



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**EXTRACCIÓN MINIATURIZADA DE CONTAMINANTES ORGÁNICOS PRESENTES EN
TEJIDOS DE BOVINO BASADA EN LA TÉCNICA DE DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE
SÓLIDA**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. TANIA MILENA GUTIÉRREZ VALENCIA



TUTOR: Doctora MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

AÑO: 2012



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.

Esta tesis fue revisada, evaluada y aprobada por los siguientes sinodales:

Dr. RAFAEL DE JESÚS VILLALOBOS Y PIETRINI
Presidente del jurado

Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA
Vocal

Dra. MARÍA DEL PILAR CAÑIZARES MACÍAS
Vocal

Dra. HELGI HELENE JUNG COOK
Vocal

Dr. EDUARDO RODRÍGUEZ DE SAN MIGUEL GUERRERO
Secretario

AGRADECIMIENTOS-INSTITUCIONALES

Mis más sinceros agradecimientos y eterna gratitud a:

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** – UNAM por darme la oportunidad de realizar mis estudios doctorales en esta, nuestra amada casa de estudios.

A mi Tutora, la Doctora **Martha Patricia García Camacho** por su apoyo incondicional y orientación oportuna en cada una de las etapas del desarrollo del trabajo.

A la **Coordinación del Posgrado en Ciencias Químicas**, por toda su gestión y ayuda.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT** por la ayuda económica otorgada para la realización de mis estudios doctorales. Becario No 223864.

A la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico** de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por el financiamiento de los siguientes proyectos:

- Programa de Apoyo a Proyectos Institucionales de Mejoramiento de la Enseñanza (**PAPIME PE202310**).

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT IN223111**)

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por el proyecto Ciencia Básica **SEP-CONACYT 166389**.

A los miembros de mi **Comité Tutorial**: Doctora Luz Elena Vera Ávila y a la Doctora Alma Luisa Revilla Vázquez por su orientación y valiosas sugerencias para el desarrollo de las actividades de investigación.

A los **miembros del jurado evaluador**: Doctor Rafael de Jesús Villalobos y Pietrini, Doctora Luz Elena Vera Ávila, Doctora María del Pilar Cañizares Macías, Doctora Helgi Helene Jung Cook y Doctor Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero por el tiempo dedicado a la lectura de este trabajo y sus valiosas contribuciones y sugerencias para la mejora del mismo.

A la **Dra. Lucía Angélica García Camacho** y al **Dr. Ignacio Rangel** del Laboratorio de Patología de la Facultad de Estudios Superiores de la FES Cuautitlán de la UNAM por el suministro de las muestras de hígado.

A el **Maestro Juan Manuel Rodríguez** y a la **Maestra Kenneth Rubio Carrasco** por su ayuda y colaboración en el análisis de las muestras por CLAR/EM/EM llevado a cabo en el laboratorio 101 del edificio F de la Facultad de Química de la UNAM.

AGRADECIMIENTOS-PERSONALES

A la **Maestra Josefina Tenopala García**, por su inmensa ayuda y colaboración administrativa.

A **Rosy, a Mary y a Valeria** por la paciencia y colaboración administrativa.

A mis **compañeros y amigos de la Facultad de Química**: a la Maestra Norma Ruth López Santiago, al Maestro José de Jesús Olmos, a Ana Laura de Anda Téllez (gracias por tu amistad), a Marisol Velasco, Angélica Rodríguez, Vania Muñoz, Gabriela de la Cruz, Gabriel Díaz, a la Maestra Silvia Mendoza Arellano, al Maestro Adolfo García Osuna, al Maestro Pedro Villanueva y al Señor Javier Jiménez por su colaboración y por todos los momentos compartidos.

A ti **Germán** por estar siempre a mi lado, sin tu ayuda nada de este sueño sería una realidad, gracias por tu amor e impulso cada día.

A Teresa, Germán, Junior y Leonor

*Por ser el motor que alimentó día con día este gran sueño
Gracias por tanto amor y paciencia*

A Germán

*Por el apoyo incondicional que solo el verdadero amor
puede dar*

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 3D anexo del edificio A del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la UNAM.

Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

Tutor

Productos de la investigación

Se obtuvieron los siguientes productos como frutos de la investigación realizada:

Artículos

Tania M. Gutiérrez Valencia, Martha P. García de Llasera. Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion–solid phase extraction–high performance liquid chromatography with diode array detection method. *Journal of Chromatography A*, 1218, 2011, 6869-6877.

Tania Milena Gutiérrez Valencia and Martha Patricia García Camacho. On-line coupling of Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) technique and Liquid Chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in biological tissues. *Memory in extensive* 124 TG. 1st. International Congress on Instrumentation and Applied Sciences to be held from October 26 to October 29, 2010 in Cancun, Quintana Roo. Mexico.

Ponencias en Congresos

Tania Milena Gutiérrez Valencia, **Martha Patricia García Camacho**. Aplicación de un sistema en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para el análisis de plaguicidas organofosforados en tejidos de bovino. 46º CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA, realizado del 10 al 14 de septiembre, 2011, en el Hotel Misión Querétaro Juriquilla, México.

Tania Milena Gutiérrez Valencia and Martha Patricia García Camacho. On-line coupling of Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) technique and Liquid Chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in biological tissues. 1st. International Congress on Instrumentation and Applied Sciences to be held from October 26 to October 29, 2010 in Cancun, Quintana Roo. Mexico.

Tania Milena Gutiérrez Valencia, Martha Patricia García Camacho. Miniaturización de un método basado en la técnica de dispersión de matriz en fase sólida para la extracción de plaguicidas organofosforados en hígado de bovino. 44º CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA, realizado del 26 al 30 de septiembre, 2009, en el Hotel Marriott Real Puebla, México.

Premio QuimiUnam 2011- 1er lugar en la modalidad presentación oral: Dr. José Francisco Herrán Arrellano. Actividad Académica llevada a cabo los días 16, 17 y 18 de noviembre de 2011 en el Auditorio Alfonso Caso de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ÍNDICE

	Pág
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	5
2.2 Objetivos Particulares	5
3. ANTECEDENTES	
3.1 Características generales de los plaguicidas organofosforados (OFFs)	6
3.1.1 Absorción de pesticidas organofosforados (OFFs) en humanos	8
3.1.2 Distribución	8
3.1.3 Metabolismo	8
3.1.4 Eliminación	10
3.1.5 Normativa	10
3.1.6 Métodos de extracción y cuantificación de plaguicidas organofosforados en muestras biológicas	11
3.2 Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)	19
3.2.1 Absorción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en humanos	20
3.2.2 Distribución	20
3.2.3 Metabolismo	20
3.2.4 Normativa	22
3.2.5 Métodos de extracción y cuantificación de HAPs en muestras biológicas	24

3.3 Métodos de extracción acoplados a la cromatografía	31
3.3.1 Extracción en Fase Sólida (EFS) acoplada a sistemas cromatográficos	32
3.3.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS) acoplada a sistemas cromatográficos	35
3.3.3 Extracción Asistida con Microondas (EAM) acoplada a sistemas cromatográficos	36
3.3.4 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU) acoplada a sistemas cromatográficos	38
3.4 Generalidades sobre la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	40
3.5 Factores que influyen en la eficiencia de la DMFS	44
3.6 Aplicación de la DMFS en el análisis de contaminantes orgánicos en matrices complejas	46
4. SECCIÓN EXPERIMENTAL	
4.1 Reactivos y Disolventes	50
4.2 Material y Equipos	50
4.2.1 Sistema cromatográfico	50
4.2.2 Material para la preparación de muestra	51
4.2.3 Equipos y aditamentos para el acople de la DMFS y la EFS al sistema cromatográfico	52
4.3 Preparación de disoluciones estándar de OFFs y HAPs	53
4.4 Metodología	54
4.4.1 Optimización del acople entre la DMFS al sistema cromatográfico (CLAR/DAD) para la determinación de OFFs en muestras de hígado	56
4.4.1.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 9 OFFs por CLAR/DAD	56

4.4.1.2 Validación del sistema cromatográfico para OFFs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación	57
4.4.2 Miniaturización de la metodología de extracción DMFS para OFFs fuera de línea	58
4.4.2.1 Preparación del adsorbente para la DMFS	58
4.4.2.2 Preparación de la muestra para la DMFS fuera de línea	58
4.4.2.3 Preparación del cartucho de DMFS	59
4.4.2.4 Relación muestra:adsorbente analizadas por DMFS	59
4.4.2.5 Optimización de la secuencia de limpieza y elución de OFFs por DMFS fuera de línea	60
4.4.2.6 Limpieza del extracto con sílice virgen “ <i>clean up</i> ” fuera de línea	62
4.4.3 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para OFFs	63
4.4.3.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs	64
4.4.3.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs	65
4.4.3.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs	66
4.4.4 Acople de un cartucho en acero inoxidable (cartucho de DMFS) a una bomba <i>Eldex</i> y válvula selectora de disolventes	66
4.4.5 Acople de la DMFS a EFS-CLAR/DAD	68
4.4.6 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs	71
4.4.6.1 Linealidad	71

4.4.6.2 Exactitud	71
4.4.6.3 Precisión	72
4.4.6.4 Límites de detección y cuantificación	72
4.4.6.5 Robustez	73
4.4.7 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD a muestras de hígado con daños patológicos	74
4.4.7.1 Verificación de OFFs en muestras de hígado con lesiones patológicas por espectroscopía UV y espectrometría de masas	74
4.4.8 Adecuación del método analítico acoplado para la determinación de HAPs en muestras de hígado	76
4.4.8.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 4 HAPs por CLAR-DFL	76
4.4.8.2 Validación del sistema cromatográfico para HAPs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación	77
4.4.9 Aplicación de la metodología de DMFS para la extracción de 4 HAPs fuera de línea	78
4.4.9.1 Limpieza del extracto con sílice virgen “ <i>clean up</i> ” fuera de línea	79
4.4.10 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para HAPs	79
4.4.10.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs	79
4.4.10.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs	80
4.4.10.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs	80

4.4.11 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de HAPs	80
4.4.11.1 Linealidad	81
4.4.11.2 Exactitud	81
4.4.11.3 Precisión	81
4.4.11.4 Límites de detección y cuantificación	81
4.4.11.5 Robustez	82
4.4.12 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL a muestras de hígado de bovino con daños patológicos y productos alimenticios de origen animal	83
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Optimización del acople entre la DMFS al sistema cromatográfico (CLAR/DAD) para la determinación de OFFs en muestras de hígado	84
5.1.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 9 OFFs por CLAR/DAD	84
5.1.2 Validación del sistema cromatográfico para OFFs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación	88
5.2 Miniaturización de la metodología de extracción DMFS para OFFs fuera de línea	91
5.2.1 Miniaturización de las cantidades muestra:adsorbente por DMFS sin y con muestras de hígado	91
5.2.2 Limpieza del extracto con sílice virgen “ <i>clean up</i> ” fuera de línea	98
5.3 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para OFFs	100

5.3.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs	100
5.3.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs	101
5.3.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs	103
5.4 Acople de un cartucho en acero inoxidable (cartucho de DMFS) a una bomba Eldex y válvula selectora de disolventes	104
5.5 Acople de la DMFS a EFS-CLAR/DAD	107
5.6 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs	111
5.6.1 Linealidad	111
5.6.2 Exactitud	112
5.6.3 Precisión	113
5.6.4 Límites de detección y de cuantificación	115
5.6.5 Robustez	117
5.7 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD a muestras de hígado de bovino con daños patológicos	119
5.8 Ventajas del manejo de la muestra por la metodología analítica en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs frente al método oficial mexicano: NOM-028-ZOO-1995	124
5.9 Adecuación del método analítico acoplado para la determinación de HAPs en muestras de hígado	125
5.9.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 4 HAPs por CLAR-DFL	125

5.9.2 Validación del sistema cromatográfico para HAPs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación	127
5.9.3 Aplicación de la metodología de DMFS para la extracción de 4 HAPs fuera de línea	130
5.9.3.1 Limpieza del extracto con sílice virgen “ <i>clean up</i> ” fuera de línea	133
5.9.4 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para HAPs	134
5.9.4.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs	134
5.9.4.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs	135
5.9.4.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs	136
5.9.4.4 Acople de la DMFS a EFS-CLAR/DFL	137
5.9.5 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación HAPs	139
5.9.5.1 Linealidad	139
5.9.5.2 Exactitud	140
5.9.5.3 Precisión	140
5.9.5.4 Límites de detección y cuantificación	142
5.9.5.5 Robustez	143
5.9.6 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL a muestras de hígado con daños patológicos y productos alimenticios de origen animal	144

5.10 Ventajas de la metodología analítica en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de HAPs en tejidos de bovino frente a otras metodologías aplicadas en alimentos	147
5.11 Comparación de los métodos analíticos acoplados para la determinación de OFFs y HAPs en muestras de bovino	149
6. CONCLUSIONES	152
7. PERSPECTIVAS	154
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
ANEXOS	167

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrilo
BaA	Benzo[a]antraceno
BbF	Benzo[b]fluoranteno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
BaP	Benzo[a]pireno
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
C.V. %	Coefficiente de variación porcentual
DAD	Detector ultravioleta visible con arreglo de diodos
DCE	Detector de conductividad electrónica
DFL	Detector de fluorescencia
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida
DS	Desviación estándar
EFS	Extracción en fase sólida
EM	Espectrometría de masas
HAPs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
IC	Intervalo de confianza
k'	Factor de retención
K _{ow}	Coefficiente de partición octanol:agua
LCE	Límite de cuantificación experimental
LCTM	Límite de cuantificación teórico del método
LDA	Límite de detección absoluto
LDE	Límite de detección experimental
LDTM	Límite de detección teórico del método
N.I	No inyectado
N.D	No detectado
N.R	No reportado
N.C	No cuantificable
N.E	No estimado
OFFs	Plaguicidas organofosforados
PTFE	Politetrafluoroetano
R _s	Resolución
t _r	Tiempo de retención
t _o	Tiempo muerto
UV	Ultravioleta
w _b	Ancho de pico

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 3.1. Hidrólisis del diazinón al ácido dietiltiofosfórico y 2-isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina.	6
Figura 3.2. Fase I. Proceso de biotransformación, metabolismo general de los plaguicidas organofosforados.	9
Figura 3.3. Cromatograma del extracto de: a. Hígado de jabalí. b. Leche de vaca. Tomado de <i>Plaguica y col. (2005)</i> .	14
Figura 3.4. Representación esquemática del metabolismo del benzo[<i>a</i>]pireno en humanos (<i>US Department of Health and Human Services (ATSDR)</i>). EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutation-S-Transferasa.	21
Figura 3.5. Cromatogramas de los extractos de diferentes especies de pescado por DMFS: 1. Benzo[<i>a</i>]antraceno, 2. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno, 3. Benzo[<i>k</i>]fluoranteno, 4. Benzo[<i>a</i>]pireno. Tomado de <i>Pensado y Casais (2005)</i> .	26
Figura 3.6. Esquema de la configuración en línea de la EFS al sistema CLAR/EM/EM para el análisis de verapamil y metabolitos. Posición A: Se carga la muestra en el cartucho de EFS. Posición B: Elución y análisis de los compuestos retenidos en el cartucho de EFS hacia el sistema cromatográfico. Tomado de <i>Zang y col. (2005)</i> .	34
Figura 3.7. Acople entre microextracción en fase sólida a la cromatografía de líquidos. PDMDPS: Polidimetildifenilsiloxano. Tomado de <i>Scott y Abdul (2008)</i> .	36
Figura 3.8. Acople de la EAM a la cromatografía de líquidos, mediante la EFS para el análisis de pesticidas organoclorados presentes en granos. Tomado de <i>Chen y col. (2007)</i> .	37
Figura 3.9. Acople de la EAU a la cromatografía de líquidos para el análisis de N-metilcarbamatos en suelos y alimentos. PP: Bomba peristáltica. R: Residuos. EC: Celda de extracción. SV: Válvula selectora. IV ₁ y IV ₂ : Válvulas de conmutación. IV: Puerto de inyección. HPP: Bomba de alta presión. HC: Cámara de hidrólisis. DC: Cámara de derivatización. OPA: Ftaldialdehído. Tomado de <i>Caballo-López y Luque de Castro (2003)</i> .	39
Figura 3.10. Recobros porcentuales \pm DS (n= 4) para 11 pesticidas a partir de naranjas usando diferentes adsorbentes, nivel de fortificación: 0.5 ng mg ⁻¹ . Tomado de <i>Kristenson y Haverkate (2001)</i> .	41
Figura 3.11. a. Microscopia electrónica de barrido (MEB: resolución de 20 μ m), partículas de sílice derivatizadas C ₁₈ antes de la dispersión. b. MEB (resolución de 20 μ m) partículas de sílice después de la dispersión de hígado de bovino, Tomado de <i>Barker (2000)</i> .	42

- Figura 3.12.** Pasos típicos de la DMFS. 42
- Figura 3.13.** Esquema de una columna de DMFS modificada con co-columna de óxido de aluminio. Tomado de *Zhao y Wielen (1999)*. 43
- Figura 3.14.** Factores que influyen en la eficiencia de la DMFS. 44
- Figura 4.1.** Diagrama general de la metodología aplicada 54
- Figura 4.2.** Extracción en fase sólida (EFS) acoplada “*on-line*” al sistema cromatográfico CLAR/DAD. **E:** Reservorio para el extracto proveniente de la DMFS “*off-line*”. **B1:** Bomba de pre-concentración *Eldex*. **VC-1:** Válvula de conmutación de 6 vías. **P:** Pre-columna en acero inoxidable con adsorbente. **PI:** Puerto de inyección. **VP:** Válvulas de purga 1 y 2. **R.** Residuos. **BC:** Bomba cromatográfica. **D:** Disolventes cromatográficos 1 y 2. **CP:** Computador. **CG:** Columna de guarda. **CA:** Columna analítica. **DAD:** Detector UV con arreglo de diodos. 64
- Figura 4.3.** Acople de un cartucho en acero inoxidable para la DMFS a una bomba recíproca *Eldex* y una válvula selectora de disolventes. 67
- Figura 4.4.** Acople del cartucho de DMFS al sistema de EFS mediante válvulas de conmutación *Rheodyne* y bombas *Eldex*. **a.** Tubo vacío como sistema de dilución. **b.** Bucle de 5.0 mL. **c.** Cámara dinámica de mezclado. 69
- Figura 5.1.** Variación del *Log* del factor de retención (k') en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, en una columna analítica RES-ELUT C₁₈ (5 µm x 150 mm x 4.6 mm I.D.) a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ con una mezcla de los 9 OFFs con concentración de 5.0 mg L⁻¹ cada uno. 86
- Figura 5.2.** Cromatograma de una disolución estándar de 10 mg L⁻¹ de la mezcla de los 9 OFFs. Elución por gradiente lineal desde 65:35 v/v metanol:agua hasta 100 % de metanol en 20 min. Columna analítica RES-ELUT C₁₈ (5 µm x 150 mm x 4.6 mm I.D.) a un flujo de 1.0 mL min⁻¹ y λ= 220 nm con corrección en la línea base. Volumen de inyección 20 µL. 88
- Figura 5.3.** Frente de elución de 9 OFFs de un cartucho de dispersión de 2.0 g de sílice C₁₈, sin muestra, fortificada con 10 µg de cada OFF. Elución con ACN al 100 % y aplicando la secuencia descrita en la tabla 5.7. 93
- Figura 5.4.** Frente de elución de 9 OFFs de un cartucho de dispersión de 0.5 g de sílice C₁₈, sin muestra, fortificado con 10 µg de cada OFF. Elución con ACN:Agua al 80:20 v/v y aplicando la secuencia descrita en la tabla 5.10. 96
- Figura 5.5.** Cromatogramas de un extracto de muestra de hígado (0.050 g) homogeneizada en 0.200 g de sílice C₁₈ y con una co-columna de 0.050 g de sílica virgen a diferentes longitudes de onda. Muestra fortificada con 200 µg g⁻¹ de OFFs. Fase móvil: metanol:agua 65:35 en gradiente lineal a 100 % de metanol. **A.** Muestra de hígado sin fortificación a

220 nm. 1. Metil paratión. 2. Fenitrotión. 3. Paratión. 4. Clorfenvinfos. 5. Diazinón. 6. Etión. 7. Fenclorfos. 8. Clorpirifos. 9. Carbofenotión. 99

Figura 5.6. Cromatogramas de una disolución de los 9 OFFs pre-concentrada en el sistema EFS-CLAR/DAD (figura 4.2-sección experimental) en diferentes adsorbentes, $\lambda = 220$ nm. 1. Metil paratión. 2. Fenitrotión. 3. Paratión. 4. Clorfenvinfos. 5. Diazinón. 6. Etión. 7. Fenclorfos. 8. Clorpirifos. 9. Carbofenotión. 101

Figura 5.7. Porcentajes de recuperación de los OFFs vs. Porcentaje de ACN en disolución. Dilución del volumen de 1.0 mL proveniente del cartucho de DMFS (al 80:20 v/v de ACN:Agua), con diferentes volúmenes de agua (3.0, 2.2, 1.6, 1.0 y 0.6 mL). **a.** Con el polímero bondesil env 40 μm . **b.** Con la sílice C_{18} nucleosil 10 μm . Pre-concentración de disoluciones de 0.2 mg L^{-1} de OFFs a un caudal de 1.0 mL min^{-1} . 102

Figura 5.8. Efecto del caudal de pre-concentración en el sistema EFS-CLAR/DAD, sobre los valores de recobros en: disoluciones de OFFs en ACN:Agua al 25:75 v/v para concentraciones bajas (2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$) y altas (50 $\mu\text{g L}^{-1}$). 104

Figura. 5.9. Recobros de los OFFs a partir del cartucho de DMFS en acero inoxidable (figura 4.3-sección experimental) con diferentes secuencias de limpieza y de elución. Ensayos realizados simulando la DMFS sin muestra de hígado y fortificando 0.200 g de sílice C_{18} con 10 μg de cada OFF. 105

Figura 5.10. Porcentajes de recobros de OFFs en una pre-columna con nucleosil C_{18} , aplicación de la configuración 3 con cámara dinámica de mezclado como dispositivo de dilución. Ensayos realizados sin y con muestra, fortificación a 4.0 $\mu\text{g g}^{-1}$. 108

Figura 5.11. Acople en línea de DMFS-EFS-CLAR/DAD. **D₁:** Agua. **D₂:** ACN:Agua 30:70 v/v. **D₃:** ACN 100 %. **D₄:** Metanol 100 %. **D₅:** Agua. **VS:** Válvula selectora de disolventes. **B1:** Bomba *Eldex* 1. **CD:** Cartucho de DMFS. **V1:** Válvula de conmutación 1. **F:** Puerto de llenado de agua. **V2:** Válvula de conmutación 2. **CM:** Cámara de mezclado. **B2:** Bomba *Eldex* 2. **P:** Pre-columna rellena de sílice C_{18} . **PI:** Puerto de inyección. **VP:** Válvula de purga. **B3:** Bomba cromatográfica. **PC:** Computador. **CG:** Columna de guarda. **CA:** Columna analítica. **DAD:** Detector UV con arreglo de diodos. **R:** Residuos. 109

Figura 5.12. Robustez de la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD con diferentes tejidos de bovino a dos niveles de fortificación para 6 OFFs: 0.5 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ y para etiión, fenclorfos y clorpirifos: 1.0 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. **a.** Recobros. **b.** Precisión C.V. %. 118

Figura 5.13. Cromatogramas obtenidos mediante la aplicación de DMFS-EFS-CLAR/DAD. **A.** Disolución estándar de 25 mg L^{-1} de OFFs. **B.** Muestra fortificada a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de OFFs. **C.** Muestra sin fortificación. **a.** Hígado. **b.** Músculo **c.** Pulmón. **1.** Metil paratión. **2.** Fenitrotión. **3.** Paratión **4.** Clorfenvinfos, **5.** Diazinón **6.** Etión, **7.** Clorpirifos, **8.** Fenclorfos, **9.** Carbofenotión. Gradiente lineal con 65:35 v/v metanol:agua al 100 % de metanol. $\lambda = 220$ nm. Corrección línea base. 120

Figura 5.14. Cromatogramas de la muestra de hígado número 27 con patología severa a $\lambda = 268$ nm. **a.** Verificación de la presencia del fenitrotión: **A.** Muestra fortificada a $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ de OFFs. **B.** Muestra sin fortificar. **b.** Análisis de muestra con gradiente lineal de 55:45 v/v metanol:agua a 100 % de metanol en 30 min. 121

Figura 5.15. a. Cromatogramas CLAR-EM/EM con el espectro de masas SIM (m/z : 277.00): **A.** Disolución estándar de fenitrotión (2.5 mg L^{-1}). **B.** Extracto de la muestra de hígado número 27 con daños patológicos. Condiciones descritas en la **sección 4.4.7.1. b.** Cromatograma de la muestra de hígado número 27 con fenitrotión. Detección a $\lambda = 268$ nm. Comparación con espectro UV: **a.** Disolución estándar de fenitrotión. **b.** Espectro UV-Vis del pico cromatográfico presente en la muestra. **c.** Espectro SIM de masa $m/z = 277.00$. 123

Figura 5.16. Variación del *Log* del factor de retención (k') en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, en una columna analítica Spheri-5 ODS ($5 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) a un flujo de 1.0 mL min^{-1} con una mezcla de los 4 HAPs con concentración de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uno. 126

Figura 5.17. Cromatograma de una disolución estándar de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de los 4 HAPs. Elución en el modo isocrático con 91:5 v/v metanol:agua. Columna analítica Spheri-5 ODS ($5 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) a un flujo de 1.0 mL min^{-1} . Volumen de inyección $20 \mu\text{L}$. Longitudes de onda indicadas en la tabla 5.22. 128

Figura 5.18. Frentes de elución de HAPs al aplicar la DMFS, con la secuencia: 5.0 mL agua, 5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v, 4.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v y 3.0 mL ACN 100 %. **a.** Sin muestra **b.** Con muestra: fortificación a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de HAPs 132

Figura 5.19. Recobros promedio de extracción de HAPs sin y con muestras de hígado fortificadas a $30 \mu\text{g g}^{-1}$ y aplicando la DMFS para una relación muestra:adsorbente de 0.050:0.2000. 133

Figura 5.20. Efecto del porcentaje de ACN en el extracto proveniente del cartucho de DMFS sobre la eficiencia de la pre-concentración de los HAPs en una pre-columna con sílice C_{18} . Pre-concentración de disoluciones con $0.01 \mu\text{g HAPs}$ a caudal de 1.0 mL min^{-1} . 136

Figura 5.21. Efecto del caudal de pre-concentración, en el sistema EFS-CLAR/DAD, sobre los valores de recobros en disoluciones de HAPs en ACN:Agua al 40:60 v/v, para concentraciones bajas ($1.0 \mu\text{g L}^{-1}$) y altas ($0.4 \mu\text{g L}^{-1}$). 137

Figura 5.22. Recobros de HAPs aplicando el acople DMFS-EFS-CLAR/DFL en muestras de hígado fortificadas a 0.4 ng g^{-1} y aplicando 1.5 y 2.0 mL de ACN al 100 % como volúmenes de elución de los HAPs del cartucho de DMFS. 138

Figura 5.23. Robustez de la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL con diferentes tejidos de bovino a dos niveles de fortificación (0.1 y 0.6 ng g⁻¹). **a.** Recobros. **b.** Precisión C.V. %. 144

Figura 5.24. Cromatogramas obtenidos mediante la aplicación de DMFS-EFS-CLAR/DFL. **A.** Disolución estándar de 1.5 µg L⁻¹ de HAPs. **B.** Muestra fortificada a 0.6 ng g⁻¹ de HAPs. **C.** Muestra sin fortificación. **a.** Hígado. **b.** Músculo **c.** Pulmón. **1.** Benzo[*a*]antraceno. **2.** Benzo[*b*]fluoranteno. **3.** Benzo[*k*]fluoranteno. **4.** Benzo[*a*]pireno. Modo isocrático con 91:9 v/v metanol:agua a flujo de 1.0 mL min⁻¹. 145

Figura 5.25. Cromatogramas aplicando la metodología DMFS-EFS-CLAR/DFL **a.** **A.** Muestra de patología número 27, zoom de pico sospechoso con adición de benzo[*k*]fluoranteno y muestra 27 fortificada. **B.** Disolución control de 0.15 µg L⁻¹ de HAPs. **C.** Muestra de jamón ahumado. **b.** **A.** Disolución control de 0.25 µg L⁻¹. **B.** Muestra de patología número 17. 146

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 3.1. Clasificación de los organofosforados de interés en medicina veterinaria.	7
Tabla 3.2. Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, control de residuos tóxicos en músculo e hígado de bovinos. Límites Máximos Permisibles.	12
Tabla 3.3. Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de plaguicidas en matrices complejas.	15
Tabla 3.4. Características principales de los 16 HAPs prioritarios.	23
Tabla 3.5. Concentraciones de benzo[<i>a</i>]pireno en diferentes alimentos. Tomado de <i>Vives y col. (2001)</i> .	24
Tabla 3.6. Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices complejas.	27
Tabla 3.7. Comparación de los procedimientos de tratamiento de muestra en línea, fuera de línea.	31
Tabla 3.8. Aplicación de la DMFS para la extracción de diversos contaminantes en matrices complejas.	47
Tabla 4.1. Ensayos preliminares con DMFS. Cantidades analizadas en la miniaturización de la DMFS, (réplicas n= 3).	60
Tabla 4.2. Secuencias de limpieza y de elución de los 9 OFFs con DMFS. Ensayos realizados con y sin muestra	61
Tabla 4.3. Limpieza del extracto obtenido por DMFS con diferentes cantidades de sílice virgen para diferentes cantidades de muestra y adsorbente (réplicas n= 3).	63
Tabla 4.4. Secuencia de operación para la pre-concentración del extracto (que contiene a los OFFs) proveniente de la DMFS mediante EFS acoplada al sistema cromatográfico (CLAR/DAD).	65
Tabla 4.5. Simulación de la DMFS sin muestra y sin pre-concentración en sílice C ₁₈ , con diferentes secuencias de limpieza y elución de los OFFs con la configuración indicada en la figura 4.3.	68
Tabla 4.6. Secuencia de limpieza y elución de los 4 HAPs por DMFS. Ensayos realizados sin muestras de hígado a un nivel de fortificación de 0.5 µg g ⁻¹ HAPs*. Sistema CLAR/DAD.	78

- Tabla 5.1.** Longitudes de onda de cuantificación de los 9 OFFs estimados mediante el programa “PolyView 2000-Diode Array Spectral-Processing software”: barrido 190-367 nm. 85
- Tabla 5.2.** Factores de retención ($\log k'$) y tiempos de retención de 5 OFFs en una columna analítica RES-ELUT C₁₈ a un flujo de 1.0 mL min⁻¹. Composición de la fase móvil 65:35 v/v metanol:agua, modo isocrático. 86
- Tabla 5.3.** Ecuaciones lineales de calibración para los 9 OFFs en el sistema CLAR/DAD, por inyecciones sucesivas de disoluciones estándar entre 1.0 a 25.0 mg L⁻¹. 89
- Tabla 5.4.** Repetibilidad del sistema CLAR/DAD evaluado en términos de las C.V. % para cada nivel de concentración con n= 3. 89
- Tabla 5.5.** Precisión inter-día del sistema CLAR/DAD evaluada en términos de los C.V. % para dos niveles de concentración con n= 5 realizado en días diferentes. 90
- Tabla 5.6.** Límites de detección y cuantificación experimentales del sistema CLAR/DAD, S/N= 3 y S/N= 10 respectivamente. Volumen de inyección: 20 μ L. 91
- Tabla 5.7.** Aplicación del método de *Reyes-Reyes*. Recobros de la secuencia de limpieza y posterior elución de los 9 OFFs de un cartucho de DMFS con 2.00 g de sílice C₁₈ sin muestra y fortificación con 10 μ g de cada de OFF. (*Reyes Reyes, 2006*). 92
- Tabla 5.8.** Recobros de la secuencia de limpieza y de elución de los 9 OFFs a partir de un cartucho de DMFS, con 0.500 g de hígado homogeneizado en 2.000 g de sílice C₁₈. Fortificación: 60 μ g g⁻¹. 93
- Tabla 5.9.** Precisión en los recobros de OFFs al aplicar la DMFS a muestras de hígado homogeneizado (0.500 g) en 2.000 g de sílice C₁₈ y fortificadas a 60 μ g g⁻¹ de OFFs. n= 3. 94
- Tabla 5.10.** Programa de limpieza y de elución para los 9 OFFs con diferentes tamaños de muestra y adsorbente C₁₈. **V**₁: ACN:Agua al 30:70 v/v; **V**₂: ACN:Agua al 40:60 v/v; **V**_{elución}: ACN:Agua al 80:20 v/v. 95
- Tabla 5.11.** Recobros y C.V. % por aplicación de la DMFS sin muestras de hígado para diferentes cantidades de adsorbente sílice C₁₈. n= 3. 97
- Tabla 5.12.** Recobros y C.V. % por aplicación de la DMFS con muestras de hígado para diferentes tamaños de muestra y adsorbente (1:4). Réplicas n= 3. 97
- Tabla 5.13.** Porcentajes de adsorción y recobros de los OFFs al incorporar una co-columna de sílice virgen en el cartucho de DMFS. 98
- Tabla 5.14.** Modo de operación secuencial del sistema acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para el análisis de OFFs en muestras de hígado. 111

- Tabla 5.15.** Linealidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD. Ecuaciones lineales para el área obtenida en función de la concentración, intervalo de 0.50 a 10.0 μg de OFFs por gramo de muestra. El intervalo de confianza de m y b está calculado para un nivel de 95 % y 13 grados de libertad. 112
- Tabla 5.16.** Recobro global del método con muestras de hígado: *cantidad recuperada en ng vs. cantidad adicionada de OFFs* (para un intervalo de fortificación entre 25 - 500 ng). El intervalo de m y b está calculado en base a la distribución t para un $\alpha= 0.05$ y 14 grados de libertad. 113
- Tabla 5.17.** Repetibilidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para los 5 niveles de concentración con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para $n= 3$. 114
- Tabla 5.18.** Precisión inter-día del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para 2 niveles de concentración (0.5 y 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$) con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para un $n= 5$, días diferentes. 114
- Tabla 5.19.** Límites de detección del método DMFS-EFS-CLAR/DAD estimados según: Code of Federal Regulation (US, EPA) Appendix B to Part 16 *Definition and Procedure for the Determination of Method Detection Limit* y obtenidos con las ecuaciones 4.4 y 4.5 para 0.050 g de muestra. 115
- Tabla 5.20.** Límites de detección absoluto del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD estimados por fortificación sucesiva de OFFs hasta obtención de una relación $S/N= 3$ para una tamaño de muestra de 0.10 g. 117
- Tabla 5.21.** Datos comparativos entre la metodología analítica propuesta DMFS-EFS-CLAR/DAD y otras metodologías de extracción y análisis para OFFs en diferentes matrices. 124
- Tabla 5.22.** Longitudes de onda de excitación y emisión para los 4 HAPs estudiados, empleando un detector de fluorescencia “Prostar” 363. 125
- Tabla 5.23.** Factores de retención ($\text{Log } k'$), logaritmo de los coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}) y tiempos de retención de los 4 HAPs. Columna analítica Spheri-5 ODS a un flujo de 1.0 mL min^{-1} . Composición de la fase móvil 91:9 v/v metanol:agua, modo isocrático. 127
- Tabla 5.24.** Ecuaciones lineales de calibración para los 4 HAPs en el sistema CLAR/DFL, por inyecciones sucesivas de disoluciones estándar entre 0.25 a 1.50 $\mu\text{g L}^{-1}$. 128
- Tabla 5.25.** Repetibilidad del sistema CLAR/DFL evaluado en términos de las C.V. % para cada nivel de concentración. $n= 3$. 129
- Tabla 5.26.** Precisión inter-día del sistema CLAR/DFL evaluado en términos de las C.V. % para dos niveles de concentración para $n= 5$ realizado en días diferentes. 129

- Tabla 5.27.** Límites de detección y cuantificación experimentales del sistema CLAR/DFL, S/N= 3 y S/N= 10 respectivamente. Volumen de inyección: 20 μL . 130
- Tabla 5.28.** Aplicación del método de DMFS. Recobros de la secuencia de limpieza y de elución de los 4 HAPs de un cartucho de DMFS con 0.20 g de sílice C_{18} sin muestra y fortificada con 0.5 μg de cada HAPs. 131
- Tabla 5.29.** Aplicación del método de DMFS. Recobros de la secuencia de limpieza y de elución de los 4 HAPs de un cartucho de DMFS con 0.050 g de muestra y 0.200 g de sílice C_{18} . Fortificación a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ de HAPs. 131
- Tabla 5.30.** Recobros obtenidos por triplicado con muestras de hígado en el modo fuera de línea del método, empleando 0.050 g de muestra con 0.200 g de sílice C_{18} y una columna de sílica virgen (0.050g). Muestras fortificadas a 0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ de HAPs, extracto pre-concentrado. 134
- Tabla 5.31.** Linealidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL. Ecuaciones lineales para el área obtenida en función de la concentración, intervalo de 0.10 a 0.60 ng de OFFs por gramo de muestra; el intervalo de confianza de m y b esta calculados para un nivel del 95 % y 10 grados de libertad. 139
- Tabla 5.32.** Recobro global del método: *cantidad recuperada en pg vs. cantidad adicionada de HAPs* (para un intervalo de fortificación entre 5 - 30 pg). Los intervalos de m y b están calculados con base en la distribución t para un $\alpha= 0.05$ y 11 grados de libertad. 140
- Tabla 5.33.** Repetibilidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL para los 4 niveles de concentración con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para $n= 3$. 141
- Tabla 5.34.** Precisión *inter-día* del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL para 2 niveles de concentración (0.10 y 0.60 ng g^{-1}) con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para $n= 5$ en días diferentes. 141
- Tabla 5.35.** Límites de detección del método DMFS-EFS-CLAR/DFL estimados según: *Code of Federal Regulation* (US, EPA) Appendix B to Part 16 *Definition and Procedure for the Determination of Method Detection Limit*, obtenidos con las ecuaciones 4.4 y 4.5 para 0.050 g de muestra. 142
- Tabla 5.36.** Datos comparativos entre la metodología analítica propuesta DMFS-EFS-CLAR/DFL y otras metodologías de extracción y análisis para HAPs en diferentes matrices. 148
- Tabla 5.37.** Parámetros optimizados de las metodologías acopladas DMFS-EFS-CLAR/DAD y DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de OFFs y HAPs respectivamente, en muestras de bovino. 149

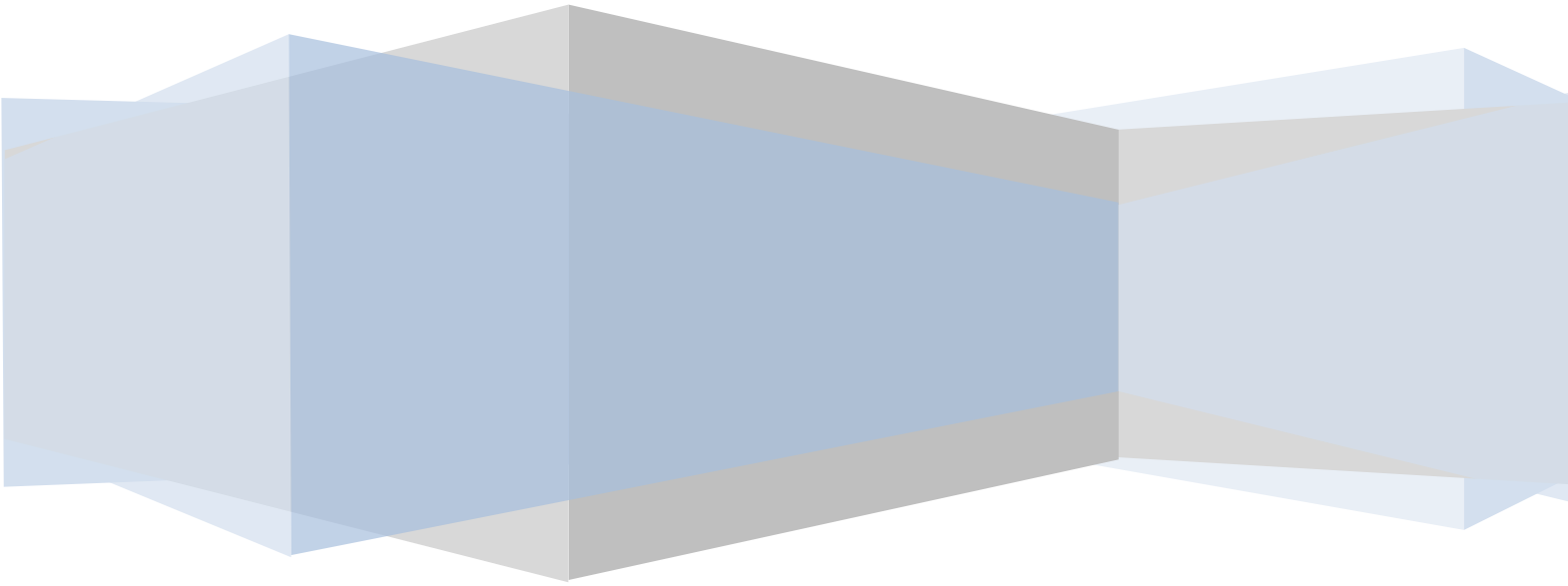
ABSTRACT

Miniaturized methods based on matrix solid-phase dispersion coupled to solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array or fluorescence detection (MSPD–SPE–HPLC/DAD and MSPD–SPE–HPLC/FLD) were developed for the trace simultaneous determination of organophosphorus pesticides (OPPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bovine tissue respectively. The pesticides: parathion-methyl, fenitrothion, parathion, chlorfenvinphos, diazinon, ethion, fenchlorphos, chlorpyrifos and carbophenothion, as well as the hydrocarbons: benzo[*a*]anthracene, benzo[*b*]fluoranthene, benzo[*k*]fluoranthene and benzo[*a*]pyrene were used. To perform the coupling between MSPD and SPE, 0.05 g of sample was dispersed with 0.2 g of C₁₈ silica sorbent and packed into a stainless steel cartridge containing 0.05 g of silica gel in the bottom. After a clean-up of high and medium polarity interferences with water and an acetonitrile:water mixture, the OPPs and PAHs were desorbed from the MSPD independent cartridges with pure acetonitrile and afterwards directly transferred to a dynamic mixing chamber for dilution with water and preconcentration into an SPE 20 mm × 2.0 mm I.D. C₁₈ silica column. Subsequently, the OPPs and HAPs compounds were eluted on-line with the chromatographic mobile phase to the analytical column and the diode array detector or fluorescence detector for their separation and detection, respectively. The methods were validated and yielding recovery values between 91 % and 101 % for OPPs and 96 % and 99 % for PAHs, and precision values, expressed as relative standard deviations (RSD), which were less than or equal to 12 % for OPPs and lower than or equal to 10 % for PAHs. Linearity was good and ranged from 0.5 to 10 µg g⁻¹ for OPPs and 0.1 to 0.6 ng g⁻¹ for PAHs. The limits of detection of the OPPs were in the range of 0.04–0.25 µg g⁻¹ and the limits of detection of the PAHs were of 0.012 ng g⁻¹. The methods were satisfactorily applied to the analysis of samples from unhealthy animals and food samples. They are recommended for food control, research efforts when sample amounts are limited and laboratories that have ordinary chromatographic instrumentation.

RESUMEN

Se desarrollaron dos métodos miniaturizados de análisis basados en la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) acoplada a la extracción en fase sólida (EFS) y la cromatografía de líquidos (CLAR) con detector UV con arreglo de diodos (DAD) y de fluorescencia (DFL) para el análisis a nivel de trazas de 9 plaguicidas organofosforados (OFFs) y 4 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en tejidos de bovino. Los OFFs analizados (metil paratión, fenitrotión, paratión, clorfenvinfos, diazinón, etión, fenclorfos, clorpirifos y carbofenotión) se encuentran regulados por la norma mexicana NOM-ZOO-028-1995 para hígado de bovino. Los HAPs analizados (benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno) están dentro de los 16 HAPs prioritarios en el análisis ambiental regulado por la “*Environmental Protection Agency*” (EPA). Para llevar a cabo el acople entre la DMFS y la EFS, 0.05 g de muestra fueron dispersados con 0.20 g de sílice C₁₈, posteriormente se empacó la mezcla en un cartucho de acero inoxidable que contenía en el fondo 0.05 g de sílice virgen. Después de efectuar las etapas de limpieza de interferentes de alta y mediana polaridad con agua y mezclas de acetonitrilo:agua, los OFFs y los HAPs fueron eluidos del cartucho de dispersión con acetonitrilo puro y directamente transferidos a una cámara de mezclado dinámica donde el extracto fue diluido con agua. La mezcla fue pre-concentrada en una precolumna de acero inoxidable que contenía sílice C₁₈, (EFS). Subsecuentemente, los OFFs y los HAPs fueron eluidos por la fase móvil del sistema cromatográfico hacia la columna analítica y los detectores DAD y DFL respectivamente. Los métodos acoplados fueron validados satisfactoriamente, reportando recobros entre 91 y 101 % y valores de precisión (C.V. %) menores o iguales al 12 % para los OFFs. La metodología DMFS-EFS-CLAR/DAD presentó una adecuada linealidad en un intervalo entre 0.5 y 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ y límites de detección entre 0.04-0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$. El método DMFS-EFS-CLAR/DFL generó recobros entre 96 % y 99 % y valores de precisión menores o iguales al 10 % para los HAPs. Además exhibió una adecuada linealidad entre 0.1 y 0.6 ng g^{-1} y límites de detección para los 4 HAPs de 0.012 ng g^{-1} . Los métodos fueron satisfactoriamente aplicados al análisis de muestras de hígado provenientes de necropsias animales enfermos y otras muestras alimenticias. Los métodos se recomiendan para el control de la calidad en alimentos, cuando la cantidad de muestra es limitada y solo se cuenta con instrumentación cromatográfica ordinaria. El acople de esta metodología de extracción al sistema de análisis es el primer reporte realizado en la literatura especializada.

1. Introducción



El aumento progresivo en el uso de pesticidas para el control de diferentes plagas en plantas y animales ha generado un alto impacto socio-ambiental debido a su persistencia en el entorno y a su toxicidad. Una de las principales características fisicoquímicas de gran parte de estas sustancias xenobióticas es la afinidad que presentan por los tejidos con alto contenido de lípidos, razón por la cual su bioacumulación en tejidos blandos de organismos superiores se presenta con relativa facilidad. Por ejemplo, algunos estudios indican que el pesticida organofosforado diazinón causa efectos hepatotóxicos con cambios en la bioquímica y en la ultra-estructura en hígado de ratas *Wistar* (Kalender *et al.*, 2005). De hecho, a los pesticidas en general se les asocia con daños patológicos y cromosómicos en humanos (Webster *et al.*, 2002).

Los ejemplos típicos de acumulación de residuos de pesticidas están representados por los que ocurren con los compuestos organofosforados (OFFs), los cuales se han detectado en tejidos de animales como los bovinos (García de Llasera and Reyes-Reyes, 2009) y los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), registrados en tejidos con altos contenidos de lípidos, como es el caso de órganos de bovinos y porcinos (Ciganek y Neca, 2006) y en muestras animales de origen acuáticos (Smoker *et al.*, 2010).

Una vez en el organismo, los OFFs pueden acumularse en el tejido graso y a pesar de su degradación en metabolitos primarios y secundarios inducidas por acción de la luz, sistemas enzimáticos, microorganismos y cambios de pH, se han encontrado en músculo de res algunos OFFs y sus metabolitos, aún después de la cocción (Coulibaly y Scoot, 1994). La ingesta prolongada de estas sustancias en los humanos causa serios problemas en el sistema nervioso central por la inhibición de neurotransmisores como la acetilcolinesterasa lo que produce la muerte por paro respiratorio (Bird *et al.*, 2008).

Por su parte, los HAPs son catalogados por las agencias internacionales de control ambiental (EPA y la Comunidad Europea) como el grupo de contaminantes de mayor riesgo para los seres humanos. Las actividades antropogénicas y naturales han generado la acumulación de estas sustancias en diferentes alimentos disponibles a la población. En organismos superiores su acumulación causa daños genéticos, manifestándose en

problemas teratológicos y carcinogénicos, razón por la cual su determinación en diferentes tipos de matrices contribuye al control ambiental y de toxicidad en organismos destinados al consumo humano.

Entonces, el mayor reto para el desarrollo de métodos confiables en la determinación de contaminantes químicos, es la complejidad de las matrices biológicas (como los tejidos de animales hígado, riñón, músculo y pulmón) que influyen en la exactitud y precisión de los métodos analíticos. Sin embargo, en la actualidad se presentan diferentes técnicas en las que se busca disminuir el impacto ambiental y hacer más eficientes a las metodologías de extracción así como a las de análisis, manteniendo la rigurosidad analítica necesaria para su aplicación.

La cromatografía de gases con detector de masas y la cromatografía de líquidos con detectores ultravioleta visible y de fluorescencia son los sistemas de análisis más comúnmente utilizados para la cuantificación de OFFs y HAPs a nivel de trazas (*Smoker et al., 2010; Buonasera et al., 2009; Salm et al., 2009; Martínez-Nieto et al., 2009*). La extracción sólido-líquido (ESL) y la extracción líquido-líquido (ELL) como técnicas de extracción clásicas son aún muy usadas en la determinación de estos contaminantes a partir de tejidos de animales. Estas técnicas se caracterizan por el alto consumo de disolventes, etapas largas de tratamiento de la muestra y tiempos de análisis prolongados. Generalmente estos procesos de extracción son llevados a cabo fuera de línea “del inglés *off-line*”, lo cual significa que la extracción y el análisis se encuentran separados. De esta forma aumenta la manipulación de la muestra y con ello la disminución de la precisión del método.

Por otra parte, el acople de las metodologías de extracción a los sistemas de análisis permite la simplificación de los procedimientos de tratamiento de muestra tradicionales gracias a la manipulación de pequeñas cantidades de muestra y de disolventes, reducción de las fuentes de error y tiempo de análisis, así como el incremento de la sensibilidad respecto a las metodologías operadas fuera de línea. De esta forma es más rápido y eficiente monitorear contaminantes en muestras biológicas (con alto

contenido de lípidos) destinadas al consumo humano, así como contribuir con el diagnóstico veterinario.

En la actualidad el desarrollo de metodologías acopladas para el análisis de muestras biológicas se ha desarrollado exitosamente para el manejo de muestras líquidas, sin embargo, es aún incipiente para muestras sólidas, dada la complejidad de las mismas. La extracción en fase sólida (EFS) es una de las técnicas de extracción más comúnmente utilizada para el aislamiento de contaminantes a nivel de trazas de matrices biológicas en estado líquido, tales como orina (*Panuwet et al., 2008*) y plasma (*Herrera et al., 2002*); además puede ser fácilmente acoplada a la cromatografía de líquidos (*Zhao et al., 2010*; *León-González et al., 2011*). Para el caso de muestras biológicas sólidas, la EFS ha sido utilizada en los protocolos de tratamiento de muestras en línea “del inglés *on line*” como sistema de pre-concentración y/o como etapa de limpieza “*clean up*” (*Alcaide-Molina et al., 2009*).

Es de resaltar que las metodologías, una vez acopladas, presentan la facilidad para ser automatizadas mediante la implementación de electroválvulas, auto-muestreadores, cartuchos y tubos de acero inoxidable e interfases (*Díaz-Plaza et al., 2007*).

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es otra técnica de extracción que actualmente es de las más empleadas para la extracción de un amplio número de compuestos en diferentes y complejas matrices de tipo animal (*Barker, 2007*). El principal objetivo de esta técnica es la dispersión de la matriz en un soporte sólido para facilitar la destrucción de la arquitectura de la matriz y de esta forma permitir la elución selectiva de los analitos de interés con una mezcla de disolventes apropiada. La DMFS presenta versatilidad con muestras sólidas, semisólidas o de alta viscosidad, además del manejo de cantidades de muestra (0.5 a 1.0 g) y disolventes reducidas en comparación con las metodologías convencionales.

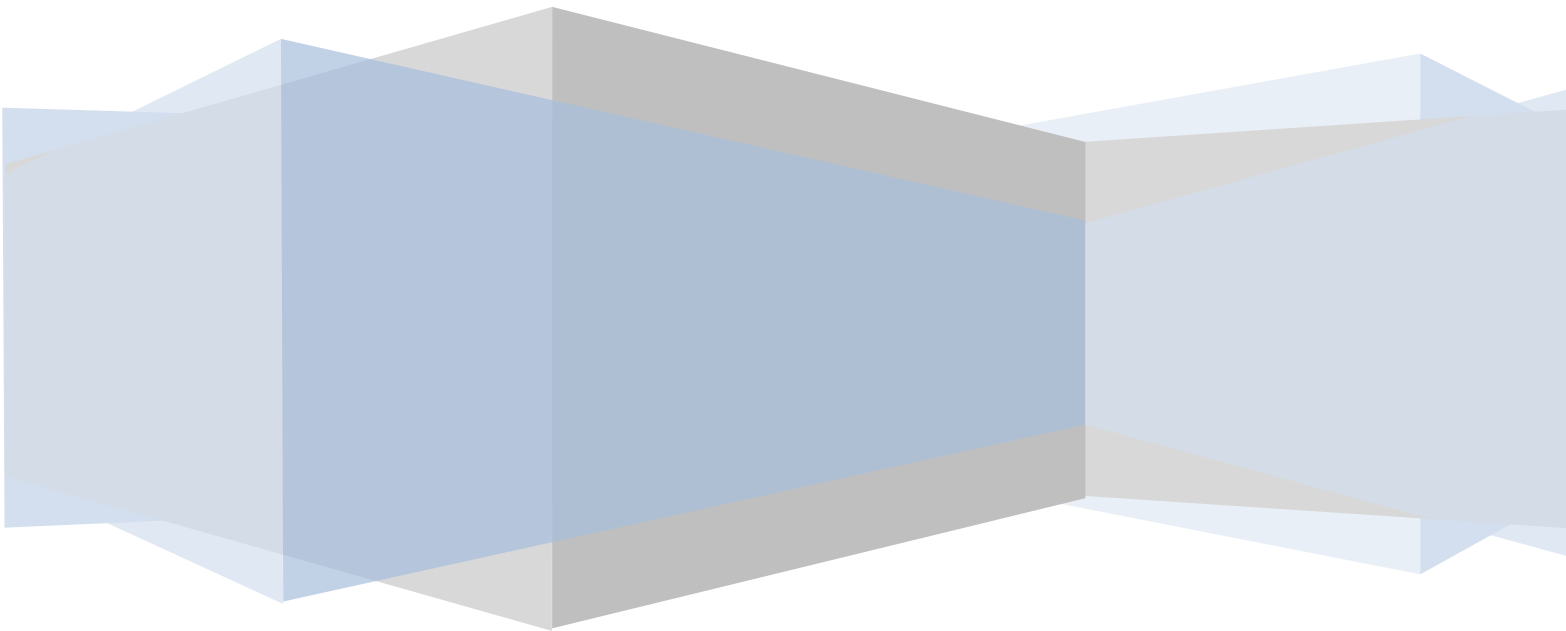
El acople de la DMFS a la EFS y al sistema cromatográfico para el análisis de residuos de pesticidas e hidrocarburos aromáticos en muestras biológicas no ha sido reportado en la literatura especializada; la posibilidad de acoplamiento brindaría un

avance importante en el desarrollo de las metodologías en línea debido a las grandes ventajas que estas ofrecen. *Liu y col. (2011)* utilizaron la DMFS para la extracción de ésteres de polifenil polibromato e hidroxilatos análogos a partir de muestras ambientales (suelo, pescado y cortezas de árboles); en este trabajo de investigación, el primer extracto obtenido fue analizado directamente por CG-DCE y el segundo extracto por CG-EM/EM. No se realizaron etapas previas de pre-concentración de los extractos pues los sistemas de detección empleados presentan alta sensibilidad (5 - 213 pg mL⁻¹) y selectividad.

El presente trabajo de investigación buscó desarrollar metodologías acopladas entre la DMFS, la EFS y la cromatografía de líquidos con detectores ultravioleta visible con arreglo de diodos (DAD) y de fluorescencia (DFL) para el análisis simultáneo en tejidos de bovino de 9 OFFs y de 4 HAPs, respectivamente. Los OFFs analizados (metil paratión, fenitrotión paratión, clorfenvinfos, diazinón, etión, fenclorfos clorpirifos y carbofenotión) son usados frecuentemente en México para el control de plagas en cultivos y establos, razón por la cual se encuentran regulados por la norma NOM-ZOO-028-1995. Los 4 HAPs (benzo[*a*]antraceno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*k*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno) analizados se eligieron entre los 16 HAPs considerados por la EPA como compuestos de alto riesgo a nivel ambiental debido a que son muy bioacumulables en tejidos.

Una vez desarrollada y validada la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD o DFL se efectuaron las correspondientes aplicaciones a muestras de hígado con lesiones patológicas provenientes del Complejo Agropecuario Industrial de Tizayuca, Hidalgo (CAIT), en el cual se reportó una elevada mortalidad de animales jóvenes, presumiéndose como posible causa, el contacto con sustancias tóxicas de acuerdo con las observaciones de los médicos veterinarios patólogos. El análisis de HAPs se realizó también en muestras patológicas de hígado y además en muestras alimenticias de jamón. El desarrollo de los métodos analíticos propuestos representa uno de los primeros trabajos acerca del acople de la DMFS al sistema cromatográfico en muestras sólidas de alta complejidad.

2. Objetivos



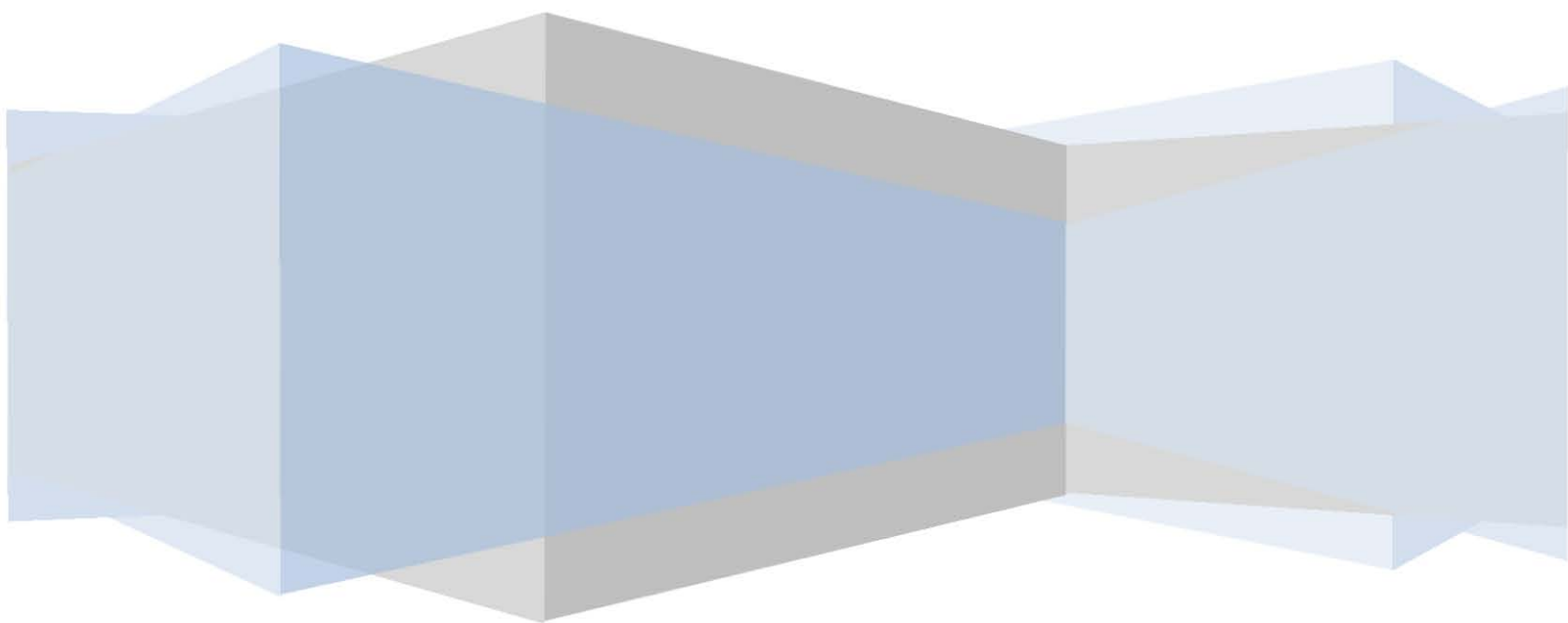
2.1 Objetivo General

- ✓ Desarrollar métodos miniaturizados basados en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de Pesticidas Organofosforados (OFFs) e Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) en muestras de hígado de bovino, con posterior análisis por cromatografía de líquidos.

2.2 Objetivos Particulares

- ✓ Optimizar y validar un método por cromatografía líquida de alta resolución con detector ultravioleta con arreglo de diodos, para la separación analítica de los pesticidas organofosforados: Metil paratión, Fenclorfos, Paratión, Clorfenvinfos, Diazinón, Etión, Clorpirifos, Fenitrotión y Carbofenotión.
- ✓ Optimizar y validar un método por cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia, para la separación analítica de los hidrocarburos aromáticos policíclicos: Benzo[*a*]pireno, Benzo[*b*]fluoranteno, Benzo[*k*]fluoranteno y Benzo[*a*]antraceno.
- ✓ Desarrollar métodos miniaturizados basados en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de los pesticidas organofosforados e hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de hígado de bovino.
- ✓ Lograr el acople de la columna de Dispersión de Matriz en Fase Sólida al sistema cromatográfico vía una pre-columna de pre-concentración, para la elución en línea de los plaguicidas organofosforados y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de hígado de bovino.
- ✓ Aplicar las metodologías analíticas desarrolladas a la determinación de los compuestos en estudio en muestras provenientes de necropsias de bovinos, los cuales presentaron muerte en estado juvenil sin causa determinada, con posibilidades de haber sufrido sobreexposición a tóxicos.

3. Antecedentes



La presencia de residuos de plaguicidas organofosforados (OFFs) y de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en tejidos animales (p.ej. hígado de peces, bovinos, etc.) es de gran interés en el área de los alimentos (*Brian y Scoot, 1994; Coulibaly y Scoot, 1993*). Estas sustancias son consideradas muy tóxicas para el ser humano y por tal razón existen regulaciones a nivel internacional para su control.

3.1 Características generales de los plaguicidas organofosforados (OFFs)

Gran número de plaguicidas OFFs presentan una elevada persistencia en el medio ambiente, razón por la cual se han reportado varios problemas en la salud humana (*Laganá y Faberi, 2004; Hajslova y Zrostlikova, 2003; Monika y Buszewski, 2004*) directamente relacionados con la exposición a diferentes fuentes de contaminación. Una de las principales reacciones de los OFFs en medio acuosos es la hidrólisis bien sea por el átomo de P o en la cadena alquímica; la oxidación del enlace P=S a P=O es otra de las reacciones que se llevan a cabo bajo condiciones bióticas o abióticas de tal forma que la conversión del enlace fosfoditionato a sus homólogos del oxígeno incrementa fuertemente la toxicidad para insectos y mamíferos. En la **figura 3.1**, se observa la reacción de hidrólisis típica de los OFFs.

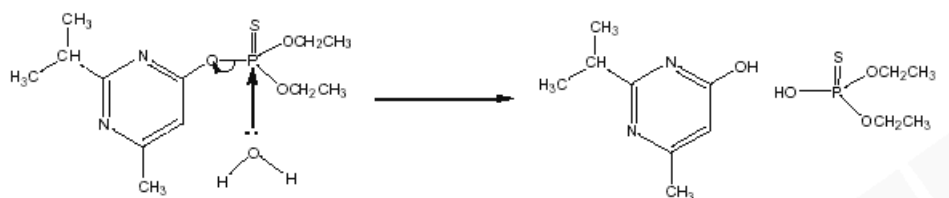


Figura 3.1. Hidrólisis del diazinón al ácido dietiltiofosfórico y 2-isopropil-4-metil-6-hidroxipirimidina.

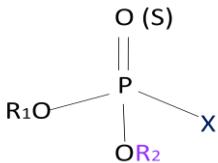
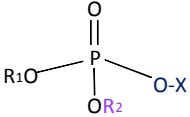
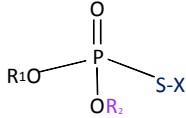
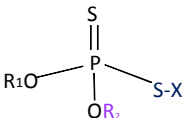
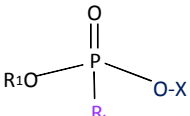
Los OFFs inhiben las esterasas fosforilasas, en especial a la enzima acetilcolinesterasa causando la acumulación de la acetilcolina neurotransmisora, por lo tanto hay mayores evidencias de intoxicación por los cambios químicos en el sistema nervioso central además de los sistemas urinario, reproductor y en el páncreas. Así por ejemplo, el diazinón ha demostrado afectar el transporte de membrana mitocondrial en

hígado de ratas y provocar alteraciones en el citocromo P-450 en hígado de seres humanos (Russo y Luigi, 2002; Kalender et al., 2005).

La mutagenicidad y carcinogenicidad son otros de los efectos dañinos asociados a la presencia de plaguicidas OFFs siendo específicos hacia ciertos órganos tales como el hígado, riñón y corazón. En medicina veterinaria, la insuficiencia hepática aguda ha sido asociada a reacciones adversas de los medicamentos, tóxicos ambientales, aditivos en los alimentos, agentes infecciosos entre otros (Coster y Gudrun, 2008; Zafer y Guler, 2007; Webster et al., 2002).

En la **tabla 3.1** se indican la fórmula general y los principales grupos de OFFs de interés en medicina veterinaria; los grupos R_1 y R_2 son radicales alquilo generalmente metilo o etilo, el grupo X es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo y suele contribuir de forma importante a sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.

Tabla 3.1. Clasificación de los organofosforados de interés en medicina veterinaria.

Fórmula General	Grupo	Compuestos	Fórmula estructural
	Fosfatos	Clorfenvinfos	
	O-arilfosforotionatos	Fenclorfos Fentiión Fenitrotión	
	Fosforoditioatos	Etiión Malatiión	
	Fosfonatos	Triclorfón	

3.1.1 Absorción de pesticidas organofosforados (OFFs) en humanos

En humanos expuestos a este tipo de sustancias, la absorción por la piel no es uniforme en toda la superficie corporal para un determinado compuesto. En el caso del paratión, la absorción dérmica en distintas zonas del cuerpo humano varía desde 0 %, en el arco plantar, hasta el 100 % en el escroto; entre ambas cifras extremas están: 8.6 % en la cara ventral del antebrazo, alrededor del 33 % en distintos puntos de la cara y el 63 % en las axilas.

La temperatura ambiental elevada es otro factor importante que contribuye a la absorción cutánea. La excreción de *p*-nitrofenol urinario en voluntarios, tras la aplicación de la misma cantidad de paratión a la piel, ha demostrado que la absorción por vía dérmica aumenta con la temperatura, probablemente a consecuencia de un aumento de la circulación periférica en estas condiciones; la humedad relativa alta, que también la favorece, actúa de manera similar (*Aboudania y Lapadula, 1990*).

3.1.2 Distribución

Una vez absorbidos, los OFFs, sus metabolitos se distribuyen rápidamente por todo los órganos y tejidos, aunque las concentraciones más elevadas se alcanzan en el hígado y los riñones, antes de ser eliminados de manera prácticamente total por la orina y las heces. No obstante, los compuestos más lipofílicos pueden almacenarse en pequeña proporción en los tejidos grasos y en el tejido nervioso dada su riqueza en lípidos de donde pueden ser posteriormente liberados.

3.1.3 Metabolismo

El catabolismo de los compuestos organofosforados una vez absorbidos tiene lugar, en parte, a través de las llamadas esterazas "A", enzimas que los hidrolizan a una velocidad considerable, actuando como desintoxicadoras. El catabolismo de los OFFs sigue las dos fases habituales de biotransformación de los xenobióticos en el organismo.

Las denominadas fases I y II. En la **figura 3.2** se presenta la fase I de biotransformación con las 8 reacciones que la comprenden.

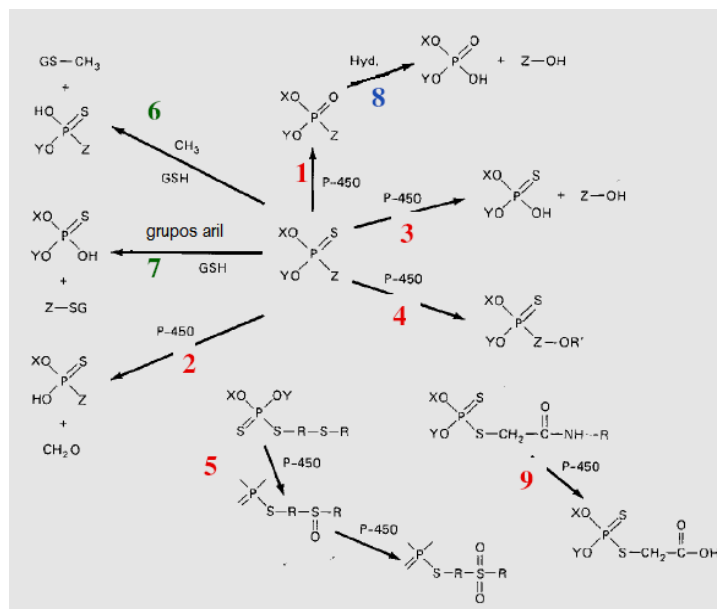


Figura 3.2. Fase I. Proceso de biotransformación, metabolismo general de los plaguicidas organofosforados.

Únicamente la reacción 1 da como resultado un aumento de toxicidad; en ésta ocurre una desulfuración oxidante del éster de fosforotioato produciéndose su análogo oxigenado. Esto es llevado a cabo por el sistema MFO (monooxigenasa de función mixta). En el caso de los mamíferos los metabolitos obtenidos en la fase I pueden ser hidrolizados por enzimas hidrolasas aril y alifáticas (reacción 8) encontradas en sus tejidos, pero los insectos carecen de estas enzimas haciéndolos más susceptibles (*Casarett et al., 1996*).

El metabolismo de estos compuestos transcurre principalmente en el hígado y como resultado final de la transformación de la molécula se originan los “grupos salientes” que son característicos de cada organofosforado en particular (por acción de citocromos P-450) y un total de hasta 8 alquilfosfatos diferentes (por acción de las esterasas A) que son comunes para el conjunto de los organofosforados.

3.1.4 Eliminación

En términos generales, entre 75 y 100 % de los OFFs administrados por vía oral se transforman en compuestos solubles, entre los que se encuentran los alquilfosfatos prolongándose su eliminación urinaria por un periodo que oscila entre 24 y 48 horas tras la administración (experimental). Debe tenerse en cuenta, no obstante, que la absorción por vía dérmica puede ser más lenta, puede extenderse durante un periodo más largo y, en consecuencia, su eliminación puede prolongarse más allá del referido plazo, puesto que representa el resultado de la integración de todo el proceso de absorción (*Obiols, 2000*).

3.1.5 Normativa

Décadas atrás, el paratión fue el plaguicida más utilizado en la agricultura. Sin embargo, por su elevada toxicidad su uso está totalmente restringido (junto con el metilparatión) y sujeto al procedimiento de consentimiento fundamentado previo del Convenio de Rotterdam (que regula los movimientos internacionales de algunas sustancias peligrosas). Otros organofosforados, algo menos tóxicos, se siguen usando, como el malatión, dimetoato y clorpirifos, pero lentamente son reemplazados por otras nuevas moléculas, como los piretroides o bipiridinilos.

Dado que los plaguicidas OFFs tienen elevada toxicidad (muchos están prohibidos en países del primer mundo) es prioritario balancear los beneficios respecto a sus riesgos de modo que la producción nacional de agroalimentos sea sustentable. Algunos reportes (*Relya, 2005*) indican que plaguicidas prohibidos o restringidos son exportados a países en desarrollo en forma irregular, por lo que es menester estudiarlos también desde el punto de vista legal y sanitario.

Por lo anterior y por el hecho que los bovinos son animales domésticos destinados a la alimentación humana, las Normas Oficiales Mexicanas NOM-004-Z00-1994 regulan 14 plaguicidas OFFs en grasa, hígado, riñón y músculo en bovinos con límites máximos permisibles (LMP) para diferentes plaguicidas: Diazinon, Di-syston, Ronnel y Metabolitos,

Clorpirifos, Fenitrothion, Malathion, Parathion, Trifluralin, Etofenproxim, Coumatral, Clorfenfos, Diclorvos, Fenitrothion y Triclorfon.

Así mismo, la norma oficial mexicana NOM-028-ZOO-1995 establece las condiciones para el análisis de residuos de plaguicidas OFFs, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases, realizando una extracción sólido – líquido previa y posterior limpieza del extracto en columnas con adsorbentes. En la **tabla 3.2** se indican los correspondientes valores de los límites máximos permisibles para 14 OFFs en hígado y músculo de bovinos.

Es importante destacar que, en términos generales algunos OFFs como el clorpirifos y el paratión son lipofílicos y presentan volatilidad intermedia. Sin embargo, en alimentos sometidos a cocción a varias temperaturas, entre 70 y 80 °C, la estabilidad de los plaguicidas paratión, fentión y clorpirifos en músculo de bovino es relativamente alta, persistiendo al final del proceso de cocción el 76 % de paratión, 74 % de fentión y el 70 % de clorpirifos de la concentración inicial; éstos plaguicidas fueron extraídos por técnicas convencionales sólido – líquido y líquido-líquido (*Coulibaly y Scoot, 1993*).

3.1.6 Métodos de extracción y cuantificación de plaguicidas organofosforados en muestras biológicas

Los OFFs han sido determinados por diferentes métodos de extracción y análisis en aguas superficiales, organismos acuáticos y mamíferos (*Serrano y López, 1999; Walter y Lott, 1993*). En la actualidad, existe gran variedad de métodos analíticos reportados en la literatura las cuales incluyen rutinas laboriosas, tiempos prolongados de análisis y consumo excesivo de disolventes.

Se debe señalar que las etapas básicas de la determinación de plaguicidas son:

a) Extracción. El procedimiento de extracción está sujeto al tipo de plaguicida a estudiar y a la naturaleza del sustrato que lo contiene; debe tener una recuperación superior al 80 % y ser suficientemente efectivo. Normalmente el método consiste en una homogeneización

del sustrato a alta velocidad, mezclado con disolventes y un desecante como sulfato sódico anhidro, junto con aglomerantes del tipo tierra de diatomeas.

Tabla 3.2. Norma Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994, control de residuos tóxicos en músculo e hígado de bovinos. Límites Máximos Permisibles.

Compuesto	Tejido	Límites máximos permisibles (mg kg ⁻¹)
Diclorvos	Músculo	0.02
Diazinón	Músculo	0.70
	Hígado	0.70
Di-Syston	Músculo	0.10
	Hígado	0.10
Fenclorfos y metabolitos	Músculo	4.00
	Hígado	4.00
Clorpirifos y Metabolito	Músculo	2.00
	Hígado	2.00
Fenitrotión	Músculo	0.05
	Hígado	0.05
Malatión	Músculo	4.00
	Hígado	4.00
Paratión	Músculo	0.70
	Hígado	0.70
Tritión (Carbofenotión)	Músculo	0.07
	Hígado	0.07
Etión	Músculo	2.50
	Hígado	1.00
Coumafos	Músculo	1.00
Clorfenvinfos	Músculo	0.20
	Hígado	0.20
Fentión y metabolitos	Músculo	0.10
Triclorfon	Músculo	0.10

b) Purificación del extracto. A pesar que se utilizan métodos de extracción muy selectivos, es habitual purificar el extracto para eliminar compuestos co-extraídos que puedan interferir en la determinación de los residuos. Como en el caso de la extracción es difícil encontrar un método universal de purificación, los ejemplos más comunes son los procesos de adsorción en columna, cromatografía en capa fina, co-distilación por arrastre y cromatografía de exclusión molecular (Sun y Chen, 2008).

c) Determinación. La determinación de residuos de plaguicidas ha evolucionado de forma paralela al avance de técnicas analíticas. Se han empleado métodos biológicos como la medida de la actividad colinérgica de los OFFs, métodos espectrofotométricos, reacciones de fluorescencia y fosforescencia, métodos cromatográficos: cromatografía en papel, cromatografía en capa fina, cromatografía gaseosa (la más empleada) y cromatografía líquida. Además de lo expuesto hasta ahora, hemos de destacar que se han conseguido, acoplado a la cromatografía, tanto en fase líquida como gaseosa, una serie de técnicas analíticas que han mejorado sensiblemente los resultados; dentro de éstos se pueden citar: resonancia magnética nuclear, espectrometría de masas y técnicas radio químicas que han ayudado a la determinación de plaguicidas así como a la de sus metabolitos.

Otros métodos emplean la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) y Fluidos Supercríticos (EFSc) para minimizar el tamaño y pasos en el tratamiento de la muestra con alto contenido de grasa; la aplicación de la cromatografía líquida, con pasos previos de limpieza, la extracción soxhlet, la extracción acelerada con disolventes (EAD), la extracción asistida con microondas (EAM), dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) o la combinación DMFS con EAD, aumentan la eficiencia de purificación, dando como resultado extractos libres de grasa, recuperando en mililitros a los analitos de interés (Frenich y Plaza, 2007; Beyer y Merck, 2008; Pagliuca y Gazzoti, 2005).

Pagliuca y col. (2005) determinaron el contenido de 8 OFFs en leche de vaca e hígado de jabalí empleando como adsorbente C₁₈ para la muestra de hígado y posterior análisis por cromatografía de gases, obteniéndose cromatogramas limpios de

interferencias. En la **figura 3.3** se observa la elución de los plaguicidas clorpirifos, diazinón, etil paratión, entre otros.

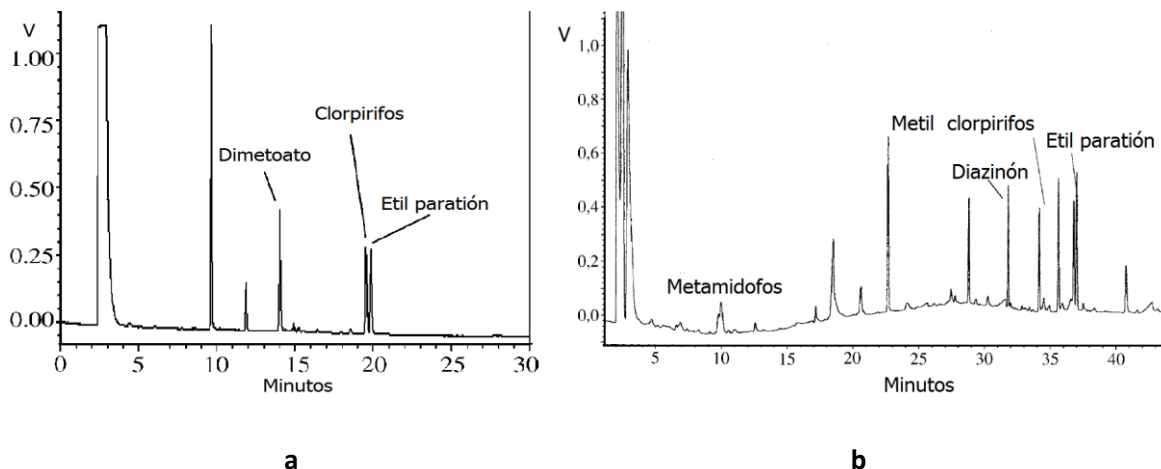


Figura 3.3. Cromatograma del extracto de: **a.** Hígado de jabalí. **b.** Leche de vaca. Tomado de *Plaguica y col. (2005)*.

Sin embargo, son pocos los trabajos encontrados en la literatura que presentan métodos de extracción simples y rápidos para el manejo de las muestras lipídicas. La DMFS origina metodologías simples, rápidas y adecuadas para el manejo de muestras sólidas, semisólidas y de alta viscosidad que además tienen un carácter lipídico; esta técnica tiene el potencial para ser automatizada, pero hasta el momento, esto aún no ha sido realizado (*Valsamaki y Boti, 2006; Kruve y Kunnapas, 2008*).

En la **tabla 3.3** se presentan algunos métodos de extracción y cuantificación de OFFs en diversas matrices. Las metodologías convencionales se caracterizan por consumir un número significativo de reactivos, además de complicadas secuencias en el tratamiento de la muestra como es el caso de la ELL y la ESL. Por el contrario, las metodologías actuales consisten en sistemas de análisis rápidos, sensibles, ecológicos y lo suficientemente robustos para aplicarse en diferentes matrices.

La DMFS como técnica de extracción y la EFS como sistema de limpieza “*clean up*” son ampliamente utilizadas para el tratamiento de muestras sólidas (frutas, tejidos de animales, insectos, etc.) dadas las ventajas de versatilidad que ofrecen. El clorpirifos y el

Tabla 3.3. Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de plaguicidas en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Alimentos para bebés: 5.0	Fensulfotión, Fenamifos, Profenofos, Fonofos, Isofenfos, Dialifos, Sulprofos y Protiofos	S.P	ELL: (AcOEt (20 mL)-sonicación-centrifugación-filtración-secado-ACN (2.0 mL) y agua (4.0 mL). EFS: "Clean up" (C_{18} , secado N_2 , elución ACN (10 mL), evaporación, dilución ACN:Agua 1:9	CLAR/UV	LD: 4.4-37.5 ng mL^{-1} . LC: 14.5-125.0 ng mL^{-1}	37 - 119	Buonasera et al., 2009
Granos de trigo, maíz, arroz y frijol: 0.050	Organoclorados	Trituración, homogeneización y secado con N_2 por 24 h	EAM: ACN 95 % a un flujo 1.0 mL min^{-1} por 10 min. Dilución del extracto con agua para "clean up" (EFS en C_{18})	CLAR /UV	LD: 19-37	86 - 105	Chen et al., 2007
Frutas y vegetales: 0.5	36 pesticidas	Trituración, homogeneización y almacenamiento a -20°C	DMFS: 0.5 g C_{18} , 1.0 g Na_2SO_4 , "clean-up": 0.5 g sílice. Elución: DCM: AcOEt (4:1)	CG/EM	LC: < 20	60 - 120	Covaci et al., 2010
Aceite de olivo: 20 μL	Simazina, Diazinón, Clorpirifos Fenitrotión, Malatión, Paratión; Fentoato y Etión	Filtración (0.22 μm), almacenamiento a 4°C	Adsorción y Desadsorción térmica en interfase TOTAD a 275°C por 5.0 min	CG/DCE/DNF	L.D: DNF: 1-89 $\mu\text{g L}^{-1}$ y con DCE: 0.9-4.7 $\mu\text{g L}^{-1}$	N.R	Díaz, 2007

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **DMFS:** Dispersión de Matriz en Fase Sólida. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **ELL:** Extracción Líquido-Líquido. **EAM:** Extracción Asistida por Microondas. **DCM:** Diclorometano. **MeOH:** Metanol. **AA:** Ácido Ascórbico. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **UV:** Detector Ultravioleta. **DCE:** Detector de Conductividad Eléctrica. **DNF:** Detector para Nitrógeno y Fósforo. **°T:** Temperatura. **E.I:** Estándar Interno. **N.R:** No Reportado. **S.P:** Sin pre-tratamiento.

Tabla 3.3. (Continuación) Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de plaguicidas en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Alimento para ganado: 0.5-1.0	Piretroides, pesticidas OCs y OFFs	Trituración y mezcla homogénea de cereales con aceite vegetal, sales y óxido. Refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	DMFS: 2.0 g C_{18} , florisil o alúmina y 0.200 g de Na_2SO_4 . "Clean-up" con florisil o alúmina. Elución con 5-10 mL AcOEt o hexano; se lleva a sequedad el extracto y redissuelve con 200 μL de AcOEt.	CG- μDCE	LD: 0.03-1.5. LC: 0.12-5.0	> 75	<i>Fernández et al., 2008</i>
Hígado y músculo de bovino: 0.5	Clorpirifos, Clorfenvinfos, Diazinón, Fenitrotión, y Metilparatión	Trituración, homogeneización y refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	DMFS: 2.0 g de C_{18} , elución con 5.0 mL de ACN puro. "Clean up" con 0.5 g sílice. El extracto se evapora y se redissuelve con 250 μL de ACN puro	CLAR/DAD	LD: 25-100 LC: 75-300	55 - 101	<i>García de Llasera and Reyes-Reyes, 2009</i>
Hígado: pollo, cerdo y cordero: 0.5 a 5.0	OFFs y OCs	Homogeneización y refrigeración a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$	ESL: 60 mL de AcOEt y "clean-up" por CPG con AcOEt:ciclohexano (1:1 v/v). DMFS: 2.0 g C_{18} y "clean-up" con 2.0 g de florisil, elución con 10 mL AcOEt	CG-EM/EM	LD: 0.01-8.7. LC: 0.08-23.2	62 - 115	<i>Garrido et al., 2007</i>
Insectos: 0.040	OFFs y Piretroides	Almacenamiento en N_2 líquido	DMFS: 40-80 mg de C_8 . Elución con 100 μL AcOEt para OFFs y 3.5 mL hexano para piretroides	CG-EM	LD: 5-80 OFFs y 5-35 para piretroides	52 - 94	<i>Kristenson y Shahmiri, 2004</i>

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **DMFS:** Dispersión de Matriz en Fase Sólida. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **CPG:** Cromatografía de Permeación en Gel. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **ELL:** Extracción Líquido Líquido. **DCM:** Diclorometano. **MeOH:** Metanol. **AA:** Ácido Ascórbico. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **μDCE :** Micro-detector de Conductividad Eléctrica. **UV:** Detector Ultravioleta. **DAD:** Detector con Arreglo de Diodos. **$^{\circ}\text{T}$:** Temperatura. **E.I:** Estándar Interno. **N.R:** No Reportado. **S.P:** Sin pre-tratamiento.

Tabla 3.3. (Continuación) Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de plaguicidas en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Músculo de Ajolote mexicano: 0.5	Clorpirifos, Fenitrotión y Metilparatión	Trituración, homogeneización y refrigeración	DMFS: 2.0 g de C_{18} con "clean-up" de silica gel y elución con ACN	CLAR/DAD	LD: < 500	90	García de Llasera et al., 2010
Frutas: 0.025	OFFs y un piretroide	Trituración, homogeneización y almacenamiento a -20°C	DMFS: 0.025 g C_8 . Limpieza con 8.0 mL de agua. Elución con 100 μL AcOEt	CG-EM	LD: 4-90	83 - 118	Kristenson y Haverkate, 2001
Jugos de frutas: 1.0 mL	12 Pesticidas	Almacenamiento a 4°C . Sonicación por 15 min	DMFS: 1.0 g de tierras diatomáceas y elución con 10 mL de DCM	CLAR-EM/EM	LD: 0.01-0.94 ng mL^{-1} . LC: 0.03-3.12 ng mL^{-1}	71 - 118	Radišić et al., 2009
Sangre humana: 100 μL	Dimetoato, Fentión, Diazinón y Clorpirifos	Análisis inmediato	ELL: 100 μL de la disolución de ZnSO_4 0.3 M con MeOH (1:5 v/v), centrifugación y análisis de 20 μL del extracto	CLAR-EM/EM	LC: 0.5 ng mL^{-1}	97 -106	Salm et al., 2009
Frutas: 0.1 a 0.025	OFFs, triazinas y piretroides	Homogeneización y almacenamiento de la pulpa a -20°C	DMFS: 0.1-0.025 g C_8 , elución con 700 μL de AcOEt	CG- μDCE	LD: < 0.56	62 - 116	Ramos et al., 2009

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **DMFS:** Dispersión de Matriz en Fase Sólida. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **ELL:** Extracción Líquido Líquido. **DCM:** Diclorometano. **MeOH:** Metanol. **AA:** Ácido Ascórbico. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **UV:** Detector Ultravioleta. **DAD:** Detector con Arreglo de Diodos. **μDCE :** Micro-detector de Conductividad Eléctrica. **$^{\circ}\text{T}$:** Temperatura. **E.I:** Estándar Interno. **N.R:** No Reportado. **S.P:** Sin pre-tratamiento.

Tabla 3.3. (Continuación) Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de plaguicidas en matrices complejas

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Leche pasteurizada: 50 mL	13 OFFs	N.R	ELL: 100 mL AcOEt y 50 g de Na_2SO_4 . Evaporación del sobrenadante y redisolución con 10 mL de hexano y ELL con 50 mL de ACN	CG/DFE	LD: 5.0-19 ng mL^{-1}	33 - 99	Salas et al., 2003
Músculo de pescado y alimentos: 5.0	Clorpirifos	N.R	ESL: Músculo de pescado, extracción con ACN y posterior "Clean-up" con C_{18} y $-\text{NH}_2$. ESL: Alimento, 100 mL de ACN pre-concentración a 2.0 mL "Clean-up" C_{18} y $-\text{NH}_2$.	CG/DFE	LD: Pescado 0.2 y Alimento: 1.0	60 - 110	Sun y Chen, 2008
Tejido de porcino: 0.5	Fluoroquinolonas, OFFs y N-metil carbamatos	Almacenamiento a -18°C . Trituración y homogeneización	DMFS: 2.0 g C_{18} . Co-columnas de abajo hacia arriba: 1.0 g de Na_2SO_4 , 0.25 g C_{18} , mezcla (muestra:adsorbente) y 0.5 g Na_2SO_4 . Elución con 8 mL ACN	CLAR/DAD	LD: 9000-22000. LC: 30000-74000	60 - 108	Wang et al., 2009

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **DMFS:** Dispersión de Matriz en Fase Sólida. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **ELL:** Extracción Líquido Líquido. **DCM:** Diclorometano. **MeOH:** Metanol. **AA:** Ácido Ascórbico. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **UV:** Detector Ultravioleta. **DAD:** Detector con Arreglo de Diodos. **DFE:** Detector Fotométrico de Llama. **T:** Temperatura. **E.I:** Estándar Interno. **N.R:** No Reportado. **S.P:** Sin pre-tratamiento.

diazinón son los OFFs más comúnmente analizados en muestras alimenticias debido a su amplio uso y estabilidad en sistemas biológicos.

3.2 Características generales de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos químicos que se componen de dos o más anillos aromáticos simples sin heteroátomos ni sustituyentes. Son componentes naturales de materias primas orgánicas, especialmente de petróleos crudos, generados por pirólisis de la materia orgánica, combustión incompleta de fósiles, en procesos industriales, etc. (*Sanchez-Brunete y Ester, 2007*).

Químicamente, los hidrocarburos aromáticos son compuestos por regla general bastante inertes a la sustitución electrofílica y a la hidrogenación, reacciones que deben llevarse a cabo con ayuda de catalizadores. Esta estabilidad es debida a la presencia de orbitales degenerados (comparando estas moléculas con sus análogos alifáticos) que conllevan a una disminución general de la energía total de la molécula.

Puesto que el benzo[*a*]pireno (BaP) es el hidrocarburo aromático policíclico más estudiado y dado que es representativo de los efectos nocivos que ocasionan los compuestos de este grupo, se acostumbra expresar los impactos ocasionados por los hidrocarburos aromáticos policíclicos en términos de equivalencia con el benzo[*a*]pireno.

A menudo estos contaminantes no polares persisten en el medio ambiente y presentan una fuerte tendencia a bioacumularse en tejidos lipídicos de los organismos superiores, incluyendo al ser humano, a través del consumo de alimentos contaminados (*Pena et al., 2007*). Las propiedades semivolátiles de los HAPs les otorgan gran movilidad, además de presentar una baja solubilidad en agua, la mayoría de ellos son lipofílicos; también dependiendo de su carácter aromático los HAPs absorben la radiación ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico.

Los compuestos de mayor persistencia se acumulan en plantas (se absorben por las raíces), peces, invertebrados terrestres y acuáticos además los mamíferos pueden

absorber los HAPs por inhalación, contacto dérmico o por ingestión aunque con menor frecuencia (*Zhu, 2008*).

3.2.1 Absorción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en humanos

El estudio de estas sustancias comenzó tras observarse la relación entre la aparición de ciertos cánceres de la piel con actividades profesionales que implicaban contacto con alquitrán y hollín. Los HAPs en humanos se almacenan en sangre, placenta y en la leche materna; el benzo[*a*]pireno interviene en la pérdida del factor de crecimiento epidérmico y en animales, en la disminución de la fertilidad y crecimiento fetal, entre otros trastornos (*Singh, 2008*).

3.2.2 Distribución

Una vez liberados a la atmósfera, los HAP en el aire pueden ser inhalados por el hombre; las partículas de HAP tienen un diámetro < 2.5 μm y pueden ser inhaladas y depositadas en los pulmones. Las partículas son retenidas en los pulmones y debido a su diminuto tamaño pueden tapar los conductos alveolares y al ser partículas liposolubles pueden almacenarse en los tejidos grasos del cuerpo o entrar en las membranas celulares causando lesiones en órganos y en tejidos.

La mayoría de los HAPs sufren foto-oxidación, siendo ésta, una forma para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de fotooxidación más frecuente es la formación de endoperóxidos, que pueden convertirlos a quinonas. Los HAPs reaccionan rápidamente con óxidos de nitrógeno o ácido nítrico, por ejemplo, el antraceno puede oxidarse a antraquinona por acción del HNO_3 o dar un derivado nitrogenado mediante una reacción de sustitución con NO_2 .

3.2.3 Metabolismo

La biotransformación de los HAPs a moléculas diol-epóxido es realizada por el complejo enzimático CYP1A1. Durante el metabolismo del BaP ocurre una primera

oxidación de la molécula de hidrocarburo (inactiva), obteniéndose el 7,8-epóxido que posteriormente, tras la hidrólisis con epóxido hidrolasa, da lugar al *trans*-7,8-diol el cual es, finalmente, oxidado a 7,8-diol-9, 10-epóxido que es una molécula con centro activo en el carbono situado en la posición C-10. Como consecuencia de la acumulación de estas sustancias en el organismo se desarrollan tumores en piel, pulmones, huesos, mamas y estómago (Kazerouni *et al.*, 2001).

En la **figura 3.4** se indica el metabolismo del benzo[*a*]pireno en humanos.

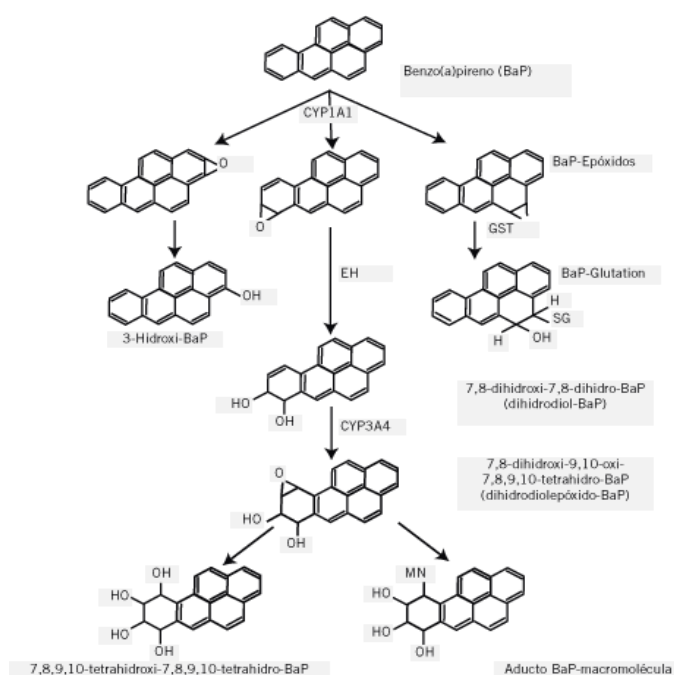


Figura 3.4. Representación esquemática del metabolismo del benzo[*a*]pireno en humanos (US Department of Health and Human Services (ATSDR)). EH: Epóxido hidrolasa. GST: Glutation-S-Transferasa.

La carcinogenicidad de los HAPs se ha asociado con la complejidad de la molécula (número de anillos), el peso molecular, el carácter lipofílico, la actividad metabólica a un intermediario diol-epóxido reactivo y con la capacidad de unirse covalentemente al ADN (Bostrom *et al.*, 2002).

3.2.4 Normativa

Se han caracterizado más de 600 HAPs. De estos, el más simple y además el más volátil es el naftaleno, el cual tiene dos anillos aromáticos y está presente exclusivamente en la fase gaseosa. En el otro extremo, están los más grandes, entre 5 y 6 anillos, tienden a estar presentes únicamente en la fase de material particulado. Hace algunos años la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) identificó los HAPs más frecuentes, comúnmente conocidos como “*los 16 HAPs prioritarios según la EPA*”, los cuales se indican en la **tabla 3.4** (Simon et al., 2006).

La Agencia Internacional de Investigación en Cáncer, conocida por sus siglas en inglés *IARC*, después de múltiples investigaciones agrupa a los diferentes compuestos estudiados en cinco grupos, de acuerdo con sus propiedades carcinogénicas: 1-Carcinogénico para Humanos, 2A-Probablemente Carcinogénicos para Humanos, 2B-Posiblemente Carcinogénicos para Humanos, 3-No clasificable como Carcinogénicos para Humanos y 4-Probablemente no Carcinogénicos para Humanos.

Cabe resaltar que los HAPs analizados en este estudio están ubicados dentro de los grupos de posiblemente carcinogénicos (2B) y el BaP como carcinogénico (1) para humanos, esto indica que el análisis de estas sustancias brinda una excelente guía de la contaminación en productos alimenticios.

En Europa y EUA., se han establecido límites máximos permisibles de 0.03 a 1.0 ppb, de benzo[a]pireno en alimentos. En la **tabla 3.5** se indican algunas concentraciones de HAPs encontradas en alimentos destinados al consumo humano. Destacan por sus contenidos elevados en benzo[a]pireno los productos sometidos a la técnica de conservación ahumado.

Tabla 3.4. Características principales de los 16 HAPs prioritarios.

Compuesto	Fórmula	Grupo	Punto de Fusión (°C)	Punto de Ebullición (°C)	Presión de vapor (kPa)	Log K _{ow}
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	3	90 - 96	278 - 279	2.10 x 10 ¹	3.98
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	-	92 - 93	265 - 280	3.90 x 10 ¹	4.07
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	3	216 - 219	340	3.60 x 10 ²	4.45
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	2B	157 - 167	435	1.50 x 10 ¹	5.61
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	1	177 - 179	493 - 496	7.30 x 10 ¹	6.06
Benzo[b]fluorantreno	C ₂₀ H ₁₂	2B	167 - 168	481	6.70 x 10 ¹	6.04
Benzo[k]fluorantreno	C ₂₀ H ₁₂	2B	198 - 217	471 - 480	2.10 x 10 ¹	6.06
Benzo[g,h,i]perileno	C ₂₂ H ₁₂	3	275 - 278	525	1.30 x 10 ¹	6.50
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	2B	252 - 256	441 - 448	5.70 x 10 ¹	5.56
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₄ H ₁₄	2A	266 - 270	524	1.30 x 10 ¹	6.84
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	3	107 - 111	375 - 393	6.50 x 10 ¹	4.90
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	3	116 - 118	293 - 295	8.70 x 10 ¹	4.18
Indeno[1,2,3-cd]pireno	C ₂₂ H ₁₂	2B	163.6	497,1	1.40 x 10 ¹	6.58
	C ₁₀ H ₈	2B	80.2	218	1.10 x 10 ¹	3.37
Naftaleno	C ₁₄ H ₁₀	3	96 - 101	339 - 340	2.30 x 10 ¹	4.45
Fenantreno	C ₁₆ H ₁₀	3	150 - 156	360 - 404	3.10 x 10 ¹	4.88
Pireno						

Adaptado de EPA 1999 e IARC. K_{ow}: Coeficiente de reparto octanol:agua

Tabla 3.5. Concentraciones de benzo[*a*]pireno en diferentes alimentos. Tomado de *Vives y col. (2001)*.

Alimento	Benzo[<i>a</i>]pireno $\mu\text{g kg}^{-1}$
Tocino	0.011
Chorizo	0.12-0.34
Jamón	0.009
Atún	0.023
Salmón	0.04
Trucha	0.57
Sardina	2.46
Pescado ahumado nigeriano	35.5-139
Carne ahumada	10.5-66.9
Aceite crudo de colza	2.46

Las normas mexicanas no establecen límites máximos permisibles de HAPs en productos marinos, solo existen normativas de control mediante las NMX, algunas de las cuales son: -NMX-F505-1993-SCF1 “Productos de la Pesca-Ostiones ahumados enlatados en aceite; NMX-F-481-SCF1-2001 “Mejillones enlatados” ; NMX-FF-080-1992 “Productos Avícolas- Carne de pollo de engorda en canal”.

En México, únicamente se cuenta con límites permisibles de HAPs en sedimentos y en agua potable, los cuales son establecidos en la norma NOM-EM-138-ECOL-2002. La Comisión General de las Comunidades Europeas REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN, establece una cantidad máxima de benzo[*a*]pireno en alimentos ahumados y organismos acuáticos entre 1 a 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ en base húmeda.

3.2.5 Métodos de extracción y cuantificación de HAPs en muestras biológicas

La determinación analítica de los HAPs en suelos, sedimentos o tejidos biológicos usualmente requiere métodos complejos y costosos que dificultan su cuantificación. La

extracción soxhlet es considerada como el método estándar (*Nam et al., 2003*), incluso se acopla a técnicas versátiles como la EFS en la determinación de 13 HAPs en placenta de mujeres con partos prematuros (*Singh, 2008*); sin embargo el uso de grandes cantidades de disolventes y tiempo de tratamiento, impulsa al desarrollo de nuevas técnicas de extracción, que incluyen la extracción líquida presurizada ELP, también conocida como extracción acelerada con disolvente EAD (por sus siglas en inglés PLE y ASE) (*Lundstedt et al., 2000; Belkessam et al., 2005*) y la extracción con fluidos supercríticos EFSc (por sus siglas en inglés SFE).

Estas metodologías requieren equipos costosos, aunque existen otras alternativas que incluyen la extracción asistida por microondas EAM (MAE por sus siglas en inglés), la cual es una técnica rápida y simple, pero está limitada por la eficiencia en la extracción (*Sanchez-Brunete y Ester, 2007*). Muchos protocolos de pre-tratamiento de muestras implican la saponificación, la extracción líquido - líquido de HAPs con hexano, ciclohexano o isooctano y posteriormente limpieza del extracto con una columna empacada con sílice, alúmina o florisil; el extracto final se evapora y redisuelve con acetonitrilo para su posterior aplicación al cromatógrafo de líquidos. En este proceso el hexano es considerado como el disolvente más apropiado para elevar los porcentajes de recuperación de los HAPs (*Barranco y Alonso, 2003*).

Por el contrario, la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) provee de una alternativa rápida, simple y económica que fácilmente genera extractos analizables por técnicas cromatográficas de líquidos y gases, con porcentajes de recuperación altos y minimiza las interferencias de matriz, además de bajos límites de detección en muestras biológicas con alto contenido de lípidos (*Barker, 2007*).

La extracción de HAPs por dispersión de matriz en fase sólida disminuye el tamaño de muestra y el volumen de disolventes, incluso se presentan diferentes alternativas para conservar la muestra (por ejemplo la liofilización) (*Pena y Casais, 2008*) y mejorar los

recobros de HAPs; sin embargo hasta el momento existen pocos reportes de la extracción y posterior cuantificación de HAPs en hígado y músculo de bovinos.

Pensado y col. (2005) mediante DMFS cuantificaron 11 HAPs en muestras de pescado y los cromatogramas de los extractos de pescado para benzo[*a*]pireno, benzo[*b*]fluoranteno, benzo[*a*]antraceno, benzo[*k*]fluoranteno, entre otros HAPs, se muestran en la **figura 3.5**.

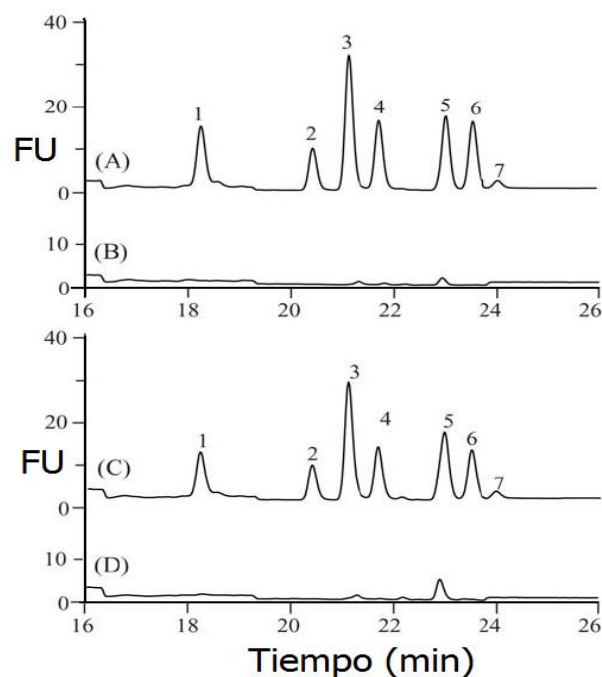


Figura 3.5. Cromatogramas de los extractos de dos diferentes especies de pescado por DMFS: 1. Benzo[*a*]antraceno, 2. Benzo[*b*]fluoranteno, 3. Benzo[*k*]fluoranteno, 4. Benzo[*a*]pireno. Tomado de *Pensado y col. (2005)*.

En la **tabla 3.6** se indican las metodologías de extracción y de análisis de HAPs más comúnmente empleadas en matrices complejas reportadas en la literatura especializada.

Tabla 3.6. Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Muestras de alimentos: Té : 40 μL	15 HAPs	S.P	MEFS: Se utilizó una columna capilar C-Sil 19 CB acoplada al CLAR y se desorbieron los analitos con la fase móvil del sistema cromatográfico, agua:ACN.	CLAR/DFL	LD: (0.3 - 4.6) $\times 10^{-3}$. LC: N.R	> 70	<i>Ishizaki et al., 2010</i>
Peces, algas, camarón, mariscos: 2.0	12 HAPs	Saponificación de grasas con KOH y Etanol a 60 °C	EAM: Con la muestra saponificada se calentó por 10 min a 100 °C en un sistema de micro-ondas a 230 kHz, el sobrenadante se evapora redissuelve con una mezcla metanol:agua. "Clean up". EFS con alúmina.	CLAR/DFL	LD: 0.0048 – 0.075 y LC: 0.016 – 0.250	85 - 105	<i>Zhang et al., 2010</i>
Carne y pollo al carbón: 5.0	BaP BbF Fluoranteno	Cocción al carbón, trituración y posterior almacenamiento a -18 °C	ESL: Con 15 mL de NaOH por 3-6 h. Posterior EFS, elución con 60 mL de DCM.	CLAR/DFL	L.D: 0.01-0.03 y LC: 0.09 - 0.1	68 - 118	<i>Farhadian et al., 2010</i>
Matrices marinas: 0.25 a 5.0 g	24 HAPs	Trituración, homogeneización y liofilización	EAD: Se utilizó una celda de extracción con sílice virgen y alúmina para limpieza del extracto, programa de extracción con isooctano a °T: 100 °C, el extracto se pre-concentró a 0.5 mL. "Clean up": CPG con DCM como disolvente.	CG/EM	L.D: 0.00044-0.0017 y LC: 0.0015 - 0.0058	75 - 119	<i>Liguori et al., 2006</i>

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **MEFS:** Microextracción en Fase Sólida. **EAD:** Extracción Asistida con Disolventes. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **EAM:** Extracción Asistida con Microondas. **CPG:** Cromatografía por Permeación en Gel. **DCM:** Diclorometano. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **CPG:** Cromatografía por Permeación en Gel. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **DFL:** Detector de Fluorescencia. **°T:** Temperatura. **N.R:** No Reportado. **S.P:** Sin pre-tratamiento.

Tabla 3.6. (Continuación) Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Bilis de pescado: 1.0 mL	HAPs y metabolitos	Almacenamiento a 80 °C	Hidrólisis enzimática: 10 μL de muestra, 10 μL de enzima y 480 μL de agua fueron mezclados. Incubación por 2 h a 37 °C. Centrifugación y eliminación de proteínas con metanol. El sobrenadante fue inyectado.	CLAR/DFL	LD: N.R. LC: 20.2-477	75 - 94	<i>Vuontisjarvi et al., 2004</i>
Carne ahumada: 1 a 3	HAPs	Trituración y liofilización, almacenamiento	EAM: 2.0 g de muestra en 20 mL de hexano a 115 °C por 15 min <i>Clean-up</i> EFS: con 5.0 g sílice en fase reversa elución con 8 mL de la mezcla hexano:DCM (70:30).	CLAR/EFL	LD: N.R. LC: 0.2 a 0.6	77 - 103	<i>Purcaro et al., 2009</i>
Mejillones: 2.0	11 HAPs	Almacenamiento a 20 °C. Homogeneización	ELL: Saponificación de la muestra con 10 mL de KOH (2N-metanol). Digestión por 2 h. ELL con 20 mL de ciclohexano, centrifugación y evaporación del sobrenadante a 0.2 mL.	CLAR/DFL	LD: < 0.3 y LC: < 0.9	N.R	<i>Serpe et al., 2010</i>
Agua de río	8 HAPs	Ajuste del pH: 2.5- 10 HCl o NaOH	EFS-CLAR-DAD: La pre-concentración se realizó a un flujo de 4.2 mL min ⁻¹ por 10 min. Se utilizó como adsorbentes filtros de cigarrillo y sílice C ₁₈ .	CLAR/DAD	LD: 0.9-58.6 ng L ⁻¹ y LC: N.R.	87 - 115	<i>Liang et al., 2006</i>
Agua de río: 10 mL	8 HAPs	Almacenamiento a 4 °C y filtración	EFS-NC: Se adiciona a la muestra 1 mL de NC. Centrifugación y filtración de la mezcla. El sólido se lava con 100 μL de hexano y se inyectan 2 μL al CG	CG-EM	LD: 0.030-0.060 y LC: 0.1- 0.2	21 - 96	<i>Jiménez-Soto et al., 2012</i>

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **EAM:** Extracción Asistida por Microondas. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **EFS-NC:** Extracción en Fases Sólida con nantotubos de carbono. **ELL:** Extracción Líquido Líquido. **DCM:** Diclorometano. **MeOH:** Metanol. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **UV:** Detector Ultravioleta. **DAD:** Detector con Arreglo de Diodos. **DFL:** Detector de Fluorescencia. **EFL:** Detector de Espectrofluorescencia. **T:** Temperatura. **N.R:** No Reportado.

Tabla 3.6. (Continuación) Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Hígado, riñón, pulmón, músculo y humor vítreo en porcinos y bovinos: Tamaño de muestra no indicada	16 HAPs	Se homogeneizaron los órganos y se liofilizaron	Soxhlet: Las muestras fueron sometidas a 2 h de reflujo con DCM, "clean-up": por CPG a un flujo de 1.0 mL min^{-1} . El extracto se hizo pasar por cartuchos de 10 g florisil. Se evaporó y redisolvió con ACN.	CLAR/DFL	LD: N.R. y LC: 0.005-0.01	67 - 80	<i>Ciganek y Neca, 2006</i>
Hojas de té de ginkgo (<i>Gingko biloba L.</i>): 10-15	18 HAPs	Lavado de hojas con Acetona:Etanol 1:1	EAD: Extracción con 200 mL de DCM:Acetona (1:1 v/v) por 45 min a $120 \text{ }^\circ\text{C}$ y P: 1500-2000 psi. Se centrifugó el extracto y el sobrenadante se evaporó con N_2 , posteriormente se redisolvió con 1.0 mL de hexano.	CG/EM	LD: 1.0-10 y LC: N.R.	53 - 117	<i>Yin et al., 2011</i>
Pescado y camarón: 10	18 BPCs 7 DFB 32 HAPs	Almacenamiento $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Homogeneización	ESL: 5 mL de agua y 10 mL de ACN o ActOEt se mezclaron con la muestra por espacio de 1 min Se centrifuga la mezcla por 5 min, el sobrenadante es evaporado con N_2 . Se redisuelve con 1.0 mL de n-hexano. "Clean up": EFS con sílice virgen y elución con n-hexano:DCM.	CG/EM	LD: N.R. y LC: 0.05-0.25	73 - 120	<i>Kalachova et al., 2011</i>
Productos ahumados	4 HAPs	Trituración de las muestras	ESL-US: La muestra se mezcla con ACN en relación 1:3 (p/v) y se somete a US. El sobrenadante se concentra a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ y redisuelve con 1 mL NaH_2PO_4 pH 4.5	CLAR/DLM	LD: 0.4-2.0 y LC: 1.4-6.7	87 - 102	<i>Lui et al., 2011</i>

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **BPCs:** Bifenilos Policlorados. **DFB:** Difenilos Éter Polibromados. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **EAD:** Extracción Asistida con Disolventes. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **US:** Ultrasonido. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **CPG:** Cromatografía de Permeación por Gel. **ELL:** Extracción Líquido Líquido. **DCM:** Diclorometano. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **DLM:** Detector de Longitud Múltiple. **DFL:** Detector de Fluorescencia. **T:** Temperatura. **N.R:** No Reportado.

Tabla 3.6. (Continuación) Métodos de extracción y cuantificación recientes en la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en matrices complejas.

Tipo y tamaño de muestra (g)	Contaminantes	Pre-tratamiento	Técnica de extracción y limpieza	Técnica de análisis	LD y LC ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Recobros (%)	Referencia
Muestras de sedimentos, suelo: 2.0	13 HAPs	Homogeneización y separación con filtro de 200 mesh	ESL: A la muestra se le adicionó 10 mL de metanol y centrifugó. Se aplicó ultrasonido por 20 min y se volvió centrifugar, separando el sobrenadante. ELL: El sobrenadante fue mezclado con 0.5 mL de hexano, se llevó a sequedad con N_2 y redisolvió con 25 μL de metanol.	CLAR/DFL	LD: 0.003-0.04 y LC: N.R.	81 - 92	<i>Shamsipur y Hassan, 2010</i>
Miel y propóleos: 1.0	15 HAPs	Almacenamiento a temperatura ambiente	ELL: La muestra se mezcló fuertemente con 100 mL de agua y hexano. "Clean up": EFS: 15 mL del sobrenadante se paso por un cartucho con la mezcla alúmina, sílice y sulfato de sodio y se eluyeron los analitos con 20 mL de la mezcla n-hexano:DCM 3:1. Se evaporó el extracto con N_2 a 1.0 mL.	CG/EM	LD: 0.03-0.15 miel y 0.02-0.07 propóleos LC: N.R.	N.R.	<i>Dobrinas et al., 2008</i>
Mejillón: 0.5	HAPs alquilados	Liofilización y homogeneización	DMFS: 0.5 g de muestra mezclados con 0.5 g de tierras diatomáceas. CPG: Con 4 g de Bio-SX-3. Elución con AcOEt:Hexano (1:1). Co-adsorbentes florisil.	CG/EM	L.D: 0.01-0.67 y LC: 0.02-1.93	93 - 115	<i>Fernández-González et al., 2010</i>

LD: Límite de Detección. **LC:** Límite de Cuantificación. **ELP:** Extracción con Líquidos Presurizados. **DMFS:** Dispersión de Matriz en Fase Sólida. **EAD:** Extracción Asistida con Disolventes. **ESL:** Extracción Sólido Líquido. **EFS:** Extracción en Fases Sólida. **CPG:** Cromatografía de Permeación por Gel. **ELL:** Extracción Líquido Líquido. **DCM:** Diclorometano. **AcOEt:** Acetato de Etilo. **ACN:** Acetonitrilo. **CG:** Cromatografía de Gases. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos. **EM:** Espectrometría de Masas. **DAD:** Detector con Arreglo de Diodos. **DFL:** Detector de Fluorescencia. **T:** Temperatura. **N.R:** No Reportado. **S.P:** Sin pre-tratamiento.

3.3 Métodos de extracción acoplados a la cromatografía

Uno de los grandes retos que presentan las metodologías analíticas actuales, para la extracción y posterior análisis de contaminantes en diversas matrices, es desarrollar procedimientos que permitan una menor manipulación de la muestra (disminución de las fuentes de error - disminución del número de etapas en el pre-tratamiento), menor consumo de disolventes (metodologías amigables con el medio ambiente), disminución en los tiempo de análisis y aumento de la sensibilidad (disminución de los límites de detección y cuantificación).

Las metodologías en línea (*on-line* en inglés: extracción y análisis secuencial) han ganado en los últimos años gran interés en la literatura especializada, pues su desarrollo en el análisis de trazas de contaminantes orgánicos en muestras biológicas presentan ventajas sobresalientes respecto a las metodologías fuera de línea (*off-line* en inglés) (Hyotylainen y Riekkola, 2004). En la **tabla 3.7** se comparan los procedimientos de tratamiento de muestra en línea y fuera de línea.

Tabla 3.7. Comparación de los procedimientos de tratamiento de muestra en línea, fuera de línea.

Procedimiento	Manejo del sistema	Tiempo de análisis	Precisión	Sensibilidad	Posibilidad de automatización	Simplicidad en el equipo
Fuera de línea	Paralelo	Alto	Baja	Moderada	Baja	Simple
En línea	Secuencial	Bajo	Alta	Alta	Alta	Relativamente complicado

Las metodologías fuera de línea son una buena opción cuando el número de muestras es pequeño, porque usualmente no se requiere de un método automatizado. Sin embargo, cuando este número aumenta se hace necesario utilizar sistemas acoplados que optimizan la calidad de los resultados. La sensibilidad de los procedimientos en línea es mayor y aún más cuando la cantidad de la muestra es limitada.

Entre las etapas generales a considerar para el desarrollo de sistemas acoplados en línea se destacan: la miniaturización de la metodología de extracción, transferencia de los

analitos de interés al sistema de análisis (mediante el uso de interfases) y análisis por el sistema de medida más indicado. Una vez optimizada cada una de las anteriores etapas, es posible acoplar y automatizar la metodología en estudio. Las metodologías de extracción que han sido acopladas a los sistemas cromatográficos son variadas; dentro de las técnicas más comúnmente empleadas para el manejo de muestras sólidas están: Extracción en Fase Sólida (EFS), Extracción con Líquidos Presurizados (ELP), Extracción Asistida por Microondas y Ultrasonido (EAM y EAU), entre otras.

A continuación se citan algunos ejemplos de sistemas acoplados en el análisis de contaminantes orgánicos en diversas matrices.

3.3.1 Extracción en Fase Sólida (EFS) acoplada a sistemas cromatográficos

Una de las técnicas más empleadas en la extracción de contaminantes en diferentes matrices es la extracción en fase sólida (EFS). En las metodologías basadas en esta técnica, la muestra líquida se aplica a un cartucho o pre-columna empacada con un adsorbente capaz de fijar los compuestos de interés. La recuperación de los analitos se lleva a cabo por la adición de un volumen pequeño de disolvente de elución fuerte ya sea un disolvente orgánico o una mezcla hidrorgánica. La fracción se colecta y puede inyectarse directamente o puede evaporarse a sequedad para reconstituirse en un disolvente adecuado para el análisis por la cromatografía de gases o líquidos (*Hennion, 1999*).

El principio básico de la EFS es la transferencia de analitos a partir de la fase móvil a los sitios activos de la fase sólida adyacente. Esta transferencia se estimula por la selección de condiciones apropiadas de operación de los 3 principales componentes: adsorbente-analito-eluyente (*Hennion y Pichon, 1994*). Las etapas generales de la EFS son: **1.** Humedecimiento y acondicionamiento del adsorbente. **2.** Aplicación de la muestra. **3.** Lavado-elución de los compuestos interferentes. **4.** Elución de los analitos de interés en un pequeño volumen de disolvente.

Las fases sólidas que se emplean en la EFS son similares a las utilizadas en cromatografía de líquidos (*sílice derivatizada: C₈, C₁₈, C₃₀, etc.; polímeros: divinilbencenos estireno, etc.*), donde las sílicas modificadas químicamente con diferentes grupos químicos son las más empleadas. Las diferentes fases se clasifican según el tipo de interacción que tengan con el analito; las interacciones son consecuencias de las propiedades químicas y básicamente son de tres tipos: interacciones polares, interacciones no polares e interacciones de intercambio iónico.

La EFS puede utilizarse como un paso de limpieza del extracto “*clean up*” o como sistema de pre-concentración de los analitos (más utilizado en el modo *on-line*). Dependiendo de la aplicación deseada, la naturaleza de la fase (o adsorbente) y el tipo de disolvente empleado garantizará los resultados de limpieza o pre-concentración deseados.

En la EFS los parámetros más relevantes en el proceso de pre-concentración son:

- **El volumen muerto:** volumen requerido para llenar todos los poros de la fase o adsorbente.
- **Retención:** es el fenómeno que causa la inmovilización de las moléculas del analito debido a la atracción entre estas y el adsorbente.
- **Elución:** es el proceso por el cual el analito se desadsorbe de la fase, la elución ocurre cuando el analito presenta mayor afinidad por el eluyente. Una elución es apropiada cuando no requiere más de 5 veces el volumen muerto de la columna.
- **Capacidad:** es la masa total del analito que puede quedar fuertemente retenida en condiciones ideales por una cantidad de adsorbente.

Los parámetros anteriormente descritos deben optimizarse en todo proceso que implique la retención y recuperación selectiva de los analitos de interés.

La EFS se ha trabajado en línea con la cromatografía de gases y de líquidos, empleando válvulas convencionales neumáticas de inyección de cromatografía líquida dotadas con pre-columnas para concentrar los contaminantes en muestras acuosas (*Hankemeier y Rozenbrand, 1998*). El problema típico de los acoples a la cromatografía

líquida radica en los pasos de limpieza a los cuales deben someterse a la muestra antes de ser inyectada; pensando en lo anterior se han diseñado dispositivos que constan de pre-columnas que retienen los analitos de interés y permiten la elución de las interferencias más abundantes de la matriz.

En la **figura 3.6** se presenta un acople típico de la EFS a la cromatografía de líquidos con detector de masas para el análisis en línea de fármacos y sus metabolitos en muestras de plasma; el sistema está constituido por una válvula de conmutación de 6 vías la cual está provista de un cartucho de EFS. Esta válvula se encuentra conectada a la bomba cromatográfica que se encarga de pre-concentrar la muestra en el cartucho de EFS, posición A; posteriormente se gira la válvula de conmutación para transferir los analitos (retenidos en el cartucho de EFS) al sistema cromatográfico, posición B (*Zang et al., 2005*). De esta forma fue posible analizar 8 analitos en 2.8 min y 300 muestras sin cambios detectables en la robustez del método.

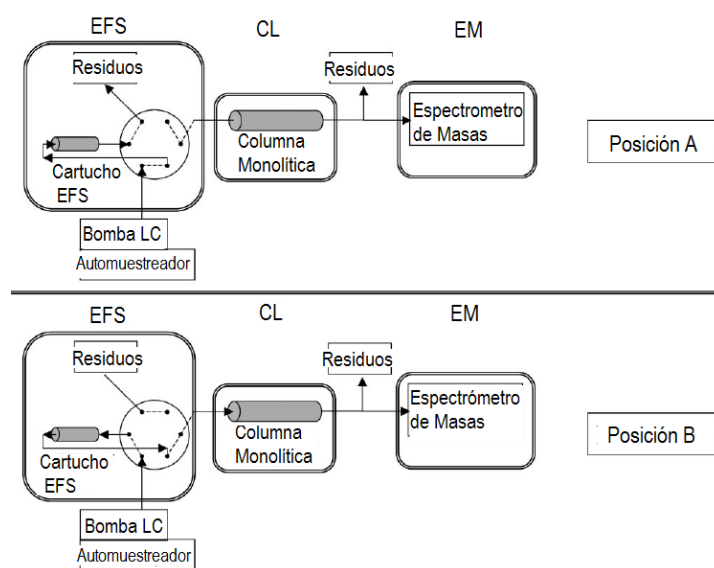


Figura 3.6. Esquema de la configuración en línea de la EFS al sistema CLAR/EM/EM para el análisis de verapamil y metabolitos. Posición A: Se carga la muestra en el cartucho de EFS. Posición B: Elución y análisis de los compuestos retenidos en el cartucho de EFS hacia el sistema cromatográfico. Tomado de *Zang y col. (2005)*.

La EFS presenta algunas limitaciones y en particular en el análisis de sustancias polares donde los volúmenes de fuga y la capacidad del cartucho pueden ser demasiado bajos, razón por la cual cada uno de los anteriores parámetros debe ser optimizado en los sistemas en línea.

3.3.2 Microextracción en Fase Sólida (MEFS) acoplada a sistemas cromatográficos

La microextracción en fase sólida (MEFS) (SPME por sus siglas en inglés) emplea una fibra de sílice fundida recubierta con un material adsorbente que sirve para la extracción, la cual puede estar constituida por un polímero líquido o un adsorbente sólido. Esta capa puede extraer diferentes tipos de moléculas, volátiles o no volátiles. La cantidad de moléculas extraídas por la fibra es proporcional a su concentración en la muestra, siempre y cuando se alcance el equilibrio termodinámico.

Luego de la extracción, la fibra de MEFS es transferida al puerto de inyección del instrumento de separación (generalmente un cromatógrafo de gases o líquidos) donde la desorción de los analitos toma lugar. El método de MEFS resulta muy atractivo pues la extracción se realiza de manera rápida y puede ser llevada a cabo sin necesidad de utilizar solventes.

Scott y Abdul (2008) trabajaron en la optimización del acoplamiento entre un sistema de MEFS y la cromatografía líquida para la determinación de HAPs en matrices acuosas; la activación de la columna analítica se realizó con la mezcla de disolventes apropiados mediante dos bombas controladas por un computador (**figura 3.7**). La muestra se depositó en el capilar (el cual ocupa la posición del bucle) por medio de un dispensador cuando la válvula de inyección se encontraba en posición de carga.

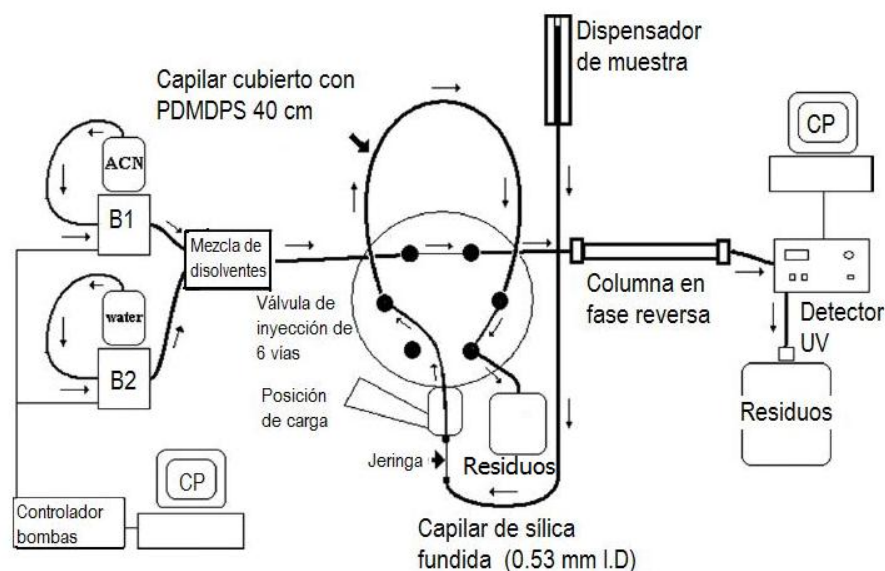


Figura 3.7. Acople entre microextracción en fase sólida a la cromatografía de líquidos. PDMDPS: Polidimetildifenilsiloxano. Tomado de *Scott y Abdul (2008)*.

Una vez alcanzado el tiempo de equilibrio entre la muestra y la fibra se inyectan los HAPs concentrados a la columna analítica mediante el lavado de la fibra por la fase móvil (acetonitrilo:agua).

3.3.3 Extracción Asistida con Microondas (EAM) acoplada a sistemas cromatográficos

La extracción asistida por microondas EAM (MAE por sus siglas en inglés) es una técnica ampliamente reconocida por su versatilidad en el manejo de muestras sólidas. Varios estudios comparativos han indicado que esta técnica presenta características analíticas iguales o superiores a las técnicas soxhlet, extracción con líquidos presurizados (ELP) y extracción con fluidos supercríticos (EFSc) (*Hyotylainen y Riekkola, 2004*).

En la EAM el disolvente orgánico y la muestra están sometidos a la radiación proveniente de un magnetrón; el disolvente o la muestra pueden tener carácter dieléctrico. Las principales ventajas de la EAM son la alta velocidad de extracción (debido al rápido aumento de la temperatura) y la facilidad de operación instrumental. La temperatura elevada asociada a la alta transferencia de masa permite extracciones cuantitativas y reproducibles.

En la actualidad existen pocos documentos publicados acerca del acople entre la EAM a los sistemas cromatográficos. *Chen y col. (2007)* realizaron el acople de la EAM a la cromatografía de líquidos para el análisis de pesticidas organoclorados en muestras de granos (arroz, trigo, maíz y frijol). En la **figura 3.8** se presenta el acople: EAM-EFS-CLAR/ DUV.

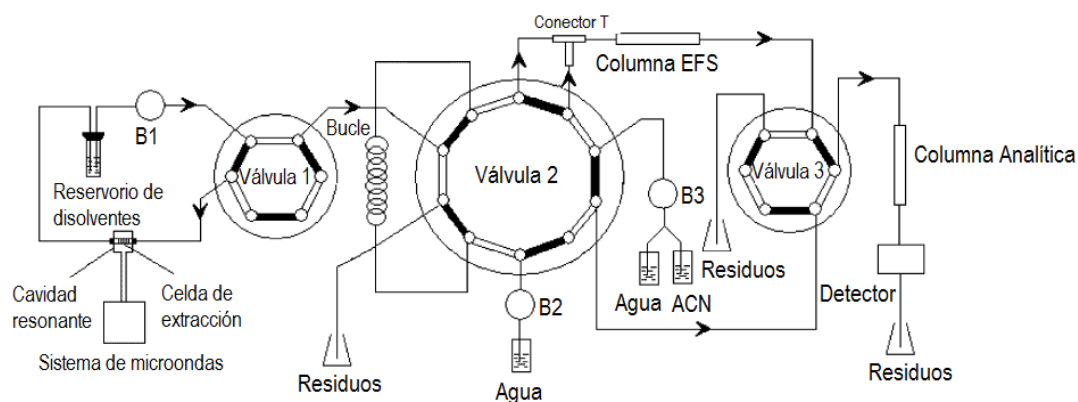


Figura 3.8. Acople de la EAM a la cromatografía de líquidos, mediante la EFS para el análisis de pesticidas organoclorados presentes en granos. Tomado de *Chen y col. (2007)*.

Éste es un claro ejemplo en donde se acoplan dos metodologías de extracción (EAM y EFS) al sistema cromatográfico. La muestra irradiada en la zona de microondas (*celda de extracción*) fue extraída con una disolución de ACN:Agua al 95 v/v a un caudal de 1.0 mL min^{-1} (por la bomba peristáltica, B1-**figura 3.8**). La extracción se optimizó por recirculación del disolvente a través de la muestra por espacio de 10 min. Posteriormente sólo 1.0 mL del extracto fue diluido en línea con agua. El extracto fue pre-concentrado en una columna de EFS para retener cuantitativamente a los pesticidas organoclorados (mediante una segunda bomba, B2-**figura 3.8**), los interferentes de la matriz fueron eliminados. Después se dió la transferencia de los analitos a la columna analítica con la fase móvil ACN:Agua 75:25 v/v para su posterior separación y análisis a 238 nm.

La EAM también ha sido acoplada a la cromatografía de gases (*Ericsson, 2003*) empleando el mismo principio de acople del ejemplo anterior; análisis de muestras de aire

con ésteres organofosforados fueron determinados con el sistema EAM-EFS-CG/DNF en un tiempo total de 1.5 h con recobros superiores al 97 %.

3.3.4 Extracción Asistida con Ultrasonido (EAU) acoplada a sistemas cromatográficos

En la extracción asistida con ultrasonido EAU (UAE por sus siglas en inglés), vibraciones acústicas con frecuencias mayores a 20 kHz son aplicadas a las muestras. Estas vibraciones causan burbujas con presión negativa, las cuales al colapsar remueven los analitos desde la superficie de la matriz. Tradicionalmente la EAU se lleva a cabo en el modo estático, sin embargo en los sistemas en línea el proceso debe ser dinámico; tal como sucede con otras técnicas de extracción.

Las extracciones dinámicas presentan varias ventajas: los analitos son removidos y transferidos desde la matriz sólida al disolvente y la exposición continua de la muestra a disolvente fresco aumenta el número transferencias de los analitos desde la matriz al disolvente.

La EAU puede ser acoplada a la cromatografía de líquidos y de gases; *Caballo-López y Luque de Castro (2003)* realizaron el acople de la EAU al sistema cromatográfico de líquidos para el análisis de N-metilcarbamatos en muestras de suelo y alimentos (manzanas). En la **figura 3.9** se indica el diagrama de acoplamiento entre los dos sistemas.

La celda de extracción (EC) fue colocada en un baño de agua a 40 °C, a través de la cual se re-circuló agua a pH= 10 a un caudal de 1.25 mL min⁻¹ mediante una bomba peristáltica (PP). Durante este proceso se aplicó, por 2.0 min, radiación ultrasonido. Posteriormente el extracto fue filtrado previo a la etapa de pre-concentración, la cual se llevó a cabo en una columna de EFS con sílica C₁₈ (IV₁), los analitos retenidos en la columna fueron eluidos con un volumen optimizado de metanol. El extracto metanólico fue conducido hacia el puerto de inyección con aire (IV); posteriormente se transfirieron los analitos presentes en el extracto a la columna analítica mediante la fase móvil metanol:agua 40:60 v/v.

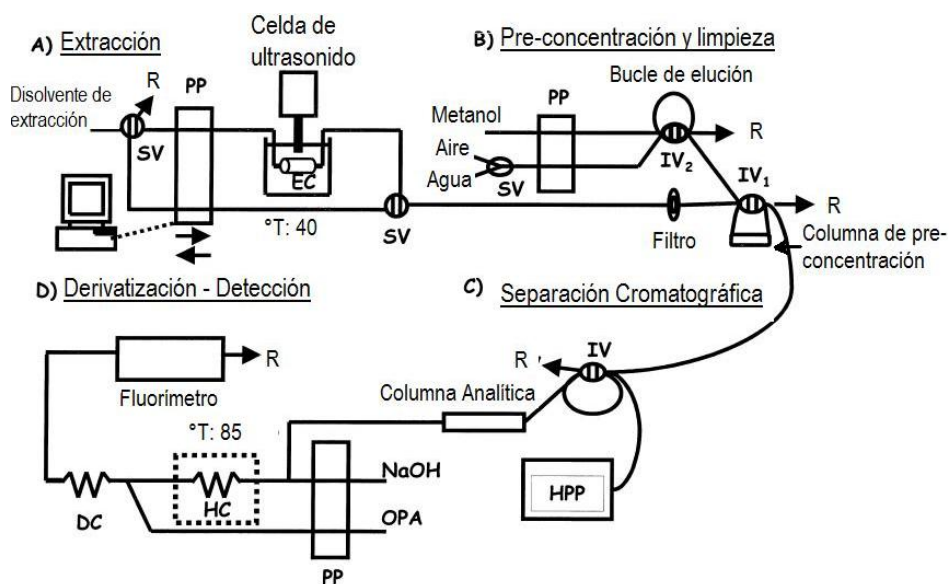


Figura 3.9. Acople de la EAU a la cromatografía de líquidos para el análisis de N-metilcarbamatos en suelos y alimentos. PP: Bomba peristáltica. R: Residuos. EC: Celda de extracción. SV: Válvula selectora. IV₁ y IV₂: Válvulas de conmutación. IV: Puerto de inyección. HPP: Bomba de alta presión. HC: Cámara de hidrólisis. DC: Cámara de derivatización. OPA: Ftaldialdehído. Tomado de *Caballo-López y Luque de Castro (2003)*.

Los resultados indicaron un tiempo de análisis reducido (4 min) respecto al método oficial de la EPA 8318 para el análisis de N-metilcarbamatos en muestras de suelo (4 h). Los recobros obtenidos estuvieron entre 77 y 95 % para muestras de suelos y 85 y 101 % para alimentos; la degradación de los analitos al utilizar esta metodología acoplada no fue registrada.

Es importante resaltar que una vez optimizado el acople entre la metodología de extracción y el sistema de análisis el siguiente paso es la automatización del mismo. Para ello el uso de electroválvulas de conmutación, automuestreadores, cartuchos en acero inoxidable, controladores automáticos de bombas de alta y baja presión e interfases permitirán la futura automatización.

Otra de las metodologías empleadas en la preparación de muestra sólidas o semisólidas es la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), la cual ha sido aplicada a diferentes tipos de matrices con excelentes resultados de exactitud, precisión y robustez

analítica en la extracción de una amplia gama de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Karageorgou y Samanidou, 2011; Capriotti et al., 2010; Moreda et al., 2009; Bogialli y Di Corcia, 2007; Barker, 2007). El acople de la DMFS a los sistemas cromatográficos mediante la EFS para el análisis de OFFs y HAPs en muestras biológicas complejas no ha sido reportado. A continuación se describe con mayor detalle esta técnica analítica dado que la DMFS fue utilizada para la extracción de los OFFs y los HAPs.

3.4 Generalidades sobre la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)

Desde que se introdujo la DMFS en 1989 por *Barker*, esta técnica ha sido mencionada en más de 250 publicaciones donde se aplica a diferentes matrices (*Barker, 2007*). La DMFS se basa en diversos principios fisicoquímicos que involucran la dispersión completa de la matriz en el soporte sólido.

La DMFS ha tenido diversas aplicaciones debido a la facilidad de eliminar muchas de las complicaciones típicas de la extracción líquido-líquido (ELL) o de la extracción sólido-líquido (ESL), además del manejo de muestras biológicas complejas semisólidas, sólidas o altamente viscosas. En el proceso de dispersión, la muestra (hígado, fruta, etc.), fortificada con una disolución estándar de los analitos o con un estándar interno, es colocada en un mortero de ágata o de vidrio, el cual contiene una cantidad apropiada de adsorbente o dispersante (sílice C₁₈, C₈, sílice cianopropilamino, florisil, arena, grafeno (*Lui et al., 2011*), etc.).

La elección adecuada del dispersante o adsorbente favorece el análisis cuantitativo de los analitos en una determinada matriz. Un ejemplo de este comportamiento es el reportado por *Kristenson y Haverkate (2001)*, en el cual el uso de sílicas derivatizadas (C₈, C₁₈, etc.) favoreció la retención de 11 pesticidas (recobros mayores) frente a la sílica sin derivatizar, cuando se aplicó la DMFS a muestras de frutas. En la **figura 3.10** se presentan los recobros porcentuales de los 11 pesticidas analizados con diferentes adsorbentes. El bajo poder de retención de la sílice frente a la sílice derivatizada quedó claramente

demostrado, pues los recobros obtenidos para los pesticidas de alta y mediana polaridad oscilaron entre 0 y 20 %.

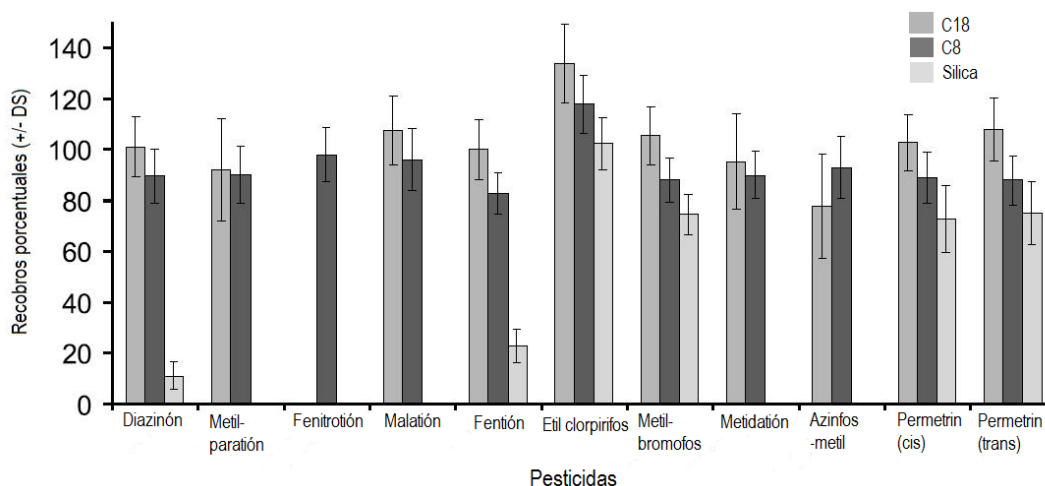


Figura 3.10. Recobros porcentuales \pm DS (n= 4) para 11 pesticidas a partir de naranjas usando diferentes adsorbentes, nivel de fortificación: 0.5 ng mg^{-1} . Tomado de *Kristenson y Haverkate (2001)*.

La sílice-C₁₈ es el material que ofrece los mejores resultados para trabajar con muestras biológicas, ya que al actuar como abrasivo produce fuerzas de dispersión en la arquitectura de la matriz, la cual forma una bicapa sobre las partículas del soporte gracias a las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de varios de los componentes, favoreciéndose el aislamiento posterior del analito; la homogeneidad y la delgada capa de muestra que cubre a las partículas dispersantes permite alcanzar una alta eficiencia en el proceso de transferencia de masa, lo cual explica los altos porcentajes de recuperación con baja cantidad de disolvente.

En la **figura 3.11.a**, se presenta una microscopía electrónica de barrido (MEB) de partículas de sílice derivatizada, antes del proceso de dispersión de la muestra. En **figura 3.11.b**, se indica la MEB de las partículas de sílice después de la dispersión de hígado de bovino. Recientes aplicaciones de DMFS en diferentes tipos de matrices, emplean otros adsorbentes en el proceso de dispersión, tales materiales van desde silicatos no

derivatizados (sílica gel, arena, etc.) (Teixeira y Teixeira, 2005), hasta sólidos orgánicos (fibras gráficas, nanotubos de carbono, materiales poliméricos, etc.) (Ravelo et al., 2008).

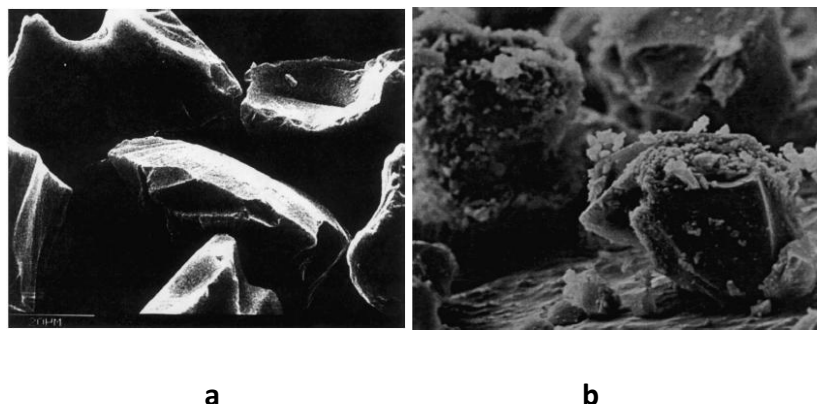


Figura 3.11. **a.** Microscopia electrónica de barrido (MEB: resolución de 20 μm), partículas de sílice derivatizadas C_{18} antes de la dispersión. **b.** MEB (resolución de 20 μm) partículas de sílice después de la dispersión de hígado de bovino. Tomado de *Barker, 2000*.

La relación entre la cantidad de muestra y el adsorbente puede variar acorde con las necesidades del análisis, sin embargo muchas aplicaciones utilizan una relación 1:4 por optimización de la metodología (Barker, 2000). El adsorbente y la muestra son macerados hasta conseguir una pasta homogénea que posteriormente es transferida y empacada en una columna de polipropileno donde se lleva a cabo la secuencia de limpieza y elución selectiva de los analitos de interés. En la **figura 3.12** pueden detallarse los pasos típicos de la metodología de extracción.

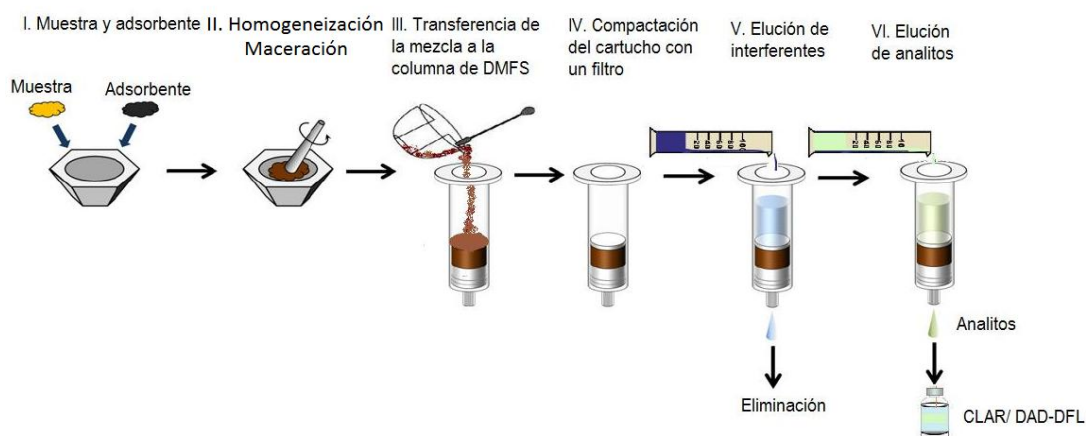


Figura 3.12. Pasos típicos de la DMFS.

En ocasiones se utilizan co-columnas que consisten en otra fase sólida o soporte cromatográfico (alúmina, sílica virgen, carbón grafitizado, sílice ácida, etc.) (Laganá y Faberi, 2004), que puede incorporarse dentro de la columna de dispersión o en columna aparte y suelen emplearse como etapas adicionales de limpieza o asisten en el aislamiento del analito. En las muestras de origen animal regularmente se emplean materiales con capacidad de retener lípidos (sílica virgen, florisil, alúmina o sílice-C₁₈, entre otros). Es posible realizar eluciones múltiples o secuenciales que permitan aislar una o varias clases de compuestos con la dispersión de una sola muestra.

Zhao y Wielen (1999), optimizaron la secuencia de limpieza con adsorbentes y el perfil de elución de alquilfenoles etoxilados a partir de músculo de pescado; en la **figura 3.13** se presenta el esquema del cartucho de DMFS con co-columna de óxido de aluminio desactivado con un 5 % de agua. Esta metodología generó recobros por encima del 90 % de los analitos en cuestión.

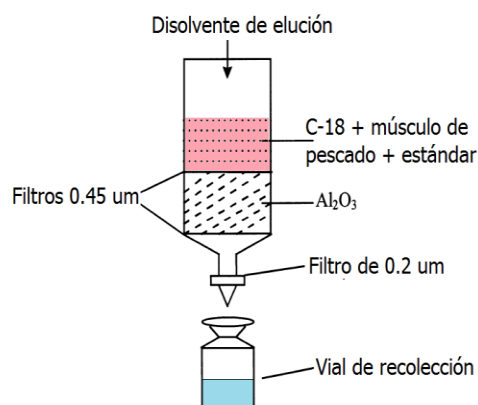


Figura 3.13. Esquema de una columna de DMFS modificada con co-columna de óxido de aluminio. Tomado de Zhao y Wielen (1999).

Muchas de las ventajas de esta metodología de extracción radican en la facilidad de eliminar las interferencias típicas que se presentan al manejar la extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida de muestras sólidas, semisólidas o con alta viscosidad, las cuales no se pueden someter directamente a una separación cromatográfica como es el caso de los tejidos grasos de animales.

3.5 Factores que influyen en la eficiencia de la DMFS

La DMFS junto con la EFS se pueden considerar como procedimientos de cromatografía de líquidos simple y en general se aplican los mismos principios. Sin embargo la DMFS posee características que la diferencian de la EFS y la hacen más compleja, en comparación con los procesos cromatográficos estándar. La DMFS se diseñó principalmente para romper y dispersar los componentes de una muestra sólida con un soporte sólido unido a una fase orgánica que pueda ser utilizado posteriormente como material de empaque en una columna de la que puedan eluirse los componentes de interés.

De esta forma, la muestra dispersa forma parte de la columna misma y en sentido estricto es parte del sistema cromatográfico (*Barker, 2000*). En DMFS las interacciones dinámicas involucradas no se comprenden del todo, sin embargo se conocen varios factores que han mostrado afectar la eficiencia en el proceso. En la **figura 3.14** se resumen los parámetros analíticos más relevantes en la eficiencia de la metodología de extracción DMFS.

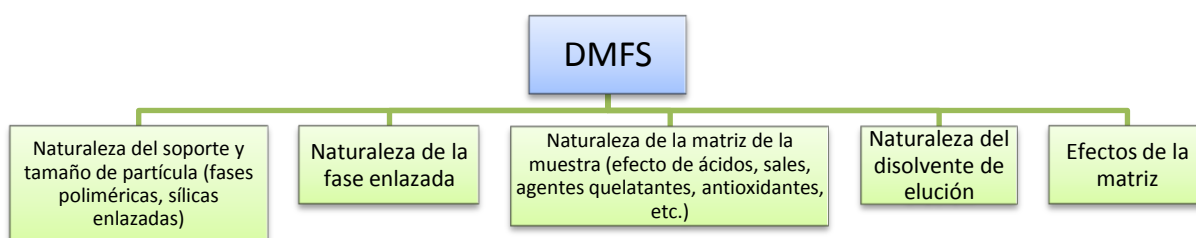


Figura 3.14. Factores que influyen en la eficiencia de la DMFS.

Naturaleza del soporte sólido: hasta el momento la mayoría de los artículos publicados que involucran a la DMFS utilizan soportes a base de sílice. Un aspecto positivo de usar este tipo de adsorbentes es la presencia de grupos silanoles sin derivatizar, los cuales tienen un papel importante, ya que son capaces de formar enlaces de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que permite obtener una mezcla homogénea seca (*Barker, 2000*).

Tamaño de partícula: se ha reportado el uso de partículas de adsorbente de 40 μm de diámetro; en otras investigaciones se han empleado mezclas de partículas entre 40 y 100 μm que producen buenos resultados, además de ser más económicas.

Naturaleza de la fase unida: la mayoría de las aplicaciones de la DMFS utilizan materiales para la generación de cromatografías en fase inversa como la C_8 y C_{18} . Existen algunas dudas respecto al rol que desempeña la presencia y la naturaleza de la fase unida; se cree que la fase unida lipofílica es esencial para romper, dispersar la muestra y también permitir la formación de una nueva fase o bicapa que se asemeja a una membrana celular.

Naturaleza de la muestra: debido a que la matriz forma parte de la columna cromatográfica, es de esperarse variaciones en los resultados y recobros de los analitos al cambiar de una matriz a otra. Mientras que la fase unida está inmóvil sobre el soporte sólido, los componentes de la matriz no lo están. Por esta razón ciertos componentes de la muestra se eluyen por clases de compuestos o fracciones dependiendo del disolvente que se emplea para eluir y las interacciones dinámicas entre los componentes en la matriz dispersa y la fase sólida. Las interacciones de la matriz con la fase sólida y la fase móvil afectan de forma importante el orden de elución de los compuestos de la columna de DMFS (Barker, 2000).

Modificaciones a la matriz: así como en ocasiones es necesario en EFS alterar las muestras para modificar el estado de ionización de los componentes y asegurar que ciertas interacciones de las fases estacionarias y/o del disolvente de elución ocurran, en la DMFS pueden adicionarse ácidos, bases, sales, agentes quelatantes o antioxidantes antes de dispersar la muestra y/o aditivos en el disolvente de elución para aumentar la eficiencia del proceso.

Naturaleza del disolvente de elución: en la DMFS se debe considerar la polaridad relativa del disolvente de elución y la naturaleza de la fase estacionaria para determinar lo que permanece en la columna de dispersión y lo que se eluye. Si se da el caso que muchos de los analitos eluyen con los componentes de la matriz, la secuencia y diseño del perfil de

elución puede ayudar a retener los componentes de la muestra en la columna y recuperar los analitos de interés con alto grado de especificidad. Esto no siempre se logra y es entonces cuando el uso de co-columnas y otras técnicas de limpieza deben ser empleadas (*Barker, 2000*).

Cada uno de estos parámetros debe optimizarse adecuadamente para la extracción de un determinado compuesto. Las ventajas que presenta la DMFS es el uso de pequeñas cantidades de muestra, disolventes, soporte, posibilidad de automatización y versatilidad en el manejo de varios tipos de muestras.

La miniaturización de la metodología podría ser en el futuro un método potente para trabajar en línea con cromatografía líquida mediante el uso de válvulas para el acoplamiento de pre-columnas de extracción conectadas a la columna de análisis y así disminuir errores y el empleo mínimo de muestra y disolventes (*Berrueta et al., 2001; Kristenson y Haverkate, 2001; Kristenson y Shahmiri, 2004; Barker, 2000*).

3.6 Aplicación de la DMFS en el análisis de contaminantes orgánicos en matrices complejas

En la **tabla 3.8** se describen algunas de las más recientes aplicaciones de la DMFS en el análisis de contaminantes en diversas matrices.

Tabla 3.8. Aplicación de la DMFS para la extracción de diversos contaminantes en matrices complejas.

Tipo de muestra	Contaminante	Cantidad de muestra (g)	Adsorbente (g)	Disolvente de elución	Recobros (%) y LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Técnica de análisis	Referencia
Tejido de pescado	13 Esteres organofosforados	0.5	2.0 florisil, co-columna de alúmina	10 mL n-hexano-acetona (6:4)	70-110 LD: 0.2-9	CG-DNF	<i>Campane et al., 2010</i>
Frutas y vegetales	36 pesticidas	0.5	0.5 C ₁₈ , 1.0 Na ₂ SO ₄ , "clean-up": 0.5 sílice virgen	10 mL DCM:AcOEt (4:1)	60-120 LD: N.R.	CG-EM	<i>Covaci et al., 2010</i>
Alimento para ganado	Piretroides, pesticidas OCs y OFFs	0.5-1.0	2.0 C ₁₈ , florisil o alúmina y 0.2 de Na ₂ SO ₄ .	5-10 mL AcOEt o hexano;	> 75 LD: 0.03-1.5	CG- μ DCE	<i>Fernández et al., 2008</i>
Hígado y músculo de bovino	5 OFFs	0.5	2.0 C ₁₈ "Clean-up" con 0.5 sílice virgen	5.0 mL de ACN puro.	55-101 LD: 25-100	CLAR/DAD	<i>García de Llasera y Reyes-Reyes, 2009</i>
Biota	OCs y Éstes difenil polibrominatos (PBDEs)	0.1	0.4 C ₁₈ , "Clean-up" 0.1 florisil	1.3 mL de ACN puro	55-130 LD: 0.3-7.0.	CG/DCE-DIF	<i>Moliner et al., 2009</i>
Tejidos de porcino	Fluoroquinolonas, OFFs y N-metil carbamatos	0.5	2.0 C ₁₈ .	8 mL ACN puro	60.1-108 LD: 9000-22000	CLAR/DAD	<i>Wang et al., 2009</i>
Tejidos de pollo	Enrofloxacin y Ciprofloxacina	0.2	0.2 PMI "Clean-up": 0.045 co-columna de PMI	3.0 mL de ACN:ATFA (99:1 v/v)	83-102 LD: 8-9	CLAR/DAD	<i>Qiao y Suna, 2010</i>

LD: Límites de detección. **OFFs:** Plaguicidas organofosforados. **OCs:** Pesticidas organoclorados. **PMI:** Polímeros molecularmente impresos. **ATFA:** Ácido tetrafluoroacético. **DCM:** Diclorometano. **AcOEt:** Acetato de etilo. **CG:** Cromatografía de gases. **CLAR:** Cromatografía de líquidos. **DNF:** Detector de nitrógeno-fósforo. **EM:** Espectrómetro de masas. **μ DCE:** Micro-detector de conductividad eléctrica. **DCE:** Detector de conductividad eléctrica. **DIF:** Detector de ionización por flama. **DAD:** Detector ultravioleta visible con arreglo de diodos.

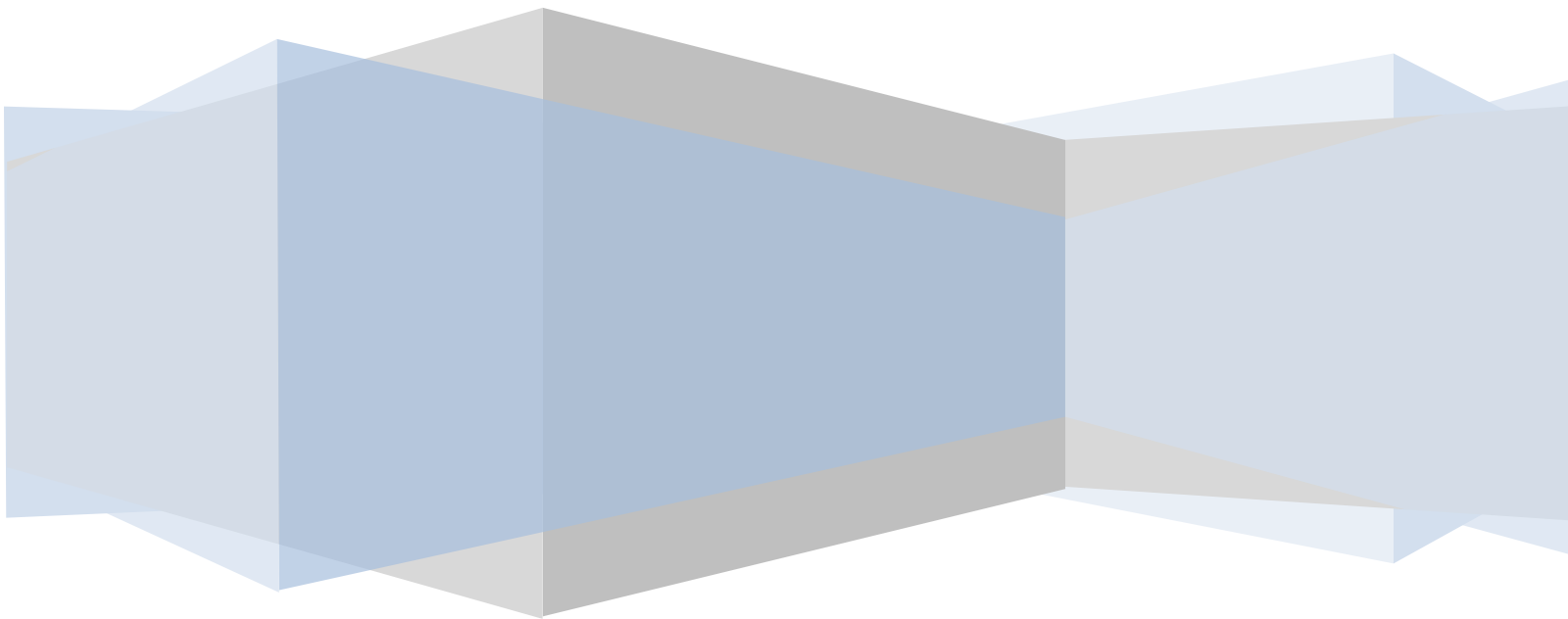
Tabla 3.8 (Continuación) Aplicación de la DMFS para la extracción de diversos contaminantes en matrices complejas.

Tipo de muestra	Contaminante	Cantidad de muestra (g)	Adsorbente (g)	Disolvente de elución	Recobros (%) y LD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Técnica de análisis	Referencia
Café y sustitutos de café	Acrilamida	0.5	2.0 C ₁₈ , "clean-up": 1.0 C ₁₈	4.0 mL de agua	84-97 LD: 5	CG/EM	<i>Dias et al., 2010</i>
Placenta de humanos	43 PB-DES	4.0	8.0 C ₁₈ y Florisil	100 mL hexano:DCM (8:2)	91-114 LD: 0.34-10.7	CG/EM	<i>Priyanthi et al., 2009</i>
Lomo de atún	Aminas biogénicas	0.5	2.0 Sílice-CN	4.0 mL de disolución reguladora de amonio	83-112 LD: 19.7-1640	CLAR/EM-Orbitrap	<i>Self et al., 2011</i>
Hígado de bovino	Residuos de fenotiazinas	0.25	1.0 C ₁₈ +1.0 arena de mar	6.0 mL de ACN	59-84 LD: 100	CLAR/DFL	<i>Quintana et al., 2010</i>
Fríjol-Soya	6 Pesticidas	1.0	2.0 sílice, "clean-up": 0.5 C ₈	25 mL AcOEt:Metanol (8:2)	60-120 LD: 40-80	CLAR/DAD	<i>Maldaner et al., 2008</i>
Músculo de pescado	16 OCs	2.0	2.0 alúmina ácida + 10 Na ₂ SO ₄	45 mL DCM:hexano (3:7) y EAD	91-104 LD: 0.008-0.05	CG/EM	<i>Shen et al., 2011</i>
Mantequilla	Hormonas	0.5	0.4 nanotubos de carbono multicapa	10 mL AcOEt	84-111 LD: 0.2-1.3	CG/EM	<i>Su et al., 2011</i>
Vegetales	3 Fenilurea herbicidas	0.5	1.0 alúmina neutra	8.0 mL DCM	87-103 LD: 0.1-0.2	EC/DEQL	<i>Wang et al., 2011</i>
Lodos de aguas residuales	17 HAPs	0.2	1.0 florisil y 0.5 Na ₂ SO ₄	6.0 mL DCM	76-104 LD:	CLAR/DFL	<i>Pena y Casais, 2008</i>

LD: Límites de detección. **HAPs:** Hidrocarburos aromáticos policíclicos. **DCM:** Diclorometano. **OCs:** Pesticidas organoclorados. **PB-DES:** Difenileteres polibrominados. **ACN:** Acetonitrilo. **AcOEt:** Acetato de etilo. **CG:** Cromatografía de gases. **EAD:** Extracción asistida con disolventes. **CLAR:** Cromatografía de líquidos. **DFL:** Detector de fluorescencia. **EM:** Espectrómetro de masas. **EC:** Electroforesis capilar. **DEQL:** Detector electro-quimioluminiscente. **DAD:** Detector ultravioleta visible con arreglo de diodos.

En general, la DMFS emplea bajos volúmenes de extracción (del orden de 1.3 a 100 mL), mínimas etapas de tratamiento de la muestra y una amplia versatilidad para la extracción de un amplio grupo de contaminantes en diversas matrices. El acople de la DMFS a los sistemas cromatográficos (los más empleados en la actualidad) brindaría grandes ventajas en el análisis de OFFs y HAPs en matrices biológicas, siendo las sustancias más monitoreadas a nivel ambiental.

4. Sección Experimental



4.1 Reactivos y Disolventes

- Metanol grado cromatográfico, *JT Baker 99.97 %*, (*Phillipsburg, NJ, EUA*).
- Acetonitrilo grado cromatográfico, *JT Baker 99.9 %*, (*Phillipsburg, NJ, EUA*).
- Agua Desionizada con $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ de resistividad.
- Sílice LC-18 diámetro de partícula de $40 \mu\text{m}$, *SUPELCO (Bellefonte, PA, EUA)*.
- Sílice C₁₈ Nucleosil diámetro de partícula $10 \mu\text{m}$, *Phenomenex (San Francisco, CA, EUA)*.
- Sílice C-18-PAH CHROMABOND diámetro de partícula de $45 \mu\text{m}$, *Macherey-Nagel (Bethlehem, PA, EUA)*.
- Sílice virgen LC-Si diámetro de partícula de $40 \mu\text{m}$ *SUPELCO (Bellefonte, PA, EUA)*.
- Polímero PLRP Bondesil-env *Varian, (Palo Alto, CA, EUA)*.
- Estándares de plaguicidas organofosforados, *Chem. Service (West Chester, PA, EUA)* con pureza certificada > 98 %: Metil paratión, Paratión, Fenitrotión, Clorfenvinfos, Diazinón, Etión, Fenclorfos, Clorpirifos y Carbofenotión.
- Estándares de hidrocarburos aromáticos policíclicos, *Chem. Service (West Chester, PA, EUA)* con pureza certificada > 99 %: Benzo[*a*]antraceno, Benzo[*b*]fluoranteno, Benzo[*k*]fluoranteno y Benzo[*a*]pireno.

4.2 Material y Equipos

4.2.1 Sistema cromatográfico

Análisis de plaguicidas organofosforados (OFFs)

- Cromatógrafo de Líquidos, *Varian (Palo Alto, CA, EUA)*, equipado con una bomba ternaria modelo 9012.
- Detector ultravioleta visible con arreglo de diodos, *Varian (Palo Alto, CA, EUA)*, modelo 9065.
- Inyector Manual, *Rheodyne 7725 (i), IDEX Health & Science Group (Cotati, California, EUA)*, con bucle de $20 \mu\text{L}$.
- Columna analítica en acero inoxidable, RES-ELUT C₁₈ ($5 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$), *Varian (Palo Alto, CA, EUA)*, para el análisis de plaguicidas.

- Columna de guarda en acero inoxidable (20 x 2 mm I.D.), *Upchurch Scientific (Washington, EUA)*, empacada con sílice C₁₈ Nucleosil.
- Reservorio para disolventes de 250 mL, *Wheaton (Milville, NJ, EUA)*.
- Ultrasonido para desgasificación de disoluciones y fase móvil, *Bransonic modelo 1510 (EUA)*.

Análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

- Cromatógrafo de Líquidos, *Varian (Palo Alto, CA, EUA)*, equipado con una bomba ternaria modelo 9012.
- Detector de Fluorescencia, *Varian (Walnut Creek, CA, EUA)*, modelo Prostar 363.
- Interface, *Varian (Walnut Creek, CA, EUA)*, modelo Star 800.
- Columna analítica en acero inoxidable, Spheri-5 ODS (5 µm x 250 mm x 4.6 mm I.D.), *Perkin Elmer's Brownlee (San José, CA, EUA)*.
- Columna de guarda en acero inoxidable (20 x 2 mm I.D.), *Upchurch Scientific (Washington, EUA)*, empacada con sílice C₁₈ Nucleosil.
- Inyector manual, *Rheodyne 7725 (i), IDEX Health & Science Group (Cotati, California, EUA)*, con bucle de 20 µL.
- Jeringa de 50 µL, *Hamilton (Reno, NV, EUA)*.
- Codificación y tratamiento de datos con el "software LC Workstation multi instrument" Versión 6.20.
- "Poly View 2000- Diode Array Spectral- Processing software"

4.2.2 Material para la preparación de muestra

- Cartuchos de polipropileno de 6 y 1 mL con frits de politetrafluoroetileno PTFE, *Varian (EUA)*.
- Mortero de ágata de 50 mL.
- Manifold de 10 puestos, *Ashcroft (CT, EUA)*.
- Viales con tapa de 1, 5 y 10 mL.

- Espátula de acero inoxidable.
- Jeringa de polipropileno de 20 mL HSW.
- Balanza analítica Adventurer-Pro 110 ± 0.0001 g, modelo AV114C, *Ohaus (Pine Brook, NJ, EUA)*.
- Micropipeta de volumen variable 100 – 1.000 µL, *Eppendorf (Alemania)*.
- Micropipeta de volumen variable 2 - 20 µL, *Pipetman, Gilson (Francia)*.
- Deionizador y purificador de agua Millipore, *Simplicity UV (Bedford, MA, EUA)*.
- Homogeneizador de muestras Ultraturrax, *Labortechnik IKL (Staufen, Alemania)*.

4.2.3 Equipos y aditamentos para el acople de la DMFS y la EFS al sistema cromatográfico

DMFS

- Bomba recíproca con caudales de 0.2 a 8.0 mL min⁻¹, modelo 100-S *Eldex (Napa, CA, EUA)*.
- Cartucho en acero inoxidable (30 x 8.0 mm I.D.) *Optilab (Berlin, Germany)*.
- Válvula de disolventes selectora de 6 vías, *Upchurch Scientific (Washington, EUA)*.
- Válvula de conmutación de 6 vías, *Rheodyne 7000 IDEX Health & Science Group (Cotati, California, EUA)*.
- Un puerto de llenado manual, *Rheodyne 7012 Health & Science Group (Cotati, California, EUA)*.
- Dos cámaras dinámicas de mezclado de 6.0 x 2.3 cm en teflón y en acero inoxidable.
- Plancha de agitación magnética modelo 500, *Troemner (NJ. EUA)*.
- Reservorio de disoluciones frascos ámbar de 30 mL.
- Bucle de 5.0 mL, 1.0 mm (0.040") I.D. x 1/16" OD., *Rheodyne (Cotati, California, EUA)*.

EFS

- Pre-columna con filtros en acero inoxidable (20 x 2.0 mm I.D.), *Upchurch Scientific (Washington, EUA)*.

- Bomba recíproca con caudal de 0.1 a 7.5 mL min⁻¹, modelo CC-S-100-S, *Eldex (Napa, CA, EUA)*.
- Válvula de conmutación de 6 vías, Rheodyne 7000 IDEX Health & Science Group (*Cotati, California, EUA*).
- Capilares en acero inoxidable entre 0.1-0.5 mm I.D. para las diferentes conexiones.
- Tubo de teflón de 0.062" I.D. x 1/8" O.D. x 10', *Upchurch Scientific (Washington, EUA)*.
- Férulas y conectores.

4.3 Preparación de disoluciones estándar de OFFs y HAPs

Disoluciones de plaguicidas organofosforados (OFFs)

Se prepararon disoluciones estándar de (100 ± 1) mg L⁻¹ de cada uno de los plaguicidas, utilizando metanol como disolvente. A partir de estas disoluciones se realizaron las correspondientes diluciones para la optimización de la separación cromatográfica y la detección por espectroscopía UV. Posteriormente, se preparó una disolución estándar de (500 ± 3) mg L⁻¹ en metanol, con los 9 plaguicidas. Con esta disolución se llevaron a cabo las diferentes fortificaciones a muestras de tejido de bovino, así como la preparación, por dilución, de disoluciones de trabajo. Las disoluciones anteriormente preparadas, fueron almacenadas en recipientes ámbar a 4 °C.

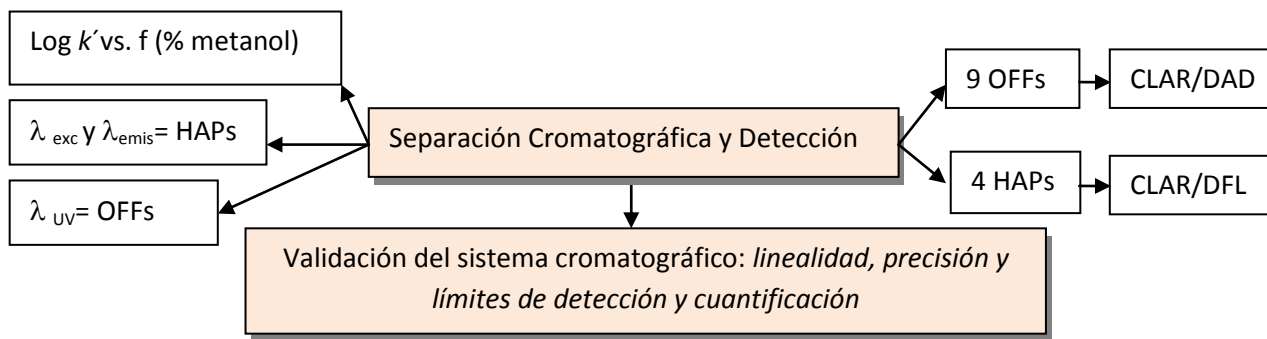
Disoluciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Se prepararon disoluciones estándar de (100 ± 3) mg L⁻¹ de cada uno de los hidrocarburos aromáticos, utilizando metanol como disolvente. A partir de estas disoluciones se realizaron las correspondientes diluciones para la optimización de la separación cromatográfica y la detección por fluorescencia. Posteriormente, se preparó una disolución estándar de (25 ± 2) mg L⁻¹ en metanol, con los 4 hidrocarburos. Con esta disolución se llevaron a cabo las diferentes fortificaciones a muestras de tejido de bovino así como la preparación, por dilución, de disoluciones de trabajo. Las disoluciones anteriormente preparadas, fueron almacenadas en recipientes ámbar a 4 °C.

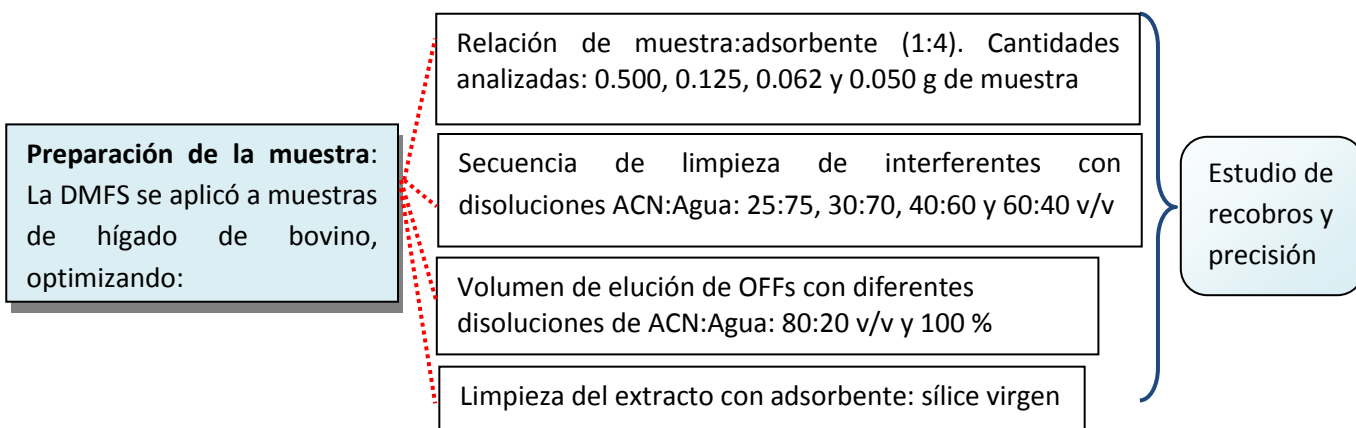
4.4 Metodología

Para el cumplimiento de los objetivos se planteó un conjunto de etapas experimentales que se resumen en la **figura 4.1**.

OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA Y DETECCIÓN DE LOS 9 OFFs Y 4 HAPs



MINIATURIZACIÓN DE LA METODOLOGÍA DE EXTRACCIÓN POR DMFS CON OFFs FUERA DE LÍNEA



OPTIMIZACIÓN DE LA PRE-CONCENTRACIÓN DE OFFs POR EFS EN LÍNEA

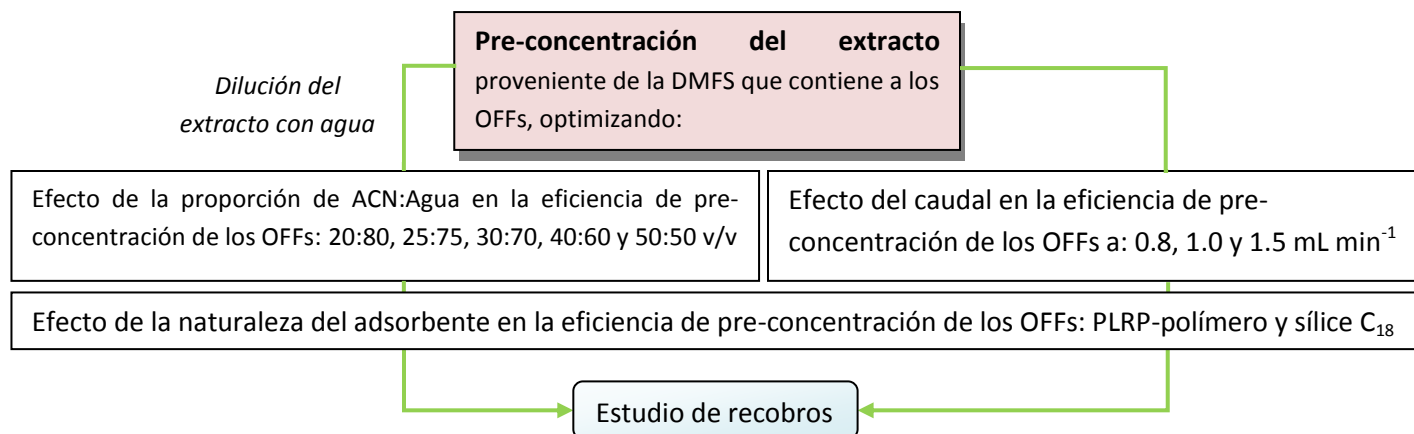
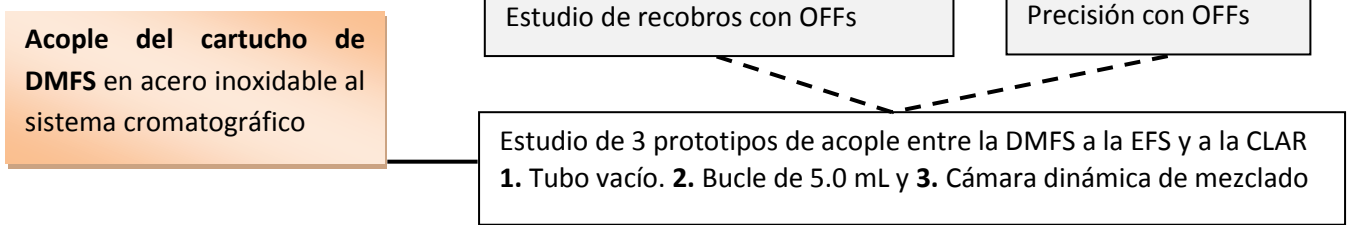
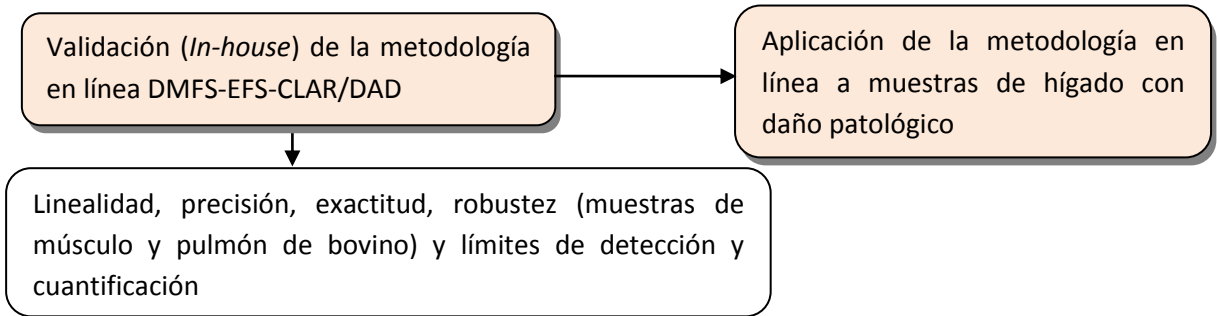


Figura 4.1. Diagrama general de la metodología aplicada

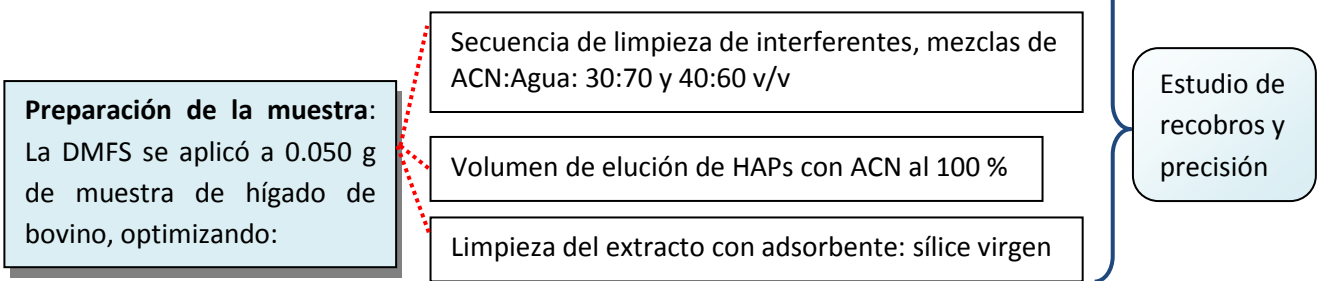
ESTUDIO DE TRES PROTOTIPOS PARA EL ACOPLÉ ENTRE LA DMFS A LA EFS Y AL SISTEMA CROMATOGRÁFICO



VALIDACIÓN DEL MÉTODO EN LÍNEA DMFS-EFS-CLAR/DAD PARA OFFs Y APLICACIÓN A MUESTRAS DE HÍGADO CON DAÑOS PATOLÓGICOS



ADECUACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO ACOPLADO PARA LA DETERMINACIÓN DE HAPs EN MUESTRAS DE HÍGADO



OPTIMIZACIÓN DE LA PRE-CONCENTRACIÓN DE HAPs POR EFS EN LÍNEA

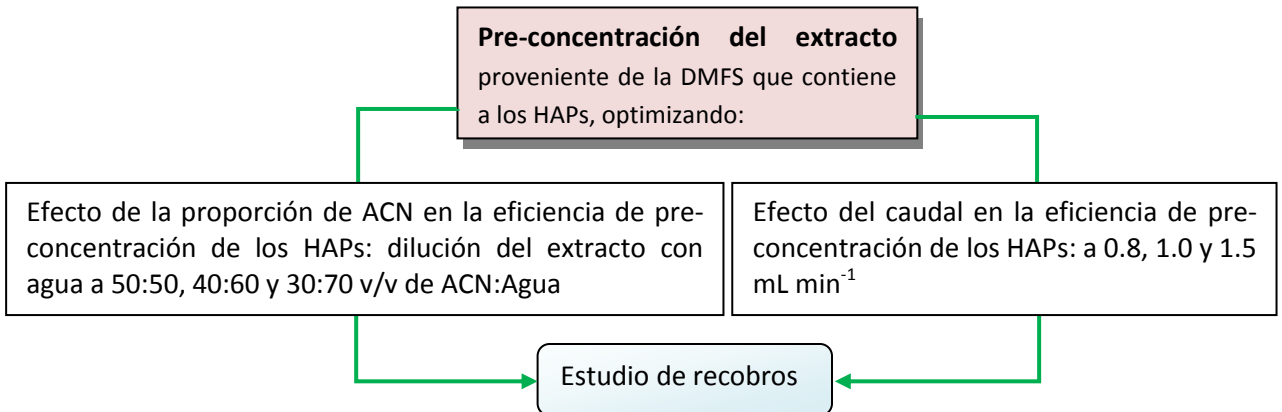


Figura 4.1. (Continuación) Diagrama general de la metodología aplicada

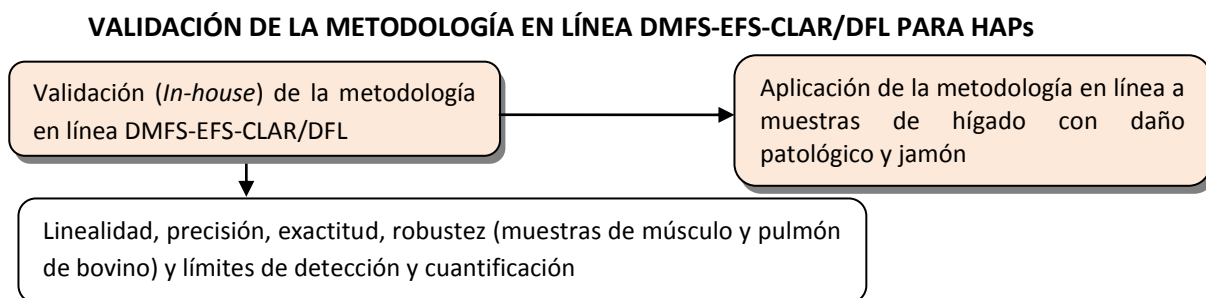


Figura 4.1. (Continuación) Diagrama general de la metodología aplicada

4.4.1 Optimización del acople entre la DMFS al sistema cromatográfico (CLAR/DAD) para la determinación de OFFs en muestras de hígado

4.4.1.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 9 OFFs por CLAR/DAD

Mediante un barrido espectroscópico entre 190 - 367 nm fueron obtenidos los espectros UV de cada uno de los OFFs a partir de disoluciones estándar de 10 mg L^{-1} en metanol a un flujo de 1.0 mL min^{-1} y en condiciones isocráticas de elución con una mezcla metanol:agua 90:10 v/v como fase móvil. Se seleccionaron las longitudes de onda de mayor absorbancia por encima de los 220 nm; por debajo de esta longitud de onda las interferencias espectrales debidas a los componentes de la matriz son mayores, razón por la cual no se establecieron en esta zona las longitudes de onda específicas para cada plaguicida.

Para la optimización de la separación cromatográfica de los 9 OFFs se utilizó una columna analítica con sílice C_{18} como fase estacionaria y se calculó, con una disolución de 5.0 mg L^{-1} de la mezcla de OFFs en metanol, el logaritmo del factor de retención ($\text{Log } k'$) para cada plaguicida en función de la composición de la fase móvil (mezclas de metanol:agua de 90:10, 80:20, 70:30, 65:35 y 60:40 v/v a un flujo de 1.0 mL min^{-1}), de acuerdo con la **ecuación 4.1**.

$$\text{Log } k' = \frac{tr - t_0}{t_0}, \quad (4.1)$$

tr: Tiempo de retención, en minutos.

t₀: Tiempo muerto, en minutos (el tiempo muerto de la columna fue estimado mediante la inyección de una disolución de NaNO₃ 0.6 mg L⁻¹ preparada en una mezcla metanol:agua 50:50).

Se verificó gráficamente la dependencia del *Log k'* en función del porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil. Además se estimaron los valores de resolución (*R_s*) para cada pico cromatográfico (**ecuación 4.2**) con el fin de observar si la separación entre los compuestos presentó valores de *R_s* ≥ 1. De esta forma se obtuvo la relación de fase móvil adecuada para iniciar un gradiente lineal a 100 % de metanol y de esta forma conseguir la separación cromatográfica de los 9 OFFs.

$$R_s = \frac{2(tr_2 - tr_1)}{Wb_1 + Wb_2}, \quad (4.2)$$

tr₁: Tiempo de retención, en minutos, del primer pico cromatográfico en eluir.

tr₂: Tiempo de retención, en minutos, del segundo pico cromatográfico en eluir.

Wb₁: Ancho del primer pico cromatográfico, en minutos.

Wb₂: Ancho del segundo pico cromatográfico, en minutos.

4.4.1.2 Validación del sistema cromatográfico para OFFs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación

Disoluciones estándar de 1.0, 10, 15, 20 y 25 mg L⁻¹ de la mezcla de los 9 OFFs fueron inyectadas (20 μL) por triplicado al sistema cromatográfico para establecer la linealidad a las longitudes de onda específicas para cada plaguicida. Se elaboraron las correspondientes curvas de calibración relacionando *área del pico cromatográfico (en UA)* vs. *concentración (en mg L⁻¹)*. La precisión del sistema fue evaluada en términos de la repetibilidad y de la precisión inter-día; la repetibilidad o precisión intra-día se determinó mediante inyecciones sucesivas (n= 3) para cada una de las disoluciones estándar de la mezcla de los 9 OFFs (1.0 a 25 mg L⁻¹). La precisión inter-día se evaluó en días diferentes mediante cinco réplicas con dos disoluciones estándar de 1.0 y 25 mg L⁻¹; en cada caso fueron evaluados los correspondientes coeficientes de variación porcentual (C.V. %).

La sensibilidad del sistema cromatográfico fue estimada en función de los límites de detección y de cuantificación, para ello se establecieron los límites de detección experimentales (LDE) por medio de inyecciones sucesivas de disoluciones cada vez más diluidas (0.5, 0.4, 0.3 0.2 y 0.1 mg L⁻¹) hasta obtener una relación señal:ruido (S/N) igual a 3 y para los límites de cuantificación experimentales (LCE) se realizaron inyecciones sucesivas de disoluciones por encima de los LDE hasta obtener una relación S/N igual a 10 (Currie, 1995).

4.4.2 Miniaturización de la metodología de extracción DMFS para OFFs fuera de línea

Para llevar a cabo el acople de la DMFS al sistema cromatográfico fue necesario realizar la miniaturización de las cantidades de muestra y adsorbente establecidas en un método de extracción fuera de línea previo (García de Llasera et al., 2009) el cual utiliza 0.50 g de muestra mezclada con 2.00 g de adsorbente (sílice C₁₈), siguiendo la típica relación 1:4 propuesta por Barker (Barker, 2007). A continuación se describen los pasos generales de la metodología de extracción y el proceso de miniaturización.

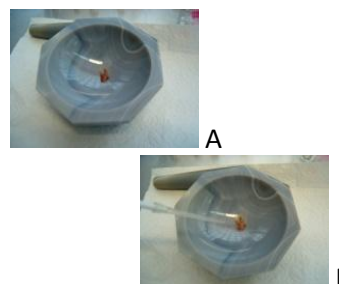
4.4.2.1 Preparación del adsorbente para la DMFS

Se utilizó sílice C₁₈ como adsorbente para la DMFS que fue acondicionada mediante lavados con metanol y acetonitrilo con relación de 2.5 mL por cada gramo de adsorbente, posteriormente se secó al vacío con el sistema de extracción como se presenta en la figura. La fase así acondicionada fue empacada en recipientes para su posterior uso.



4.4.2.2 Preparación de la muestra para la DMFS fuera de línea

Se realizaron ensayos preliminares con muestras de hígado de bovino, consistentes en pesar (0.5000 ± 0.0001) g de muestra (A) completamente homogénea, se fortificó con una disolución estándar de la mezcla de los 9 OFFs (B). El tiempo de equilibrio y evaporación del disolvente fue de 15 min,



tiempo optimizado en previos trabajos (Reyes-Reyes, 2006). Se pesó (2.0000 ± 0.0001) g de sílice C₁₈ que se adicionó a la muestra (C), posteriormente se maceró hasta obtener una mezcla homogénea en el mortero de ágata (D).



C



D

4.4.2.3 Preparación del cartucho de DMFS

Una vez obtenida la mezcla homogénea muestra:adsorbente, se rellenó un cartucho de polipropileno (6 ó 1.0 mL), el cual contenía un filtro (frit) de PTFE en el fondo (A); una vez que toda la mezcla fue transferida al cartucho se colocó un segundo filtro en la parte superior para compactar levemente la mezcla. El cartucho se colocó en el sistema de vacío para llevar a cabo la optimización de las secuencias de limpieza y extracción cuantitativa de los analitos (B) para su posterior inyección al sistema cromatográfico.



A



B

4.4.2.4 Relación muestra:adsorbente analizadas por DMFS

Los ensayos preliminares consistieron en simular la DMFS sin muestra de hígado. Para esto se pesaron (2.0000 ± 0.0001) g de sílice C₁₈ y se fortificó con 20 μ L de una disolución estándar de 500 mg L⁻¹ de la mezcla de los 9 OFFs (10 μ g), se dejó en reposo 15 min y posteriormente se efectuó la DMFS como se describió anteriormente. Posteriormente se aplicó la DMFS a diferentes cantidades de sílice C₁₈ para llegar a la optimización de la miniaturización del método, en la **tabla 4.1** se presentan las diferentes cantidades de sílice C₁₈ analizadas.

Para cada cantidad de adsorbente se optimizaron las secuencias de limpieza y elución de los OFFs, realizando los triplicados correspondientes. El recobro porcentual de cada plaguicida en cada ensayo se calculó con la **ecuación 4.3**.

$$\text{Recobro (\%)} = \frac{\text{Área del pico en el extracto}}{\text{Área del pico en disolución control}} \times 100 \quad (4.3)$$

En la **tabla 4.1** se indican las concentraciones de las disoluciones control utilizadas en los estudios de recobros, las cuales están de acuerdo con el nivel de fortificación empleado y con el volumen optimizado para la elución cuantitativa de los OFFs del cartucho de DMFS.

Tabla 4.1. Ensayos preliminares con DMFS. Cantidades analizadas en la miniaturización de la DMFS, (réplicas n=3).

Muestra (g)	Adsorbente sílice C ₁₈ (g)	Fortificación (µg)*	Concentración disolución control (mg L ⁻¹)
0.5000	2.0000	10 y 30	10.0 y 5.0
0.1250	0.5000	10	2.5
0.0625	0.2500	10	3.3
0.0500	0.2000	10	10.0

*Fortificación a partir de una disolución de 500 mg L⁻¹

Una vez optimizada la secuencia de limpieza y de elución de los OFFs del cartucho de DMFS sin muestra, se aplicó la DMFS a muestras de hígado manteniendo siempre constante la relación muestra:adsorbente (1:4). En la **tabla 4.1** se indican las cantidades de muestra analizadas. Se realizaron los correspondientes triplicados de cada ensayo para evaluar la precisión y la exactitud del método por medio de los valores de los C.V. %.

4.4.2.5 Optimización de la secuencia de limpieza y elución de OFFs por DMFS fuera de línea

Considerando la elevada complejidad de las muestras analizadas fue necesario evaluar diferentes eluentes de limpieza para la eliminación de interferentes de alta y mediana polaridad (lípidos de bajo peso molecular, vitaminas hidrosolubles, minerales, aminoácidos, etc.) previa a la elución de los OFFs del cartucho de dispersión.

En la DMFS la sílice C₁₈ retiene compuestos cuya afinidad con este adsorbente es alta en presencia de disolventes con bajas fuerzas de elución, por lo tanto se analizaron diferentes mezclas con alto contenido de agua y baja concentración de disolvente orgánico en las etapas de limpieza que favorecen la retención de los OFFs; las fracciones

correspondientes fueron inyectadas al cromatógrafo para evaluar posibles fugas de los compuestos de interés y de esta forma elaborar los frentes de elución, los cuales indican la distribución de cada uno de los analitos en el adsorbente. El analito que presente mayor coeficiente de reparto se desplazará más lentamente respecto a aquellos cuyos coeficientes sean más bajos (*Valcárcel, 1994*). De esta forma se estimaron los volúmenes de fuga y de elución para cada uno de los compuestos estudiados.

Se emplearon como disolventes de limpieza diferentes mezclas de acetonitrilo:agua; las cuales han demostrado mayor eficiencia en la eliminación de interferencias en comparación con el metanol cuando se trabaja con muestras de hígado (*Garrido-Frenich et al., 2007; García de Llasera et al., 2009*). Para la elución selectiva de los OFFs se utilizaron mezclas de disolventes más concentradas en ACN (80:20 v/v y 100 %) que garantizarán recobros cuantitativos. En **tabla 4.2** se indican todas las secuencias ensayadas para la limpieza y posterior elución de los OFFs aplicando la DMFS con y sin muestras de hígado.

Tabla 4.2. Secuencias de limpieza y de elución de los 9 OFFs con DMFS. Ensayos realizados con y sin muestra.

Ensayo	Muestra:Adsorbente (g)	Etapas de limpieza			Elución
		1	2	3	
1	0.5000:2.0000	20 mL H ₂ O	3.0 mL ACN 25 %	1.0 mL ACN 60 %	6.0 mL ACN 100 %
2	0.1250:0.5000	5.0 mL H ₂ O	2.0 mL ACN 25 %	2.0 mL ACN 50 %	4.0 mL ACN 80 %
		5.0 mL H ₂ O	2.0 mL ACN 25 %	2.0 mL ACN 40 %	4.0 mL ACN 80 %
		5.0 mL H ₂ O	3.0 mL ACN 30 %	1.0 mL ACN 40 %	4.0 mL ACN 80 %
		2.5 mL H ₂ O	1.5 mL ACN 30 %	0.5 mL ACN 40 %	3.0 mL ACN 80 %
3	0.0625:0.2500	2.5 mL H ₂ O	1.0 mL ACN 30 %	0.4 mL ACN 40 %	1.0 mL ACN 80 %
		2.5 mL H ₂ O	0.6 mL ACN 30 %	0.4 mL ACN 40 %	1.0 mL ACN 80 %

En cada una de las secuencias estudiadas, el objetivo principal fue realizar la limpieza de interferentes con volúmenes altos de las disoluciones menos concentradas en acetonitrilo y en el caso de la elución de los OFFs desorber selectivamente a los compuestos de interés sin eluir lípidos de alto peso molecular que interfirieran con la señal espectroscópica de cada analito en el cromatograma correspondiente.

Los extractos fueron inyectados al sistema cromatográfico (CLAR/DAD) para determinar el contenido de OFFs mediante la comparación del área obtenida en el extracto frente al área de una disolución estándar de la mezcla de los 9 OFFs (los niveles de fortificación y concentración de las disoluciones control se indican en la **tabla 4.1**); de esta forma se obtuvieron los valores de los recobros (área del pico en el extracto entre área del pico en la disolución control - **ecuación 4.3**) para cada uno de los 9 OFFs.

La secuencia del ensayo 1 (**tabla 4.2**) fue previamente optimizada por el grupo de investigación (Reyes-Reyes, 2006) y además fue la base para los posteriores ensayos realizados con diferentes tamaños de muestra. En el ensayo 2 se aumentó la concentración del ACN:Agua del 25:75 al 30:70 v/v en la etapa de limpieza 2 (**tabla 4.2**), con el fin de mejorar la eliminación de interferentes (eliminación del color en las fracciones) sin desadsorber aún a los compuestos de interés. Se realizó para este ensayo el frente de elución sin muestra y fortificando la sílice-C₁₈ con 4 µg de la mezcla de OFFs.

Para la etapa de limpieza 3 se optó por disminuir la concentración del ACN:Agua del 60:40 al 40:60 v/v y de esta forma evitar fugas de los OFFs más polares (metil paratión y fenitrotión) a medida que la cantidad de muestra disminuía. En general la elución de los 9 OFFs (ensayos del 2 al 4) se llevó a cabo con la disolución de ACN:Agua al 80:20 v/v para minimizar la co-elución en el extracto de interferentes y mantener los recobros cuantitativos. Cada ensayo se evaluó por triplicado para verificar la repetibilidad y exactitud del método aplicado.

4.4.2.6 Limpieza del extracto con sílice virgen “clean up” fuera de línea

Algunos investigadores indican que la incorporación de una segunda columna, en el fondo del cartucho de DMFS, con un material adsorbente como sílice virgen, sílice C₁₈ o florisil son comúnmente usados para la retención de lípidos en muestras complejas, (Barker, 2000; Kristenson et al., 2001; Barker, 2007). Por lo anterior una vez optimizadas las secuencias de limpieza y elución de los OFFs con muestras de hígado (**tabla 4.2**), se evaluó el efecto de incluir en el fondo del cartucho de DMFS una co-columna de sílice virgen “clean-up” para aumentar la limpieza del extracto de interferentes polares.

En la **tabla 4.3** se describen las cantidades de sílice virgen empleadas para cada relación de muestra:adsorbente, además de las concentraciones de las disoluciones control utilizadas para determinar los recobros correspondientes. Para cada caso se evaluaron las pérdidas por adsorción de los OFFs en la sílice virgen mediante la comparación entre los recobros obtenidos cuando se utilizó una co-columna de sílice virgen en el fondo del cartucho de dispersión con los obtenidos en ausencia de ésta. Se realizó un triplicado de cada ensayo para evaluar repetibilidad y exactitud del método.

Tabla 4.3. Limpieza del extracto obtenido por DMFS con diferentes cantidades de sílice virgen para diferentes cantidades de muestra y adsorbente (réplicas n= 3).

Muestra (g)	Adsorbente sílice C ₁₈ (g)	Sílice virgen (g) "Clean up"	Fortificación (µg g ⁻¹)*	Concentración disolución control (mg L ⁻¹)
0.5000	2.0000	0.500	20 y 60	10.0 y 5.0
0.1250	0.5000	0.500	80	2.5
0.0625	0.2500	0.200	160	3.3
0.0625	0.2500	0.100	160	3.3
0.0500	0.2000	0.050	200	10.0

*Fortificación a partir de una disolución de 500 mg L⁻¹

4.4.3 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para OFFs

La extracción en fase sólida (EFS) es una de las metodologías de pre-concentración que más fácilmente se acoplan a la CLAR (*Hyotylainen y Riekkola, 2004*); una de las estrategias abordadas para realizar el acople entre la DMFS al sistema cromatográfico fue utilizar la EFS para conseguir la transferencia de los compuestos de interés (OFFs y HAPs), provenientes del cartucho de DMFS, a un segundo adsorbente con afinidad similar o igual a la sílice C₁₈.

Para realizar el acople de la EFS al sistema cromatográfico fue necesario utilizar una pre-columna en acero inoxidable (empacada con un adsorbente) unida a una válvula de conmutación (de 6 vías) que permite la pre-concentración del extracto y su posterior

elución hacia la columna cromatográfica. En la **figura 4.2** se presenta el acople de la EFS al sistema cromatográfico en estudio.

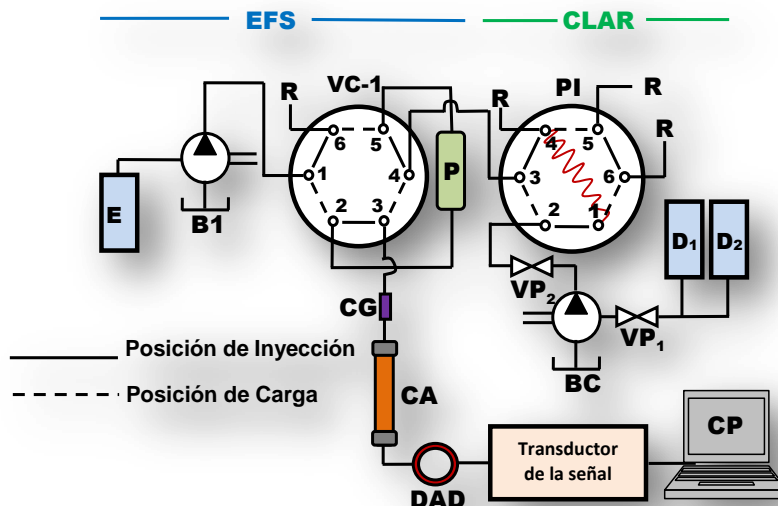


Figura 4.2. Extracción en fase sólida (EFS) acoplada "on-line" al sistema cromatográfico CLAR/DAD. E: Reservorio para el extracto proveniente de la DMFS "off-line". B1: Bomba de pre-concentración *Eldex*. VC-1: Válvula de conmutación de 6 vías. P: Pre-columna en acero inoxidable con adsorbente. PI: Puerto de inyección. VP: Válvulas de purga 1 y 2. R: Residuos. BC: Bomba cromatográfica. D: Disolventes cromatográficos 1 y 2. CP: Computador. CG: Columna de guarda. CA: Columna analítica. DAD: Detector UV con arreglo de diodos.

Para la pre-concentración de los OFFs en el cartucho P esquematizado en la **figura 4.2**, fue necesario evaluar: la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de retención cuantitativa de los analitos, la dilución del extracto (con agua) proveniente de la DMFS para evitar la fuga de los OFFs de mayor polaridad y el caudal de pre-concentración en la bomba (B1-**figura 4.2**).

4.4.3.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs

Para estudiar la eficiencia del sistema acoplado EFS-CLAR/DAD en la retención de los 9 OFFs, se analizaron tres adsorbentes para la pre-concentración, empacados en la pre-columna P, **figura 4.2**. En promedio 0.037 g de polímero PLRP-S 100 Å de 10-15 µm, polímero bondesil env de 40 µm o sílice C₁₈ nucleosil de 10 µm fueron colocados en la pre-columna del sistema. Se pre-concentraron disoluciones estándar en cada una de las fases (2.0 mL de una disolución 0.1 mg L⁻¹ de cada OFFs). El efecto de la naturaleza del

adsorbente se evaluó en función del ensanchamiento de los picos en la separación cromatográfica de los 9 OFFs.

4.4.3.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs

Ensayos preliminares para incrementar la retención cuantitativa de los 9 OFFs en el cartucho de pre-concentración (**P**, ver **figura 4.2**) consistieron en evaluar la siguiente estrategia:

- *Dilución con agua del extracto proveniente del cartucho de dispersión*: se prepararon 5 disoluciones estándar de 1.0 mL en ACN:Agua al 80:20 v/v a una concentración de 0.20 mg L⁻¹ de los 9 OFFs. Posteriormente a cada disolución se le adicionó un volumen diferente de agua (3.0, 2.2, 1.6, 1.0 y 0.6 mL) para obtener porcentajes de ACN:Agua de 20:80, 25:75, 30:70, 40:60 y 50:50 v/v.

Las disoluciones fueron colocadas en el reservorio **E**, ver **figura 4.2**, donde se enviaron a pre-concentración a la pre-columna **P** a un caudal de 1.0 mL min⁻¹ (bomba **B1**) cuando la válvula **VC-1** se encontraba en la posición de carga. En la **tabla 4.4** se describen las secuencias de operación para la pre-concentración, elución y acondicionamiento del sistema EFS-CLAR/DAD.

Tabla 4.4. Secuencia de operación para la pre-concentración del extracto (que contiene a los OFFs) proveniente de la DMFS mediante EFS acoplada al sistema cromatográfico (CLAR/DAD).

Operación	EFS		CLAR/DAD	
	Pre-concentración	Elución	Acondicionamiento columna analítica	Inyección directa
<i>Válvulas</i>	<i>Posición de las válvulas</i>			
VC-1	Carga	Inyección	Carga	Carga
PI	Carga/Inyección	Carga/Inyección	Carga/Inyección	Inyección
<i>Bombas</i>	<i>Estado de las bombas</i>			
B1	Encendida	Apagada	Apagada/Encendida	Apagada
BC	Encendida	Encendida	Encendida	Encendida

Una vez las disoluciones fueron pre-concentradas, la válvula **VC-1** se giró a la posición de inyección para llevar a cabo la elución de los OFFs (retenidos en la pre-columna (**P**)), mediante el paso de la fase móvil hacia la columna analítica (**CA**) donde se efectuó la separación y posterior cuantificación de los OFFs. Una disolución de la mezcla de los 9 OFFs fue el control utilizado para determinar los porcentajes de recobros de los pesticidas (p.ej. 10.0 mg L^{-1}); esta disolución se inyectó directamente al cromatógrafo de líquidos cuando las válvulas **PI** se encontraba en la posición de inyección y la válvula **VC-1** en la posición de carga. Con los resultados obtenidos se estableció el volumen de agua necesario para diluir el extracto proveniente del cartucho de DMFS y garantizar la transferencia y la retención cuantitativa de los OFFs en la pre-columna **P** del sistema EFS-CLAR/DAD.

4.4.3.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs

Otro parámetro analizado en la retención de los contaminantes estudiados, por EFS, fue el caudal o velocidad con que el extracto proveniente de la DMFS pasa a través de la pre-columna **P** (**figura 4.2**). Diferentes caudales (0.8 , 1.0 y 1.5 mL min^{-1}) y concentraciones (10 mL de 2.5 y $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) fueron evaluados para determinar las condiciones de operación óptimas en la bomba **B1** que permitieran una retención cuantitativa de los OFFs en el cartucho de pre-concentración.

4.4.4 Acople de un cartucho en acero inoxidable (cartucho de DMFS) a una bomba *Eldex* y válvula selectora de disolventes

Para lograr el acople entre la DMFS al sistema cromatográfico fue necesario utilizar una columna de acero inoxidable de $30 \times 8.0 \text{ mm}$. La columna en acero inoxidable fue empacada de la misma forma que los cartuchos de polipropileno: con 0.050 g de sílice virgen (co-columna de limpieza) y la mezcla de 0.050 g de muestra dispersada con 0.200 g de adsorbente sílice C_{18} . El cartucho de DMFS en acero inoxidable fue conectado a una bomba *Eldex* con válvula selectora de disolventes, como se presenta en la **figura 4.3**.

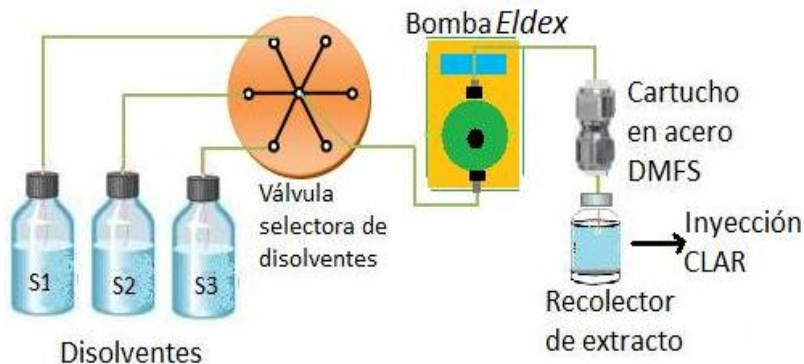


Figura 4.3. Acople de un cartucho en acero inoxidable para la DMFS a una bomba recíproca *Eldex* y una válvula selectora de disolventes.

Con la válvula selectora se enviaron, a través del cartucho de DMFS, las diferentes mezclas de disolventes para la etapa de limpieza y de elución de los OFFs (a un caudal de 1.0 mL min^{-1}). Los primeros ensayos consistieron en simular la DMFS (sin muestra de hígado y sin efectuar la pre-concentración por EFS); se fortificó 0.200 g de sílice C_{18} con la mezcla de los 9 OFFs ($20 \mu\text{L}$ de la disolución de 500 mg L^{-1}). La sílice C_{18} se colocó en el cartucho de DMFS en acero inoxidable (ver-**figura 4.3**) y posteriormente se aplicó la secuencia de limpieza y de elución de los OFFs optimizada (en la **sección 4.4.2.5**) para el tamaño de muestra de 0.050 g .

Los extractos obtenidos fueron analizados directamente en el cromatógrafo de líquidos (sin pre-concentración por EFS) y comparados frente a una disolución estándar de 10 mg L^{-1} . En la **tabla 4.5** se presentan las diferentes secuencias analizadas y que pudieran influir sobre los recobros de los OFFs cuando se trabaja el sistema en línea. Las variables analizadas fueron: empuje de las diferentes mezclas de disolventes con agua, variación del volumen de ACN:Agua al 30:70 v/v, limpieza con ACN:Agua al 40:60 v/v, secado del cartucho de DMFS previo a la elución de los OFFs y elución con ACN:Agua al 80:20 v/v ó 100 %.

Una vez optimizadas la secuencia de limpieza y la elución de los OFFs sin muestra con el acople de la **figura 4.3** se realizaron ensayos con muestras de hígado previamente fortificadas con $10 \mu\text{g}$ de OFFs ($200 \mu\text{g g}^{-1}$ de muestra).

Tabla 4.5. Simulación de la DMFS sin muestra y sin pre-concentración en sílice C₁₈ con diferentes secuencias de limpieza y elución de los OFFs con la configuración indicada en la **figura 4.3**.

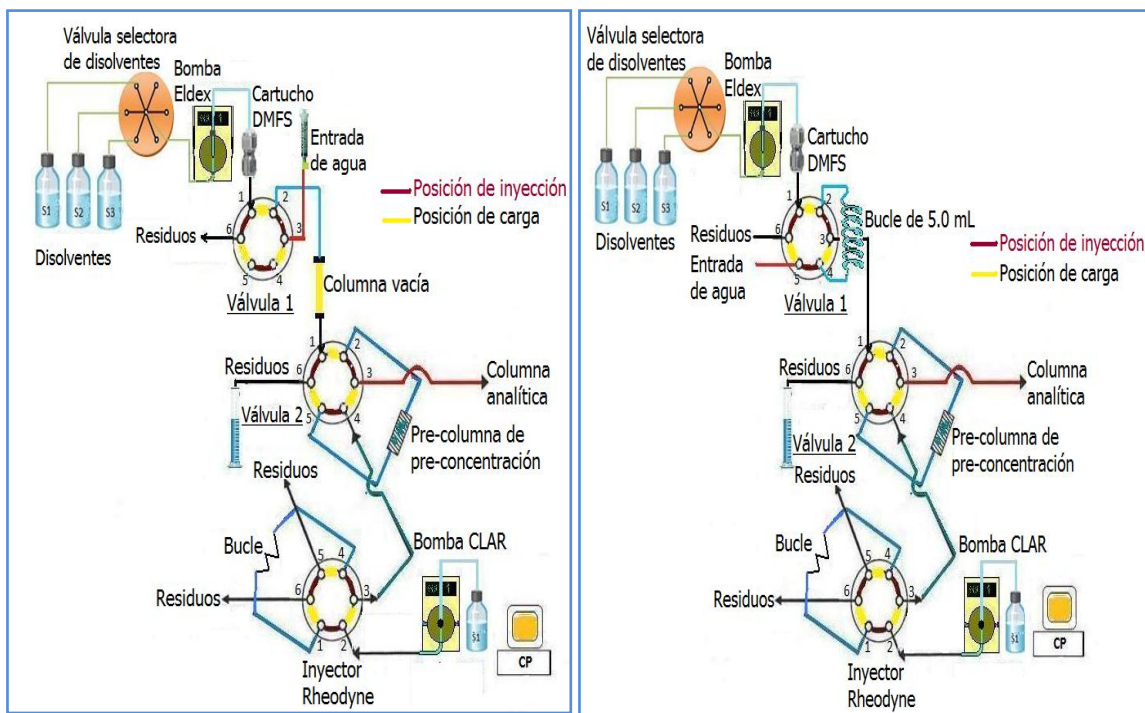
Secuencias- Analizadas	Volúmenes				
	Ensayo 1.	Ensayo 2.	Ensayo 3	Ensayo 4	Ensayo 5
1. Agua	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
2. ACN:Agua al 30 v/v	0.60 mL	0.60 mL	0.60 mL	2.0 mL	2.0 mL
3. Agua	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	No	No
4. ACN:Agua al 40:60 v/v	0.40 mL	0.40 mL	0.40 mL	No	No
5. Agua	1.5 mL	1.5 mL	1.5 mL	No	No
6. Secado	No	No	No	No	Si
7. ACN:Agua al 80:20 v/v	1.0 mL	2.0 mL	3.0 mL	No	No
8. ACN al 100 %	No	No	No	2.0 mL	2.0 mL

Caudal bomba Eldex: 1.0 mL min⁻¹

4.4.5. Acople de la DMFS a EFS-CLAR/DAD

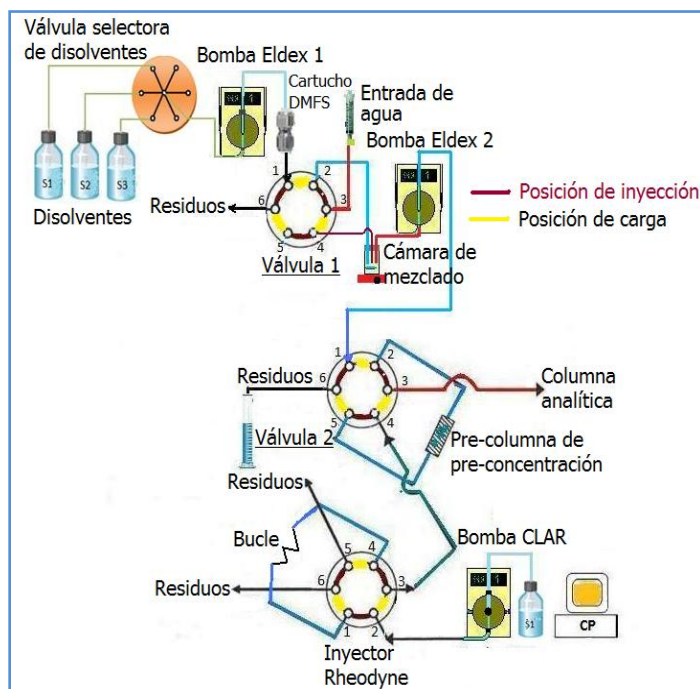
Teniendo como base los resultados anteriores se prosiguió al estudio de 3 prototipos que permitieran el acople entre la DMFS a la EFS y a su vez al sistema cromatográfico. A cada prototipo se le adaptó un dispositivo que favoreciera la dilución del extracto proveniente del cartucho DMFS y que contiene a los OFFs, pues de lo contrario la pre-concentración de los plaguicidas en el adsorbente no sería cuantitativa.

En todos los prototipos las etapas de limpieza de la muestra contenida en el cartucho DMFS se aplicaron cuando la válvula 1 se encontraba en la posición de inyección, **figura 4.4**, los residuos fueron eliminados por la vía 6. Posteriormente se llevó a cabo la elución de los OFFs con la mezcla del disolvente adecuado, cuando la válvula 1 se encontraba en la posición de carga. El extracto fue depositado en el correspondiente dispositivo de dilución el cual contenía un determinado volumen de agua. La mezcla (extracto + agua) fue pre-concentrada en la pre-columna de pre-concentración dispuesta en la válvula 2, ver **figura 4.4**. La elución de los analitos retenidos en la pre-columna se llevó a cabo con la fase móvil del sistema cromatográfico, cuando la válvula 2 se encontraba en la posición de inyección.



a

b



c

Figura.4.4. Acople del cartucho de DMFS al sistema de EFS mediante válvulas de conmutación *Rheodyne* y bombas *Eldex*. **a.** Tubo vacío como sistema de dilución. **b.** Bucle de 5.0 mL. **c.** Cámara dinámica de mezclado.

A continuación se describen los 3 prototipos evaluados para lograr el acople.

1. Acople con tubo vacío: el primer diseño evaluado utilizó una bomba *Eldex* (para impulsar los disolventes de limpieza del cartucho de DMFS y de elución de los analitos) y dos válvulas de conmutación de 6 vías (válvulas 1 y 2) como se presenta en la **figura 4.4.a**. En este acople se utilizó como sistema de dilución un tubo vacío en acero inoxidable que unió a la DMFS con la EFS-CLAR/DAD.

2. Acople con bucle de 5.0 mL: al segundo prototipo se le adaptó un bucle de 5.0 mL en la válvula 1 como sistema de dilución del extracto proveniente del cartucho de DMFS, este acople se presenta en la **figura 4.4.b**.

3. Acople con cámara dinámica de mezclado: para optimizar el proceso de dilución del extracto proveniente del cartucho de DMFS, se optó por incorporar al sistema de acople una cámara dinámica de mezclado (elaborada en teflón para los OFFs) y una segunda bomba *Eldex*, esta última pre-concentraría la mezcla (extracto provenientes del cartucho DMFS más el agua contenida en la cámara de mezclado) en la pre-columna ubicada en la válvula 2, este acople se presenta en la **figura 4.4.c**.

Los ensayos realizados con los tres prototipos consistieron en simular la DMFS sin muestra, fortificando la sílice C₁₈ con 0.2 µg de OFFs (20 µL de una disolución de 10 mg L⁻¹); la sílice fortificada fue empacada en el cartucho de dispersión en el cual se encontraba la co-columna de sílice vírgen. Posteriormente se aplicó la secuencia de limpieza previamente optimizada con la metodología fuera de línea (para el tamaño de muestra de 0.050 g). El extracto proveniente del cartucho de DMFS (contiene a los OFFs) fue enviado al sistema de dilución correspondiente. Con el compendio de todos los resultados obtenidos con el estudio de los 3 prototipos se procedió a validar la metodología en línea para los OFFs.

4.4.6 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs

La validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD fue realizada teniendo en cuenta los parámetros de una validación “*en el laboratorio*” por su denominación en inglés “*in-house*”. La cual comprende la evaluación de la linealidad, precisión (repetibilidad y precisión inter-día), límites de detección y cuantificación, exactitud y robustez (*European Commission Decision 2002/657/EC/2002: Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; Wood, 1999*).

4.4.6.1 Linealidad

Una vez optimizado el prototipo de acople entre la DMFS y la EFS-CLAR/DAD el siguiente paso consistió en validar la metodología en línea para la determinación de OFFs en muestras de hígado de bovino. Las muestras de hígado utilizadas para el proceso de validación fueron obtenidas de supermercados de la ciudad de México. Para establecer la correspondencia entre la respuesta del detector del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de OFFs en muestras de hígado (0.050 g), se realizaron curvas de calibración a diferentes niveles de concentración (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra, cada uno por triplicado) para los 9 OFFs; a cada muestra se le aplicó la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD y se relacionó el *área del pico cromatográfico (en unidades arbitrarias UA) vs. concentración (en $\mu\text{g g}^{-1}$)* de esta forma se estableció la linealidad del método.

4.4.6.2 Exactitud

La exactitud o “veracidad” de la metodología en línea puede ser expresada como los recobros en los ensayos de adicionar una cantidad conocida de analito a una matriz blanco cuando no está disponible el material de referencia (MR) (*Serrano et al., 2003*). Los recobros globales de la metodología acoplada fueron estimados mediante la elaboración de las curvas que relacionan la *cantidad recuperada de OFFs (en ng) vs. cantidad*

adicionada de OFFs (en ng), al multiplicar por 100 el valor de la pendiente, se estimó el recobro global del método en línea para los 9 OFFs en estudio. Los recobros indican la exactitud de la metodología propuesta para la determinación de los OFFs en muestras de hígado.

4.4.6.3 Precisión

La precisión del método fue evaluada en términos de la repetibilidad y de la precisión inter-día. La repetibilidad se determinó mediante extracciones por triplicado realizadas para cada nivel de fortificación en las curvas de calibración. La precisión inter-día se evaluó en días diferentes mediante cinco réplicas para dos niveles de fortificación 0.5 y 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$; en cada caso fueron evaluados los correspondientes C.V. % (Wang et al., 2009).

4.4.6.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección experimental del método (LDEM) acoplado para la extracción y posterior cuantificación de los OFFs fueron determinados mediante fortificación secuencial decreciente de OFFs a las muestras de hígado (por debajo de 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$: 0.20, 0.12 y 0.04 $\mu\text{g g}^{-1}$), a las cuales se les aplicó la metodología en línea y se estableció la señal en el detector de cada OFFs hasta mantener una relación S/N igual a 3. Los límites de cuantificación experimentales (LCE) del sistema fueron determinados mediante la aplicación de la metodología en línea a muestras de hígado fortificadas a niveles por encima de los LDE hasta establecer la concentración según la cual el sistema mantiene una relación S/N igual a 10.

Para establecer los límites de detección teóricos del método (LDTM) se aplicaron los lineamientos del: “Code of Federal Regulation (US, EPA) Appendix B to Part 16 Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit” Revision 1.11”. En el cual se establecen los siguientes parámetros:

$$LDTM = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} \cdot S \quad (4.4)$$

$$[LCB - LCA] = [0.64 LDTM - 2.20 LDTM] \quad (4.5)$$

Donde:

LDTM: Límite de detección del método en área o respuesta del detector, a 99 % de confianza

t: Valor estadístico de t con $\alpha = 0.01$ y 6 grados de libertad.

s: Desviación estándar de la respuesta del detector para $n = 7$ ensayos (para un nivel de fortificación de 1 a 5 veces más el LDE; $1.25 \mu\text{g g}^{-1}$ de muestra, en este caso).

[**LCB-LCA**]: Es el intervalo del LDTM para un 95 % de confianza y 7 ensayos. **LCB**: límite de confianza bajo y **LCA**: límite de confianza alto.

El valor obtenido en **LDTM** se interpola en la curva de calibración correspondiente para obtener el LDTM en $\mu\text{g g}^{-1}$ de la muestra. Este procedimiento se llevó a cabo para un tamaño de muestra de 0.050 g. A su vez también se estimaron los LDEM para un tamaño de muestra de 0.100 g y en esta forma aumentar la sensibilidad del método acoplado.

4.4.6.5 Robustez

Entendida como la capacidad de un procedimiento analítico para no ser afectado por variaciones pequeñas pero deliberadas en los parámetros del método y que provee una indicación de su fiabilidad durante su uso habitual (*European Commission Decision 2002/657/EC/2002: Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results; Nász, 2012*), este parámetro fue evaluado en la metodología en línea mediante el cambio de la matriz analizada. Para tal fin se aplicó la metodología acoplada a muestras de músculo y pulmón de bovino con las mismas condiciones de preparación de la muestra utilizadas para la validación de la metodología en línea con muestras de hígado.

Las muestras de músculo fueron fortificadas a diferentes niveles de concentración: 0.5, 2.5 y $10.0 \mu\text{g g}^{-1}$. Posteriormente se aplicó la metodología en línea de DMFS-EFS-CLAR/DAD, $n = 3$, para evaluar la precisión y la exactitud del método propuesto mediante

los valores de recobros y los C.V. %. La precisión inter-día del método DMFS-EFS-CLAR/DAD fue establecida en días diferentes con muestras de músculo (0.050 g) fortificadas a 2 niveles de concentración, 0.5 y 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, estos ensayos fueron realizados para n= 5. El mismo procedimiento fue aplicado a muestras de pulmón.

4.4.7 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD a muestras de hígado con daños patológicos

Una vez validado el sistema acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD se procedió a la aplicación del método a muestras de hígado provenientes de ejemplares jóvenes del Complejo Agroindustrial de Tizayuca (CAIT). Las biopsias de hígado fueron colectadas por personal calificado del Laboratorio de Patología Animal de la FES Cuautitlán, UNAM. Estas muestras presentaron lesiones hepáticas, todas fueron valoradas en grado-severidad con actividad necro-inflamatoria y etapa-fibrosis. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su correspondiente análisis. Las muestras fueron analizadas durante las siguientes 8 horas a partir del proceso de descongelación.

Las muestras fueron tomadas directamente del hígado de los ejemplares, los cuales no fueron sometidos al proceso de desangrado común que se practica a todos los bovinos destinados al consumo humano. Se realizaron dos muestreos; en el primero se recolectaron 10 muestras (identificadas con los números: 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 16 y 17) y en el segundo se recolectaron 13 muestras (enumeradas del 18 al 30). Las muestras una vez recolectadas fueron almacenadas a - 20 °C en el laboratorio de patología; un total de 23 muestras de hígado distribuidas en 2 lotes, fueron analizadas con la metodología en línea para la determinación de OFFs.

4.4.7.1 Verificación de OFFs en muestras de hígado con lesiones patológicas por espectroscopía UV y espectrometría de masas

Las muestras de hígado con lesiones patológicas que presentaron picos cromatográficos cuyos tiempos de retención coincidieron con alguno de los OFFs

analizados, fueron sometidas a análisis por espectroscopía UV (*pureza espectral*) y espectrometría de masas (modo SIM, verificación peso molecular).

Pureza espectral: la pureza espectral de los picos fue evaluada con el “software” de “PolyView 2000 modo MCA *peak purity*”, en el que se comparan los espectros obtenidos de las muestras con la base de datos previamente elaborada con los extractos provenientes de muestras de hígado fortificadas con los 9 OFFs. El parámetro de pureza espectral está dado por la relación de disimilaridad, DR, para el cual se manejan los siguientes valores:

DR < 1 existe buena similaridad espectral.

1 < DR < 2 hay una pobre similaridad espectral.

DR > 2 hay una mala similaridad espectral.

Análisis por cromatografía de líquidos (CL) - espectrometría de masas (EM): Para el análisis por CLAR/EM de las muestras que presentaron algún pico cromatográfico referente a un OFF, se utilizó un cromatógrafo de líquidos *Agilent Technologies 1200 series* acoplado a un detector de masas *Triple quadrupolo QQQ 6410* con las siguientes condiciones de operación:

Condiciones de operación espectrómetro de masa 6410

Fuente de ionización: Electrospray

Modo SIM: Masa 277 ó 264

Tiempo de corrida (min): 3 Polaridad: Positiva

Diferencia de potencial EMV: 0

Filtro: Encendido Temperatura del gas (°C): 350 Potencia del capilar (V): 4000

Ancho de filtro: 0.07

Flujo del gas (L/min): 9

Tiempo de permanencia (ms): 200

Presión del nebulizador (psi): 40

Tipo y volumen de inyección: Automuestreador-Volumen (μL): 0.4

Bomba binaria

Tiempo de corrida (min): 3

Flujo (mL/min): 0.4

Disolvente: 90 % ACN

Disolvente B: 10 % Acetato de amonio 5mM

Columna: Zorbax $5\mu\text{m}$ x 4.6 x 50 mm. Extend- C_{18} *Agilent*

Una disolución control de 2.5 mg L^{-1} del plaguicida en cuestión fue inyectada al sistema CLAR/EM bajo las condiciones descritas anteriormente. Posteriormente, se inyectó el extracto correspondiente a la muestra que presentó el compuesto desconocido cuyo espectro UV y tiempo de retención coincide con alguno de los plaguicidas estudiados.

4.4.8 Adecuación del método analítico acoplado para la determinación de HAPs en muestras de hígado

El método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs fue adecuado para la determinación de HAPs en muestras de hígado. A continuación se indican los parámetros optimizados para el desarrollo del acople DMFS-EFS-CLAR/DFL.

4.4.8.1 Optimización de la separación cromatográfica y de la detección de los 4 HAPs por CLAR-DFL

La optimización de las longitudes de onda de excitación y emisión para el análisis de los 4 HAPs se realizó mediante inyecciones de una disolución estándar de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de los cuatro hidrocarburos en metanol; se variaron las longitudes de onda de excitación y de emisión en el detector de fluorescencia, con el fin de determinar los valores con los cuales se obtenía la mejor respuesta del detector, representada en la

mayor área de pico cromatográfico para cada compuesto. Para ello se trabajó en el modo isocrático de elución y con una relación de fase móvil metanol:agua 95:5 v/v a un flujo de 1.0 mL min^{-1} .

Para la optimización de la separación cromatográfica de los 4 HAPs se utilizó una columna analítica con sílice C_{18} como fase estacionaria y se calculó, con una disolución de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de los HAPs en metanol, el logaritmo del factor de retención ($\text{Log } k'$) para cada hidrocarburo en función de la composición de la fase móvil (mezclas de metanol:agua de 100, 95:5, 93:7 y 91:9 v/v a flujo de 1.0 mL min^{-1}), de acuerdo con la **ecuación 4.1** (ver página 57).

Se verificó gráficamente la dependencia del $\text{Log } k'$ en función del porcentaje de disolvente orgánico en la fase móvil. Además se estimaron los valores de resolución (R_s) para cada pico cromatográfico (**ecuación 4.2**, ver página 57) con el fin de observar si la separación entre los compuestos presentó valores de $R_s \geq 1$. En esta forma se obtuvo la relación de fase móvil adecuada para conseguir la separación cromatográfica de los 4 HAPs.

4.4.8.2 Validación del sistema cromatográfico para HAPs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación

Disoluciones estándar de 0.25, 0.50, 1.0 y $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de los 4 HAPs fueron inyectadas ($20 \mu\text{L}$) por triplicado al sistema cromatográfico para establecer la linealidad, a las longitudes de onda de fluorescencia respectivas para cada hidrocarburo. Se elaboraron las correspondientes curvas de calibración relacionando *área del pico cromatográfico (en unidades arbitrarias UA) vs. concentración (en $\mu\text{g L}^{-1}$)*. La precisión fue evaluada en términos de repetibilidad y de precisión inter-día; la repetibilidad se determinó mediante inyecciones sucesivas ($n=3$) para cada una de las disoluciones estándar (0.25 a $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$). La precisión inter-día se evaluó en días diferentes mediante cinco réplicas con dos disoluciones estándar de 0.25 y $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$; en cada caso fueron evaluados los correspondientes coeficientes de variación porcentual (C.V. %).

La sensibilidad del sistema cromatográfico fue estimada en función de los límites de detección y de cuantificación, para ello se establecieron los LDE por medio de inyecciones sucesivas de disoluciones cada vez más diluidas (0.12, 0.03 y 0.015 $\mu\text{g L}^{-1}$) hasta obtener una relación señal:ruido (S/N) igual a 3 (Currie, 1995; Long y Winefordner, 1983) y para los LCE se realizaron inyecciones sucesivas de disoluciones por encima de los LDE hasta obtener una relación S/N igual a 10.

4.4.9 Aplicación de la metodología de DMFS para la extracción de 4 HAPs fuera de línea

Ensayos preliminares para la extracción de los 4 HAPs utilizando la DMFS fueron llevados a cabo con el sistema cromatográfico acoplado al detector ultravioleta visible con arreglo de diodos (DAD). La optimización de la secuencia de limpieza y de la elución de los HAPs del cartucho de dispersión, se realizó inicialmente sin muestra de hígado para una cantidad de adsorbente de 0.200 g. En la **tabla 4.6** se indican todas las secuencias ensayadas para la limpieza y la elución de los HAPs.

Tabla 4.6. Secuencias de limpieza y de elución de los 4 HAPs por DMFS. Ensayos realizados sin muestras de hígado a un nivel de fortificación de 0.5 $\mu\text{g HAPs}^*$. Sistema CLAR/DAD.

Adsorbente (g)	Etapas de limpieza			Elución
0.2000	5 mL H ₂ O	5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v Fracciones 1.0 mL	5.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v Fracciones 1.0 mL	3.0 mL ACN 100 % Fracciones 0.5 mL
	5 mL H ₂ O	5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v Fracciones 1.0 mL	4.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v Fracciones 1.0 mL	3.0 mL ACN 100% Fracciones 0.5 mL
	5 mL H ₂ O	5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v Fracciones 1.0 mL	4.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v Fracciones 1.0 mL	6.0 mL ACN:Agua 80:20 v/v Fracciones 1.0 mL

*Fortificación a partir de una disolución de 25 mg L^{-1}

Una vez seleccionada la mejor secuencia de limpieza y de elución de los HAPs, se aplicó la DMFS a muestras de hígado para determinar los volúmenes adecuados de elución de todos los HAPs manteniendo los recobros cuantitativos; para tal fin se construyeron los frentes de elución respectivos (análisis de fracciones de 0.5 mL). Con

base en los resultados obtenidos se realizaron tres réplicas con muestras de hígado para evaluar la repetibilidad y exactitud del método aplicado.

Teniendo en cuenta que los HAPs presentan altos coeficientes de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) entre 5.61 y 6.87 la afinidad de estos contaminantes hacia la sílice C₁₈ es grande, razón por la cual los volúmenes utilizados en las secuencias de limpieza de interferentes (con ACN:Agua al 30:70 y 40:60 v/v) fueron mayores a los utilizados para los OFFs. Para cada una de las secuencias estudiadas se elaboraron los correspondientes frentes de elución de los 4 HAPs, mediante la recolección de fracciones (1.0 ó 0.5 mL) que posteriormente fueron analizadas en el sistema cromatográfico para evaluar posibles fugas con los eluentes de limpieza y el recobro global en el proceso de elución de los hidrocarburos.

4.4.9.1 Limpieza del extracto con sílice virgen “clean up” fuera de línea

En el caso de los HAPs una vez optimizada las secuencias de limpieza y de elución con muestras de hígado, se analizó el efecto de incluir una co-columna de 0.050 g de sílice virgen en el fondo del cartucho de dispersión sobre los recobros obtenidos en ausencia de ésta. Se realizaron tres réplicas para estimar la repetibilidad y exactitud del método simulando la DMFS sin muestras de hígado y fortificando a 10 µg de HAPs por gramo de muestra.

4.4.10 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para HAPs

Para la optimización de la pre-concentración de los HAPs mediante EFS se evaluaron los mismos parámetros considerados para la pre-concentración de los OFFs.

4.4.10.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs

Para los HAPs se evaluó únicamente la fase sílice C₁₈ nucleosil de 10 µm en la pre-columna de pre-concentración; pues estos contaminantes presentan valores de $\log K_{ow}$ lo

suficientemente altos para retenerse fuertemente en materiales poliméricos, como es el caso de la PLRP-S, lo cual impediría la elución cuantitativa de los HAPs hacia el sistema cromatográfico.

4.4.10.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs

Utilizando las mismas condiciones de operación del acople ilustrado en la **figura 4.2.**, se evaluó el porcentaje de ACN presente en el extracto proveniente del cartucho de DMFS en la retención cuantitativa de los HAPs en la pre-columna de pre-concentración (**P** en la **figura 4.2**). Se prepararon 3 disoluciones estándar de 1.5 mL en ACN al 100 % a concentración de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ de los 4 HAPs. Posteriormente a cada disolución se le adicionó un volumen diferente de agua (3.5, 2.2 y 1.5 mL) para obtener porcentajes de ACN:Agua de 30:70, 40:60 y 50:50 v/v. Los picos cromatográficos de los HAPs en estos ensayos fueron comparados frente a los obtenidos con una inyección directa de una disolución control de 0.5 mg L^{-1} .

4.4.10.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs

El otro parámetro analizado en la retención de los contaminantes estudiados, por EFS, fue el caudal o velocidad con que el extracto de la DMFS pasa a través de la pre-columna **P** (**figura 4.2**). Diferentes caudales ($0.8, 1.0$ y 1.5 mL min^{-1}) y concentraciones (10 mL de 0.4 y $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$) fueron evaluados para determinar las condiciones de operación óptimas en la bomba **B1** que permitieran la retención cuantitativa de los HAPs en el cartucho de pre-concentración.

4.4.11 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de HAPs

Se realizaron ensayos preliminares con la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL utilizando una cámara dinámica de mezclado en acero inoxidable y se aplicó la secuencia de limpieza y elución de los HAPs optimizada en los ensayos fuera de línea (**sección 4.4.9**). Posteriormente se validó la metodología “*in-house*” acoplada con muestras

de hígado de bovino llevando a cabo el mismo procedimiento descrito anteriormente para los OFFs.

4.4.11.1 Linealidad

Para establecer la correspondencia entre la respuesta del detector del sistema cromatográfico a diferentes concentraciones de HAPs en muestras de hígado (0.050 g), se realizaron curvas de calibración a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.4 y 0.6 ng g⁻¹ de muestra, cada uno por triplicado) para los 4 HAPs, a cada muestra se le aplicó la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL y se relacionó el *área del pico cromatográfico (en unidades arbitrarias UA) vs. concentración (en ng g⁻¹)*, de esta forma se estableció la linealidad del método.

4.4.11.2 Exactitud

Los recobros globales de la metodología acoplada fueron estimados mediante la elaboración de las curvas que relacionan la *cantidad recuperada de HAPs (en pg) vs. cantidad adicionada de HAPs (en pg)*, al multiplicar por 100 el valor de la pendiente, se estimó el recobro global del método en línea para los 4 HAPs en estudio. Los recobros indican la exactitud de la metodología propuesta para la determinación de los HAPs en muestras de hígado.

4.4.11.3 Precisión

La precisión del método fue evaluada en términos de la repetibilidad y de la precisión inter-día. La repetibilidad se determinó mediante las extracciones por triplicado realizadas para cada nivel de fortificación en las curvas de calibración. La precisión inter-día se evaluó en días diferentes mediante cinco réplicas para dos niveles de fortificación a 0.1 y 0.6 ng g⁻¹; en cada caso fueron evaluadas los correspondientes C.V. %.

4.4.11.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección experimental (LDE) del método acoplado para la extracción y posterior cuantificación de los HAPs, fueron determinados mediante

fortificación secuencial decreciente de HAPs a las muestras de hígado (por debajo de 0.1 ng g^{-1} : 0.040 , 0.024 y 0.012 ng g^{-1}), a las cuales se les aplicó la metodología en línea y se estableció la señal en el detector de cada HAPs hasta mantener una relación S/N igual a 3. Los límites de cuantificación experimentales (LCE) del sistema fueron determinados mediante la aplicación de la metodología en línea a muestras de hígado fortificadas a niveles por encima de los LDE, hasta establecer la concentración según la cual el sistema mantiene una relación S/N igual a 10.

Para establecer los límites de detección teóricos del método (LDTM) se aplicaron nuevamente los lineamientos del: Code of Federal Regulation (US, EPA); Appendix B to Part 16 “*Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit*” *Revision 1.11*”. El procedimiento ya fue descrito en el apartado anterior, en la validación de los OFFs, mediante las **ecuaciones 4.4 y 4.5** (ver página 73).

4.4.11.5 Robustez

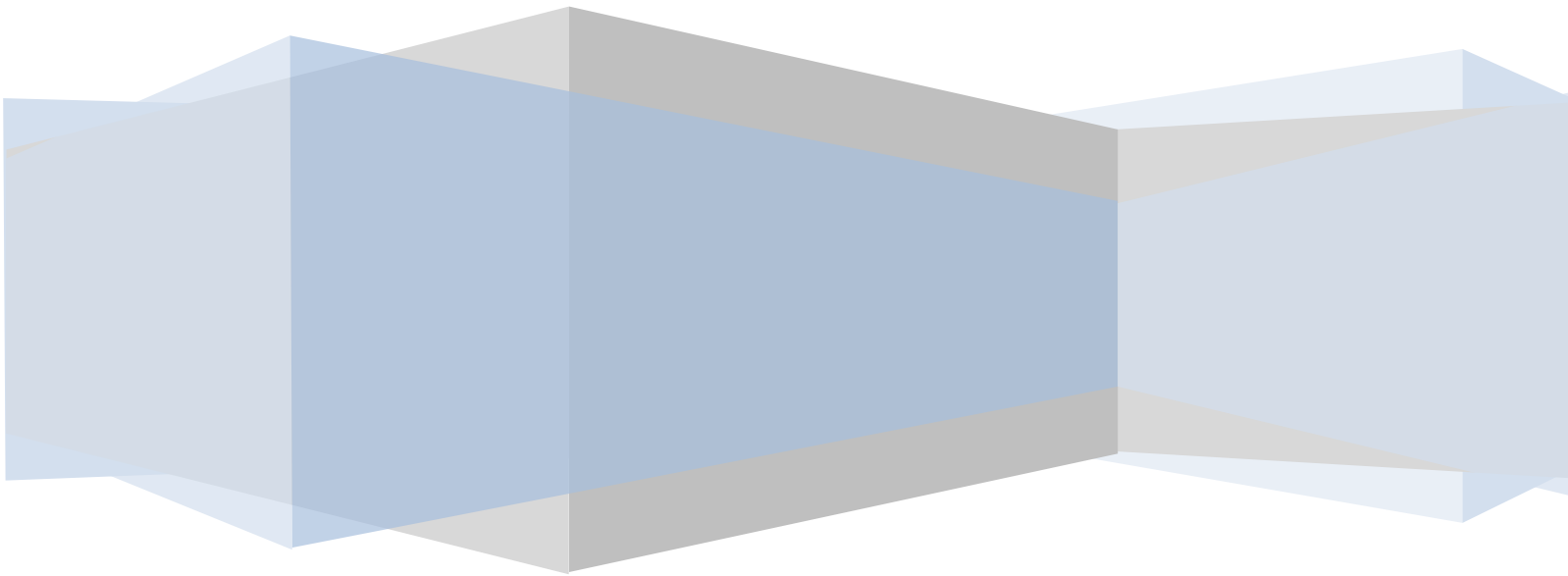
Este parámetro fue evaluado en el sistema en línea mediante el análisis de otros tipos de tejidos de bovino. Para tal fin se aplicó la metodología a muestras de músculo y pulmón de bovino con las mismas condiciones de preparación de la muestra utilizadas para la validación de la metodología en línea con muestras de hígado.

Entonces muestras de músculo fueron fortificadas por triplicado a dos niveles de concentración: 0.1 y 0.6 ng g^{-1} . Posteriormente, se les aplicó la metodología en línea de DMFS-EFS-CLAR/DFL, para evaluar la precisión y exactitud del método mediante los valores de recobros y C.V. %. La precisión inter-día del método DMFS-EFS-CLAR/DFL fue establecida en días diferentes, con muestras de músculo (0.050 g) fortificadas a 2 niveles de concentración, 0.1 y 0.60 ng g^{-1} , estos ensayos fueron realizados para $n= 5$. El procedimiento anteriormente descrito fue también aplicado a muestras de pulmón.

4.4.12 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL a muestras de hígado de bovino con daños patológicos y productos alimenticios de origen animal

Una vez validado el sistema acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL, se procedió a la aplicación del método a muestras de hígado provenientes de ejemplares jóvenes del Complejo Agroindustrial de Tizayuca (CAIT). Un total de 23 muestras de hígado distribuidas en 2 lotes (uno de 10 y el otro de 13 muestras), fueron analizadas con la metodología en línea para la determinación de HAPs; además se realizaron análisis de los HAPs en muestras de jamón ahumado provenientes de supermercados de la ciudad de México.

5. Resultados y Discusión



A continuación se presentan los resultados obtenidos a partir de la metodología anteriormente descrita.

5.1 Optimización del acople entre la DMFS al sistema cromatográfico (CLAR/DAD) para la determinación de OFFs en muestras de hígado

5.1.1. Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 9 OFFs por CLAR/DAD

Mediante el manejo del “software Polyview 2000” se establecieron las longitudes de onda óptimas para la detección y la cuantificación de cada uno de los 9 OFFs, que fueron seleccionadas teniendo en cuenta la posibilidad de interferencias espectrales al trabajar con muestras reales ($\lambda \geq 220$ nm). En la **tabla 5.1** se indican las longitudes de onda seleccionadas para la determinación de cada uno de los compuestos estudiados y en el Anexo II se presentan los correspondientes espectros UV de los 9 OFFs.

Con el apoyo en los valores de $\text{Log } k'$ obtenidos con diferentes proporciones de metanol:agua se establecieron las condiciones óptimas para lograr una adecuada separación de los picos cromatográficos de los plaguicidas estudiados. En la **figura 5.1** se presentan las curvas correspondientes a los $\text{Log } k'$ vs. *composición de la fase móvil* (% Metanol) en una columna C_{18} para los 9 OFFs.

La separación cromatográfica de los 9 OFFs en una columna C_{18} de 150 mm es evidenciada por el comportamiento observado en las curvas de la **figura 5.1**, las cuales siguen en forma paralela y lineal para cada compuesto conforme aumenta el porcentaje de agua en el sistema. Teniendo en cuenta la variedad de solubilidades que hay entre los 9 OFFs, (valores de $\text{Log } K_{ow}$ - **tabla 5.2**) se puede observar que las fases móviles con alta fuerza de elución permiten que todos los plaguicidas eluyan rápidamente de la columna analítica.

Tabla 5.1 Longitudes de onda de cuantificación de los 9 OFFs estimados mediante el programa “PolyView 2000-Diode Array Spectral- Processing software”: barrido 190-367 nm.

Plaguicida	Longitudes de onda de absorción máxima (nm)	Longitud de onda de cuantificación(nm)
1. Metil paratión	196.59	273
	273.45	
2. Fenitrotión	268.43	268
	196.68	
3. Paratión	197.42	273
	273.94	
4. Clorfenvinfos	200.78	244
	243.58	
5. Diazinón	196.54	244
	245.96	
6. Etión	197.37	220
7. Fenclorfos	201.75	224
	229.30	
8. Clorpirifos	198.08	287
	228.03	
	288.84	
9. Carbofenotión	196.94	263
	262.97	

Para una relación 90:10 v/v metanol:agua no se logró una adecuada separación de las curvas para los tres últimos plaguicidas (fenclorfos, clorpirifos y carbofenotión-**figura 5.1**); sin embargo el aumento del porcentaje de agua en la fase móvil provocó una sustancial mejora en la resolución a partir de la relación 70:30 v/v metanol:agua, con lo cual se pudo establecer el orden de elución para cada uno de los OFFs.

A pesar de obtener resultados satisfactorios con la relación 70:30 v/v, se consideró aumentar los tiempos de retención para permitir en el cromatograma la previa salida de compuestos polares presentes en las muestras, los cuales pudiesen actuar como interferencias a las longitudes de onda de cuantificación.

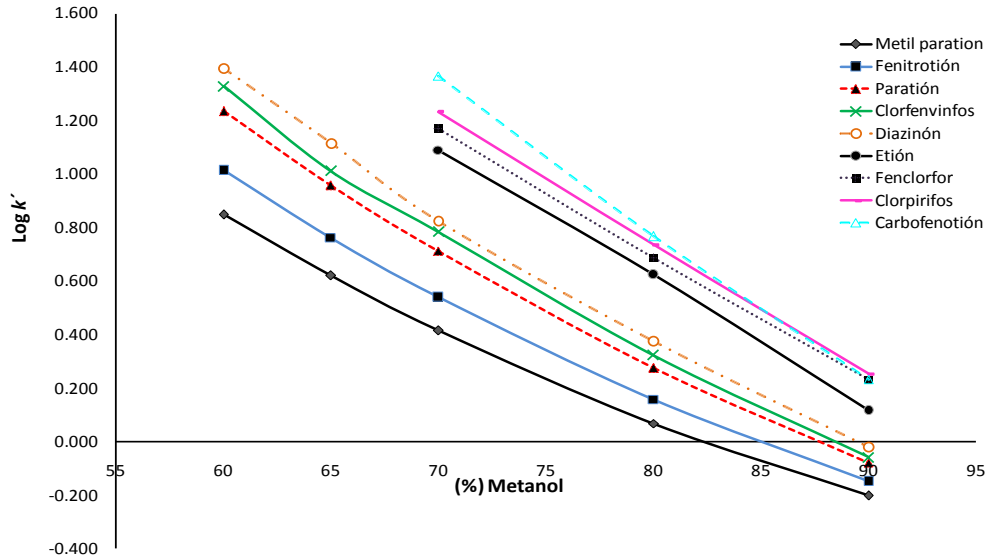


Figura 5.1. Variación del $\text{Log } k'$ en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, en una columna analítica RES-ELUT C_{18} ($5 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) a un flujo de 1.0 mL min^{-1} con una mezcla de los 9 OFFs con concentración de 5.0 mg L^{-1} cada uno.

Tabla 5.2. Factores de retención ($\text{Log } k'$) y tiempos de retención de 5 OFFs en una columna analítica RES-ELUT C_{18} a un flujo de 1.0 mL min^{-1} . Composición de la fase móvil 65:35 v/v metanol:agua, modo isocrático.

Pesticida	Tiempo de retención (tr, min)	$\text{Log } k'^+$	$\text{Log } K_{ow}^*$
1. Metil paratión	5.975	0.620	2.86-3.00
2. Fenitrotión	7.840	0.763	3.16-3.43
3. Paratión	11.621	0.957	3.10-3.90
4. Clorfenvinfos	13.025	1.012	3.85-4.22
5. Diazinón	16.236	1.116	3.42-3.81
6. Etión	N.E	N.E	4.19-5.07
7. Fenclorfos	N.E	N.E	4.88-5.07
8. Clorpirifos	N.E	N.E	4.96-5.20
9. Carbofenotión	N.E	N.E	4.75-5.12

*Reportados en: (Finizio et al., 1997) y (Serrano et al., 1997)

N.E: No establecido

$^+t_o = 1.155 \text{ min}$

De esta forma se decidió acondicionar el sistema cromatográfico con una relación de fase móvil 65:35 v/v metanol:agua y llevar a cabo un gradiente lineal creciente de esta composición de metanol hasta el 100 % de metanol durante un tiempo de 20 min. En la **tabla 5.2** se indican los tiempos de retención de los primeros cinco OFFs con una fase

móvil 65:35 v/v metanol:agua en el modo isocrático, así como sus factores de retención (k') y los coeficientes de reparto octanol-agua (K_{ow}).

El coeficiente de reparto octanol-agua, K_{ow} , es una constante que refleja la hidrofobicidad de los compuestos por lo que es una medida de cómo una sustancia química puede distribuirse entre dos disolventes inmiscibles; el agua (es disolvente polar) y el octanol (es disolvente relativamente no polar, que representa a las grasas).

Los plaguicidas con una vida media y un K_{ow} altos pueden acumularse en tejido graso y bioacumularse a lo largo de la cadena alimenticia. Tomando como referencias los valores del $\text{Log } K_{ow}$ es posible predecir el orden de elución de los 9 OFFs en una columna C_{18} .

El metil paratión (con $\text{Log } K_{ow}$ entre 2.86 y 3.00 - **tabla 5.2**) presenta menor retención en la fase estacionaria y por lo tanto será el primer OFF en eluirse cuando se aplican las metodologías de extracción basadas en los principio de retención mediante el uso de adsorbentes, de tal forma que cuando la fuerza de elución del disolvente, esté por encima de la fuerza de adsorción del analito éste eluirá del sistema de extracción. Caso contrario sucede con los 2 últimos OFFs (clorpirifos y carbofenotión, con $\text{Log } K_{ow}$ entre 4.75 y 5.20), que presentan mayor afinidad y por tanto mayor retención en la fase estacionaria y necesitarán un volumen mayor del disolvente para eluirse del mismo sistema de extracción.

En la **figura 5.2** se presenta un cromatograma con la separación analítica de los 9 OFFs aplicando las condiciones optimizadas de composición de fase móvil y gradiente lineal de 65:35 v/v metanol:agua a 100 % de metanol en 20 min.

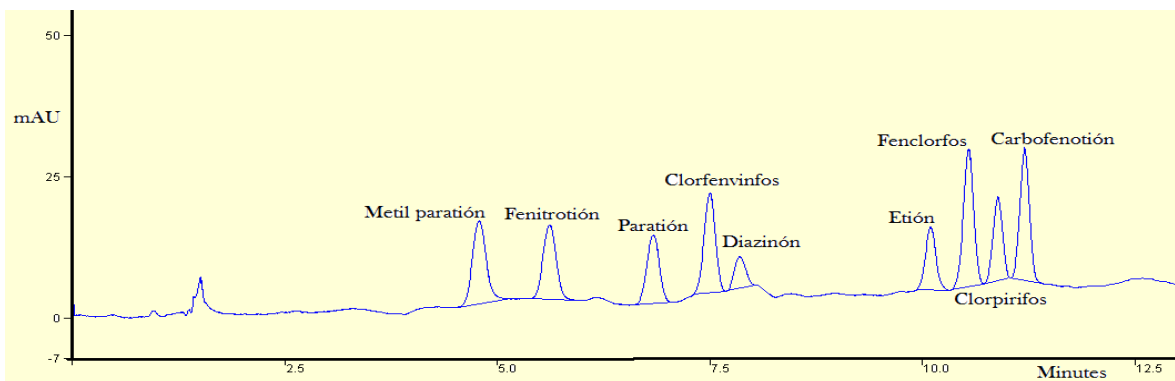


Figura 5.2. Cromatograma de una disolución estándar de 10 mg L^{-1} de la mezcla de los 9 OFFs. Elución por gradiente lineal desde 65:35 v/v metanol:agua hasta 100 % de metanol en 20 min. Columna analítica RES-ELUT C_{18} ($5 \mu\text{m} \times 150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) a un flujo de 1.0 mL min^{-1} y $\lambda = 220 \text{ nm}$ con corrección en la línea base. Volumen de inyección $20 \mu\text{L}$.

5.1.2. Validación del sistema cromatográfico para OFFs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación

Con las condiciones anteriormente optimizadas respecto a la separación cromatográfica de los plaguicidas se llevó a cabo el proceso de validación del sistema cromatográfico como fue descrito en la **sección 4.4.1.2**. Se elaboraron las curvas de calibración relacionando el *área de pico cromatográfico (en unidades arbitrarias UA)* con *la concentración de cada OFF (en mg L^{-1})* para definir la linealidad del sistema CLAR/DAD.

En la **tabla 5.3** se indican las respectivas ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación (**r**) para cada uno de los OFFs en estudio. Los valores de los coeficientes de correlación oscilaron entre $0.9976 < r < 0.9990$ indicando una respuesta lineal del detector DAD a las variaciones de las concentraciones respectivas. Por lo anterior, se puede indicar que existe una adecuada linealidad del sistema cromatográfico para un intervalo de concentraciones comprendido entre 1.0 y 25 mg L^{-1} .

En la **tabla 5.4** se presentan los C.V. % correspondientes para cada una de las disoluciones estándar inyectadas el mismo día. La repetibilidad del sistema cromatográfico, evaluado mediante los C.V. % indicaron valores iguales o inferiores al 3.4 % para $n = 3$.

Tabla 5.3. Ecuaciones lineales de calibración para los 9 OFFs en el sistema CLAR/DAD, por inyecciones sucesivas de disoluciones estándar entre 1.0 a 25.0 mg L⁻¹.

Plaguicida	Coefficiente de correlación (r)	Pendiente (m ± I.C)	Ordenada (b ± I.C)
1. Metil paratión	0.9989	3.304 ± 0.042	- 1.338 ± 0.066
2. Fenitrotión	0.9985	2.047 ± 0.031	- 0.724 ± 0.051
3. Paratión	0.9988	2.794 ± 0.037	- 0.956 ± 0.061
4. Clorfenvinfos	0.9976	2.235 ± 0.043	- 1.996 ± 0.071
5. Diazinón	0.9990	1.038 ± 0.013	0.359 ± 0.022
6. Etión	0.9988	1.342 ± 0.018	- 0.465 ± 0.029
7. Fenclorfos	0.9990	2.679 ± 0.037	- 1.051 ± 0.060
8. Clorpirifos	0.9990	1.309 ± 0.017	- 0.291 ± 0.028
9. Carbofenotión	0.9990	2.032 ± 0.030	- 1.225 ± 0.051

I.C= Intervalo de confianza

Tabla 5.4. Repetibilidad del sistema CLAR/DAD evaluada en términos de los C.V. % para cada nivel de concentración con n= 3.

Plaguicida/mg L ⁻¹	1.0	10.0	15.0	20.0	25.0
	C.V. %				
1. Metil paratión	3.2	0.9	1.2	1.9	1.3
2. Fenitrotión	2.8	1.9	0.8	2.6	1.6
3. Paratión	2.1	1.9	0.4	1.3	0.9
4. Clorfenvinfos	1.2	2.6	0.9	1.4	2.9
5. Diazinón	2.8	2.0	1.5	2.9	2.3
6. Etión	2.3	2.7	2.7	1.4	2.1
7. Fenclorfos	3.4	1.7	0.9	1.0	1.0
8. Clorpirifos	2.0	3.1	1.4	2.0	1.7
9. Carbofenotión	1.6	1.0	2.0	1.3	0.7

La precisión inter-día del sistema CLAR/DAD en días diferentes para dos niveles de concentración (1.0 y 25.0 mg L⁻¹) reportó valores de C.V. % iguales o inferiores al 4.0 %, valor que esta de acuerdo con el C.V. % para el sistema cromatográfico indicado por la “Food and Drug Administration” (C.V. % ≤ 5.0 %) (Shabir, 2003). En la **tabla 5.5** se presentan los respectivos C.V. % para los 9 OFFs cuando disoluciones estándar fueron inyectadas en días diferentes (n= 5).

Con base en los resultados de repetibilidad y de precisión inter-día, es posible indicar que el sistema cromatográfico CLAR/DAD presentó una adecuada precisión (C.V. % por debajo del 4.1 %, baja variabilidad) para un nivel de confianza del 95 %.

Tabla 5.5. Precisión inter-día del sistema CLAR/DAD evaluada en términos de los C.V. % para dos niveles de concentración con n= 5 realizado en días diferentes.

Plaguicida	Concentración (mg L ⁻¹)	
	1.0	25.0
	C.V. %	
1. Metil paratión	1.5	1.2
2. Fenitrotión	2.6	1.1
3. Paratión	2.7	1.2
4. Clorfenvinfos	1.3	1.0
5. Diazinón	2.3	1.4
6. Etión	2.0	1.5
7. Fenclorfos	4.0	1.1
8. Clorpirifos	1.7	1.3
9. Carbofenotión	1.6	1.7

La sensibilidad del sistema CLAR/DAD puede analizarse mediante los valores obtenidos de las pendientes de las curvas de calibración linealizadas aplicando el método de mínimos cuadrados. El metil paratión presentó la mayor pendiente seguida del paratión y del fenclorfos; por el contrario, diazinón y etión presentaron los valores más bajos. Este comportamiento fue confirmado con los valores de LDE que también son un indicio de la sensibilidad del sistema de medida. En la **tabla 5.6** se presenta los correspondientes valores de LDE y LCE de los 9 OFFs según el procedimiento indicado en la **sección 4.4.1.2**.

Los valores de los LDE oscilaron entre 0.1 y 0.5 mg L⁻¹ correspondientes a los límites absolutos de 2 a 10 ng de OFFs detectables según la relación S/N= 3. El metil paratión presentó el LDE más bajo (0.1 mg L⁻¹), nuevamente seguido del paratión y fenclorfos, este comportamiento está de acuerdo con los valores de pendientes encontrados para cada uno de los plaguicidas en las respectivas curvas de calibración. Con el sistema CLAR/DAD se pueden cuantificar, con exactitud, concentraciones iguales o mayor de 1.0 mg L⁻¹ para todos los OFFs.

Tabla 5.6. Límites de detección y cuantificación experimentales del sistema CLAR/DAD, S/N= 3 y S/N= 10 respectivamente. Volumen de inyección: 20 μ L.

Plaguicida	LDE (mg L ⁻¹)	LDA* (ng)	LCE (mg L ⁻¹)
1. Metil paratión	0.1	2.0	0.5
2. Fenitrotión	0.4	8.0	0.8
3. Paratión	0.2	4.0	0.6
4. Clorfenvinfos	0.3	6.0	0.8
5. Diazinón	0.5	10.0	0.9
6. Etión	0.4	8.0	0.8
7. Fenclorfos	0.2	4.0	0.6
8. Clorpirifos	0.4	8.0	0.9
9. Carbofenotión	0.3	6.0	0.9

*LDA: Límites de detección absolutos (masa detectable)

5.2 Miniaturización de la metodología de extracción DMFS para OFFs fuera de línea

5.2.1 Miniaturización de las cantidades muestra:adsorbente por DMFS sin y con muestras de hígado

Siguiendo el procedimiento descrito en la sección experimental **4.4.2** se realizaron ensayos preliminares de la DMFS sin muestra de hígado; para ello se fortificaron 2.00 g de sílice C₁₈ con 20 μ L de una disolución estándar de 500 mg L⁻¹ de los 9 OFFs y se llevó a cabo el procedimiento de limpieza y posterior elución de los plaguicidas como se describió en las figuras de la **sección 4.4.2.1**. En este primer ensayo se aplicó una secuencia de limpieza y de elución previamente optimizada en el laboratorio y reportada en un trabajo anterior (*Reyes-Reyes, 2006*), los resultados de recobros obtenidos aplicando la secuencia en este trabajo se presentan en la **tabla 5.7**.

Cabe mencionar que los 20 mL de agua iniciales en la secuencia de limpieza fueron requeridos para la eliminación de interferentes de tipo polar presentes en las muestras reales; posteriormente se aumentó la fuerza de elución con acetonitrilo (al 25:75 y 60:40 v/v), el cual fue empleado con el fin de eliminar interferentes de menor polaridad.

La elución de los OFFs se realizó con acetonitrilo al 100 %, encontrándose un volumen óptimo para esta última operación de 5.0 mL; sin embargo, se adicionó un mililitro adicional para evitar posibles retenciones de los últimos 4 OFFs en el sistema de

Tabla 5.7. Aplicación del método de *Reyes-Reyes*. Recobros de la secuencia de limpieza y posterior elución de los 9 OFFs de un cartucho de DMFS con 2.00 g de sílice C₁₈ sin muestra y fortificación con 10 µg de cada OFF. (*Reyes-Reyes, 2006*).

Plaguicida	Limpieza	Limpieza	Limpieza	Elución						Recobro Global (%)
	Agua	ACN:Agua 25:75 v/v	ACN:Agua 60:40 v/v	ACN 100 %						
	20 mL	3 mL	1 mL	Fracciones de 1mL						
				1	2	3	4	5	6	
1. Metil paratión	N.I.	N.D.	N.D.	42	48	11	N.D.	N.D.	N.D.	101
2. Fenitrotión	N.I.	N.D.	N.D.	37	50	12	N.D.	N.D.	N.D.	99
3. Paratión	N.I.	N.D.	N.D.	12	44	22	19	N.D.	N.D.	97
4. Clorfenvinfos	N.I.	N.D.	N.D.	28	44	17	8	N.D.	N.D.	97
5. Diazinón	N.I.	N.D.	N.D.	23	37	33	9	N.D.	N.D.	102
6. Etión	N.I.	N.D.	N.D.	N.D.	34	24	19	24	N.D.	101
7. Fenclorfos	N.I.	N.D.	N.D.	N.D.	48	23	16	11	N.D.	98
8. Clorpirifos	N.I.	N.D.	N.D.	N.D.	39	22	19	16	N.D.	96
9. Carbofenotión	N.I.	N.D.	N.D.	N.D.	36	31	15	15	N.D.	97

NI= No inyectado, ND= No detectado

extracción. Con esta secuencia se lograron obtener porcentajes de recuperación entre un 96 y 101 %.

En la **figura 5.3** se presenta el frente de elución de los 9 OFFs con ACN al 100 % desde un cartucho de DMFS con 2.0 g de adsorbente. Puede observarse que la elución de los últimos 4 OFFs es más lenta (frentes más extendidos) respecto a los primeros plaguicidas; el volumen de ACN al 100 % requerido para la elución cuantitativa de los analitos fue de 5.0 mL; sin embargo se adiciona un mililitro de seguridad después del volumen total de elución para asegurar la total desadsorción de los analitos, por lo anterior se realizaron eluciones de los OFFs con 6.0 mL de ACN al 100 %.

Con los resultados anteriormente descritos se procedió a evaluar la secuencia de elución a partir muestras de hígado previamente fortificadas con la disolución estándar de 500 mg L⁻¹ de los 9 OFFs; en la **tabla 5.8** se presentan los porcentajes de recuperación cuando la muestra de hígado se encontraba presente en el cartucho de dispersión. Con la metodología de extracción aplicada se obtuvieron valores de recuperación entre 96 y 101 % para los OFFs en el eluato de acetonitrilo al 100 %.

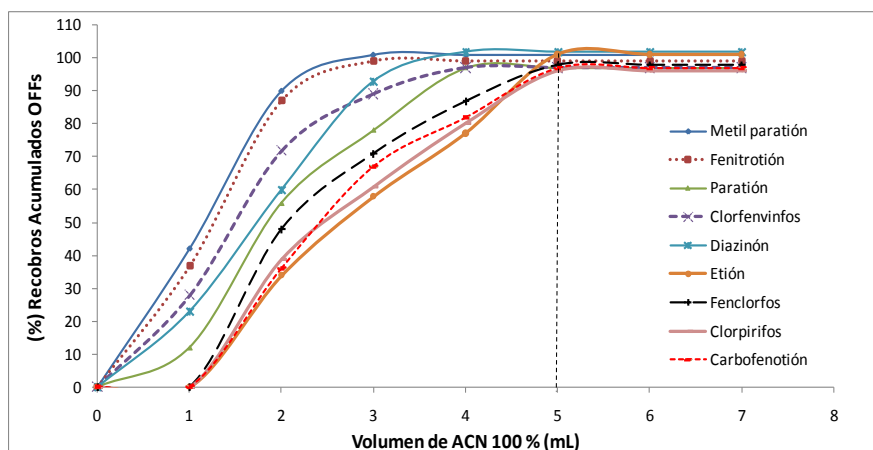


Figura 5.3. Frente de elución de 9 OFFs de un cartucho de dispersión de 2.0 g de sílice C_{18} , sin muestra, fortificada con $10 \mu\text{g}$ de cada OFF. Elución con ACN al 100 % y aplicando la secuencia descrita en la **tabla 5.7**.

Tabla 5.8. Recobros de la secuencia de limpieza y de elución de los 9 OFFs a partir de un cartucho de DMFS, con 0.500 g de hígado homogeneizado en 2.000 g de sílice C_{18} . Fortificación: $60 \mu\text{g g}^{-1}$.

Plaguicida	Limpieza	Limpieza	Limpieza	Elución
	Agua 20.0 mL	ACN 25:75 v/v 3.0 mL	ACN 60:40 v/v 1.0 mL	ACN 100 % 6.0 mL
1. Metil paratión	N.I	N.D	N.D	100
2. Fenitrotión	N.I	N.D	N.D	99
3. Paratión	N.I	N.D	N.D	97
4. Clorfenvinfos	N.I	N.D	N.D	96
5. Diazinón	N.I	N.D	N.D	98
6. Etión	N.I	N.D	N.D	98
7. Fenclorfos	N.I	N.D	N.D	98
8. Clorpirifos	N.I	N.D	N.D	101
9. Carbofenotión	N.I	N.D	N.D	98

NI: No inyectado. ND: No detectado

Posteriormente, se realizaron ensayos para la evaluación de la precisión y exactitud de la metodología de extracción de los 9 OFFs en muestras de hígado partiendo de 0.500 g de muestra homogeneizada con 2.000 g de sílice C_{18} como adsorbente y

fortificando a $60 \mu\text{g g}^{-1}$ con la mezcla de plaguicidas. En la **tabla 5.9** se detalla la repetibilidad promedio del método de extracción por DMFS y sus respectivos C.V. % con muestras de hígado.

Tabla 5.9. Precisión en los recobros de OFFs al aplicar la DMFS a muestras de hígado homogeneizado (0.500 g) en 2.000 g de sílice C_{18} y fortificadas a $60 \mu\text{g g}^{-1}$ de OFFs. $n= 3$.

Plaguicida	Porcentaje de recobro	C.V. %
1. Metil paratión	99	1
2. Fenitrotión	96	2
3. Paratión	97	1
4. Clorfenvinfos	91	1
5. Diazinón	98	1
6. Etión	96	1
7. Fenclorfos	99	1
8. Clorpirifos	97	2
9. Carbofenotión	97	1

El coeficiente de variación fue menor o igual a 2 % por lo que el método de extracción presenta buena repetibilidad y exactitud (recobros entre el 91 y 99 %). Con este primer método de extracción y demostrando su aplicabilidad con los parámetros de precisión y exactitud reportados, se procedió a realizar la miniaturización de las cantidades de muestra y adsorbente manteniendo siempre constante la relación (1:4) de masas entre ellas. Los volúmenes de elución de los disolventes de limpieza y recuperación final de los analitos se optimizaron en cada caso estudiado.

Tomando como referencia los primeros resultados obtenidos para un tamaño de muestra de 0.500 g y una secuencia de limpieza de 20 mL de agua, 3.0 mL de ACN:Agua al 30:70 v/v, 1.0 mL de ACN:Agua al 60:40 v/v y de elución con 6.0 mL de ACN al 100 %, se procedió a optimizar los volúmenes y la relación de la mezcla de disolventes ACN:Agua, con el fin de eliminar la mayor cantidad de interferentes presentes en la muestra de hígado sin pérdida significativa de los analitos por fuga en los eluentes de lavado.

Para cada tamaño de muestra estudiado se ajustaron los volúmenes respectivos. De acuerdo con la **tabla 4.2 - sección experimental**, se realizaron 3 experimentos para un

tamaño de muestra de 0.1250 g (ensayo 2), los resultados mostraron que las relaciones de disolventes para la limpieza de interferentes más apropiadas fueron de 30:70 v/v (V_1) y 40:60 v/v (V_2) ACN:Agua. La posterior elución de los OFFs se realizó con la mezcla ACN:Agua en relación 80:20 v/v ($V_{\text{elución}}$), en lugar del acetonitrilo puro, tratando de minimizar la elución de interferentes desde la matriz en el posterior acople. Los volúmenes optimizados para cada relación de muestra:adsorbente se presentan en la **tabla 5.10**.

Tabla 5.10. Programa de limpieza y elución para los 9 OFFs con diferentes tamaños de muestra y adsorbente C_{18} . V_1 : ACN:Agua al 30:70 v/v; V_2 : ACN:Agua al 40:60 v/v; $V_{\text{elución}}$: ACN:Agua al 80:20 v/v.

Ensayo	Muestra (g)	Adsorbente C_{18} (g)	V_{H_2O} (mL)	V_1 (mL)	V_2 (mL)	$V_{\text{elución}}$ (mL)
1	0.5000	2.00	20.0*	3.0*	1.0*	6.0*
2	0.1250	0.50	5.0	3.0	1.0	4.0
3	0.0620	0.25	2.5	1.5	0.5	3.0
4	0.0500	0.20	2.0	0.6	0.4	1.0

* V_{H_2O} : Volumen de agua, V_1 : ACN:Agua 30:70 v/v, V_2 : ACN:Agua 60:40 v/v, $V_{\text{elución}}$: ACN 100 %

A medida que el tamaño de la muestra disminuyó fue necesario ajustar los volúmenes de las disoluciones de limpieza (ACN:Agua al 30:60 v/v y ACN:Agua a 40:60 v/v) así como el volumen del ACN:Agua al 80:20 v/v para la elución cuantitativa de los OFFs. Utilizando la información suministrada por los frentes de elución fue posible optimizar cada secuencia de limpieza y elución de los analitos.

En la **figura 5.4** se presenta el frente de elución para los 9 OFFs a partir de un cartucho de DMFS que contenía 0.500 g de sílice C_{18} . Al disminuir la cantidad de adsorbente de 2.0 a 0.5 g se observaron volúmenes de fuga más bajos para los últimos 4 OFFs, pues a partir del primer mililitro de ACN:Agua al 80:20 v/v todos los OFFs iniciaron la elución; caso contrario a lo observado en el frente de elución presentado para un tamaño de adsorbente de 2.0 g (**figura 5.3**). La elución cuantitativa de los 9 OFFs a partir de un cartucho de DMFS para un tamaño de sílice C_{18} de 0.50 g fue de 3 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v, (más un mililitro de seguridad: 4.0 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v).

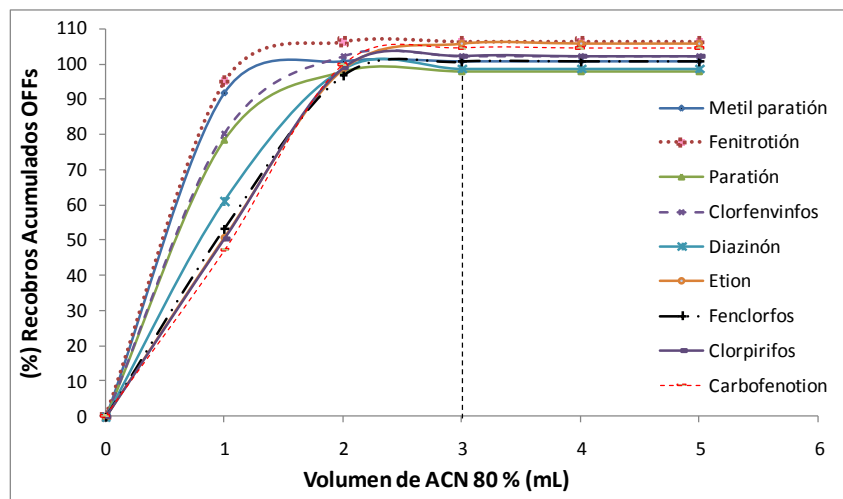


Figura 5.4. Frente de elución de 9 OFFs de un cartucho de dispersión con 0.50 g de sílice C_{18} , sin muestra, fortificado con $10 \mu\text{g}$ de cada OFF. Elución con ACN:Agua al 80:20 v/v y aplicando la secuencia descrita en la **tabla 5.10**.

Continuado con este mismo análisis se optimizó para un tamaño de muestra de 0.050 g la elución cuantitativa de los OFFs con un volumen de 1.0 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v. El parámetro de calidad analítica utilizado para evaluar el efecto de la disminución del tamaño de muestra sobre la precisión y exactitud del método con y sin muestra fue el C.V. % cuyos valores se presentan en las **tablas 5.11 y 5.12**.

En general, los C.V. % aumentan a medida que el tamaño de muestra disminuye, este comportamiento es de esperarse pues la extracción de los compuestos en pequeñas matrices es menos repetitiva a medida que disminuye el tamaño de muestra, además de existir el error asociado al muestreo; sin embargo, los valores de C.V. % obtenidos son inferiores o iguales al 6 %; este valor es considerado aceptable en muestras complejas según la *European Commission Decision 2002/657/EC/2002*, la cual considera que un método es preciso cuando sus C.V. % son inferiores al 20 % y presenta porcentajes de extracción entre el 80 y el 110 %.

Tabla 5.11. Recobros y C.V. % por aplicación de la DMFS sin muestras de hígado para diferentes cantidades de adsorbente sílice C₁₈. n= 3.

Plaguicida	Diferentes cantidades de adsorbente (g)			
	2.000	0.500	0.250	0.200
	Recobros (%) (± C.V. %)			
1. Metil paratión	94 (± 1)	101 (± 3)	99 (± 4)	91 (± 6)
2. Fenitrotión	97 (± 2)	106 (± 3)	103 (± 3)	94 (± 6)
3. Paratión	96 (± 1)	98 (± 2)	99 (± 3)	91 (± 4)
4. Clorfenvinfos	95 (± 1)	102 (± 5)	101 (± 5)	93 (± 6)
5. Diazinón	95 (± 2)	99 (± 3)	90 (± 5)	94 (± 6)
6. Etión	97 (± 3)	98 (± 2)	98 (± 5)	95 (± 7)
7. Fenclorfos	102 (± 2)	97 (± 3)	99 (± 4)	94 (± 5)
8. Clorpirifos	102 (± 1)	99 (± 4)	98 (± 6)	91 (± 6)
9. Carbofenotión	102 (± 1)	100 (± 2)	98 (± 5)	92 (± 6)

Tabla 5.12. Recobros y C.V. % por aplicación de la DMFS con muestras de hígado para diferentes tamaños de muestra y adsorbente (1:4). Réplicas n= 3.

Plaguicida	Diferentes tamaños de muestra*			
	0.500	0.125	0.0625	0.050
	Recobros (%) (± C.V. %)			
1. Metil paratión	99 (± 1)	97 (± 4)	96 (± 4)	96 (± 4)
2. Fenitrotión	96 (± 2)	99 (± 3)	99 (± 4)	99 (± 5)
3. Paratión	97 (± 1)	99 (± 1)	99 (± 2)	98 (± 2)
4. Clorfenvinfos	91 (± 1)	95 (± 1)	98 (± 3)	101 (± 4)
5. Diazinón	98 (± 1)	98 (± 4)	94 (± 6)	99 (± 6)
6. Etion	96 (± 1)	99 (± 1)	95 (± 2)	99 (± 4)
7. Fenclorfos	99 (± 1)	100 (± 2)	95 (± 4)	100 (± 4)
8. Clorpirifos	97 (± 2)	100 (± 3)	97 (± 4)	98 (± 6)
9. Carbofenotión	97 (± 1)	98 (± 2)	100 (± 4)	99 (± 5)

*Los niveles de fortificación para cada tamaño de muestra se encuentran en la **tabla 4.1. Sección experimental**

Los recobros obtenidos para los 9 OFFs mediante la aplicación de la DMFS con y sin muestra fueron cuantitativos, los valores van desde el 91 % (± 4 % C.V.) hasta 106 % (± 3 % C.V.) para las extracciones realizadas sin muestra (**tabla 5.11**) y desde 91 % (± 1 % C.V.) hasta 101 % (± 4 % C.V.) para las extracciones realizadas con muestras de hígado previamente fortificadas (**tabla 5.12**). Por lo anterior, se puede indicar que el método de extracción, en las condiciones anteriormente descritas, presenta una adecuada precisión y

exactitud para ser aplicado en un intervalo de tamaños de muestra de hígado que va desde los 0.500 hasta los 0.050 g sin perder calidad analítica en el modo fuera de línea.

Para el tamaño de muestra de 0.050 g y 0.200 g de adsorbente la secuencia de limpieza fue: 2.0 mL de agua, 0.6 mL de ACN:Agua al 30:70 v/v, 0.4 mL de ACN:Agua al 40:60 v/v y elución de los OFFs con un volumen de 1.0 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v; esta secuencia fue utilizada en los ensayos posteriores.

5.2.2 Limpieza del extracto con sílice virgen “clean up” fuera de línea

Una vez optimizadas las secuencias de limpieza y de elución de los OFFs con muestras de hígado (los extractos hasta el momento obtenidos fueron incoloros y libres de partículas), se evaluó el efecto de incluir en el fondo del cartucho de DMFS una co-columna de sílice virgen “clean-up” para eliminar compuestos interferentes presente en el extracto (principalmente de tipo polar observados en los cromatogramas).

La cantidad de sílice empleada para cada tamaño de muestra fue optimizada teniendo en cuenta la disminución en los valores de recobros y el porcentaje de retención de los analitos. En la **tabla 5.13** se presentan los porcentajes de OFFs retenidos en la co-columna de sílice virgen colocada en el fondo del cartucho de DMFS para cada relación de muestra y adsorbente de dispersión (C₁₈).

Tabla 5.13. Porcentajes de adsorción y recobros de los OFFs al incorporar una co-columna de sílice virgen en el cartucho de DMFS.

Muestra (g)	Adsorbente sílice C ₁₈ (g)	Sílice virgen(g)	*(% Adsorción de OFFs	Recobros (%)
0.5000	2.0000	0.500	0.1-4.0	95 - 104
0.1250	0.5000	0.500	0.9-4.9	95 - 99
0.0625	0.2500	0.200	1.0-5.9	87 - 99
0.0625	0.2500	0.100	0.3-6.3	90 - 104
0.0500	0.2000	0.050	0.3-7.1	90 - 101

*(% Adsorción: Recobros obtenidos sin co-columna – Recobros obtenidos con co-columna

De acuerdo con los porcentajes de adsorción de los OFFs en la sílice virgen para cada relación de muestra:adsorbente de dispersión (C_{18}) fue posible optimizar la cantidad de sílice que permitiera la eliminación de algunos interferentes y mantuviese los recobros cuantitativos. La retención máxima de los OFFs en la co-columna de sílice virgen fue del 7.1 % para un tamaño de muestra de 0.050 g, este valor es considerado como muy bajo porque afecta poco a los valores de recobros, que oscilaron entre 90 y 101 % y se consideran cuantitativos.

Solo para el tamaño de muestra de 0.0625 g fue necesario ajustar la cantidad de sílice virgen en la co-columna de 0.200 a 0.100 g para evitar la adsorción del metil paratión en el sistema y de esta forma mantener su recobro en 90 %. En la **figura 5.5** se observan los cromatogramas de un extracto de hígado (0.050 g) a diferentes longitudes de onda, obtenido al aplicar la DMFS bajo las condiciones hasta el momento optimizadas.

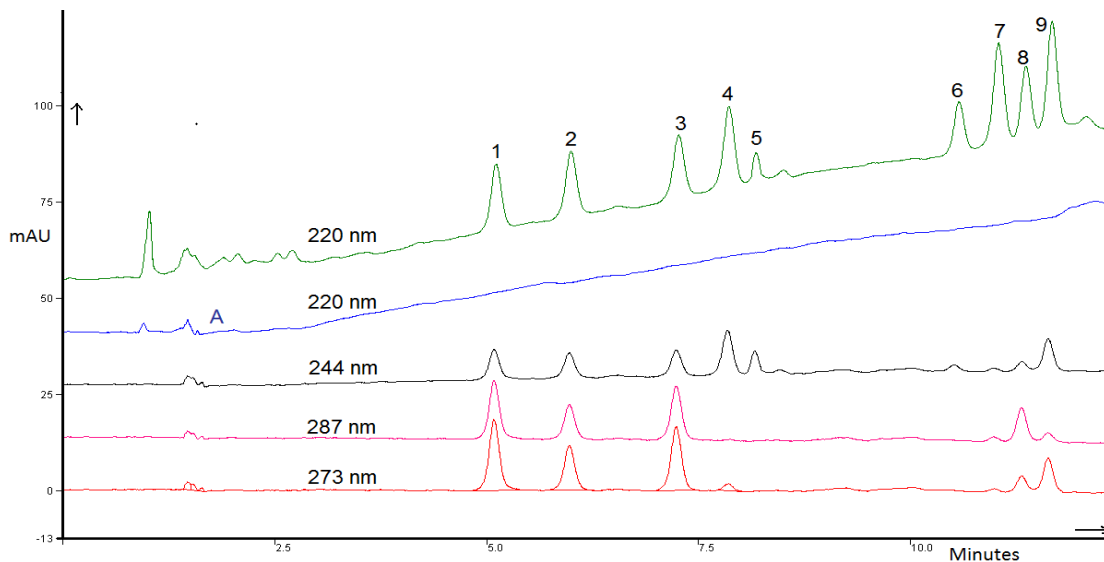


Figura 5.5. Cromatogramas de un extracto de muestra de hígado (0.050 g) homogeneizada en 0.200 g de sílice C_{18} y con una co-columna de 0.050 g de sílice virgen, a diferentes longitudes de onda. Muestra fortificada a $200 \mu\text{g g}^{-1}$ de OFFs. Fase móvil: metanol:agua 65:35 v/v en gradiente lineal a 100 % de metanol. **A.** Muestra de hígado sin fortificación a 220 nm. 1. Metil paratión. 2. Fenitrotión. 3. Paratión. 4. Clorfenvinfos. 5. Diazinón. 6. Etión. 7. Fenclorfos. 8. Clorpirifos. 9. Carbofenotión.

Los picos cromatográficos presentan una adecuada resolución además de muy bajas interferencias registradas a 220 nm; a esa longitud de onda se esperaba que existiera el mayor número de interferentes espectrales debido a las contribuciones espectroscópicas de moléculas orgánicas en esta zona.

5.3 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para OFFs

Hasta el momento todos los resultados obtenidos para la extracción de los OFFs se realizaron en el modo fuera de línea “*off-line*”, es decir, todas las extracciones fueron realizadas en un cartucho de polipropileno y el extracto final fue inyectado posteriormente al sistema cromatográfico. A continuación se discuten los resultados obtenidos cuando se utilizó la EFS (**figura 4.2-sección experimental**) como mecanismo de pre-concentración de los contaminantes analizados con el fin de aumentar la sensibilidad del sistema y la viabilidad del acople entre la DMFS y la CLAR.

5.3.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs

El efecto del adsorbente en el proceso de pre-concentración de los OFFs fue evaluado en términos de la resolución cromatográfica de los analitos en estudio. De acuerdo con los resultados mostrados en la **figura 5.6**, la separación cromatográfica de los 9 OFFs fue adecuada cuando se utilizó como adsorbentes la sílice C₁₈ de 10 µm y el polímero bondesil env de 40 µm, el caso contrario fue observado con el polímero de PLRP-S 100 Å de 10-15 µm en el cual se presentó una mala resolución y pobre gaussianidad, además de problemas de solubilidad.

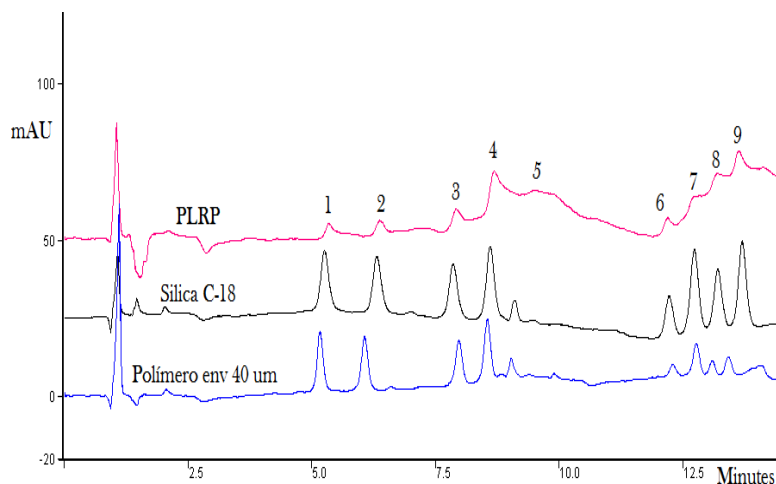


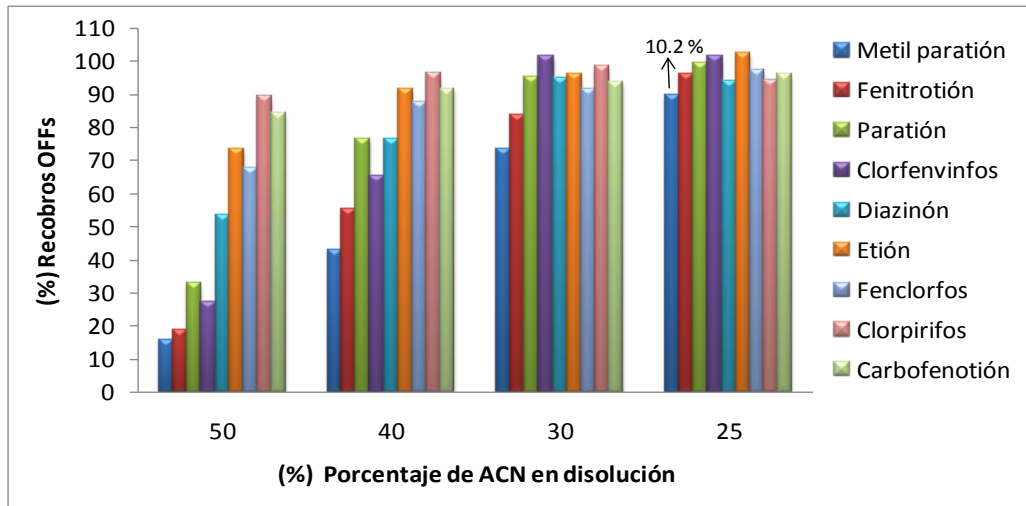
Figura 5.6. Cromatogramas de una disolución de los 9 OFFs pre-concentrada en el sistema EFS-CLAR/DAD (**figura 4.2-sección experimental**) en diferentes adsorbentes, $\lambda = 220$ nm. 1. Metil paratión. 2. Fenitrotión. 3. Paratión. 4. Clorfenvinfos. 5. Diazinón. 6. Etión. 7. Fenclorfos. 8. Clorpirifos. 9. Carbofenotión.

Este comportamiento se debe muy posiblemente a los procesos de reparto y adsorción diferentes que se llevan a cabo en la fase de pre-concentración del sistema de EFS y en la columna analítica del sistema cromatográfico. Teniendo como base los resultados obtenidos, se continuaron los experimentos de optimización de la pre-concentración con el polímero bondesil env de $40 \mu\text{m}$ y la sílice C_{18} de $10 \mu\text{m}$.

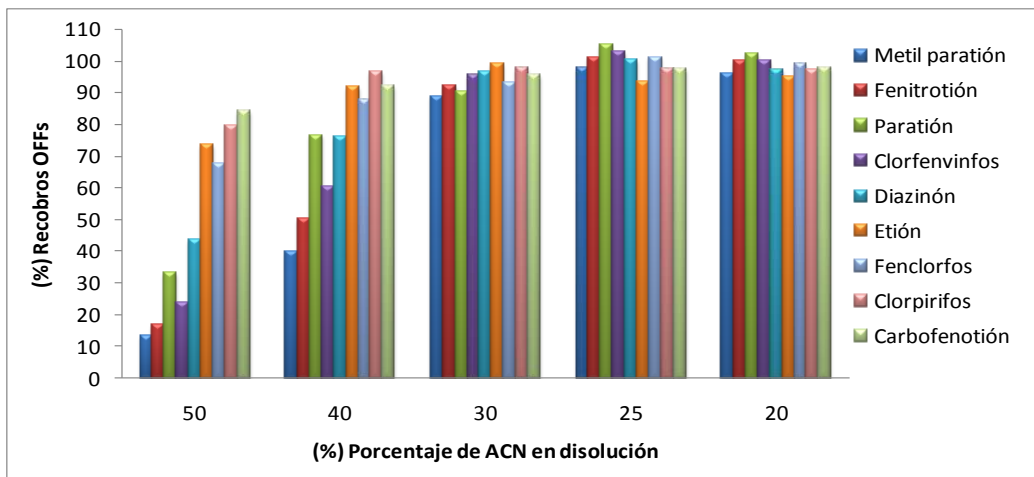
5.3.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente del extracto DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs

Teniendo en cuenta que los adsorbentes empleados en la EFS tienen características apolares, la retención de los analitos en estudio debe realizarse con una proporción de disolvente orgánico baja para que permita la retención cuantitativa de los mismos, razón por la cual el extracto de la DMFS de 1.0 mL constituido de ACN:Agua al 80:20 v/v (conteniendo a los OFFs) presenta una fuerza de elución muy alta para lograr la retención cuantitativa de los analitos antes mencionada cuando se aplica a una pre-columna EFS. Por lo tanto, se necesitó diluir los extractos antes de la pre-concentración, para lo cual se realizó el siguiente ensayo.

- *Dilución del extracto proveniente del cartucho de dispersión con agua:* al adicionar diferentes volúmenes de agua al volumen de 1.0 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v que proviene del cartucho de DMFS y que contiene a los OFFs, se observó una retención cuantitativa al pre-concentrar las disoluciones en un primer tiempo en el polímero de bondesil por EFS, posteriormente en la sílice C₁₈. En la **figura 5.7.a** se indican los recobros para los plaguicidas a diferentes porcentajes de ACN en el polímero bondesil-env.



a



b

Figura 5.7. Porcentajes de recuperación de los OFFs vs. Porcentaje de ACN en disolución. Dilución del volumen de 1.0 mL proveniente del cartucho de DMFS (al 80:20 v/v de ACN:Agua) con diferentes volúmenes de agua (3.0, 2.2, 1.6, 1.0 y 0.6 mL). **a.** Con el polímero bondesil env 40 µm. **b.** Con la sílice C₁₈ nucleosil 10 µm. Pre-concentración de disoluciones de 0.2 mg L⁻¹ de OFFs a un caudal de 1.0 mL min⁻¹.

Se observa en las gráficas que al diluirse el extracto con agua, predomina la fuerza de adsorción de los OFFs en el polímero respecto a la afinidad por el disolvente y de esta forma su pre-concentración es cuantitativa. Sin embargo en los cromatogramas se detectó una fuga del metil paratión del 10 % (es decir, el plaguicida empieza a eluirse de la pre-columna de pre-concentración, hacia residuos, a una relación de ACN:Agua de 25:75 v/v) registrándose además la disminución de la calidad cromatográfica en los picos.

Por lo anterior se optó por emplear la sílice C₁₈ como fase de pre-concentración en la EFS a diferentes porcentajes de ACN. Los resultados se presentan en la **figura 5.7.b**. En este caso en los cromatogramas no se registraron comportamientos que indicaran la presencia de fugas de los plaguicidas (elución de los analito de la pre-columna con sílice C₁₈) al pre-concentrar las disoluciones de OFFs diluidas con el porcentaje de ACN apropiado.

De acuerdo con lo anterior, un porcentaje ACN:Agua comprendido entre el 20:80 y el 25:75 v/v produce recobros cuantitativos de los analitos en estudio (entre 93 y 105 %), además de presentar C.V. % inferiores al 9 %, lo cual confirma la precisión de la metodología de pre- concentración mediante la EFS acoplada en línea a la CLAR/DAD.

Para realizar una pre-concentración cuantitativa de los OFFs provenientes del cartucho de DMFS en una pre-columna rellena de sílice C₁₈ fue necesario diluir el extracto (1.0 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v) con aproximadamente 2.2 mL de agua y de esta forma alcanzar la retención cuantitativa, sin fugas detectables.

5.3.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los OFFs

Una vez establecida la proporción de ACN requerida para el proceso de pre-concentración de los OFFs en una pre-columna con sílice C₁₈, la cual se encuentra acoplada al sistema cromatográfico, el paso siguiente consistió en evaluar el efecto del caudal de pre-concentración sobre los valores de los recobros cuando se trabajó con concentraciones bajas y altas. En la **figura 5.8** se presentan los recobros de los 9 OFFs

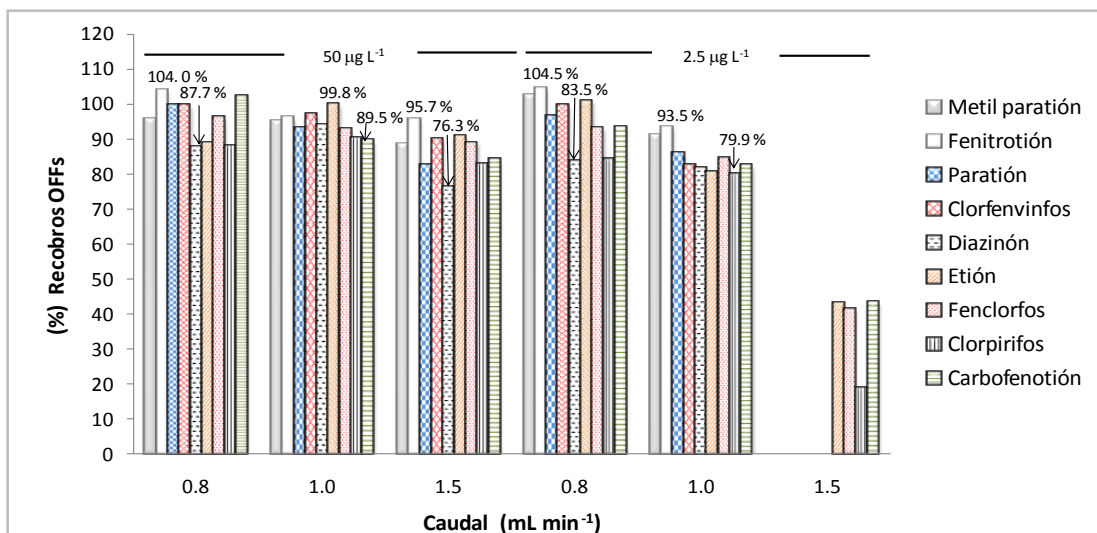


Figura 5.8. Efecto del caudal de pre-concentración en el sistema EFS-CLAR/DAD, sobre los valores de recobros en: disoluciones de OFFs en ACN:Agua al 25:75 v/v para concentraciones bajas ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) y altas ($50 \mu\text{g L}^{-1}$).

cuando se pre-concentraron disoluciones a diferentes caudales en el sistema EFS-CLAR/DAD.

El efecto del caudal sobre la retención de los OFFs a concentraciones altas ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) muestra disminuciones de los valores de recobros en la pre-concentración que van desde el 88 % al 76 % para el diazinón y del 104 al 96 % para el fenitrotión a medida que el caudal aumenta. Este comportamiento es más evidente a concentraciones menores ($2.5 \mu\text{g L}^{-1}$) donde, con un caudal de 1.5 mL min^{-1} , los primero 5 OFFs (de mayor polaridad) no fueron detectados en el sistema cromatográfico- detector UV. Los equilibrios entre la fase (sílice C_{18}) y los analitos son evidentemente afectados por el caudal de pre-concentración; solo a 0.8 mL min^{-1} fue posible mantener una retención cuantitativa de los 9 OFFs de forma reproducible para concentraciones altas y bajas.

5.4 Acople de un cartucho en acero inoxidable (cartucho de DMFS) a una bomba *Eldex* y válvula selectora de disolventes

Tomando como referencia los resultados obtenidos en la miniaturización de la DMFS para una cantidad de muestra de 0.050 g y 0.200 g de sílice C_{18} , (en la cual fue necesario realizar una limpieza con 2.5 mL de agua, 0.60 mL de ACN:Agua al 30:70 v/v,

0.40 mL de ACN:Agua al 40:60 v/v y posterior desorción de los OFFs con 1.0 mL de ACN:Agua al 80:20 v/v, co-columna de sílice virgen de 0.050 g), se continuó con la etapa de acoplamiento entre un cartucho de DMFS de acero inoxidable a la EFS y al sistema cromatográfico (**figura 4.3- sección experimental**).

Los resultados obtenidos para los cinco ensayos realizados (**tabla 4.5-sección experimental**) con el cartucho en acero inoxidable y sin muestra de hígado, se indican en la **figura 5.9**. En términos generales los recobros para los 9 OFFs fueron aumentando a medida que el volumen de ACN:Agua al 80:20 v/v se incrementó de 1.0 a 3.0 mL, este efecto fue más significativo para el diazinón, el cual presentó recobros de 64 y 79 % respectivamente.

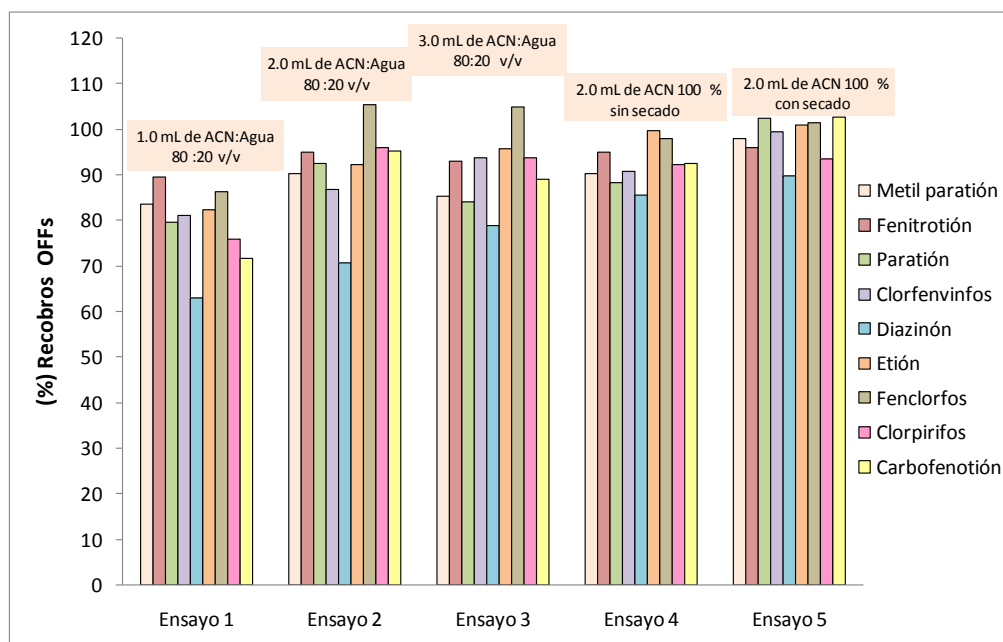


Figura. 5.9. Recobros de los OFFs a partir del cartucho de DMFS en acero inoxidable (**figura 4.3-sección experimental**) con diferentes secuencias de limpieza y de elución. Ensayos realizados simulando la DMFS sin muestra de hígado y fortificando 0.200 g de sílice C_{18} con 10 μ g de cada OFF.

El aumento en el volumen de ACN:Agua al 80:20 v/v facilitó la desadsorción de los OFFs a partir del cartucho de DMFS en acero inoxidable cuando éste se adaptó a una bomba *Eldex* (ensayos del 1 al 3). Por lo anterior se analizó el efecto del porcentaje de ACN en la desadsorción de los OFFs (ACN al 100 %) para incrementar los valores en los

recobros (ensayo 4). Los resultados indicaron que al aumentar la proporción de ACN efectivamente la desadsorción de todos los OFFs fue cuantitativa.

Cuando el cartucho de DMFS fue sometido a secado con vacío (ensayo 5) previo a la desadsorción con ACN al 100 %, se observó un leve aumento en los recobros. El proceso de eliminación de agua ayuda a la elución de los analitos retenidos; esta estrategia ha sido utilizada en algunas metodologías en las cuales se emplea $N_{2(g)}$ para el secado del cartucho de extracción (*Kristenson y Haverkate, 2001*); sin embargo, este procedimiento no es aconsejable en el momento de llevar a cabo el acople entre el cartucho DMFS y la pre-columna que contiene sílice C_{18} para el proceso de pre-concentración y de ésta al sistema cromatográfico, pues sería necesario adaptar un sistema de secado adicional en el montaje en línea que incrementaría costos instrumentales innecesarios.

En los ensayos 4 y 5 se eliminó la etapa de limpieza de 0.4 mL de ACN:Agua al 40:60 v/v, pues al aumentar el volumen de ACN:Agua al 30:40 v/v de 0.6 a 2.0 mL se realizó una sola etapa de limpieza empleando un volumen mayor sin fugas detectables de los OFFs de mayor polaridad. Por lo anterior, la secuencia en línea seleccionada para la limpieza y posterior elución de los OFFs desde el cartucho de DMFS en acero inoxidable, fue la siguiente:

1. Agua (2.5 mL)
2. ACN:Agua al 30 v/v (2.0 mL)
3. ACN al 100 % (2.0 mL)

La anterior secuencia, que corresponde al ensayo 4, fue aplicada a muestras de hígado previamente fortificadas con 10 μg de OFFs ($200 \mu\text{g g}^{-1}$ de muestra), obteniéndose recobros que oscilaron entre el 71 % (± 8 % C.V.) para el diazinón y el 100 % (± 4 % C.V.) para el etión.

5.5. Acople de la DMFS a EFS-CLAR/DAD

Tomando como base los resultados anteriores, se prosiguió con el estudio de tres diferentes prototipos que permitieran el acople de la DMFS a la EFS y al sistema cromatográfico. A cada prototipo se le adaptó un dispositivo que favoreciera la dilución de los 2 mL de ACN al 100 % provenientes del cartucho DMFS, los cuales contenían a los OFFs; lo anterior con el fin de lograr la pre-concentración de los plaguicidas en la sílice C₁₈ de forma cuantitativa. Para tal fin, fue necesario disminuir la concentración de la mezcla ACN:Agua aproximadamente entre 20:80 y 25:75 v/v. Los resultados obtenidos para los tres prototipos estudiados se indican a continuación.

1. Acople con tubo vacío: los primeros ensayos realizados con la configuración descrita en la **figura 4.4.a** (sección experimental), en la cual mediante la bomba *Eldex* y la válvula selectora de disolventes se realizan las etapas de limpieza del cartucho de DMFS: 2.5 mL de agua y 2.0 mL de ACN:Agua al 30:70 v/v, sin muestra, indicaron que al realizar la desadsorción de los OFFs con ACN, se presentaron caídas en la presión del sistema y en su lugar se evidenciaron fugas en las diferentes conexiones. Por lo anterior la pre-concentración del extracto no se pudo llevar a cabo. Teniendo en cuenta los inconvenientes de presión en el sistema, este prototipo de acople fue descartado.

2. Acople con bucle de 5.0 mL: nuevamente se realizaron ensayos preliminares sin muestra en el cartucho de DMFS; para favorecer la dilución de los 2.0 mL de ACN al 100 % provenientes del cartucho de DMFS se incorporó un bucle de 5.0 mL como dispositivo de dilución (**figura 4.4.b-sección experimental**); este se llenó con 5.0 mL de agua antes de iniciar el proceso de elución de los OFFs. Posteriormente, la mezcla fue conducida por la bomba *Eldex* a un caudal de 1.0 mL min⁻¹ a la pre-columna con sílice C₁₈ ubicada en la válvula 2.

Los primeros resultados con simulación de la DMFS y sin muestra presentaron porcentajes de fuga de los OFFs del orden del 73 %, los cuales fueron monitoreados a la salida del cartucho de pre-concentración. Este comportamiento indicó una baja eficiencia en la dilución del extracto de ACN al 100 %. Otros ensayos realizados para optimizar la

retención de los analitos en la pre-columna que contenía la sílice C₁₈ indicaron la presencia de un flujo laminar y no turbulento en el bucle. En consecuencia se decidió ensayar otro tipo de configuración.

3. Acople con cámara dinámica de mezclado: se incorporó al sistema de acople una cámara dinámica de mezclado y una segunda bomba *Eldex*, esta última se encargó de pre-concentrar la mezcla (extracto proveniente del cartucho DMFS más el agua contenida en la cámara de mezclado) en la pre-columna que contenía la sílice C₁₈ (**figura 4.4.c-sección experimental**).

Siguiendo el procedimiento descrito en la **sección 4.4.5**, los ensayos realizados simulando la DMFS sin muestra indicaron una pre-concentración satisfactoria de los 9 OFFs en la pre-columna con sílice-C₁₈. En la **figura 5.10** se presentan los recobros promedio obtenidos mediante la configuración de cámara de mezclado sin y con muestras de hígado fortificadas.

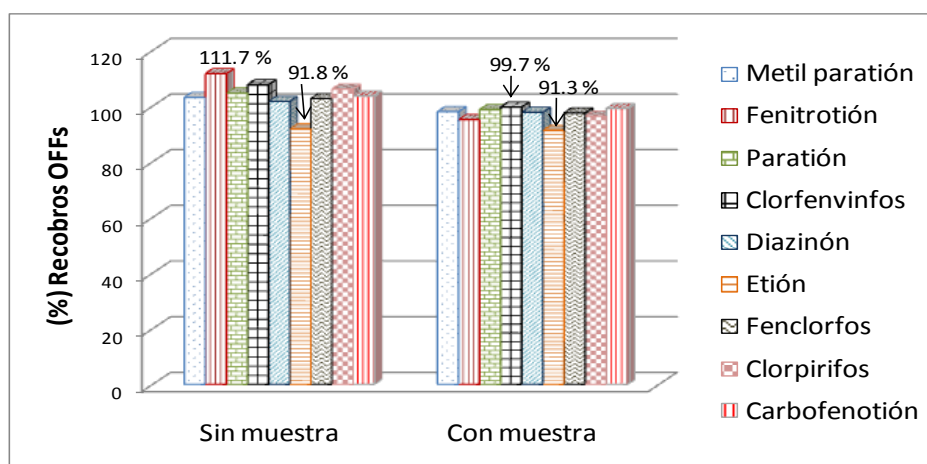


Figura 5.10. Porcentajes de recobros de OFFs en una pre-columna con nucleosil C₁₈, aplicación de la configuración 3 con cámara dinámica de mezclado como dispositivo de dilución. Ensayos realizados sin y con muestra, fortificación a 4.0 µg g⁻¹.

El valor de recobro más bajo obtenido en los ensayos sin muestra y empleando la configuración 3 fue de 92 % para el etión y el más alto fue de 112 % para el fenitrotión. Evidentemente, con la cámara de mezclado se obtuvo la mezcla necesaria para la dilución

del extracto proveniente del cartucho DMFS con el agua agregada en la misma cámara (por medio de un puerto de llenado), permitiendo así la pre-concentración de los OFFs de manera cuantitativa sin fugas detectables.

Cuando se trabajó con muestras de hígado fortificadas a las cuales se les aplicó la metodología en línea, se observaron recobros del 91 y del 100 % para el etión y el clorfenvinfos respectivamente como valores extremos. En la **figura 5.11** se esquematiza el acople final entre la DMFS, EFS y el sistema cromatográfico para el análisis de OFFs en muestras de hígado.

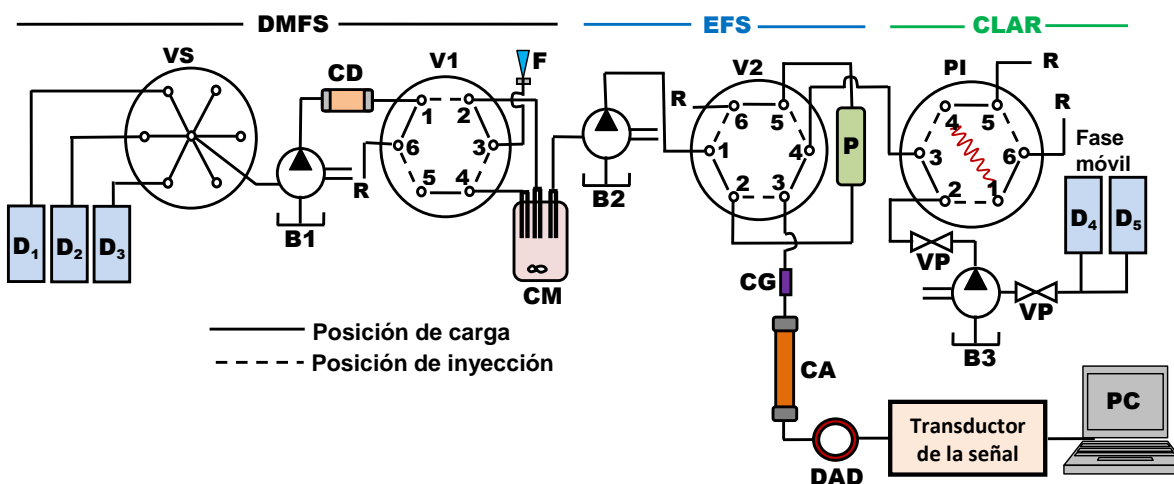


Figura 5.11. Acople en línea de DMFS-EFS-CLAR/DAD. **D₁**: Agua. **D₂**: ACN:Agua 30:70 v/v. **D₃**: ACN 100 %. **D₄**: Metanol 100 %. **D₅**: Agua. **VS**: Válvula selectora de disolventes. **B1**: Bomba *Eldex* 1. **CD**: Cartucho de DMFS. **V1**: Válvula de conmutación 1. **F**: Puerto de llenado de agua. **V2**: Válvula de conmutación 2. **CM**: Cámara de mezclado. **B2**: Bomba *Eldex* 2. **P**: Pre-columna rellena de sílice C₁₈. **PI**: Puerto de inyección. **VP**: Válvula de purga. **B3**: Bomba cromatográfica. **PC**: Computador. **CG**: Columna de guarda. **CA**: Columna analítica. **DAD**: Detector UV con arreglo de diodos. **R**: Residuos.

Mediante el acople de la DMFS-EFS-CLAR/DAD la secuencia de elución optimizada en etapas anteriores fue aplicada a las muestras de hígado dispersadas en C₁₈ y empacadas en el cartucho de dispersión (**CD**, el cual contenía una co-columna de sílice virgen en el fondo). Las disoluciones de lavado fueron enviadas por la bomba *Eldex* 1 (**B1**) a un caudal de 1.0 mL min⁻¹ a través del cartucho de dispersión; cada una de ellas fue seleccionada por la válvula selectora (**VS**) y los residuos generados de las etapas de

limpieza fueron evacuados por la vía 6 de la válvula 1 (**V1**), la cual se encontraba en posición de carga.

Los OFFs fueron eluidos del cartucho de dispersión (**CD**) con 2.0 mL de ACN al 100 % (**D₃**), los cuales se hicieron pasar a través de (**CD**) cuando la válvula 1 (**V1**) se encontraba en la posición de inyección. Simultáneamente 8.0 mL de agua desionizada fueron depositados en la cámara dinámica de mezclado (**CM**) mediante el puerto de llenado “*filler port*” (**F**), logrando de esta forma la mezcla dinámica y continua del extracto de acetoniitrilo a medida que este último estaba saliendo del cartucho de dispersión (**CD**). Con esta dilución del extracto con agua se obtuvo una concentración aproximada de ACN:Agua del 20:80 v/v, la cual no causó disminución en los valores de recobro para los OFFs más apolares.

Una vez terminada la elución de los OFFs del **CD** con los 2.0 mL de ACN al 100 % y su posterior dilución con agua, la bomba *Eldex 2* (**B2**) inició la pre-concentración de la mezcla a un caudal de 0.8 mL min^{-1} previamente optimizado, **ver sección 5.3.3**, en la pre-columna **P** dispuesta en la válvula 2 (**V2**) del sistema. La pre-concentración se efectuó cuando la **V2** se encontraba en la posición de carga y los respectivos desechos se eliminaron por la vía 6 de la misma válvula.

Todo el proceso de extracción que corresponde a la DMFS se llevó a cabo simultáneamente al acondicionamiento de la columna analítica (**CA**) y la pre-columna de pre-concentración (**P**) con la fase móvil (65:35 v/v metanol:agua). En este caso el **PI** podía estar en la posición de carga o de inyección y la **V2** se encontraba en la posición de inyección.

Posteriormente se llevó a cabo la desadsorción de los OFFs retenidos en **P** mediante la fase móvil analítica; el giro de la **V2** a la posición de inyección, permitió la transferencia de los OFFs a la fase móvil del sistema cromatográfico para su posterior separación y detección con el detector ultravioleta arreglo de diodos (**DAD**). En la **tabla 5.14** se presenta un resumen del proceso de operación del sistema acoplado.

Tabla 5.14. Modo de operación secuencial del sistema acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para el análisis de OFFs en muestras de hígado.

		DMFS		EFS	CLAR/DAD		
Operación		Limpieza (D ₁ y D ₂)	Elución (D ₃)	Pre-concentración	Transferencia-Análisis (*D ₄ :D ₅)	Acondicionamiento ⁺ (D ₄ :D ₅ 65:35)	Inyección directa
Tiempo (min)		4.5	2.0	10	20	15	20
Posición de la válvula	V1	C	I	C/I	C/I	C/I	C/I
	V2	C	C	C	I	I	C
	PI	C/I	C/I	C/I	C/I	C/I	I
Estado de las bombas	B1	Encendida	Encendida	Apagada	Apagada	Apagada	Apagada
	B2	Apagada	Apagada	Encendida	Apagada	Apagada	Apagada
	B3	Encendida	Encendida	Encendida	Encendida	Encendida	Encendida

C: Posición de carga. I: Posición de inyección

*Gradiente lineal: Fase móvil: metanol:agua 65:35 v/v a 100 % de metanol en 20 min. D₁= Agua: 2.5 mL; D₂= ACN:Agua 30:70 v/v: 2.0 mL; D₃= ACN al 100 %: 2 mL; D₄= Metanol; D₅= Agua.

⁺Acondicionamiento de la columna analítica (CA) y la pre-columna (P).

El análisis de una muestra de hígado de bovino en el sistema acoplado tomó en promedio un tiempo de 45 min. Tomando como referencia las condiciones establecidas con la configuración 3, se procedió a validar el método de extracción y cuantificación de OFFs en muestras de hígado.

5.6 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs

5.6.1 Linealidad

El método en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD fue validado usando muestras de hígado libres de pesticidas, fortificadas con OFFs a diferentes niveles. Al relacionar el *área de pico (en UA)* vs. *los diferentes niveles de concentración* para cada plaguicida se obtuvieron las curvas de calibración correspondientes. En la **tabla 5.15** se indican las ecuaciones lineales para los 9 OFFs, las desviaciones estándar asociadas a los valores de pendientes y las ordenadas y los coeficientes de correlación.

Los valores de los coeficientes de correlación ($0.988 \leq r \leq 0.999$) demuestran que existe una adecuada linealidad entre la respuesta del detector con el incremento de la concentración de los 9 OFFs cuando se manejan las muestras de hígado en el sistema acoplado. El intervalo de linealidad para 6 de los 9 OFFs estuvo entre 0.5 a 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$

mientras que para el etión, fenclorfos y clorpirifos fue de 1.0 a 10.0 $\mu\text{g g}^{-1}$. De acuerdo con lo anterior el sistema DMFS-EFS-CLAR/DAD, presentó una adecuada linealidad para el análisis de OFFs en muestras de hígado.

Tabla 5.15. Linealidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD. Ecuaciones lineales para el área obtenida en función de la concentración, intervalo de 0.50 a 10.0 μg de OFFs por gramo de muestra. El intervalo de confianza de m y b está calculado para un nivel de 95 % y 13 grados de libertad.

Pesticida	Intervalo de concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ecuación de calibración	Error en la pendiente (\pm I.C)	Error en la ordenada (\pm I.C)	Coefficiente de correlación (r)
1. Metil paratión	0.5-10	$y= 8.39x + 0.42$	0.12	0.64	0.999
2. Fenitrotión	0.5-10	$y= 5.68x + 3.15$	0.08	0.40	0.988
3. Paratión	0.5-10	$y= 7.65x + 0.10$	0.03	0.16	0.998
4. Clorfenvinfos	0.5-10	$y= 4.90x + 0.03$	0.03	0.13	0.998
5. Diazinón	0.5-10	$y= 1.85x + 0.39$	0.02	0.10	0.993
6. Etión	1.0-10	$y= 2.96x - 0.22$	0.01	0.07	0.998
7. Fenclorfos	1.0-10	$y= 5.35x + 0.13$	0.01	0.06	0.999
8. Clorpirifos	1.0-10	$y= 2.97x - 0.22$	0.01	0.03	0.999
9. Carbofenotión	0.5-10	$y= 4.63x + 0.75$	0.02	0.09	0.999

I.C: Intervalo de confianza

5.6.2 Exactitud

Los recobros globales del método evaluado por la pendiente (al multiplicarla por 100) de las curvas de calibración al relacionar la *cantidad de OFFs recuperada* (en ng) vs. la *cantidad de OFFs añadidos a la muestra* (en ng) se indican en la **tabla 5.16**. Los valores de los recobros para los 9 OFFs oscilaron entre el 91 (± 2 I.C) % obtenido para el diazinón y el 101 (± 3 I.C) % obtenido para el fenitrotión. Estos valores están de acuerdo con la *Comisión Europea de Decisión 2002/657/EC/2002*, la cual considera que un método es exacto cuando sus recobros se encuentran entre el 80 – 110 % para fortificaciones por encima de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ cuando se emplea la CLAR como técnica de análisis. Además se observó una buena linealidad del método representada por sus valores de r que oscilaron entre 0.995 al 0.999.

En general, el método de extracción y posterior cuantificación empleando el acople DMFS-EFS-CLAR/DAD para OFFs en muestras de hígado de bovino presentó una adecuada exactitud para aplicarse a muestras de hígado.

Tabla 5.16. Recobro global del método con muestras de hígado: *cantidad recuperada en ng vs. cantidad adicionada de OFFs* (para un intervalo de fortificación entre 25 - 500 ng). El intervalo de **m** y **b** está calculado con base a la distribución t para un $\alpha= 0.05$ y 14 grados de libertad.

Pesticida	Recobro (%) (pendiente x 100)	Ordenada ¹	Coefficiente correlación (r)
1. Metil paratión	94 (± 1)	- 0.003 (± 0.004)	0.999
2. Fenitrotión	101 (± 3)	0.005 (± 0.007)	0.995
3. Paratión	96 (± 2)	-0.004 (± 0.004)	0.998
4. Clorfenvinfos	100 (± 1)	-0.006 (± 0.003)	0.999
5. Diazinón	91 (± 2)	-0.003 (± 0.006)	0.995
6. Etión	96 (± 1)	- 0.004 (± 0.004)	0.999
7. Fenclorfos	98 (± 1)	- 0.008 (± 0.004)	0.999
8. Clorpirifos	100 (± 1)	- 0.008 (± 0.003)	0.999
9. Carbofenotión	95 (± 1)	- 0.001 (± 0.003)	0.999

¹(\pm I.C): Intervalo de confianza a un 95 % (t_{n-2}).

5.6.3 Precisión

La precisión del método acoplado evaluado en función de la repetibilidad intra-día para los diferentes niveles de fortificación, se presenta en la **tabla 5.17**. Los C.V. % globales fueron iguales o inferiores al 11 % para los diferentes niveles de fortificación, por lo cual se puede indicar que existe una adecuada repetibilidad.

Respecto a la precisión inter-día para dos niveles de fortificación, los valores de los C.V. % fueron iguales o inferiores al 12 %, los cuales están de acuerdo con la *Comisión Europea de Decisión 2002/657/EC/2002*, misma que considera que un método es preciso cuando los valores de la DER (%) son inferiores a un 20 %; por lo anterior, la metodología acoplada presentó una adecuada precisión para ser aplicada a muestras de hígado. En la **tabla 5.18** se presentan los C.V. % para los dos niveles de fortificación.

Tabla 5.17. Repetibilidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para los 5 niveles de concentración con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para n= 3.

Pesticida	Nivel de fortificación en $\mu\text{g g}^{-1}$					Promedio global
	0.50	1.00	2.50	5.00	10.00	
	C.V. %					
1. Metil paratión	4	6	4	4	3	10
2. Fenitrotión	4	1	1	1	1	4
3. Paratión	2	2	3	6	2	8
4. Clorfenvinfos	4	2	6	5	2	9
5. Diazinón	8	1	1	2	4	8
6. Etión	-	3	8	6	3	11
7. Fenclorfos	-	3	3	4	1	5
8. Clorpirifos	-	2	3	2	1	4
9. Carbofenotión	4	4	2	2	2	6

Tabla 5.18. Precisión inter-día del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD para 2 niveles de concentración (0.5 y $10.0 \mu\text{g g}^{-1}$) con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para un n= 5, días diferentes.

Pesticida	Nivel de fortificación ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
	0.5	10.0
	C.V. %	
1. Metil paratión	4	5
2. Fenitrotión	12	2
3. Paratión	8	2
4. Clorfenvinfos	6	9
5. Diazinón	12	10
6. Etión	10*	6
7. Fenclorfos	5*	2
8. Clorpirifos	12*	6
9. Carbofenotión	10	5

*C.V. %: Correspondientes a un nivel de fortificación de $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$

5.6.4 Límites de detección y de cuantificación

Los límites de detección experimentales del método (LDEM) en línea para la extracción y posterior cuantificación de los OFFs fueron determinados mediante fortificación secuencial decreciente con los OFFs a las muestras de hígado (por debajo de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ de muestra), como se describió en la **sección 4.4.6.4** de la sección experimental.

Los LDEM oscilaron entre 0.04 y $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$ de muestra en base húmeda, los cuales se encuentran por debajo de los LMP por la **NOM-004-1994** para muestras de hígado de bovino, a excepción del carbofenotión, el cual presentó un **LDEM** de $0.20 \mu\text{g g}^{-1}$, en tanto que la norma establece $0.07 \mu\text{g g}^{-1}$. En la **tabla 5.19** se reportan los valores de los LDM del sistema acoplado para el análisis de los 9 OFFs.

Tabla 5.19. Límites de detección del método DMFS-EFS-CLAR/DAD estimados según: “Code of Federal Regulation (US, EPA) Appendix B to Part 16 Definition and Procedure for the Determination of Method Detection Limit” y obtenidos con las ecuaciones 4.4 y 4.5 para 0.050 g de muestra.

Pesticida	^a LMP (NOM-004-1994) $\mu\text{g g}^{-1}$	^b LDM			^f LCM
		^c LDEM (S/N= 3) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	^d LDTM _{95%} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	^e LDTM _{99%} ($\mu\text{g g}^{-1}$)	
1. Metil paratión	N.R	0.04	[0.25-0.86]	0.39	0.10
2. Fenitrotión	0.05	0.04	[0.16-0.55]	0.25	0.37
3. Paratión	0.70	0.05	[0.20-0.70]	0.32	0.20
4. Clorfenvinfos	0.20	0.04	[0.24-0.81]	0.37	0.20
5. Diazinón	0.70	0.25	[0.13-0.46]	0.21	0.41
6. Etión	1.00	0.20	[0.19-0.66]	0.30	0.90
7. Fenclorfos	4.00	0.04	[0.14-0.48]	0.22	0.77
8. Clorpirifos	2.00	0.05	[0.28-0.97]	0.44	0.58
9. Carbofenotión	0.07	0.20	[0.18-0.62]	0.28	0.35

^aLMP: Límite Máximo Permissible. ^bLDM: Límite de Detección del Método. ^cLDEM: Límite de Detección Experimental. ^dLDTM_{95%}: Intervalo para el Límite de Detección Teórico del Método a un 95 % de confiabilidad para 7 ensayos. ^eLDTM_{99%}: Límite de Detección para un 99 % de confiabilidad. ^fLCM: Límite de Cuantificación del Método. ^gLCEM: Límite de Cuantificación Experimental del Método. N.R: No regulado

Al comparar los **LDEM** con los valores teóricos **LDTM**, obtenidos con la metodología del “Code of Federal Regulation” (**ecuaciones 4.4 y 4.5**), se observaron límites de detección más bajos para la mayoría de los OFFs, es decir, el sistema DMFS-EFS-CLAR/DAD tiene la capacidad de detectar cantidades más bajas de los OFFs que los modelos estadísticos aplicados a diferentes niveles de confianza 95 y 99 %.

Los límites de detección absolutos (**LDA**) fueron optimizados para un tamaño de muestra de 0.100 g de hígado. Sin embargo al utilizar mayor cantidad de muestra, los interferentes aumentarían sustancialmente y las secuencias de limpieza y elución deberían ser nuevamente ajustadas.

Ensayos preliminares aplicando la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD para un tamaño de muestra de 0.10 g de hígado y 0.40 g de sílice C₁₈ con diferentes secuencias de limpieza y elución de los OFFs indicaron que un volumen de 5.0 mL agua, 4.0 mL ACN:Agua al 30:70 v/v y 0.4 mL ACN:Agua al 50:50 v/v eliminan varias de las interferencias presentes en la muestra, sin pérdidas significativas de los OFFs.

La elución cuantitativa de los 9 OFFs se llevó a cabo con 3.0 mL de ACN:Agua al 75:25 v/v, pues la elución de los pesticidas con ACN al 100 % incrementó considerablemente las interferentes. Los 3.0 mL de ACN:Agua al 75:25 v/v fueron diluidos con 8.5 mL agua desionizada en la cámara de mezclado (este volumen fue optimizado por pre-concentración de disoluciones estándar que contenían 0.2 µg de OFFs en la pre-columna que contiene sílice C₁₈). Por lo anterior la secuencia de limpieza y elución de los OFFs para el análisis de 0.10 g de muestra de hígado fue:

1. 5.0 mL de agua
2. 4.0 mL de ACN:Agua 30:70 v/v
3. 0.40 mL de ACN:Agua 50:50 v/v (este volumen complementa la limpieza de la muestra)
4. 3.0 mL de ACN:Agua 75:25 v/v

Con esta secuencia se procedió a estimar los **LDA** mediante fortificación secuencial decreciente de los OFFs a las muestras de hígado (por debajo de 0.5 µg g⁻¹ de muestra). En la **tabla 5.20** se presentan los valores de **LDA** para un tamaño de muestra de 0.10 g al aplicar la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD. Los valores estimados para los **LDA** variaron entre 2.0 a 10.0 ng de OFFs.

Tabla 5.20. Límites de detección absoluto del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD estimados por fortificación sucesiva de OFFs hasta obtención de una relación S/N= 3 para una tamaño de muestra de 0.10 g.

Pesticida	^a LMP (NOM-004-1994) $\mu\text{g g}^{-1}$	^b LDA	
		Masa de OFFs (ng) detectable	Masa de OFFs (ng) detectable
		0.050 g	0.100 g
1. Metil paratión	NR	2.0	2.0
2. Fenitrotión	0.05	2.0	2.0
3. Paratión	0.70	2.5	3.0
4. Clorfenvinfos	0.20	2.0	3.0
5. Diazinón	0.70	12.5	10.0
6. Etión	1.00	10.0	10.0
7. Fenclorfos	4.00	2.0	2.0
8. Clorpirifos	2.00	2.5	3.0
9. Carbofenotión	0.07	10.0	10.0

^aLMP: Límite Máximo Permissible. ^bLDA: Límite de Detección Absoluto. NR: No Regulado.

En general, se logró verificar que la metodología acoplada presenta la capacidad de extraer satisfactoriamente la misma cantidad de analitos independiente del tamaño de muestra analizada.

Los valores de **LCEM** para los 9 OFFs oscilaron entre 0.10 y 0.90 $\mu\text{g g}^{-1}$; de lo anterior se pudo establecer que la metodología acoplada para la determinación de 9 OFFs en hígado de bovino presentó adecuados límites de detección para realizar análisis en muestras de hígado con enfermedades patológicas.

5.6.5 Robustez

Con las condiciones descritas en la **sección 4.4.6.5** se aplicó el sistema acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD a diferentes tejidos de bovino (músculo y pulmón). El análisis de este tipo de muestras puede contribuir a un diagnóstico médico veterinario y al control de la calidad de alimentos de origen animal destinados al consumo humano. En la **figura 5.12.a** se presentan los recobros promedio obtenidos para los tres tejidos de bovino analizados; los valores indicaron recobros cuantitativos entre 94 y 100 % para un nivel de fortificación de 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ para hígado, 93 al 104 % para músculo y del 92 al 100 % para pulmón.

Para un nivel más bajo de concentración ($0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ para 6 OFFs y $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ para etión, fenclorfos y clorpirifos), los recobros presentaron una leve disminución para el etión y fenitrotión en muestras de hígado y de pulmón, estos valores oscilaron entre 83 y 100 % para el hígado, 92 y 99 % para músculo y 85 al 103 % para pulmón. La precisión del método aplicado a los diferentes tejidos se indica en la **figura 5.12.b**; la precisión intra-día e inter-día, expresada como el C.V. %, tuvo valores entre 0.1 a 12 % para muestras de hígado y pulmón mientras que para las muestras de músculo los C.V. % fueron más bajos (0.6 - 5.0 %); estos valores indican que al trabajar con muestras de músculo se presentará una menor variabilidad dado la baja presencia de interferentes.

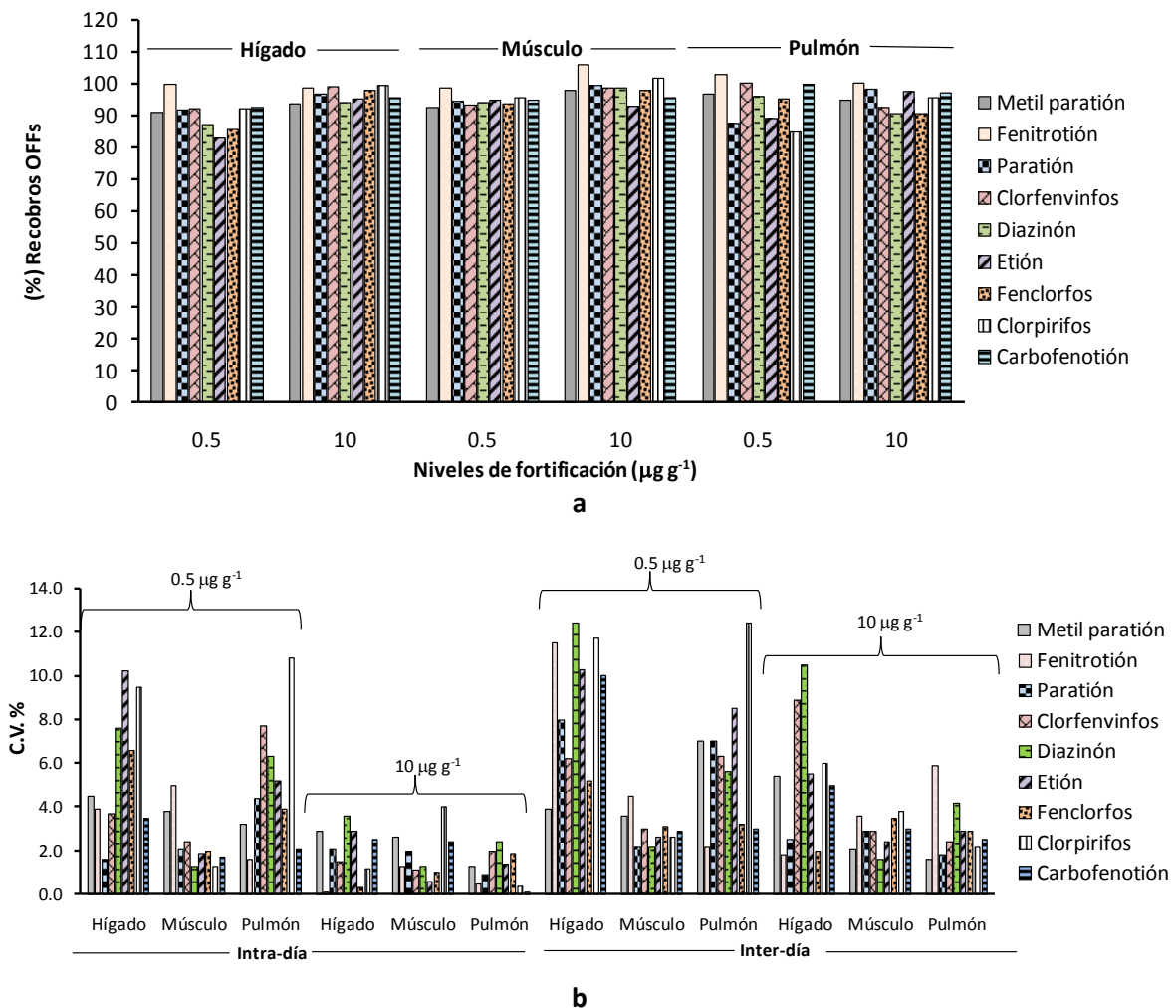


Figura 5.12. Robustez de la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD con diferentes tejidos de bovino a dos niveles de fortificación para 6 OFFs: 0.5 y $10 \mu\text{g g}^{-1}$ y para etión, fenclorfos y clorpirifos: 1.0 y $10 \mu\text{g g}^{-1}$. **a.** Recobros. **b.** Precisión C.V. %.

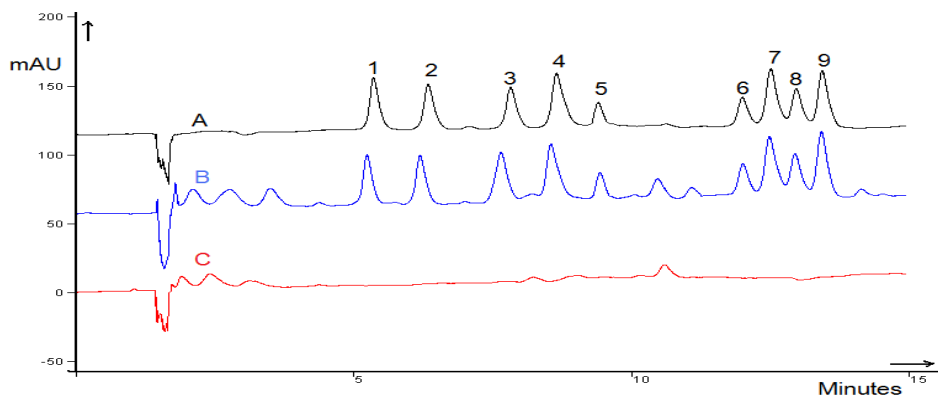
Por lo anterior, el método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DAD puede ser aplicado a diferentes tipos de tejidos de bovino para la determinación de los 9 OFFs sin cambios significativos en la precisión y en la exactitud del sistema. En la **figura 5.13** se presentan los cromatogramas obtenidos para los diferentes tipos de tejidos analizados mediante el acople DMFS-EFS-CLAR/DAD, en cada uno de ellos se puede observar la ausencia de picos interferentes a una longitud de onda de 220 nm, indicando de esta forma que las etapas de limpieza optimizadas fueron eficientes.

Cabe aclarar que aquellos picos que presentaron tiempos de retención similares a los OFFs a 220 nm, no absorbieron a las longitudes de onda de cuantificación del pesticida en análisis; en el caso del paratión en muestras de músculo, en donde aparece una interferencia cercana, esta última no absorbe a 273 nm y el pico cromatográfico del OFF puede integrarse automáticamente.

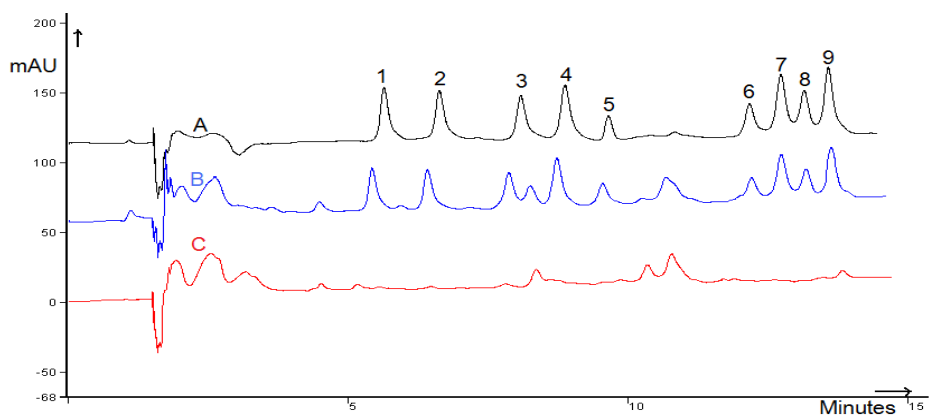
5.7 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD a muestras de hígado de bovino con daños patológicos

El siguiente paso en la validación del método en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD fue llevar a cabo la aplicación del análisis de OFFs en muestras de hígado con daños patológicos provenientes de ejemplares jóvenes del Complejo Agroindustrial de Tizayuca (CAIT). Las muestras una vez recolectadas fueron analizadas en el laboratorio con la metodología anteriormente validada.

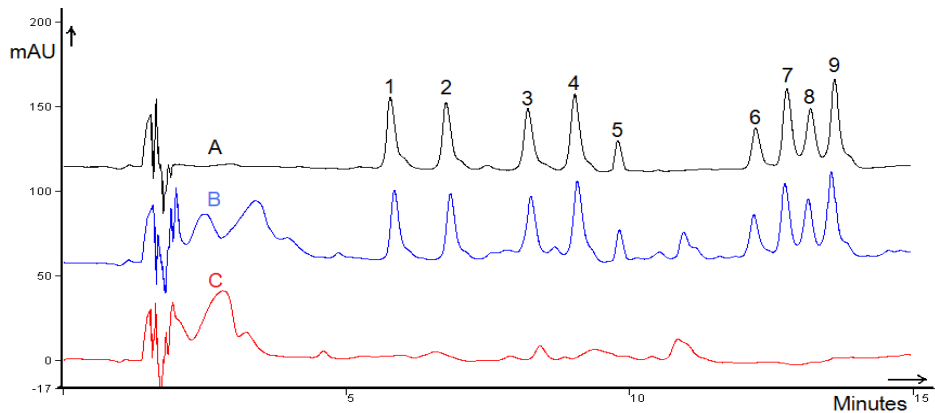
Algunas de las muestras analizadas presentaron compuestos cuyos tiempos de retención fueron similares a los plaguicidas en estudio (las muestras enumeradas con: 8, 16, 17, 29 y 30), sin embargo los espectros UV no correspondieron a los registrados en la base de datos de OFFs elaborada con muestras de hígado sanas previamente fortificadas.



a



b



c

Figura 5.13. Cromatogramas obtenidos mediante la aplicación de DMFS-EFS-CLAR/DAD. **A.** Disolución estándar de 25 mg L^{-1} de OFFs. **B.** Muestra fortificada a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ de OFFs. **C.** Muestra sin fortificación. **a.** Hígado. **b.** Músculo **c.** Pulmón. **1.** Metil paratión. **2.** Fenitrotión. **3.** Paratión **4.** Clorfenvinfos, **5.** Diazinón **6.** Etión, **7.** Clorpirifos, **8.** Fenclorfos, **9.** Carbofenotión. Gradiente lineal con 65:35 v/v metanol:agua al 100 % de metanol. $\lambda=220 \text{ nm}$. Corrección línea base.

La muestra identificada con el número 27 presentó un pico cromatográfico con el mismo tiempo de retención del fenitrotión y su espectro UV fue similar al presentado por el control de fenitrotión en una muestra de hígado sano fortificada con OFFs. Además, en el cromatograma de la **figura 5.14.a** se observó el incremento en el área del pico desconocido cuando se fortificó la muestra con $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ de fenitrotión.

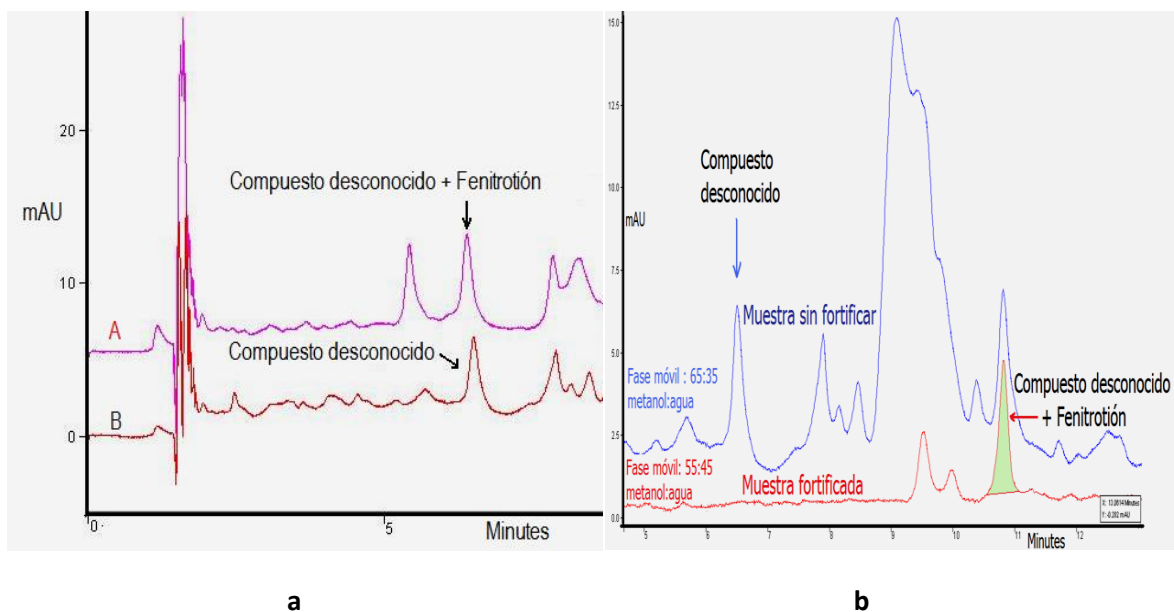


Figura 5.14. Cromatogramas de la muestra de hígado número 27 con patología severa a $\lambda = 268 \text{ nm}$. **a.** Verificación de la presencia del fenitrotión: **A.** Muestra fortificada a $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ de OFFs. **B.** Muestra sin fortificar. **b.** Análisis de muestra con gradiente lineal de 55:45 v/v metanol:agua a 100 % de metanol en 30 min.

Otro ensayo realizado para evidenciar la presencia del fenitrotión consistió en fortificar la muestra y realizar un gradiente lineal empezando con 55:45 v/v metanol:agua hasta un 100 % de metanol en 30 min. Con estas condiciones el compuesto desconocido y el estándar de fenitrotión deben presentar separación cromatográfica de las señales correspondientes a cada compuesto en el caso de ser sustancias diferentes. Si los dos compuestos son los mismos, los picos (compuesto desconocido y estándar de fenitrotión) continuarán juntos en el frente de elución.

El cromatograma resultante de este ensayo se presenta en la **figura 5.14.b**, en el cual no se observó separación cromatográfica entre el pico desconocido y el estándar de fenitrotión adicionado al aplicar el gradiente lineal antes mencionado. La confirmación de

la identidad del compuesto registrado se realizó mediante análisis por CLAR/EM. Para tal efecto se sometió a la muestra número 27 y a una disolución control de 2.5 mg L⁻¹ de fenitrotión a un análisis de masas en el modo SIM con el fin de monitorear el ion molecular de m/z de 277 unidades.

En la **figura 5.15.a** se presenta el cromatograma de la muestra 27 obtenido mediante análisis por CLAR-EM/EM. El tiempo de retención del compuesto desconocido (supuesto fenitrotión) correspondiente a 1.582 min presente en la muestra número 27 así como su masa (m/z: 277.00) son similares a los encontrados en el cromatograma y en el espectro de la disolución estándar del fenitrotión de 2.5 mg L⁻¹ (tr: 1.598 min y m/z: 277.00 unidades).

Por otra parte, en el cromatograma de la **figura 5.15.b** se indican los espectros UV del pico cromatográfico sospechoso de ser fenitrotión presente en la muestra número 27 y el de un estándar de fenitrotión en un extracto de una muestra de hígado sano. Se encontró un valor de similaridad espectral **DR** igual a 0.992, de acuerdo con los parámetros de pureza espectral, **sección 4.4.7.1**, indican una buena similaridad entre los dos espectros.

Por lo anterior se concluyó que el compuesto desconocido en la muestra número 27 correspondía al fenitrotión. La cuantificación del fenitrotión mediante la curva de calibración y adiciones estándar indicaron una concentración promedio de 1.4 ± 0.3 µg de fenitrotión por gramo de muestra; este valor se encuentra por encima del límite máximo permitido de acuerdo con la NOM-004-ZOO-1994 fijado en 0.05 µg g⁻¹ del pesticida en muestras de hígado en base húmeda, destinado a la alimentación humana.

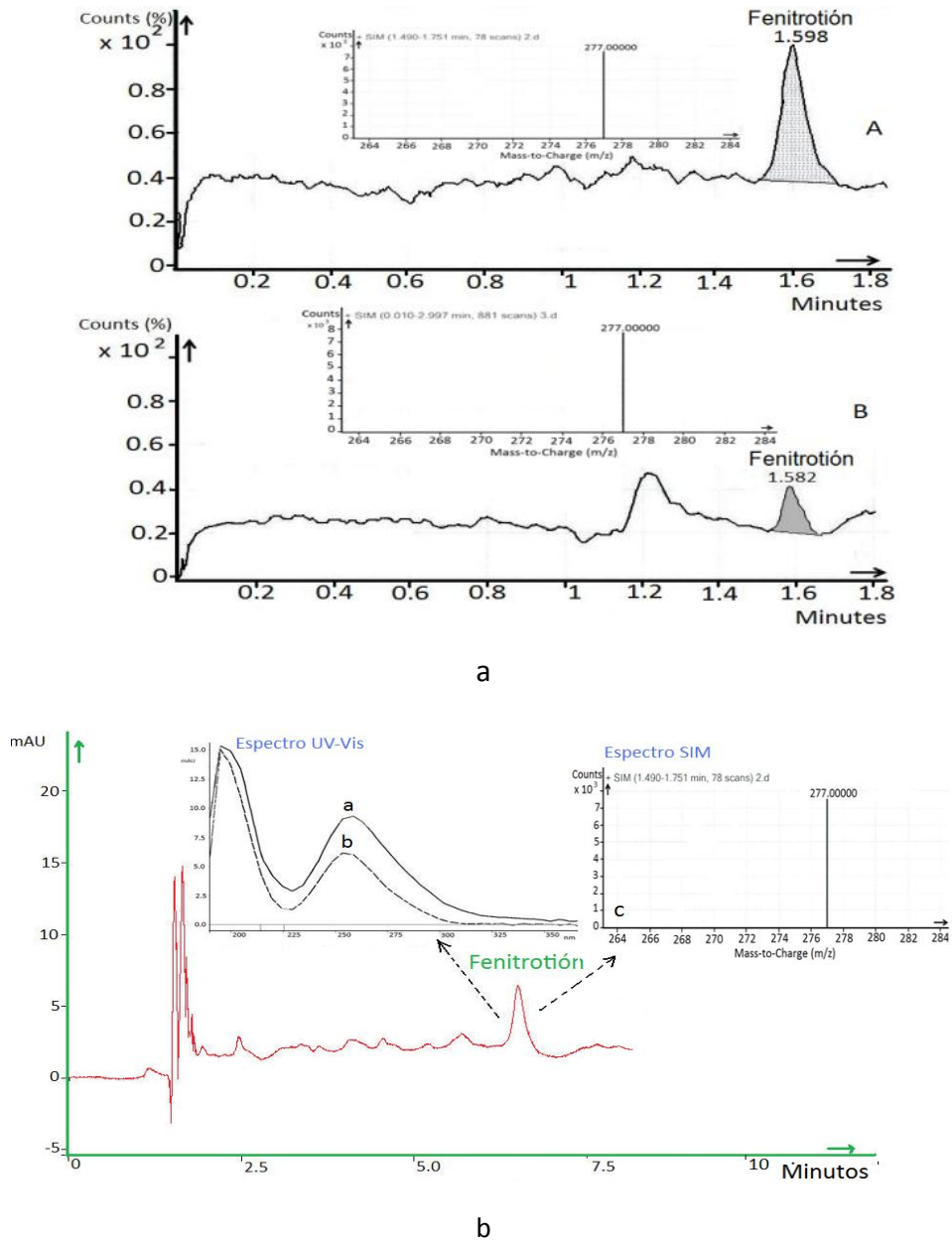


Figura 5.15. a. Cromatogramas CLAR-EM/EM con el espectro de masas SIM (m/z : 277.00): **A.** Disolución estándar de fenitrotión (2.5 mg L^{-1}). **B.** Extracto de la muestra de hígado número 27 con daños patológicos. Condiciones descritas en la **sección 4.4.7.1**. **b.** Cromatograma de la muestra de hígado número 27 con fenitrotión. Detección a $\lambda = 268 \text{ nm}$. Comparación con espectro UV: **a.** Disolución estándar de fenitrotión. **b.** Espectro UV del pico cromatográfico presente en la muestra. **c.** Espectro SIM de masa $m/z = 277.00$.

5.8 Ventajas del manejo de la muestra por la metodología analítica en línea DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs frente al método oficial: NOM-028-ZOO-1995

Las metodologías usadas comúnmente para la extracción y posterior análisis de OFFs en tejidos biológicos emplean grandes cantidades de muestra, tiempos de análisis entre 3 y 26 h, alto consumo de reactivos y un gran número de pasos en el tratamiento de la muestra, (NOM-028-ZOO-1994; Diagne *et al.*, 2002). En la **tabla 5.21** se indican algunas metodologías utilizadas para el análisis de OFFs en diferentes matrices.

En la metodología acoplada hay menor manipulación de la muestra, tiempo de análisis de 45 min y bajo consumo de reactivos (4.0 mL) al compararlo con la **NOM-028-ZOO-1995** en la cual se utilizan aproximadamente 10 reactivos diferentes, volumen total de 270 mL además de un tiempo de análisis de 3 h.

Tabla 5.21. Datos comparativos entre la metodología analítica propuesta DMFS-EFS-CLAR/DAD y otras metodologías de extracción y análisis para OFFs en diferentes matrices.

Parámetro	Soxhlet ^a	NOM-028 ^e	DMFS ⁱ fuera de línea	ELL-EFS ^m	DMFS ^q en línea
Cantidad de muestra (g)	5-10 ^b	50 ^f	0.5 ^j	10 ⁿ	0.05
Consumo de reactivos (mL)	232.5 ^c	270 ^g	7.0 ^k	123 ^o	4
Tiempo de extracción y análisis	26 h	3 h	1 h	1 h:40 min	45 min
Limpieza (g)	n.d ^d	0.3 ^h	0.5 ^l	n.d ^p	0.05
Recobros (%)	84-94	60-110	80-116	65-75	91-101
LDM ($\mu\text{g g}^{-1}$)	n.r	n.r	1.0	1×10^{-3}	0.04

^aDiagne *et al.*, 2002. ^bFrijol. ^cHexano, diclorometano, ACN. ^dSílica virgen. ^eNOM-028-ZOO-1995. ^fHígado. ^gAcetato de etilo, hexano, éter de petróleo, ACN, metanol, carbón activado, cloruro de metileno, óxido de magnesio ^hCarbón activado. ⁱGarcía *et al.*, 2007. ^jPolvo. ^kHexano, acetona, acetato de etilo. ^lAlúmina. ^mPagliuca *et al.*, 2005. ⁿHígado de jabalí. ^oAcetona, ACN, diclorometano. ^pC₁₈ monofuncional. ^qEste trabajo. n.d: No hay datos. n.r: No reportado.

Los LDM para la metodología acoplada estuvieron del orden de $40 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el metil paratión y $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ para el diazinón, estos límites son aceptables teniendo en cuenta la complejidad de la muestra y el tipo de detector utilizado. El acople de la DMFS al sistema cromatográfico permitió reducir los LDM de OFFs de $1.0 \mu\text{g g}^{-1}$ a $0.04 \mu\text{g g}^{-1}$ al cambiar del modo fuera de línea al modo en línea; es decir, se aumentó la sensibilidad de la metodología de análisis en un factor de 25. En esta forma el sistema DMFS-EFS-CLAR/DAD puede considerarse una excelente alternativa para el análisis de OFFs en hígado,

pulmón y músculo de bovino, la cual puede sustituir los métodos convencionales pues presenta características analíticas de calidad (linealidad, precisión, robustez y exactitud) para monitorear contaminantes en tejidos biológicos destinados al consumo humano.

5.9 Adecuación del método analítico acoplado para la determinación de HAPs en muestras de hígado

Tomando como referencia las condiciones de acoplamiento optimizadas para el análisis de OFFs, se adecuó el sistema para la extracción y posterior análisis de HAPs en muestras de hígado. La primera etapa consistió en la optimización de las condiciones de separación y detección cromatográficas empleando el sistema CLAR/DFL.

5.9.1 Optimización de la separación cromatográfica y detección de los 4 HAPs por CLAR-DFL

Se establecieron las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas para la detección y cuantificación de cada uno de los 4 HAPs, las cuales fueron seleccionadas teniendo en cuenta la mayor intensidad de fluorescencia, representada en el incremento del área de los picos cromatográficos. En la **tabla 5.22** se indican las longitudes de onda de excitación y de emisión empleadas para los análisis de los HAPs estudiados.

Tabla 5.22. Longitudes de onda de excitación y emisión para los 4 HAPs estudiados, empleando un detector de fluorescencia “Prostar” 363.

Hydrocarburo	Longitudes de onda de excitación (nm)	Longitud de onda de emisión (nm)
1. Benzo[a]antraceno	270	410
2. Benzo[b]fluoranteno	263	410
3. Benzo[k]fluoranteno	263	410
4. Benzo[a]pireno	263	410

Mediante los valores del logaritmo del factor de retención cromatográfico $\text{Log } k'$ obtenidos con diferentes proporciones de metanol:agua se establecieron las condiciones óptimas de separación cromatográfica así como el orden de elución para los cuatro hidrocarburos. En la **figura 5.16** se presentan las curvas correspondientes a los $\text{Log } k'$ en función de la composición de la fase móvil en una columna C_{18} .

Las curvas indican una adecuada separación de los 4 HAPs hacia porcentajes menores en metanol que la relación de fase móvil 95:5 v/v metanol:agua; sin embargo, los isómeros estructurales de benzo[*b*]fluoranteno y benzo[*k*]fluoranteno solo presentaron una separación adecuada ($R_{S_{k-b}} = 1.2$) con una relación de 91:9 v/v metanol:agua. Por lo anterior, la composición de la fase móvil utilizada para los posteriores análisis fue 91:9 v/v metanol:agua en el modo isocrático. En la **tabla 5.23** se indican los tiempos de retención y los respectivos $\text{Log } k'$ para los 4 HAPs a un flujo de 1.0 mL min^{-1} .

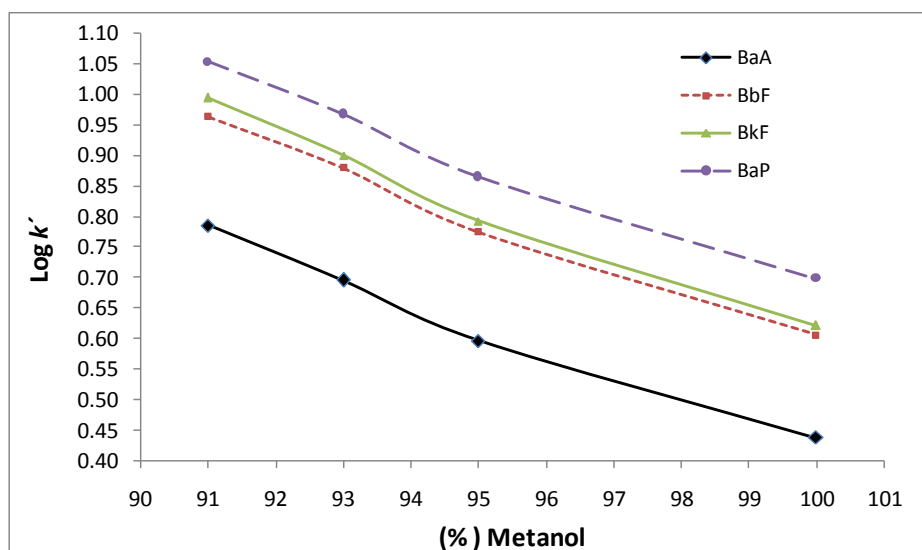


Figura 5.16. Variación del Log del factor de retención (k') en función del porcentaje de metanol en la fase móvil, en una columna analítica Spheri-5 ODS ($5 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) a un flujo de 1.0 mL min^{-1} con una mezcla de los 4 HAPs con concentración de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uno.

De acuerdo con los valores reportados de $\text{Log } K_{ow}$ para los 4 HAPs, los cuales se presentan en la **tabla 5.23**, estos compuestos tienen una alta afinidad por la fase estacionaria de la columna analítica (sílice C_{18}) y su elución se realiza a tiempos mayores respecto a los presentados por los OFFs.

Tabla 5.23. Factores de retención ($\text{Log } k'$), logaritmo de los coeficientes de partición octanol-agua (K_{ow}) y tiempos de retención de los 4 HAPs. Columna analítica Spheri-5 ODS a flujo de 1.0 mL min^{-1} . Composición de la fase móvil 91:9 v/v metanol:agua, modo isocrático.

Hidrocarburo	Tiempo de retención (t_r , min)	$\text{Log } k'^+$	$\text{Log } K_{ow}^*$
1. Benzo[<i>a</i>]antraceno	12.801	0.786	5.70-5.91
2. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	18.350	0.964	5.80-6.37
3. Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	19.576	0.995	6.84-6.87
4. Benzo[<i>a</i>]pireno	22.160	1.054	6.12-6.74

*Reportados en: (Tollback et al., 2008), (Mackay et al., 1992) y (Wang et al., 2009).

⁺ $t_0 = 1.800 \text{ min}$

En general, los HAPs tienen muy bajas solubilidades en agua, razón por la cual, cantidades relativamente pequeñas de este disolvente en la fase móvil incrementan considerablemente el tiempo de análisis y la factibilidad de precipitación de los hidrocarburos.

El tiempo de elución del benzo[*a*]antraceno es adecuado para permitir la elución de compuestos interferentes más polares presentes en las muestras de tejidos biológicos. En la **figura 5.17** se presenta un cromatograma obtenido en el sistema CLAR/DFL de una disolución estándar de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de los 4 HAPs, con las condiciones anteriormente descritas.

5.9.2 Validación del sistema cromatográfico para HAPs: linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación

Tomando como referencia las condiciones anteriormente optimizadas se llevó a cabo el proceso de validación del sistema cromatográfico como fue descrito en la **sección 4.4.8.2**. Se elaboraron las curvas de calibración relacionando el *área de pico cromatográfico (en unidades arbitrarias AU)* con la *concentración de HAPs (en $\mu\text{g L}^{-1}$)* para definir la linealidad del sistema CLAR/DFL.

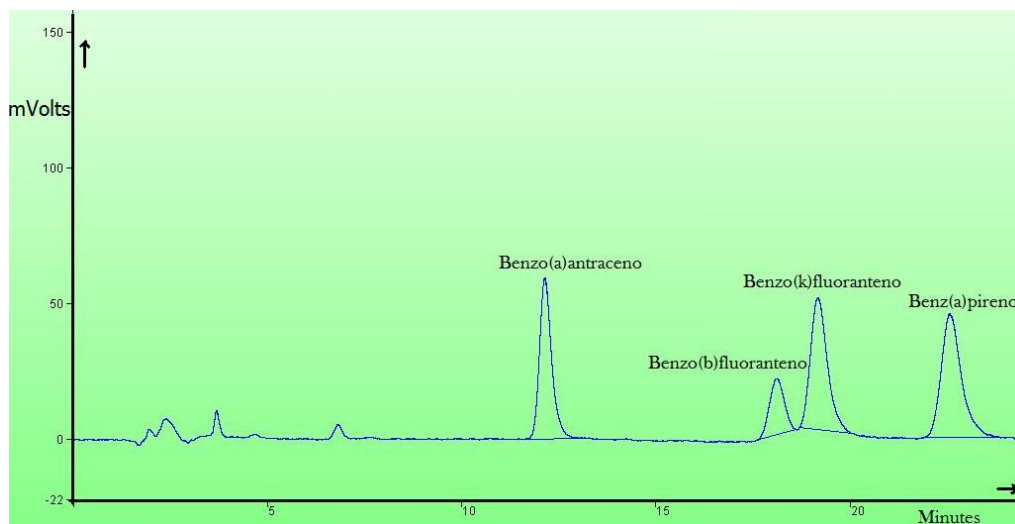


Figura 5.17. Cromatograma de una disolución estándar de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de la mezcla de los 4 HAPs. Elución en el modo isocrático con 91:5 v/v metanol:agua. Columna analítica Spheri-5 ODS ($5 \mu\text{m} \times 250 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm I.D.}$) a flujo de 1.0 mL min^{-1} . Volumen de inyección $20 \mu\text{L}$. Longitudes de onda indicadas en la **tabla 5.22**.

En la **tabla 5.24** se indican las respectivas ecuaciones de la recta y los coeficientes de correlación lineal (**r**) para cada uno de los HAPs en estudio. Los valores de los coeficientes oscilaron entre $0.9951 \leq r \leq 0.9969$ indicando una respuesta lineal del detector DFL a las variaciones de las concentraciones respectivas. Por lo anterior, se puede indicar que existe una adecuada linealidad del sistema cromatográfico para un intervalo de concentraciones comprendido entre 0.25 y $1.50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 5.24. Ecuaciones lineales de calibración para los 4 HAPs en el sistema CLAR/DFL por inyecciones sucesivas de disoluciones estándar entre 0.25 a $1.50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Hidrocarburo	Coefficiente de correlación (r)	Pendiente ($m \pm \text{I.C}$)	Ordenada ($b \pm \text{I.C}$)
1. Benzo[a]antraceno	0.9969	1488696 ± 61683	-51912 ± 96807
2. Benzo[b]fluoranteno	0.9952	605473 ± 31193	-24581 ± 48955
3. Benzo[k]fluoranteno	0.9952	1656874 ± 85141	-67775 ± 133624
4. Benzo[a]pireno	0.9951	1820032 ± 94167	-66304 ± 147789

I.C= Intervalo de confianza al 95 %

En la **tabla 5.25** se presentan los C.V. % correspondientes para cada una de las disoluciones estándar inyectadas el mismo día. La repetibilidad del sistema

cromatográfico, evaluado mediante los C.V. %, indicó valores por debajo del 5 % para $n=3$.

Tabla 5.25. Repetibilidad del sistema CLAR/DFL evaluado en términos de las C.V. % para cada nivel de concentración. $n=3$.

Hidrocarburo	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)			
	0.25	0.50	1.0	1.5
	C.V. %			
1. Benzo[a]antraceno	3.1	0.6	0.9	3.1
2. Benzo[b]fluoranteno	2.9	0.9	1.2	2.6
3. Benzo[k]fluoranteno	4.3	0.6	2.6	3.0
4. Benzo[a]pireno	1.4	0.5	2.1	3.2

La precisión inter-día del sistema CLAR/DFL en días diferentes para dos niveles de concentración (0.25 y $1.50 \mu\text{g L}^{-1}$) reportó valores de C.V. %, inferiores al 6 %. En la **tabla 5.26** se presentan los respectivos C.V. % para los 4 HAPs cuando disoluciones estándar fueron inyectadas en días diferentes ($n=5$).

Tabla 5.26. Precisión inter-día del sistema CLAR/DFL evaluada en términos de los C.V. % para dos niveles de concentración para $n=5$ realizado en días diferentes.

Hidrocarburo	Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	
	0.25	1.50
	C.V. %	
1. Benzo[a]antraceno	3.3	2.1
2. Benzo[b]fluoranteno	2.7	2.1
3. Benzo[k]fluoranteno	5.7	2.5
4. Benzo[a]pireno	2.4	2.9

Con base en los resultados de repetibilidad y precisión inter-día es posible indicar que el sistema cromatográfico CLAR/DFL presentó una adecuada precisión (C.V. % por debajo del 6 %, baja variabilidad), para el nivel de confianza del 95 %.

La sensibilidad del sistema CLAR/DFL puede analizarse mediante los valores obtenidos en las pendientes de las curvas de calibración linealizadas por el método de mínimos cuadrados. El benzo[a]pireno presentó la mayor pendiente seguida del

benzo[*k*]fluoranteno y el benzo[*a*]antraceno; por el contrario, el benzo[*b*]fluoranteno mostró el valor más bajo. Este comportamiento fue verificado con los LDE que también son un indicio de la sensibilidad del sistema de medida. En la **tabla 5.27** se presentan los correspondientes valores de LDE y LCE de los 4 HAPs según el procedimiento indicado en la **sección 4.4.8.2**.

Tabla 5.27. Límites de detección y cuantificación experimentales del sistema CLAR/DFL, S/N= 3 y S/N= 10 respectivamente. Volumen de inyección: 20 μL .

Hidrocarburo	LDE ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LDA* (pg)	LCE ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1. Benzo[<i>a</i>]antraceno	0.015	0.3	0.05
2. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	0.030	0.6	0.10
3. Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	0.015	0.3	0.05
4. Benzo[<i>a</i>]pireno	0.015	0.3	0.05

*LDA: Límite de detección absoluto

Los valores de los LDE oscilaron entre 0.015 y 0.030 $\mu\text{g L}^{-1}$ correspondientes a los límites absolutos de 0.3 a 0.6 pg de HAPs detectables según la relación S/N= 3. A excepción del benzo[*b*]fluoranteno, todos los HAPs presentaron LDE de 0.015 $\mu\text{g L}^{-1}$, este comportamiento está de acuerdo con los valores de pendientes encontrados para cada uno de los hidrocarburos en las respectivas curvas de calibración. Con el sistema CLAR/DFL se pueden cuantificar con exactitud concentraciones por encima de 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ para benzo[*a*]antraceno, benzo[*k*]fluoranteno y benzo[*a*]pireno y sobre 0.10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el benzo[*b*]fluoranteno.

5.9.3 Aplicación de la metodología de DMFS para la extracción de 4 HAPs fuera de línea

La optimización de la secuencia de limpieza y de elución de los HAPs del cartucho de dispersión se llevó a cabo con el sistema CLAR/DAD y se trabajó con la relación muestra:adsorbente de 0.050:0.200. Los resultados obtenidos para cada una de las secuencias analizadas (ver **sección experimental 4.4.9-tabla 4.6**) sin muestra de hígado indicaron que con la secuencia de **5.0 mL de agua, 5.0 mL de ACN:Agua 30:70 v/v, 4.0 mL de ACN:Agua 40:60 v/v y 3.0 mL ACN al 100 %**, fue posible obtener recobros cuantitativos de los HAPs. Esta secuencia fue aplicada a muestras de hígado previamente fortificadas a

las cuales se les aplicó la DMFS. En las **tablas 5.28 y 5.29** se indican los valores de los recobros obtenidos para cada una de las fracciones (de 0.5 mL) en los ensayos realizado.

Tabla 5.28. Aplicación del método de DMFS. Recobros de la secuencia de limpieza y de elución de los 4 HAPs de un cartucho de DMFS con 0.20 g de sílice C₁₈ sin muestra y fortificada con 0.5 µg de cada HAPs.

Hidrocarburo	Limpieza	Limpieza	Limpieza	Elución						Recobro Global (%)
	Agua	ACN:Agua 30:70 v/v	ACN:Agua 40:60 v/v	ACN 100 %						
	5 mL	5 mL	4 mL	Fracciones de 0.5mL						
			0.5	1	1.5	2.0	2.5	3.0		
1. Benzo[a]antraceno	N.I.	N.I.	N.D.	42	52	13	N.D	N.D	N.I	107
2. Benzo[b]fluoranteno	N.I.	N.I.	N.D.	22	53	21	N.D	N.D	N.I	96
3. Benzo[k]fluoranteno	N.I.	N.I.	N.D.	20	50	20	N.D	N.D	N.I	90
4. Benzo[a]pireno	N.I.	N.I.	N.D.	24	50	20	4	N.D	N.I	98

N.I: No inyectado. N.D. No detectado

Tabla 5.29. Aplicación del método de DMFS. Recobros de la secuencia de limpieza y de elución de los 4 HAPs de un cartucho de DMFS con 0.050 g de muestra y 0.200 g de sílice C₁₈. Fortificación a 10 µg g⁻¹ de HAPs.

Hidrocarburo	Limpieza	Limpieza	Limpieza	Elución						Recobro Global (%)
	Agua	ACN:Agua 30:70 v/v	ACN:Agua 40:60 v/v	ACN 100 %						
	5 mL	5 mL	4 mL	Fracciones de 0.5mL						
			0.5	1	1.5	2.0	2.5	3.0		
1. Benzo[a]antraceno	N.I.	N.I.	N.D.	95	19	N.D	N.I	N.I	N.I	114
2. Benzo[b]fluoranteno	N.I.	N.I.	N.D.	74	33	N.D	N.I	N.I	N.I	107
3. Benzo[k]fluoranteno	N.I.	N.I.	N.D.	66	39	N.D	N.I	N.I	N.I	105
4. Benzo[a]pireno	N.I.	N.I.	N.D.	57	48	N.D	N.I	N.I	N.I	105

N.I: No inyectado. N.D. No detectado

El volumen de elución de HAPs con ACN al 100 % fue establecido en 3.0 mL (2.0 de elución más 1.0 mL de seguridad adicional), mientras que, cuando la muestra está presente el volumen de elución de HAPs fue de 1.5 mL, (1.0 mL de elución más 0.5 mL de seguridad adicional). Cuando la muestra se encuentra presente las interacciones de los analitos con el adsorbente cambian, pues se crea una nueva fase: adsorbente-muestra, en este caso hay menor fuerza de interacción de los HAPs en la nueva fase, razón por la cual el volumen de elución es menor (1.0 mL) respecto al volumen encontrado en los ensayos en ausencia de muestra (2.0 mL).

En la **figura 5.18** se presentan los frentes de elución con acetonitrilo al 100 % para los 4 HAPs al aplicar la DMFS con y sin muestra. Las líneas punteadas indican los volúmenes máximos de elución de los 4 HAPs.

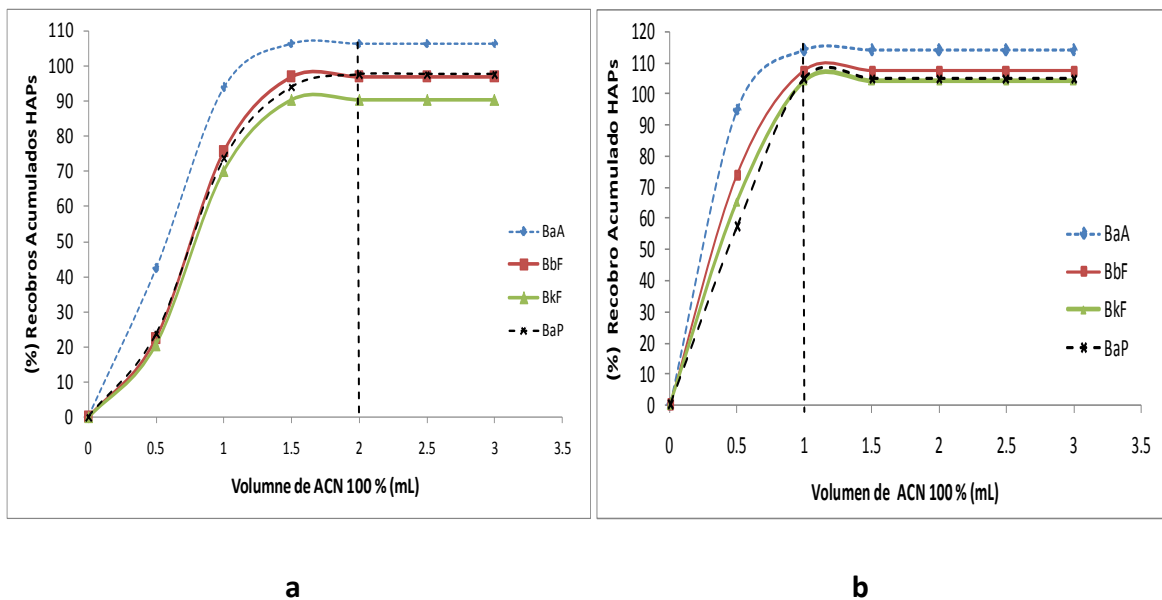


Figura 5.18. Frentes de elución de HAPs al aplicar la DMFS, con la secuencia: 5.0 mL agua, 5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v, 4.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v y 3.0 mL ACN 100 %. **a.** Sin muestra **b.** Con muestra: fortificación a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ HAPs.

Por el comportamiento de los frentes de elución se puede concluir que, en ausencia de muestra, las interacciones de adsorción entre la sílice C_{18} y los analitos son mayores que cuando la muestra está presente, debido a que la matriz forma otro tipo de superficie de interacción que modifica la fuerza de adsorción y los equilibrios entre los HAPs y la mezcla muestra:adsorbente. Este comportamiento molecular se refleja a nivel macroscópico en la diferencia de los volúmenes de elución con el disolvente anteriormente indicado. El volumen máximo de elución se alcanza a los 2.0 mL sin muestra y al 1.0 mL con muestra.

En general, los recobros cuando se procedió a simular la DMFS sin muestra oscilaron entre 93 % (± 2 % C.V) y 97 % (± 3 % C.V) para benzo[*b*]fluoranteno y el benzo[*k*]fluoranteno respectivamente. Cuando la muestra se encontraba presente los valores de los recobros no presentaron diferencias significativas, estos valores estuvieron entre 93 % (± 1 % C.V) y 96 % (± 3 % C.V) para el benzo[*a*]antraceno y el benzo[*a*]pireno

respectivamente. En la **figura 5.19** se presenta el comportamiento de los recobros para los 4 HAPs al aplicar la DMFS con una relación muestra:adsorbente de 0.050:0.200 y con la secuencia de limpieza y de elución anteriormente descrita.

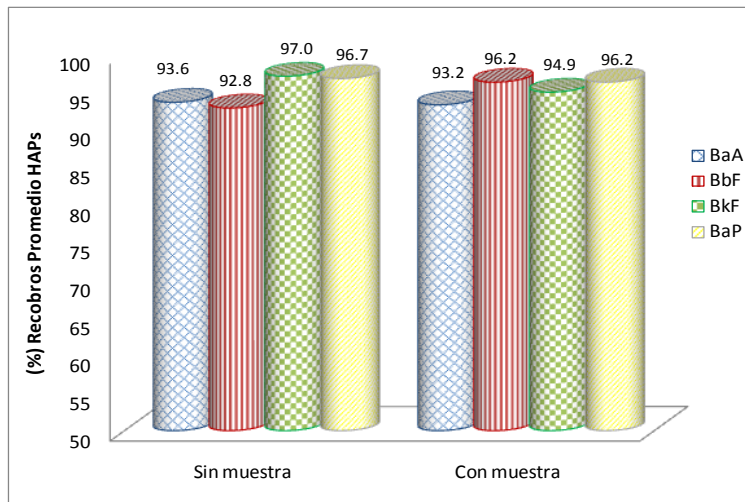


Figura 5.19. Recobros promedio de extracción de HAPs sin y con muestras de hígado fortificadas a $30 \mu\text{g g}^{-1}$ y aplicando la DMFS para una relación muestra:adsorbente de 0.050:0.2000.

5.9.3.1 Limpieza del extracto con sílice virgen “clean up” fuera de línea

Una vez optimizadas las secuencias de limpieza y de elución de los HAPs con muestras de hígado, se evaluó el efecto de incluir en el fondo del cartucho de DMFS una co-columna de sílice virgen (0.050 g) con el fin de eliminar la mayor cantidad de interferentes presentes en el extracto, tal como se procedió con los pesticidas organofosforados. Los ensayos realizados con la co-columna de sílice virgen en la DMFS para el análisis de los HAPs en muestras de hígado fortificadas ($0.01 \mu\text{g}$ de HAPs ó $0.2 \mu\text{g g}^{-1}$) indicaron una disminución del recobro promedio para el benzo[*a*]pireno de un 10 %; además no se observó ningún efecto en la limpieza del extracto al utilizar una co-columna de sílice virgen, por lo que su uso no se consideró necesario.

En la **tabla 5.30** se presentan los recobros por triplicado de los analitos extraídos con DMFS para 0.050 g de muestra y 0.200 g de sílice C_{18} , empleando una co-columna de sílice virgen para efectuar una limpieza o “clean up” del extracto.

Tabla 5.30. Recobros obtenidos por triplicado con muestras de hígado* en el modo fuera de línea del método, empleando 0.050 g de muestra con 0.200 g de sílice C₁₈ y una co-columna de sílice virgen (0.050 g). Muestras fortificadas a 0.2 µg g⁻¹ de HAPs, extracto pre-concentrado.

Hidrocarburo	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	s	C.V. %
1. Benzo[a]antraceno	93	91	93	92	1	1
2. Benzo[b]fluoranteno	99	93	101	98	4	4
3. Benzo[k]fluoranteno	92	91	98	94	4	4
4. Benzo[a]pireno	81	78	91	83	7	8

*Secuencia de limpieza: 5.0 mL agua, 5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v, 4.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v. Elución con 1.5 mL ACN 100 %.

Este ensayo presentó mayor variabilidad en los valores de los recobros para el benzo[a]pireno (C.V: 8 %), además no hubo disminución de los picos cromatográficos concernientes a las impurezas de la matriz al emplear la co-columna. Por lo anterior, no se incluyó la co-columna de sílice virgen al final del cartucho de DMFS en el proceso de extracción.

5.9.4 Optimización de la pre-concentración del extracto de DMFS mediante EFS en línea (EFS-CLAR/DAD) para HAPs

Para la optimización de la pre-concentración de los HAPs mediante EFS (**figura 4.2-sección experimental**) se evaluaron los mismos parámetros considerados para la pre-concentración de los OFFs.

5.9.4.1 Efecto de la naturaleza del adsorbente en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs

El efecto en el acoplamiento del adsorbente usado en el proceso de pre-concentración de los HAPs fue analizado en términos de la resolución cromatográfica de los analitos en estudio. En la pre-concentración de la disolución estándar de los 4 HAPs solo se empleó sílice C₁₈ de 10 µm como adsorbente en la pre-columna EFS. Se obtuvieron picos cromatográficos detallados con adecuada resolución; por lo anterior se continuó trabajando con este adsorbente en los ensayos posteriores.

5.9.4.2 Efecto de la proporción de acetonitrilo proveniente de la DMFS en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs

Teniendo en cuenta que el adsorbente empleado en la EFS tiene características apolares, la retención de los analitos en estudio debe realizarse con una proporción de disolvente orgánico baja para que permita la retención cuantitativa de los mismos. Razón por la cual el extracto de la DMFS de 1.5 mL de ACN al 100 % (que contiene a los HAPs) presenta una fuerza de elución muy alta para lograr la retención cuantitativa antes mencionada. Por lo tanto, se necesitó diluir el extracto proveniente del cartucho de DMFS previo al proceso de pre-concentración de los analitos en la pre-columna que contiene la sílice C₁₈.

- *Dilución del extracto proveniente del cartucho de dispersión con agua:* al adicionar diferentes volúmenes de agua al volumen de 1.5 mL de ACN al 100 % proveniente del cartucho de DMFS y que contiene a los HAPs, se observó el incremento de la retención de los analitos al pre-concentrar las disoluciones en la sílice C₁₈. A medida que la cantidad de agua se incrementa en las disoluciones que contienen a los hidrocarburos, los recobros mejoran sustancialmente, registrándose un aumento del 50 al 96 % cuando la concentración de ACN:Agua fue del 40:60 v/v (**figura 5.20**); sin embargo, por debajo de este valor los recobros de los últimos hidrocarburos, benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno disminuyen en un 10 %. Este comportamiento se debe a la baja solubilidad de estos compuestos en agua, lo cual afecta la desadsorción cuantitativa a otro sistema.

Con base en lo anterior se estableció que los 1.5 mL de ACN al 100 % provenientes del cartucho de DMFS deberían ser diluidos con aproximadamente 2.2 mL de agua para obtener una disolución de 40:60 v/v de ACN:Agua; en esta forma se concluyó que la relación ACN:Agua más apropiada para pre-concentrar a los HAPs fue de 1.0 mL ACN al 100 % por 1.5 mL de agua.

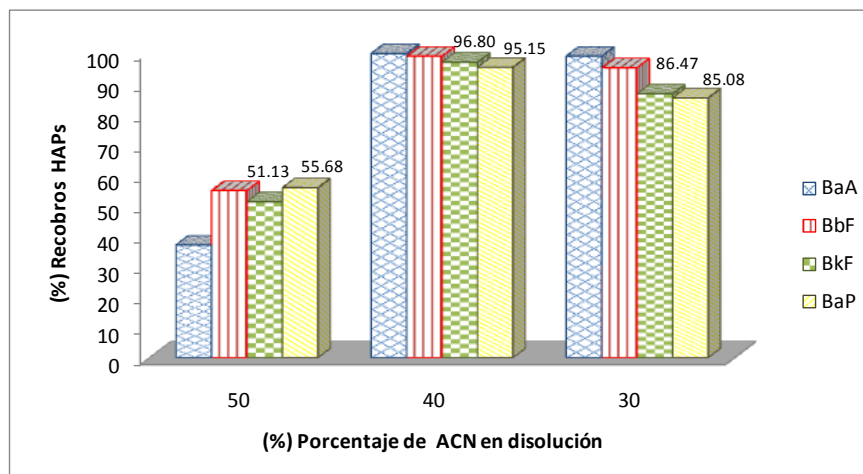


Figura 5.20. Efecto del porcentaje de ACN en el extracto proveniente del cartucho de DMFS sobre la eficiencia de la pre-concentración de los HAPs en una pre-columna con sílice C_{18} . Pre-concentración de disoluciones con $0.01 \mu\text{g}$ HAPs a caudal de 1.0 mL min^{-1} .

5.9.4.3 Efecto del caudal en la eficiencia de pre-concentración de los HAPs

Una vez establecida la concentración de ACN requerida para el proceso de pre-concentración de los HAPs en una pre-columna con sílice C_{18} , la cual se encuentra acoplada al sistema cromatográfico, el paso siguiente consistió en evaluar el efecto del caudal de pre-concentración sobre los valores de los recobros cuando se trabajó a concentraciones bajas y altas. En la **figura 5.21** se presentan los recobros de los 4 HAPs cuando se pre-concentraron disoluciones estándar a diferentes caudales en el sistema EFS-CLAR/DAD.

La alta afinidad que presentan los HAPs por el material particulado hace posible que el efecto del caudal de pre-concentración sobre los valores de recobros para bajas y altas concentraciones sea despreciable. Los recobros se mantuvieron entre el 92 y 101 % (**figura 5.21**). Por lo anterior, para la pre-concentración de los extractos provenientes de la DMFS (que contienen a los 4 HAPs) se utilizó un caudal de 1.0 mL min^{-1} .

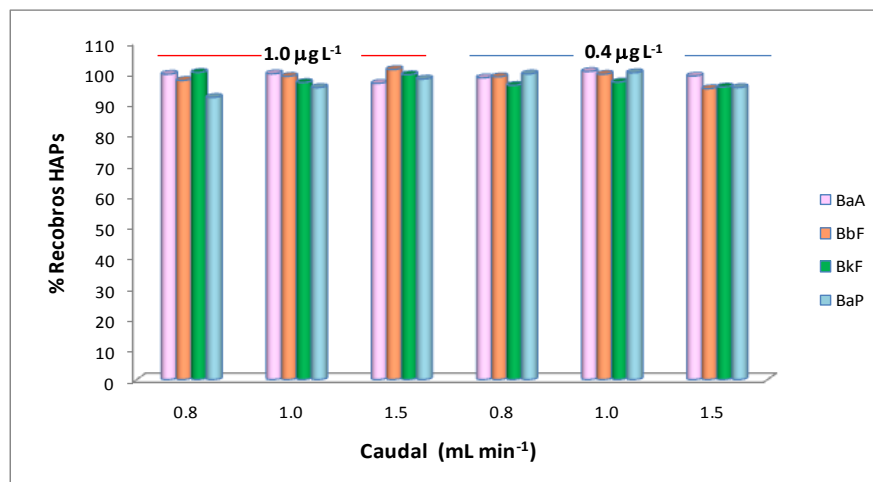


Figura 5.21. Efecto del caudal de pre-concentración, en el sistema EFS-CLAR/DAD, sobre los valores de recobros en disoluciones de HAPs en ACN:Agua al 40:60 v/v, para concentraciones bajas ($1.0 \mu\text{g L}^{-1}$) y altas ($0.4 \mu\text{g L}^{-1}$).

5.9.4.4 Acople de la DMFS a EFS-CLAR/DFL

Para el análisis de los HAPs en tejidos de bovino se utilizó el acople descrito en la **figura 5.11**, en el cual se realizó la detección por fluorescencia (DFL) y se utilizó un reservorio adicional en la válvula selectora de disolventes (D_3) para el ACN:Agua al 40:60 v/v y en esta forma se aplicó la secuencia de limpieza y de elución de HAPs en muestras de hígado anteriormente optimizada. El primer ensayo de extracción para HAPs en muestras de hígado en el modo acoplado consistió en llevar a cabo la secuencia de limpieza y elución previamente optimizadas en el modo fuera de línea bajo las siguientes condiciones de operación:

- 5.0 mL agua, 5.0 mL ACN:Agua 30:70 v/v, 4.0 mL ACN:Agua 40:60 v/v, 1.5 mL ACN 100 %
- Caudal de pre-concentración: 1.0 mL min^{-1}
- Volumen de dilución: 2.250 mL de agua que se mezclaron con 1.5 mL de ACN al 100 %, provenientes del cartucho en acero inoxidable de la DMFS y que contenían a los HAPs.
- Fase Móvil: 91:9 v/v metanol:agua
- Flujo bomba cromatográfica: 1.0 mL min^{-1} en modo isocrático
- Cantidad muestra:adsorbente: 0.050:0.200

Al aplicar la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de los 4 HAPs, se obtuvieron recobros entre 77 y 93 % cuando se utilizó 1.5 mL de ACN al 100 % como volumen de elución; los bajos recobros obtenidos fueron un indicio de que el volumen de elución empleado fue insuficiente para extraer cuantitativamente a los hidrocarburos del cartucho de DMFS. Los resultados obtenidos con esta secuencia se presentan en la **figura 5.22**.

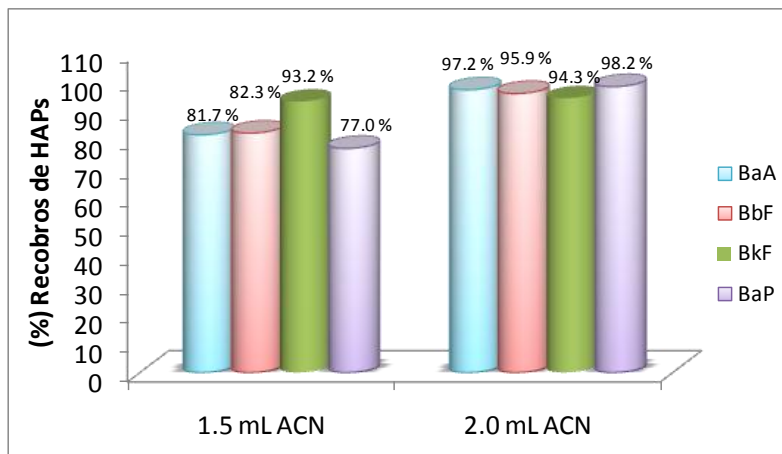


Figura 5.22. Recobros de HAPs aplicando el acople DMFS-EFS-CLAR/DFL en muestras de hígado fortificadas a 0.4 ng g^{-1} y aplicando 1.5 y 2.0 mL de ACN al 100 % como volúmenes de elución de los HAPs del cartucho de DMFS.

El segundo ensayo consistió en eluir a los HAPs con 2.0 mL de ACN al 100 % y diluirlos en la cámara de mezclado con 3.0 mL de agua. Con este último procedimiento los recobros aumentaron satisfactoriamente para todos los hidrocarburos (94 – 98 %) (**figura 5.22**) y por tanto se estableció la siguiente secuencia final de limpieza y elución de los HAPs en muestras de hígado utilizando la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL:

1. Agua (5.0 mL)
2. ACN:Agua al 30:70 v/v (5.0 mL)
3. ACN:Agua al 40:60 v/v (4.0 mL)
4. ACN al 100 % (2.0 mL)

El ACN que contiene a los hidrocarburos y que proviene del cartucho de DMFS fue diluido en la cámara de mezclado con 3.0 mL de agua para su posterior pre-concentración en la pre-columna **P** del sistema en línea. Con los parámetros anteriormente optimizados

para la determinación de HAPs en muestra de hígado, se prosiguió con la validación del sistema DMFS-EFS-CLAR/DFL.

5.9.5 Validación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación HAPs

5.9.5.1 Linealidad

El método en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL fue validado usando muestras de hígado libres de hidrocarburos, fortificadas con HAPs a diferentes niveles. Al relacionar el *área de pico (en UA)* vs. *los diferentes niveles de concentración* para cada hidrocarburo se obtuvieron las curvas de calibración correspondientes. En la **tabla 5.31** se indican las ecuaciones lineales para los 4 HAPs así como las desviaciones estándar asociadas a los valores de pendientes y ordenada además de los coeficientes de correlación.

Tabla 5.31. Linealidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL. Ecuaciones lineales para el área obtenida en función de la concentración, intervalo de 0.10 a 0.60 ng de OFFs por gramo de muestra; el intervalo de confianza de *m* y *b* esta calculado para un nivel del 95 % y 10 grados de libertad.

Hidrocarburo	Intervalo de concentración (ng g ⁻¹)	Ecuación de calibración	Error en la pendiente (± I.C)	Error en la ordenada (± I.C)	Coefficiente de correlación (r)
1. Benzo[<i>a</i>]antraceno	0.1-0.6	$y = 3175160x + 3355$	49413	18653	0.999
2. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	0.1-0.6	$y = 1123700x + 57332$	562	212	0.994
3. Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	0.1-0.6	$y = 6029018x - 19082$	1288	486	0.999
4. Benzo[<i>a</i>]pireno	0.1-0.6	$y = 6545219x + 191059$	2846	1074	0.995

I.C: Intervalo de confianza a 95%

Los valores de los coeficientes de correlación ($0.994 \leq r \leq 0.999$) demuestran que existe una adecuada linealidad entre la respuesta del detector con el incremento de la concentración de los 4 HAPs cuando las muestras de hígado se encuentran presentes en el sistema acoplado. El intervalo de linealidad para los 4 HAPs estuvo entre 0.10 y 0.60 ng g⁻¹. De acuerdo con lo anterior, el sistema DMFS-EFS-CLAR/DFL presentó una adecuada linealidad para el análisis de HAPs en muestras de hígado.

5.9.5.2 Exactitud

Los recobros globales del método, evaluados por el valor de la pendiente (al multiplicarla por 100) de las curvas de calibración al relacionar la *cantidad de HAPs recuperada* (en pg) vs. *la cantidad de los HAPs añadidos a la muestra*, se indican en la **tabla 5.32**. Los valores de los recobros para los 4 HAPs oscilaron entre el 96 (± 2 I.C) % obtenido para el benzo[*a*]pireno y el 99 (± 1 I.C) % obtenido para el benzo[*a*]antraceno. Estos valores están de acuerdo con la *Comisión Europea de Decisión 2002/657/EC/2002*, la cual considera que un método es exacto cuando sus recobros se encuentran entre el 50-120 % para fortificaciones iguales o inferiores a $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ cuando se emplea la CLAR como técnica de análisis. Además se observó una buena linealidad del método representada por sus valores de *r* que oscilaron entre 0.998 y 0.999.

Tabla 5.32. Recobro global del método: *cantidad recuperada en pg vs. cantidad adicionada de HAPs* (para un intervalo de fortificación entre 5 - 30 pg). Los intervalos de **m** y **b** están calculados con base en la distribución *t* para un $\alpha= 0.05$ y 11 grados de libertad.

Hidrocarburo	Recobro (%) (pendiente x 100)	Ordenada ¹	Coefficiente correlación (r)
1. Benzo[<i>a</i>]antraceno	99 (± 1)	- 0.27 (± 0.26)	0.999
2. Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	97 (± 2)	0.21 (± 0.28)	0.999
3. Benzo[<i>k</i>]fluoranteno	98 (± 2)	- 0.12 (± 0.31)	0.999
4. Benzo[<i>a</i>]pireno	96 (± 2)	0.40 (± 0.29)	0.998

¹I.C: Intervalo de confianza a un 95 % (t_{n-2}).

En general, el método de extracción y posterior cuantificación de HAPs empleando el acople DMFS-EFS-CLAR/DFL en muestras de hígado de bovino presentó una adecuada exactitud.

5.9.5.3 Precisión

En la **tabla 5.33** se presentan los datos de precisión del método acoplado, evaluada en función de la repetibilidad *intra-día* para los diferentes niveles de fortificación. Los C.V. % globales fueron inferiores al 10 % para los diferentes niveles de fortificación por lo que se infiere que existe una adecuada repetibilidad. Respecto a la precisión *inter-día* para

los dos niveles de fortificación, los valores de los C.V. % fueron inferiores al 11 %, los cuales están de acuerdo con la *Comisión Europea de Decisión 2002/657/EC/2002*, organismo que considera que un método es preciso cuando los valores de la C.V. % son inferiores a 20 %. En la **tabla 5.34** se presentan los C.V. % para los dos niveles de fortificación; por lo anterior, se puede indicar que la metodología acoplada presentó una adecuada precisión para ser aplicada a muestras de hígado.

Tabla 5.33. Repetibilidad del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL para los 4 niveles de concentración con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para n= 3.

Hidrocarburo	Nivel de concentración en ng g ⁻¹ de hígado				Promedio global
	0.10	0.20	0.40	0.6	
	C.V. (%)				
1. Benzo[a]antraceno	2	2	4	1	5
2. Benzo[b]fluoranteno	4	8	2	2	9
3. Benzo[k]fluoranteno	2	2	1	2	4
4. Benzo[a]pireno	2	4	2	4	6

Tabla 5.34. Precisión *inter-día* del método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL para 2 niveles de concentración (0.10 y 0.60 ng g⁻¹) con muestras de hígado. La dispersión de los promedios está dada en C.V. % para n= 5 en días diferentes.

Hidrocarburo	Nivel de fortificación (ng g ⁻¹)	
	0.10	0.60
	C.V. (%)	
1. Benzo[a]antraceno	10	3
2. Benzo[b]fluoranteno	3	2
3. Benzo[k]fluoranteno	1	2
4. Benzo[a]pireno	2	4

5.9.5.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección experimentales del método (LDEM) en línea para la extracción y posterior cuantificación de los HAPs fueron determinados mediante fortificación secuencial en concentraciones decrecientes con estándares de los 4 HAPs a las muestras de hígado (por debajo de 0.1 ng g^{-1} de muestra), en la forma descrita en la **sección 4.4.11.4** de la sección experimental. En la **tabla 5.35** se reportan los valores de los LDM para los 4 HAPs. Los LDEM fueron iguales a 0.012 ng g^{-1} de muestra y los LCEM fueron de 0.040 ng g^{-1} para todos los hidrocarburos.

Tabla 5.35. Límites de detección del método DMFS-EFS-CLAR/DFL estimados según: “Code of Federal Regulation (US, EPA) Appendix B to Part 16 Definition and Procedure for the Determination of Method Detection Limit”, obtenidos con las ecuaciones 4.4 y 4.5 para 0.050 g de muestra.

Hidrocarburos	^a LDM			^e LCM	^g LDA
	^b LDEM (S/N= 3) (ng g^{-1})	^c LDTM _{95%} (ng g^{-1})	^d LDTM _{99%} (ng g^{-1})	^f LCEM (S/N=10) (ng g^{-1})	Masa de HAPs (μg) detectable
1.Benzo[a]antraceno	0.012	[0.010-0.036]	0.016	0.04	0.6
2.Benzo[b]fluoranteno	0.012	[0.019-0.066]	0.030	0.04	0.6
3.Benzo[k]fluoranteno	0.012	[0.010-0.033]	0.015	0.04	0.6
4.Benzo[a]pireno	0.012	[0.012-0.042]	0.019	0.04	0.6

^aLDM: Límite de Detección del Método. ^bLDEM: Límite de Detección Experimental del Método. ^cLDTM_{95%}: Intervalo para el Límite de Detección Teórico del Método a un 95% de confiabilidad para 7 ensayos. ^dLDTM_{99%}: Límite de Detección para un 99% de confiabilidad. ^eLCM: Límite de Cuantificación del Método. ^fLCEM: Límite de Cuantificación Experimental del Método. ^gLDA: Límite de Detección Absoluto

Al comparar los **LDEM** con los valores teóricos (**LDTM**) obtenidos con la metodología del “Code of Federal Regulation” (**ecuaciones 4.4 y 4.5**), se observó que los valores se encontraban en el intervalo correspondiente al 95 % de confiabilidad para benzo[a]antraceno, benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno; en estos casos el modelo estadístico aplicado para este tipo de metodologías incorporó fácilmente los valores experimentales obtenidos.

Para el caso del benzo[b]fluoranteno se obtuvo un LDEM de 0.012 ng g^{-1} , el cual es considerado bastante bueno para este compuesto. Otras metodologías analíticas que han empleado el sistema CLAR/DFL reportan LDE del orden de 0.01 ng g^{-1} para el benzo[b]fluoranteno en carne de res y en pollo ahumado (Farhadian et al., 2010). Por lo

anterior, el sistema DMFS-EFS-CLAR/DFL presentó la sensibilidad adecuada para el análisis de 4 HAPs en muestras de hígado de bovino.

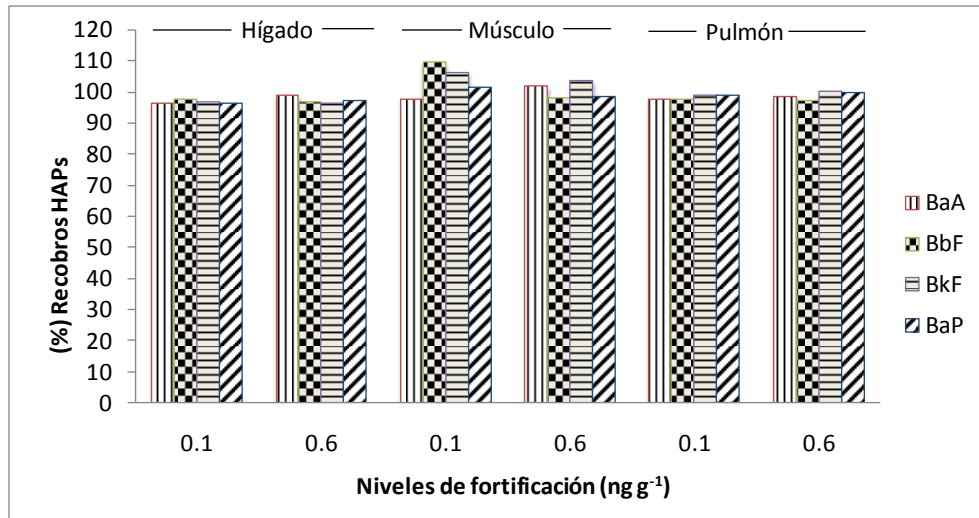
5.9.5.5 Robustez

Con la metodología descrita en la **sección 4.4.11.5** se aplicó el sistema acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL a diferentes tejidos de bovino (músculo y pulmón), los cuales fácilmente pueden acumular hidrocarburos por su alto contenido de lípidos. El análisis de este tipo de muestras puede contribuir a un diagnóstico médico veterinario y al control de la calidad de alimentos de origen animal destinados al consumo humano.

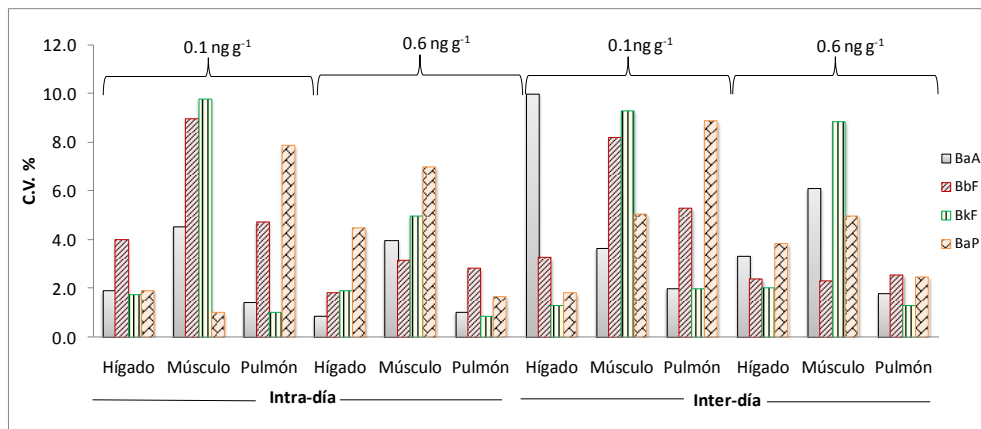
En la **figura 5.23.a** se indican los recobros promedio obtenidos para los tres tejidos de bovino analizados; los valores indicaron recobros cuantitativos para un nivel de fortificación de 0.6 ng g^{-1} entre 96 y 99 % para hígado, 98 y 102 % para músculo y del 97 y 100 % para pulmón. Para un nivel más bajo de concentración (0.1 ng g^{-1}) los recobros para los tres diferentes tipos de tejidos presentaron un comportamiento similar sin cambios significativos en los valores (96 al 97 % para el hígado, 98 al 110 % para músculo y 98 al 99 % para pulmón).

La precisión del método aplicado a los diferentes tejidos se indica en la **figura 5.23.b**; la precisión intra-día e inter-día, expresada como el C.V. %, tuvo valores entre 1 y 9 % para muestras de hígado y pulmón, mientras que para las muestras de músculo los C.V. % fueron ligeramente más altos (1 - 10 %). Sin embargo no existen diferencias significativas entre los valores de los C.V. % de los tejidos analizados.

Por lo anterior, el método acoplado DMFS-EFS-CLAR/DFL puede ser aplicado a diferentes tipos de tejidos de bovino para la determinación de los 4 HAPs sin cambios significativos en la precisión y exactitud del sistema. En la **figura 5.24** se presentan los cromatogramas obtenidos para los diferentes tipos de tejidos analizados mediante el acople DMFS-EFS-CLAR/DFL, en cada uno de ellos se puede observar la ausencia de picos interferentes a los tiempos de retención de los analitos de interés, indicando de esta forma que las etapas de limpieza optimizadas fueron eficientes.



a



b

Figura 5.23. Robustez de la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL con diferentes tejidos de bovino a dos niveles de fortificación (0.1 y 0.6 ng g⁻¹). **a.** Recobros. **b.** Precisión C.V. %.

5.9.6 Aplicación de la metodología en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL a muestras de hígado con daños patológicos y productos alimenticios de origen animal

El siguiente paso en la validación del método en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL consistió en aplicar la metodología analítica a 4 muestras de hígado de bovino con daños patológicos (muestras identificadas con los números 2, 17, 27 y 30) provenientes de ejemplares jóvenes del Complejo Agroindustrial de Tizayuca (CAIT). También fueron analizadas muestras de jamón ahumado de dos marcas registradas comercialmente con la metodología en línea.

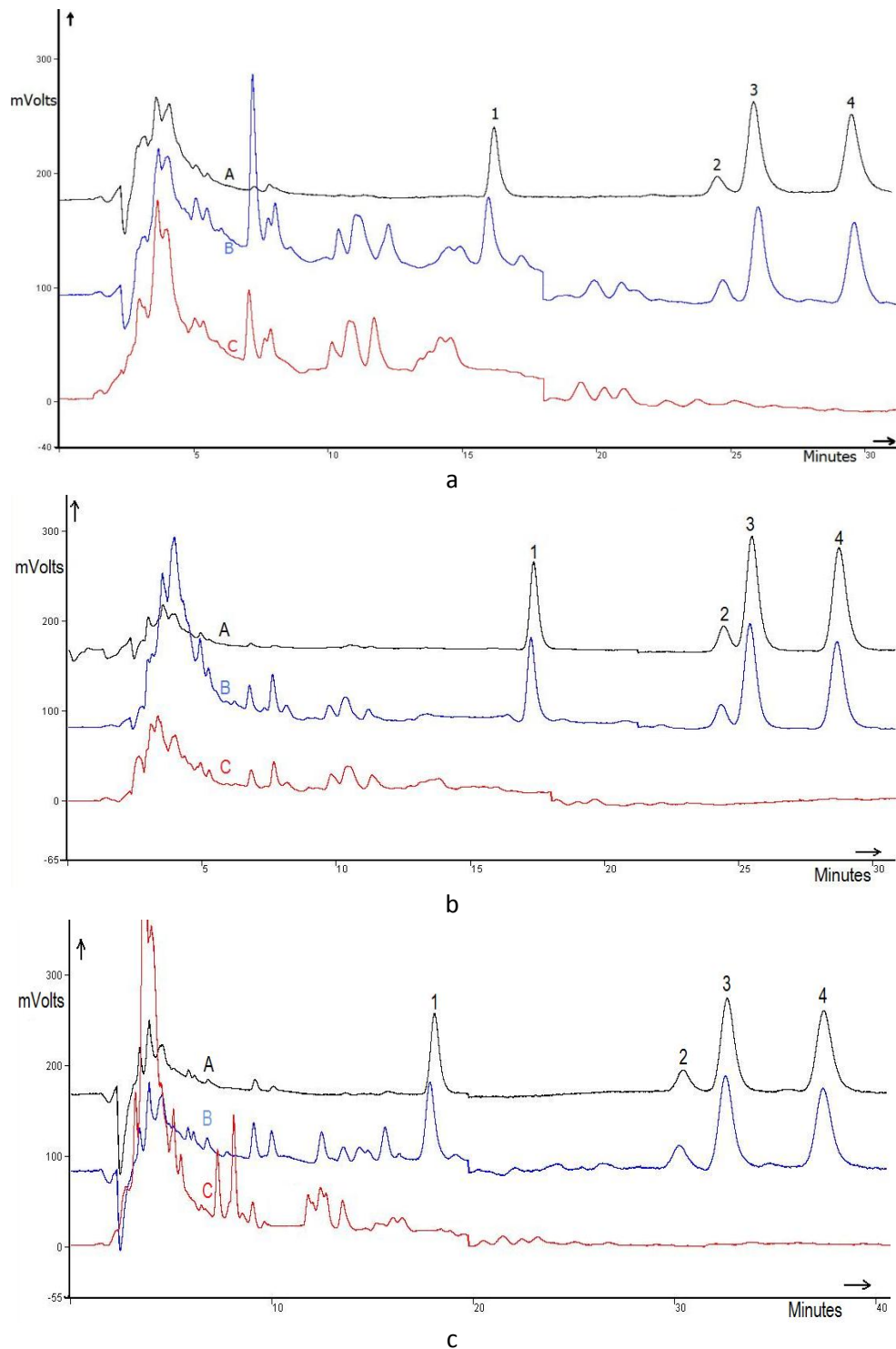
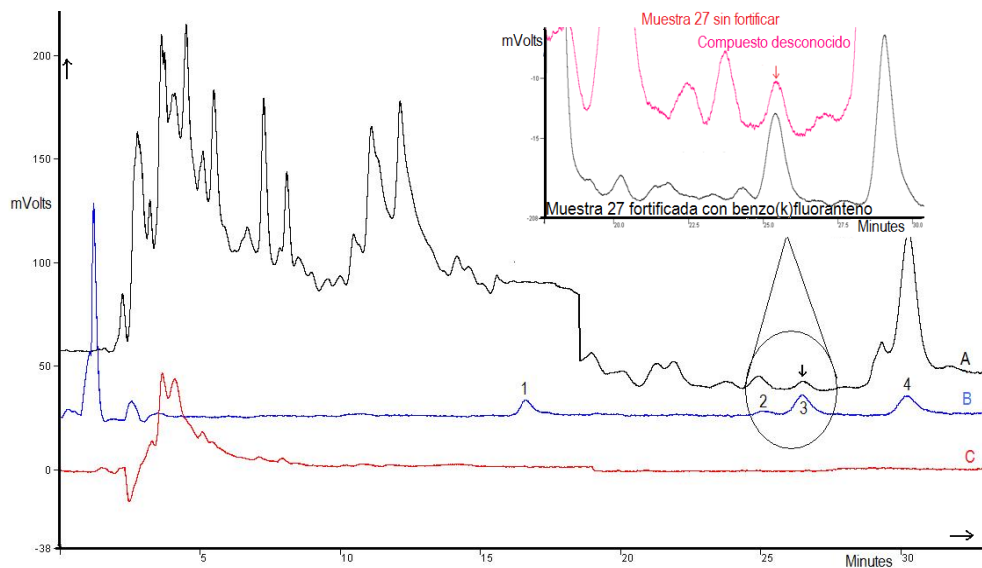
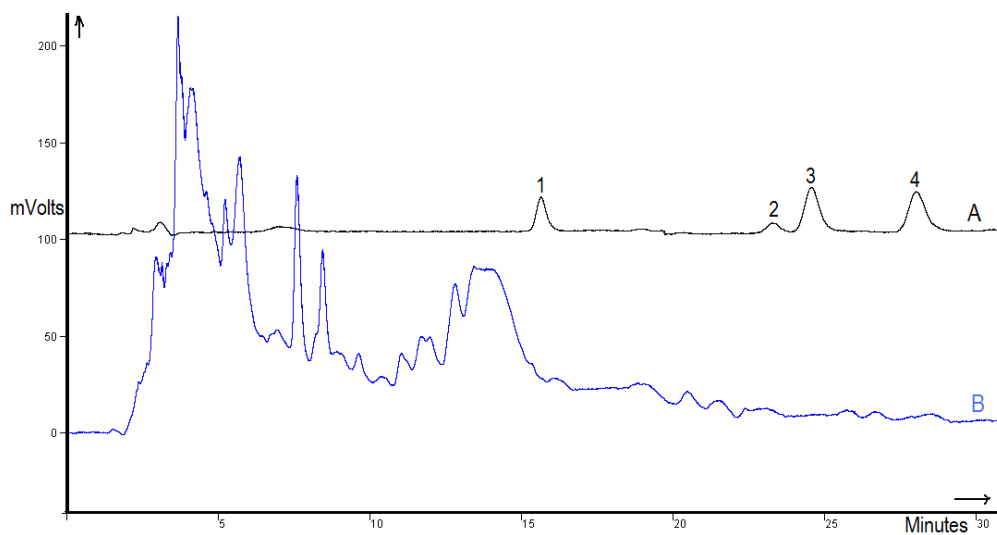


Figura 5.24. Cromatogramas obtenidos mediante la aplicación de DMFS-EFS-CLAR/DFL. **A.** Disolución estándar de $1.5 \mu\text{g L}^{-1}$ de HAPs. **B.** Muestra fortificada a 0.6 ng g^{-1} de HAPs. **C.** Muestra sin fortificación. **a.** Hígado. **b.** Músculo **c.** Pulmón. 1. Benzo[a]antraceno. 2. Benzo[b]fluoranteno. 3. Benzo[k]fluoranteno. 4. Benzo[a]pireno. Modo isocrático con 91:9 v/v metanol:agua a flujo de 1.0 mL min^{-1} .

Las muestras de jamón analizadas no presentaron picos cromatográficos detectables por el método analítico propuesto que indicaran la presencia de los HAPs como puede observarse en la **figura 5.25.a, cromatograma C**.



a



b

Figura 5.25. Cromatogramas aplicando la metodología DMFS-EFS-CLAR/DFL **a. A.** Muestra de patología número 27, zoom de pico sospechoso con adición de benzo[k]fluoranteno y muestra 27 fortificada. **B.** Disolución control de $0.15 \mu\text{g L}^{-1}$ de HAPs. **C.** Muestra de jamón ahumado. **b. A.** Disolución control de $0.25 \mu\text{g L}^{-1}$. **B.** Muestra de patología número 17.

Las muestras de hígado con daños patológicos identificadas con los números 2, 17 y 30 no presentaron picos cromatográficos detectables que indicaran la presencia de los HAPs por este método (**figura 5.25.b, cromatograma B**). En el caso de la muestra identificada con el número 27 presentó un pico cromatográfico con el tiempo de retención del benzo[*k*]fluoranteno, este comportamiento fue corroborado mediante triplicados y fortificación de la muestra a 0.1 ng g^{-1} de benzo[*k*]fluoranteno; en la **figura 5.25.a** se presentan los cromatogramas (**A y B**) respectivos.

Los cromatogramas obtenidos del análisis de la muestra de hígado número 27 indicaron un incremento de pico del compuesto desconocido por la adición del benzo[*k*]fluoranteno. Por lo anterior se considera que la muestra 27 probablemente presentó el benzo[*k*]fluoranteno a niveles no cuantificables, pues la especificidad de la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL con la detección fluorescente es una herramienta confiable para indicar la presencia del HAP, sin embargo un análisis por CLAR-EM verificaría completamente esta afirmación.

De acuerdo con los resultados obtenidos es posible indicar que el método analítico utilizado ofrece resultados confiables, sensibles, exactos, precisos y rápidos para la elaboración de un diagnóstico veterinario.

5.10 Ventajas de la metodología analítica en línea DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de HAPs en tejidos de bovino frente a otras metodologías aplicadas en alimentos

Los reportes publicados acerca de trabajos realizados con muestras de hígado en la determinación de HAPs son escasos; son predominantes los análisis en muestras de mariscos y aceites comestibles. En la **tabla 5.36** se indican algunas metodologías utilizadas para el análisis de HAPs en diferentes matrices.

Es evidente que la DMFS, bien sea en el modo fuera de línea o en línea ofrece un menor consumo de disolventes (11 mL), bajos tiempos de análisis (1 h), cantidades pequeñas de muestra y límites de detección lo suficientemente bajos para competir con otros sistemas de análisis como CG-EM. Incluso el método EPA 8310 para residuos sólidos

Tabla 5.36. Datos comparativos entre la metodología analítica propuesta DMFS-EFS-CLAR/DFL y otras metodologías de extracción y análisis para HAPs en diferentes matrices.

Parámetro	Soxhlet ^a	Método 8310 EPA	DMFS ^g fuera de línea	EAM ^j	DMFS ^m en línea
Cantidad de muestra (g)	10 ^b	10 ^e	0.05 ^h	1 - 0.2 ^k	0.05
Consumo de reactivos (mL)	160 ^c	300 ^f	10.5 ⁱ	18 ^l	11
Tiempo de extracción y análisis	18 h	16-24 h	1 h	45 min	1 h
Limpieza	n.d ^d	sílica gel	s.l	silica gel	s.l
Determinación	CG-EM	CLAR-DFL	CLAR-DFL	CLAR-DFL	CLAR-DFL
Recobros (%)	70 - 118	n.d	99 - 103	86 - 98	96 - 99
LDM ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	20-75	0.013-0.66	0.4 - 0.9	0.1-0.5	0.012

^aAnyakora et al., 2005. ^bMuestras marinas. ^cDiclorometano, cloruro de metileno, ACN. ^eSólidos, suelos, agua 16 HAPs. ^fAcetona:Hexano (1:1 v/v) ^gTrabajo realizado en el laboratorio de análisis de trazas. ^hMuestras de hígado y camarón. ⁱACN, metanol. ^jPena et al., 2007. ^kSalmón y trucha. ^lHexano metano con hidróxido de potasio, diclorometano. ^mEl presente trabajo. n.d: No hay datos. n.r: No reportado. s.l: Sin limpieza. EAM: Extracción Asistida por Microondas.

emplea grandes cantidades de disolventes en la metodología de extracción (soxhlet) y tiempo realmente prolongados (16-24 h), sin tener en cuenta el tiempo de análisis cromatográfico para los 16 HAPs prioritarios (37 min).

De acuerdo con los lineamientos del *Reglamento (Comunidad Europea CE) No 333/2007 de la Comisión 28 de marzo de 2007*, en el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de benzo[a]pireno en productos alimenticios, los LD recomendados para mariscos son menores de 0.3 ng g⁻¹. La metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL cumple satisfactoriamente con este parámetro de calidad, pues el LDEM para el benzo[a]pireno fue de 0.012 ng g⁻¹.

Mediante el sistema acoplado fue posible aumentar la sensibilidad de la metodología en un factor de 75 veces respecto al sistema fuera de línea para el análisis de HAPs. Por lo anterior se puede considerar que la metodología analítica propuesta es amigable con el ambiente al compararla con las metodologías convencionales (Método EPA 8310 con LDM: 0.013-0.66 $\mu\text{g kg}^{-1}$), además de ser rápida, exacta, precisa y con un alto potencial de automatización para monitorear este tipo de sustancias en tejidos biológicos.

El uso de pequeñas cantidades de muestras permitirá a futuro realizar los análisis de biopsias y obtener, en un tiempo máximo de una hora, resultados rápidos y exactos de la muestra.

5.11 Comparación de los métodos analíticos acoplados para la determinación de OFFs y HAPs en muestras de bovino

En la **tabla 5.37** se presentan las condiciones de operación más relevantes entre los dos métodos analíticos acoplados para la determinación de OFFs y HAPs en tejidos de bovinos. Las diferencias fisicoquímicas (principalmente solubilidad) entre los dos grupos de contaminantes son las responsables de las diferencias en las secuencias de limpieza y elución finales para los OFFs y HAPs empleando la configuración de la **figura 5.11**. Los parámetros determinados para la retención cuantitativa de los analitos en estudio en la columna de pre-concentración con sílice C₁₈ (**P, figura 5.11**) se indican en la **tabla 5.37**.

Tabla 5.37. Parámetros optimizados de las metodologías acopladas DMFS-EFS-CLAR/DAD y DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de OFFs y HAPs respectivamente, en muestras de bovino.

Parámetro	DMFS-EFS-CLAR/DAD	DMFS-EFS-CLAR/DFL
	OFFs	HAPs
- Tamaño de la muestra (g)	0.050	0.050
- Secuencia de limpieza	1. Agua (2.5 mL). 2. ACN:Agua 30:70 v/v (2.0 mL)	1. Agua (5.0 mL). 2. ACN:Agua 30:70 v/v (5.0 mL). 3. ACN:Agua 40:60 v/v (4.0 mL)
- Elución	ACN al 100 % (2.0 mL)	ACN al 100 % (2.0 mL)
- Caudal de pre-concentración del extracto (mL min ⁻¹)	0.8	1.0
- Volumen de agua de dilución en la cámara dinámica de mezclado (mL)	8.0	3.0
- Tiempo de análisis (min)	45	60
- Límites de detección y cuantificación	0.04-0.25 µg g ⁻¹	0.012 ng g ⁻¹
- Recobros (%)	91-101	96-99
- Robustez C.V. %	≤ 12	≤ 10

Los 9 OFFs se retienen satisfactoriamente en el sistema acoplado cuando el porcentaje de ACN:Agua presente estuvo entre 25:75 y 20:80 v/v, mientras que los 4 HAPs lo hacen al 40:60 v/v de ACN:Agua; siendo en cada caso, la concentración más adecuada

para evitar fugas en el sistema de medida. De acuerdo con los valores de $\text{Log } K_{ow}$ de los primeros 4 OFFs (metil paratión, fenitrotión, paratión, clorfenvinfos y diazinón) estos se encuentran por debajo de 4.5, lo cual indica menor fuerza de adsorción en la sílice C_{18} cuando la concentración de ACN:Agua es igual o mayor al 50:50 v/v. Razón por la cual la concentración de disolvente orgánico en las etapas de limpieza fue relevante para mantener los recobros de los 9 OFFs cuantitativos.

Cuando se pre-concentraron disoluciones de los HAPs en ACN:Agua al 50:50 v/v los 4 HAPs presentaron recobros por encima del 40 %; es decir, la capacidad de retención de este tipo de compuestos es evidentemente mayor respecto a los OFFs en sílice C_{18} dadas sus propiedades hidrofóbicas. Las etapas de limpieza en la muestra de hígado cuando los HAPs están presentes en el cartucho de DMFS fueron 3, mientras que, con los OFFs, 2 etapas fueron requeridas para evitar fugas de los OFFs más polares.

El tiempo de análisis para los dos grupos de contaminantes con las metodologías acopladas osciló entre 45 y 60 minutos; la elución de los HAPs presentó tiempos mayores con respecto a los presentados por los OFFs, debido a las altas retenciones que presentan los HAPs en la columna analítica. Para los OFFs se presentó una amplia gama de interacciones tanto polares como apolares dada la estructura química de esta familia de plaguicidas.

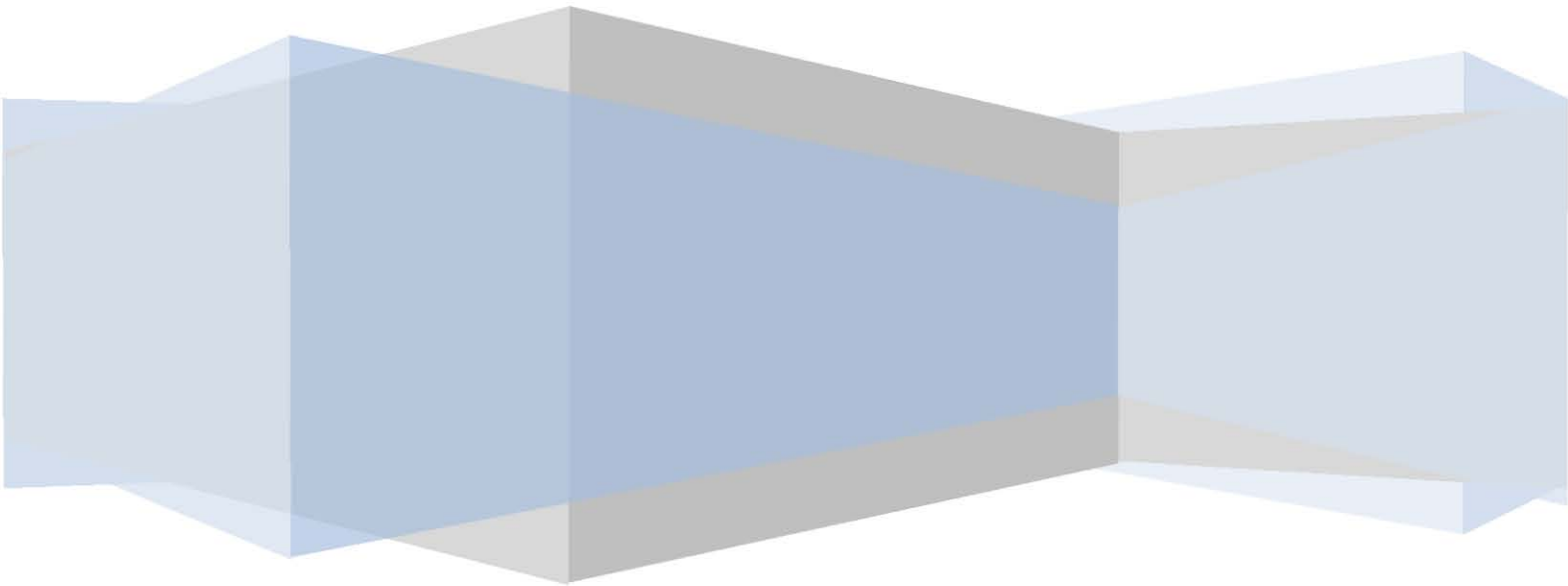
Las dos metodologías acopladas mostraron la robustez suficientes para aplicarse a diferentes tejidos de bovinos sin cambios en la precisión del método inicial (para muestras de hígado). Los valores de los C.V. % fueron inferiores al 13 % lo cual es bastante aceptable teniendo en cuenta la alta complejidad de las muestras analizadas.

Los límites de detección para los HAPs son evidentemente más bajos que los obtenidos para los OFFs. Esta diferencia es debido a la estructura molecular muy conjugada que caracteriza a los HAPs, los cuales presentan propiedades fluorescentes que permiten su detección a nivel de ultra-trazas. El análisis de los HAPs por cromatografía líquida con detector de fluorescencia es una de las metodologías más sensibles y selectivas para este tipo de contaminantes (*Smoker et al., 2010*).

Caso contrario sucede con los OFFs, los cuales presentan absorciones en la región del UV (ϵ : coeficientes de absorción molar, bajos) y la presencia de dobles enlaces conjugados es más baja que en los sistemas policíclicos.

En general los sistemas acoplados DMFS-EFS-CLAR/DAD y DMFS-EFS-CLAR/DFL deben ajustarse para cualquier tipo de analito tomando como referencia las propiedades fisicoquímicas de solubilidad, volatilidad, estabilidad fotoquímica y térmica, etc., que permitan la extracción y posterior análisis de los analitos de forma exacta y precisa para cualquier tipo de diagnóstico.

6. Conclusiones



La metodología analítica acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD para la determinación de OFFs, presentó la calidad analítica de linealidad ($0.995 \leq r \leq 0.999$), precisión (C.V. % ≤ 12), exactitud (91 - 101 %) y robustez necesaria para su aplicación en diferentes tejidos de bovino para el control de calidad en productos destinados al consumo humano y para la elaboración de un diagnóstico veterinario en ejemplares expuestos a este tipo de contaminantes. Los límites de detección alcanzados con la metodología propuesta son aceptables, teniendo en cuenta los límites máximos permisibles de la Norma Mexicana. Estos valores oscilaron entre 0.04 y 0.25 $\mu\text{g g}^{-1}$ de muestra en base húmeda.

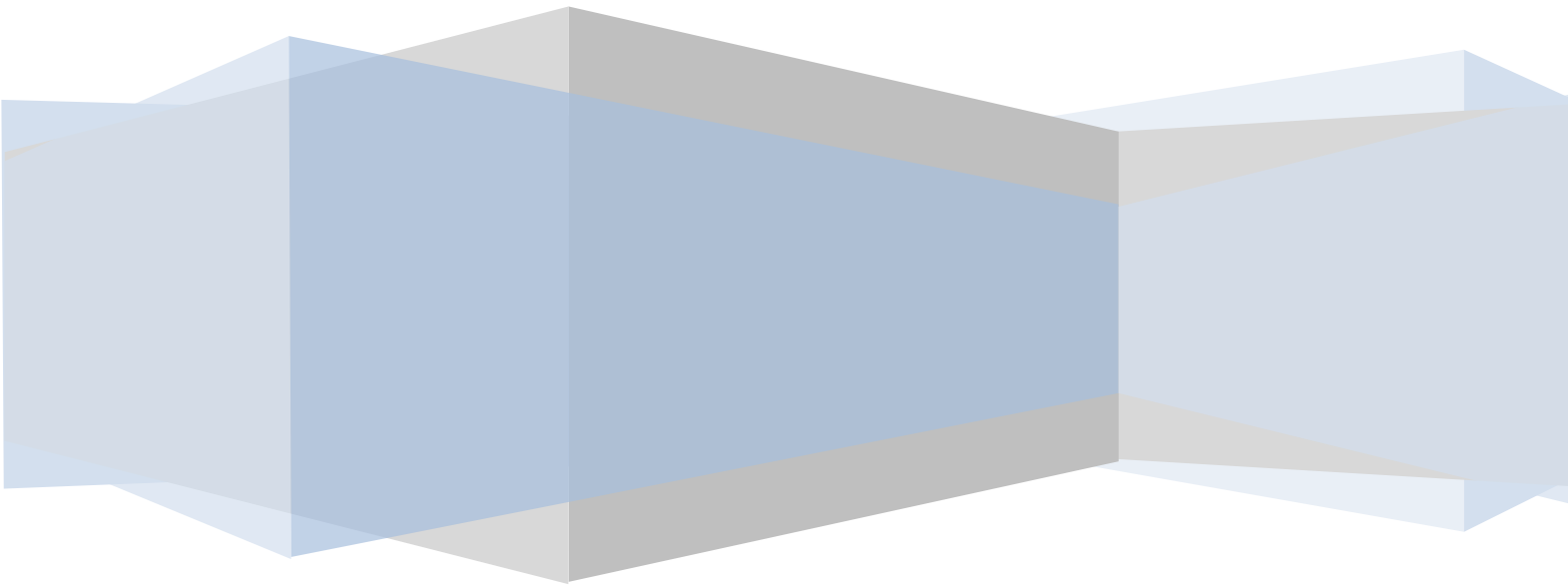
Dentro de las ventajas obtenidas con el método DMFS-EFS-CLAR/DAD se encuentran: el bajo consumo de disolventes (disminución de costos), manipulación de pequeñas cantidades de muestra, tiempos de análisis cortos, además de un menor número de pasos en el proceso de tratamiento de la muestra, si se compara con el Método Oficial Mexicano NOM-ZOO-026-1994 que regula este tipo de contaminantes en tejidos de bovino.

La metodología analítica acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL para la determinación de HAPs, presentó la calidad analítica de linealidad ($0.998 \leq r \leq 0.999$), precisión (C.V. % ≤ 10), exactitud (96 - 99 %) y robustez necesaria para su aplicación en diferentes tejidos de bovino para el control de calidad en productos destinados al consumo humano y para contribuir al diagnóstico médico veterinario en ejemplares expuestos a este tipo de contaminantes. Los límites de detección y cuantificación alcanzados con la metodología propuesta son aceptables (LD: 0.012 ng g^{-1}) si se comparan con otros sistemas de análisis de mayor costo como lo es un sistema CLAR-EM/EM (aprox. LD: 0.03 ng g^{-1}), lo cual representa una gran ventaja respecto a la relación costo:sensibilidad.

En general la robustez de la metodología de análisis permite ser aplicada rápidamente a otros tipos de tejidos (músculo, pulmón y jamón) sin cambios en las características estadísticas de calidad (precisión y exactitud).

El acople de dos metodologías de extracción y posterior análisis por cromatografía de líquidos con un detector con arreglo de diodos o de fluorescencia, ha sido el primer trabajo reportado sobre esta temática en la literatura especializada.

7. Perspectivas



Los resultados obtenidos en este trabajo abren la posibilidad de ahondar en el estudio del comportamiento fisicoquímico de otro tipo de contaminantes al aplicar la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DAD o DMFS-EFS-CLAR/DFL en diferentes muestras sólidas o de alta viscosidad que requieran resultados de forma rápida, económica y confiable.

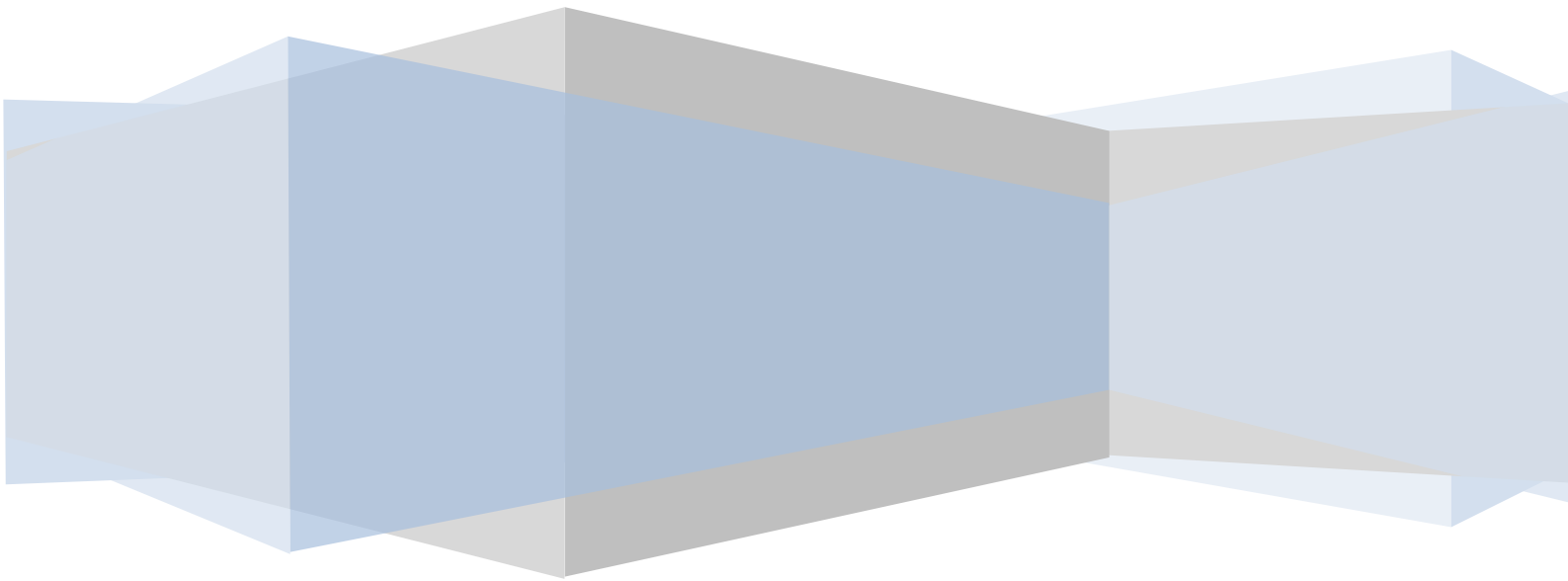
Con los resultados obtenidos en el desarrollo de la primera metodología acoplada entre la DMFS al sistema cromatográfico mediante la EFS, es posible continuar con el proceso de automatización del sistema analítico propuesto. La incorporación de electroválvulas, bombas controladas a través de un “software” y un automuestreador con varios cartuchos de DMFS en acero inoxidable serían requeridos para lograr la total automatización de la metodología aquí desarrollada.

Se debe continuar con el estudio de otros contaminantes presentes en muestras alimenticias destinadas para el consumo humano y de esta forma concientizar la necesidad del control de calidad de los alimentos desde el origen hasta su destino final. Las metodologías acopladas brindan suficientes ventajas analíticas que permitirían desplazar a las ya existentes, las cuales requieren un mayor consumo de reactivos, tiempo de análisis prolongados y una mayor generación de residuos.

Dada la robustez de los sistemas acoplados DMFS-EFS-CLAR/DAD y DMFS-EFS-CLAR/DFL su aplicación a otro tipo de matrices es promisoría pues su adecuación no requiere de otros aditamentos que incrementen el costo de los análisis.

Finalmente, las metodologías analíticas propuestas DMFS-EFS-CLAR/DAD y DMFS-EFS-CLAR/DFL deben validarse mediante la aplicación de estudios inter-laboratorio que garanticen la reproducibilidad, robustez, selectividad y exactitud bajo otras condiciones de operación.

8. Referencias Bibliográficas



A

Aboudania, M., and Lapadula, D.M. 1990. Mechanisms of organophosphorus ester induced delayed neurotoxicity: Type I and Type II. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology*, 30, 405-440.

Alcaide-Molina, M., Ruiz-Jiménez, J., Mata-Granados, J.M and Luque de Castro, M.D. 2009. High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solid-phase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 1115-1125.

Anyakora, C., Ogebeche, A., Palmer, P., and Coker, H. 2005. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in marine samples of Siokolo Fishing Settlement. *Journal of Chromatography A*, 1073, 323-330.

B

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

Barker, S. 2007. Matrix solid phase dispersión (MSPD). *Journal of Biochemical Biophysical Methods*, 70, 151-162.

Barranco, A., and Alonso-Salces, R.M. 2003. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *Journal of Chromatography A*, 988, 33-40.

Belkessam, L.P., Lecomte, V., and Milon, A. 2005. Influence of pre-treatment step on PAHs analyses in contaminated soils. *Chemosphere*, 58, 321-328.

Berrueta, L.A., Fernandez-Armentia, M., and Bakkali, A. 2001. Matrix solid-phase dispersion technique for the determination of a new antiallergic drug, bilastine, in rat faeces. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 760, 185-90.

Beyer, A., and Marek, B. 2008. Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food. *Food Chemistry*, 108, 669-680.

Bird, S.B., Stherland, T.D., Gresham, C., Oakeshott, J., Scott, C., and Eddleston, M. 2008. OpdA Bacterial Organophosphorus Hidrolase Persevents Lethality in Rats after Poisoning with Highty Organophosphorus pesticides. *Toxicology*, 247, 88-92.

Bogialli, S., and Di Corcia, A. 2007. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 163-179.

Bostrom, C.E., Gerde, P., Hanberg, A. Jernstrom, B., Johansson, C., and Kyrklund, T. 2002. Cancer Risk Assessment, Indicator, and Guidelines for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Ambient Air. *Environmental Health Perspectives*, 110, 451-488.

Brian, P., and Scoot, J. 1994. Determination and confirmation of organophosphate pesticides and their metabolites in Beef Tissue Using Thermospray/LC-MS. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 42, 2619-2624.

Buonasera, K., D'Orazio, G., Fanali, S., Dugo, P., and Mondello, L. 2009. Separation of organophosphorus pesticides by using nano-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3970-3976.

C

Caballo-López, A., and Luque de Castro, M.D. 2003. Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration–solid-phase extraction–column liquid chromatography–post column derivatisation–fluorescence detection for the determination of *N*-methylcarbamates in soil and food. *Journal of Chromatography A*, 998, 51-59.

Campone, L., Piccinelli, A.L. Östman, C., and Rastrelli, L. 2010. Determination of organophosphorous flame retardants in fish tissues by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 397, 799-806.

Capriotti, A.L., Cavaliere, Ch., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., and Laganà, A. 2010. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2521-2532.

Casarett, D. 1996. Toxicology. *The Basic science of poisons*. 5^oEd. 655-667.

Chen, L., Ding, L., Jin, H., Song, D., Zhang, H., Li, J., Zhang, K., Wang, Y., and Zhang, H. 2007. The determination of organochlorine pesticides based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 589, 239-246.

Ciganek, M., and Neca, J. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons in porcine and bovine organs and tissues. *Veterinarni Medicina*, 51, 239-247.

Code of Federal Regulation (CFR). Title 40, Vol 20. Appendix B to Part 136- *Definition and Procedure for the Determination of the Method Detection Limit- Revision 1.11*. From the U. S. Government Printing Office via GPO Access. [40CFR136].

COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS, Diario Oficial de la Unión Europea. Por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. REGLAMENTO (CE) No 1881/2006 DE LA COMISIÓN de 19 de diciembre de 2006.

COMISIÓN DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS, Diario Oficial de la Unión Europea. Por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de plomo, cadmio, mercurio, estaño inorgánico, 3-MCPD y benzo[a]pireno en los productos alimenticios. REGLAMENTO (CE) No 333/2007 DE LA COMISIÓN de 28 de marzo de 2007.

Coster, S., and Gudrun, K. 2008. Pollutant effects on genotoxic parameters and tumor-associated protein levels in adults: a cross sectional study. *Environmental Health*, 7, 1-9.

Coulibaly, K., and Scoot, J. 1993. Thermostability of Organophosphate Pesticides and Some of Their Major Metabolites in Water and Beef Muscle. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 41, 1719-1723.

Coulibaly, K., and Scoot, J. 1994. Effect of pH and Cooking Temperature on the Stability of Organophosphate Pesticides en Beef Muscle. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 42, 2035-2039.

Covaci, A., Mashiya, J., Molope, I., Tshiame, I., Molatlhegi, R., and Ngobeni, P. 2010. Miniaturized methods based on matrix solid-phase dispersion for the rapid screening of 36 pesticides in agricultural food commodities. *Analytical Letters*, 43, 1400-1410.

Currie, L. 1995. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Applied Chemistry*, 67, 1699-1723.

D

Diagne, R., Foster, G., and Khan, S. 2002. Comparison of Soxhlet and microwaveassisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 3204-3207.

Dias, C., Alves, R.S., Casal, S. Oliveira, M.B., and Oliveira J. 2010. Development and Validation of aMatrix Solid-Phase DispersionMethod to Determine Acrylamide in Coffee and Coffee Substitutes. *Journal of Food Science*, 75, T57-T63.

Díaz-Plaza, E. M., Cortés, J.M., Vázquez, A. and Villén, J. 2007. Automated determination of pesticide residues in olive oil by on-line reversed-phase liquid chromatography gas chromatography using the through oven transfer adsorption desorption interface with electron-capture and nitrogen-phosphorus detectors operating simultaneously. *Journal of Chromatography A*, 1174, 145-150.

Dobrinás, S., Birghila, S., and Coatu, V. 2008. Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in honey and propolis produced from various flowering trees and plants in Romania. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 71-77.

E

Ericsson, M., and Colmsjo, A. 2003. Dynamic Microwave-Assisted Extraction Coupled On-Line with Solid-Phase Extraction and Large-Volume Injection Gas Chromatography: Determination of Organophosphate Esters in Air Samples. *Analytical Chemistry*, 75, 1713-1719.

European Commission Decision 2002/657/EC/2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*. 17, 8, 2002.

F

Farhadian, A., Jinap, S., Abas, F., and Sakar, Z.I. 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat. *Food Control*, 21, 606-610.

Fernández, V., and González, E. 2010. A matrix solid-phase dispersion–gel permeation chromatography–programmed temperature vaporisation–GC-MS procedure for the analysis of polycyclic aromatic. *Journal of Separation Science*, 33, 3741-3750.

Fernández, M., Llomperta, M., Lamasa, J., Loresa, M., Garcia, C., Cela, R., and Dagnac, T. 2008. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the simultaneous determination of pyrethroid and organochlorinated pesticides in cattle feed. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2832-2842.

Jiménez-Soto, J.M., Cárdenas, S., and Valcárcel, M. 2012. Evaluation of single-walled carbon nanohorns as sorbent in dispersive micro solid-phase extraction. *Analytica Chimica Acta*, 714, 76-81.

Finizio, A., Vighi, M., and Sandroni, D. 1997. Determination of N-Octanol/Water partition coefficient (Kow) of pesticide critical review and comparison of methods. *Chemosphere*, 34, 131-161.

Frenich, A., and Plaza, P. 2007. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1153, 194-202.

G

García de Llasera, M.P., and Reyes-Reyes, M.L. 2009. A validated matrix solid-phase dispersion method for the extraction of organophosphorus pesticides from bovine samples. *Food Chemistry*, 114, 1510-1516.

García de Llasera, M.P., Cruz-Reyes, L., and Vera-Avila, L. 2010. A method for the analysis of organophosphorus pesticide residues in Mexican axolotl. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45, 25-32.

García, M., Rodríguez, I., and Cela, R. 2007. Optimisation of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of organophosphate compounds in dust samples. *Analytica Chimica Acta*, 590, 17-25.

Garrido-Frenich, A., Plaza-Bolaños, P., and Martínez-Vidal, J. L. 2007. Multiresidue analysis of pesticides in animal liver by gas chromatography using triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1153, 194-202.

H

Hajslova, J., and, Zrostlikova, J. 2003. Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, 1000, 181-197.

Hankemeier, Th. and Rozenbrand, J. 1998. Data Correlation in On-Line Solid-Phase Extraction-Gas Chromatography-Atomic Emission/Mass Spectrometric Detection of Unknown Microcontaminants. *Chromatographia*, 48, 273-283.

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

Hennion, M.C., Pichon, V. 1994. Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water. *Environmental Science Technology*, 28, 576A-583A.

Herrera, M.C., Prados-Rosales, R.C., Luque-García, J.L., and Luque de Castro, M.D. 2002. Static-dynamic pressurized hot water extraction coupled to on-line filtration-solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-post-column derivatization-fluorescence detection for the analysis of N-methylcarbamates in food. *Analytica Chimica Acta*, 463, 189-197.

Hyotylainen, T., and Riekkola, M.L. 2004. Approaches for on-line coupling of extraction and chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 1962-1981.

I

Ishizaki, A., Saito, K., Hanioka, N., Narimatsu, S., and Kataoka, H. 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in food samples by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography-fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1217, 5555-5563.

K

Kalender, S., Ogutca, A., Uzunhisarcikli, M., Açikgoz, F., Durak, D., Ulusoy, Y., and Kalender, Y. 2005. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology*, 211, 197-206.

Kalachova, K., Pulkrabova, J., Drabova, L., Cajka, T., Kocourek, V., and Hajslova, Jana. 2011. Simplified and rapid determination of polychlorinated biphenyls, polybrominated diphenyl ethers, and polycyclic aromatic hydrocarbons in fish and shrimps integrated into a single method *Analytica Chimica Acta*, 707, 84-91.

Karageorgou, E.G., and Samanidou, V.F. 2011. Development and validation according to European Union Decision 2002/657/EC of an HPLC-DAD method for milk multi-residue analysis of penicillins and amphenicols based on dispersive extraction by QuEChERS in MSPD format. *Journal of Separation Science*, 34, 1893-1901.

Kazerouni, N., Sinha, R., Hsu, C., Greenberg, A., and Rothman, N. 2001. Analysis de 200 food items for benzo(a)pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food Chem. Toxicol.* 39, 423-436.

Kristenson, E.M., and Shahmiri, S. 2004. Matrix solid-phase dispersion micro-extraction of pesticides from single insects with subsequent GC-MS analysis. *Chromatographia*, 59, 315-320.

Kristenson, E.M., and Haverkate, E.G.J. 2001. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic-mass spectrometric analysis. *Journal of Chromatography A*, 917, 277-286.

Kruve, A., and Kunnapas, A. 2008. Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1187, 58-66.

L

Laganá, A., and Faberi, A. 2004. Application of an innovative matrix solid-phase dispersion-solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry analytical methodology to the study of the metabolism of the estrogenic mycotoxin zearalenone in rainbow trout liver and muscular tissue. *Environmental Analytical Chemistry*, 84, 1009-1016.

Lagunas-Allué, L., Sanz-Asensio, J., Martínez-Soria, M.T. 2010. Response surface optimization for determination of pesticide residues in grapes using MSPD and GC-MS: assessment of global uncertainty. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398, 1509-1523.

León-González, Z., Ferreira-Vera, C., Priego-Capote, F., and Luque de Castro, M.D. 2011. Targeting metabolomics analysis of the sunscreen agent 2-ethylhexyl 4-(N,N-dimethylamino)benzoate in human urine by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry with liquid chromatography-time-of-flight/mass spectrometry confirmation. *Journal of Chromatography A*, 1218, 3013-3021.

Liang, H.D., Hana, D.M., and Yan, X.P. 2006. Cigarette filter as sorbent for on-line coupling of solid-phase extraction to high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Journal of Chromatography A*, 1103, 9-14.

Liguori, L., Heggstad, K., Hove, H.T., and Julshamn, K. 2006. An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes. *Analytica Chimica Acta*, 573, 181-188.

Liu, Q., Shi, J., Sun, J., Wang, T. Zeng, L. Zhu, N., and Jiang, G. 2011. Graphene-assisted matrix solid-phase dispersion for extraction of polybrominated diphenyl ethers and their methoxylated and hydroxylated analogs from environmental samples. *Analytica Chimica Acta*, 708, 61-68.

Liu, W., Qi, J., Yan, L., Jia, Q., and Yuc, C. 2011. Application of poly(butyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) monolith microextraction coupled with high performance liquid chromatography to the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products. *Journal of Chromatography B*, 879, 3012-3016.

Long, G.L., and Winefordner, J.D. 1983. Limit of Detection: A closer look at the IUPAC definition. *Analytical Chemistry*, 55, 7, 712-724A.

Lundstedt, S., Haglund, P., and Oberg, L. 2000. Pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Journal of Chromatography A*, 883, 151-162.

M

Mackay, D., Shiu, W.Y., and Ma, K.C. 1992. Illustrated Handbook of Physical–Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, vol. II, Lewis Publishers, Michigan.

Maldaner, L., Santana, C.C., and Jardim, I.C.F. 2008. HPLC Determination of Pesticides in Soybeans using Matrix Solid Phase Dispersion. *Journal of Liquid Chromatography*, 31, 972-983.

Martínez-Nieto, L., Hodaifa, G., and Casanova, M.S. 2009. Elimination of pesticide residues from virgin olive oil by ultraviolet light: Preliminary results Hazard, *Journal of Hazardous Materials*, 168, 555-559.

Moliner, Y. Campíns, P. Molins, C. Segovia, L. and Seco, A. 2009. Miniaturized matrix solid phase dispersion procedure and solid phase microextraction for the analysis of organochlorinated pesticides and polybrominated diphenylethers in biota samples by gas chromatography electron capture detection. *Journal of Chromatography A*, 1216, 6741-6745.

Monika, M., and Buszewski, B. 2004. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *Journal of Chromatography B*, 800, 309-314.

Moreda-Piñeiro, J., Alonso-Rodríguez E., López-Mahía P., Muniategui-Lorenzo, S., Prada-Rodríguez, D., Romarís-Hortas V., Míguez-Framil, M., Moreda-Piñeiro A., and Bermejo-Barrera, P. 2009. Matrix solid-phase dispersion of organic compounds and its feasibility for extracting inorganic and organometallic compounds. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 110-116.

N

Nam, J.J., Song, K. C., Eom, S.H., and Lee, A. 2003. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in South Korea. *Chemosphere*, 50, 1281-1289.

Nász, S., Debreczeni, L., Rikker, T., and Eke, Z. 2012. Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of eleven coccidiostats in milk. *Food Chemistry*, 133, 536-543.

Norma Oficial Mexicana. NOM-028-ZOO-1995. Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases. Enero 1996.

O

Obiols, J., 2000. Plaguicidas organofosforados (I): Aspectos generales y toxicocinética. *Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo*, España. Disponible en: www.siafa.com.ar/notas/nota105/plaguicidas

P

Pagliuca, G., Gazzotti, T., Zironi, E., and Sticca, P. 2005. Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1071, 67-70.

Pena, M.T., and Casais, C.M. 2008. Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. *Analytica Chimica Acta*, 626, 155-165.

Pena, M.T., Casais, M.C., and Cela, M. 2007. Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*, 116, 32-38.

Pensado, L., Casais, M.C., Mejuto, M.C., and Cela, R. 2005. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1077, 103-109.

Panuwet, P., Nguyen, J.V., Kuklenyik, P., Udunka, S. O., Needham, L.L., and Barr, D.B. 2008. Quantification of atrazine and its metabolites in urine by on-line solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1931-1939.

Priyanti, R.M.A., Wei, Hua., Chen, R.C., and Li, A. 2009. Optimization of the Matrix Solid Phase Dispersion Extraction Procedure for the Analysis of Polybrominated Diphenyl Ethers in Human Placenta. *Analytical Chemistry*, 81, 9795-9801.

Purcaro, G., Moret, S., and Conte, L.S. 2009. Optimisation of microwave assisted extraction (MAE) for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) determination in smoked meat. *Meat Science*, 81, 275-280.

Q

Quintana, M.C., Ramos, J.J., Hernández, L., and Ramos, L. 2010. Determination of residual phenothiazines in liver by matrix solid phase dispersion combined with HPLC with fluorescence detection. *Journal of Liquid Chromatography*, 33, 270-282.

Qiao, F. and Suna, H. 2010. Simultaneous extraction of enrofloxacin and ciprofloxacin from chicken tissue by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 795-798.

R

Radišić, M., Grujic, S., Vasiljevic, T., and Laušević, M. 2009. Determination of selected pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 113, 712-719.

Ramos, J.J., González, M.J., and Ramos, L. 2009. Comparison of gas chromatography-based approaches after fast miniaturized sample preparation for the monitoring of selected pesticide classes in fruits. *Journal of Chromatography A*, 1216, 7307-7313.

Ravelo, L., Hernández, J., and Rodríguez, M. 2008. Multi-walled carbon nanotubes as efficient solid-phase extraction materials of organophosphorus pesticides from apple, grape, orange and pineapple fruit juices. *Journal of Chromatography A*, 1211, 33-42.

Relya, R. 2005. Impact of insecticides and herbicides on the biodiversity of aquatic communities. *Ecological Applications*. 15, 618-627.

Reyes, M.L. Tesis Maestría. Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección UV. (2008). UNAM.

Russo, M., and Luigi, C. 2002. Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissue by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography B*, 780, 431-441.

S

Salas, J. González, M. and Noa, M. 2003. Organophosphorus Pesticide Residues in Mexican Commercial Pasteurized Milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4468-4471.

Salm, P., Taylor, P.J., Roberts, D., and De Silva, J. 2009. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantitative determination of the organophosphorus pesticides dimethoate, fenthion, diazinon and chlorpyrifos in human blood. *Journal of Chromatography B*, 877, 568-574.

Sanchez-Brunete, C., and Ester, M. 2007. Analysis of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons by matrix solid-phase dispersion and isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry in sewage sludge from the Spanish area of Madrid. *Journal of Chromatography A*, 1148, 219-227.

Scott, S., and Abdul, M. 2008. Solvent-resistant sol-gel polydimethyldiphenylsiloxane coating for on-line hyphenation of capillary microextraction with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1205, 26-35.

Self, R.L., Wu, W-H., and Marks, H.S. 2011. Simultaneous Quantification of Eight Biogenic Amine Compounds in Tuna by Matrix Solid-Phase Dispersion followed by HPLC-Orbitrap Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 5906-5913.

- Serrano, R.**, Barreda, M., Pitarch, E., and Hernández, F. 2003. Determination of low concentrations of organochlorine pesticides and PCBs in fish feed and fish tissues from aquaculture activities by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 26, 75-86.
- Serrano, R.**, and López, F.J. 1999. Multiresidue determination of persistent organochlorine and organophosphorus compounds in whale tissues using automated liquid chromatographic clean up and gas chromatographic-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 855, 633-643.
- Serrano, R.**, López, F.J., Hernández, F., and Peña, J.B. 1997. Bioconcentration of Chlorpyrifos, Chlorfenvinphos, and Methidathion in *Mytilus galloprovincialis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 59, 968-975.
- Serpe, F.P.**, Esposito, M., Gallo, P., and Serpe, L. 2010. Optimisation and validation of an HPLC method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in mussels. *Food Chemistry*, 122, 920-925.
- Shabir, G.A.** 2003. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. *Journal of Chromatography A*, 987, 57-66.
- Shamsipur, M.**, and Hassan, J. 2010. A novel miniaturized homogenous liquid-liquid solvent extraction-high performance liquid chromatographic-fluorescence method for determination of ultra traces of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4877-4882.
- Shen, Z-L.**, Yuan, D., Zhang, H., Hu, M., Zhu, J-H., Zhanga, X-Q and Suc, Q-D. 2011. Matrix Solid Phase Dispersion-Accelerated Solvent Extraction for Determination of OCP Residues in Fish Muscles. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 58, 494-502.
- Simon, R.**, Palme, S., and Anklam, E. 2006. Single laboratory validation of a gas chromatography mass spectrometry method for quantification of 15 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in spiked smoke flavourings. *Journal of Chromatography A*, 1103, 307-313.
- Singh, K.** 2008. Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon levels in placental tissues of Indian women with full- and preterm deliveries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, 639-647.
- Smoker, M.**, Tran, K., and Smith, R. 2010. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Shrimp. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 58, 12101-12104.
- Su, R.**, Wang, X., Xu, X., Wang, Z., Li, D., Zhao, X., Li, X., Zhang, H., and Yu, Aimin 2011. Application of multiwall carbon nanotubes-based matrix solid phase dispersion extraction for determination of hormones in butter by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5047-5054.
- Sun, F.**, and Chen, H-S. 2008. Monitoring of pesticide chlorpyrifos residue in farmed fish: Investigation of possible sources. *Chemosphere*, 71, 1866-1869.

T

Teixeira, D., and Teixeira, C. 2005. Novel methods to extract flavanones and xanthenes from the root bark of *Machura pomifera*. . *Journal of Chromatography A*, 1062, 175-181.

Tollback, J., Blasco-Bigatá, M., Crescenzi, C., and Strom, J. 2008. Feasibility of Analyzing Fine Particulate Matter in Air Using Solid-Phase Extraction Membranes and Dynamic Subcritical Water Extraction. *Analytical Chemistry*, 80, 3159-3167.

U

US Department of Health and Human Services (ATSDR). 1995. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)(Update). Atlanta, GA, US.

V

Valcárcel, M., and Gómez, A. 1994. Técnicas Analíticas de Separación. Editorial Reverté, S.A. Barcelona. Capitulo 12. 337.

Valsamaki, V.I., and Boti, V.I. 2006. Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion. *Analytical Chimica Acta*, 195, 573-574.

Vives, I., Grimalt, J. O., and Guitart, R. 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*, 3, 45-51.

Vuontisjarvi, H., Keinanen, M., Vuorinen, P., and Peltonen, K. 2004. A comparison of HPLC with fluorescence detection and fixed wavelength fluorescence methods for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 24, 333-342.

W

Walter, C., and Lott, H. 1993. Matrix solid-phase dispersión extraction and the analysis of drugs and enviromental pollutants in aquatic species. *Journal of Chromatography A*, 642, 225-242.

Wang, S., Mu, H., Bai, Y., Zhang, Y., and Liu, H. 2009. Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and *N*-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD. *Journal of Chromatography B*, 877, 2961-2966.

Wang, Y., Xiao, L., and Cheng, M. 2011. Determination of phenylureas herbicides in food stuffs based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1218, 9115-9119.

Wang, Z., Ma, X., Na, G., Lin, Z., Ding, Q., and Yao, Z. 2009. Correlations between physicochemical properties of PAHs and their distribution in soil, moss and reindeer dung at Ny-Ålesund of the Arctic. *Environmental Pollution*, 157, 3132-3136.

Webster, L., McKenzie, G.F., and Moriarty, H.T. 2002. Organophosphate-based pesticides and genetic damage implicated in bladder cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 133, 112-117.

Wood, R. 1999. How to validate analytical methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 624-632.

Y

Yin, H., Tan, Q., Chen, Y., Lv, G., and Hou, X. 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution recorded in annual rings of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.): Determination of PAHs by GC/MS after accelerated solvent extraction. *Microchemical Journal*, 97, 138-143.

Z

Zafer, A., and Guler, E. 2007. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23, 242-249.

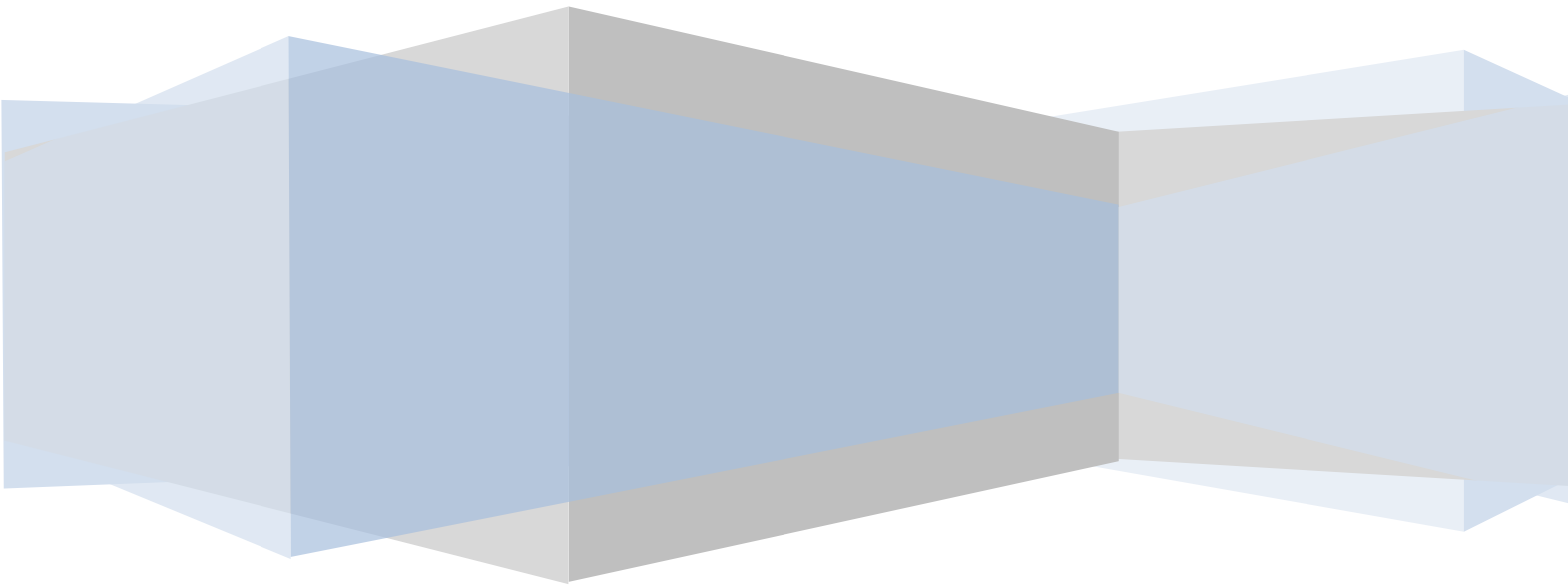
Zang, X., Luo, R., Song, N., Chen, T. K., and Bozigian, H. 2005. A novel on-line solid-phase extraction approach integrated with a monolithic column and tandem mass spectrometry for direct plasma analysis of multiple drugs and metabolites. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19, 3259-3268.

Zhang, H., Xue, M., and Dai, Z. 2010. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic products by HPLC-fluorescence. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 469-474.

Zhao, M., and Wielen, F. 1999. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with sequential clean-up for the determination of alkylphenol ethoxylates in biological tissues. *Journal of Chromatography A*, 837, 129-138.

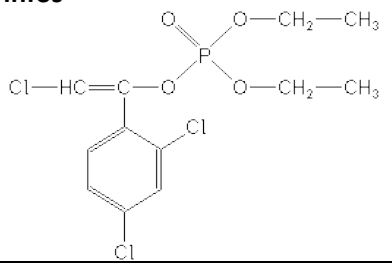
Zhu, L. 2008. Effect of rhamnolipids on the uptake of PAHs by ryegrass. *Environmental Pollution*, 156, 46-52.

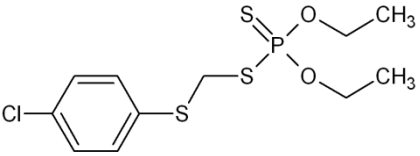
ANEXOS

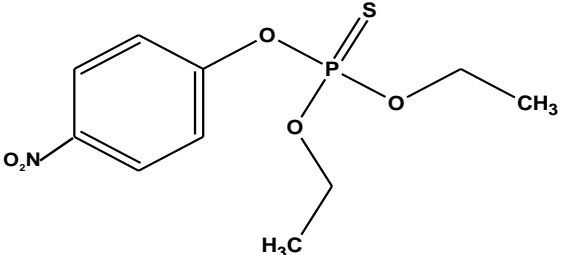


ANEXO I

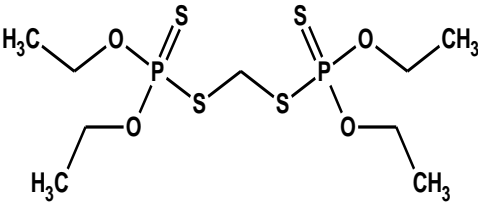
Fichas de seguridad de los contaminantes estudiados

<p>Clorfenvinfos</p> 	<p>Nombre común: Clorfenvinfos (BSI), E-ISO, (m)F-ISO, BPC); CVP (JMAF); a excepción de (EUA).</p> <p>Nombre IUPAC: (EZ)-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)vinil dietil fosfato. Nombre C.A. 2-cloro-1-(2,4-diclorofenil)etenil dietil fosfato.</p> <p>Número CAS: [470-90-6], OMS 1328 ENT 24969. CGA 26351</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 359.56 g/mol. Fórmula molecular: C₁₂H₁₄Cl₃O₄P Forma cristalización: Líquido de color amarillo claro, con olor ligero. Punto de fusión: -23 y -19 °C. Punto de ebullición: 167-179 °C. Presión de vapor: 0.53 mPa. $n_D^{20} = 1.5281$. K_{ow}, Log P: 3.85-4.22: Solubilidad 23°C: 145 mg/L en agua, es soluble en los disolventes orgánicos más comunes como: acetona, etanol, xileno, propileno glicol, diclorometano y hexano. Estabilidad: Es corrosivo para los metales, ataca al estaño, latón, hierro y acero. Se descompone al calentarse y al quemarse, produciendo gases tóxicos y corrosivos como el cloruro de hidrógeno y los óxidos de fósforo.</p>	
<p>Aplicaciones: Para control de garrapatas, moscas, piojos, pulgas, gusano barrenador, ácaros, moscas en bovinos, porcinos, equinos, ovinos, caprinos, caninos y sarna en bovinos: como concentrado emulsionable en equivalentes gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) 200 y como solución concentrada acuosa en equivalentes gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) 300</p>	
<p>Análisis: Análisis de residuos por GLC-FID (CIPAC Handbook, 1980, 1A, 1131;FAO Specification)</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: Oral para ratas: LD₅₀: 9.7-39.0 mg tech/kg. Para perros > 12000 mg/kg. Inhalación aguda LC₅₀: (4 h) para ratas</p>	
<p>Ecotoxicología: Es extremadamente tóxico para peces, insectos y zooplancton. Además, es moderadamente tóxico para anfibios, moluscos y aves. En este último grupo de animales puede ocasionar los siguientes efectos subletales: reducción del vuelo y canto, ataxia, ataraxia, postración, debilidad en las alas, plumaje erizado, postura alterada, rigidez, caídas al caminar, falta de alimentación y pérdida de peso, lagrimeo, disnea, temblores y convulsiones. Algunas especies de frijol son susceptibles a este plaguicida. Asimismo, puede ocasionar daños por aplicación directa en semillas de ciertos cultivos.</p>	
<p>Destino Ambiental: Al ser liberado al aire puede presentarse como vapor y como partículas. El vapor reacciona con radicales hidroxilo y ozono para ser eliminado de la atmósfera, con una vida media de 7 y 92 horas respectivamente. Las partículas son removidas físicamente por precipitación con la lluvia y el polvo. La fotólisis directa es también otro mecanismo posible de eliminación de este compuesto en condiciones ambientales. En suelo la movilidad del Clorfenvinfos es moderada y puede lixiviarse hasta las aguas subterráneas. Su persistencia puede llegar a ser elevada dependiendo del tipo de suelo, la formulación y la dosis aplicada. Su vida media en los sistemas terrestres varía entre 14 y 84 días para suelos minerales y es mayor de 150 días en suelos orgánicos. El 1-(2,4-diclorofenil) etanol, la 2,4-dicloroacetofenoca y la sal sódica del desetil-clorfenvinfos han sido identificados como los principales productos de su biodegradación en suelos. En el agua se adsorbe a los sólidos suspendidos y sedimentos (vida media de 13.2 días). La volatilización y la hidrólisis no son importantes para este plaguicida ni en el suelo ni en los cuerpos de agua. No parece acumularse en animales o en plantas. Sin embargo, en especies vegetales como la calabaza, zanahoria, cebolla, maíz y papa puede ser absorbido y translocado.</p>	

<p>Carbofenotión</p> 	<p>Nombre común: Carbofenotión (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, ANSI, ESA). Trition Nombre IUPAC: S-4-Clorofeniltiometil O,O-dietilfosforoditioato. Nombre C.A. S-[[[4-clorofenil]tio]metil]-O,O-dietil fosforoditioato Número CAS: [786-19-6]</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 342.86 g/mol Fórmula molecular: C₁₁H₁₆ClO₂PS₃ Forma: Líquido incoloro con un olor similar al mercaptano. Punto de ebullición: 82 °C. Punto de fusión: Desconocido. Presión de vapor: 1.07 mPa (25 °C). $n_D^{20} = 1.598$. Kow, Log P: 4.72-5.12. Solubilidad: < 1 mg/L en agua, es soluble en los disolventes orgánicos más comunes como: acetona, etanol, keroseno, 4-metilpentano-2-ona, xileno. Estabilidad: Es relativamente estable a la hidrólisis y calor (< 80 °C), la oxidación ocurre en el fosforotioato</p>	
<p>Aplicaciones: Es un acaricida no sistémico e insecticida con una larga acción residual, es usado en combinación con aceite de petróleo en spray para el control de plagas en arboles con frutas cítricas y en algodón. En combinación con el metil-paratión para el control en cultivos de uva y <i>Oidium spp.</i> y <i>Delia coarctata</i> en granos</p>	
<p>Análisis: Análisis de productos GLC (AOAC Methods, 1984, Pestic. Anal. Man., 1979. Analytical methods están disponibles de Stauffer Chemical Co. AOAC Method 968.24. Organophosphorus Pesticide Residues Sweep codistillation method).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: Oral para ratas albino: LD₅₀: 79.4 mg/kg, hembras 20.0 mg/kg</p>	
<p>Ecotoxicología: Esta sustancia puede ser peligrosa para el ambiente; debería prestarse atención especial a peces, abejas y pájaros. Los LD50 para ratas macho es de 79.4 mg/kg y hembras de 20 mg/kg, en conejos 1850 mg/kg. Toxicidad aguda en peces en agua fría con truchas arcoiris 56 ppb en agua cálida 13 ppb. En invertebrados adultos 1.2 ppb. Toxicidad aguda en peces de agua dulce: peces de agua fría, trucha arco iris - 56 ppb; Peces de aguas calidad: pez sol - 13 ppb. - Toxicidad oral aviar aguda: codorniz - 320 mg/kg. - Toxicidad aguda para los invertebrados de agua dulce: Palaemontes adultos 1.2 ppb - Toxicidad aguda para los organismos marinos y estuarinos: el camarón rosado 0.47 ppb, pez sheepshead - 17 ppb. - Toxicidad crónica para los organismos marinos y estuarinos: camarón hierba estudio del ciclo de vida - la concentración máxima aceptable Teórica (MATC) >0.22<0.36 ppb; embriones de pececillo sheepshead / juveniles estudio MATC >1.3<2.8 ppb. - Carbofenotión se caracteriza por ser altamente tóxico para los organismos de agua dulce y marinas / estuarinas y altamente tóxico para aves de caza de tierras altas.</p>	
<p>Destino Ambiental: La excreción del carbofenotión es rápida. Los metabolitos del carbofenotión fueron encontrados en ratas, donde los productos de 4-clorotiofenol metilsulfona, 3-hidroxilación y el ácido p-clorobencenosulfínico fueron detectados. Existen pocos datos sobre la distribución del carbofenotión en el medio ambiente. Estudios preliminares indican que este plaguicida es relativamente inmóvil en suelos franco arenosos, sin embargo no se puede indicar la contaminación en aguas superficiales. Presenta bajo potencial de lixiviación pero genera varios productos de degradación, aquellos con grupos sulfona y sulfoxido pueden tener mayor movilidad en el suelo. Puede ser susceptible de biodegradación en agua después de dos semanas; aproximadamente el 10% de la concentración inicial de 10 mg/L permanece en muestras de agua de río. La Hidrólisis del compuesto puede ser una ruta de degradación en agua; sin embargo, no hay datos registrados bajo condiciones ambientales (pH 5-9). El valor de su log Kow y algunos estudios realizados sugieren que su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es muy alto.</p>	

<p>Paratión</p> 	<p>Nombre común: Paratión (BSI, E-ISO, F-ISO, ESA, JMAF); thiophos (anteriormente a excepción de Rusia). Nombre IUPAC: <i>O,O</i>-Dietil-<i>O</i>-4-nitrofeniltiofosfato . Nombre C.A.: <i>O,O</i>-dietil <i>O</i>-(4-nitrofenil) fosforotioato. Nombre Bayer: E-605 Número CAS: [56-38-2], Código oficial OMS 19 ENT 15 108.</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 291.3 g/mol. Fórmula molecular: C₁₀H₁₄NO₅PS Forma cristalización: Líquido de color amarillo claro, con olor ligero. Punto de ebullición: 157-162 °C (0.6 mmHg). Presión de vapor 5.0 mPa (20 °C). Solubilidad en agua 24 mg/L (25 °C), ligeramente soluble en aceites de petróleo, completamente miscible con la mayoría de solventes orgánicos. El productor técnico es de color marrón con olor a ácido gálico. Estabilidad: Es rápidamente hidrolizado en medio alcalino. Por calentamiento forma el isómero <i>O,S</i>-dietil.</p>	
<p>Aplicaciones: Es un insecticida no sistémico, prohibido en USA y la Unión Europea pero empleado en muchos países del mundo. Se usa como fumigante y acaricida en el tratamiento foliar y del suelo antes de la cosecha en una gran variedad de cultivos, tanto al aire libre como en invernaderos.</p>	
<p>Análisis: Análisis del producto por CLAR (CIPAC Handbook, 1983, 1B, 1875;AOAC Methods 1984, 6.463-6.471, 6.493-6.499) o por titulación redox (ibid 6.472-6.478).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: El paratión inhibe la actividad de la colinesterasa en todas las especies que han sido sometidas a estudio. No se han obtenido pruebas de su capacidad cancerígena en estudios de dos años en ratas. La JMPR concluyó que el paratión no es genotóxico. Se puede calcular un valor de referencia basado en efectos sobre la salud para el paratión de 10 µg/l a partir de una IDA de 0,004 mg/kg de peso corporal basada en una DSEAO de 0,4 mg/kg de peso corporal al día obtenida en un estudio de dos años en ratas, correspondiente a la atrofia retiniana y la inhibición de la acetilcolinesterasa cerebral con la dosis más alta, y aplicando un factor de incertidumbre de 100. LD50 oral aguda: Para ratas machos 13 mg/kg, para hembras 3.6 mg/kg, ADI para hombre 0.005 mg/kg.</p>	
<p>Ecotoxicología: LD50 para pato silvestre 1.9-2.1 mg/kg, para faisán 12.4 mg/kg, paloma 2.5 mg/kg. LD50 percutánea aguda: para ratas machos 21 mg/kg, para hembras 6.8 mg/kg, LC50 (96 h) es: Trucha arco iris 1.5 mg/L, piscardo 1.4-2.7 mg/L. Su toxicidad es mejorada por la oxidación metabólica a dietil 4-nitrofenil fosfato.</p>	
<p>Destino Ambiental: En aguas de superficiales desaparece normalmente en una semana, debido a la absorción sobre las partículas en suspensión y sobre los sedimentos. Al ser absorbido es objeto de degradación por acción de los microorganismos y por hidrólisis química. Por foto degradación presenta una vida media de 1 a 10 días en el agua. Su descomposición se acelera por incremento del valor de pH. Cuando se libera al ambiente se adsorbe fuertemente en la capa superior del suelo y no es probable que se filtre en cantidades significativas. Desaparece en el transcurso de una semana de las aguas superficiales.</p>	

http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=13081&loc=ec_rcs

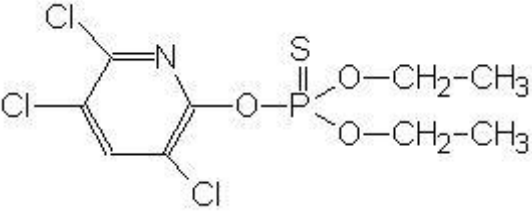
<p>Etión</p> 	<p>Nombre común: Etión (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, ANSI, ESA, JMAF); Dietión ((m) Francia, Sudáfrica, anteriormente India); Excepción (Italia, Portugal). Nombre IUPAC: O,O,O',O'- tetraetil S,S'-metilen bis(fosforoditioato). Nombre C.A.: S,S'-metilen O,O,O',O'- tetraetil di(fosforoditioato). ENT 24,105; USEPA/OPP PC Code 058401; Ethanox; Ethiol 100; Número CAS: 563-12-2</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 384.48 g/mol. Fórmula molecular: C₉H₂₂O₄P₂S₄ Forma cristalización: Líquido incoloro a ambar, sin olor, pero el producto técnico tiene olor muy desagradable, densidad relativa 1.22 (20°C). Punto de fusión: -12 a -13 °C, Presión de vapor 0.2 mPa (25 °C). Solubilidad: Escasamente soluble en agua, soluble en la mayoría de solventes orgánicos incluyendo kerosene, miscible con disolventes aromáticos. Estabilidad: Es lentamente oxidado en aire e hidrolizado tanto en medio ácido como en medio básico. Se descompone al calentarse o arder, produciendo gases tóxicos y corrosivos, entre los cuales se incluyen óxidos de fósforo y de azufre.</p>	
<p>Aplicaciones: Acaricida e insecticida no sistémico, Agrícola: Para aplicación al follaje, especialmente en cultivos de manzana y cítricos; Pecuario: Para el control de garrapatas, piojos y moscas en bovinos, ovinos, equinos y aves:</p>	
<p>Análisis: Análisis del producto por CLAR (CIPAC Handbook, 1983, 1B, 1826; AOAC Methods 1984, 6.436-6.459), los residuos pueden ser determinados por glc (ibid., 29.001-29.028, 29.059-29.064).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: LD50 para ratas 208 mg A.I./kg, para hembras de rata 24.4 mg tec/kg. LD50 percutánea aguda: para conejos 915. Con ensayos de alimentación en 2 años: En ratas de 6 mg/kg (con dieta de 0.3 mg/kg diarios) perros 2 mg/kg (dieta de 0.05 mg/kg diarios).</p>	
<p>Ecotoxicología: Su toxicidad para aves puede variar desde casi nula hasta extremadamente alta, dependiendo de la especie. Es muy tóxico para aves cantoras, moderadamente tóxico para aves de talla media (codorniz virginiana y estornino) y no tóxico para aves de zonas elevadas (faisán de cuello anillado y pato silvestre). Es extremadamente tóxico para peces e invertebrados (crustáceos, insectos y zooplancton) marinos y de agua dulce. Es ligera a moderadamente tóxico para moluscos. No es fitotóxico, excepto para algunas variedades de manzana.</p>	
<p>Destino Ambiental: Cuando es liberado al aire puede presentarse en forma de vapor y partículas. El vapor reacciona rápidamente con radicales hidroxilo (vida media 40 min) y se deposita con la lluvia y el polvo. Puede sufrir fotólisis directa en la atmósfera. Según estudios de laboratorio, su vida media en suelo es de 1.3 a 8 semanas, pero en suelos orgánicos bajo condiciones de invernadero su vida media puede prolongarse hasta 49 semanas. Tras uso repetido, sus residuos se acumulan en suelo en donde se une fuertemente a las partículas, por ello es poco probable que se lixivie y contamine las aguas subterráneas. Puede ser degradado por acción de los microorganismos. En condiciones de laboratorio su vida media en agua fluctúa entre 4 y 22 semanas. En los cuerpos de agua no se biodegrada, pero puede ser hidrolizado. La velocidad de la hidrólisis depende del pH; en aguas ácidas o neutras su vida media es de 25 a 63 semanas, mientras que en aguas alcalinas (pH 10) se reduce a tan sólo unos días. En ríos y lagos se une a los sólidos suspendidos y sedimentos. Su volatilización es poco importante tanto en suelo como en agua, excepto en arroyos o ríos con corrientes rápidas. Puede ser almacenado en los tejidos de las plantas y se bioacumula significativamente en los animales (peces).</p>	

Referencia: <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/etion.pdf>

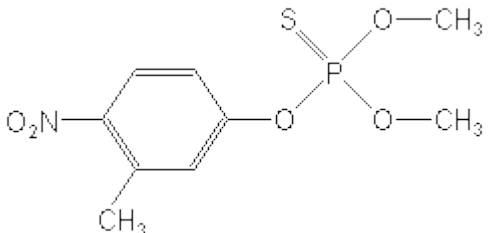
<p>Fenclorfos</p> 	<p>Nombre común: Fenclorfos, (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, BPC) el nombre "ronnel" es usado en Canadá y USA, Fenclorfos es el nombre por la OMS, OMS 123, ENT 23 284. No aprobado en Reino Unido.</p> <p>Nombre IUPAC: <i>O,O</i>-dimethyl <i>O</i>-(2,4,5-trichlorophenyl) phosphorothioate. Nombre C.A.: <i>O,O</i>-dimetil <i>O</i>-(2,4,5-triclorofenil) fosforotioato.</p> <p>Número CAS: 299-84-3. Nombres comerciales: Ectoral, Troleno, Viozeno, Nankor y Korlan.</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 321.5 g/mol. Fórmula molecular: C₈H₈Cl₃O₃PS</p> <p>Forma de cristalización: Polvo blanco o cristales incoloros, Punto de fusión: 41 °C, Punto de ebullición: 97 °C (1.3Pa), Densidad relativa 1.48, Presión de vapor: 0.1 mPa (25 °C), Solubilidad: Soluble en la mayoría de disolventes orgánicos y escasamente soluble en agua, 40 mg/L (20 °C), Coeficiente de partición Octanol-agua a pH 7 (20 °C) como log Pow 4.88, Estabilidad, Temperatura de descomposición desconocida en la literatura. Con leve olor a mercaptano, degrada rápidamente en el ambiente por hidrólisis o por oxidación. No es inflamable ni combustible, se descompone al calentarse produciendo vapores corrosivos (cloruro de hidrógeno, óxidos de fósforo y óxidos de azufre), incompatible con agentes oxidantes fuertes. Biocida (tóxico para toda vida animal en diferentes grados, debido a que inhibe la colinesterasa).</p>	
<p>Aplicaciones: Insecticida. En agricultura es altamente tóxico para muchos insectos, aunque no para larvas de mariposa. En ganado para control de moscas y parásitos de la piel.</p>	
<p>Análisis: Análisis del producto por cromatografía de gases (AOAC 2005, method 985.22, EPA Method 8140) y por CLAR.</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: Agudos oral LD50 rata >2000 mg/kg, conejo 640 mg/kg, perro >500 mg/kg. cutáneo LD50 >2000 mg/kg, conejo 640 mg/kg, perro >500 mg/kg.</p>	
<p>Ecotoxicología: La sustancia es muy tóxica para organismos acuáticos. Puede ocurrir bioacumulación en peces. LD50 aguda pájaros 3500 mg/kg, peces 96 horas LC50 0.74. LD50 anade real macho cerca de 2000 mg/kg, faisán macho oral 611 mg/kg. LC50 trucha arco iris 550ug/L, LC50 bagre 1600 ug/L. LC50 mojarra de agallas azules 1300ug/L. LC50 trucha 555 ug/L. LC50 trucha de lago 490ug/L. LC50 oral codorniz japonesa (5 días en la dieta) >5.000 ppm, 14 días de edad sin signos manifiestos de toxicidad a 5000 ppm/grado técnico.</p>	
<p>Destino Ambiental: La EPA canceló el registro de todos los productos que contienen fenclorfos como ingrediente activo el 22 de enero de 1991. Si es liberado al suelo, la eliminación se producirá por la biodegradación. La eliminación del suelo debido a la volatilización, fotólisis e hidrólisis es relativamente lenta. Se espera que tenga una baja movilidad en la mayoría de los suelos. En cuerpos de agua se adsorbe a los sólidos suspendidos y sedimentos. En agua puede sufrir biodegradación, hidrólisis y fotólisis. La bioconcentración en los organismos acuáticos puede ser importante. La reacción con radicales hidroxilo producidos fotoquímicamente es un proceso de degradación importante para fenclorfos en fase de vapor. La vida media debido a esta reacción ha sido estimada en 2,1 horas. Aunque rápidamente sufre fotólisis con luz de 290 nm, la fotólisis es lenta en agua con luz natural. Con 12 horas de luz natural, su vida media es de 17.5 días sobre la superficie del agua. En suelos la biodegradación puede ser rápida ya que la vida media en aguas superficiales es 8.4 días. Respecto a su destino en la atmósfera, su presión de vapor indica que puede estar presente en fase de vapor y adherido a las partículas presentes en el aire.</p>	

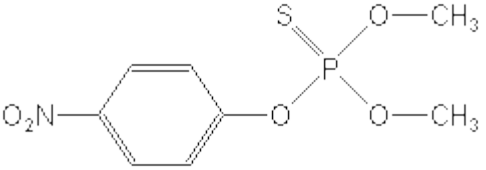
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

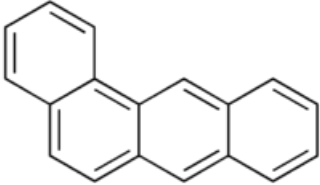
http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=74540&loc=es_rss#x351

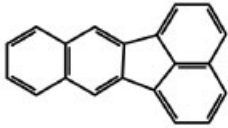
<p>Clorpirifos</p> 	<p>Nombre común: Clorpirifos, (BSI, E-ISO, ANSI, ESA, BAN), clorpirifos ((m) F-ISO, JMAF), chlorpyriphos-ethyl ((M) Francia).</p> <p>Nombre IUPAC: <i>O,O</i>-dietil <i>O</i>-3,5,6-tricloro-2-piridil fosforotioato. Nombre C.A.: <i>O,O</i>-dietil <i>O</i>-[3,5,6-tricloro-2-piridinil] fosforotioato. Número CAS: 2921-88-2. Código de desarrollo: Dowco 179. Código oficial OMS 971; ENT 27 311.</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 350.6 g/mol. Fórmula molecular: C₉H₁₁Cl₃NO₃PS</p> <p>Forma de cristalización: Cristales incoloros con un ligero olor a mercaptano, Punto de fusión: 42-43.5 °C, Presión de vapor: 2.7 mPa (25 °C), Kow 50000. Solubilidad: En agua: 1.4 mg/L (25 °C). En benceno 7900, acetona 6500, cloroformo 6300, disulfuro de carbono 5900, éter etílico 5100, xileno 5000, isooctanol 790, metanol 450 (todos en mg/kg, 25 °C) Estabilidad, La velocidad de hidrólisis incrementa con el pH y con la presencia de cobre y otros metales con los que puede formar quelatos. DT50 1.5 d (agua pH 8, 25°C) a 100 d (buffer fosfatos pH 7, 15 °C).</p>	
<p>Aplicaciones: Insecticida no sistémico con acción de contacto, digestiva o respiratoria. Inhibidor de la colinesterasa. Usos: Control de insectos coleópteros, dípteros, homópteros y lepidópteros en el suelo o en follaje de una gran variedad de cultivos incluyendo frutas cítricas, nogal fresas, plátanos peras, vegetales, papas, betabel, cacahuates, tabaco, cereales, espárrago, maíz, sorgo, alfalfa, algodón, arroz, cultivo ornamental, cultivo de viveros, cultivo forestal, etc. Insectos del suelo, moscas de champiñón, tratamiento de productos almacenados. Fitotoxicidad: No es tóxico para la mayoría de las especies vegetales, a excepción de azaleas, camelias y rosas.</p>	
<p>Análisis: Análisis del producto por CLAR (CIPAC Handbook 1985, IC 2018, AOAC Methods 1990 981-03). Determinación de residuos por GLC (A Ambrus et al.J. Assoc. Anal. Chem. 1981, 64, 733, AOAC Method 985.22. Residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: LD50 oral ratas 135-163 mg/kg, conejo 1000-2000 mg/kg, Piel y ojos LD50 aguda percutánea para ratas >2000, conejos 2000 mg/kg. Inhalación LC50 (4-6 horas) para ratas 0.2 mg/L de aire (14 ppb), NOEL (2 años) basada en en la actividad de la colinestera en plasma sanguíneo para ratas 0.03 y perros 0.01 mg/kg diario. ADI (JMPR) 0.01 mg/kg b.w. (1982). Clase toxicológica: WHO II, EPA II o III. Otros: No teratogénico.</p>	
<p>Ecotoxicología: Pájaros: LD50 oral aguda 32-102 mg/kg para pollo. Peces LC50 (96 horas) para trucha arco iris 0.003 mg/L. Abejas: Tóxico para las abejas. Dafnia: EC50 (48 horas) 1.7 ug/L.</p>	
<p>Destino Ambiental: Animales. En ratas perros y otros mamíferos después de la administración se lleva a cabo su metabolismo rápidamente, siendo su principal metabolito el 3,5,6.tricloro piridinol. Se excreta en la orina principalmente. Plantas: No es sistémico en los vegetales, no es absorbido a través de las raíces. Los metabolitos absorbidos por las plantas son metabolizados rápidamente a 3,5,6.tricloro piridinol, el cual es conjugado y secuestrado. Agua y suelo: En el suelo es degradado en forma lenta, con vida media de 60 a 120 días a 3,5,6-tricloropiridin-2-ol, el cual es posteriormente degradado al compuesto organoclorado y a bióxido de carbono. Valores medidos de Koc de 995 a 31,000, indican que clorpirifos debe tener baja o nula movilidad en suelos. La volatilización desde la superficie del agua se espera que sea atenuada por la adsorción en sólidos suspendidos y en sedimentos en la columna de agua. El tiempo de vida media esperado por volatilización es de 15 años si se considera la adsorción.</p>	

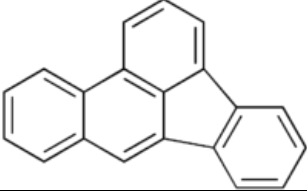
<p>Diazinón</p> 	<p>Nombre común: Diazinón, (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, ANSI, ESA, BAN, JMAF), dymplilato (nombre BAN inicial).</p> <p>Nombre IUPAC: O,O-dietil O-2-isopropil-6-metilpirimidil-4-il fosforotioato. Nombre C.A.: O,O-dietil O-[6-metil-2-(1-metiletil)-4-pirimidil] fosforotioato. Número CAS: 333-41-5. Código de desarrollo: G 24 480. Código oficial OMS 469; ENT 19 507.</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 304.3 g/mol. Fórmula molecular: C₁₂H₂₁N₂O₃PS</p> <p>Forma de cristalización: Aceite claro incoloro, (El grado técnico es un líquido amarillo). Punto de ebullición: 83-84 °C a 0.0002 mmHg y 125 °C a 1 mmHg, Presión de vapor: 1.2x10⁻² Pa (25 °C), (OECD 104). Gravedad específica / Densidad 1.116-1.118 (20 °C). Kow, Log P: 3.30 (OECD 107).</p> <p>Solubilidad: En agua: 60 mg/L (20 °C). Completamente miscible con la mayoría de los disolventes orgánicos comunes. Estabilidad, Susceptible a la oxidación por encima de los 100 °C. Estable en medio neutro pero se hidroliza lentamente en medio alcalino y más rápido en medio ácido. DT50 (20) 11.77 horas (pH 3.1), 185 d(pH 7.4); 6.0 d(pH 10.4). Se descompone arriba de los 120 °C.</p>	
<p>Aplicaciones: Insecticida y acaricida no sistémico con acción de contacto, digestiva o respiratoria. Inhibidor de la colinesterasa. Usos: Control de insectos succionadores y trituradores un una gran variedad de cultivos incluyendo los árboles frutales deciduos, frutas cítricas, olivos, plátanos peras, vegetales, papas, betabel, caña de azúcar, café cacao, arroz, cultivo ornamental, cultivo de viveros, cultivo forestal, etc. Insectos del suelo, moscas de champiñón, moscas, piojos, garrapatas, pulgas, cucarachas, chinches, hormigas y otros insectos. Uso doméstico. También se usa para ectoparásitos veterinarios. No es fitotóxico empleado en la forma recomendada, Compatible con muchos otros plaguicidas pero incompatible con los compuestos que tienen cobre. Nombre comercial principal: Basudi, Dianón, Diazol, Ectoban, Knox-out.</p>	
<p>Análisis: Análisis del producto por GLC con FID (CIPAC Handbook 1980, IA 1199, AOAC Methods 1990 971.08, 982.06). Determinación de residuos por GLC con TID o MCD (ibid, 968.24, 970.33, 970.52). AOAC Método 970.53. Residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados, Método de confirmación: polarografía oscilatoria de barrido simple, AOAC Método 968.24, AOAC Método 982.06.</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: LD50 oral ratas 300-400, ratones 80-135 mg/kg, piel y ojos: LD50 aguda percutánea para ratas >2150, conejo 540-650 mg/kg, irritante ligero para la piel y ojos (conejos). Inhalación LC50 (4 horas) para ratas 3.5 mg/L de aire, NOEL (90 días) para ratas 0.1 y para perros 0.02 mg/kg diario. ADI (JMPR) 0.002 mg/kg b.w. (1993). Clase toxicológica: WHO II, EPA II o III.</p>	
<p>Ecotoxicología: Pájaros: LD50 oral aguda 3.5 mg/kg. Peces LC50 (96 horas) para trucha arco iris 2.6-3.2 mg/L, carpa 7.6-23.4 mg/L. Abejas: Altamente tóxico para las abejas. Dafnia: EC50 (24 horas) 1.4 mg/L.</p>	
<p>Destino Ambiental: Animales. Los principales metabolitos son dietil tiofosfato y dietil fosfato. Plantas: Los estudios con diazinón marcado con 14C muestran una absorción y translocación rápida en las plantas. El metabolismo procede mediante la hidrólisis y la posterior transformación y degradación de los derivados de hidroxipirimidina a CO₂. Agua y suelo: La degradación involucra la oxidación del azufre (formación de diaxozon) y la hidrólisis del compuesto. Es fácil y fuertemente adsorbido en el suelo, KOM 332 mg/g o M. Su movilidad es baja.</p>	

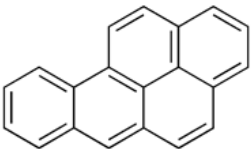
<p>Fenitrotión</p> 	<p>Nombre común: Fenitrotión, (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, ESA, BAN). MEP (JMAF). Nombre IUPAC: <i>O,O</i>-dimetil <i>O</i>-4-nitro-<i>m</i>-tolil fosforotioato. Nombre C.A.: <i>O,O</i>-dimetil <i>O</i>-[3-metil-4-nitrofenil] fosforotioato.. Número CAS: 122-14-5. Código de desarrollo: Bayer 41831, S-5660, S1102A. Código oficial OMS 43, OMS 223 ENT 25715</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 277.2 g/mol. Fórmula molecular: C₉H₁₂NO₅PS Forma de cristalización: Líquido aceitoso color café claro o café rojizo con olor suave característico. Punto de fusión: 3.4 °C. Punto de ebullición: 140-145 °C. Presión de vapor: 18 mPa (25 °C). Gravedad específica / Densidad 1.328 (20 °C). Kow, Log P: 3.43 (20 °C). Punto de ignición: 88 °C. Solubilidad: En agua: 21 mg/L (20 °C). Altamente soluble en alcoholes, ésteres, cetonas, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos clorados. En hexano 24, en isopropanol 128 g/L a 20 °C. Estabilidad: Relativamente estable a la hidrólisis en condiciones normales. DT50 calculada 108.8 d (pH 4), 84.5 d (pH 7), 75 d (pH 9) (22 °C).</p>	
<p>Aplicaciones: Insecticida no sistémico con acción por contacto digestiva. Inhibidor de la colinesterasa. Usos: control de insectos en cereales, fruta suave, fruta tropical, arroz, caña de azúcar, pastizales y cultivos forestales. También se usa como insecticida para cuidar la salud pública (control de mosquitos) para control de insectos domésticos, insectos plaga en granjas. No es fitotóxico si se emplea en la forma recomendada. Altas proporciones en su aplicación pueden dañar cultivos de algodón y algunas frutas. Tipo de formulación: GR, EC, WP, DP, UL; AL. Compatibilidad: Compatible con la mayoría de insecticidas y fungicidas, incompatible con compuestos alcalinos. Nombres comerciales: Folithion, Sumithion, Dicofen,</p>	
<p>Análisis: Análisis del compuesto por GLC (CIPAC Handbook 1985, IC, 2117. AOAC 1990 método 981.07, 989.02. EPA Método 622.1 con detección de ionización de llama, EPA Método 507 con detector NPD, AOB Método OA-002-1 con detector de espectrometría de masas), FDA Método 211.1, FDA Método 232.1.</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: LD50 oral ratas 1700 mg/kg, piel y ojos: LD50 aguda percutánea para ratas 810 mg/m³. NOEL (2 años) para ratas 10 y (1 año) para perros 50 mg/kg diario. ADI (JMPPR) 0.005 mg/kg b.w. (1988). Clase toxicológica: WHO II, EPA II.</p>	
<p>Ecotoxicología: Pájaros: LD50 oral aguda 1192 mg/kg para patos. Peces LC50 (48 horas) para carpa 4.1 mg/L. Abejas: Tóxico para las abejas.</p>	
<p>Destino Ambiental: Animales. El compuesto es rápidamente secretado en la orina y las heces. Después de tres días, c. 90% ha sido excretado por ratas, ratones y conejos. Los metabolitos más importantes son dimetilfenilnitrooxon y 3-metil-4-nitrofenol. Plantas: El compuesto es aplicado en los bosques y se degrada con DT50 4 d: 70-85% se degrada en dos semanas. Los metabolitos principales son 3-metil-4-nitrofenol, el análogo oxigenado y sus productos de descomposición desmetilfenitrotion, ácido dimetilfosforotiónico y el ácido fosforotiónico. Agua y suelo: DT50 12-28 días en la superficie y 4-20 días a mayor profundidad. Los metabolitos más importantes en la superficie son 3-metil-4-nitrofenol y CO₂ y a mayor profundidad es aminofenitrotion. Presenta baja a moderada movilidad en suelos y puede perderse por biodegradación. En el agua la degradación ocurre hasta en un 82% con una vida media de 4 a 7 días. En la atmósfera existe en estado de vapor y adherido a partículas, pero se degrada por reacción con radicales hidroxilo generados fotoquímicamente. También se degrada por fotólisis directa con vida media de 61 minutos. La bioacumulación en organismos acuáticos varía de baja a alta. Puede degradarse por hidrólisis</p>	

<p>Metil Paratión</p> 	<p>Nombre común: Metil Paratión, (BSI, E-ISO, (m) F-ISO, metil paratión (ESA, JMAF), metaphos (RUSIA). Nombre IUPAC: dimetoxi-(4-nitrofenoxi)-sulfanilideno-λ5-fosfano. Nombre C.A.: O,O-dimetil O-[4-nitrofenil] fosforotioato.. Número CAS: 298-00-0. Código de desarrollo: E-120; Bayer 11405. Código oficial OMS 213, ENT 17292</p>
<p>Propiedades fisicoquímicas: Peso molecular: 263.2 g/mol. Fórmula molecular: C₈H₁₀NO₃PS Forma de cristalización: Cristales incoloros, inodoros (técnico, líquido oscuro). Punto de fusión: 35-36 °C. Punto de ebullición: 154 °C/136 Pa. Presión de vapor: 0.2 mPa (20 °C). Gravedad específica / Densidad: 1.358 (20 °C), técnico 1.20-1.22. Kow, Log P: 3.0. Punto de ignición: >150 °C. Solubilidad: En agua: 55 mg/L (20 °C). Altamente soluble en disolventes orgánicos comunes como diclorometano, tolueno (>200), hexano (10-20) g/L (20 °C). Ligeramente soluble en éter de petróleo y algunos tipos de aceite mineral. Estabilidad: Se hidroliza en medio ácido o alcalino. DT50 (25 °C) 68 d (pH 5), 40 d (pH 7), 33 d (pH 9). Se isomeriza bajo calentamiento al análogo O, S-dimetil. Fotodegradación en la luz.</p>	
<p>Aplicaciones: Insecticida no sistémico con acción por contacto digestiva. Inhibidor de la colinesterasa. Usos: control de insectos succionadores o trituradores en una gran variedad de cultivos, incluyendo cereales, frutas, vid, cultivos forestales y ornamentales. No es fitotóxico si se emplea en la forma recomendada. Altas proporciones en su aplicación pueden dañar cultivos de alfalfa, sorgo, variedades de frutas, rosas y otras. Tipo de formulación: EC, WP, DP, UL; CS. Compatibilidad: Compatible con la mayoría de plaguicidas, incompatible con compuestos alcalinos. Nombres comerciales: Folidol M, Metacide, Cekumethion, Fostox metil, Penncap-M.</p>	
<p>Análisis: Análisis del compuesto por GLC (Con detección FID: CIPAC Handbook 1985, IC, 2169. AOAC 1990 método 977.04, método 980.11, método 968.24, EPA método 8140, método 8141), o por CLAR (AOAC 1990 método 977.05 y 1B 1879).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: LD50 oral ratas 6 mg/kg, piel y ojos: LD50 aguda percutánea para ratas 45 mg/kg., inhalación: LC50 (4 h) para ratas 0.17 mg/L aire. NOEL (2 años) para ratas 2 y (1 año) para perros 50 mg/kg diario. ADI (JMPR) 0.02 mg/kg b.w. (1988). Clase toxicológica: WHO I, EPA I.</p>	
<p>Ecotoxicología: El metil paratión ha sido detectado en abejas con concentración de residuos desde 0.04 a 5.80 ppm. También en muestras de peces de estuarios, con concentración de 47 ug/kg y en peces provenientes de lagos, con concentración de 15.96 ug/kg.</p>	
<p>Destino Ambiental: Animales: El compuesto es rápidamente secretado en la orina durante las 24 horas siguientes a la ingesta. Sus metabolitos principales son el 4-nitrofenol y el dimetil fosfato. Plantas: En las plantas los metabolitos principales son p-nitrofenol glucopiranosido y P-S demetil paratión metil. Agua y suelo: De acuerdo al valor de Koc y a los estudios de lixiviación, el compuesto presenta una movilidad entre media y baja. En suelos biológicamente activos se degrada rápidamente mediante oxidación a fosfato, la desmetilación de los grupos éster y la hidrólisis hasta ácido fosfórico y 4-nitrofenol. La biodegradación es también un proceso bastante probable de eliminación. En agua se adsorbe a sólidos suspendidos y sedimentos. Valores hallados de BCFs de 8.3 y 959 sugieren que el compuesto puede tener de baja a alta bioconcentración en organismos acuáticos pero se espera que sea rápidamente metabolizado. En la atmósfera está presente en fase de vapor y adsorbido a las partículas; en estado de vapor es degradado mediante reacción con radicales hidroxilo generados fotoquímicamente con vida media de 6.5 horas.</p>	

<p>Benzo[a]antraceno</p> 	<p>Nombre común :benzo[a]antraceno Nombre IUPAC: benzo[a]antraceno Número CAS: 56-55-3</p>
<p>Propiedades físicoquímicas: Peso molecular: 228.3 g/mol. Fórmula molecular: C₁₈H₁₂. Forma cristalización: placas incoloras recristalizadas en ácido acético glacial o alcohol, presenta fluorescencia verde-amarilla. Punto de fusión: 158-160 °C. Punto de fusión: 437.6 °C. Presión de vapor: 2.2x10⁻⁸ mmHg a 20°C. K_{ow}: 10^{5.6}. Solubilidad: 0.010 mg/L en agua a 25 °C, ligeramente soluble en ácido acético y etanol caliente, soluble en acetona y éter dietílico, muy soluble en benceno. Estabilidad: se caracteriza por una gran estabilidad debido a las múltiples formas resonantes que presenta, susceptible a fotooxidación.</p>	
<p>Aplicaciones: Se genera en el alquitrán de hulla, se utiliza como endurecedor, en la fabricación de colorantes y en síntesis químicas. El antraceno se utiliza en la producción de antraquinona, una importante materia prima para la fabricación de colorantes rápidos. Se emplea también como diluyente para conservantes de la madera y en la producción de fibras sintéticas, plásticos y monocristales.</p>	
<p>Análisis: Análisis del compuesto por GC (detección por espectrometría de masas: EPA método 625, EPA método 1625). Además por CLAR con detección por fluorescencia.</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: posible carcinógeno en humanos, produce tumores en ratones y mutaciones en células de mamífero in vitro La exposición crónica a este compuesto condiciona la formación de tumores a nivel pulmonar, dérmico y renal en animales, almacenándose principalmente en el tejido lipídico. En el intestino se transporta por difusión pasiva. No se ha detectado en hígado pero si en tejido graso. Se ha detectado gran cantidad de derivados en ratas y conejos: 3-hidroxibenzantraceno, 8-hidroxibenzantraceno, 9-hidroxibenzantraceno, 7,12-dihidro-7,12-dihidroxibenzantraceno, trans-8,9-dihidro-8,9-dihidroxibenzantraceno y muchos otros. Los derivados diol-epóxido de los HAPs son la última forma carcinógena de estos compuestos encontradas in vivo. Los diolepóxidos unidos a la doble hélice del AND en una inclinación de 50 grados; esto puede indicar un comportamiento sistemático en las asociaciones moleculares que preceden a la carcinogénesis.</p>	
<p>Ecotoxicología: compuesto persistente y bioacumulable en tejido adiposo, presencia amplia en partículas de aire, presente en aguas contaminadas por derrames petroleros.</p>	
<p>Destino Ambiental: El benzo[a]antraceno se genera en productos de combustión incompleta, lo cual incluye madera y vegetación así como productos alimenticios tales como hamburguesas carbonizadas, pollo al carbón, cereales y mariscos. También se genera como producto de la combustión en motores como automóviles o calentadores de gas, plantas de cocina y diferentes plantas industriales. En la atmósfera puede existir en fase gaseosa y unido a partículas atmosféricas y allí es degradado por reacción con radicales hidroxilo producidos fotoquímicamente, teniendo una vida media de 7.7 horas. Según su valor de K_{oc} (545000 a 1870000) el compuesto no presenta movilidad en suelos, aunque se espera algo de volatilización. Disuelto en agua sufre fotólisis con una vida media de horas hasta pocos días y en cuerpos eutróficos de agua, es posible la oxidación por radicales alquilperóxido. Se adsorbe a sólidos suspendidos y sedimentos en agua. El compuesto no contiene grupos hidrolizables por lo que esta forma de degradación es muy poco probable. Algunas pruebas de biodegradación eliminación total la concentración del compuesto generando CO₂.</p>	

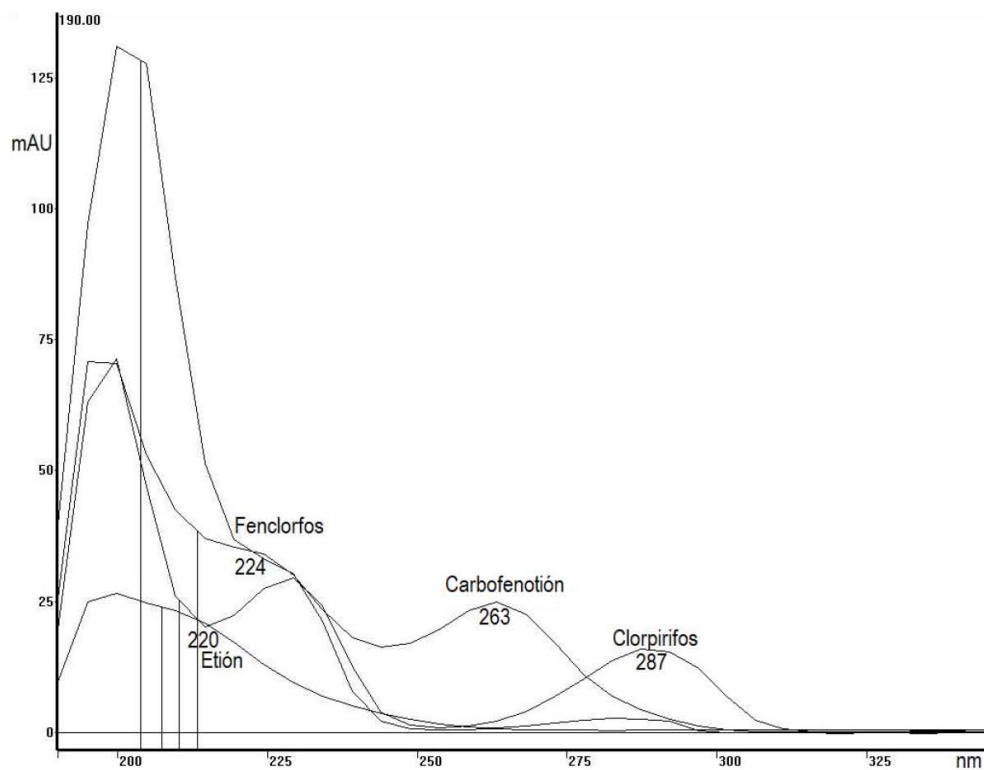
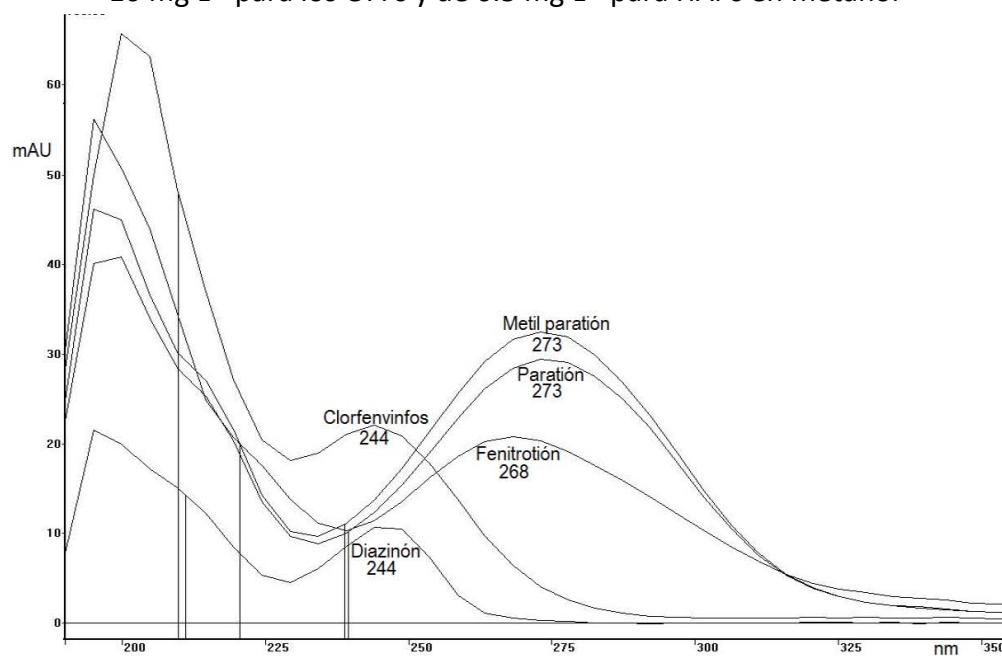
<p>Benzo[k]fluoranteno</p> 	<p>Nombre común :benzo[k]fluoranteno Nombre IUPAC: benzo[k]fluoranteno Número CAS: 207-08-9</p>
<p>Propiedades físicoquímicas: Peso molecular: 252.3 g/mol Fórmula molecular: C₂₀H₁₂. Forma cristalización: agujas de color amarillo claro recristalizadas en benceno. Punto de fusión: 215-217. Punto de ebullición: 480 °C. Presión de vapor: 1.03x10⁻¹⁰ mm Hg a 25 °C Kow: 10^{6.5} Solubilidad: 0.00076 mg/L de agua a 25 °C soluble en benceno, diclorometano, etanol, ácido acético y acetona. Estabilidad: Gran estabilidad por resonancia, susceptible a fotooxidación. Puede ser oxidado a quinona y metilado en la posición 8. No sufre fotooxidación en disolventes orgánicos bajo luz fluorescente o luz del sol en interiores.</p>	
<p>Aplicaciones: involucrado en procesos de combustión, fabricación de productos químicos de uso industrial: pigmentos, colorantes, polímeros, fabricación del negro de humo, estabilizante o pigmento en polímeros, presente en el asfalto.</p>	
<p>Análisis: Análisis del compuesto por CLAR (Con detector de fluorescencia y UV: EPA método 610, NIOSH método 5506, EMSLC método 550) CG-MS (con detector FID Método NIOSH 5515, con detector de espectrometría de masas EPA 625 método, EPA método 1625).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: Esta sustancia es probablemente carcinógena para los seres humanos, Los estudios realizados han probado que produce tumores en ratones y mutaciones en células de mamífero. Se absorbe rápidamente del tracto gastrointestinal y del pulmón. En general, los HAPs son altamente liposolubles y pueden pasar a través de la membrana epitelial. Es metabolizado a 8,9 dihidroxibenzo[k]fluoranteno en ratones.</p>	
<p>Ecotoxicología: presencia amplia en el medio ambiente en general. A lo largo de la cadena alimentaria de interés para el ser humano, se produce una bioacumulación, especialmente en aceites y grasas.</p>	
<p>Destino Ambiental: Se genera en combustibles fósiles, hay evidencias de biosíntesis en plantas. Suelos: De acuerdo al valor de K_{oc} 7.9x10⁵, se espera que sea inmóvil en el suelo y de acuerdo con su presión de vapor, tampoco se espera que se volatilice desde el suelo. En un estudio de largo término, un residuo contaminado con HAPs fue aplicado a suelos agrícolas; valores de vida media de 8.7 y 2.9 años fueron calculados para benzo[k]fluoranteno. Se sospecha que la biodegradación es la forma más importante de degradación en suelos. Agua: Según los valores de K_{oc}, 3.3x10⁵ a 8.7x10⁶ es de esperar que se adsorba a sólidos suspendidos y sedimentos y no se espera que se volatilice desde la superficie del agua. Su concentración en organismos acuáticos puede llegar a ser muy alta. Organismos acuáticos con sistemas de desintoxicación enzimático muy pobre tienden a acumular HAPs. No se espera que sufra hidrólisis en el ambiente debido a la carencia de grupos funcionales hidrolizables. De acuerdo a su presión de vapor, se espera que exista solo unido a partículas en la atmósfera.</p> <p>La biodegradación reduce sustancialmente la concentración del compuesto en agua, según resultados de estudios de laboratorio. Los procesos anaerobios no tuvieron efectos significativos sobre la concentración del compuesto.</p> <p>Las concentraciones reportadas en aguas subterráneas contaminadas están en orden de 0.02 ng/L a 3 µg/L, mientras que en aguas potables la concentraciones reportadas llegan hasta los 300 ng/L.</p>	

<p>Benzo[b]fluoranteno</p> 	<p>Nombre común :benzo[b]fluoranteno Nombre IUPAC: Benzo[e]acefenantrileno Número CAS: 205-99-2</p>
<p>Propiedades físicoquímicas: Peso molecular: 252.3 g/mol. Fórmula molecular: C₂₀H₁₂ Forma cristalización: agujas (recristalizadas en benceno), agujas incoloras (recristalizadas en tolueno o ácido acético glacial) Punto de fusión 168 °C Presión de vapor:5.0x10⁻⁷mm Hg de 20 a 25 °C Kow:10^{6.04}. Los coeficientes de partición para Ciclohexano/metanol-agua y para 1:4 nitrometano/ciclohexano son 14.7 y 1.94 respectivamente. Solubilidad:0.0012 mg/L de agua, muy soluble en benceno, ligeramente soluble en acetona. Estabilidad: gran estabilidad por resonancia, susceptible a fotooxidación. Forma un picrato con punto de fusión de 156 °C.</p>	
<p>Aplicaciones: no tiene usos intencionales conocidos pero pueden ser productos intermedios y subproductos no intencionales en diversos procesos tales como: i) procesos de combustión, ii) fabricación de productos fitosanitarios, iii) fabricación de productos químicos de uso industrial (pigmentos, colorantes, polímeros, iv) fabricación del negro de humo, el cual es usado a su vez como aditivo de carga, estabilizante o pigmento en polímeros, v) componentes biocidas en el alquitrán (creosota y productos similares) para la conservación de la madera y otros materiales tales como el asfalto.</p>	
<p>Análisis: Análisis del compuesto por CLAR (Detector UV y fluorescencia: EPA método 610, NIOSH 5506), CG (Detector de espectrometría de masas: EPA método 8270, EPA método 8250, EPA método 1625; detector de ionización de llama: EPA método 8100, NIOSH 5515).</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: Esta sustancia es probablemente carcinógena para los seres humanos. La forma carcinogénica de los HAPs resulta de su oxidación por la función mixta del sistema oxidasa a los derivados diol-epoxi; estos compuestos contienen regiones altamente reactivas que probablemente se unen covalentemente al ADN.</p>	
<p>Ecotoxicología: presencia amplia en el medio ambiente en general. A lo largo de la cadena alimentaria de interés para el ser humano, se produce una bioacumulación, especialmente en aceites y grasas.</p>	
<p>Destino Ambiental: Es una sustancia ubicua que se origina como consecuencia de la combustión incompleta de hidrocarburos, carbón, biomasa y emisiones de vehículos. Ha sido identificado como componente del humo de cigarrillo. Por el valor de su presión de vapor, existe en fase gaseosa y también adherido a partículas de la atmósfera. En fase gaseosa es degradado por reacción con radicales hidroxilo generados fotoquímicamente, con una vida media atmosférica de 21 horas. Se produce fotólisis del compuesto al irradiarlo con luz de 290 nm, teniendo una vida media de 9 horas, por lo cual se espera su degradación mediante ese proceso. Se espera que sea inmóvil en el suelo, basados en el valor de Koc (6.26 – 6.70) medido en sedimentos. No se espera volatilización de cuando se encuentra adherido al suelo, teniendo en cuenta su presión de vapor; sin embargo se presenta su lenta biodegradación en suelo y agua, con un tiempo de vida medio que puede ir desde varios meses hasta años. La vida media estimada en el proceso de volatilización a partir de aguas de ríos y lagos es de 116 y 852 días respectivamente, por lo que se deduce que el compuesto se volatiliza lentamente. Tiene un alto potencial de bioconcentración en organismos acuáticos, esto se confirma con el valor de BFC de 2800 medido en almejas.</p>	

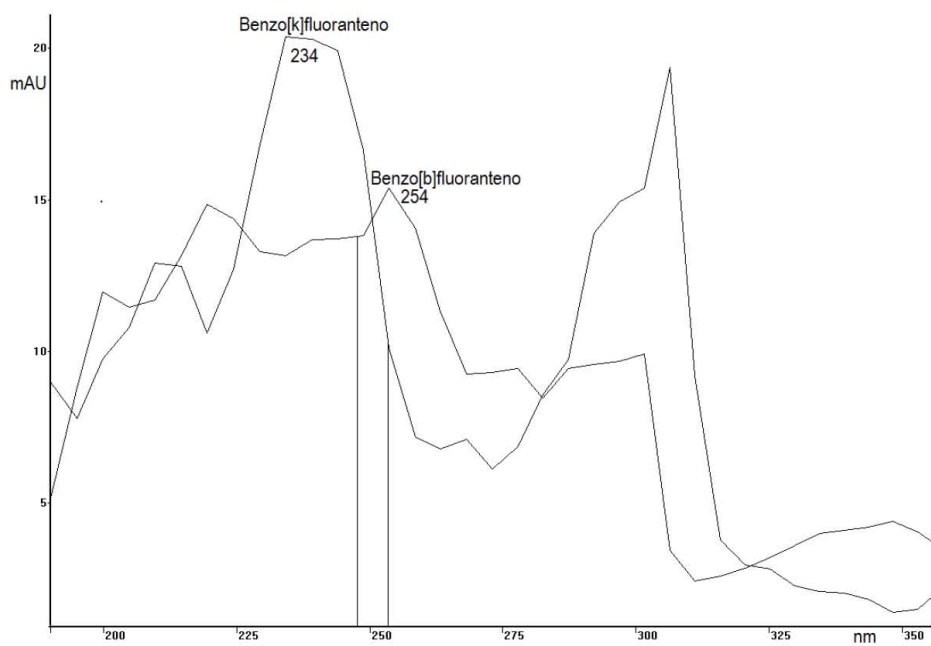
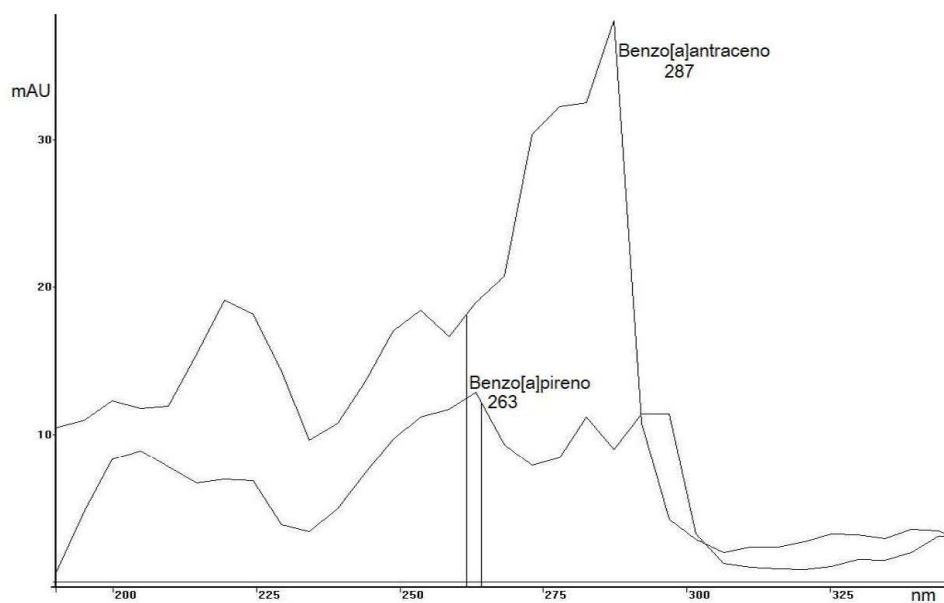
<p>Benzo[a]pireno</p> 	<p>Nombre común :benzo[a]pireno Nombre IUPAC: benzo[a]pireno Número CAS: 50-32-8</p>
<p>Propiedades físicoquímicas: Peso molecular: 252.31 g/mol. Fórmula molecular: C₂₀H₁₂. Forma cristalización: Agujas monoclinicas de color amarillo claro recristalizadas en benceno y metanol; los cristales pueden ser monoclinicos y ortorrómbicos; placas amarillentas (recristalizadas en benceno y ligroína). Punto de fusión: 179 °C. Punto de ebullición: 495 °C. Presión de vapor: 5.6x10⁻⁹mm Hg a 25 °C Log Kow: 6.13. Solubilidad: 0.0023 mg/L de agua a 25 °C es muy soluble en solventes apolares tales como el benceno, tolueno, xileno, ciclohexano, acetona, éter, dimetilsulfóxido, dimetilformamida. Es poco soluble en etanol, metanol. Estabilidad: Relativamente estable puede ser atacado por oxidantes, susceptible a fotooxidación, reacciona con agentes oxidantes (tales como percloratos, peróxidos, permanganatos, cloratos, nitratos, cloro, bromo y flúor)</p>	
<p>Aplicaciones: Se utiliza puro como reactivo de laboratorio, se usa como marcador de la incidencia y efectos carcinogénicos de los HAPs. Involucrado en procesos de combustión, fabricación de productos fitosanitarios, fabricación de productos químicos de uso industrial (pigmentos, colorantes, polímeros, fabricación del negro de humo, el cual es usado a su vez como aditivo de carga, estabilizante o pigmento en polímeros, componentes biocidas en el alquitrán (creosota y productos similares) para la conservación de la madera y otros materiales como el asfalto.</p>	
<p>Análisis: Análisis del compuesto por GC (detección por FID: EPA-OSW método 8100, detección por espectrometría de masas: NOAA-NST método 130.30, EPA-OSW método 8270D, EPA-NERL método 625, EPA-NERL método 525.2, EPA-EAD método 1625). CLAR (detección por UV y fluorescencia: EPA-OSW método 8310, EPA/NERL método 550, EPA-EAD método 610, NIOSH método 5506)</p>	
<p>Toxicología en mamíferos: posible carcinógeno en humanos, puede causar daño al feto en desarrollo. Existen indicios de que causa cáncer de estómago, piel, sangre, bazo, páncreas y mama en animales</p>	
<p>Ecotoxicología: A lo largo de la cadena alimentaria de interés para el ser humano se produce una bioacumulación especialmente en tejido adiposo. Es metabolizado principalmente en el hígado por las enzimas citocromo P 450 1A1 y 1B1 formando una gama de metabolitos polares más activos, de ellos el principal es el Benzo[a]pireno-7,8-epoxido, el cual es metabolizado por la epóxido hidrolasa formando Benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol que luego es epoxidado por la CYP1A1 formando el Benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epoxido, el cual es el metabolito más tóxico y el responsable de la carcinogenicidad por su capacidad de reaccionar con el ADN.</p>	
<p>Destino Ambiental: Es producido por combustión incompleta, se encuentra en combustibles fósiles, es emitido el ambiente por erupciones volcánicas y se une a las partículas de la atmósfera. Una vez en el medio ambiente tiene un tiempo de vida media bastante prolongado: t_{1/2} aire= 170 h. t_{1/2} agua= 1700 h. t_{1/2} sedimento= 8000 h. Tiene cromóforos que absorben luz de 290 nm y por tanto es susceptible de degradarse por fotólisis. De acuerdo con el valor de Koc de 930 a 6,300, presenta poca o ninguna movilidad en el suelo. En procesos de biodegradación se han observado tiempos de vida media de 229 y 309 días. En el agua se adsorbe a sólidos suspendidos y sedimentos y puede bioacumularse en organismos acuáticos. No se degrada por hidrólisis por carecer de grupos funcionales hidrolizables.</p>	

ANEXO II

Espectros de ultra-violeta visible de los contaminantes estudiados: Disoluciones control de 10 mg L^{-1} para los OFFs y de 0.5 mg L^{-1} para HAPs en metanol



Plaguicidas organofosforados



Hidrocarburos aromáticos policíclicos

ANEXO III

Cálculo de la ecuación linealidad, coeficientes de correlación y desviación estándar de pendiente y ordenada para el benzo[a]pireno para la metodología acoplada DMFS-EFS-CLAR/DFL

Benzo[a]antraceno						
Concentración ng g ⁻¹	Area UA	(x _i - \bar{x})	(x _i - \bar{x}) ²	(y _i - \bar{y})	(y _i - \bar{y}) ²	(x _i - \bar{x})(y _i - \bar{y})
0.1	327177	-0.23	0.050625	-708105.17	5.0141E+11	159323.663
0.1	315990	-0.23	0.050625	-719292.17	5.1738E+11	161840.738
0.1	317127	-0.23	0.050625	-718155.17	5.1575E+11	161584.913
0.2	629022	-0.13	0.015625	-406260.17	1.6505E+11	50782.5208
0.2	611088	-0.13	0.015625	-424194.17	1.7994E+11	53024.2708
0.2	625946	-0.13	0.015625	-409336.17	1.6756E+11	51167.0208
0.4	1318675	0.08	0.005625	283392.83	8.0311E+10	21254.4625
0.4	1255427	0.08	0.005625	220144.83	4.8464E+10	16510.8625
0.4	1350165	0.08	0.005625	314882.83	9.9151E+10	23616.2125
0.6	1872078	0.28	0.075625	836795.83	7.0023E+11	230118.854
0.6	1896962	0.28	0.075625	861679.83	7.4249E+11	236961.954
0.6	1903729	0.28	0.075625	868446.83	7.542E+11	238822.879
$\bar{x} = 0.325$	$\bar{y} = 1035282.17$					
Sumatorias		0.00	0.4425	0.00	4.472E+12	1405008.35

Pendiente de la regresión y sobre x (m)

$$m = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$m = \frac{2896259.28}{0.4425} = 3175160.1$$

Ordenada en el origen (b)

$$b = \bar{y} - m\bar{x}$$

$$b = 1035282.17 - 3175160.1 \times 0.325 = 3355.1$$

Coefficiente de correlación momento- producto (r)

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

$$r = \frac{1405008.35}{\sqrt{0.4425 \times 4.472E + 12}} = 0.999$$

Concentración ng g ⁻¹	Area UA	(x _i) ²	(x _i - \bar{x}) ²	(y _i - \hat{y})	(y _i - \hat{y}) ²
0.1	327177	0.01	0.050625	6305.8588	39763854.66
0.1	315990	0.01	0.050625	-4881.1412	23825539.83
0.1	317127	0.01	0.050625	-3744.1412	14018593.65
0.2	629022	0.04	0.015625	-9365.1525	87706082.14
0.2	611088	0.04	0.015625	-27299.1525	745243729.53
0.2	625946	0.04	0.015625	-12441.1525	154782276.58
0.4	1318675	0.16	0.005625	45255.8249	2048089683.65
0.4	1255427	0.16	0.005625	-17992.1751	323718366.31
0.4	1350165	0.16	0.005625	76745.8249	5889921633.25
0.6	1872078	0.36	0.075625	-36373.1977	1323009513.84
0.6	1896962	0.36	0.075625	-11489.1977	132001664.71
0.6	1903729	0.36	0.075625	-4722.1977	22299151.50
$\bar{x} = 0.325$	$\bar{y} = 1035282.17$				
Sumatorias		1.710	0.4425	0.00	10804380089.66

Desviación estándar de la pendiente (S_m)

Para calcular la S_m primero hay que encontrar el valor del dato estadístico (S_{y/x})

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}, \text{ dato estadístico, } \hat{y} : \text{ valores sobre la recta de regresión}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{10804380089.66}{12 - 2}} = 32870.0$$

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_m = \frac{32870.0}{\sqrt{0.4425}} = 49413.2$$

Desviación estándar de la ordenada (S_b)

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$S_b = 32870.0 \sqrt{\frac{1.710}{12 \times 0.4425}} = 18653.1$$

ANEXO IV

Publicación internacional

Journal of Chromatography A, 1218 (2011) 6869–6877



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma



Determination of organophosphorus pesticides in bovine tissue by an on-line coupled matrix solid-phase dispersion–solid phase extraction–high performance liquid chromatography with diode array detection method

Tania M. Gutiérrez Valencia, Martha P. García de Llasera*

Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 April 2011

Received in revised form 11 July 2011

Accepted 5 August 2011

Available online 12 August 2011

Keywords:

Matrix solid-phase dispersion

Solid-phase extraction

On-line coupling analysis

HPLC

Organophosphorus pesticides

Bovine tissues

ABSTRACT

A miniaturized method based on matrix solid-phase dispersion coupled to solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection (MSPD–SPE–HPLC/DAD) was developed for the trace simultaneous determination of the following organophosphorus pesticides (OPPs) in bovine tissue: parathion-methyl, fenitrothion, parathion, chlorfenvinphos, diazinon, ethion, fenchlorphos, chlorpyrifos and carbophenothion. To perform the coupling between MSPD and SPE, 0.05 g of sample was dispersed with 0.2 g of C₁₈ silica sorbent and packed into a stainless steel cartridge containing 0.05 g of silica gel in the bottom. After a clean-up of high and medium polarity interferences with water and an acetonitrile:water mixture, the OPPs were desorbed from the MSPD cartridge with pure acetonitrile and directly transferred to a dynamic mixing chamber for dilution with water and preconcentration into an SPE 20 mm × 2.0 mm I.D. C₁₈ silica column. Subsequently, the OPPs were eluted on-line with the chromatographic mobile phase to the analytical column and the diode array detector for their separation and detection, respectively. The method was validated and yielded recovery values between 91% and 101% and precision values, expressed as relative standard deviations (RSD), which were less than or equal to 12%. Linearity was good and ranged from 0.5 to 10 µg g⁻¹, and the limits of detection of the OPPs were in the range of 0.04–0.25 µg g⁻¹. The method was satisfactorily applied to the analysis of real samples and is recommended for food control, research efforts when sample amounts are limited, and laboratories that have ordinary chromatographic instrumentation.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Organophosphorus pesticides (OPPs) are esters of phosphoric acid with different substituents that are commonly used to control pests in crops and livestock. Persistent OPPs can be found in the liver from exposed animals because they are trapped and metabolized in its lipophilic tissues. Dichlorvos and parathion are highly toxic and rapidly acting OPPs [1]. Also, it is known that the hepatotoxic effect of diazinon causes biochemical and ultrastructural changes in adult male Wistar rats [2] and that OPPs have been associated with pathology and chromosomal damage in humans [3]. As a result of all of the damage caused by OPPs, the development of analytical methods to measure these compounds in animal matrices and animal-derived food products has recently become a very important field. Gas chromatography and liquid chromatography with mass spectrometry (MS) and ultraviolet–visible detection

(UV–vis) are the most commonly used systems for the analysis of OPPs at trace-levels [4–7]. The most used extraction techniques involved in the sample preparation methods for OPPs from animal tissues are the classic solid–liquid and liquid–liquid extraction (SLE and LLE), but the sorbent-based technique matrix solid phase dispersion (MSPD) has also been used successfully [8–14]; these methods were all performed using the off-line mode, which means that extraction and analysis are separated.

To the best of our knowledge, on-line coupled analytical methods to facilitate the trace determination of OPPs in animal tissues, such as bovine liver or muscle, have not reported in the literature; this is the case not only for food surveillance but also for other kind of applications where the amount of sample is limited, e.g., biopsy or necropsy samples collected for veterinary studies. In fact, methodologies that include sample treatment on-line coupled to measurement systems have been shown to be important. The manipulation of small quantities of sample and solvents, reduction of error sources (because of minimal sample contamination) and analysis time, better sensitivity and lower limits of detection than off-line methods make the on-line approach a great alternative for the analysis of organic pollutants in a wide range

* Corresponding author. Tel.: +52 55 56223899–44051;

fax: +52 55 56223899–44051.

E-mail address: pgcillas@servidor.unam.mx (M.P. García de Llasera).

of biological samples. The extraction techniques suitable for on-line coupling with liquid or gas chromatography are diverse; the most common techniques for solid samples are supercritical fluid extraction (SFE), pressurized liquid- and hot water extraction (PLE and HWE), microwave- and sonication-assisted extraction (MAE and SAE, respectively) [15]. For instance, dynamic MAE coupled with on-line solid phase-high performance liquid chromatography was used for the determination of organochlorine pesticides from grains [16]. A methyl carbamate has been analyzed by an on-line supercritical fluid extraction/clean-up/supercritical fluid chromatography/mass spectrometry method (SFE/CU/MS) from leaf and chitin meals [17]. These analytes have also been measured by static-dynamic TDWE [18] and continuous ultrasound-assisted extraction [18]; both techniques were coupled to on-line filtration-solid-phase extraction-high performance liquid chromatography-post-column derivatization-fluorescence detection from different fruits and vegetables and from soil and food, respectively. Solid phase extraction (SPE) is also a widely known technique that can be easily coupled on-line to a liquid chromatographic system for the determination of organic contaminants and drugs, especially in liquid biological matrices, such as urine [20] and plasma [21]. In the case of solid biological matrices, SPE is usually included as a pre-concentration and/or clean-up step of the on-line sample preparation protocols; these kinds of SPE applications are described in some of the above cited references. It is important to note that when the on-line instrumental coupling can be optimized, the automation of the whole analytical system is easy to achieve with the use of six or ten-way switching valves, auto samplers, steel cartridges filled with different sorbents, stainless steel tubing, low flow pumps and pressure and flow electronic control systems and interfaces [22–26].

The application of matrix solid phase dispersion coupled to solid phase extraction and chromatography has not yet been reported for the analysis of pesticide residues in complex biological samples. Only some endogenous compounds [27] and drugs [28] have been analyzed from fish tissue with the use of coupled MSPD; in these cases, the analysis was aided by sophisticated and expensive chromatographic instrumentation such as liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC/MS/MS). However, MSPD could be an appropriate extraction technique that allows for the development of a coupled methodology with ordinary chromatographic analysis. This sort of method could be useful in food quality control measures and the monitoring of OPPs or herbotoxic residues associated with pathologies in animal tissues, such as liver or liver. This extraction technique is specially adapted to the handling of solid samples and offers rapid extractions of diverse organic compounds, versatility and low cost [28]. For these reasons, MSPD has experienced increased usage in recent years [30]. Miniaturization of MSPD would be required as a first strategy in couple it with other extraction or chromatographic techniques. This miniaturization can be achieved by considering the dependences that exists between the sample/sorbent ratio and recoveries of analytes obtained with the eluents. In this way, Kristensen et al. [31], miniaturized MSPD for the automated extraction of ten organophosphorus pesticides and one pyrethroid from fruits; they reduced the sample size to 25 mg and the C₁₈ silica bonded sorbent to 25 mg. Also, Moliner-Martínez et al. [32] developed a miniaturized method based on MSPD for organochlorinated pesticides (OCPs) and polybrominated diphenylethers (PBDEs) from mussels and codices by using 0.1 g of dry sample and 0.4 g of C₁₈. Other miniaturized MSPD methods were developed for OPPs, triazine pesticides and pyrethroids from fruits [33] and for other pesticides from agricultural food commodities [34].

The aim of this work is to perform the first coupling of MSPD to on-line SPE-HPLC with a diode array detector (DAD) for the analysis of nine OPPs from bovine tissues. These compounds

(parathion-methyl, fenitrothion, parathion, chlorfenvinphos, diazinon, ethion, fenitrothion, chlorpyrifos and carbophenothion) have a wide range of polarities and are commonly used in Mexico NOM-004-1984 [35] for bovine fumigation. The coupled methodology was validated with liver samples and subsequently applied in the analysis of bovine samples that presented pathological lesions.

2. Experimental

2.1. Reagents, solutions and sorbents

Methanol and acetonitrile were HPLC grade and purchased from J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). The OPPs standards (parathion-methyl, fenitrothion, parathion, chlorfenvinphos, chlorpyrifos, diazinon, ethion, fenitrothion and carbophenothion) were from Chem Service (West Chester, PA, USA) with certified purity >98%. Water (18.2 M Ω cm² resistivity) was obtained from a Millipore deionizer Simplicity UV (Bedford, MA, USA). A stock solution of nine analytes at 500 mg L⁻¹ was prepared in methanol and stored in the dark at 4 °C. Working standard solutions were prepared by appropriate dilution of the stock solution in methanol at different concentration levels (1.0–25 mg L⁻¹).

Silica LC-18 and silica LC-Si (particle diameter 40 μ m) from SUPECO (Bellefonte, PA, USA) were used as dispersing and clean-up sorbents, respectively, to perform MSPD. Nucleosil silica C₁₈ sorbent (particle diameter 10 μ m) purchased from Phenomenex (San Francisco, CA, USA) was used to pack the SPE cartridge.

2.2. HPLC systems

The OPPs were analyzed using a model 9012 liquid chromatograph and a model 9005 UV diode array detector (DAD) from Varian (Palo Alto, CA, USA) and with the software LC Workstation Multi-Instrument Version G.20. This HPLC system was equipped with a manual injection port switching valve Rheodyne 7725i with a 20 μ L loop and a 5 μ m RSN-EHT C₁₈ stainless steel analytical column (150 mm \times 4.6 mm I.D.) connected to a guard column (20 mm \times 2 mm I.D., same stationary phase); both columns were obtained from Varian. Analytical separation was performed with an elution gradient programmed linearly for 20 min from an initial mobile phase composition of 85:35 (v/v) methanol/water to a final composition of 100:0 methanol at a flow rate of 1 mL min⁻¹. Absorption spectra of the pesticides were obtained by scanning wavelengths in the range of 180–360 nm. The individual detection wavelengths selected for each pesticide were as follows: parathion-methyl, 273 nm; fenitrothion, 268 nm; parathion, 273 nm; chlorfenvinphos, 244 nm; chlorpyrifos, 267 nm; diazinon, 244 nm; ethion, 220 nm; fenitrothion, 224 nm; and carbophenothion, 273 nm.

The confirmative analysis of fenitrothion was performed by a model 1200 series liquid chromatograph from Agilent Technologies (Boeblingen, Germany) coupled to an Agilent QQQ 641 triple quadrupole tandem mass spectrometer detector (MS/MSD), which was programmed and controlled using Agilent Chemstation software. The MS/MSD was equipped with an electrospray ion source which was operated in positive ionization mode. Compound separation was achieved using a 5 μ m Zorbax 50 mm \times 4.6 mm I.D. Extend-C₁₈ Agilent column at 25 °C and isocratic elution with 90:10 (v/v) acetonitrile/ammonium acetate 5 mM at a flow rate of 0.4 mL min⁻¹; the injection volume was 4 μ L. Selective ion-monitoring mode (SIM) was used for the identification of fenitrothion from bovine liver. The scan segment was 277 m/z (dwell time 200 ms). The electrospray ion source was held at 350 °C, the drying gas flow was at 9 L min⁻¹, the nebulizer pressure was 40 psi

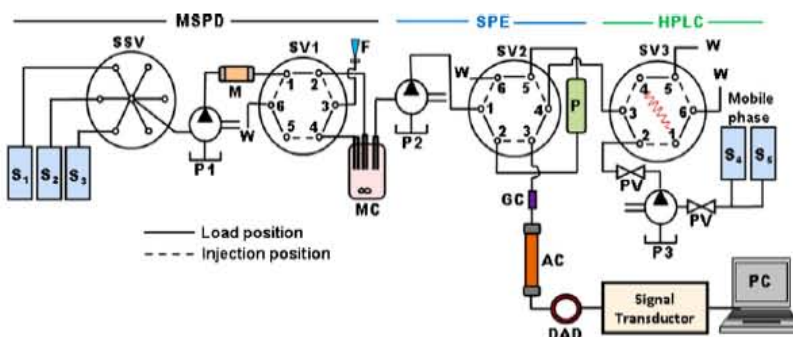


Fig. 1. MSPD-SPE-HPLC/DAD assembly. S_1 = water; S_2 = 30:70 (v/v) acetonitrile:water; S_3 = acetonitrile; S_4 = methanol; S_5 = water; SSV = solvent selector valve; P1 = pump 1; M = MSPD cartridge; SV1 = six-port switching valve 1; F = filler port; SV2 = six-port switching valve 2; MC = dynamic mixing chamber; P2 = pump 2; P = C_{18} -bonded silica precolumn; SV3 = chromatographic injection port switching valve; PV = purge valve; P3 = chromatographic pump; PC = computer; GC = guard column; AC = analytical column; DAD = diode array detector UV; W = waste.

and the capillary voltage was 4000 V. This analysis was performed in the Bioequivalence Laboratory of the Faculty of Chemistry, UNAM.

2.3. Matrix solid phase dispersion coupled to on-line solid phase extraction high performance liquid chromatography

2.3.1. Sample preparation

The bovine liver tissue samples used for development and validation of the coupled method were obtained in supermarkets from Mexico City; the samples were stored at -4°C until analysis. The bovine liver tissue samples used for application of the validated method were obtained from the Animal Pathology Laboratory of the *Facultad de Estudios Superiores FES-Cuautitlán, UNAM*. The samples collected from animals suspected of death by intoxication were immediately stored at -20°C until analysis. Five grams of liver were homogenized with an Ultraturrax apparatus (IKL-Labortechnik, Staufen, Germany). Then, 50 mg of homogeneous sample was placed into an agate mortar (50 mL capacity) containing 200 mg of C_{18} -sorbent, that had been previously washed with 1 mL of methanol by each gram of sorbent and vacuum dried. Next, the sample and sorbent were gently blended for a few minutes using a pestle until a homogeneous mixture was obtained. The dispersed phase was packed into a 30 mm \times 8.0 mm I.D. stainless steel cartridge with a polytetrafluoroethylene (PTFE) frit and with 0.050 g of sorbent silica gel compressed in the bottom, to act as a co-column. The dispersed phase and co-column were separated by a PTFE frit and compressed by another PTFE frit used for cover. The MSPD cartridge was closed with two steel nuts and was connected to the coupled system.

2.3.2. Coupling

The on-line coupling of MSPD-SPE-HPLC and accessories used are described next. A schema of the complete assembly and operation mode are shown in Fig. 1 and Table 1.

Two Eldex model CC-100-S (CA, USA) reciprocal pumps (P1 and P2) were used. The P1 pump sent the cleaning and elution solvents to the 30 mm \times 8.0 mm I.D. MSPD stainless steel cartridge (M) via a solvent selector Upchurch Scientific (Washington, USA) six-port valve (SSV) at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The complete MSPD solvent sequence was as follows: 2.5 mL water (S_1), 2.0 mL 30:70 (v/v) acetonitrile:water (S_2) and 2.0 mL acetonitrile (S_3). After application to the cartridge, S_1 and S_2 were discarded, but S_3 was sent into a 6.0 cm \times 2.5 cm I.D. dynamic mixing chamber (MC), built in the laboratory, containing a magnetic stirrer; here S_3 was diluted with 8 mL of pure water introduced by a Rheodyne (Berkeley, CA, USA) model 7012 filler port (F). At the same time, P2 was activated for the preconcentration of the diluted extract on a previously equilibrated 20 mm \times 2.0 mm I.D. SPE stainless steel column (P). M and P were connected, each one to the two Rheodyne model 7000 six-port switching valves (SV1 and SV2) used. Finally, the analytes trapped on the SPE column (P) were eluted through the guard-column (GC) and the analytical column (AC) with the mobile phase, constituted by a gradient of methanol (S_4) and water (S_5), which was sent by the chromatographic pump (P3) via the chromatographic injection port switching valve (SV3) for subsequent analysis by the HPLC/DAD system.

2.4. Method validation

The linearity and precision of the MSPD-SPE-HPLC/DAD method were evaluated by analyzing bovine liver tissue samples

Table 1
Operation mode of the on-line coupling of MSPD-SPE-HPLC.

Operation	MSPD		SPE		HPLC		
	Clean-up (S_1 and S_2)	Elution (S_3)	Equilibrate (S_4 : S_5 , 65:35)	Concentration	Equilibrate (S_4 : S_5 , 65:35)	Transfer (gradient ^b S_4 and S_5)	Direct injection
Valve position	SV1 Inject SV2 Inject SV3 ^a Load	Load Inject Load	Inject Inject Load	Inject Load Load	Inject Load Load	Inject Inject Load	Inject Load Inject
Pump mode (1 mL min^{-1})	P1 Activated P2 Stopped P3 Activated	Activated Stopped Activated	Activated Stopped Activated	Stopped Activated Activated	Activated Stopped Activated	Stopped Stopped Activated	Stopped Stopped Activated

^a Injection port 7725i.

^b Mobile phase: methanol:water 65:35 (v/v) to 100% methanol during 20 min; S_1 = 2.5 mL water; S_2 = 2.0 mL 30:70 (v/v) acetonitrile:water; S_3 = 2 mL acetonitrile; S_4 = methanol; S_5 = water.

(free of pesticide residues) spiked at five concentration levels (0.5, 1.0, 2.5, 5 and 10 $\mu\text{g g}^{-1}$). For each concentration level, three replicates were made to determine the relative standard deviation (RSD). Precision was determined in terms of repeatability by running five liver tissue extracts from samples spiked at two different concentration levels (0.5 and 10 $\mu\text{g g}^{-1}$), and reproducibility was determined using five replicate samples that were spiked at the same concentration levels and analyzed on three different days. Recoveries were determined and the accuracy was evaluated by relating the measured amount of OPPs vs. the added amount in the spiked samples. The slope of the curve indicated the overall recoveries for each pesticide. The experimental limits of detection (LOD) were determined at a signal-to-noise ratio (S/N) of 3, and the limits of quantification (LOQ) were determined at a S/N of 10 [36] at the λ_{max} of each pesticide, using extracts from spiked liver tissue samples. Finally, the ruggedness of the method was evaluated by analyzing the pesticides in different bovine tissues (i.e., muscle and lung). The samples were spiked at two concentration levels (0.5 and 10 $\mu\text{g g}^{-1}$) as performed previously with liver. Recoveries and relative standard deviation (RSD) were calculated.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of MSPD conditions

3.1.1. Miniaturization

Preliminary experiments were conducted off-line to optimize a miniaturized MSPD method based on a previous procedure proposed by García de Mesa and Reyes-Reyes [11], using 0.5 g of liver, 2 g of C_{18} as dispersing sorbent and an independent cleaning column packed with 0.5 g of silica gel. The elution sequence applied in this previous methodology was as follows: (a) 20 mL of deionized water, (b) 3 mL of acetonitrile:water 25:75 (v/v), (c) 1 mL of acetonitrile:water 60:40 (v/v) and (d) 6 mL of acetonitrile. Our optimization of the miniaturized method consisted of the gradual reduction of the sample amount and dispersion of the C_{18} sorbent relative to the previous method, while preserving the 1:4 ratio (w/w). Also, the silica gel sorbent and the cleaning and elution sequence for the extraction of the nine OPPs from liver tissue were optimized for each sample amount assayed. The different sample sizes used in the miniaturization and the respective amounts of C_{18} dispersing sorbent and silica are indicated in Table 2 as well as the elution sequences, which were modified in each case. Additionally, the silica gel used to improve the clean-up of lipidic compounds was incorporated in the bottom of the cartridge, because it was considered that the coupling would be done with only one MSPD column. These preliminary assays were performed using polypropylene cartridges. Therefore, as can be observed in Table 2, the volumes of deionized water (V_{water}) and the organic solvent composition and volumes of the acetonitrile:water mixtures (V_1 and V_2) used in the cleaning sequence were adjusted. Acetonitrile was increased from 25% to 30% in V_1 to achieve better elimination of matrix interferences and was reduced from 60% to 40% in V_2 to avoid breakthrough of pesticides from the miniaturized MSPD columns. The elution of OPPs was performed with an 80:20 (v/v) acetonitrile:water mixture instead the pure acetonitrile used in the previous work, in an effort to eliminate more nonpolar interferences. Table 2 also shows the quantitative recovery values (>90%) obtained for pesticides in each assay; the spiked amount of pesticide was kept constant at 30 μg .

3.1.2. Final MSPD elution sequence of coupling

To conduct the coupling of the MSPD to the SPE and the chromatography system, the dispersed liver- C_{18} phase and silica were packed into a stainless steel cartridge (M), which was directly con-

Table 2
Working conditions for the miniaturization of the off-line MSPD method and pesticide recoveries.

Sample	Cu	Silica	Sequence (L)				Recovery % (RRT)								
			Clean up		Elution		pesticide			pesticide			pesticide		
			V_{water}	V_1	V_2	V_{water}	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0.125	0.500	0.500	5.0	3.0	1.0	4.0	94.1 (1.15)	97.2 (1.14)	95.1 (1.07)	92.2 (1.31)	93.3 (1.44)	97.2 (1.15)	97.4 (1.17)	98.3 (1.17)	96.5 (1.07)
0.25	0.250	0.100	2.5	1.5	0.5	3.0	91.1 (1.17)	95.3 (1.30)	95.2 (1.12)	91.2 (1.04)	90.7 (1.47)	91.3 (1.42)	91.2 (1.16)	94.5 (1.61)	97.9 (1.17)
0.50	0.200	0.050	2.5	0.6	0.4	2.0	96.3 (1.22)	99.9 (1.31)	95.2 (1.20)	91.9 (1.53)	97.1 (2.00)	97.6 (1.28)	97.3 (1.45)	98.3 (1.59)	97.2 (1.40)

(1) methoxyfenozide, (2) fenitrothion, (3) parathion, (4) diazinon, (5) diazinon 35, (6) ethion, (7) fenitrothion, (8) chlorpyrifos, (9) omethoifenothion.

needed to a pump (P1). At the same time, a solvent selector valve (SSV) that was joined to different containers of the cleaning and elution solvents was connected to P1. Before the implementation of coupling the on-line SPE, some extraction assays were performed using the configuration we selected: the smallest sample size of 0.05 g and the working preliminary conditions described in Table 2. However, the results showed a significant decrease in the recoveries of OPPs compared with the recoveries from preliminary assays. For instance, 83% and 80% for diazinon and fenitrothion, respectively, instead of 97% and 96%, for this reason, it was necessary to re-optimize the cleaning and elution sequence, by eliminating the ly solvent, which caused significant breakthrough of pesticides and also by increasing the elution volume of the acetate/water 30:70 (v/v) minimum (75.0 l/min) to 2.0 ml to avoid matrix effects. Moreover, it was verified that the optimum elution solvent in elution quantities necessary of all OPPs from the MSPD without steel cartridge was 2.0 ml of pure acetone (94–100% were the hydro-organic solution with SPE acetone (94–100% were the minimum and maximum values obtained for diazinon and parathion, respectively). In summary, the final cleaning, elution sequence that was optimized in 3 steps: (a) 2.5 ml of deionized water; (b) 2.0 ml of acetone/water 30:70 (v/v) and; (c) 2.0 ml of pure acetone. This sequence was used in subsequent coupling experiments.

1.2. Optimization of SPE conditions

SPE was on-line coupled to the HPLC/DAD system as a technique of pre-concentration for OPPs. This method increased sensitivity in the quantification when working with small sample amounts. The advantages of on-line methodologies are well known in this respect. To place the coupling between the MSPD and the on-line SPE-HPLC it was necessary to establish the optimal conditions for the transference of OPPs from the MSPD stainless steel cartridge to the SPE C₁₈ bonded silica packed precolumn. Afterwards, the on-line system easily allowed the elution of analytes by the mobile phase from the SPE precolumn to the analytical column for direct on-line separation and HPLC-walsh array detection.

1.2.1. Influence of solvent for loading

To achieve the retention of analytes in the SPE precolumn, it was necessary to dilute the target acetone extract with water. This operation decreased the percentage of acetone in the extract that contained the OPPs, and thereby prevented the breakthrough of the compound when the sample was loaded into the SPE C₁₈-bonded silica precolumn. Efforts to optimize the water: organic solvent composition for the quantitative retention of analytes in the SPE column consisted of the triaxial pre-concentration of 10 ml of water-acetone/water solutions containing 10 µg L⁻¹ of each pesticide at different acetone/water contents (50%, 60%, 70% and 85%). When each mixture had been passed through the SPE minimum at a flow rate of 1 ml min⁻¹, the on-line analysis was performed. The recoveries were calculated by comparison with pesticide peak areas obtained from the pre-concentration of a pure water standard solution spiked at the same concentration. As can be seen from Fig. 2A, the recovery values for all pesticides increased as acetone/water concentrations decreased. In other words, as the minimal composition of acetone/water (25:75), the recovery values were maximal, and ranged from 92% to 105% for all pesticides. Including the more polar paraquat methyl and fenitrothion, which exhibited high breakthrough at 50% acetone/water, it was therefore determined that the acceptable concentration of the diluted extract must be equal to or lower than 25% for the loading of the SPE/water system. To perform the coupling of MSPD-SPE, the extract consisted of 2.0 ml acetone/water was diluted with 8.0 ml of water to obtain an acetone/water ratio of 20% (v/v). For this purpose, it was necessary to incorporate

a dynamic mixing chamber (MC) between the MSPD cartridge (M) and the SPE column (C). This MC allowed the rapid dilution and homogenization of the extract as it left M. This MC was connected between the pump (P2) and MC, also connected between the SSV and SVD valves (see Fig. 1), where M and P were fixed, respectively.

3.2.2. Flow rate for loading

Another factor evaluated in the optimization of the SPE pre-concentration step was the effect of the flow rate on recoveries of OPPs. Two solutions of OPPs (50 and 2.5 µg L⁻¹) were prepared in 20% (v/v) acetone/water and 10 ml was pre-concentrated in triplicate assays on the C₁₈-bonded silica precolumn at different flow rates (0.8, 1.0 and 1.5 ml min⁻¹) using the pump P2. Fig. 2B shows that recoveries of the OPPs were minimally affected by the increasing flow rate at the high concentration (50 µg L⁻¹), by contrast, recoveries obtained at the low concentration of 2.5 µg L⁻¹ were notably affected. In the last case, it was observed that the recovery percentage obtained at the 1.5 ml min⁻¹ flow rate was not quantitative for ethion, fenchlorfos, chlorpyrifos and carbophenothion (C₄Q6) and that the five more polar pesticides (parathion methyl, fenitrothion, parathion, chlorfenvinphos and diazinon) were not recovered. Therefore, the type on-line pre-concentration step of the coupled method was conducted at a flow rate of 0.8 ml min⁻¹ because recoveries of pesticides seemed not to be affected by their concentration.

1.3. Optimization of HPLC conditions

To establish the most appropriate mixture of methanol and water for the mobile phase in the chromatographic separation of nine OPPs, the curves corresponding to the logarithm of the retention factor k' vs. methanol percent in the mobile phase were constructed ($k' = R_f - D_f/D_0$) where R_f = retention time (RT) and D_f = dead time. For this purpose, direct injections of a 5 mg L⁻¹ standard solution were performed. The curves from Fig. 3 show that the methanol/water 65:35 (v/v) mobile phase provided adequate isocratically chromatographic separation for the first 5 pesticides (residues 1–5), but the rest of compounds were not highly retained. Therefore, to reduce the analysis time, a gradient was programmed linearly from an initial mobile phase composition of methanol/water 10:90 (v/v) to a final composition of pure methanol over a period of 20 min at a flow rate of 1 ml min⁻¹. Under these operational conditions, satisfactory separation of analytes was achieved in 15 min. The chromatogram obtained for the standard solution was spiked and spiked liver tissue samples are shown in Fig. 4. It can be noted that the on-line coupling was excellent because the extra broadening of peaks was not observed.

3.4. Validation of the coupled MSPD-SPE-HPLC method

3.4.1. Linearity and accuracy

The coupled MSPD-SPE-HPLC/DAD method was validated using liver tissue samples free from pesticides. Linear calibration curves (spiked concentration vs. peak area) were prepared for most pesticides at 5 levels of fortification in triplicate measurements (0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10 µg g⁻¹), for the compounds ethion, parathion methyl and diazinon. At levels of fortification were used the same as previously mentioned, except 0.5 µg g⁻¹. These curves demonstrated good linearity with correlation coefficients (r^2) ranging from 0.989 to 0.999. At the same time, the accuracy was evaluated by the determination of recoveries efficiencies of the spiked samples, which were analyzed using the developed MSPD-SPE-HPLC/DAD method under the previously described conditions. Then, the added we recovered amount curves were constructed presenting excellent correlation coefficients (>0.99). Table 3 shows that all of the linear parameters values, their respective relative standard deviations

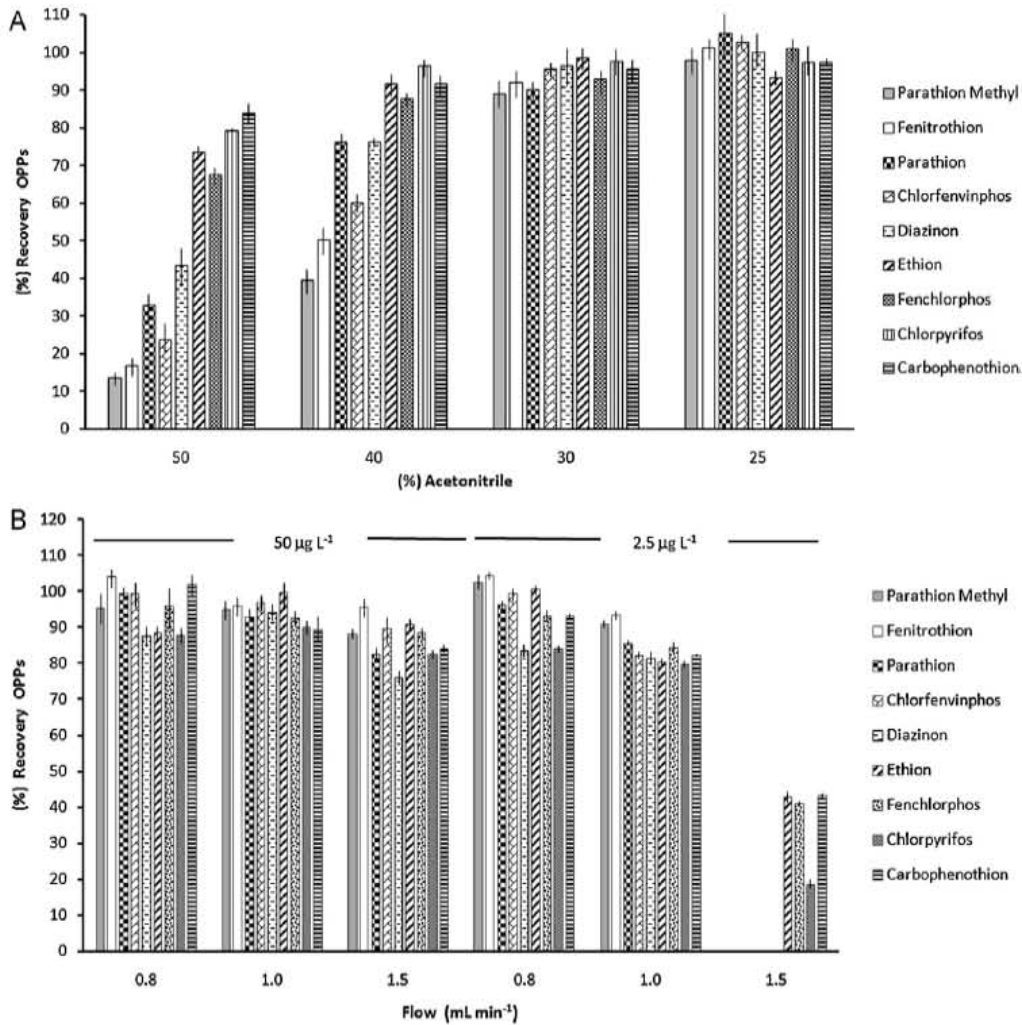


Fig. 2. Optimization of the SPE conditions. (A) The effect of the percentage of acetonitrile on recoveries of OPPs when loading 10 mL of a hidro-organic standard solution at 10 µg L⁻¹. (B) The effect of flow rate on recoveries of OPPs pre-concentrated at two concentrations.

Table 3

Method validation: parameters from the added vs. recovered amount curves (linearity range of spiked samples (25–500 ng). Precision is expressed as relative standard deviation (RSD), limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ).

Pesticides	R ² (%) (slope × 100)	Intercept ^a	Correlation coefficient (r)	RSD% (µg g ⁻¹)				LOQ (s/n=10) (µg g ⁻¹)	LOD (s/n=3) (µg g ⁻¹)	MRL ^d (µg g ⁻¹)
				Intra-day ^b		Inter-day ^c				
				0.5	10	0.5	10			
Parathion methyl	93.6 (±1.4)	-0.003 (±0.004)	0.999	3.9	2.9	4.5	5.4	0.10	0.04	n.r.
Fenitrothion	100.7 (±2.8)	0.005 (±0.007)	0.995	3.9	0.1	11.5	1.8	0.37	0.04	0.05
Parathion	96.3 (±1.6)	-0.004 (±0.004)	0.998	1.6	2.1	8.0	2.5	0.20	0.05	0.70
Chlorfenvinphos	99.8 (±1.1)	-0.006 (±0.003)	0.999	3.7	1.5	6.2	8.9	0.20	0.04	0.20
Diazinon	91.1 (±2.5)	-0.003 (±0.006)	0.995	7.6	3.6	12.4	10.5	0.41	0.25	0.70
Ethion	95.5 (±1.4)	-0.004 (±0.004)	0.999	10.2	2.9	10.3	5.5	0.90	0.20	1.00
Fenchlorphos	98.4 (±1.4)	-0.008 (±0.004)	0.999	6.6	0.3	5.2	2.0	0.77	0.04	4.00
Chlorpyrifos	99.8 (±1.3)	-0.008 (±0.003)	0.999	9.5	1.2	11.7	6.0	0.58	0.05	2.00
Carbophenothion	95.2 (±1.1)	-0.001 (±0.003)	0.999	3.5	2.5	10.0	5.0	0.35	0.20	0.07

R = Recovery; n.r. = not regulated.

^a Interval at level of confidence 95% (t_{n-2}).

^b Repeatability ($n=3$).

^c Reproducibility ($n=5$).

^d Maximum residue level (Norma Oficial Mexicana NOM-004-1994).

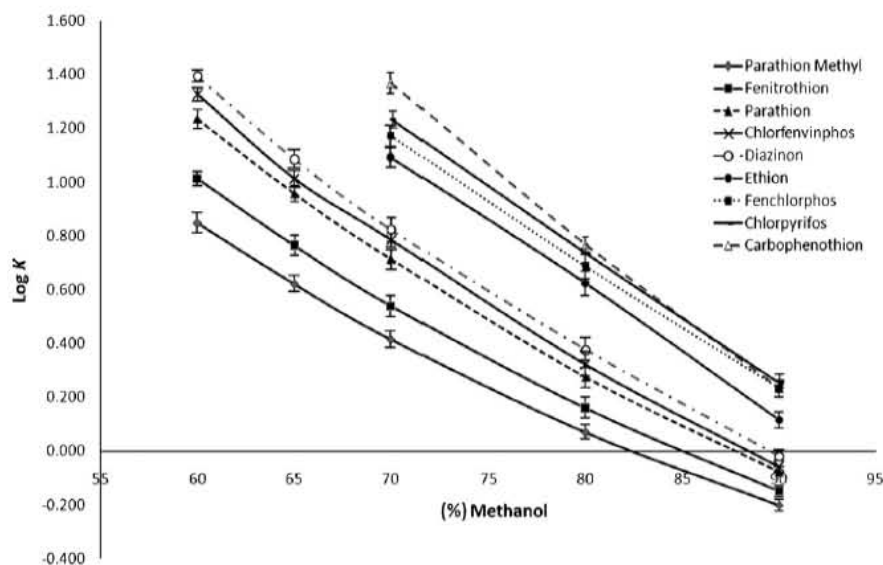


Fig. 3. Variation of the logarithm of the retention factor k' of pesticides with the percentage of methanol contained in the water-methanol mobile phase. Measured on a 150 mm \times 4.6 mm I.D. column packed with a 5 μ m RES-ELUT C₁₈ silica.

(RSD) and correlation coefficients (r). Also, the global recoveries were deduced from the slope of this curve; they ranged between 91% and 101% for diazinon and fenitrothion, respectively. These values were in agreement with European Commission Decision, 2002/657/EC/2002 which considers that a method is accurate when analyte recoveries are between 88 and 110%.

3.4.2. Precision and lower limit values

Table 3 also shows the precision of the MSPD-SPE-HPLC/DAD method, which was evaluated with the relative standard deviation parameter RSD in terms of repeatability (intra-day) and reproducibility (inter-day) at two levels of fortification (0.5 and 10 μ g g⁻¹). Adequate precision was found for all pesticides; intra-day RSD values were \leq 10% and inter-day values were \leq 12%. These values were in agreement with European Commission Decision 2002/657/EC/2002 which considers a method to be precise when RSD% is less than 20%. The limits of detection (LODs) and limits of quantification (LOQs) were calculated at the wavelength of

maximum absorption for each pesticide and were similar to other MSPD-based methodologies for OPPs [13,31]. The LODs ranged from 0.04 and 0.25 μ g g⁻¹, and the LOQs ranged from 0.1 and 0.9 μ g g⁻¹. All LOD values were below the maximum residue level established in Mexico NOM-004-1994 [35], with the exception of the LOD carbophenothion.

3.4.3. Ruggedness

The ruggedness of the coupled method was determined by the evaluation of recoveries and precision obtained at two levels of fortification (0.5 and 10 μ g g⁻¹) using three different bovine tissues: liver, muscle and lung. Fig. 5A shows that the recoveries were quantitative and similar within all type of matrices. At 10 μ g g⁻¹ recoveries from liver, muscle and lung ranged from 94% to 100%, 93% to 104% and 92% to 100%, respectively. At 0.5 μ g g⁻¹, recoveries from liver, muscle and lung ranged from 83% to 100%, 92% to 99% and 85% to 103%, respectively. Fig. 5B shows that the intra-day repeatability and inter-day reproducibility, expressed as RSDs from recoveries, were equal for liver and lung (0.1–12%) but lower for muscle (0.6–5%). Therefore, this method can be applied to different types of bovine tissues without significant changes to its precision and accuracy.

3.5. Application to real samples

The proposed MSPD-SPE-HPLC/DAD method was applied to the analysis of 23 real liver samples from unhealthy juvenile animals. Previous histopathological studies found severe liver injury in addition to the presence of necro-inflammatory activity and fibrosis stage. According to this analysis, fenitrothion was detected in one of the unhealthy samples. Fig. 6 presents the chromatogram of this sample, in which the pesticide peak and its UV-vis spectra are compared with a peak from a standard solution. The pesticide concentration was 1.4 ± 0.3 μ g g⁻¹. Subsequent analysis of the extract using HPLC-MS/MS (for conditions, see Section 2.2) with acquired ion signals using time-scheduled multiple-ion SIM mode was able to confirm the presence of this pesticide. Fig. 7 shows the chromatograms and the selected ion for monitoring (molecular ion m/z : 277) of a standard solution of fenitrothion at 2.5 μ g mL⁻¹

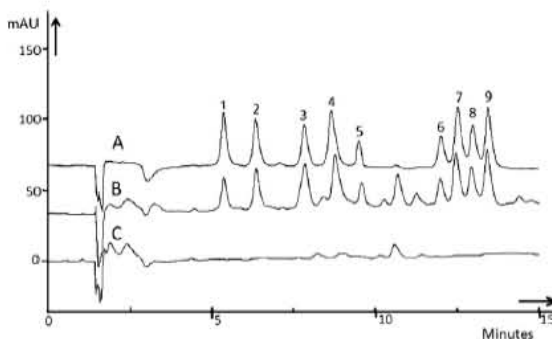


Fig. 4. Chromatograms obtained with the coupled on-line MSPD-SPE-HPLC/DAD method. Detection at $\lambda = 220$ nm. (A) Standard solution of OPPs (25 mg L⁻¹). (B) Healthy liver tissue spiked with a mixture of the tested OPPs (10 μ g g⁻¹). (C) Non-spiked healthy liver tissue sample. (1) Parathion-methyl, (2) fenitrothion, (3) parathion, (4) chlorfenvinphos, (5) diazinon, (6) ethion, (7) fenchlorphos, (8) chlorpyrifos, (9) carbophenothion.

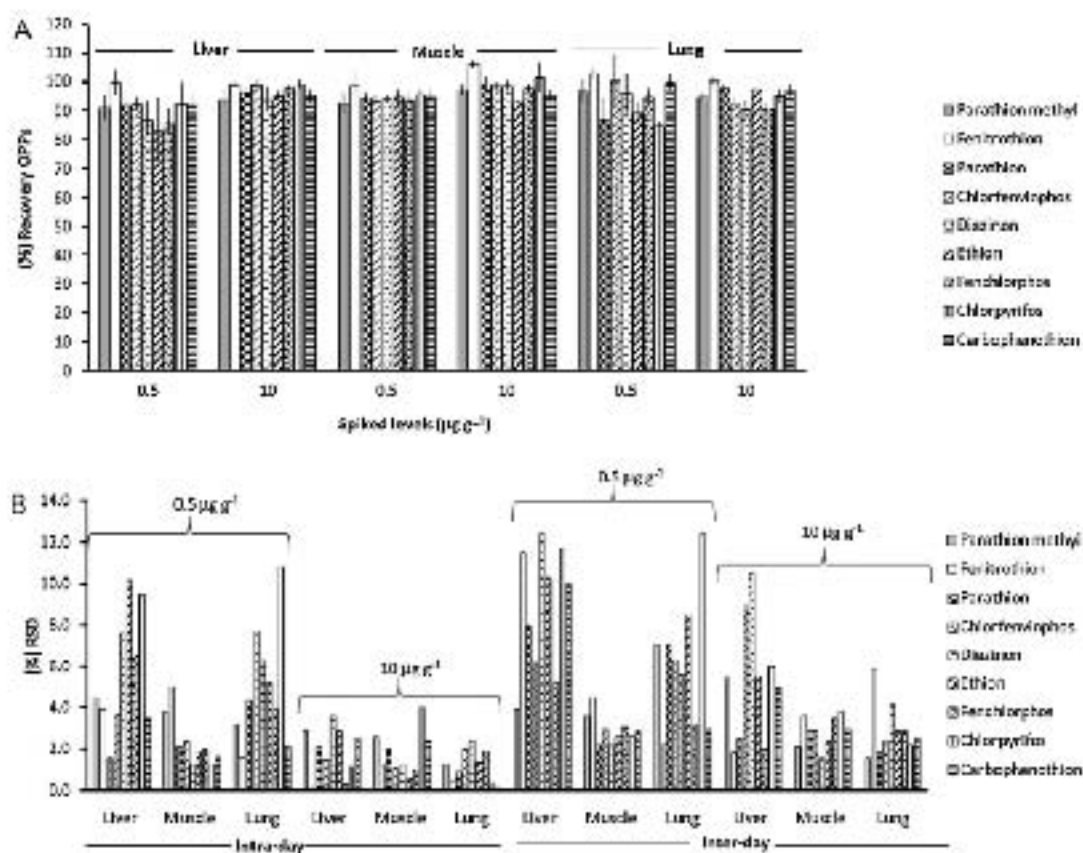


Fig. 5. Application of the MS/MS-SPS-MS/MS method with different levels spiked into for analysis levels. (A) Recovery and (B) precision.

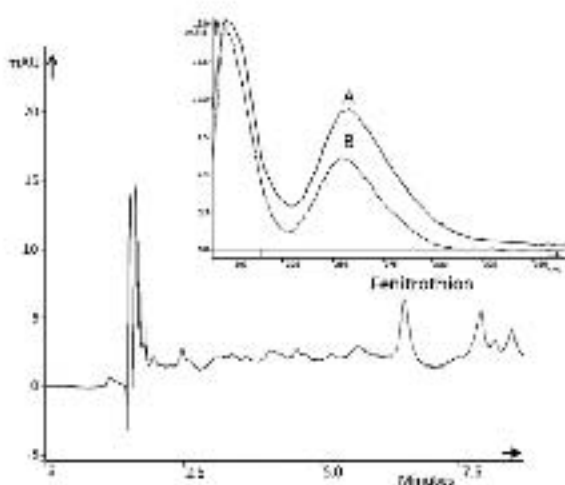


Fig. 6. Chromatogram of the extract from the unhealthy mouse liver tissue sample; wazmethion peak is shown. Detection at $\lambda = 263 \text{ nm}$; chromatographic conditions were described in Section 2.2. Comparison of UV spectra: (A) refers to the standard and (B) refers to the peak of sample.

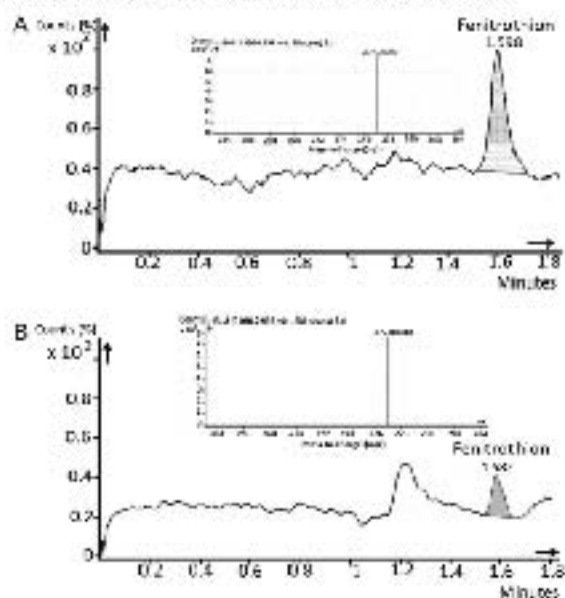


Fig. 7. Selected ion monitoring (SIM) MS/MS chromatograms: (A) Fenitrothion and (B) Fenrothion at 2.5 ng l^{-1} . (C) Fenrothion from the unhealthy mouse liver tissue sample. Chromatographic conditions were explained in Section 2.2.

(Fig. 7A) and the sample with the pesticide (Fig. 7B). Therefore, an unhealthy liver tissue sample analyzed by the proposed analytical method contained fenitrothion at a concentration above the MRL ($0.05 \mu\text{g g}^{-1}$) according to NOM-028-2004-1994, Mexico [35]. This result demonstrates that the analytical methodology is appropriate for food control and for veterinary research.

4. Conclusions

An analytical method using on-line coupled MSPD–SPE–HPLC/DAD was developed for the extraction and quantification of OPPs with different polarities in bovine liver tissue samples. This method is a good alternative to traditional techniques, because it is faster, it uses less solvent and sorbent, and the samples are analyzed without any manipulation, thereby minimizing the main source of errors. This study is the first report of a coupling between MSPD–SPE–HPLC/DAD in the literature in which the two extraction techniques MSPD and SPE are integrated in TPLC through a dynamic mixing chamber. The proposed method allows the extraction of OPPs from a very small amount of sample (50 mg) with good linearity (0.988 < r < 0.989), accuracy (recoveries from 91% to 101%), and precision (RSD% < 12). The limits of detection were between 0.04 and $0.25 \mu\text{g g}^{-1}$, which allows the monitoring of contaminated samples below permissible food levels and for veterinary research. Also, the method can be applied in different tissues without sacrificing its precision and accuracy. Fenitrothion was efficiently detected and quantified in an unhealthy liver sample at a concentration of $1.4 (\pm 0.3) \mu\text{g g}^{-1}$. Therefore, this method can be recommended for research when the amount of sample is limited and for laboratories that have ordinary chromatographic instrumentation.

Acknowledgements

This work was supported by La Dirección General de Asuntos del Personal Académico from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA–UNAM) Research Project PAPIIME P1202310. The authors would like to thank L. García and L. Rangel (Escuela de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México) for their cooperation in collecting samples. Also, the authors would like to thank J.M. Rodríguez and K. Rivas (Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México) for their technical assistance in liquid chromatography–mass spectrometry. The authors thank the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the doctoral scholarship (No. 223864) awarded for J.M. Gutiérrez-Valencia.

References

- [1] S.D. Pitt, T.D. Shand, C. Coats, J. Colquhoun, C. Scott, M. Erdem, *Toxicology* 247 (2008) 18.
- [2] S. Kulkarni, A. Ogawa, M. Uemura, S. H. Park, D. Datta, S. Ghose, S. Kulkarni, *Toxicology* 241 (2008) 187.
- [3] L. Wolden, G.P. Molinari, L.L. Murray, *Cancer Control* 13 (2006) 112.
- [4] H. Farkas, M. Székely, A. Újvári, A. Székely, M. Borsos, E. Indor, *Int. J. Appl. Chem.* 77 (2011) 1777.
- [5] K. Nakamura, H. Okano, S. Kuroki, T. Inoue, J. Wada, *J. Chromatogr. A* 1176 (2008) 2170.
- [6] F. Salm, R.J. Taylor, D. Roberts, J. De Sisto, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 288.
- [7] I. Martínez-Esteban, G. Revilla, M.S. Chaves, *J. Hazard. Waste* 168 (2009) 222.
- [8] E. Serrano, S. López, A. Ruiz, E. Rivera, E. Hernández, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 151.
- [9] G. Ryzhov, T. Gonen, F. Pined, P. Sider, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 57.
- [10] G.F. Peng, Y.C. Cao, J.J. Zhang, *Chin. J. Exp. Vet. Med.* 30 (10) (2006) 96–98.
- [11] A. García-Ferrás, P. Fernández, J.L. Martínez-Vidal, *J. Chromatogr. A* 1155 (2008) 124.
- [12] S. Wang, H. Ma, Y. Bai, Y. Zhang, H. Liu, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 261.
- [13] M.P. García de la Llera, M. Reyes, *Spain Food Chem.* 114 (2009) 1510.
- [14] M.P. García de la Llera, L. Guadalupe, L. Vera-Solís, *J. Environ. Sci. Heal. B* 45 (2010) 27.
- [15] T. Higashimura, M. Nakahara, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2004) 1982.
- [16] J. Chen, J. Ding, H. He, D. Song, H. Zhang, J. Li, K. Zhang, Y. Wang, H. Zhang, *Anal. Chem.* 82 (2010) 2207–2210.
- [17] K.J. Veenendaal, A.A. Gharabeh, T. Kumpkorn, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 2222.
- [18] M.P. Reyes, R.C. Probst, R. Soto, J.L. López, G.M. Rodríguez, *Chem. Abstr.* 2010 460 (2010) 140.
- [19] A. García-Ferrás, M.B. López de Castro, *J. Chromatogr. A* 988 (2003) 51.
- [20] F. Perzová, M. Křiváková, S. Křiváček, S.O. Hájek, L.L. Neudová, E.B. Těs, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2010) 1021.
- [21] X. Pang, R. Liu, M. Song, T.C. Chen, M. Tashiro, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (2001) 5293.
- [22] M. Fernández-Rodríguez, B. Fernández, A. Meléndez, M. Berge, G. Nda, R. Salazar, *J. Chromatogr. A* 955 (2002) 9.
- [23] E.M. Díaz-Huix, J.M. García, A. Vázquez, J. Villos, *J. Chromatogr. A* 1174 (2008) 147.
- [24] C. Chávez-Peña, P. Campa-Félix, M.C. Prieto-Basso, *Anal. Chem.* 82 (2010) 518.
- [25] M. Abadía-Holme, J. Ruiz-Jiménez, J.M. Mateo-Sanz, M.B. López de Castro, *J. Chromatogr. A* 1218 (2010) 1112.
- [26] K. Sato, K. Vojt, A. Hölzel, H. Kuroki, *J. Pharmaceut. Biomed. Sci.* (2010) 224.
- [27] A. López, A. Treviño, M. Castellano, E. Carrón, J. De Lasa, A. Toben, S. Viveros, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 229.
- [28] Y. Liu, C. Song, P. Dai, H. Zhang, H. Wang, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 508.
- [29] S. Balci, *J. Environ. Biophys. Methods* 10 (2007) 121.
- [30] A.L. Capriles, Ch. Treviño, E. Chavira, R. Gálvez, S. Gómez, A. Tassón, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2521.
- [31] T.M. Robinson, P.G.J. Fawcett, G.J. Swann, I. Rorer, R.L. Vetter, H.A.H. Bokman, *J. Chromatogr. A* 117 (2003) 277.
- [32] Y. Méndez-Núñez, R. Camacho-Pérez, C. Melina-López, L. Sepúlveda-Martínez, A. Escobedo-Cruz, *J. Chromatogr. A* 1218 (2010) 8741.
- [33] J.J. Rorer, M.J. González, I. Rorer, *J. Chromatogr. A* 1218 (2008) 7707.
- [34] A. García, G. Valdés, J. Melero, J. Salazar, K. Meléndez, P. Fajana, *Anal. Chem.* 75 (2003) 410.
- [35] Norma Oficial Mexicana NOM-028-2004-1994. Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en líquidos y sólidos de origen animal por métodos de extracción, derivatización y análisis por cromatografía de gases. México D.F., 18 de febrero 1994.
- [36] L. García-Pascual, *Quim.* 87 (1998) 1992.

ANEXO V

Constancia de asistencia a eventos

2011 Año Internacional de la Química
Química, nuestra vida, nuestro futuro

2011
Año Internacional de la Química

SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.
Presenta la presente

Constancia

A los señores MILIBES GUERRERO VALDEZ, DR. MARTHA PATRICIA GARCÍA GARCÍA
del trabajo Intitulado: APLICACION DE UN SISTEMA EN LINEA PARA EFECTUACIÓN PARA EL ANÁLISIS DE PLASMITAS CROMOSOMIALES EN TEJIDOS DE UTERO

que presentamos al marco de las actividades de desarrollo del
46º CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA
30º CONGRESO NACIONAL DE EDUCACIÓN QUÍMICA
Celebrados en Querétaro, Qro., del 19 al 24 de Septiembre, 2011

Ricardo Guzmán
Dr. Ricardo Guzmán
Presidente Nacional SQM

Martha Patricia García
Lic. Martha Patricia García
Presidenta de CQMQ

Disponible en la página:
http://www.cqmq.org.mx

1ST INTERNATIONAL CONGRESS ON INSTRUMENTATION AND APPLIED SCIENCES

CERTIFICATE OF PARTICIPATION

THE R E G I S T E R E D

THINK MIKUR COLLEGE, VILLASIRI AND MIKUR PRACTICE CENTER COUNCIL
attended the congress and presented the paper
Online coupling of Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) technique and Liquid Chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in biological tissues

at the 1st INTERNATIONAL CONGRESS ON INSTRUMENTATION AND APPLIED SCIENCES
HOLDING IN MEGHALAYA, INDIA, 2011

Dr. J. K. Choudhary
DR. J. K. CHOUDHARY
HONORARY CHAIR

Dr. Lejla Mujic
LEJLA MUJIC
CHAIR



SOCIEDAD QUÍMICA DE MÉXICO, A.C.

LE TIENE LA PRESENTE

Constancia

A LOS SEÑORES: AL EN C. TANIA MILENA GUTIÉRREZ VALENCIA, DGA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO

EL TÍTULO INTITULADO: MINATURIZACIÓN DE UN MÉTODO BASADO EN LA TÉCNICA DE DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA PARA LA EXTRACCIÓN DE PLAGUICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN HIGADO DE BOVINO

FOI PRESENTADO EN EL MARCO DE LAS ACTIVIDADES CIENTÍFICAS DEL
49º CONGRESO MEXICANO DE QUÍMICA
88º CONGRESO NACIONAL DE EDUCACIÓN QUÍMICA
CIUDAD DE PUERTO VALLARTA, JALISCO, DEL 25 AL 27 DE SEPTIEMBRE 2011

Estudio presento
C.A. P.S. BRO. E. RUFF. 1266 G
PRESIDENTE NACIONAL SQM

Antonia Campesano
C.A. P.S. BRO. E. RUFF. 1266 G
PRESIDENTE DE COORDINACIÓN

PRESIDENTE DE SESIÓN



COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



El Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas otorga la presente constancia de 1er lugar en la modalidad presentación oral con el premio
Dr. José Francisco Herrán Arellano a:

Gutiérrez Valencia Tania Milena

en la actividad académica "QuimiUNAM 2011"
Realizada a saber los días 26, 27 y 28 de noviembre de 2011
en el Auditorio "Alfonso Caso" de la Universidad Nacional Autónoma de México

"POR MI RAZA HABLA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria

Josefina de Gracia Martínez
Dra. Josefina de Gracia Martínez
COORDINADORA GENERAL DE POSGRADO