



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**DESARROLLO DE METODOLOGÍA ANALÍTICA  
PARA LA DETERMINACIÓN DE LA BIOTOXINA  
ÁCIDO DOMOICO**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA**

**PRESENTA**

**DENY YURIRIA MARÍN PÉREZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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:

**PRESIDENTE:** PEDRO VILLANUEVA GONZÁLEZ

**VOCAL:** LUZ ELENA VERA ÁVILA

**SECRETARIO:** JOSEFINA ELIZALDE TORRES

**1er. SUPLENTE:** MINERVA CARRASCO FUENTES

**2° SUPLENTE:** ERNESTO SÁNCHEZ MENDOZA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 115, DEPARTAMENTO DE QUIMICA ANALÍTICA, DIVISION  
DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUIMICA, UNAM.**

---

**ASESOR DEL TEMA:**

DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA

---

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. EN C. ROSARIO COVARRUBIAS  
HERRERA

---

**SUSTENTANTE:**

MARÍN PÉREZ DENY YURIRIA

**DEDICADA  
A MIS PADRES  
PORQUE GRACIAS A USTEDES AÚN SIGO AQUÍ**

## AGRADECIMIENTOS:

Gracias a la **Facultad de Química**, que me permitió realizar mis estudios y por ser mi segunda casa durante todo este tiempo.

A mis padres **Graciela Pérez** y **José Roberto Marín**, quienes me otorgaron su apoyo para realizar esta difícil tarea, a mi hermana **Araceli** y mis sobrinos **Hugo** y **Jazmín** quienes siempre me apoyaron.

A la **Dra. Luz Elena Vera Ávila**, por la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, que estuvo pendiente en mi proyecto y proporcionarme los conocimientos necesarios para lograr terminar la tesis.

A la **M. en C. Rosario Covarrubias Herrera**, porque tuvo la paciencia de enseñarme, ayudarme en terminar la tesis, sobre todo encontré una gran amiga incondicional.

A **David Chávez Romo**, gracias por hacer amena mi estancia en el laboratorio y por ayudarme a terminar la tesis en todos los aspectos.

A **Marce, Olivia, Blanca** y **Raúl**, por ser parte de un gran laboratorio y apoyarme hasta el último momento.

A mis grandes amigos **Tania, Paola, Perlita** y **Armando**, que siempre puedo contar con ellos no importa lo lejos que nos encontremos.

A mis dos grandes amigas **Abigail** y **Beatriz**, que estuvimos juntas hasta el último momento de la carrera.

Y gracias también a **Idalia, Olga, Angélica, Silvia, Jonathan, Manuel, Héctor, Erick, Sandra, Víctor, Ernesto, Mitzy, Jesús, Jorge, Nancy, Gerardo**, a toda la gente que me faltó mencionar pero los tengo presente, por cada momento que estuvimos juntos, a todos gracias por creer en mí.

A **Guadalupe Bucio Mejía**, que me animo y me apoyo en cada momento.

## ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCION.....	4
II. ANTECEDENTES.....	8
II.1. Marea roja.....	8
II.2. Dinoflagelados y diatomeas.....	14
II.3. Biotoxinas marinas.....	15
II.4. Acido domoico.....	16
II.4.1. Estructura y propiedades.....	16
II.4.2. Historia.....	18
II.4.3. Géneros causantes.....	19
II.4.4. Mecanismo de acción.....	19
II.4.5. Síntomas tóxicos.....	20
II.4.6. Métodos de análisis.....	20
II.5. Extracción en fase sólida (EFS).....	22
II.5.1. Generalidades.....	22
II.5.2. Procedimiento de la EFS.....	24
II.5.3. Mecanismos de retención.....	27
II.5.4. Diseño del proceso de EFS.....	29
II.5.5. Extracción en fase solida en línea.....	30
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	32
III.1. Hipótesis.....	32
III.2. Objetivos.....	32
Objetivo general.....	32
Objetivos particulares.....	32
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	34
IV.1. Equipo y Material.....	34
IV.2. Reactivo y Disoluciones.....	35
IV.3. Procedimientos y metodología analítica.....	36
IV.3.1. Condiciones cromatográficas.....	36
IV.3.2. Extracción en fase sólida.....	37
IV.3.3. Montajes experimentales.....	40
IV.3.4. Análisis de muestras.....	43
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
V.1. Desarrollo del método analítico.....	45
V.1.1. Condiciones cromatográficas.....	45
V.1.2. Preparación de muestra.....	47
V.1.2.1. Diseño del método de preparación de muestra.....	47
V.1.3.1. Optimización del proceso de extracción en fase sólida.....	49
V.2. Validación del método analítico.....	56
V.2.1. Estabilidad del acido domoico.....	56
V.2.2. Linealidad del método.....	57
V.2.3. Precisión y exactitud del método.....	61
V.2.4. Limite de detección del método.....	63
V.3. Aplicación del método en muestras reales de agua de mar.....	65
VI. CONCLUSIONES.....	71
Anexo.....	74
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

## RESUMEN

El ácido domoico es una biotoxina marina producida por microalgas, principalmente diatomeas del género *Pseudonitzschia*, que es causante de la llamada “intoxicación de tipo amnésico” por ingestión de moluscos o mariscos contaminados. Debido a su potente acción sobre el sistema nervioso central, el ácido domoico puede provocar no sólo una pérdida temporal de memoria en las personas intoxicadas, sino incluso la muerte. Por ello es importante establecer monitoreos rutinarios que permitan detectar la presencia de esta biotoxina, tanto en los organismos marinos de consumo humano como en el agua de mar, particularmente en las localidades dedicadas al cultivo o la pesca de estos productos.

Las concentraciones de ácido domoico que podrían esperarse en el agua de mar durante un evento de florecimiento algal nocivo de las diatomeas productoras (comúnmente llamado marea roja), son extremadamente bajas. Aunque se han reportado algunos métodos para determinación de ácido domoico en fitoplancton, organismos marinos y agua de mar, la instrumentación utilizada es costosa y sofisticada (cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas tándem, CLAR-EM/EM), o bien es menos refinada (CLAR-Fluorescencia), pero requiere de complicados y largos procesos de preparación de muestra, incluyendo derivatización del analito. El presente trabajo propone un método alternativo, preciso, robusto y altamente sensible, que sólo requiere de instrumentación convencional para la determinación de ácido domoico en agua de mar, a niveles de concentración del orden de ultra-trazas (< 1 parte por billón).

La metodología desarrollada se llevó a cabo en dos etapas:

- I. Preconcentración y limpieza de la muestra mediante un cartucho de extracción en fase sólida (EFS) empacado con un adsorbente de fase reversa C-18 (EFS fuera de línea).

II. Carga del extracto en una precolumna de fase reversa polimérica y elución en línea a la columna analítica del cromatógrafo de líquidos, equipado con detector UV, para su separación y determinación (EFS-CLAR/UV en línea).

En la primera etapa se optimizaron las condiciones experimentales con el objeto de lograr un alto factor de preconcentración del ácido domoico, así como la eliminación de sales y de una buena parte de los interferentes presentes en la matriz de la muestra. La segunda etapa tuvo como objetivo aumentar significativamente la sensibilidad y selectividad del método, analizando todo el extracto obtenido del cartucho y ajustando las condiciones cromatográficas para separar la señal del analito de cualquier otra señal debida a interferencias remanentes.

El método finalmente establecido permitió procesar volúmenes de muestra de 100 mL en cada análisis, lo que se traduce en factores de preconcentración de varios miles, comparado con una inyección directa de la muestra en el cromatógrafo de líquidos. Los cromatogramas obtenidos a alta sensibilidad de detección mostraron una línea base con poco ruido de fondo y sin interferencias en la zona de elución del analito.

La evaluación estadística del método desarrollado condujo a los siguientes resultados:

- Intervalo de linealidad: 50 ppt (partes por trillón) a 3 ppb (partes por billón) de ácido domoico, equivalente a una cantidad absoluta de 5-300 ng.
- Precisión y exactitud (determinadas a concentraciones de 300 ppt de ácido domoico): coeficiente de variación de 4.6 % y recuperación promedio de 94.5 %.
- Límite de detección del método: 46 ppt de ácido domoico, equivalente a una cantidad absoluta de 4.6 ng.



El método se aplicó con excelentes resultados en tres diferentes muestras de agua de mar colectadas en: Acapulco, Gro., Tecolutla, Ver. y Sisal, Yuc. Los cromatogramas obtenidos confirmaron la efectividad y selectividad del método, puesto que las señales residuales de las diferentes matrices no interfirieron con la detección de la biotoxina.

En conclusión, se desarrolló un método simple, sensible y selectivo para la determinación de ácido domoico a muy bajos niveles de concentración en agua de mar. Este método puede implementarse en cualquier laboratorio que cuente con el equipo básico para hacer análisis de tipo ambiental, lo que debería facilitar el establecimiento de programas de monitoreo rutinario de esta biotoxina en las costas del país.

## I. INTRODUCCION

Durante las dos últimas décadas se han escrito muchos reportes relacionados con las mareas rojas. La presencia de florecimientos algales es hasta cierto punto un fenómeno natural que ocurre periódicamente según lo corroboran registros históricos, sin embargo, este fenómeno se ha incrementado en frecuencia, intensidad y distribución geográfica.

Las mareas rojas se presentan principalmente durante la primavera y el verano. Cuando los vientos soplan y enfrían la capa superficial del mar, el agua del fondo emerge para reemplazar al agua superficial. Esta agua emergente, además de ser rica en nutrientes, puede contener grandes cantidades de quistes de dinoflagelados, especie de plancton marino que se encuentra en fase de latencia. Cuando el afloramiento es menos intenso, el agua se calienta y se vuelve más tranquila, entonces los quistes germinan y comienzan a crecer y a multiplicarse. Los vientos y las corrientes marinas pueden contribuir a concentrarlos en ciertas zonas. Los florecimientos algales nocivos son una proliferación de especies de algas tóxicas que afectan negativamente los recursos naturales y secretan toxinas que pueden afectar a los seres humanos. Estos florecimientos algales pueden impartir una gama de coloraciones al agua de mar, desde amarilla o verde hasta café o roja, que es la más frecuente, de donde deriva el término de marea roja. La aparición de esas tonalidades en una gran extensión de la superficie del mar es uno de los signos que alertan a la población respecto a dicho fenómeno. Estos eventos comienzan de forma espontánea e impredecible y tienen una duración variable.

Existen diversas toxinas marinas relacionadas con los florecimientos algales nocivos. Las especies involucradas en la producción de las mismas son los dinoflagelados, componente mayor del fitoplancton, seguido por las diatomeas y el resto son generalmente organismos del zooplancton.

Los mariscos bivalvos son especies esencialmente micrófagas, es decir, se alimentan de organismos microscópicos. El alimento ingresa a través del sifón

inhalante o en forma directa por las aberturas de las valvas, así filtran grandes volúmenes de agua lo que les permite obtener y concentrar apreciables cantidades de organismos componentes del plancton, incluidos los que producen sustancias tóxicas. Como consecuencia de la continua filtración de plancton tóxico, una gran cantidad de veneno se liga a los tejidos o se concentra en las glándulas digestivas de los mariscos. Los bivalvos más conocidos que se ven involucrados en estos episodios son: ostras, choros, cholgas, choritos, almejas, culengues, ostiones, navajuelas y machas.

Las toxinas pueden transmitirse a los seres humanos a través del consumo del marisco contaminado. Hasta el momento se carece de un antídoto, por lo que los enfermos deben atenderse lo más rápidamente posible en centros adecuados donde se les pueda mantener la función respiratoria hasta que la toxina se metabolice por completo, lo que ocurre alrededor de 12 horas después de la ingesta.

El fenómeno de la marea roja repercute también en la economía del país ya que entre sus efectos se encuentran la muerte masiva de peces, la reducción en la venta de mariscos y la disminución en el turismo. Actualmente no se cuenta con un método efectivo para la predicción y el control de los crecimientos masivos de dinoflagelados y diatomeas, debido a la dinámica de los mares donde se presentan. No es suficiente con la detección a simple vista de los cambios en la superficie del mar, ya que además éstos no son siempre evidentes, por lo que se hace necesario recurrir a otro tipo de mecanismos más específicos y confiables. Es necesario seguir insistiendo en las investigaciones y programas de monitoreo con técnicas analíticas estandarizadas, susceptibles de implementarse en los litorales mexicanos.

Las biotoxinas marinas son responsables de un número importante de enfermedades asociadas a los productos pesqueros. Entre ellas pueden citarse: la intoxicación paralizante por moluscos (PSP), la intoxicación diarreica por moluscos (DSP), la intoxicación neurotóxica por moluscos (NSP), la intoxicación amnésica por moluscos conocida también como intoxicación por

ácido domoico (ASP), la ciguatera y la tetradotoxina. En este trabajo nos enfocamos al estudio de la neurotoxina ácido domoico, producida por una especie de fitoplancton en el que predomina la diatomea *Pseudonitzschia ssp*, identificada por primera vez en 1987, en la isla Príncipe Eduardo, Canadá.

En los últimos años, se han reportado en publicaciones internacionales algunos métodos para determinar ácido domoico en agua de mar, fitoplancton y bilvalvos (moluscos). La técnica comúnmente utilizada es la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a diversos detectores como: UV (CLAR-UV), espectrometría de masas tandem (CLAR-EM-EM) o fluorescencia (CLAR-F). En el caso de los detectores más simples (UV y F), los procedimientos de preparación de muestra suelen ser laboriosos y generalmente requieren de reacciones de derivatización. Por el contrario, el uso de la espectrometría de masas simplifica enormemente la preparación de muestra, pero estos equipos son muy costosos y requieren de personal altamente especializado. Es por ello que se considera aún necesario desarrollar metodologías analíticas más simples y acordes con los recursos instrumentales con que cuentan la mayoría de los laboratorios del país.

La extracción en fase sólida (EFS) es una técnica que se utiliza para concentrar y/o “limpiar” la muestra previo a la cuantificación de los compuestos de interés. El término “extracción en fase sólida” es debido a que el material de soporte utilizado es un sólido, a través del cual se hace pasar una muestra líquida o gaseosa. Los analitos son adsorbidos en el soporte y luego eluidos de acuerdo a sus diferentes afinidades con el material adsorbente y la fase móvil utilizada.

La finalidad del presente trabajo es proponer un nuevo método analítico, basado en la extracción en fase sólida acoplada a la cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV (EFS-CLAR/UV), para la determinación de ácido domoico en agua de mar a niveles de concentración del orden de trazas. Nuestra meta fue alcanzar límites de detección inferiores a la parte por billón con una metodología analítica simple, rápida y económica, pero al mismo tiempo precisa, exacta y robusta, que pudiera ser fácilmente implementada en

los laboratorios del país involucrados en estudios de toxicología y contaminación ambiental.

## II. ANTECEDENTES

### II.1. Marea roja

Las mareas rojas se producen por una proliferación masiva de la población total de fitoplancton o de microalgas, principalmente algunas especies de dinoflagelados, diatomeas y cianobacterias, debido a diferentes factores biológicos (organismos fitoplanctónicos), antropogénicos (contaminación orgánica del mar por las descargas de aguas residuales u otro tipo de contaminantes producidos por el ser humano) y ambientales (como temperatura, luminosidad, salinidad, corrientes, vientos, latitud, profundidad, fenómeno El Niño, etc.). La marea roja es un fenómeno que se presenta de manera espontánea, impredecible y con una duración variable [1,2].

Usar el término marea roja para referirse a las proliferaciones algales nocivas puede conducir a errores, ya que hay especies que son tóxicas a muy bajas concentraciones y no producen un cambio en la coloración del agua de mar. En cambio otras proliferaciones pueden producir una fuerte coloración y ser inocuas.

Los científicos usan el término "*Harmful Algae Bloom*" o "*HAB*" ("*Floraciones Algales Nocivas*" o "*FAN*", en español) para referirse al fenómeno de florecimiento que involucra la presencia de toxinas o que causa impactos negativos en la cadena trófica [2].

Las algas nocivas son plantas unicelulares microscópicas que viven en los mares. Sin embargo, la mayoría de las especies de algas o fitoplancton marino no son nocivas y sirven como productores de energía en el inicio de la cadena trófica, sin la cual las especies vivas mayores no podrían existir.

Las floraciones de algas nocivas son fenómenos naturales causados por organismos fitoplanctónicos microscópicos que, en condiciones ambientales favorables para su desarrollo, se multiplican explosivamente y se concentran en determinadas localidades, donde pueden producir alteraciones a la salud humana, la vida marina o la economía del área afectada. La coloración y la intensidad que alcanzan las floraciones algales nocivas, depende de la especie que prolifere y las concentraciones que ésta alcance.

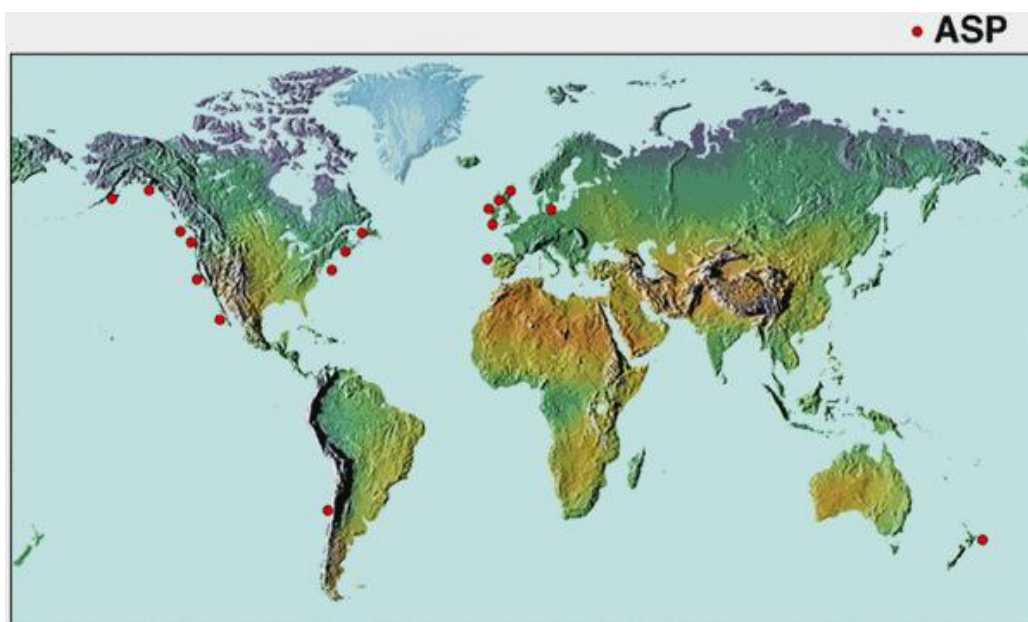
El crecimiento poblacional, la gradual eutroficación de las costas y el cambio climático global son factores importantes en el cambio futuro de las aguas costeras que, ante las actuales perspectivas, podrían favorecer el desarrollo de mareas rojas y el aumento de los dinoflagelados tóxicos. Por ello es indispensable una vigilancia constante y periódica del fitoplancton de las aguas costeras, principalmente en aquellos lugares que por su crecimiento turístico o desarrollo de la acuacultura tienden a deteriorar más rápido la calidad de esta agua [1].

Las floraciones algales nocivas han estado distribuidas alrededor del mundo, siendo los trópicos los que han tenido mayor presencia de éstas.

Los principales problemas de salud pública causados por algas nocivas a nivel mundial son:

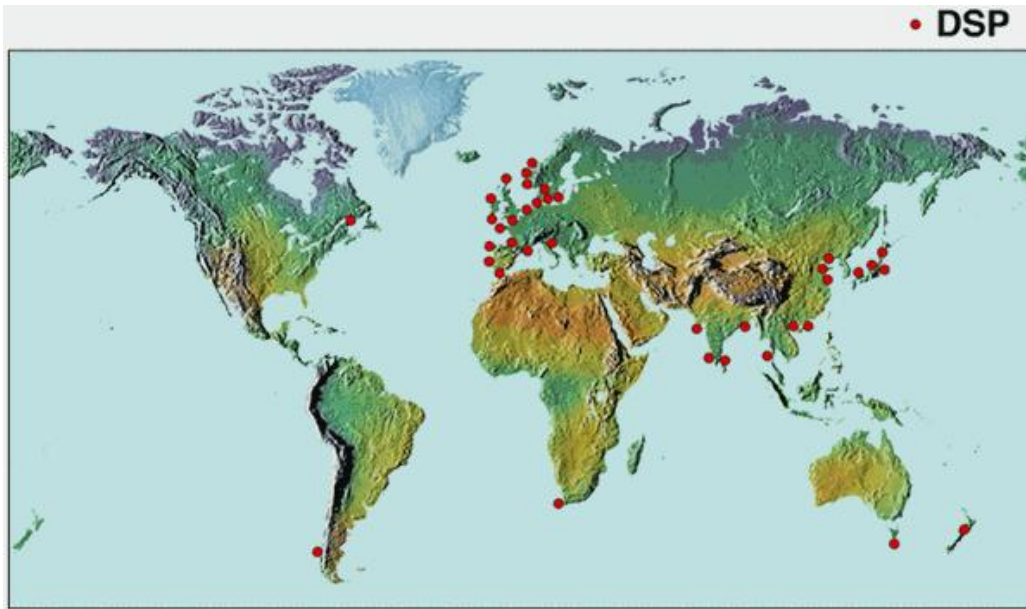
- Intoxicación amnésica por moluscos (ASP, del nombre en inglés: amnesic shellfish poisoning), **Figura II. 1.**
- Intoxicación diarreica por moluscos (DSP, del nombre en inglés: diarrhetic shellfish poisoning), **Figura II.2.**
- Intoxicación neurotóxica por moluscos (NSP, del nombre en inglés: neurotoxic shellfish poisoning), **Figura II.3.**
- Intoxicación parálitica por moluscos (PSP, del nombre en inglés: paralytic shellfish poisoning), **Figura II.4.**

En los mapas de las **Figuras II.1 – II.4**, los puntos rojos indican donde se han ubicado las floraciones algales nocivas registradas que causaron los diferentes tipos de intoxicación [2].

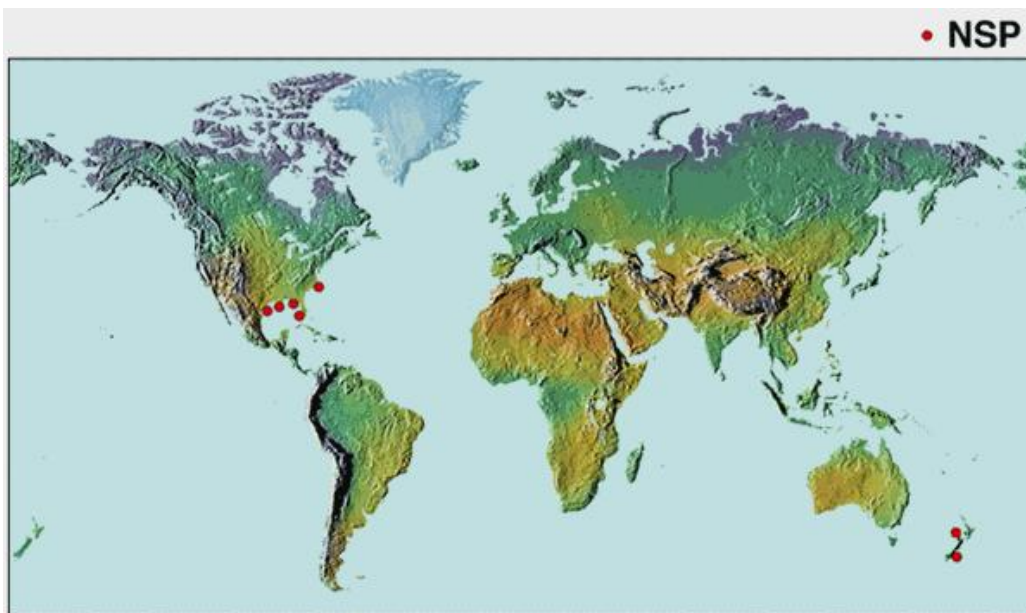


**Figura II.1** Intoxicación amnésica por moluscos (ASP: amnesic shellfish poisoning).

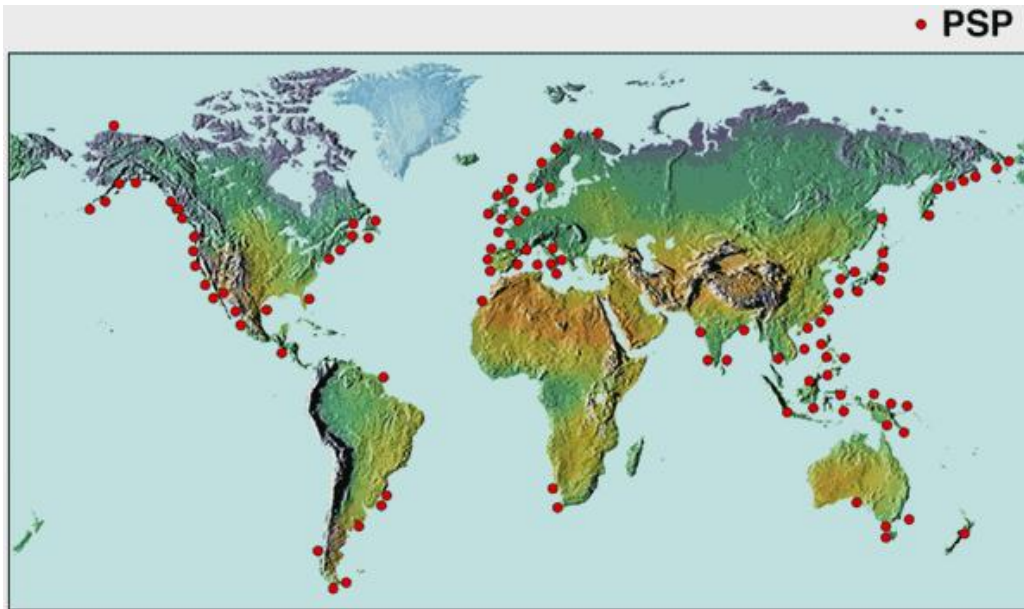




**Figura II.2** Intoxicación diarreica por moluscos (DSP: diarrhetic shellfish poisoning).



**Figura II.3** Intoxicación neurotóxica por moluscos (NSP: neurotoxic shellfish poisoning).



**Figura II.4** Intoxicación paralítica por moluscos (PSP: paralytic shellfish poisoning).

En años recientes este fenómeno se ha presentado recurrentemente en distintas costas del mundo. Algunas investigaciones han demostrado que se debe principalmente al transporte de las formas enquistadas de los dinoflagelados por corrientes marinas o por el lastre de los barcos.

La marea roja en México no es un fenómeno nuevo, en la **Tabla II.1** se muestran los estados afectados así como el organismo que la produjo durante el 2009.

Los microorganismos generadores de mareas rojas tóxicas están clasificados dentro de diferentes grupos taxonómicos entre los cuales destacan las diatomeas, cianofitas y dinoflagelados, estos últimos producen la mayor variedad y las sustancias más tóxicas de las mareas rojas.

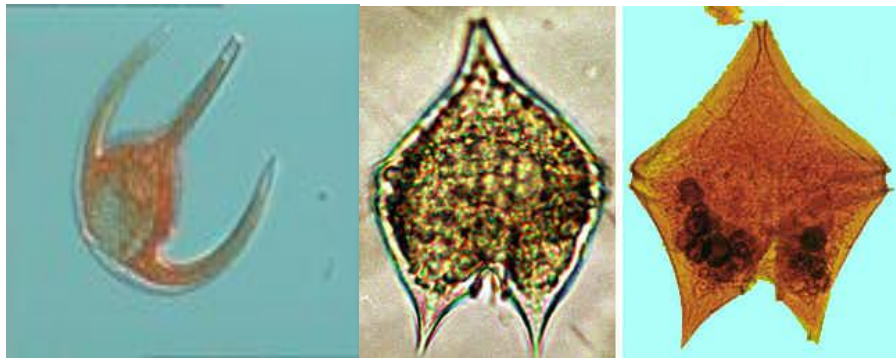
Tabla II.1 Presencia de marea roja en costas nacionales durante 2009 [3].

Lugar donde ocurrió el evento	Duración del evento	Acciones implementadas	Organismo productor	Tipo de toxina	Impacto en la salud
Bahía de Mazatlán, Sinaloa	Del 14 al 16 de enero	No se implementó veda	Mesodinium rubrum	No tóxica	No se registraron defunciones ni intoxicados
Canal de San Lorenzo, Bahía de La Paz, BCS	Del 27 al 29 de febrero	No se implementó veda	Mesodinium rubrum	No tóxica	No se registraron defunciones ni intoxicados
Bahías de Manzanillo, Colima	Del 4 al 25 de marzo	No se implementó veda	Mesodinium rubrum	No tóxica	No se registraron defunciones ni intoxicados
Tonalá y Puerto Madero, Chiapas	Del 7 de marzo al 1 de agosto	Se implementó veda sanitaria, seguimiento de monitoreo de fitoplancton y producto. Comunicación de riesgo a la población	Pseudonitzchia ssp	Toxina amnésica: Ácido Domoico	No se han registrado defunciones ni intoxicados
Salina Cruz y Salinas del Marqués, Oaxaca	Del 23 de marzo al 5 de abril	Se implementó veda sanitaria, seguimiento de monitoreo de fitoplancton y producto. Comunicación de riesgo a la población	Pyrodinium bahamenses var compressum	Toxina paralizante: Saxitoxina	No se han registrado defunciones ni intoxicados
Salina Cruz y Salinas del Marqués, Tehuantepec, Oaxaca	Del 1° al 22 de mayo	Se implementó veda sanitaria, seguimiento de monitoreo de fitoplancton y producto. Comunicación de riesgo a la población	Alexandrium minutum y Prorocentrum micans	Toxina paralizante: Saxitoxina  Toxina diarreica	No se han registrado defunciones ni intoxicados  Se detectó mortandad de peces.
Estero Coyote, localidad de Punta Abreojos, Baja California Sur	Del 19 de junio al 14 de julio	Se implementó veda sanitaria, seguimiento de monitoreo de fitoplancton y producto (análisis en producto, toxina no detectable)	Pseudonitzchia ssp	Toxina amnésica: Ácido Domoico	No se han registrado defunciones ni intoxicados.
Playa Bagdad, municipio de Matamoros, Tamaulipas	En el mes de octubre	Se implementó veda sanitaria, seguimiento de monitoreo de fitoplancton y producto.	Karenia brevis	Toxina neurotóxica	No se han registrado defunciones ni intoxicados  Mortandad de peces y otras esp. 200 ton

## II.2. Dinoflagelados y diatomeas

Los eventos de mareas rojas tóxicas y florecimientos de fitoplancton son producidos por varias especies de microalgas, entre las cuales destacan los dinoflagelados por la diversidad de especies involucradas en estos fenómenos. La mayoría de las especies pertenecen al plancton y sólo algunas son de hábitos bentónicos [1].

Los dinoflagelados (**Figura II.5**) están bien representados en ambientes marinos y son muy diversos en formas. Por lo general poseen dos flagelos y pueden ser tecados o atecados (desnudos), la mayoría son fotosintéticos, pero hay heterótrofos [4]. Muchas especies producen toxinas que causan distintos envenenamientos por consumo de mariscos y pescados (envenenamiento paralítico, neurotóxico, diarreico y ciguatera).



**Figura II.5** Dinoflagelados [5,6].

Las diatomeas (**Figura II.6**) son abundantes y con frecuencia dominan al fitoplancton marino. Están formadas por dos valvas y banas singulares de sílice y son fotosintéticas.

Las especies de diatomeas que se relacionan con la producción de toxinas son muy pocas, según fue descrito por Subba en 1988. Su carácter nocivo se los confiere la producción de ácido domoico, poderosa toxina que provoca el envenenamiento amnésico por ingestión de mariscos (ASP), enfermedad que causa la muerte a los humanos [1].



**Figura II.6** Diatomeas al microscopio [7].

Estas diatomeas no han sido identificadas formando florecimientos en aguas mexicanas, aunque sí se menciona frecuentemente en informes a *Pseudonitzschia pungens* y *Pseudonitzschia seriata* en las costas del Golfo de México y *Pseudonitzschia pungens*, *Pseudonitzschia seriata* y *Pseudonitzschia delicatissima* en el Golfo de California. Actualmente todo el grupo de *Pseudonitzschia* está sujeto a revisión por su producción de toxinas.

### **II.3. Biotoxinas marinas**

Las biotoxinas marinas son responsables de un número importante de enfermedades asociadas a los productos pesqueros.

En general, estas toxinas son producidas por algas del fitoplancton (diatomeas, dinoflagelados). No todos los dinoflagelados del plancton marino elaboran toxinas. Los moluscos bivalvos que se alimentan por filtración de agua, incorporan el

plancton y acumulan la toxina. En el caso del caracol de mar (no es filtrador sino predador), acumula la toxina al alimentarse con bivalvos tóxicos. El hombre al ingerir moluscos tóxicos manifiesta un cuadro de intoxicación cuya gravedad dependerá de la cantidad de toxina ingerida.

En la **Tabla II.2** se muestran las biotoxinas marinas más comunes, el microorganismo que las produce y el tipo de efecto que causa el veneno en los humanos.

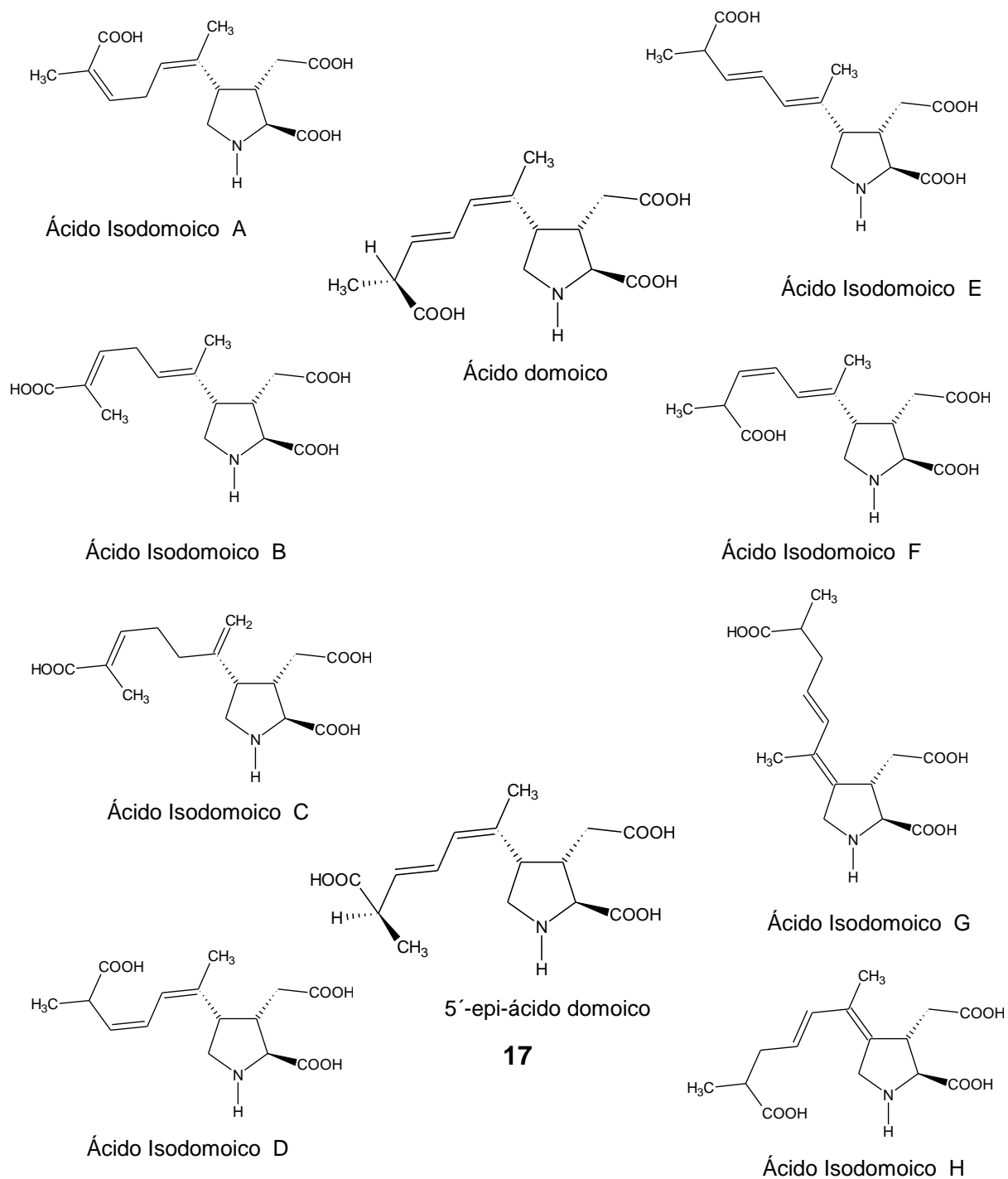
**Tabla II.2** Tipos de biotoxinas marinas [8].

<b>Biotoxina</b>	<b>Veneno</b>	<b>Microorganismo</b>
Saxitoxina	Veneno paralizante	Dinoflagelados: Nombre anterior: <i>Alexandrium catenella</i> , <i>acatenella</i> , <i>tamarense</i> . Nombre actual: <i>Gymnodinium catenatum</i> , <i>Pyrodinium bahamense</i>
Brevetoxina	Veneno neurotóxico	Dinoflagelados: nombre anterior: <i>Ptychodiscus brevis</i> ., <i>Gymnodinium breve</i> nombre actual: <i>Karenia Brevis</i>
Ácido domoico	Veneno amnésico	Diatomea: <i>Nitschia Pungens v. Multiseris</i> <i>P. Delicatissima</i> , <i>P. Multiseris</i> <i>P. Pseudo-Delicatissima</i> antes <i>N. Pseudoseriata</i> Hasle hoy <i>Pseudonitzschia Australis</i>
Ácido okadaico	Veneno diarreico	Dinoflagelado: <i>Dinophysis fortii</i> , <i>acuminata</i> , <i>acuta</i> , <i>rotundataa</i> , <i>prorocentrum</i> , <i>lima</i> .
Ciguatera Scaritoxina Maitotoxina Ciguatoxina	Ciguatera	Dinoflagelado: <i>Gambierdiscus Toxicus</i> (Maitotoxina)
Neosaxitoxina Saxitoxina	Cianobacterias	<i>Cyanophyta</i> , <i>Aphanazomenon flosaquae</i> <i>Anabaena</i> <i>Ocillatoria</i>

## II.4. Ácido domoico

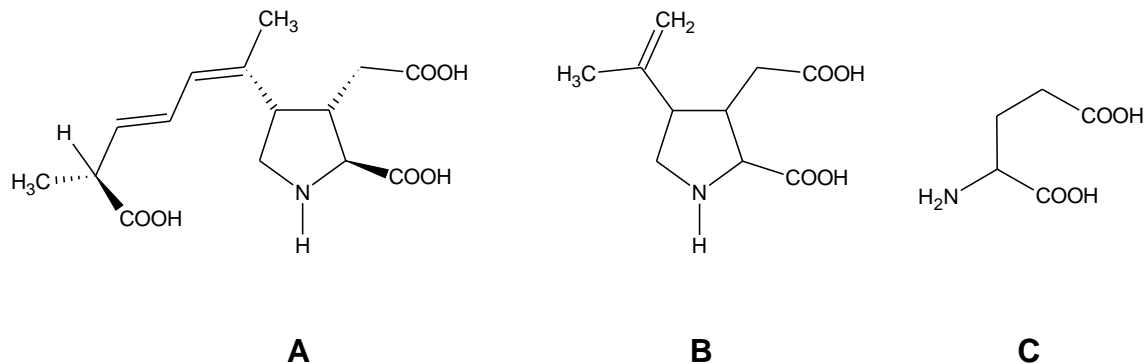
### II.4.1. Estructura y propiedades

La toxina responsable de la intoxicación de tipo amnésico es el ácido domoico cuya estructura química se muestra en la **Figura II.7**. Esta molécula tiene tres grupos carboxílicos y un grupo amino, su estructura es similar a la de los aminoácidos neuroexcitadores, el ácido glutámico y el ácido kaínico (**Figura II.8**) [9].



**Figura II.7** Estructura química del ácido domoico y sus isómeros [9].

Estudios del alga *Chondria armata* dieron lugar al descubrimiento de los ácidos isodomoicos A, B y C, sin embargo ninguno de estos isómeros se ha reportado en plancton o tejido de molusco. El ácido domoico es la toxina predominante en el plancton o mariscos contaminados, mientras que su enantiómero, el 5'-epi-ácido domoico, y tres de los isómeros geométricos, ácidos isodomoicos D, G y F, se han aislado en menor cantidad. Así mismo, se ha determinado que la actividad del los isómeros D y E es casi la misma que la del ácido domoico [9].



**Figura II.8** Estructura del ácido domoico (A), ácido kaínico (B) y ácido glutámico (C) [9].

Algunas de las más relevantes propiedades físicas del ácido domoico se muestran en la **Tabla II.3**. De acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC, el nombre de este compuesto es ácido(3*S*,4*S*)-4-(carboximetil)-3-[(1*Z*,3*E*,5*R*)-5-carboxi-1-metilhexa-1,3-dienil]-3,4-dihidro-2*H*-pirrol-5-carboxílico.



Tabla II.3 Propiedades físicas.

Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	Forma	Solubilidad (mg/ mL)		Longitud de onda (nm)	pka	
			Metanol	Agua		grupos carboxilo	grupo amino
C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>6</sub>	311.33	Sólido blanco	0.6	8	242	1.85, 4.47 y 4.75	10.60

#### II.4.2. Historia

El primer reporte sobre intoxicación con ácido domoico se presentó en Canadá en 1987, en la isla Prince Edward, causado por el consumo de mejillones que afectó a más de 100 personas, ocasionando la muerte de tres de ellas. Además de los síntomas neurotóxicos en las víctimas, hubo pérdida de la memoria a corto plazo en muchas de ellas, de ahí derivó el nombre con el que comúnmente se conoce este síndrome: Amnesic Shellfish Poisoning [10].

#### II.4.3. Géneros causantes

El ácido domoico fue aislado por primera vez de la macroalga *Chondria armata domoi* y posteriormente de *Alsidium corallinum*, un alga del Mediterráneo. Subsecuentemente se le encontró en la diatomea *Pseudonitzschia ssp* en sus diferentes variedades: *P. pungens multiseriis*, *P. pseudodelicatissima*, *Amphora coffaeiformis*, *P. actydrophilila*, *P. australis* y *P. seriata* [9].

La toxina es resistente a altas temperaturas (resiste la cocción casera), es estable en medio ácido (vinagre, limón), no genera inmunidad y no se conoce antídoto. Los moluscos tóxicos no pueden identificarse por evaluaciones organolépticas ya que la toxina no altera su color, olor ni sabor.

#### II.4.4. Mecanismo de acción

Las intoxicaciones de tipo amnésico son generadas por la acción del ácido domoico sobre el sistema nervioso central. A la fecha se tienen algunos avances que demuestran la acción selectiva de este ácido sobre los mecanismos neuronales en invertebrados. En estudios realizados con células nerviosas cerebrales en ratas, se ha descubierto que este ácido actúa con gran potencia de excitación seguida de una gradual despolarización del potencial de membrana, sobre todo en la región del hipocampo.

Con base en estudios bioquímicos y fisiológicos, concretamente se ha propuesto que el ácido domoico actúa en tres distintos receptores que son quisqualato, N-metil-d-aspartato (NMDA) y kainato.

El mecanismo de la toxina ácido domoico es explicado por su estructura similar a la del ácido glutámico que es un neurotransmisor, pero presenta mayor fuerza de afinidad con sus receptores. El ácido domoico es tres veces más potente que su análogo el ácido kaínico y 100 veces más potente que el ácido glutámico [10].

El ácido domoico se une con alta afinidad a receptores glutamato del tipo quisqualato y también a receptores de la subclase NMDA abriendo los canales de membrana permeables al  $\text{Na}^+$ , provocando la entrada de  $\text{Na}^+$  y la despolarización de la membrana. El canal abierto por la unión de ácido domoico con un receptor NMDA (también accesible al kainato y quisqualato) es altamente permeable al  $\text{Ca}^{2+}$  e induce un aumento en la concentración intracelular de este catión. Como resultado se produce una activación sostenida de las enzimas calcio-sensibles, lo que finalmente conduce al agotamiento de la energía, hinchazón neuronal y muerte celular [1,10,11].

#### II.4.5. Síntomas tóxicos

Los síntomas más comunes de la intoxicación con ácido domoico son náusea, vómitos, calambres abdominales, dolor de cabeza, diarrea y pérdida de memoria. La pérdida de memoria y la edad se correlacionan bien; los menores de 40 años son más susceptibles a diarreas y los mayores de 50 años a pérdida de memoria. La pérdida de memoria es fundamentalmente de corto plazo.

#### II.4.6. Métodos de análisis

El bioensayo en ratón para las toxinas paralizantes (PSP) de la AOAC, también permite detectar ácido domoico en concentraciones de aproximadamente 40 µg/g tejido. La señal típica de la presencia de ácido domoico es un síndrome característico en el que los ratones se rascan con la pata trasera los hombros, seguido de convulsiones [11].

Para la detección de rutina de las toxinas ASP, el método de ensayo en ratón de la AOAC ha sido sustituido por métodos de Cromatografía Líquida con detectores de fluorescencia, UV con arreglo de diodos (UV-DAD) o espectrometría de masas tándem (EM/EM), que resultan herramientas más sensibles y confiables [11]. En la **Tabla II.4** se resumen algunos métodos reportados en la literatura, específicamente para la determinación de ácido domoico.

**Tabla II.4** Algunos métodos publicados para la determinación de ácido domoico en fitoplancton, organismos marinos y agua de mar.

Muestra	Técnica <sup>1</sup>	Proceso <sup>2</sup>	Resultados <sup>3</sup>	Referencia
Moluscos	CLAR-UV-DAD	El tejido de molusco es homogenizado con HCl. La mezcla se filtra y centrifuga tomando una alícuota del sobrenadante la cual es diluida, filtrada y analizada.	Se aplica cuando la concentración de ácido domoico es ≥20 µg/g de tejido.	[12]
Agua de mar	CLAR-EM/EM	Muestra de 75 mL de agua de mar, acidificada con 0.1% de ácido fórmico, filtrada en discos C18 y eluida con una mezcla acetónitrilo-agua (pH 8)	LDM 0.02 - 0.06 ng/mL Recobro 92.1 - 110.6 % DER 8.4 - 9.0 % Incertidumbre	[13]

		para determinar ácido domoico.	1.92, 0.23 y 0.03 para 10, 1.0 y 0.1 ng/mL	
Agua de mar y fitoplancton	CLAR-EM/EM	<p>La muestra de agua de mar es filtrada, acidificada con 2% de ácido fórmico, pasada por un cartucho C18 y eluida con una mezcla metanol-agua.</p> <p>La muestra de <i>Pseudonitzchia</i> se sonica y centrifuga para liberar el ácido domoico. Luego se filtra para separar las células del medio. El tratamiento subsecuente se realiza según el procedimiento antes descrito.</p>	<p><b>Agua de mar:</b>                      Recobro 95 - 104 %                      DER. 1-6 %                      Linealidad <math>r^2 = 0.9997</math>                      LDM 0.03 ng/mL                      LCM 0.1 ng/mL</p> <p><b>Recuperación en cultivo:</b> 98 %</p>	[14]
Mariscos	CLAR-ESI-EM/EM	<p>El tejido es removido del caparazón, combinado, homogenizado y sometido a ELP con metanol-agua a 60°C y 1500 psi. El extracto se centrifuga y el sobrenadante se diluye en metanol-acetona para su análisis.</p>	<p>Recobro 81 - 95 %                      Linealidad <math>r^2 = 0.999</math>                      LDM 0.02 ng/g                      LCM 0.5 ng/g</p>	[15]
Mariscos y fitoplancton	CLAR-F	<p>El tejido se homogeniza con metanol-agua y se centrifuga; el extracto se diluye en agua con una alícuota de NBD-F para su derivatización y análisis.</p> <p>La muestra de <i>Pseudonitzchia australis</i> se somete a sonicación en agua y se centrifuga. El sobrenadante es removido, filtrado y almacenado para su análisis. La derivatización del extracto se realiza con NBD-F en acetonitrilo y borato de sodio 0.1M. La reacción se para después de 3 min adicionando HCl 1M a la mezcla.</p>	<p><b>Fitoplancton:</b>                      Linealidad <math>r^2 = 0.998</math>                      LDM 0.1 ng/g</p> <p><b>Mariscos:</b>                      DER 3-5 %                      Linealidad <math>r^2 = 0.992</math></p>	[16]

Mejillones	CLAR-F	El tratamiento de la muestra es similar al método anterior.	LCM 25 ppb Recobro 97.6 – 99.3 %	[17]
------------	--------	---	--	------

<sup>1</sup> **CLAR**: cromatografía de líquidos de alta resolución; **EM/EM**: espectrometría de masas tandem; **ESI**: ionización por electrospray; **F**: detector de fluorescencia.

<sup>2</sup> **ELP**: extracción con líquidos presurizados; **NBD-F**: 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol; **NBD-Cl**: 4-cloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol.

<sup>3</sup> **R**: recuperación; **DER**: desviación estándar relativa; **LDM**: límite de detección del método; **LCM**: límite de cuantificación del método.

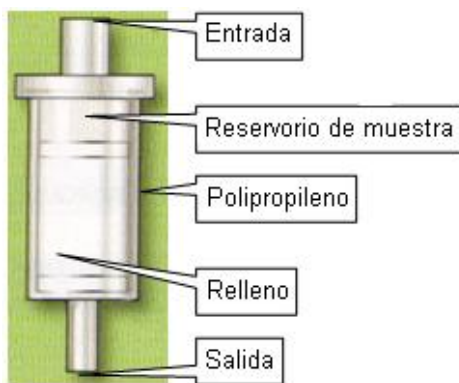
## II.5. Extracción en fase sólida (EFS)

### II.5.1. Generalidades

Introducida a finales de los años 70's, la extracción en fase sólida (EFS) es un método rápido de preparación de muestras mediante el cual se concentran y purifican los compuestos deseados antes de proceder a su análisis [18].

La EFS es, en esencia, una cromatografía en columna a microescala y por lo tanto el principio de separación se basa en las interacciones débiles (tipo Van der Waals, iónicas, hidrófobas, etc.) entre los constituyentes de una fase líquida, donde se encuentra disuelta la muestra, y una fase estacionaria, que determinan la repartición de los solutos [19].

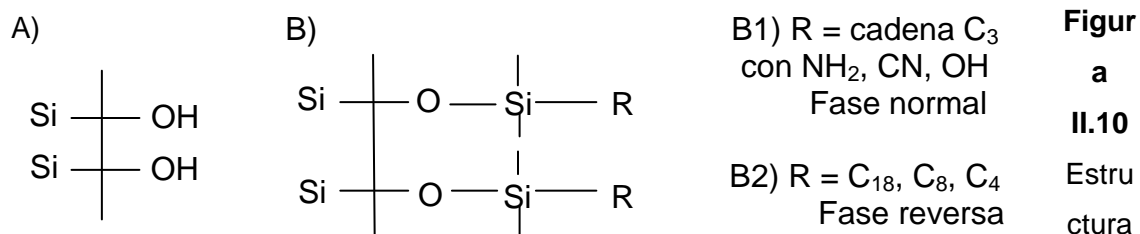
Comercialmente las fases estacionarias para la EFS se encuentran empacadas en cartuchos, depositadas sobre una membrana porosa (disco), en forma de fibra recubriendo la punta de una aguja (microextracción en fase sólida) o bien recubriendo una pequeña barra magnética. Probablemente los dispositivos de EFS más populares siguen siendo los cartuchos de polipropileno u otro polímero inerte aunque también se encuentran en vidrio. La estructura básica de un cartucho se muestra en la **Figura II.9**.



**Figura II.9** Estructura base de un cartucho de EFS [20].

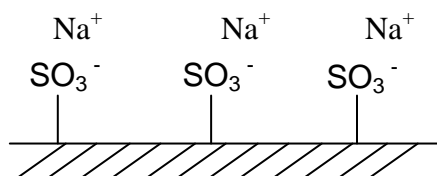
Los rellenos de los cartuchos de EFS son polímeros tridimensionales que generalmente están constituidos por dos tipos de materiales: sílice o resinas orgánicas. Las interacciones que se produzcan entre el analito y el relleno del cartucho están condicionadas por el tipo de material y por los grupos funcionales presentes en éste.

Los adsorbentes (relleno) más populares son los basados en sílice debido principalmente a que son rígidos, no excesivamente caros, reproducibles, estables y no tienden a encogerse o a hincharse en presencia de disolventes acuosos u orgánicos. Los rellenos de sílice modificada químicamente contienen grupos funcionales unidos covalentemente a la superficie mediante enlaces silano. El objetivo de modificar la superficie del adsorbente es modificar su selectividad (**Figuras II.10 y II.11**).



s tipo de fases estacionarias para EFS basadas en sílice.

Los adsorbentes de tipo polimérico están constituidos por resinas, habitualmente de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB). Sus características dependen de la naturaleza del monómero que las conforma aunque generalmente son hidrófobas y no polares. Puede modificarse su polaridad por adición de grupos funcionales.



**Figura II.11** Estructura tipo de fase estacionaria de intercambio iónico.

### II.5.2. Procedimiento de la EFS

El protocolo general de EFS para la preparación de muestras consta de los siguientes pasos [18,19].

- **Pretratamiento de muestra.** En este paso los analitos son liberados de la matriz original de la muestra y/o modificados para favorecer su interacción con el adsorbente del cartucho (ajuste de pH, derivatización, etc.). Un ejemplo del proceso en el caso de muestras sólidas es la extracción con Soxhlet.
- **Activación del cartucho.** El cartucho se coloca en un soporte adecuado y se le hacen pasar los disolventes de activación ya sea con ayuda de vacío o por presión positiva mediante una jeringa adaptada a la entrada del cartucho. En el comercio existen dispositivos para la preparación simultánea de muchas muestras, los cuales consisten de una cámara sometida a vacío en la cual se colocan los cartuchos de EFS. La naturaleza del o los disolventes de activación depende de la naturaleza del adsorbente o fase estacionaria en el cartucho. Los adsorbentes polares (sílice, alúmina, fases normales) se activan con disolventes poco polares o medianamente polares (p. ej. hexano, cloroformo, éter), dependiendo del disolvente de la muestra. Los cartuchos de fase reversa se activan con algunos mililitros de metanol o acetonitrilo, seguidos por un lavado con agua pura. Los

intercambiadores de iones se activan, generalmente, con disoluciones diluidas de ácidos fuertes (intercambiador de cationes) o bases fuertes (intercambiador de aniones).

- **Aplicación de la muestra.** La muestra se percola a través del cartucho. En este paso los analitos y algunos otros compuestos presentes en la muestra son retenidos en la fase estacionaria, mientras que los compuestos con poca afinidad por el adsorbente son eliminados en el efluente del cartucho.
- **Remoción de interferencias (lavado).** En esta etapa se realiza un proceso de limpieza mediante el paso de disolventes adecuados, que permitan desorber compuestos interferentes sin afectar la interacción de los analitos de interés con la fase estacionaria.
- **Etapas de elución.** La desorción o elución del o los analitos se efectúa mediante el paso de un disolvente de fuerza apropiada. Si el volumen y la fuerza del disolvente de elución se ajustan cuidadosamente, es posible eliminar en este paso a aquellos interferentes que interaccionan con la fase estacionaria más fuertemente que los compuestos de interés puesto que estas especies no serán eluidas.
- **Etapas de post-elución.** Aquí se realizan diversos procesos como evaporación, reconstitución y, en su caso, derivatización de la muestra para su posterior análisis cromatográfico.

Después de la activación del cartucho, el fraccionamiento puede realizarse de varias maneras. En el caso de que se desee concentrar y purificar analitos que se encuentran a bajas concentraciones (niveles traza) en matrices complejas (p.ej. muestras ambientales), el procedimiento es tal como se describió anteriormente (**Figura II.12 a**).

En un segundo enfoque, las condiciones (fase estacionaria y disolvente de muestra) se ajustan de tal manera que los analitos no se retienen en el cartucho durante la aplicación de la muestra y se colectan inmediatamente en los efluentes de la carga y el lavado, mientras que los componentes interferentes de la matriz



quedan adsorbidos en la fase estacionaria y se desechan con el cartucho (**Figura II.12 b**). Este procedimiento se emplea cuando los analitos se encuentran en concentraciones elevadas.

Finalmente, en una tercera estrategia, la muestra se aplica sin saturar la columna y se fracciona en dos o más porciones, eluyendo con una serie de disolventes de fuerza creciente. De esta manera una muestra muy compleja se puede subdividir en distintas fracciones, cada una de las cuales contiene diferentes analitos agrupados por similitud en sus interacciones con las fases estacionaria y móvil.

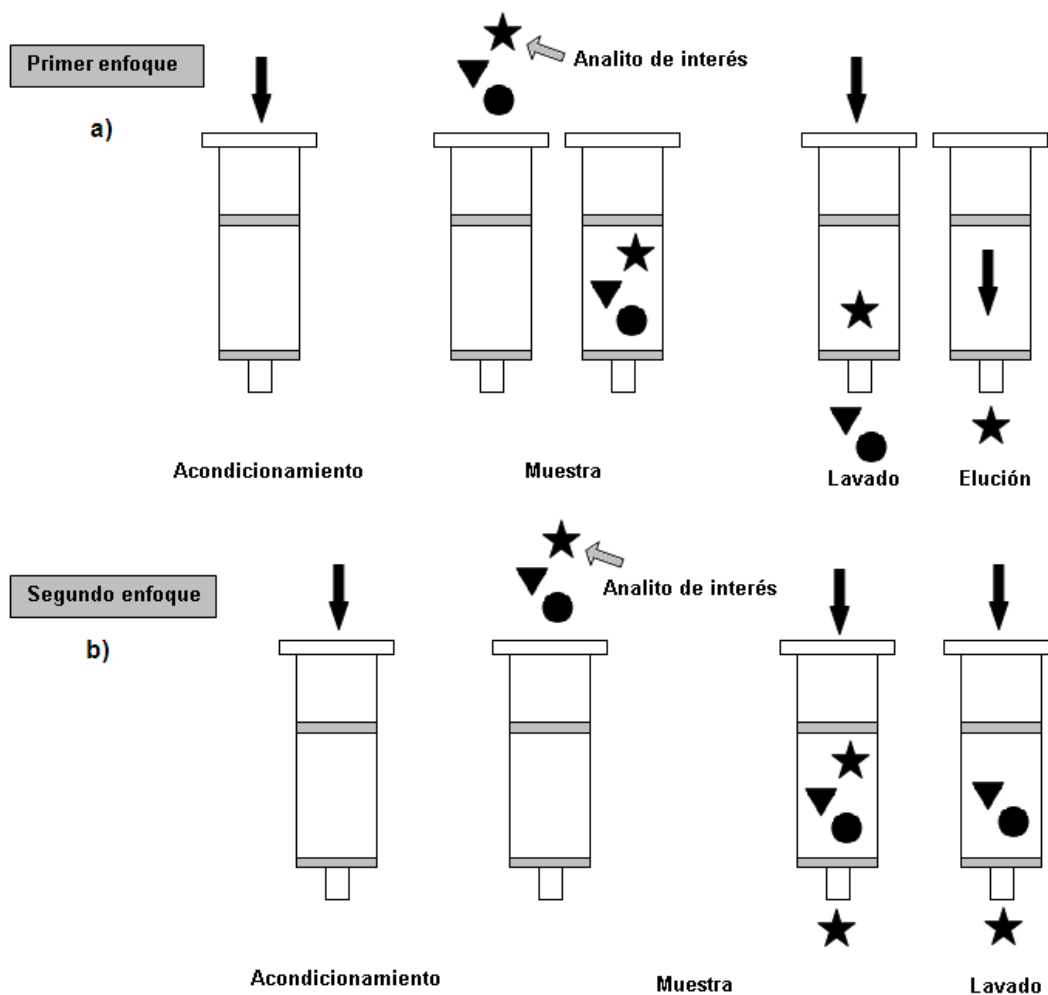


Figura II.12 Estrategias de fraccionamiento de muestras por EFS.

### II.5.3. Mecanismos de retención.

Los mecanismos de retención de compuestos en adsorbentes de EFS son los mismos que en cromatografía líquida [18,19].

**Fase reversa.** Se usa generalmente para extractos de compuestos orgánicos poco polares o medianamente polares contenidos en una matriz o muestra acuosa. La fase reversa más común está constituida por cadenas hidrocarbonadas químicamente unidas a la sílice (principalmente C8 y C18). Aunque las interacciones de estas cadenas con los solutos son muy débiles

(interacciones de dispersión o fuerzas de London), la retención puede ser muy importante ya que está determinada principalmente por efectos hidrofóbicos. En el caso de solutos poco hidrofóbicos se prefiere utilizar una fase estacionaria polimérica (PS-DVB) que presenta mayor poder de retención por su mayor hidrofobicidad y además puede interactuar con solutos aromáticos mediante interacciones  $\pi$ .

**Fase normal.** Se emplea generalmente para extractos o muestras de analitos polares en disolventes orgánicos poco polares. Los mecanismos de retención están basados en puentes de hidrógeno y uniones dipolo-dipolo entre los grupos funcionales de los analitos y los grupos polares superficiales de la fase estacionaria (sílice o alúmina). Las sílices químicamente modificadas con pequeñas cadenas hidrocarbonadas (generalmente propilo) que tienen en su extremo terminal grupos polares, como ciano, amino o alcohol, son también utilizadas para la EFS en fase normal.

**Intercambio de iones.** Se usa para extractos de compuestos iónicos o ionizables en muestras predominantemente acuosas y de baja fuerza iónica. Los adsorbentes están constituidos por un soporte (sílice o resinas) al cual se han unido químicamente grupos iónicos con carga positiva o negativa. Los contraiones de carga contraria, asociados a los iones fijos por atracción eléctrica, son intercambiados por analitos de la misma carga, quedando estos últimos retenidos. En principio, solo los compuestos cargados son retenidos en el cartucho, el resto de la matriz y los interferentes se eliminan durante la carga de muestra y los lavados.

**Fase mixta.** Presenta diferentes mecanismos de acción sobre los analitos, pudiendo de esta forma extraer compuestos que tengan características químicas diferentes, tanto polares como no polares. Las fases estacionarias son sílices modificadas con cadenas hidrocarbonadas y grupos polares, o bien

resinas injertadas con grupos polares. Suelen combinarse mecanismos de interacción hidrófobos con mecanismos de intercambio iónico.

Existen otros tipos de mecanismos por los cuales puede retenerse al analito:

**Afinidad.** Se basa en interacciones altamente específicas entre un soluto particular, o un grupo de solutos estructuralmente relacionados, y una segunda molécula inmovilizada en la fase estacionaria, ya sea por unión covalente o por atrapamiento en los poros del soporte. El mecanismo de retención involucra interacciones del tipo "llave-cerradura" como las que se presentan en los sistemas biológicos: pares antígeno-anticuerpo, enzima-sustrato y en general receptor-ligando. Las fases estacionarias de afinidad suelen llamarse inmunoabsorbentes.

**Par de iones.** Es una forma alternativa útil cuando la muestra contiene algún componente con carácter iónico o ionizable. Se basa en la formación de un par iónico entre el soluto y un contraion de carga opuesta que se agrega a la fase móvil. Cuando el soluto es un compuesto de molécula grande, el contraion puede ser un ion inorgánico pequeño, ya que su función es únicamente neutralizar la carga del soluto. Para solutos de molécula pequeña se emplean contraiones orgánicos relativamente grandes que, además de neutralizar la carga, proporcionan hidrofobicidad al par iónico. Ejemplos de estos últimos son los alquilsulfonatos y alquilsulfatos para solutos catiónicos y los iones tetraalquilamonio para solutos aniónicos. Las variables que permiten controlar la retención del soluto son: tipo y concentración del contraion, pH y proporción de disolvente orgánico en la fase móvil.

### II.5.4. Diseño del proceso de EFS

La elección del mecanismo de extracción apropiado para una muestra depende principalmente de tres factores a considerar [19]:

**El tipo de analito.** Se debe tener en cuenta el tamaño, la polaridad y los grupos funcionales de los compuestos a analizar.

**El tipo de matriz.** La matriz en la que se encuentran los analitos que se desean separar condiciona y determina el tipo de extracción que se debe emplear.

**El objetivo de la preparación de la muestra.** El interés principal de un proceso de EFS puede ser la preconcentración de compuestos muy diluidos en la matriz de la muestra, o bien la eliminación de interferentes en muestras donde los analitos están relativamente concentrados. El volumen de muestra a procesar, así como los disolventes que se emplearán durante las etapas de lavado y elución del cartucho dependerán en gran medida del objetivo principal de la EFS. Adicionalmente, el disolvente que se utilice en la elución de los cartuchos deberá ser compatible con la técnica cromatográfica que se vaya a usar para la separación y análisis de los compuestos de interés.

### II.5.5. Extracción en fase sólida en línea

El principio de la extracción en fase sólida en línea es el mismo que el de la extracción en fase sólida fuera de línea. Normalmente se basa en el uso de una fase estacionaria que retiene fuerte y selectivamente a los analitos de interés de una muestra en un sistema automatizado. En este modo de operación, el adsorbente se empaca en una pequeña precolumna de acero inoxidable, la cual se coloca entre dos puertos de una válvula de conmutación multipuertos. A su vez, la válvula se intercala entre el inyector y la columna analítica de un cromatógrafo de líquidos y por otro de sus puertos se conecta a una bomba auxiliar. Las primeras etapas del proceso de EFS, hasta el paso de lavado o remoción de interferencias, se realizan de manera similar al proceso fuera de línea, excepto por el hecho de que los diversos disolventes y la muestra son enviados a la precolumna mediante la bomba auxiliar. Durante estas etapas, la válvula se mantiene en la "posición de carga" y el efluente de la precolumna es desechado

por otro puerto de la válvula. En la etapa de elución, la válvula se rota ("posición de inyección") y los analitos adsorbidos en la precolumna son transferidos mediante la fase móvil (enviada por la bomba del cromatógrafo) a la columna analítica para su separación y detección. Dado que las válvulas multipuertos pueden ser controladas electrónicamente, el proceso de preparación y análisis de la muestra puede ser totalmente automatizado [21].

La extracción en fase sólida en línea presenta varias ventajas con respecto a la EFS fuera de línea [21]:

- Disminuye la manipulación de la muestra lo que disminuye los riesgos de contaminación o pérdida de analitos, mejorando la exactitud y precisión de los análisis.
- Toda la muestra concentrada en la precolumna es analizada por lo que es posible alcanzar límites de detección y cuantificación más bajos, lo que se traduce en métodos analíticos más sensibles. En la EFS fuera de línea sólo una pequeña alícuota del extracto obtenido es inyectada en el cromatógrafo.
- Los tiempos de análisis son más cortos.
- El sistema es automatizable por lo que resulta más apropiado para el procesamiento secuencial de muestras en análisis de rutina.

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### III.1. Hipótesis

Mediante procesos de extracción en fase sólida, acoplados a la cromatografía de líquidos con detección UV, es posible desarrollar una metodología analítica suficientemente sensible para el monitoreo de ácido domoico en agua de mar, a los niveles de concentración en que esta toxina podría encontrarse durante un fenómeno de florecimiento algal nocivo de las diatomeas responsables de su producción.

#### III.2. Objetivos

Objetivo general

Desarrollar una metodología analítica precisa, exacta y altamente sensible para la determinación de ácido domoico, a niveles de concentración del orden de trazas en agua de mar. Esta metodología estará basada en la preconcentración del ácido domoico por extracción en fase sólida y su posterior elución y determinación en línea por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV.

Objetivos particulares

- Optimizar las condiciones cromatográficas para lograr una retención apropiada y una máxima sensibilidad de detección del ácido domoico.
- Establecer condiciones experimentales de carga, lavado y elución, que permitan alcanzar altos factores de preconcentración y purificación del

ácido domoico presente en muestras de agua salada, mediante EFS-fase reversa fuera de línea.

- Determinar condiciones adecuadas para la transferencia cuantitativa del extracto anterior a una precolumna de fase reversa y su posterior elución en línea hacia la columna analítica del cromatógrafo de líquidos.
- Realizar un estudio estadístico del método analítico desarrollado, enfocado a la determinación de su exactitud (medida como % de recuperación), precisión, linealidad y límite de detección.
- Aplicar el método desarrollado a muestras reales de agua de mar fortificadas con ácido domoico a niveles de partes por billón ( $\mu\text{g/L}$ ) o menores.



## IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### IV.1. Equipo y Material

- Bomba cuaternaria para cromatografía de líquidos, Polymer Laboratories modelo LC-1150.
- Bombas isocráticas auxiliares, Eldex Laboratories, modelos CC-100-S y CC-30-S.
- Inyector Rheodyne 7125 con bucle de 26  $\mu\text{L}$  (calibrado en el laboratorio).
- Válvula de conmutación de 6 puertos, Rheodyne 7000.
- Detector UV de longitud de onda variable, Spectromonitor 3200 de Thermo Separation Products.
- Detector UV-DAD (Detector con arreglos de diodos), Spectromonitor 5000 de Thermo Separation Products.
- Sistema de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos constituido por: Computadora Dell Intel Pentium 4, software Eurochrom for Windows Basic Edicion V3.05 e interfase Knauer, modelo 76019.
- Sistema purificador y desionizador de agua NANOPURE, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Potenciómetro Corning modelo 220 con electrodo combinado de vidrio calomel Cole-Parmer modelo 60648.
- Balanza analítica Ohaus modelo AP210S, capacidad: 210g con precisión de 0.1 mg.
- Columna analítica (150  $\times$  4.6 mm d.i.) de fase reversa Hypersil ODS, 5  $\mu\text{m}$ , de Thermo Scientific.
- Precolumna de concentración (20  $\times$  2 mm d.i.) empacada en el laboratorio con fase reversa polimérica PLRP-S, 10-15  $\mu\text{m}$ , de Polymer Laboratories.
- Cartuchos para extracción en fase sólida, Spe-ed C18/14% de Applied Separations.
- Jeringa de 100  $\mu\text{L}$  para cromatografía de líquidos, Hamilton, Microliter 710.

- Jeringa de vidrio de 2 centímetros cúbicos, Popper Micro-mate, modelo 5009.
- Sistema de filtración de vidrio Millipore, modelo OM027, con membranas de filtración de nylon 66, marca Lida, de 47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

### IV.2. Reactivos y Disoluciones

#### Reactivos

- Ácido domoico 90 %, Sigma-Aldrich.
- Cloruro de sodio (NaCl) grado reactivo, J.T.Baker.
- Hexansulfonato de sodio, Fisher Scientific, grado HPLC.
- Ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 70 %, J.T.Baker.
- Metanol (MeOH) grado HPLC, Fisher Scientific.
- Acetonitrilo (AcCN) grado HPLC, Prolabo.
- Acetato de amonio 98 %, grado reactivo analítico, Productos Químicos Monterrey.

#### Disoluciones preparadas

- Disolución patrón de ácido domoico en metanol a concentración de 50 mg/L.
- Disoluciones estándar de ácido domoico en metanol-agua 50:50 (v/v) a diferentes concentraciones.
- Disolución de acetato de amonio 0.01M en metanol-agua 30:70 (v/v).
- Disolución acuosa de  $\text{HClO}_4$  0.1 M y 0.01M.
- Disolución acuosa de hexansulfonato de sodio  $5 \times 10^{-1}$  M.

La disolución patrón de ácido domoico se guardó en el congelador ( $-20^\circ\text{C}$ ) cuando no estaba en uso. Las disoluciones estándar de este compuesto se prepararon a partir de la disolución patrón, renovándolas periódicamente.

### **Preparación de muestras salinas**

Se disolvió la cantidad necesaria de cloruro de sodio en agua pura para obtener una concentración de 3.5 % (p/v), que simulara la salinidad del agua de mar. A partir de esta disolución se prepararon muestras fortificadas con ácido domoico a diferentes concentraciones (muestras sintéticas) para el desarrollo y optimización del método analítico.

## **IV.3. Procedimientos y metodología analítica**

### **IV.3.1. Condiciones cromatográficas**

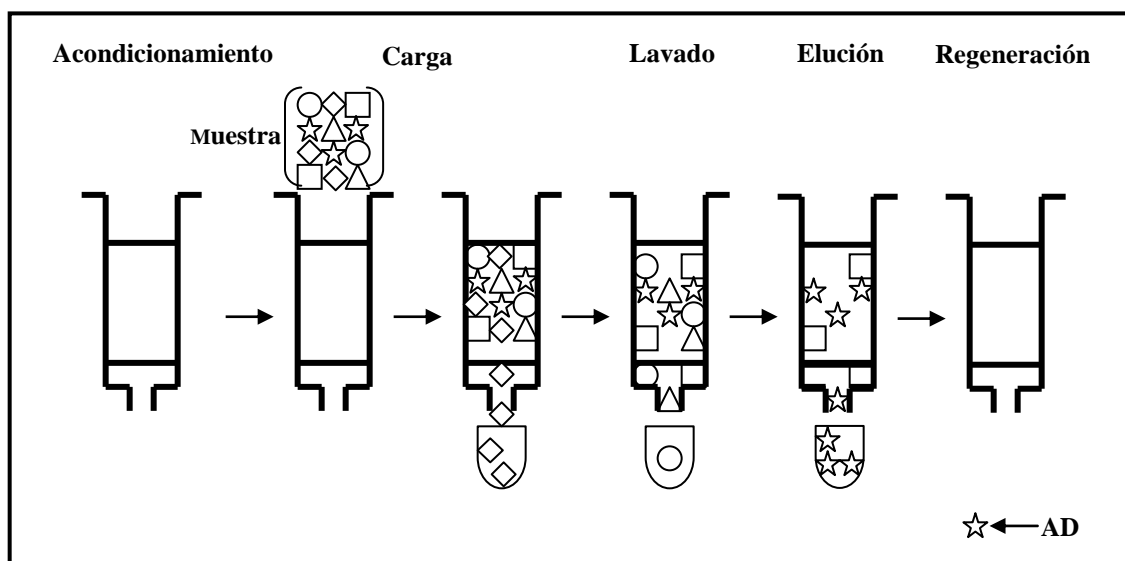
Las condiciones cromatográficas se optimizaron inyectando un estándar de ácido domoico en el sistema en línea (precolumna polimérica de fase reversa PLRP-S + columna analítica de fase reversa C-18) a diferentes composiciones de la fase móvil. Debido a que ambas columnas participan en la retención del analito y afectan el ensanchamiento de su pico cromatográfico, la optimización debe realizarse bajo condiciones similares a las que se tendrán en el método analítico final. La composición de la fase móvil que permitió obtener un pico simétrico y suficientemente retenido para separarlo de las señales de matriz, que generalmente aparecen al inicio del cromatograma cuando se analizan muestras reales, fue una mezcla AcCN-H<sub>2</sub>O (HClO<sub>4</sub> 10<sup>-2</sup> M) 15:85 (v/v). En estas condiciones y trabajando a velocidad de flujo de 1 mL/min, el ácido domoico tiene un tiempo de retención de aproximadamente 6 - 7 minutos.

Para optimizar la señal de respuesta, se determinó la longitud de onda de máxima absorción del ácido domoico mediante barridos espectrales en la región UV, encontrándose su máximo en 239 nm.

### IV.3.2. Extracción en fase sólida

Las concentraciones de ácido domoico que se espera encontrar en el agua de mar contaminada con esta biotoxina son extremadamente bajas, por lo que el tratamiento de la muestra es un paso crucial. El procedimiento establecido consistió de dos operaciones de EFS, una fuera de línea y la otra en línea. En la primera operación, la muestra acuosa se percoló a través de un cartucho de fase reversa C-18 para la preconcentración y limpieza parcial del analito. En la segunda operación, el extracto obtenido del cartucho se transfirió cuantitativamente a una precolumna empacada con fase reversa polimérica, para su posterior elución en línea hacia la columna analítica con la fase móvil antes descrita.

Las condiciones experimentales para las etapas de carga, lavado y elución (**Figura IV.1**), así como la velocidad de flujo a la cual se efectúan, fueron optimizadas para los dos procesos de EFS, tomando en cuenta la naturaleza del soluto. A continuación se detallan los parámetros estudiados en cada etapa.



**Figura IV.1** Esquema general de las etapas que conforman un proceso de EFS.

### **Acondicionamiento**

Tanto para el cartucho como para la precolumna se utilizó el procedimiento convencional para el acondicionamiento de adsorbentes de fase reversa, consistente en una activación de la fase estacionaria con un disolvente orgánico, seguida de un lavado con una disolución acuosa. En el caso presente, las fases C-18 y PLRP-S se activaron con metanol y se acondicionaron con una disolución acuosa de  $\text{HClO}_4$  0.01 M.

### **Carga**

Se prepararon disoluciones de ácido domoico en medio acuoso con diferentes contenidos de disolvente orgánico (MeOH). Volúmenes conocidos y crecientes de estas disoluciones fueron percolados a través del cartucho (o de la precolumna) para determinar el “volumen de fuga”, es decir el volumen de carga a partir del cual el analito empieza a aparecer en el efluente. Algunos de estos ensayos se realizaron a diferentes velocidades de flujo para determinar el efecto de este parámetro sobre el volumen de fuga. Considerando las propiedades ácido-base del compuesto de interés, también se investigó el efecto de la presencia de la sal de un contraion (hexansulfonato de sodio) en la disolución de carga y el efecto del pH del medio.

En el caso del cartucho, todos los ensayos se realizaron simulando la salinidad del agua de mar, por adición de NaCl 3.5 % (p/v) a las disoluciones de carga. El objetivo del estudio fue encontrar condiciones que permitieran alcanzar altos volúmenes de fuga del analito y por lo tanto factores de preconcentración elevados.

En el caso de la precolumna, los ensayos tuvieron como fin encontrar las condiciones apropiadas de dilución del eluato del cartucho para que éste pudiera ser cargado en la pequeña precolumna sin que hubiera pérdida del analito.

### **Lavado**

El interés primordial de esta etapa fue eliminar el exceso de sales residuales, y en particular iones halogenuro provenientes de la muestra, que hubieran podido quedar atrapados en los poros o en el volumen interparticular del lecho estacionario. Los iones halogenuro en medio ácido son muy corrosivos y atacan al acero inoxidable, por lo que pueden dañar tanto a la bomba auxiliar como a diversas partes del equipo de cromatografía de líquidos. Así mismo, por la naturaleza secuencial del proceso de EFS, era necesario desalojar los residuos de la sal del contraion para que la siguiente etapa se llevara a cabo en condiciones óptimas. Por ello, en estos ensayos se evaluó la composición y el volumen máximo de la solución de lavado que podía pasarse por el cartucho (o la precolumna) sin provocar la desorción y pérdida del analito.

### **Elución**

Esta etapa sólo aplica para el proceso de EFS fuera de línea. El objetivo de los ensayos realizados fue encontrar una composición de eluyente tal que fuera capaz de extraer cuantitativamente al analito retenido en la fase C-18 del cartucho, arrastrando la menor cantidad posible de otros compuestos interferentes, provenientes de la muestra, que hubieran quedado retenidos durante la etapa de carga. Se estudiaron diversos eluyentes, desde acetato de amonio acuoso hasta metanol puro, así como combinaciones de metanol-agua y metanol-acetato de amonio en diferentes proporciones y concentraciones.

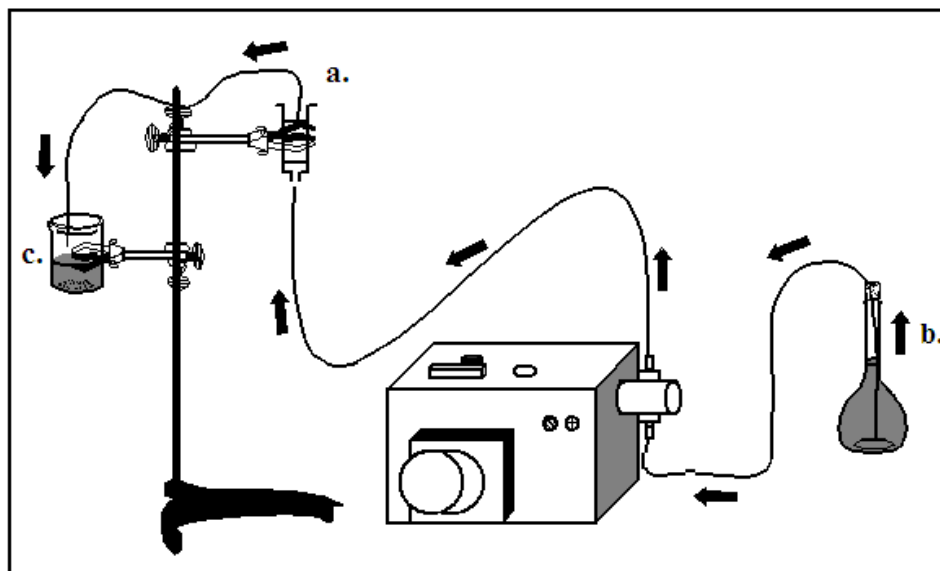
En el caso del proceso de EFS en línea, el analito es convenientemente eluido y transferido de la precolumna a la columna analítica mediante la fase móvil anteriormente seleccionada (condiciones cromatográficas).

### IV.3.3. Montajes Experimentales

#### EFS fuera de línea

Las disoluciones correspondientes a las diferentes etapas del proceso de EFS se pasaron a través del cartucho a flujo controlado y constante mediante una bomba isocrática. Para ello fue necesario conectar el tubo de salida de la bomba al vástago inferior del cartucho utilizando un adaptador (conector luer-hembra 1/4”), y hacer fluir las disoluciones de abajo hacia arriba (**Figura IV.2**). Además de la posibilidad de controlar el flujo, este modo de operación tiene la ventaja de evitar la compactación del empaque y disminuir los riesgos de oclusión de los filtros que retienen el lecho estacionario. La recuperación de los efluentes del cartucho fue realizada por medio de una manguera colocada en la parte superior del cartucho, aplicando el principio físico del “efecto sifón”. Para lograr este efecto, se adaptó una jeringa a la salida de la manguera de recuperación con el fin de inducir por vacío el inicio del desplazamiento del líquido al interior de ésta. Después se retiró la jeringa y la manguera se transfirió a un vaso de precipitados, cuya altura se ajustó con respecto al cartucho para controlar la velocidad de transvase del efluente, adaptándola al flujo proporcionado por la bomba.

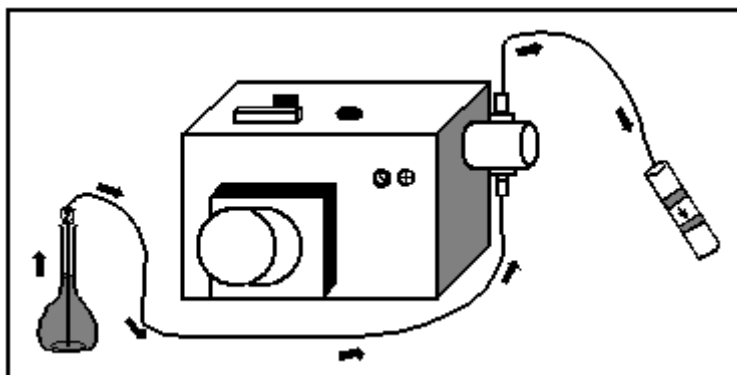
Con este arreglo experimental se pudo semi-automatizar el proceso de EFS fuera de línea, lo que resultó muy conveniente para ensayos en los que se percolaron grandes volúmenes de muestra a flujo elevado (hasta 200 mL a 7.5 mL/min) o volúmenes pequeños de otras disoluciones a flujos más bajos (como 5 o 10 mL a 5 mL/min).



**Figura IV.2** Esquema del sistema utilizado en el proceso de EFS fuera de línea en un cartucho C-18 (a). La dirección del flujo está señalada por las flechas. **Etapas de acondicionamiento, carga y lavado:** (b) disolución correspondiente, (c) efluentes. **Etapas de elución:** (b) eluyente, (c) eluato.

### EFS en línea

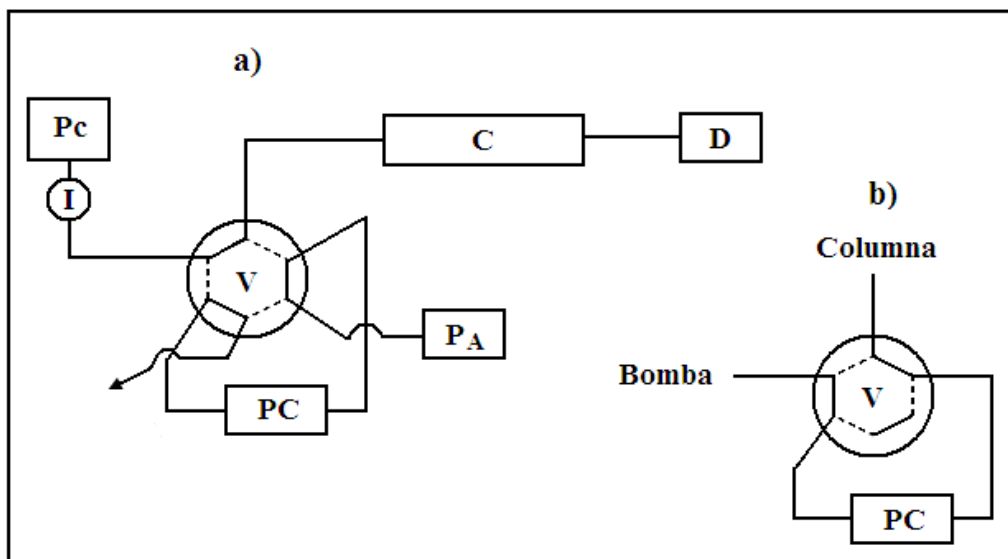
Con el fin de optimizar el tiempo de análisis y el tiempo de uso del cromatógrafo de líquidos, las etapas de acondicionamiento, carga y lavado de la precolumna se realizaron en un montaje independiente en algunos ensayos (**Figura IV.3**).



**Figura IV.3** Esquema del sistema utilizado en las etapas de acondicionamiento, carga y lavado de la precolumna PLRP-S. La dirección del flujo está señalada por las flechas.



El montaje para el acoplamiento en línea de la precolumna polimérica con el sistema cromatográfico se muestra en la **Figura IV.4**. Este montaje tiene como componente principal una válvula de conmutación de 6 puertos colocada entre el inyector y la columna analítica del cromatógrafo de líquidos, a los cuales se conecta mediante los puertos 2 y 3, respectivamente. En los puertos restantes de la válvula se conectan una bomba isocrática auxiliar (puerto 5), la precolumna (entre los puertos 1 y 4) y una salida de desechos (puerto 6). Cuando todo el proceso de EFS se lleva a cabo en este montaje, las etapas de acondicionamiento, carga y lavado de la precolumna se realizan con la bomba auxiliar, manteniendo la válvula de conmutación en la “posición de carga” (**Figura IV.4-a**). Simultáneamente, la columna analítica se acondiciona con la fase móvil enviada por la bomba del cromatógrafo. En la etapa final del proceso la válvula se rota a la “posición de inyección”, con lo cual el flujo de fase móvil se desvía hacia la precolumna, eluyendo los compuestos retenidos y transfiriéndolos directamente a la columna analítica para su separación y análisis (**Figura IV.4-b**).



**Figura IV.4** Esquema del sistema en línea EFS-CLAR. El esquema (a) muestra el sistema en la posición de carga de la válvula de conmutación y el esquema (b) muestra el camino que sigue la fase móvil (línea continua) durante la elución en línea de la precolumna (posición de inyección de la válvula). **Pc**: bomba del cromatógrafo, **I**: inyector, **V**: válvula de conmutación, **PA**: bomba auxiliar, **PC**: precolumna, **C**: columna analítica, **D**: detector UV.

#### IV.3.4. Análisis de muestras

Las condiciones finalmente establecidas para la preparación de las muestras se resumen en la **Tabla IV.1**. Al terminar las operaciones de EFS fuera de línea y en línea, el extracto final transferido a la columna cromatográfica es separado y analizado bajo las condiciones descritas anteriormente (sección IV.3.1).

Durante el desarrollo y la validación del método analítico, cada análisis de una muestra sintética fue seguido por la inyección y análisis de un estándar de ácido domoico, como referencia para la cuantificación del analito por el método de estandarización externa. La cuantificación se hizo por comparación de las áreas del pico de ácido domoico en la muestra y en el estándar.

Las tres muestras de agua de mar analizadas en este trabajo provenían de Sisal, Yuc., Tecolutla, Ver. y Acapulco, Gro. En ninguna de ellas se detectó la presencia de ácido domoico pero, para corroborar el buen funcionamiento, robustez y aplicabilidad del método, una alícuota de 100 mL de cada muestra se fortificó con ácido domoico a niveles inferiores a la ppb (partes por billón =  $\mu\text{g/L}$ ) y se volvió a analizar. La determinación de la cantidad de ácido domoico recuperado en las muestras dopadas se realizó por estandarización externa.

**Tabla IV.1** Condiciones finales del proceso de preparación de muestra.

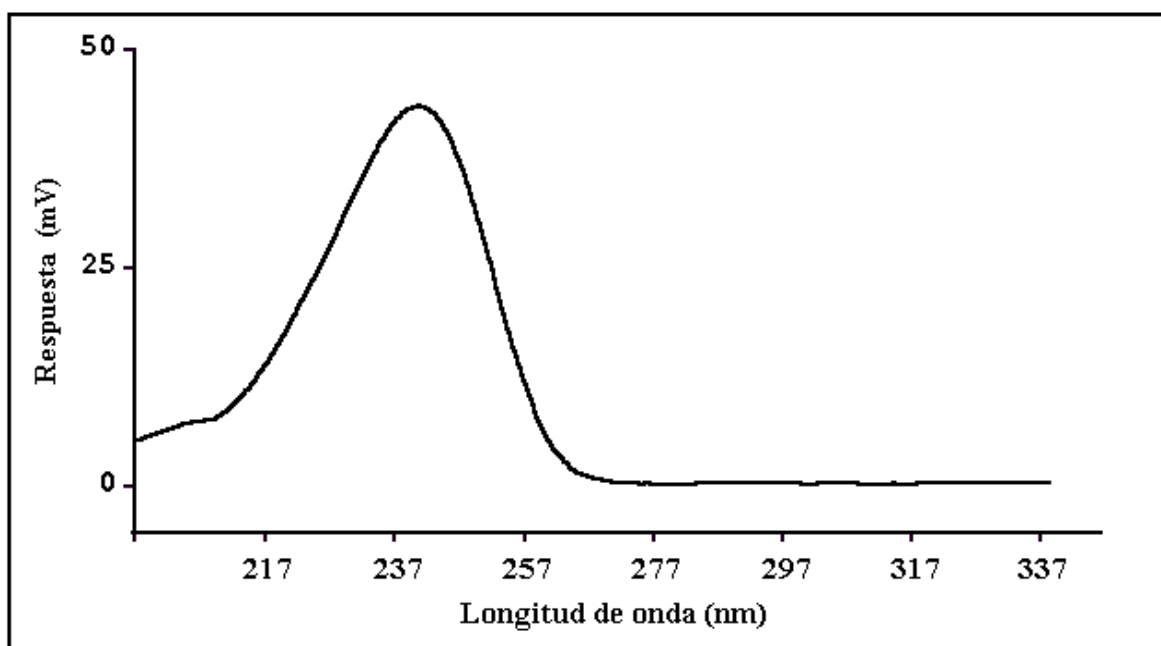
<b>Operación</b>	<b>Extracción en fase sólida fuera de línea</b>	<b>Extracción en fase sólida en línea</b>
Adsorbente	Fase reversa C-18	Fase reversa PSDVB
Dispositivo	Cartucho de polipropileno	Precolumna de acero inoxidable
Flujo	5 mL/min	1.5 mL/min
Acondicionamiento	HClO <sub>4</sub> 0.01M; 5 mL	HClO <sub>4</sub> 0.01M; 5 mL
Carga de muestra	100 mL de muestra sintética [agua con NaCl 3.5 % (p/v) fortificada con ácido domoico], o la muestra de agua de mar, ajustada a pH~3.7 con HClO <sub>4</sub> y con hexansulfonato de sodio 5×10 <sup>-3</sup> M.	Extracto del cartucho diluido a 25 mL con solución acuosa de HClO <sub>4</sub> 8×10 <sup>-3</sup> M y hexansulfonato de sodio 5×10 <sup>-3</sup> M.
Limpieza de muestra	HClO <sub>4</sub> 0.01M; 10 mL	HClO <sub>4</sub> 0.01M; 10 mL
Elución	4 mL de acetato de amonio 0.01M en agua-metanol 70:30 (v/v)	Elución en línea a la columna analítica
Regeneración	MeOH	MeOH

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### V.1. Desarrollo del método analítico

#### V.1.1. Condiciones cromatográficas

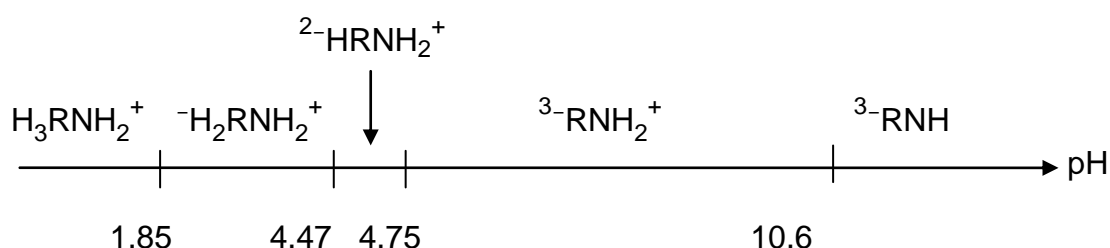
En la **Figura V.1** se presenta el espectro de absorción de una solución estándar de ácido domoico inyectada en el cromatógrafo de líquidos, el cual fue obtenido haciendo un barrido espectral con un detector UV-DAD durante la elución del pico del analito. Con base en el espectro, se decidió elegir una longitud de onda cercana a los 240 nm para la detección del compuesto de interés. En el trabajo posterior se utilizó un detector UV de longitud de onda variable, en vez del de arreglo de diodos, por su mayor sensibilidad; la longitud de onda finalmente seleccionada para la detección con este aparato fue de 239 nm.



**Figura V.1** Espectro de absorción del ácido domoico. Barrido espectral por UV-DAD. Composición de fase móvil: AcCN-H<sub>2</sub>O (HClO<sub>4</sub> 0.01 M) 15:85 (v/v).

Debido a la polaridad del ácido domoico y a que la matriz de las muestras de interés es acuosa, se optó por elegir la cromatografía de líquidos en fase reversa como técnica de análisis. Las fase móviles que se emplean en esta técnica (comúnmente mezclas metanol-agua o acetonitrilo-agua) son compatibles con las características de solubilidad del analito.

La retención del ácido domoico en un sistema cromatográfico de fase reversa depende del pH de la fase móvil debido a las propiedades ácido-base de este compuesto (pKa en la **Tabla II.3**). Considerando los tres grupos funcionales ácido carboxílico y el grupo funcional amino (ver **Figura II.8**), la molécula de ácido domoico puede representarse como  $H_3RNH$ ; en la **Figura V.2** se muestran las zonas de predominio de las diferentes formas ácido-base. Como puede observarse, en todo el intervalo de pH existen uno o más grupos cargados, lo que se traduce en alta afinidad de la molécula por la fase móvil acuosa y menor afinidad por la fase estacionaria apolar, a pesar de que el área hidrocarbonada del soluto es suficientemente importante. No obstante, en la zona de pH entre 1.85 y 4.47 la carga global de la molécula es nula por lo que estas condiciones resultan las más interesantes para favorecer su retención.



**Figura V.2** Zonas de predominio de las diferentes formas ácido-base del ácido domoico.

Se buscó ajustar la retención a un tiempo entre 5 y 10 min (flujo 1 mL/min) porque a tiempos más largos se pierde sensibilidad por el ensanchamiento del pico y a tiempos muy cortos se corre el riesgo de interferencias por señales debidas al disolvente del estándar inyectado o por compuestos polares remanentes de la matriz de la muestra que eluyen al inicio del cromatograma. Se ensayaron diversas mezclas agua-disolvente orgánico como fase móvil, añadiendo  $HClO_4$  0.01 M en la fracción acuosa. En estas condiciones la forma

predominante del ácido domoico es el zwitterión, aunque la especie con carga positiva,  $\text{H}_3\text{RNH}_2^+$ , no es del todo despreciable. A pesar de ello, se logró retener al analito, tal vez porque el ion  $\text{ClO}_4^-$  fue capaz de asociarse débilmente con la especie catiónica formando pares de iones y neutralizando su carga.

En estos ensayos preliminares se observó una mayor sensibilidad de detección utilizando acetonitrilo como disolvente orgánico en la fase móvil, lo cual se atribuye a que la absorbancia del acetonitrilo a 239 nm es menor que la del metanol; adicionalmente, los picos cromatográficos tienden a ser más finos con el primer disolvente debido a su menor viscosidad. Finalmente, con una fase móvil AcCN- $\text{H}_2\text{O}$  ( $\text{HClO}_4$   $10^{-2}$  M) 15:85 (v/v) a flujo de 1 mL/min, se obtuvo una retención adecuada para el ácido domoico (entre 6 y 7 min). Las condiciones cromatográficas establecidas permitieron obtener picos fácilmente detectables al inyectar un estándar del analito a concentración de 0.2 ppm (partes por millón =  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Puesto que el bucle del inyector utilizado era de 26  $\mu\text{L}$  (calibrado en el laboratorio), la sensibilidad absoluta del sistema cromatográfico para el ácido domoico fue menor a los 5 ng.

### **V.1.2. Preparación de muestra**

#### **V.1.2.1. Diseño del método de preparación de muestra**

Como ya se ha mencionado, la preparación de muestra es un proceso fundamental cuando se desea determinar un compuesto a niveles de concentración del orden de trazas en una matriz que puede contener muchos otros compuestos miles o millones de veces más concentrados.

En nuestro caso particular, la meta era desarrollar un método capaz de cuantificar ácido domoico en agua de mar a niveles menores a la ppb (partes por billón =  $\text{ng}/\text{mL}$ ) y con la posibilidad de detectar inequívocamente al analito a concentraciones significativamente menores a ese límite. Por esta razón, los

pasos de preconcentración y purificación de la muestra debían ser diseñados y optimizados cuidadosamente.

Para poder preconcentrar un volumen de muestra lo más grande posible, y eliminar durante este paso la mayor parte de las sales presentes en el agua de mar, se decidió realizar una EFS fuera de línea en un cartucho C-18 como primera etapa. La cantidad de adsorbente en los cartuchos es mucho mayor que en las precolumnas que se utilizan para la EFS en línea y por ende su capacidad de muestra y volúmenes de fuga también son mayores. Sin embargo, la elución completa del o los compuestos de interés retenidos en un cartucho requiere de un cierto volumen de disolvente fuerte, que en el mejor de los casos podría ser de 1 a 2 mL. Así, si se cargaran 100 mL de muestra en el cartucho y, en el caso óptimo, éste se eluyera con 1 mL de disolvente, el factor de preconcentración sería de 100. Este procedimiento conlleva a una pérdida de sensibilidad potencial puesto que sólo una pequeña alícuota del eluato es inyectada en el cromatógrafo (el volumen del bucle del inyector) y analizada. Por el contrario, si este mismo volumen de muestra se pudiera cargar en una precolumna acoplada en línea con el sistema cromatográfico, toda la muestra preconcentrada sería analizada. Asimilando la precolumna a un inyector con un bucle de 26  $\mu\text{L}$ , el factor de preconcentración en este caso sería cercano a 4000. Desafortunadamente, por la alta polaridad del ácido domoico, no era factible cargar este volumen de muestra en una precolumna sin pérdida notable del analito.

Con base en estos razonamientos, se decidió realizar una extracción en fase sólida en línea como segunda etapa, transfiriendo todo el eluato del cartucho a una precolumna. El problema de este paso es que el eluato estaría constituido por una disolución del analito en un disolvente fuerte que no permitiría la retención del compuesto en la precolumna. Por lo tanto, un paso previo a optimizar sería la dilución del eluato con una disolución acuosa, hasta un punto en que éste pudiera ser cargado en la precolumna sin que se presentara fuga del compuesto de interés. Con el objeto de facilitar este paso se eligió como material de empaque para la precolumna la fase reversa PLRP-S. Este adsorbente está constituido por un copolímero estireno-divinilbenceno que

tiene un poder de retención mayor que las fases C-18, especialmente en el caso de solutos con anillos aromáticos.

Es evidente que la metodología así diseñada requiere afinar y optimizar cuidadosamente todos los pasos que conforman las dos etapas de EFS. En las siguientes secciones se describen los aspectos más relevantes del trabajo realizado para la puesta a punto de este método de preparación de muestra.

### V.1.2.2. Optimización del proceso de extracción en fase sólida.

#### A) Operaciones en el cartucho C-18.

Inicialmente los experimentos para la optimización de condiciones en el cartucho C-18 se llevaron a cabo con disoluciones relativamente concentradas del estándar de ácido domoico, de modo que los resultados de cada estudio pudieran seguirse por inyección directa de los eluatos en el cromatógrafo. Posteriormente, cuando se trabajó con soluciones muy diluidas, hubo que hacer reajustes y los experimentos se hicieron transfiriendo el eluato del cartucho a la precolumna para su elución y análisis en línea.

##### - Optimización de la etapa de elución.

Los primeros ensayos se realizaron cargando previamente el cartucho con 1 mL de una disolución de ácido domoico de 2 ppm (2 µg cargados). Para la remoción del analito retenido se probaron diversos eluyentes, recuperando el eluato en fracciones de 1 mL las cuales se analizaron por inyección directa en el CLAR. En la **Tabla V.1** se describen los eluyentes probados y los resultados obtenidos.



**Tabla V.1** Estudio del proceso de elución en el cartucho C-18.

Composición del Eluyente	Volumen (mL)	Recuperación (µg)	Recuperación global (%)
Acetato de amonio 0.01M acuoso	5	---	---
Metanol	1	1.48	95
	1	0.42	
Metanol-agua 50:50 (v/v)	1	1	93
	1	0.86	
Metanol-agua (acetato de amonio 0.1M) 50:50 (v/v)	1	1.57	94
	1	0.32	

--- no detectable

Como puede observarse, la disolución acuosa de acetato de amonio (pH 7) no fue capaz de eluir al analito, a pesar de que en este medio su carga neta era de -2. El metanol puro o las mezclas al 50 % de metanol en agua (con o sin sales para fijar el pH) dieron resultados aceptables y muy semejantes.

En ensayos posteriores, se disminuyó a 30 nanogramos la cantidad de ácido domoico cargado en el cartucho para simular condiciones más próximas a las que se tendrían en el análisis de las muestras. Estos ensayos fueron realizados después de haber optimizado las condiciones para la transferencia del eluato del cartucho a la precolumna y el análisis en línea (sección **V.1.2.2 B**). Se comenzó probando el metanol puro como eluyente del cartucho (2 mL), pero los resultados obtenidos en varias réplicas del experimento fueron desalentadores pues sólo se recuperaba aproximadamente 40 % del soluto. Se hicieron entonces diversas pruebas para definir dónde se estaba perdiendo el analito y éstas mostraron que el problema provenía de una elución incompleta del cartucho. Aparentemente, el metanol puro no era capaz de romper algunas interacciones fuertes del ácido domoico con sitios activos en la superficie del adsorbente.

Los adsorbentes de fase reversa C-18 están constituidos por una matriz de sílice a la que se han enlazado cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos por reacción con los silanoles de superficie. Aunque muchos silanoles quedan sin reaccionar, la mayoría de ellos no son accesibles a los solutos debido a la capa superficial de cadenas hidrocarbonadas, pero algunos silanoles quedan expuestos y pueden actuar como sitios activos que interaccionan fuertemente con los grupos funcionales básicos de los analitos. Adicionalmente, la sílice con la que se preparan muchos de los adsorbentes comerciales de fase reversa contiene impurezas de cationes metálicos pesados a niveles traza; estas impurezas también son sitios de adsorción muy fuertes para compuestos que forman complejos con este tipo de cationes. El ácido domoico posee grupos amino y carboxilo capaces de formar complejos estables con muchos cationes metálicos; además, su grupo amino puede interaccionar con silanoles residuales por formación de puentes hidrógeno. No es entonces extraño que una fracción del soluto quedara fuertemente atrapada en el cartucho. Como el número de sitios activos expuestos es pequeño, la cantidad de ácido domoico que interaccionó con estos sitios en los primeros ensayos resultaba insignificante frente a la cantidad cargada. Sin embargo, al disminuir esta última (de 2 µg a 30 ng), la cantidad de analito retenida en los sitios activos representó un porcentaje importante.

Considerando lo anterior, se decidió probar la elución con la mezcla metanol-agua (acetato de amonio 0.1M) 50:50 (v/v). El agua es un disolvente que desactiva a la sílice bloqueando los sitios silanol, el acetato y el amonio pueden bloquear por interacción eléctrica cargas superficiales positivas (cationes metálicos) y negativas (silanoles ionizados), finalmente, el metanol elimina las interacciones hidrofóbicas del soluto con las cadenas hidrocarbonadas. Los resultados obtenidos con esta mezcla fueron bastante satisfactorios, con porcentajes de recuperación cercanos al 100 %.

Con el objeto de mejorar las características del eluyente y tener mayor selectividad en la elución, se decidió disminuir la concentración de sales y el contenido de metanol. A partir de los resultados de recuperación obtenidos, se

optó por elegir una mezcla metanol-agua (acetato de amonio 0.01M) 30:70 (v/v) como el eluyente más apropiado; bastaron 4 mL de éste para asegurar la completa remoción del ácido domoico retenido en el cartucho.

### - **Composición de la solución de carga.**

Los ensayos preliminares que se hicieron añadiendo pequeñas cantidades de metanol a la muestra acuosa, mostraron que no era posible retener cuantitativamente al analito en el cartucho en presencia del disolvente orgánico. Estos ensayos tenían por objeto tratar de eliminar interferentes polares desde la etapa de carga, sin embargo, dados los resultados, se trabajó con la muestra acuosa sin ningún modificador orgánico.

Por otra parte, debido a la naturaleza ácido-base del soluto, era necesario regular el pH de la solución de carga a un valor que favoreciera su retención. Como se mencionó en una sección anterior, el ácido domoico se encuentra predominantemente en forma de zwitterión en el intervalo de pH 1.85-4.47 (**Figura V.2**), por lo que se hicieron pruebas acidificando la muestra con  $\text{HClO}_4$  a diferentes valores de pH dentro de este intervalo. Los resultados no fueron satisfactorios pues una fracción del soluto se fugó aún con muy bajos volúmenes de carga.

Tratando de resolver este problema, se fijó el pH de la solución en 2 ( $\text{HClO}_4$  0.01 M) y se adicionó un agente formador de pares de iones, el hexansulfonato. Este anion forma un par de iones con el grupo amino del ácido domoico (protonado en medio ácido), neutralizando su carga y aumentando la hidrofobicidad del soluto. El resultado fue exitoso ya que el analito no se fugó del cartucho, aún aumentando el volumen de carga. Sin embargo, los cromatogramas obtenidos al final del análisis fueron muy sucios, probablemente por impurezas presentes en los reactivos que se concentraron durante el proceso. Para subsanar este inconveniente, se disminuyó progresivamente la concentración, tanto del hexansulfonato de sodio como del ácido perclórico, hasta obtener un cromatograma aceptablemente limpio aunado a una buena recuperación del analito.

Las condiciones finalmente seleccionadas para la composición de la solución de carga fueron: muestra acuosa adicionada con hexansulfonato de sodio  $5 \times 10^{-3}$  M y ácido perclórico aproximadamente  $2 \times 10^{-4}$  M (pH~3.7).

- **Volumen de fuga durante la carga de la muestra.**

Una vez establecidas las condiciones para la composición de la solución de carga y para la elución cuantitativa del soluto, se investigó qué volumen de muestra podría cargarse en el cartucho sin riesgo de fuga. Para ello se percolaron volúmenes crecientes de muestras dopadas con una cantidad fija de ácido domoico (30 ng totales en el volumen percolado) a través del cartucho. En la **Tabla V.2** se muestran los resultados de recuperación del analito obtenidos en estos experimentos. De acuerdo con ellos, se eligió un volumen de 100 mL como volumen de carga para todos los ensayos posteriores.

**Tabla V.2** Estudio de recuperación de ácido domoico en función del volumen de muestra cargado en el cartucho C-18.

Volumen de carga (mL)	Recuperación (%)
25	103
100	98
200	50

- **Velocidad de flujo durante la carga.**

Para optimizar el tiempo de análisis, se examinó el efecto producido por un aumento en la velocidad de flujo durante la etapa de carga de la muestra. En la **Tabla V.3** se muestran los resultados obtenidos. La disminución de recuperación al flujo más alto puede ser debida a que una fracción del soluto no alcanzó a penetrar en la fase estacionaria, e interaccionar con ella, durante la rápida migración de la fase móvil a través del cartucho.

Con base en estos resultados, se eligió una velocidad de flujo de 5 mL/min para cargar la muestra en el cartucho C-18.

**Tabla V.3** Influencia de la velocidad de flujo sobre la recuperación del soluto.

<b>Velocidad de flujo (mL/min)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
1.0	94
2.0	91
5.0	92
7.5	79

### **B) Operaciones en la precolumna PLRP.**

El paso más delicado en esta etapa es la transferencia del eluato del cartucho a la precolumna. Los ensayos realizados para optimizar este paso se describen a continuación.

#### **- Composición de la solución de carga.**

Como se mencionó anteriormente, los 4 mL de eluato recuperados del cartucho contenían 30% de metanol (1.2 mL). Esta solución no podía cargarse directamente en la precolumna porque el ácido domoico se habría fugado de inmediato. Para conocer las características de retención de este soluto en la fase reversa polimérica PLRP-S, y a partir de ello deducir cómo debería ser modificado o tratado el eluato del cartucho, se realizaron una serie de ensayos independientes cargando en la precolumna diversos volúmenes de disoluciones de ácido domoico a diferente composición.

Inicialmente se probaron diferentes volúmenes de carga en medio ácido (pH~2.3 fijado con HClO<sub>4</sub>) y sin disolvente orgánico. Posteriormente se ensayó un volumen de carga de 25 mL con un pequeño contenido de metanol, encontrando que con sólo 1% de disolvente orgánico ya había pérdida de analito. Esto nos llevó a intentar aumentar la retención por adición de hexansulfonato, como agente formador de pares de iones. Los resultados

fueron muy alentadores pues se pudo aumentar el volumen de carga y el contenido de metanol obteniendo buena recuperación del analito. Se ensayaron dos diferentes concentraciones de hexansulfonato de sodio,  $5 \times 10^{-2}$  y  $5 \times 10^{-3}$  M, no detectando diferencias significativas en los resultados, por lo cual se optó por la menor de ellas. En todos estos experimentos se mantuvo la disolución acidificada al pH antes mencionado y se trabajó a velocidad de flujo de 1.5 mL/min. En la **Tabla V.4** se reporta la recuperación de ácido domoico obtenida en los diferentes ensayos.

Al analizar los resultados se concluyó que la solución de carga debería tener menos de 5 % de metanol para asegurar una buena recuperación del analito. Puesto que el eluato del cartucho contenía en total 1.2 mL de metanol, bastaba con diluirlo a 25 mL para satisfacer esta condición. Evidentemente, la dilución debería hacerse con una solución de hexansulfonato de sodio acidificada. El último ensayo reportado en la **Tabla V.4** corresponde a condiciones muy cercanas a las que se tendrían al diluir el eluato del cartucho C-18 para transferirlo a la precolumna PLRP-S.

**Tabla V.4** Efecto del volumen de carga, contenido de metanol y hexansulfonato de sodio en la recuperación de ácido domoico.

Volumen cargado en la precoluma (mL)	Metanol (%)	Hexansulfonato de sodio (M)	Recuperación (%)
25	0	0	104
40	0	0	76
50	0	0	50
25	1	0	87
50	0	0.05	103
50	5	0.05	96
50	4	0.005	100
25	4.8	0.005	98

Las condiciones finales para el proceso completo de EFS tanto en el cartucho C-18 como en la precolumna PLRP-S se especificaron en la sección correspondiente a la parte experimental (**Tabla IV.1**).

### V.2. Validación del método analítico

Una vez optimizada cada una de las etapas de EFS, así como las condiciones cromatográficas para la separación y detección del ácido domoico, se realizó la evaluación estadística del método desarrollado. Todos los experimentos de esta sección se llevaron a cabo con muestras sintéticas de agua pura adicionadas con NaCl 3.5 % (p/v) para simular la salinidad del agua de mar; el volumen de muestra fue de 100 mL. Los resultados de este estudio se describen a continuación.

#### V.2.1. Estabilidad del ácido domoico.

Algunas disoluciones empleadas en la etapa de preparación de muestra, así como la fase móvil utilizada en la separación cromatográfica, contenían HClO<sub>4</sub> 0.01 M. Por eso se consideró importante verificar la estabilidad del ácido domoico en medio ácido como parte de la validación del método. El estudio se realizó con una disolución del analito a concentración de 1.0 ppm en un medio acuoso acidificado con HClO<sub>4</sub> 0.1 M. Periódicamente se inyectó esta disolución en el cromatógrafo durante un lapso de 10 días y se determinó la concentración por comparación del área del pico de ácido domoico con el área del pico obtenido al inyectar una disolución estándar de este soluto a la misma concentración. Como se muestra en la **Tabla V.5**, no se observó ningún cambio significativo en la concentración del compuesto de interés durante el intervalo de tiempo estudiado. Por lo tanto, se concluye que el ácido domoico es bastante estable en disoluciones acuosas de ácido perclórico a concentración relativamente elevada.

**Tabla V.5** Estabilidad del ácido domoico en una disolución acuosa de HClO<sub>4</sub> 0.1 M.

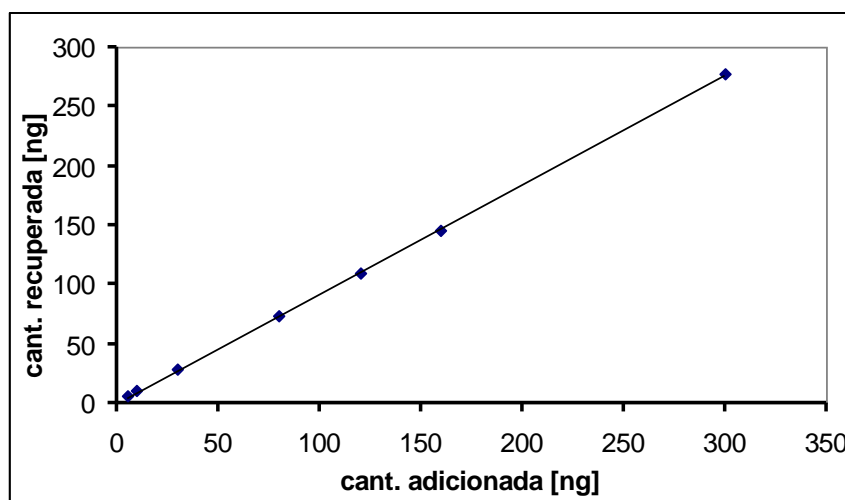
Día	Concentración de AD (ppm)*
1	1.01
2	0.94
5	1.04
6	1.11
7	0.95
8	1.01
10	1.02

\* AD: ácido domoico

### V.2.2. Linealidad del método

En la **Figura V.3** se presentan los resultados obtenidos al estudiar la linealidad del método con muestras fortificadas con ácido domoico a concentraciones en el intervalo de 50 ppt (partes por trillón = pg/mL) a 3 ppb. Las muestras fueron preparadas según el método desarrollado (condiciones resumidas en la **Tabla IV.1**) y finalmente eluidas en línea de la precolumna a la columna analítica para su separación, detección y cuantificación. La cantidad recuperada del compuesto se determinó por estandarización externa, comparando el área del pico obtenido en la muestra analizada con el área del pico obtenido por inyección directa de 26 µL (volumen del bucle del inyector) de un estándar de ácido domoico a concentración conocida.





**Figura V.3** Linealidad del método.

La ecuación de regresión lineal, obtenida por el método de mínimos cuadrados, y su correspondiente coeficiente de determinación ( $r^2$ ) fueron los siguientes (ecuaciones **E-V.1** y **E-V.2**):

$$y = 0.9165 x + 0.407 \quad (\text{E-V.1})$$

$$r^2 = 0.998 \quad (\text{E-V.2})$$

Donde “y” es la cantidad recuperada y “x” es la cantidad adicionada. La ordenada al origen y la pendiente de la ecuación **E-V.1** son buenos indicadores de la calidad del método analítico desarrollado. Una ordenada al origen estadísticamente igual a cero indica que el método no presenta errores sistemáticos. Una pendiente estadísticamente igual a uno demuestra que no hay pérdidas de analito durante las diferentes etapas del método, o ganancias por contaminación cruzada o por coelución de interferencias.

Las pruebas de hipótesis realizadas sobre la ordenada al origen (a) y la pendiente (b) de la recta de regresión fueron:

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 estadísticos se muestran en la **Tabla V.6**.

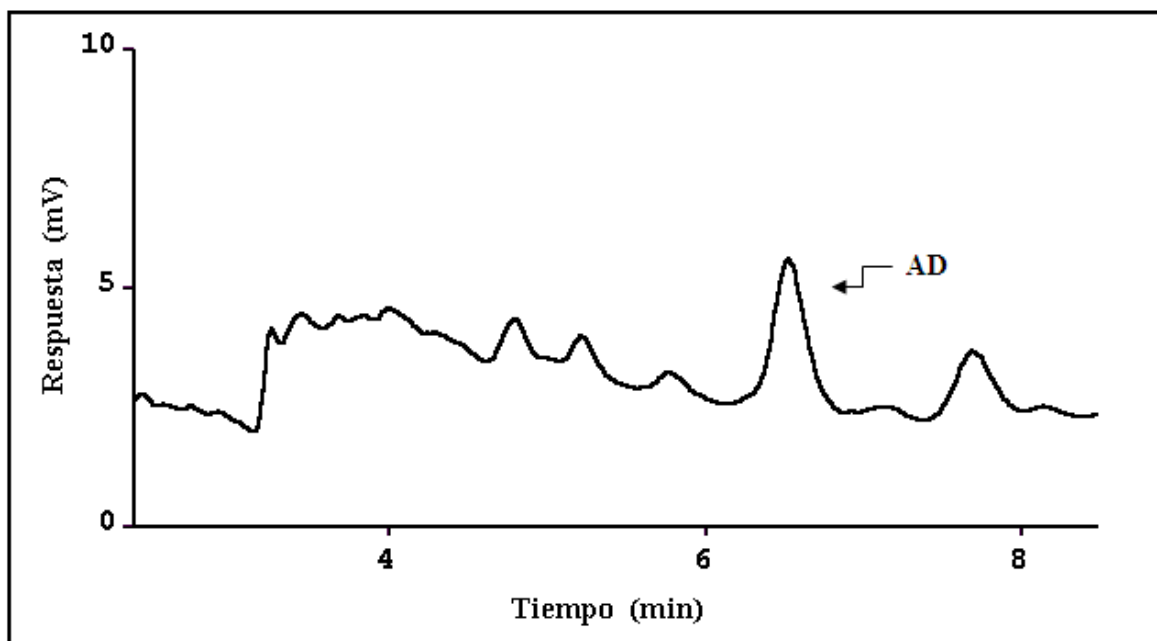
**Tabla V.6** Resultados de las pruebas de hipótesis sobre la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión. Nivel de confianza  $\alpha = 0.05$ .

Parámetro	t calculada	t critica	Decisión
a	0.57	2.57	Aceptar $H_0$
b	-16.47	2.57	Rechazar $H_0$

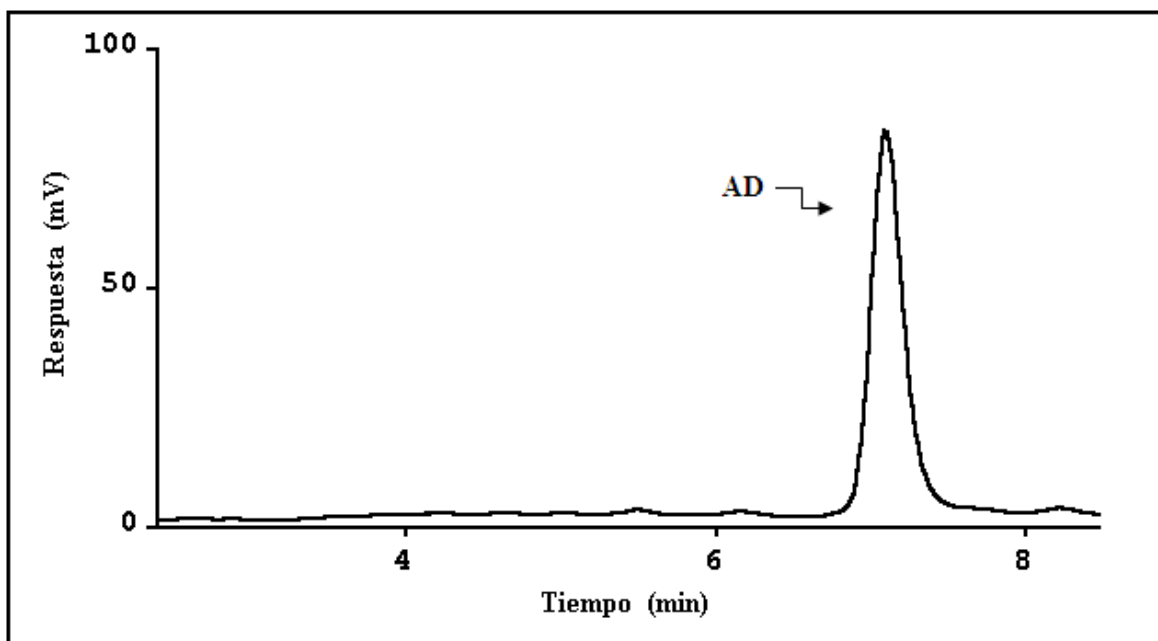
Los resultados del estudio demuestran que existe una relación lineal entre la cantidad de ácido domoico presente en las muestra y la cantidad determinada por el método en el intervalo de concentraciones estudiado. La ordenada al origen es estadísticamente igual a cero por lo que este método no presenta errores sistemáticos. Sin embargo, la pendiente de la recta es significativamente menor a 1, lo que indica que probablemente hubo algunas pérdidas de analito durante el procesamiento de las muestras. El porcentaje de recuperación promedio en las condiciones estudiadas fue de ~92 %. Cabe hacer notar que un porcentaje de recuperación arriba del 90 % se considera muy satisfactorio en análisis ambientales de contaminantes a niveles traza.

En las **Figuras V.4** y **V.5** se presentan los cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras sintéticas fortificadas con ácido domoico (AD) a concentraciones de 100 ppt y 3 ppb, respectivamente. Como puede observarse en la **Figura V.4**, que corresponde a una concentración diez veces menor a la

ppb, el pico del analito destaca claramente sobre el ruido de fondo de la línea base. La cantidad absoluta de analito en esta muestra fue de 10 ng.



**Figura V.4** Cromatograma de una muestra sintética fortificada con ácido domoico (AD) a 100 ppt.



**Figura V.5** Cromatograma de una muestra sintética fortificada con ácido domoico (AD) a 3 ppb.

### V.2.3. Precisión y exactitud

La precisión del método se evaluó con base en el coeficiente de variación (% CV) obtenido en el análisis de 8 muestras independientes, dopadas con ácido domoico a 300 ppt (30 ng). La cantidad de analito determinada por el método (ng) y la correspondiente concentración de éste en cada réplica (ppb) se reportan en la **Tabla V.7**.

Como puede observarse, el coeficiente de variación obtenido fue menor al 5 %, lo que representa un resultado excelente para niveles de concentración inferiores a la ppb. Es importante hacer notar que las 8 réplicas fueron analizadas en diferentes días. Los resultados en la **Tabla V.7** se presentan en el orden cronológico en que fueron realizadas las determinaciones, pudiendo constatarse que no existe ninguna tendencia en los valores de concentración obtenidos. Por lo tanto, se considera que el método desarrollado es preciso y se corrobora la ausencia de problemas de contaminación cruzada.

La exactitud del método se estimó por la recuperación promedio (% R). Para estos ensayos se obtuvo una recuperación de 94.6 %, ligeramente mayor que la recuperación global reportada en la sección anterior para un amplio intervalo de concentraciones. Aunque en principio podría ser posible aplicar un factor correctivo a la concentración calculada, para tomar en cuenta la recuperación global del método (92 % según el estudio de linealidad), se prefirió no hacerlo. Esto debido a que en muestras reales de agua de mar, los efectos de matriz pueden influir significativamente sobre el área del pico del analito, tanto en sentido negativo (pérdidas) como en sentido positivo (ganancia aparente por coelución de interferencias). Incluso es de esperarse que la matriz de la muestra varíe significativamente dependiendo del sitio o de la temporada de colección del agua de mar. Por ello no tiene sentido aplicar un factor correctivo derivado del análisis de muestras sintéticas, donde la matriz es más limpia e idéntica de muestra a muestra.

**Tabla V.7** Estudio de precisión y exactitud del método.

Muestras (réplicas)	Cantidad de AD determinada (ng)	Concentración de AD (ppb)
1	27.3	0.273
2	27.8	0.278
3	28.6	0.286
4	27.8	0.278
5	28.4	0.284
6	30.7	0.307
7	29.7	0.297
8	26.6	0.266
<b>Promedio</b>	28.4	0.284
<b>DE</b>	1.32	0.013
<b>CV (%)</b>	4.65	
<b>R (%)</b>	94.6	

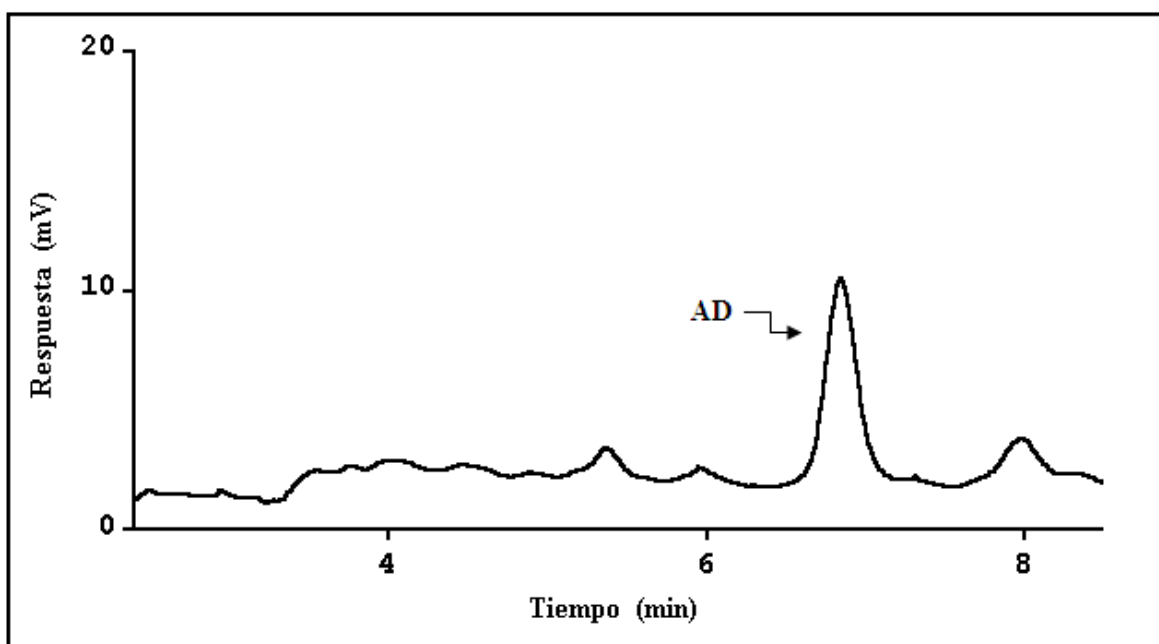
**DE:** Desviación estándar, **CV:** Coeficiente de Variación, **R:** Recuperación. Las ocho réplicas fueron dopadas a 0.300 ppb de ácido domoico (AD).

Utilizando los resultados de la **Tabla V.7**, se calculó el intervalo de confianza para la concentración de ácido domoico en las muestras analizadas, así como el intervalo de confianza para la recuperación del analito. Estos datos se presentan en la **Tabla V.8**.

**Tabla V.8** Intervalo de confianza para la concentración de ácido domoico determinada en muestras replicadas (n=8). Nivel de confianza  $\alpha = 0.05$ .

Analito	Intervalo de confianza concentración	Intervalo de confianza recuperación
Ácido domoico	0.273 < ppb < 0.295	93.5 < %R < 95.7

En la **Figura V.6** se muestra uno de los cromatogramas obtenidos en los ensayos de repetitividad.



**Figura V.6** Cromatograma de una muestra de agua dopada con ácido domoico (AD) a 300 ppt.

#### V.2.4. Límite de detección del método

Los resultados anteriores demostraron que el método analítico desarrollado permite determinar concentraciones de ácido domoico de algunas centenas de partes por trillón en un medio acuoso salino con buena precisión y aceptable exactitud.

Mediante cálculos estadísticos sencillos y utilizando la desviación estándar en unidades de concentración, reportada en la **Tabla V.7**, se estimó el límite de detección del método (LDM). La estimación de LDM se basó en el criterio recomendado por la EPA (Environmental Protection Agency; agencia de protección ambiental de E.U.) para el análisis de contaminantes en muestras ambientales de agua. Según este criterio, el LDM se calcula aplicando la siguiente relación (ecuación **E-V.3**):

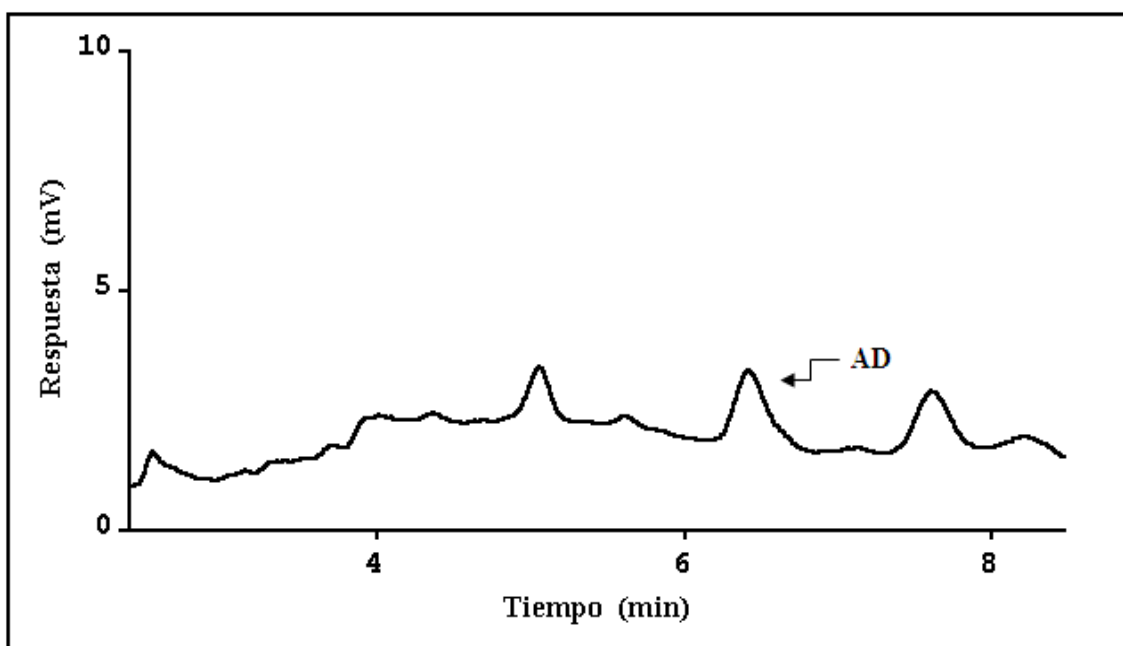
$$\text{LDM} = t_{(0.01, n-1)} * S \quad (\text{E-V.3})$$

Donde “ $t_{(0.01, n-1)}$ ” es la “ $t$ ” de Student para un nivel de confianza de 1 % con  $n-1$  grados de libertad (prueba de una cola) y “ $S$ ” es la desviación estándar obtenida en el análisis de al menos 7 muestras fortificadas con el analito a niveles de concentración no mayores a 10 veces el LDM esperado. El valor de concentración obtenido para el LDM se presenta en la **Tabla V.9**.

**Tabla V.9** Límite de Detección del Método (LDM).

Analito	Desviación estándar (ppt)	$t_{(0.01, n-1)}$	LDM (ppt)
Ácido domoico	13.2	3.5	46

El LDM calculado fue de 46 ppt, es decir ~20 veces menor a la ppb, lo que es un excelente logro considerando que la instrumentación utilizada en el método es muy convencional (CLAR-UV y bombas isocráticas para la EFS) y está al alcance de cualquier laboratorio dedicado al monitoreo ambiental. El cromatograma mostrado en la **Figura V.7** corrobora experimentalmente la factibilidad de detectar al ácido domoico a este nivel de concentración.



**Figura V.7** Cromatograma de una muestra de agua dopada con ácido domoico (AD) a 50 ppt.

Los picos adyacentes al ácido domoico, que sobresalen del ruido de fondo de la línea base, provienen probablemente de impurezas presentes a niveles traza en alguno (o en varios) de los reactivos usados. Estas impurezas también fueron preconcentradas durante la preparación de muestra y no fueron eliminadas en los pasos de lavado. No obstante, en las condiciones cromatográficas establecidas, los picos de impurezas están bien separados y no interfieren en la detección o cuantificación del compuesto de interés.

### V.3. Aplicación del método en muestras reales de agua de mar

Se analizaron 3 diferentes muestras de agua de mar, colectadas en Acapulco, Gro., Tecolutla, Ver. y Sisal, Yuc. Todas las muestras se filtraron a través de una membrana con poro de 0.45  $\mu\text{m}$  para remover sólidos suspendidos y se mantuvieron en refrigeración (4°C) hasta su análisis. De cada muestra colectada se tomaron alícuotas de 100 mL y se determinó su pH antes de someterlas al tratamiento por EFS. El agua de mar es de naturaleza alcalina por lo que fue necesario agregar un ácido para ajustarla al pH requerido por la

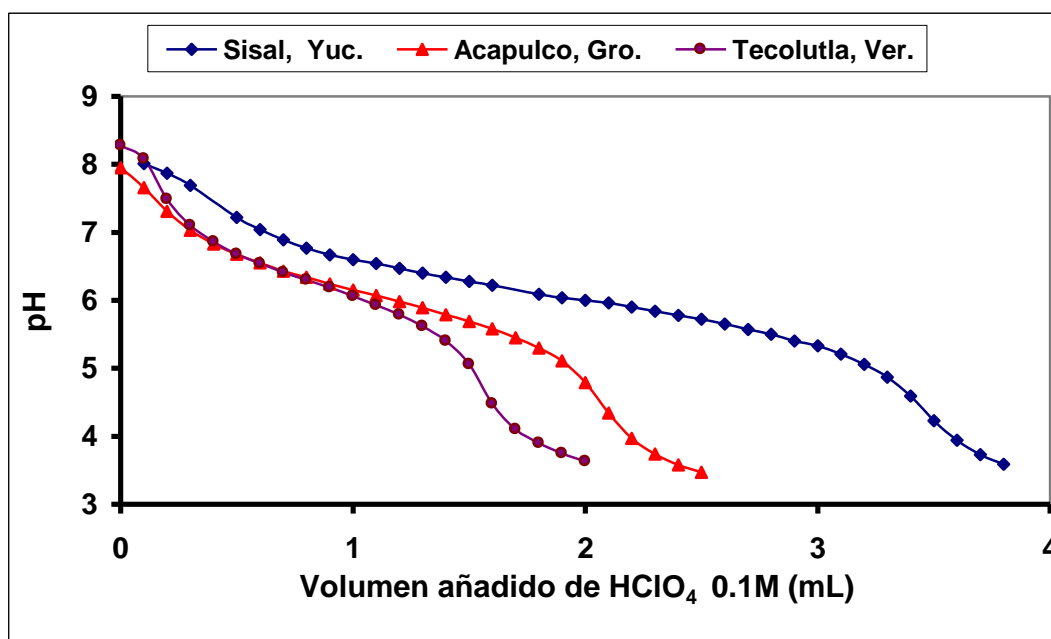


metodología desarrollada (pH~3.6). En la **Tabla V.10** se presentan los datos correspondientes a las tres muestras.

**Tabla V.10** Volumen de HClO<sub>4</sub> 0.1 M utilizado para ajustar el pH de las muestras de agua de mar (100 mL).

Operación	Sisal, Yuc.	Acapulco, Gro.	Tecolutla, Ver.
pH inicial	8.01	7.95	8.28
Vol. adicionado de HClO <sub>4</sub> 0.1 M (mL)	3.8	2.5	2.0
pH final	3.59	3.47	3.63

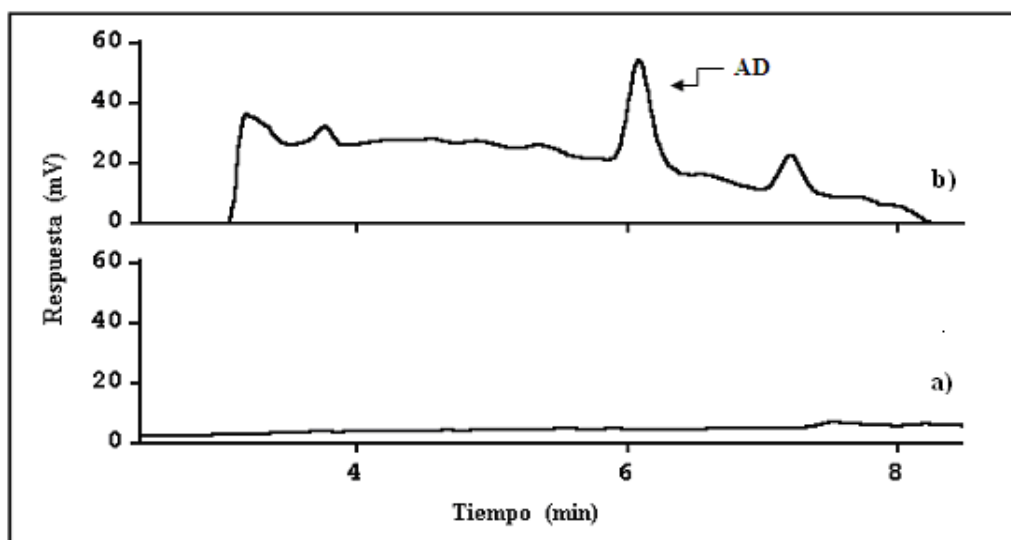
La variación del pH de las muestras durante la adición de ácido se monitoreó potenciométricamente. En la **Figura V.8** se presenta el perfil obtenido para las curvas de pH en función del volumen de ácido añadido. En los tres casos el comportamiento fue muy similar; las curvas presentaron una zona de amortiguamiento alrededor de pH 6-7, aunque esta zona fue más extendida para la muestra proveniente de Yucatán. El valor del pH en la región de amortiguamiento hace pensar que un posible responsable del mismo podría ser el par ácido-base H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.



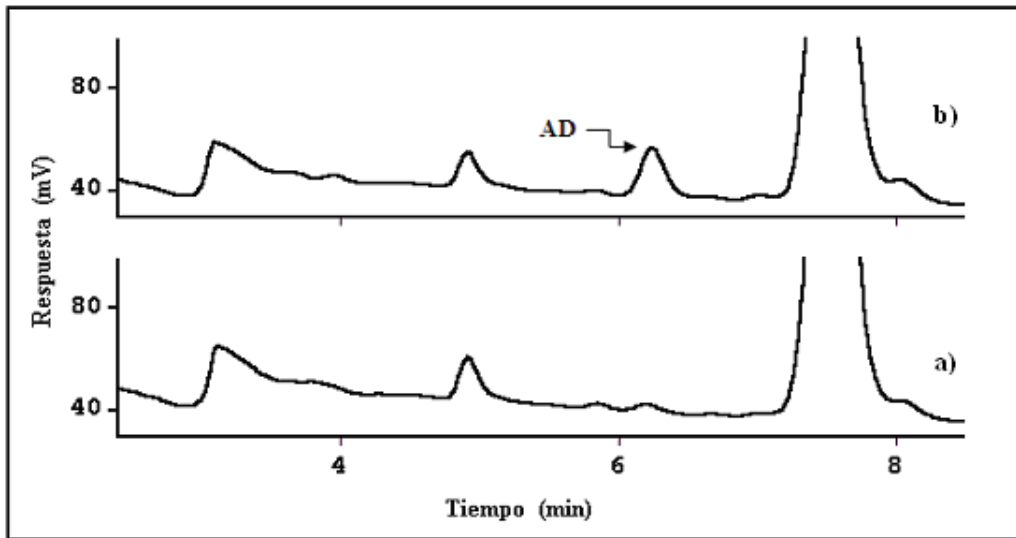
**Figura V.8** Comportamiento ácido-base de las muestras de agua de mar.

Los análisis se llevaron a cabo con alícuotas de las muestras sin dopar (blanco de muestra) y dopadas con ácido domoico a 0.5 o 1.0 ppb. Una vez ajustado el pH, se agregó hexansulfonato de sodio a concentración  $5 \times 10^{-3}$  M y se procesaron de acuerdo con el protocolo ya establecido.

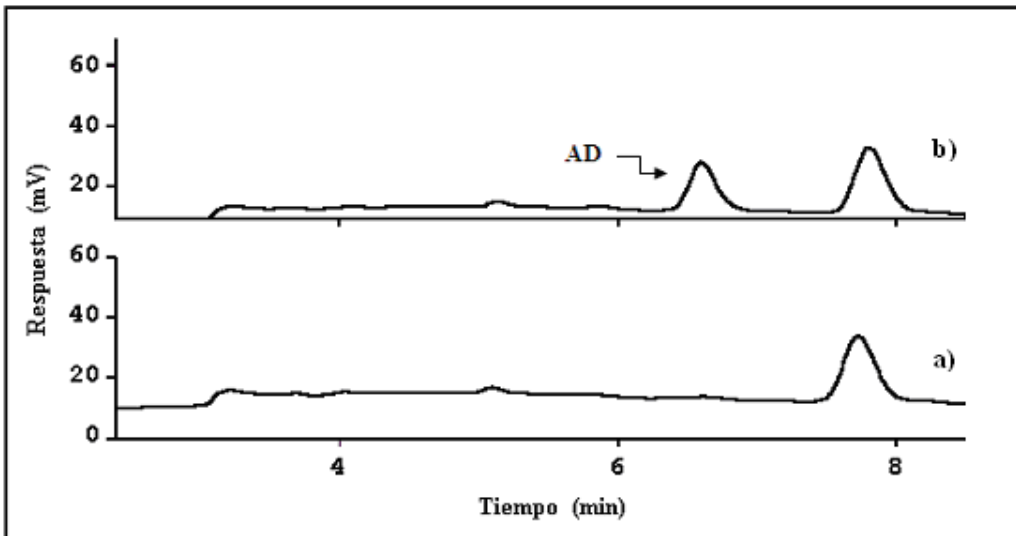
En las **Figuras V.9, V.10 y V.11** se presentan los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras blanco y las muestras fortificadas del agua de mar de Yucatán, Acapulco y Veracruz, respectivamente.



**Figura V.9** Cromatogramas obtenidos del análisis de agua de mar colectada en Sisal, Yuc. (a) muestra blanco y (b) muestra fortificada con ácido domoico (AD) a 1.0 ppb.



**Figura V.10** Cromatogramas obtenidos del análisis de agua de mar colectada en Acapulco, Gro. (a) muestra blanco y (b) muestra fortificada con ácido domoico (AD) a 0.5 ppb.



**Figura V.11** Cromatogramas obtenidos del análisis de agua de mar colectada en Tecolutla, Ver. (a) muestra blanco y (b) muestra fortificada con ácido domoico (AD) a 0.5 ppb.

En todos los cromatogramas de las muestras blanco se observan pequeños picos y ondulaciones de la línea base que podrían corresponder a residuos de compuestos presentes en la matriz original. Sin embargo, en general estas señales son mínimas en la zona donde eluye el ácido domoico y no afectan

significativamente su cuantificación. Adicionalmente, se observa un pico bastante importante a un tiempo de retención un poco mayor que el del analito. Comparado con la señal del ácido domoico, dicho pico es sumamente grande en el caso de la muestra de Acapulco; sin embargo, la separación entre ambos es suficientemente amplia de modo que no representa un problema desde el punto de vista analítico. Curiosamente la intensidad de esa señal decrece notablemente en el agua de Tecolutla y es muy pequeña en el agua de Sisal, lo que podría estar relacionado con el nivel de contaminación del agua de mar en los tres lugares de origen. Dado su comportamiento durante el proceso analítico, se podría especular que se trata de un compuesto de polaridad y área hidrocarbonada semejantes a las del ácido domoico, probablemente con algún anillo aromático y tal vez con grupos funcionales ionizables capaces de formar pares de iones con el hexansulfonato en medio ácido (p.ej. una amina o un aminoácido). Desafortunadamente la instrumentación utilizada en este trabajo no nos permitió la identificación del componente responsable de ese pico, pero sería interesante investigarlo en un trabajo futuro.

Aparte de la señal antes referida, los cromatogramas de las muestras reales son relativamente limpios, demostrando que el método desarrollado puede ser aplicado para el monitoreo de la biotoxina en diferentes muestras de agua de mar. Esto se corrobora con los buenos resultados obtenidos para la recuperación del ácido domoico en las tres muestras analizadas, según se reporta en la **Tabla V.11**.

**Tabla V.11** Recuperación de ácido domoico en las muestras de agua de mar.

<b>Muestras (nivel de fortificación)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
Sisal, Yuc. (1.0 ppb)	93
Acapulco, Gro. (0.5 ppb)	103
Tecolutla, Ver. (0.5 ppb)	100

La recuperación de ácido domoico en las muestras reales fue ligeramente mayor que en las muestras sintéticas fortificadas a concentración semejante (ver **Tabla V.8**). Esto es atribuido a un efecto de matriz, que no forzosamente significa coelución de interferencias pues la composición de la muestra (en particular otras sales diferentes a NaCl presentes en el agua de mar) podría promover una mejor recuperación del analito. En todo caso, la recuperación fue muy similar en las tres muestras reales y la diferencia con las muestras sintéticas fue menor al 10 %.

La aplicación exitosa del método desarrollado a diferentes muestras de agua de mar demuestra su confiabilidad y robustez.

## VI. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico de alta sensibilidad y selectividad, que permitirá monitorear la biotoxina ácido domoico en agua de mar a los muy bajos niveles de concentración en que podría encontrarse durante un fenómeno de marea roja.
- El método propuesto consta de tres etapas. Las dos primeras están enfocadas a la preconcentración y limpieza de la muestra mediante una doble extracción en fase sólida (EFS), utilizando un cartucho empacado con fase enlazada C-18 y una precolumna empacada con fase polimérica estireno-divinilbenceno. La última etapa comprende la elución de la biotoxina retenida en la precolumna y su análisis en línea por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV a 239 nm.
- Debido a la naturaleza ácido-base del soluto, el pH es un parámetro fundamental en todas las etapas del método desarrollado. Su control riguroso y el uso de un agente formador de pares de iones son indispensables para promover la retención del analito polar en los adsorbentes de fase reversa del cartucho y la precolumna de EFS. Bajo estas condiciones, el volumen de fuga del soluto en el cartucho C-18 es mayor a 100 mL, trabajando a una velocidad de flujo de 5 mL/min.
- Por el carácter secuencial del proceso, el segundo punto crítico es la elución del ácido domoico retenido en el cartucho. La mezcla metanol-agua (acetato de amonio 0.01 M) 30:70 (v/v) resulta idónea para este fin pues con sólo 4 mL se puede recuperar cuantitativamente al analito y, por ser un eluyente relativamente débil, se minimiza la desorción de posibles compuestos interferentes que hubieran quedado retenidos en el cartucho durante la carga de la muestra.

- La segunda etapa de EFS se facilita notablemente por el bajo contenido de metanol y el volumen moderado del eluato obtenido del cartucho. Así, basta con diluir este extracto a 25 mL con una disolución acuosa de hexansulfonato de sodio acidificada a pH ~ 2.1, para poder cargarlo en la precolumna de EFS sin pérdida significativa del analito.
- Las condiciones experimentales optimizadas para las dos etapas de extracción en fase sólida permiten alcanzar factores de preconcentración del ácido domoico cercanos a 4,000 y un alto grado de purificación de las muestras.
- El estudio estadístico del método propuesto demostró que éste es lineal en el intervalo de concentraciones de ácido domoico de 50 ppt a 3 ppb (5-300 ng de la biotoxina en 100 mL de muestra). La precisión y exactitud, a concentraciones de ácido domoico inferiores a la ppb, fueron excelentes; se obtuvo una recuperación promedio > 90%, con un coeficiente de variación < 5 %.
- El límite de detección del método (LDM), determinado estadísticamente según el criterio recomendado por la EPA para contaminantes en aguas naturales, fue de 46 ppt (4.6 ng de ácido domoico en 100 mL de agua), lo cual se corroboró experimentalmente. Este LDM es del mismo orden que los obtenidos por otros métodos reportados en la literatura; sin embargo, dichos métodos requieren del uso de equipo sofisticado y muy costoso.
- El método propuesto fue aplicado a tres diferentes muestras de agua de mar, provenientes de Sisal, Yuc., Tecolutla, Ver. y Acapulco Gro. Los excelentes resultados obtenidos con las muestras fortificadas comprobaron su robustez y confiabilidad.

- El diseño del método es tal, que su aplicación es viable en cualquier laboratorio que cuente con la instrumentación básica para la realización de análisis de tipo ambiental en nuestro país. Así, el presente trabajo busca contribuir, mediante una alternativa más simple y abordable, a la detección, seguimiento y control de un problema causado por un fenómeno natural, cuya aparición es cada vez más frecuente.



Anexo

Listado de ecuaciones estadísticas

A.1	$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$\bar{x}$	Media aritmética muestral de los valores $x_i$
A.2	$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	$n$	Número de muestras
A.3	$CV = \frac{s}{\bar{x}} * 100$	$s$	Desviación estándar de los valores $x_i$
A.4	$IC = \pm \frac{t * s}{\sqrt{n}}$	CV	Coefficiente de variación o desviación estándar relativa
A.5	$v_1 = n - 1$	IC	Intervalo de confianza
A.6	$v_2 = n - 2$	$v_1$	Grados de libertad para un conjunto de datos
A.7	$y = mx + b$	$v_2$	Grados de libertad para pares de datos
A.8	$m = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$	$y$	Variable dependiente
A.9	$b = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$	$m$	Pendiente de la recta de mínimos cuadrados
A.10	$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\left[ \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2 \right]}}$	$x$	Variable independiente
		$b$	Ordenada al origen de la recta de mínimos cuadrados
		$r$	Coefficiente de correlación momento producto
		$t$	Valor de t para un nivel de confianza ( $\alpha$ ) establecido

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cortés, A. R. *Las mareas rojas*, AGT Editor S.A., México, 1998, pp: 33, 47-62, 81-84.
2. <http://www.monografias.com/trabajos32/floraciones-algales-nocivas/floraciones-algales-nocivas.shtml?monosearch>  
Página consultada en julio-diciembre 2009
3. [http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/antecedentes\\_en\\_mexico](http://www.cofepris.gob.mx/wb/cfp/antecedentes_en_mexico)  
Página consultada en julio-diciembre 2009
4. Montes de Oca, H. 2007. Descripción de los efectos de la marea roja y propuesta de un plan de acción. **Tesis de Licenciatura:** Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México,
5. [http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://weblogs.clarin.com/ensayo-y-error/archives/DINOFLAGELADO3.jpg&imgrefurl=http://weblogs.clarin.com/ensayo-y-error/archives/2007/08/&usq=\\_\\_NJTWuSOBXTyqBON8LUGgAymPeYU=&h=254&w=393&sz=19&hl=es&start=6&um=1&itbs=1&tbnid=xfLcfsotLRj\\_uM:&tbnh=80&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Ddinoflagelados%26hl%3Des%26sa%3DN%26um%3D1](http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://weblogs.clarin.com/ensayo-y-error/archives/DINOFLAGELADO3.jpg&imgrefurl=http://weblogs.clarin.com/ensayo-y-error/archives/2007/08/&usq=__NJTWuSOBXTyqBON8LUGgAymPeYU=&h=254&w=393&sz=19&hl=es&start=6&um=1&itbs=1&tbnid=xfLcfsotLRj_uM:&tbnh=80&tbnw=124&prev=/images%3Fq%3Ddinoflagelados%26hl%3Des%26sa%3DN%26um%3D1)  
Página consultada en julio-diciembre 2009
6. [http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.seriestemporales-ieo.net/en/galeria/galeria4/Ceratium\\_azoricum.jpg&imgrefurl=http://www.seriestemporales-ieo.net/en/galeria/galeria4/galeria4.htm&usq=\\_\\_0SyPJSj8wlvWYeT2QA9p7ezCZis=&h=576&w=768&sz=85&hl=es&start=4&um=1&itbs=1&tbnid=CjGe3NYeKCZr1M:&tbnh=107&tbnw=142&prev=/images%3Fq%3Ddinoflagelados%26hl%3Des%26sa%3DN%26um%3D1](http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=http://www.seriestemporales-ieo.net/en/galeria/galeria4/Ceratium_azoricum.jpg&imgrefurl=http://www.seriestemporales-ieo.net/en/galeria/galeria4/galeria4.htm&usq=__0SyPJSj8wlvWYeT2QA9p7ezCZis=&h=576&w=768&sz=85&hl=es&start=4&um=1&itbs=1&tbnid=CjGe3NYeKCZr1M:&tbnh=107&tbnw=142&prev=/images%3Fq%3Ddinoflagelados%26hl%3Des%26sa%3DN%26um%3D1)  
Página consultada en julio-diciembre 2009

7. <http://es.wikipedia.org/wiki/Diatomea>  
Página consultada en julio-diciembre 2009
8. <http://cofepris.salud.gob.mx/mareaRoja/bioToxinas.pdf>  
Página consultada en julio-diciembre 2009
9. Daranas, A.H., Norte, M., Fernández, J.J. 2001. *Toxic marine microalgae. Toxicon* **39**: 1101-1132.
10. Mos, L. 2001. *Domoic acid: a fascinating marine toxin. Environmental Toxicology and Pharmacology* **9**: 79-85.
11. <http://cofepris.salud.gob.mx/mareaRoja/generales.pdf>  
Página consultada en julio-diciembre 2009
12. AOAC Official Methods of Analysis, 1995. Natural Toxins 991.26, p.48.
13. De La Iglesia, P., Giménez, G., Diogène, J. 2008. *Determination of dissolved domoic acid in seawater with reversed-phase extraction disks and rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry with head-column trapping. J. Chromatogr. A* **1215**: 116-124.
14. Wang, Z., King, K.L., Ramsdell, J.S., Doucette, G.J. 2007. *Determination of domoic acid in seawater and phytoplankton by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A* **1163**: 169-176.
15. Pardo, O., Yusa, V., León, N., Pastor, A. 2007. *Development of a pressurized liquid extraction and liquid chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry method for the determination of domoic acid in shellfish. J. Chromatogr. A* **1154**: 287-294.

16. James, K.J., Gillman, M., Lehane, M., Gago-Martinez, A. 2000. *New fluorimetric method of liquid chromatography for the determination of the neurotoxin domoic acid in seafood and marine phytoplankton. J. Chromatogr. A 871: 1-6.*
17. Maroulis, M., Monemvasios, I., Vardaka, E., Rigas, P. 2008. *Determination of domoic acid in mussels by HPLC with post-column derivatization using 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) and fluorescence detection. J. Chromatogr. B 876: 245-251.*
18. Christian G.D. *Química Analítica*, 6<sup>ta</sup> edición, McGraw Hill, México, 2009, pp: 547-551.
19. Snyder, L.R., Glajch, J.L., Kirkland, J.J. *Practical HPLC Method Development*, 2<sup>nda</sup> edición, Editorial Wiley Interscience, N.Y., 1997, pp: 317-324.
20. Catálogo de productos para cromatografía, SUPELCO, 1999
21. Subra, P., Hennion, M.-C., Rosset, R., Frei, R.W. 1988. *Recovery of organic compounds from large-volume aqueous samples using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques, J. Chromatogr. 456: 121-141.*
22. Miller N.J., Miller J.C. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall. 4ta Edición, México, 2004, pp. 21-23, 32,33,263.