos obtenidos con el área de los picos de sus respectivos estándares inyectados mostró que el volumen de fuga para los tres compuestos es mayor a 50 ml.

Una vez comprobado que los solutos no son eluidos de la precolumna cuando se cargan volúmenes ≤ 50 ml, se procedió a estudiar la linealidad del sistema.

Para ello se cargaron soluciones (25 ml) de carbofurano a diferentes concentraciones en la precolumna y se analizaron. Antes de cada ensayo la precolumna se lavó con 10 ml de ACN puro para eluir cualquier impureza remanente de ensayos anteriores y se acondicionó con 10 ml de HClO_4 0.01M (acuoso). El área del pico obtenido en el análisis de cada solución se comparó con el área del pico de un estándar inyectado.

De hecho, en todos los ensayos, la cantidad inyectada del estándar correspondió a la cantidad de carbofurano teóricamente cargado y analizado en el sistema en línea, por lo que ambos picos deberían ser iguales si la recuperación fuera del 100%.

En la tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 5.1
Linealidad del sistema en línea para el carbofurano (cantidad recuperada Q_m vs cantidad teóricamente analizada Q_s)

Q_s (ng)	Q_m (ng)
8.12	7.5
16.25	15.57
27.08	28.12
54.16	58.63
135.48	122.3
270.81	261.07

El análisis de regresión de la cantidad recuperada vs la cantidad teóricamente cargada en la precolumna condujo a la ecuación (E 5.1):

$$y = 0.9505x + 1.1017 \quad r^2 = 0.9978 \quad (\text{E 5.1})$$

Donde "y" es la cantidad recuperada y "x" es la cantidad cargada; el coeficiente de correlación obtenido muestra que ambas cantidades están linealmente relacionadas en el intervalo estudiado.

Para descartar la presencia de errores sistemáticos y comprobar que la recuperación del carbofurano en el sistema en línea es completa, se realizaron pruebas de hipótesis sobre la ordenada al origen (a) y la pendiente (b) de la recta de regresión.

Ordenada al origen:

Hipótesis nula $H_0: a = 0$

Hipótesis alterna $H_1: a \neq 0$

Pendiente:

Hipótesis nula $H_0: b = 1$

Hipótesis alterna $H_1: b \neq 1$

Los resultados del análisis estadístico se muestran en la Tabla 5.2. Puesto que para ambos parámetros se obtuvo que $t(\text{calculada}) < t(\text{tablas})$, se puede decir que el método de preconcentración y determinación en línea del carbofurano no presenta errores sistemáticos y proporciona una recuperación total del analito.

Tabla 5.2

Análisis estadístico de la ordenada al origen (a) y la pendiente (b) de la ecuación: Cantidad analizada vs Cantidad cargada, para comprobar el buen funcionamiento del sistema en línea para la preconcentración y determinación del carbofurano.

Parámetro	n	α^*	$t(\text{calculada})$	$t(0.025,4)$	¿aceptar H_0 ?
a	6	0.05	-0.434	2.78	Si
b	6	0.05	2.61	2.78	Si

* α = nivel de significancia

5.3 Tratamiento de la muestra y desarrollo del método analítico.

Después de haber establecido las condiciones para la EFS en línea con el análisis cromatográfico, se realizó un ensayo preliminar con un extracto en ACN de una muestra de tejido no fortificado. El cromatograma obtenido (Fig. 5.3) muestra la elución de una gran cantidad de interferentes de la matriz justo en la región donde eluyen el carbofurano y sus metabolitos. Estos interferentes tienen evidentemente una polaridad e hidrofobicidad similar a la de los analitos, impidiendo totalmente su detección. Se hace notar que, en el cromatograma del extracto, la escala de respuesta está dada en mVolts, mientras que los cromatogramas de ensayos

anteriores correspondientes a la separación de los analitos (Figuras 5.1 – 5.2), tienen una escala en micro Volts.

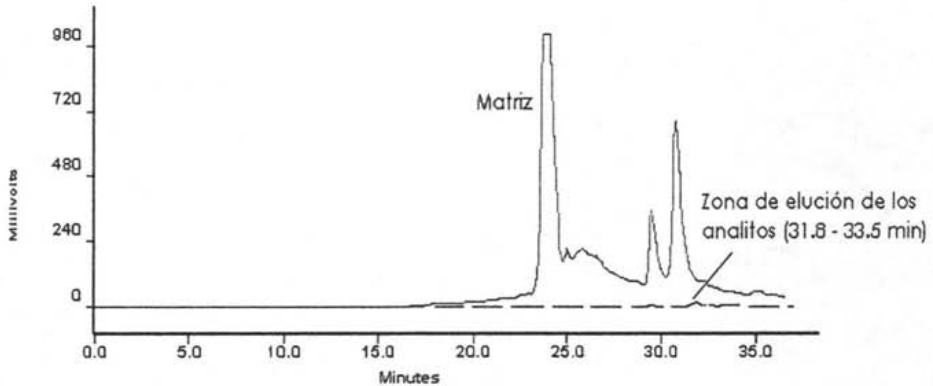


Fig. 5.3 Cromatograma de un extracto en ACN de tejido blanco (250 mg). El extracto evaporado (1 ml) se diluyó a 25 ml en HClO_4 0.01M, se cargó en la precolumna lavando con 5 ml de H_2O y se transfirió en línea a la columna para su análisis mediante el gradiente de elución (2). Detección UV a 210 nm; otras condiciones como en la figura 5.1.

Para tratar de resolver este problema se hicieron una gran cantidad de variaciones en el programa de gradiente y en la composición de las fases móviles: el acetonitrilo se sustituyó por metanol, se varió la concentración de HClO_4 y se cambió el medio ácido a medio neutro, etc. Asimismo, se cambió la longitud de onda de detección de 210 nm a 280 nm (máximo secundario de absorbancia para los analitos).

Los cambios anteriores no dieron resultados satisfactorios, pues las variaciones provocadas en la retención de los interferentes eran semejantes a las que sufrían los analitos. Dado que las condiciones originales (fases móviles de ACN y HClO_4) eran las mejores para la separación de los solutos de interés y la forma de sus picos, se decidió mantenerlas, sin embargo, sí se modificó la longitud de onda de detección (280 nm) porque se observó una disminución de respuesta de las interferencias proporcionalmente mayor a la de los analitos. Aún así, al trabajar con una muestra de tejido fortificado, fue imposible observar los picos de interés frente a la comparativamente enorme señal de la matriz.

Considerando lo anterior, se comenzaron a realizar cambios en las etapas de pretratamiento de muestra, con el fin de eliminar en mayor proporción los interferentes. Primero, se ensayó el MeOH como disolvente de extracción en vez de ACN, lo que permitió reducir notablemente algunas señales de la matriz. Experimentalmente también se observó una mayor cantidad de residuo sólido en las muestras extraídas con MeOH, indicando con ello una menor solubilización del componente del tejido. Las propiedades del ACN (parámetro de solubilidad de Hildebrand $\rho = 11.8$) comparadas con las del MeOH ($\rho = 12.9$), explican que el primero sea capaz de extraer de la matriz una mayor cantidad de compuestos de polaridad media y baja.

Debido a la limitada disponibilidad de tejido, los siguientes ensayos para la optimización de condiciones se realizaron con pequeñas porciones del extracto de una muestra en vez de utilizar un extracto completo para cada experimento.

Así, la muestra de 250 mg de tejido en 5 ml de MeOH se sonicó por 45 min, el líquido se decantó lavando el residuo sólido con varias porciones del disolvente hasta completar aproximadamente 10 ml, luego se evaporó hasta un volumen de 5 ml y de ahí se tomaron alícuotas entre 0.5 y 1 ml para los ensayos.

El siguiente punto a analizar fue la composición de la solución usada para reconstituir y diluir el extracto antes de cargarlo en la precolumna. Dos alícuotas de 1 ml del extracto se evaporaron casi a sequedad y el residuo se resuspendió en 1 ml de MeOH. A una de las suspensiones se le agregó 1 ml de HClO_4 0.01M y a la otra 1 ml de agua, ambos se pasaron a través de filtros desechables para muestras, enjuagando el recipiente y el propio filtro con 1 ml más de MeOH y numerosas porciones de HClO_4 o agua, según el caso, hasta completar aproximadamente 30 ml. Las soluciones anteriores se cargaron en las precolumnas y se analizaron. La figura 5.4 muestra los cromatogramas obtenidos.

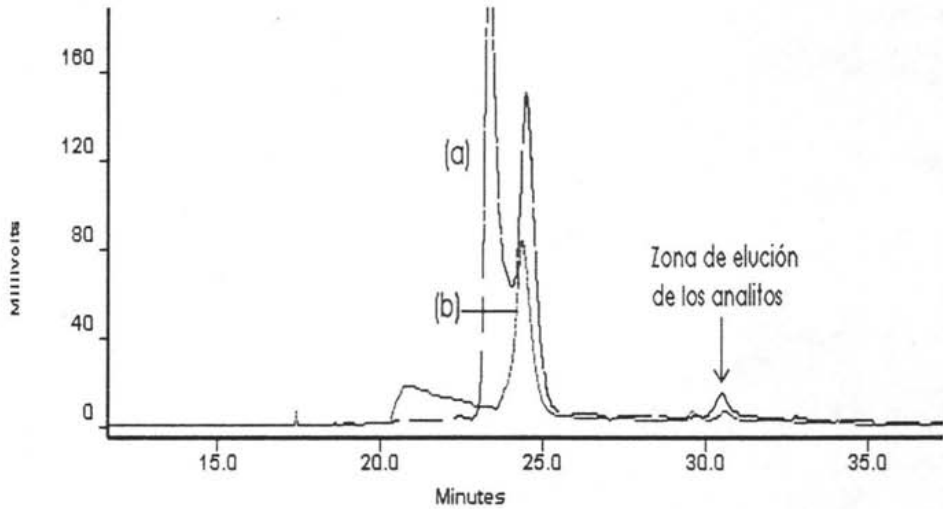


Figura 5.4 Optimización del medio utilizado para reconstituir el extracto evaporado previo a su carga en la precolumna. Alícuotas de 1 ml de extracto, reconstituido con metanol y (a) HClO_4 0.01M, (b) H_2O . Transferencia en línea a la columna analítica y separación mediante el gradiente (2). Detección a 280 nm. Otras condiciones como en la fig. 5.1

Resulta obvio que se obtiene un cromatograma con menos señales de la matriz utilizando agua pura para la reconstitución del extracto. Es posible que algunos componentes del residuo del extracto evaporado se solubilicen mejor en el medio fuertemente ácido de la mezcla $\text{MeOH} - \text{HClO}_4$ 0.01M y por ello el cromatograma del análisis de esta solución muestra un gran pico de matriz que no está presente cuando la resuspensión del residuo se hace en medio neutro.

Aunque se logró una mejora importante con la resuspensión del extracto en $\text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$, las señales de matriz todavía eran muy grandes para poder detectar adecuadamente a los analitos. Por ello se procedió en el siguiente paso a optimizar el lavado de la precolumna una vez cargada, el cual inicialmente sólo se hacía con algunos mililitros de agua. En estos ensayos se utilizaron alícuotas de 0.5 ml de extracto dopadas con carbofurano y 7-fenolcarbofurano para poder observar si el tratamiento de la muestra o los lavados de la precolumna provocaban pérdidas de estos analitos.

Los cromatogramas de la figura 5.5 muestran los resultados obtenidos al lavar la precolumna con (a) 5 ml de ACN – H₂O 4:96 (v/v), (b) 5 ml de HClO₄ 0.05M y (c) ACN – H₂O 4:96 (v/v) (5 ml) + NH₄OH 0.01 M pH 9.6 (2 ml) + H₂O (5 ml). El lavado más vigoroso, en donde se incluyó un medio básico permitió obtener el cromatograma más limpio. En este caso, el enjuague final con agua tiene por objeto exponer el menor tiempo posible los analitos al medio básico ya que en éste son inestables; con ello, también se protege a la columna analítica cuyo soporte de sílice es atacado por soluciones básicas.

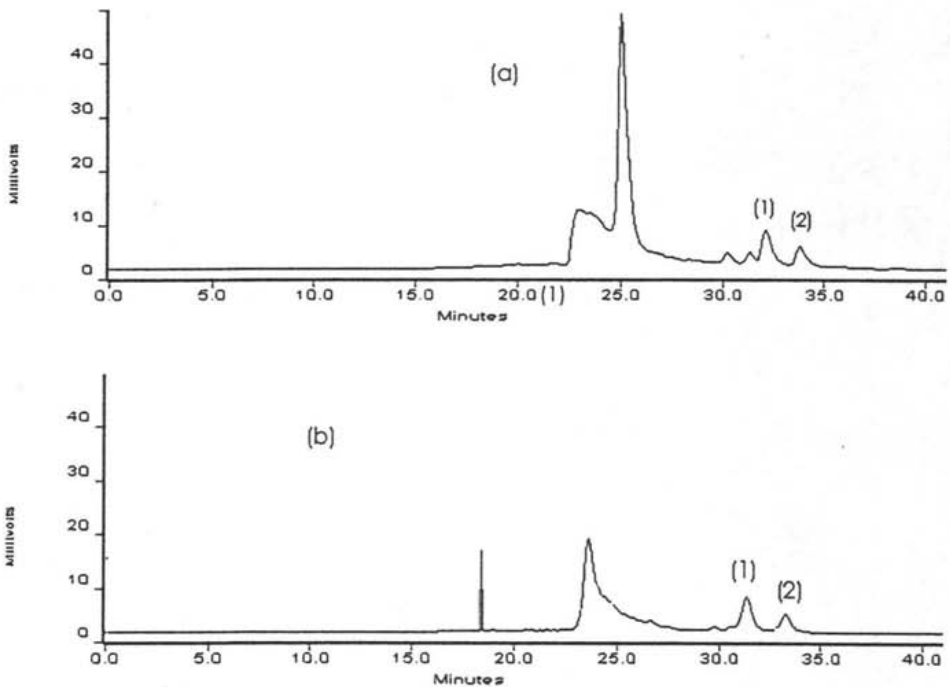


Fig. 5.5a y 5.5b Optimización del lavado de la precolumna. Alícuotas de 0.5 ml de extracto fortificadas con 7-fenolcarbofurano (1) y carbofurano (2), (540 ng c/u) fueron evaporadas y reconstituídas con MeOH-H₂O, filtradas, diluidas a 30 ml con agua y cargadas en precolumnas. Los lavados se efectuaron con (a) ACN-H₂O 4:96 (v/v) y (b) HClO₄ 0.05 M, 5 ml. Otras condiciones como en la figura 5.4

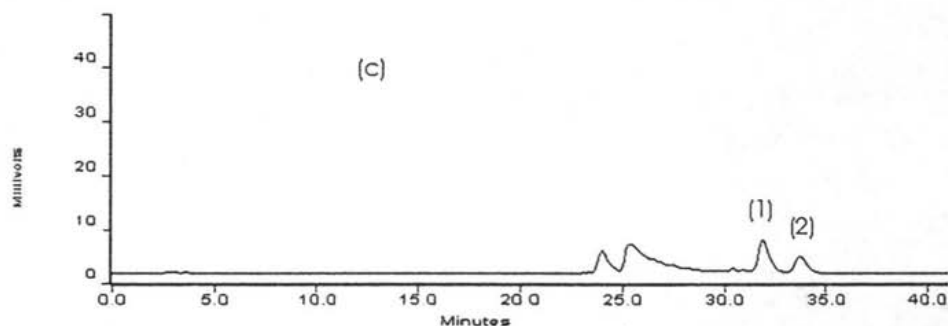


Fig. 5.5c Optimización del lavado de la precolumna. Alícuotas de 0.5 ml de extracto fortificadas con 7-fenolcarbofurano (1) y carbofurano (2). (540 ng c/u) fueron evaporadas y reconstituidas con MeOH-H₂O, filtradas, diluidas a 30 ml con agua y cargadas en precolumnas. Los lavados se efectuaron con 5 mL ACN-H₂O 4:96 (v/v) + 2 mL NH₄OH 0.01 M pH 9.6 + 5 mL H₂O. Otras condiciones como en la figura 5.4.

Por otra parte, en la figura 5.5 se observan claramente los picos de los dos analitos en los tres cromatogramas. Aunque en los tres casos el tamaño de los picos de interés es similar, se comprobó, mediante la inyección directa de un estándar, que la recuperación de los analitos era baja, principalmente la del 7-fenolcarbofurano (60 – 65%). Por esta razón se hicieron experimentos testigo en precolumnas cargadas con soluciones acuosas de los analitos y sometidas a los mismos lavados. Estos experimentos mostraron que la pérdida observada no era debido a los lavados. Por lo tanto, el problema debía provenir de etapas anteriores del pretratamiento de la muestra.

Se identificaron como posibles puntos críticos la evaporación del extracto de la muestra y la filtración. La primera se había estado realizando por vacío o por inmersión del recipiente en un baño maría a 60 °C. Con ambos métodos el proceso era muy lento y con el segundo se corría el riesgo de propiciar la descomposición de los analitos a pesar de la temperatura moderada del baño.

Por lo tanto se optó por utilizar una corriente suave de N₂ para la evaporación, lo que además permitió acelerar un poco más esta etapa. Con respecto a la filtración, se decidió sustituir los filtros desechables para muestras por un sistema de filtración Millipore con membranas de Nylon 66. En efecto, el área de membrana de los

dispositivos desechables es muy pequeña y fácilmente se ocluye dificultando el paso del líquido y haciendo muy lento el proceso de filtración. La membrana del sistema Millipore es más grande (47 mm de diámetro) y por ello permite percolar suspensiones con mayor cantidad de partículas sólidas sin ocluirse; además, al ser un sistema abierto, se puede controlar mejor el lavado del retenido.

Los cambios anteriores permitieron no solo facilitar y hacer más rápida la etapa de pretratamiento de la muestra, sino también mejorar la recuperación de carbofurano y 7-fenol carbofurano (> 90%). Se procedió entonces a realizar el análisis de una muestra completa fortificada con los cuatro analitos bajo las condiciones optimizadas.

El resultado obtenido mostró que aún no era posible separar adecuadamente los picos de interés de los picos de matriz. En particular, los metabolitos 3-hidroxicarbofurano y 3-ceto-7-fenolcarbofurano quedaban totalmente ocultos por las señales de la propia muestra. Por ello se optó por emplear condiciones aún más severas durante el lavado de la precolumna:

1. 5 ml de ACN – H₂O 5:95 (v/v)
2. 2 ml de NH₄OH 0.01 M a pH = 11
3. 5 ml de ACN – H₂O 5:95 (v/v)

Sin embargo, estos tres pasos de lavado no ofrecieron resultados suficientemente satisfactorios.

En la literatura se encontró un método en el cual muestras de tejido animal eran tratadas con ácido fórmico después de la extracción con acetonitrilo⁴¹. A pesar de que en los ensayos anteriores ya se había desechado el uso de un medio fuertemente ácido (HClO₄ 0.01M) en la resuspensión del extracto evaporado, se decidió hacer la prueba con el ácido fórmico.

Dos alícuotas de 0.5 ml de extracto no dopado se evaporaron casi a sequedad con corriente de N₂, el residuo se resuspendió en 1 ml de MeOH y 1 ml de H₂O agregando además 250 µL de ácido fórmico, se filtró en el sistema Millipore lavando el retenido

con 1 ml de MeOH y abundante agua hasta completar aproximadamente 30 ml. Las soluciones anteriores se cargaron en precolumnas; una de ellas se lavó sólo con 2 mL de solución ACN -H₂O 5:95 (v/v), para la otra se realizó el lavado intensivo (3 pasos) antes descrito. La transferencia en línea y separación cromatográfica se efectuaron en este caso en condiciones isocráticas con una fase móvil ACN - HClO₄ 0.01 M 25:75 (v/v).

En la figura 5.6 se muestran los cromatogramas obtenidos. Como puede observarse, la adición de ácido fórmico al extracto, aunada al lavado intensivo de la precolumna permite reducir sustancialmente las señales de la matriz. Por otra parte, si la adición de ácido fórmico se combina sólo con lavado ligero de la precolumna (sin incluir solución básica), persiste un gran pico de matriz que impide la detección de los dos metabolitos menos retenidos del carbofurano.

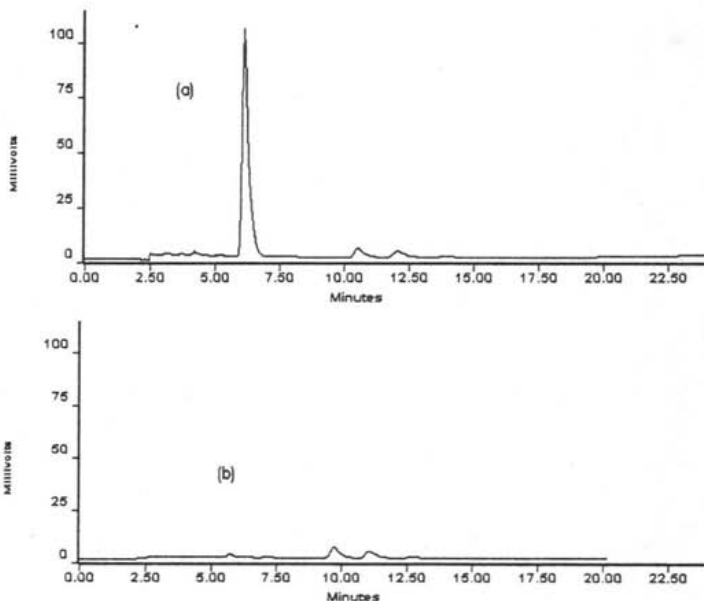


Fig. 5.6 Efecto de la adición de ácido fórmico al extracto y el lavado de la precolumna sobre el perfil cromatográfico de la muestra. Alícuotas de 0.5 ml de extracto tratadas con ácido fórmico (250 μ L); el lavado de la precolumna cargada se realizó con (a) 5 ml de ACN-H₂O 5:95 (v/v), (b) 5 ml ACN-H₂O 5:95 (v/v) + 2 ml NH₄OH 0.01 M pH 11 + 5 ml ACN-H₂O 5:95 (v/v). Transferencia en línea y separación cromatográfica en condiciones isocráticas, fase móvil ACN - HClO₄ 0.01 M 25:75 (v/v). Detección UV a 280 nm.

Al realizar ensayos testigo con alícuotas de 0.5 ml de MeOH dopados con los cuatro analitos y sometidos al mismo tratamiento se observó una fuerte pérdida de los metabolitos 3-hidroxicarbofurano y 3-ceto-7-fenol carbofurano en el experimento que incluyó adición de ácido fórmico y lavado intensivo. En vista de que estos compuestos son ocultados por los picos de matriz en el caso de un lavado suave, figura 5.6 (a), o bien se pierden con un lavado más agresivo, figura 5.6 (b), se tuvo que optar por establecer el método analítico sólo para la determinación de carbofurano y 7-fenolcarbofurano. Aunque esta restricción hace perder información de la muestra, al menos permite una determinación apropiada del compuesto original y su principal metabolito en humanos.

Una vez que se optimizaron todas las condiciones, se sustituyó la columna analítica empacada en el laboratorio por una columna comercial. La fase móvil se reajustó ya que la retención de los compuestos no es idéntica en fases reversas de diferentes marcas (en este caso Spherisorb ODS-2 e Hypersil ODS), debido a diferencias en contenido de carbón de las fases y/o en número o grado de actividad de los silanoles residuales del soporte. Para una mayor conveniencia experimental y reproducibilidad de las separaciones se optó por trabajar en condiciones isocráticas. La fase móvil finalmente adoptada para la columna comercial fue ACN-HClO₄ 0.05M 18:82 (v/v).

La descripción detallada del método analítico finalmente establecido para la determinación del carbofurano y 7-fenolcarbofurano en muestras de tejido epitelial se presentó en la parte experimental de este trabajo. La figura 5.7 muestra los cromatogramas obtenidos al aplicar el método a una muestra de tejido fortificado y una sin fortificar (muestras completas de 250 mg).

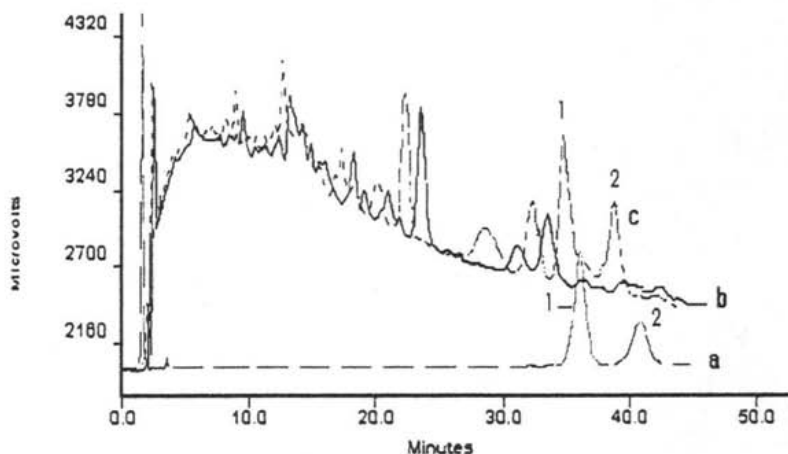


Fig. 5.7 Cromatogramas obtenidos a partir de: (a) inyección de 27 μL de estándar de 7-fenolcarbofurano (1) y carbofurano (2) a 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cada uno; (b) muestra de tejido (250 mg) sin fortificar; (c) muestra de tejido (250 mg) fortificada con 108 ng de cada pesticida. Las muestras fueron tratadas con el método establecido. Separación isocrática con ACN-HClO_4 0.05M 18:82 (v/v), detección UV a 280 nm; precolumna PLRP-S de 5 μm (20 x 2 mm D.I.) acoplada en línea a la columna analítica Hypersil ODS de 5 μm (150 x 4.6 mm D.I.)

Como puede observarse en la figura 5.7, con la matriz utilizada los analitos pueden distinguirse claramente de la señal de fondo y están adecuadamente separados de los picos de matriz cercanos.

Cabe señalar (como se dijo en la parte experimental) que la matriz empleada fue constituida a partir de varias muestras de tejido epitelial finamente cortado y mezclado homogéneamente. Los cromatogramas mostrados en la figura fueron obtenidos a partir de 250 mg de esta matriz, lo que corresponde al peso promedio de una muestra.

Sin embargo, dada la variabilidad entre individuos, es muy posible que el perfil cromatográfico de otras muestras tratadas bajo las mismas condiciones difiera del mostrado en esta figura y por lo tanto también pueden ocurrir interferencias parciales de la matriz sobre los picos de los analitos. Esto quedó demostrado con algunas muestras que nos fueron proporcionadas posteriormente, las cuales se procesaron de forma individual.

5.3 Evaluación del método analítico

Para determinar si el método desarrollado permitía cuantificar cantidades de analito menores a los 100 ng con precisión y exactitud aceptables, se realizó un estudio de repetibilidad con muestras blanco, las cuales se doparon con 54 ng de 7-fenolcarbofurano y carbofurano.

Estas muestras provenían de una conjunto diferente al que se utilizó para establecer las condiciones del método y eran de tamaño y pesos variados, por lo que se optó de nuevo por cortarlas en pequeños trozos, mezclar homogéneamente y tomar porciones de ~250 mg para cada ensayo.

Como se mencionó en la parte experimental, cada porción fue fortificada con los dos analitos y dejada en reposo por aproximadamente 12 horas para permitir la penetración y/o adsorción de los compuestos añadidos en el tejido. Para el estudio de repetibilidad se analizaron 7 muestras en diferentes días. La tabla 5.3 muestra los datos obtenidos.

Tabla 5.3

Estudio de repetibilidad del Método.

Análisis de 7 muestras de tejido blanco fortificadas con carbofurano (54.2 ng) y 7-fenolcarbofurano (54.8 ng)

No. de Muestra	ng recuperados 7-fenolcarbofurano	ng recuperados carbofurano
1	51.4	50.4
2	66.5	43.5
3	51.2	55.1
4	46.3	40.4
5	56.6	58.6
6	53.3	47.9
7	50.1	49.2
x	53.6 ng	49.3 ng
s	6.5 ng	6.3 ng
CV	12.1%	12.7%
R*	97.9%	91.0%

*R = Recuperación promedio; s = desviación estándar; CV = Coeficiente de Variación

Para avalar la exactitud del método en el análisis de muestras conteniendo cantidades de analitos del orden de 54 – 55 ng, se realizó una prueba de hipótesis sobre la media de los resultados obtenidos:

Hipótesis nula: $H_0: x = \mu$

Hipótesis alterna: $H_1: x \neq \mu$

Donde: $\mu = 54.2$ ng (carbofurano)

$\mu = 54.8$ ng (7-fenolcarbofurano)

En la Tabla 5.4 se muestra el resultado de esta prueba y en la Tabla 5.5 se presentan los intervalos de confianza para la cantidad de pesticida recuperado en las muestras analizadas.

Tabla 5.4

Análisis estadístico de la exactitud del método en la determinación de muestras de tejido dopadas con 54.2 ng de carbofurano y 54.8 ng de 7-fenolcarbofurano

Analito	n	α^*	t(calculada)	t(0.025,6)	¿aceptar H_0 ?
Carbofurano	7	0.05	-2.06	3.025	Si
7-fenolcarbofurano	7	0.05	-0.48	3.025	Si

Tabla 5.5

Intervalos de confianza (al umbral 5%) de la cantidad de plaguicida recuperado en el análisis de 7 muestras fortificadas con 54.2 ng de carbofurano y 54.8 ng de 7-fenolcarbofurano.

Analito	Intervalo de confianza	Intervalo de confianza % recuperación
Carbofurano	42 < ng recuperados < 56	78 < %R < 104
7-fenolcarbofurano	46 < ng recuperados < 61	84 < %R < 111

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el método permite cuantificar con exactitud cantidades del orden de los 54 ng de carbofurano o de 7-

fenolcarbofurano en muestras de 250 mg de tejido, lo que corresponde a una concentración de 0.22 ng/mg.

Respecto a la precisión, los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de 7 muestras (12 – 13%) pueden considerarse aceptables para el límite de cuantificación de compuestos en matrices complejas. De hecho, la definición de límite de cuantificación para contaminantes en muestras biológicas no ha sido claramente establecida. Para tener un punto de comparación podrían considerarse los lineamientos decretados para los métodos analíticos empleados en estudios de bioequivalencia de fármacos en los cuales el principio activo se determina en algún fluido biológico (p. ej. sangre u orina)⁴².

De acuerdo con el Código de Registros Federales de EU, el límite de cuantificación corresponde a la mínima cantidad de la sustancia de interés, en el fluido o secreción biológica, que puede determinarse con una precisión mayor al 20% y una exactitud en el intervalo de $\pm 20\%$ del valor real.

Aplicando estos criterios a los resultados de la Tabla 5.3 se puede considerar que el límite de cuantificación del método analítico desarrollado para la determinación de carbofurano y 7-fenolcarbofurano en tejido biológico es menor a los 54 ng (< 0.22 ng/mg).

Sin embargo, cabe señalar que otro criterio comúnmente adoptado respecto al límite de cuantificación de un método señala que éste corresponde a 10 veces el valor de la desviación estándar obtenida en el análisis de varias muestras blanco independientes fortificadas a niveles cercanos al límite de cuantificación esperado. De acuerdo con este criterio, el límite de cuantificación del método desarrollado sería de 63-65 ng (0.25-0.26 ng/mg) para ambos analitos.

Se hace notar que en el estudio realizado, las muestras no fueron realmente independientes. Esto se debió, por una parte, a la dificultad para obtener un número suficiente de muestras independientes. Por otra parte, como ya se mencionó, el

segundo conjunto de muestras que nos fueron facilitadas era muy variable en cuanto a sus dimensiones y pesos, incluyendo tejidos desde 200 mg y hasta más de 500 mg.

Los resultados de la Tabla 5.3 fueron también empleados para evaluar el límite de detección del método (LDM). Para ello, se utilizó el criterio recomendado por la EPA para el análisis de contaminantes en muestras ambientales (principalmente muestras de agua)⁴³. De acuerdo con este criterio, el límite de detección se calcula por la siguiente relación:

$$\text{LDM} = t_{(0.01, n-1)} \times s \quad (\text{E 5.2})$$

Donde $t_{(0.01, n-1)}$ es el valor de la "t" de Student para un intervalo de confianza del 99% con n-1 grados de libertad; s es la desviación estándar (en unidades de masa o de concentración) obtenida en el análisis de al menos 7 muestras dopadas a niveles no mayores a 10 veces el límite de detección esperado.

En la Tabla 5.6 se reporta el límite de detección calculado para el pesticida y su metabolito. En ambos casos, la mínima cantidad de analito que podría detectarse por este método es de 20 ng.

Tabla 5.6

Límites de Detección del Método para el análisis de carbofurano y 7-fenolcarbofurano en muestras de tejido cervical.

Analito	n	t(0.01,6)	LDM (ng)	LDM (ng/mg)
Carbofurano	7	3.14	20	0.08
7-fenolcarbofurano	7	3.14	20	0.08

Con el objeto de verificar resultados obtenidos en el estudio precedente se realizaron ensayos adicionales con la mezcla de tejidos restante. Tres porciones de 250 mg se fortificaron con diferentes cantidades del plaguicida y su metabolito y se analizaron. Los resultados se presentan en la Tabla 5.7.

Tabla 5.7

Análisis de muestras de tejido blanco (250 mg) dopadas con diferentes cantidades de los analitos

Cantidad adicionada (ng)	Cantidad recuperada (ng)	%R
7-fenolcarbofurano		
27.4	29.7	108
82.2	71.7	87
109.6	101	92
Carbofurano		
27.1	35.1	130
81.2	80.6	99
108.3	107	99

Dado que, por limitaciones de muestra, no se pudieron realizar más ensayos (réplicas o niveles), los resultados obtenidos no son suficientes para efectuar el análisis estadístico (p. ej. linealidad del método). Sin embargo, se pueden adelantar las siguientes conclusiones:

- 1) El método permite efectivamente detectar cantidades de analito del orden de los 20 ng en 250 mg de tejido, tal como se corroboró experimentalmente. En el caso del carbofurano el resultado obtenido no cumple con el criterio de exactitud por lo que, para este analito el límite de cuantificación es superior a los 27 ng en 250 mg de tejido. En el caso del 7-fenolcarbofurano, la cantidad recuperada para 27 ng adicionados cumple con el criterio de exactitud. Por lo tanto, el límite de cuantificación podría ser cercano a este nivel, pero se requiere realizar el análisis de algunas réplicas para comprobar que se obtienen resultados con una precisión aceptable.
- 2) La recuperación obtenida en el análisis de tejidos dopados con cantidades mayores de analito (entre los 80 ng y los 110 ng) cae dentro del intervalo establecido en la Tabla 5.5, corroborándose la exactitud del método. Asimismo, estos resultados son indicativos de la linealidad del método en el intervalo de 50 - 110 ng de soluto por 250 mg de tejido (200 - 440 ng/g). Sin

embargo, se requiere un mayor número de experimentos para comprobar estadísticamente esta información.

5.4 Aplicación del Método

En esta sección se reporta la aplicación del método en el análisis de muestras independientes de tejido epitelial proveniente de personas expuestas al pesticida. Algunos datos de estas muestras se presentan en la Tabla 5.8. La primera muestra, cuyo peso (base húmeda) era de 411 mg, se seccionó en dos partes que fueron tratadas y analizadas independientemente, pero una de ellas fue dopada con 54 ng de 7-fenolcarbofurano y carbofurano. Las muestras 2 y 3 se analizaron tal cual. En la Figura 5.8 se presentan los cromatogramas obtenidos del análisis de las cuatro muestras.

Tabla 5.8
Muestras Analizadas: Datos

Muestra	Peso (mg)	Observaciones y edad de la persona ^(a)	¿Dopada? (ng)
a	163.6	Tejido sano, 45 años	No
a' ^(b)	247.4	Tejido sano, 45 años	Si (54 ng)
b	928	Cáncer in situ, 36 años, esposo trabajador del campo	No
c	214.2	Tejido sano, 31 años	No

^(a) En las muestras marcadas "tejido sano", no se detectaron anomalías desde el punto de vista clínico. ^(b) Las muestras a y a' son secciones del mismo tejido, excepto que la segunda fue dopada con los analitos

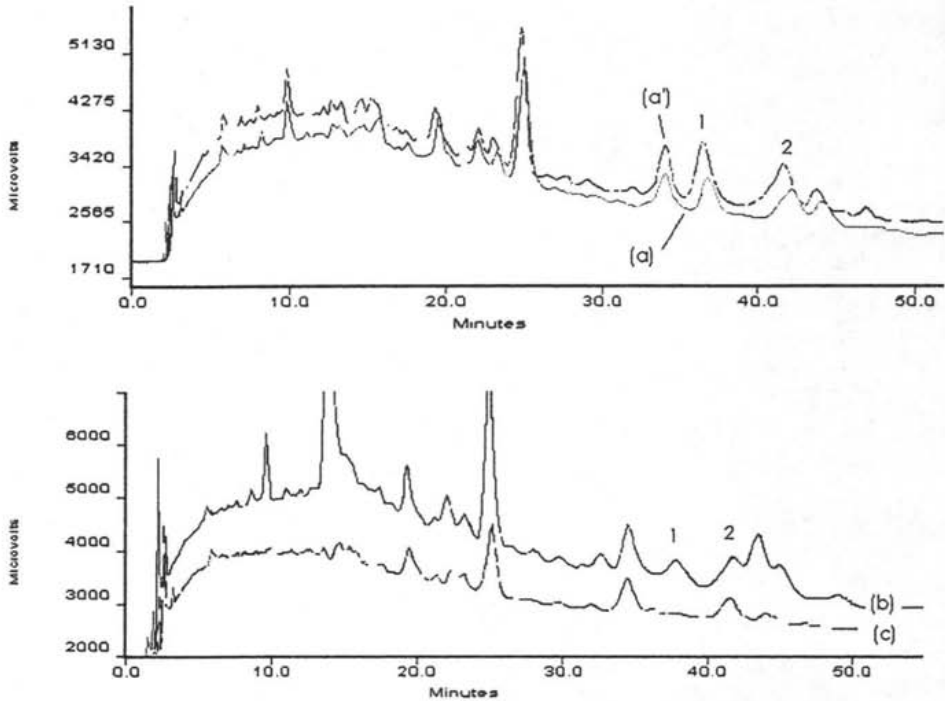


Fig. 5.8 Cromatogramas obtenidos del análisis de algunas muestras de tejido epitelial. (a) y (a') corresponden a dos secciones de una muestra de tejido sano, la segunda de las cuales fue dopada con 54 ng de los dos analitos; (b) muestra de tejido con cáncer, no dopada, (c) muestra de tejido sano sin dopar. Los números indican la zona donde eluye el 7-fenolcarbofurano (1) y el carbofurano (2). Condiciones cromatográficas como en la Fig. 5.7.

El análisis comparativo de los cromatogramas muestra en los 4 casos un grupo de señales importantes en la zona donde eluye el carbofurano (40 - 42 min); este conjunto de picos no se había observado, o bien era pequeño, en los cromatogramas de muestras anteriores (ver p. ej. Fig. 5.7). Por otra parte, tres de los cromatogramas de la figura 5.8 presentan un pico muy bien definido en la zona donde eluye el 7-fenolcarbofurano (35 - 37 min).

Se discutirá primero el caso de la muestra (c), para la cual no se observa ningún pico que pudiera corresponder al 7-fenolcarbofurano, pero sí hay una señal definida en la zona de elución del carbofurano. Aunque no se tienen datos de la historia de la muestras, se considera que en el ambiente prevaleciente en el cuello uterino y

durante el posterior tiempo de almacenamiento y transporte de la muestra húmeda, si el carbofurano hubiera estado presente en el tejido epitelial, forzosamente debería haberse formado el metabolito derivado de su hidrólisis, ya que los carbamatos no son muy estables y la hidrólisis del grupo carbámico es una de sus principales vías de degradación. Por ello se concluye que la señal observada no corresponde al carbofurano, sino a una interferencia de matriz que eluye en el mismo tiempo de retención que el plaguicida.

Con esta base, se puede ahora regresar al análisis de los cromatogramas de las muestras (a) y (a'). La muestra sin dopar presenta un pico en el tiempo de retención del metabolito, además del conjunto de señales que aparecen en la zona del carbofurano. A pesar de corresponder a una muestra de tejido sano, los resultados indican la probable presencia del metabolito del pesticida. No se puede descartar la posibilidad de que el tejido también tenga residuos de carbofurano pero, por las interferencias de matriz que eluyen al final del cromatograma, es difícil afirmarlo. Al analizar la misma muestra dopada se observa un claro incremento en el tamaño de los picos atribuidos a los compuestos en estudio, sin que se perciban hombros extra o alguna deformación en los mismos. Esto refuerza en algún grado la identidad atribuida aunque no es una confirmación absoluta. Desafortunadamente, en este estudio se utilizó un detector UV simple que no permite obtener espectros de los compuestos que eluyen de la columna. Los espectros habrían podido ayudar a tener mayor seguridad en la identificación de los picos de la muestra original.

Finalmente, la muestra (b), que proviene de una persona con cáncer cervicouterino confirmado, también dio un cromatograma con señales muy claras en los tiempos de retención del 7-fenolcarbofurano y el carbofurano. Al igual que en el caso anterior, no es posible afirmar con seguridad la presencia de estos compuestos, pero tampoco puede descartarse.

En la Tabla 5.9 se reportan resultados cuantitativos para las muestras (a) y (b), asumiendo que el pico atribuido al 7-fenolcarbofurano efectivamente corresponde a este compuesto y que se encuentra libre de impurezas. Por otra parte, al

comparar todos los cromatogramas que se obtuvieron, surge la sospecha de que algunos interferentes de la matriz coeluyen con el carbofurano, por lo que no se realizó la cuantificación de este analito.

Tabla 5.9

Cuantificación de 7-fenolcarbofurano en muestras de tejido cervical.

No. de muestra	Cantidad de metabolito (ng)	Concentración de metabolito (ng/g)
a	174	279.4
b	63.2	68.2

De acuerdo con los datos de la Tabla 5.9, resulta sorprendente observar que la concentración de 7-fenolcarbofurano en el "tejido sano" es cuatro veces mayor que la del tejido canceroso. Evidentemente, se requiere de algún método alternativo (p.ej. espectrometría de masas) que permita confirmar la identidad y pureza del pico asignado al metabolito. Desgraciadamente, no fue posible conseguir otra muestra de la misma persona. Sin embargo, se nos ha informado que algunas mujeres a las cuales no se les habían detectado anomalías en el tejido cervical, han regresado a la clínica tiempo después con un cáncer cervicouterino desarrollado.

Las muestras analizadas provienen de mujeres campesinas o de parejas sexuales de campesinos de una región agrícola del estado de Colima. En esta región se cultivan cítricos, legumbres y una gran variedad de frutas, y se expande una cantidad considerable de agroquímicos para la protección de los cultivos. Entre los plaguicidas más usados en la región se encuentra el carbofurano cuyas formulaciones se expenden bajo los nombres de Furadan, Vydate y Qufuran.

Existe una gran preocupación en el sector médico que atiende a la población agrícola por la alta incidencia de cáncer cervicouterino que se presenta incluso en mujeres muy jóvenes (16 – 18 años). Esto ha llevado a sospechar de algún factor externo como causante directo o inductor de las anomalías observadas. Dado que, por sus condiciones de vida e higiene, el sector campesino está expuesto al

contacto directo y continuo con los plaguicidas, es factible que estos logren penetrar hasta el tejido blando del aparato genital femenino.

Los resultados obtenidos en el análisis de las muestras (a) y (b) son una llamada de alerta, pues indican la posible presencia del metabolito del carbofurano en el tejido cervical. De esta manera, se pudiera reforzar la hipótesis de una probable asociación entre el cáncer cervicouterino observado en las mujeres campesinas y la exposición a pesticidas, y en particular al carbofurano. Sin embargo los resultados no pudieron ser contundentes debido a que la cantidad de muestras analizadas no fue suficiente.

6. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método analítico para la determinación de trazas del pesticida carbofurano y su principal metabolito en humanos, el 7-fenolcarbofurano, en muestras de tejido del epitelio cérvico-uterino.

La cuidadosa optimización de condiciones experimentales, desde la etapa de recuperación de los analitos a partir del tejido, pasando por la reconcentración y limpieza del extracto en una precolumna y, finalmente, la transferencia en línea de la muestra purificada al sistema de cromatografía de líquidos, permitió eliminar una gran parte de los interferentes de matriz, sin pérdida significativa de los compuestos de interés.

Asimismo, el diseño de un sistema EFS-CLAR en línea condujo a una óptima sensibilidad ya que toda la muestra procesada (y no sólo una alícuota del extracto) fue analizada.

2. Se determinaron las figuras de calidad del método por el análisis de 7 réplicas de tejido blanco (250 mg cada una) dopadas a 0.2 ng/mg con carbofurano y 7-fenolcarbofurano. En estas condiciones, se obtuvo una recuperación promedio superior a 90%, con coeficientes de variación del 12%, para ambos analitos. Se comprueba así la exactitud del método y, aunque la precisión no es excelente, se considera aceptable para este nivel de concentración, dada la complejidad de la matriz.

La cantidad mínima detectable en estas muestras fue de 0.08 ng/mg (considerando muestras de 250 mg), lo cual está de acuerdo con el criterio de la EPA para el límite de detección.

3. La aplicación del método en el análisis de tres muestras de tejido epitelial, obtenidas de mujeres campesinas que estuvieron expuestas al pesticida, indicó la posible presencia del metabolito 7-fenolcarbofurano en dos de ellas. Este resultado es una llamada de alerta ya que podría estar relacionado con la

fuerte incidencia de cáncer cérvico-uterino que se ha presentado entre las mujeres de la región de donde provienen las muestras.

Sin embargo, los resultados requieren ser corroborados por alguna técnica alterna (idealmente cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas) debido a que el método desarrollado no es suficientemente selectivo. Dada la variabilidad entre individuos, no se descarta que, en algunos tejidos, pudiera haber componentes de polaridad e hidrofobicidad muy parecida a la de los analitos, por lo que se comportarían de manera muy semejante en todas las etapas del método, incluyendo la separación cromatográfica. Estos interferentes de matriz podrían así ocasionar un "falso positivo".

4. A pesar de sus limitaciones, el método propuesto es bastante sensible y permite detectar algunas decenas de nanogramos de los compuestos de interés en las muestras de tejido. Además, tiene la ventaja de que sólo requiere de materiales y equipo convencionales, que se encuentran en la mayor parte de los laboratorios de análisis. Por ello, podría ser empleado como un primer paso exploratorio para descartar la presencia del pesticida, y particularmente de su metabolito, en el tejido epitelial de mujeres con riesgo.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. www.cancerteam.com.ar
2. www.saludhoy.com
3. www.ecologiasocial.org.ar
4. <http://omega.ilce.edu.mx:3000>
5. Fluhman, C. F. El cuello uterino y sus enfermedades. Salvat Editores, Barcelona, 1963.
6. Botella, L. J. El útero, fisiología y patología. Ediciones Díaz De Santos, Madrid, 1997.
7. www.geosalud.com
8. www.tusalud.com.mx
9. Encyclopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory and Instrumentation. Ed. R. A. Meyers, John Wiley & Sons, LTD, UK, 2000. V 7, 6111-6113, 6125 - 6126.
10. Vázquez Lira J. C. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México, 1999.
11. Nunes, G.S.; Barceló, D. *Trends Anal. Chem.* **1999**, *18*, 99-107.
12. Handbook of Pesticide Toxicology. Ed. Wayland J. Hayes, Jr, Edward R. Laws, Jr. Academic Press Inc., San Diego, California, 1991, V 3, 1125-1135, 1153-1156.
13. www.cepis.ops-oms.org
14. Bernal González M. Tesis de Maestría. Facultad de Química, UNAM, México, 2000.
15. McGarvey, B. D. J. *Chromatogr.* **1993**, *642*, 89-105.
16. Liška, I.; Slobodnik, J. J. *Chromatogr. A* **1996**, *733*, 235-258.
17. Jeong, M.L.; Chesney, D. J. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *389*, 53-57.
18. Martínez Fernández, J.; Parrilla Vázquez, P.; Martínez Vidal, J. L. *Anal. Chim. Acta* **2000**, *412*, 131-139.
19. www.fao.org
20. Marvin, C. H.; Brindle, I. D.; Hall, C. D.; Chiba, M. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1495-1497

21. López Blanco, M. C.; Cancho Grande, B.; Simal-Gándara, J. *J. Chromatogr. A* **2002**, 963, 117-123.
22. Cochrane, W. P.; Lanouette, M.; Trudeau, S. *J. Chromatogr.* **1982**, 243, 307-314.
23. Beauchamp, K. W. Jr.; Liu, D. D. W.; Kikta, E. J. Jr. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1989**, 72, 845 - 847.
24. García de Llasera, M. P.; Bernal - González, M. *Water Res.* **2001**, 35, 1933-1940.
25. Cramer, P.H.; Drinkwine, A.D.; Going, J.E.; Carey, A. E. *J. Chromatogr.* **1982**, 235, 489-500.
26. Sonobe, H.; Carver, R. A.; Kamps, L. R. *J. Chromatogr.* **1981**, 210, 356-359.
27. Abad, A.; Moreno, M.J.; Pelegrí, R.; Martínez, M. I.; Sáez, A.; Gamón, M.; Montoya, A. *J. Chromatogr.* **1999**, 833, 3-12.
28. Abad, A.; Moreno, M.J.; Montoya, A. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 347, 103-110.
29. Nunes, G. S.; Ribeiro, M. L.; Polese, L.; Barceló, D. *J. Chromatogr. A* **1998**, 795, 43-51.
30. Parrilla-Vázquez, P.; Martínez-Vidal, J. L.; Martínez - Fernández, J. *J. Chromatogr. B* **2000**, 738, 387-394.
31. Goewie, C. E.; Hogendoorn, E. A. *J. Chromatogr.* **1987**, 404, 352-358.
32. Caballo - López, A.; Luque de Castro, M. D. *J. Chromatogr. A* **2003**, 998, 51-59.
33. Hennion, M. C.; Pichon, V. *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 576-583.
34. Masqué, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F. *Trends Anal. Chem.* **1998**, 17, 384-394.
35. Hennion, M. C.; Coquart, V. *J. Chromatogr.* **1993**, 642, 211-224.
36. Ramsteiner, K. A. *J. Chromatogr.* **1988**, 456, 3-20.
37. Poole, C. F.; Gunatilleka, A. D.; Sethuraman, R. *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 17-39.
38. Snyder, L. R. *Practical HPLC Development*. John Wiley & Sons, Inc., N. Y., 1997
39. Liška, I. *J. Chromatogr. A* **2000**, 885, 3-16.
40. Vera-Ávila, L.E.; Gallegos-Pérez, J.L.; Camacho-Frias, E. *Talanta* **1999**, 50, 509-526.
41. Chang, R. R.; Jarman, W. M.; Hennings, J. A. *Anal. Chem.* **1993**, 65, 2420-2427.
42. Bioavailability and Bioequivalence Requirements, 21 CFR, 320 (1991).

43. USEPA, Appendix B to part 136 – Definition and procedure for the determination of the Method Detection Limit – Revision 1.11, Fed. Regist., 49, 43430 (1984c)

ANEXO 1

Fórmulas estadísticas empleadas en el presente trabajo.

1. Linealidad

a) Ecuación de una línea recta: $y = bx + a$

$$b) \quad a = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$c) \quad a = y - bx$$

$$d) \quad r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2]}}$$

$$e) \quad \bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n} \quad \bar{y} = \frac{\sum_i y_i}{n}$$

$$f) \quad t = \left(\frac{a - \alpha}{S_e} \right) \sqrt{\frac{n \cdot S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}} \quad S_e = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2)S_{yy}}}$$

$$g) \quad S_{xx} = n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2$$

$$h) \quad S_{yy} = n \sum_i y_i^2 - (\sum_i y_i)^2$$

$$i) \quad S_{xy} = n \sum_i x_i y_i - (\sum_i x_i)(\sum_i y_i)$$

$$j) \quad t = \left(\frac{b - \beta}{S_e} \right) \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}}$$

$$k) \quad \text{I.C.: } b \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$l) \quad t = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

$$m) \quad \text{I.C.: } \bar{x} - t_{\alpha/2} \cdot \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \leq R \leq \bar{x} + t_{\alpha/2} \cdot \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

2. Nomenclatura

x, y	Variables
	x Variable independiente
	y Variable dependiente
y/x	Y dado x
b, β	Pendiente de la recta de regresión de y/x
a, α	Ordenada al origen de la recta de regresión de y/x
\bar{x}	Media de los valores observados de x
r	Coefficiente de correlación momento producto
n	Tamaño de la muestra (número de determinaciones)
(n-1) ó (n-2)	Término que se conoce como grados de libertad
μ	Media poblacional
α	Nivel de significancia de la prueba estadística
s	Desviación estándar de muestra
s ²	Varianza de muestra
t	Valor calcula de la t de Student
$t_{\alpha/2}$	Valor de tablas de la distribución t de Student para el nivel de significancia α con (n-1) o (n-2) grados de libertad
I. C.	Intervalo de confianza