



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

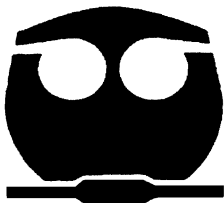
“Desarrollo de un método analítico para la determinación de trazas de pesticidas organofosforados por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en *Ambystoma mexicanum*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

LEOPOLDO CRUZ REYES



MÉXICO D.F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado:

PRESIDENTE	BERNARDO LUCAS FLORENTINO
VOCAL	ELBA ROJAS ESCUDERO.
SECRETARIO	MARTHA PATRICIA GARCIA CAMACHO.
1ER. SUPLENTE	INES MIRANDA MARTINEZ.
2DO. SUPLENTE	MINERVA CARRASCO FUENTES.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 3D (anexo), departamento de Química analítica, edificio A Facultad de
Química UNAM:

Asesor del tema:

Dra. Martha Patricia García Camacho

Sustentante:

Leopoldo Cruz Reyes



AGRADECIMIENTOS _____

A los proyectos PAPIIT IN203302-32. y PAPIIT-IN205707-2. de la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA), de la UNAM por el apoyo otorgado.

A la Dra. Cecilia Vanegas y a la Dra. Cecilia Robles del Laboratorio de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias, por las muestras de ajolote donadas para el proyecto.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho, por su orientación, su infinita paciencia y su apoyo otorgado para la realización y finalización de esta tesis.



AGRADECIMIENTOS _____

He llegado al final de una bella etapa en mi vida y en mi han quedado marcadas huellas muy profundas durante este recorrido, por lo cual, quiero expresar un profundo agradecimiento a quienes con su ayuda, apoyo y comprensión me alentaron a lograr una meta mas en mi vida.

A Dios... .

Por darme el don de la vida, por ser un amigo incondicional, por los momentos en los cuales me escuchaste y pude disfrutar de tu presencia con lo cual aliviaste mi alma, por nunca dejarme solo, por todas tus bendiciones y por no dejarme caer nunca. Por cuidar a toda mi familia en mi ausencia. GRACIAS.

A la Virgen de Guadalupe... .

Por colmarme de tantas bendiciones, por cuidarme, por demostrarme tantas veces tu existencia, y con ello darme fuerzas para salir delante de cada dura prueba a la que tuve que afrontar, que sin tu apoyo hoy no podría seguir adelante. Porque todo lo que tengo y lo que recibo es regalo que tú me has dado. GRACIAS MADRE MIA.



AGRADECIMIENTOS _____

A MI MAMÁ... .

Por darme día a día tus atenciones y sobre todo tu amor de madre. A quien sin escatimar esfuerzo alguno ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos trazados.

Porque jamás existirá una forma de agradecerte tu cariño, guía y apoyo para llegar a realizar uno de los anhelos más grandes de la vida, fruto de tu inmenso amor y confianza que en mi depositaste. Por tu ejemplo de superación incansable, por tu comprensión, por esto y mucho más. GRACIAS MAMÁ

A MI PADRE....

Porque de ti aprendí a darle el valor a las cosas, de saber diferenciar entre lo que solo puede durar por un día y lo que es para toda la vida. Porque constituyes una parte fundamental en el legado más grande que pudiera recibir de tu parte mi educación y por lo cual estaré eternamente agradecido. Por tu ejemplo de superación incansable, por tu comprensión, por esto y mucho más. GRACIAS PAPA

A MIS HERMANAS... .

Porque con ustedes he convivido gran parte de mi vida, porque me han dado su cariño y amistad y sobre todo porque me han apoyado en mis decisiones que he tomado en mi vida. GRACIAS OLGA Y ROSA.



AGRADECIMIENTOS _____

A MIS CARNALES... .

Porque dios no medio la bendición de contar con hermanos de sangre, pero si me puso en el lugar en donde los podría encontrar, han sido para mí eso mis carnales, han compartido conmigo momentos de alegría, de tristeza y hasta hoy aun siguen junto a mí. GRACIAS POR ESTAR AUN AQUÍ, ERNESTO, EDGAR, JORGE, ALBERTO.

A MIS AMIGOS... .

A Araceli Castillo Núñez y Nelly Mendoza Monrroy por ser mis amigas incondicionales, por compartir momentos muy hermosos y sobre todo por estar conmigo cuando más lo requería, por escucharme y siempre tener palabras de aliento para seguir adelante. GRACIAS.

Sin importar el orden de aparición y es porque es su nombre el que se me aparece en este momento, quiero agradecerles el darme momentos de alegría y hacer que mi estancia en la facultad sea más llevadera, a todos ustedes.

CARLOS, POLLO, REX, CRISTIAN, MIRIAN, OFELIA, AZUL, ANTONIO, MARTIN, CHULETÓN, PALENCIA, REY, CHOCO, CHINO, SANDRA, LA JEFA, ERICK, JUAN, FRODO, MAGALY, LEONARDO, BRENDA, MARIANA, MIMOSO, VALTER, JULIO, NORA, RA, Y OTROS. GRACIAS.

A LOS PROFESORES... .

De la Facultad de Química UNAM, que contribuyeron en mi formación, porque confiaron en mí y sobre todo porque fueron personas que influyeron en mi formación como profesionista y como persona. GRACIAS.



AGRADECIMIENTOS _____

Cuando se ha llegado al final de una etapa y se comienza con otra, solo se quiere que esa transición se lleve a cabo al lado de las personas que se ama mucho, es por eso que ha ustedes los deje al último y no es porque son menos importantes sino que son los que requieren de una mención aparte.

A MI ESPOSA... .

A mi amiga, que durante esa pequeña etapa de nuestras vidas, me demostró que puedo confiar en ella, abrir mi alma y mi corazón para contarte todo y ser mi confidente, en la etapa de novios no solo se nos fundió nuestros corazones en uno solo, sino que logramos adaptarnos muy bien comenzamos a ser cómplices de un sinfín de travesuras y que hoy en la etapa de esposos, tenemos que lograr superar este largo camino que encontramos con un sinfín de obstáculos y solo así ser lo que ambos queremos llegar a ser una sola ALMA.

GORETTY, porque tu constante estímulo es para mí un aliciente más para poder seguir en este camino, por ser una parte muy importante en mi vida, por ayudarme a ser una mejor persona día a día.

Solo deseo que entiendas que un logro mío, es un logro tuyo, que mi esfuerzo es inspirado en ti y que mi único ideal eres tú.

GRACIAS, ALMA GORETTY, TE AMO.



AGRADECIMIENTOS _____

A MI HIJO...

Por ser un pedacito de cielo, una pequeña parte de un paraíso que dios me envió, para hacerme el hombre más feliz y realizado del mundo, gracias porque nunca pensé que de tan pequeño angelito emanara tanta fuerza y entusiasmo para sacar adelante a alguien, para saber que aun hay esperanza de una vida mejor, por ser un motor que me impulsa a lograr alcanzar mis metas trazadas,

Por enseñarme a enfrentar con una sonrisa los obstáculos que en mí vida se crucen.

GRACIAS, LUIS ANGEL TE QUIERO MUCHO.



ÍNDICE.



ÍNDICE

GENERAL

INTRODUCCIÓN.	1
OBJETIVOS.	4
CAPITULO 1.	6
ANTECEDENTES	
1.1. GENERALIDADES SOBRE LA CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS A NIVEL AMBIENTAL Y EN LOS ALIMENTOS.	7
1.2. PROPIEDADES DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.	9
1.2.1. Estructura química y propiedades físico-químicas.	10
1.2.2. Toxicología.	11
1.2.3. Metabolismo.	13
1.3. DESCRIPCIÓN Y PRINCIPIOS DE LA DMFS.	14
1.4. APLICACIONES DE LA DMFS EN LA EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.	18
1.5. COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA DE DMFS CON OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN ALIMENTOS.	20
1.6. PRINCIPIOS BÁSICOS E INSTRUMENTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA.	21
1.6.1. Generalidades.	21
1.6.2. Parámetros.	23
1.6.3. Cromatografía de líquidos.	25



ÍNDICE

1.7. CARACTERÍSTICAS DEL AJOLOTE.	31
1.7.1 . Biología.	31
1.7.2. Importancia ecológica	33
1.7.3. Estudios toxicológicos con pesticidas u otros contaminantes en anfibios.	34
1.8. NORMATIVIDAD E INVESTIGACIÓN EN MÉXICO.	36
CAPITULO 2. METODOLOGÍA.	37
DESARROLLO EXPERIMENTAL.	38
2.1. MATERIAL Y EQUIPO.	38
2.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE LOS PESTICIDAS.	40
2.3. DETECCIÓN Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS PESTICIDAS.	40
2.3.1. Condiciones óptimas de detección.	40
2.3.2. Optimización de los gradientes de elución para la retención cromatográfica de los pesticidas organofosforados.	41
2.3.3. Linealidad, precisión, límites de detección y de cuantificación del sistema cromatográfico.	42
2.4. DESARROLLO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.	43
2.4.1. Ensayos preliminares.	43
2.4.1.1. DMFS con estándares sin muestra.	43
2.4.1.2. DMFS con estándares y con muestra (músculo de ajolote).	45



ÍNDICE

2.4.1.3. Limpieza en los ensayos preliminares.	45
2.4.2. Ensayos finales.	46
2.4.2.1. Establecimiento de las condiciones de extracción.	46
2.4.2.1.1. Elución en los ensayos sin muestra.	46
2.4.2.1.2. Elución en los ensayos con muestra.	47
2.4.2.2. Linealidad y precisión del método de extracción final (sin evaporación).	48
2.4.2.3. Evaporación.	49
2.4.2.4. Comparación entre el uso de la sílice SUPELCO y la sílice BAKER como adsorbentes de limpieza del extracto.	50
2.4.2.5. Filtración del evaporado.	51
2.5. EVALUACIÓN DEL MÉTODO.	51
2.5.1. Linealidad y precisión.	51
2.5.2. Exactitud en los estudios de recobro.	52
2.5.3. Límites de detección y cuantificación.	52
2.6. APLICACIÓN DEL MÉTODO.	53
2.6.1. Análisis de muestras fortificadas de hígado.	53
2.6.2. Análisis de muestras de organismos expuestos.	53
CAPITULO 3.	54
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	
3.1. DETECCIÓN Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS PESTICIDAS.	55
3.1.1. Condiciones óptimas de detección.	55



ÍNDICE

3.1.2. Optimización de los gradientes de elución para la retención cromatográfica de los pesticidas organofosforados.	56
3.1.3. Linealidad, precisión y límites de detección del sistema cromatográfico.	58
3.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.	60
3.2.1. Ensayos preliminares.	60
3.2.1.1. DMFS con estándares sin muestra.	60
3.2.1.2. DMFS con estándares y con muestra (músculo de ajolote).	63
3.2.1.3. Limpieza en los ensayos preliminares.	65
3.2.2. Ensayos finales.	66
3.2.2.1. Establecimiento de las condiciones de extracción.	66
3.2.2.1.1. Elución en los ensayos sin muestra.	66
3.2.2.1.2. Elución en los ensayos con muestra.	67
3.2.2.2. Linealidad y precisión del método de extracción final (sin evaporación).	69
3.2.2.3. Evaporación.	71
3.2.2.4. Comparación entre el uso de la sílice SUPELCO y la sílice BAKER como adsorbentes de limpieza del extracto.	72
3.2.2.5. Filtración del evaporado.	73
3.2.3. Protocolo completo de extracción.	74
3.3. EVALUACIÓN DEL MÉTODO.	77
3.3.1. Linealidad y precisión.	77
3.3.2. Exactitud en los estudios de recobro.	78



ÍNDICE

3.3.3. Límites de detección y cuantificación.	80
3.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO.	80
3.4.1. Análisis de muestras fortificadas de hígado.	80
3.4.2. Análisis de muestras de organismos expuestos.	82
CONCLUSIONES.	84
ANEXOS.	86
BIBLIOGRAFÍA.	91



DE TABLAS:

No. de tabla		Pág.
1.1	Clasificación de los pesticidas organofosforados de acuerdo a los sustituyentes de los átomos de hidrógeno en el ácido fosfónico o fosfórico [Lacorte and Barcelo, 2000; Hassall, 1990].	10
1.2	Toxicología de algunos pesticidas organofosforados [CICOPLAFEST, 1997; The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 1994].	12
1.3	Aplicación de la técnica de DMFS en tejidos animales y de plantas (2002-2005).	19
3.1	Longitudes de onda de máxima absorción y de cuantificación de los pesticidas organofosforados.	56
3.2	Parámetros de retención de los pesticidas en la columna de sílice C-18, con los dos gradientes utilizados.	56
3.3	Resolución entre los picos de los pesticidas con el gradiente B.	57
3.4	Diferencia de la selectividad (α), de los pesticidas con el gradiente A y con el gradiente B.	57
3.5	Reproducibilidad del sistema cromatográfico. Coeficiente de variación (%), (n=3).	59
3.6	Limites de detección y de cuantificación del sistema cromatográfico.	60
3.7	Promedio de los porcentajes recuperados en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 100% para eluirlos. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	61
3.8	Promedio de los porcentajes recuperados en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 90% para eluirlos. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	62



ÍNDICE

3.9	Promedio de los porcentajes recuperados en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 80% para eluirlos. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	62
3.10	Resultados de los recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 80% para eluirlos. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre. (n=2)	63
3.11	Resultados de los recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 90% para eluirlos. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre. (n=2)	63
3.12	Resultados de los recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 100% para eluirlos. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre. (n=2)	64
3.13	Coeficientes de variación de los analitos con el protocolo preliminar.	64
3.14	Porcentajes recuperados, para la extracción de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares, (sin muestra) y ACN al 100%, para eluirlos. Colocando 100 mg de sílice virgen como co-columna. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	65
3.15	Recobros promedio de dos ensayos para la extracción de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 100%, para eluirlos. Colocando 100 mg de sílice virgen como co-columna. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	65
3.16	Porcentajes recuperados de la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares, sin muestra y ACN al 100% (2 g C-18 + 0.5g de sílice virgen). Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	66
3.17	Porcentajes recuperados de las sub-fracciones de 3 ensayos, en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 100%. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de	67



ÍNDICE

	solución madre.	
3.18	Recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 100% para eluirlos colocando 500mg de sílice virgen como co-columna. Fortificando con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre.	68
3.19	Reproducibilidad del sistema cromatográfico. Coeficiente de variación (%).	70
3.20	Recobros en la evaporación de 6 mL de una disolución de los pesticidas organofosforados a una concentración de 5 mg/L de fentión y clorpirifos y 2.5 mg/L de metil paratión. Elución con ACN al 100% (promedio de 3 inyecciones).	71
3.21	Porcentajes obtenidos de la limpieza de extractos con 2 sílices diferentes. Ensayos sin muestra. (n=2)	72
3.22	Recobros obtenidos de la limpieza de extractos con 2 sílices diferentes. Ensayos con muestras fortificadas.(n=3)	73
3.23	Recobros de los analitos en extractos limpiados con sílice BAKER y filtrados.(n=3)	73
3.24	Reproducibilidad del método utilizando muestras fortificadas a una concentración de 15 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 7.5 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión. (n=3).	78
3.25	Recobro (%) de los pesticidas en estudio.	78
3.26	Exactitud del método (cantidad adicionada vs cantidad recuperada).	79
3.27	Limites de detección y cuantificación en el sistema cromatográfico para el método desarrollado.	80
3.28	Recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas de hígado y ACN al 100% para eluirlos.	82



DE FIGURAS:

No. de Figura		Pág.
1.1	Pasos generales para realizar la DMFS.	17
1.2	Componentes básicos de un sistema para CLAR.	27
1.3	Ajolote en cautiverio.	31
3.1	Espectros de absorción de los pesticidas organofosforados, en el intervalo de 190 a 367 nm.	55
3.2	Respuesta del detector en función de la concentración de los pesticidas en estudio, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fentiión a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.	58
3.3	Respuesta del detector en función de la concentración de los pesticidas en muestras fortificadas sin evaporación, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fentiión a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.	70
3.4	Protocolo completo para la determinación de trazas de pesticidas organofosforados por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida – Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en <i>Ambystoma mexicanum</i> .	75
3.5	Cromatogramas de los plaguicidas organofosforados en estudio a diferentes longitudes de onda de detección, en músculo de ajolote. Columna VARIAN de 150x4.60 mm empacada en fase inversa RES ELUT C18, con un tamaño de partícula de 5 µm; flujo de 1mL min ⁻¹ ; gradiente de metanol:agua inicial 75:25, hasta 100% en 17.5 min. Concentración de los pesticidas de 60 µg/g para fentiión y clorpirifos y de 30 µg/g para metil paratiión, con un volumen de inyección de 20 µL. Detección por espectrofotometría UV a la longitud de absorción máxima de cada compuesto. Identificación de los picos; 1) Metil paratiión, 2) Fentiión y 3) Clorpirifos.	76
3.6	Respuesta del detector en función de la concentración de los pesticidas en muestras fortificadas con el método desarrollado, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fentiión a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.	77



ÍNDICE

- 3.7 Respuesta del detector en función de la concentración adicionada vs cantidad recuperada de los pesticidas en muestras fortificadas con el método desarrollado, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fentión a 254 nm y clorpirifos a 287 nm. 79
- 3.8 Cromatograma de los pesticidas organofosforados en estudio en hígado de ajolote fortificado, a las 3 longitudes de onda de estudio de los pesticidas una muestra sin fortificar. Columna VARIAN de 150x4.60 mm empacada en fase inversa RES ELUT C18, con un tamaño de partícula de 5 μm . flujo de 1mL min^{-1} ; gradiente de metanol:agua inicial 75:25, hasta 100% en 17.5 min. Concentración de los pesticidas de 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión, con un volumen de inyección de 20 μL . Detección por espectrofotometría UV a la longitud de onda de absorción máxima de cada compuesto, 273 nm para metil paratión, 254 nm para fentión y 287 nm para clorpirifos. 81
- 3.9 Cromatogramas (a) extracto proveniente de un organismo no expuesto a clorpirifos y, (b) extracto proveniente de un organismo expuesto a clorpirifos. Detección a 287 nm. Condiciones cromatográficas como en la Figura 3.3. 83



GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
CITES	Convenio Internacional de Tráfico de Especies
DMFS	Dispersión de la Matriz en Fase Sólida
EFS	Extracción en Fase Sólida
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
DAD	Detección de Arreglo de Diodos
LMR	Límite Máximo Residual
IDA	Ingesta Diaria Admisible
LD ₅₀	Dosis Letal que mata al 50%
C ₁₈	Octadecilsilano
C ₈	Octilsilano
PCBs	Bifenilos Policíclicos (por sus siglas en inglés)
PBDEs	Éteres Difeníl Polibromados (por sus siglas en inglés)
PAHs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (por sus siglas en inglés)
CG	Cromatografía de gases
DCE	Detector de captura de electrones
DNP	Detector nitrógeno fósforo
DFF	Detector fotométrico de flama
EM	Espectrometría de masas
R _s	Resolución cromatográfica
t _R	Tiempo de retención del soluto
W	Ancho de la base del pico cromatográfico
α	Selectividad
N	Número de platos teóricos o eficiencia
k'	Factor de capacidad
K _A	Constante de distribución del soluto
V _s	Volumen del soluto en la fase estacionaria
V _m	Volumen del soluto en la fase móvil
t ₀	Tiempo muerto
H	Altura del plato teórico
K _B	Constante de distribución de la especie más retenida
K _A	Constante de la especie menos retenida
UICN	Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza
C V	Coeficiente de Variación
RSD	Desviación Estándar Relativa (por sus siglas en inglés)



INTRODUCCIÓN.



INTRODUCCIÓN

A medida que el hombre busca su bienestar para lograr tener una vida más cómoda, y no carecer de alimento, no ha considerado todo lo que puede causar con el fin de lograr dicho objetivo. Así por ejemplo, uno de los “beneficios” que se tiene hoy en día es el uso de pesticidas en el campo, puesto que evitan que las plagas terminen con las cosechas, así como que enfermen a los animales. Sin embargo, el uso de estos compuestos también ha resultado ser perjudicial por sus efectos dañinos, que aun siendo estudiados en la actualidad, no se tiene el conocimiento completo sobre el impacto que causan en el medio ambiente, sobre su eliminación o acumulación, tanto en los animales como en las plantas y en el ecosistema en general.

Una de las consecuencias de la contaminación del medio ambiente con productos nocivos, es la disminución de las poblaciones de plantas y de animales, como en el caso del ajolote *Ambystoma mexicanum*, el cual es un anfibio que pertenece a la familia de las salamandras, especie única en el mundo, que constituye un eslabón alimenticio importante en los lagos de la altiplanicie mexicana, especialmente en los ecosistemas del lago de Xochimilco y de Chalco. Este peculiar animal, también es importante desde el punto de vista cultural y alimenticio porque en la época prehispánica era apreciado como un manjar exquisito, ya que su sabor es parecido al de la anguila. Medicinalmente, se acostumbraba comerlos en caldo para fortalecer al sistema inmune. El jarabe del ajolote se empleaba como reconstituyente, de la misma manera que hasta hace muy poco se utilizó el aceite de hígado de bacalao. [<http://es.wikipedia.org/wiki/Ajolote>].

En la actualidad, el ajolote mexicano se encuentra en la categoría de Especie Bajo Protección Especial por la Norma Mexicana NOM- 059-SEMARNAT-2001 y es incluida en el Apéndice II de el Convenio Internacional de Tráfico de Especies (CITES) que incluye a especies con comercialización controlada. El deterioro de las poblaciones del ajolote obedece, entre otros factores, a su sobre-explotación, a la introducción de especies exóticas competidoras, a la reducción de los lagos del valle central de México y de manera central a la alteración de su hábitat por el aporte de contaminantes.



INTRODUCCIÓN

Por estas razones, el ajolote *Ambystoma mexicanum* es una especie cada vez más raramente encontrada en su ambiente natural.

A pesar de la magnitud del problema, los estudios sobre el efecto de los contaminantes en el ajolote son escasos. De manera particular, los estudios sobre el efecto de pesticidas organofosforados adquieren gran importancia debido a su amplio uso en la actividad agrícola de Xochimilco. Los daños que causan estos contaminantes, tanto en plantas como en animales, y por consiguiente en el hombre, obligan a realizar estudios en el laboratorio sobre sus efectos en los organismos, además de monitorearlos y controlarlos en el ecosistema. Para realizar lo anterior, es necesario contar con métodos analíticos fiables que permitan determinar sus concentraciones a nivel de trazas en muestras tan complejas como las muestras ambientales, particularmente los tejidos biológicos. El desarrollo de estos métodos, se apoya en gran parte de las herramientas que aporta la Química Analítica, como son las técnicas para la identificación, aislamiento y cuantificación de los contaminantes en diferentes matrices.

Cabe destacar, que uno de los puntos críticos en el desarrollo de los métodos para el análisis de trazas, es la extracción cuantitativa y a la vez selectiva de los contaminantes. Como consecuencia, el manejo de los tejidos biológicos es muy difícil y requiere comúnmente de varios pasos en la secuencia del protocolo analítico global. Esto representa una tarea muy laboriosa por los largos tiempos de trabajo, uso de grandes cantidades de muestras y de volúmenes de disolventes, lo que contribuye a la contaminación ambiental con altos costos en los análisis. Por lo tanto, es muy importante que los nuevos métodos de preparación de muestras tiendan a ser más simples, reduciendo al máximo los inconvenientes mencionados y las fuentes de error en las mediciones.

En la actualidad, existen algunas técnicas analíticas que facilitan el desarrollo de metodologías más simples y rápidas que las tradicionales, como por ejemplo la Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (DMFS), la cual además ha demostrado que se



INTRODUCCIÓN _____

adapta bien al manejo de muestras biológicas sólidas. Esta técnica se basa en la dispersión de pequeñas cantidades de la matriz biológica en la superficie de los adsorbentes convencionales utilizados en la Extracción en Fase Sólida (EFS). Posteriormente, se empaca una columna de extracción, la cual será tratada a su vez con pequeños volúmenes de disolventes para fraccionar la muestra y lograr la separación selectiva de los compuestos de interés [Barker, 2000]. Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para llevar a cabo el análisis de los extractos obtenidos con los residuos de pesticidas.

En el presente trabajo, en base a la utilización de las técnicas de Dispersión de la Matriz en Fase Sólida y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en el procedimiento experimental, se llevaron a cabo los objetivos descritos a continuación.



OBJETIVOS.



OBJETIVOS. _____

General.

- Desarrollar un método analítico para determinar trazas de pesticidas organofosforados en el ajolote ***Ambystoma mexicanum***, por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida (DMFS) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con Detección Espectrofotométrica de Arreglo de Diodos (CLAR-DAD).

Particulares.

- Seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo la separación cromatográfica y la detección de los pesticidas organofosforados por CLAR-DAD.
- Desarrollar un método por la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida para extraer de manera selectiva y cuantitativa los pesticidas organofosforados contenidos en el músculo del ajolote ***Ambystoma mexicanum***.
- Realizar un protocolo completo de extracción y análisis para la determinación de los pesticidas organofosforados.
- Llevar a cabo la aplicación del método desarrollado a muestras de organismos expuestos en el laboratorio a alguno de los plaguicidas en estudio.



CAPITULO 1. ANTECEDENTES.



1.1. GENERALIDADES SOBRE LA CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS A NIVEL AMBIENTAL Y EN LOS ALIMENTOS.

Un pesticida se define como toda aquella sustancia que es destinada a controlar cualquier plaga, incluida los vectores de enfermedades humanas y de los animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o interfieran con la producción agropecuaria o forestal, o que afecten de forma negativa el bienestar del hombre y de las animales. De acuerdo a su uso se pueden clasificar en agrícolas, forestales, urbanos, para jardinería, pecuarios, domésticos e industriales [CICOPLAFEST, 1997].

Los pesticidas agrícolas son los usados en diversas extensiones, en sistemas de producción agrícola y en productos y subproductos de origen vegetal. Los pesticidas forestales son aquellos que se usan en bosques y maderas [CICLOPLAFEST, 1997]. Su uso tiene un impacto adverso en el medio ambiente ya que, cuando son empleados a cielo abierto, su difusión en los distintos medios (aire, agua, suelo) y la contaminación de fuentes de alimento para los organismos silvestres, conllevan la posibilidad de que se produzcan efectos negativos que afecten a poblaciones enteras y pongan en riesgo la supervivencia de las especies en peligro de extinción, dañando también a organismos predadores y polinizadores, entre otros.

Entre los efectos más notables se encuentran los que alteran la capacidad reproductiva de los organismos expuestos y los que ocasionan la muerte, ya que conducen a la extinción de las especies. Dichas sustancias representan un peligro toxicológico latente para formas de vida no perjudiciales (como el caso del ajolote mexicano) y están consideradas como una de las causas principales de la contaminación ambiental a nivel mundial, por la que los análisis de los residuos de pesticidas en diferentes matrices biológicas son incluidos especialmente en áreas como la química ambiental, la química forense y la medicina preventiva [Meyers, 2000; Russo, et al. 2002].



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

Las matrices biológicas son consideradas de gran interés para la determinación analítica de pesticidas, ya que como en nuestro caso (el ajolote mexicano), están expuestas constantemente a estas sustancias a través de las siguientes fuentes:

1. La aplicación aérea de los pesticidas, de los cuales un alto porcentaje llega al suelo y al agua, como los ríos o lagos cercanos de los lugares donde se utilizan estos productos.
2. La lluvia, cuando se presenta después de ser rociado el pesticida. El agua puede llegar al suelo y por consiguiente arrastrar a los pesticidas a los ríos y lagos.

Dentro del hábitat de los ajolotes en el lago de Xochimilco, los pesticidas más utilizados en las zonas agrícolas aledañas, pertenecen a la familia de los organofosforados. Algunos de estos se han encontrado, por ejemplo en la leche de vaca en concentraciones superiores al límite máximo residual (LMR) [Salas, et al. 2003], lo que nos puede indicar que la absorción de estos pesticidas se puede dar en organismos vivos, aunque sus consecuencias no han sido determinadas aún.

Los compuestos de baja polaridad, como es el caso de algunos de los pesticidas organofosforados con elementos como halógenos, ésteres, tiofosfatos, etc., una vez en el organismo, pasan del torrente sanguíneo hacia los tejidos rápidamente y tienden a permanecer en los órganos con gran estabilidad [Kuivinen, 2002]. Además, de su fácil absorción por vía cutánea, inhalación e ingestión [Hayes, 1991].

Son muchos los daños que puede ocasionar el mal uso de los pesticidas en el medio ambiente, algunos de ellos pueden ser la intoxicación aguda y crónica con el resultado de graves enfermedades, malformaciones genéticas e incapacidad para la reproducción y hasta la muerte.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

La gran persistencia de los pesticidas en el aire, en el agua, tanto en los ríos como en los acuíferos subterráneos y en los suelos, modifica continuamente la fauna y la flora. Esta haciendo desaparecer especies irremplazables como las águilas imperiales y las reales, el linco, el gato montés, el ajolote mexicano ***Ambystoma mexicanum***, como ejemplos de algunos de los organismos, que se ven afectados por estos pesticidas.

La contaminación por pesticidas es particularmente perjudicial para el medio acuático tanto cuando esta se produce directamente, cuando caen al aplicarse sobre un río, un arroyo, etc., tanto indirectamente, cuando se filtran desde los terrenos con el agua de lluvia o de riego hasta los acuíferos subterráneos. Los efectos de la enorme persistencia que presentan al degradarse los pesticidas, entre 50 y 100 años, se extienden a los mares, al agua potable y a los alimentos.

1.2. PROPIEDADES DE LOS PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

Los pesticidas organofosforados se aplican en formulaciones para incrementar su efectividad, absorción, transmisión, inmovilización y desintoxicación, conteniendo aditivos y adyuvantes como mezclas de surfactantes, aceites, emulsiones y sales [CICLOPLAFEST, 1997]. Estos pesticidas fueron introducidos en el mercado en el período de 1945-1955, y aún en la actualidad, son los pesticidas de mayor uso bajo la aceptación de su especificidad, debido a que en su mayoría, tienen una degradación rápida después de su aplicación, una acumulación esporádica en la cadena trófica, es decir en la comunidad biológica o en las especies que se encuentra en ese ecosistema, y bajo potencial carcinógeno en las especies animales y vegetales del lugar [Juhler, 1997]. Sin embargo, esta familia de pesticidas presenta especies con muy variada polaridad, existiendo también compuestos lipídicos que pueden acumularse en los tejidos. Cabe mencionar que estos pesticidas tienen una toxicidad aguda más elevada, en comparación con la de los otros grupos de pesticidas. Además, sus efectos nocivos



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

en la naturaleza aun no se definen. Los organofosforados, también se pueden concentrar en grasa, carne y leche.

1.2.1. Estructura química y propiedades físico-químicas.

Dependiendo de su estructura química, se reconocen cerca de 140 compuestos organofosforados diferentes que pueden clasificarse en base al tipo de grupo funcional que sustituye a uno a más átomos de hidrógeno (Tabla 1.1.). Las características de cada grupo pueden variar de manera substancial, y le confieren la especificidad para reaccionar contra un tipo de organismo u otro [Meyers, 2000; y Hassall, 1990].

Tabla 1.1. Clasificación de los pesticidas organofosforados de acuerdo a los sustituyentes de los átomos de hidrógeno en el ácido fosfónico o fosfórico [Lacorte, 2000; Hassall, 1990].

Grupo	Estructura	Ejemplo
Fosfatos y ortofosfatos	$(R O)_2 - \underset{\text{O}}{\underset{ }{P}} - O X$	Clorfenvinfos, diclorvos, mevinfos, fosfamidón.
Fosfonato	$(R O)_2 - \underset{\text{O}}{\underset{ }{P}} - C H X$	Triclorfon, butonato
Fosfortioato	$(R O)_2 - \underset{\text{S}}{\underset{ }{P}} - O X$	Bromofos, clorpirifos, coumafos, diazinon, fenitroton, fentiión, paration, pirimifos.
Fosforotiolato	$(R O)_2 - \underset{\text{O}}{\underset{ }{P}} - S X$	Demeton-S-metil, metil oxydemeton, vamidotón.
Fosforoditioato	$(R O)_2 - \underset{\text{S}}{\underset{ }{P}} - S X$	Azinfos, dimetoato, disulfoton, malatión, menazon, forato.
Fosforamidato	$X O - \underset{\text{O}}{\underset{ }{P}} - N H R$	Fenamifos, schradan.

R= grupo alquilo o arilo

X= grupo alifático, aromático o heterocíclico



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

Los pesticidas organofosforados presentan gran diversidad en características físico-químicas como son; la polaridad, la solubilidad en agua, la presión de vapor, el coeficiente de reparto octanol-agua, la ionización ácido-base y la vida media [Juhler, 1997]. Estos pesticidas son medianamente volátiles, con presiones de vapor que varían entre 0.13 y 7000 mPa. [Meyers, 2000]. Tanto la solubilidad, movilidad y volatilización de los plaguicidas organofosforados en el ambiente depende en gran medida de sus constantes de ionización ácido-base (pKa). Sin embargo, la polaridad, que puede estimarse a través de su solubilidad en agua y / o su coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{OW}$ o $\log P_{OW}$), es el parámetro fisicoquímico que revela el grado de hidrofobicidad de un pesticidas y su tendencia a acumularse en las células vivas, organismos y materia orgánica de los suelos y sedimentos [Meyers, 2000]. En el anexo I se describen en detalle las características físico-químicas de los pesticidas organofosforados en estudio.

1.2.2. Toxicología.

El modo de acción de los pesticidas organofosforados se basa en la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, el fenómeno tiene lugar a nivel de la sinapsis nerviosa, donde el neurotransmisor acetilcolina despolariza a la membrana postsináptica para excitar a las células efectoras como glándulas, fibras musculares u otras neuronas. Una vez conseguido su objetivo, para que las células efectoras vuelvan al reposo, el neurotransmisor debe de ser hidrolizado por la enzima acetilcolinesterasa [Russo, et al. 2002].

Los pesticidas organofosforados inhiben la actividad de la acetilcolinesterasa uniéndose a la enzima en el sitio preciso en donde debería unirse la molécula de acetilcolina para ser hidrolizada. Como resultado, cuando un pesticida organofosforado se encuentra presente, la enzima en vez de acetilarse queda fosforilada. Esta diferencia es importante para que se lleve a cabo la intoxicación del organismo, porque mientras que la enzima acetilada es regenerada rápidamente por hidrólisis, la regeneración de la



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

enzima fosforilada es muy lenta [Hassall, 1990], se reporta un factor de un millón de veces debido a que el enlace P-O es mucho más fuerte que el enlace C-O lo cual provoca que la estimulación de las células efectoras de un organismo intoxicado con pesticidas organofosforados se prolongue más de lo normal [Cremllyn, 1980].

Consecuentemente, la intoxicación aguda con los organofosforados puede provocar efectos graves que pueden ser: el síndrome muscarínico (estimulación de glándulas y fibras musculares lisas), el síndrome nicotínico (estimulación de las fibras musculares estriadas), o el síndrome neurológico (por estimulación de otras neuronas). Se observan convulsiones, fallo respiratorio y arritmias cardíacas, la muerte se debe a la anoxia [Russo, et al, 2002; CICOPLAFEST, 1997].

En la Tabla 1.2. se muestran los grados de toxicidad para los pesticidas organofosforados considerados en el estudio, la ingesta diaria admisible (IDA) para humanos, que es una estimación de la dosis de exposición diaria donde es poco probable que se produzca un efecto nocivo aunque la exposición sea de por vida; así como la dosis letal oral y percutánea que mata al 50% (LD_{50}) de la población en prueba, ratas en este caso [CICOPLAFEST, 1997].

Tabla 1.2. Toxicología de algunos pesticidas organofosforados [CICOPLAFEST, 1997; The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, 1994].

Pesticida	Toxicidad (grado)	IDA ($\text{mg Kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$)	DL_{50} (mg Kg^{-1})	
			Oral	Percutánea
Clorpirifos	III	0.010	135 - 163	> 2000
Fentión	II	0.001	200	≤ 1000
Metil paratión	I	0.020	14 - 24	67

I: Extremadamente tóxico, máximo 5 mg / Kg

II: Altamente tóxico, de 5 a 50 mg / Kg

III: Moderadamente tóxico, de 50 a 500 mg / Kg

No se puede olvidar que los pesticidas organofosforados pueden tener otras propiedades independientes de sus efectos anticolinesterasa, incluyendo



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

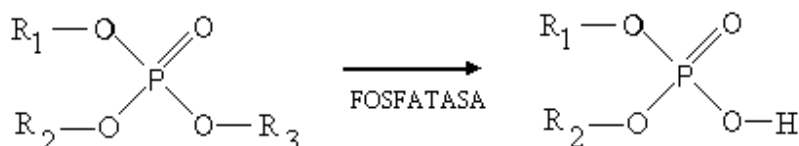
mutagenicidad y carcinogenicidad así como una toxicidad específica hacia órganos como el corazón, hígado, riñón, etc., aunque aquí cabe mencionar que no se tienen estudios que prueben que estos compuestos se acumulan en el ajolote *Ambystoma mexicanum*, aunque si existen reportes de la presencia de residuos de estos compuestos en órganos del cuerpo humano, como en el hígado [Russo, et al., 2002]. En el mismo artículo se señala que en los riñones cancerosos es donde se acumulan más los pesticidas en comparación con los tejidos sanos.

En la actualidad los pesticidas organofosforados también han sido relacionados con patologías y daño en los cromosomas humanos [Bolognesi, 2003]. Algunos autores como Webster, et al. (2002), concluyeron que los pesticidas organofosforados alteran el núcleo celular y relacionaron este resultado como el desarrollo de cáncer en vejiga.

1.2.3. Metabolismo.

El entender el metabolismo de los pesticidas es analíticamente muy importante para su cuantificación total ya que la estimación involucra al compuesto original así como a sus metabolitos (los cuales en su gran mayoría son tóxicos), esto incluye a los que pueden ser eliminados por vía de la orina [Meyers, 2000; Mukherjee, 1996].

Los pesticidas organofosforados son metabolizados rápidamente en el cuerpo a través de la ruta: 1) hidrólisis, 2) oxidación, y 3) transmetilación. La hidrólisis de los ésteres de fosfato se presentan específicamente a un lado del grupo de eliminación en los enlaces triéster del pesticida:





CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

La conversión del fosforoditionato en fosfatos incrementa la toxicidad para insectos y mamíferos. Cabe resaltar que la toxicidad de los pesticidas organofosforados está asociada con los metabolitos primarios (oxon) obtenidos de la desulfuración oxidativa de los compuestos padre, debido a que los oxones son químicamente más activos que los organofosforotionatos y por lo tanto reaccionan más rápidamente con la acetilcolinesterasa [Coulibaly, 1994; Russo, et al., 2002].

1.3. DESCRIPCIÓN Y PRINCIPIOS DE LA DMFS

Uno de los problemas que se tiene actualmente para la determinación de residuos de pesticidas en alimentos, es que los protocolos de preparación de las muestras en los métodos oficiales, presentan pasos muy laboriosos, lo cual conlleva a no generar resultados analíticos a tiempo para prevenir la entrada de alimentos contaminados al mercado [Yague, C. et al, 2001]. Los métodos analíticos que se buscan actualmente son aquellos que se adaptan a la cada vez más estricta normatividad en cuanto a los límites de detección y que permitan lo siguiente [Crouch, 1997; Serrano, et al., 1999].

- Usar un tamaño de muestra inicial menor, aún para análisis de trazas.
- Mayor especificidad o selectividad en la extracción.
- Mayor potencial para la automatización o para los métodos en línea.
- Técnicas ambientales amigables, con menos desperdicios y disminución en el uso de disolventes orgánicos.

Una de las técnicas que cumple con éxito estos puntos es la denominada Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) en la cual se han basado varios métodos para la extracción de residuos tóxicos en los alimentos. La DMFS fue introducida en 1989 y consiste básicamente en incorporar a la matriz como parte de una columna de un sistema cromatográfico que permite la separación selectiva de los analitos,



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

permitiendo manejar muestras sólidas, semisólidas y viscosas. [Barker, 1989; Tolls, et al, 1999].

Para que se lleve acabo esta técnica se requieren materiales simples, por lo que se puede realizar en el laboratorio o en el campo, y consta principalmente de 3 pasos:

- 1) Dispersión de la muestra en el material de soporte sólido.
- 2) Empaque de la columna.
- 3) Elución selectiva de los analitos de interés.

Aunque hoy en día existen fases sólidas con soporte polimérico, la DMFS, se ha aplicado más con sílices enlazadas, por que se espera que los grupos silanol no enlazadas en la superficie y en los poros del material del soporte contribuyan de forma importante para obtener pastas más secas, lo que facilitan el empaclado y la elución. En cuanto al tamaño de la partícula, el uso de materiales con diámetro de 3-20 μm conduce a flujos lentos o nulos, por esto se prefieren partículas de 40 a 100 μm de diámetro. Además, a diferencia de los materiales esféricos que se usan en cromatografía de líquidos, estos materiales se prefieren con bordes puntiagudos y de forma irregular para facilitar la ruptura de la matriz durante la molienda [Barker, 2000].

En la DMFS, se utilizan materiales de fase-reversa, como lo son compuestos como el C₁₈ y C₈, se piensa que una fase unida lipofílica es esencial para romper y dispersar la muestra, permitiendo la formación de una nueva fase o bicapa que se asemeja a una membrana celular.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

Debido a que la matriz pasa a formar parte de la fase cromatográfica, son de esperarse variaciones en los resultados y recobros al cambiar de una matriz a otra. Mientras que la fase unida esta inmóvil sobre el soporte sólido, los componentes de la matriz dispersa no lo están y ciertos analitos de interés son eluidos constantemente junto con componentes de la matriz dependiendo del disolvente de elución y de las interacciones dinámicas entre la matriz dispersa y la fase sólida. De esta forma 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 debido al hecho de que algunos analitos de ciertas clases químicas co-eluyen con los componentes de la matriz, en las mismas fracciones. Estas interacciones de la matriz con la fase sólida y la fase móvil afectan de forma importante el orden de elución de los compuestos de interés en la columna de DMFS.

Por la necesidad de alterar las muestras para la modificación de su estado de ionización y asegurar que ciertas interacciones ocurran entre la fase unida al soporte sólido y / o el disolvente de elución, pueden adicionarse ácidos, bases, sales, agentes quelantes o antioxidantes antes de moler la muestra y / o aditivos en el disolvente de elución para aumentar la eficiencia del proceso.

Por lo tanto, lo que determina que es lo que permanece en la columna y que es lo que eluye, es la polaridad relativa de los disolventes de elución y la naturaleza de la fase unida al soporte sólido. La secuencia y el diseño del perfil de elución deben de enfocarse a incrementar la retención de los componentes de la muestra sobre la columna mientras que se eluyen a los analitos de interés con un alto grado de selectividad. Esto no siempre se puede lograr, por lo que en ocasiones pueden aplicarse co-columnas u otras técnicas de limpieza.

La Figura 1.1. ilustra como se llevan acabo los pasos generales para realizar la

CAPITULO 1: ANTECEDENTES

DMFS, [Barker, 2000 y 2007].

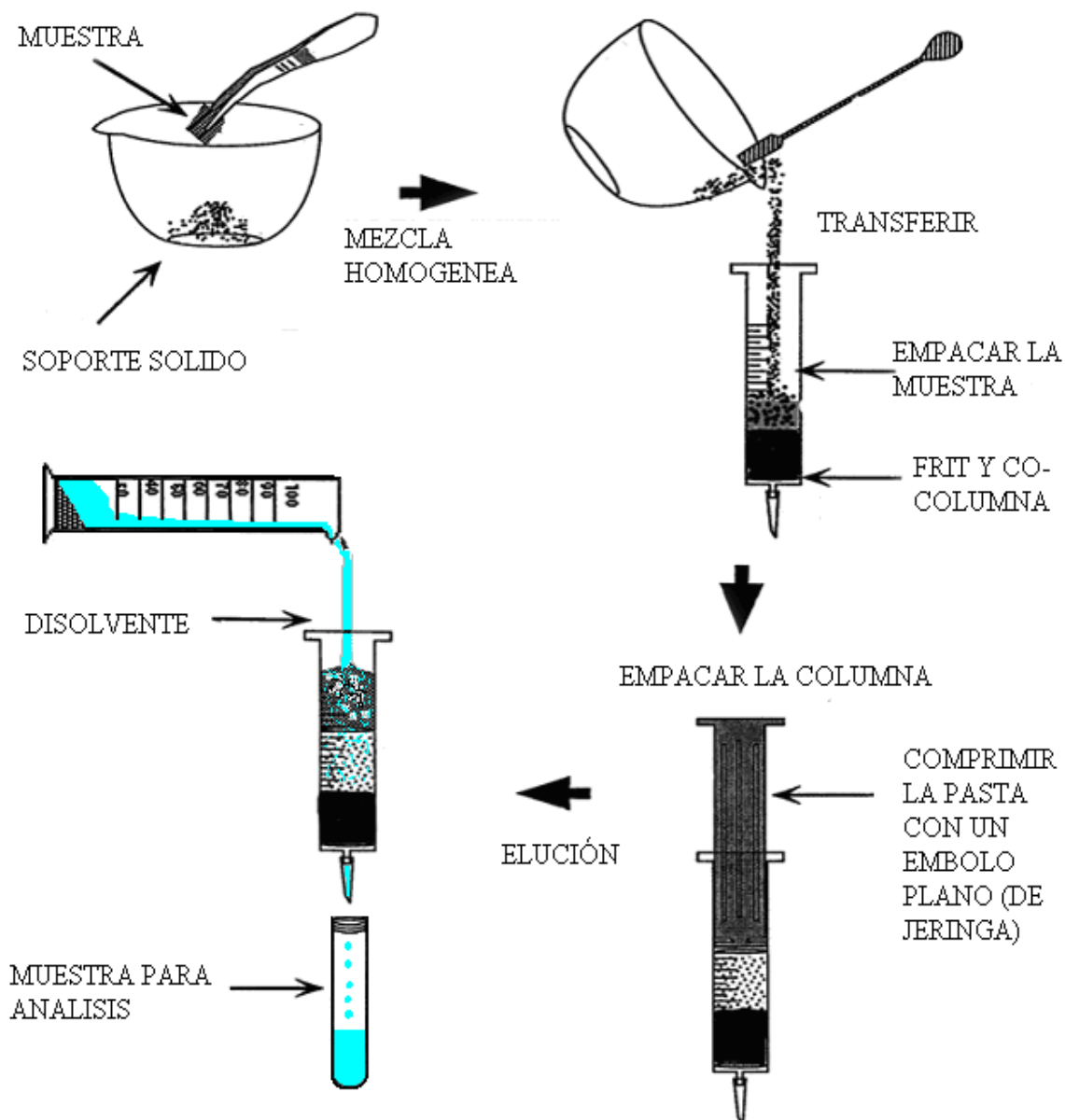


Figura.1.1. Pasos generales para realizar la DMFS.

Estos pasos generales consisten en:

1. Para dispersar la muestra sólida o semisólida se le debe colocar en un mortero no poroso, de vidrio o ágata, junto con un material de soporte sólido



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

(octadecilsilano C_{18}) con fase unida, comúnmente en una relación de 1:4 y hacer uso del pistilo para molerlas hasta obtener una pasta homogénea. Las muestras líquidas se pueden dispersar colocándolas en un tubo de ensayo o en un tubo de jeringa, que posteriormente servirá como columna, y el soporte sólido con una espátula.

2. La pasta obtenida después de la dispersión debe de ser lo suficientemente seca para empacar la columna; para ello se coloca un filtro en el fondo del cartucho, se transfiere la pasta, se cubre con un filtro y se comprime con un émbolo de jeringa plano. Como el objetivo es llevar a cabo una elución cromatográfica para aislar a los analitos de interés u otros componentes de la muestra, los principios básicos de llevar a cabo una buena cromatografía siguen siendo válidos.
3. La elución selectiva de los analitos de interés, es muy versátil y suele adaptarse a lo particular del ensayo, generalmente la adición del disolvente de elución a la columna debe de ser precedido por el uso del disolvente para enjuagar el mortero y el pistilo. Las eluciones típicas para un único compuesto han reflejado el deseo de realizar cierto grado de fraccionamiento selectivo, usando disolventes de polaridad moderada o disolventes modificados para la adición de ácidos, bases o sales o porcentajes variados de otros disolventes.

1.4. APLICACIONES DE LA DMFS EN LA EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Recientemente se ha utilizado la técnica de DMFS en los procedimientos generales de preparación de muestras para la extracción de los analitos en una gran variedad de muestras como son frutas y vegetales u otros alimentos procesados [Smith, 2003]; debido a que esta técnica engloba etapas de extracción y purificación. Al respecto, recientemente, Barker reportó en el 2007 una revisión de la aplicación de la DMFS en el análisis de alimentos, aislamiento de una amplia gama de drogas, de pesticidas y de una gran variedad de componentes, haciendo referencia a 250 trabajos publicados sobre la determinación de residuos tóxicos en algunas muestras complejas



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

de origen animal como pescado, pollo, bovino y cerdo, así como de una gran variedad de plantas.

Por otra parte Juan, A. Pico, Y. Font, G. también publicaron en el año 2003 una revisión sobre los métodos de determinación de residuos de pesticidas organofosforados en alimentos, en donde se cita la aplicación de la DMFS en el manejo de muestras como por ejemplo pescado, músculo de res y pollo, entre otros.

En la Tabla 1.3. se muestran algunas aplicaciones de la DMFS, en diferentes matrices así como la determinación de diferentes analitos.

Tabla 1.3. Aplicación de la técnica de DMFS en tejidos animales y de plantas (2002-2005).

Matriz	Analito	Dispersión	Purificación y elución	Determinación	Referencia
Té	Pesticidas organoclorados y piretroides.	Florisil	Florisil, n-hexano-diclorometano v/v (1:1)	CG	Hu, Yan– Yun et al. 2005
Grasa de pollo y de bovino, músculo e hígado de pez	PCBs y PBDEs	Na ₂ SO ₄ , florisil	Sílice ácida, n-hexano	CG-DCE	Martinez, 2005
Pescado	PAHs	Na ₂ SO ₄ , C18	Florisil, C18, Acetonitrilo	CLAR-DFF	Pensado, et al. 2005
Músculo, tiroides e hígado de cerdo, músculo de res.	Derivados de tiocarbamida	Silica virgen	Gel de sílice, metanol, cloroformo	CG-EM	Zhang, et al, 2005
Grasa de pollo y de res, mantequilla	PCBs	Na ₂ SO ₄ , florisil	Hexano:diclorometano 9:1	CG-EM, CG-DCE	Criado, et al. 2004
Frutas y Hortalizas	funguicidas	C-18	Silice, acetato de etilo	DNP, DCE, EM	Navarro, et al. 2002
Frutas y Hortalizas	Pesticidas Organofosforados	C-18, agua/diclorometano	Acetato de etilo / sulfato de sodio	CL- EM	Blasco, et al. 2002
Frutas y Hortalizas	Pesticidas Organofosforados	C-18	Carbón y hexano / acetato de etilo	CG-EM	Kristenson, et al. 2001

PCBs: Bifenilos policíclicos, PBDEs: Éteres difenil polibromados, PAHs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos. CG: Cromatografía de gases, CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución, CL: Cromatografía de líquidos, DCE: Detector de captura de electrones, DNP: Detector nitrógeno fósforo, DFF: Detector fotométrico de flama, EM: Espectrometría de masas.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

1.5. COMPARACIÓN DE LA TÉCNICA DE DMFS CON OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS PARA LA EXTRACCIÓN DE PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN ALIMENTOS.

Considerando que todos los métodos de análisis de residuos deben de proporcionar una precisión y exactitud adecuada, siendo lo más rápidos y simples posibles, de manera que proporcionen resultados confiables para el análisis de alimentos complejos, a continuación se comparan algunas técnicas de extracción con la DMFS para resaltar las bondades de esta última.

Las técnicas a comparar son:

1. Extracción con disolventes orgánicos y purificados: Los métodos basados en esta técnica dependen del tipo de materia a la que se le va a extraer plaguicidas organofosforados, por ejemplo aquellos que contienen menos de un 2% de materia grasa y los que contienen más de un 2%. Es una técnica muy reproducible y simple de efectuar, pero aun así requiere de un gasto elevado de disolventes para llevar a cabo la extracción, tiene una separación en ocasiones incompleta de fases e interferentes, puede ser muy lenta y se corre el riesgo de formar emulsiones.
2. Extracción en fase sólida: Esta consiste en extraer los pesticidas disueltos en una matriz acuosa al atravesar un adsorbente donde quedan retenidos, el inconveniente es que en muestras sólidas hay que realizar una extracción previa de los analitos con algún disolvente miscible con el agua, lo que agrega más pasos al procedimiento completo.
3. Microextracción en fase sólida: Se basa en la adsorción de los analitos sobre una fibra recubierta con una fase estacionaria, los cuales se desorben posteriormente en el inyector de un cromatógrafo de gases o de líquidos. Su principal inconveniente es desconocer los efectos que puede tener la matriz sobre el proceso, y que no se puede realizar una extracción directa en muestras sólidas.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

4. Extracción en fase sólida sobre barras magnéticas: Similar a la microextracción en fase sólida, pero utiliza una barra magnética recubierta de fase en lugar de fibra. Es una técnica muy rápida, pero su inconveniente es la limitada capacidad, de concentración de los pesticidas más polares.
5. Extracción con fluidos supercríticos: Se basa en utilizar fluidos supercríticos para solubilizar los compuestos de baja volatilidad presentes en una muestra. Su inconveniente es presentar baja reproducibilidad e interferencias de matriz, así como la necesidad de adquirir un equipo oneroso.

Como ya se ha explicado en la introducción la técnica de DMFS tiene ventajas sobre las antes descritas, ya que esta permite la extracción de los plaguicidas desde pequeñas cantidades de muestras sólidas, semisólidas y líquidas, y requiere menos cantidad de disolvente, además de que también permite llevar acabo simultáneamente una purificación de la muestra.

1.6. PRINCIPIOS BÁSICOS E INSTRUMENTACIÓN DE LA CROMATOGRAFÍA.

1.6.1. Generalidades.

La cromatografía es una técnica que es utilizada para la separación de los constituyentes de una mezcla. Se ha convertido en un método analítico de primer orden para identificar y cuantificar los compuestos de una fase líquida o gaseosa homogénea. El principio básico se fundamenta en los equilibrios de distribución de los compuestos presentes entre dos fases no miscibles de la que una, llamada estacionaria, está inmovilizada en una columna o fijada sobre un soporte y la otra, llamada móvil, se desplaza al contacto de la primera. La elución, proceso en el cual, migran y se separan los solutos a través de una fase estacionaria gracias al movimiento de una fase móvil y a las velocidades diferenciales de los compuestos presentes por la fase móvil. De todos los métodos analíticos e instrumentales, la cromatografía es la que tiene el mayor



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

campo de aplicabilidad y por ello, ocupa una posición dominante. El esquema de trabajo por cromatografía puede resumirse de la siguiente manera [Rouessac, 2003]:

- 1- Se inmoviliza en una columna un sólido finamente dividido llamado *fase estacionaria*.
- 2- Se coloca en la parte superior de la columna un pequeño volumen de *muestra* que hay que separar.
- 3- Con ayuda de la *fase móvil* se obliga a la mezcla disuelta, a atravesar la columna de arriba abajo para arrastrar los diversos constituyentes, los cuales migran a velocidades diferentes, para poder ser colectados separadamente a la salida de la columna.

Para revelar la presencia de las sustancias eluidas a la salida de la columna cromatográfica se utilizan **detectores**. El detector es un dispositivo capaz de convertir una propiedad física, no medible directamente, en una señal elaborable y ofrecernos información sobre la naturaleza y magnitud de la propiedad física.

A continuación se describen y definen los parámetros de los detectores:

- **Sensibilidad.** Medida de la efectividad de un detector para convertir la muestra en una señal eléctrica medible.
- **Linealidad.** Intervalo de masa ó concentración de muestra sobre el cual el detector mantiene una sensibilidad constante sin una desviación arbitraria, El significado práctico de la linealidad del detector es el que le indica al analista la concentración para la cual el detector es confiable. Hay dos límites en la curva de linealidad.
 - a) El límite de concentración inferior, que es dado por el límite de detección.
 - b) El límite superior, definido por un porcentaje de desviación arbitrario de la curva de linealidad.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

- **Intervalo Dinámico Lineal.** Intervalo sobre el cual la sensibilidad del detector es constante.
- **Ruido.** Es cuantificado por el promedio de la amplitud pico-pico de la señal. El significado de conocer el nivel de ruido de un detector es un factor determinante en la determinación de la cantidad mínima detectable y el límite inferior del intervalo lineal.
- **Límite de Detección.** Está definido como la mínima cantidad de sustancia que puede producir una señal que sea el triple del nivel de ruido.
- **Corriente de Fondo.** Señal constante de salida generada por el proceso en el que un detector está operativo sin que alguna sustancia pase a través de él. Esta señal es muy importante, ya que permite diagnosticar el buen o mal funcionamiento del detector.

1.6.2. Parámetros.

Resolución. Es una medida cuantitativa de la capacidad del sistema cromatográfico para separar dos analitos A y B, o de dos bandas adyacentes. Se mide como la distancia entre dos picos dividida entre el ancho promedio de las bandas. Si la retención y el ancho de la banda son expresadas en unidades de tiempo, la resolución de cada columna queda definida con la ecuación (1):

$$R_S = \frac{2((t_R)_B - (t_R)_A)}{W_A + W_B} \quad \text{ecuación (1)}$$

Donde t_R : tiempo de retención del soluto;
W: ancho de la base del pico.

La ecuación (2) es la ecuación fundamental de la resolución y nos da una clara evidencia de que depende de la selectividad (α), el número de platos teóricos o eficiencia (N) y el factor de capacidad (k') del sistema parámetros cromatográficos fundamentales.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES

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

Se puede mejorar la resolución para una fase estacionaria determinada alargando la columna, lo que incrementa el número de platos teóricos. Sin embargo, una consecuencia adversa de añadir platos, es un incremento en el tiempo necesario para la separación de los componentes [Skoog, D. A, et al, 2001]. El aumentar la separación diferencial de los picos individuales, involucran a la selectividad y al factor de capacidad. Los parámetros cromatográficos fundamentales se describen a continuación.

Factor de capacidad o factor de retención (k'). Es un parámetro experimental importante que se utiliza para describir las velocidades de migración de los solutos en columnas. Para el soluto A, el factor de retención, k'_A se define como:

$$k'_A = \frac{K_A \cdot V_S}{V_M}$$

donde K_A es la constante de distribución del soluto A, V_S es el volumen del soluto en la fase estacionaria y V_m el volumen del soluto en la fase móvil [Skoog, D. A, et al, 2001].

El factor de capacidad (k'), se puede medir en un cromatograma con la siguiente relación;

$$k' = \frac{t'_r}{t_0}$$

donde, t'_r es el tiempo de retención ajustada ($t_r - t_0$), y t_0 es el tiempo muerto.

Eficiencia. El ensanchamiento de banda que ocurre cuando un compuesto pasa a través de la columna depende de la eficiencia de una columna cromatográfica. Para efectuar mediciones cuantitativas de la eficiencia de las columnas cromatográficas se emplean dos términos: (1) *altura del plato* H y (2) *cantidad de platos o número de platos teóricos* N. Los dos están relacionados por la ecuación:



CAPITULO 1: ANTECEDENTES

$$N = \frac{L}{H}$$

donde L es la longitud del empaque de la columna (en cm). La eficiencia de las columnas cromatográficas aumenta a medida que es mayor el número de platos N y la altura H es menor. Se observan grandes diferencias en la eficiencia de las columnas como resultado de las diferencias en el tipo de columna y de las fases móvil y estacionaria. En términos de número de platos teóricos, la eficiencia puede variar desde unos centímetros hasta varios cientos de miles; la altura de los platos varía desde unas décimas hasta milésimas de centímetro y son comunes incluso más pequeñas [Skoog, D. A, et al, 2001].

Selectividad (α). De una columna para dos solutos, A y B, se define como la relación de la constante de distribución del soluto retenido con más fuerza, B, y la constante de distribución del soluto retenido con menos fuerza, A:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} = \frac{k'_B}{k'_A}$$

donde K_B es la constante de distribución de la especie retenida con más fuerza, especie B, y K_A es la constante de la especie retenida con menos fuerza, es decir, la especie A, que eluye más rápido. De acuerdo con esta definición, α siempre debe ser mayor que la unidad [Skoog, D. A, et al, 2001].

1.6.3. Cromatografía de líquidos.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución CLAR o HPLC por sus siglas en inglés, es una técnica cromatográfica de reparto o posición en la que la muestra se fracciona entre una fase móvil que es líquida y una fase estacionaria [Bermejo, 1991]. Se utiliza una presión muy elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

[Harris, 2001]. Debido a estas presiones el equipo para CLAR es elaborado y relativamente costoso [Skoog, et al., 2001].

Los disolventes más usados en HPLC son agua, disoluciones tampón acuosas y disolventes orgánicos como el metanol, n-pentano, ciclohexano, tolueno, tetracloruro de carbono, acetonitrilo, isopropanol, etanol, n-hexano, diclorometano, acetato de metilo, éter dietílico, cloroformo, agua grado cromatográfico. Los disolventes deben de ser espectroscópicamente puros, exentos de partículas sólidas y desgasificados, esto se lleva a cabo con un gas inerte muy poco soluble como el helio, por ultrasonificación o filtración.

Comúnmente se usan partículas microporosas esféricas de sílice muy pura, que son permeables al disolvente como fase estacionaria [Harris, 2001]. De acuerdo al tipo de cromatografía, las fases estacionarias pueden ser las siguientes:

Para cromatografía de adsorción.

- Alúmina, gel de sílice, carbón activo.

Para cromatografía de reparto.

- Sílice enlazada con grupos polares (grupos ciano, amino y diol) y no polar (alcoholes, aminas, amidas).

Para cromatografía iónica.

- Resinas de intercambio con activación por grupos ácidos fuertes (sulfónico $-\text{SO}_3-\text{H}^+$), y ácidos débiles carboxilílico ($\text{COO}-\text{H}^+$), o básicos fuertes (aminas terciarias), básicos débiles (aminas primarias).

Para cromatografía de exclusión.

CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

- Styragel, Sephadex, silica, poliméricas, resina de intercambio catiónico en su forma ácida.

Instrumentación.

Los componentes básicos de un sistema para CLAR se representan en la Figura. 1.2, [Hernández, 2002], y a continuación se describen:

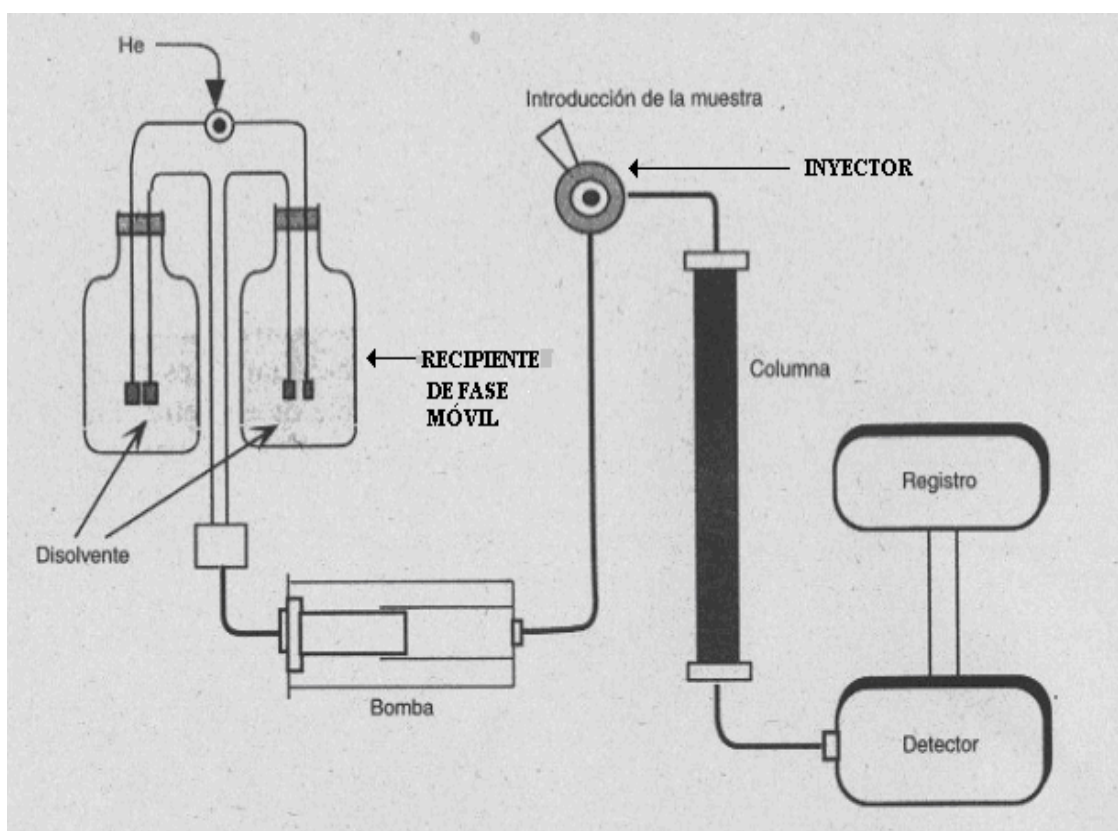


Fig. 1.2. Componentes básicos de un sistema para CLAR.

1. Los reservorios o recipientes: Que se utilizan para almacenar la fase móvil tienen que ser inertes, es decir, el disolvente no deberá extraer especie alguna del material con el que estén contruidos. Pueden ser botellas de vidrio y tubos de teflón. Están provistos de unos filtros, indispensables para eliminar los gases disueltos y partículas que pueda contener la fase móvil (Loro, 2001).



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

2. Las bombas: Son utilizadas debido a las elevadas presiones de trabajo y al pequeño tamaño de las partículas de la fase estacionaria, y es la encargada de introducir la fase móvil o disolvente a través de la columna. Los sistemas de bombeo deberán reunir las siguientes características [Hernández, 2002].

- Generar presiones superiores a 6000 psi.
- Capaces de cubrir un amplio rango de flujo entre 0,1 y 10 ml/min con una precisión del 0,5 % y que esté libre de pulsaciones.
- Construidos con materiales inertes respecto a los disolventes empleados.

Las bombas empleadas en HPLC son de tres tipos:

- *Bombas recíprocas o de vaivén*, son las más utilizadas. Están formadas por una pequeña cámara cilíndrica que se llena y luego se vacía por oscilación de un pistón de zafiro. El bombeo produce un flujo pulsado que después debe amortiguarse. Sus principales ventajas son que se consiguen presiones elevadas y se suministra un caudal constante, pudiéndose adaptar a la técnica de elución con gradiente, debido a su pequeño volumen interno [Skoog, et al., 2001].
- *Bombas neumáticas o de presión constante*, hacen uso de la presión de un gas aplicado al recipiente conteniendo la fase móvil. Son sencillas, no provocan pulsaciones pero están limitadas a presiones relativamente bajas [Hernández, 2002].
- *Bombas de desplazamiento o tipo jeringa*, consisten en una cámara equipada con un mecanismo de tornillo. Suministran un flujo libre de pulsaciones pero con una capacidad limitada a unos 250 ml. [Loro, 2001].

3. Inyector: Los volúmenes que se inyectan de muestra deberán ser pequeños para evitar la sobrecarga de la columna. Hay varios tipos:



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

- El método más simple es la utilización de una *jeringa de alta presión* con un diafragma (“septum”) a la entrada de la columna. Está limitado a una presión máxima de operación de 1500 psi. En la actualidad ya no son utilizados.
 - Las *válvulas de inyección* con bucles de volumen conocido, es el método más utilizado [Harris, 2001].
4. Columna: Es donde se produce la migración diferencial de los solutos que permite su separación [Loro, 2001]. El material de las columnas cromatográficas suele ser de acero inoxidable cuya longitud varía de 5 a 30 cm y un diámetro de 1 a 5 mm. La eficiencia de las columnas aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. El tamaño típico de las partículas es de 3-10 μm [Harris, 2001].

Las columnas son caras y se degradan con facilidad, por eso, se protege la entrada de la columna con otra más corta, la pre-columna, que retiene por adsorción las impurezas de forma irreversible [Harris, 2001].

5. Detectores: Los más comunes en cromatografía de líquidos son los siguientes:
- Detectores espectrofotométricos de absorbancia ultravioleta, son los más utilizados. Su fundamento es la espectrofotometría de absorción de luz visible y ultravioleta de un componente a una determinada longitud de onda. Los más potentes son los que utilizan un montaje de fotodiodos para registrar el espectro completo de cada soluto que pasa por el detector. Los datos de absorbancia se representan en función de la longitud de onda y del tiempo.
 - Detectores espectrofotométricos de fluorescencia, son muy sensibles y selectivos, el principio de operación se basa en la irradiación con la luz UV al componente de interés y la posterior medida de la luz fluorescente emitida por éste [Loro, 2001].



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

- Detectores electroquímicos, ofrece ventajas debido a su especificidad, sensibilidad y amplia aplicabilidad, especialmente para compuestos orgánicos. Responde a analitos que puedan oxidarse o reducirse. Es el ejemplo de fenoles, aminas, peróxidos (pueden detectarse por oxidación) y cetonas, aldehídos (detectados por reducción). Las técnicas electroquímicas más utilizadas con esta finalidad son la amperometría, voltamperometría y coulombimetría.

Estos, detectores se basan en las propiedades de los solutos.

También se utilizan detectores basados en una propiedad de la disolución, las cuales responden a un conjunto amplio de solutos, pero suelen ser poco sensibles:

- Detectores de índice de refracción, está formado por una celda con dos compartimentos, en uno se introduce el disolvente puro y en el otro la muestra, se hace pasar luz visible paralela. Cuando entra en la celda soluto de distinto índice de refracción al disolvente el haz se desvía y varía la señal dada por la fotocélula [Harris, 2001]. El principal inconveniente es que son muy sensibles a los cambios de temperatura y no resultan apropiados para trabajar con la modalidad de elusión con gradiente.
- Detectores de conductividad, son los más utilizados cuando los solutos eluidos son iónicos, como ácidos y bases, así como cationes y aniones inorgánicos después de su separación por cromatografía de cambio iónico. Tienen elevada sensibilidad, baratos y de larga duración.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

1.7. CARACTERÍSTICAS DEL AJOLOTE.

1.7.1. Biología.

El ajolote es un anfibio que a primera vista parece un renacuajo gigante. Su cuerpo es alargado, con un tronco compacto, la cabeza es grande con unos ojos pequeños, y carecen de párpados. Tienen una boca de gran capacidad y dientes diminutos que se disponen en hileras a la entrada de la cavidad oral. Su lengua es retráctil (como la de las ranas). A la altura del cuello tienen tres pares de branquias laterales externas, las cuales utilizan para respirar, tomando agua por la boca y dejándola salir por las agallas moviéndolas,

[<http://es.wikipedia.org/wiki/Ajolote>]
como se muestra en la Figura 1.3.



Figura 1.3. Ajolote en cautiverio.

El agua cargada de oxígeno pasa a través de las ramas branquiales cerca de los capilares sanguíneos. Por medio de un sencillo intercambio a favor del gradiente, el oxígeno del agua pasa a la corriente sanguínea del ajolote y el dióxido de carbono de la sangre pasa al agua del medio externo. De esta forma utilizan la gran cantidad de vasos capilares que poseen.

También poseen sacos pulmonares, que no se han desarrollado como pulmones debido a su escaso uso, por lo cual sube de vez en cuando a la superficie para tomar aire atmosférico.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

Esta característica, así como su aspecto se deben a su peculiar desarrollo metabólico, que es un caso de neotenia. El desarrollo del ajolote podría describirse como una evolución que admite la irregularidad en los ritmos de metamorfosis del estado larvario: el punto crítico de la edad propia de la madurez fisiológica nunca es el mismo en todos los individuos. Curiosamente, el ajolote ha desarrollado la capacidad de madurar sexualmente y reproducirse conservando el estado larvario o la mayoría de sus aspectos. Existe el estado maduro: algunos individuos alcanzan la madurez, pero de manera irregular, por lo que en libertad, es corriente la morfología del ajolote *larvario* o *semi-larvario*, de color más claro. Pertenecientes a la familia de los anfibios denominados urodelos (anfibios de cuatro patas y cola en estado adulto), son las secreciones químicas de diversas glándulas las que juegan un papel importante en el apareamiento. El macho pone un espermátóforo, la hembra se posa sobre este para introducirlo en su cloaca, sus secreciones disuelven la matriz gelatinosa permitiendo que los espermatozoides entren a los túmulos de la espermateca, donde se almacenan hasta que inicie el desove. El huevo del ajolote, como el de los demás urodelos es poliespérmico, esto es, varios espermatozoides lo penetran. La hembra es el sexo heterogamético [Malacinski, 1988, Amstrons, 1989].

Las extremidades son de aspecto frágil y quebradizo. En los ejemplares albinos y albinos parciales se pueden observar los huesos transparentándose a través de la fina piel. Tienen 4 dedos en las patas delanteras y 5 en las traseras. Por lo general son de color parduzco oscuro con pequeñas manchas blanquecinas de gran eficacia mimética, pues lo hacen confundir con las piedras. Los ejemplares de colores claros, tienen manchas brillantes, que le dan gran belleza estética.

En su etapa adulta puede medir entre 25 y 30 centímetros. Respecto a su longevidad, los ajolotes pueden llegar a vivir 25 años aproximadamente, en condiciones normales.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

A diferencia de lo que les ocurre a las salamandras y otros anfibios metamorfoseados, los ajolotes no presentan muda de piel.

La edad de reproducción en condiciones óptimas es después del año. Sin embargo, es común que se tarden año y medio en madurar sexualmente [Amstrong et al, 1989]. La cantidad de huevos que puede poner una hembra adulta es de alrededor de 660 por puesta [Amstrong et al, 1989]. En condiciones ideales las hembras en cautiverio son capaces de tener puestas cada 2 meses, sin reducir la cantidad de huevos en las puestas. Sin embargo, estas cantidades de huevos únicamente se mantiene durante 5 o 6 años, y después el número de huevos decrece y los que se ponen cuentan con bajos valores de sobrevivencia, por lo que no son útiles para la reproducción [Amstrong et al, 1989].

La tasa de eclosión es muy alta en cautiverio. En dos estudios realizados independientemente se observó que la tasa de eclosión está cerca del 90% de la puesta [Hernández, 1996; Prado, et al., 1996]. Sin embargo, es posible que la tasa de eclosión en la naturaleza sea mucho menor a la que sucede en cautiverio.

1.7.2. Importancia ecológica.

El ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum*, es una especie que día a día es mas difícil de observar en su forma silvestre. Por consiguiente, es difícil capturarlo y no se conoce con precisión las características de su entorno ecológico, por lo cual su papel e importancia ecológica aun no esta bien determinada. Sabemos mucho sobre su biología gracias a los estudios que se han realizado con especímenes que están en cautiverio, el ajolote tiene una gran importancia a nivel de investigación, ya que sirve como anfibio modelo en muchos de los procesos fisiológicos y morfológicos del grupo. También tiene muchos procesos hormonales que han sido estudiados ampliamente para explicar el proceso regenerativo tan particular que posee.



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

Los ajolotes son animales generalmente saludables. Su sistema inmunológico ha sido estudiado científicamente y se han encontrado diferencias muy significativas a las de los mamíferos. Por ejemplo un trasplante de un miembro (patas, etc.) de un ajolote a otro es aceptado normalmente y dicho miembro se vuelve completamente funcional, en el mamífero sin embargo tarde o temprano el rechazo ocurre porque el cuerpo no reconoce el trasplante como un cuerpo compatible. Si se le ha amputado parte de algún miembro, brazo o pierna, tiene la capacidad de regenerarse solo. [http://es.wikipedia.org/wiki/Ambystoma_mexicanum]

También puede regenerar células del cerebro o del corazón. Y dentro de las investigaciones de carácter médico, se han extraído células de una minúscula parte de ajolotes en cautiverio para su examen, y su organismo es capaz de regenerarlas. [<http://www.jornada.unam.mx/2005/03/09/a48n1cie.php>]

Es mucho el interés que se tiene por este organismo, al grado que ha sido catalogado como especie bandera, la cual se define como “aquella especie representativa de un área determinada y que tiene un significado cultural para la población”, con el objetivo de preservar y proteger el área del lago de Xochimilco.

No se conoce aun el impacto que tendría si el *Ambystoma mexicanum*, desapareciera, ya que no es considerado una especie “tope”, es decir un eslabón importante dentro de una cadena ecológica.

1.7.3. Estudios toxicológicos con pesticidas u otros contaminantes en anfibios.

BeeBee (1996) menciona que la mayoría de los estudios realizados sobre el género *Ambystoma* se han concentrado únicamente en *Ambystoma mexicanum*, por razones prácticas de su manejo en cautiverio. Se han realizado trabajos de aspectos



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

básicos como la anatomía, bioquímica, embriología, genética, metamorfosis, fisiología y regeneración de estos organismos.

Los aspectos de cultivo, especialmente en condiciones de laboratorio, también han sido bien estudiados. Desafortunadamente, existe poca información disponible acerca de su ecología, particularmente sobre su biología y alimentación.

Los estudios toxicológicos con pesticidas u otros contaminantes, aun no son bien estudiados, ya que no es posible el estudio *in situ* por su desaparición dentro de su hábitat. También es necesario contar con herramientas de análisis para fortalecer este tipo de estudios. La interacción y el efecto que tienen los pesticidas en estos singulares organismos, pueden ser estudiados en el laboratorio para posteriormente extrapolar las conclusiones de estos estudios a preservarlos en su estado natural.

En los últimos años se ha reconocido que la declinación de las poblaciones de anfibios, en número y especies, es un fenómeno mundial. La contaminación ambiental por pesticidas ha sido señalada como una de las posibles causas de este fenómeno reclamándose la inclusión de estos vertebrados en protocolos de evaluación de riesgo de impacto ambiental por pesticidas.

Hoy en día se considera a los anfibios como un bioindicador ambiental, especialmente para los xenobióticos, debido a que muchos anfibios acuáticos y/o terrestres experimentan estrés, estos pueden desempeñar papeles vitales en las comunidades, son sensibles a los contaminantes, tienen sus ciclos de vida cerca de los campos donde se aplican los pesticidas, y han desarrollado vulnerabilidad tanto en embriones, como en larvas cuyas etapas coincide con las aplicaciones de plaguicidas. El malatión por ejemplo ha sido tan estudiado a nivel toxicológico, resultando ser embriotóxico y teratogénico para embriones del sapo *Bufo arenarum*, una especie anfibia autóctona, aunque a concentraciones mucho mayores que las reportadas para aves y del mismo orden de magnitud que las reportadas para mamíferos. Los ensayos



CAPITULO 1: ANTECEDENTES _____

de toxicidad aguda evidenciaron un aumento de la susceptibilidad al tóxico con el progreso de la embriogénesis. Los efectos sub-letales más relevantes fueron la disminución de la velocidad de diferenciación y del tamaño de los embriones, los que finalmente conducen al fin del desarrollo; ambos efectos se revierten con la suspensión a los tiempos de exposición [Jason, et al., 2006].

Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* permitieron establecer una fuerte correlación de los efectos observados con el grado de inhibición de las colinesterasas, con disminuciones significativas del contenido endógeno de glutatión reducido y con cambios significativos en la toxicocinética del pesticida; el consumo de las reservas lipídicas con el progreso del desarrollo, son capaces de detoxificar al malatión por "secuestro". En estudios embrionarios avanzados y larvales una mayor disponibilidad del insecticida para interactuar con los sistemas enzimáticos que lo metabolizan y con sus blancos bioquímicos [http://investigadores.uncoma.edu.ar/Libiquima/Quimica/Libiquima/Plaguicidas/Tesistas.html].

1.8. NORMATIVIDAD E INVESTIGACIÓN EN MÉXICO.

El ajolote mexicano *Ambystoma mexicanum*, es una especie protegida y regulada por la NOM 059 ECOL – 01, la cual la coloca como “especie bajo protección”, el Convenio Internacional de Tráfico de Especies (CITES) lo clasifica dentro de la categoría II, como “especie amenazada” y la Unión Internacional de Conservación de la Naturaleza (UICN) le otorga el estatus de “vulnerabilidad D₂”, lo cual significa que es una especie que tiene un alto grado de extinción en libertad a mediano plazo y que además presenta un área de distribución “restringida”, con posibilidades de convertirse en “especie amenazada” o “extinta” a corto plazo, debido entre otros factores a las actividades humanas.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

2.1. MATERIAL Y EQUIPO.

SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

- ✓ Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (VARIAN, USA) con bomba ternaria modelo 9010.
- ✓ Inyector RHEODYNE con bucle de 20 μ L.
- ✓ Detector UV-Vis de arreglo de diodos (VARIAN, USA) modelo 9065.
- ✓ Software de control y procesamiento de datos "Star Workstation" (VARIAN, USA) versión 4.5 1989-1996.
- ✓ Columna analítica de acero inoxidable (VARIAN, USA) de 150 x 4.60 mm d. i. Empacada con sílice fase inversa RES ELUT C18, tamaño de partícula 5 μ m.
- ✓ Precolumna de guarda de acero inoxidable Hichrom, de 13 x 4.5 mm d. i., empacada con sílice fase inversa Nucleosil C18, (Phenomenex, USA) tamaño de partícula 10 μ m.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

- ✓ Músculo de ajolote (*Ambystoma mexicanum*).
- ✓ Hígado de ajolote (*Ambystoma mexicanum*).

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

- ✓ Mortero de ágata.
- ✓ Reservorios con filtros para empacar cartuchos para la extracción en fase sólida de 6mL, (VARIAN, USA).
- ✓ Cartucho de jeringa de 20 mL (BD, PLASTIPAK, México), con adaptador.
- ✓ Filtros para cartuchos de extracción en fase sólida de 6mL, 1/2", 20 μ m (VARIAN, USA).



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

- ✓ Émbolo de jeringa de 5mL (BD, PLASTIPAK, México).
- ✓ Cámara de vacío con regulador de presión, (Ashcroft, USA).
- ✓ Rotovapor automático con bomba de vacío BÜCHI, (Laboteknik AG, Suiza).

OTROS EQUIPOS Y MATERIAL.

- ✓ Baño de ultrasonido para degasificación de las disoluciones y de la fase móvil (Branson, USA) modelo 1210.
- ✓ Membranas de “nylon” (Cole Parmer, USA) de 47 mm de diámetro y tamaño de poro de 0.45 μm .
- ✓ Micropipeta de volumen variable de 20 – 200 μL , (Eppendorf, Alemania).
- ✓ Micropipeta de volumen variable de 100 – 1000 μL , (Eppendorf, Alemania).
- ✓ Micropipeta de volumen variable de 2 – 20 μL , (Eppendorf, Alemania).
- ✓ Microbalanza analítica, modelo AG 245 (Mettler Toledo, Suiza).
- ✓ Material común de laboratorio, Vasos de precipitado de 5, 10 y 20 ml, matraces aforados de 5, 10 y 25 ml, etc.

DISOLVENTE Y REACTIVOS.

- ✓ Metanol grado cromatográfico (J. T. Baker, México).
- ✓ Acetonitrilo grado cromatográfico (J. T. Baker, México).
- ✓ Agua grado cromatográfico purificada en sistema de micro filtración (COLE-PARMER, USA).
- ✓ Sílice C18, Supelclean LC18 (SUPELCO, USA).
- ✓ Gel de sílice, polvo 60-200 mallas apropiado para cromatografía (J. T. Baker, México).
- ✓ Estándares de pesticidas organofosforados (Chemservice, West Chester, USA):
 - Clorpirifos, pureza 99%
 - Fentión, pureza 98.7%.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

- Metil-paratión, pureza 99.5%.

2.2. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES DE LOS PESTICIDAS.

Se preparó una solución madre con la mezcla de los 3 pesticidas en estudio, con las siguientes concentraciones, para Fentión y Clorpirifos de 500 mg/L y para Metil Paratión de 250 mg/L, utilizando metanol como disolvente.

A partir de esta solución madre, se realizaron las disoluciones de diferentes concentraciones para ser utilizadas en el cromatógrafo de líquidos y obtener los espectros de estos compuestos con el detector UV de arreglo de diodos. También con esta solución madre se prepararon las diluciones para establecer las condiciones de separación cromatográfica, y la fortificación de las muestras.

Esta solución fue almacenada en un frasco de vidrio color ámbar con tapón de rosca a una temperatura de 4 °C, manteniéndose estable durante 6 meses.

2.3. DETECCIÓN Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS PESTICIDAS.

2.3.1. Condiciones óptimas de detección.

Para llevar a cabo esta parte, se inyectaron 20 μ L de una disolución de 10 mg/L a partir de la solución madre, al sistema CLAR - DAD para obtener su espectro de absorción de luz ultravioleta (en un rango de 190 a 367 nm), posteriormente se selecciono la longitud de onda de máxima adsorción a la que se detecta a cada uno de los pesticidas organofosforados.

Para realizar la separación de los compuestos de interés se realizó un programa en el cual la fase móvil fue inicialmente una mezcla 70:30 metanol:agua la cual se modificó con fuerza eluyente creciente hasta llegar a 100% de metanol en 5 minutos, los espectros de los pesticidas se obtuvieron a partir de los cromatogramas resultantes.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

2.3.2. Optimización de los gradientes de elución para la retención cromatográfica de los pesticidas organofosforados.

Conociendo la longitud de onda de máxima adsorción, en la detección y cuantificación de cada pesticida organofosforado, a continuación se realizó la optimización de un gradiente de elución para la retención y separación de estos compuestos en los extractos.

Para lograr esto, se trabajo inicialmente con una disolución de la mezcla de los plaguicidas a una concentración de 10 mg/L, para Fentiión y Clorpirifos y de 5 mg/L para metil paratiión y de esta disolución se inyectaron 20 μ L en el cromatógrafo de líquidos, iniciando el programa de elución con una fase móvil, constituida por una mezcla de 70:30 % metanol:agua (v/v), con fuerza eluente creciente, a 100% de metanol, en un tiempo de 10 minutos. Con este gradiente se trabajó toda la parte preliminar, estas condiciones experimentales se identificaron como gradiente A

Es importante mencionar que debido a la naturaleza de la muestra con la que se trabajó, fue necesario ir modificando el tiempo en el que se alcanza el 100% de metanol en el gradiente, con el objeto de obtener una adecuada separación de los compuestos de interés de los interferentes co-eluidos en los extractos.

Durante el establecimiento de las condiciones de extracción finales se trabajó con una disolución de la mezcla de los pesticidas a una concentración de 30 mg/ L de fentiión y clorpirifos y 15 mg/ L de metil paratiión, y de esta disolución se inyectaron 20 μ L en el cromatógrafo de líquidos. El programa de elución inició con una fase móvil constituida por una mezcla de 75:25 % metanol:agua (v/v), con fuerza eluente creciente a 100% de metanol, en un tiempo de 17.5 minutos, estas condiciones experimentales se identificaron como gradiente B.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

2.3.3. Linealidad, precisión, límites de detección y de cuantificación del sistema.

Linealidad y precisión del sistema cromatográfico.

Para determinar la linealidad y precisión del sistema cromatográfico, se procedió a realizar una curva patrón, con disoluciones con las siguientes concentraciones 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L y 30 mg/L, para fentión y clorpirifos y de 1 mg/L, 2.5 mg/L, 5 mg/L, 7.5 mg/L y 15 mg/L, para metil paratió. Se inyectaron 20 μ L de las disoluciones por triplicado. El área del pico cromatográfico se relacionó con la concentración de cada analito y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados.

Límites de detección y de cuantificación del sistema cromatográfico.

Para realizar la determinación del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC), se llevo a cabo la inyección de 20 μ L, al sistema cromatografico de disoluciones con las siguientes concentraciones, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 15 mg/L, y 30 mg/L , para fentión y clorpirifos y de 1 mg/L, 2.5 mg/L, 5 mg/L, 7.5 mg/L y 15 mg/L, para metil paratió. Los LDs y los LCs, se estimaron estadísticamente a partir de las gráficas de calibración utilizando las siguientes relaciones:

$$LD = [3.3 \cdot S_{bo}] / b_1$$

$$LC = [10 \cdot S_{bo}] / b_1$$

Donde b_1 =Pendiente

S_{bo} =Desviación estándar de la ordenada al origen.

Además, se determinó el límite de detección experimental de cada compuesto inyectando disoluciones de estándares cada vez más diluidas hasta que desapareció la señal.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

2.4. DESARROLLO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.

Para desarrollar el método de extracción basado en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), se llevó a cabo lo siguiente:

2.4.1. Ensayos preliminares.

2.4.1.1. DMFS con estándares sin muestra.

Con el fin de conocer el comportamiento de retención y elución de los analitos de interés se simuló la DMFS sin la utilización de muestra, se fortificaron 400 mg del adsorbente C-18 con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión, contenidos en 60 μL , de solución madre. La sílice C-18 fue previamente acondicionada, esto consistió en lavarla con 2 mL de metanol por cada gramo del adsorbente estando empacada en una columna y dejarla secar perfectamente por aspiración al vacío durante una hora. Se dejó equilibrar con los pesticidas durante 15 minutos, posteriormente se molió, haciendo uso del mortero de ágata y se procedió a la preparación de la columna de dispersión.

La elución selectiva de los pesticidas organofosforados se planteó considerando que este sistema de extracción se comporta como una cromatografía en fase inversa, por lo cual se podría realizar con mezclas de acetonitrilo:agua de fuerza eluente creciente.

Le secuencia de elución fue la siguiente.

FRACCIÓN 1. 5 mL de agua grado cromatográfico a desechar.

FRACCIÓN 2. 1 mL de la mezcla con 25% de acetonitrilo y 75% agua a desechar.

FRACCIÓN 3. 1 mL de la mezcla de acetonitrilo al 50% y 50% agua a desechar.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

FRACCIÓN 4. 1 – 4 mL de acetonitrilo (ACN) al 100% a análisis.

En este caso que no se utilizó muestra, las fracciones 1, 2 y 3 correspondientes a los lavados y eliminación de interferentes fueron desechados.

La fracción 4 se analizó en el cromatógrafo de líquidos, por que es en ella en la que se esperaba contener a los pesticidas de interés; esta fracción se recuperó en subfracciones de 1 mL, y se analizó el contenido de los pesticidas en cada una de ellas. Para el cálculo de los recobros, se compararon las áreas de los picos en los extractos de estándares, con los de una solución de referencia de concentración 30 µg/mL de fentión y clorpirifos y 15 µg/mL de metil paratión, en 1 mL, la cual representó al 100% de recobro. Esto se realizó el mismo día de las extracciones.

Los recobros se calcularon en estos ensayos y en los subsecuentes con la siguiente fórmula.

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Área del pico en el extracto}}{\text{Área del pico en solución de referencia}} * 100$$

Este procedimiento se realizó por triplicado.

Considerando que más adelante trabajaría con una muestra la cual es rica en lípidos, como lo son los organismos acuáticos, posteriormente se probaron eluciones con ACN al 90% y al 80%, con el fin de que al dispersar una muestra real, los pesticidas de interés eluirían con la menor cantidad de interferentes lipofílicos.

Las primeras fracciones correspondientes al lavado fueron las mismas descritas anteriormente, la variación se realizó en la fracción 4 en donde se utilizaron ACN al 90% y al 80%, en vez del 100%. El procedimiento para su análisis fue el mismo que para el caso del eluato con ACN al 100%, se realizó por triplicado.



2.4.1.2. DMFS con estándares y con muestra (músculo de ajolote).

Con el fin de evaluar la presencia de los interferentes en la muestra real se aplicó la metodología descrita en la sección anterior, utilizando muestra de músculo de ajolote.

Así, se utilizó 100 mg de muestra de homogeneizado de músculo de ajolote, la cual se fortificó por 15 minutos, con la misma cantidad de pesticidas, 60 μ L de solución madre la cual corresponde a 30 μ g de fentión y clorpirifos y 15 μ g de metil paratión, la muestra fortificada se disperso con 400 mg de adsorbente C-18 para después formar la columna de dispersión. Los extractos se analizaron, calculándose los recobros para cada fracción de 1 mL, al igual que en la sección 2.4.1.1, pág. 45.

2.4.1.3. Limpieza en los ensayos preliminares.

Debido a que los extractos obtenidos por la DMFS con muestra, ocasionaban una elevación de la presión al ser inyectados al sistema cromatográfico, a causa de la retención y acumulación gradual de interferentes lipídicos, se optó por llevar a cabo un paso de limpieza con adsorbentes, el cual se efectuó con sílice virgen, por lo que en un primer ensayo, se utilizó la DMFS sin muestra, fortificando la C18 con estándares y en un segundo ensayo la DMFS utilizando muestra fortificada con los estándares. Para la limpieza se colocaron 100 mg de sílice virgen en el fondo del cartucho de la columna de dispersión y se aplicó el mismo tren de elución con ACN al 100% en la fracción final.

Al evaluar primero los recobros utilizando estándares sin muestra, se trató de saber si la co-columna de sílice virgen no retenía a los compuestos de interés ocasionando recobros bajos y si era necesario variar los volúmenes de elución.

Después de obtener resultados satisfactorios al considerar las variaciones pertinentes, lo siguiente a realizar fue llevar a cabo la DMFS utilizando muestra, estándares y la sílice virgen en el fondo de la columna de dispersión para evaluar si la co-columna si ayuda a retener interferentes procedentes de la muestra, lo cual se



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

manifestaría al monitorear la presión del sistema cromatográfico. Los ensayos se realizaron por triplicado y se obtuvieron los recobros.

2.4.2. Ensayos finales.

2.4.2.1. Establecimiento de las condiciones de extracción.

En base a los resultados preliminares, que nos mostraron como afecta a la extracción el adsorbente (C-18), el uso de la co-columna de sílice virgen y el tren de elución, lo que se procedió a realizar fue mejorar la sensibilidad del método con el manejo de una mayor cantidad de muestra aumentando de 100 mg a 500 mg. Una consecuencia de esto fue aumentar las cantidades de los adsorbentes de dispersión y limpieza por lo que de aquí en adelante se aumentó 4 veces más la cantidad del adsorbente de dispersión (C-18) de 500 mg a 2000 mg y del adsorbente de limpieza (sílice virgen) de 100 mg a 500mg en el fondo del cartucho.

Los volúmenes de elución también se modificaron y se indican en la siguiente sección.

2.4.2.1.1. Elución en los ensayos sin muestra.

Para apreciar el efecto del aumento de la cantidad de los adsorbentes en la recuperación de los pesticidas, primero se trabajó fortificando 2 g del adsorbente C-18 con 30 μg de fentión y clorpirifos y 15 μg de metil paratión contenidos en 60 μL de la solución madre. Se dejó equilibrar durante 15 minutos.

Se aplicaron las siguientes condiciones de elución, considerando volúmenes cuatro veces mayores que en los ensayos preliminares.

FRACCIÓN 1. 20 mL de agua grado cromatográfico a desechar; esto es para eliminar impurezas.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

FRACCIÓN 2. 4 mL de la mezcla con 25% de acetonitrilo y 75% agua a desechar.

FRACCIÓN 3. 4 mL de la mezcla de acetonitrilo al 50% y 50% agua a análisis.

FRACCIÓN 4. 4-8 mL de acetonitrilo al 100% a análisis.

Las fracciones 3 y 4 fueron divididas en sub-fracciones de 2 mL, y en cada uno se monitoreo la presencia de los analitos de interés en el cromatógrafo de líquidos.

Las áreas obtenidas de los picos correspondientes a los pesticidas en cada una de las sub-fracciones de 2 mL, se compararon con un control de recuperación correspondiente al 100% de recobro que contenía 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión en 2 mL de ACN, lo que representa una concentración de 15 mg/L de fentión y clorpirifos y de 7.5 mg/L de metil paratión.

Cabe destacar, que el volumen de la fracción 3 se optimizó, para que en esta ya no eluyan los analitos de interés.

Con la fracción 3 ya optimizada se verificó que en la fracción 4, se eluyeran todos los pesticidas de interés, y con el volumen adecuando para obtener el 100 % de recobro o muy cercano.

2.4.2.1.2. Elución en los ensayos con muestra.

El tren de elución que se detalla más adelante se aplicó a la columna de dispersión, constituida por 0.5 g de muestra de ajolote fortificada (tiempo de equilibrio de 15 min.) con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión contenidos en 60 µL de la solución madre, más 2g del adsorbente C-18. Después de macerar y homogeneizar, se colocó la pasta seca obtenida en el cartucho de extracción el cual contenía previamente empacada 500 mg de sílice virgen en el fondo.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

Las condiciones de elución fueren las siguientes.

FRACCIÓN 1. 20 mL de agua grado cromatográfico a desechar; esto es para eliminar impurezas altamente polares como lo son las proteínas y restos de sangre, esto se logro establecer por observación visual, al desaparecer la coloración así como la turbidez en los eluatos.

FRACCIÓN 2. 4 mL de la mezcla con 25% de acetonitrilo y 75% agua a desechar.

FRACCIÓN 3. 2 mL de la mezcla de acetonitrilo al 50% y 50% agua. Este volumen se seleccionó ya que eluyen los analitos a volúmenes mayores, a desechar.

FRACCIÓN 4. 6 mL de acetonitrilo al 100%, volumen mínimo en el cual eluyen los plaguicidas en su totalidad, a análisis.

Las fracciones 2 y 3 corresponden a los lavados y eliminación de interferentes de la matriz biológica, estas fracciones son muy importantes porque en estas se eliminaron los componentes no deseados más polares que los analitos de interés, sin que eluyan estos.

Las áreas obtenidas con cada sub-fracción, fueron comparadas con las disoluciones de concentraciones como en la sección 2.4.2.1, en la pagina 49.

2.4.2.2. Linealidad y precisión del método de extracción final (sin evaporación).

Se procedió a utilizar la metodología final de extracción sin evaporación, con muestra de músculo de ajolote fortificado a los siguientes niveles 60 μg de pesticida /g de músculo, 30 μg de pesticida /g de músculo y 22.5 μg de pesticida /g de músculo para fentión y clorpirifos y de 30 μg de pesticida /g de músculo, 15 μg de pesticida /g de músculo y 11.25 μg de pesticida /g de músculo para metil paratión. Con los resultados



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

obtenidos se trazó la gráfica de cantidad adicionada contra área de los picos y mediante el ajuste de mínimos cuadrados se calcularon los coeficientes de correlación, los cuales representan la linealidad. Para determinar la precisión del método, se realizó la inyección de cada concentración por triplicado.

2.4.2.3. Evaporación.

Para verificar que durante la evaporación de los eluatos obtenidos a partir de llevar a cabo los pasos del método de extracción final no hubiera pérdidas de los pesticidas se evaluaron se procedió a realizar los siguientes pasos:

1. Se evaporó a sequedad una disolución de 6 mL con una concentración de 5 mg/L para fentión y clorpirifos y de 2.5 mg/L para metil paratión, en un rotavapor a 40 °C a 170 mbar a 50 rpm, y durante 30 minutos, y se reconstituyó con 1000 µL de ACN. El porcentaje recuperado se evaluó con respecto a una disolución de 30 mg/L para fentión y clorpirifos y de 15 mg/L para metil paratión correspondientes al 100%.

Se inyectó por triplicado.

2. Se llevó a cabo la extracción utilizando muestra fortificada a una concentración de 30 µg/g para fentión y clorpirifos y 15 µg/g para metil paratión, con las mismas condiciones descritas en el paso 1, el extracto se reconstituyó hasta un volumen total de 1000 µL de ACN. El recobro se evaluaría igual que el porcentaje recuperado. Pero debido a que los eluatos obtenidos fueron turbios, en la apreciación visual, no se inyectaron al sistema cromatográfico.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

2.4.2.4. Comparación entre el uso de la sílice SUPELCO y la sílice BAKER como adsorbentes de limpieza del extracto.

Al tener establecidas las condiciones de extracción, de elución y de evaporación, se procedió a realizar una limpieza suplementaria del extracto concentrado, esto debido a que los eluatos aún contenían lípidos. Se compararon los efectos en la limpieza con 2 sílices de diferente marca comercial, la SUPELCO y la BAKER empacadas en cartuchos diferentes al de la fase dispersa.

Las sílices fueran acondicionadas de manera independiente esto consistió en:

Lavarla con 2 mL de ACN por cada gramo del adsorbente estando empacada en una columna y dejarla secar perfectamente por aspiración al vacío durante una hora.

Para evaluar la eficiencia de las 2 diferentes sílices para eliminar los lípidos co-extraídos se realizó la DMFS, con las condiciones de extracción final ya establecidas, con muestra (músculo de ajolote). El extracto obtenido en la fracción 4 compuesta por 100% de ACN, donde se eluyen los compuestos, se hizo pasar a través de un cartucho con 1500 mg de sílice SUPELCO; el eluato se llevó a evaporación total y fue reconstituido con 1000 μ L de acetonitrilo, y se evaluó el recobro obtenido. Para el caso de la sílice BAKER lo realizado fue lo mismo. El recobro se evaluó por comparación con el evaporado, de 6 mL de una disolución de concentración de 5 mg/L para fentión y clorpirifos y de 2.5 mg/L para metil paratión, reconstituido con 1000 μ L de ACN, dando una concentración final de 30 mg/L para fentión y clorpirifos y de 15 mg/L para metil paratión.

Al observar que ninguna de las sílices retenían a los compuestos de interés y los porcentajes recuperados eran satisfactorios se procedió a realizar los ensayos con muestra con el procedimiento arriba descrito.



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

2.4.2.5. Filtración del evaporado.

Se realizó una filtración de los extractos provenientes de las muestras fortificadas anteriores, utilizando filtros de nylon de 0.45 μm .

Se evaluó el recobro obtenido después de la filtración y se estableció si existió pérdida de los pesticidas comparando el resultado con una disolución de concentración de 30 mg/L para fentión y clorpirifos y de 15 mg/L para metil paratión.

2.5. EVALUACIÓN DEL MÉTODO.

Una vez establecido el protocolo completo de extracción y análisis por DMFS-CLAR (descrito más adelante en la sección de resultados), se procedió a realizar la evaluación del método de determinación.

2.5.1. Linealidad y precisión.

Linealidad.

Para determinar la linealidad del método, se realizó una curva patrón, con los siguientes niveles de fortificación: a) 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión, b) 30 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y 15 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión, c) 15 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y 7.5 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión. Se inyectaron 20 μL de las disoluciones por triplicado. Con los resultados obtenidos, el área del pico cromatográfico se relacionó con la concentración recuperada de cada analito, por medio de la regresión lineal con el ajuste de mínimos cuadrados.

Precisión.

Para evaluar la precisión del método se realizó la inyección por triplicado de tres extractos provenientes de una muestra fortificada a 15 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

7.5 µg/g para metil paratión. También se inyectaron 3 extractos provenientes de extracciones de tres días diferentes. Se compararon los recobros de cada analito de interés y con los resultados generados se calculó el coeficiente de variación (CV) de cada analito con la siguiente formula.

$$CV = [(S / \chi) * 100]$$

Donde: S= desviación estándar,

χ = media.

2.5.2. Exactitud en los estudios de recobro.

Se realizaron por triplicado las extracciones con las siguientes concentraciones de fortificación de las muestras, a) 60 µg/g para fentión y clorpirifos y 30 µg/g para metil paratión, b) 30 µg/g para fentión y clorpirifos y 15 µg/g para metil paratión, c) 15 µg/g para fentión y clorpirifos y 7.5 µg/g para metil paratión. Se trazaron las gráficas de cantidad adicionada contra cantidad recuperada cuya pendiente nos permitió estimar la exactitud del método en el intervalo graficado. Si el valor de la pendiente es igual a 1 la exactitud es del 100%.

2.5.3. Límites de detección y de cuantificación.

Para obtener los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), se llevo a cabo la inyección por triplicado de 20 µL al sistema cromatográfico, de extractos provenientes de muestras fortificadas de las siguientes concentraciones, a) 60 µg/g para fentión y clorpirifos y 30 µg/g para metil paratión, b) 30 µg/g para fentión y clorpirifos y 15 µg/g para metil paratión, c) 15 µg/g para fentión y clorpirifos y 7.5 µg/g para metil paratión. Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC), se calcularon estadísticamente a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de las graficas de área vs., concentración utilizando las siguientes relaciones:



CAPITULO 2. METODOLOGÍA

$$LD = [3.3 \cdot S_{bo}] / b_1$$

$$LC = [10 \cdot S_{bo}] / b_1$$

Donde b_1 =Pendiente

S_{bo} =Desviación estándar de la ordenada al origen.

2.6. APLICACIÓN DEL METODO.

2.6.1. Análisis de muestras fortificadas de hígado.

Para evaluar la robustez del método de extracción, este se aplicó a una muestra más rica en lípidos que el músculo, el hígado. Así se llevó a cabo el análisis de los pesticidas en muestras de hígados provenientes de los mismos organismos utilizados para desarrollar el presente método. Las muestras se fortificaron por triplicado a un nivel de 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión, también se realizó un blanco sin fortificar.

2.6.2. Análisis de muestras de organismos expuestos.

Con el método de extracción y análisis desarrollado, se analizó una muestra de músculo proveniente de un ajolote expuesto durante 96 horas en el laboratorio a la concentración de máxima solubilidad del clorpirifos, la cual es de 1.4 mg/L en agua. Después de este tiempo, el ajolote fue sacrificado y se conservó en congelación hasta el día de su análisis. Los animales provienen del Laboratorio de Análisis Ambiental de la Facultad de Ciencias UNAM. En paralelo se analizó una muestra de un organismo no expuesto al clorpirifos.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. DETECCIÓN Y SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS PESTICIDAS.

3.1.1. Condiciones óptimas de detección.

La selección de la longitud de onda óptima para realizar la detección cromatográfica de cada uno de los pesticidas organofosforados en estudio se basó en los espectros de absorción de luz ultravioleta presentados en la Figura. 3.1.

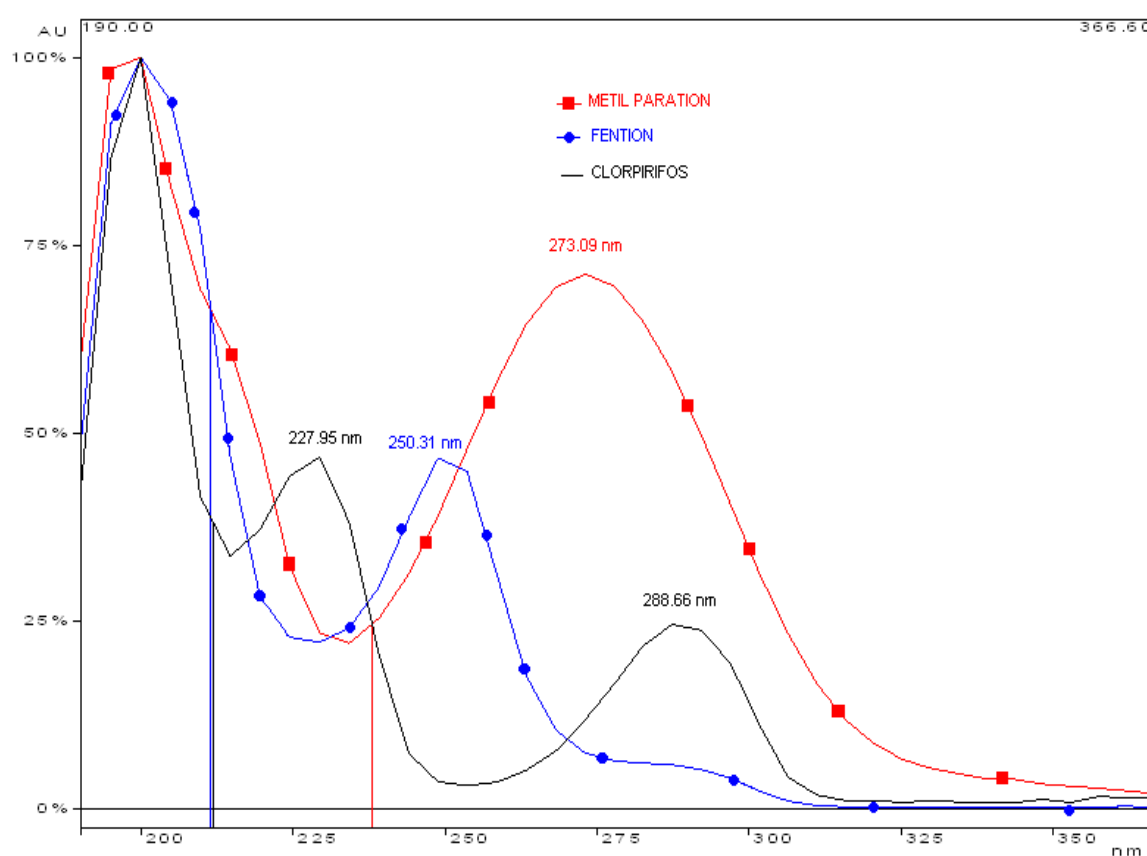


Figura 3.1. Espectros de absorción de los pesticidas organofosforados en estudio, en el intervalo de 190 a 367 nm.

La longitud de onda de máxima absorción de cada uno de los pesticidas se presenta en la tabla 3.1. junto con las longitudes de onda más cercanas establecidas por el detector de arreglo de diodos para su análisis por cromatografía de líquidos y así evitar que se detecten interferentes que limiten o interfieran en la detección.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Las longitudes de onda usadas para la cuantificación, con los métodos programados por el “software” de control. Se programó cada longitud de detección óptima para que se seleccionara en los tiempos en los que se esperaban que eluyeron los solutos de cada pesticida en el cromatograma.

Tabla 3.1. Longitud de onda de máxima absorción y de cuantificación de cada uno de los pesticidas organofosforados.

Pesticidas	Longitud de Onda de máxima absorción UV. (nm)	Longitud de Onda usados para la Cuantificación. (nm)
Metil paratión	199.53	273
	273.09	
Fentión	199.53	254
	250.31	
Clorpirifos	199.53	287
	227.95	
	288.66	

3.1.2. Optimización de los gradientes de elución para la retención cromatográfica de los pesticidas organofosforados.

En la tabla 3.2, se muestra la dependencia del factor de capacidad (k') de cada compuesto, en función de cada gradiente, utilizado y descrito en la parte de metodología así como los tiempos de retención. Estos valores indican el orden de elución de los pesticidas en estudio en la columna de C-18.

Tabla 3.2. Parámetros de retención de los pesticidas en estudio en la columna de sílice C-18, con los dos gradientes utilizados.

Pesticidas	Gradiente A			Gradiente B		
	Tiempo de retención (tr) en minutos.	k'	Log k'	Tiempo de retención (tr) en minutos.	k'	Log k'
Metil paratión	4.22	2.01	0.303	3.92	1.80	0.255
Fentión	5.65	3.04	0.483	6.85	3.89	0.590
Clorpirifos	6.96	3.97	0.599	13.96	8.97	0.953



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

t_0 se determinó inyectando una disolución acuosa de nitrato de sodio (2 M), y fue de 1.40 minutos.

En la tabla 3.3, se presenta el valor de la resolución para el gradiente B, con el cual se desarrolló el método de determinación de los pesticidas en estudio. Los valores indican que se presenta suficiente separación entre cada analito debido a que los valores son superiores a 1.5, valor que representa una separación en la línea base.

Tabla 3.3. Resolución entre los picos de los pesticidas con el gradiente B.

	Gradiente B
R_s Fentión- Metil paratión	8.61
R_s Clorpirifos-Fentión	11.94
R_s Clorpirifos-Metil paratión	16.88

En la tabla 3.4, se muestra la selectividad (α), la cual indica las diferencias relativas entre la interacción de los solutos entre la fase estacionaria y la fase móvil.

Tabla 3.4. Diferencia de la selectividad (α), de los pesticidas en estudio con el gradiente A y con el gradiente B.

	Gradiente A	Gradiente B
α Fentión- Metil paratión	1.51	2.16
α Clorpirifos-Fentión	1.31	2.30
α Clorpirifos-Metil paratión	1.97	4.98

De esta tabla podemos decir que la columna es muy selectiva para estos analitos, debido a que el valor es superior a 1, con cada gradiente utilizado.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1.3. Linealidad, precisión y límites de detección del sistema cromatográfico.

Linealidad.

La Figura 3.2. representa la respuesta del detector en función de la concentración de los 3 pesticidas en estudio (n=5), y se presentan las ecuaciones de la recta y los coeficientes de correlación obtenidos.

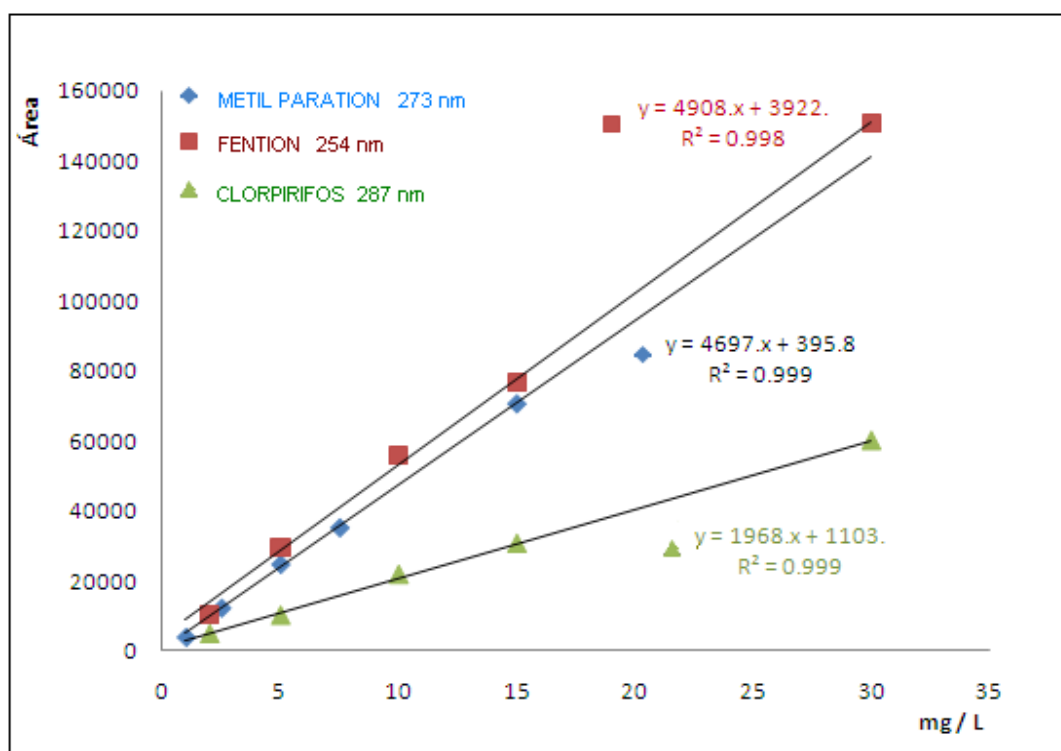


Figura 3.2. Respuesta del detector en función de la concentración de los pesticidas en estudio, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fention a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.

Los coeficientes de correlación que se muestran junto con cada ecuación, indica que la respuesta del detector en el intervalo de 30 mg/L a 2 mg/L, para fention y clorpirifos y en un intervalo de 15 mg/L a 1 mg/L para metil paration, fue lineal, con r^2 por arriba de 0.998 para los pesticidas en estudio.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Precisión.

En la tabla 3.5, se muestran los coeficientes de variación obtenidos a partir de las áreas de los cromatogramas provenientes de cada disolución de los pesticidas empleadas para la calibración.

Tabla 3.5. Reproducibilidad del sistema cromatográfico. Coeficiente de variación (%), (n=5).

Concentración (mg./L)		C. V. (%)		
MP	FyC	Metilparatión (MP)	Fentión (F)	Clorpirifos (C)
15	30	1.6	0.8	2.7
7.5	15	0.4	1.2	5.3
5	10	0.9	1.6	2.3
2.5	5	1.3	1.4	3.2
1	2	3.3	0.6	2.5

Con estos datos se observa que la variabilidad máxima del sistema es ligeramente superior al 5%, con lo que podemos decir que la precisión del sistema cromatográfico, permite trabajar con un variabilidad menor del 5.3%, en los resultados obtenidos, dentro de estos intervalos de concentración de los tres plaguicidas en estudio.

Limites de detección y cuantificación.

En la tabla 3.6, se muestran los límites de detección teóricos y experimentales; también se muestran los límites de cuantificación.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 3.6. Límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico.

Compuesto	Límite de detección (mg/L)		Límite de cuantificación (mg/L), estimados.
	Estimado	Experimental (determinación directa)	
Metil Paratión	1.20	1.50	2.60
Fentión	1.42	1.50	4.31
Clorpirifos	1.00	3.00	3.03

Se observa que los valores obtenidos de los LDs, determinados directamente son similares, aunque el clorpirifos presenta valores mayores.

3.2. DESARROLLO DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.

3.2.1. Ensayos preliminares.

3.2.1.1. DMFS con estándares (sin muestra).

La técnica de DMFS, fortificando con estándares solamente al adsorbente, como se describió en la parte experimental sección 2.4.1.1, pág. 45, del presente proyecto, se realizó con el fin de simular la extracción con la muestra y conocer el orden de elución de los compuestos de interés, así como sus recobros, sin la presencia de los interferentes provenientes de la muestra.

En la tabla 3.7, se muestran los porcentajes de los pesticidas recuperados en las fracciones correspondientes a la secuencia completa de elución con la aplicación final de ACN al 100%.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 3.7. Promedio de los porcentajes recuperados en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 100% para eluirlos. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	Promedio de los % de recobro total	Coefficiente de variación (%)
Metil paratión	NI	NI	1.00	62	36	ND	ND	99	2.7
Fentión	NI	NI	ND	50	48	ND	ND	98	2.5
Clorpirifos	NI	NI	ND	46	57	ND	ND	103	8.6

NI: no se inyectó
 ND: no se detectó.

Con estos resultados podemos ver que la retención y elución de los pesticidas se llevó acabo adecuadamente al obtenerse recobros globales cuantitativos sin pérdida de estos en las fracciones de lavado (agua, ACN: agua 25:75% y 50:50%), en donde solo se pierde el 1% del metil paratión. Los coeficientes de variación indicaron que los resultados son reproducibles, ya que fueron menores al 8.6%. Para muestras biológicas en un orden de ppm se pueden aceptar RSD o CV hasta de 16. [Wood, 1999]

Cabe mencionar que los eluatos de 100% de ACN se observaron claros, pero la presión del sistema cromatografico de todas maneras subió después de 3-5 inyecciones, lo que nos indicó que otros compuestos seguían quedando retenidos y acumulándose en la fase estacionaria de la precolumna. Por esta razón se probaron eluentes más débiles como el ACN al 90% y al 80%, para recuperar a los pesticidas en el cartucho de extracción con menos lípidos.

Los resultados provenientes con la elución de ACN al 90% (2 repeticiones) se presentan en la tabla 3.8.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 3.8. Promedio de los porcentajes recuperados en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 90% para eluirlos. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 90%	1 ml sol ACN 90%	1 ml sol ACN 90%	1 ml sol ACN 90%	Recobro global promedio
Metil paratión	NI	NI	ND	69	39	ND	ND	108
Fentión	NI	NI	ND	59	46	ND	ND	105
Clorpirifos	NI	NI	ND	42	61	ND	ND	103

NI: no se inyectó
 ND: no se detectó.

Los resultados provenientes con la elución de ACN al 80% (2 repeticiones) se presentan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Promedio de los porcentajes recuperados en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 80% para eluirlos. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 80%	1 ml sol ACN 80%	1 ml sol ACN 80%	1 ml sol ACN 80%	Recobro global promedio
Metil paratión	NI	NI	6	74	12	ND	ND	92
Fentión	NI	NI	2	58	27	1	ND	87
Clorpirifos	NI	NI	ND	30	54	9	ND	93

NI: no se inyectó
 ND: no se detectó.

Los recobros obtenidos en los eluatos a 90% de ACN, nos indicaron que al igual que con ACN al 100% se pueden eluir los compuestos de interés con recobros cuantitativos. En cambio, con las eluciones utilizando ACN al 80%, se dan recobros menores, aunque los recobros no están por debajo del 87%.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.2.1.2. DMFS con estándares y con muestra (músculo de ajolote).

En estos ensayos con muestra se esperaba que tanto el volumen como la secuencia de elución fueran similares a los obtenidos sin muestra, por lo que se utilizó la misma secuencia de elución planteada en la parte experimental, para llevar a cabo la extracción.

Las tablas 3.10, 3.11, y 3.12, contienen los recobros obtenidos con las diferentes secuencias de elución probadas, con 80%, 90% y 100% de acetonitrilo respectivamente en la fracción final.

Tabla 3.10. Resultados de los recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 80% para eluirlos. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre. (n=2)

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 80%	1 ml sol ACN 80%	1 ml sol ACN 80%	1 ml sol ACN 80%	Recobro global promedio
Metil paratión	NI	NI	7	22	ND	ND	ND	29
Fentión	NI	NI	3	8	ND	ND	ND	11
Clorpirifos	NI	NI	6	19	ND	ND	ND	25

NI: no se inyectó
 ND: no se detectó.

Tabla 3.11. Resultados de los recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 90% para eluirlos. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre. (n=2)

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 90%	1 ml sol ACN 90%	1 ml sol ACN 90%	1 ml sol ACN 90%	Recobro global promedio
Metil paratión	NI	NI	ND	54	47	ND	ND	101
Fentión	NI	NI	ND	30	60	ND	ND	90
Clorpirifos	NI	NI	ND	25	78	ND	ND	103

NI: no se inyectó
 ND: no se detectó.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 3.12. Resultados de los recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 100% para eluirlos. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre. (n=2)

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1 ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	Recobro global promedio
Metil paratión	NI	NI	ND	75	30	ND	ND	105
Fentión	NI	NI	ND	59	39	ND	ND	98
Clorpirifos	NI	NI	ND	55	48	ND	ND	103

NI: no se inyectó
 ND: no se detectó.

Se observa que los recobros obtenidos, con 100% de ACN fueron los más altos con respecto a la elución con ACN al 90% y a la elución de ACN al 80%, por lo que se estableció que es más conveniente trabajar con esta solución para la elución de los pesticidas de interés. La elución con 80% proporcionó recobros muy bajos, inferiores al 29%. Cabe destacar que la elución con 90% también resultó ser cuantitativa, con recobros algo menores para el fentión. Sin embargo se observó que aun cuando este eluyente reduce la presencia de lípidos en el extracto final el contenido de agua, dificulta la evaporación final del extracto. Así, que se selecciono la elución con acetonitrilo puro. Sin embargo se, tomó en cuenta que la elución con ACN 100% también se pueden eluir muchos interferentes lipidicos, por lo que en el protocolo final se realizó una limpieza extra con adsorbentes.

En la tabla 3.13, se presentan los coeficientes de variación en los recobros globales, de cada uno de los pesticidas, usando el protocolo preliminar, que consideró la elución de los pesticidas utilizando ACN al 100%.

Tabla 3.13. Coeficientes de variación de los analitos de interés, con el protocolo preliminar.

Pesticidas	C. V. (%)
Metil paratión	1.8
Fentión	3.6
Clorpirifos	0.84

Se observa que los C. V. son aceptables, menores al 3.6 %



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.2.1.3. Limpieza en los ensayos preliminares.

Conociendo que la elución más adecuada se llevó a cabo con ACN al 100%, y siguiendo con el procedimiento descrito en la parte de metodología (sección 2.4.1.3, pág. 47). En la tabla 3.14. se muestran los recobros obtenidos, en las fracciones del tren de elución cuando se colocó 100 mg de sílice virgen en el fondo del cartucho de dispersión sin usar muestra.

Tabla 3.14. Porcentajes recuperados, para la extracción de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 100%, para eluirlos. Colocando 100 mg de sílice virgen como co-columna. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	3 y 4 ml de sol ACN 100%	% de recobro total
Metil paratión	NI	NI	ND	72	32	ND	104
Fentión	NI	NI	ND	63	40	ND	103
Clorpirifos	NI	NI	ND	52	56	ND	108

NI: no se inyectó
ND: no se detectó.

En la tabla 3.15, se muestran los recobros obtenidos a partir de la elución con ACN al 100%, utilizando muestra.

Tabla 3.15. Recobros promedio de dos ensayos para la extracción de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 100%, para eluirlos. Colocando 100 mg de sílice virgen como co-columna. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	5 ml H ₂ O	1ml sol 25:75% ACN:Agua	1 ml sol 50:50% ACN:Agua	1 ml sol ACN 100%	1 ml sol ACN 100%	3 y 4 ml de sol ACN 100%	% de recobro total
Metil paratión	NI	NI	ND	81	29	ND	100
Fentión	NI	NI	ND	65	35	ND	100
Clorpirifos	NI	NI	ND	55	51	ND	106

NI: no se inyectó
ND: no se detectó.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se observa que los ensayos realizados con muestra y sin muestra presentan recobros similares, indicando que la muestra no afecta en la recuperación de los pesticidas, en estas condiciones. Por esta razón, sí se consideró conveniente utilizar la limpieza con adsorbente de sílice virgen en el fondo de la columna de dispersión. El efecto de esta limpieza se evidenció en el sistema cromatográfico, la cual no ocasionó saturación de la pre-columna de guardia al efectuar las inyecciones de los extractos.

3.2.2. Ensayos finales.

3.2.2.1. Establecimiento de las condiciones de extracción.

En los ensayos finales se aumentaron las cantidades de adsorbentes y muestra, como se indica en la sección 2.4.2.1, pág. 48, de la metodología.

3.2.2.1.1. Elución en los ensayos sin muestra.

A continuación se muestran en la tabla 3.16, los resultados obtenidos realizando la DMFS fortificando solamente el adsorbente C-18, sin muestra.

Tabla 3.16. Porcentajes recuperados de la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 100% (2 g C-18 + 0.5g de sílice virgen). Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	20 ml H ₂ O	4ml sol 25:75% ACN:Agua	2 ml sol 50:50% ACN:Agua	2 ml sol 50:50%	2 ml sol ACN 100%	2 ml sol ACN 100%	2 ml sol ACN 100%	2 ml sol ACN 100%	% de recobro total
Metil paratión	NI	NI	ND	17	70	15	ND	ND	102
Fentión	NI	NI	ND	8	67	29	ND	ND	104
Clorpirifos	NI	NI	ND	8	44	50	ND	ND	102

NI: no se inyectó
ND: no se detectó.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Como se puede ver, en la tabla 3.16, los volúmenes correspondientes a los diferentes eluentes y de los adsorbentes aplicados son mayores, debido al aumento en la cantidad de la muestra. Además la fracción 4 (acetonitrilo puro) fue dividida en sub-fracciones de 2 mL, para su análisis posterior y cálculo de los recobros obtenidos en cada uno de ellos. La tabla 3.17, muestra los recobros promedios obtenidos en cada sub-fracción de 3 ensayos, también se muestra los coeficientes de variación, los cuales son aceptables, menores al 1.9%.

Tabla 3.17. Porcentajes recuperados de las sub-fracciones de 3 ensayos, en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando estándares sin muestra y ACN al 100%. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	20 ml H ₂ O	4ml sol 25:75% ACN:Agua	2 ml sol 50:50% ACN:Agua	2 ml sol ACN 100%	2 ml sol ACN 100%	recobro global	C. V.
Metil paratión	NI	NI	ND	77	22	99	1.7
Fentión	NI	NI	ND	66	36	102	1.9
Clorpirifos	NI	NI	ND	40	61	101	0.8

NI: no se inyectó
ND: no se detectó.

Se tuvieron recobros satisfactorios, por lo que la metodología propuesta se considera apropiada. Esto demostró que la utilización de la co-columna de sílice virgen (500 mg) en el fondo del cartucho, no retiene a los analitos en estudio y por el contrario si a algunos componentes lípidicos.

3.2.2.1.2. Elución en los ensayos con muestra.

Al trabajar con la muestra fortificada y considerando los resultados obtenidos en la sección anterior, se realizó la optimización de los volúmenes del tren de elución correspondientes a la fracción 4 de ACN al 100% en la cual se eluyen los pesticidas en



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

los primeros 4 mL. Se agregó 1 mL más de ACN al 100%, para asegurarse que no se queda en la columna algún porcentaje del compuesto más retenido (clorpirifos).

Los recobros globales promedio resultantes de los 3 ensayos obtenidos con la aplicación de 5 mL de ACN al 100% en el tren de elución se muestran en la tabla 3.18.

Tabla 3.18. Recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas y ACN al 100% para eluirlos colocando 500mg de sílice virgen como co-columna. Fortificando con 30 µg de fentión y clorpirifos y 15 µg de metil paratión, contenidos en 60 µL, de solución madre.

PESTICIDA	1 extracción	2 extracción	3 extracción	Prom. % de recobro total	Coficiente de Variación (%)
Metil paratión	93	98	91	94	4.1
Fentión	102	97	98	99	2.9
Clorpirifos	98	102	101	100	2.2

Como podemos ver en estos resultados, los pesticidas si se pueden extraer adecuadamente de la muestra de músculo de ajolote, dado que se obtienen recobros cuantitativos y coeficientes de variación muy aceptables por debajo del 4.1%.

En base a todos los resultados anteriores, quedó como se describe a continuación el protocolo final de la elución de los pesticidas en estudio:

FRACCIÓN 1. 24 mL de agua grado cromatográfico.

FRACCIÓN 2. 4 mL de la mezcla con 25% de acetonitrilo y 75% agua.

FRACCIÓN 3. 2 mL de la mezcla de acetonitrilo al 50% y 50% agua.

FRACCIÓN 4. 6 mL de acetonitrilo al 100%.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____

La fracción 1 se aumentó 4 mL más debido a que con los 20 mL inicialmente propuestos aún se observan eluatos turbios.

3.2.2.2. Linealidad y precisión del método de extracción final (sin evaporación).

En esta parte se realizó la extracción por DMFS con 0.5 g de muestra y 2 g de sílice C-18 más 500 mg de sílice en el fondo como co-columna, fortificando la muestra con las siguientes concentraciones de los pesticidas: 60 μg de pesticida/g de muestra, 30 μg de pesticida/g de muestra y de 22.5 μg de pesticida/g de muestra para fentiión y clorprifos y de 30 μg de pesticida /g de músculo, 15 μg de pesticida /g de músculo y 11.25 μg de pesticida /g de músculo para metil paratiión.

Posteriormente se aplicó la secuencia de elución previamente descrita y los extractos se analizaron por CLAR-DAD sin evaporar.

La evaluación de la linealidad del método de extracción final (sin evaporación), se muestra, en la Figura 3.3, es la curva de calibración de área vs concentración, y representa la respuesta del detector en función de la concentración de los 3 pesticidas, utilizando muestras fortificadas sin evaporación, y se presentan las ecuaciones de la recta y los coeficientes de correlación obtenidos.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

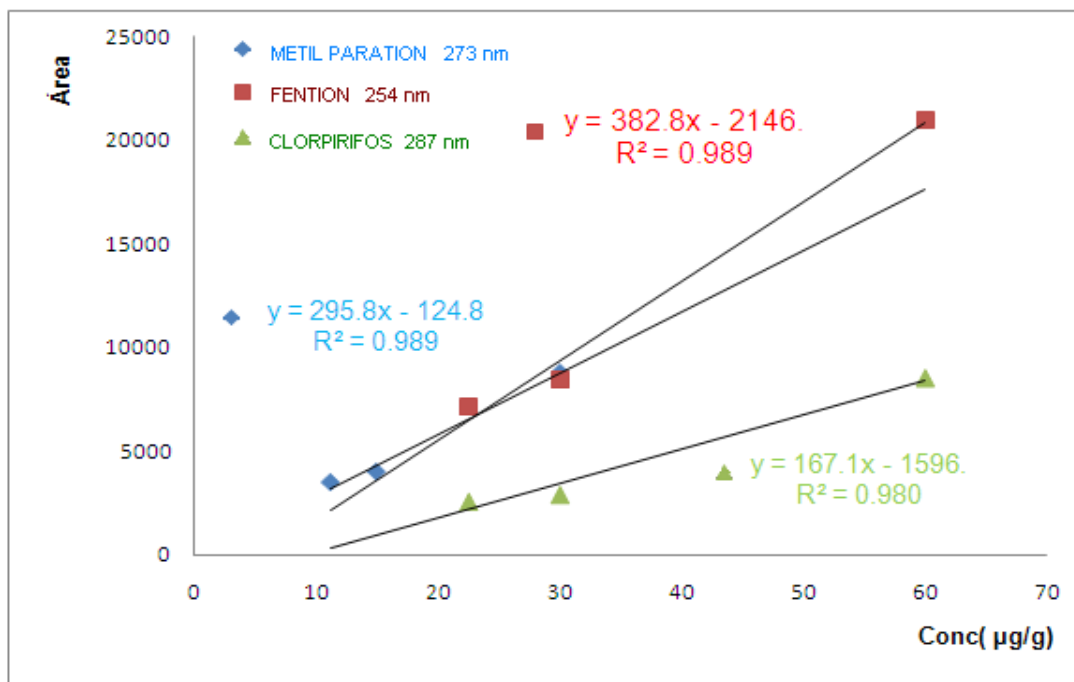


Figura 3.3. Respuesta del detector en función de la concentración de los pesticidas en muestras fortificadas sin evaporación, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fention a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.

Para el caso de la reproducibilidad del método los resultados se presentan en la tabla 3.19.

Tabla 3.19. Reproducibilidad del sistema cromatográfico. Coeficiente de variación (%).

Concentración (µg del pesticida /g de muestra)		Recobro promedio (%)	C. V. del Metil paration (M. P.) (%)	C. V. del Fention (F) (%)	C. V. del Clorpirifos (C) (%)
M.P.	F y C				
30	60	97	0.98	2.2	2.6
15	30	96	1.8	1.3	0.85
11.25	22.5	99	2.7	2.1	2.5

Con estos datos observamos que la variabilidad máxima obtenida del sistema es inferior al 2.7%, lo que nos indica que la reproducibilidad del método sin evaporar permite trabajar adecuadamente, en los intervalos de concentración evaluados para los tres pesticidas.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.2.2.3. Evaporación.

Para determinar estos compuestos a concentraciones más bajas, se procedió a efectuar la evaporación del extracto. Para conocer el efecto que tiene la evaporación en los analitos en estudio, se llevó a cabo el procedimiento descrito en la parte de metodología (sección 2.4.2.3. pág. 51), utilizando en primer lugar solo una disolución de estándares, los resultados se muestran en la tabla 3.20.

Tabla 3.20. Recobros en la evaporación de 6 mL de una disolución de los pesticidas organofosforados a una concentración de 5 mg/L de fentión y clorpirifos y 2.5 mg/L de metil paratión. Elución con ACN al 100% (promedio de 3 inyecciones).

PESTICIDA	1 evaporación	2 evaporación	3 evaporación	Prom. % de recobro total	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación (%)
Metil paratión	91	98	98	95	4.04	4.2
Fentión	98	99	95	97	2.29	2.4
Clorpirifos	101	94	96	97	3.59	3.7

Los recobros obtenidos se acercan al 100% por lo que se deduce que los analitos no sufrieron ningún cambio o alteración al ser evaporados. Los coeficientes de variación siguieron siendo aceptables inferiores al 4.2%.

En los ensayos subsecuentes se estudio el efecto de la evaporación en los analitos presentes en un extracto proveniente de la DMFS de muestra fortificada. En este caso, la evaporación del extracto obtenido de la elución con acetonitrilo al 100% generó un residuo blanquecino, que se resuspendió en un volumen final de 1000 μ L con acetonitrilo, sin que fuera inyectado al sistema cromatográfico a causa de su turbidez.

Por esta razón, se optó por hacer una limpieza extra colocando un cartucho independiente con 1500 mg de la sílice. Para esto, se probaron 2 tipos de sílices con el fin de seleccionar la más efectiva para evitar la turbiedad del extracto.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.2.2.4. Comparación entre el uso de la sílice SUPELCO y la sílice BAKER como adsorbentes de limpieza del extracto.

Los recobros obtenidos en los 2 extractos con las diferentes sílices utilizadas para su limpieza se muestran en la tabla 3.21, para los ensayos en donde solo se fortificó con pesticidas el adsorbente de dispersión C-18.

Tabla 3.21. Porcentajes obtenidos de la limpieza de extractos con 2 sílices diferentes. Ensayos sin muestra. (n=2).

PESTICIDA	Prom. % de recobro total con SUPELCO	Prom. % de recobro total con BAKER
Metil paratión	84	89
Fentión	80	89
Clorpirifos	86	85

La tabla 3.21, muestra que los pesticidas en estudio no se retienen significativamente en los cartuchos empacados con las sílices de limpieza. Los recobros disminuyen ligeramente, aproximadamente en un 10% con respecto a los ensayos representados en la tabla 3.17, para la sílice virgen SUPELCO. También se observa que los recobros al limpiar los extractos con la sílice SUPELCO son inferiores para metil paratión y fentión que con la sílice BAKER.

En la tabla 3.22, se muestran los recobros promedio obtenidos a partir de 3 inyecciones, en los ensayos de DMFS, utilizando muestras fortificadas. Se observa que el efecto de la matriz influye más en la recuperación de los plaguicidas con el uso de la sílice SUPELCO, ya que disminuyeron más que en los ensayos sin muestra. Por el contrario, los recobros con la sílice BAKER fueron mejores que los obtenidos con la sílice SUPELCO, por lo que se optó por utilizar sílice BAKER para realizar la limpieza antes de llevar a cabo la evaporación.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 3.22. Recobros obtenidos de la limpieza de extractos con 2 sílices diferentes. Ensayos con muestras fortificadas. (n=3)

PESTICIDA	Prom. % de recobro total con SUPELCO	Prom. % de recobro total con BAKER
Metil paratión	70	99
Fentión	77	92
Clorpirifos	77	97

3.2.2.5. Filtración del evaporado.

El extracto obtenido con la sílice BAKER, evaporado y reconstituido a 1000 μL , se filtró a través de una membrana de "nylon" de 0.45 μm , con el fin de eliminar cualquier resto de partículas suspendidas existentes. Después de efectuar esta operación se obtuvieron extractos transparentes, sin turbidez o color.

Los recobros obtenidos después de realizar la DMFS, utilizando muestra fortificada con estándares, y una columna empacada con 1500 mg de sílice BAKER, para su limpieza, con evaporación, reconstitución y filtración del extracto se presenta en la tabla 3.23.

Tabla 3.23. Recobros de los analitos en extractos limpiados con sílice BAKER y filtrados. (n=3)

PESTICIDA	Prom. % de recobro total con el filtro de nylon.
Metil paratión	99
Fentión	97
Clorpirifos	98

Los recobros obtenidos después de llevar a cabo la filtración para los 3 pesticidas en estudio fueron similares a los obtenidos sin filtración, por lo cual se demuestra que los pesticidas no son retenidos en la membrana, por lo que si se puede utilizar en el proceso.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. _____

3.2.3. Protocolo completo de extracción.

Considerando todos los parámetros optimizados en las secciones anteriores se estableció el protocolo completo para la extracción de los pesticidas organofosforados por la técnica de Dispersión de la Matriz en Fase Sólida el cuál se esquematiza en la Figura 3.4.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

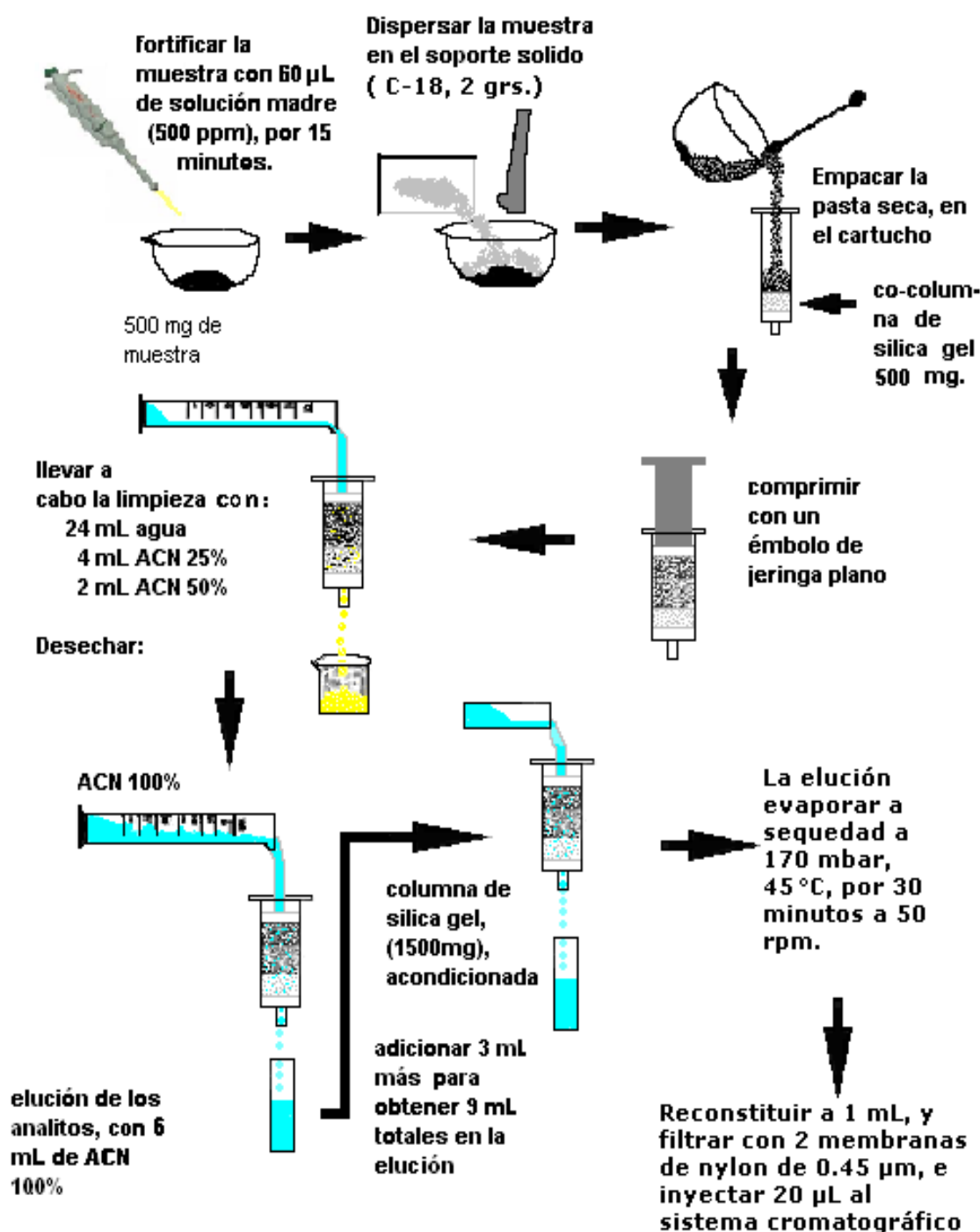


Figura 3.4. Protocolo completo para la determinación de trazas de pesticidas organofosforados por Dispersión de la Matriz en Fase Sólida – Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en *Ambystoma mexicanum*.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Figura 3.5. se muestran cromatogramas, a diferentes longitudes de onda, de un extracto proveniente de una muestra fortificada con 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión. La extracción fue realizada a partir del protocolo de extracción final anterior.

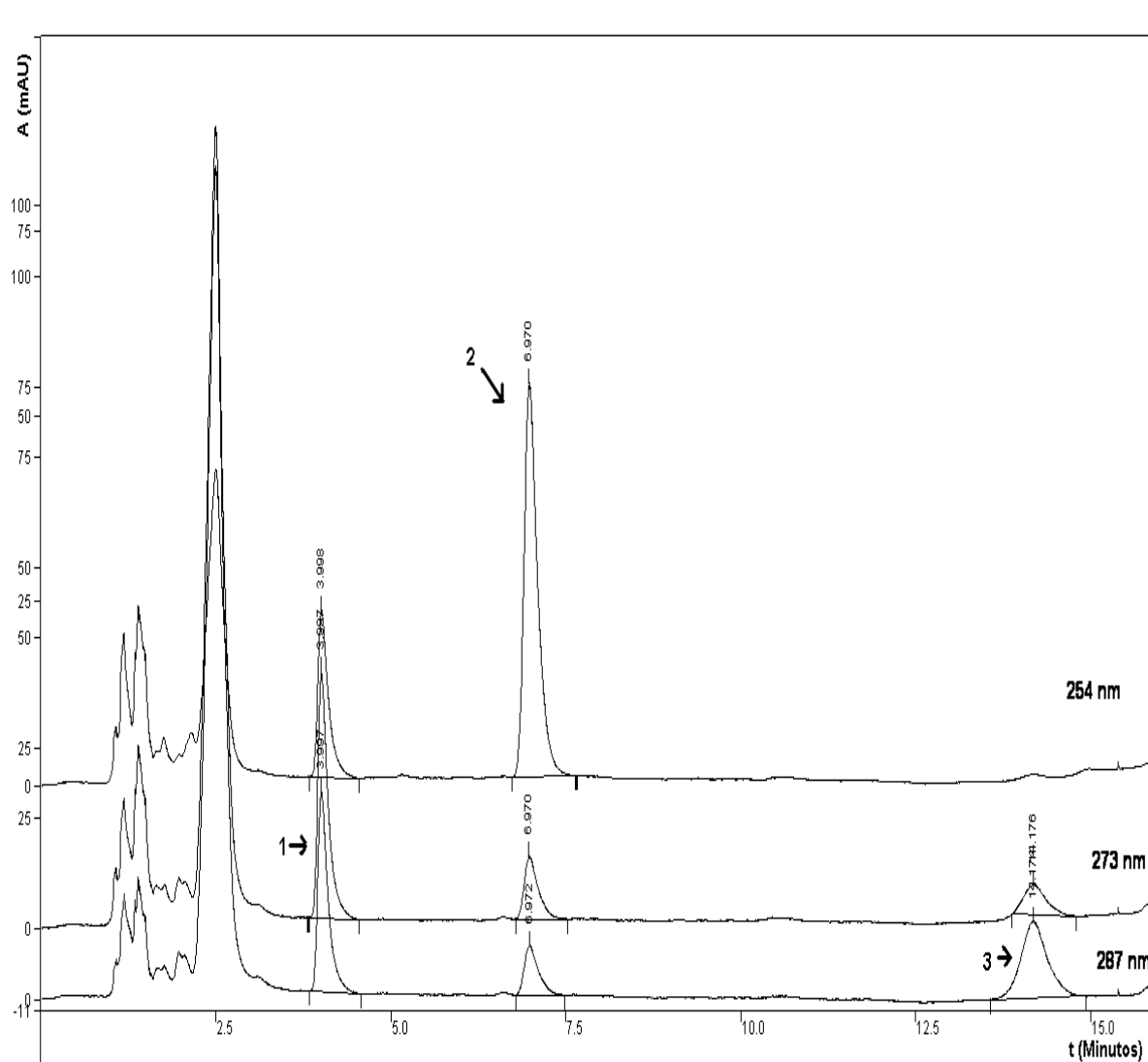


Figura 3.5. Cromatogramas de los plaguicidas organofosforados en estudio a diferentes longitudes de onda de detección, en músculo de ajolote. Columna VARIAN de 150x4.60 mm empacada en fase inversa RES ELUT C18, con un tamaño de partícula de 5 μm ; flujo de 1 mL min^{-1} ; gradiente de metanol:agua inicial 75:25, hasta 100% en 17.5 min. Concentración de los pesticidas de 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión, con un volumen de inyección de 20 μL . Detección por espectrofotometría UV a la longitud de absorción máxima de cada compuesto. Identificación de los picos; 1) Metil paratión, 2) Fentión y 3) Clorpirifos.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3. EVALUACIÓN DEL MÉTODO.

3.3.1. Linealidad y precisión.

La linealidad se evaluó por medio de las correspondientes a las áreas de los picos de los plaguicidas vs la concentración de los mismos en la muestra. Por medio del ajuste de mínimos cuadrados se calculó el coeficiente de correlación. Las curvas son presentadas en la Figura 3.6. junto con las ecuaciones de cada una de las curvas y el coeficiente de correlación.

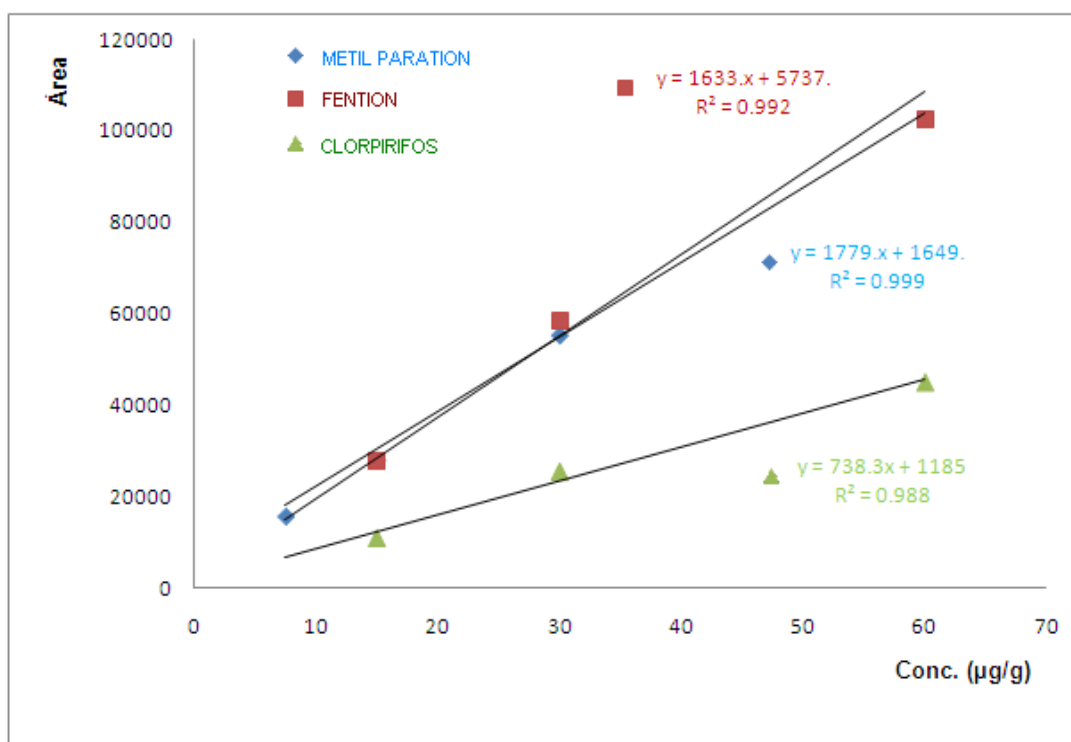


Figura 3.6. Respuesta del detector en función de la concentración de los pesticidas en muestras fortificadas con el método desarrollado, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paratión a 273 nm, fention a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.

Con los valores de los coeficientes de correlación se considera que la linealidad del método fue aceptable en el intervalo de concentraciones estudiadas para cada uno de los pesticidas.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

La repetibilidad y reproducibilidad, del método desarrollado la podemos evaluar con los coeficientes de variación que se muestran en la siguiente tabla 3.24.

Tabla 3.24. Reproducibilidad del método utilizando muestras fortificadas a una concentración de 15 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 7.5 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión. (n=3).

Pesticida	Repetibilidad (en un solo día)	C. V. (3 ext. mismo día)	Reproducibilidad (en diferentes días).	C. V. (3 ext. diferentes días)
metil paratión	96	2.7	96	1.8
fentión	87	0.66	99	2.9
clorpirifos	99	5.9	100	2.2

Esta tabla nos indica que la repetibilidad y la reproducibilidad fueron buenas, con coeficientes de variación inferiores a 5.9%. La bibliografía indica que para compuestos orgánicos presentes en muestras biológicas en el orden de ppm se pueden aceptar RSD o CV de 16. [Wood, 1999]

3.3.2. Exactitud en los estudios de recobro.

Los recobros obtenidos a los 3 niveles de concentración de los pesticidas en el músculo se muestran en la tabla 3.25.

Tabla: 3.25. Recobro (%) de los pesticidas en estudio.

Concentración ($\mu\text{g/g}$)		Metil paratión (MP)	Fentión (F)	Clorpirifos (C)
MP	FyC			
7.5	15	96	87	99
15	30	98	87	97
30	60	99	85	86

En la cual se observa que los recobros son cuantitativos en los intervalos de concentración probados ya que están por arriba de 85%. En la Figura 3.7. se representa la curva correspondiente a la correlación entre la concentración adicionada vs cantidad recuperada de los 3 pesticidas con el método desarrollado, y también se presentan las ecuaciones de la recta y los coeficientes de correlación obtenidos.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

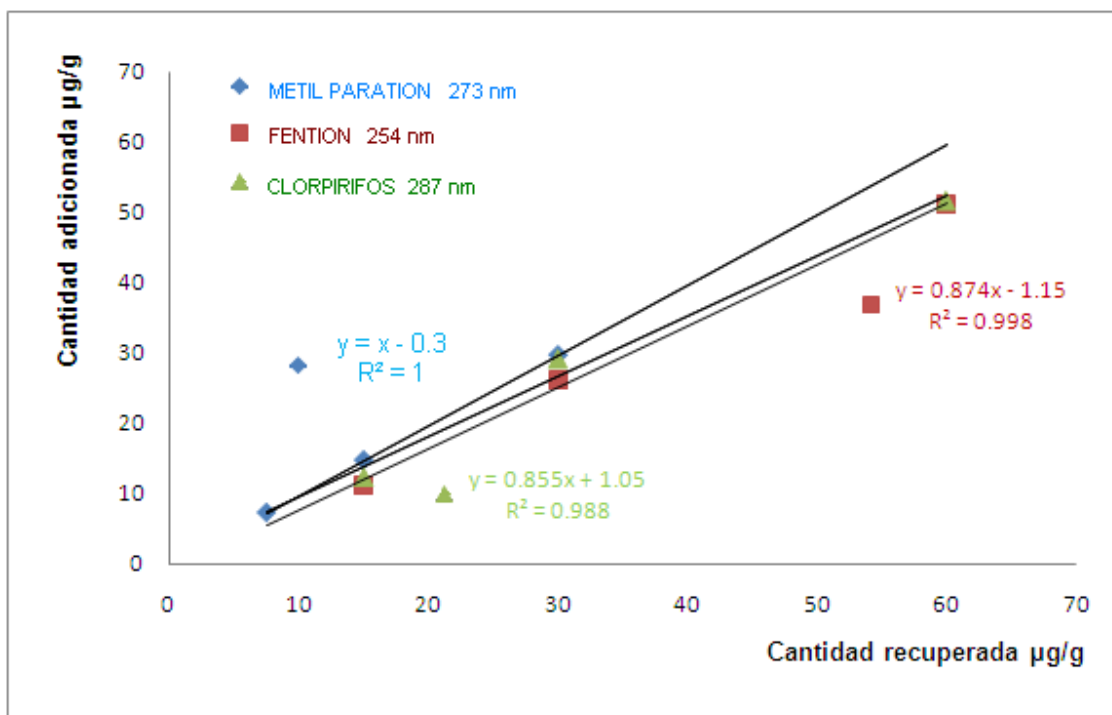


Figura 3.7. Respuesta del detector en función de la concentración adicionada vs cantidad recuperada de los pesticidas en muestras fortificadas con el método desarrollado, detección por espectrofotometría de absorción UV, Metil paration a 273 nm, fention a 254 nm y clorpirifos a 287 nm.

En la Tabla 3.26. se muestra la correlación que hay entre la cantidad adicionada contra la cantidad recuperada para cada pesticidas en estudio. La pendiente por 100 nos indica el valor del recobro global.

Tabla: 3.26. Exactitud del método (cantidad adicionada vs cantidad recuperada).

Pesticida	Coefficiente de correlación (r^2)	Recobro = Pendiente de la recta (m) * 100
Metil paratión	1	100
Fention	0.998	87.4
Clorpirifos	0.988	85.5

La Tabla anterior indica que la curva es lineal en el intervalo analizado con coeficiente de correlación lineal mayores de 0.980 y que se obtienen recobros cuantitativos mayores del 85%.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.3. Límites de detección y cuantificación.

Límites de detección y de cuantificación del método.

Los límites de detección y de cuantificación del método que se determinaron para cada pesticida son los que se muestran en la tabla 3.27.

Tabla 3.27, Límites de detección y cuantificación en el sistema cromatográfico para el método desarrollado.

Pesticida	Límite de detección ($\mu\text{g/g}$) Estimados	Límite de cuantificación ($\mu\text{g/g}$) Estimados.
Metil Paratión	5.6	17.0
Fentión	5.6	17.0
Clorpirifos	8.0	24.00

3.4. APLICACIÓN DEL MÉTODO.

3.4.1. Análisis de muestras fortificadas de hígado.

En la Figura 3.8, se muestran los cromatogramas obtenidos en muestras de hígado, que fueron procesadas con el método desarrollado para la determinación de pesticidas organofosforados en el *Ambystoma mexicanum*, también se muestra un blanco sin fortificar.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

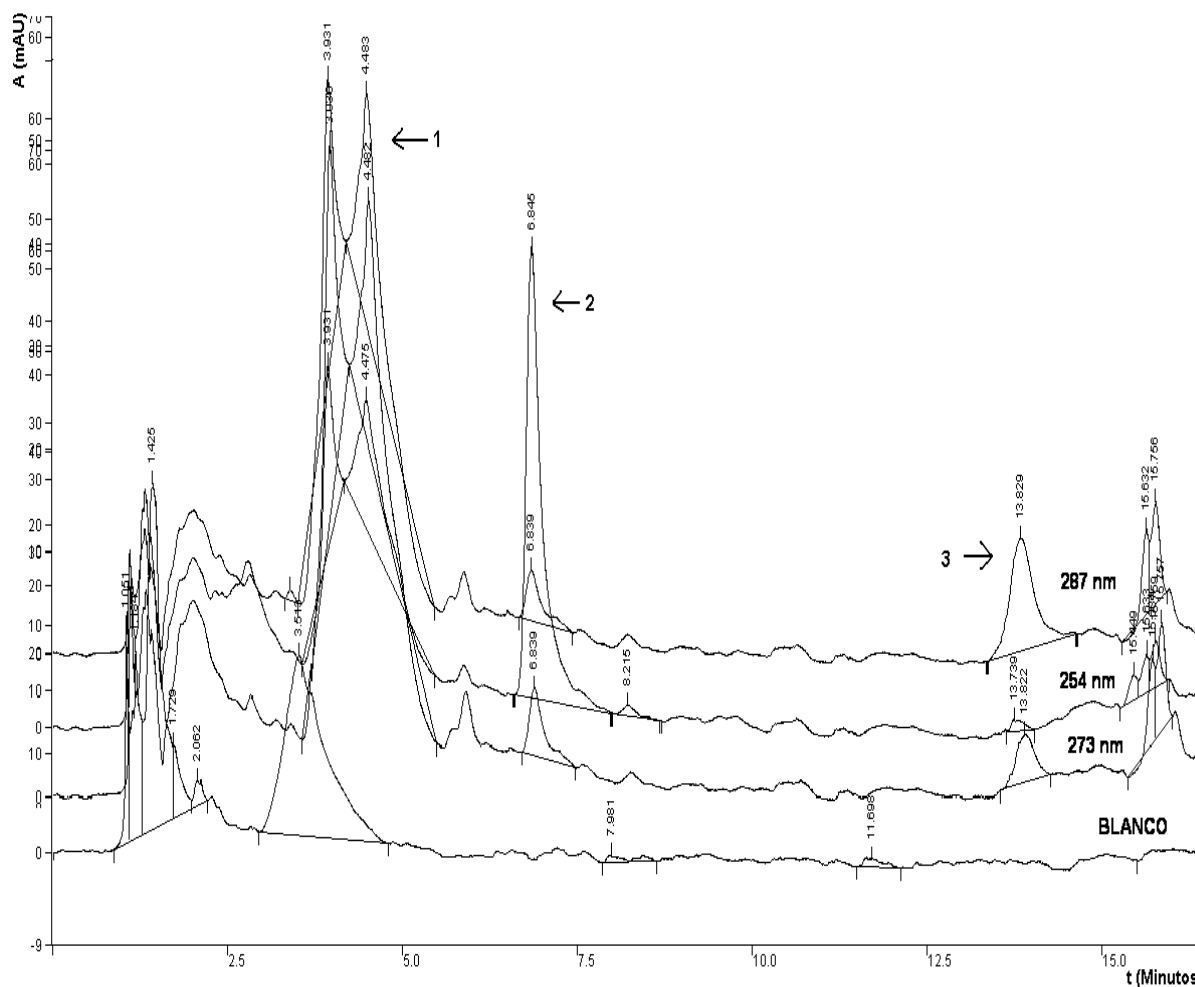


Figura 3.8: Cromatograma de los pesticidas organofosforados en estudio en hígado de ajolote fortificado, a las 3 longitudes de onda de estudio de los pesticidas una muestra sin fortificar. Columna VARIAN de 150x4.60 mm empacada en fase inversa RES ELUT C18, con un tamaño de partícula de 5 μm . flujo de 1 mL min^{-1} ; gradiente de metanol:agua inicial 75:25, hasta 100% en 17.5 min. Concentración de los plaguicidas de 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión, con un volumen de inyección de 20 μl . Detección por espectrofotometría UV a la longitud de absorción máxima de cada compuesto. 273 nm para metil paratión, 254 nm para fentión y 287 nm para clorpirifos.

Se puede observar que con esta muestra se encuentran más interferencias a la detección co-eluyendo con los compuestos de interés.

En la tabla 3.28. se muestran el promedio de los recobros registrados para 3 extracciones realizadas, con el hígado a un nivel de fortificación de 60 $\mu\text{g/g}$ para fentión y clorpirifos y de 30 $\mu\text{g/g}$ para metil paratión.



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Tabla 3.28. Recobros en la elución de los pesticidas organofosforados, utilizando muestras fortificadas de hígado y ACN al 100% para eluirlos.

PESTICIDA	1 extracción	2 extracción	3 extracción	Prom. % de recobro total	Coefficiente de Variación
Metil paratión	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D
Fentión	74	79	78	77	3.44
Clorpirifos	64	70	61	65	7.05

N. D.: No Determinado.

De esta tabla se puede decir que con el método desarrollado si se puede recuperar y cuantificar a los pesticidas en estudio, aún cuando los recobros son más bajos que con el músculo, de 77% para fentión y de 65 % para clorpirifos, estos valores indican que la matriz si influye en el % del recobro. Esto se puede deber a que el hígado es una matriz mas compleja que el músculo a nivel de metabolitos, debido a que en éste se lleva a cabo un sin fin de reacciones enzimáticas, y su constitución de lípidos es mas elevada.

En el cromatograma proveniente del extracto de hígado no se puede integrar el área del metil paratión debido a que co-eluía con un gran interferente. Lo anterior demuestra que cada problema analítico es particular y los métodos deben desarrollarse y optimizarse en función de la matriz y de las propiedades físico-químicas de los analitos.

3.4.2. Análisis de muestras de organismos expuestos.

En la Figura 3.9, se muestran dos cromatogramas provenientes de muestras de músculo, que fueron procesadas con el método desarrollado para la determinación de pesticidas organofosforados en el ajolote mexicano. El cromatograma 3.9. a, corresponde a un extracto proveniente de una muestra de un organismo sin exponer al clorpirifos y el cromatograma 3.9. b es de un extracto proveniente de un organismo



CAPITULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

expuesto al clorpirifos, a su concentración de máxima solubilidad, la cual es de 1.4 mg/L en agua. Estos organismos fueron criados y expuestos en el laboratorio de Analisis Ambiental de la Facultad de Ciencias, para ser estudiados biológicamente y sus tejidos analizados por la técnica desarrollada.

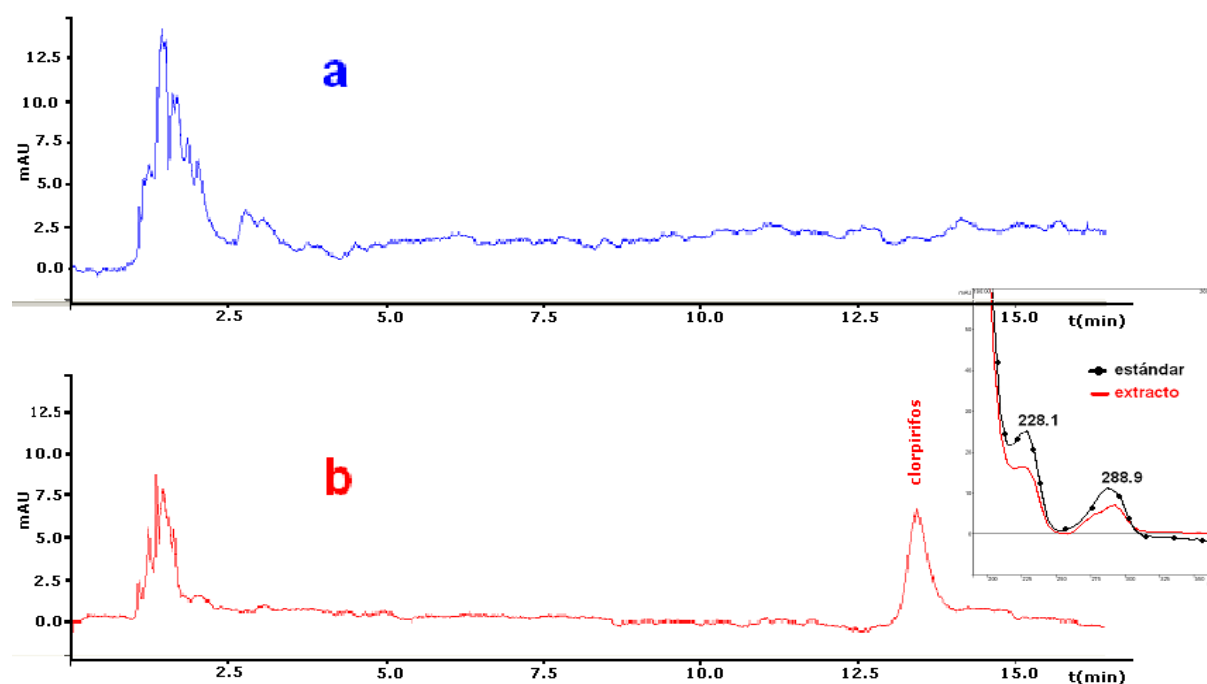


Figura 3.9. Cromatogramas (a) de un extracto proveniente de un organismo no expuesto a clorpirifos y, (b) extracto proveniente de un organismo expuesto al clorpirifos. Detección a 287 nm. Condiciones cromatográficas indicadas en la Figura 3.3.

En el cromatograma 3.9. b, se observa la presencia de un pico el cual se encuentra localizado en el tiempo de retención del clorpirifos. Para corroborar la presencia de este compuesto se compararon los espectros de absorción UV-VIS de este pico con el de un estándar, como se muestra en la parte superior del cromatograma 3.9 b. Los 2 espectros fueron muy similares. Con las curvas de calibración realizadas se interpoló el área obtenida y se determinó la concentración que contenía el músculo de ajolote, la cual fue de 23.99 $\mu\text{g/g}$, lo que nos demuestra que este plaguicida tiene una fácil bioadsorción. Lo anterior, demuestra que el método desarrollado representa una herramienta de gran utilidad para muestras biológicas.



CONCLUSIONES.



CONCLUSIONES

Se desarrolló un método para la extracción de los pesticidas organofosforados metil paratión, fentión y clorpirifos en el músculo del ajolote *Ambystoma mexicanum*, que fue lineal, preciso y exacto. La utilización de la DMFS originó un método de preparación de muestra más simple que requiere de un menor tiempo de trabajo que los métodos tradicionales, en los cuales se involucran un gran número de operaciones, grandes volúmenes de disolventes orgánicos y cantidades de muestra. Los límites de detección y cuantificación permitieron determinar a uno de los pesticidas estudiados, en músculo de un organismo expuesto artificialmente al clorpirifos en el agua de los acuarios. Por lo tanto, se evidenció la gran utilidad de esta herramienta analítica, hasta hoy disponible, en los estudios biológicos sobre el *Ambystoma mexicanum*.

La aplicación del método desarrollado en el hígado del ajolote *Ambystoma mexicanum* puede realizarse sin problema para dos de los pesticidas en estudio, aunque los recobros sean un poco más bajos que con el músculo. Es evidente como la naturaleza de la matriz influye en el valor del recobro porque el hígado es una matriz biológica más compleja que el músculo, en cuanto a su constitución y función, con proporción en lípidos mucho más elevada y en la que se llevan a cabo un sinnúmero de reacciones enzimáticas. Lo anterior no hace más que demostrar que el método es robusto, aun cuando en el hígado sea difícil realizar la determinación del metil paratión, por la presencia de interferentes a la detección. En este caso, se sugiere modificar el gradiente de elución cromatográfico para separarlo del interferente o realizar una limpieza con una mayor cantidad de sílice virgen.



ANEXOS.



ANEXOS

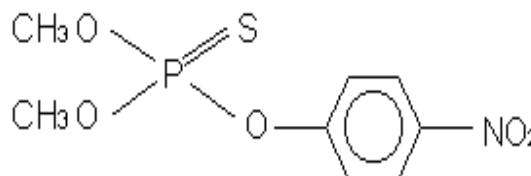
Metil paratión. (Nombre común).

Nombre químico (IUPAC): O,O-dimetil O-4-nitrofenil fosforotioato

Propiedades físicas y químicas

Fórmula química: $C_8H_{10}NO_5PS$

Peso molecular: 263.21 g/mol



Polvo o sólido cristalino de color blanco, con olor penetrante parecido al ajo. Punto de ebullición 154 °C y su punto de fusión a 35 °C. Su densidad relativa 1.358 a 20 °C. Solubilidad en agua 55 mg/L a 20 °C. Es soluble en etanol, cloroformo y disolventes alifáticos. Presión de vapor 0.2 mPa a 20 °C. Su constante de la ley de Henry 8.57×10^{-3} Pa m³/moles. Se hidroliza en medios alcalinos y ácidos. Log P: 3.0, punto de ignición > 150 °C. Análisis por CG, HPLC, por colorimetría por su producto de hidrólisis (4-nitrofenol).

Usos: control de insectos succionadores o trituradores en una gran variedad de cultivos.

Actúa como insecticida no sistemático con acción por contacto, digestiva o respiratoria, inhibidor de la colinesterasa.

DESTINO EN EL AMBIENTE

Persistencia: Cuando es emitido al aire, una parte se encuentra en forma de vapor y otra parte asociada a las partículas. El vapor es eliminado mediante reacciones con radicales hidroxilo (vida media de 6.5 horas), mientras que las partículas son removidas por precipitación húmeda y seca. Este compuesto tiene una persistencia baja a moderada en el ambiente (días a meses), con excepción de los sitios en los cuales han ocurrido derrames accidentales donde puede permanecer por años. En los suelos generalmente es poco persistente, su vida media varía de 1 a 30 días con un valor típico de 5 días. La biodegradación, aerobia y anaerobia, principal mecanismo de



ANEXOS

eliminación, seguida por la fotólisis. La velocidad de la biodegradación depende del tipo de suelo y de la temperatura. Este proceso es favorecido sobre todo en suelos arenosos en zonas de clima cálido. El metil paratión tiene afinidad moderada por la mayoría de los suelos, por lo cual presenta una movilidad limitada y pocas posibilidades de lixiviarse hasta las aguas subterráneas. No obstante, uno de sus productos de degradación, el 4-Nitrofenol, se adsorbe débilmente a las partículas y puede contaminar los acuíferos. Es degradado rápidamente en los mares, lagos y ríos por acción de los microorganismos, por hidrólisis y fotólisis. Cerca del 100% de su concentración es removida en un período de 2 a 4 semanas, favorecida en aguas alcalinas con alta salinidad y presencia de sedimentos. Cierta grado de volatilización es posible en suelo como en agua. Su potencial de bioconcentración en plantas y animales es bajo y no se biomagnifica a través de la cadena trófica. Muchas especies de animales, tanto vertebrados como invertebrados, tienen la capacidad de metabolizarlo y eliminarlo en poco tiempo. De forma similar, es absorbido y metabolizado rápidamente por las plantas; con vida media de pocas horas y sus residuos desaparecen casi por completo en 6 a 7 días.

Fentión. (Nombre común).

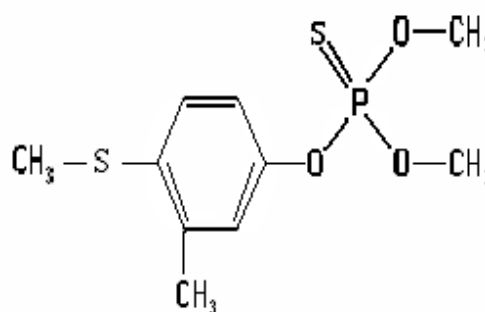
Nombre químico (IUPAC): O,O-dimetil

O-4-metiltio-m-tolil fosforotioato

Propiedades físicas y químicas

Peso molecular: 278.34 g/mol

Fórmula química: $C_{10}H_{15}O_3PS_2$



Líquido incoloro, con ligero olor

a

ajo. Su punto de fusión es a los 7 °C. Su densidad relativa es 1.250 a 20 °C/4 °C. Su solubilidad (a 20°C) en agua es de 2 mg/L y en diclorometano propan-2-ol es de menor de 1 kg/L. Es muy soluble en aceites glicéricos y tolueno; es soluble en metanol, etanol, éter, acetona, n-hexano y muchos disolventes orgánicos (especialmente los clorados) y ligeramente soluble en éter de petróleo y disolventes alifáticos. Su presión de vapor es de 4 mPa a 20 °C y de 10 mPa a 30 °C. Su constante de la ley de Henry es de 1.46×10^{-8}



ANEXOS

6 atm-cm³/mol (valor estimado). Esta sustancia se descompone al calentarse, produciendo gases tóxicos que incluyen a los óxidos de fósforo y óxidos de azufre.

DESTINO EN EL AMBIENTE

Persistencia: Poco persistente (6 semanas). Sus vapores son rápidamente degradados en la atmósfera por reacción con radicales hidroxilo (vida media aproximada de 5 horas). Es moderadamente persistente en suelo, con vida media promedio de 34 días en la mayoría de las condiciones; sus residuos suelen permanecer entre 4 y 6 semanas en este medio. Se absorbe fuertemente a las partículas, por lo cual no se espera que se lixivie y contamine las aguas subterráneas. Su vida media en los cuerpos de agua varía de 2.9 a 21.1 días, pero puede prolongarse en los sedimentos de pantanos salinos donde la luz y el oxígeno son limitados o reducirse en aguas alcalinas. Tanto en suelo como en agua, sus principales mecanismos de eliminación son la biodegradación y la fotólisis.

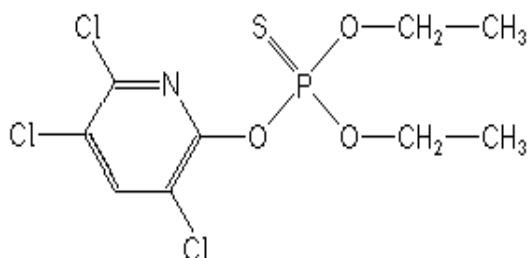
Clorpirifos. (Nombre común).

Nombre químico (IUPAC): O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato

Propiedades físicas y químicas

Fórmula química: C₉ H₁₁ Cl₃ N O₃ P S

Peso molecular: 350.59 g/mol



Cristales blancos granulares, con ligero olor a mercaptano. Su punto de ebullición es 160 °C. Su punto de fusión se encuentra entre los 41 y 42 °C. Su densidad relativa es 1.398 a 43.5 °C. Su solubilidad en agua es 0.4 mg/L a 23 °C. Es soluble en acetona, benceno, cloroformo, metanol, disulfuro de carbono, dietil éter, xileno e iso-octanol. Su presión de vapor es 2.02x10⁻⁵ mm Hg a 25 °C; Su constante de la ley de Henry es 2.9x10⁻⁶ atm-m³/mol a 20 °C. Se descompone al calentarse a aproximadamente 160 °C, produciendo gases tóxicos y corrosivos que incluyen al ácido



ANEXOS

clorhídrico, fosgeno, óxidos de fósforo, de nitrógeno y de azufre: Reacciona con bases fuertes, ácidos y aminas. Es corrosivo al cobre y al latón.

Uso: Agrícola, urbano, industrial, pecuario, doméstico y jardinería.

DESTINO EN EL AMBIENTE

Moderadamente persistente (hasta 1 año). En el aire puede hallarse en forma de vapor y partículas. La reacción con radicales hidroxilo elimina el vapor de la atmósfera y la precipitación húmeda y seca remueve las partículas. La fotólisis directa está involucrada en la destrucción de este pesticida en el aire. Es moderadamente persistente en suelo. Su vida media en los sistemas terrestres varía entre 60 y 120 días, pero puede abarcar un intervalo de 2 semanas hasta 1 año dependiendo del tipo de suelo, el clima y otras condiciones. Su permanencia disminuye a pH básico, pero se incrementa en condiciones anaerobias. Su movilidad en suelo es baja o nula, por ello son pocas sus posibilidades de lixiviarse y contaminar las aguas subterráneas. Los mecanismos de eliminación en suelo incluyen la fotólisis, hidrólisis y biodegradación (vida media de 2 a 81 días). La volatilización participa en suelos húmedos (vida media de 45 a 163 horas), pero no en suelos secos. El TCP es su principal producto de degradación, cuya movilidad y persistencia son moderadas. En los cuerpos de agua, su persistencia depende del tipo de formulación, siendo mayor en los concentrados emulsionables y polvos humectables. Cuando éstos se aplican, las concentraciones en agua disminuyen rápidamente debido a la adsorción firme a sedimentos y materia orgánica suspendida. Para los gránulos y formulaciones de liberación controlada, las concentraciones que se alcanzan son menores, pero se mantiene por más tiempo. La volatilización es su principal ruta de disipación en el agua (vida media de 3.5 a 20 días), seguida de la fotólisis en la superficie y la hidrólisis a altas temperaturas y pH básico. Su potencial de bioacumulación en organismos acuáticos puede variar de moderado a muy alto. Este plaguicida y sus metabolitos se acumulan en las plantas, pudiendo ser detectados en los cultivos 10 a 14 días después de su aplicación.



BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

1. Barker, S. A. (2000). Review: Matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 885: 115-127.
2. Barker, S. A. (2007). Review: Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J. Biochem. Biophys. Methods* 70. 151–162.
3. Barker, S. A. Long, A. R. and Short, C. R. (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *J. Chromatogr.* 475: 353-361.
4. Bermejo, M. F. (1991). *Química analítica general, cuantitativa e instrumental*. Vol. 2. Ed. Paraninfo, S. A. Madrid. 1435-1449.
5. Blasco, C. Font, G. and Picó, Y. (2002). Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 970: 201-212.
6. Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 542:251-272.
7. CICOPLASFEST: Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaria de Salud, Secretaria de Comercio y Fomento Industrial. (1997). *Catálogo Oficial de Plaguicidas*. México, D. F.
8. Coulibay, K. and Smith, J. S. (1994). Effect of pH and cooking temperature on the stability of organophosphate pesticides in beef muscle. *J. Agric. Food Chem.* 42: 2035-2039.
9. Cremllyn, R. (1980). *Pesticides, preparation and mode of action*. John Wiley and Sons. England. 80-95.



BIBLIOGRAFÍA

10. Criado, R. M. Hernández, F. D. Rodríguez, P. I. and Torrijos, R. C. (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. *J. Chromatogr. A* 1056 (1-2): 187-194.
11. Crouch, M. D. and Barker, S. A. (1997). Analysis of toxic wastes in tissues from aquatic species, application of matrix solid-phase dispersion. *J. Chromatogr. A* 774: 287-309.
12. 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 triazine. *Int. J. Environment and pollution*, 13 (1-6):284-312.
13. Harris, D. C. (2001). *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Reverté, S. A. Barcelona. 643-647.
14. Hassall, K. A. (1990). *The biochemistry and uses of pesticides. Structure, metabolism, mode of action and use in crop protection*. 2nd edition. Ed. Macmillan. Hong Kong. 81-123.
15. Hayes, W. J. Jr. and Laws, E. R. Jr. (1991). *Handbook of pesticide toxicology*. Vol. 1 General principles. Academic Press Chicago. 271.
16. Hernández, L. y González, C. (2002). *Introducción al análisis instrumental*. Ed. Ariel, Barcelona, 393-433.
17. Hu, Yan-Yun. Ping, Z. He, You-Zhao and Sheng, Guo-Ping. (2005). Response surface optimization for determination of pesticide multiresidues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* 1098, (1-2): 188-193.
18. Juan, A. Picó, Y. y Font, G. (2003). Revisión de los métodos de determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en alimentos. *Rev. Toxicol.* 20: 166-175.



BIBLIOGRAFÍA

19. Juhler, R. K. (1997). Optimized method for the determination of organophosphorus pesticides in meat and fatty matrices. *J. Chromatogr. A* 786: 145-153.
20. Kirk, R. S. Sawyer, R. y Egan, H. (1996). "Composición y análisis de alimentos de Pearson" Ed. Continental, S. A. México. D. F. 181-183
21. Kristenson, E. M. Ramos, L. Brinkman, Udo. A. Th. (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends. Anal. Chem.* Vol. 25, No. 2. 96-111.
22. Kristenson, E. M, Haverkate, E. G. J. Slooten C. J. Ramos, L. Vreuls, R. J. J. Brinkman Udo. A. Th. (2001). Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A* 917: 277-286.
23. Kuivinen, J. and Bengtson, S. (2002). Solid-phase extraction and cleanup of organophosphorus pesticides residues in bovine muscle with gas chromatographic detection. *J. Chromatogr. Sci.* 40: 392-396.
24. Loro, J. F. Manual de cromatografía. (2001). Dirección General de Universidades e Investigación. Consejería de Educación, Cultura y Deportes. Gobierno de Canarias. 155.
25. Martínez, A, Ramil, M. Montes, R. Hernans, D. Rubí E. Rodriguez I. and Torrijos R. C. (2005). Development of a matrix solid-phase dispersion method for the screening of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinatedbiphenyls in biota sample using gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A* 1072 (1): 83-91.
26. Meyers, R. A. (2000). In *Encyclopedia of Analytical Chemistry Applications. Theory and Instrumentation.* Ed. Jonh Wiley and Sons. LTD. Vol. 7. 6114-6123, 6364-6378, 6421-6444.



BIBLIOGRAFÍA

27. Mukherjee, I. and Gopel, M. (1996). Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. *J. Chromatogr. A* 754: 33-42.
28. Navarro, M. Picó, Y, Marín, R. and Mañes, J. (2002). Application of matrix solid-phase dispersion to the determination of a new generation of fungicides in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 968: (1-2): 201-209.
29. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-1994. Que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas, en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de mayo de 1994, México DF. 1994. Y modificada el 22 de marzo del 2000.
30. Pensado, L. Casais, M. C. Mejuto, M. C. Torrijos, R. C. (2005). Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *J. Chromatogr. A* 1077: 103-109.
31. Rohr, J. R. Sager, T. Sesterhenn, T. M. and Palmer, B. D. (2006). Exposure, Postexposure, and Density-Mediated Effects of Atrazine on Amphibians: Breaking Down Net Effects into Their Parts. *Environ Health Perspect.* 114(1): 46–50.
32. Rouessac, F. y Rouessac, A. (2003). *Análisis químico: Métodos y técnicas instrumentales modernas*. Ed. McGraw-Hill. Madrid. 57-79.
33. Russo, M. V. Campanella, L. and Avino, P. (2002). Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. B* 780: 431-441.
34. Salas, J. H. González, M. M. Noa, M. Pérez, N. A. Días, G. Gutiérrez, R. Zazueta, H. and Osuna, I. (2003) Organophosphorus pesticides residues in Mexican commercial pasteurized milk. *J. Agric. Food Chem.* 51: 4468-4471.



BIBLIOGRAFÍA

35. Serrano, R. López, F. J. and Hernández, F. (1999). Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A* 885: 633-643.
36. Skoog, D. A. y Leary, J. J. (1994). *Análisis instrumental*. Ed. McGraw-Hill. Madrid. 4^a edición. 730-775.
37. Skoog, D. A. West, D. M. Holler, F. J. (2001). *Química analítica*. Ed. McGraw-Hill. México, D. F. 7^a edición. 687-715.
38. Smith, R. M. (2003). Review: Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A* 1000: 3-27.
39. Tolls, J. Haller, M. Sjim, D. T. H. M. (1999). Extraction and isolation of linear alcohol ethoxylates from fish. *J. Chromatogr. A* 839: 109-117.
40. Webster, L. R. McKenzie, G. H. Moriaty, H. T. (2002). Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 133: 112-117.
41. Wood, R. (1999). How to validate analytical methods, *Trends. Anal Chem. A* 18: 624-631.
42. Yague, C. Bayarri, S. Lázaro, R. Conchello, P. Arino, A. and Herrera, A. (2001). Multiresidue determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in milk by gas chromatography with electron capture determination after extraction by matrix solid-phase dispersion. *J. AOAC. Int.* 84(5): 1561-1568.
43. Zhang, L. Liu, Y. Xie, Meng-Xia. and Qiu, Yue-Ming. (2005). Simultaneous determination of thyreostatic residues in animal tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1074 (1-2): 1-7.



BIBLIOGRAFÍA

Paginas de Internet:

AJOLOTE.

http://ajolote.ibiologia.unam.mx/documentos/presentacion_conabio.ppt#21. Consultada 02-2007.

http://redescolar.ilce.edu.mx/redescolar/publicaciones/publi_reinos/fauna/ajolote/ajolote.htm. Consultada 02-2007.

<http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/104/10410308.pdf>. Consultada 03-2007.

<http://ajolote.ibiologia.unam.mx/>. Consultada 02-2007.

http://chichinautzin.conanp.gob.mx/que_hacemos/est_ambys.htm. Consultada 03-2007.

http://sepiensa.org.mx/contenidos/l_ajolotes/ajol.htm. Consultada 30-2007.

<http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/imavet/v4n4a04/v4n4a04.pdf>. Consultada 05-2008.

<http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfJ087.pdf#search=%2CARACTERISTICAS%20BIOLOGICAS%20DEL%20AJOLOTE%22>. Consultada 02-2007.

<http://www.elementos.buap.mx/num36/hm/55.htm>. Consultada 03-2007.

<http://es.wikipedia.org/wiki/Ajolote>. Consultada 03-2007.

<http://investigadores.uncoma.edu.ar/Libiquima/Quimica/Libiquima/Plaguicidas/Tesistas.html>. Consultada 05-2008.

CLORPIRIFOS:

http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/pdf/clorpirifos_etil.pdf. Consultada 02-2008.

FENTIÓN:

<http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/pdf/fention.pdf>. Consultada 02-2008.

METIL PARATIÓN:

http://www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas/pdf/paration_metilico.pdf. Consultada 02-2008.