



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE  
MÉXICO

---

---

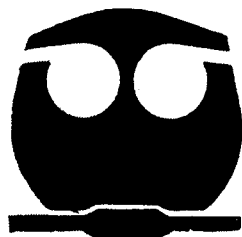
FACULTAD DE QUÍMICA

**T E S I S**

CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LOS FACTORES QUE AFECTAN  
LA EFICIENCIA DE LA EXTRACCIÓN EN LA TÉCNICA DE  
DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:  
EDGAR RESÉNDIZ GARCÍA



MÉXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Jurado asignado:

Profesores

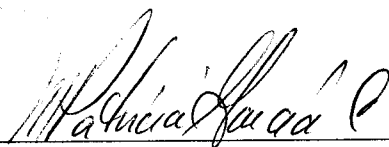
Presidente	ADOLFO GARCÍA OSUNA
Vocal	JOSEFINA ELIZALDE TORRES
Secretario	MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO
1 <sup>er</sup> . Suplente	ELBA ROJAS ESCUDERO
2 <sup>do</sup> . Suplente	ERIKA MARIA RAMIREZ MAYA

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 3D anexo, edificio A 3<sup>er</sup> piso, Facultad de Química, circuito interior  
Ciudad Universitaria

Asesora:

Dra Martha Patricia García Camacho



---

Sustentante:

Edgar Resendiz García



---

## AGRADECIMIENTOS



- ❖ A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), proyecto PAPIIT IN203302 intitulado “Extracción de contaminantes orgánicos en adsorbentes con matrices biológicas dispersas”.
  
- ❖ Al seminario académico José Herrán Arellano de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma México.  
  
por el financiamiento otorgado.



- ❖ A la Doctora Marta Patricia García Camacho, por todo el apoyo en la realización de este trabajo.



- ❖ A Maria Guadalupe García, por apoyar mi formación académica.

**INTRODUCCIÓN**

1

**CAPÍTULO I  
ANTECEDENTES**

I.1.	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS (CL)	5
I.2.	EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)	13
I.3.	DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (DMFS)	26
I.4.	PRESENCIA DE CONTAMINANTES PERSISTENTES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS	32

**CAPITULO II  
MATERIALES Y EQUIPOS**

II.1.	DISOLVENTES Y REACTIVOS	34
II.2.	DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA	34
II.3.	SISTEMA CROMATOGRAFICO	35
II.4.	MUESTRAS BIOLÓGICAS	35
II.5.	OTROS MATERIALES Y APARATOS UTILIZADOS	35

**CAPITULO III  
DESARROLLO EXPERIMENTAL**

III.1.	PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO	36
III.2.	ESTABLECIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y EL ANÁLISIS CROMATOGRAFICO	36
III.3.	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SAPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA EL BENZO(A)PIRENO	37
III.4.	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA LA MEZCLA DE COMPUESTOS	38
III.5.	CONDICIONES FINALES DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	39
III.6.	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN	39
III.7.	PROTOCOLO PARA REALIZAR LA DISPERSIÓN Y EL EMPAQUE DE LA COLUMNA	43
III.8.	ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL BENZO(A)PIRENO POR DMFS	42
III.9.	ELIMINACIÓN DE LÍPIDOS INTERFERENTES EN LA SECUENCIA DE ELUCIÓN	44
III.10.	LIMPIEZA DE EXTRACTOS CON ADSORBENTES	44
III.11.	ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO CON DIFERENTES MEZCLAS DE ACETONITRILLO:AGUA EN DIFERENTES FASES ESTACIONARIAS	44
III.12.	OBSERVACIÓN POR MICROSCIPIA ELECTRÓNICA DE HÍGADO Y MÚSCULO DISPERSO EN FASE ESTACIONARIA	45
III.13.	FRENTES DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO DE LAS FASES SÍLICE N-ALQUIL CON DOS DIFERENTES MATRICES	45

	Página
III.14. FRENTE DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTÍON CON DOS DIFERENTES MEZCLAS DE DISOLVENTES ORGÁNICO:AGUA EN OCTADECIL SILANO SUPELCLEAN	46
III.15. FRENTE DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTÍON CON DOS DIFERENTES MEZCLAS DE DISOLVENTES ORGÁNICO:AGUA EN BONDESIL-ENV	46

**CAPITULO IV  
RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

IV.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN Y EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO	49
IV.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA EL BENZO(A)PIRENO	49
IV.3. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA LA MEZCLA DE COMPUESTOS BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTÍON	52
IV.4. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL BENZO(A)PIRENO POR DMFS	57
IV.5. ENSAYOS POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA	59
IV.6. ELIMINACIÓN DE LÍPIDOS INTERFERENTES EN LA SECUENCIA DE ELUCIÓN	66
IV.7. LIMPIEZA DE EXTRACTOS EN ADSORBENTES	67
IV.8. ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO CON MEZCLAS DE ACETONITRILLO:AGUA EN DIFERENTES FASES ESTACIONARIAS	68
IV.9. OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE HÍGADO Y MÚSCULO EN LA FASE	73
IV.10. FRENTE DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO DE LAS SÍLICES N-ALQUIL CON LAS DOS DIFERENTES MATRICES	76
IV.11. FRENTE DE ELUCIÓN DE FENITROTÍON, CLORPIRIFOS Y BENZO(A)PIRENO CON DOS DIFERENTES MEZCLAS DE DISOLVENTES ORGÁNICO-AGUA	83
IV.12. FRENTE DE ELUCIÓN DE FENITROTÍON, CLORPIRIFOS Y BENZO(A)PIRENO EN LA FASE BONDESIL-ENV	88

**CONCLUSIONES** 98

**BIBLIOGRAFIA** 99

**ANEXO**

Figura		Página
I.1.	Diagrama general de un sistema típico de CLAR.	8
I.2.	Procedimiento típico de preconcentración por EFS.	14
I.3.	Modelo molecular de una esfera de sílice enlazada con grupos octadecilo.	17
I.4.	Estructura molecular del co-polímero estireno divinilbenceno.	18
I.5.	Similitud entre EFS y la CLAR.	21
I.6.	Determinación experimental del volumen de fuga y el rendimiento de extracción	24
I.7.	Esquema simplificado del procedimiento de dispersión, empaque, elución y limpieza aplicando DMFS.	28
III.7A.	Diagrama del procedimiento de preparación de muestra, dispersión y elución aplicando la técnica de DMFS.	43
IV.1.	Variación del factor de capacidad ( $k'$ ) de benzo(a)pireno en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.	50
IV.2.	Respuesta del detector en función de la concentración de benzo(a)pireno.	51
IV.3.	Variación del log $k'$ de benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.	53
IV.4.	Cromatograma de los compuestos en estudio.	54
IV.5.	Respuesta del detector en función de la concentración del fenitrotión.	54
IV.6.	Respuesta del detector en función de la concentración del clorpirifos.	55
IV.7.	Respuesta del detector en función de la concentración del benzo(a)pireno.	55
IV.8.	Recuperación global de benzo(a)pireno en octil silano supelclean, eluído con diferentes eluentes de acetonitrilo:agua.	68
IV.9.	Recuperación global de benzo(a)pireno en octadecil silano supelclean, eluído con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua.	69
IV.10.	Recuperación global de benzo(a)pireno en octadecil silano chromabond, eluído con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua.	69
IV.11.	Recuperación global de benzo(a)pireno en polímero bondesil-env, eluído con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua.	70
IV.12.	Frente de elución de benzo(a)pireno fortificado en hígado, disperso en diferentes adsorbentes, eluído con acetonitrilo al 100%.	71
IV.13.	Fotografía del octadecil silano sin moler obtenida por microscopia electrónica.	73
IV.14.	Fotografía del octadecil silano molida en mortero obtenida por microscopia electrónica.	73
IV.15.	Dispersión de hígado en octadecil silano supelclean obtenida por microscopia electrónica.	74
IV.16.	Dispersión de músculo en octadecil silano supelclean obtenida por microscopia electrónica.	74
IV.17.	Dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, eluído con acetonitrilo al 100% obtenida por microscopia electrónica.	75
IV.18.	Dispersión de músculo en octadecil silano supelclean, eluído con acetonitrilo al 100% obtenida por microscopia electrónica.	75
IV.19.	Frentes de elución de benzo(a)pireno fortificado en hígado y disperso en diferentes soportes sólidos, eluído con 80:20 acetonitrilo:agua.	76
IV.20.	Frente de elución de benzo(a)pireno fortificado en músculo y disperso en diferentes soportes sólidos, eluído con 80:20 acetonitrilo:agua.	77

Figura		Página
IV.21.	Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octil silano supelclean.	79
IV.22.	Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano supelclean.	80
IV.23.	Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano chromabond.	81
IV.24.	Frente de elución de fenitrotión eluído de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, con fracciones de 1mL de 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua.	83
IV.25.	Frente de elución de clorpirifos eluído de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, con fracciones de 1mL de 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua.	84
IV.26.	Frente de elución de benzo(a)pireno eluído de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, con fracciones de 1mL de 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua.	84
IV.27.	Frentes de elución de cada uno de los compuestos eluidos con fracciones de 1 mL de 80:20 acetonitrilo:agua.	85
IV.28.	Frentes de elución de cada uno de los compuestos eluidos con fracciones de 1 mL de 80:20 metanol:agua.	86
IV.29.	Frente de elución de fenitrotión, clorpirifos y benzo(a)pireno, eluído con acetonitrilo al 100% en octadecil silano supelclean.	92
IV.30.	Frente de elución de fenitrotión, clorpirifos y benzo(a)pireno, eluído con acetonitrilo al 100% en polímero bondesil-env.	92
IV.31.	Frentes de elución para benzo(a)pireno de cartuchos de hígado disperso en polímero bondesil-env, adicionado con diferentes volúmenes de HSNa 1M, eluído con acetonitrilo al 100%.	94
IV.32.	Variación del volumen de retención en adición de heptan sulfonato de sodio 1M en la dispersión de hígado en polímero bondesil-env.	95



Tabla	Página
I.1. Adsorbentes comerciales disponibles usados en EFS.	19
I.2. Resumen de los métodos reportados en la literatura del año 2000 al 2005 en donde se aplica la DMFS para la extracción de contaminantes en tejidos de pescado.	31
IV.1. Longitudes de onda de máxima absorción y de cuantificación de los compuestos evaluados.	49
IV.2. Variación de factor de capacidad ( $k'$ ) de benzo(a)pireno en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.	50
IV.3. Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones.	52
IV.4. Variación de factor de capacidad ( $k'$ ) de benzo(a)pireno, clorpirifos, fenitrotión en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.	52
IV.5. Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de fenitrotión.	56
IV.6. Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de clorpirifos.	56
IV.7. Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de benzo(a)pireno.	57
IV.8. Elución de benzo(a)pireno con EFS, en octil silano supelclean aplicando 1mL de benzo(a)pireno en 100% metanol.	57
IV.9. Apariencia de diluciones de benzo(a)pireno en diferentes fracciones de metanol:agua.	58
IV.10. Elución de benzo(a)pireno con EFS, en octil silano supelclean aplicando 1mL de benzo(a)pireno en 95:5 metanol:agua.	58
IV.11. Elución de benzo(a)pireno con EFS, en octadecil silano supelclean aplicando 1mL de benzo(a)pireno en 95:5 metanol:agua.	59
IV.12. Elución de benzo(a)pireno con DMFS, en octil silano supelclean aplicando 500 $\mu$ L solución estándar 10 ppm.	60
IV.13. Elución de benzo(a)pireno con DMFS, en octil silano supelclean aplicando 500 $\mu$ L de una disolución de la solución estándar en 95:5 metanol:agua.	60
IV.14. Elución de benzo(a)pireno con DMFS, en octadecil silano supelclean fortificado con 500 $\mu$ L de solución estándar en 95:5 metanol:agua.	61
IV.15. Apariencia de elución de la dispersión de hígado en octadecil silano supelclean a diferentes volúmenes de agua grado cromatográfico.	62
IV.16. Apariencia de elución de la dispersión de hígado en octadecil silano supelclean a diferentes volúmenes de acetonitrilo:agua.	63
IV.17. Secuencia de elución de benzo(a)pireno, fortificado en hígado disperso en octadecil silano supelclean.	64
IV.18. Secuencia de elución de benzo(a)pireno, fortificado en hígado disperso en octadecil silano supelclean.	64
IV.19. Secuencia de elución de benzo(a)pireno, fortificado en hígado disperso en octadecil silano supelclean.	65
IV.20. Elución de benzo(a)pireno disperso en octadecil silano supelclean en fracciones de acetonitrilo 100%, acetonitrilo:agua 90:10, acetonitrilo:agua 80:20.	66
IV.21. Recobro de benzo(a)pireno después de la limpieza con gel de sílice.	67
IV.22. Recobro de benzo(a)pireno después de la limpieza con florisil.	67

Tabla	Página
IV.23. Volúmenes de elución total de benzo(a)pireno obtenidos de la elución con acetonitrilo 100 % por DMFS en diferentes adsorbente.	72
IV.24. Parámetros cromatograficos del frente de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octil silano supelclean.	79
IV.25. Parámetros cromatograficos del frente de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano supelclean.	80
IV.26. Parámetros cromatograficos del frente de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano chromabond.	81
IV.27. Rendimientos de extracción y volumen de elución obtenidos por cada mezcla de eluente utilizado para cada compuesto.	86
IV.28. Recobros de la elución de estándares, en polímero bondesil-env, en fracciones de 1 mL de acetonitrilo:agua 80:20.	88
IV.29. Recobros de la elución de estándares, en polímero bondesil-env, en fracciones de 1 mL de acetonitrilo:agua 90:10.	89
IV.30. Recobros de la elución de estándares, en polímero bondesil-env, en fracciones de 1 mL de acetonitrilo100 %.	89
IV.31. Recobro de benzo(a)pireno, en polímero bondesil-env, con diferentes cantidades de surfactantes HSNa y LSNa, eluido con acetonitrilo al 100%.	90
IV.32. Porciento de recobro y volumen de elución total para cada compuesto eluidos de cartuchos de dispersión de hígado en octadecil silano y polímero bondesil-env con acetonitrilo al 100%.	93
IV.33. Porcentajes de recobro globales y Vm para benzo(a)pireno por efecto de la adición de volúmenes variables de HSNa 1M.	94
IV.34. Reproducibilidad (coeficiente de variación) de los parámetros calculados a partir de los frentes de elución para benzo(a)pireno en los estudios de reproducibilidad de efecto de la cantidad de heptansulfonato de sodio 1M adicinada.	96

ABREVIATURAS

<b>C8</b>	octil silano
<b>C18</b>	octadecil silano
<b>CG</b>	Cromatografía de Gases
<b>CLAR</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
<b>C<sub>m</sub></b>	Concentración de soluto en la fase móvil
<b>COP's</b>	Contaminantes Orgánicos Persistentes
<b>C<sub>s</sub></b>	Concentración de soluto en la fase estacionaria
<b>cv</b>	coeficiente de variación
<b>DCE</b>	Detector de captura de electrones
<b>DFE</b>	Detector Fotométrico de Flama
<b>DMFS</b>	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>ELL</b>	Extracción Líquido Líquido
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b>F<sub>c</sub></b>	Flujo volumétrico
<b>FIA</b>	Análisis por Inyección de Flujo
<b>H</b>	Altura equivalente a un plato teórico
<b>HPA's</b>	Hidrocarburos policíclicos Aromáticos
<b>HSNa</b>	Heptansulfonato de sodio
<b>K</b>	Coefficiente de reparto
<b>k'</b>	Factor de retención
<b>LSNa</b>	Lauril sulfato de sodio
<b>M</b>	Concentración molar (moles / L)
<b>N</b>	Número de platos teóricos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBB's</b>	Bifenilos Polibromados
<b>PBDE's</b>	Ésteres Difenilos Polibromados
<b>PCB's</b>	Bifenilos Policlorados
<b>PE-DVB</b>	Poliestireno Divinilbenceno
<b>PLRP-S</b>	Polímero estireno-divinilbenceno sulfonado
<b>PRP-1</b>	Polímero estireno-divinilbenceno
<b>PTB's</b>	Sustancia Persistentes, Tóxicas y Bioacumulables
<b>R<sub>s</sub></b>	Resolución
<b>R %</b>	Rendimiento de extracción o recobro
<b>t<sub>0</sub></b>	Tiempo muerto
<b>t<sub>r</sub></b>	Tiempo de retención
<b>t<sub>r</sub>'</b>	Tiempo de retención ajustado
<b>V<sub>f</sub></b>	Volumen de fuga
<b>V<sub>m</sub></b>	Volumen de elución total
<b>V<sub>r</sub></b>	Volumen de retención
<b>w<sub>b</sub></b>	Ancho a la base
<b>w<sub>1/2</sub></b>	Ancho a la mitad de la altura
<b>β</b>	Razón de reparto
<b>α</b>	Factor de selectividad

# **INTRODUCCIÓN**

La creciente exigencia social en relación con la calidad y seguridad de los alimentos, está impulsando una serie de cambios tanto en el sector industrial, que tiende a desarrollar y adoptar nuevos procesos más seguros, como en el ámbito científico, con el desarrollo de nuevas técnicas de evaluación analítica más sensibles, y a nivel institucional, a través de una legislación más estricta en el cumplimiento de las demandas.

Por motivos obvios, entre los aspectos que más atención reciben están los relacionados con el establecimiento de los límites máximos permitidos para determinadas sustancias consideradas tóxicas y/o alergénicas. Estos límites comprenden muy bajas concentraciones de los contaminantes lo que permite garantizar la seguridad de los alimentos destinados al consumo humano y definir los controles necesarios sobre los mismos, para comprobar su cumplimiento y, en su caso, acceder a la detección rápida de eventuales episodios de contaminación.

Por esta razón, los avances tecnológicos de las dos últimas décadas en el campo de la instrumentación analítica permiten disponer en la actualidad de detectores más sensibles y selectivos. Sin embargo, resulta sorprendente que muchos de los procedimientos de preparación de muestra habitualmente empleados para la extracción de trazas de contaminantes en muestras complejas han evolucionado poco. En general, el objetivo de estos procedimientos es la extracción de los analitos de la matriz estudiada y la purificación progresiva de los extractos obtenidos hasta llegar a conseguir una fracción concentrada, lo más pura posible. Después de esto, es relativamente frecuente que la etapa de análisis instrumental de ese extracto concentrado y purificado, implique el uso de equipos sofisticados capaces de dar una respuesta inequívoca en el intervalo de minutos. En gran parte, los tratamientos previos necesarios para obtener el extracto purificado y concentrado a partir de la matriz original se basan en el uso de técnicas tradicionales que, aunque eficaces y reproducibles, se caracterizan por su elevado consumo de tiempo (p.e. los tiempos típicos implicados en una extracción líquido-líquido (ELL) o con equipo Soxhlet oscilan entre 1-24 horas), de disolventes orgánicos y/o adsorbentes, requieren grandes cantidades de muestra y les falta automatización.

Para mejorar estos inconvenientes los esfuerzos realizados en la última década en este campo de investigación han llevado a la adaptación ventajosa de algunos de los métodos clásicos, pero también al desarrollo de nuevas técnicas. Una de las aproximaciones más afortunadas para conseguir este objetivo ha sido el desarrollo de sistemas acoplados en serie, con o sin automatización. En este campo, también la miniaturización de los dispositivos se ha revelado como un factor clave para

desarrollar sistemas analíticos integrados capaces de aumentar de manera significativa la capacidad de procesar muestras y la autonomía.

Uno de los principales atractivos de los sistemas integrados es que permiten una reducción del tamaño de muestra de partida, de gran interés en los casos de disponibilidad limitada de ésta, sin pérdida apreciable de sensibilidad. Esto presenta indudables ventajas también desde el punto de vista analítico, ya que se promueve una disminución en línea de las cantidades de adsorbentes, disolventes y reactivos necesarios para su tratamiento, incluso en el caso de que se sigan empleando técnicas clásicas de preparación de muestra. Además, al reducirse el tamaño de la muestra, la proporción agente extractor/muestra puede ser fácilmente aumentada con la consecuente mejora en la eficacia de la transferencia de los analitos de la matriz a la fase extractora sin incremento final del gasto de disolvente.

La Extracción en Fase Sólida (EFS) es una técnica aplicada a la preparación de muestras que permite la reducción del consumo de disolvente (en general, menos de 30 mL), elimina la necesidad de ajustar el contenido en agua de las muestras antes de su análisis y, puesto que puede ser integrada en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA), permite su acoplamiento con los subsiguientes procesos de purificación y análisis instrumental, dando lugar a sistemas integrados semiautomáticos de análisis. Este hecho, a su vez, redundando en una reducción adicional de los tiempos de análisis por muestra, ya que elimina la necesidad de la concentración de los extractos entre tratamientos sucesivos. Al tratarse de un sistema cerrado, se reduce también de manera importante el riesgo de degradación, contaminación y/o pérdida de los analitos, lo cual es de especial relevancia en el caso de compuestos lábiles, traza o volátiles, así como la posible exposición del operario a disolventes y reactivos tóxicos.

La Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (DMFS) se encuentra entre las técnicas de uso más extendido para la extracción de compuestos orgánicos. La DMFS técnica patentada en 1989 por Barker y colaboradores, consiste en la dispersión de la muestra sólida o semisólida en la superficie de un adsorbente apropiado (generalmente sílice con grupos orgánicos químicamente unidos), la cual se empaca en una columna en donde se procede a fraccionar los componentes de la muestra con el disolvente o serie de disolventes elegidos. Para realizar la limpieza del extracto que contiene a los analitos de interés, suele colocarse otro(s) adsorbente(s) en el fondo de la misma columna o aplicarse en columnas separadas (Gaunt, P & Barker, S. A., 2000; Crouch M. D. & Barker, S. A., 1997). De esta manera, una elección adecuada del adsorbente debe permitir la retención selectiva de los compuestos de interés; la elución con un disolvente apropiado debe conducir a la desorción selectiva de los mismos y la limpieza de los interferentes co-eluidos debe permitir llegar a obtener

un extracto listo para ser analizado en la técnica de separación-detección elegida. La simplificación del proceso de preparación de muestra, con la consecuente disminución tanto de tiempo como de disolventes, han hecho que esta técnica resulte particularmente atractiva para su aplicación en análisis rutinarios de monitorización, incluidos los desarrollados en el campo alimentario. El gran número de aplicaciones y métodos publicados basados en DMFS durante los últimos años y la variedad de los mismos es la mejor prueba de ello. Las ventajas de esta técnica han sido fehacientemente demostradas en diferentes estudios publicados en los últimos años; por ejemplo, para el análisis de pesticidas en frutas y vegetales de distinta naturaleza, donde la preparación de la muestra puede ser completada en tan sólo 10 min utilizando cantidades de muestra y adsorbente del orden de los miligramos y volúmenes de disolvente en orden de los 10 mL (Navarro, M. Y Picó, 2002) La determinación de contaminantes traza, como los congéneres tóxicos, también en el caso de bifenilos policlorados (PCBs) en alimentos grasos de origen animal se efectúa por métodos basados en esta técnica (Ling, Y.C., Chang, M.Y. 1994; Conka, K. Drobn, A and Kocan, A., 2005). Gracias a sus características, la DMFS parece particularmente adaptada para el manejo de muestras semisólidas o sólidas, aunque también puede ser empleada para la preparación de muestras líquidas previamente liofilizadas. Su desarrollo y primeras aplicaciones se realizaron en extractos de residuos veterinarios (fármacos) provenientes de matrices biológicas complejas como el hígado y músculo de bovino. (Barker, S. A., 2000; Smith R. M., 2003). Los trabajos más recientes han demostrado la aplicabilidad de la técnica para la extracción de analitos orgánicos de frutas y vegetales. (Barker, S. A., 2000; Smith R. M., 2003).

Los principios que rigen las DMFS y a la EFS son muy parecidos. La EFS, es una técnica cuyos parámetros pueden ser estimados a partir de los principios de la cromatografía de líquidos. Sin embargo, en la DMFS se ha encontrado que existen ciertas diferencias que necesitan ser investigadas más a fondo.

Por lo tanto, el objetivo general es: **Estudiar algunos de los factores que afectan la eficiencia de extracción en la técnica de dispersión de matriz en fase sólida**, para lo cual fue necesario alcanzar los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la retención de los compuestos modelo en una serie de fases estacionarias con diferentes grupos químicamente unidos.
- Estudiar la elución selectiva de los compuestos modelo, con mezclas de disolventes hidrorgánicos y orgánicos puros de diferente fuerza eluotrópica.
- Estudiar el efecto que presenta la modificación de la matriz por adición de agentes químicos, agentes activos de superficie o surfactantes.
- Establecer las condiciones de la retención y elución cuantitativa de los compuestos modelo en hígado y músculo provenientes de pescado, mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*).



**CAPÍTULO**

**I**

**ANTECEDENTES**

## **I.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS**

### **I.1.1. Generalidades**

La característica que distingue a la cromatografía de líquidos de la mayoría de los métodos físicos y químicos de separación, es que se ponen en contacto dos fases mutuamente inmiscibles: la fase estacionaria y la móvil. Una muestra que se introduce en la fase móvil es transportada a lo largo de la columna que contiene una fase estacionaria. Los compuestos químicos presentes en la muestra, experimentan interacciones repetidas (repartos) entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cuando ambas fases se han escogido en forma apropiada, los componentes de la muestra se separan gradualmente en bandas en la fase estacionaria. Al final del proceso, los componentes separados emergen en orden creciente de interacción con la fase estacionaria; el componente menos retenido emerge primero, el retenido más fuertemente eluye al último. El reparto de los solutos entre las fases aprovecha las diferencias entre las propiedades físico-químicas de los componentes de la muestra.

En la cromatografía de líquidos la selección de una amplia gama de materiales para las fases móvil y estacionaria, permite separar moléculas que difieren muy poco en sus propiedades físico-químicas. En un sentido amplio, la distribución de un soluto entre dos fases, es el resultado del balance de fuerzas entre las moléculas del soluto y las moléculas de cada fase, la distribución refleja la atracción o repulsión relativas que presentan las moléculas o iones de las fases competidoras por el soluto y entre sí. Estas fuerzas pueden ser de naturaleza polar, proviniendo de dispersión, momentos dipolares permanentes o inducidos, puentes de hidrógeno e interacciones dielectricas. (Skoog, 1998; Snyder, 1979).

### **I.1.2. Tipos de cromatografía de líquidos**

La cromatografía de líquidos, puede clasificarse de acuerdo al tipo de mecanismo involucrado, así la cromatografía puede ser de adsorción, reparto, intercambio iónico, exclusión y afinidad.

Las principales características de estos tipos de cromatografía se resumen a continuación:

○ **Cromatografía de adsorción**

Consta de una fase estacionaria sólida (sílice, alúmina, carbón activado) y una fase móvil líquida; el soluto puede adsorberse en la superficie de las partículas sólidas. El equilibrio entre la fase estacionaria y móvil es la causa de la separación.

○ **Cromatografía de reparto**

En esta, una fase estacionaria puede estar constituida por un soporte (generalmente sílice) que contenga grupos funcionales químicamente unidos de polaridad variada. El soluto se equilibra entre esta fase estacionaria y una fase móvil. Para este tipo de cromatografía se tienen dos metodologías de trabajo:

○ **Fase Normal**

La fase móvil es no-polar (hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc.) y la fase estacionaria es polar (generalmente sílice con grupos NH<sub>3</sub>, CN, COO, etc).

○ **Fase Inversa**

La fase móvil es polar (agua, soluciones amortiguadoras de pH, acetonitrilo, metanol, etc.) y la fase estacionaria es no-polar (generalmente sílice derivatizada con cadenas de n-alquil (C8 y C18).

○ **Intercambio Iónico**

La fase estacionaria es una resina, un polímero o una sílice modificada con grupos funcionales cargados que tiene la propiedad de separar especies ionizadas (cationes o aniones). La fase móvil es generalmente una disolución acuosa amortiguadora de pH.

○ **Exclusión**

La fase estacionaria está constituida de partículas altamente porosas (geles) que permiten la separación de los componentes en función de su tamaño. A la fase estacionaria se le conoce como gel de permeación. El cromatograma obtenido representa la distribución de pesos moleculares.

○ **Afinidad**

Este tipo de cromatografía utiliza interacciones altamente específicas entre un tipo de molécula de soluto y una segunda molécula unida covalentemente a la fase estacionaria. Por ejemplo, la molécula inmovilizada podría ser un anticuerpo específico para una proteína particular.

La cromatografía de reparto en fase inversa será descrita con detalle en la siguiente sección dado que fue la utilizada en la realización del presente trabajo.

### **I.1.2.1. Cromatografía de reparto en fase inversa**

La cromatografía de reparto en fase inversa permite separar moléculas en base a sus polaridades; la fase estacionaria está generalmente constituida por partículas de sílice químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos. Esto proporciona a la fase estacionaria un carácter apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografía se emplean mezclas de disolventes polares, tales como: agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos, como fases móviles.

En cromatografía en fase inversa las moléculas se retienen en la columna en virtud de las interacciones hidrofóbicas que se establecen con la sílice modificada. Aunque, las interacciones hidrofóbicas son en general bastante débiles, son también a menudo muy numerosas y para que las moléculas eluyan, es casi siempre necesario disminuir la polaridad del disolvente; para ello se puede sustituir el agua de la fase móvil con un disolvente orgánico cuya concentración se va aumentando gradualmente.

La versatilidad y eficiencia de este tipo de cromatografía se ha incrementado con el uso de sistemas de alta resolución (CLAR), que utilizan alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación.

En la separación de compuestos orgánicos mediante cromatografía de fase inversa, las fases estacionarias más comúnmente empleadas, poseen una cadena lineal de 18 carbonos y se denominan C18.

No obstante, los materiales de empaque con base en sílice presentan limitaciones, como su inestabilidad en fases acuosas a pH extremos y su poca compatibilidad con la actividad biológica de algunas proteínas. La solución a estos inconvenientes se ha encontrado en la generación de fases estacionarias con base polimérica; el acceso a revestimientos de la sílice con una capa polimérica para incrementar la estabilidad química ha resultado como ventaja al hacer a estas fases estacionarias más rígidas; el material de empaque de base polimérica más estudiado, y por lo tanto más comercial, es el poliestireno divinilbenceno (PEDVB).

### I.1.3. Instrumentación

Un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) completo requiere de una mezcladora de disolventes, un inyector y una bomba que envía la fase móvil a la columna. Generalmente, las columnas analíticas requieren alta presión para que el flujo de líquido sea adecuado, la mezcladora se requiere para variar la proporción de disolvente en la fase móvil y el inyector permite la aplicación de la muestra. A la salida de la columna se coloca un detector, generalmente de absorción ultravioleta o de fluorescencia y si se desea recuperar las moléculas que eluyen de la columna, se requiere un colector de fracciones.

En la figura I.1 se representa el esquema de un sistema de CLAR típico.

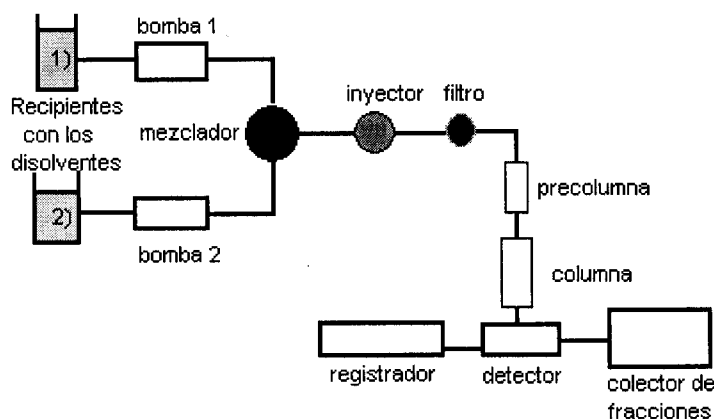


Figura I.1. Diagrama general de un sistema típico de cromatografía de líquidos de alta resolución.

El rápido avance de CLAR en las últimas décadas se debe principalmente a dos factores, el uso de micropartículas de sílice en intervalos de 3-10 $\mu$ m como material de empaque en columnas y el uso de la cromatografía en fase inversa usando fases estacionarias no polares y fases móviles (mezcla de disolventes orgánico-acuosos). También se han realizado notables mejoras en la preparación de las partículas de sílice modificadas químicamente y en el entendimiento del mecanismo de retención, incluido el rol de los silanoles residuales en cromatografía de líquidos de fase inversa. Estas mejoras han contribuido a la mejor reproducibilidad en la separación de compuestos, por lo que se ha comprobado que en más del 70% de las separaciones por CLAR se ha empleado la fase inversa con partículas de sílice modificadas químicamente.

#### I.1.4. Parámetros que influyen en la separación cromatográfica

El comportamiento cromatográfico de un soluto con una columna y una fase móvil dada, depende de diferentes parámetros que serán descritos a continuación. Sin embargo es importante introducir las definiciones de los términos siguientes.

##### I.1.4.1. Definición de términos

**a) Tiempo de retención ( $t_r$ ).** Es el tiempo que un soluto permanece en la columna, se mide desde el momento de la inyección hasta la elución del máximo pico. Es característico del soluto para condiciones de operación constante y auxiliar en la identificación de los mismos.

**b) Tiempo muerto ( $t_0$ ).** Es el tiempo requerido para eluir un soluto que no se retiene en la fase estacionaria. También se define como el tiempo que un soluto permanece en fase móvil y representa el espacio vacío de la columna.

**c) Tiempo de retención ajustado ( $t_r'$ ).** Mide el tiempo que el componente permanece en fase estacionaria. Se calcula por medio de la ecuación 1.

$$t_r' = t_r - t_0 \quad \text{ecuación (1)}$$

**d) Ancho a la base ( $w_b$ ).** Es la porción de la línea de base intersectada por las tangentes al pico cromatográfico. Para un pico gaussiano es igual a  $4\sigma$ ;  $w_b$  es tradicionalmente usado en el cálculo de la eficiencia del sistema.

**e) Ancho a la mitad de la altura ( $w_{1/2}$ ).** Representa una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (número de platos teóricos).

**f) Número de platos teóricos (N).** Cada plato teórico representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases. El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos.

**g) Volumen de retención ( $V_r$ ).** La retención de un soluto refleja su distribución entre la fase móvil y la estacionaria. El volumen de fase móvil necesario para transportar la banda de soluto desde el punto de inyección, a través de la columna, hasta el detector (en el máximo del pico del soluto) se define como el volumen de retención,  $V_r$ . Se puede obtener directamente del cromatograma multiplicando el tiempo de retención correspondiente ( $t_r$ ) por el gasto o flujo volumétrico ( $F_c$ ) expresado como el volumen de fase móvil por unidad de tiempo de acuerdo con la ecuación 2.

$$V_r = t_r F_c \quad \text{ecuación (2)}$$

El gasto o flujo volumétrico, en términos de los parámetros de la columna, depende de la sección transversal de la columna vacía, la porosidad total del relleno (empaquete) de la columna y la velocidad lineal promedio de la fase móvil.

#### **I.1.4.2. Parámetros**

**a) Coeficiente de reparto ( $K$ ).** Cuando un soluto entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la estacionaria. Si la fase móvil se para en cualquier momento, el soluto establece un equilibrio de distribución entre las dos fases. La concentración en cada fase al equilibrio está dada por el coeficiente termodinámico de reparto como se observa en la ecuación 3.

$$K = C_s / C_m \quad \text{ecuación (3)}$$

donde  $C_s$  y  $C_m$  son la concentración de soluto en la fase estacionaria y móvil, respectivamente. Cuando  $K = 1$ , el soluto se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases. El coeficiente de reparto determina la velocidad promedio de desplazamiento en cada zona del soluto, más específicamente, del centro de la zona de soluto conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna (Skoog, 1998).

**b) Factor de retención ( $k'$ ).** El factor de retención  $k'$  es el parámetro más importante de cromatografía en columna porque relaciona el equilibrio de distribución de la muestra con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. Para un conjunto dado de parámetros de operación,  $k'$  es una medida del tiempo transcurrido en la fase estacionaria en relación al tiempo transcurrido en fase móvil. Se define como el cociente de las moles de un soluto en la fase estacionaria entre las moles en la fase móvil como en la ecuación 4.

$$k' = C_s V_s / C_m V_m \quad \text{ecuación (4)}$$

La razón volumétrica de fases,  $V_m/V_s$ , se denota usualmente por  $\beta$ . Así,  $k' = K/\beta$ . Dicho de otra forma, la razón de reparto es el tiempo adicional que una banda de soluto requiere para eluir, en comparación con un soluto no retenido (para el cual  $k' = 0$ ), dividido entre el tiempo de elución de una banda no retenida. La ecuación 5 permite calcular  $k'$ .

$$k' = t'_r / t_0 \quad \text{ecuación (5)}$$

**c) Eficiencia (N).** La eficiencia de la columna está relacionada con el ensanchamiento de la banda que se encuentra en la columna y puede ser calculada por la ecuación 6:

$$N = 16 (t_r / w_b)^2 \quad \text{ecuación (6)}$$

y se expresa como un número de platos teóricos (N) para la columna bajo condiciones experimentales específicas. La eficiencia es conocida frecuentemente como el número de platos teóricos por metro de columna cromatográfica, o expresada como H altura equivalente a un plato teórico, que es la longitud de la columna (L) dividida por el número de platos teóricos ecuación 7.

$$H = L / N \quad \text{ecuación (7)}$$

A partir de que el valor observado de N depende de factores experimentales tales como la velocidad de flujo y la carga de la muestra, es importante que las comparaciones sean hechas bajo condiciones idénticas.



**d) Factor de selectividad o factor de separación (retención relativa).** El factor de selectividad ( $\alpha$ ) de una columna, se define como la habilidad del sistema para separar dos picos. La ecuación 8 representa al factor de selectividad.

$$\alpha = K_B / K_A \quad \text{ecuación (8)}$$

donde  $K_B$  es el coeficiente de reparto para el soluto más retenido y  $K_A$  es la constante para el menos retenido. Para esta definición, el valor de  $\alpha$  debe ser mayor de 1, si  $\alpha = 1$  los dos picos tienen el tiempos de retención idénticos, es decir, no existe separación (Skoog, 1998).

**e) Resolución (Rs).** El grado de separación o resolución de dos bandas adyacentes se mide como la distancia entre los picos (o centros) dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si la retención y el ancho de la banda se expresan en unidades de tiempo, la resolución está dada por la ecuación 9. La ecuación 10 hace evidencia que la retención depende de los parámetros  $N$ ,  $k'$  y  $\alpha$ .

$$R_s = 2(tr_2 - tr_1) / (wb_2 + wb_1) \quad \text{ecuación (9)}$$

$$R_s = \frac{1}{4} (\alpha - 1) N^{1/2} (k'/1 + k') \quad \text{ecuación (10)}$$

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es de 1.0; una resolución de 1.5 representa separación a la línea base. La resolución alcanzada en un sistema es proporcional al producto de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema, que son los tres más importantes parámetros de control en un sistema cromatográfico.

La resolución de picos adyacentes puede mejorarse ya sea aumentando la separación de los picos o disminuyendo los anchos de los picos individuales. Esto involucra la selectividad de la columna cuando se alejan más los picos y la eficiencia cuando se intenta disminuir el ancho del pico.

## **I.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)**

### **I.2.1. Generalidades**

En los últimos años se ha incrementado el interés por la Extracción en Fase Sólida (EFS) como técnica de enriquecimiento alternativa a la Extracción Líquido Líquido (ELL). La EFS se ha desarrollado considerablemente durante los últimos 20 años, con innovaciones y grandes mejoras en los formatos, automatizaciones, acoplamientos y la introducción de nuevos adsorbentes capaces de atrapar los analitos más polares (los más difíciles de extraer) y de lograr extractos libres, en lo posible, de interferencias matriciales. Igualmente, se ha trabajado en desarrollar una teoría de retención que posibilite la predicción del desempeño de un adsorbente en particular, frente a una muestra dada.

### **I.2.2. Procedimiento**

La EFS se efectúa aplicando un volumen dado de muestras a través de un cartucho o precolumna empacado con un adsorbente capaz de fijar los compuestos de interés. Las interferencias se eluyen lavando el adsorbente con el fin de minimizar su presencia en la fracción eluida del analito final. La recuperación del analito se lleva a cabo por la adición de un volumen pequeño de disolvente de elución fuerte, ya sea un disolvente orgánico o una mezcla hidrorgánica. La fracción se colecta y puede inyectarse directamente, o puede evaporarse a sequedad para reconstituirse en un disolvente adecuado para la cromatografía de líquidos o de gases. Puede ocurrir que el analito se retenga débilmente y por el contrario las interferencias se retengan fuertemente en el cartucho. Una gran ventaja de la EFS es que la extracción y la concentración se llevan a cabo simultáneamente (Hennion y Scribe, 1993; Snyder et al., 1979).

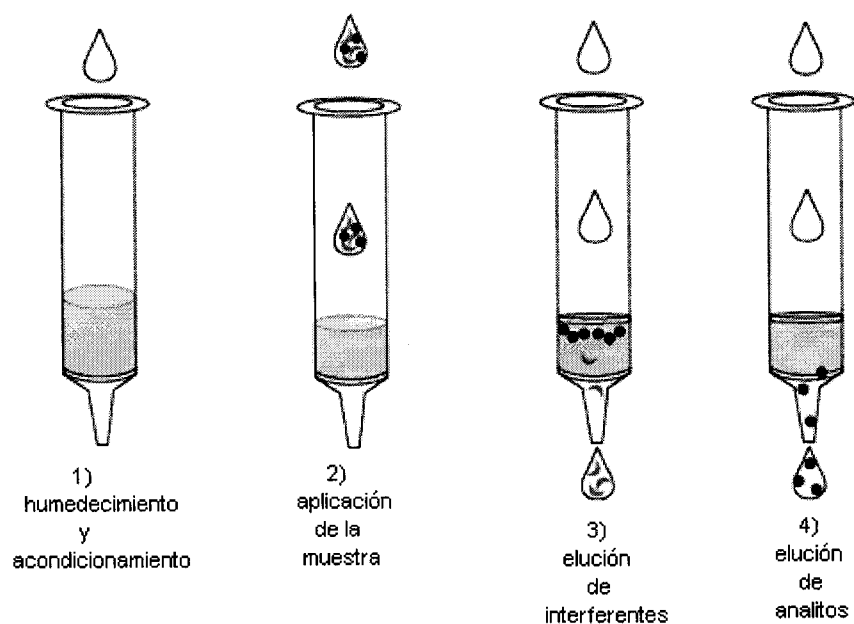
El principio básico de la EFS es la transferencia de analitos a partir de la fase móvil a los sitios activos de la fase sólida adyacente. Esta transferencia se estimula por la selección de condiciones apropiadas de operación en el sistema de los 3 principales componentes: adsorbente-analito-eluyente (Liska, 2000; Hennion y Pichon, 1994).

El procedimiento típico de preconcentración, comprende entonces las siguientes etapas:

1. Humedecimiento y acondicionamiento del adsorbente.
2. Aplicación de la muestra.
3. Lavado y, en lo posible, elución de los compuestos interferentes (limpieza o simplificación de la matriz).
4. Elución de los analitos de interés en un pequeño volumen de disolvente.

Durante la primera etapa de este proceso, el adsorbente se acondiciona, con el objeto de prepararlo para recibir la muestra, con un disolvente adecuado y posteriormente con el disolvente que constituirá la muestra. Durante la aplicación de la muestra, los analitos y algunas interferencias son retenidos por el adsorbente, estas últimas pueden eliminarse haciendo un lavado con una mezcla de agua y disolvente orgánico (cuando se utilizan adsorbentes apolares). Finalmente, se lleva a cabo la elución de los compuestos de interés aplicando un pequeño volumen de disolvente orgánico (Driss et al., 1993; Hennion y Pichon, 1994).

En la figura I.2 se representan los cuatro pasos básicos descritos para la operación de la técnica EFS.



**Figura I.2.** Procedimiento típico de preconcentración por extracción en fase sólida.

### **I.2.3. Adsorbentes**

Los adsorbentes utilizados en la EFS son los mismos que se usan en la CL, solo que el intervalo del tamaño de partícula (granulometría) es más amplio. Comúnmente el adsorbente de la fase se empaca en pequeños tubos o cartuchos. Los adsorbentes también están disponibles en forma de disco-filtro para el manejo de muestras acuosas. (Hennion y Pichon, 1994; Dean, 1998).

#### **I.2.3.1. Adsorbentes de carácter polar**

Los adsorbentes de fase normal tienen grupos funcionales polares, por ejemplo ciano, amino y diol (en esta categoría también incluyen las sílices sin modificar), la naturaleza polar de estos adsorbentes indica que son más afines por los compuestos polares, como el fenol y los productos de degradación que contienen grupos funcionales muy polares como hidroxilo, carbonilo y aminas. Otros adsorbentes comúnmente utilizados son la alumina, el florisil y el grafito que se emplean como adsorbentes de limpieza de extractos.

#### **I.2.3.2. Adsorbentes de carácter apolar**

Por lo contrario, los adsorbentes de fase inversa tienen grupos funcionales no polares como octadecilo, octilo y metilo, que por lo tanto son más afines a retener compuestos no polares y medianamente polares, por lo que suelen ser los de elección para extraer compuestos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA's) (Sabik et al., 2000).

El adsorbente más usado en las aplicaciones publicadas en muestras biológicas es la C18, en donde los analitos apolares se retienen bastante bien y se han alcanzado recobros por encima del 85-90 %. Sin embargo la retención de analitos medianamente o débilmente polares han obtenido recobros por debajo de lo reportado para los apolares (Pichon, 1998), por lo que hoy en día se encuentran adsorbentes específicos y aquellos que han sido especialmente diseñados para ampliar el intervalo de polaridad. Estos incluyen las sílices no recubiertas y monofuncionales con la intención de incrementar el número de grupos silanol libres sobre la superficie de la sílice con el fin de proveer interacciones secundarias polares con los analitos.

### **I.2.3.2.1. Sílice n-alquil enlazada**

Los adsorbentes más comunes, se basan en partículas de sílice (partículas de forma irregular con un diámetro de partícula entre 30 y 60  $\mu\text{m}$ ) a la que se enlazan grupos funcionales en los grupos silanol superficiales para modificar sus propiedades retentivas (Dean, 1998; Sabik et al., 2000).

Las sílices octadecil (C18) y octil (C8) enlazadas, han sido los adsorbentes de extracción universal durante muchos años para el manejo de muestras biológicas y ambientales. Un primer requisito de las sílices C18 en la EFS es que provean de altos recobros, no sólo para analitos polares sino también para la extracción de analitos de polaridad media. El modelo del mecanismo de retención incluye principalmente las interacciones hidrofóbicas. Se considera a la fase estacionaria saturada del componente orgánico, como activada, y la retención se origina por repulsión de las regiones hidrofóbicas de la molécula del analito por las moléculas de agua, lo que conduce a la interacción con los sustituyentes carbonáceos de la fase estacionaria o con la capa orgánica adsorbida en la superficie de la misma.

El enlace de los grupos funcionales no siempre es completo, así que permanecen grupos silanoles sin reaccionar. Estos grupos silanol son sitios ácido polares activos y pueden interactuar con los analitos. Para reducir estas interacciones, algunos adsorbentes son “recubiertos”, lo que implica una reacción posterior para cubrir los grupos silanol libres con grupos alquilo de cadena corta. Las fases de sílice para EFS fueron primero recubiertas, pero con el fin de incrementar el número de interacciones secundarias, ha sido de interés incrementar el número de grupos silanol residuales (Pichon, 2000).

En la figura I.3, se representa un modelo molecular de una esfera de sílice octadecil, se muestran en la superficie de la esfera de sílice las cadenas alquil C18 hidrofóbicas y el recubrimiento de los grupos silanoles hidrofílicos.

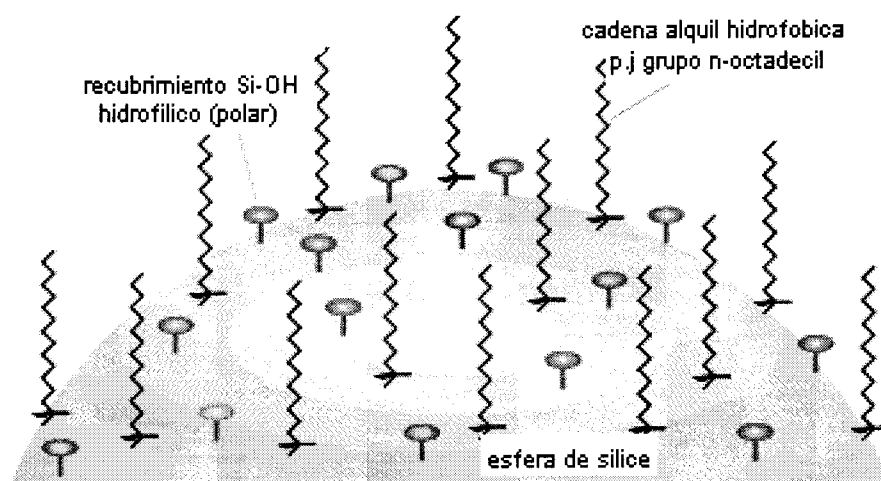


Figura I.3. Modelo molecular de una esfera de sílice enlazada con grupos octadecilo.

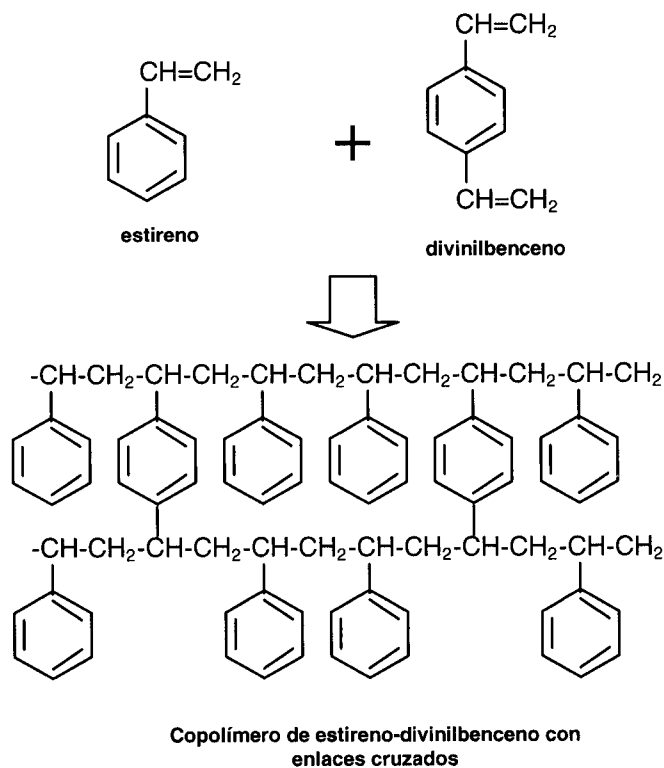
Con el fin de tener una cantidad máxima de cadenas octadecilo en la superficie de la sílice, un primer requerimiento es la porosidad. Casi todas las sílices para EFS se hacen de sílice con grandes áreas superficiales específicas, en el intervalo de 500 a 600 m<sup>2</sup>/g, contrariamente al caso de las fases estacionarias de CL. Partiendo de tales sílices porosas, cada proveedor suministra varios tipos de sílice modificada. Algunos están disponibles con un alto porcentaje de carbón correspondiendo a una máxima cobertura de la superficie con grupos alquilo. También hay alquilo sílices ligeras con bajo porcentaje de carbón y que en general contienen altas cantidades de grupos silanol sin modificar, con las cuales ocurren fuertes interacciones iónicas con analitos cargados positivamente. Por ello, se considera que el uso de la sílice C18 con un alto recubrimiento superficial de cadenas alquilo y silanoles residuales incrementa la retención de algunos analitos polares por la adición de interacciones secundarias, principalmente puentes de hidrógeno entre los grupos silanol y los grupos polares; sin embargo, no son aún convenientes para extraer compuestos polares a partir de grandes cantidades de muestra (Hennion, 1999; Sabik et al., 2000).

#### I.2.3.2.2. Poliméricas

Las resinas de poliestireno divinilbenceno (PE-DVB) se presentan como una alternativa a los adsorbentes de sílice enlazada para atrapar compuestos polares. El primer co-polímero comercial disponible en precolumnas desechables fueron los PRP-1 (Hamilton) y PLRP-S (Polymer Lab) de grado CL. Una de las ventajas de este adsorbente sobre la sílice C18 es su estabilidad cuando se aplican muestras en el intervalo de pH de 1 a 14. La cualidad de acoplar este adsorbente polimérico con una columna C18 ha permitido su aplicación a extracción multiresiduo incluyendo compuestos

polares que no se extraen sobre sílice C18. Se ha encontrado que para un grupo de compuestos orgánicos, los analitos son retenidos alrededor de 10 a 40 veces más por PRP-1 que por sílice C18. Para usos en diferido, el absorbente de PE-DVB también está dispuesto en discos (Hennion, 1999; Pichon, 2000).

En la figura I.4 se representa la estructura química del soporte sólido poliestireno divinilbenceno.



**Figura I.4.** Estructura molecular del co-polímero estireno divinilbenceno.

El mecanismo de retención está gobernado por interacciones hidrofóbicas similares a las discutidas en el caso de las sílices enlazadas, pero debido a los anillos aromáticos en la red de la matriz polimérica, se pueden esperar fuertes interacciones electrón-donadoras ( $\pi$ - $\pi$ ) con los anillos aromáticos de los analitos, además de que se esperarían cambios en la densidad electrónica del analito causada por los sustituyentes presentes (deslocalización de electrones). Esto se aprecia en el hecho de que el benceno es 20-30 veces más retenido por PRP-1 que por sílice C 8. (Hennion, 1999; Pichon, 2000; Sabik et al., 2000).

En los últimos años, los polímeros con áreas superficiales específicas altas (en intervalos de 700-1200 m<sup>2</sup>/g en vez de 350-500 m<sup>2</sup>/g) se han puesto disponibles comercialmente en cartuchos desechables. Algunos estudios han mostrado el alto potencial de estos adsorbentes poliméricos de alto entrecruzamiento para la extracción de compuestos polares en agua (Willard, C.C. 1988).

### I.2.3.3. Intercambiadores de iones

Se han introducido también resinas funcionalizadas para incrementar la retención de compuestos polares tales como: fenoles, alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas mediante la introducción de un grupo carboxílico o usando resinas sulfonadas. En tales casos, los adsorbentes pueden formar puentes de hidrógeno con los analitos y también pueden actuar como intercambiadores catiónicos (Huck y Bonn, 2000; Pichon, 2000).

En tabla I.1 se resumen los adsorbentes comerciales disponibles usados para la EFS de compuestos orgánicos en muestras biológicas (Hennion, 1991; Dean, 1998), los mecanismos de separación involucrados, la naturaleza de los analitos y la naturaleza del disolvente de desorción.

Adsorbente	Fase enlazante	Mecanismo de separación	Disolvente de elución	Naturaleza del analito	Aplicaciones
<b>FASES NO POLARES</b>					
Sílice octil, C 8	Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub>	Fase inversa	Disolvente orgánico	No polares y débilmente polares	HPA's, BPC's, pesticidas organofosforados y organoclorados, alquilbencenos, policlorofenoles, ftalato, esterres, policloroanilinas, herbicidas apolares, ácidos grasos, aminoantraquinona
Sílice octadecil C 18	Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub>	Fase inversa	Disolvente orgánico	No polares y débilmente polares	
Copolímeros porosos de estireno divinilbenceno		Fase inversa	Disolvente orgánico	No polares y débilmente polares	
Carbón grafitizado		Fase inversa	Disolvente orgánico	No polares y débilmente polares	
<b>FASES POLARES</b>					
Sílice, Si	Si-OH	Fase normal	Agua	Polares	Fenol, ácido notriolotriacético, fenoxiácidos, fenilendiaminas, anilina y derivados polares, ácido sulfónico, ácido ftalico, aminofenoles
Sílice cianopropil, CN	Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN	Fase normal	Agua	Polares	



<b>FASES DE INTERCAMBIO IÓNICO</b>					
Ácido bencensulfónico	Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -SO <sub>3</sub>	Intercambio iónico	Agua (pH ajustado)	Cationes y aniones orgánicos	Mismos que en las fases polares
Amina terciaria dietilaminopropil	Si-(CH <sub>2</sub> )-NH <sup>+</sup> -(CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Intercambio iónico	Agua (pH ajustado)	Cationes y aniones orgánicos	

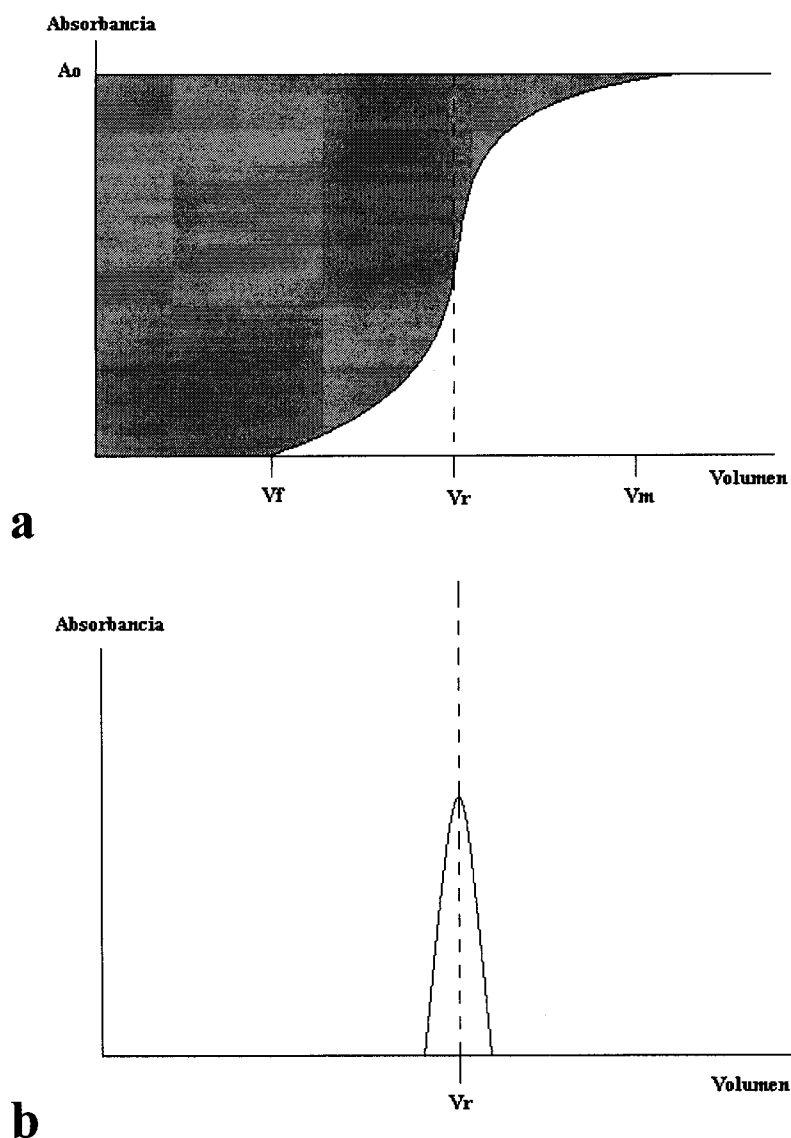
HPA's = Hidrocarburo Policíclico Aromático, BPC's = Bifenilos Policlорados

**Tabla I.1.** Adsorbentes disponibles usados en EFS, los mecanismos de separación involucrados, la naturaleza de los analitos y la naturaleza del disolvente de desorción.

#### **I.2.4. Parámetros de la EFS**

La EFS se puede considerar como un proceso de cromatografía de líquidos simple: una cromatografía frontal durante el paso de extracción y una cromatografía de elución o desplazamiento durante el proceso de desorción. Ambos modos de CL son bien conocidos y en una primera aproximación, la EFS puede analogarse a la CL siendo el adsorbente del cartucho equivalente a la fase estacionaria de la columna analítica, mientras que el disolvente de la muestra durante el paso de extracción (máxima retención) y el disolvente (o mezcla de disolventes) durante el paso de desorción (mínima retención), serían los equivalentes a la fase móvil (Hennion, 1991; Pichon, 2000). Por lo tanto para poder describir los parámetros de la EFS primero es importante destacar las similitudes que existen entre la EFS y la CLAR.

En la figura I.5 se representa gráficamente la similitud que existe entre la extracción en fase sólida y la cromatografía de elución considerando como ejemplo, a) la manipulación de una muestra acuosa en una precolumna de extracción cuyo efluente está directamente conectado a un detector espectrofotométrico U.V. y b) Inyección directa a la misma precolumna de una solución concentrada del compuesto de interés teniendo como fase móvil agua pura.



$V_f$  = volumen de fuga,  $V_r$  = volumen de retención,  $V_m$  = volumen máximo,  $A_o$  = absorbancia inicial.

**Figura 1.5.** Similitud entre EFS y la CLAR. a) Frente de elución de un analito aplicado a la precolumna en una solución acuosa a nivel traza. b) Pico de elución en un soluto aplicado a la precolumna por medio de una inyección directa de una solución acuosa concentrada.

En la figura 1.5 (a) se observa la curva del frente de elución obtenido cuando se registra la señal UV del efluente. En este caso, la absorbancia inicial de la muestra adicionada ( $A_o$ ) se midió previamente pasando directamente la muestra por el detector UV (sin pasar por la precolumna). En la curva, en un inicio, mientras el analito está siendo retenido en la precolumna, la absorbancia es cero. Después, el analito comienza a eluir y la absorbancia aumenta cuando se sobrepasa el volumen de fuga o fin de fijación ( $V_f$ ).

El volumen máximo de elución o desorción total ( $V_m$ ) se obtiene cuando la absorbancia de la solución efluente es la misma que  $A_o$ . Bajo condiciones ideales, esta curva tiene una forma bilogarítmica, donde el punto de inflexión corresponde al volumen de retención ( $V_r$ ) del mismo analito. Este mismo valor que se obtiene en el pico de elución de la figura I.5 (b).

La secuencia a seguir en los procedimientos de la EFS demanda varias decisiones a tomar con respecto a la selección del tipo y la cantidad de adsorbente, la composición y volumen de la solución de lavado que se puede aplicar sin pérdida de los analitos, la composición y volumen de la solución de desorción o elución. Los parámetros más importantes que determinan la selección de las condiciones anteriores son el rendimiento de extracción (R%) y el volumen de muestra que se puede aplicar sin pérdida del analito o compuesto de interés, conocido como el volumen de fuga ( $V_f$ ). Estos parámetros son dependientes entre si y pueden ser deducidos de la curva del frente de elución.

#### **I.2.4.1. Volumen de fuga ( $V_f$ )**

El volumen de fuga o fin de fijación se define usualmente como el volumen de muestra que corresponde al 1% de la absorbancia inicial considerando el frente de elución representado en la figura 5 a. A partir de este volumen, el frente de elución comienza a aparecer (el detector comienza a dar señal) con lo que se deduce que el analito está fugando. La fuga de los analitos puede ocurrir ya sea cuando las muestras no son suficientemente retenidas por los adsorbentes o cuando la capacidad del adsorbente se ha sobrepasado (saturación de los sitios activos); este último es poco probable en el análisis ambiental donde las concentraciones de los compuestos orgánicos que nos ocupan son del orden de  $\mu\text{g/L}$  o menores (Hennion, 1991).

El  $V_f$  se podría estimar en una primera aproximación a partir del volumen de retención ( $V_r$ ) si se conoce el factor de retención  $k'$  del soluto en el sistema cromatográfico dado. La similitud entre la EFS y la CL indica que los datos generados por CL para la medición o estimación de  $V_r$  son útiles y el conocimiento del comportamiento de la retención de los analitos por la fase estacionaria hidrofóbica se podría aplicar. En la práctica, solamente se necesita contar con un valor aproximado del  $V_f$  para seleccionar el tipo y la cantidad de adsorbente adecuado. Por otra parte, se puede determinar el  $V_f$  experimentalmente.

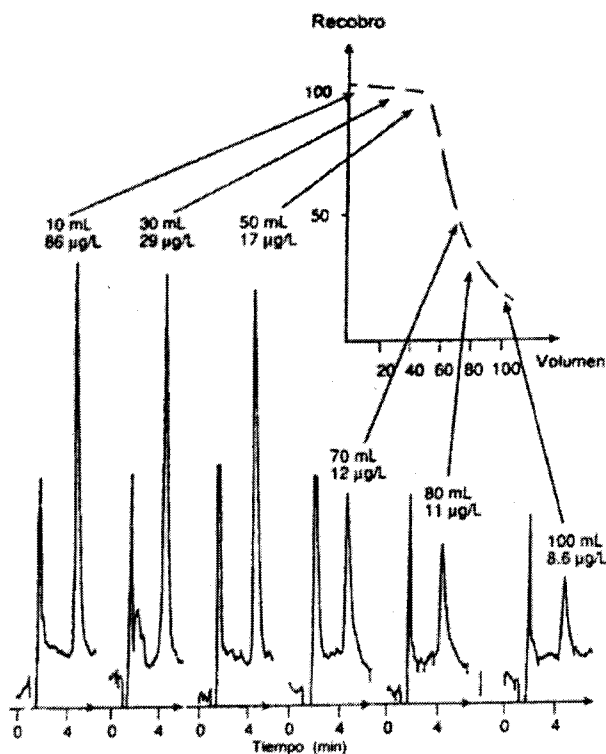
#### **I.2.4.2. Método para obtener el frente de elución**

La medición directa del volumen de fuga a partir del frente de elución para cada analito de interés, podría realizarse monitoreando continua o discretamente la señal UV de salida. Sin embargo este método consume tiempo y la lectura de  $V_f$  al nivel de 1% de absorbancia inicial no es fácil ni exacta, aun más cuando se encuentra el analito a niveles traza ( $\mu\text{g/L}$ ). También, conforme el analito sea más retenido, la diferencia en el valor de los volúmenes de  $V_f$ ,  $V_r$  y  $V_m$  se hace mayor, ya que el frente de elución es más extendido debido al bajo número de platos teóricos de los cartuchos o precolumnas de extracción (Hennion et. al., 1998; Subra et. al., 1998; Hennion, 1999).

#### **I.2.4.3. Método de preconcentración en línea con CLAR**

Un método alternativo más rápido, consiste en la medición del  $V_f$  mediante la preconcentración en la precolumna de volúmenes crecientes de muestras de agua pura adicionada con una cantidad constante de analito. De esta manera, conforme el volumen de muestra se incrementa, la concentración del analito disminuye. Después de la aplicación de cada volumen, se miden las áreas o las alturas de los picos del analito retenido en el adsorbente cuando es eluido directamente en la columna analítica (Subra et al., 1988; Hennion y Pichon, 1994; Hennion, 1999). Como se muestra en la figura I.6., la cantidad extraída permanece constante mientras la fuga no ocurre y las áreas o alturas de pico permanecen constantes. En el momento en el que la fuga ocurre, la cantidad extraída disminuye al igual que las áreas o alturas de los picos. Los recobros correspondientes se pueden calcular dividiendo las áreas de pico obtenidas después de la fuga entre aquellas obtenidas antes. Así, se traza una curva del recobro en función del volumen de muestra y el  $V_f$  puede considerarse en el punto donde comienza a disminuir en recobro. Otra ventaja de éste método es que los valores de  $V_f$  de varios compuestos se pueden estimar simultáneamente (Hennion y Pichon, 1994).

La figura I.6. representa el gráficamente el método de preconcentración en línea en CLAR en que se determina experimentalmente el  $V_f$  y  $R$ .



**Figura I.6.** Determinación experimental del volumen de fuga y el rendimiento de extracción correspondiente ( Hennion y Pichon, 1994)

En el presente trabajo se adecuó esta metodología de trabajo, empleando cartuchos de extracción empacados con adsorbente C8 y C18 en lugar de precolumnas. En los cartuchos se hizo pasar una disolución de analito de concentración conocida, seguida de la elución con la serie de disolventes de la secuencia de elución. Las fracciones obtenidas con el disolvente de elución final fueron analizadas por CLAR y con las áreas obtenidas se construyó la curva de porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del disolvente de elución; el Vf se consideró como el punto que en las fracciones se comenzó a detectar al analito a la longitud de onda determinada.

#### I.2.4.4. Rendimiento de extracción

El rendimiento de la extracción o recobro se define como el cociente entre la cantidad extraída y la cantidad aplicada. Teóricamente se alcanza el 100% sólo cuando ambas cantidades son iguales. El conocimiento del Vf recibe mucha atención en el desarrollo de métodos por EFS y por lo tanto resulta importante su medición y predicción cuando, se pretende retener a los analitos, el Vf debe ser lo más grande posible y cuando se pretende desorberlos debe ser lo más pequeño posible.

Solamente los recobros obtenidos con el mismo adsorbente y eluente se pueden comparar entre experimentos diferentes sólo si se conoce la cantidad de adsorbente y el volumen de muestra o de eluente aplicado.

#### I.2.4.5. Usos y aplicaciones

La EFS es un método de preparación de muestra que se adapta bien para la extracción de compuestos en muestras acuosas. Las muestras biológicas deben ser líquidas o si no sufrir un tratamiento previo que las lleve a este estado antes de aplicarlas a los adsorbentes. Este último paso es eliminado en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) que será descrita en la sección siguiente.

La EFS se usa para 6 propósitos principales en la preparación de muestras (Hennion, 1991; Snyder et al., 1997):

- Remoción de interferencias
- Concentración, enriquecimiento de trazas de analito
- Eliminación de sales
- Intercambio de disolvente
- Derivatización "*in situ*"
- Almacenamiento de muestra y transporte

La EFS es un proceso cromatográfico que presenta ventajas sobre la ELL como son:

- Extracción más completa del analito
- Área superficial mucho mayor
- Separación de interferentes más eficiente
- Consumo reducido de disolventes orgánicos
- Recolección facilitada de la fracción total del analito
- Procesos manuales mas convenientes
- Remoción de particulados
- Fácil automatización

### **I.3. DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (DMFS)**

#### **I.3.1. Generalidades**

Introducida por S. A. Barker en 1989, la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es una técnica analítica que permite manejar directamente muestras sólidas, semisólidas y viscosas. Esta técnica provee de un mecanismo que rompe y dispersa simultáneamente la muestra sobre el adsorbente que es utilizado posteriormente como material de empaque de una columna, generando así una fase con características cromatográficas únicas determinadas por la combinación muestra-fase estacionaria-analito (S. A. Barker, 2000).

La DMFS es un proceso que involucra la fragmentación (homogenización) de la muestra en un adsorbente como C18 constituida por un soporte de sílice con cadenas de octadecilo enlazadas. Este tipo de material es el mismo que se utiliza para empacar las columnas de extracción en fase sólida, las diferencias radican en que dicho adsorbente posee granulometría más grandes y menos homogéneas. Así, el soporte sólido de la fase estacionaria sirve como material abrasivo al molerlo junto con la muestra en un mortero, las fuerzas mecánicas y de cizalla permiten romper la estructura del tejido aumentando así la superficie de contacto; pero también el proceso adquiere mayores alcances al emplear un soporte sólido con una fase orgánica unida, ya que los componentes de la muestra son dispersados sobre ésta, llevándose a cabo interacciones que permiten que los componentes de la muestra se distribuya sobre la superficie en base a su polaridad relativa. De esta manera, los componentes no polares se dispersaran en la fase orgánica no polar, las moléculas pequeñas muy polares (agua) se asociaran con los silanoles presentes en la superficie y en el interior de los poros del soporte de sílice y con los componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno, y las moléculas menos polares, se distribuyeran en la superficie, ahora bifásica, que se formará con los lípidos de la matriz dispersados en la fase unida (S. A. Barker, 2000).

### I.3.2. Procedimiento

La técnica de DMFS, consiste de cuatro pasos simplificados:

**1) Dispersión de la matriz** en el adsorbente, homogenizando hasta obtener una pasta, en un mortero de material no poroso (vidrio o ágata).

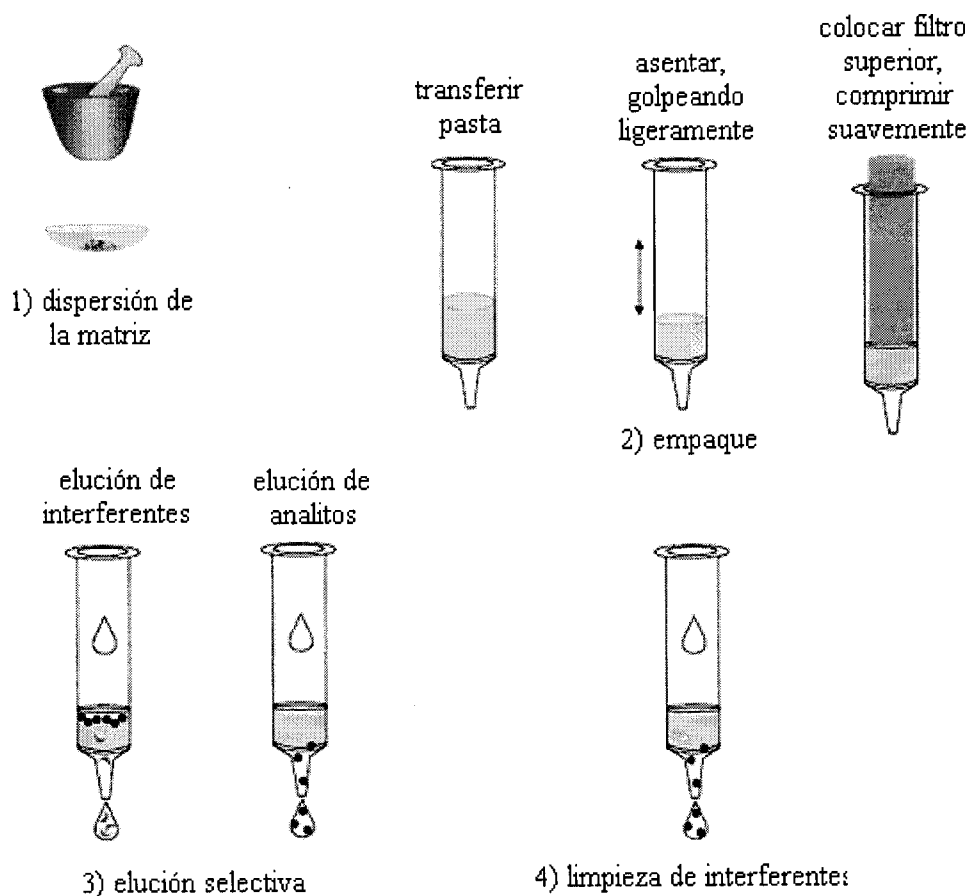
**2) Empaque** de la pasta en el cartucho, colocando un filtro en el fondo evitando la formación de canales en la columna al transferir la pasta y cubriendo con otro filtro. Finalmente se comprime con ayuda de un émbolo plano de jeringa evitando la sobre compactación.

**3) Elución selectiva**, usando disolventes de polaridad variada o disolventes modificados por la adición de ácidos, bases, sales o porcentajes variados de otros disolventes.

**4) Limpieza de interferentes** con el uso de co-columnas para obtener un fraccionamiento posterior y para ayudar a la limpieza del extracto. En las muestras de origen animal regularmente se emplean materiales con la capacidad de retener a los lípidos (gel de sílice, florisil, alúmina o C18), los cuales pueden ser empacados en el fondo del cartucho junto a la pasta de dispersión o usarse en una columna externa que colecte y fraccione el eluato de la primera. Es posible realizar eluciones múltiples o secuenciales que permitan aislar una o varias clases de compuestos con la dispersión de una sola muestra. También se ha demostrado que se puede fraccionar toda la muestra, lo que permite aislar e identificar a los compuestos endógenos. Para este propósito las columnas de DMFS preparadas con fase estacionaria C18 han sido eluidas con una secuencia de disolventes iniciando por los polares (acetato de etilo, acetonitrilo, metanol), y puede ser seguido de diluciones de ácidos, bases o sales para alterar la fuerza iónica de los componentes de la columna, hasta llegar a los más apolares como el hexano (S. A. Barker, 2000).



En la figura I.7 se representan estos 4 pasos simplificados con que se realiza la DMFS.



**Figura I.7.** Esquema simplificado del procedimiento de dispersión, empaque, elución y limpieza aplicando DMFS.

### I.3.3. Factores que afectan la retención en DMFS

La DMFS junto con la EFS se pueden considerar como procedimientos de cromatografía de líquidos simple y en general se aplican los mismos principios. Sin embargo la DMFS posee características que la diferencian de la EFS y la hacen más compleja, en comparación con los procesos cromatográficos estándar. La DMFS se diseñó principalmente para romper y dispersar los componentes de una muestra sólida, con un soporte sólido unido a una fase orgánica que pueda ser utilizado posteriormente como material de empaque de una columna, de la que pueden eluirse los componentes de interés. De esta forma, la muestra dispersa forma parte de la columna misma y en sentido estricto es parte del sistema cromatográfico (S. A. Barker, 2000). En DMFS las interacciones dinámicas involucradas no se comprenden del todo. Sin embargo, se conocen varios factores que han mostrado afectar la eficiencia en el proceso, los cuales se describen a continuación.

### **I.3.3.1. Naturaleza del soporte sólido**

Hasta el momento la mayoría de los artículos publicados que involucran DMFS utilizan soportes a base de sílice. Un aspecto positivo de usar este tipo de soportes, es la presencia de grupos silanoles sin derivatizar, los cuales tienen un papel importante, ya que son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que permite obtener un homogenizado seco que de otra forma sería más complicado lograr (S. A. Barker, 2000).

### **I.3.3.2. Tamaño de partícula**

Se ha reportado el uso de partículas de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro; también se han empleado materiales que contienen mezclas de partículas entre 40-100  $\mu\text{m}$  que producen buenos resultados además de ser más económicos. Las partículas de mayor tamaño no son recomendadas, porque generan dificultades de flujo.

### **I.3.3.3. Naturaleza de la fase unida**

La mayoría de las aplicaciones de la DMFS utilizan materiales para la generación de cromatografías en fase inversa como el C8 y C18. Existen algunas dudas respecto al rol que desempeñan la presencia y la naturaleza de la fase unida; se cree que la fase unida lipofílica es esencial para romper y dispersar la muestra y también se cree que la fase lipofílica permite la formación de una nueva fase o bicapa que se asemeja a una membrana celular. Dos puntos que han demostrado ser esenciales para la EFS y la DMFS son el pre-lavado para eliminar posibles interferentes y acondicionamiento con disolventes (S. A. Barker, 2000).

### **I.3.3.4. Naturaleza de la muestra**

Debido a que la matriz forma parte de la columna cromatográfica, es de esperarse que habrá variaciones en los resultados y recobros de los analitos al cambiar de una matriz a otra. Mientras que la fase unida está inmóvil sobre el soporte sólido, los componentes de la matriz dispersa no lo están. Por esta razón, ciertos componentes de la matriz se eluyen por clases de compuestos o fracciones, dependiendo del disolvente que se emplea para eluir y las interacciones dinámicas entre los

componentes de la matriz dispersa y la fase sólida. De esta forma, en muchos de los casos, los analitos tienden a eluir en fracciones que no son del todo predecibles por su distribución relativa en la fase sólida o el disolvente de elución. Esto se explica por el hecho de que los analitos de cierta naturaleza química co-eluyen con los compuestos de la matriz, en las mismas fracciones. En muchos casos las interferencias pueden ser removidas empleando cartuchos de EFS posterior a la DMFS. Las interacciones de la matriz con la fase sólida y la fase móvil afectan de forma importante el orden de elución de los compuestos de la columna de DMFS (S. A. Barker, 2000).

#### **I.3.3.5. Modificaciones a la matriz**

Así como en ocasiones es necesario en EFS, alterar las muestras para modificar el estado de ionización de los componentes de la muestra y asegurar que ciertas interacciones entre las fases estacionarias y/o el disolvente de elución ocurran; en la DMFS pueden adicionarse ácidos, bases, sales, agentes quelantes o antioxidantes antes de dispersar la muestra y/o aditivos en el disolvente de elución para aumentar la eficiencia del proceso (S. A. Barker, 2000).

#### **I.3.3.6. Naturaleza y secuencia de adición del disolvente de elución**

Así como la polaridad relativa del disolvente de elución y la naturaleza de la fase estacionaria juegan un papel importante en la EFS para determinar lo que permanece en la columna y lo que se eluye; en la DMFS también se tienen que considerar para la retención y la elución de los componentes de la matriz. Si se da el caso en que muchos de los analitos de interés eluyen con los componentes de la matriz, la secuencia y el diseño del perfil de elución, pueden ayudar a retener los componentes de la muestra en la columna y recuperar los analitos de interés con alto grado de especificidad. Esto no siempre se logra y es entonces cuando el uso de co-columnas y otras técnicas de limpieza deben ser empleadas (S. A. Barker, 2000).

#### **I.3.4. Aplicaciones**

La aplicación de la DMFS ha permitido resolver problemas analíticos complicados además de presentar numerosas ventajas respecto a los métodos convencionales de extracción. La DMFS reduce significativamente el tiempo de análisis, el consumo de disolventes que suelen ser de difícil

tratamiento (reciclaje), las cantidades de muestra, además de que permite la extracción selectiva de los analitos y provee resultados comparables a los obtenidos por métodos tradicionales u oficiales.

En la actualidad, los métodos basados en la DMFS ha tenido aplicación exitosa en el aislamiento de fármacos y contaminantes orgánicos como pesticidas e hidrocarburos policíclicos aromáticos, en tejidos animales y vegetales (M. Navarro, Y. Picó, 2002; L. Pensado, 2005; S.A. Barker, 2000).

En la tabla I.2 se resumen los métodos reportados en la literatura del año 2000 al 2005 en donde se aplica la DMFS para la extracción de contaminantes en tejidos de pescado. En las diferentes publicaciones se mencionan los diferentes analitos evaluados, así como el adsorbente en que fue dispersada la muestra, el disolvente de elución, adsorbente de limpieza y técnica de análisis empleada.

Matriz	Analito	Adsorbente	Elución y limpieza	Determinación	Referencia
Músculo e hígado de pescado	PCB's y PBDE's	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , florisil	n-hexano, sílice ácida	CG-DCE	Martínez A, 2005
Alimento para pescado	PBDE's, PCB's y Pb's.	C 18	Hexano, alúmina básica	CG-EM	Carro, AM, 2005
Pescado	PAH's	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> C 18	Acetonitrilo, C18, florisil	CLAR-DFF	Pensado. L, 2005
Músculo de pescado	Lactosas macrocíclicas	C 18, alúmina neutra	Diclorometano, metanol, Carbón activado	CLAR-EM	Lagaña, A, 2003
Músculo de pescado	Alquinbencensulfonatos Lineales	C 18	Acetonitrilo con 1% de ácido acético, EFS	CLAR-DCE CLAR-EM	Crescenzi, C, 2001

PBB's: Bifenilos polibromados, PCB's: Bifenilos policlorados, PBDE's: Éteres difenil policlorados, PAH's: Hidrocarburos policíclicos aromáticos, CG: Cromatografía de gases, CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución, DCE: Detector de captura de electrones, DFF: Detector fotométrico de flama, EM: Espectrometría de masas, EFS: extracción en fase sólida.

**Tabla I.2.** Resumen de los métodos reportados en la literatura del año 2000 al 2005 en donde se aplica la DMFS para la extracción de contaminantes en tejidos de pescado.

## **I.4. PRESENCIA DE CONTAMINANTES PERSISTENTES EN MUESTRAS BIOLÓGICAS**

### **I.4.1. Generalidades**

Las sustancias orgánicas que son persistentes, bioacumulables y que poseen características de toxicidad capaces de ocasionar efectos adversos a la salud o al ambiente se conocen como Sustancias Persistentes, Tóxicas y Bioacumulables (PTB's). Dependiendo de su movilidad en el ambiente, estas sustancias pueden ser de interés local, regional o global. Los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's) se definieron como una subclase de los PTB's.

### **I.4.2. Características tóxicas de los Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP's)**

Por su carácter tóxico, los COPs están ligados a una serie de efectos nocivos a la salud humana, como trastornos congénitos, daño al sistema inmunológico y respiratorio, problemas reproductivos, desórdenes de índole sexual, periodos de lactación humana más cortos y mal funcionamiento endócrino. Otros síntomas de la exposición nociva a los COPs sobre la salud humana incluyen: alergias, hipersensibilidad, daño al sistema nervioso, desórdenes neurológicos de comportamiento y desarrollo, pérdida de la memoria a corto plazo y cáncer. La Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de su Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer, considera a muchos de los COP's como potenciales carcinógenos humanos.

Los COP's son lipofílicos por lo que se bioacumulan de forma exponencial en la cadena alimenticia. Los animales pertenecientes a los niveles tróficos superiores de las cadenas alimenticias son capaces de absorber concentraciones de estos compuestos mucho mayores a las encontradas en el medio ambiente, a través de un mecanismo conocido como biomagnificación.

Debido a que los COP's son compuestos semivolátiles, una vez en el aire, pueden viajar distancias considerables a través de los ciclos de evaporación y deposición atmosférica. De esta manera, estos compuestos se pueden hallar a miles de kilómetros de distancia de sus fuentes de origen. Tanto el viento como el agua acarrean estos compuestos hasta los lugares más recónditos del planeta, incluyendo el océano abierto, los desiertos y las regiones polares (Alcock et al., 1999; Baker & Hites, 1999).

### **I.4.3. Fuentes de emisión y generación**

Aunque existen algunas fuentes naturales de COP's, la mayor parte de estas sustancias deben su origen a fuentes antropogénicas asociadas con la fabricación, uso y eliminación de determinados productos químicos orgánicos. Algunos de estos compuestos son plaguicidas (aldrin, clordano, DDT y metabolitos de éste, dieldrin, endrin, heptacloro, mirex, organofosforados, toxafeno, atrazina, etc.) y se han utilizado extensivamente durante largo tiempo, aunque es escasa la información existente sobre las cantidades liberadas al ambiente. Algunos otros se emplean como aditivos o auxiliares en una variedad de aplicaciones industriales (bifenilos policlorados, hexaclorobenceno, etc.). Otros COP's, como las dioxinas, los furanos y los hidrocarburos policíclicos aromáticos se generan como subproductos no intencionales en todo tipo de procesos de combustión entre los que se encuentran la quema de combustibles fósiles, basura, incineración no controlada de residuos sólidos y peligrosos, en incendios forestales, etc. Esto hace que sea extremadamente difícil evaluar los niveles liberados al ambiente. (K.C. Jones., P de Voogt, 1999).

En este trabajo se utilizaron el benzo(a)pireno uno de los hidrocarburos policíclicos aromáticos de mayor interés por sus propiedades carcinogénicas y dos pesticidas órganofosforados (clorpirifos y fenitrotión) ampliamente usado en ganadería. Las propiedades fisico-químicas de estos compuestos se presentan en el capítulo de anexo.

**CAPÍTULO**  
**II**  
**MATERIALES**  
**Y**  
**EQUIPOS**

## **II.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS**

- Metanol grado cromatográfico (J.T. Baker. México).
- Acetonitrilo grado cromatográfico (Mallinckrodt, USA).
- Agua grado cromatográfico purificada en sistema de micro filtración (COLE-PARMER, USA).
- Estándares plaguicidas (Chemservice, West Chester) clorpirifos 99%, fenitrotión 99%.
- Estándar PAH's (Chemservice, West Chester) benzo(a)pireno 98%.
- Heptansulfonato de sodio (SIGMA, USA).
- Lauril sulfato de sodio (SIGMA-ALDRICH USA).

## **II.2. Dispersión de Matriz en Fase Sólida**

- Mortero de ágata de 30 mL.
- Reservorios con filtro para empacar cartuchos de EFS de 6 mL (VARIAN, USA).
- Octil silano C8 Supelclean (Supelco, USA).
- Octadecil silano C18 Supelclean (Supelco, USA).
- Octadecil silano C18 Chromabond (MACHEREY-NAGEL).
- Polímero bondesil-env (VARIAN USA).
- Filtros para cartucho de EFS ½'', 20 µm (VARIAN, USA).
- Cámara de vacío con regulador de presión (Ashcroft, USA).
- Biohomogenizador 1- 200 mL, COLE-PARMER INSTRUMENT Co.



### **II.3. SISTEMA CROMATOGRÁFICO**

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (VARIAN, USA) bomba ternaria 9010, automuestreador 9100 con bucle de 20  $\mu\text{L}$ , detector UV-Vis de arreglo de diodos 9065. Software de control y procesamiento de datos "Star Workstation" versión 4.5 (VARIAN, USA).
- Columna analítica de acero inoxidable 150 mm de longitud por 4.6 mm d.i. empacada con sílice fase reversa RES ELUT C18 tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ .
- Pre-columna de guarda de acero inoxidable Hicrom de 13 mm de longitud por 4.5 mm d.i. empacada con sílice fase inversa Nucleosil C18 (Phenomenex, USA) tamaño de partícula 10  $\mu\text{m}$ .

### **II.4. MUESTRAS BIOLÓGICAS**

- Hígado de mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- Músculo de mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*).

### **II.5. OTROS MATERIALES Y APARATOS UTILIZADOS**

- Sistema de filtración por vacío para fase móvil, Micro Filtration System (Cole Parmer, USA).
- Membranas de nylon tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$  y 47 mm de diámetro (Cole Parmer, USA).
- Ultrasonido modelo 1210 (Branson, USA).
- Micropipeta de volumen variable 2-20  $\mu\text{L}$  (Transferpette, Germany).
- Micropipeta de volumen variable 20-200  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Germany).
- Micropipeta de volumen variable 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Germany).
- Microbalanza analítica modelo AG 245 (Mettler Toledo, Suiza).

**CAPÍTULO**

**III**

**DESARROLLO**

**EXPERIMENTAL**

### **III.1. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES DE TRABAJO**

#### **III.1.1. Solución madre de benzo(a)pireno**

Se pesaron con precisión 1.02 mg de estándar benzo(a)pireno, pureza de 98%, (Chemservice, West Chester). Se disolvieron en 5 mL de metanol con agitación manual a temperatura ambiente hasta su completa disolución, para finalmente llevar a un aforo de 10 mL en un matraz volumétrico. La solución madre de 100 ppm se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar con tapón rosca, en refrigeración hasta su uso. A partir de esta solución se prepararon las diluciones de trabajo a diferentes concentraciones.

#### **III.1.2. Solución madre de la mezcla de contaminantes**

Se midieron con precisión 5.05 mg de estándar del plaguicida fenitrotión pureza de 99% (Chemservice, West Chester). Por separado se pesaron con precisión 5.05 mg de estándar plaguicida clorpirifos pureza de 99% (Chemservice, West Chester) y 1.02 mg de estándar benzo(a)pireno, pureza de 98%, (Chemservice, West Chester). Los diferentes compuestos se disolvieron juntos en 5 mL de metanol con agitación manual a temperatura ambiente hasta su completa disolución para finalmente llevar a un aforo de 10 mL en un matraz volumétrico. Se obtuvo así una solución de 500 ppm de fenitrotión, clorpirifos y 100 ppm de benzo(a)pireno. La solución madre de la mezcla de contaminantes se almacenó en un frasco de vidrio color ámbar con tapón rosca, en refrigeración hasta su uso. A partir de esta solución se prepararon las diluciones de trabajo a diferentes concentraciones.

### **III.2. ESTABLECIMIENTO PARA LA SEPARACIÓN Y EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

#### **III.2.1. Establecimiento de las condiciones para la detección**

Se caracterizó a los analitos obteniendo su espectro de absorción en un intervalo de 190 a 350 nm con el detector de arreglo de diodos (DAD). Para esto, se realizaron inyecciones de una solución a una concentración de 5 ppm para el clorpirifos y fenitrotión y 1 ppm para el benzo(a)pireno. Obteniéndose las longitudes de onda de máxima absorción.

### **III.3. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANALISIS CROMATOGRAFICO PARA EL BENZO(A)PIRENO**

#### **III.3.1. Variación del factor de retención ( $k'$ ) en función de % metanol**

Se realizaron inyecciones de 20  $\mu$ L de la solución 1 ppm con las que midió el tiempo de retención del benzo(a)pireno variando la composición de la fase móvil 100% metanol, 90:10, 80:20 y 70:30 metanol:agua, con una velocidad de flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . A partir de éstas se calculó el factor de retención para cada composición de la fase móvil probada, mediante la siguiente relación:

$$k' = t'_r / t_0 \text{ donde } t'_r = t_r - t_0$$

Con la que se construyó la curva  $\log k' = f(\% \text{ de metanol})$ .

#### **III.3.2. Linealidad y límite de detección**

Para conocer la linealidad del sistema cromatográfico, se realizó una curva de calibración de benzo(a)pireno, inyectando soluciones estándar de benzo(a)pireno a concentraciones de 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm con las que se registró la respuesta del detector en unidades de área del pico. Así se construyó el gráfico de respuesta del detector en función de la concentración de benzo(a)pireno. Los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) se calcularon a partir de este gráfico mediante la siguiente relación:

$$\begin{aligned} \text{LC} &= 10 \text{ s} / \text{S} & \text{donde s es la desviación estándar de la} \\ & & \text{respuesta y S es el error de la curva de} \\ \text{LD} &= 3.3 \text{ s} / \text{S} & \text{calibración.} \end{aligned}$$

#### **III.3.3. Reproducibilidad**

Se realizaron por triplicado las inyecciones de una dilución estándar de benzo(a)pireno a concentraciones de 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm. Con los datos generados se calculó el coeficiente de variación para cada punto con la siguiente relación:

$$cv = [s / \bar{x}] 100$$

### **III.4. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO PARA LA MEZCLA DE COMPUESTOS BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTIÓN**

#### **III.4.1. Variación de $k'$ en función de % metanol**

Se realizaron inyecciones de 20  $\mu\text{L}$  de la mezcla de compuestos a concentraciones de 5 ppm de clorpirifos y fenitrotión y 1 ppm de benzo(a)pireno, con las que se midió el tiempo de retención para cada uno de los compuestos variando la composición de la fase móvil en 100 % metanol, 90:10, 80:20 y 70:30 metanol:agua, con una velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$ . A partir de estos valores de tiempo de retención se calculó el factor de retención para cada composición de la fase móvil probada, mediante la siguiente relación:

$$k' = t'_r / t_0 \text{ donde } t'_r = t_r - t_0$$

Se construyeron las gráficas de  $\log k' = f(\% \text{ de metanol})$  para cada compuesto.

#### **III.4.2. Linealidad y límite de detección**

Se realizó una curva de calibración para cada uno de los compuestos, utilizando soluciones por separado de estándar de benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión a concentraciones de 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm para benzo(a)pireno y 5, 2.5, 0.5 y 0.25 ppm para clorpirifos y fenitrotión. Bajo estas condiciones se registró la respuesta del detector en unidades de área del pico, con los datos obtenidos se construyó el gráfico de respuesta del detector en función de la concentración de cada uno de los compuestos. Los límites de cuantificación (LC) y detección (LD) se calcularon a partir de este gráfico mediante la siguiente relación:

$$\begin{aligned} \text{LC} &= 10 \text{ s} / \text{S} & \text{donde } s \text{ es la desviación estándar de la} \\ & & \text{respuesta y } S \text{ es el error de la curva de} \\ \text{LD} &= 3.3 \text{ s} / \text{S} & \text{calibración.} \end{aligned}$$

### **III.4.3. Reproducibilidad**

Se realizaron por triplicado las inyecciones de dilución estándar de benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión a concentraciones de 1, 0.5, 0.1 y 0.05 ppm para benzo(a)pireno y 5, 2.5, 0.5 y 0.25 ppm para clorpirifos y fenitrotión. Con los datos generados de la respuesta del detector se calculó el coeficiente de variación para cada punto con la siguiente relación:

$$cv = [s / \bar{x}] 100$$

## **III.5. CONDICIONES FINALES DE ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

### **III.5. A 1) Benzo(a)pireno solo**

**Fase estacionaria:** columna analítica VARIAN de 150 mm de longitud por 4.6 mm d.i. empacada con fase inversa RES ELUT C18 tamaño de partícula 5 µm.

**Fase móvil:** flujo: isocrático velocidad 1 mL / min, composición metanol 100 %

**Detección:** UV arreglo de diodos (DAD), a  $\lambda$  263 nm.

Tiempo de análisis: 10 minutos.

### **III.5. A 2) Mezcla de contaminantes**

**Fase estacionaria:** columna analítica VARIAN de 150 mm de longitud por 4.6 mm d.i. empacada con fase inversa RES ELUT C18 tamaño de partícula 5 µm.

**Fase móvil:** flujo: gradiente de 0 a 5 minutos composición de 85 a 100 % de metanol; isocrático de 5 a 15 minutos, composición 100 % metanol, velocidad 1mL/min.

**Detección:** UV arreglo de diodos (DAD), a  $\lambda$  263 nm para benzo(a)pireno,  $\lambda$  287 nm para clorpirifos y  $\lambda$  268 nm para fenitrotión.

Tiempo de análisis: 15 minutos.

## **III.6. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN**

### **III.6.1. Acondicionamiento de los adsorbentes**

Se acondicionaron los adsorbentes haciendo pasar un volumen de acetonitrilo al 100 % similar al que ocupa el sólido, esto se realizó empacando 5 g del adsorbente en un cartucho de EFS; que se colocó en una cámara de vacío con regulador de presión, en donde se le aplicó un volumen de

disolvente 1.5 mL por g de adsorbente. El secado se realizó aplicando vacío durante 1 h aproximadamente. El adsorbente acondicionado se conservó en un frasco de vidrio color ámbar de 30 mL con tapón rosca a temperatura ambiente hasta su uso.

### **III.6.2. Obtención y conservación de muestras biológicas**

Se obtuvieron 25 pescados frescos de mojarra tilapia (*Oreochromis niloticus*), a los que se les extrajo el hígado que tenía un peso de 20 g aproximadamente. Se homogenizó el total de las muestras, se almacenó en porciones de 1 g y se mantuvo en congelación hasta su uso. De igual manera se procedió en la conservación del músculo.

### **III.6.3. Cálculo del porcentaje de recobro**

El análisis de datos se realizó en gran parte a partir de los gráficos de % de recobro en función del volumen de fase móvil aplicada. Así se obtuvieron parámetros cromatográficos como el volumen de retención, volumen de elución y volumen de fuga de los analitos.

El porcentaje de recobro se calculó con la siguiente relación:

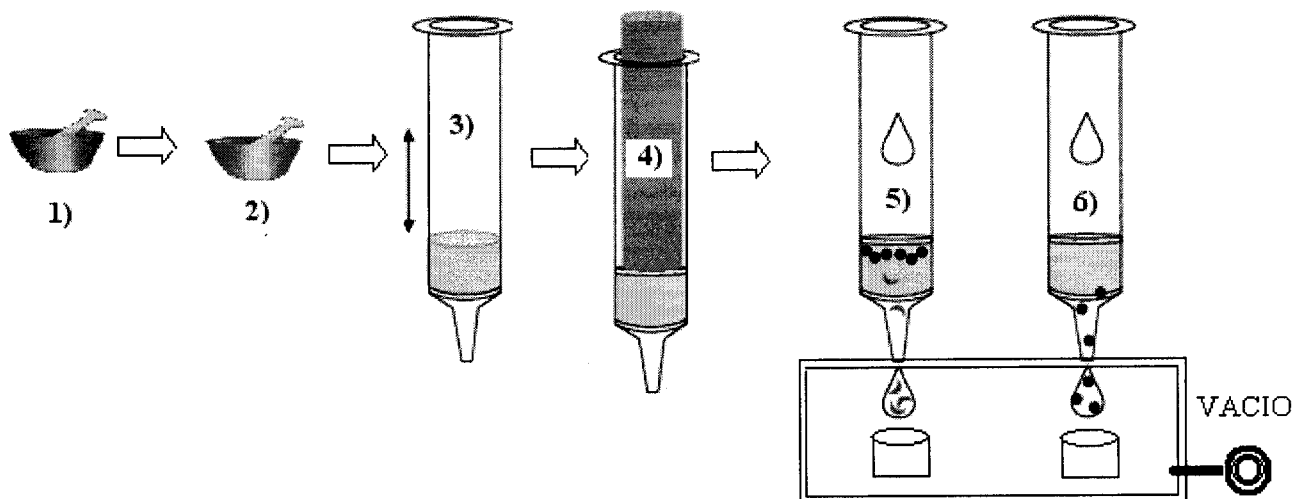
$$\left[ \frac{\text{área}_{\text{muestra}}}{\text{área}_{\text{estándar}}} \right] \left[ \frac{\text{ng}_{\text{inyectados}}}{\mu\text{L}_{\text{inyectados}}} \right] \left[ \frac{\mu\text{L}_{\text{fracción analizada}}}{\text{ng}_{\text{fortificado}}} \right] 100$$

simplificado:

$$\left[ \frac{\text{área}_{\text{muestra}}}{\text{área}_{\text{estándar}}} \right] \text{concentración}_{\text{estándar}} \left] 100$$

## **III.7. PROTOCOLO PARA REALIZAR LA DISPERSIÓN Y EL EMPAQUE DE LA COLUMNA**

En la figura III.7A se presenta el procedimiento de preparación de muestra, dispersión y elución aplicando la técnica de DMFS.



**Figura III.7A.** Diagrama del procedimiento de preparación de muestra, dispersión y elución aplicando la técnica de DMFS.

**El paso 1** consistió en depositar la cantidad de muestra en un mortero de ágata, a la que se fortificó con el volumen de solución de estándar indicado correspondiente a 10  $\mu\text{g/g}$  de benzo(a)pireno. Se deja equilibrar por 1 hora.

**El paso 2** consistió en incorporar el adsorbente a la muestra fortificada, homogenizando (dispersando) con ayuda del pistilo del mortero hasta su completa disgregación.

**El paso 3** consistió en transferir la pasta formada con la muestra dispersa en el adsorbente a un cartucho de extracción.

**El paso 4** consistió en compactar la pasta, aplicando presión con ayuda de un émbolo, procurando no dejar canales y sin compactar de más para evitar problemas en la elución con disolventes.

**El paso 5** consistió en aplicar la secuencia de elución para eliminar interferentes (generalmente agua y/o mezclas de disolvente orgánico-agua).

**El paso 6** consistió en aplicar el disolvente de elución de los analitos (generalmente mezclas de disolventes orgánicos-agua y/o disolventes orgánicos puros).

Las fracciones obtenidas se analizaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución, con el sistema cromatográfico descrito en *condiciones finales de análisis cromatográfico III.5 A 1*.

Para optimizar la secuencia y los volúmenes de elución de los pasos 5 y 6 se efectuaron los ensayos que se describirán a continuación.



### **III.8. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL BENZO(A)PIRENO POR DMFS**

#### **III.8.1. Ensayos por Extracción en Fase Sólida (EFS)**

Para realizar estos ensayos se empacaron cartuchos con 400 mg de las fases estacionarias octil silano supelclean y octadecil silano supelclean previamente acondicionadas con metanol. Se les aplicó 1 mL de solución de estándar benzo(a)pireno disuelto en metanol al 100 % a una concentración de 1 ppm. Posteriormente se aplicó la siguiente secuencia de elución:

- 2 mL de acetonitrilo:agua 30:70
- 2 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- 2 mL de acetonitrilo:agua 70:30
- 3 fracciones de 4 mL de acetonitrilo al 100 %

El análisis de las tres fracciones finales se analizaron por CLAR con el sistema cromatográfico III.5.A 1.

También se aplicaron las siguientes disoluciones estándar de benzo(a)pireno preparadas en diferentes mezclas de metanol agua: 80:20, 85:15, 90:10 y 95:5. Previamente se observó su apariencia para verificar que el benzo(a)pireno no se insolubilizara por la adición de agua.

#### **III.8.2. Ensayos por Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)**

##### **III.8.2.1. DMFS con solución estándar**

Para realizar estos ensayos se adicionaron 500 µL de la solución estándar de benzo(a)pireno 10 ppm disuelta en metanol:agua 95:5 a 400 mg de las fases octil silano supelclean y octadecil silano supelclean. La dispersión se realizó siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A. Posteriormente a la columna se le aplicó la siguiente secuencia de elución:

- 4 mL de agua (grado cromatografico)
- 2 mL de acetonitrilo:agua 30:70 (solo en ensayos con octil silano)
- 2 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- 2 mL de acetonitrilo:agua 70:30
- 3 fracciones de 4 mL de acetonitrilo al 100%

El análisis de las tres fracciones finales se analizaron por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 1.

### III.8.2.2. DMFS con muestras de pescado (hígado)

#### III.8.2.2.1. Estudio de retención y elución de benzo(a)pireno

Para realizar estos ensayos se utilizaron las fases estacionarias octil silano supelclean y octadecil silano supelclean en las que se dispersaron 100 mg de hígado de pescado fortificadas con 100 µL de la solución madre de benzo(a)pireno, siguiendo el protocolo que se describió en la figura III.7A. Posteriormente se aplicó la siguiente secuencia de elución a la columna.

5 mL de agua grado cromatográfico  
4 mL de acetonitrilo:agua 30:70  
4 mL de acetonitrilo:agua 50:50  
4 mL de acetonitrilo:agua 70:30  
2 fracciones de 5 mL de acetonitrilo 100%.

El análisis de las dos fracciones finales se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 1.

#### III.8.2.2.2. Estudio cualitativo de los extractos (observación de turbiedad y coloración)

Para reducir los interferentes propios de la matriz en los extractos se realizó un estudio cualitativo variando el volumen y la composición acetonitrilo:agua en las fracciones de lavado en la secuencia de elución, para ello se probaron los siguientes volúmenes y mezclas de disolventes.

Volumen (mL)	Disolvente o mezcla de disolventes
10, 7, 5 y 3	agua grado cromatográfico
7, 5, 4 y 3	acetonitrilo:agua 30:70
7, 5, 4 y 3	acetonitrilo:agua 50:50
7, 5, 4 y 3	acetonitrilo:agua 70:30

De las observaciones hechas se estructuró el protocolo final de elución de interferentes.

### **III.9. ELIMINACIÓN DE LÍPIDOS INTERFERENTES EN LA SECUENCIA DE ELUCIÓN**

Para realizar estos ensayos se utilizó la fase octadecil silano supelclean, en las que se dispersaron muestras de hígado fortificadas con 100  $\mu$ L de la solución madre de benzo(a)pireno, siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A.

Se probaron las siguientes fracciones de elución:

- 3 fracciones de 5 mL de acetonitrilo:agua 80:20
- 3 fracciones de 5 mL de acetonitrilo:agua 90:10
- 3 fracciones de 5 mL de acetonitrilo al 100%

El análisis de los extractos obtenidos se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 1.

### **III.10. LIMPIEZA DE EXTRACTOS CON ADSORBENTES**

Para realizar estos ensayos se utilizaron cartuchos empacados con 1) 500 mg de gel de sílice, 2) 750 mg de florisil como se describe en la figura I.2, en cada uno se adicionaron los extractos obtenidos de la elución de acetonitrilo al 100 % de los ensayos de la sección anterior.

### **III.11. ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO CON DIFERENTES MEZCLAS DE ACETONITRILLO:AGUA EN DIFERENTES FASES ESTACIONARIAS**

Para realizar estos ensayos se dispersaron muestras de hígado fortificadas con 100  $\mu$ L de la solución madre de benzo(a)pireno en cada una de las siguientes fases octil silano supelclean, octadecil silano supelclean, octadecil silano chromabond, polímero bondesil-env, siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A. A la que se aplicó la secuencia de elución siguiente:

- 5 mL de agua grado cromatográfico
- 2 mL de acetonitrilo:agua 30:70
- 2 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- 2 fracciones de 5 mL de acetonitrilo 100%

El análisis de las dos fracciones finales se analizaron por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 1.

### **III.12. OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE HÍGADO Y MÚSCULO DISPERSO EN FASE ESTACIONARIA**

Para realizar estas observaciones se realizaron dispersiones de hígado y músculo de pescado en la fase octadecil silano supelclean. Se tomaron fotografías por microscopía electrónica antes y después de aplicar la secuencia de elución a 750 aumentos.

### **III.13. FRENTES DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO DE LAS FASES SÍLICE N-ALQUIL CON DOS DIFERENTES MATRICES**

#### **III.13.1. Benzo(a)pireno con dos diferentes matrices**

##### **III.13.1.1. Ensayos en hígado**

Para realizar estos ensayos se utilizaron las fases octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond, en las que se dispersaron muestras de hígado fortificadas con 100 µL de la solución madre de benzo(a)pireno, siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A. A la que se aplicó la secuencia de elución siguiente:

5 mL de agua grado cromatográfico  
2 mL de acetonitrilo:agua 30:70  
2 mL de acetonitrilo:agua 50:50  
Fracciones de 1 mL hasta 10 mL de acetonitrilo:agua 80:20

El análisis de las últimas fracciones obtenidas se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 1. Con los datos obtenidos del análisis se construyó el gráfico de frente de elución de benzo(a)pireno a partir del porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del eluyente.

##### **III.13.1.2. Ensayos en músculo**

Para realizar estos ensayos se utilizaron las fases octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond; en las que se dispersaron muestras de músculo fortificadas con 100 µL de la solución madre de benzo(a)pireno, siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A. A la que se aplicó la secuencia de elución siguiente:

5 mL de agua grado cromatográfico  
2 mL de acetonitrilo:agua 30:70  
2 mL de acetonitrilo:agua 50:50  
Fracciones de 1 mL hasta 10 mL de 80:20 acetonitrilo:agua

El análisis de las últimas fracciones obtenidas se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 1. Con los datos obtenidos del análisis se construyó el gráfico de frente de elución de benzo(a)pireno a partir del porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del eluyente.

#### **III.14. FRENTES DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTIÓN CON DOS DIFERENTES MEZCLAS DE DISOLVENTES ORGANICO:AGUA EN OCTADECIL SILANO SUPELCLEAN**

Para realizar estos ensayos se utilizaron muestras de hígado fortificadas con 100 µL de la solución madre de mezcla de contaminantes benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión, dispersas en octadecil silano supelclean siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A. A la que se aplicó la secuencia de elución siguiente:

- 5 mL de agua grado cromatográfico
- 2 mL de acetonitrilo:agua 30:70
- 2 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- a) fracciones de 1 mL hasta 10 mL de acetonitrilo:agua 80:20
- b) fracciones de 1 mL hasta 10 mL de metanol:agua 80:20

El análisis de los extractos obtenidos se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 2. Con los datos obtenidos del análisis de las fracciones en a) y b) se construyó el gráfico de frente de elución de benzo(a)pireno a partir del porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del eluyente.

#### **III.15. FRENTES DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTIÓN CON DOS DIFERENTES MEZCLAS DE DISOLVENTES ORGÁNICO:AGUA EN BONDESIL-ENV**

Estos ensayos se efectuaron con la solución estándar de los contaminantes orgánicos. Así se dispersaron 100 µL de la solución madre de la mezcla de contaminantes en 400 mg del polímero bondesil-env, siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7. A la que se aplicó la secuencia de elución siguiente:

- 3 mL de acetonitrilo:agua 30:70
- 3 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- a) fracciones de 1 mL hasta 8 mL de acetonitrilo:agua 80:20
- b) fracciones de 1 mL hasta 8 mL de acetonitrilo:agua 90:10
- c) fracciones de 1 mL hasta 5 mL y de 5 en 5 hasta 20 mL de 100% de acetonitrilo

El análisis de los extractos obtenidos se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 2. Con los datos obtenidos del análisis de las fracciones en a), b) y c) se construyó el gráfico del frente de elución para cada compuesto.

### **III.16. ENSAYOS CON SOLUCIÓN ESTÁNDAR CON ADICIÓN DE SURFACTANTES**

Para realizar estos ensayos se aplica el mismo protocolo que se empleó para realizar la dispersión y empaque de la columna descrita en la figura I.7, realizando la adición del volumen de surfactante entre el tiempo de fortificación de la muestra y la dispersión con el adsorbente.

#### **III.16.1. Selección de surfactante**

Para realizar estos ensayos se utilizaron soluciones de heptansulfonato de sodio (HSNa) 1M y lauril sulfato de sodio (LSNa) 1M. Se adicionaron 100 y 400  $\mu$ L de estos surfactantes en fortificaciones de 100  $\mu$ L de la solución de mezcla de contaminantes en 400 mg del adsorbente polimérico bondesil-env. La adición del surfactante se realizó después de transcurrir el tiempo de fortificación y se dejó reposar durante 30 min más a temperatura ambiente, se continuó con el protocolo de dispersión y empaque de la columna de elución que se describe en la figura III.7A. A la que se aplicó la secuencia de elución siguiente:

3 mL de acetonitrilo:agua 30:70  
3 mL de acetonitrilo:agua 50:50  
Fracciones de 1 en 1 mL hasta 5 mL de 100% de acetonitrilo  
Fracciones de 5 en 5 mL hasta 30 mL de 100% de acetonitrilo

Los extractos obtenidos de las últimas fracciones se analizaron por CLAR con el sistema cromatográfico descrito en III.5 A 2. Con los datos obtenidos del análisis de las fracciones se construyó el gráfico de frente de elución de benzo(a)pireno a partir del porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del eluyente.

#### **III.16.2. Ensayos con muestras de hígado fortificada con los 3 compuestos benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión en octadecil silano supelclean y polímero bondesil-env sin surfactante**

Para realizar estos ensayos se utilizaron muestras de hígado fortificadas con 100  $\mu$ L de la solución madre de la mezcla de contaminantes en 400 mg de cada adsorbente, sin adicionar el surfactante, siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A. A la que se aplicó la siguiente secuencia de elución:

3 mL de acetonitrilo:agua 30:70  
3 mL de acetonitrilo:agua 50:50  
Fracciones de 1 en 1 mL hasta 10 mL de acetonitrilo al 100%  
Fracciones de 5 en 5 mL hasta 30 mL de acetonitrilo al 100%

El análisis de los extractos obtenidos se analizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 2. Con los datos obtenidos del análisis de las fracciones se construyó el gráfico de frente de elución de benzo(a)pireno a partir del porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del eluyente.

### **III.16.3. Frentes de elución de benzo(a)pireno en polímero bondesil-env con surfactante**

#### **III.16.3.1. Recobro de benzo(a)pireno en función de diferentes cantidades de HSNa 1M**

Para realizar estos ensayos se utilizaron muestras de hígado fortificadas con 100  $\mu$ L de la solución madre de la mezcla de contaminantes, dispersas en 400 mg de adsorbente polímero bondesil env, a las que se adicionó 100, 200 y 400  $\mu$ L de HSNa 1M; después de transcurrir el tiempo de fortificación, se dejó reposar por 30 min más y se continuó siguiendo el protocolo que se describe en la figura III.7A, a la que se aplicó la siguiente secuencia de elución:

3 mL de acetonitrilo:agua 30:70  
3 mL de acetonitrilo:agua 50:50  
Fracciones de 1 en 1 mL hasta 10 mL de acetonitrilo al 100%  
Fracciones de 5 en 5 mL hasta 30 mL de acetonitrilo al 100%

El análisis de las últimas fracciones obtenidas se realizó por CLAR con el sistema cromatográfico III.5 A 2. Con los datos obtenidos se construyó el gráfico de porcentaje de recobro acumulado en función del volumen del disolvente de elución. A partir de este gráfico se obtuvieron los parámetros  $V_f$ ,  $V_r$  y  $V_m$ .

**CAPÍTULO**  
**IV**  
**RESULTADOS**  
**Y**  
**DISCUSIÓN**



## IV.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES PARA LA DETECCIÓN Y EL ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

### IV.1.1. Establecimiento de las condiciones para la detección

En la tabla IV.1 se muestran los porcentajes de máxima absorción y las longitudes de onda de máxima absorción de cada compuesto, también se presentan las longitudes de onda que el detector de arreglo de diodos tiene establecidas para el despliegue de resultados. Con éstas se llevó a cabo la cuantificación a través de una calibración externa. Los espectros de absorción de luz ultravioleta de cada uno de los compuestos evaluados se presentan en el anexo I.

compuesto	longitud de onda de máxima absorción UV (nm)	porcentaje de máximo de absorción	longitud de onda para cuantificar
benzo(a)pireno	262.07	100	263
	294.12	87.7	
	282.80	86.1	
	202.82	69.3	
	220.82	52.6	
clorpirifos	199.53	100.0	287
	228.10	41.8	
	288.91	21.7	
fenitrotión	200.60	100.0	268
	267.63	42.7	

**Tabla IV.1.** Longitudes de onda de máxima absorción y de cuantificación de los compuestos evaluados.

Se optó por monitorear al benzo(a)pireno a 263 nm, porque en esta longitud de onda presenta la máxima absorción, además de no presentar interferentes con los espectros de los otros compuestos empleados. En el caso del clorpirifos se optó por monitorear a 287 nm, pues corresponde a la segunda longitud de onda máxima que interfiere menos con los máximos de los otros compuestos; el mismo caso se presenta con el fenitrotión a 268 nm.

## IV.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA EL BENZO(A)PIRENO

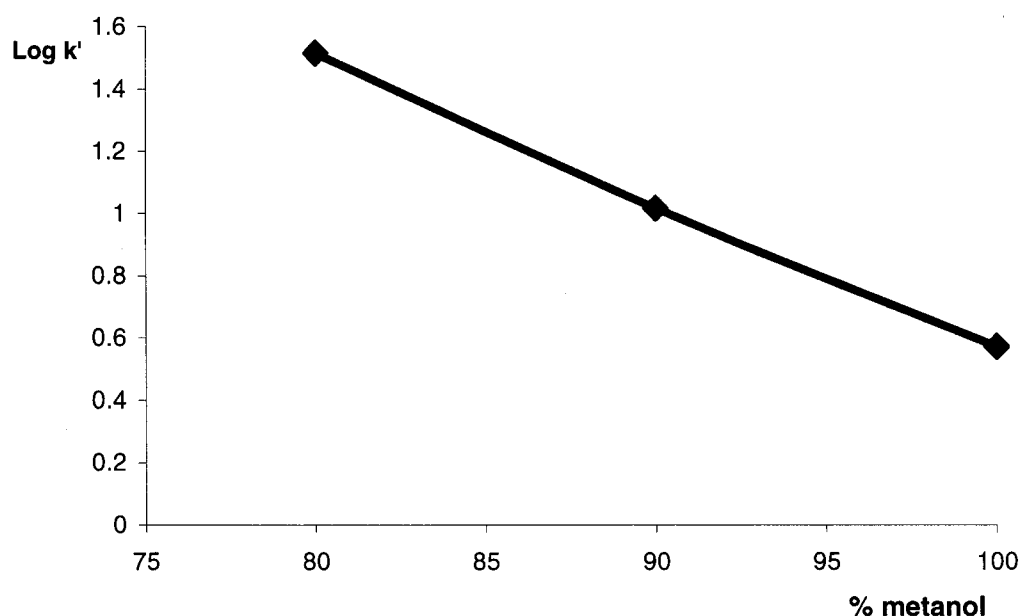
### IV.2.1. Variación del factor de retención ( $k'$ ) en función de % metanol

La tabla IV.2 presenta los valores de tiempo de retención ( $t_r$ ), factor de capacidad ( $k'$ ) y  $\log k'$  para el benzo(a)pireno con los diferentes porcentajes de metanol de la fase móvil.

% metanol	$t_r$	$k'$	$\log k'$
100	6.630	3.7357	0.5723
90	15.904	10.360	1.0156
80	47.282	32.773	1.5155
70	> 150.00	No determinado	No determinado

**Tabla IV.2.** Variación de factor de capacidad ( $k'$ ) de benzo(a)pireno en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.  $t_0 = 1.4$  min.

En la figura IV.1 se representa el comportamiento del  $\log k'$  en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.



**Figura IV.1.** Variación del factor de capacidad ( $k'$ ) de benzo(a)pireno en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.

Se observa que al disminuir el porcentaje de metanol en la fase móvil el  $\log k'$  aumenta notablemente siguiendo una relación lineal. De acuerdo a estos resultados se procedió a analizar al benzo(a)pireno con una fase móvil compuesta por metanol puro porque proporcionaría un tiempo de retención lo suficientemente alejado del pico del tiempo muerto y suficientemente rápido para su análisis en los extractos durante la optimización de las condiciones de extracción.

#### IV.2.2. Linealidad y límite de detección

La figura IV.2 representa la respuesta del detector en función de la concentración de benzo(a)pireno.

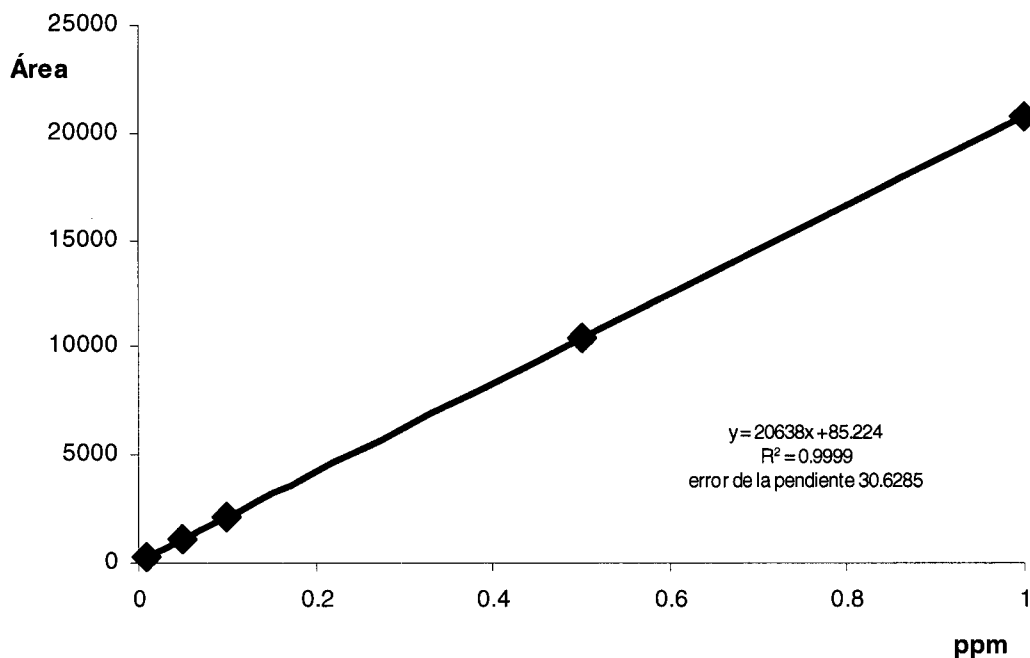


Figura IV.2. Respuesta del detector en función de la concentración de benzo(a)pireno, detección por UV a 263 nm.

El ajuste estadístico realizado con los valores obtenidos presentan un muy buen coeficiente de correlación.

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de la regresión lineal para benzo(a)pireno en este sistema cromatográfico son:

$$\begin{aligned} \text{Límite de detección} & \quad (\text{LD}) = 0.0430 \text{ mg L}^{-1} \\ \text{Límite de cuantificación} & \quad (\text{LC}) = 0.1302 \text{ mg L}^{-1} \end{aligned}$$

El límite de detección y cuantificación experimental fue de 0.05 ppm y el de cuantificación de 0.15 ppm.

#### IV.2.3. Reproducibilidad

La tabla IV.3 presenta los valores de área obtenidos como respuesta de detección a las inyecciones de cada concentración de benzo(a)pireno evaluada.

	concentración en ppm			
	1	0.5	0.1	0.05
cv	2.58 %	2.64 %	2.67 %	5.89 %

Tabla IV.3. Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones.

Se obtuvo buena reproducibilidad a concentraciones de 1, 0.5 y 0.1 ppm con coeficientes de variación por debajo de 3 %. Con la concentración de 0.05 ppm se presentó mayor variabilidad aunque aceptable, dado que es una concentración cercana al límite de detección.

Con estos resultados se optó por trabajar con una concentración de 1 ppm de benzo(a)pireno como solución de referencia en los ensayos de extracción, porque esta concentración presenta mejor reproducibilidad y buena definición de pico en el cromatograma con el sistema cromatográfico empleado. Dos de las condiciones indispensables para realizar el análisis de los extractos de los ensayos en muestras fortificadas, con que se estudiaran los factores que modifican la eficiencia de la extracción por DMFS.

### IV.3. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA PARA LA MEZCLA DE COMPUESTOS BENZO(A)PIRENO, CLORPIRIFOS Y FENITROTIÓN

#### IV.3.1. Variación de $k'$ en función de % metanol

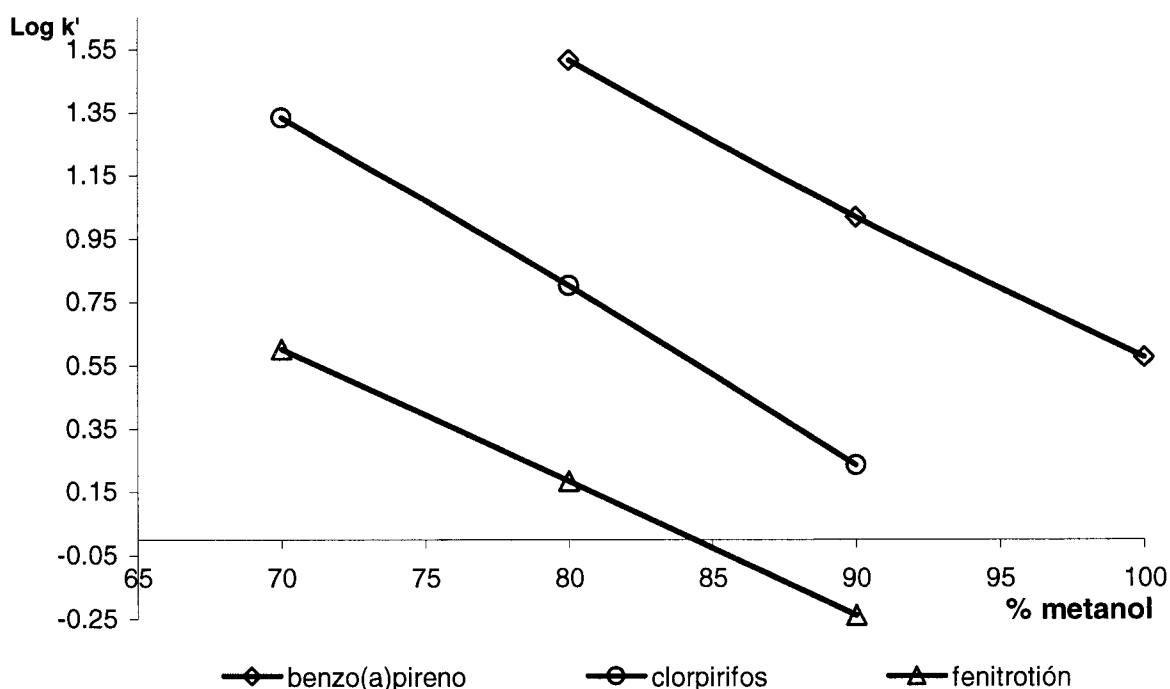
La tabla IV.4 presenta los valores de tiempo de retención ( $t_r$ ), factor de capacidad ( $k'$ ) y  $\log k'$  para benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión con los diferentes porcentajes de metanol en la fase móvil.

% metanol	benzo(a)pireno			clorpirifos			fenitrotión		
	$t_r$ (min)	$k'$	$\log k'$	$t_r$ (min)	$k'$	$\log k'$	$t_r$ (min)	$k'$	$\log k'$
70	> 150	NC	NC	31.65	21.60	1.3345	6.982	3.987	0.6007
80	47.28	32.77	1.5155	10.24	6.317	0.8005	3.538	1.527	0.1838
90	15.90	10.36	1.0156	3.805	1.718	0.2350	2.206	0.576	-0.239
100	6.630	3.735	0.5723	ND	NC	NC	ND	NC	NC

ND = no determinado debido a la superposición de los picos en el cromatograma. NC = no se calculo por no contar con el  $t_r$ .

Tabla IV.4. Variación de factor de capacidad ( $k'$ ),  $\log k'$  y tiempo de retención de benzo(a)pireno, clorpirifos, fenitrotión en función del porcentaje de metanol en al fase móvil, con una velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$  y composición de la fase móvil metanol:agua variable. Tiempo muerto de 1.4 min.

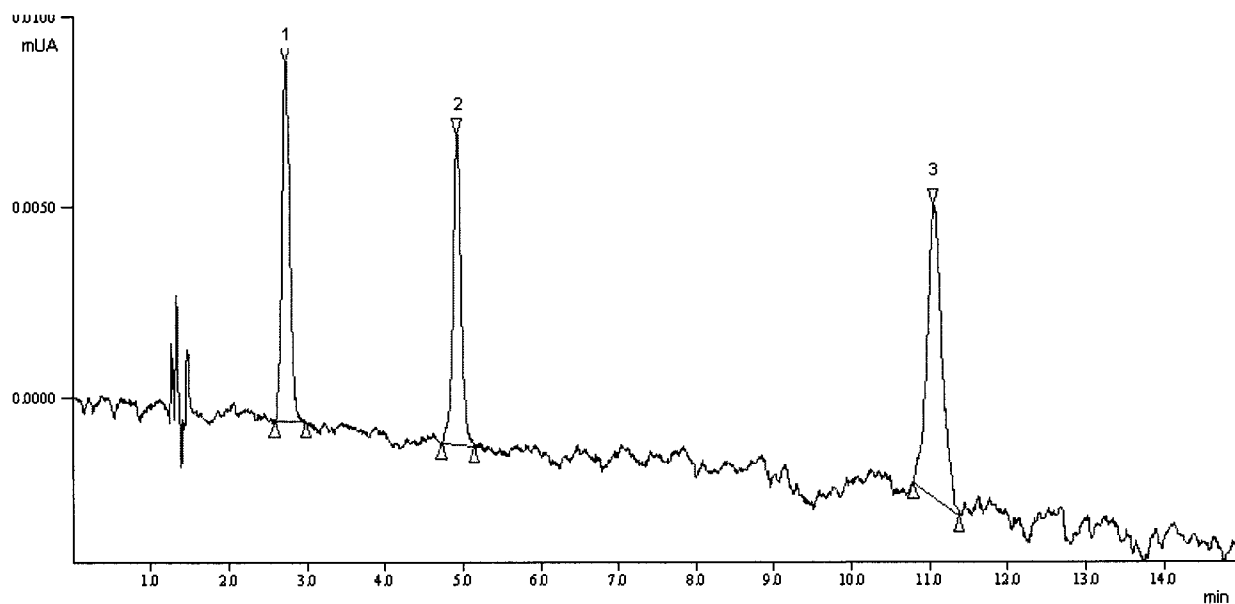
En la figura IV.3 se representa el log  $k'$  de cada compuesto en función del porcentaje de metanol en la fase móvil.



**Figura IV.3.** Variación del log  $k'$  de benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$  detección por UV. Concentración de  $1\text{ mg L}^{-1}$ .

En la figura IV.4 se muestra la buena separación de las curvas de los compuestos evaluados además de que las curvas corren paralelas. Respecto al benzo(a)pireno, no fue posible determinar experimentalmente su  $k'$  con 70% de metanol, pues después de 150 minutos de corrida no se presentó respuesta del detector, por lo que no se consideró realizar una separación analítica de este compuesto con fracciones por debajo del 80% de metanol; en tanto que clorpirifos y fenitrotión presentaron un  $t_r$  medible en 70% de metanol. Por el contrario, para estos dos compuestos que son sensiblemente más polares que el benzo(a)pireno, la elución con metanol a 100% derivó en la superposición de los picos en el cromatograma. De acuerdo a estas curvas se dedujo que una separación por gradiente era la más apropiada para tener un tiempo de análisis corto con una resolución apropiada.

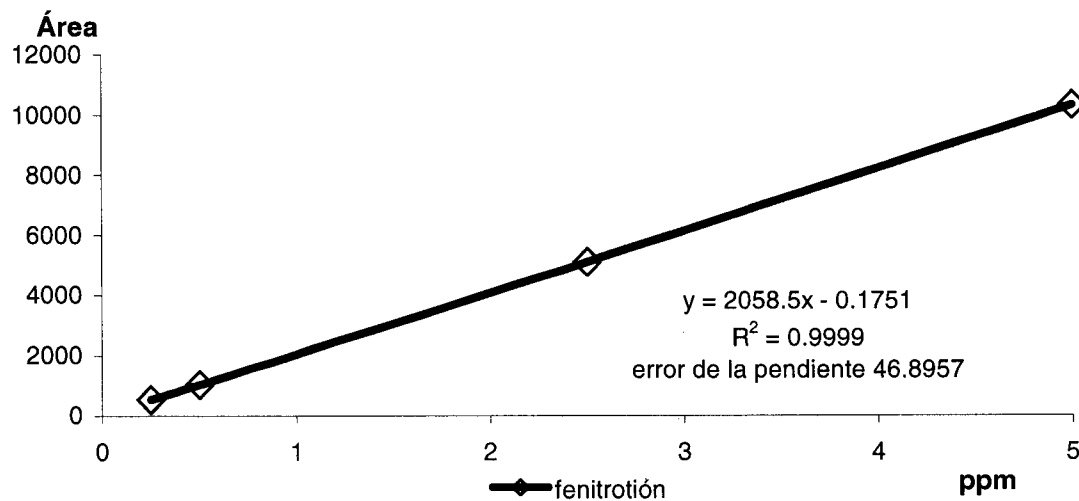
En la figura IV.4 se representa la separación de los compuestos mediante una elución en gradiente.



**Figura IV.4.** Cromatograma de los compuestos en estudio, velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$ , composición de la fase móvil: gradiente metanol:agua 85 a 100% de metanol en 5 minutos y constante 100% metanol de 5 a 15 minutos. Inyección de  $20\mu\text{L}$ , detección por absorción UV. 1) fenitrotión (268 nm), 2) clorpirifos (287 nm), 3) benzo(a)pireno (263 nm).

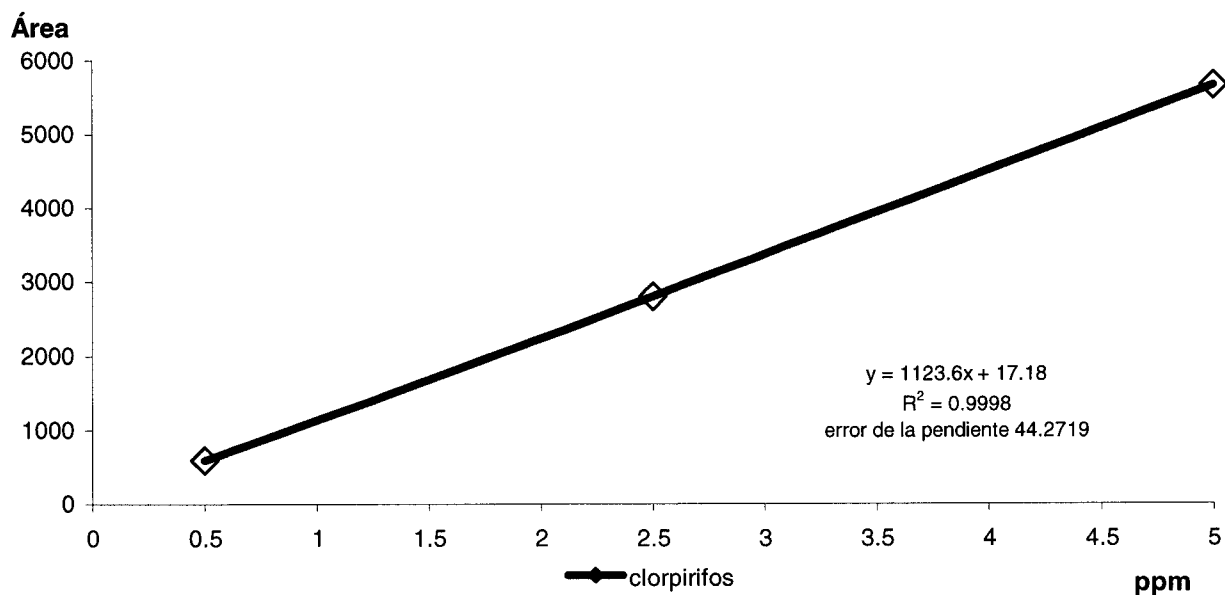
### IV.3.2. Linealidad y límite de detección

La figura IV.5 representa la respuesta del detector en función de la concentración de fenitrotión.



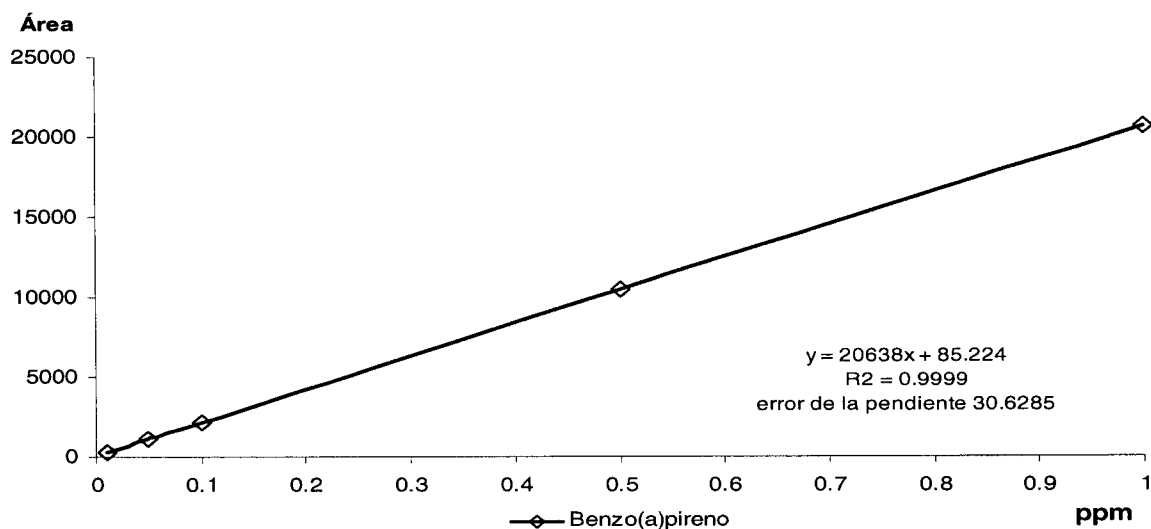
**Figura IV.5.** Respuesta del detector en función de la concentración del fenitrotión. Composición de la fase móvil gradiente de 85 a 100% metanol de 0 a 5 min, velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$  detección por UV a 268 nm.

La figura IV.6 representa la respuesta del detector en función de la concentración de clorpirifos.



**Figura IV.6.** Respuesta del detector en función de la concentración de clorpirifos. Composición de la fase móvil gradiente de 85 a 100% metanol de 0 a 5 min, velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$  detección por UV a 287 nm.

La figura IV.7 representa la respuesta del detector en función de la concentración de benzo(a)pireno.



**Figura IV.7.** Respuesta del detector en función de la concentración de benzo(a)pireno, sistema cromatográfico: composición de la fase móvil: isocrático metanol al 100%, velocidad de flujo de  $1\text{ mL min}^{-1}$ , detección por UV a 263 nm.

El ajuste estadístico realizado con los valores obtenidos en los 3 casos muestran un muy buen coeficiente de correlación en el intervalo de concentraciones evaluadas.

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de la regresión lineal para fenitrotión en este sistema cromatográfico son:

$$\begin{aligned} \text{Límite de detección} & \quad (\text{LD}) = 0.12 \text{ mg L}^{-1} \\ \text{Límite de cuantificación} & \quad (\text{LC}) = 0.28 \text{ mg L}^{-1} \end{aligned}$$

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de la regresión lineal para clorpirifos en este sistema cromatográfico son:

$$\begin{aligned} \text{Límite de detección} & \quad (\text{LD}) = 0.12 \text{ mg L}^{-1} \\ \text{Límite de cuantificación} & \quad (\text{LC}) = 0.18 \text{ mg L}^{-1} \end{aligned}$$

Los límites de detección y cuantificación calculados a partir de la regresión lineal para benzo(a)pireno en este sistema cromatográfico son:

$$\begin{aligned} \text{Límite de detección} & \quad (\text{LD}) = 0.0430 \text{ mg L}^{-1} \\ \text{Límite de cuantificación} & \quad (\text{LC}) = 0.1302 \text{ mg L}^{-1} \end{aligned}$$

### IV.3.3. Reproducibilidad

La tabla IV.5 presenta los valores de área obtenidos como respuesta de detección a las inyecciones de cada concentración de fenitrotión evaluada.

	<b>concentración en ppm</b>			
	<b>5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>
cv	3.32 %	3.06 %	5.62 %	11.24 %

**Tabla IV.5.** Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de fenitrotión.

Se obtuvo buena reproducibilidad en concentraciones de 2.5 y 5 ppm, a concentraciones de 0.5 y 0.25 ppm el coeficiente de variación es mayor dado la proximidad del límite de cuantificación y detección que dificulta la integración del área de los picos.

La tabla IV.6 presenta los valores de área obtenidos como respuesta de detección a las inyecciones de cada concentración de clorpirifos evaluada.

	<b>concentración en ppm</b>			
	<b>5</b>	<b>2.5</b>	<b>0.5</b>	<b>0.25</b>
cv	1.63 %	6.03 %	9.32 %	----

**Tabla IV.6.** Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de clorpirifos.



Se obtuvo muy buena reproducibilidad sólo a una concentración de 5 ppm, a concentraciones de 2.5 y 0.5 ppm el coeficiente de variación es mayor dado que se dificulta la integración del área.

La tabla IV.7 presenta los valores de área obtenidos como respuesta de detección a las inyecciones de cada concentración de benzo(a)pireno evaluada.

	concentración en ppm			
	1	0.5	0.1	0.05
cv	2.58 %	2.64 %	2.67 %	5.89 %

**Tabla IV.7.** Reproducibilidad del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de benzo(a)pireno.

Se obtuvo buena reproducibilidad a concentraciones de 1, 0.5 y 0.1 ppm con coeficientes de variación por debajo de 3 %. Con la concentración de 0.05 ppm se presentó mayor variabilidad, dado que es una concentración cercana al límite de detección.

#### IV.4. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN DEL BENZO(A)PIRENO POR DMFS

##### IV.4.1. Ensayos por EFS con octil silano supelclean

Para establecer las condiciones en las que se realizarían los ensayos por DMFS se estudió primero el comportamiento del benzo(a)pireno por EFS.

La tabla IV.8 presenta los recobros obtenidos con la secuencia de elución aplicada en cada uno de los eluatos y en el efluente de la columna de 400 mg. La solución estándar de benzo(a)pireno aplicada se realizó en metanol puro.

efluente	fracción acetonitrilo:agua			fracción acetonitrilo 100%			total acumulado
	30:70 (2mL)	50:50 (2mL)	70:30 (2mL)	(4mL)	(4mL)	(4mL)	
77.2 %	3.6 %	4.5 %	19.3 %	1.30 %	0.0 %	0.0 %	106 %

**Tabla IV.8.** Elución de benzo(a)pireno con EFS, en octil silano supelclean aplicando 1mL de benzo(a)pireno en metanol 100 %.

En esta tabla se observa que en la EFS sobre octil silano, el compuesto fugó en un 77 % con el efluente, lo cual puede deberse a que el compuesto estaba disuelto en metanol que es uno de los disolventes capaces de eluir al compuesto, Así, el disolvente de la disolución estándar aplicada disminuyó la retención del compuesto, arrastrándolo a la fuga. Por lo tanto, para corroborar esto se prepararon disoluciones estándar en diferentes mezclas de metanol-agua, para tener la certeza de que

el compuesto no se fugara por efecto de acarreo del disolvente. Previamente se observó si en estas disoluciones estándar, el benzo(a)pireno permanecía soluble, para aplicar solamente aquellas en las que el compuesto se solubilizara completamente.

La tabla IV.9 muestra la turbiedad observada del benzo(a)pireno en diferentes disoluciones de metanol:agua.

<b>Fracciones (metanol:agua)</b>				
<b>80:20</b>	<b>85:15</b>	<b>90:10</b>	<b>95:5</b>	<b>100 %</b>
+++	+++	++	0	0

+++ alta turbiedad, ++ moderada turbiedad, + baja turbiedad, 0 traslúcido.

**Tabla IV.9.** Apariencia de diluciones de benzo(a)pireno en diferentes fracciones de metanol:agua.

Se observa que las diluciones metanol:agua 80:20, 85:15 y 90:10 probadas presentaron turbiedad que fue indicativo de insolubilidad del compuesto a causa del contenido de agua, por lo que solamente la dilución de metanol:agua 95:5 y la disolución en metanol 100 % no presentó turbiedad aparente. Por lo tanto se decidió probar la dilución acetonitrilo:agua 95:5 para aplicar el estándar de benzo(a)pireno en la fase octil silano supelclean.

La tabla IV.10 presenta los resultados obtenidos al aplicar el benzo(a)pireno en una disolución metanol:agua 95:5 al cartucho de EFS, también presenta los porcentajes de recobro obtenidos con las diferentes eluentes.

efluente	fracción acetonitrilo:agua			fracción acetonitrilo 100%			total acumulado
	30:70 (2mL)	50:50 (2mL)	70:30 (2mL)	(4mL)	(4mL)	(4mL)	
3.14 %	0.0	1.53 %	9.62 %	65.5 %	3.11 %	3.68 %	86.08 %

**Tabla IV.10.** Elución de benzo(a)pireno con EFS, en octil silano supelclean aplicando 1mL de benzo(a)pireno en metanol:agua 95:5.

De estos resultados se observa que, en efecto, al hacer la dilución de la solución estándar en una fracción de metanol:agua se contribuyó a que no fugara el compuesto en el efluente porque se presentó sólo el 3.14 % de fuga. Con esto, el octil silano mostró retener al compuesto, aunque en la fracción de 2 mL acetonitrilo:agua 50:50 comenzó a fluirse un poco; también en la de acetonitrilo:agua 70:30. Sin embargo, se observa que la mayor cantidad se recuperó en la primera fracción de 4 mL de acetonitrilo al 100 %.

#### IV.4.2. Ensayos por EFS con octadecil silano supelclean

La tabla IV.11 presenta los recobros obtenidos al adicionar el benzo(a)pireno en una disolución metanol:agua 95:5 al cartucho de EFS octadecil silano supelclean. También se presentan los porcentajes de recobro obtenidos con los diferentes eluentes.

efluente	fracción acetonitrilo:agua			fracción acetonitrilo 100 %			total acumulado
	30:70 (2mL)	50:50 (2mL)	70:30 (2mL)	(4mL)	(4mL)	(4mL)	
0.0 %	0.0	0.0 %	13.4 %	77.6 %	3.30 %	0.0 %	94.3 %

**Tabla IV.11.** Elución de benzo(a)pireno con EFS, en octadecil silano supelclean aplicando 1mL de benzo(a)pireno en metanol:agua 95:5.

Se observa que con octadecil silano supelclean, a diferencia de la octil silano no se presentó fuga en el efluente y la elución del compuesto inició con la fracción de acetonitrilo:agua 70:30. De igual manera, la mayor cantidad de compuesto fue recuperada en la primera fracción de acetonitrilo 100 %.

Comparando el comportamiento de benzo(a)pireno en ambas fases es notable que la fase octadecil silano supelclean presentó mejor retención, ya que fue más lenta su elución inicial (con un porcentaje mayor de acetonitrilo), también presentó un mejor porcentaje de recobro acumulado después de aplicar el tren de elución completo.

#### IV.5. ENSAYOS POR DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA (DMFS)

##### IV.5.1. DMFS con solución estándar fase octil silano supelclean

El primer ensayo realizado por DMFS se basó en los resultados de la EFS presentados en la tabla IV.10. Así, se aplicó la misma secuencia de elución eliminando el lavado con acetonitrilo:agua 70:30 dado que se consideró que comenzaría a eluir el benzo(a)pireno. También se agregó un primer lavado de la columna de dispersión con agua.

Los resultados de la elución de benzo(a)pireno en la fase octil silano se presentan en la tabla IV.12.

	fracción acetonitrilo:agua		fracción acetonitrilo 100%			total acumulado
	agua 4 (mL)	30:70 (2 mL)	50:50 (2 mL)	(4 mL)	(4 mL)	
0.0 %	76.7 %	11.9 %	6.10 %	0.0 %	0.0 %	95.0 %

**Tabla IV.12.** Elución de benzo(a)pireno con DMFS, en octil silano supelclean aplicando 500 µL solución estándar 10 ppm.

Se observa que a diferencia de como ocurrió en EFS, el compuesto fugó en un 76.7 % con las fracciones de elución de acetonitrilo:agua 30:70, lo que aparentó deberse a una baja en la fuerza de retención del compuesto en esta fase. Para corroborar, si el efecto se debía a que la disolución estándar para la fortificación fue preparada en metanol 100 % y esto ocasionaba la fuga, de igual forma que en EFS, se probó la aplicación de la disolución estándar para la fortificación en una mezcla metanol:agua 95:5. También se suprimió la elución con acetonitrilo:agua 30:70, pues en esta fracción eluye la mayor parte del compuesto, el objetivo de ésta fracción es eluir compuestos interferentes; y se incluyó la elución acetonitrilo:agua 70:30 como en la EFS.

En la tabla IV.13 se muestran los resultados obtenidos después de haber hecho las modificaciones mencionadas.

	fracción acetonitrilo:agua		fracción acetonitrilo 100 %			total acumulado
	agua (4mL)	50:50 (2mL)	70:30 (2mL)	(4mL)	(4mL)	
0.0 %	0.0 %	34.4 %	36.36 %	2.50 %	1.90 %	74.35 %

**Tabla IV.13.** Elución de benzo(a)pireno con DMFS, en octil silano supelclean aplicando 500 µL de una disolución de la solución estándar en metanol:agua 95:5.

Se observó que de esta manera se repitió el comportamiento presentado en EFS. En efecto al hacer la dilución de la solución estándar en una fracción de metanol:agua se contribuyó a que no fugara el compuesto en la fracción acetonitrilo:agua 50:50, pero aún con estas sensibles mejoras, la fracción de acetonitrilo:agua 70:30 mostró eluir un mayor porcentaje del compuesto que en EFS: un 34.4 % lo que representa el 50 % del recobro total. La otra mitad recuperada con respecto al recobro global se obtuvo prácticamente en la primera fracción con acetonitrilo 100 %.

#### IV.5.2. DMFS con solución estándar fase octadecil silano supelclean

En la tabla IV.14 se presentan los recobros obtenidos de la elución de benzo(a)pireno disperso en la fase octadecil silano. Con este adsorbente se eliminó la fracción de acetonitrilo:agua 30:70 de la secuencia de elución y se aplicó la disolución estándar preparada en una mezcla de metanol:agua 95:5.

	fracción acetonitrilo:agua		fracción acetonitrilo 100%			total acumulado
	agua (4mL)	50:50 (2mL)	70:30 (2mL)	(4mL)	(4mL)	
0.0 %	0.0 %	6.93 %	85.4 %	3.35 %	0.0 %	95.7 %

**Tabla IV.14.** Elución de benzo(a)pireno con DMFS, en octadecil silano supelclean fortificado con 500 µL de disolución estándar en metanol:agua 95:5.

Los resultados muestran que se obtuvo mejor recobro global que con octil silano; la elución en la fracción de lavado acetonitrilo:agua 50:50, que correspondería a elución de interferentes con la muestra, parece ser superado. En este caso, se inicia la elución de 6.93 % del compuesto con la fracción acetonitrilo:agua 70:30 y la mayor cantidad de compuesto se obtiene en la primera fracción de 4 mL con acetonitrilo al 100 %. Por lo tanto, estos resultados se consideraron para la aplicación de las muestras de pescado que a continuación se describen.

#### IV.5.3. DMFS con muestras de pescado (hígado)

##### IV.5.3.1. Estudio de retención y elusión de benzo(a)pireno

Una vez establecido el comportamiento que presenta el benzo(a)pireno aplicado en disolución estándar en el octadecil silano supelclean, fue importante saber cuales eran las variaciones que se presentarían cuando la matriz fuera integrada. Dependiendo de la matriz empleada se hace evidente que una gran cantidad de estructuras y/o compuestos interaccionarán con la fase; estos interferentes de naturaleza química diversa pudieran interferir co-eluyendo con el benzo(a)pireno. Por lo tanto, se probaron diferentes secuencias de elución para eliminar la mayor parte de estos interferentes previamente a la recuperación del benzo(a)pireno y se hicieron observaciones en cuanto a coloración y turbidez.

Así se probó la siguiente secuencia de limpieza de interferentes para su observación:

orden de aplicación	volumen (mL)	disolvente o mezcla de disolventes
A	10, 7, 5 y 3	agua grado cromatográfico
B	7, 5, 4 y 3	30:70 acetonitrilo:agua
C	7, 5, 4 y 3	50:50 acetonitrilo:agua
D	7, 5, 4 y 3	70:30 acetonitrilo:agua

#### IV.5.3.2. Observaciones en los eluatos obtenidos de la secuencia de limpieza de interferentes

A) disolvente: agua grado cromatográfico.

La tabla IV.15 resume las apariencias de los eluatos obtenidos al aplicar el volumen de disolvente indicado.

A)	volumen (mL)			
	10	7	5	3
apariciencia que presenta el eluato	ligera coloración, turbidez.	coloración rojiza, turbidez.	coloración rojiza, turbidez.	mayor coloración, turbidez.

**Tabla IV.15.** Apariciencia de elución de la dispersión de hígado en octadecil silano supelclean a diferentes volúmenes de agua grado cromatográfico.

La apariencia de los eluatos en las diferentes fracciones, presentó a simple vista los interferentes (restos de macromoléculas) que provenían de la muestra de hígado. Siendo tan baja la solubilidad del compuesto en agua, se tiene la certeza que, con el volumen de agua empleada en cada caso, no se podría tener desorción del benzo(a)pireno con este disolvente. Por lo tanto, se consideró una buena opción el realizar un primer lavado con 5 mL de agua para eliminar gran parte de interferentes polares provenientes de la muestra.

La tabla IV.16 resume las apariencias de los eluatos obtenidos al aplicar el volumen de disolvente indicado.

apariencia que presenta el eluato	volumen de elución (mL)			
	7	5	4	2
B)	+ turbidez sin coloración	+ turbidez sin coloración	++ turbidez sin coloración	+++ turbidez y poca coloración
C)	+ turbidez sin coloración	++ turbidez sin coloración	++ turbidez sin coloración	++ turbidez y poca coloración
D)	sin turbidez sin coloración	+ turbidez sin coloración	+ turbidez sin coloración	++ turbidez sin coloración

+++ muy turbio, ++ turbio, + poco turbio.

**Tabla IV.16.** Apariencia de elución de la dispersión de hígado en octadecil silano supelclean a diferentes volúmenes de B) acetonitrilo:agua 30:70 C) acetonitrilo:agua 50:50 D) acetonitrilo:agua 70:30.

De la observación de la apariencia de los eluatos obtenidos en las tres diferentes fracciones de mezcla de disolventes evaluadas B), C) y D) coincide que en el menor volumen de elución empleado se presenta la mayor turbidez lo que implica alta elución de interferentes. Por el otro extremo, el volumen mayor empleado aparenta contener menor cantidad de interferentes, si se considera la disminución gradual de la turbidez. Así, se planteó la secuencia de elución de interferentes, empleando un volumen de 4 mL por fracción de disolvente. Lo que aún estaba sujeto a modificación pues se debía garantizar que el benzo(a)pireno no eluyera en alguna de estas fracciones.

En los ensayos de DMFS con solución estándar se demostró que un pequeño porcentaje del compuesto se eluía en la fracción con acetonitrilo:agua 70:30; por lo que entre las modificaciones que se consideraron, fue limpiar el extracto obtenido de la elución con la fracción de acetonitrilo:agua 70:30.

Así, se probó la siguiente secuencia de elución considerando un lavado con agua y lavados con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua.

- 5 mL de agua grado cromatográfico
- 4 mL de acetonitrilo:agua 30:70
- 4 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- 4 mL de acetonitrilo:agua 70:30
- 2 fracciones de 5 mL de acetonitrilo 100%

La tabla IV.17 presenta los recobros obtenidos al analizar las fracciones que no presentaron turbidez.

	fracción de elución						% de recobro total
	5 mL agua	4 mL acetonitrilo:agua 30:70	4 mL acetonitrilo:agua 50:50	4 mL acetonitrilo:agua 70:30	5 mL acetonitrilo 100 %	5 mL acetonitrilo 100 %	
% de recobro	NI	NI	9.85 %	53.7 %	33.95 %	0.0	<b>97.5 %</b>

NI = no inyectado

**Tabla IV.17.** Secuencia de elución de benzo(a)pireno, fortificado en hígado disperso en octadecil silano supelclean.

En la tabla se observa que desafortunadamente el benzo(a)pireno comenzó a eluir a partir de la fracción de acetonitrilo:agua 50:50 en un 9.85 % de la cantidad fortificada, seguido de la elución de 53.7 % en la fracción acetonitrilo:agua 70:30, para terminar de desorberse en la primera fracción de acetonitrilo al 100 %. Con lo que se comprueba que la elución del benzo(a)pireno se da en gran porcentaje cuando se aplica la mezcla de disolventes acetonitrilo:agua 70:30, que ésta destinada a la remoción de interferente. Se decidió filtrar a través de una membrana de nylon con poro de 0.45 µm el extracto de la fracción acetonitrilo:agua 50:50 debido a que se presentó la pérdida de aproximadamente el 12 % del compuesto. El recobro global considerando estos tres eluatos representa un 97.5 % del compuesto, por lo que al parecer el volumen que se está probando fue demasiado grande con las mezclas de disolventes en polaridad decreciente. Por lo que se decidió reducir a la mitad estos volúmenes para comparar el efecto.

La secuencia modificada de elución de interferentes es la siguiente:

- 5 mL de agua grado cromatográfico
- 2 mL de acetonitrilo:agua 30:70
- 2 mL de acetonitrilo:agua 50:50
- 2 mL de acetonitrilo:agua 70:30
- 2 fracciones de 5 mL de acetonitrilo 100%

La tabla IV.18 presenta los recobros obtenidos después de aplicar la modificación en el volumen aplicado.

	fracción de elución						% de recobro total
	5 mL agua	2 mL acetonitrilo:agua 30:70	2 mL acetonitrilo:agua 50:50	2 mL acetonitrilo:agua 70:30	5 mL acetonitrilo 100 %	5 mL acetonitrilo 100 %	
% de recobro	NI	NI	0.0	7.3 %	87.5 %	3.1 %	<b>97.9 %</b>

NI = no inyectado

**Tabla IV.18.** Secuencia de elución de benzo(a)pireno, fortificado en hígado disperso en octadecil silano supelclean.



Se comprueba que la reducción en el volumen de elución consiguió que el benzo(a)pireno no se desorbiera en las primeras fracciones de la secuencia de elución de interferentes (acetoni-trilo:agua 30:70 y 50:50); no obstante, el 7.3 % si logró ser eluido con la fracción de acetoni-trilo:agua 70:30. Por ello, se optó por eliminar dicha mezcla de elución aun cuando podría considerarse como mínima la cantidad eluida de compuesto.

Finalmente así, la secuencia de elución de interferentes quedó de la siguiente manera:

- 5 mL de agua grado cromatográfico
- 2 mL de acetoni-trilo:agua 30:70
- 2 mL de acetoni-trilo:agua 50:50
- 2 fracciones de 5 mL de acetoni-trilo 100%

Los resultados obtenidos después de la modificación a la secuencia de elución se presentan en la tabla IV.19.

	fracción de elución					% de recobro total
	5 mL agua	2 mL acetoni-trilo:agua 30:70	2 mL acetoni-trilo:agua 50:50	5 mL acetoni-trilo 100 %	5 mL acetoni-trilo 100 %	
<b>% de recobro</b>	NI	NI	0.0	84.2 %	13.8 %	<b>98.0 %</b>

NI = no inyectado

**Tabla IV.19.** Secuencia de elución de benzo(a)pireno, fortificado en hígado disperso en octadecil silano supelclean.

Las modificaciones hechas a la secuencia de elución de interferentes dieron buenos resultados tanto en apariencia de las fracciones de acetoni-trilo al 100 % como en el recobro cuantitativo de benzo(a)pireno. Así, se estableció esta secuencia de elución de interferentes, garantizando que el benzo(a)pireno fue retenido por la fase y desorbido por el acetoni-trilo al 100 %. También, al eluir con las fracciones de mezcla de disolventes se favoreció la eliminación de compuestos interferentes que en orden de polaridad eran menos retenidos por el adsorbente. En este mismo contexto se buscó reducir la proporción de interferentes menos polares y apolares que co-eluyeron con el compuesto y que potencialmente interferirían en el sistema cromatográfico de análisis porque al recuperar el benzo(a)pireno con acetoni-trilo al 100 % conducía a la elución simultánea de lípidos los cuales se acumulaban gradualmente en la precolumna a medida que se efectuaban las inyecciones de los extractos. La eliminación de estos interferentes apolares resultó ser más difícil de efectuar dado que el benzo(a)pireno también presenta carácter lipofílico. Así, se realizaron estudios de la elución del benzo(a)pireno con mezclas de acetoni-trilo con 10 % y 20 % de agua para intentar retirar la mayor parte de lípidos en el cartucho de extracción y eluir cuantitativamente al benzo(a)pireno.

#### IV.6. ELIMINACIÓN DE LÍPIDOS INTERFERENTES EN LA SECUENCIA DE ELUCIÓN

En esta sección se pretendía aplicar diferentes mezclas hidroorgánicas (acetonitrilo:agua 90:10 y 80:20) para tratar de disminuir los interferentes lipídicos retenidos en la columna. Sin embargo, como se muestra en la tabla IV.20 con las recuperaciones obtenidas después de aplicar los volúmenes indicados para diferentes mezcla de disolventes, los recobros acumulados disminuyen notablemente a mayor % de agua en la mezcla eluente.

eluente	volumen de elución (mL)			% acumulado
	5	5	5	15 mL
acetonitrilo 100%	88.5	6.41	0.0	94.91
acetonitrilo:agua 90:10	68.15	3.16	0.0	71.31
acetonitrilo:agua 80:20	60.80	1.36	0.0	62.16

**Tabla IV.20.** Elución de benzo(a)pireno disperso en octadecil silano supelclean en fracciones de acetonitrilo 100%, acetonitrilo:agua 90:10, acetonitrilo:agua 80:20.

Los porcentajes acumulados muestran que la elución de benzo(a)pireno con dos fracciones de 5 mL de acetonitrilo 100 % se presenta como la mejor opción para desorber la mayor cantidad del compuesto, en tanto que en las fracciones de acetonitrilo:agua 90:10 y 80:20 sólo lograron desorber el 71 % y el 61 % de compuesto respectivamente.

Así, se estableció que, para desorber con la mejor cuantitatividad el benzo(a)pireno del octadecil silano supelclean, 10 mL de acetonitrilo al 100 % era la mejor fase eluente. No obstante, utilizar acetonitrilo al 100 %, implicaba también que algunos de los compuestos interferentes apolares propios de la matriz dispersa co-eluyeran con éste como se mencionó anteriormente. Los interferentes, que no eran a simple vista observables, se hacían evidentes al bloquear la pre-columna analítica después de 2 o 3 inyecciones (aumento de la presión). Por esta razón, se planeó realizar la limpieza de los extractos de acetonitrilo 100 % utilizando adsorbentes como la sílice virgen y el florisil.

#### IV.7. LIMPIEZA DE EXTRACTOS EN ADSORBENTES

Las tablas IV.21 y IV.22 se presentan los recobros obtenidos antes y después de la limpieza con los dos adsorbentes empleados.

% recobro sin limpieza	% recobro con limpieza gel de sílice	Disminución del % de recobro
100.9	92.80	8.10
101.0	91.90	9.10
101.3	91.45	9.85
<b>cv = 0.20 %</b>	<b>cv = 0.75 %</b>	

Tabla IV.21. Recobro de benzo(a)pireno después de la limpieza con gel de sílice.

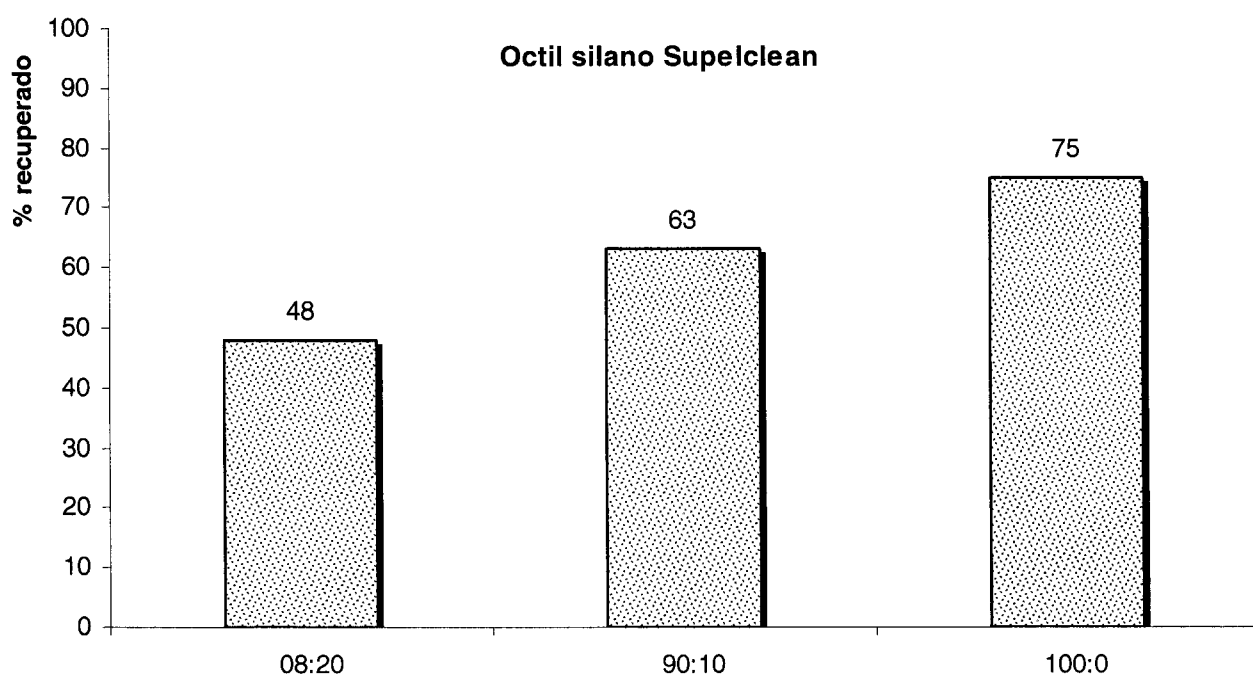
% recobro sin limpieza	% recobro con limpieza gel de sílice	Disminución del % de recobro
100.0	99.15	0.85
101.0	99.10	1.90
99.50	98.25	1.25
<b>cv = 0.76 %</b>	<b>cv = 0.51 %</b>	

Tabla IV.22. Recobro de benzo(a)pireno después de la limpieza con florisil.

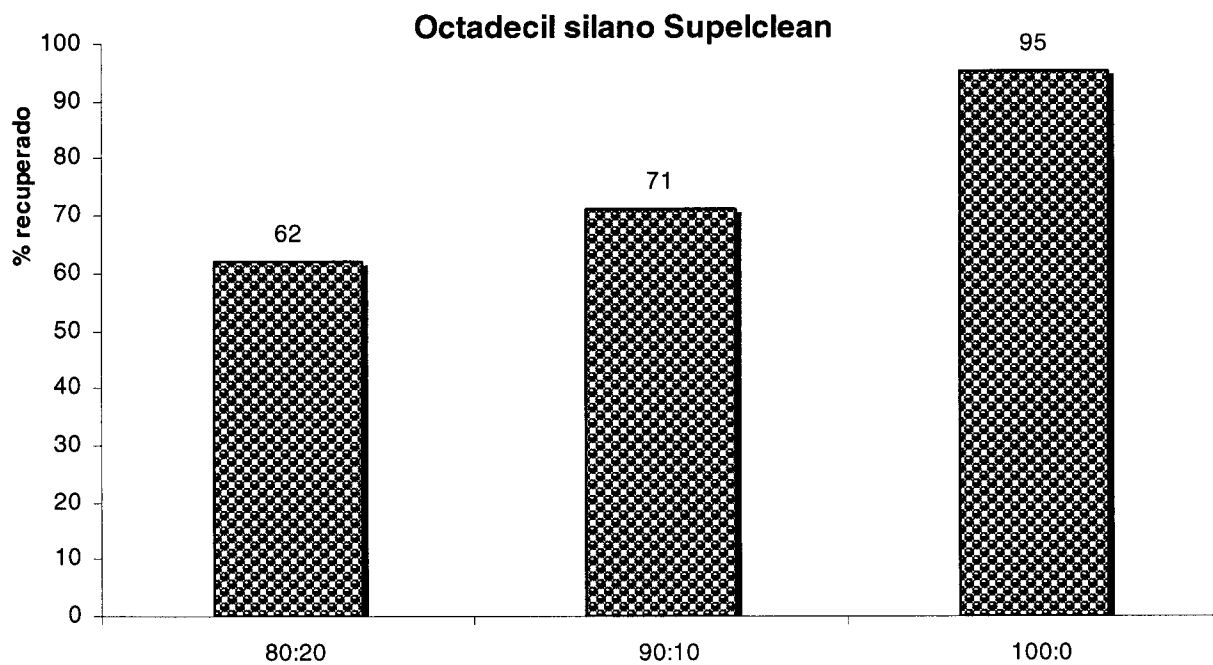
Se observó que la limpieza de los extractos con el adsorbente florisil presentó globalmente menor pérdida de benzo(a)pireno, aunque con baja reproducibilidad. En contraparte, la limpieza con gel de sílice mostró mayor pérdida de compuesto, pero con reproducibilidad aceptable. La realización de una limpieza del extracto con adsorbentes redujo considerablemente la presencia de lípidos, esto se hizo evidente ya que disminuyeron los problemas con la precolumna de guarda que pudo utilizarse hasta con 20 inyecciones, antes de necesitar un cambio de la misma, y aparte realizar un proceso de limpieza a los extractos con esta metodología fue conveniente principalmente cuando se trataba con volúmenes de eluatos iguales o mayores a 5 mL. En los ensayos siguientes se obtuvieron los frentes de elución y por esta razón, la metodología varió en el fraccionamiento de extractos a 1 mL, con el fin de obtener más puntos con que construir las curvas. Con esta reducción del volumen de los eluatos no se presentaron dificultades con los lípidos, ya que no se acumulaban en la precolumna, para fines prácticos de rapidez y simplicidad, en estos estudios no se continuó realizando la limpieza de extractos a través de adsorbentes.

#### IV.8. ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO CON MEZCLAS DE ACETONITRILLO:AGUA EN DIFERENTES FASES ESTACIONARIAS

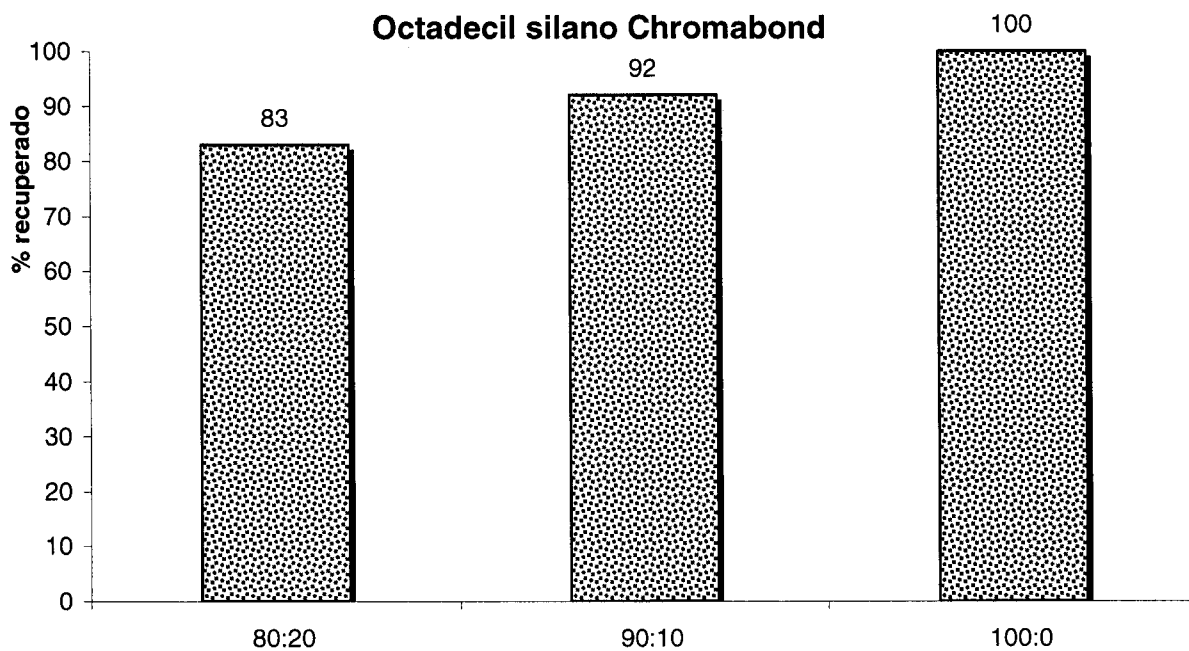
En las figuras IV.8, IV.9, IV.10 y IV.11 se presentan los gráficos de los recobros globales de benzo(a)pireno, eluido con acetonitrilo:agua 80:20, 90:10 y acetonitrilo 100 % en cada adsorbente en la última fracción de la secuencia de elución seleccionada.



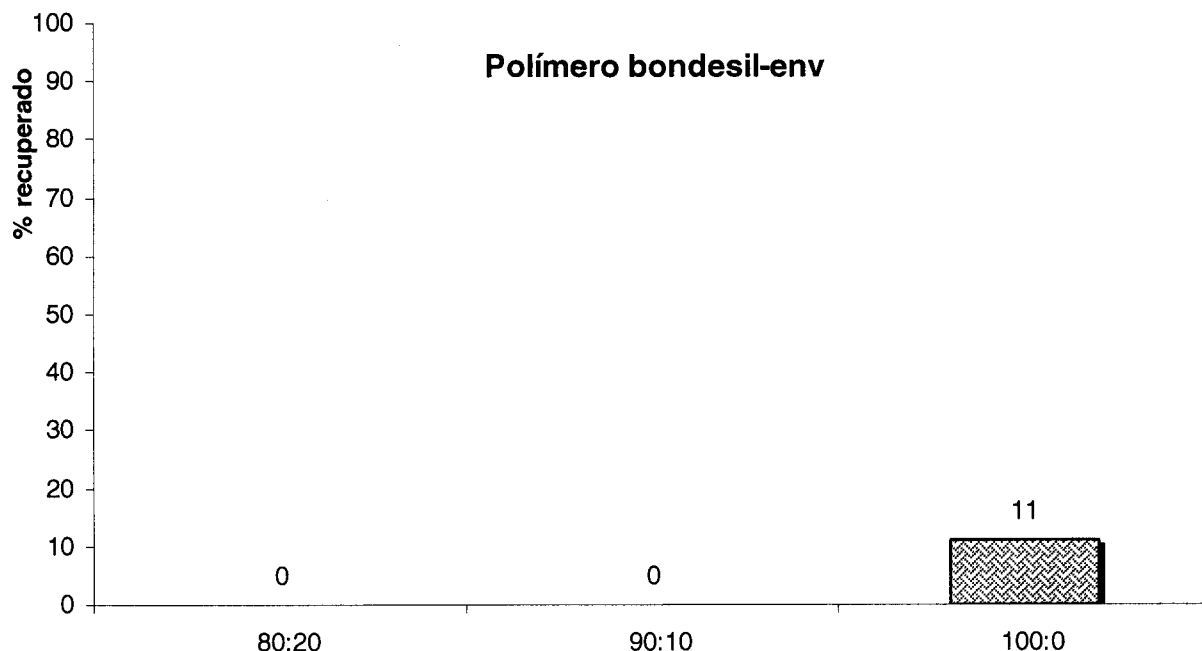
**Figura IV.8.** Recuperación global de benzo(a)pireno en octil silano supelclean, eluido con diferentes eluentes de acetonitrilo:agua.



**Figura IV.9.** Recuperación global de benzo(a)pireno en octadecil silano supelclean, eluido con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua.



**Figura IV.10.** Recuperación global de benzo(a)pireno en octadecil silano chromabond, eluido con diferentes mezclas de acetonitrilo:agua.



**Figura IV.11.** Recuperación global de benzo(a)pireno en polímero bondesil-env, eluido con diferentes mezclas de acetoneitrilo:agua.

Los mejores recobros en cada fracción de eluyente se lograron con el octadecil silano chromabond, seguido del octadecil silano supelclean, estos dos adsorbentes comparten estructura  $[\text{SiO}_2]-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ . El adsorbente chromabond resultó ser la mejor opción para la recuperación cuantitativa de benzo(a)pireno; considerando que en la elución con acetoneitrilo:agua 80:20 se obtuvo mejor recobro que incluso con la elución de acetoneitrilo:agua 90:10 en el adsorbente octadecil silano supelclean. Por su parte, se hacen más notables los recobros más bajos obtenidos con octil silano supelclean. Esto puede deberse a baja retención del benzo(a)pireno, pues es muy posible que parte importante del compuesto fuese eluido con las fracciones de limpieza de interferentes; tal parece que la cadena C8 de este adsorbente no interactúa lo suficiente con el compuesto para ser retenido completamente, como ocurre en la EFS, por lo que con este resultado se evidencia que el papel de la matriz presente en la columna es muy importante, característica en la DMFS. Dado que hasta este momento se han comparado los resultados de los ensayos en donde la sílice es compartida como soporte sólido por los tres adsorbentes, las diferencias encontradas entre las mismas deben ser exclusivas de la longitud en la fase enlazante octil y octadecil y probablemente en la tasa de recubrimiento entre las octadecil supelclean y chromabond (aunque no se cuenta con este dato).

El caso del polímero bondesil-env fue distinto, al tratarse de una estructura polimérica basada en poliestireno divinilbenceno; era de esperarse que las interacciones entre los enlaces  $\pi$ - $\pi$  de los anillos del soporte y el compuesto fueran de mayor fuerza. Por tanto, la fuerza de desorción del disolvente no fue suficiente para desorberlo. Así pues, se encontró que la elución de benzo(a)pireno con la mezcla de disolventes en acetonitrilo:agua 80:20 y 90:10 presentó desorción nula, sólo en el caso de la elución con acetonitrilo al 100 % se logró recuperar apenas el 11.5 % del compuesto. Lo anterior hizo implementar un proceso que ayudará a disminuir las interacciones analito-adsorbente que se presentarán más adelante en la sección de adición de surfactantes.

En la figura IV.12 se presenta el gráfico de porcentaje de recobro acumulado de benzo(a)pireno en función del volumen de eluyente en los diferentes adsorbentes estudiados.

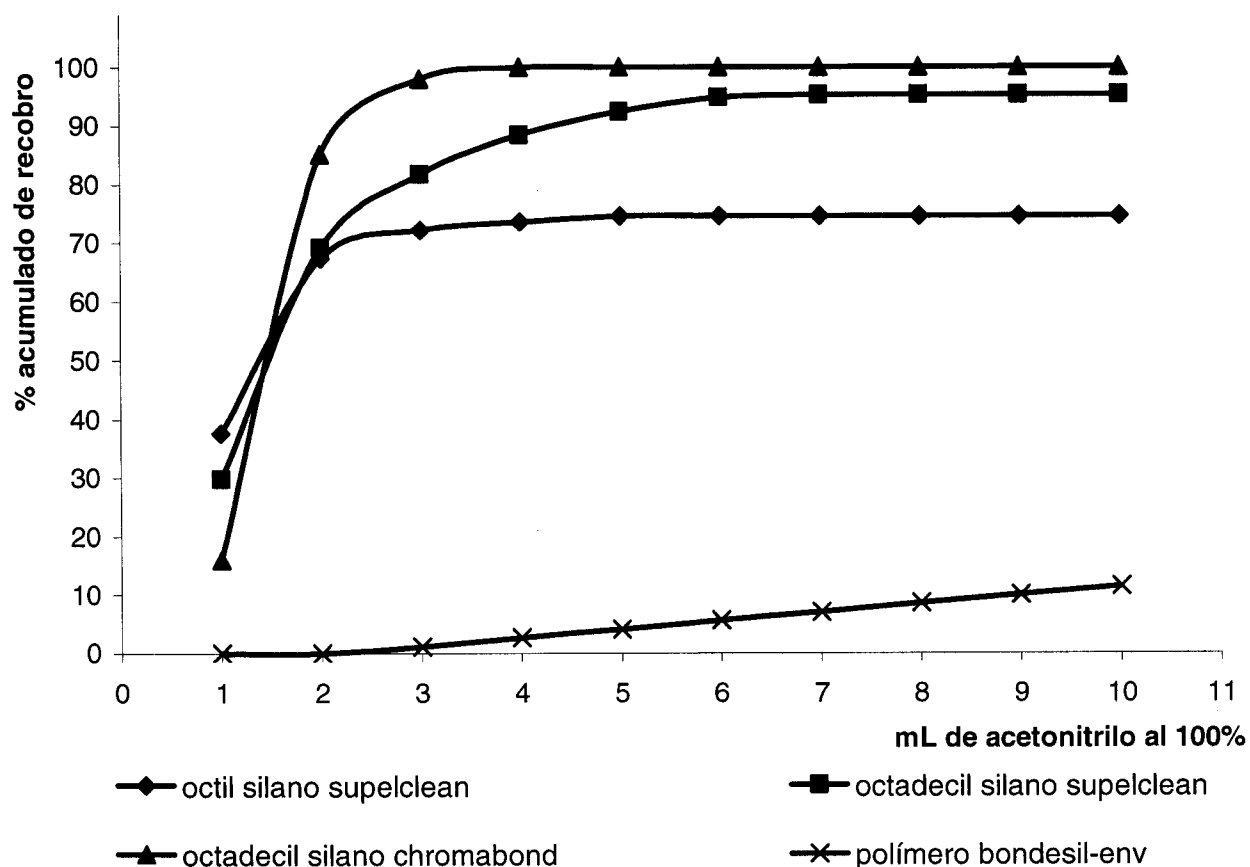


Figura IV.12. Frente de elución de benzo(a)pireno fortificado en hígado, disperso en diferentes adsorbentes, eluido con acetonitrilo al 100%.

De las curvas anteriores se determinaron los valores de los volúmenes de elución total del benzo(a)pireno, los cuales se presentan en la tabla IV.23.

fase estacionaria	V <sub>m</sub> (mL)
octil silano supelclean	5
octadecil silano supelclean	7
octadecil silano chromabond	4
polímero bondesil-env	10

V<sub>m</sub> = volumen máximo o de desorción completa.

**Tabla IV.23.** Volúmenes de elución total de benzo(a)pireno obtenidos de la elución con acetonitrilo 100 % por DMFS en diferentes adsorbente.

Se observa claramente que con el adsorbente octadecil silano chromabond; se alcanzó a estabilizar la curva con un menor volumen de disolvente de elución (4 mL), por lo que hace a este adsorbente la mejor opción para aplicar la técnica, considerando además que proporciona los más altos recobros, como ya se discutió. Como segunda opción, se encuentra el octadecil silano supelclean, que si bien alcanza un valor máximo de recobro de 95 % (relativamente alto), este se obtiene hasta los 7 mL de disolvente de elución. De todas maneras, este adsorbente también puede ser considerado apropiado para desarrollar un método de extracción de trazas de benzo(a)pireno.

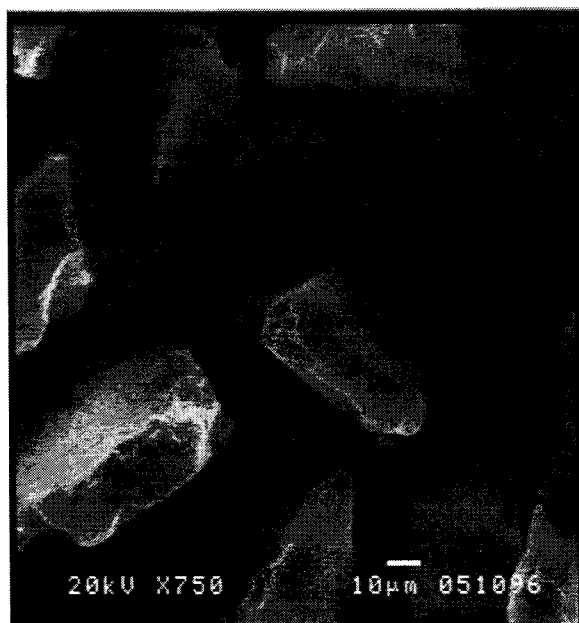
De los resultados anteriores se consideró que el comportamiento mostrado por el octil silano supelclean fué el óptimo para tomarlo como base para el desarrollo del protocolo de extracción del benzo(a)pireno. En el caso de los otros adsorbentes (octil silano supelclean y polímero bondesil-env) no se pueden considerar apropiados, particularmente el polímero bondesil-env, para el que mas adelante se propone utilizar agentes químicos que ayuden a disminuir las interacciones adsorbente-analito.



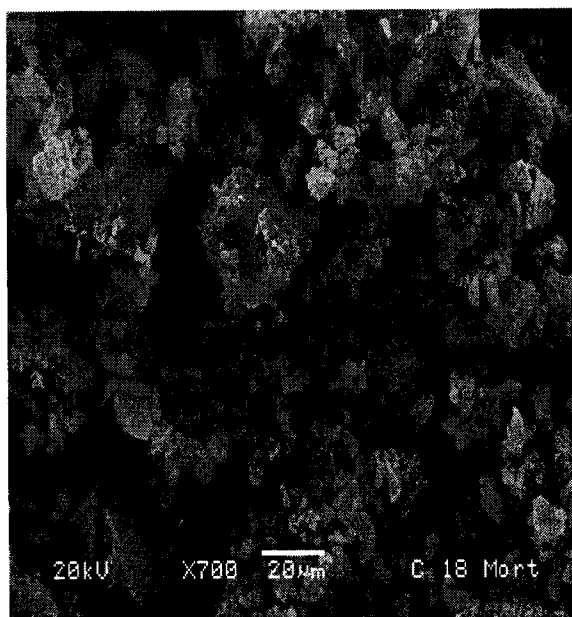
## IV.9. OBSERVACIÓN POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE HÍGADO Y MÚSCULO EN LA FASE

### IV.9.1. Fase octadecil silano supeclean sin muestra

Las fotografías por microscopia electrónica de barrido de la fase octadecil silano supeclean acondicionada con metanol, y molida se pueden apreciar en las figuras IV.13 y IV.14.



**Figura IV.13.** Fotografía del octadecil silano sin moler obtenida por microscopia electrónica de barrido al vacío, 750 aumentos.

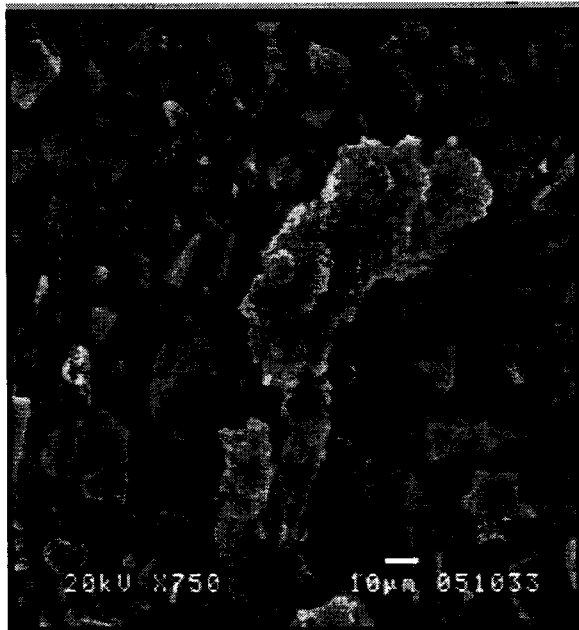


**Figura IV.14.** Fotografía del octadecil silano molida en mortero obtenida por microscopia electrónica de barrido al vacío, 700 aumentos.

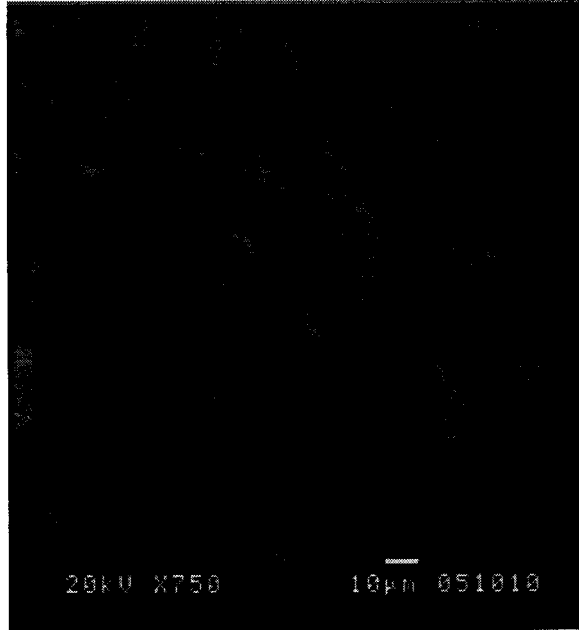
En la figura IV.13 se observa que las partículas de fase son irregulares en forma y tamaño (alrededor de 40-100  $\mu\text{m}$ ), característica común en un adsorbente destinado a la extracción. En la figura IV.14 se puede apreciar que al moler la sílice en el mortero se pierde la estructura original del octadecil silano, reduciéndose a menor tamaño la totalidad de la partícula.

#### IV.9.2. Muestras dispersas en la fase octadecil silano supelclean

En las figuras IV.15 y IV.16 se presentan las fotografías de la dispersión de hígado y músculo de pescado en la fase octadecil silano supelclean.



**Figura IV.15.** Dispersión de hígado en octadecil silano supelclean obtenida por microscopía electrónica de barrido al vacío, 750 aumentos.



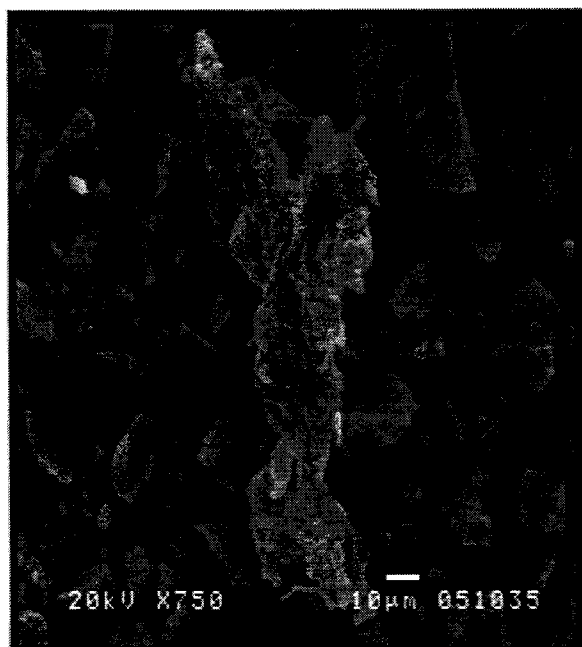
**Figura IV. 16.** Dispersión de músculo en octadecil silano supelclean obtenida por microscopía electrónica de barrido al vacío, 750 aumentos.

En la figura IV.15 se muestra como el hígado se adhiere como una película a la sílice de tal manera que sus partículas quedan englobadas por los componentes de la matriz, al mismo tiempo que algunos pequeños fragmentos de la fase se acumulan sobre dicha cubierta formando aglomerados.

En la figura IV.16 se observa el mismo comportamiento que en las anteriores, aunque en ellas se resalta la estructura fibrosa del músculo, por lo que la pasta queda menos homogénea que la de hígado; se forman aglomerados más pequeños y en menor cantidad. Sin embargo, la interacción de los restos de tejido con el adsorbente sigue siendo evidente.

### IV.9.3. Fase octadecil silano supelclean después de la elución con acetonitrilo al 100%

Las figuras IV.17 y IV.18 representan la dispersión de cada uno de los tejidos después de la elución con acetonitrilo al 100%.



**Figura IV.17.** Dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, eluido con acetonitrilo al 100% obtenida por microscopía electrónica de barrido al vacío, 750 aumentos.



**Figura IV.18.** Dispersión de músculo en octadecil silano supelclean, eluido con acetonitrilo al 100% obtenida por microscopía electrónica de barrido al vacío, 1500 aumentos.

En las figuras IV.17 y IV.18 se observan como el tejido queda adherido en el adsorbente después de efectuar la elución con acetonitrilo al 100%. En este caso, se observa que ya son menos evidentes sobre los tejidos, los fragmentos de la fase aglomerada, con lo que da idea de que en buena proporción los compuestos apolares son separados del complejo matriz-adsorbente.

En las fotografías del hígado sobresale la presencia de segmentos o glóbulos (grasas) que engloban al adsorbente. Esto es una diferencia significativa con las muestras de músculo, dado que la constitución de cada tejido varía su proporción de lípidos que pueden presentarse como interferentes en la extracción. Las muestras de hígado dado su alto contenido de grasas resultan más difíciles de limpiar ya que se adhieren a la superficie del adsorbente y pueden co-eluir junto con compuestos apolares como el benzo(a)pireno.

En efecto, dado que en la dispersión, la matriz es fracturada mediante la fuerza de abrasión que ejerce el soporte sólido sobre ella, con ello se aumenta la superficie de contacto, favoreciéndose el reparto de los componentes de la muestra con la fase estacionaria.

Esta suposición se verá reforzada si se observaron diferencias en los parámetros de las curvas de frente de elución: volumen de fuga o inicio de desorción ( $V_f$ ), volumen de retención ( $V_r$ ) y volumen máximo o desorción completa ( $V_m$ ), con respecto a un mismo compuesto (en este caso benzo(a)pireno) y diferentes tipos de matriz (en este caso hígado y músculo), resultados presentados y discutidos a continuación.

#### IV.10. FRENTES DE ELUCIÓN DE BENZO(A)PIRENO DE LAS SÍLICES N-ALQUIL CON LAS DOS DIFERENTES MATRICES

##### IV.10.1. Ensayos en hígado

En la figura IV.19 se presentan los frentes de elución con una mezcla acetonitrilo:agua 80:20, para benzo(a)pireno disperso en octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond.

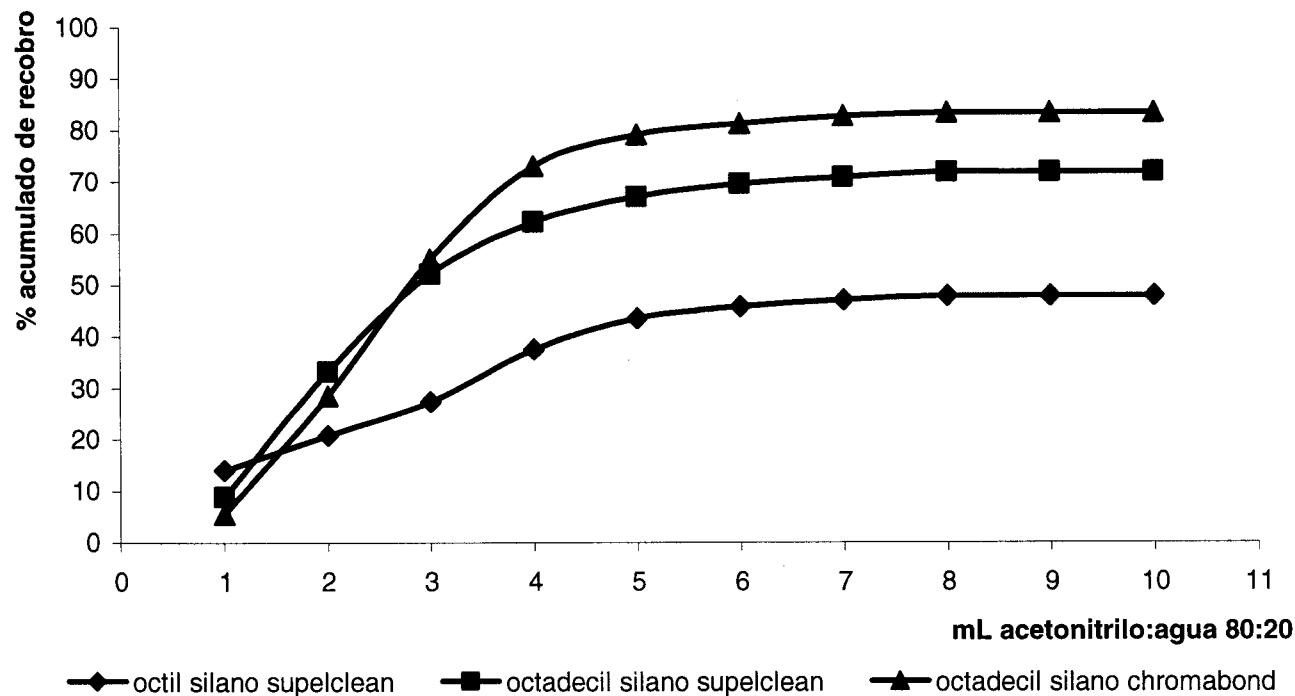


Figura IV.19. Frentes de elución de benzo(a)pireno fortificado en hígado y disperso en diferentes soportes sólidos, eluido con 80:20 acetonitrilo:agua.

En estos ensayos la recuperación de benzo(a)pireno disperso en octadecil silano chromabond; presentó el mejor recobro de 83.34 %, como ya se había discutido en la sección anterior; le sigue en forma decreciente, el octadecil silano supelclean con un recobro de 71.74 % y el octil silano supelclean con un recobro de 47.78 %. Sólo en el caso del octil silano supelclean, se comprobó que el bajo recobro fue debido a la retención insuficiente, como también fue discutido en la sección anterior; parte del compuesto se pierde en los lavados.

De la comparación de las curvas se observa que los recobros mejoran en función del aumento en el porcentaje del disolvente orgánico con que se eluye. Éstos se acercan al 100 % conforme se aumenta el porcentaje de acetonitrilo en el eluyente. Los ensayos reportados de la figura IV.19 se realizaron con acetonitrilo:agua 80:20 como eluyente final para disminuir el contenido de lípidos en el extracto final por lo que los recobros globales son inferiores al 100 % para las fases octadecil silano que con la elusión de acetonitrilo puro.

#### IV.10.2. Ensayos en músculo

En la figura IV.20 se representan los frentes de elución para benzo(a)pireno disperso en octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond.

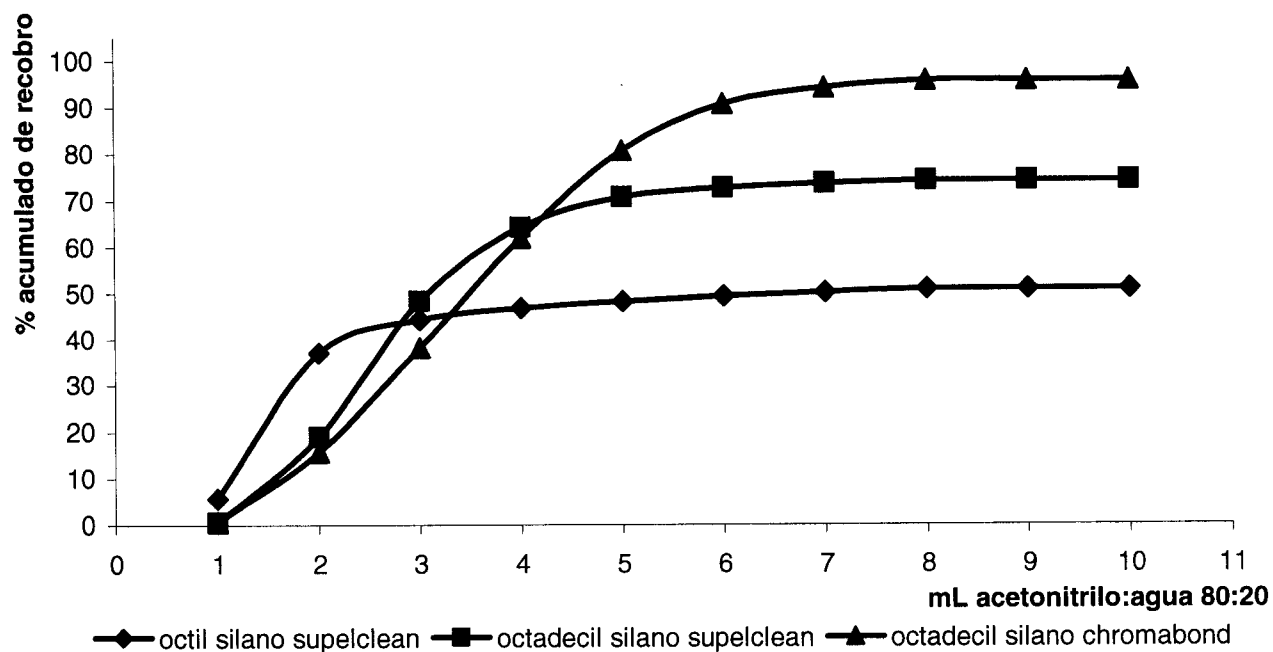


Figura IV.20. Frente de elución de benzo(a)pireno fortificado en músculo y disperso en diferentes soportes sólidos, eluido con 80:20 acetoneitrilo:agua.

En el caso del músculo se repite el mismo comportamiento que las eluciones de benzo(a)pireno de las dispersiones en hígado en cuanto a la cuantitatividad en el recobro dependiente del adsorbente usado. Se obtuvo para el octadecil silano chromabond un recobro de 95.7 %, para el octadecil silano supelclean un recobro de 74.1 % y para el octil silano supelclean un recobro de 50.9 %.

También se presentaron interferentes (que se hacen notar en la vida útil de la precolumna) inherentes de la matriz pero en menor proporción, por lo que comparando los recobros máximos obtenidos con la elución acetonitrilo:agua 80:20 en ambos tejidos respecto al tipo de fase estacionaria, resulta ser que en músculo se obtienen mejores recobro que en hígado, lo cual parece lógico pues esta documentado que la cantidad de grasas es mayor en tejido hepático que en las fibras musculares.

De manera general, se puede decir que no existen grandes diferencias al comparar el comportamiento del benzo(a)pireno en las matrices estudiadas, si bien se trata de matrices provenientes de la misma especie, en la que la variabilidad más evidente es por el contenido de las biomoléculas que se encuentran en proporciones mayoritarias en hígado. Sin embargo, en la siguiente sección, en donde se comparan los frentes de elución con las dos matrices si se observan diferencias notables.

#### **IV.10.3. Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en extractos de dispesión de hígado y músculo en octil silano supelclean, octadecil silano supelclean, octadecil silano chromabond**

En las figuras IV.21, IV.22 y IV.23 se presentan los frentes de elución de benzo(a)pireno de las dos matrices hígado y músculo en los adsorbente octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond. En las tablas IV.24, IV.25 y IV.26 se presentan los parámetros de los frentes de elución correspondientes.

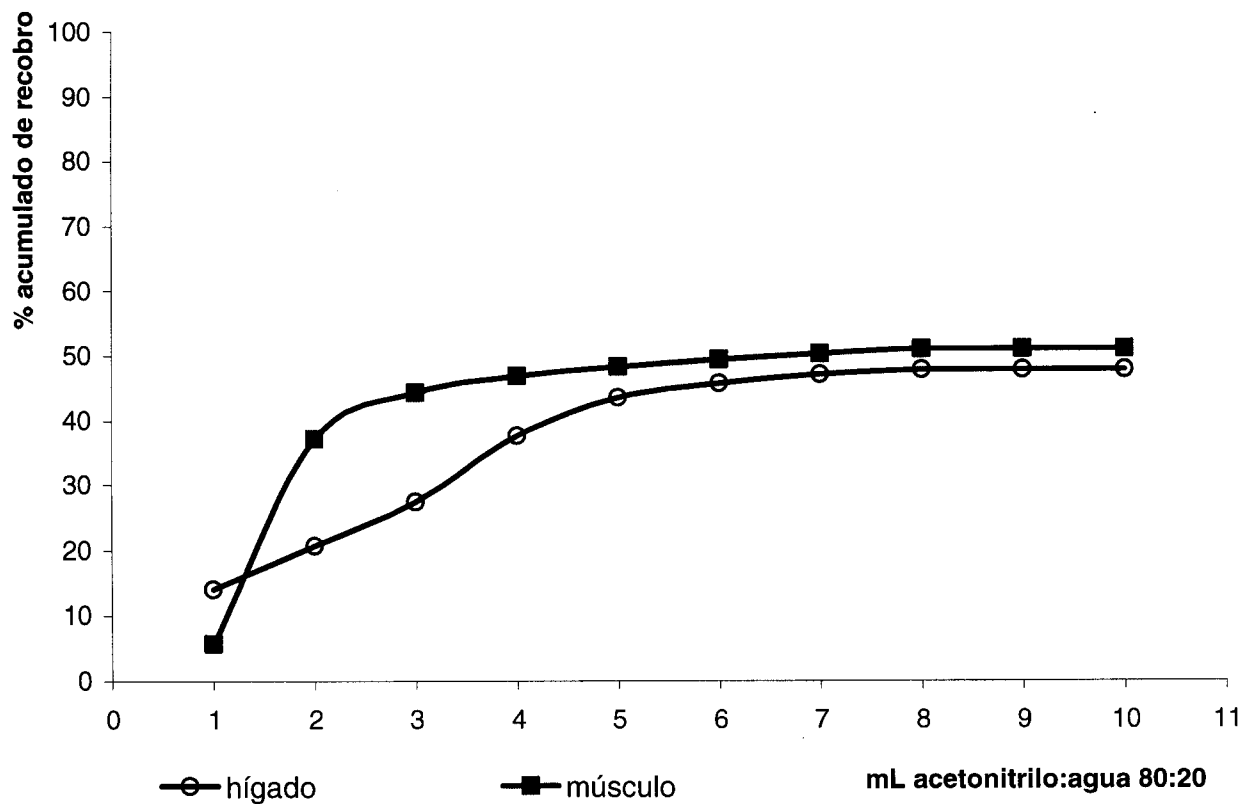
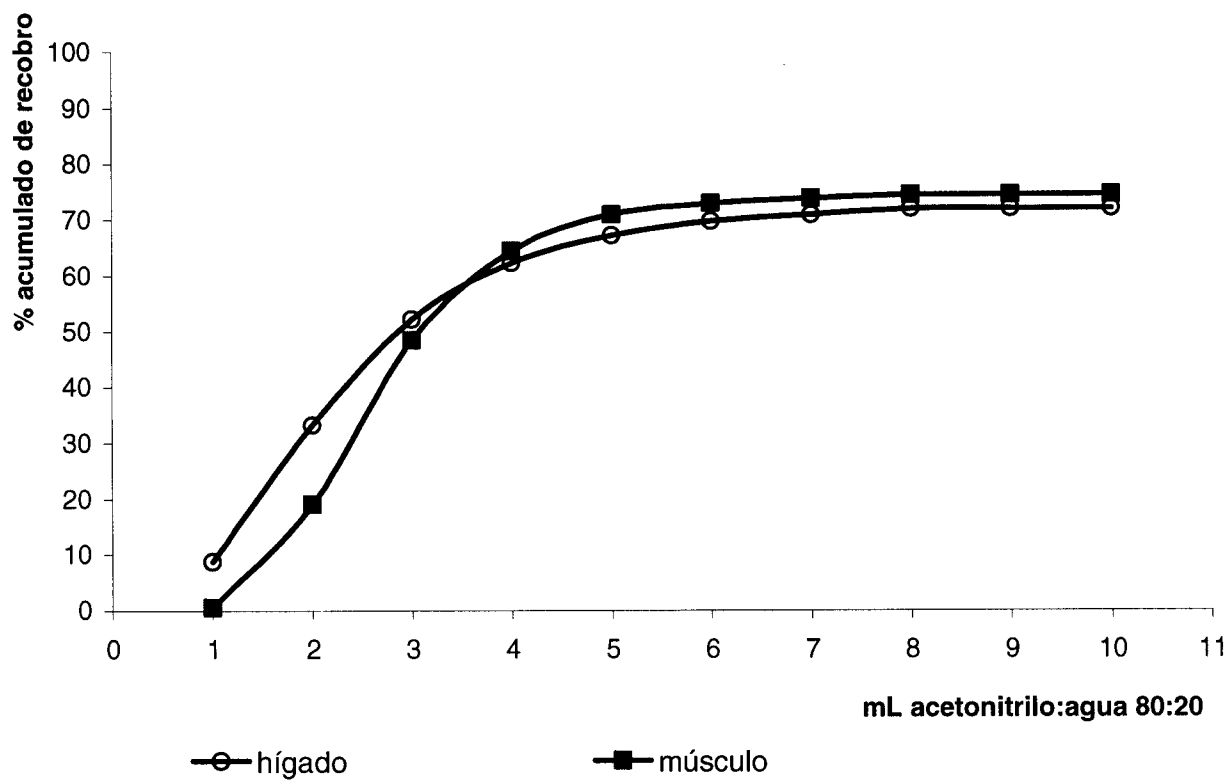


Figura IV.21. Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octil silano supelclean.

Muestra	Vr (mL)	Vm (mL)
Hígado	2.47	5.7
Músculo	1.50	6.3

Tabla IV.24. Parámetros cromatográficos del frente de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octil silano supelclean.

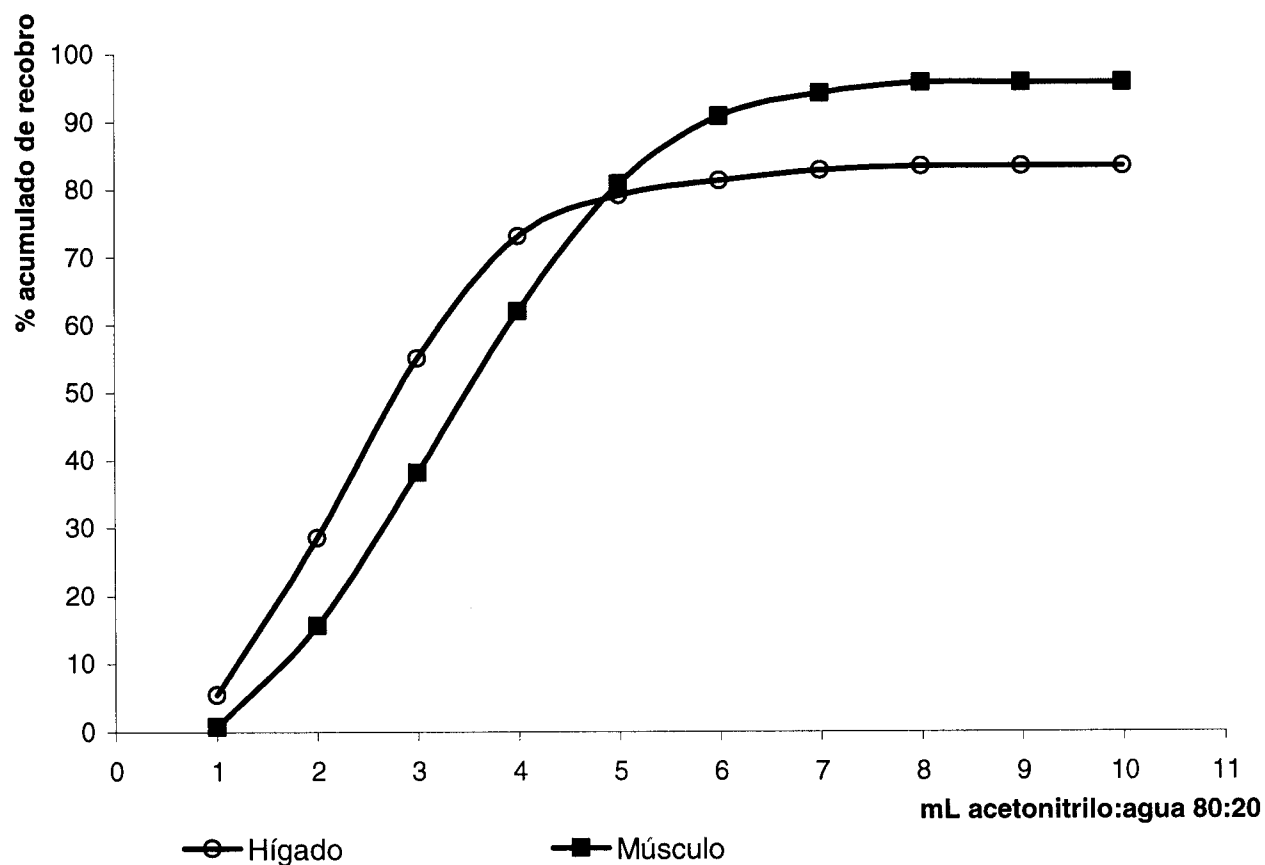


**Figura IV.22.** Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano supelclean.

Muestra	Vr (mL)	Vm (mL)
Hígado	2.15	5.8
Músculo	2.30	6.8

**Tabla IV.25.** Parámetros cromatográficos del frente de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano supelclean.





**Figura IV.23.** Comparación de los frentes de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano chromabond.

Muestra	V <sub>r</sub> (mL)	V <sub>m</sub> (mL)
Hígado	2.40	5.2
Músculo	3.20	7.2

**Tabla IV.26.** Parámetros cromatograficos del frente de elución de benzo(a)pireno en hígado y músculo de cartuchos de extracción de octadecil silano chromabond.

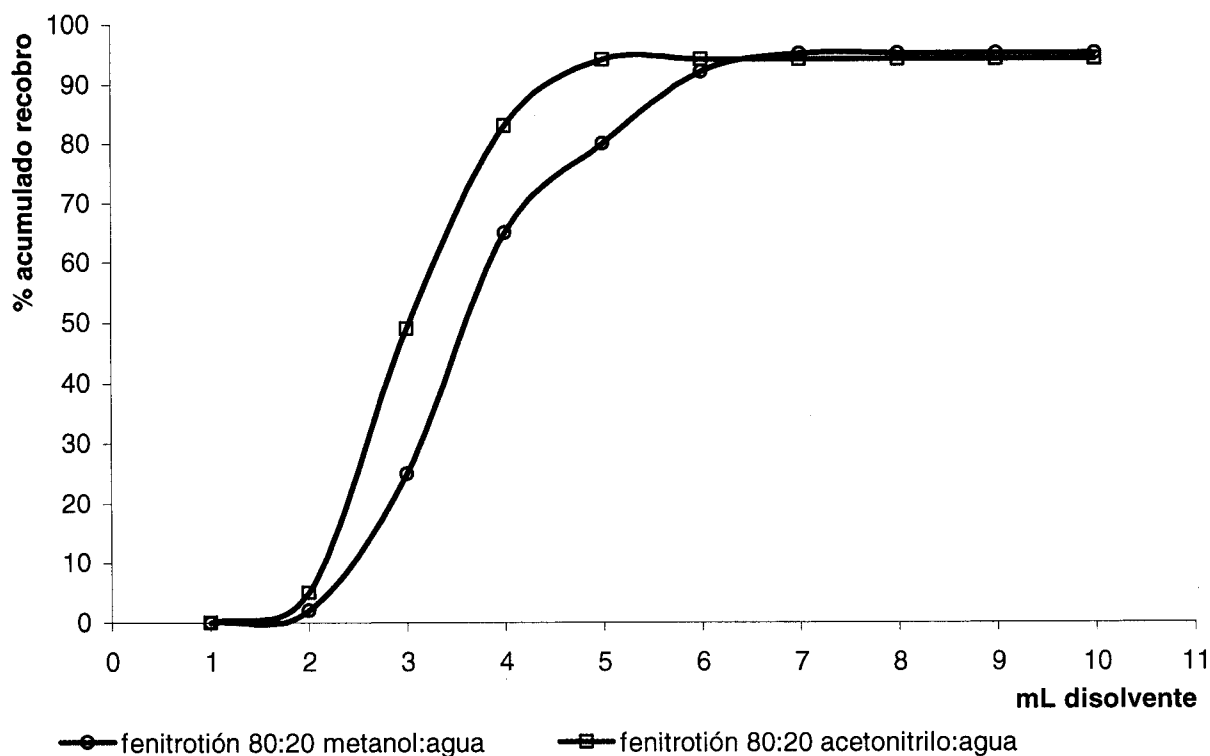
Los resultados muestran comportamientos prácticamente similares, desde el punto de vista en que desde el primer mililitro eluido en los tres adsorbentes, es mayor el recobro para hígado que para músculo. Conforme aumenta el volumen de elución y se obtiene completa la curva de frente de elución en hígado, se observa desplazada hacia la izquierda en las sílices C 18. Con la muestra de músculo la elución es un poco más lenta, pero más eficiente la desorción de benzo(a)pireno. Esto se observa con mayor claridad en los frentes de elución en cartuchos de octadecil silano chromabond, en la que, de inicio las curvas de frente de elución corren paralelas hasta llegar a un punto en que se cruzan y se obtiene mayor recobro en la elución de los cartuchos de dispersión en músculo que en la de hígado. En el caso del octil silano supelclean (figura IV.21) este comportamiento se ve invertido, pues en la curva del frente de elución con hígado es mucho más extendida y cabe destacar que con este adsorbente se tuvieron pérdidas en el lavado. Estas particularidades se hacen evidentes en los parámetros de los frentes de elución; dado que, en los adsorbentes los  $V_r$  y  $V_m$  son menores en hígado que en músculo.

Estas variaciones en los valores de los parámetros de los frentes de elución refuerzan la suposición de que la matriz modifica la cinética de desorción por DMFS, que evidencian los desplazamientos que se observan en las curvas de frente de elución. En la sección anterior se mencionó que la diferencia en el contenido de biomoléculas entre las matrices podría ser la razón más importante para explicar los diferentes comportamientos. Pues si bien, se acepta que una matriz como el hígado es más compleja que el músculo por la mayor proporción de lípidos, también esto sugiere que debido a los componentes de dicha matriz las interacciones entre el analito y el adsorbente sean más rápidas y fuertes, además de que los lípidos ocupen sitios activos en el adsorbente y esto sea una de las diferencias que explique el desplazamiento de los frentes de elución y los menores recobros.

El estudio de como influye la naturaleza de la matriz en la eficiencia de extracción empleando la dispersión en fase sólida, puede revelar diferencias más notables cuando se analice el comportamiento de un compuesto modelo con matrices provenientes de especies diferentes y/o composición (p.ej. muestra vegetal y animal).

#### IV.11.FRENTES DE ELUCIÓN DE FENITROTIÓN, CLORPIRIFOS Y BENZO(A)PIRENO CON DOS DIFERENTES MEZCLAS DE DISOLVENTES ORGÁNICO-AGUA

En las figuras IV.24, IV.25 y IV.26 se presentan los frentes de elución en hígado para cada compuesto estudiado, según el orden de elución presentado por polaridad decreciente utilizando acetonitrilo:agua 80:20 y metanol:agua 80:20.



**Figura IV.24.** Frente de elución de fenitrotión eluido de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, con fracciones de 1mL de acetonitrilo:agua 80:20 y metanol:agua 80:20.

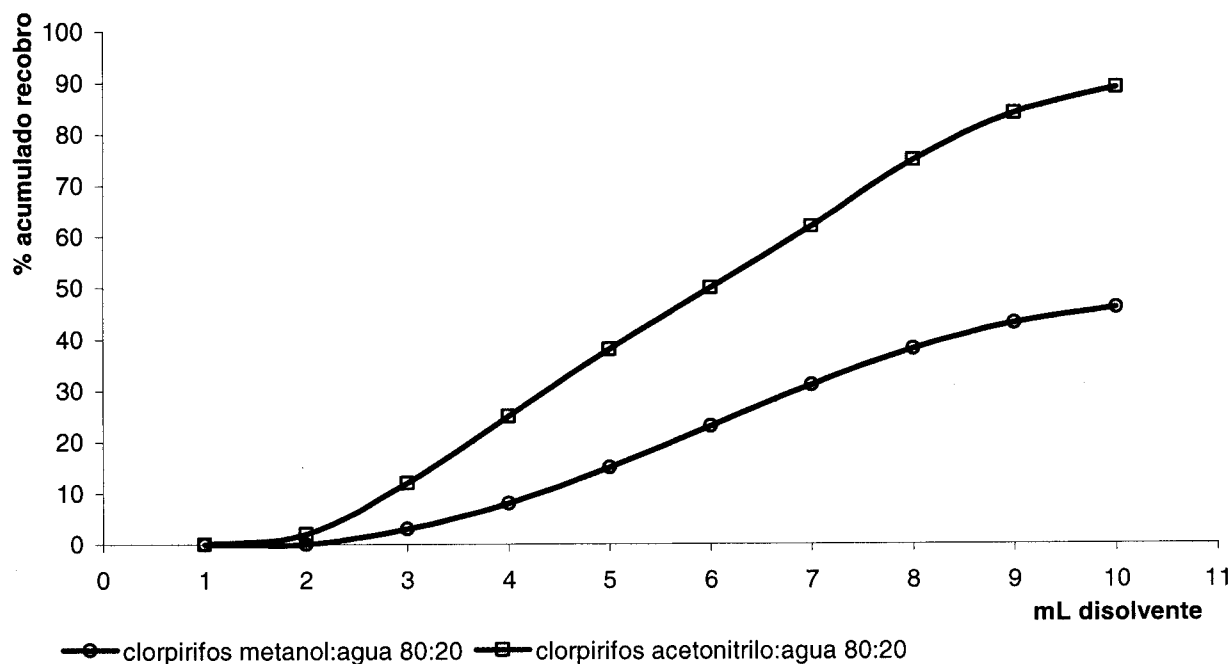


Figura IV.25. Frente de elución de clorpirifos eluido de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, con fracciones de 1mL de 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua.

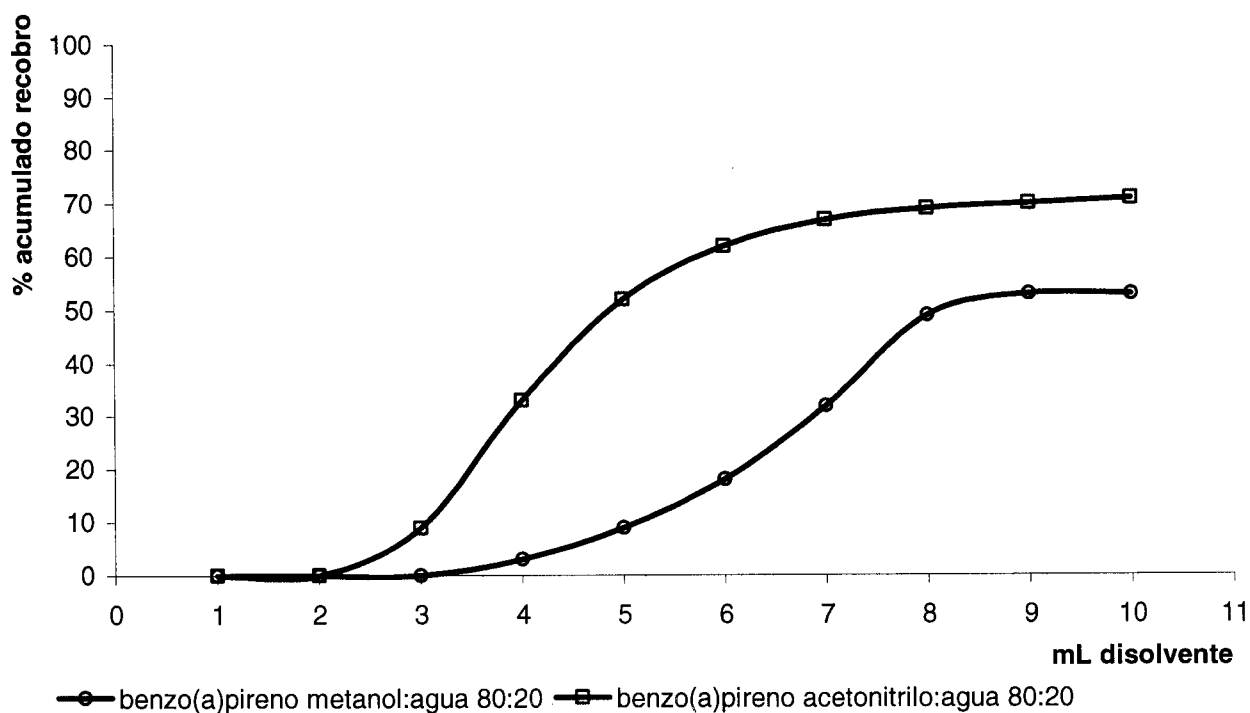


Figura IV.26. Frente de elución de benzo(a)pireno eluido de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean, con fracciones de 1mL de 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua.

Se observa que en los tres casos la mezcla de acetonitrilo:agua conduce a eluciones más rápidas y cuantitativas.

#### IV.11.1. Comparación de los frentes de elución de fenitrotión, clorpirifos y benzo(a) pireno con dos diferentes mezclas de disolventes orgánico-agua en la fase octadecil silano supelclean

En las figuras IV.27 y IV.28 se comparan las curvas de los frentes de elución de los tres compuestos eluidos con 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua respectivamente. En la tabla IV.27 se presentan los recobros globales de extracción (% R) y el volumen de elución total (Vm) para cada uno de los compuestos obtenidos de cada frente de elución.

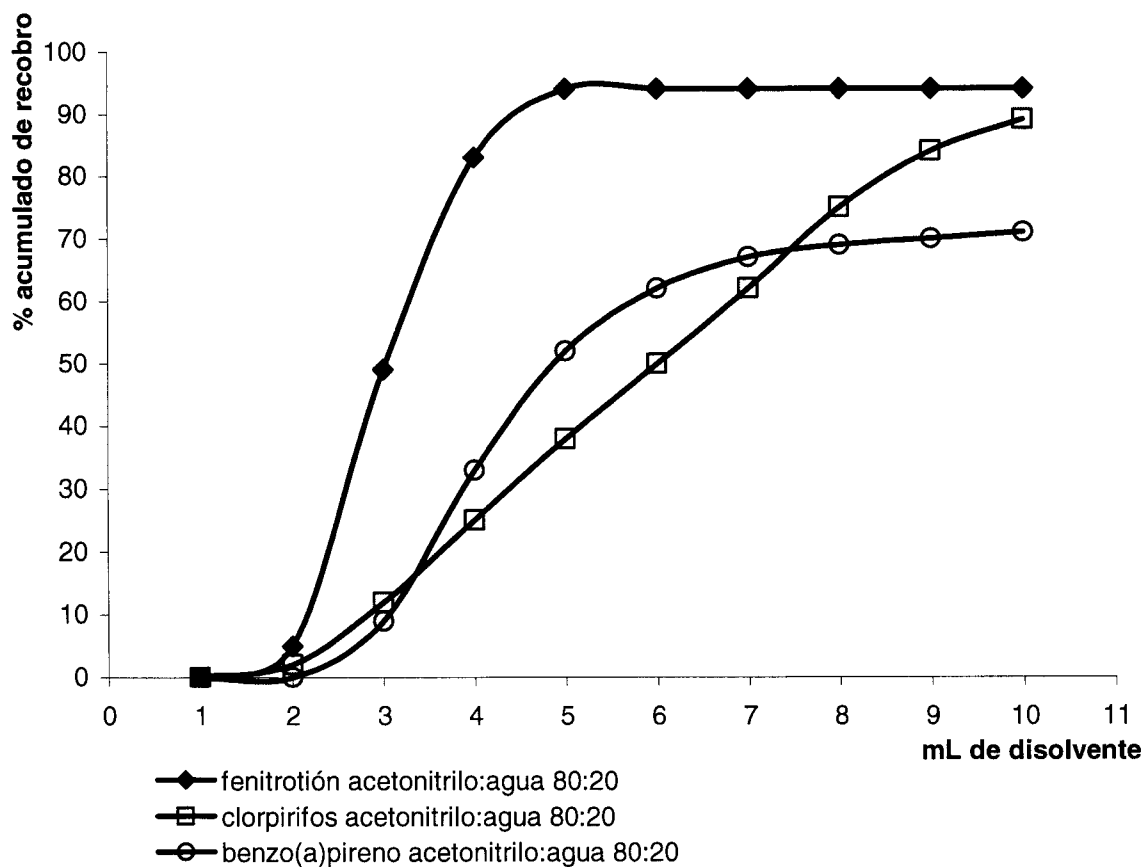


Figura IV.27. Frentes de elución de los tres los compuestos eluidos con fracciones de 1 mL de acetonitrilo:agua 80:20.

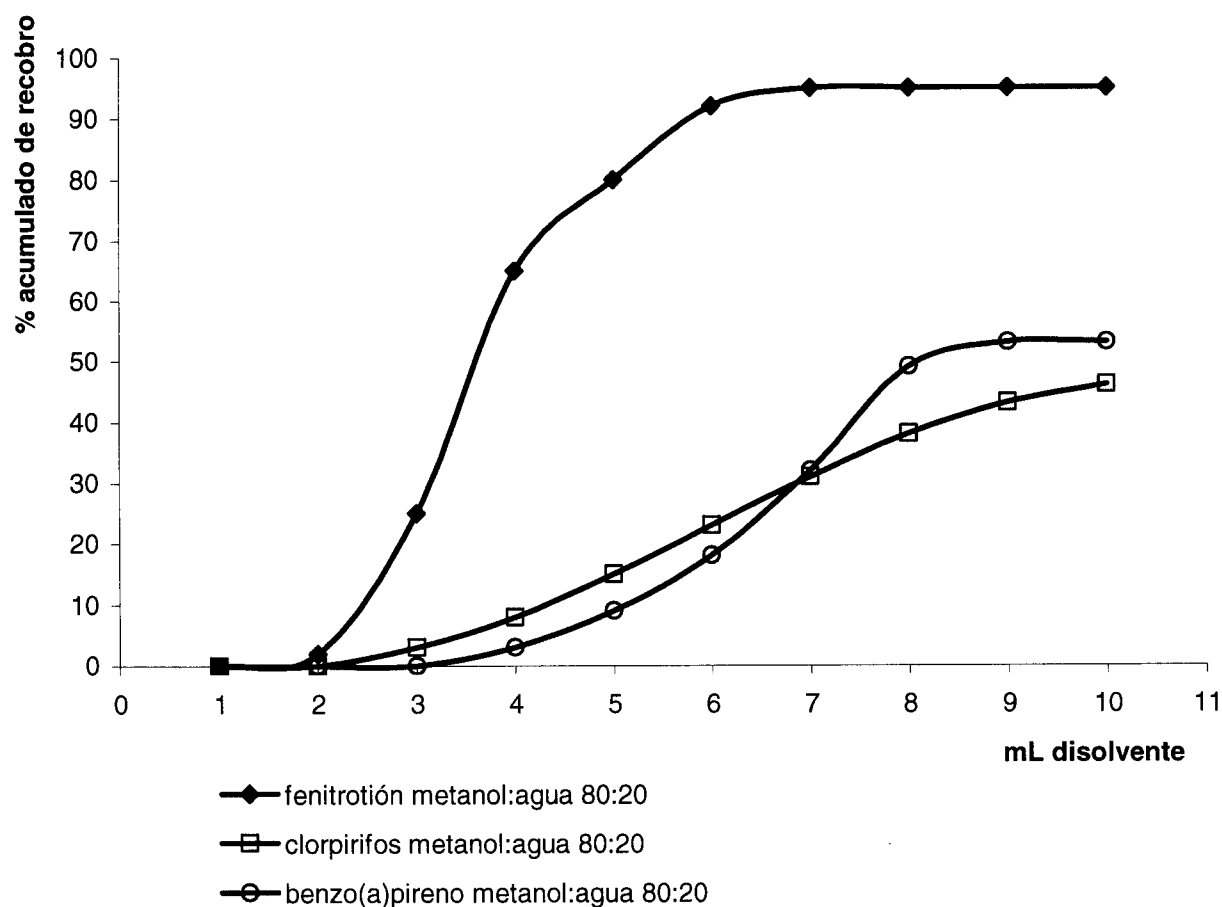


Figura IV.28. Frentes de elución de los tres compuestos eluidos con fracciones de 1 mL de 80:20 metanol:agua.

Compuesto	Mezcla eluente 80:20	V <sub>m</sub> (mL)	% recobro
Fenitrotión	acn: H <sub>2</sub> O	5	94
	MeOH:H <sub>2</sub> O	7	95
Clorpirifos	acn: H <sub>2</sub> O	10	90
	MeOH:H <sub>2</sub> O	>10	45*
Benzo(a)pireno	acn: H <sub>2</sub> O	8	70
	MeOH:H <sub>2</sub> O	10	53

acn = acetonitrilo, MeOH = metanol.

\* No se alcanza a medir puesto que, las curva no se estabiliza hasta este punto de la elución.

Tabla IV.27. Rendimientos de extracción y volumen de elución obtenidos por cada mezcla de eluente utilizado para cada compuesto.

Se observa que en los frentes de elución de la columna de dispersión de hígado en octadecil silano supelclean los recobros de los analitos se realizan de acuerdo a su hidrofobicidad ( $\text{Log } P$ ) y a la fuerza eluente de los disolventes (a mayor  $\text{Log } P$  menor recobro global).

En el orden de elución, se presentó en primer lugar el fenitrotión con recobros del 94 % con acetonitrilo:agua 80:20, en un  $V_m$  de 5 mL y del 95 % con metanol:agua 80:20, en un  $V_m$  de 7 mL. Para este compuesto, que es el más polar se respetó el orden de elución según la fuerza del eluente para desorber el compuesto de la fase estacionaria tal como se esperaría en la EFS.

En segundo lugar se presentó el clorpirifos con un recobro de 90 % con acetonitrilo:agua 80:20 en un  $V_m$  de 10 mL y de 45 % con metanol:agua 80:20 en un  $V_m$  de 10 mL. Finalmente, se presentó el benzo(a)pireno con un recobro de 70 % con acetonitrilo:agua 80:20 en un  $V_m$  de 8 mL y de 53 % con metanol:agua 80:20 en un  $V_m$  de 10 mL.

De acuerdo a estos resultados, se observa que el orden de elución se da de acuerdo a la polaridad de los compuestos como en EFS. Sin embargo, los últimos dos compuestos presentaron un comportamiento interesante, pues las curvas de los frentes de elución se sobrepusieron. En el caso del clorpirifos, también es muy notorio que eluye muy lentamente originando un frente muy expandido que no llega a estabilizarse, al menos hasta los 10 mL de eluente que se adicionaron. Lo que no se observa con el benzo(a)pireno, en éste si se alcanza a estabilizar el frente con las dos mezclas de disolventes probadas. Estos resultados podrían sugerir que el orden de elución se invierte; probablemente por efecto de los componentes de la muestra integrados en el adsorbente además de los analitos. Sin embargo, esta suposición tendrá que comprobarse en ensayos posteriores en que se continúe la elución con esta mezcla de disolventes, porque también puede ser un efecto de la baja eficiencia de la columna de dispersión y a una interacción mucho más lenta el clorpirifos con el adsorbente.

#### IV.12.FRENTES DE ELUCIÓN DE FENITROTÍÓN, CLORPIRIFOS Y BENZO(A)PIRENO EN LA FASE BONDESIL-ENV

El estudio de la DMFS con el polímero bondesil-env mostró que el benzo(a)pireno presentaba una desorción muy baja, puesto que se dificultó su elución con las mezclas de disolventes utilizadas en las sílices. Por esta razón se consideró este adsorbente ideal para evaluar el efecto de la adición de agentes químicos como los surfactantes en el mejoramiento de los recobros en los extractos. También se decidió trabajar con los otros dos compuestos fenitrotión y clorpirifos de polaridad diferente al benzo(a)pireno.

##### IV.12.1. Ensayos con solución estándar sin adición de surfactantes

Antes de efectuar la DMFS con el hígado de pescado fortificado con los compuestos de interés, se realizaron ensayos por DMFS utilizando soluciones estándar de los compuestos directamente aplicadas al adsorbente bondesil-env antes de la maceración y empaque de los cartuchos, simulando la DMFS con muestra.

En las tablas IV.28, IV.20 y IV.30 se presentan los recobros obtenidos de la elución de los compuestos con mezclas de acetonitrilo:agua 80:20, 90:10 y 100% acetonitrilo.

##### acetonitrilo:agua 80:20

Contaminante	Recobros (%)														
	Fracciones consecutivas de 1 mL														
	acetonitrilo:agua 30:70			acetonitrilo:agua 50:50			acetonitrilo:agua 80:20								acumulado
1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8		
<b>Fenitrotión</b>	NI	NI	NI	2.8	3.7	2.7	3.4	8.8	36.7	18.5	8.8	3.1	ND	ND	<b>88.5%</b>
<b>Clorpirifos</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	1.8	2.0	13.1	12.5	11.6	10.3	ND	ND	<b>51.4%</b>
<b>Benzo(a)pireno</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.9	1.3	1.3	ND	<b>3.5 %</b>

NI: no inyectado, ND: no detectado.

Tabla IV.28. Recobros de la elución de estándares, en polímero bondesil-env, en fracciones de 1 mL de acetonitrilo:agua 80:20.



acetonitrilo:agua 90:10

Contaminante	Recobros (%)														
	Fracciones consecutivas de 1 mL														
	acetonitrilo:agua 30:70			acetonitrilo:agua 50:50			acetonitrilo:agua 90:10								acumulado
1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	6	7	8		
<b>Fenitrotión</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	0.6	2.5	20.6	62.5	13.0	ND	ND	ND	<b>99.2%</b>
<b>Clorpirifos</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	8.56	22.0	24.8	21.0	15.0	<b>91.4%</b>
<b>Benzo(a)pireno</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	<b>0.0 %</b>

NI: no inyectado, ND: no detectado.

**Tabla IV.29.** Recobros de la elución de estándares, en polímero bondesil-env, en fracciones de 1 mL de acetonitrilo:agua 90:10.

acetonitrilo al 100%

Contaminante	Recobros (%)														
	Fracciones consecutivas de 1 mL														
	acetonitrilo:agua 30:70			acetonitrilo:agua 50:50			acetonitrilo 100 %								acumulado
1	2	3	1	2	3	1	2	3	4	5	10	15	20		
<b>Fenitrotión</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	23.3	75.6	1.8	ND	ND	ND	ND	ND	<b>100%</b>
<b>Clorpirifos</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	10.0	56.2	30.0	4.3	ND	ND	ND	ND	<b>100%</b>
<b>Benzo(a)pireno</b>	NI	NI	NI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.0	10.5	15.9	ND	<b>31.4%</b>

NI: no inyectado, ND: no detectado.

**Tabla IV.30.** Recobros de la elución de estándares, en polímero bondesil-env, en fracciones de 1 mL de acetonitrilo 100 %.

En las tablas se observa que la retención para el fenitrotión en esta fase estacionaria fue menor en comparación con la de los otros compuestos, debido a su mayor polaridad del compuesto. En el caso de la elución con acetonitrilo:agua 80:20 se presentó una fuga ligera de este compuesto en la fracción acetonitrilo:agua 50:50 que se emplea como elución de limpieza, aunque esto no se presentó en los ensayos subsiguientes. Se observa que el porcentaje global recuperado aumenta para fenitrotión y clorpirifos con el porcentaje de acetonitrilo del eluyente, pero el benzo(a)pireno presenta recobros muy bajos o no es detectado con las fracciones acetonitrilo:agua 80:20 y 90:10 de eluyente; en el caso de acetonitrilo al 100% como eluyente si se recuperó aunque en un porcentaje muy bajo.

Este comportamiento puede ser explicado desde el punto de vista de la polaridad de los compuestos, presentando un coeficiente de reparto octanol/agua  $\log P$  de 3.43 para fenitrotión, 4.7 para clorpirifos y 6.0 para benzo(a)pireno; y se están tratando de retener en una fase estacionaria apolar como el bondesil-env que presenta una estructura de polimérica poliestireno divinilbenceno, en la que las interacciones analito-fase estacionaria son más fuertes para los analitos más apolares y con mayor cantidad de enlaces  $\pi$ . Por esta razón, en el caso del benzo(a)pireno que es una molécula completamente apolar, las interacciones entre los enlaces  $\pi$ - $\pi$  de los anillos aromáticos resultan ser

muy fuertes obteniéndose recobros globales muy bajos siendo el máximo alcanzado de apenas el 31.4 % utilizando 15 mL de acetonitrilo al 100 % como eluente de extracción.

#### IV.12.2. Ensayos con solución estándar con adición de surfactantes para la extracción de fenitrotión, clorpirifos y benzo(a)pireno en polímero bondesil-env

En el estudio de adición de surfactantes para el mejoramiento de los recobros en la fase polímero bondesil-env, se utilizó la mezcla de los tres compuestos considerando la desorción del benzo(a)pireno, compuesto más retenido en el polímero bondesil-env y no eluido cuantitativamente con los eluentes probados.

##### IV.12.2.1. Selección de surfactante

Se probaron dos surfactantes, el heptansulfonato de sodio (HSNa) y lauril sulfato de sodio (LSNa). Después de aplicarlos a las muestras y realizar la DMFS, con cada uno de ellos se obtuvieron los porcentajes de recobro de la elución de benzo(a)pireno con acetonitrilo al 100 %. Se adicionaron de cantidades variables de estos surfactantes.

En la tabla IV.31 se presentan los recobros obtenidos de la elución de la columna de dispersión.

	% de recobro por fracción de mL de acetonitrilo al 100%											acumulado
	1	2	3	4	5	10	15	20	25	30	35	
Blanco	0	0	0	0	5	10.5	15.4	4.8	0	0	0	36.0 %
HSNa 100µL	0	0	0	0	3.2	28.1	12.0	4.0	0	0	0	47.0 %
LSNa 100µL	0	2	4	5.8	5.5	29.2	25.7	15.7	5.8	6.1	0	100 %
HSNa 400µL	0	0	0	0	6	38.7	50.7	4.6	0	0	0	100 %
LSNa 400µL	0	1.6	6.2	6.0	6.7	39.8	28.5	11.2	0	0	0	100 %

**Tabla IV.31.** Recobro de benzo(a)pireno, en polímero bondesil-env, con diferentes cantidades de surfactantes HSNa y LSNa, eluido con acetonitrilo al 100%.

Se obtuvieron resultados combinados para ambos surfactantes probados; 100 µL de heptansulfonato de sodio (HSNa) fué capaz de desorber hasta un 47 % del analito eluyendo con 20 mL de acetonitrilo al 100%, se mejoró el recobro en un 11.6 %. La adición de 100 µL de lauril sulfato de sodio (LSNa) desorbió el 100 % del analito eluyendo con un volumen total de 30 mL de acetonitrilo al 100 %. Por otro lado, con 400 µL de HSNa se recuperó el 100 % del analito eluyendo

con 20 mL de acetonitrilo al 100 % y con 400  $\mu$ L de LSNa lo hizo también con 20 mL, aunque en este último caso la desorción del analito inició en el segundo mL de elución.

De los resultados se deduce que, con 400  $\mu$ L de lauril sulfato de sodio a una concentración de 1M se mejor recobro de benzo(a)pireno en el polímero bondesil-env. Este surfactante presenta una cadena alifática de mayor numero de carbonos, con que, la desorción de benzo(a)pireno se incrementa notablemente. Por lo tanto se puede considerar a este surfactante como el más conveniente para aplicarlo a las muestras dispersas. Desafortunadamente se presentó el inconveniente de no contar con la cantidad suficiente de este surfactante en el laboratorio para realizar más ensayos, así que se optó por realizar los ensayos con HSNa, para realizar estudios comparativos con muestras de hígado fortificado y disperso en esta misma fase estacionaria. El eluente seleccionado fue el acetonitrilo al 100 % dado que solo con esta fase móvil se obtuvieron recobros cuantitativos.

#### **IV.12.3. Ensayos con muestras de hígado fortificadas con los tres compuestos en octadecil silano supelclean y polímero bondesil-env sin surfactante**

En la figura IV.29 y IV.30 se representan los frentes de elución de benzo(a)pireno, clorpirifos y fenitrotión en dispersión de hígado con octadecil silano supelclean y polímero bondesil-env, eluidos con acetonitrilo al 100 %.

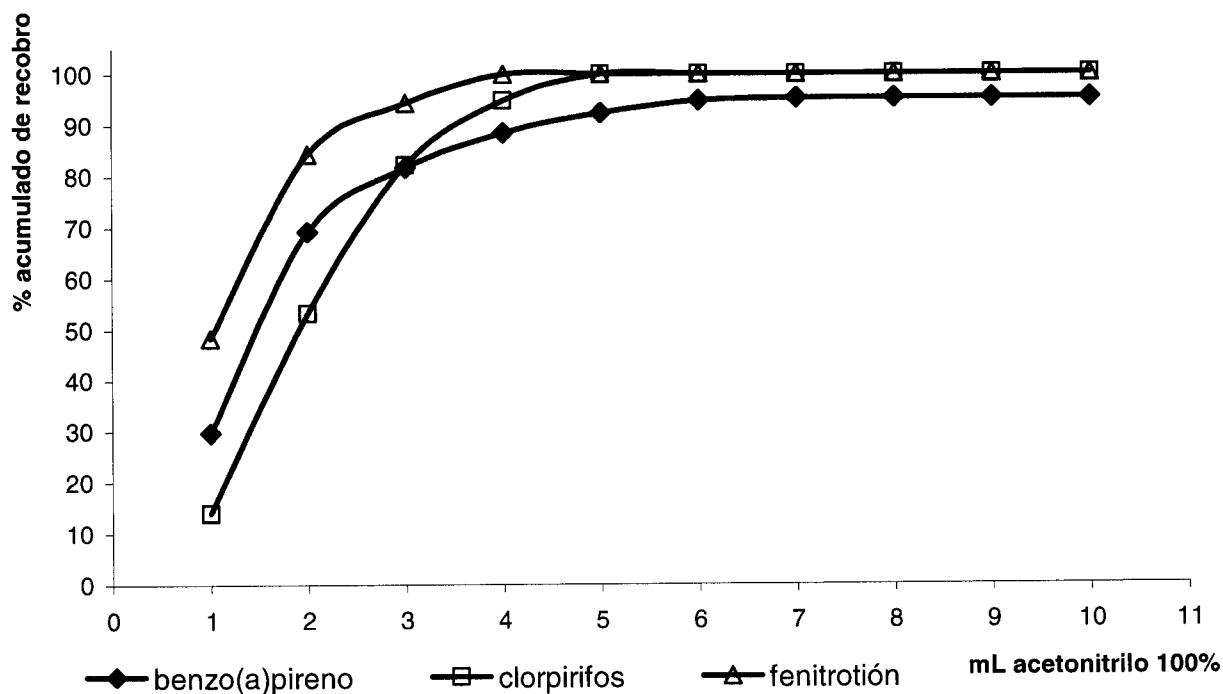


Figura IV.29. Frente de elución de fenitrotión, clorpirifos y benzo(a)pireno, eluido con acetonitrilo al 100% en octadecil silano supelclean.

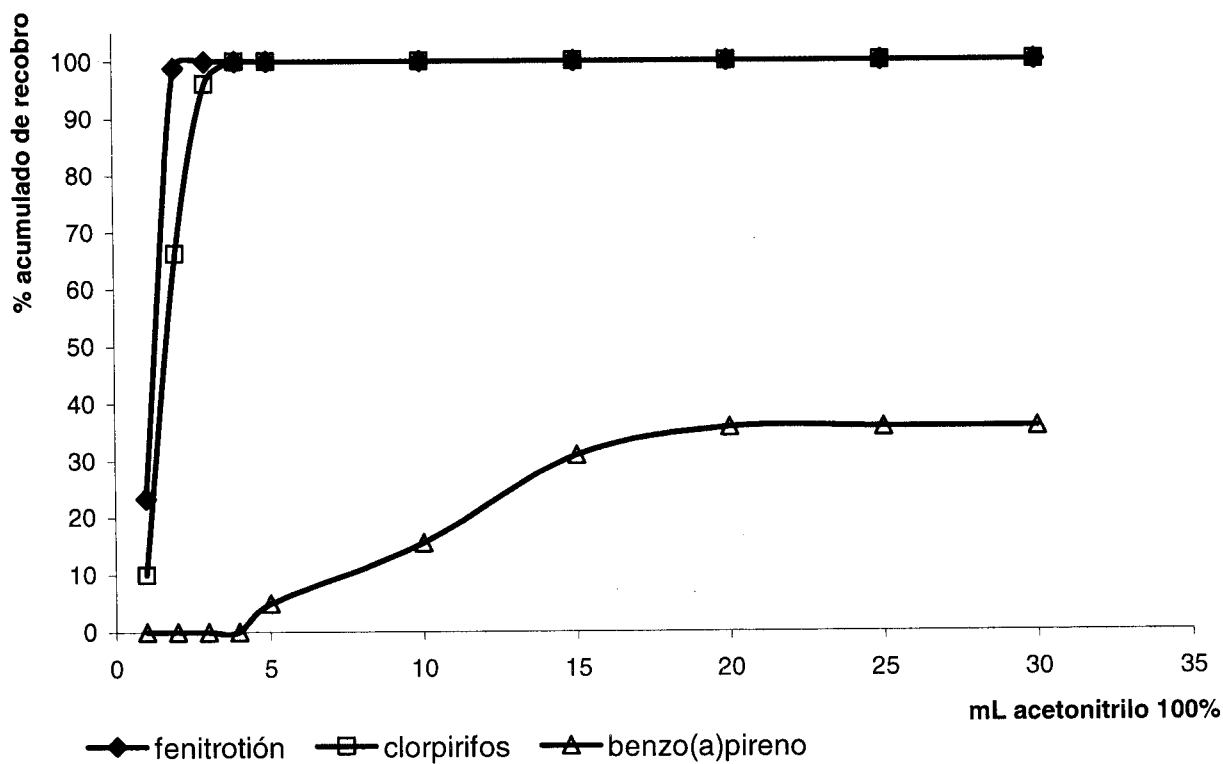


Figura IV.30. Frente de elución de fenitrotión, clorpirifos y benzo(a)pireno, eluido con acetonitrilo al 100% en polímero bondesil-env.

El orden de elución en el octadecil silano supelclean se presentó parecido al mostrado en la sección IV.10.1 con la aparente sobreposición de los frentes de elución de clorpirifos y benzo(a)pireno. En este ensayo se noto más claramente que el benzo(a)pireno eluye en primer lugar que el clorpirifos, lo que pareciera no ser acorde a lo que se espera en EFS; sin embargo, la dependencia de la polaridad y el recobro de los compuestos se respeta al observar los recobros globales. El Vm también se obtiene en un volumen mayor para el compuesto más hidrófobo (Tabla IV.33).

En el polímero se hace más que evidente lo limitado de la desorción del benzo(a)pireno de esta fase estacionaria.

En la tabla IV.32 se resumen los valores de los parámetros obtenidos de la elución de los compuestos de dispersiones de hígado en las dos fases estudiadas.

Compuesto	octadecil silano supelclean		polímero bondesil-env	
	% recobro	Vm (mL)	% recobro	Vm (mL)
Fenitrotión	100	4	100	3
Clorpirifos	100	5	100	4
Benzo(a)pireno	95.3	7	36	20

Vm = volumen máximo de elución.

Tabla IV.32. Porcentaje de recobro y volumen de elución total para cada compuesto eluidos de cartuchos de dispersión de hígado en octadecil silano y polímero bondesil-env con acetonitrilo al 100%.

Los recobros obtenidos para fenitrotión y clorpirifos de las dos fases en estas condiciones de elución difieren sólo en el Vm, siendo éste de apenas 1 mL. Por lo que, el incluirlos en el estudio de desorción por adición de surfactante no presentó utilidad.

La diferencia en el Vm fue muy evidente para el benzo(a)pireno entre el adsorbente octadecil silano supelclean y el polímero bondesil-env. En este último en los primeros 10 mL de la elución solo se recuperó alrededor del 15 %, en el acumulado de las fracciones sucesivas de 5 mL, solo fue posible recuperar el 36 % con un Vm de 20 mL de acetonitrilo al 100 %. Debido a este comportamiento mostrado, se realizó la adición de heptansulfonato de sodio (HSNa) 1M a la

dispersión de hígado en la fase bondesil-env, siguiendo primordialmente la desorción del benzo(a)pireno de esta fase.

#### IV.12.4. Recobro de benzo(a)pireno en función de diferentes cantidades de HSNa 1M

En la figura IV.31 se representa el frente de elución de benzo(a)pireno con adiciones de 100, 200 y 400  $\mu\text{L}$  de HSNa 1M, eluido con acetonitrilo al 100 %. En la tabla IV.33 se presentan los porcentajes de recobro global de benzo(a)pireno y los  $V_m$  obtenidos por efecto de la adición de HSNa 1M.

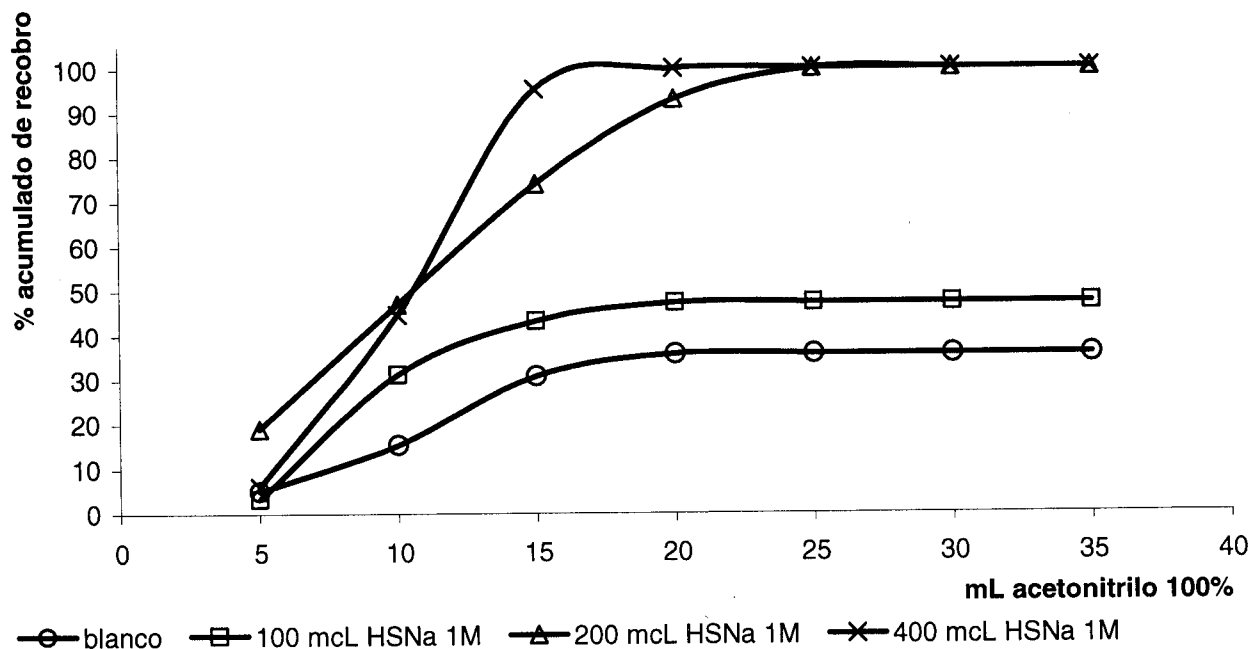


Figura IV.31. Frentes de elución para benzo(a)pireno de cartuchos de hígado disperso en polímero bondesil-env, adicionado con diferentes volúmenes de HSNa 1M, eluido con acetonitrilo al 100%.

$\mu\text{L}$ de HSNa 1M	% recobro	$V_m$ (mL)
100	47.32	20
200	100	25
400	100	20

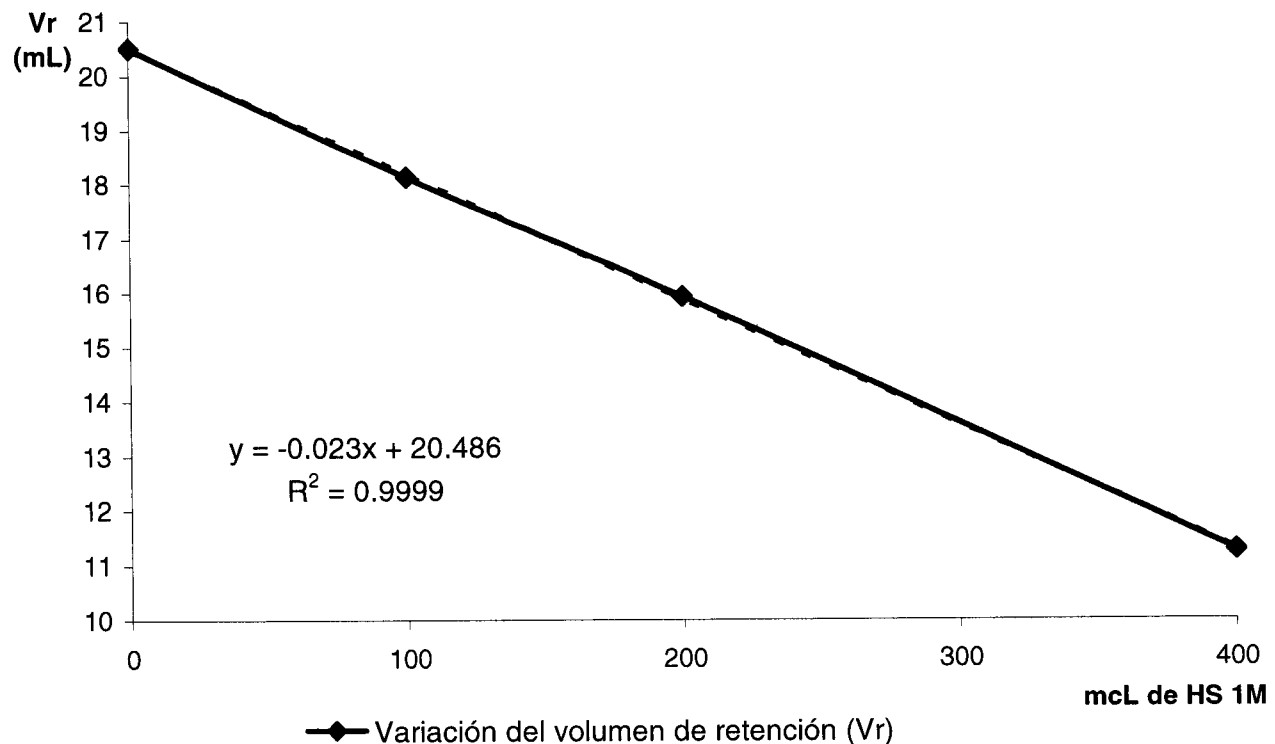
Tabla IV.33. Porcentajes de recobro globales y  $V_m$  para benzo(a)pireno por efecto de la adición de volúmenes variables de HSNa 1M.

Los resultados muestran que los mejores recobros de benzo(a)pireno se obtuvieron con la adición de 200 y 400  $\mu\text{L}$  de HSNa 1M en la dispersión de hígado en la fase bondesil-env. Siendo la adición de 400  $\mu\text{L}$  la que ayuda a extraer el 100 % del compuesto en un volumen de elución menor.

Los estudios con y sin muestra al parecer no varían mucho; esto puede ser debido a que el efecto del surfactante se presente más directamente en la interacción con el analito y la fase estacionaria, por ello aumenta el recobro independientemente de si tiene o no muestra la fase estacionaria.

Con los resultados obtenidos de los frentes de elución se calcularán los parámetros  $V_f$ ,  $V_r$  y  $V_m$  con que se construyó la gráfica de  $V_r$  en función de la cantidad de surfactante adicionada y se comprobó la reproducibilidad de éstos.

En la figura IV.32 se representa la correlación existente entre la cantidad de HSNa 1M adicionada y el volumen de retención para el benzo(a)pireno en la dispersión de hígado en la fase bondesil-env.



**Figura IV.32.** Variación del volumen de retención en adición de heptan sulfonato de sodio 1M en la dispersión de hígado en polímero bondesil-env.

Se observa la tendencia lineal de desorción del benzo(a)pireno en el polímero bondesil-env conforme se aumenta el volumen de HSNa 1M adicionada. Se presenta muy buena correlación entre el volumen de retención y los  $\mu\text{L}$  de HSNa 1M adicionados.

El principal beneficio que se obtuvo con la incorporación del surfactante en la dispersión de matriz en fase sólida fue mejorar el porcentaje de recobro del benzo(a)pireno, no así, en la reducción considerable del volumen de disolvente de elución. Un beneficio adicional que se obtuvo fue la limpieza de los extractos con la fase polimérica, debido a que parte de los interferentes (grasas y proteínas) que persistían en extractos de otras fases estacionarias probadas, no se presentaron en la elución de analitos del polímero.

Debido a las escasas referencias existentes en las que se apliquen surfactantes en esta técnica, se requiere realizar más estudios del efecto de surfactantes en la desorción de analitos en este tipo de fases estacionaria, con analitos de polaridades semejantes.

#### **IV.12.5. Reproducibilidad en las curvas de los frentes de elución de benzo(a)pireno adicionada con HSNa 1M, en la dispersión de hígado en la fase bondesil-env**

En las tablas IV.34 se presenta la reproducibilidad [coeficiente de variación (c.v.)] de los parámetros calculados a partir de las curvas de frente de elución, obtenidos a partir de la adición de cantidades variables de HSNa 1M.

<b><math>\mu\text{L}</math> de HSNa 1M</b>	<b>Elución de benzo(a)pireno (coeficientes de variación n = 3)</b>	
	<b>Vf</b>	<b>Vr</b>
100	62.7%	9.33%
200	64.9%	4.62%
400	18.23%	11.90%

**Tabla IV.34.** Reproducibilidad n = 3 (coeficiente de variación) de los parámetros calculados a partir de los frentes de elución para benzo(a)pireno en los estudios de reproducibilidad de efecto de la cantidad de heptansulfonato de sodio 1M adicionada.

La reproducibilidad mostrada para cada parámetro calculado en cada ensayo, representó la alta variabilidad del método de preparación de muestra y su elución. Para el Vf se mostraron c.v. (s) muy altos, debido a que el porcentaje recuperado en el primer fraccionamiento no partía del mismo punto. En el Vm se presentó lo contrario, se consideró al último volumen del fraccionamiento añadido como el final de la elución del analito, al ya no presentar respuesta en el detector.



El inconveniente fue que, debido a la manera en como se estructuró la secuencia de elución, las fracciones empleadas fueron de 5 mL de disolvente, por esto no se observa con precisión el volumen total de elución. Por lo que, para obtener estos parámetros con certeza, se requerirá implementar otra metodología de fraccionamiento o de monitoreo de los extractos. Así, el único parámetro en que se obtuvo información con un c.v. apropiado para el análisis del comportamiento de elución de benzo(a)pireno por adición de HSNa 1M fue el  $V_r$ , con el que se construyó el gráfico presentado en la figura IV.32 en la que se mostró la correlación lineal que presenta la cantidad de HSNa 1M adicionada y el  $V_r$ .

# CONCLUSIONES

Aunque la Dispersión de Matriz en Fase Sólida comparte características similares a la Extracción en Fase Sólida, los factores que gobiernan el proceso en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida aun no han sido estudiados profundamente, ya que en algunos casos los analitos presentan comportamientos diferentes a los que se presentarían en Extracción en Fase Sólida.

Se demuestra con este trabajo que la naturaleza de la matriz, la naturaleza del eluente y la naturaleza de la fase estacionaria, juegan los papeles más importantes al igual que en la Extracción en Fase Sólida.

Las diferencias entre Extracción en Fase Sólida y Dispersión de Matriz en Fase Sólida son más evidentes cuando en esta última, algunos compuestos presentan retenciones muy fuertes, inclusive irreversibles, que no suceden en la Extracción en Fase Sólida. En algunos casos la naturaleza de la matriz, del analito y de la fase estacionaria interaccionan de tal manera que es difícil liberar a ciertos analitos de la columna. Además, en este caso se observó que la naturaleza de la muestra podría modificar el orden de elución de algunos de los analitos, suposición que se tendrá que verificar con más trabajo experimental.

El principal beneficio que se obtuvo con la incorporación del surfactante en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida fue mejorar el porcentaje de recobro del benzo(a)pireno, no así, en la reducción del volumen de disolvente de elución. Un beneficio adicional que se obtuvo, fue la limpieza de los extractos, debido a que parte de los interferentes (grasas y proteínas) que persistían en extractos de otras fases estacionarias probadas, no se presentaron en la elución de analitos del polímero bondesil-env. Debido a las escasas referencias existentes en las que se apliquen surfactantes en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida, se requiere realizar más estudios del efecto de surfactantes en la desorción de analitos en este tipo de fases estacionaria, con analitos de polaridades semejantes, aunque con diferentes estructuras químicas. Es evidente que el efecto en la modificación de la matriz por la adición de algunos agentes químicos es un factor a considerar en el estudio de los principios que gobiernan la Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

También en este trabajo se demostró que con los diferentes analitos y muestras utilizadas, se siguen conservando los principios generales de la cromatografía, puesto que se presentan los fenómenos de retención que se esperarían de una columna cromatográfica empacada con una fase inversa. Además se consiguió establecer las condiciones óptimas para la determinación de los analitos en el hígado y músculo de pescado. El sistema cromatográfico mostró muy buena linealidad, límites de detección, cuantificación y reproducibilidad para los analitos utilizados. El método de extracción presentó recobros cuantitativos y reproducibles.

# **BIBLIOGRAFÍA**

**Alcock, R.R., Jones, K.C., McLanchlan, M.S., Johnston, A.E., 1999.** *Response to comment on "Evidence for the presence of PCDD/Fs in the environment prior to 1900 and further studies on their temporal trends"* Environ. Sci. Technol. 33, 206-207.

**Anastassiandes, M. & Steven J. Lehotay. (2003).** *Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the determination of pesticide residues in produce.* Journal AOAC Int. 86 (2): 412-431.

**Baker, J.I., Hites, R.A., 1999.** *Comment on "Evidence for the presence of PCDD/Fs in the environment prior to 1900 and further studies on their temporal trends"* Environ. Sci. Technol. 33, 205.

**Barker S. A., Austin R. Long and Charles R. Short (1989).** *Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion.* Journal of Chromatography A, 475: 353-361.

**Barker S. A., Austin R. Long and Murray E II. (1993).** *Disruption and fractionation of biological materials by matrix solid-phase dispersion.* Journal of Chromatography A, 629 23-34.

**Barker S. A. (2000).** *Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis (Review).* Journal of Chromatography A, 880: 63-68.

**Barker S. A. (2000).** *Matrix solid-phase dispersion (Review).* Journal of Chromatography A, 885: 115-127.

**Blesa, J., J. M. Soriano, J. C. Moltó, R. Marín, J. Mañes. (2003).** *Determination of aflatoxins in peanuts by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography.* Journal of Chromatography A, 1011: 49-54.

**Carro A. M., R. A. Lorenzo, F. Fernández, R. Rodil and R. Cela. (2005).** *Multiresidue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion mass spectrometry gas chromatography.* Journal of Chromatography A, 1071(1-2): 93-98

**Colin F. Poole, Ajith D. Gunatilleka, Revathy Sethuraman (2000).** *Contributions of theory to method development in solid-phase extraction (Review).* Journal of Chromatography A, 885: 17-39.

**Conka, K., Drobn, B., Kocan. A., (2005).** *Simple solid-phase extraction method for determination of polychlorinated biphenyls and selected organochlorine pesticides in human serum.* Journal of Chromatography A, 1084, 1-2, 33-38.

**Criado, M. R., D. Hernández F., I. Rodríguez P. and R. Cela Torrijos. (2004).** *Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of polychlorinated biphenyls in fat by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection.* Journal of Chromatography A, 1056(1-2): 187-194.

**Crecenzi, C., S. Bayoundh, P. A., G. Cormack, T. Clein and K. Ensing. (2001).** *Determination of chenbuterol in bovine liver by combining matrix solid-phase dispersion and molecularly imprinted solid-phase extraction followed by liquid chromatography/electrospray ion trap multiple-stage mass spectrometry.* Anal. Chem. 73 (10): 2171-2177.

**Crouch, M. D. and Barker S. A. (1997).** *Analysis of toxic wastes in tissues from aquatic species, application of matrix solid-phase dispersion.* Journal of Chromatography A, 774: 287–309.

**CICOPLAFEST:** Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; Secretaria del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; Secretaria de Salud; Secretaria de Comercio y Fomento industrial. (1997). Catálogo Oficial de Plaguicidas. México D.F.

**Gaunt, P, and Barker S. A. (2000).** *Matrix solid-phase dispersion extraction of triazines from catfish tissues; examination of the effect of temperature and dissolved oxygen on the toxicology of atrazine.* International Journal of Environment and Pollution, 13 (1-6): 284-312.

**Garcinuño. R.M., L. Ramos, P. Fernández-Hernando, C. Cámara. (2004).** *Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples.* Journal of Chromatography A, 1041: 35–41.

**Handbooks of Amersham Pharmacia Biotech: Ion Exchange Chromatography, Affinity Chromatography, Hydrophobic Interaction Chromatography, Reversed Phase Chromatography,** Sweden, 2002.

**Hennion, M. C., Pichon, V. (1991).** *Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water.* Journal of chromatography A 553 : 329-343.

**Hennion, M. C. Cau-Dit-Coumes, C., Pichon, V. (1998).** *Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples. Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters.* Journal of chromatography A 823: 147-161.

**Hennion, M. C. (1999).** *Solid-phase extraction: Method development, sorbents and coupling with liquid chromatography.* Journal of chromatography A 856: 3-54.

**Hiddings J. Calvin, Eli Grohlea, Phyllir R Brown.** *Advances in chromatography* vol. 30. New York U.S.A.,1989.

**Huck C.W., G.K. Bonn. (2000).** *Recent developments en polymer-based sorbents for solid-phase extraction.* Journal of chromatography A 885: 51-72.

**Juhler Rend K. (1997).** *Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices.* Journal of Chromatography A, 786: 145-153.

**Kishida Kunihiro, Naoto Furusawa. (2001).** *Matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken.* Journal of Chromatography A, 937: 49–55.

**Kubala-Drincic, H., Davorin Bazulic, Jasenka Sapunar-Postruznic, Mirela Grubelic and Goran Stuhne. (2003).** *Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatographic determination of chloramphenicol in muscle tissue.* Journal Agric. Food Chem. 51(4): 871-875.

- Lagaña A.**, A. Bacaloni, M. Castellano, R. Curini, Ll. De Leva, A. Fabeli, and S. Materazzi. (2003). *Sample preparation for determination of macrocyclic lactone mycotoxin in fish tissue, based on On-line matrix solid-phase dispersion and solid-phase extraction clean up followed by liquid chromatography/ tandem mass spectrometry*. Journal AOAC int. 86 (4): 729-736.
- Ling Y. C.**, Chang M. Y. and Huang I. P. (1994). *Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography screening of polychlorinated biphenyls in fish*. Journal of Chromatography A, 669: 1-2 119-124.
- Liska I.** (2000). *Fifty years of solid-phase extraction in water analysis – historical development and overview (Review)*. Journal of Chromatography A, 885: 3-16.
- Marcé R.M.**, F. Borrull (2000). *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds (Review)*. Journal of Chromatography A, 885: 273-290.
- Martínez A.**, M. Ramil, R. Montes, D. Hernanz, E. Rubí, I. Rodríguez and R. Cela Torrijos. (2005) *Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls in biota samples using gas chromatography with electron-capture detection*. Chromatography A, 1072: 83-91.
- Navarro M.**, Y. Picó, R. Marín, J. Mañes. (2002). *A pplication of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables*. Journal of Chromatography A, 968: 201-209
- Noble, A.** (1993) *Partition coefficients (n-octanol-water) for pesticides*. Journal of Chromatography, 642: 3-14.
- Pensado L.**, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela (2005). *Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples*. Journal of Chromatography A, 1077: 103-109.
- Reid Kendra R.**, Lonnie J. Kennedy, Eric W. Crick<sup>1</sup>, Eric D. Conte (2002). *Solid-phase extraction sorbent consisting of alkyltrimethylammonium surfactants immobilized onto strong cation-exchange polystyrene resin*. Journal of Chromatography A, 975: 135-143.
- Ruiz, M. J.**, Cameán Ana Ma, Moreno M. I. and Picó Y. (2005). *Determination of microcystins in biological samples by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography mass spectrometry determination*. Journal of Chromatography A, 1073 (1-2): 257-262.
- Sabik, H.** Jeannot, R., Rondeau, B. (2000) *Multiresidues methods using solid-phase extraction techniques for monitoring priority pesticides, including triazines and degradation product, in ground and surface waters*. Journal of Chromatography A, 855: 217-2362.
- Skoog, D.** (1988). *Fundamentals of analytical chemistry*. Principles. Saunders college publishins, Fifth edition., 602-606.
- Snyder, Llord R.** (1979). *Introduction to modern liquid chromatography*.

**Smith, R. M.** (2003). *Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques (Review)*. Journal of Chromatography A, 1000: 3–27.

**Soler Carla** , Jordi Mañes, Yolanda Picó. (2005). *Routine application using single quadrupole liquid chromatography–mass spectrometry to pesticides analysis in citrus fruits*. Journal of Chromatography A, 1088: 224–233.

**The Merck Index.** (1989). *Encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals*, Eleventh edition.

**Valenzuela A. I.**, R. Lorenzini, M.J. Redondo, G. Font.( 1999). *Matrix solid-phase dispersion microextraction and determination by high-performance liquid chromatography with UV detection of pesticide residues in citrus fruit*. Journal of Chromatography A, 839: 101–107

**Walker, C. C.** Heidi M. Lott and S. A. Barker. (1999). *Matrix solid-phase dispersion extraction and analysis of drugs and environmental pollutants in aquatic species (Review)*. Journal of Chromatography A, 642: 225–242.

**Willard, HH.**, Instrumental Methods of Analysis, Wadsworth, Inc., U.S.A., 1988.

**Yost R. W.** (1980). Introducción a la cromatografía líquida práctica. Capítulos 3, 6.

**Zhang Lei**, Yuan Liu, Meng-Xia Xie , Yue-Ming Qiu. (2005). *Simultaneous determination of thyreostatic residues in animal tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1074: 1–7.

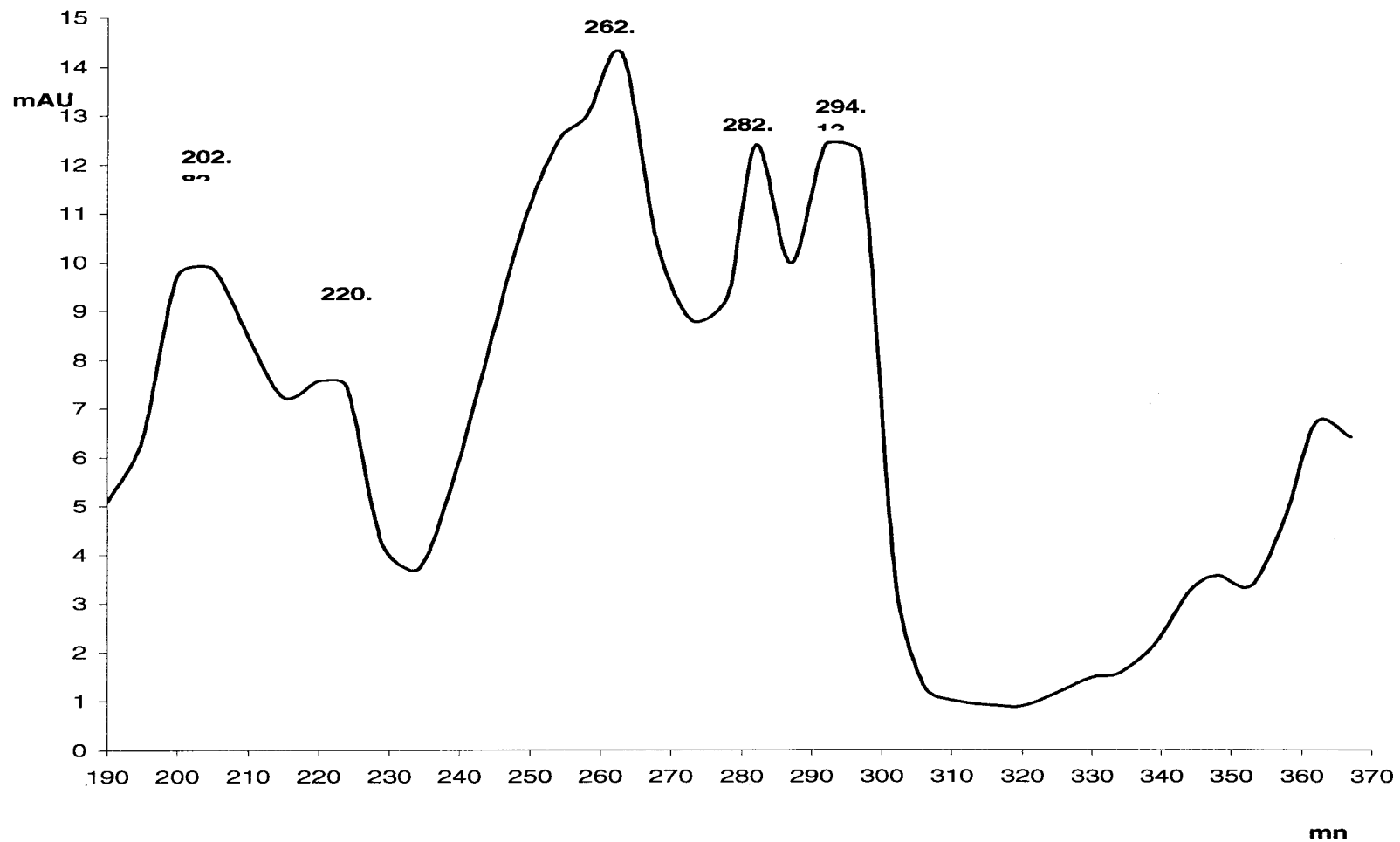
**Zhao M.**, F. van der Wielen, P. de Voogt (1999). *Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylates in biological tissues*. Journal of Chromatography A, 837: 129–138.

**Zhao-Yang Li**, Zhi-Chao Zhang, Qi-Lin Zhou, Ru-Yu Gao, Qin-Sun Wang (2002). *Fast and precise determination of phenthoate and its enantiomeric ratio in soil by the matrix solid-phase dispersion method and liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 977: 17–25.

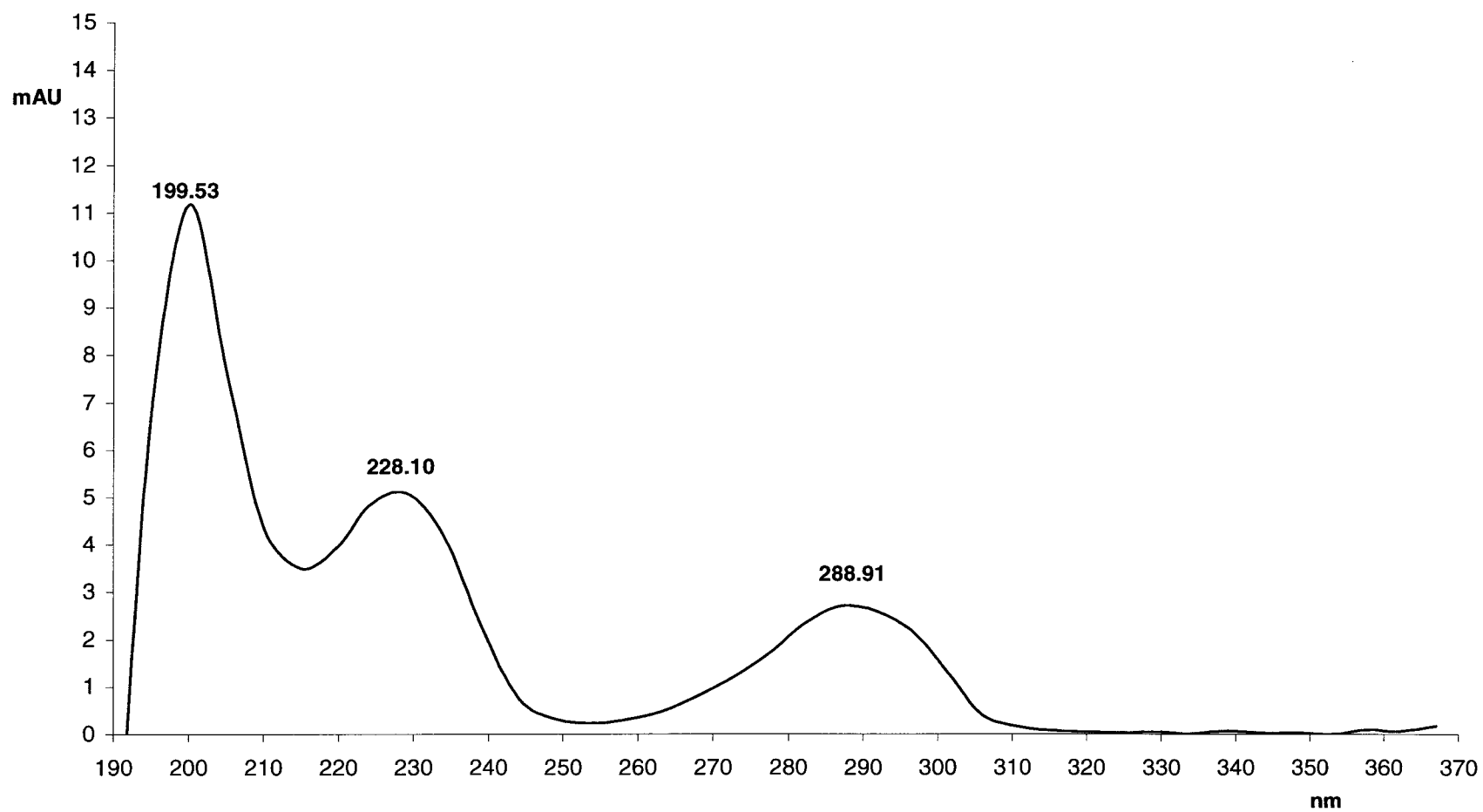
Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. Sede de las Naciones Unidas, en Nueva York, del 24 de mayo de 2001 al 22 de mayo de 2002.



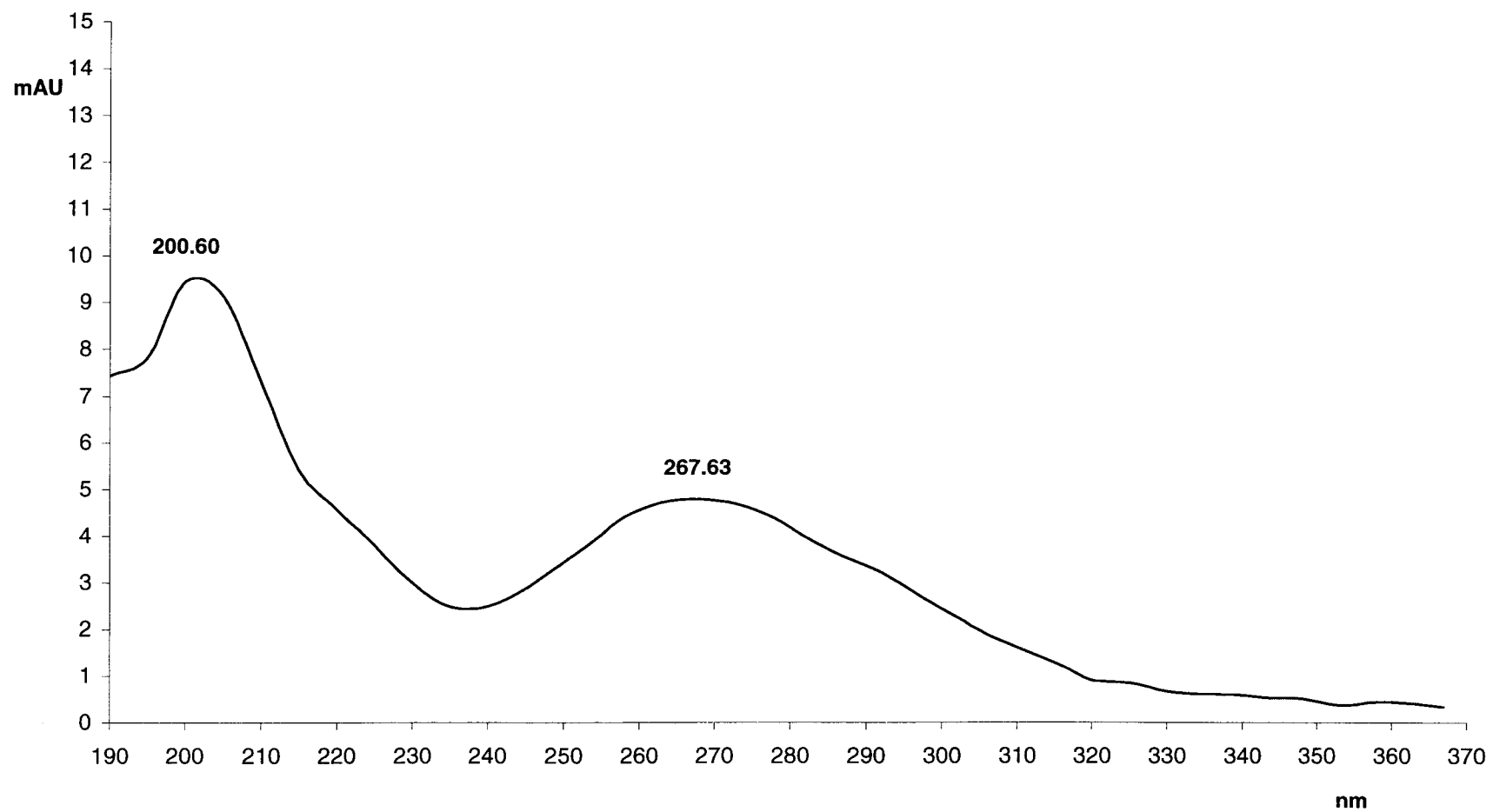
**ANEXO**



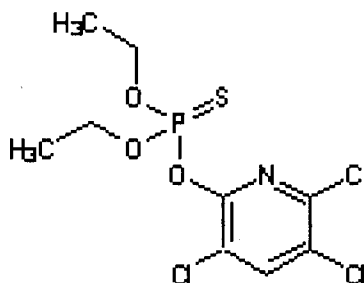
**Figura A1.** Espectro de absorción de benzo(a)pireno a una concentración de 1 mg/L, en el intervalo de 190 a 367 nm



**Figura BI.** Espectro de absorción de clorpirifos a una concentración de 1 mg/L, en el intervalo de 190 a 367 nm



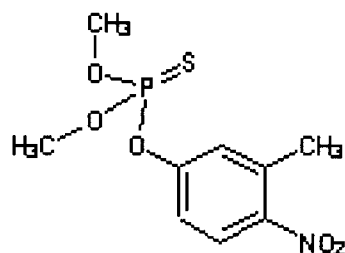
**Figura CI.** Espectro de absorción de fenitrotión a una concentración de 1 mg/L, en el intervalo de 190 a 367 nm



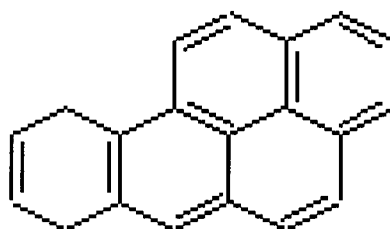
**Nombre común:** clorpirifos, dursban  
**Nombre IUPAC:** O, O-dietil O-3,5,6 tricloro-2-piridil fosforotioato

#### Propiedades físico-químicas

**Peso molecular:** 350.58 g/mol  
**Fórmula molecular:** C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>Cl<sub>3</sub>NO<sub>3</sub>PS  
**Forma:** cristales incoloros, con un olor a mercaptanos  
**Punto de fusión:** 42-43.5 °C  
**Presión de vapor:** 2.5 mPa (25 °C)  
**Densidad:** 1.116-1.118 g/L (25 °C)  
**Log P** 4.7  
**Absorbancia máxima en UV:** 200, 229, 289 nm  
**Solubilidad:** 2 mg/L de agua (25 °C), 6.5 g/kg de acetona, 7.9 g/kg de benceno, 450 g/kg de metanol  
**Estabilidad:** La velocidad de hidrólisis en agua incrementa con el pH, la temperatura, la presencia de cobre y posiblemente con otros metales puede formar quelatos  
**Usos:** Para el control de moscas, mosquitos (larvas y adultos), presencia en suelo de 60-120 días  
**Análisis:** Por CLAR con detección UV y CG-EM  
**Modo de acción:** Insecticida no sistémico y acaricida, acción en el sistema respiratorio, digestivo y por contacto. Inhibidor de la acetilcolinesterasa  
**Toxicología:** DL<sub>50</sub> oral para ratas 135-163 mg/kg



<b>Nombre común:</b>	fenitrotión, metolnitrofos
<b>Nombre IUPAC:</b>	O, O-dimetil O-(3-metil-4-nitrofenil)fosforoditioato
<b>Propiedades físico-químicas</b>	
<b>Peso molecular:</b>	277.23 g/mol
<b>Fórmula molecular:</b>	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>5</sub> P <sub>2</sub> S
<b>Forma:</b>	Líquido amarillo o ligeramente café o ambar
<b>Punto de fusión:</b>	140-145 °C
<b>Presión de vapor:</b>	18 mPa (20 °C)
<b>Densidad:</b>	1.32-1.34 g/mL
<b>Log P</b>	3.43
<b>Absorbancia máxima en UV:</b>	200, 268 nm
<b>Solubilidad:</b>	14 mg/L de agua (25 °C), > 1g/kg de diclorometano, metanol, xileno y 42 g/kg de hexano
<b>Estabilidad:</b>	Estable por 2 años a temperatura entre 20-25 °C, hidrolizado en álcalis a 30 °C, 50% de la pérdida ocurre en 4.5 h en una solución de 10 M de NaOH
<b>Usos:</b>	Potente insecticida por contacto, efectivo contra una amplia variedad de plagas como insectos chupadores y masticadores (del café o trigo)
<b>Análisis:</b>	CG-DTI
<b>Toxicología:</b>	DL <sub>50</sub> oral para ratas 250-800 mg/kg



**Nombre común:** benzo(a)pireno  
**Nombre IUPAC:** 3,4-Benzopireno

#### Propiedades físico-químicas

**Peso molecular:** 252.3 g/mol  
**Fórmula molecular:** C<sub>20</sub>H<sub>12</sub>  
**Forma:** Polvo o cristales amarillo pálido, inodoro  
**Punto de fusión:** 179-179.3 °C  
**Presión de vapor:** 8.7 mPa (20 °C)  
**Densidad:** 1.4 g/mL  
**Log P** 6.04  
**Absorbancia máxima en UV:** 202.8, 220.2, 262, 282.8, 294.1 nm  
**Solubilidad:** Benceno, tolueno, xileno, metanol, insoluble en agua  
**Análisis:** CG-DTI

#### Ejemplo de cálculo con datos experimentales:

Datos: fortificación con 40 µL de disolución 100 ppm de benzo(a)pireno, fracción de 1 mL de la elución con acetonitrilo 100 %, inyección de 20 µL.

$$\left[ \frac{\text{área}_{\text{muestra}}}{\text{área}_{\text{estándar}}} \right] \left[ \frac{\text{ng}_{\text{inyectados}}}{\mu\text{L}_{\text{inyectados}}} \right] \left[ \frac{\mu\text{L}_{\text{fracción analizada}}}{\text{ng}_{\text{fortificado}}} \right] 100$$

$$\left[ \frac{34671}{29531} \right] \left[ \frac{20 \text{ ng}}{20 \mu\text{L}} \right] \left[ \frac{1000 \mu\text{L}}{4000 \text{ ng}} \right] 100 = 29.35 \%$$

En la tabla AII se presentan los porcentajes de recobro acumulado en función de los mL de eluente acetonitrilo 100% de dispersiones de hígado en los diferentes adsorbentes que se ilustra en la figura IV.12 donde se presenta el gráfico de % de recobro acumulado de benzo(a)pireno en función del volumen de eluente en los diferentes adsorbentes.

mL de acetonitrilo 100 %	fase estacionaria			
	octil silano Supelclean	octadecil silano Supelclean	octadecil silano Chromabond	polímero bondesil-env
1	37.68	29.72	16.02	0
2	67.35	69.23	85.14	0
3	72.18	81.76	98.04	1.11
4	73.66	88.50	99.97	2.60
5	<b>74.68</b>	92.40	99.97	4.07
6	74.68	94.80	99.97	5.55
7	74.68	<b>95.26</b>	99.97	7.03
8	74.68	95.26	99.97	8.51
9	74.68	95.26	99.97	9.99
10	74.68	95.26	99.97	<b>11.47</b>

Tabla AII. Porcentajes de recobro acumulado de la elución de benzo(a)pireno con acetonitrilo 100% de dispersión de hígado en los diferentes adsorbentes.

En la tabla BII se presentan los porcentajes de recobro acumulado en función de los mL de eluente 80:20 acetonitrilo:agua de dispersiones de hígado en los tres diferentes adsorbentes que se ilustra en la figura IV.19 donde se presentan los frentes de elución con una mezcla 80:20 acetonitrilo:agua, para benzo(a)pireno disperso en octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond.

mL 80:20 acetonitrilo:agua	octil silano Supelclean	octadecil silano Supelclean	octadecil silano Chromabond
	% de recobro acumulado		
1	14.08	8.82	5.47
2	20.71	33.22	28.52
3	27.35	52.16	54.97
4	37.62	62.17	73.06
5	43.50	67.07	79.05
6	45.71	69.55	81.26
7	47.03	70.75	82.76
8	<b>47.78</b>	<b>71.74</b>	<b>83.34</b>
9	47.78	71.74	83.34
10	47.78	71.74	83.34

Tabla BII. Porcentajes de recobro acumulado de la elución de benzo(a)pireno con una mezcla de 80:20 acetonitrilo:agua de dispersión de hígado en los tres diferentes adsorbentes.



En la tabla CII se presentan los porcentajes de recobro acumulado en función de los mL de eluente 80:20 acetonitrilo:agua de dispersiones de músculo en los tres diferentes adsorbentes que se ilustra en la figura IV.20 donde se representan los frentes de elución para benzo(a)pireno disperso en octil silano supelclean, octadecil silano supelclean y octadecil silano chromabond.

mL 80:20 acetonitrilo:agua	octil silano Supelclean	octadecil silano Supelclean	octadecil silano Chromabond
	% de recobro acumulado		
1	5.68	0.58	0.75
2	37.11	19.0	15.63
3	44.27	48.35	38.18
4	46.82	64.31	61.97
5	48.22	70.77	80.78
6	49.32	72.75	90.74
7	50.15	73.65	94.15
8	<b>50.89</b>	<b>74.18</b>	<b>95.71</b>
9	50.89	74.18	95.71
10	50.89	74.18	95.71

Tabla CII. Porcentajes de recobro acumulado de la elución de benzo(a)pireno con una mezcla de 80:20 acetonitrilo:agua de dispersión de músculo en los tres diferentes adsorbentes.

En la tabla DII se presentan los porcentajes de recobro acumulado en función de los mL de eluente 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua de las dispersiones de hígado en octadecil silano speleclean. Los frentes de elución se ilustran en ls figuras IV.27 y IV.28.

mezcla de disolventes	80:20 metanol:agua % acumulado de recobro			80:20 acetonitrilo:agua % acumulado de recobro		
	mL	fenitrotión	clorpirifos	benzo(a)pireno	fenitrotión	clorpirifos
1	0	0	0	0	0	0
2	2	0	0	5	2	0
3	25	3	0	49	12	9
4	65	8	3	83	25	33
5	80	15	9	94	38	52
6	92	23	18	94	50	62
7	95	31	32	94	62	67
8	95	38	53	94	75	69
9	95	43	53	94	84	70
10	95	46	53	94	89	71

Tabla DII. Porcentajes de recobro acumulado de la elución de cada uno de los compuestos con 80:20 acetonitrilo:agua y 80:20 metanol:agua.