



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO DE MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN  
MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ORIGEN VEGETAL POR MEDIO DE  
EXTRACCIÓN POR ADSORBENTES**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO**

**PRESENTA**

**Carlos Enrique García Osorio**



**MÉXICO, D.F.**

**Año 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI  
**VOCAL:** Profesor: MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO  
**SECRETARIO:** Profesor: JUAN CARLOS HERNÁNDEZ CHACÓN  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: MINERVA MONROY BARRETO  
**2° SUPLENTE:** Profesor: CAROLINA FLORES ÁVILA

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Química Analítica. Laboratorio 208, Edificio F2, Facultad de Química, Circuito Interior Ciudad Universitaria

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Martha Patricia García Camacho \_\_\_\_\_

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera \_\_\_\_\_

### **SUSTENTANTE:**

Carlos Enrique García Osorio \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por darme la oportunidad de aprender y la formación académica adquirida.

Se agradece a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo y la beca otorgada en el proyecto PAPIIT IT203214.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT por el apoyo en el proyecto de Ciencia Básica 166389

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por sus conocimientos y asesoría para la realización de este trabajo.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias por la supervisión y asesoría brindada durante el desarrollo de la tesis

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones realizadas a este trabajo.

*Dedicado con mucho cariño a mis padres y a mis hermanos que forman parte muy importante en mi vida.*

*A mi madre: Gracias por tu cariño, apoyo y confianza en todo momento.*

*A mi padre: Gracias por tu esfuerzo en todos estos años para poder brindarme educación.*

*A mis hermanos: Luis y Gerardo con los que tengo una bonita amistad. Los quiero.*

*A todos mis compañeros del Laboratorio 208. Gracias por su amistad y por los momentos compartidos.*

## CONTENIDO

RESUMEN	15
I. Introducción	17
II. ANTECEDENTES	19
2.1. Microcontaminantes	19
2.2. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)	20
2.2.1. Estabilidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	20
2.2.2. Producción y usos	21
2.2.3. Métodos analíticos para la determinación de HAP's	22
2.3. Pesticidas o plaguicidas	23
2.3.1. Uso de plaguicidas en México	24
2.3.2. Clasificación de los plaguicidas	24
2.4. Glifosato	25
2.4.1. Características generales	25
2.4.2. Propiedades Físicoquímicas	25
2.4.3. Regulación y Toxicología	27
2.4.4. Métodos de análisis para la determinación de glifosato	27
2.4.5. Métodos cromatográficos	27
2.4.5.1. Cromatografía de gases (CG)	28
2.4.5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	28
2.5. Derivatización	29
2.5.1. Agentes comúnmente utilizados para la derivatización del glifosato	30
2.6. Suplementos alimenticios a base de microalgas	31
2.6.1. Alga <i>Spirulina plantesis</i>	32
2.6.2. Alga <i>Chlorella vulgaris</i>	33
2.7. Preparación de la muestra para la determinación de compuestos orgánicos en muestras complejas	34
2.7.1. Extracción en fase sólida (EFS)	34
2.7.2. Interacción analito – adsorbente en EFS	37
2.7.2.1. Interacciones apolares	37
2.7.2.2. Interacciones polares	38
2.7.2.3. Interacciones iónicas	38
2.7.2.4. Intercambio iónico	39
2.7.3. Selección de adsorbente	40
2.7.4. Dispersión de matriz en fase sólida	41
2.7.5. Factores que afectan el análisis en DMFS	42
2.7.5.1. La naturaleza del soporte sólido	42
2.7.5.2. Tamaño de partícula	43
2.7.5.3. Relación muestra/dispersante	43
2.7.5.4. La naturaleza de la muestra	43
2.7.5.5. Modificaciones de matriz	44
2.7.5.6. La naturaleza del solvente de elución y la secuencia de adición	44
2.7.6. Etapas de la DMFS	44

2.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)	45
2.8.1. Definiciones y parámetros cromatográficos	46
2.8.2. Tipos de cromatografía	49
III. OBJETIVOS	52
IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL	52
4.1 Materiales y reactivos	52
4.1.1 Estándares y disolventes	52
4.1.2 Reactivos	52
4.1.3 Sistema cromatográfico	52
4.1.4 Instrumentos, equipos y accesorios	53
4.1.5 Sistema de extracción	53
4.2 Optimización de los métodos de determinación	54
4.2.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos HAP's	56
4.2.1.1 Análisis cromatográfico y detección por CLAR -UV	56
4.2.1.2 Preparación de disoluciones estándar	56
4.2.1.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de detección y separación cromatográfica	56
4.2.1.4 Validación del sistema cromatográfico. CLAR-UV	57
4.2.1.4.1 Linealidad	57
4.2.1.4.2 Precisión	57
4.2.1.4.3 Límite de detección y cuantificación	57
4.2.1.5 Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción	58
4.2.1.5.1 Acondicionamiento del adsorbente (sílice C18)	58
4.2.1.5.2 Optimización del método de DMFS para la extracción de HAP's	58
4.2.1.5.3 DMFS con estándares	58
4.2.1.5.4 DMFS con muestra	59
4.2.1.6 Validación del método DMFS –CLAR- UV. Ensayos en microalga <i>Spirulina</i> .	61
4.2.1.6.1 Linealidad y exactitud del método	61
4.2.1.6.2 Precisión del método	61
4.2.1.6.3 Límites de detección y cuantificación del método	61
4.2.1.6.4 Porcentaje de recobro y selectividad del método	62
4.2.1.7 Robustez del método. DMFS en muestras de la microalga <i>Chlorella</i> alimenticias	62
4.2.1.7.1 Limpieza de extractos DMFS por medio de co-columna EFS	63
4.2.2 Glifosato	64
4.2.2.1 Análisis cromatográfico y detección por CLAR-UV y CLAR-Fluorescencia	64
4.2.2.2 Preparación de disoluciones	64
4.2.2.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de detección	64
4.2.2.4 Condiciones óptimas de detección UV	65
4.2.2.4.1 Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis del derivado de Glifosato	65
4.2.2.5 Validación del sistema CLAR-UV	66
4.2.2.5.1 Linealidad	66
4.2.2.5.2 Precisión	66
4.2.2.5.3 Límite de detección y cuantificación por UV	67
4.2.2.6 Validación del sistema CLAR-DF	67
4.2.2.6.1 Linealidad	67

4.2.2.6.2	Precisión	67
4.2.2.6.3	Límite de detección y cuantificación	68
4.2.2.7	Establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción por DMFS	68
4.2.2.7.1	Acondicionamiento de adsorbente amino para extracción por DMFS	68
4.2.2.7.2	Acondicionamiento de la Fase BONDESIL SAX- CI para “clean-up” por SPE	69
4.2.2.7.3	Evaluación de las condiciones de la elución del analito de los adsorbentes	69
4.2.2.8	Evaluación de la fuga y retención de los analitos de los adsorbentes	69
4.2.2.8.1	Optimización del método de DMFS del GLY con adsorbentes	70
4.2.2.8.2	Evaluación del proceso de limpieza por EFS con intercambiador SAX-CI	71
4.2.2.8.3	Optimización del método de DMFS del GLY con las tabletas de microalgas	71
4.2.2.8.4	Efecto de matriz en la extracción de glifosato con adsorbente amino	71
4.2.2.8.5	Uso de intercambiador SAX-CI para eliminar interferentes en la matriz	71
4.2.2.9	Validación del método DMFS-SAX-CLAR-UV. Ensayos con microalga <i>Spirulina</i> .	72
4.2.2.9.1	Linealidad y exactitud del método	72
4.2.2.9.2	Precisión del método	72
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	73
5.1	HAP's	73
5.1.1	Establecimiento de las condiciones de detección UV y separación cromatográfica	73
5.1.2	Condiciones óptimas para la detección.	73
5.1.3	Condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAP's	74
5.1.3.1	Linealidad del sistema CLAR-UV	77
5.1.3.2	Precisión, Límites de detección y cuantificación	77
5.1.4	Establecimiento de las condiciones óptimas de la extracción	78
5.1.4.1	DMFS con estándares	78
5.1.4.2	DMFS con muestra sin fortificar	82
5.1.4.3	DMFS con muestra fortificada	83
5.1.5	Validación del método de extracción por DMFS-CLAR-UV para HAP's en microalga <i>Spirulina</i>	84
5.1.5.1	Linealidad	84
5.1.5.2	Precisión del método	86
5.1.6	Robustez del método. DMFS en muestras de la microalga <i>Chlorella</i> alimenticias	86
5.1.6.1	Limpieza de extractos DMFS por medio de co-columna EFS	87
5.1.6.2	Detección de los HAP's en los extractos por fluorescencia	91
5.2	Glifosato	93
5.2.1	Análisis cromatográfico y detección por CLAR-UV y CLAR-Fluorescencia	93
5.2.2	Establecimiento de las condiciones óptimas de detección	93
5.2.3	Condiciones óptimas para detección UV.	93
5.2.4	Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis del derivado de Glifosato	94
5.2.5	Validación del sistema cromatográfico CLAR-UV	95
5.2.5.1	Linealidad del sistema CLAR-UV	95
5.2.5.2	Límite de detección y cuantificación	97
5.2.6	Validación del sistema CLAR-DF	97
5.2.6.1	Linealidad del sistema CLAR-DF	97
5.2.6.2	Límite de detección y cuantificación	98

5.2.7 Establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción por DMFS _____	98
5.2.7.1 DMFS de glifosato en fase amino _____	98
5.2.7.2 Lavado con agua _____	99
5.2.7.3 Elución de glifosato con buffer de fosfatos (pH=7, C= 5 mmol/L) _____	99
5.2.8 Retención en el intercambiador SAX-Cl _____	100
5.2.8.1 Evaluación del proceso de EFS con intercambiador SAX-Cl _____	101
5.2.9 Validación del método de extracción por DMFS-SAX-CLAR-UV para Glifosato en microalga <i>Spirulina</i> . _____	103
5.2.9.1 Ensayo detección por fluorescencia _____	104
5.3. Comparación de las dos estrategias de extracción y análisis para los compuestos estudiados _____	107
VI. CONCLUSIONES _____	108
VII. REFERENCIAS _____	110
ANEXO I _____	116
ANEXO II _____	119

## Índice de tablas

Tabla	Descripción	Página
1	Fuente y vías de ingreso de micro-contaminantes orgánicos	19
2	Propiedades de los principales Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos	21
3	Propiedades fisicoquímicas del glifosato	26
4	Determinación de glifosato en muestras de suelo por CLAR	29
5	Agentes derivatizantes utilizados para la derivación del compuesto glifosato	30
6	Composición química total de algunos alimentos y diferentes algas (% de materia seca)	33
7	Adsorbentes más comunes en EFS	36
8	Grupos comúnmente utilizados en adsorbentes para intercambio iónico	39
9	Clasificación de adsorbentes según su interacción con los analitos	40
10	Mezclas de metanol/agua utilizadas para evaluar la recuperación de los analitos por DMFS con sílice C18 fortificada	59
11	Secuencias de elución para eliminar coloración en los extractos de los HAP's provenientes de <i>Spirulina</i>	60
12	Concentraciones de fortificación con sus correspondientes concentraciones de los controles de recuperación de los extractos	62
13	Adsorbentes utilizados en la etapa de limpieza del extracto para el alga <i>Chlorella</i>	63
14	Condiciones para la reacción de derivación con Fmoc	64
15	Longitud de onda con mayor respuesta para los HAP's utilizados en los ensayos	73
16	Retención cromatográfica de los HAP's. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C <sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min <sup>-1</sup> · composición variable de metanol en cada ensayo	75
17	Precisión (a un nivel de concentración 1 mg L <sup>-1</sup> ), límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico CLAR-UV para los HAP's	78
18	Recobros de los analitos con mezclas de metanol: agua. Fortificación 10 µg/g de adsorbente C18. Cantidad de adsorbente utilizada 200 mg	79
19	Resumen de recobros globales de los analitos aplicando distintas mezclas de metanol/agua.	79
20	Recobros de los analitos con la secuencia de lavados de elución propuesta. Fortificación a 10 µg g <sup>-1</sup> . Cantidad de fase C-18 utilizada 0.2 g	81
21	Límites de detección y cuantificación para el método por DMFS con muestra	84
22	Concentraciones probadas de Fmoc-Cl en la derivación del glifosato a concentración de 100 µg/L	94
23	Parámetros de retención para el compuesto glifosato	94
24	<i>Límites de detección y cuantificación</i>	98
25	Elución del compuesto glifosato con fracciones de 2.5 mL de buffer de fosfatos pH=7; C= 5mmol/L	99
26	Elución del compuesto glifosato en el intercambiador SAX	101

## Índice de figuras

<b>Figura</b>	<b>Descripción</b>	<b>Página</b>
1	Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de glifosato	26
2	Reacción de derivación precolumna con FMOC-Cl	31
3	<i>Imagen microscópica de la Spirulina</i>	32
4	Alga Chlorella vista en microscopio	34
5	Esquema general de la EFS	36
6	Etapas generales de la extracción mediante DMFS	45
7	Descripción general de la metodología desarrollada	55
8	Cromatograma obtenido de una disolución estándar de una mezcla de los HAP's a una concentración de 5 µg /mL. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C <sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min <sup>-1</sup> , composición constante de 80 % metanol . Modificando la longitud de onda en el detector UV.	74
9	<i>Cromatograma obtenido de una disolución estándar de una mezcla de los HAP's a una concentración de 5 µg /mL. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición constante de 90 % metanol . Longitud de onda 243 nm. Detección UV.</i>	75
10	<i>Variación del factor de retención (k') de los tres HAP's analizados, en función del porcentaje de metanol en la fase móvil columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> . Flujo 1 mL.min<sup>-1</sup> concentración de cada analito 5 µg mL<sup>-1</sup></i>	76
11	Curva de calibración obtenida para los tres HAP's en el intervalo de concentraciones (0.25 – 3.5 µg mL <sup>-1</sup> )	77
12	<i>Frentes de elución de los HAP's con distintas proporciones de metanol. Correspondientes a las fracciones de 2.0 mL.</i>	81
13	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Spirulina sin fortificar. Cantidad de muestra 0.05 g cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición constante de 85 % metanol . Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Secuencia de limpieza 2</i>	83
14	<i>Cromatograma obtenido de extractos de espirulina fortificado a una concentración de 40 µg/g de muestra Cantidad de muestra 0.05 g cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición constante de 85 % metanol . Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Secuencia 2</i>	83
15	<i>Extracto obtenido para alga Spirulina fortificada con HAP's</i>	84
16	<i>Curva de la concentración fortificada vs respuesta obtenida para los tres analitos, en un intervalo de concentraciones 10-140 µg/g. Muestra alga Spirulina</i>	85
17	<i>Linealidad del método</i>	85
18	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Chlorella no fortificado y fortificado a una concentración de 40 µg/g de muestra Cantidad de muestra 0.05 g, cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS</i>	86

	<i>HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 <math>\mu</math>) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 85 % metanol . Longitud de onda 243 nm. Detección UV</i>	
19	<i>Cromatograma. Comparación de DMFS Chlorella sin fortificar vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con adsorbente LC-Si.</i>	87
20	<i>Cromatograma. Comparación de extracto DMFS Chlorella sin fortificar vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con adsorbente Florisil.</i>	88
21	<i>Cromatograma Comparación de DMFS Chlorella sin fortificar vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con 100 mg de adsorbente amino</i>	89
22	<i>Cromatograma. Comparación de DMFS Chlorella sin fortificar vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con 200 mg de adsorbente amino</i>	89
23	<i>Extracto de alga Chlorella. Obtenida después de la DMFS. Extracto pasado a través de la fase amino</i>	90
24	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Chlorella no fortificado, fortificado y aplicando la limpieza con adsorbente amino (200 mg) a una concentración de 40 <math>\mu</math>g/g de muestra Cantidad de muestra 0.05, cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 <math>\mu</math>) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 85 % metanol . Longitud de onda 243 nm. Detección UV.</i>	90
25	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Spirulina fortificado a una concentración de 0.4 <math>\mu</math>g/g de muestra Cantidad de muestra 0.05 g, cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 <math>\mu</math>) C18 fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 85 % metanol . Detección UV (negro) y detección por fluorescencia <math>\lambda_{ex}</math>= 263 <math>\lambda_{em}</math>=410 nm</i>	91
26	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Chlorella fortificado a una concentración de 0.4 <math>\mu</math>g/g de muestra para fluorescencia y 40 <math>\mu</math>g/g para UV Cantidad de muestra 50 mg, cantidad de fase C18 200 mg. Columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 <math>\mu</math>m) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 85 % metanol . Detección UV y detección por fluorescencia <math>\lambda_{ex}</math>= 263 <math>\lambda_{em}</math>=410 nm</i>	92
27	<i>Variación del factor del log del factor de retención (k') de glifosato en función del porcentaje de metanol en la fase móvil columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 <math>\mu</math>) C<sub>18</sub> . Flujo 1 mL.min<sup>-1</sup></i>	95
28	<i>Linealidad del compuesto glifosato en detección por fluorescencia</i>	96
29	<i>Cromatograma obtenido de la derivación de una disolución estándar de glifosato a una concentración de 10 <math>\mu</math>g /mL. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 <math>\mu</math>) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 20 % metanol pH= 6.4 . Detección UV <math>\lambda</math>=215 nm</i>	96

30	<i>Linealidad del derivado del glifosato en detección por UV</i>	97
31	<i>Comparación de la elución del glifosato por DMFS utilizando 250 y 500 mg de fase amino y elución con buffer fosfato pH=7</i>	100
32	<i>Extractos obtenidos para alga Spirulina. Izquierda: directamente después de la DMFS y derecha: después de DMFS más el SAX-CI</i>	101
33	<i>Cromatograma donde se realiza la comparación de extracto de alga Chlorella (nivel de fortificación 0.4 µg/g) después de la DMFS con adsorbente amino, el extracto DMFS y el extracto DMFS-SAX</i>	102
34	<i>Cromatograma donde se realiza la comparación de extracto de alga Spirulina después de la DMFS con adsorbente amino y el extracto final después de DMFS-SAX.</i>	102
35	<i>Curva de la concentración vs respuesta obtenida para Glifosato, en un intervalo de concentraciones 1 -10 mg/L. Muestra alga Spirulina</i>	103
36	<i>Cantidad de Glifosato recuperado en función de la cantidad de Glifosato adicionada la muestra de alga Spirulina</i>	104
37	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Espirulina fortificado a una concentración de 10 ng/mL compuesto glifosato Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición constante de 20 % metanol pH=6.4. Detección por fluorescencia λ<sub>ex</sub>= 256 λ<sub>em</sub>=318 nm Blanco (azul), extracto después de DMFS con adsorbente amino (rojo) y extracto después de usar el SAX</i>	105
38	<i>Cromatograma obtenido de extractos de Chlorella fortificado a una concentración de 10 ng/mL compuesto glifosato Columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición constante de 20 % metanol pH=6.4. Detección por fluorescencia λ<sub>ex</sub>= 256 λ<sub>em</sub>=318 nm Blanco, extracto después de DMFS con adsorbente amino y extracto después de usar el SAX</i>	105

<b>Lista de símbolos y abreviaturas</b>	
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>AMPA</b>	Ácido aminometilfosfónico
<b>B[a]A</b>	Benzo[a]Antraceno
<b>°C</b>	Grado Celsius
<b>C18</b>	Octadecilsilano
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>CLAR</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>COFEPRIS</b>	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
<b>C.V.</b>	Coefficiente de variación
<b>FL</b>	Fluorescencia
<b>DMFS</b>	Dispersión de la matriz en fase sólida
<b>ELL</b>	Extracción líquido-líquido
<b>USEPA</b>	Agencia de protección al Ambiente de los Estados Unidos
<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>FAO</b>	Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas, por sus siglas en inglés
<b>FM</b>	Fase Móvil
<b>FMOC-Cl</b>	9-fluoroenilmetilcloroformato
<b>HAP</b>	Hidrocarburo policíclico aromático
<b>k'</b>	Factor de capacidad
<b>K</b>	Constante de reparto
<b>K<sub>ow</sub></b>	Coefficiente de reparto octanol/agua
<b>LCM</b>	Límite de cuantificación del método
<b>LDM</b>	Límite de detección del método
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>mL</b>	Mililitro
<b>min</b>	minuto
<b>N</b>	Eficiencia, medida como número de platos teóricos
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud

<b>ppb</b>	Partes por billón
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>r<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinación
<b>SAX</b>	Intercambiador de aniones fuerte, por sus siglas en inglés
<b>t<sub>m</sub></b>	Tiempo muerto
<b>t<sub>r</sub></b>	Tiempo de retención
<b>USEPA</b>	Agencia de protección al ambiente de los Estados Unidos de América
<b>UV/Vis</b>	Ultravioleta/visible

## RESUMEN

En la mayoría de los métodos analíticos disponibles para la determinación de analitos orgánicos es necesario que éstos se encuentren en disolución. Por tanto, en el caso de muestras sólidas es necesario separar el analito de la matriz empleando un extractante. Por otro lado, las interacciones analito-matriz en este tipo de muestras son más fuertes que las que se establecen en el caso de matrices líquidas. Por ello, se suelen emplear condiciones de extracción más enérgicas, lo cual disminuye la selectividad de la extracción y, normalmente, hace necesaria la inclusión de etapas posteriores de purificación. Consumo reducido de disolventes, rapidez, sencillez, posibilidad de procesar simultáneamente varias muestras y bajo costo son atributos deseables a la hora de seleccionar una técnica de extracción.

De manera particular en este proyecto se desarrollaron metodologías analíticas para dos tipos de compuestos estudiados, los cuales presentan polaridades muy distintas. Para lo cual se utilizaron adsorbentes apropiados, en la que se empleó la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección UV, y algunas pruebas por detección por fluorescencia para la determinación y cuantificación por un lado del grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) (Antraceno, Pireno y Benz(a)antraceno) y por el otro lado al glifosato (pesticida) presentes en muestras de microalgas presentadas en tabletas como suplemento alimenticio.

En términos generales, el desarrollo de los métodos consistió en: 1) elección de los adsorbentes afines a los compuestos de interés 2) aislamiento de los analitos desde la matriz biológica, 3) Limpieza o "clean up" de los extractos y 4) análisis cromatográfico de los extractos obtenidos. La metodología para el caso de los HAP's se validó en el intervalo de concentraciones 10-140 µg/g, dando como valores de precisión expresado en términos de C.V. menores al 10%, además de una buena correlación entre las variables con valores de  $r^2 \geq 0.99$ ; mientras que los porcentajes de recuperación se encuentran en un intervalo de 78-82 % para los tres HAP's estudiados. En relación con el límite de cuantificación se obtuvieron valores de 5.6 µg/g. Mientras que para el caso del

glifosato la metodología se validó en el intervalo de concentraciones 0.4-4  $\mu\text{g/g}$ , dando como valores de precisión expresado en términos de C.V menores al 10%, además de una buena correlación entre las variables con valores de  $r^2 \geq 0.99$ ; mientras que el porcentaje de recuperación obtenido fue de 45%. Adicional a esto, para metodologías se aplicaron a otra especie de alga alimenticia pero con la realización adicional de un “clean up” para eliminar los interferentes provenientes de la matriz por medio de la técnica de extracción en fase sólida (EFS).

## I. Introducción

Los métodos analíticos tradicionales empleados para la determinación de microcontaminantes orgánicos en muestras de origen vegetal se llevan a cabo en procedimientos multi-etapas. Las técnicas de preparación de muestras tradicionales exigen cantidades de muestra de 2-100 g, así como volúmenes y cantidades considerables de disolventes y adsorbentes de alta pureza. Todo esto conlleva a un manejo de los extractos costoso en términos de tiempo y consumo de reactivos, además de que no siempre se dispone de grandes cantidades de muestra. La extracción en fase sólida (EFS), técnica de preparación de muestra que se basa en los mecanismos de separación de la cromatografía de líquidos, consiste en la transferencia del analito de una fase líquida a los sitios activos de una fase sólida (material adsorbente), la cual puede estar empacada en columnas, cartuchos o discos de extracción. La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), técnica derivada de la EFS, consiste en mezclar una muestra viscosa, sólida o semisólida con un material adsorbente previamente lavado y acondicionado. La fuerza manual que se aplica con un mortero y un pistilo permite el rompimiento completo de la arquitectura de la muestra y la presencia del adsorbente permite que los componentes de la muestra se dispersen y se disuelvan sobre toda la superficie con base a su polaridad relativa e interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas. Estas técnicas de extracción, que permiten desarrollar metodología analítica miniaturizada muy selectiva para el aislamiento de contaminantes orgánicos en muestras complejas como las vegetales, fueron usadas en el presente trabajo cuyo objetivo fue el optimizar métodos para el aislamiento de algunos contaminantes orgánicos (hidrocarburos aromáticos y pesticidas) que pueden encontrarse a niveles traza en microalgas (usadas como suplemento alimenticio) con aplicación a su búsqueda en control de calidad en alimentos. El análisis de los extractos se efectuó por cromatografía de líquidos de alta resolución y detección UV y de fluorescencia.

Se seleccionaron algunos representantes del grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), porque son contaminantes que se encuentran ampliamente dispersos en el ambiente, potencialmente mutagénicos y carcinogénicos con una alta toxicidad (antraceno, pireno y benzo(a)antraceno);

su carácter es hidrofóbico (log del coeficiente de reparto octanol-agua (Kow), entre 3 y 5) y los de más alto peso molecular llegan a tener hasta  $\log Kow > 5.5$  (IARC 2010). Por otro lado, se seleccionó al Glifosato, un compuesto completamente diferente en polaridad, es decir, un herbicida de carácter muy polar ( $\log Kow = -3.2$ ) (FAO 2010) y además zwitteriónico, con propiedades ácido-base y de uso muy expandido en el mundo y particularmente en nuestro país. Es bien conocido que el uso excesivo de los plaguicidas conlleva a graves problemas medio-ambientales, como la aparición de resistencia a las plagas. Adicional a esto el glifosato es un plaguicida que puede ser fácilmente absorbido por frutos y vegetales ricos en agua y concentrarse en la parte interna de los mismos, también dado su alta solubilidad en agua es común encontrarlo en los medios acuosos, de donde provienen las microalgas, constituyentes de las muestras trabajadas en esta tesis.

Las diferencias en polaridades de los dos tipos de compuestos estudiados dirigieron el desarrollo de los métodos de determinación por diferentes caminos o estrategias que serán descritas y discutidas en esta investigación que se efectuó dentro del dominio del análisis de microcontaminantes en la Química Analítica.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1. Microcontaminantes

Los microcontaminantes orgánicos son sustancias que a bajos niveles de concentración, pueden ejercer efectos sobre los organismos vivos y su medio, se agrupan bajo éste nombre genérico, debiendo fundamentalmente su peligrosidad a dos de sus principales características: persistencia en el medio y poder de acumulación alrededor de la cadena trófica (Cid et al. 1998)

Estos compuestos pueden ser productos químicos sintéticos, sustancias de origen antropogénico, plaguicidas, productos de desinfección, entre otros. En la tabla 1 se muestran ejemplos de estas sustancias, sus fuentes y vías de ingreso al ambiente.

Tabla 1. Fuente y vías de ingreso de micro-contaminantes orgánicos (Hollender et al., 2008).

<b>Fuente</b>	<b>Grupo de sustancias (ejemplos)</b>	<b>Vías de ingreso al ambiente</b>
<b>Asentamientos urbanos</b>	Productos de aseo personal, fármacos, detergentes, disruptores endócrinos, tintas, retardadores de flama, plaguicidas	Agua residual
<b>Agricultura</b>	Plaguicidas, insecticidas, herbicidas, fungicidas, fármacos para animales	Lixiviados
<b>Industria</b>	Polímeros, oxidantes, reductores, detergentes, tintes, barnices	Agua residual y lixiviados
<b>Tráfico</b>	Aceites de motor, lubricantes, productos de combustión completa e incompleta (HAP).	Lixiviados

## **2.2. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)**

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's) son compuestos orgánicos formados por tres o más anillos aromáticos condensados, en donde algunos átomos de carbono son comunes a dos o tres anillos. Esta estructura se denomina también sistema de anillos fusionados. Los anillos pueden estar en línea recta, angulados o racimados (Mastandrea et al. 2005). A los anillos aromáticos pueden unirse otros tipos de anillos como los de cinco átomos de carbono o los que contienen otros átomos (oxígeno, nitrógeno o azufre) en lugar de carbono. Estos últimos se conocen como heteroaromáticos o heterocíclicos.

Los HAP's pueden clasificarse en dos grupos con propiedades y efectos diferentes: los de bajo peso molecular, con dos o tres anillos aromáticos, son menos hidrofóbicos y presentan una alta toxicidad; los de alto peso molecular son fuertemente hidrofóbicos y potencialmente mutagénicos y carcinógenos (Vera et al. 2002). En la tabla 2 se muestran las características de los 16 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos considerados como contaminantes prioritarios por la EPA.

### **2.2.1. Estabilidad de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos**

Los sistemas conjugados de orbitales  $\pi$  de los HAP's son los responsables de su estabilidad química. Son sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad es pequeña. Dependiendo de su carácter aromático los HAP's absorben la luz ultravioleta y producen un espectro fluorescente característico. Son solubles en muchos disolventes orgánicos, y prácticamente insolubles en agua, esta propiedad esta relacionada con la masa molecular, cuanto mayor sea la solubilidad del HAP disminuye (Mastandrea et al. 2005).

Desde el punto de vista químico los HAP's reaccionan por sustitución del hidrógeno o por adición cuando se produce su saturación. Generalmente se conserva el sistema de anillos. La mayoría de los HAP's se fotooxidan, una reacción importante para eliminarlos de la atmósfera. La reacción de foto oxidación da lugar a la formación de endoperóxidos que pueden convertirse en quinonas.

Tabla 2. Propiedades de los principales Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (ATSDR 1995; IARC 2010)

Nombre (abreviaturas, en inglés)	Fórmula	P.M. g/mol	P.F. °C	P.E. °C	V <sup>M</sup> cm <sup>3</sup> /mol	F a 25 °C	P <sup>S</sup>	S g/mol	LogK <sub>ow</sub>	H
Naftaleno (NA)		128.19	80.5	218	148	0.2830	10.4	31	3.37	43.01
Acenaftileno (Ay)		152.20	95.0	270	—	—	0.89	—	—	—
Acenafteno (AE)		154.21	96.2	277	173	0.1980	0.30	3.8	4.00	12.17
Fluoreno (F)		166.20	116	295	188	0.1260	0.09	1.9	4.18	7.87
Fenantreno (PA)		178.20	101	339	199	0.1770	0.02	1.1	4.57	3.24
Antraceno (A)		178.20	216	340	197	0.0129	0.001	0.045	4.54	3.96
Pireno (P)		202.26	156	360	214	0.0506	0.0006	0.132	5.18	0.92
Fluoranteno (Fl)		202.26	111	375	217	0.1410	1.2 x 10 <sup>-3</sup>	0.26	5.22	1.03
Criseno (CH)		228.30	255	448	179	0.0053	5.3 x 10 <sup>-7</sup>	—	1.64	5.86
Benzo(a)antraceno (BaA)		228.30	160	435	248	0.0462	2.8 x 10 <sup>-6</sup>	0.0482	5.91	0.58
Benzo(b)fluoranteno (BbF)		252.32	168	481	268	0.0385	—	0.0015	5.80	—
Benzo(k)fluoranteno (BkF)		252.32	217	481	268	0.0126	5.2 x 10 <sup>-8</sup>	0.0008	6.00	0.016
Benzo(a)pireno (BaP)		252.32	175	495	263	0.0328	7 x 10 <sup>-7</sup>	0.0038	6.04	0.046
Benzo(ghi)perileno (BP)		276.34	277	525	277	0.0032	—	2.6 x 10 <sup>-4</sup>	6.50	0.075
Dibenz(a,h)antraceno (DA)		278.36	270	524	300	0.0040*	3.7 x 10 <sup>-10</sup>	0.0006	6.75	—
Indeno(1,2,3-cd)pireno (IP)		276.00	164	—	—	—	1.3 x 10 <sup>-8</sup>	5.3 x 10 <sup>-4</sup>	6.40	—

\* a 267 °C

P.M. = Peso molecular      V<sup>M</sup> = Volumen molar      S = Solubilidad  
P.F. = Punto de fusión      F = Proporción de fugacidad      Log K<sub>ow</sub> = Coeficiente de partición octanol/agua  
P.E. = Punto de ebullición      P<sup>S</sup> = Presión de vapor      H = Constante de la ley de Henry

## 2.2.2. Producción y usos

Los HAP's pueden encontrarse casi en todas partes, en el aire en la tierra y en al agua procedentes de fuentes naturales o antropogénicas. La contribución de las fuentes naturales es mínima si la comparamos con las emisiones causadas por el ser humano. La combustión de combustibles fósiles es la principal fuente de emisiones de HAP's. Otras emisiones proceden de la combustión de residuos y madera, así como los vertidos de petróleo crudo o refinado. Los

HAP's están también presentes en el humo del tabaco y en los alimentos a la parrilla, ahumados y fritos. (ATSDR 1995)

Los hidrocarburos poliarilos se utilizan principalmente en la fabricación de colorantes y en síntesis química. El antraceno se utiliza en la fabricación de antraquinona, una importante materia prima para la fabricación de colorantes. Se emplea también como diluyente para conservantes de la madera y en la producción de fibras sintéticas, plásticos y monocristales.

El pireno está presente en el alquitrán mineral, el humo del tabaco y los HAP's atmosféricos. El pireno no tiene actividad cancerígena, pero sus derivados benzo(a) y dibenzo son cancerígenos muy potentes. En el aire exterior se han medido concentraciones de benzo(a) pireno (BaP) de 0,1 ng/m<sup>3</sup> o menores en zonas no contaminadas y valores hasta varios miles de veces superiores en atmósferas urbanas contaminadas. El BaP se encuentra en asfaltos, alquitrán de hulla, alquitrán de madera, gases de escape de los automóviles, humo del tabaco, aceites minerales, aceites de motor usados y aceites usados de equipos eléctricos. El BaP y muchos de sus derivados alquilados son carcinógenos muy potentes.

### **2.2.3. Métodos analíticos para la determinación de HAP's**

Los HAP's comúnmente se encuentran presentes como mezclas de isómeros, por lo que es necesario contar con métodos analíticos altamente sensibles y selectivos. La determinación de HAP's generalmente se lleva a cabo por técnicas cromatográficas incluidas la Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM) y CLAR con detector de UV o fluorimétrico. Dado que los diferentes HAP's poseen fluorescencia nativa, los métodos por CLAR con detección fluorométrica brindan una elevada respuesta, empleando pequeños volúmenes de muestra (Jongeneelen 1997; Baumard et al. 1997; Kuusimäki et al. 2004; Yeakub & Cole 2001) .

El análisis de HAP's en muestras biológicas es particularmente complicado debido a la baja concentración en la que se encuentran en este tipo de matrices (ng/g) y por otro lado la gran cantidad de lípidos disueltos en el mismo solvente que los HAP's representan la principal interferencia en el análisis (Yeakub & Cole 2001).

Los procedimientos analíticos recomendados para la determinación de HAP's en muestras ambientales son propuestos por diversas organizaciones entre ellas la Agencia de Protección al Ambiente de los Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), en su método 550 describe la determinación de HAP's en muestras de agua potable por extracción líquido-líquido (ELL) con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y separación por CLAR con detección acoplada de UV y fluorescencia. El método 525 describe la determinación de compuestos orgánicos en muestras de agua potable por extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) con C18 como adsorbente,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como eluyente y detección por CG/EM (Hodgeson 1990).

### **2.3. Pesticidas o plaguicidas**

La Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen el término pesticida, denominado también plaguicida, como cualquier sustancia o mezcla de ellas utilizada para prevenir o controlar cualquier especie de planta o animal indeseable, incluyendo las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores de crecimiento de las plantas, o como defoliantes o desecantes, durante la producción, almacenaje, transporte, comercialización o procesado de los alimentos para el hombre o los animales. Mientras que la USEPA define a los plaguicidas como sustancias o mezclas de sustancias que se destinan a controlar plagas, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causan perjuicio o que interfieren con la producción agropecuaria y forestal.

El análisis de plaguicidas en muestras biológicas, de origen animal o vegetal, es una tarea difícil, debido a la complejidad de la matriz y la baja concentración a las que estos compuestos se encuentran presentes de manera general. Por lo tanto, a pesar de los avances en el desarrollo de instrumentación analítica altamente eficiente para su determinación, el pre-tratamiento de la muestra sigue siendo una importante parte de la obtención de resultados cuantitativos precisos (Kumar et al. 2010).

### **2.3.1. Uso de plaguicidas en México**

En México la superficie agrícola varía entre 20 y 25 millones de hectáreas (Hernández & Hansen 2011). Se utilizan plaguicidas para el control de plagas y enfermedades que afectan la producción agrícola. En 2006 el consumo de plaguicidas en México fue de 95,025 toneladas (USEPA 2007). Estas sustancias representan un riesgo para la salud humana y el ambiente debido a que pueden contaminar suelos, agua, sedimentos y aire. Los plaguicidas llegan a cuerpos de agua por escurrimiento, infiltración y erosión de los suelos, en lugares donde se han aplicado. También pueden movilizarse por transporte tanto atmosférico como por escurrimiento durante lluvias o riego agrícola y, de esta manera, transportarse hacia cuerpos de agua, tanto superficiales como subterráneos hasta contaminar agua y sedimentos.

### **2.3.2 Clasificación de los plaguicidas**

Existen diversos criterios para la clasificación de plaguicidas. El más importante desde el punto de vista analítico consiste en clasificarlos según su composición química, de modo que se pueden dividir en:

- Plaguicidas inorgánicos, en donde se incluyen compuestos de arsénico, flúor y azufre.
- Plaguicidas orgánicos de origen natural, como son la nicotina, piretrinas o cinerinas.
- Plaguicidas orgánicos de síntesis, que son la gran mayoría de los compuestos utilizados actualmente.

En este último grupo y dependiendo de su composición química, se encuentran compuestos como: organoclorados, organofosforados (entre los que se encuentra el glifosato), N-metil carbamatos, ditiocarbamatos, dinitrofenoles, triazinas, derivados del benzimidazol, fenil ureas, tioéteres, piretroides, etc (Hernández y Beltrán 1995).

## **2.4. Glifosato**

Es el herbicida más usado en el mundo (Baylis 2000) ya que está considerado como relativamente “sano” debido a su rápida degradación en suelos (Quinn et al. 1988). Se emplea también como desecante en sorgo, madurante de caña de azúcar y para renovación de praderas. Con fines no agrícolas, se usa para limpieza de zonas industriales, de estacionamiento y almacenamiento, parques y jardines.

### **2.4.1. Características generales**

El glifosato es una sal isopropilamina de N-(fosfometil) glicina, el cual es un herbicida no selectivo, sistémico de acción foliar, es decir, que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado. Se degrada a ácido aminometilfosfónico (AMPA), principal producto de degradación en agua, plantas y suelos (Jan et al. 2009). El mecanismo de acción del glifosato es por medio de la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil- shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteína y el desarrollo de la misma. El descontrol en la catálisis por la enzima EPSPS en el penúltimo paso en la vía del shikimato, reduce también la biosíntesis de otros compuestos tales como tetrahidrofolato, ubiquinona y vitamina K (COFEPRIS 2016; Ramírez-Duarte et al. 2007).

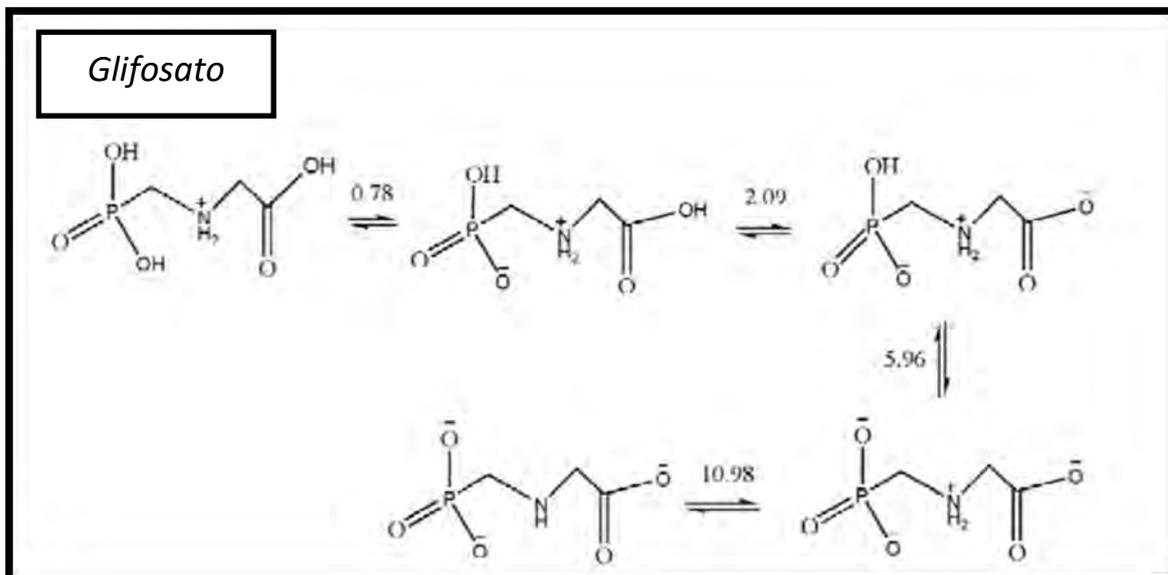
### **2.4.2. Propiedades Fisicoquímicas**

Las propiedades fisicoquímicas del glifosato se observan en la tabla 3, como principales características se puede mencionar que es muy polar, ya que el logaritmo de su coeficiente octanol/agua ( $K_{ow}$ ) tiene un valor negativo. Es muy soluble en agua y posee propiedades ácido-base como se representa en la Figura 1 (You & Koropchak 2003). También presenta a lo largo de la escala de pH diferentes cargas debido a que se trata de un compuesto zwitteriónico.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del glifosato

<b>Fórmula Molecular</b>	<b>C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub>P</b>
<b>Tipo de compuesto</b>	Zwiterión
<b>Peso Molecular</b>	169.1 g mol <sup>-1</sup>
<b>Forma</b>	Cristales incoloros
<b>Punto de fusión</b>	200 °C
<b>Densidad</b>	0.5 g cm <sup>-3</sup>
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	-3.2 a 25 °C (FAO, 2010)
<b>Solubilidad en agua</b>	12 g L <sup>-1</sup>
<b>Estabilidad</b>	Se mantiene estable hasta 60°C. Es estable a la luz
<b>pka's</b>	0.78, 2.29, 5.96, 10.98 (Hogendoorn et al. 1999)

La dificultad para establecer métodos sencillos para la extracción y determinación del Glifosato a nivel de trazas está relacionada con sus propiedades como son su naturaleza polar, es una molécula pequeña, muy soluble en agua, insoluble en disolventes orgánicos y su baja volatilidad (Islas et al. 2014).



**Figura 1.** Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de glifosato (You & Koropchak 2003)

El glifosato es un ácido débil que tiene cuatro constantes de acidez, para el grupo fosfónico (pka<sub>1</sub>, pKa<sub>3</sub>), amino (pka<sub>4</sub>) y carboxilo (pka<sub>2</sub>) (Hogendoorn et al. 1999).

### **2.4.3.Regulación y Toxicología (Salazar & Aldana 2011)**

En el aspecto regulatorio la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) considera al glifosato como de toxicidad clase II, toxicidad aguda dérmica y oral relativamente baja (los compuestos químicos de clase I, son los de mayor toxicidad en la escala de I a IV). En el marco regulatorio mexicano COFEPRIS en el Catálogo de Plaguicidas (2009), consideran al glifosato como un herbicida grado IV de toxicidad (ligeramente tóxico), con  $DL_{50}$  (oral en ratas) mayor a  $5000 \text{ mg Kg}^{-1}$ , ingesta diaria admisible (IDA) de  $0.3 \text{ mg Kg}^{-1}$  y límite máximo residual (LMR) en maíz y frijol, de  $0.1$  y  $0.2 \text{ mg Kg}^{-1}$  respectivamente. En efectos a la salud por exposición aguda lo clasifica como ligeramente irritante de vías dérmica y oral, e irritante severo de los ojos. Mientras que en exposición crónica no se han encontrado efectos en la salud en los estudios realizados en animales.

### **2.4.4. Métodos de análisis para la determinación de glifosato**

La importancia ambiental y agronómica del glifosato, ha generado la necesidad de desarrollar metodologías analíticas, capaces de detectar y cuantificar al analito a diferentes niveles de concentración. Los sistemas que se han propuesto aportan una serie de ventajas e inconvenientes para su determinación en diferentes matrices. Las metodologías que más se mencionan para el análisis de este compuesto son las técnicas de separación instrumentales como electroforesis capilar, cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución.

### **2.4.5. Métodos cromatográficos**

Las técnicas cromatográficas son las más utilizadas para la determinación de este herbicida, sin embargo se requiere utilizar reacciones de derivatización ya que este tipo de compuestos no son volátiles y no presentan grupos cromóforos o fluoróforos en su estructura (Sahasrabuddhey et al. 1999; Qian et al. 2009) que permitan su detección con los métodos convencionales. A continuación se mencionan algunos ejemplos representativos de estas técnicas.

#### **2.4.5.1. Cromatografía de gases (CG)**

El análisis por CG requiere obligatoriamente de reacciones de derivatización para la preparación de derivados volátiles y estables, que se puedan detectar con sensibilidad y selectividad elevadas. Los reactivos que más se utilizan para la derivatización son los siguientes: anhídrido trifluoroacético (TFAA)-diazometano (Seiber et al. 1984), ácido acético-ortoacetato de trimetilo (TMOA)(TSUJI et al. 1997) isopropilclorofornato- diazometano (Kataoka et al. 1996).

Los procedimientos de derivatización con anhídridos tienen el inconveniente de que la reacción es exotérmica. La adición del reactivo se lleva a cabo a temperaturas de -50 a -60 °C, que se logran con corrientes de N<sub>2</sub>. Por otra parte, los tiempos requeridos para realizar estas reacciones son muy extensos ya que, también se debe considerar el tiempo necesario para que la mezcla de reacción alcance la temperatura ambiente.

#### **2.4.5.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)**

La naturaleza zwitteriónica y polar de los analitos hace que la CLAR o HPLC (por sus siglas en inglés) sea una técnica de análisis adecuada. La derivatización en cromatografía de líquidos es necesaria para aumentar la sensibilidad analítica de los analitos. Los sistemas de detección más utilizados en cromatografía de líquidos son UV-Vis y fluorescencia.

La absorción UV-Vis proporciona una sensibilidad adecuada, tiene un intervalo lineal amplio, es compatible con la elución en gradiente, no es sensible a los cambios de temperatura y es relativamente económica, sin embargo una de sus limitaciones es que no permite obtener información estructural y está sujeta a múltiples interferencias, lo que hace necesaria una etapa previa de limpieza de muestras o bien, una derivatización de los compuestos (Hogendoorn et al. 2001).

La detección mediante espectroscopia de fluorescencia es una de las estrategias más aplicadas en el análisis cromatográfico de glifosato debido a su elevada sensibilidad y selectividad, en comparación con la detección por absorción en UV-Vis. El glifosato y su producto de degradación se pueden transformar en compuestos fluorescentes por derivatización.

Las condiciones para el análisis por CLAR para glifosato, en muestras de suelo, se presentan en la Tabla 4 donde se reportan las características principales de los métodos más comunes que aparecen en la literatura.

Tabla 4. Determinación de glifosato en muestras de suelo por CLAR

Detector	Condiciones	Derivatizante	Límites de detección	Referencia
FL ( $\lambda_{ex}$ =254 nm, $\lambda_{em}$ =313 nm)	Columna: NH <sub>2</sub> FM: 0.01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 5.4- ACN (15:85, v/v)	FMOC-Cl (9- fluoroenilmetilcloroform ato)	5 mg kg <sup>-1</sup> para glifosato	(Glass 1983)
UV (405 nm)	Columna: C18 FM: 0.02 M bromuro de tetraetilamonio, 0.05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 3.2-ACN (5:1) por 7 min-(1:5) en 8 min	DNP (1-fluoro-2,4- dinitrobenzeno)	0.05 mg kg <sup>-1</sup> glifosato	(Lundgren 1986)
FL ( $\lambda_{ex}$ =270nm, $\lambda_{em}$ 315 nm)	Columna: NH <sub>2</sub> FM: 0.05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6.0- ACN (75:25, v/v)	FMOC-Cl (9- fluoroenilmetilcloroform ato)	0.5 mg kg <sup>-1</sup> glifosato	(Miles & Moye 1988)
UV (240 nm)	Columna: C18 FM: Fosfatos 0.02M, pH 2.3- ACN (85:15, v/v)	TsCl (Cloruro <i>p</i> - toluensulfonilo)	10 µg g <sup>-1</sup> glifosato	(Khrolenko & Wieczorek 2005)
UV (217 nm)	Columna:C18 ZORBAX FM: 1% ácido acético, pH 2.5 MeOH (40:60 v/v)	1,2-naftoquinona-4- sulfonato (NQS)	0.064 mg kg <sup>-1</sup> glifosato	(Islas et al. 2014)

## 2.5. Derivatización

La derivación o derivatización es una operación orientada hacia la transformación de los analitos en otras especies más compatibles con la técnica de determinación, o que presenten mejores características para su detección (Canosa Rodríguez 2008). En el caso de usar técnicas cromatográficas en la etapa de determinación, los objetivos concretos de los procesos de derivación son:

- Mejorar la estabilidad térmica de los analitos
- Mejorar la resolución cromatográfica entre picos

- Modificar indirectamente la sensibilidad del detector, introduciendo en las moléculas grupos orgánicos adecuados que incrementen su respuesta

La derivación en medio homogéneo es aquella en la cual el agente derivatizante se adiciona directamente al medio o disolvente que contiene el analito. Según la forma experimental de llevar a cabo el proceso, se clasifican en:

Derivación discontinua u off-line (pre-columna): La derivación se realiza previamente a la introducción de los analitos en el sistema cromatográfico.

Derivación en continuo u on-line (post-columna): La derivatización se realiza en el propio sistema cromatográfico.

### 2.5.1. Agentes comúnmente utilizados para la derivatización del glifosato

En CG la derivación se utiliza para mejorar la volatilidad o para cambiar la polaridad de los analitos. En CLAR la derivación se utiliza para la introducción de un compuesto cromóforo para detección por UV o un compuesto fluorescente para su detección por fluorescencia y, en el caso de compuestos polares, para mejorar sus características de retención. El proceso de derivación puede realizarse de dos formas pre-columna y post-columna. Se dan algunos ejemplos en la tabla 5.

Tabla 5. Agentes derivatizantes utilizados para la derivación del compuesto glifosato

Derivación	Reactivo	Referencia
<b>Pre –columna</b>	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (DNP)	(Lundgren 1986)
	9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC-Cl)	(Miles & Moye 1988)
	Cloruro <i>p</i> -toluenosulfonilo (TsCl)	(Kawai et al. 1991)
	4-metoxibencenosulfonil fluoruro (MOBS-F)	(Sun et al. 2010)
	1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS)	(Islas et al. 2014)
<b>Post-columna</b>	<i>o</i> -ftalaldehído -mercaptoetanol (OPA-MER)	(Sundaram & Curry 1997)
	4-cloro-7-nitrobenzofurano (NBC-Cl)	(Durán Merás et al. 2005)
	2,2-dihidroxi-1,3-indanodiona (ninhidrina)	(Bhaskara & Nagaraja 2006)
	4-cloro-3,5-dinitrobenzotrifluoruro (CNBF)	(Qian et al. 2009)

Debido a los inconvenientes post-columna, el método pre-columna resulta una mejor alternativa debido a que es simple y menos costoso. En este trabajo se realiza la derivación con FMOC-Cl que es un reactivo que se usa tanto con

aminas primarias como secundarias. Debido a que el glifosato es una molécula zwitteriónica, la formación de su respectivo derivado, por reacción del grupo amino y al ácido cloruro, conlleva la formación de derivados fluorescentes aniónicos (figura 2), que se pueden separar por medio de CLAR en columnas empacadas con sílice y grupos amino enlazados a temperatura controlada (30 °C).

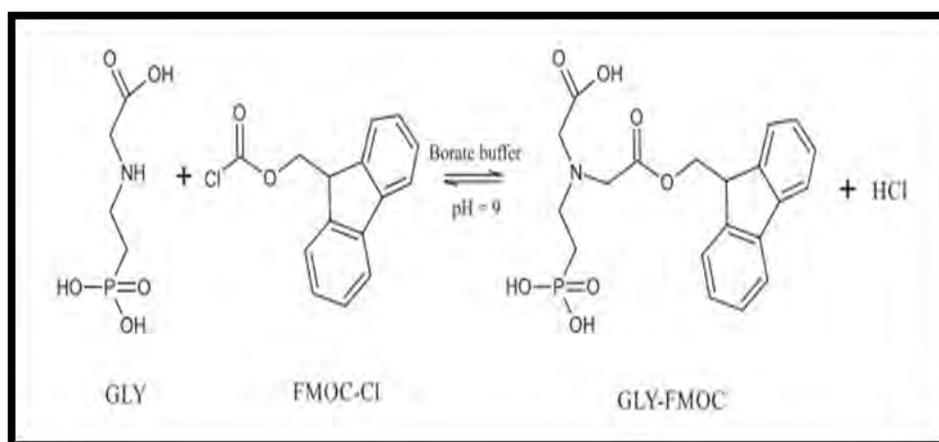


Figura 2. Reacción de derivación pre-columna con FMOC-Cl (Catrinck et al. 2014).

## 2.6 Suplementos alimenticios a base de microalgas

Las enfermedades que amenazan la vida de la población y el aumento de esta, son las principales preocupaciones del mundo actualmente. Para satisfacer la demanda nutricional de la población en aumento, los investigadores están buscando fuentes alternativas usando alimentos que sean fáciles de cultivar. El cultivo de algas es ventajoso sobre otros cultivos de plantas ya que requiere menos agua. Por otra parte, las algas pueden cultivarse utilizando los recursos de aguas salobres o marinas. Las algas son fuente de muchos nutrientes esenciales. Son un grupo diverso de organismos autótrofos que van desde unicelulares a formas multicelulares. Algunos tipos de algas son reconocidas como alimentos balanceados que ofrecen cantidad suficiente de proteínas, carbohidratos, vitaminas y minerales para el funcionamiento normal del cuerpo humano. Las algas verdes azules, algas rojas y las algas verdes tienen un mayor contenido de fibra dietética.

Se han utilizado como alimento y medicina durante muchos siglos debido a su acción antioxidante, anticancerígeno y propiedades antimicrobianas (Kay

1991). Los extractos de algas se utilizan como suplementos en muchos alimentos, productos lácteos, y la industria farmacéutica.

### **2.6.1. Alga *Spirulina plantesis***

*Spirulina plantesis* es un organismo considerado como cianobacteria y anteriormente se le incluía en las microalgas azul-verdes de la división *Cyanophyceae*. Se trata de una formación multicelular microscópica filamentosa colonial de aspecto helicoidal de tamaño entre 200 y 250 micras de largo.

Se ha reportado que *Spirulina plantesis*. (Figura 3) hace más eficiente la conversión del alimento que se ha ingerido ; al mejorar la flora intestinal, la cual desintegra compuestos no digeribles o de difícil digestión que contengan los alimentos; la misma flora bacteriana produce vitaminas y desplaza a bacterias dañinas o peligrosas dentro del intestino del organismo. *Spirulina plantesis* estimula la producción de enzimas que transportan a las grasas por el cuerpo, así el animal puede utilizar la grasa como energía para el crecimiento en lugar de que se acumule y se vuelva flácido (Iwata et al. 1990).



Figura 3. Imagen microscópica de la *Spirulina*  
<http://www.conacytprensa.mx/index.php/ciencia/mundo>

### 2.6.2 Alga *Chlorella vulgaris*

*Chlorella vulgaris* pertenece al reino eucariota de la división *Chlorophyta* o algas verdes, de la especie *vulgaris*. Es un alga verde unicelular, de agua dulce, de forma esférica como se muestra en la figura 4 , de aproximadamente 2 a 10 µm de diámetro (Mayo 2013).

El alga *Chlorella* está siendo investigada como un nuevo recurso alimenticio (ya que una célula de *Chlorella* contiene cerca de 50% de proteínas, 5% de clorofila y un gran número de vitaminas y carotenos) para utilizarse en las poblaciones humanas pobres de todo el mundo y para proveer alimento y oxígeno en submarinos (Lee 2008). Según se ha documentado, posee beneficios terapéuticos, como la capacidad de desintoxicar al organismo de metales pesados como el Hg, el Cd y el Pb entre otras especies químicas, que son contaminantes agregados a insecticidas o plásticos. En la tabla 6 se muestra la composición química total de diferentes algas y de algunos alimentos que se consumen regularmente (Becker 1994).

Tabla 6. Composición química total de algunos alimentos y diferentes algas (% de materia seca) (Becker 1994)

Producto	Proteínas	Carbohidratos	Lípidos	Ácidos Nucleicos
Leche	26	38	28	-
Huevo de Gallina	47	4	41	-
Pan	39	38	1	-
Carne	43	1	1	-
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22	4-5
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2	-
<i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7	3-4.5
<i>Spirulina Platensis</i>	46-63	8-14	4-9	2-5
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	50-56	8-18	16-40	-

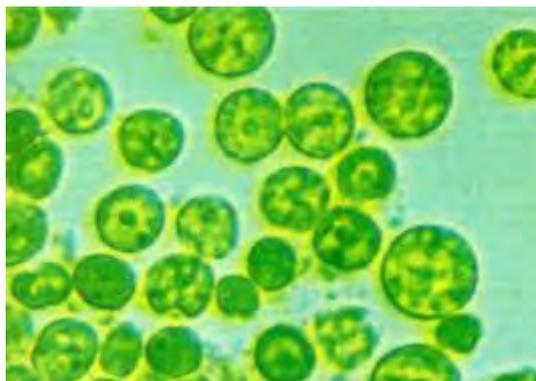


Figura 4. Alga *Chlorella* vista en microscopio (<http://artigoo.com/las-propiedades-del-alga-chlorella>)

### **2.7. Preparación de la muestra para la determinación de compuestos orgánicos en muestras complejas**

Generalmente la determinación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales y biológicas no se puede realizar de forma directa en la muestra sino que son necesarias una serie de etapas previas que constituyen el proceso analítico.

La preparación de muestra se define como el proceso de transformación de una muestra en una forma adecuada para su análisis. Este proceso puede incluir la extracción de un analito de una matriz compleja, la preconcentración de analitos muy diluidos para obtener una concentración suficiente para ser medida, la eliminación o enmascaramiento de especies interferentes, o la transformación del analito en una forma que sea más fácilmente detectable. Dentro de las técnicas de extracción más utilizadas para el aislamiento de trazas de compuestos orgánicos se encuentran las que se basan en adsorbentes, dos de las cuales se usaron en este trabajo y se describirán a continuación

#### **2.7.1. Extracción en fase sólida (EFS)**

La Extracción en Fase Sólida (EFS) o SPE (por sus siglas en inglés) se desarrolló a mediados de los años 70 como alternativa a la técnica de extracción líquido-líquido (ELL). Hoy es una de las técnicas de extracción más ampliamente utilizadas en el caso de matrices líquidas o incluso gaseosas. Gracias a la EFS se consigue concentrar y/o purificar los analitos mediante su

retención en una fase sólida o una fase líquida inmovilizada sobre un soporte sólido para a continuación proceder a su elución con un disolvente adecuado (Canosa Rodríguez 2008). Se basa en la partición selectiva o distribución de uno o más compuestos entre dos fases. La primera es un sólido adsorbente; la segunda suele ser un líquido pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico.

Entre las múltiples ventajas que presenta destacan las siguientes:

- Baja manipulación de la muestra
- Alto poder de concentración
- Obtención de extractos purificados con altas recuperaciones
- Menor consumo de disolventes en comparación con ELL
- Ausencia de emulsiones
- Posibilidad de automatización
- Versatilidad en el tipo de adsorbentes utilizados

El proceso de EFS en la muestra consta de las siguientes etapas básicas (Figura 5):

1. Acondicionamiento de la fase estacionaria. Se hace pasar a través del cartucho un disolvente o mezcla de disolventes adecuados, eliminando así las impurezas, hidratando la fase estacionaria y facilitando la transferencia de materia con la muestra.
2. Paso de la muestra a través del material adsorbente. El objetivo de esta etapa es retener cuantitativamente el analito, consiguiendo además un cierto grado de selectividad.
3. Lavado. Se utilizan disolventes con gran afinidad por las interferencias.
4. Elución. Con un disolvente apropiado se recupera el analito de la fase adsorbente. Por lo general se utiliza un pequeño volumen de disolvente orgánico, aunque también puede realizarse una desorción térmica.

Las fases adsorbentes en EFS (Tabla 7) son similares a las empleadas en cromatografía de líquidos. Las más comunes son las sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno-divinilbenceno, carbón grafitizado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio.

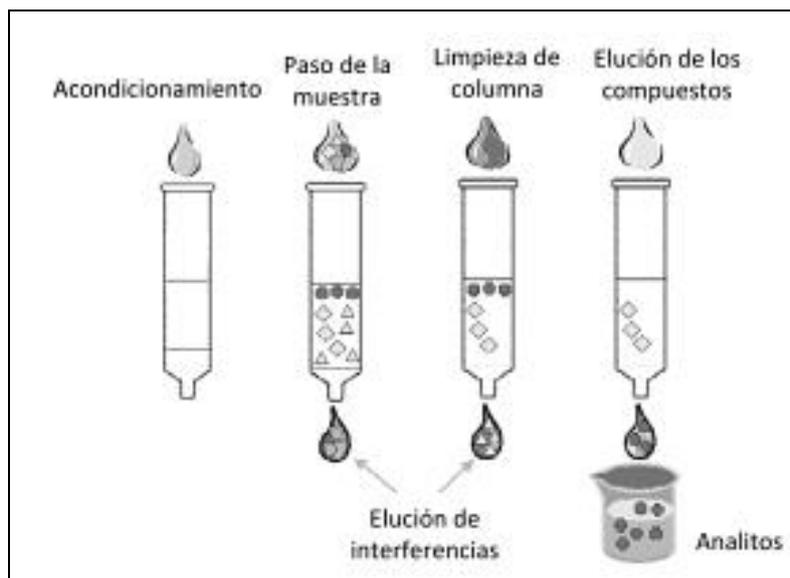


Figura 5. Esquema general de la EFS

El objetivo principal de la EFS es separar selectivamente los analitos de interés de una muestra y la eliminación de la matriz interferente. Estos analitos pueden ser adsorbidos por el sólido, o bien permanecer en la otra fase, siendo en este caso los compuestos interferentes los que quedarían retenidos en la fase sólida. En el primer caso, los analitos pueden recuperarse en una etapa posterior, utilizando un disolvente adecuado para su elución. La selección del adsorbente es un factor importante, que dependerá de los analitos y sus grupos funcionales, del tipo de muestra y de cómo interacciona esta con el adsorbente. En general, cuanto mayor sea su área superficial específica, mayor será el contacto con la especie a retener y por tanto mayor grado de retención.

Tabla 7. Adsorbentes más comunes en EFS (Zwir-Ferenc & Biziuk 2006)

Adsorbente	Estructura	Tipo de analito	Solventes para disolver (la muestra)	Disolventes para eluir
<b>FASE REVERSA</b>				
<b>Octadecilo (C18)</b>	$-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$	No polar	Metanol/agua,	Hexano y
<b>Octilo (C8)</b>	$-(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$		Acetonitrilo/agua	cloroformo
<b>Etilo (C2)</b>	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$			(analitos no polares)
<b>Ciclohexilo</b>	$-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_{12}$			Metanol (analitos polares)
<b>Fenilo</b>	$-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5$			

Fase Normal				
<b>Ciano (CN)</b>	$-(CH_2)_3CN$	Ligera,	Hexano, cloroformo	Metanol
<b>Amino (NH<sub>2</sub>)</b>	$-(CH_2)_3NH_2$	moderada y		
<b>Diol (COHCOH)</b>	$(CH_2)_3OCH_2CHOHCH_2OH$	fuertemente		
		polar		
Fase normal (adsorción)				
<b>Kieselguhr</b>	$-SiOH$	Ligera,	Hexano, cloroformo	Metanol
<b>Silica gel</b>	$-SiOH$	moderada y		(dependiendo
<b>Florisil</b>	$Mg_2SiO_3$	fuertemente		del tipo de
<b>Alumina (neutral)</b>	$Al_2O_3$	polar		analito)
INTERCAMBIADORES IÓNICOS (intercambiador de aniones y cationes)				
<b>Amino</b>	$-(CH_2)_3NH_2^+$	Intercambiador	Agua o buffer	1) Buffer (pH=pKa +2)
<b>Amino 1°,2°</b>	$-(CH_2)_3NH^+CH_2CH_2NH_2$	de aniones-	(pH=pKa +2)	2) adsorbente o analito tienen pH neutro
<b>Amina cuaternaria</b>	$-(CH_2)_3N^+(CH_3)_3$	ácido ionico		3) Disolventes con alta fuerza iónica
<b>Acido carboxilico</b>	$-(CH_2)_2COO^-$	Intercambiador		
<b>Acido propil sulfónico</b>	$-(CH_2)_3SO_2O^-$	de cationes -	Agua o buffer	1) Buffer (pH=pKa-2)
<b>Acido aromático sulfónico</b>	$-(CH_2)_3-C_6H_4-SO_2O^-$	Base iónica	(pH=pKa-2)	2) adsorbente o analito tienen pH neutro
				3) Disolventes con alta fuerza iónica

### 2.7.2. Interacción analito – adsorbente en EFS

Se puede introducir selectividad en el proceso de extracción en fase sólida utilizando distintos adsorbentes y variando la naturaleza del eluyente (Benfenati et al. 1996).

Las interacciones entre el sólido adsorbente y los analitos de una muestra pueden ser de tres tipos: iónicas, polares y apolares (Peña Badenas 2011).

#### 2.7.2.1. Interacciones apolares

Este tipo de interacción se produce entre las cadenas hidrocarbonadas del sólido adsorbente y los analitos de la muestra. Dado que la mayoría de los

compuestos orgánicos posee una estructura apolar, estos pueden ser fácilmente adsorbidos mediante fuerzas de Van der Waals. La excepción la constituyen aquellos compuestos que poseen un gran número de grupos polares o iónicos, que pueden enmascarar el carácter apolar del esqueleto carbonado. Adsorbentes típicos con un pronunciado carácter apolar son las sílices modificadas C18 y C8. Estas fases muestran, no obstante, una baja selectividad, debido a que sus grupos funcionales, los sustituyentes alquilo, pueden interactuar con casi todos los analitos apolares. En general, los compuestos apolares presentes en una disolución polar son fácilmente adsorbidos en adsorbentes apolares y eluidos con disolventes apolares. La fase octadecilsilano (C18) es, en la actualidad, la fase más ampliamente utilizada.

#### **2.7.2.2. Interacciones polares**

Las interacciones polares incluyen la formación de puentes de hidrógeno, interacciones dipolo- dipolo e interacciones  $\pi - \pi$ , que pueden ocurrir entre el sólido adsorbente y los grupos funcionales de los analitos. Algunas de estas interacciones son posibles entre grupos amino, hidroxilo y carbonilo, al igual que anillos aromáticos, dobles enlaces y grupos con heteroátomos como el nitrógeno, el azufre, el fósforo y el oxígeno. Adsorbentes típicos de este tipo son la sílice no modificada, o las sílices modificadas con grupos -CN, -NH<sub>2</sub> y -OH. En general, los compuestos polares presentes en una disolución apolar son fácilmente adsorbidos en adsorbentes polares y eluidos con disolventes polares.

#### **2.7.2.3. Interacciones iónicas**

Las interacciones iónicas se producen entre un analito con carga positiva o negativa, y un sólido adsorbente con grupos funcionales de carga opuesta. La retención se ve favorecida si los analitos se encuentran presentes en una matriz de poca fuerza iónica, mientras que, para la elución de los analitos, lo más adecuado es utilizar un disolvente de elevada fuerza iónica.

#### 2.7.2.4. Intercambio iónico (Harris 2013)

El mecanismo de intercambio iónico se basa en la atracción electrostática entre iones del analito y grupos cargados que existen en el adsorbente. Los intercambiadores catiónicos poseen grupos cargados negativamente, unidos por enlace covalente al soporte sólido del adsorbente, que atraen analitos catiónicos. En el caso de los intercambiadores aniónicos, los grupos cargados positivamente en el adsorbente, atraen analitos aniónicos.

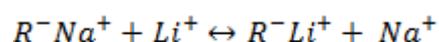
Los intercambiadores iónicos se clasifican en ácidos o básicos, fuertes o débiles, con base en el grupo cargado que posean. Como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Grupos comúnmente utilizados en adsorbentes para intercambio iónico

<b>Intercambiadores catiónicos</b>		
<b>Tipo</b>	<b>Ejemplo</b>	<b>Abreviatura</b>
<b>ácido fuerte</b>	Sulfopropil	SP
<b>ácido intermedio</b>	Fosfato	P
<b>ácido débil</b>	Carboximetil	CM
<b>Intercambiadores aniónicos</b>		
<b>Base fuerte</b>	Dietil( 2-hidroxiopropil)	QAE
<b>Base intermedia</b>	Dietilaminometil	DEAE
<b>Base débil</b>	p-Aminobencil	PAB

Los intercambiadores siempre contienen el mismo número de cargas positivas y negativas, por lo tanto son eléctricamente neutros. Los iones que se encuentran unidos a los grupos cargados reciben el nombre de contraiones.

La constante de intercambio del analito entre la fase líquida y el adsorbente, mide la selectividad relativa del intercambiador con respecto a dos iones (el analito y contraión) y se llama coeficiente de selectividad. Por ejemplo si se considera la competencia de  $\text{Na}^+$  (contraión) y  $\text{Li}^+$ (analito) por los sitios activos de una resina de intercambio catiónico (R-), esta competencia se distingue por el siguiente equilibrio



La constante de intercambio (K) se define como:

$$K = \frac{[R^-Li^+][Na^+]}{[R^-Na^+][Li^+]}$$

En general los intercambiadores iónicos fijan preferentemente los iones de mayor carga, menor radio hidratado y mayor polarizabilidad.

### 2.7.3. Selección de adsorbente

Se pueden utilizar distintos tipos de adsorbentes dependiendo del tipo de interacción que presenten los analitos. En la Tabla 9 se enlistan los tipos de adsorbentes más comunes.

Tabla 9. Clasificación de adsorbentes según su interacción con los analitos

<b>Adsorbentes Hidrofóbicos</b>	En fase reversa, los grupos funcionales no polares del adsorbente actúan según las fuerzas de Van der Waals. Las cadenas alquílicas y aromáticas son grupos funcionales que muestran afinidad con compuestos de polaridad media y baja. Los grupos silanoles libres del adsorbente favorecen las interacciones polares.
<b>Adsorbentes Hidrofílicos</b>	Las fases normales permiten una limpieza eficiente de moléculas con grupos polares. Los grupos funcionales ciano (CN) pueden usarse tanto en fase normal para extraer compuestos polares como en fase reversa para la extracción de compuestos de polaridad media. Los adsorbentes amino (NH <sub>2</sub> ) pueden usarse tanto como intercambiadores de aniones débiles (para ácidos fuertes), o como adsorbente polar que puede interactuar con grupos funcionales OH, NH, SH.
<b>Adsorbentes de Intercambio</b>	La retención de intercambio iónico se basa en la interacción iónica. Este adsorbente crea una fuerte atracción con los grupos funcionales de carga opuesta de los compuestos de la muestra, que depende esencialmente del pH, del contra-ión y de la fuerza iónica. <ul style="list-style-type: none"> <li>Las fases de intercambio aniónico fuerte (SAX) contienen una amina de tipo cuaternaria. Se usan para la extracción de ácidos débiles con una o más cargas negativas.</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las fases de intercambio catiónico fuerte (SCX) contienen un grupo sulfónico y se usan para la extracción de compuestos débilmente básicos con una o más cargas positivas.</li> <li>• Las fase de intercambio aniónico débil (DEAE, NH<sub>2</sub>) contienen un grupo dietilamino o amino. Se usan para la extracción de ácidos fuertes con una o más cargas negativas.</li> <li>• Las fase de intercambio catiónico débil (WCX) contienen un grupo carboxílico y se usan para la extracción de compuestos fuertemente básicos con una o más cargas positivas.</li> </ul>
<b>Adsorbentes Mixtos</b>	<p>Los adsorbentes mixtos muestran la máxima selectividad. Las cadenas de intercambio iónico e hidrofóbicas químicamente ligadas a la sílice ofrecen una selectividad única. Esta técnica se usa para la extracción de compuestos básicos, especialmente drogas y metabolitos, en fluidos biológicos. Los compuestos que tengan funcionalidad ácida o básica son retenidos por la función de intercambio. Una etapa de lavado con un pH adecuado permite eliminar las impurezas ionizables. Una etapa de lavado con solvente orgánico elimina impurezas retenidas por interacción hidrofóbica.</p>

#### **2.7.4. Dispersión de matriz en fase sólida**

La Dispersión de Matriz en Fase sólida (DMFS) o MSPD por sus siglas en inglés es una variante de la EFS que permite manejar directamente muestras sólidas, semisólidas y viscosas. Provee un mecanismo que rompe y dispersa simultáneamente la muestra sobre un adsorbente que puede utilizarse posteriormente como material de empaque de una columna, generando así una fase con características cromatográficas únicas (Barker 2007).

Esta técnica ha sido utilizada para resolver problemas analíticos difíciles y presenta numerosas ventajas con respecto a métodos de extracción convencionales, entre las que se pueden mencionar:

- Reducir el tiempo de análisis
- Reducir el gasto de solventes y como consecuencia el volumen de residuos.

- Permitir la extracción selectiva de los analitos.
- Permitir la obtención de resultados comparables a los obtenidos por métodos clásicos u oficiales
- Mejorar la eficiencia de la extracción de los analitos puesto que toda la muestra se expone al extractante (Bogialli & Di Corcia 2007).

### **2.7.5. Factores que afectan el análisis en DMFS**

La DMFS junto con la extracción en fase sólida (EFS), son una forma de cromatografía de líquidos y en general se aplican los mismos principios. La DMFS posee características que la diferencian de la EFS, y la hacen más compleja en comparación con el proceso cromatográfico tradicional. Se conocen algunos factores que han mostrado que afectan la eficiencia del proceso DMFS; los cuales se mencionan a continuación.

#### **2.7.5.1. La naturaleza del soporte sólido**

La mayoría de los artículos publicados que usan DMFS, utilizan soportes a base de sílica, ya que estos soportes tienen como ventaja la presencia de grupos silanoles sin derivatizar que son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y permiten obtener una muestra seca que de otra forma no sería posible obtener.

Dentro de los adsorbentes denominados de fase reversa el más empleado es el octadecilsilano (C18). El C18 está formado por partículas de sílice con cadenas hidrocarbonadas de 18 carbonos, unidas químicamente a los grupos silanoles. Las partículas de sílica actúan como dispersantes, mientras que el C18 solubiliza los componentes de la matriz sobre su superficie. También se utilizan fases más polares para los casos en que el analito que se pretende aislar sea polar, mientras que los materiales de fase reversa se emplean para aislar especies más lipofílicas (Barker 2000).

- *Co-adsorbente*: En muchos casos es posible obtener extractos libres de impurezas mediante la purificación *on-line* del extracto primario obtenido en DMFS. Esto puede lograrse colocando una capa de co-adsorbente, generalmente de distinta naturaleza que el sólido utilizado para dispersar la muestra. En muchos casos este co-adsorbente actúa reteniendo las

interferencias (Pensado et al. 2005), pero también puede destruirlas si presenta algún tipo de modificación química (Canosa Rodríguez 2008).

#### **2.7.5.2. Tamaño de partícula**

El tamaño de poro del agente dispersante no es un factor demasiado importante. No obstante, el tamaño de partícula es un parámetro a tener en cuenta. El uso de partículas de 3-20  $\mu\text{m}$  de diámetro conduce a flujos bajos o, incluso, inexistentes. La mayoría de las aplicaciones de DMFS han utilizado partículas de 40  $\mu\text{m}$  de diámetro. También se ha observado que un tamaño de partícula no uniforme, pero comprendido entre 40 y 100  $\mu\text{m}$ , funciona bien (Barker 2000).

#### **2.7.5.3. Relación muestra/dispersante**

Las relaciones muestra/dispersante están habitualmente comprendidas entre 1:1 y 1:4, pero esta relación depende de cada aplicación en particular y es una variable que se debe examinar durante el desarrollo del método (Kristenson et al. 2006). La facilidad para conseguir una mezcla homogénea con el dispersante depende básicamente de la matriz considerada. Así, para muestras líquidas de baja viscosidad (vino, leche, etc.) normalmente es suficiente con agitar para conseguir una capa fina de muestra alrededor de las partículas de adsorbente (García-López et al. 2008).

#### **2.7.5.4. La naturaleza de la muestra**

Los componentes de la matriz dispersada se mueven a través de la fase cromatográfica contenida en el cartucho de DMFS, lo que hace posible su fraccionamiento en función de la naturaleza de los compuestos presentes en la matriz, así como de las sustancias interferentes que pueden hacer más complicada su determinación analítica.

#### **2.7.5.5. Modificaciones de matriz**

A veces es necesario alterar el estado de ionización de los componentes de la muestra para asegurar que tengan lugar ciertas interacciones con la fase enlazada del soporte sólido y/o el disolvente de elución. Esto se puede llevar a cabo mediante la adición de ácidos, bases, sales, agentes quelatantes o desquelatantes, antioxidantes, entre otros, ya sea durante la etapa de mezclado de la muestra con el dispersante y/o como aditivo en el disolvente de elución (Barker 2000).

#### **2.7.5.6. La naturaleza del solvente de elución y la secuencia de adición**

Al igual que en cromatografía y en EFS, la polaridad del disolvente es de suma importancia en el momento de determinar que analitos eluyen del cartucho de DMFS y en qué orden lo hacen. La correcta elección del disolvente y el diseño del perfil de elución permiten obtener extractos libres de impurezas en base a la retención de las mismas en la fase estacionaria (Pensado et al. 2005) o mediante una primera elución de las mismas, para eliminarlas del cartucho de DMFS (Canosa et al. 2007).

#### **2.7.6. Etapas de la DMFS** (Barker 2007; Kristenson et al. 2006)

El procedimiento de la DMFS comprende los siguientes pasos:

1. **Dispersión.** Una muestra líquida, sólida o semisólida se añade a un mortero (vidrio, porcelana o ágata) y se mezcla con un agente dispersante con el objetivo de obtener la completa disrupción y dispersión de la muestra sobre dicho dispersante. Se suele trabajar con pequeñas cantidades de muestra.
2. **Empacado.** Cuando se ha completado la etapa de dispersión de la muestra, la mezcla resultante se empaqueta en una columna vacía. La columna es a menudo un cuerpo de jeringa vacío o un cartucho de acero inoxidable o polipropileno con filtros para la adecuada retención del empaque.
3. **Elución.** Pueden existir dos posibilidades. La primera es que los analitos queden retenidos en la columna y las interferencias se eluyan en una etapa previa de lavado, posteriormente los analitos se eluyen con un

disolvente distinto. Y la otra posibilidad es que las interferencias de la matriz se retengan selectivamente en la columna y los analitos eluyan de forma directa.

4. Limpieza. En muchos casos se utilizan co-columnas para obtener un mayor grado de fraccionamiento y limpieza de la muestra.

Las diferentes etapas de esta técnica se ilustran en la figura 6.

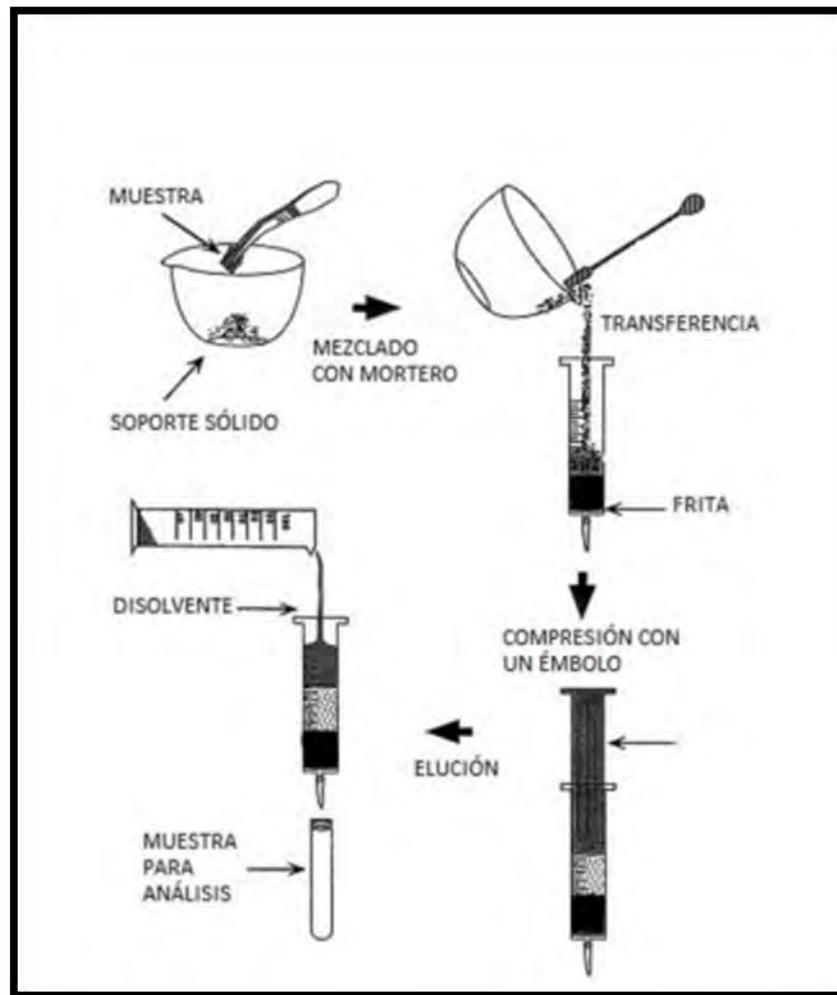


Figura 6. Etapas generales de la extracción mediante DMFS (Barker 2007)

## 2.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

La Cromatografía de líquidos, es una técnica de análisis químico ampliamente utilizada, la cual permite separar físicamente y cuantitativamente los distintos componentes de una solución por la absorción selectiva de los constituyentes de una mezcla; consta de dos fases, una fija que suele llamarse fase

estacionaria, y una móvil que fluye permanente durante el análisis, y que en este caso es un líquido (Snyder 1979).

Se representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución, y al gráfico obtenido se le conoce como cromatograma. Los solutos se representan gráficamente como una serie de picos que pueden identificarse por su anchura, altura o área. Para la cuantificación de compuestos se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada de analito.

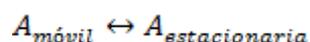
### 2.8.1. Definiciones y parámetros cromatográficos

A continuación se definen los parámetros cromatográficos más comunes.

Tiempo de retención. El tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra para que el pico del analito alcance el detector se denomina tiempo de retención y se le da el símbolo  $t_R$

Tiempo muerto. Es el tiempo para que una especie no retenida alcance el detector

Constante de distribución. Los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones simples que suponen la transferencia *de un analito entre las fases estacionaria y móvil*. Así para una especie A.



La constante de este equilibrio K se denomina, constante de distribución y se define como

$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

Donde  $C_s$  es la concentración del analito en la fase estacionaria y  $C_M$  es la concentración molar del analito en la fase móvil.

Factor de capacidad: Es un parámetro representado por el símbolo  $k'$ , el cual se utiliza para describir las velocidades de migración de los analitos en las columnas y se interpreta considerando que mientras mayor sea su valor, menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna; para una especie A el factor de capacidad se define como:

$$k'_A = \frac{K_A V_s}{V_M}$$

Donde  $K_A$  corresponde a la constante de distribución,  $V_s$  es el volumen de fase estacionaria y  $V_M$  es el volumen de la fase móvil. Este también puede representarse en términos experimentales, los cuales pueden tomarse directamente de un cromatograma.

$$k'_A = \frac{(t_R)_A - t_M}{t_M}$$

Donde  $(t_R)_A$  corresponde al tiempo de retención del componente A y  $t_M$  es el tiempo muerto obtenido para una especie no retenida.

Factor de selectividad: El factor de selectividad ( $\alpha$ ) de una columna, como su nombre lo indica, es un término que define que tan selectiva es una columna para separar dos analitos. Es de hacer notar, que la columna puede ser selectiva a una separación, que se identifica por un valor alto de este factor, pero si no se considera la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico, aun así no se lograría la separación de los mismos. Entonces el factor de selectividad de una columna para dos especies A y B se define como:

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

Donde  $k'_B$  es el factor de capacidad del compuesto B que es más retenido y  $k'_A$  es el factor de capacidad del compuesto A, que es el menos retenido. Con esta definición  $\alpha$  siempre es mayor a la unidad. En términos tomados del cromatograma  $\alpha$  se puede calcular como sigue

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Eficiencia de columna: La anchura de una banda aumenta a medida que se mueve a través de la columna, debido a que cuanto más tiempo transcurre mayor es la dispersión que puede tener lugar. Por ello la anchura de la zona está relacionada directamente con el tiempo de residencia en la columna, e inversamente con la velocidad a la que fluye la fase móvil. Se utilizan dos términos afines con frecuencia como medida cuantitativa de la eficiencia de una columna cromatográfica: la altura equivalente de plato teórico (H) y el número de platos teóricos (N). Los dos están relacionados por la ecuación:

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

Donde L es la longitud del relleno de la columna. La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos teóricos, y cuanto menor es la altura de plato (Universidad Central de Venezuela 2008).

Resolución de columna: La resolución ( $R_s$ ) de una columna constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos, en este término si se toma en cuenta el ensanchamiento de los picos, así que la magnitud de este valor si permite asegurar la separación de dos picos.

$$R_s = \frac{2[(t_r)_B - (t_r)_A]}{W_A + W_B}$$

Donde  $W_A$  y  $W_B$  son los anchos de banda a la base, de los solutos A y B respectivamente.

Hay tres parámetros fundamentales que influyen en la resolución de una separación cromatográfica: la eficiencia de la columna (expresada en número de platos teóricos), la selectividad y el factor de capacidad:

$$R_s = \left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right) \cdot \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right) \cdot \left(\frac{k'}{1 + k'}\right)$$

Modificando alguno de estos tres parámetros es posible incidir en la resolución de una separación cromatográfica.

### **2.8.2. Tipos de cromatografía**

El tipo de cromatografía en CLAR viene determinado por la fase móvil y, fundamentalmente, por la fase estacionaria. Existen diferentes tipos de fase estacionaria disponibles en forma de soportes de distintos materiales contenidos en una columna. Pueden ser de diferentes tamaños, diámetros de partícula, tamaños de poro, o que tengan unidos diferentes compuestos activos (grupos químicos, grupos polares) (Hernández 2007).

**Líquido-Sólido:** se basa en la polaridad. Los compuestos que poseen grupos funcionales capaces de producir enlaces fuertes de hidrógeno se unirán más fuertemente a la fase estacionaria que los compuestos menos polares. Así, los compuestos menos polares eluirán de la columna más rápidamente que los altamente polares.

**Líquido-Líquido,** también se basa en la polaridad. Sin embargo, esta técnica es más apropiada para muestras de mediana polaridad que son solubles en disolventes orgánicos de débil polaridad a polares.

**Fase normal,** se basa en la hidrofilia y la lipofilia usando una fase estacionaria polar y una fase móvil menos polar. Así, los compuestos hidrofóbicos eluyen más rápidamente que los hidrofílicos. La fase estacionaria está constituida por una matriz de sílica a la que se unen grupos silanol, amino y nitrilo que le confieren polaridad relativa respecto a la fase móvil.

**Fase reversa**, también se basa en la hidrofilia y la lipofilia. La fase estacionaria consiste en una matriz de sílice empacada que lleva unida covalentemente una cadena alquílica de  $n$ -carbonos (por ejemplo, C-8 significa que se incorpora una cadena octil y C-18 una octadecil). La más hidrofóbica es, en este caso, la fase estacionaria, eluyendo los compuestos hidrofílicos más rápidamente que los hidrofóbicos, que interaccionan en mayor grado con la fase estacionaria. También hay empaquetamientos poliméricos alternativos a la sílice que ofrecen similares características con mayor resistencia dinámica y más amplio rango de estabilidad al pH. Existen dos variantes de la cromatografía en fase reversa:

- **Supresión iónica**, se utiliza modificando el pH de la fase móvil para ácidos y bases débiles, de forma que el analito pasa a ser más lipófilo y se mejora la separación porque se establece más interacción con la fase estacionaria.
- **Formación de pares iónicos**, se utiliza para compuestos que tienen grupos funcionales biológicos que serán unidos a un contraión. El contraión se asocia al analito y lo desplaza del par iónico normal (corrientemente  $\text{Na}^+$  o  $\text{Cl}^-$ ) mejorando su hidrofobicidad. Para analitos catiónicos se utilizan grupos alquil o aril sulfonatos y para analitos aniónicos aminas cuaternarias.

**Intercambio iónico**, se basa en el intercambio selectivo de iones de la muestra por sus diferencias en signo y magnitud de carga iónica frente a los contraiones de la fase estacionaria. Se trata de columnas que contienen grupos funcionales que soportan cargas unidas a una matriz polimérica. Los iones funcionales están permanentemente unidos a la columna y cada uno tiene su contraión unido. La muestra es retenida porque reemplaza los contraiones de la fase estacionaria con sus propios iones. La muestra es eluida de la columna por cambio en las propiedades (pH, fuerza iónica) de la fase móvil, haciendo que esta desplace los iones de la muestra de la fase estacionaria.

### III. OBJETIVOS

#### **Objetivos generales:**

Desarrollar una metodología analítica por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) y análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV (CLAR-UV), para la determinación de antraceno, pireno y benzo(a)antraceno en la matriz de alga alimenticia *Spirulina*.

Desarrollar un método analítico para la determinación de glifosato en el alga *Spirulina* utilizando las técnicas de dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV (CLAR-UV).

#### **Objetivos particulares:**

Aplicar y comparar dos estrategias de análisis distintas, dependientes de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos para una misma matriz biológica

Efectuar el análisis de los extractos obtenidos por CLAR-UV y CLAR-FD para fines comparativos en los límites de detección e interferentes presentes

## IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 4.1 Materiales y reactivos

#### 4.1.1 Estándares y disolventes

- Disolventes: Acetonitrilo y Metanol grado cromatográfico marca J.T. Baker
- Agua grado cromatográfico obtenida a través de un sistema de desionización marca Millipore modelo Simplicity UV (Bedford, MA, USA).
- Estándar de Benzo(a)antraceno Pireno, Antraceno y Glifosato (GLY) marca (ChemService PA , EUA) pureza de 99%
- Estándar 9-fluoronometilcloroformato (FMOC-Cl) marca Merck pureza de 99%

#### 4.1.2 Reactivos

- Fosfato de sodio monobásico,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  marca J.T. Baker pureza de 99%
- Tetraborato disódico decahidratado marca J.T. Baker pureza 101.5 %
- Éter dietílico J.T. Baker pureza de 99%
- Hidróxido de sodio,  $\text{NaOH}$  J.T. Baker pureza de 87.7 %
- Ácido nítrico,  $\text{HNO}_3$  pureza 66%

#### 4.1.3 Sistema cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (LINEAR INSTRUMENTS) con dos bombas isocráticas Lab. Alliance , Series II
- Bucle de 23.5  $\mu\text{L}$  Lab. Alliance
- Detector UV LINEAR INSTRUMENTS modelo 200
- Detector de fluorescencia LINEAR INSTRUMENTS modelo LC305
- “Software” de control y procesamiento de datos “Clarity Lite” v.2.8.01.584
- Pre-columna de 20x 2 mm empacada con adsorbente Nucleosil 100-5  $\text{C}_{18}$  tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$
- Columna analítica ODS HYPERSYL Dimensiones (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ )  $\text{C}_{18}$
- Jeringa 100  $\mu\text{L}$  (HAMILTON, EUA)

#### **4.1.4 Instrumentos, equipos y accesorios**

- Espátula de cromo-níquel
- Micropipetas de 2-20, 25-125 y 100-1000  $\mu\text{L}$  (Eppendorf, Hamburg, Alemania)
- Pipetas Pasteur
- Matraces aforados de distintos volúmenes
- Mortero de ágata de 20 mL con pistilo
- Viales con tapón de rosca con capacidad de 4 , 10 y 40 mL
- Balanza Analítica modelo AG 245 ( Mettler Toledo, Suiza)
- Baño de ultrasonido Brasonic 1510 (Branson, CT EUA).

#### **4.1.5 Sistema de extracción**

- Sílice C18 marca Supelclean de 45  $\mu\text{m}$  de diámetro de partícula (Supelco, EUA)
- Fase LC-Si marca Supelco 45  $\mu\text{m}$
- Fase Florisil 149-250  $\mu\text{m}$  marca J.T. Baker
- Fase Bondesil  $\text{NH}_2$  40  $\mu\text{m}$  marca Varian
- Fase Bondesil SAX 40  $\mu\text{m}$  marca Varian
- Cartuchos Bond Elut de 6 mL con los “frits” correspondientes (Varian, CA, USA)

## 4.2 Optimización de los métodos de determinación

Los métodos de determinación de los compuestos estudiados fueron dos, por un lado el método para los hidrocarburos aromáticos policíclicos HAP's (Antraceno, Pireno y Benzo(a)antraceno) y por otro lado el método para el pesticida Glifosato (GLY). Para optimizar las condiciones de análisis cromatográfico por CLAR, detección y extracción se siguieron las diferentes actividades integradas en la figura 7, las cuales serán descritas en detalle en las secciones subsecuentes.

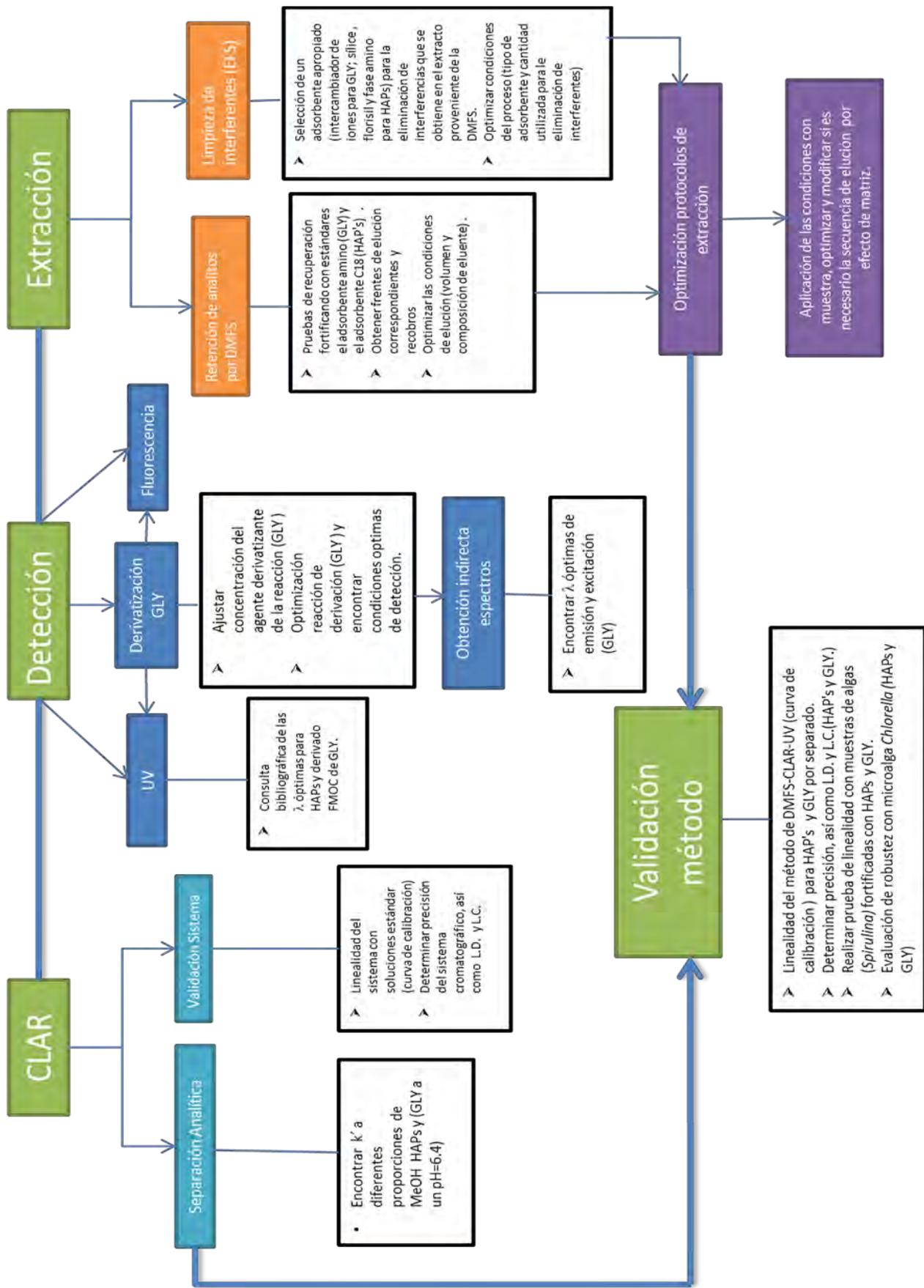


Figura 7. Descripción general de la metodología desarrollada

## **4.2.1 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos HAP's**

### **4.2.1.1 Análisis cromatográfico y detección por CLAR -UV**

#### **4.2.1.2 Preparación de disoluciones estándar**

En todas las disoluciones estándar de Pireno, Antraceno y Benzo(a) Antraceno se partió de las disoluciones madre con concentraciones de 106, 144 y 101.6 mg/L respectivamente preparadas en acetonitrilo y almacenadas hasta su uso en frascos ámbar cerrados herméticamente a una temperatura de 4°C.

A partir de cada una de las disoluciones madre, se obtuvo la mezcla de los tres compuestos a una concentración de 20 mg/L en metanol para cada compuesto. La cual se almacenó bajo las mismas condiciones hasta ser utilizada.

#### **4.2.1.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de detección y separación cromatográfica**

Para establecer las condiciones de detección, se realizaron inyecciones de la mezcla de los tres HAP's en metanol, para esto se hizo una dilución de la a una concentración de 5 mg/L en condiciones isocráticas a flujo de 1.0 mL min<sup>-1</sup> con 80 % metanol como fase móvil. Se probaron inyecciones de la mezcla con detección UV en los máximos de absorbancia reportados por Beltrán, 2014 para cada uno de los compuestos. Se eligió la longitud de onda que presentaba una mejor respuesta en las señales del cromatograma para los tres compuestos en mezcla.

Para establecer las condiciones de separación, se probó una mezcla de metanol: agua como fase móvil a distintas proporciones empleando un 100 ,90 y 85 % del disolvente orgánico e inyectando una disolución de 5 mg/L al sistema cromatográfico en fase inversa, en el cual la fase estacionaria fue una sílice C18. Para cada ensayo siempre se mantuvo un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes primero para los compuestos en forma individual y posteriormente para la mezcla de los compuestos donde se determinó los tiempos de retención y el tiempo muerto ( $t_m$ ) utilizando nitrato de sodio 1 mM. Estos datos se utilizaron para calcular el factor de retención ( $k'$ ), además de observar la dependencia del logaritmo de  $k'$  en función del porcentaje de metanol en la fase móvil de manera gráfica. El cálculo de este parámetro se efectuó con la ecuación siguiente

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Donde  $t_r$  corresponde al tiempo de retención y  $t_m$  al tiempo muerto

Con las condiciones seleccionadas de separación y detección se procedió a realizar la validación.

#### **4.2.1.4 Validación del sistema cromatográfico. CLAR-UV**

##### **4.2.1.4.1 Linealidad**

Para la determinación de linealidad del sistema cromatográfico, se inyectó por triplicado una mezcla de los tres hidrocarburos a las siguientes concentraciones 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 3.5 mg L<sup>-1</sup>. Con las áreas obtenidas de cada pico a las concentraciones antes mencionadas se construyeron las curvas de calibración de área vs concentración de cada compuesto y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados. La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de determinación (r<sup>2</sup>) de cada curva.

##### **4.2.1.4.2 Precisión**

La precisión del sistema CLAR-UV se evaluó con los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. Los ensayos de repetibilidad consistieron en realizar 5 inyecciones de una disolución de 1 mg L<sup>-1</sup> de una mezcla de los HAP's en un mismo día, y se obtuvieron los porcentajes de los coeficientes de variación (% CV) de las áreas de los picos cromatográficos. Mientras que la reproducibilidad del sistema cromatográfico se determinó en tres días diferentes realizando por triplicado la inyección de una disolución estándar de una mezcla de los tres hidrocarburos a una concentración de 1.0 mg L<sup>-1</sup>.

Con los resultados obtenidos de la respuesta del detector se calcularon los coeficientes de variación de cada una de las concentraciones con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde S corresponde a la desviación estándar y  $\bar{X}$  a la media aritmética

##### **4.2.1.4.3 Límite de detección y cuantificación**

Para obtener el valor del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del sistema cromatográfico, se utilizaron las curvas de calibración de cada uno de los compuestos. Se determinaron estadísticamente el límite de detección teórico (LDT) y límite de cuantificación teórico (LCT) utilizando la desviación estándar de la regresión para cada compuesto con las siguientes formulas

$$LD = (3.3 * S_{y/x}) / b_1$$

$$LC = (10 * S_{y/x}) / b_1$$

Donde b<sub>1</sub> corresponde a la pendiente y S<sub>y/x</sub> a la desviación estándar de la regresión.

El límite de detección experimental (LDE) se determinó, inyectando disoluciones estándar cada vez más diluidas, hasta que la señal de los picos fuesen 3 veces la señal del ruido.

#### **4.2.1.5 Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción**

##### **4.2.1.5.1 Acondicionamiento del adsorbente (sílice C18)**

La sílice C18 SUPELCLEAN antes de ser usada para la extracción de los HAP's por dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) se acondicionó previamente para eliminar interferentes, solvatar las moléculas del adsorbente y favorecer la interacción con los compuestos que se quieren retener.

Para el acondicionamiento se utilizó un cartucho de 6 mL, en el cual se empacó con aproximadamente 500 mg de la sílice C18 con ayuda de "frits" de polipropileno. Posteriormente se la añadió MeOH, en una proporción de 2.0 mL por cada gramo de adsorbente, se dejó secar a vacío durante 1 hora aproximadamente; cuando el adsorbente estaba seco se desempacó y se depositó en un vial para su uso posterior.

##### **4.2.1.5.2 Optimización del método de DMFS para la extracción de HAP's**

##### **4.2.1.5.3 DMFS con estándares**

El desarrollo del método de extracción se comenzó con el manejo de adsorbente fortificado, para lo cual se utilizaron 200 mg de sílice C18 que se fortificó directamente con 100  $\mu$ L de una mezcla estándar de Antraceno, Pireno y B[a]A a una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup>, correspondientes a 2  $\mu$ g de los HAP's. Se dejó que se evaporara el disolvente en aproximadamente una hora y posteriormente se homogenizó el adsorbente con ayuda del pistilo, simulando el proceso de dispersión como cuando se maneja la muestra real.

A continuación se empacó el adsorbente macerado en un cartucho para EFS de 6 mL y se efectuaron varios ensayos para determinar la secuencia de elución óptima. Al tratarse de un sistema de extracción parecido a la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, se esperaba que en la aplicación de mezclas de fuerza eluyente débil, es decir con un alto porcentaje de agua, los analitos no fueran eluidos y sí los interferentes de tipo polar. Al contrario, de lo que sucedería si se utilizaran mezclas con una fuerza eluyente alta, es decir con una mayor proporción de disolvente orgánico, en este caso metanol; así se podría realizar la desorción y elución cuantitativa de los compuestos. Los eluentes probados y los fraccionamientos efectuados se muestran en la Tabla 10

Tabla 10. Mezclas de metanol/agua utilizadas para evaluar la recuperación de los analitos por DMFS con sílice C18 fortificada

Porcentaje MeOH	Número de fracciones (2.0 mL)
100 %	3
90 %	3
70 %	5
50%	7

Este estudio con fraccionamientos se realizó para determinar en qué porcentaje de metanol y volumen se obtenía una recuperación aceptable de los analitos, además para identificar a partir de qué porcentaje no se recuperaba o se recuperaba una porción muy pequeña de los compuestos, posteriormente en los lavados para eliminar interferencias en nuestro proceso de DMFS con muestra. Lo anterior se dedujo bajo la suposición de que los interferentes de la muestra más polares serán eluidos con los eluentes de fuerza débil y la elución de los analitos se llevó a cabo con el metanol puro. Así, cada eluente fue recuperado en fracciones de 2.0 mL para la verificación de fuga o no fuga de los analitos con las distintas mezclas de metanol/agua y se graficaron los frentes de elución correspondientes (% recuperación acumulado vs. volumen de eluente). Para el cálculo del recobro, los eluatos se inyectaron al cromatógrafo y los picos de los compuestos se compararon con los de la solución estándar de la mezcla de los HAP's a una concentración control de 1.0 mg L<sup>-1</sup> de cada compuesto, que corresponde a la concentración que se espera si se recupera en su totalidad los 2 ug agregados de HAP's en 2 mL de disolvente.

#### 4.2.1.5.4 DMFS con muestra

La muestra con la que se trabajó para optimizar el método de extracción por DMFS fue la microalga *Spirulina* en forma de tabletas, la cual fue obtenida en una tienda naturista.

Para realizar la dispersión se realizaron pruebas con una relación 1:2 y 1:4 de muestra–adsorbente que corresponden a 100 y 50 mg de alga *Spirulina* con 200 mg de adsorbente, ya que es lo que normalmente se reporta para matrices de este tipo. En primer lugar se preparó un extracto blanco (de muestra sin fortificar) y se inyectó para verificar si existían interferentes en la matriz con las condiciones optimizadas previamente.

El siguiente paso fue realizar los ensayos fortificando la muestra con los compuestos de interés con 2 µg de los HAP's. La muestra se secó durante una

hora, transcurrido este tiempo se procedió con la homogenización con la ayuda del mortero. Por último, la fase dispersa se empacó en un cartucho de 6 mL y colocando dos “frits” en la parte inferior y un “frit” en la parte superior. A continuación se aplicó la secuencia de elución optimizada del estudio sin muestra (con adsorbente fortificado), pero se observó que el eluato obtenido al final presentaba una coloración muy intensa, además de turbidez. Por lo que se optó por modificar esta secuencia hasta limpiar coloración y se propusieron las secuencias de elución presentadas en la tabla 11

Tabla 11. Secuencias de elución para eliminar coloración en los extractos de los HAP's provenientes de *Spirulina*

<b>Ensayo</b>	<b>Secuencia de aplicación de disolventes</b>
<b>1</b>	a) 5.0 mL agua desionizada b) 1.0 mL metanol 40% c) 2.0 mL metanol 100%
<b>2</b>	a) 10.0 mL agua desionizada b) 1.0 mL metanol 40% c) 2.0 mL metanol 100%
<b>3</b>	a) 5.0 mL agua desionizada b) 2.0 mL metanol 30% c) 1.0 mL metanol 40% d) 2.0 mL metanol 100 %
<b>4</b>	a) 5.0 mL agua desionizada b) 1.0 mL metanol 30% c) 1.0 mL metanol 40 % d) 2.0 mL metanol 100 %

Se calculó la recuperación obtenida con la aplicación de cada una de las secuencias de elución, y se compararon los cromatogramas con el control que corresponde a la concentración de los compuestos (1 mg/L) que se esperaba si la elución de los 2 µg agregados fuera completa (100%) en los 2.0 mL de metanol.

Una vez seleccionada la mejor secuencia para eliminación de coloración y de elución para los analitos, se realizaron las pruebas de repetibilidad que consistieron en inyectar tres extractos el mismo día y calcular el coeficiente de variación en las áreas.

#### **4.2.1.6 Validación del método DMFS –CLAR- UV. Ensayos en microalga *Spirulina*.**

##### **4.2.1.6.1 Linealidad y exactitud del método**

Para evaluar la linealidad del método se aplicó el procedimiento de DMFS optimizado (con 2.0 mL de metanol como eluyente final de los HAP's), utilizando 200 mg de fase C18 y 50 mg de muestra fortificada a niveles de 10, 20, 40, 100 y 140 µg/g de muestra para los 3 analitos. Se determinó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la recta de la respuesta en área del detector vs la concentración fortificada. Por otra parte, se graficó la cantidad recuperada vs la cantidad adicionada y se evaluó la exactitud mediante el valor de recobro representado con la pendiente de la recta para cada compuesto.

##### **4.2.1.6.2 Precisión del método**

La precisión se determinó en términos de reproducibilidad con 3 extracciones en 3 días diferentes con un nivel de fortificación de 40 µg/g de muestra y se evaluó el % C.V. También se evaluó en términos de repetibilidad con 3 extracciones realizadas en un mismo día. Comparándolas con el estándar correspondiente.

##### **4.2.1.6.3 Límites de detección y cuantificación del método**

Se determinó el límite de detección experimental, para lo cual se fortificaron muestras de alga *Spirulina* con diferentes volúmenes de una disolución estándar de 5 mg L<sup>-1</sup>, que corresponden respectivamente a 10, 4, 2 y 1.2 µg /g de nivel de fortificación, apropiados para obtener extractos cada vez más diluidos a niveles de 0.25, 0.1, 0.05 y 0.03 µg/mL considerando extractos de 2.0 mL. Los extractos fueron inyectados y estas bajas concentraciones permitieron correr cromatogramas hasta que el tamaño de los picos llegó a 3 veces la señal del ruido de fondo y el límite de cuantificación experimental se obtuvo con una relación señal/ ruido de 10 veces.

#### 4.2.1.6.4 Porcentaje de recobro y selectividad del método

La selectividad del método se evaluó con la DMFS de la muestra sin fortificar para obtener el blanco de la matriz y observar en el extracto si había la existencia de interferentes en los tiempos de retención de los analitos. Posteriormente se adicionaron a la muestra los analitos a diferentes concentraciones que se encuentran en mezcla (Antraceno, Pireno y B[a]A) y se trataron conforme a la metodología establecida, las concentraciones de las muestras y sus respectivos controles se presentan en la Tabla 12. Estos extractos se analizaron por medio de CLAR-UV a las condiciones establecidas en la sección 5.1.1. La respuesta (área del pico cromatográfico) obtenido del análisis de cada muestra adicionada se compararon con la disolución estándar a las concentraciones correspondientes al 100% de recobro, asumiendo que esta disolución estándar contiene la cantidad de analito adicionado inicialmente a la muestra en un volumen de disolvente igual al del extracto. Entonces el porcentaje de recuperación se obtiene de la siguiente forma:

$$\% \text{ Recobro} = \left( \frac{A_{ex}}{A_{est}} \right) \times 100$$

Donde  $A_{ex}$  corresponde al área del extracto y  $A_{est}$  al área de la solución estándar

Tabla 12. Concentraciones de fortificación con sus correspondientes concentraciones de los controles de recuperación de los extractos

Nivel de fortificación correspondientes a 50 mg de alga <i>Spirulina</i> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	V final del extracto (mL)	C esperada en extracto ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
10	2.0	0.25
20	2.0	0.5
40	2.0	1.0
100	2.0	2.5
140	2.0	3.5

#### 4.2.1.7 Robustez del método. DMFS en muestras de la microalga *Chlorella alimenticias*

Con la finalidad de observar el efecto de la matriz en las características de los cromatogramas, así como el comportamiento de los recobros de los

hidrocarburos extraídos se aplicó la secuencia de elución elegida con otro tipo de alga alimenticia en este caso se eligió el alga *Chlorella*.

#### 4.2.1.7.1 Limpieza de extractos DMFS por medio de co-columna EFS

Para el alga *Spirulina* no fue necesaria la adición de otro paso de limpieza con una co-columna de EFS, puesto que el extracto no presentó ningún interferente que pudiera complicar la cuantificación de los analitos. En cambio para el alga *Chlorella* si fue necesario un “*clean up*” adicional. Para esto en primer lugar se inyectó una muestra, la cual fue procesada por DMFS sin fortificar del alga *Chlorella*, con el fin de observar el perfil cromatográfico de la matriz. Se observó que se presentaban ciertas señales provenientes de la matriz las cuales pueden interferir con la cuantificación de los analitos. Por ello se eligió implementar un paso adicional, el cual consistió en una limpieza (*clean up*) con otro adsorbente distinto al que se utilizó en la dispersión de matriz. Los adsorbentes y las cantidades correspondientes que se probaron se muestran en la tabla 13

Tabla 13. Adsorbentes utilizados en la etapa de limpieza del extracto para *Chlorella*

Adsorbente	Cantidad (mg)
Sílice Virgen	200
Florisil	200
Amino	100
Amino	200

Se efectuó la DMFS y el *clean up* con cada adsorbente y se obtuvieron los cromatogramas de la muestra sin fortificar correspondientes para cada caso para comparación con el extracto obtenido después de solamente la DMFS del alga *Chlorella* (*sin el clean-up por SPE*), para observar si existía la eliminación de señales interferentes. Con los resultados se seleccionó el adsorbente más apropiado.

## 4.2.2 Glifosato

### 4.2.2.1 Análisis cromatográfico y detección por CLAR-UV y CLAR-Fluorescencia

#### 4.2.2.2 Preparación de disoluciones

Las disoluciones de Glifosato se prepararon a un nivel de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a partir del estándar correspondiente usando agua desionizada como disolvente. Estas se guardaron en frascos color ámbar y se almacenaron a una temperatura de 4°C.

Por otro lado la solución de derivatizante 9-fluorometilcloroformato (FMOC-Cl) se preparó a una concentración de 1  $\text{mg L}^{-1}$  en acetonitrilo, de igual manera se almacena en un frasco color ámbar para su posterior uso.

#### 4.2.2.3 Establecimiento de las condiciones óptimas de detección

La detección del glifosato se efectuó gracias a una reacción de derivatización con el 9-fluorometilcloroformato (FMOC-Cl). De esta manera el analito puede detectarse por espectrofotometría en la región ultravioleta (UV) y también por fluorescencia; ésta última detección siendo más favorable por proporcionar mejores límites de detección.

La reacción de derivación se realizó con base en el procedimiento de Sancho (1996) que posteriormente adaptó Gómez (2005) el cual permitió determinar en muestras de jitomate al glifosato y su metabolito AMPA a niveles de residuos de hasta de 1.44 y 2.75  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente. Las condiciones utilizadas para realizar la reacción de derivación de una solución de glifosato (100  $\text{ng mL}^{-1}$ ) y la detección de los derivados, se indican en la tabla 14.

Tabla 14. Condiciones para la reacción de derivación con FMOC (Gómez, 2005)

Reactivos	
Concentración de boratos (M) pH=9	0.025
Concentración de* FMOC-Cl ( $\text{mg L}^{-1}$ )	1000, 100*, 10*

Reacción	
Volumen de extracto (mL)	1.0
Volumen de boratos (mL)	0.5
Volumen de FMOC-CI(mL en ACN)	1.0
Tiempo de reacción	30 minutos aproximadamente
Remoción de exceso de FMOC-CI	2 ELL con 2.5 mL de éter etílico cada una

\* Concentraciones adicionales probadas en el presente trabajo (por triplicado)

#### 4.2.2.4 Condiciones óptimas de detección UV

Con ayuda de la función del detector de UV se determinaron las longitudes de onda de máxima absorción para el derivado del glifosato. Para esto se inyectó en el sistema cromatográfico una solución del compuesto a una concentración de 5 mg L<sup>-1</sup> previamente derivatizado y se modificaron las longitudes onda, registrando el valor de las áreas obtenidas de las señales cromatográficas. De esta manera se obtuvo, de manera indirecta el espectro y las longitudes de máxima absorción.

##### 4.2.2.4.1 Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis del derivado de Glifosato

Se realizó la optimización de las condiciones cromatográficas para el análisis del derivado del Glifosato utilizando el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución con columna C18 y detector espectrofotométrico UV. Se inyectó una disolución de 10 mg L<sup>-1</sup>

Para la elección de las condiciones cromatográficas óptimas del compuesto derivatizado se utilizaron fases móviles de 20, 30 y 40 % MeOH y 80, 70 y 60 % agua respectivamente con un pH=6.37 (ajustado con *buffer* de fosfatos 0.002 M).

Los datos del tiempo de retención  $t_r$  del analito y el tiempo muerto  $t_m$  (medido con nitrato de sodio 1 mM). Se utilizaron para calcular el factor de retención ( $k'$ ), además de observar la dependencia del logaritmo de  $k'$  en función del porcentaje de metanol en la fase móvil de manera gráfica. El cálculo de este parámetro se efectuó con la ecuación siguiente:

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Para cada ensayo siempre se mantuvo un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, y se obtuvieron los cromatogramas correspondientes.

#### **4.2.2.5 Validación del sistema CLAR-UV**

##### **4.2.2.5.1 Linealidad**

Para la determinación de linealidad del sistema cromatográfico CLAR-UV, se inyectaron al cromatógrafo por triplicado el derivado del compuesto usando las siguientes concentraciones 1.0, 4.0, 10.0 y 25.0 mg L<sup>-1</sup>. Con las áreas obtenidas de cada pico para las disoluciones derivatizadas de concentraciones antes mencionadas se construyó la curva de calibración y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados. La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la curva.

##### **4.2.2.5.2 Precisión**

La precisión del sistema CLAR-UV se evaluó con los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. Los ensayos de repetibilidad consistieron en realizar 4 inyecciones de una disolución de 4 mg L<sup>-1</sup> derivatizada de Glifosato en un mismo día, y se obtuvieron los porcentajes de los coeficientes de variación (% CV) de las áreas de los picos cromatográficos. Mientras que la reproducibilidad del sistema cromatográfico se determinó en tres días diferentes realizando la inyección de los derivados de los compuestos a la misma concentración.

Con los resultados obtenidos de la respuesta del detector se calcularon los coeficientes de variación de cada una de las concentraciones con la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} \times 100$$

Donde S corresponde a la desviación estándar y X a la media aritmética

#### **4.2.2.5.3 Límite de detección y cuantificación por UV**

El límite de detección experimental (LDE) y cuantificación se determinó, inyectando disoluciones de las mezclas de reacción cada vez más diluidas, hasta que la señal del pico del GLY fuese 3 veces la señal del ruido. La concentración límite se consideró aquella en la que el pico del derivado aparecía, pero no se podía integrar.

#### **4.2.2.6 Validación del sistema CLAR-DF**

Para efectuar la validación del sistema CLAR-DF, las condiciones de separación fueron las mismas que se obtuvieron en la sección 4.2.2.4.1 (pág. 64) ya que se manejó la misma columna cromatográfica, pero ahora acoplada al detector de fluorescencia y manejando concentraciones mucho menores aproximadamente de 100 veces como se describe a continuación.

##### **4.2.2.6.1 Linealidad**

Para la determinación de linealidad del sistema cromatográfico con detección de fluorescencia, se inyectó por triplicado el derivado del glifosato a las siguientes concentraciones 25, 50, 100, 250, 500, 750 y 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Con las áreas obtenidas del pico a las concentraciones antes mencionadas se construyeron las curvas de calibración del compuesto y se llevó a cabo la regresión lineal mediante el ajuste de mínimos cuadrados. La linealidad del sistema se evaluó con el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de cada curva.

##### **4.2.2.6.2 Precisión**

La precisión del sistema CLAR-DF se evaluó con los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. Los ensayos de repetibilidad consistieron en realizar 3 inyecciones de una disolución de 25  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  del derivado de Glifosato en un mismo día, de los cuales se obtienen los porcentajes de los coeficientes de variación (% CV) de las áreas de los picos cromatográficos. Mientras que la reproducibilidad del sistema cromatográfico se determinó en tres días diferentes realizando la inyección del derivado a la misma

concentración. Con los resultados obtenidos de la respuesta del detector se calcularon los coeficientes de variación de cada una de las concentraciones.

#### **4.2.2.6.3 Límite de detección y cuantificación**

Para obtener el valor del límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del sistema cromatográfico, se utilizaron las curvas de calibración de cada uno de los compuestos. Se determinó estadísticamente el límite de detección teórico (LDT) y límite de cuantificación (LC) con la desviación estándar de la regresión para cada compuesto.

El límite de detección experimental (LDE) y cuantificación se determinó, inyectando disoluciones de las mezclas de reacción cada vez más diluidas, hasta que la señal de los picos fuesen 3 veces la señal del ruido. La concentración límite se consideró aquella en la que el pico del derivado aparecía pero no se podía integrar.

#### **4.2.2.7 Establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción por DMFS**

Para efectuar la extracción del GLY de las tabletas de microalgas se adaptó el método reportado por Gómez, 2005 para aislar al mismo compuesto del jitomate. Así, en primer lugar se utilizó un cartucho con DMFS-NH<sub>2</sub> para retener al analito y después se realizó la elución con *buffer* de fosfatos pH=7 C=5 mmol/L para recuperar al GLY. Este eluato se aplicó en segundo lugar a un cartucho EFS-SAX para realizar un “clean-up”. La elución del glifosato del SAX-Cl se realizó con una disolución de HNO<sub>3</sub> 0.01mol/L.

##### **4.2.2.7.1 Acondicionamiento de adsorbente amino para extracción por DMFS**

La sílice BONDESIL NH<sub>2</sub> antes de ser usada en la dispersión de matriz en fase sólida, se acondicionó para limpiarla, y solvatar las moléculas del adsorbente con el fin de favorecer la interacción con los compuestos de interés. Para el acondicionamiento se utilizó un cartucho de 6 mL, en el cual se empacó 200 mg de fase amino con ayuda de dos “frits” de polipropileno. Posteriormente se la añadió 5.0 mL de MeOH y 10.0 mL de agua por cada gramo de adsorbente, se secó a vacío durante 3 horas aproximadamente cuando el adsorbente estaba seco se depositó en un vial para su posterior uso.

#### **4.2.2.7.2 Acondicionamiento de la Fase BONDESIL SAX- CI para “clean-up” por SPE**

El adsorbente BONDESIL SAX-CI antes de ser usado en la extracción en fase sólida, se acondicionó para limpiarlo y prepararlo para la retención del compuesto de interés. Para esto, la fase intercambiadora fué empacada en un cartucho de 6 mL entre dos “frits” se le agregaron 10 mL de metanol. Se dejó secar a vacío durante 3 horas, y se guardó en un vial para su posterior uso.

#### **4.2.2.7.3 Evaluación de las condiciones de la elución del analito de los adsorbentes**

Para encontrar los volúmenes óptimos de elución se realizaron fraccionamientos. El volumen requerido para eluir la totalidad de la cantidad de compuesto retenido correspondió a la suma de los volúmenes de las fracciones en las que se encontró el pico correspondiente. Se consideró que el compuesto se eluía cuantitativamente si su porcentaje de recobro era mayor a 90% en el total acumulado

La elución del analito se evaluó aplicando volúmenes conocidos de disolventes puros y mezclas a los cartuchos empacados después de haber sido fortificadas. Para el cálculo del recobro del analito proveniente de las muestras fortificadas se usó la siguiente fórmula:

$$\text{Recobro} = \frac{\text{Cantidad de compuesto en la fracción de elución}}{\text{Cantidad de compuesto total fortificada en la muestra}} \times 100$$

El cálculo de las cantidades se realizó en base a las áreas de los picos de la fracción y el estándar como se describió en la sección 4.2.1.6.4.

#### **4.2.2.8 Evaluación de la fuga y retención de los analitos de los adsorbentes**

La fuga de los analitos se evaluó inyectando en el cromatógrafo el efluente de las soluciones de carga. El porcentaje de fuga se calcula con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Fuga} = \left( \frac{A_E}{A_{sc}} \right) \times 100$$

Donde  $A_E$  corresponde al área del pico del compuesto en el efluente y  $A_{sc}$  al área del pico en la solución de carga.

El porcentaje del compuesto retenido en el adsorbente se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Retenido} = 100 - \% \text{ Fuga}$$

De esta forma se verificaba que el compuesto se retuviera en su totalidad. Si en el efluente no aparecía la señal correspondiente al glifosato.

#### 4.2.2.8.1 Optimización del método de DMFS del GLY con adsorbentes

La optimización del método se efectuó comenzando con fortificación solamente del adsorbente amino. De esta manera, a partir de un estándar de 200 mg L<sup>-1</sup> de Glifosato se tomó una alícuota de 40 µL (equivalente a 8 µg del compuesto) para fortificar 500 mg y 250 mg de la fase amino además de añadir 60 µL de HNO<sub>3</sub> 1 mol/L (como lo indica el método original) y se dejó reposar por un periodo de aproximadamente una hora. Posterior a este tiempo se mezcló de forma homogénea con ayuda de un mortero de ágata y se empacó en un cartucho.

Para recuperar al analito se aplicaron al cartucho 15 mL de *buffer* de fosfatos a pH=7 C= 5 mmol/L. El eluato se recuperó en fracciones de 2.5 mL cada uno. Se obtuvo el frente de elución correspondiente graficando los recobros para cada una de las fracciones y comparando los análisis de éstas con las de un control de la cantidad total de analito esperada en un volumen de 2.5 mL aforado en *buffer* de fosfatos. Cuando fueron verificadas las condiciones para la retención y recuperación adecuada del analito con fortificación del adsorbente, se procedió a aplicarlas para optimizar el método con las muestras reales de microalga, lo que obligó a la limpieza con la fase SAX. Los ensayos con este adsorbente con disoluciones y con muestras se presentan a continuación.

El desarrollo y validación de un método DMFS-SAX-CLAR-DF no fue efectuado debido a la limitada disponibilidad del detector de fluorescencia. De todas formas se inyectaron por CLAR-DF extractos de muestras fortificadas en concentraciones 100 veces más bajas para evaluar el efecto de matriz y la

existencia de interferentes bajo estas condiciones. Los resultados de muestran en la siguiente sección.

#### **4.2.2.8.2 Evaluación del proceso de limpieza por EFS con intercambiador SAX-CI**

El proceso de EFS en el intercambiador de iones se evaluó para ser utilizado como una limpieza de los extractos obtenidos por DMFS. Para lo cual, se empacaron 250 mg del intercambiador SAX previamente activado al cual se le cargó la muestra en la que se encuentra contenido el analito (*buffer* de fosfatos). Se recuperó el efluente para observar si existía fuga del compuesto en este paso. Posteriormente se realizó la elución con 20.0 mL de HNO<sub>3</sub> 0.01 mol/L dividida en 4 fracciones de 5.0 mL cada una, se ajustó el pH a un valor mayor a 6 y posteriormente se derivatizó. Se determinó el porcentaje de recuperación para tres extractos diferentes de una misma concentración (n=3) con ayuda de un control de 3.2 mg L<sup>-1</sup> que es la concentración que se espera para el eluato final si se considera que se recupera todo lo fortificado en una sola fracción.

#### **4.2.2.8.3 Optimización del método de DMFS del GLY con las tabletas de microalgas**

##### ***4.2.2.8.4 Efecto de matriz en la extracción de glifosato con adsorbente amino***

Para esto se preparó un blanco siguiendo la secuencia de elución que se aplicó a la DMFS con estándares con 250 mg de adsorbente amino con 50 mg de muestra *Spirulina* sin fortificar. Se obtuvo el cromatograma correspondiente del eluato que proviene del cartucho de DMFS-NH<sub>2</sub>, con *buffer* de fosfatos pH=7 y C= 5 mmol/L. Se tomó una alícuota de 1 mL de este extracto y se realizó la correspondiente reacción de derivación, para observar si existe una señal interferente debido al efecto de matriz.

##### ***4.2.2.8.5 Uso de intercambiador SAX-CI para eliminar interferentes en la matriz***

Después de haber realizado la dispersión de matriz en fase sólida con la fase amino y el alga *Spirulina*. Se realizó el paso de “clean-up” por EFS para la eliminación de los interferentes que se observan en el cromatograma. Para

esto se empacaron 250 mg de SAX-Cl previamente acondicionada, adicional a esto se le añadieron 2.0 mL de buffer de fosfatos pH neutro para asegurar la retención del compuesto Glifosato en el intercambiador. Se secó al vacío y posteriormente se cargó el extracto obtenido de la DMFS que corresponde a 10 mL de *buffer* de fosfatos pH=7. Se recolectó el efluente correspondiente y se derivatizó para verificar si había fuga del Gly del cartucho. El analito se recuperó en un volumen de 20.0 mL de HNO<sub>3</sub> 0.01 mol/L, de los cuales se tomó una alícuota de 1 mL posteriormente se realizó la reacción de derivación. Se inyectó en el cromatógrafo y se analizó por medio de detección UV. Se verificó que no existiera fuga durante la carga con disoluciones del glifosato y también se determinaron así los porcentajes de recuperación (concentración de la disolución= 1mg/L).

#### **4.2.2.9 Validación del método DMFS-SAX-CLAR-UV. Ensayos con microalga *Spirulina*.**

##### **4.2.2.9.1 Linealidad y exactitud del método**

Para evaluar la linealidad del método se aplicó el procedimiento de DMFS optimizado utilizando 250 mg de fase amino y 50 mg de muestra fortificada con glifosato a niveles de 0.4, 1.6 y 4 µg/g de muestra. Se determinó el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de la recta de la respuesta en área del detector vs la concentración fortificada.

##### **4.2.2.9.2 Precisión del método**

La precisión se determinó en términos de reproducibilidad con 3 extracciones en 3 días diferentes con un nivel de fortificación de 0.4 µg/g de muestra y se evaluó el % C.V. También se evaluó en términos de repetibilidad con 3 extracciones realizadas en un mismo día. Comparándolas con el estándar correspondiente.

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 HAP's

#### 5.1.1 Establecimiento de las condiciones de detección UV y separación cromatográfica

#### 5.1.2 Condiciones óptimas para la detección.

Las longitudes de onda en la que los HAP's proporcionaron una mayor respuesta en la mezcla se presentan en la Tabla 15

Tabla 15. Longitud de onda con mayor respuesta para los HAP's utilizados en los ensayos

Compuesto	$\lambda$ (nm)
Pireno	239
Antraceno	250
Benzo(a) Antraceno	286

Dado que se trabajó con la mezcla de los tres hidrocarburos, se observó que para las dos primeras longitudes (239 y 250 nm) se obtenía una buena respuesta para Pireno y Antraceno, sin embargo para el B[a]A la respuesta fue pequeña. Al probar la detección de este compuesto con  $\lambda = 286$  nm se obtuvo la mayor respuesta pero disminuyó la respuesta para Antraceno y Pireno, por lo que finalmente se eligió la  $\lambda = 243$  nm donde se obtiene una buena señal para estos dos compuestos y aumenta para al B[a]A, aunque no sea la longitud de onda con su mayor respuesta. En la figura 8 se observan los cromatogramas correspondientes a la mezcla de los estándares de los tres hidrocarburos a diferentes longitudes de onda.

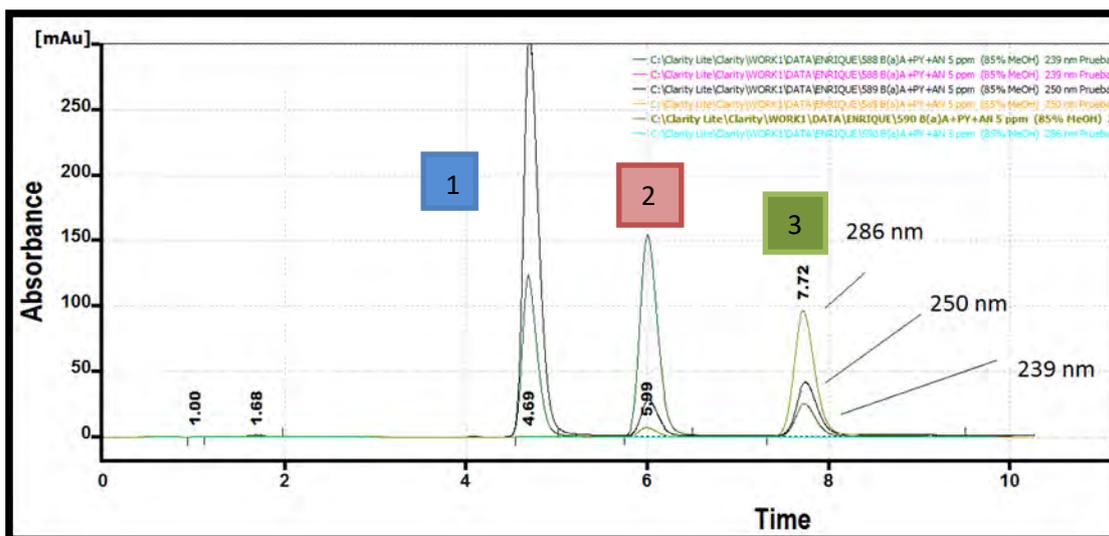


Figura 8. Cromatograma obtenido de una disolución estándar de una mezcla de los HAP's a una concentración de  $5 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm)  $150 \times 4.6$  tamaño de partícula ( $5 \mu$ )  $C_{18}$  fase móvil a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ , composición constante de 80 % metanol y 20% agua . Modificando la longitud de onda en el detector UV. Orden de elución 1.Antraceno 2. Pireno 3.B[a]A

### 5.1.3 Condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAP's

Para determinar las mejores condiciones de la separación cromatográfica, primero se inyectaron cada uno de los compuestos en forma individual para observar su tiempo de retención y también si existía algún solapamiento en las señales con una fase móvil de 80 % metanol y 20% de agua.

Posteriormente, al asegurarse de que no se encimaban las señales, se inyectó una mezcla de los compuestos a distintas proporciones de metanol/ agua en la fase móvil para obtener los tr(s) correspondientes y con el valor del tiempo muerto se calculó el factor de retención ( $k'$ ) para cada compuesto. En la Tabla 16 se presentan estos parámetros para los tres compuestos estudiados.

Tabla 16. Retención cromatográfica de los HAP's. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición variable de metanol en cada ensayo

Compuesto	Porcentaje de Metanol en fase móvil								
	100			90			85		
	tr (min)	k'	log k'	tr (min)	k'	log k'	tr (min)	k'	log k'
Antraceno	2.51	0.549	-0.260	3.41	1.105	0.043	4.307	1.659	0.220
Pireno	2.853	0.761	-0.119	4.087	1.523	0.183	5.443	2.360	0.373
Benzo(a)Antraceno	3.033	0.872	-0.059	4.82	1.975	0.296	6.847	3.227	0.509

\*Se midió el valor  $t_m=1.620$  min con nitrato de sodio para calcular el valor de k'

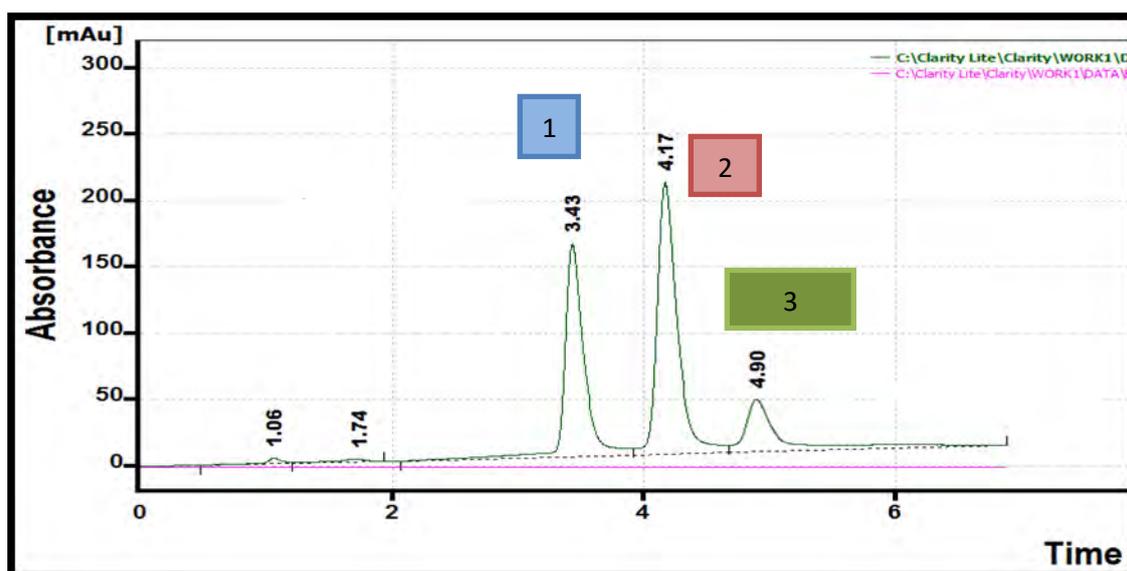


Figura 9. Cromatograma obtenido de una disolución estándar de una mezcla de los HAP's a una concentración de 5  $\mu$ g /mL. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, composición constante de 90 % metanol y 10% agua. Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Orden de elución 1.Antraceno 2. Pireno 3.B[a]A

En la figura 9 se representa el cromatograma de la separación con fase móvil del 90% de metanol, y en la figura 10 gráficamente la variación de k' en función de la proporción de metanol en la fase móvil. Se observa que las rectas son paralelas, lo que indica que se pueden separar en cualquier fase móvil que se probó. Se observó que con la fase móvil con 90 % de metanol se tiene una muy buena separación, además de que el tiempo de análisis disminuiría, sin

embargo cuando se aplicaron los HAP's a la muestra de *Spirulina* se presentaba una señal interferente para el pico cromatográfico del compuesto Antraceno. Es por ello que se seleccionó la fase móvil con 85% de metanol.

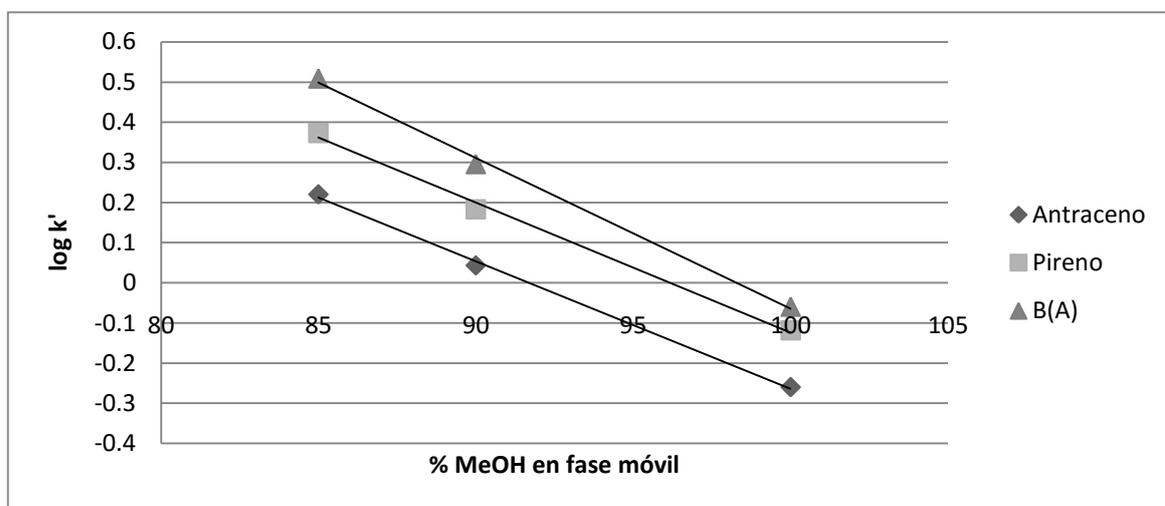


Figura 10. Variación del factor de retención ( $k'$ ) de los tres HAP's analizados, en función del porcentaje de metanol en la fase móvil columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ ) C<sub>18</sub>. Flujo 1 mL.min<sup>-1</sup> concentración de cada analito 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>

Analizando los datos de tiempo de retención, el primer compuesto en eluir es el Antraceno, en segundo lugar el Pireno y por último el Benzo(a) antraceno. El Antraceno fue el primero en eluir debido a que su estructura de tres anillos aromáticos a comparación de los otros dos hidrocarburos que tienen cuatro anillos en su estructura, lo cual nos indica que el Pireno es menos apolar en comparación del Benzo(a) antraceno, lo que lleva a una menor retención en la columna de octadecilsilano. Otro dato que nos ayuda explicar el comportamiento de estos compuestos es el logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua  $\log P_{oct}$  que es un parámetro que indica la lipofilidad de un compuesto. Mientras menor sea el valor de este parámetro el compuesto será menos hidrofóbico y por lo tanto se retiene menos en una fase hidrofóbica como la C18 (Sartorelli, 1999).

Una vez seleccionada la fase móvil de 85% metanol y 15 % agua, así como su longitud de onda de detección se realizaron los ensayos de precisión y linealidad del sistema. La precisión fue evaluada por reproducibilidad %CV en tres días distintos inyectando la mezcla de los compuestos 5 veces a una concentración de 1 mg L<sup>-1</sup>.

### 5.1.3.1 Linealidad del sistema CLAR-UV

En la figura 11 se muestran las curvas de calibración para los tres compuestos en el intervalo de 0.25-3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Los coeficientes de correlación ( $r^2$ ) obtenidos para todos los casos fueron mayores a 0.99 lo que nos indica que la respuesta del detector UV con respecto a la concentración de los analitos es lineal

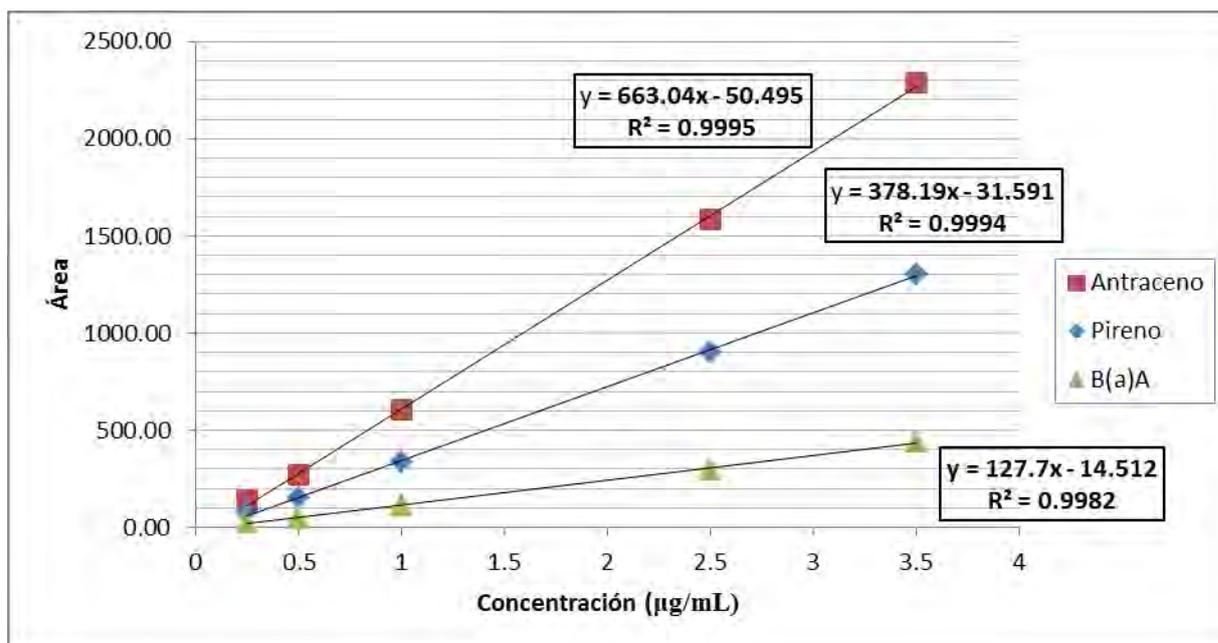


Figura 11 .Curva de calibración obtenida para los tres HAP's en el intervalo de concentraciones (0.25 – 3.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ )

### 5.1.3.2 Precisión, Límites de detección y cuantificación

En la tabla 17 se presentan los resultados obtenidos al evaluar la repetibilidad y la reproducibilidad del sistema de una disolución estándar de 1  $\text{mg L}^{-1}$

Observando la tabla 17 se puede decir que se obtuvieron coeficientes de variación (% CV) aceptables, y nos indican que la variabilidad máxima del sistema es de 4.79 % a una concentración de 1 ppm para el compuesto Pireno de acuerdo el criterio de (COFEPRIS 2011) para residuos y contaminantes en alimentos y agua ( $\text{CV} \leq 15\%$ ) El límite de detección experimental determinado para este sistema se encuentra a un nivel de 0.05  $\text{mg L}^{-1}$  para los analitos Antraceno y Pireno, en el caso del B[a]A fue de 0.1  $\text{mg L}^{-1}$ , ya que en estas condiciones la longitud de onda usada (243 nm) la absortividad para este compuesto es menor en comparación a los otros hidrocarburos. Por otra parte el límite de cuantificación experimental corresponde a 0.17  $\text{mg L}^{-1}$  para el

Antraceno y Pireno, mientras que para el B[a]A fue de 0.33 mg L<sup>-1</sup>. Estos valores se presentan en la siguiente tabla junto con los límites de detección y cuantificación teóricos para los tres analitos.

Tabla 17. Precisión (a un nivel de concentración 1 mg L<sup>-1</sup>), límites de detección y cuantificación del sistema cromatográfico CLAR-UV para los HAP's

Compuesto	L.D.E (mg/L)	L.C.E (mg/L)	*L.D.T(mg/L)	*L.C.T (mg/L)	Repetibilidad (% CV )	Reproducibilidad(% CV)
Antraceno	0.05	0.17	0.14	0.43	4.43	4.37
Pireno	0.05	0.17	0.12	0.36	4.79	4.73
B[a]A	0.10	0.33	0.12	0.36	4.64	4.62

\*Estimado con el estadístico establecido por la IUPAC. L.D.E= límite de detección experimental. L.C.E= límite de cuantificación experimental. L.D.T= límite de detección teórico. L.C.T= límite de cuantificación teórico. Intervalo de concentraciones de la curva (0.05-0.25 mg/L).

#### 5.1.4 Establecimiento de las condiciones óptimas de la extracción

##### 5.1.4.1 DMFS con estándares

Después fortificar 200 mg de adsorbente C18, dispersarlo y empacarlo, se realizó un fraccionamiento de 2.0 mL para la obtención de frentes de elución con eluentes constituidos por diferentes proporciones de metanol y agua. Cada una de las fracciones fué inyectada en nuestro sistema cromatográfico. En la tabla 18 se muestran los recobros obtenidos con las proporciones probadas, así como el total de fracciones utilizadas para tener una elución completa de nuestros analitos y en la tabla 19 se hace un resumen de los resultados obtenidos

Tabla 18. Recobros de los analitos con mezclas de metanol: agua. Fortificación 10 µg/g de adsorbente C18. Cantidad de adsorbente utilizada 200 mg

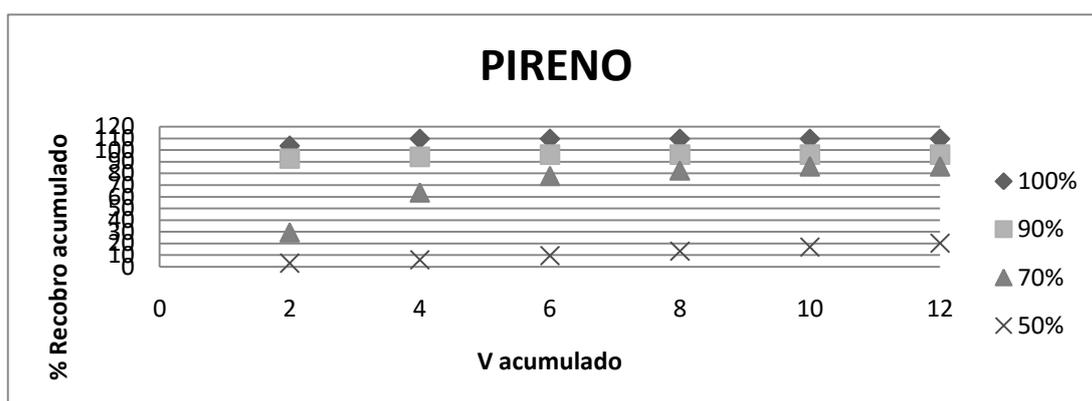
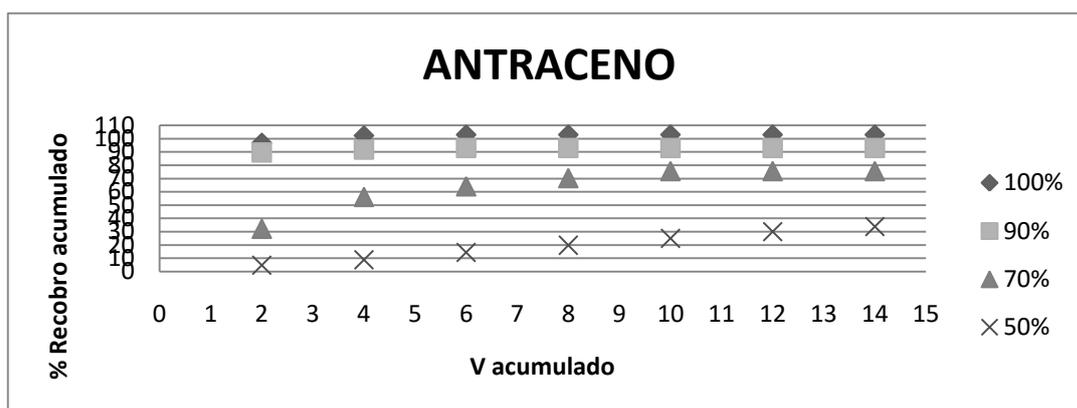
	V acumulado	% Recobro acumulado				
		100% MeOH	90 % MeOH	80% MeOH	70 % MeOH	50% MeOH
ANTRACENO	0	0	0	0	0	0
	2	97	90	39	32	5
	4	102	92	46	56	9
	6	103	93	49	64	14
	8	----	----	51	70	20
	10	----	----	----	75	25
	12	----	----	----	----	30
	14	----	----	----	----	34
PIRENO	0	0	0	0	0	0
	2	103	93	44	30	3
	4	110	94	55	64	6
	6	110	96	59	78	10
	8	----	----	63	83	14
	10	----	----	----	86	17
	12	----	----	----	----	20
	14	----	----	----	----	22
Benzo[a]Antraceno	0	0	0	0	0	0
	2	95	96	38	11	4
	4	101	96	49	29	----
	6	101	96	55	46	----
	8	----	----	60	60	----
	10	----	----	----	68	----
	12	----	----	----	----	----
	14	----	----	----	----	----

Tabla 19. Resumen de recobros globales de los analitos aplicando distintas mezclas de metanol/agua.

% MeOH	% R Antraceno	% R Pireno	% R B(a)A
100	<b>103</b>	<b>110</b>	<b>101</b>
90	<b>92</b>	<b>96</b>	<b>96</b>
70	<b>75</b>	<b>86</b>	<b>68</b>
50	<b>34</b>	<b>22</b>	<b>4</b>

En todos los casos para los cartuchos utilizados para esta prueba se realizó la elución el mismo día que se empacaron.

En la figuras 12 (a, b y c) se grafican los recobros acumulados en función del volumen del eluyente, lo que representa el frente de elución. Así se observa que el eluyente constituido por 100 y 90% MeOH, provocó el mayor porcentaje de recuperación de nuestros compuestos en los primeros 2.0 mL Mientras que para el eluyente con el 70 % de metanol se alcanzó el máximo recobro solo hasta los 10 mL. El eluyente con 50 % de metanol es insuficiente para eluir cuantitativamente a los analitos, mientras el Antraceno y Pireno eluyen muy poco a poco desde la primera hasta la séptima fracción, con bajas recuperaciones, Benzo[a] antraceno que es el hidrocarburo más hidrofóbico prácticamente queda retenido en el cartucho.



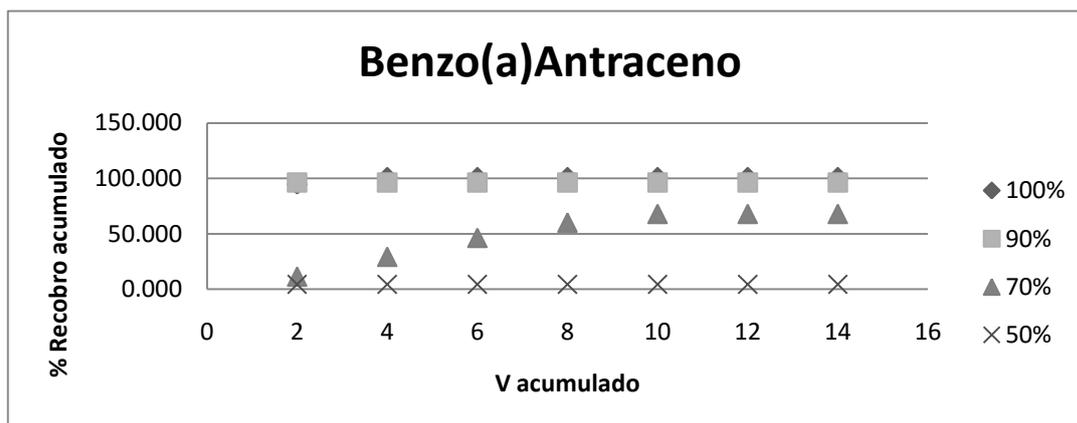


Figura 12. Frentes de elución de los HAP's con distintas proporciones de metanol, correspondientes a las fracciones de 2.0 mL.

De acuerdo a los resultados anteriores se aplicó la siguiente secuencia de elución a la sílice fortificada, para posteriormente aplicarla a la muestra:

- 5 mL de agua. (lavado)
- 2 mL de MeOH al 40 % (lavado), ya que al 50% se presenta fuga de los compuestos
- 2 fracciones de 2.0 mL de MeOH al 100% (elución de los analitos)

En la tabla 20 se presentan los recobros de los analitos que se obtuvieron en cada paso al probar la secuencia de elución mencionada

Tabla 20. Recobros de los analitos con la secuencia de lavados de elución propuesta. Fortificación a  $10 \mu\text{g g}^{-1}$ . Cantidad de fase C-18 utilizada 0.2 g

Analito	5 mL de agua	% Recobro			
		2 mL de MeOH 40%	2 fracciones de 2 mL de MeOH al 100 %		% Recobro acumulado (MeOH 100%)
			1° fracción	2° fracción	
Antraceno	ND	2	65	1	66
Pireno	ND	2	76	2	77
B[a]A	ND	ND	74	ND	74

ND=no detectado

Como se puede observar en la tabla 20, al utilizar los 5.0 mL de agua se tiene buenos resultados como eluyente de limpieza, ya que en esta fracción no se encontró fuga de ninguno de los analitos. Esto era esperado debido a que en

una fase inversa, el agua es un disolvente de fuerza débil con el cual se puede realizar la limpieza de los interferentes polares que podrían encontrarse en la muestra. En el segundo paso con 40% de metanol, se encontró un porcentaje bajo de fuga para los compuestos Antraceno y Pireno. Para evitar esta fuga, se repitió el ensayo modificando el volumen de la fracción de MeOH al 40 % a 1.0 mL, en vez de 2 mL, y se observó que los valores de fuga en los lavados desaparecieron, además de que los valores de recobro globales aumentaron un poco. Otro ajuste adicional que se realizó fue que el analito solo se recolectó en 2 mL de metanol al 100 %, ya que en la segunda fracción se recupera una cantidad muy pequeña de los analitos y afecta más por la dilución del extracto.

Por lo tanto, en la sección siguiente se presentan estas modificaciones que se aplicaron a los análisis subsecuentes con muestra real.

#### **5.1.4.2 DMFS con muestra sin fortificar**

Para evaluar si existían interferencias en los tiempos de retención de los analitos en los cromatogramas de los extractos de la microalga *Spirulina*, se probaron las 4 secuencias de elución mostradas en la tabla 11 de la metodología, las cuales se establecieron tomando de base las pruebas que se realizaron de DMFS sin muestra.

Al aplicar las secuencias 1, 3 y 4 se presentaron algunos inconvenientes en cuanto al eluato final, debido a que se daba como resultado un extracto final de una coloración muy intensa, además de un aparente precipitado, por lo que no se inyectaron en el sistema cromatográfico.

Se optó por la secuencia 2, la cual también presentaba coloración, pero menos intensa que con las otras opciones. En esta secuencia el volumen aplicado inicialmente de agua aumentó, pero no afectó a la fuga de los analitos debido a que el agua tiene una fuerza débil de elución, pero si ayudó a eliminar más pigmentos polares. En la figura 13 se presenta un cromatograma de un extracto obtenido por la secuencia 2 en donde se observa que no existen interferencias en los tiempos de retención de los compuestos de interés.

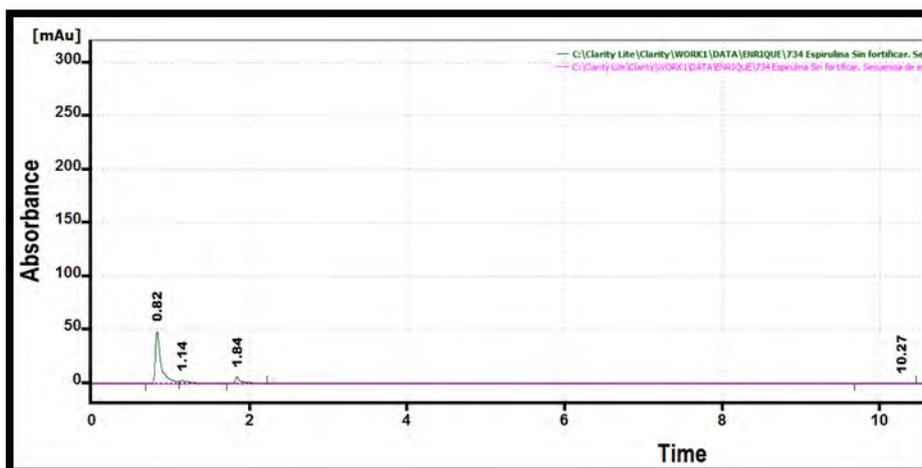


Figura 13. Cromatograma obtenido de extractos de Spirulina sin fortificar. Cantidad de muestra 0.05 g cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 85 % metanol y 15 % agua. Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Secuencia de limpieza 2 (10.0 mL agua desionizada, 1.0 mL metanol 40% y 2.0 mL metanol 100%)

#### 5.1.4.3 DMFS con muestra fortificada

Después de haber elegido la secuencia de elución óptima se procedió a realizar el proceso de dispersión de matriz en fase sólida fortificando la matriz (*Spirulina*) con los analitos para la evaluación de recobros. En la figura 14 se presenta el cromatograma del extracto fortificado con las señales correspondientes a los HAP's, mientras que en la figura 15 se observa el extracto obtenido después de la secuencia de elución. Este aún conservó su coloración verde, pero fue transparente y al inyectarlo no afecto a los picos de interés.

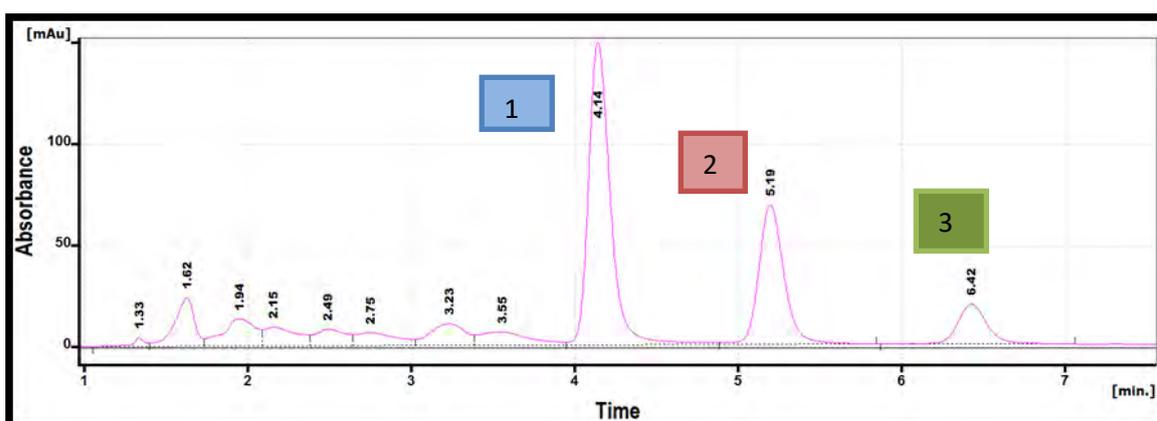


Figura 14. Cromatograma obtenido de extractos de espirulina fortificado a una concentración de 40  $\mu$ g/g de muestra Cantidad de muestra 0.05 g cantidad de fase C18 0.2 g. Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Secuencia 2 (10.0 mL agua pura, 1.0 mL metanol 40% y 2.0 mL metanol 100%). Orden de elución 1. Antraceno 2. Pireno 3. B[a]A



Figura 15. Extracto obtenido para alga *Spirulina* fortificada con HAP's

### 5.1.5. Validación del método de extracción por DMFS-CLAR-UV para HAP's en microalga *Spirulina*

#### 5.1.5.1 Linealidad

Con los ensayos de extracción de los HAP's por DMFS con muestra de *Spirulina* se puede observar que la curva de concentración fortificada vs. área de la Figura 16, presenta buena linealidad para los tres compuestos ya que los coeficientes de correlación para todos mayores a 0.99. Los límites de detección y cuantificación se presentan en la tabla 21.

Tabla 21 .Límites de detección y cuantificación para el método por DMFS con muestra

Compuesto	*L.D.T( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el extracto	*L.C.T ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en el extracto	L.D.T ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de muestra)	L.C.T ( $\mu\text{g}/\text{g}$ de muestra)
Antraceno	<b>0.16</b>	<b>0.49</b>	<b>6.4</b>	<b>19.6</b>
Pireno	<b>0.14</b>	<b>0.42</b>	<b>5.6</b>	<b>16.8</b>
B[a]A	<b>0.17</b>	<b>0.53</b>	<b>6.8</b>	<b>21.2</b>

\*Estimado con el estadístico establecido por la IUPAC. L.D.T= límite de detección teórico.  
L.C.T= límite de cuantificación teórico.

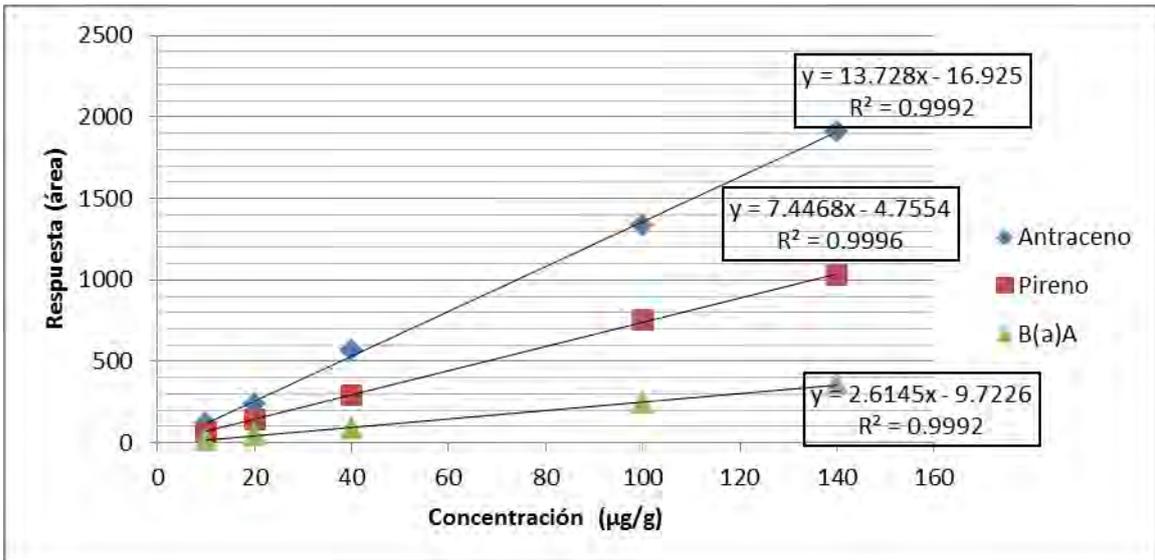


Figura 16. Curva de la concentración fortificada vs respuesta obtenida para los tres analitos, en un intervalo de concentraciones 10-140 µg/g. Muestra alga Spirulina

Se observa que en la figura 16 que la metodología de DMFS fue lineal para los tres analitos probados en el intervalo de concentraciones evaluadas con un coeficiente de correlación mayor a 0.99 para todos los casos. El recobro global que se obtiene a partir de la ecuación de la recta proveniente de graficar µg recuperados de los HAP's vs µg adicionados de los HAP's. Donde se obtuvo un recobro global entre 78 y 82% para los tres compuestos. Estas curvas se presentan en la figura 17 y también demuestran la linealidad del método.

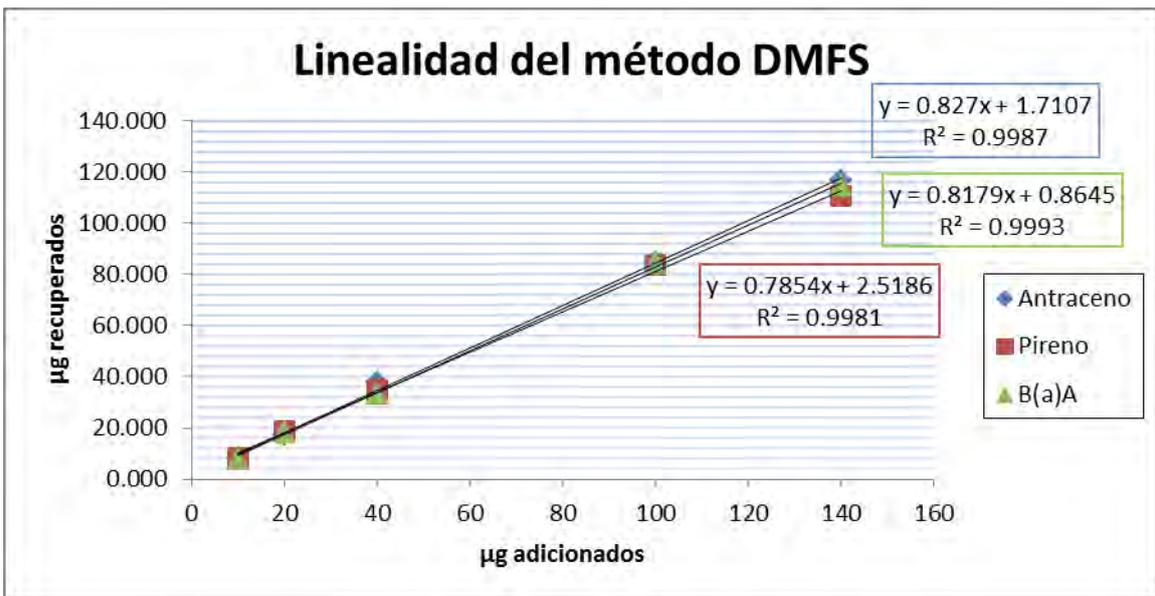


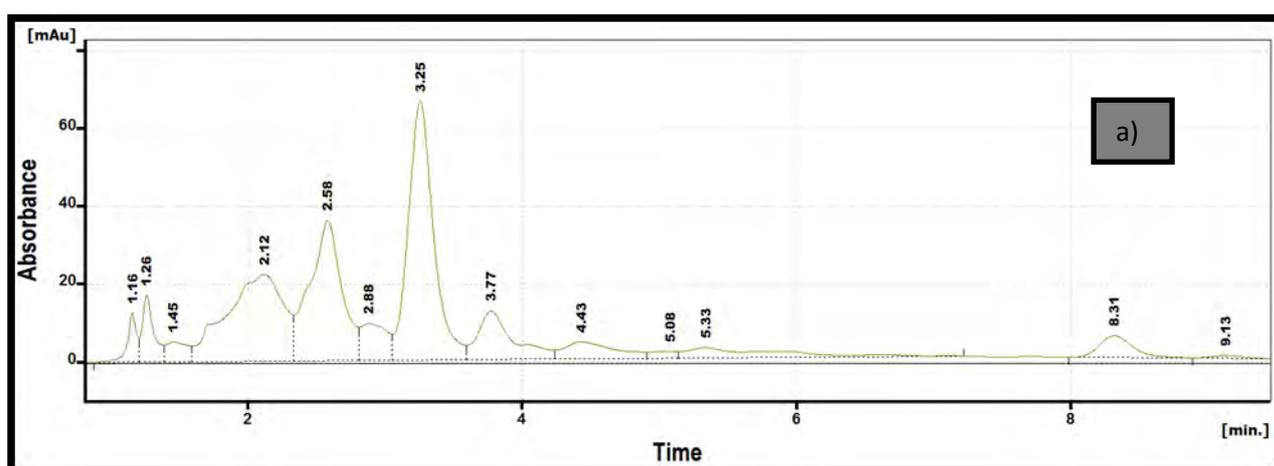
Figura 17. Linealidad del método

### 5.1.5.2 Precisión del método

Para la metodología de DMFS se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad como medidas de precisión. La repetibilidad y reproducibilidad fueron evaluadas a un nivel de fortificación de 40 µg/g de muestra *Spirulina*, el % CV obtenido para un triplicado en un mismo día fue de 2.8 % y en tres diferentes fue de 8.39 %. Estos resultados nos indican que se tiene una buena repetibilidad y reproducibilidad del método.

### 5.1.6 Robustez del método. DMFS en muestras de la microalga *Chlorella* alimenticias

En la figura 18 se observa el cromatograma correspondiente al extracto obtenido de la DMFS, realizando la misma secuencia de lavado y elución que se aplicó para el alga *Spirulina*, para evaluar si existían interferencias en los tiempos de retención de los analitos en los cromatogramas de la matriz con la microalga *Chlorella* por medio de detección UV, su perfil cromatográfico se observa en la figura 18 inciso a), donde se puede apreciar que las señales de los interferentes principalmente se encuentran por debajo de los 4 minutos, sin embargo existe una señal que puede interferir en la cuantificación del compuesto Antraceno ( $t_r = 4.4$  minutos), esto se puede observar en la figura 18 inciso b). Es por ello que se decidió implementar una limpieza del extracto por medio de una co-columna y de esta manera eliminar el pico interferente y facilitar la cuantificación del analito. Los resultados obtenidos se pueden observar en la sección 5.1.6.1.



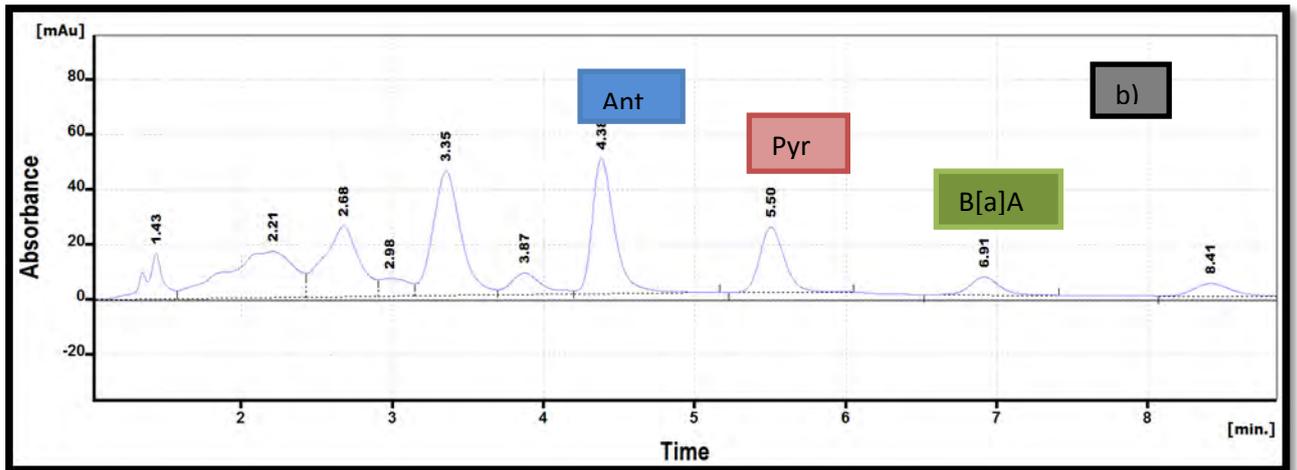


Figura 18. Cromatograma obtenido de extractos de *Chlorella* (a) no fortificado y (b) fortificado a una concentración de 40  $\mu\text{g/g}$  de muestra Cantidad de muestra 0.05 g, cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> · composición constante de 85 % metanol . Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Secuencia 2 (10.0 mL agua pura, 1.0 mL metanol 40% y 2.0 mL metanol 100%).

### 5.1.6.1 Limpieza de extractos DMFS por medio de co-columna EFS

En las figuras 19 a 22, se presentan los cromatogramas obtenidos después de haber realizado el “clean-up” por EFS con los adsorbentes probados. El extracto DMFS obtenido (metanol) se aplicó a una co-columna con diferentes adsorbentes. En primer lugar se utilizó una adsorbente LC-Si el cual no benefició en la eliminación de interferentes de la matriz. (Fig. 19)

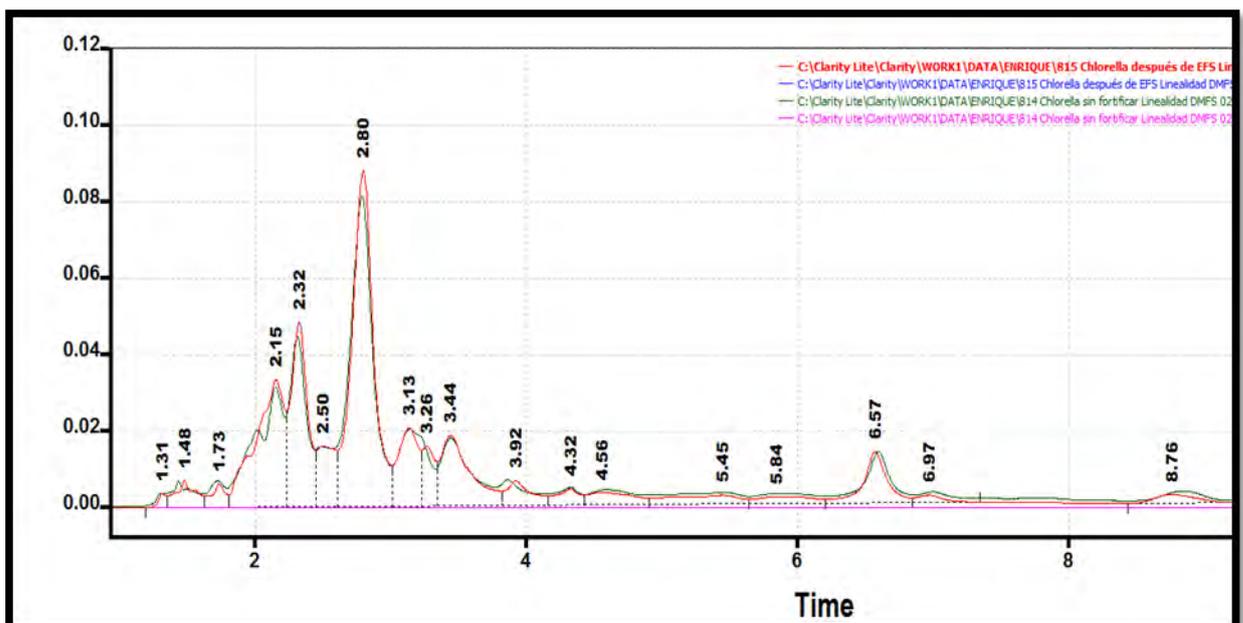


Figura 19. Cromatograma. Comparación de DMFS *Chlorella* sin fortificar (verde) vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con adsorbente LC-Si (rojo).

Por lo que se optó por probar el adsorbente Florisil (silicato magnésico), el cromatograma correspondiente se presenta en la figura 20, donde se observa la comparación con el cromatograma del extracto de la matriz (*Chlorella*) obtenido con solo la DMFS, y se identificó que prácticamente es el mismo perfil, por lo que se decidió que esta fase sólida no es la indicada para eliminar los interferentes.

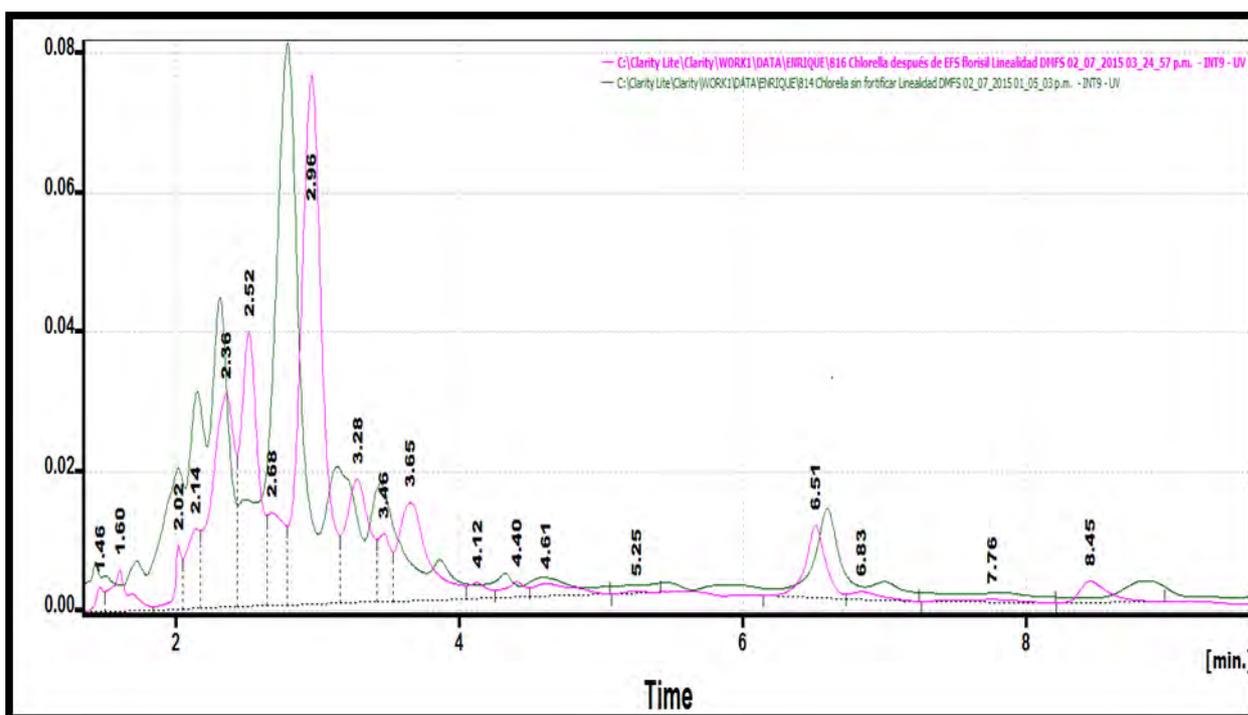


Figura 20. Cromatograma. Comparación de extracto DMFS *Chlorella* sin fortificar (verde) vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con adsorbente Florisil (rosa).

A continuación se probó el adsorbente amino (100 mg) y se comparó el extracto obtenido al aplicarlo con el cromatograma correspondiente a la matriz sin “clean-up”. Con este adsorbente se mejoró la calidad del cromatograma, debido a la disminución de los interferentes desde el intervalo de las señales con un tr de 1 minuto hasta 4.4 minutos. Siendo importante ya que podría verse afectada la cuantificación del analito Antraceno por un interferente (tr=4.4 minutos).

Lo siguiente fue comprobar si el aumento de la cantidad de fase amino (200 mg), mejoraría la eliminación de interferentes, el cromatograma correspondiente se presenta en la figura 22, en donde se observa que prácticamente todas las señales interferentes son eliminadas y aún más

importante permite la cuantificación de todos nuestros HAP's sin ningún inconveniente.

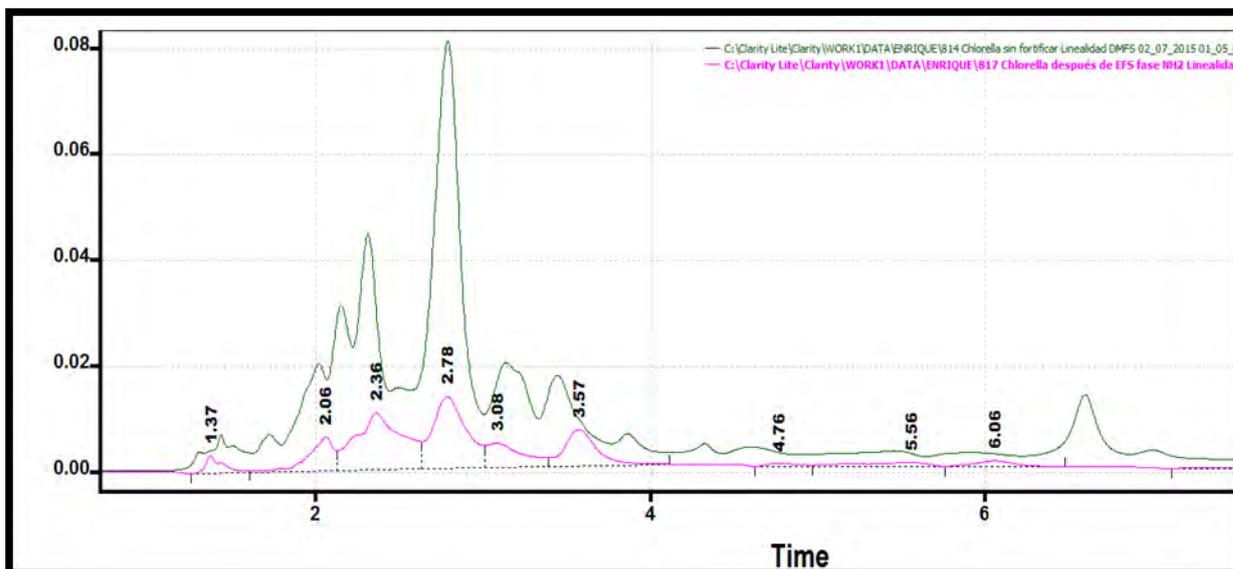


Figura 21. Cromatograma Comparación de DMFS *Chlorella* sin fortificar (verde) vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con 100 mg de adsorbente amino (rosa)

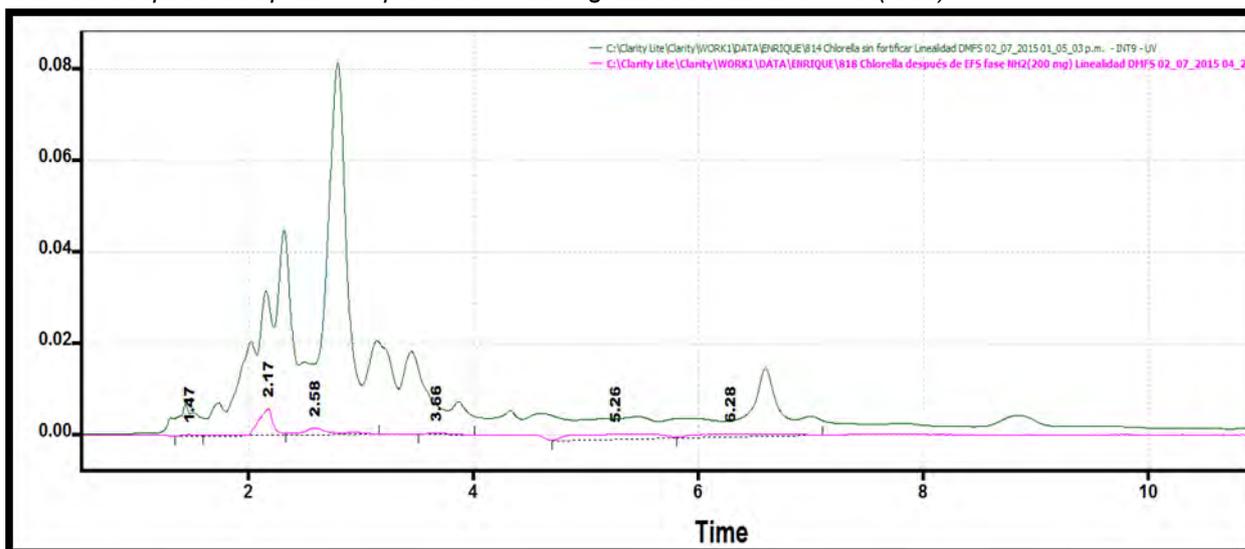


Figura 22. Cromatograma. Comparación de DMFS *Chlorella* sin fortificar (verde) vs extracto obtenido después de aplicar limpieza con 200 mg de adsorbente amino (rosa)

Observando estos resultados, se eligió como adsorbente de limpieza a la fase amino porque se observó que existe una relación directa de la cantidad utilizada con respecto a la eliminación de interferentes. Es decir, disminuyen las señales de las interferencias de mejor forma si se usan 200 mg en lugar de 100 mg. En la figura 23 puede observarse la diferencia en la coloración del extracto obtenido para el alga *Chlorella* después de la DMFS con C18 y el

extracto después de haber realizado el proceso de “clean up” con 200 mg de fase amino.



Figura 23. Extracto de alga *Chlorella*. Imagen de la izquierda obtenida después de la DMFS. Extracto pasado a través de la fase amino (Derecha)

Por último se realizó la fortificación del alga *Chlorella sp* a un nivel de 40 µg/g para verificar si los analitos podían recuperarse cuantitativamente se realizó el proceso de extracción con el método de DMFS propuesto para el alga *Spirulina* y el “clean up” con fase amino. Los cromatogramas de diferentes extractos se observan en la figura 24.

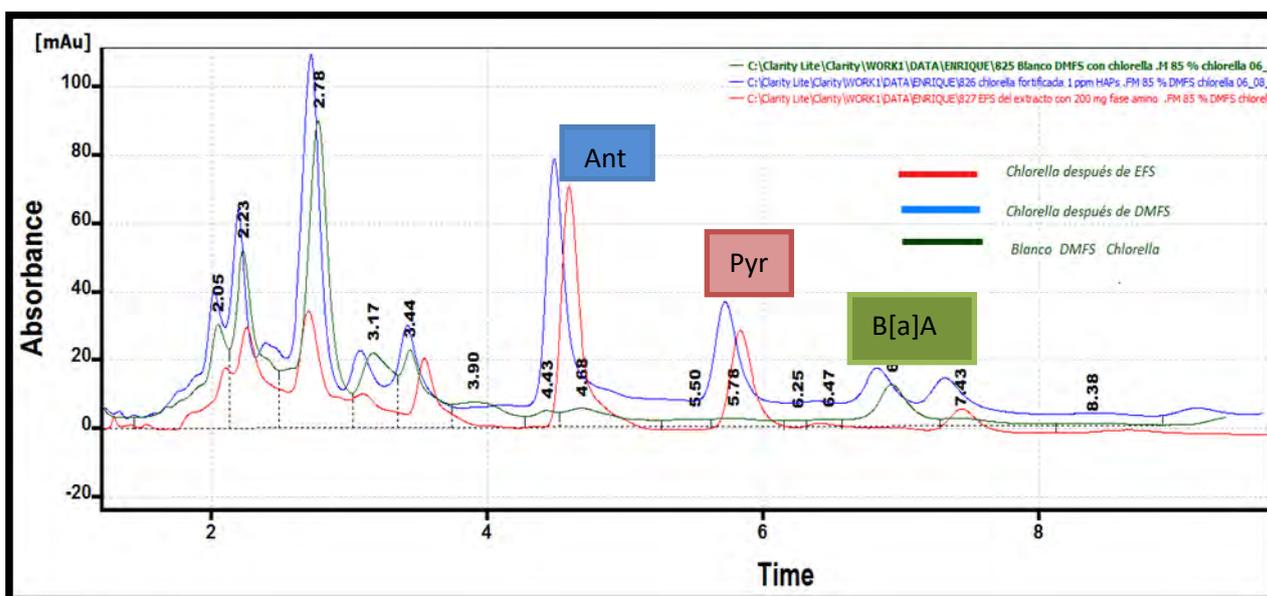


Figura 24. Cromatograma obtenido de extractos de *Chlorella* no fortificado, fortificado y aplicando la limpieza con adsorbente amino (200 mg) a una concentración de 40 µg/g de muestra Cantidad de muestra 0.05, cantidad de fase C18 0.2 g. Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5 µ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. composición constante de 85 % metanol. Longitud de onda 243 nm. Detección UV. Secuencia 2 (10.0 mL agua pura, 1.0 mL metanol 40% y 2.0 mL metanol 100%).

Donde se puede identificar que los compuestos se recuperan en una buena proporción (80-85%) que es muy similar a lo observado en *Spirulina*, además de que se eliminan de forma notoria algunas de las señales ajenas a los compuestos que salen al principio del cromatograma.

### 5.1.6.2 Detección de los HAP's en los extractos por fluorescencia

La detección de fluorescencia es más selectiva que la detección UV, por lo que los cromatogramas deben de mostrarse más limpios en este caso, además de que las señales de los HAP's son mayores debido a los límites de detección mucho más bajos. Por lo tanto, se realizó una prueba para identificar el perfil cromatográfico de la matriz en las muestras fortificadas a un nivel de  $0.4 \mu\text{g/g}$  (cien veces menos que la concentración utilizada con el método de detección UV) de nuestra mezcla de HAP's. A continuación se presentan En las figuras 25 y 26, los cromatogramas correspondientes para el alga *Spirulina* y el alga *Chlorella*.

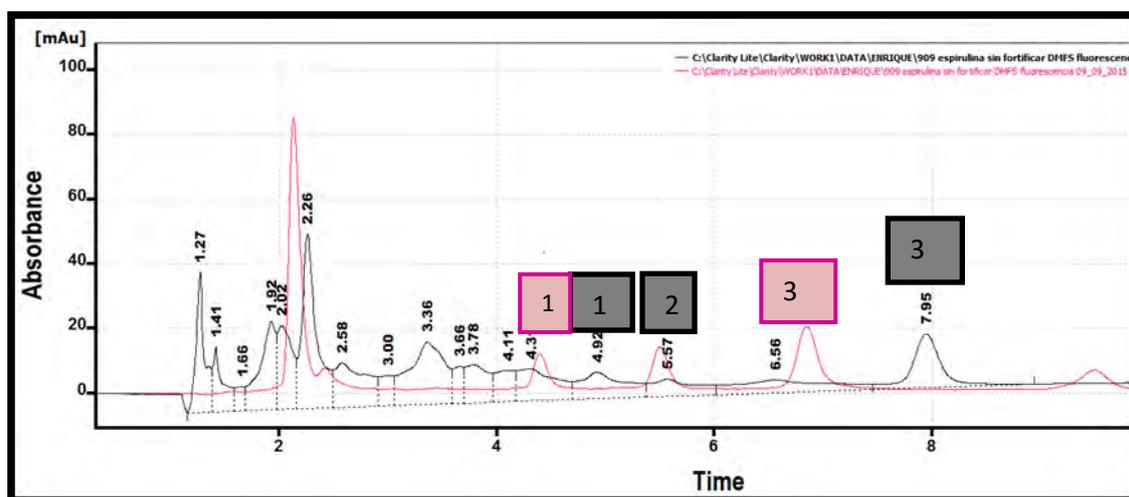


Figura 25. Cromatograma obtenido de extractos de *Spirulina* fortificado a una concentración de  $0.4 \mu\text{g/g}$  de muestra Cantidad de muestra  $0.05 \text{ g}$ , cantidad de fase C18  $0.2 \text{ g}$ . Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm)  $150 \times 4.6$  tamaño de partícula ( $5 \mu$ ) C18 fase móvil a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  composición constante de 85 % metanol. Detección UV (negro) y detección por fluorescencia (rosa)  $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$  (Olmos 2013) Orden de elución 1. Antraceno 2. Pireno 3. B[a]A

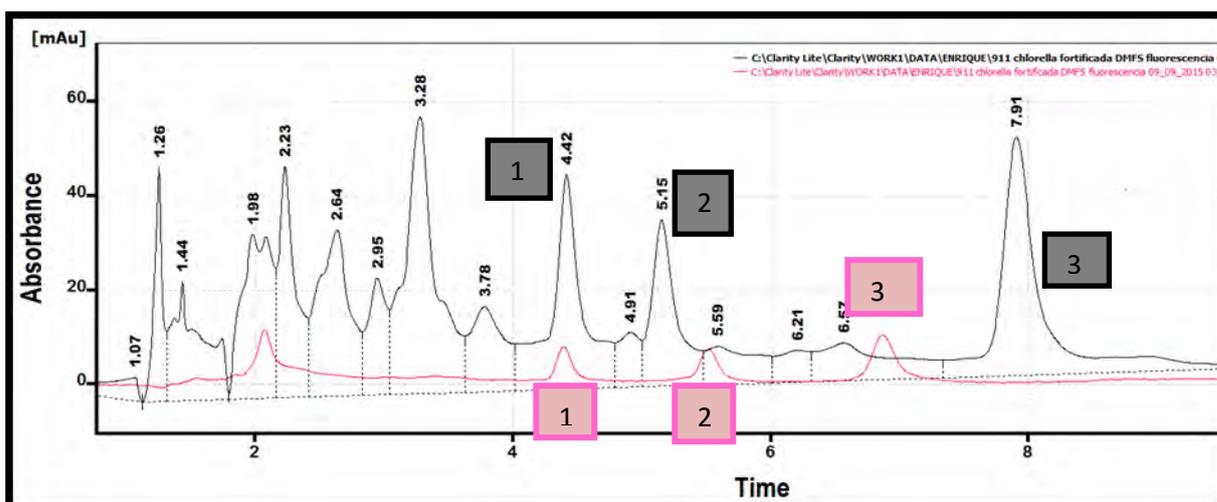


Figura 26. Cromatograma obtenido de extractos de *Chlorella* fortificado a una concentración de 0.4  $\mu\text{g/g}$  de muestra para fluorescencia y 40  $\mu\text{g/g}$  para UV. Cantidad de muestra 50 mg, cantidad de fase C18 200 mg. Columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu\text{m}$ ) C<sub>18</sub> fase móvil a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> composición constante de 85 % metanol. Detección UV (negro) y detección por fluorescencia (rosa)  $\lambda_{\text{ex}} = 263$   $\lambda_{\text{em}} = 410$  nm. Orden de elución 1. Antraceno 2. Pireno 3. B[a]A.

Al comparar los cromatogramas con las dos diferentes detecciones, se observa que como se esperaba, en detección por UV se presentan muchos picos adicionales a nuestros analitos a comparación de los cromatogramas obtenidos por fluorescencia. Esto debido a que la detección es más selectiva por fluorescencia, y porque los picos que aparecen en UV probablemente no presentan grupos fluorescentes que permitan su detección. Por lo tanto, no es necesario aplicar el paso de “clean up” para cuando se usa este tipo de detección y los límites de detección que reportan para muestras biológicas (Gul et al. 2015; Garcia Londoño et al. 2015; Tfouni et al. 2014) y que oscilan desde 2  $\mu\text{g L}^{-1}$  hasta 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ , aunque no se determinaron aquí, son aproximadamente 100 veces menores.

Algo que es muy importante resaltar es que el uso del detector de fluorescencia permite inyectar directamente los extractos que se obtienen en DMFS, evitando el paso de limpieza por EFS con el adsorbente amino, el cual es imprescindible cuando la detección es en UV. La gran respuesta y selectividad del detector de fluorescencia nos permite alcanzar límites de detección menores que los obtenidos con el detector UV, además de simplificar el procedimiento y disminuir el consumo de tiempo y recursos. Cabe destacar que en el presente trabajo se efectuó la optimización y validación del método con detección UV por solo contar con tiempo limitado para el uso del detector de fluorescencia.

## **5.2 Glifosato**

### **5.2.1 Análisis cromatográfico y detección por CLAR-UV y CLAR-Fluorescencia**

#### **5.2.2 Establecimiento de las condiciones óptimas de detección**

La reacción de derivación que se realizó tiene las siguientes ventajas a comparación de otros métodos reportados:

- Se requiere una menor cantidad de derivatizante, lo cual es conveniente para tener un menor gasto de reactivo.
- El número de reactivos utilizados es menor
- La reacción se lleva a cabo en un tiempo de 30 minutos debido a que la reacción es de cinética lenta, lo que permite que sea de forma cuantitativa.
- Adicional a esto se pudieron obtener resultados reproducibles.

El inconveniente con este proceso es que la concentración del reactivo derivatizante es alta (1000 ppm) para la detección por fluorescencia, lo que provoca que el detector se sature cuando se realiza alguna inyección, por lo cual es necesario utilizar el éter etílico para realizar dos extracciones con disolvente (ELL), para quitar el exceso de FMOC e inyectar la fracción acuosa con menos exceso de derivatizante para su posterior análisis. Por esta razón, aquí se describen los ensayos y resultados obtenidos en la derivatización al disminuir la concentración del FMOC-Cl, en un esfuerzo por disminuir el uso de reactivos e interferentes.

La reacción de derivación se realizó a diferentes concentraciones de agente derivatizante 10, 100 y 1000 ppm. Para todos los ensayos se obtuvo un pico bien definido para el derivado de glifosato y se descartó la concentración de 10 ppm de FMOC-Cl debido a que la respuesta del detector disminuyó a comparación de las otras dos concentraciones estudiadas. Se observa en la tabla 22 los valores correspondientes de las áreas obtenidas para glifosato.

#### **5.2.3 Condiciones óptimas para detección UV.**

En el anexo 1 se muestran los valores obtenidos con ayuda del detector UV, así como el espectro y la longitud de máxima absorción que corresponde a un valor de 215 nm.

Tabla 22. Concentraciones probadas de FMOC-Cl en la derivación del glifosato a concentración de 100 µg/L (n=3)

Concentración FMOC –Cl (ppm)	Área promedio (fluorescencia)	% C.V
10	540.23	15.51
100	1093.15	8.08
1000	1469.85	4.76

Para el caso de 100 y 1000 ppm la diferencia de áreas no fue notable, por lo que se eligió la de 100 ppm, además de que su coeficiente de variación no es muy alto. Sin embargo el reducir la concentración no fue suficiente para impedir que el detector se saturara con el exceso de reactivo derivatizante, fue necesario incluir por lo menos un solo paso de extracción con éter dietílico. De esta manera se pudo disminuir 10 veces el gasto de reactivo derivatizante.

#### 5.2.4 Establecimiento de las condiciones cromatográficas para el análisis del derivado de Glifosato

Se estudió el comportamiento de retención del derivado del glifosato por cromatografía de reparto en fase inversa a diferentes proporciones de metanol y agua en la fase móvil.

En la tabla 23 se muestran los parámetros de retención obtenidos del derivado del glifosato y en la figura 27 la gráfica del log k' en función del % MeOH en la fase móvil.

Tabla 23. Parámetros de retención para el compuesto glifosato

% MeOH	t	k'	log k'
40	1.65	0.130	-0.886
30	2.007	0.375	-0.426
20	3.277	1.245	0.095

*El valor de  $t_m$  utilizado es 1.46 min.*

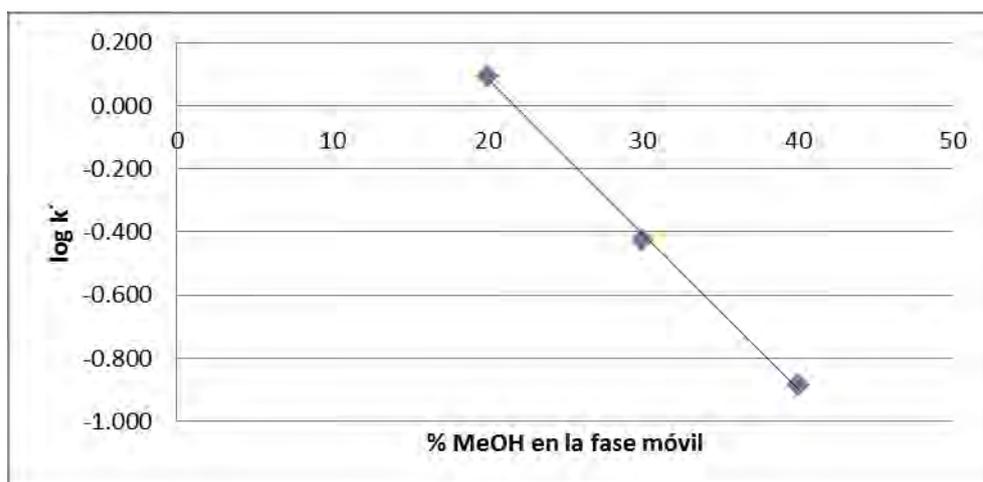


Figura 27. Variación del factor del log del factor de retención ( $k'$ ) del derivado del glifosato en función del porcentaje de metanol en la fase móvil columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula ( $5 \mu$ )  $C_{18}$ . Flujo  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$

Si se observa la figura 27 y se toma en cuenta que el valor del logaritmo  $k'$  de este compuesto tiene un valor negativo, se evidencia que se trata de un compuesto muy polar, lo que implica que no sea favorable su retención en la columna  $C_{18}$  (adsorbente apolar). La diferencia tan grande en polaridades entre el glifosato comparada con las de los HAP's estudiados previamente, define que las estrategias para su extracción sean también muy diferentes entre estos dos tipos de compuestos.

Sin embargo, si se considera que la formación de sus derivados correspondientes añade grupos cromóforos a su estructura y disminuye el carácter polar del analito original, permite que mejore su retención en una columna de fase reversa así como sus características de detección, logrando una mayor precisión y exactitud en su análisis y entonces, si la derivatización se efectúa después de la extracción, se puede retener en la columna analítica  $C_{18}$  como derivado con fase móvil con una composición de 85% MeOH y 15 % agua.

## 5.2.5 Validación del sistema cromatográfico CLAR-UV

### 5.2.5.1 Linealidad del sistema CLAR-UV

En la figura 29 se observa el cromatograma que se obtuvo después de haber realizado el proceso de derivación de una alícuota de 1.0 mL de una solución

estándar de glifosato a una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , donde se puede identificar que el derivado del glifosato tiene un  $t_r=3.2 \text{ min}$ .

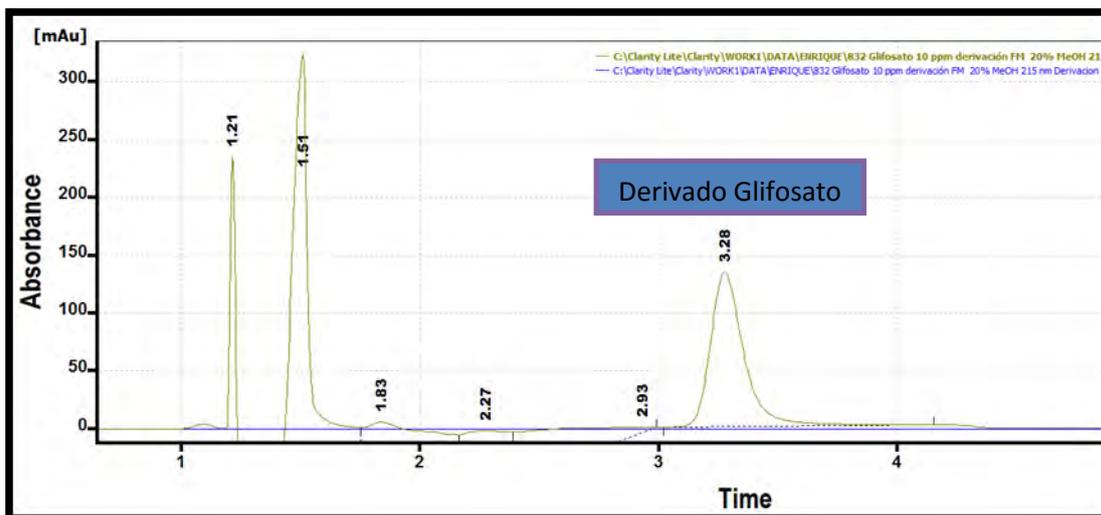


Figura 28. Cromatograma obtenido de la derivación de una disolución estándar de glifosato a una concentración de  $10 \mu\text{g /mL}$ . Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm)  $150 \times 4.6$  tamaño de partícula ( $5 \mu$ )  $C_{18}$  fase móvil a un flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  composición constante de 20 % metanol y 80 % agua  $\text{pH}= 6.4$  . Detección UV  $\lambda=215 \text{ nm}$

En la figura 29 se muestra la curva de calibración para el compuesto en el intervalo elegido. Los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) obtenidos para ambos compuestos fueron mayores a 0.99 lo que nos indica que la respuesta del detector UV con respecto a la concentración del analito es lineal.

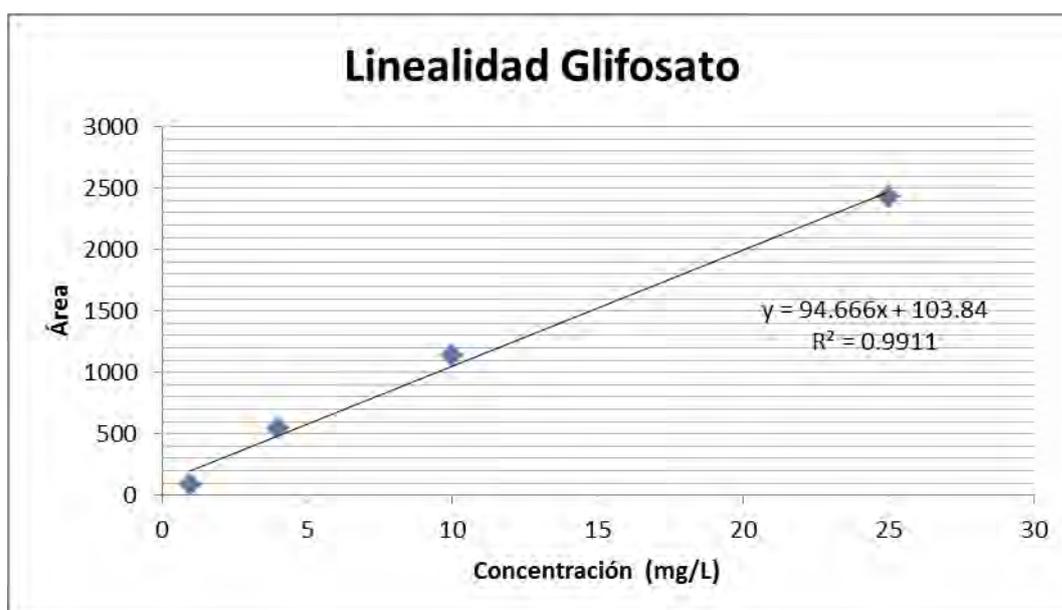


Figura 29. Linealidad del derivado del glifosato en detección por UV

La precisión del sistema CLAR-UV se evaluó con los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. Para los ensayos de repetibilidad se obtuvo un % CV de 2.70 y reproducibilidad 15.05 % para el compuesto glifosato.

#### 5.2.5.2 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección experimental determinado para este sistema se encuentra a un nivel de 0.1 mg L<sup>-1</sup> para el derivado del glifosato, se observaba la señal, pero ya no era posible su integración y cuantificación, el límite de cuantificación teórico corresponde a 0.69 mg L<sup>-1</sup>.

#### 5.2.6 Validación del sistema CLAR-DF

##### 5.2.6.1 Linealidad del sistema

En la figura 30 se muestra las curvas de calibración el compuesto de interés en el intervalo elegido. Los coeficientes de determinación ( $r^2$ ) obtenidos para ambos compuestos fueron mayores a 0.99 lo que nos indica que la respuesta del detector de fluorescencia con respecto a la concentración del analito es lineal.

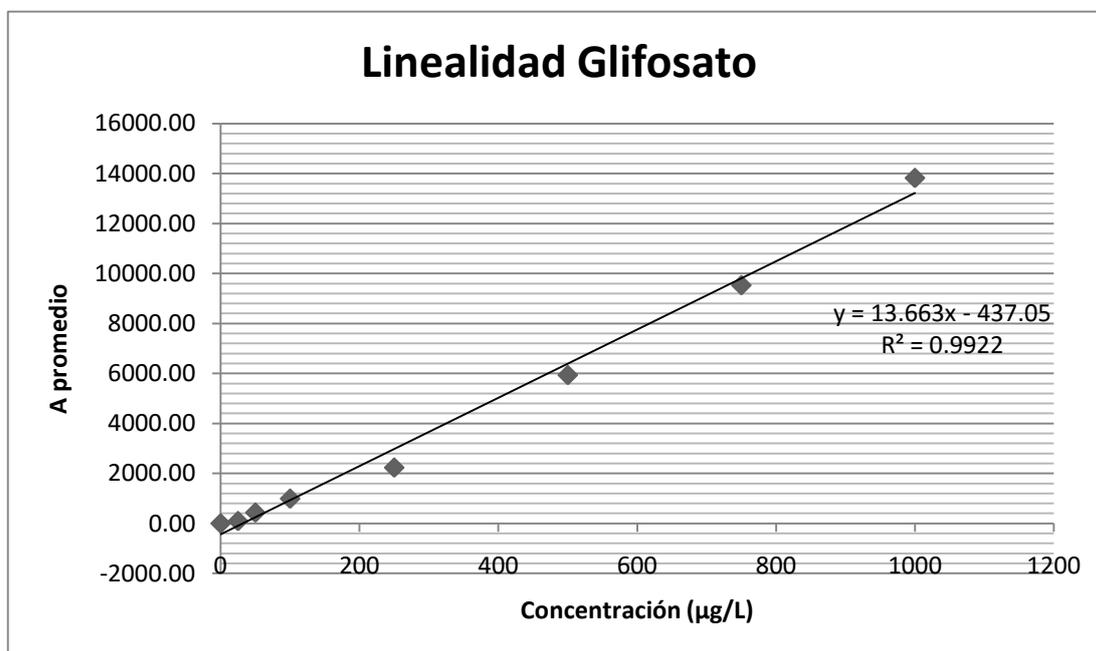


Figura 30. Linealidad del compuesto derivado del glifosato en detección por fluorescencia

La precisión del sistema CLAE-DF se evaluó con los ensayos de repetibilidad y reproducibilidad. Para los ensayos de repetibilidad se obtuvo un % CV de 3.8 y reproducibilidad 4.89 % para el compuesto glifosato.

### 5.2.6.2 Límite de detección y cuantificación

El límite de detección experimental determinado para este sistema se encuentra a un nivel de 5 µg L<sup>-1</sup> para el analito glifosato. Los valores restantes para este sistema pueden observarse en la tabla 24.

Tabla 24 .Límites de detección y cuantificación

<b>Compuesto</b>	<b>L.D.E (µg/L)</b>	<b>L.C.E (µg/L)</b>	<b>*L.D.T(µg/L)</b>	<b>*L.C.T (µg/L)</b>
<i>Glifosato</i>	<b>5.0</b>	<b>16.5</b>	<b>8.56</b>	<b>28.24</b>

*\*Estimado con el estadístico establecido por la IUPAC. L.D.E= límite de detección experimental. L.C.E= límite de cuantificación experimental. L.D.T= límite de detección teórico. L.C.T= límite de cuantificación teórico.*

### 5.2.7 Establecimiento de las condiciones óptimas para la extracción por DMFS

#### 5.2.7.1 DMFS de glifosato en fase amino

A continuación se muestran los resultados para los ensayos de DMFS en fase amino fortificada con soluciones estándar del glifosato. La optimización de la metodología de extracción se efectuó con el análisis por CLAR-UV por solo contar con tiempo limitado para el uso del detector de fluorescencia.

Así, a partir de un estándar de 200 mg/L de Glifosato se tomó una alícuota de 40 µL (equivalente a 8 µg del compuesto) para fortificar 500 mg de la fase amino, además se añadieron 60 µL de HNO<sub>3</sub> 1 mol/L y se dejó reposar por un periodo de aproximadamente una hora. Posterior a este tiempo se mezcló de forma homogénea con ayuda de un mortero de ágata y se empacó en un cartucho. Para recuperar al analito se utilizaron 15 mL de buffer de fosfatos pH=7 C= 5 mmol/L. Divididos en fracciones de 2.5 mL cada una.

Para la preparación del control se tiene la siguiente concentración de Glifosato

$$C = \frac{(200 \text{ ppm})(40 \mu\text{L})}{2500 \mu\text{L}} = 3.2 \text{ ppm}$$

### 5.2.7.2 Lavado con agua

Se hicieron ensayos de DMFS con 250 y 500 mg de adsorbente amino; se pasó agua por el cartucho de extracción con el objeto de verificar si algo del soluto se fugaba en esta condición; no se observó la señal del analito al analizar estas fracciones, concluyendo que el agua no es capaz de eluir al glifosato en las condiciones probadas, pero sí podría eluir algunas interferencias muy polares.

### 5.2.7.3 Elución de glifosato con *buffer* de fosfatos (pH=7, C= 5 mmol/L)

Al cartucho de DMFS-NH<sub>2</sub> que contiene retenido el analito glifosato (solución estándar) se le pasó *buffer* de fosfatos (pH=7, C=5 mmol/L) para poder eluirlo y recuperarlo. Para esto se realizó un fraccionamiento de 6 volúmenes de 2.5 mL, para verificar el volumen de *buffer* necesario para eluir el compuesto Glifosato casi en su totalidad. Se realizó la prueba, para dos cantidades distintas de adsorbente amino para determinar si existía alguna diferencia considerable en el porcentaje de recuperación después de haber realizado la elución en el cartucho correspondiente. Obteniéndose los resultados reportados en la Tabla 25:

Tabla 25. Elución del compuesto glifosato con 6 fracciones de 2.5 mL de *buffer* de fosfatos pH=7; C= 5mmol/L

Fracción	Volumen de fracción ( <i>buffer</i> de fosfatos)	V acumulado	500 mg fase amino		250 mg fase amino	
			%R	%R acumulado	%R	%R acumulado
1	2.5	2.5	3	3	1	1
2	2.5	5	5	8	1	2
3	2.5	7.5	8	16	1	3
4	2.5	10	27	44	14	16
5	2.5	12.5	70	114	50	66
6	2.5	15	4	118	23	89

Se observa que la mayor parte del soluto se recupera a partir de la cuarta fracción (10 mL acumulado) y que requerimos un volumen cercano a 15 mL para lograr una elución cuantitativa del analito.



Figura 31. Comparación de la elución del glifosato por DMFS utilizando 250 y 500 mg de fase amino y elución con buffer fosfato pH=7

### 5.2.8 Retención en el intercambiador SAX-Cl

En el intercambiador SAX en su forma Cl, el glifosato puede retenerse debido que a ese valor de pH=7 en el buffer de fosfatos, que es donde se encuentra después de haberse realizado la DMFS, la especie predominante contiene dos cargas negativas lo que favorece a que pueda desplazar a los aniones cloruro y retenerse en el intercambiador. Se considera que el mecanismo implicado en la retención del glifosato es del tipo intercambio iónico, donde el glifosato es retenido con una mayor facilidad que los aniones fosfato provenientes del *buffer*.

Por lo tanto, el extracto que se obtuvo después de la dispersión en el cartucho de fase amino, se pasó a través de un cartucho de SAX-Cl previamente acondicionado, para retener al analito, pero también para eliminación de picos interferentes que no se retienen en el intercambiador. La apariencia de este extracto proveniente de una muestra de *Spirulina* puede observarse en la figura 32.



Figura 32. Extractos obtenidos para alga *Spirulina*. Izquierda: directamente después de la DMFS y derecha: después de DMFS más el SAX-CI

### 5.2.8.1 Evaluación del proceso de EFS con intercambiador SAX-CI

La recuperación del cartucho de SAX-CI, se realizó con ayuda de una disolución de HNO<sub>3</sub> 0.01 mol/L en 4 fracciones de 5 mL cada una. Se observó que la mayor recuperación a partir de la tercera fracción (15.0 mL), sin embargo se eligió utilizar el volumen de 20.0 mL debido a que en la última fracción aún se puede recuperar una cantidad considerable del compuesto Glifosato. Se obtiene un valor global promedio de R=70 % con un %CV de 17% (n=3) en la suma de todas las fracciones.

Tabla 26. Elución del compuesto glifosato en el intercambiador SAX con HNO<sub>3</sub> 0.01 mol/L

V fracción (mL)	V acumulado (mL)	% R			% R acumulado		
		8	11	8	8	11	8
5.0	5.0	8	11	8	8	11	8
5.0	10.0	23	13	31	31	24	39
5.0	15	46	32	11	77	56	49
5.0	20	8	16	3	<b>85</b>	<b>72</b>	<b>53</b>

En las figuras 33 y 34 se presentan los cromatogramas CLAR-UV correspondientes a *Chlorella* y *Spirulina* realizando la DMFS solo y la DMFS-EFS con el intercambiador de aniones. Se observa que aun cuando se tiene una detección UV no selectiva a diferencia de la detección por fluorescencia, los cromatogramas no presentan interferencias en el tiempo de retención del glifosato dado lo selectivo del *clean up*.

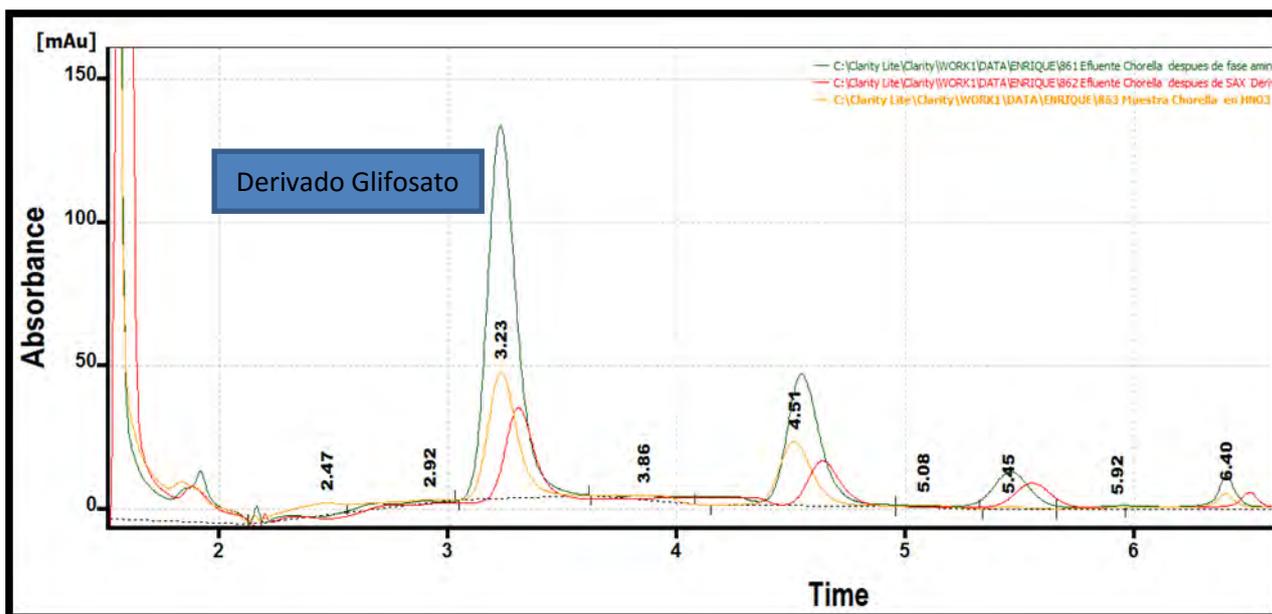


Figura 33. Cromatograma donde se realiza la comparación de extracto de alga *Chlorella* (nivel de fortificación 0.4  $\mu\text{g/g}$ ) después de la DMFS con adsorbente amino (verde), el extracto DMFS (rojo) y el extracto DMFS-SAX (naranja). Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ )  $C_{18}$  fase móvil a un flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , composición constante de 20 % metanol y 80 % agua pH= 6.4 . Detección UV  $\lambda=215 \text{ nm}$

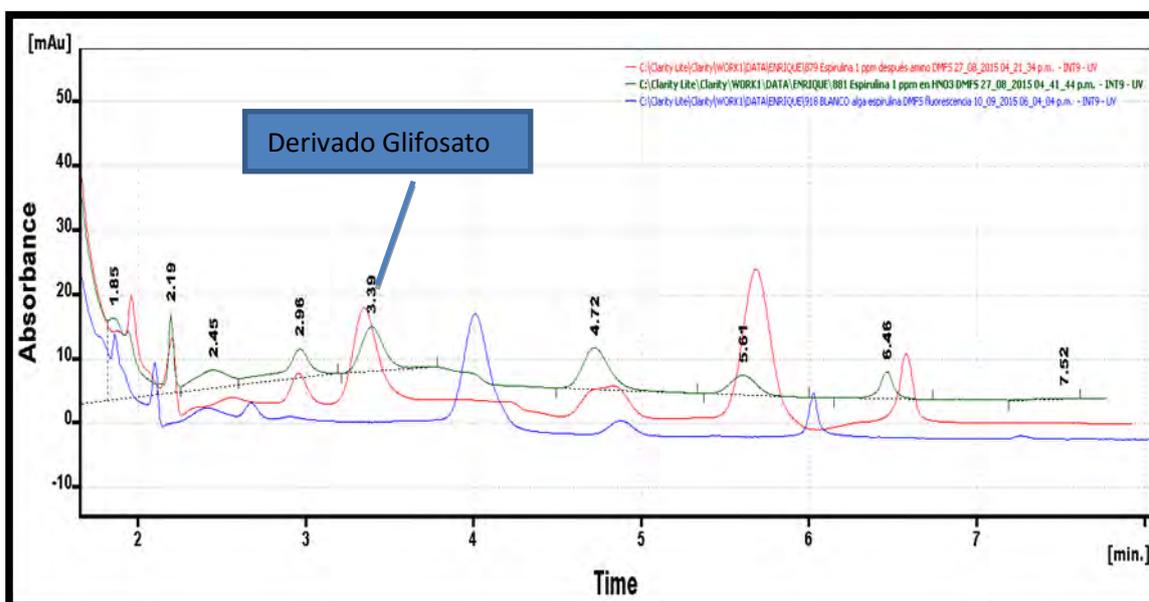


Figura 34. Cromatograma donde se realiza la comparación del blanco de matriz (azul), extracto de alga *Spirulina* después de la DMFS con adsorbente amino (rojo) y el extracto final después de DMFS-SAX (verde). Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ )  $C_{18}$  fase móvil a un flujo de 1  $\text{mL min}^{-1}$ , composición constante de 20 % metanol y 80 % agua pH= 6.4 . Detección UV  $\lambda=215 \text{ nm}$

Se observa en ambos casos que se encuentran señales interferentes pero no afectan al GLY Además de que cuando se realiza el “clean up” por EFS con el intercambiador, algunas señales disminuyen su tamaño, sin embargo no es un cambio considerable. Adicional a esto se fuga un porcentaje de nuestro compuesto en el paso del extracto de DMFS al cartucho del intercambiador. Se tiene un valor %R de 78.3 % con un %CV de 2.65% (n=3)

### 5.2.9 Validación del método de extracción por DMFS-SAX-CLAR-UV para Glifosato en microalga *Spirulina*.

Con los ensayos de extracción Glifosato por DMFS con muestra de *Spirulina* se puede observar que la curva de concentración fortificada vs área de la Figura 35, presenta buena linealidad para el compuesto ya que el coeficiente de determinación es mayor a 0.99.

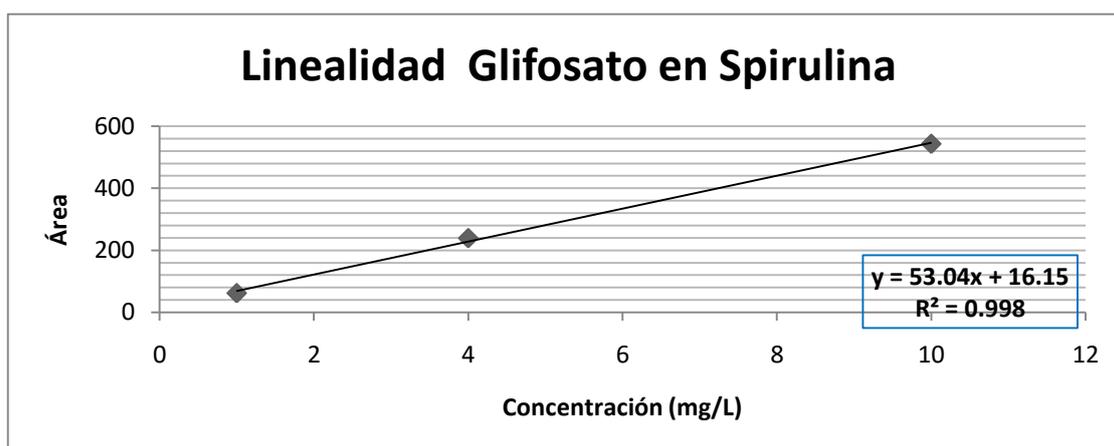


Figura 35. Curva de la concentración vs respuesta obtenida para Glifosato, en un intervalo de concentraciones 1 -10 mg/L. Muestra alga *Spirulina*

El límite de detección experimental obtenido corresponde a 0.5 mg/L mientras que el límite de cuantificación teórico tiene un valor fue de 1.80 mg/L. Para la metodología de DMFS se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad como medidas de precisión. La repetibilidad y reproducibilidad fueron evaluadas a un nivel de fortificación de 0.4 µg/g de muestra *Spirulina*, el % CV obtenido para un triplicado en un mismo día fue de 2.65 % y en tres diferentes fue de 4.26 %. Estos resultados nos indican que se tiene una buena repetibilidad y reproducibilidad del método.

El intervalo de concentraciones a las que se fortificó el alga *Spirulina* presentó un comportamiento lineal con  $r^2$  mayor a 0.99 después de haber realizado toda la metodología completa el porcentaje de recuperación global de la metodología corresponde solo a un 45.47 %, la curva de linealidad del método (cantidad adicionada vs cantidad recuperada) correspondiente se observa en la figura 36.

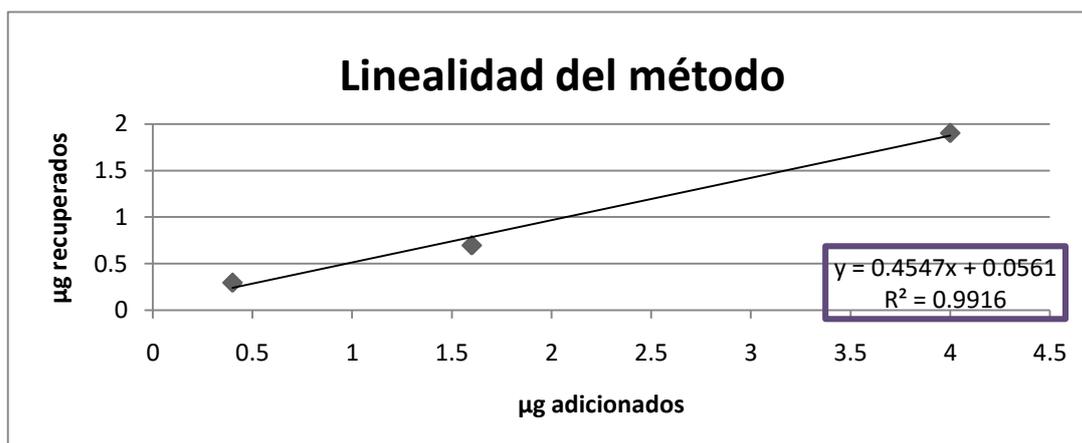


Figura 36. Cantidad de Glifosato recuperado en función de la cantidad de Glifosato adicionada la muestra de alga *Spirulina*

#### 5.2.9.1 Ensayo detección por fluorescencia

Se realizaron pruebas para ver el perfil cromatográfico del extracto DMFS-SAX por detección en fluorescencia, para esto se obtuvo un extracto de Glifosato con las condiciones óptimas y fortificado a concentraciones 100 veces menor a las que se manejaron en UV. En la figuras 37 y 38 se tienen los cromatogramas correspondientes a los extractos de *Spirulina* y *Chlorella*, donde se tiene integrado el blanco correspondiente a la matriz sin fortificar, el cromatograma del extracto obtenido después del proceso de DMFS en el cartucho de la fase amino y por último el perfil cromatográfico del extracto después de haber utilizado el intercambiador SAX para la secuencia de limpieza.

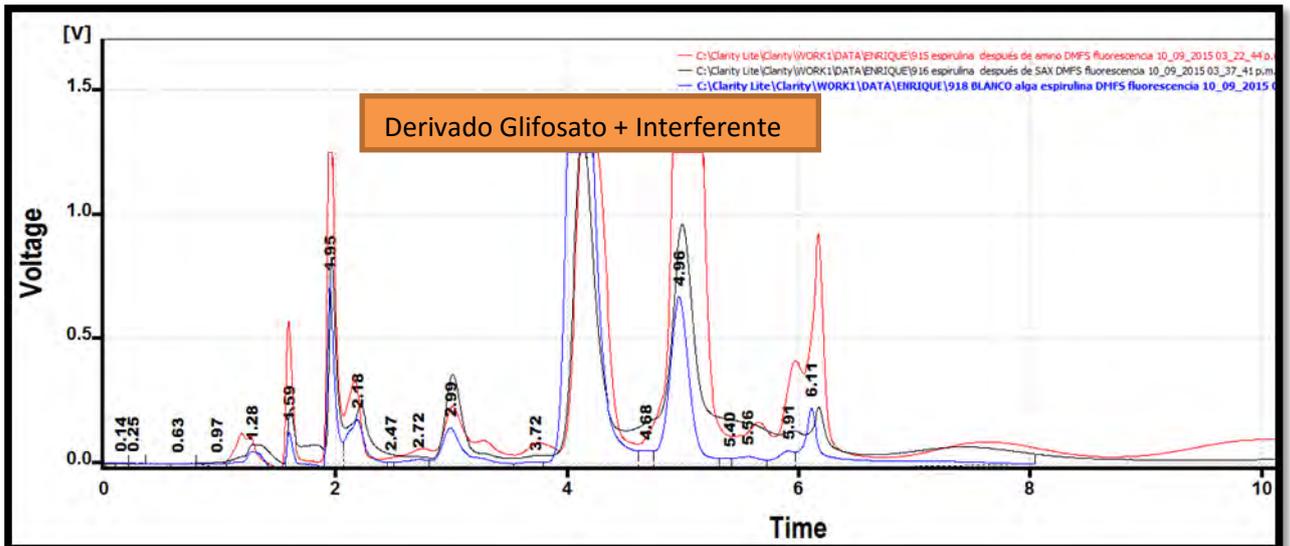


Figura 37. Cromatograma obtenido de extractos de *Spirulina* fortificado a una concentración de 10 ng/mL compuesto glifosato Columna ODS HYPERSYL Dimensiones. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ )  $C_{18}$  fase móvil a un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . composición constante de 20 % metanol y 80% agua pH=6.4. Detección por fluorescencia  $\lambda_{\text{ex}}=256$   $\lambda_{\text{em}}=318$  nm Blanco (azul), extracto después de DMFS con adsorbente amino (rojo) y extracto después de usar el SAX (negro)

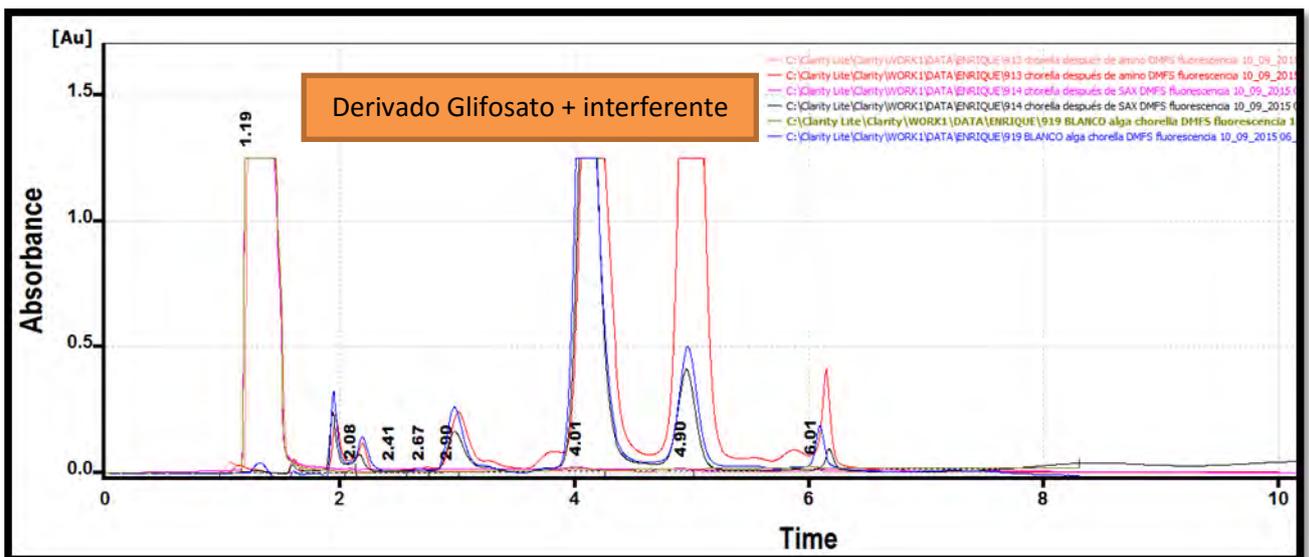


Figura 38. Cromatograma obtenido de extractos de *Chlorella* fortificado a una concentración de 10 ng/mL compuesto glifosato Columna ODS HYPERSYL Dim. (mm) 150 x 4.6 tamaño de partícula (5  $\mu$ )  $C_{18}$  fase móvil a un flujo de 1 mL  $\text{min}^{-1}$ . composición constante de 20 % metanol y 80% agua pH=6.4. Detección por fluorescencia  $\lambda_{\text{ex}}=256$   $\lambda_{\text{em}}=318$  nm Blanco (azul), extracto después de DMFS con adsorbente amino (rojo) y extracto después de usar el SAX (negro)

En ambos casos se observa una señal interferente en la matriz que no permite la cuantificación de nuestro analito ( $t_r = 3.9$  min), inclusive después de aplicar la secuencia de limpieza correspondiente.

Por lo tanto el derivado del glifosato en estas matrices se puede analizar con detección UV, *Spirulina* y *Chlorella* sin la presencia de interferentes. Con fluorescencia, la detección del derivado se ve afectada por el exceso de reactivo y subproductos de reacción que son fluorescentes aparecen en el cromatograma con picos importantes. Así, que aún con la alta selectividad de esta detección y más bajos límites de detección que se pueden obtener, se tienen problemas de integración en concentraciones más bajas del analito. En este caso, a nivel del grado de interferentes a la detección que contiene el extracto, es más ventajosa usar la detección UV, aunque los límites de detección sean más altos, se podría pensar en efectuar la concentración del extracto para usar el detector UV.

### 5.3. Comparación de las dos estrategias de extracción y análisis para los compuestos estudiados

Los compuestos estudiados en el presente trabajo se pueden considerar como pertenecientes a dos grupos diferentes por sus polaridades: Por un lado están los HAP's considerados como compuestos hidrófobos (poco polares) y por otro lado está el Glifosato considerado como un compuesto muy polar. La diferencia tan grande en polaridades entre el glifosato comparada con las de los HAP's, define que las estrategias para su extracción y análisis sean también muy diferentes entre estos dos tipos de compuestos.

Debido a que los HAP's son compuestos no polares, para su retención se usan sistemas de extracción por fase reversa, aplicando al cartucho disolventes polares (agua y metanol) de fuerza eluyente creciente, primero los de fuerza débil con menores porcentajes de disolvente orgánico, para quitar los interferentes de la muestra, y finalmente de fuerza eluyente mayor para recuperar los analitos. En el caso de los HAP's para realizar el paso adicional de la limpieza (clean up), se utilizó, por el contrario, un adsorbente polar como la fase amino, en donde el compuesto no se retiene, pero si sus interferencias.

Por otro lado, para el caso del glifosato que tiene naturaleza muy polar y zwitteriónica con propiedades ácido base muy marcadas por cambios del pH, hace que se haya podido extraer en un adsorbente polar, la sílice con grupos enlazados amino, y también que fuera factible el uso de intercambiadores iónicos para su retención selectiva en la limpieza del extracto por EFS. Además, dado que este compuesto no exhibe absorbancia significativa en la región UV/Vis y tampoco presenta fluorescencia es necesario llevar a cabo reacciones de derivación con compuestos cromóforos (Thompson, 1989) o fluoróforos (como el FMOC, utilizado en este trabajo) para su detección.

A diferencia de lo que se realizó con los HAP's en el "clean-up", en el caso del glifosato aprovechando sus propiedades químicas se buscó que este se retuviera en el intercambiador para su posterior elución y recuperación.

La comparación del análisis de los extractos con detección UV y de fluorescencia evidenció los más bajos límites de detección que se obtienen con la detección por fluorescencia. Sin embargo, no siempre esta alta sensibilidad es ventajosa ya que en los extractos del glifosato se encontraron interferentes muy importantes que no permitieron la detección del compuesto. La derivatización requirió de concentraciones muy altas del reactivo derivatizante y esto conllevó a que también se detectara el exceso de reactivo o se derivatizaran impurezas.

## VI. CONCLUSIONES

La metodología para el caso de los HAP's se validó en el intervalo de concentraciones 10-140 µg/g, dando como valores de precisión expresado en términos de C.V menores al 10%, además de un buen coeficiente de determinación entre las variables con valores de  $r^2 \geq 0.99$ ; mientras que los porcentajes de recuperación se encuentran en un intervalo de 78-82 % para los tres HAP's estudiados. En relación con el límite de cuantificación se obtuvieron valores de 5.6 µg/g. Para el caso del glifosato la metodología se validó en el intervalo de concentraciones 0.4-4 µg/g, dando como valores de precisión expresado en términos de C.V menores al 10%, además de un coeficiente de determinación con un valor  $r^2 \geq 0.99$ ; mientras que el porcentaje de recuperación obtenido fue de 45.47% .

Se desarrollaron dos métodos analíticos para dos tipos de compuestos diferentes por un lado compuestos no polares (HAP's) y por otro lado el compuesto polar Glifosato en microalgas en tabletas utilizadas como suplementos alimenticios. Con esta contribución, se evidenció claramente que las propiedades fisicoquímicas de los analitos son las que determinan fundamentalmente la estrategia a seguir para la determinación analítica. Las características de la matriz manejada también tiene su importancia en el desarrollo de los métodos, especialmente en definir como se optimiza la limpieza de interferencias.

Los protocolos completos de extracción y análisis fueron muy diferentes entre estos dos tipos de compuestos estudiados aquí (diferenciados por sus polaridades), demostrando claramente que cada problema analítico es particular y no existe una "receta de cocina" común para resolverlo.

Sin embargo, si se pueden hacer algunas generalizaciones para el manejo de fases estacionarias tanto a nivel de la extracción como del análisis, como por ejemplo que la naturaleza del adsorbente de extracción o fase estacionaria de separación cromatográfica debe de ser similar al analito para tener afinidad y por lo tanto lograr su retención. La naturaleza del adsorbente de limpieza en la extracción puede ser afín a los analitos para retenerlos mientras que no para sus interferencias, o lo contrario, para dejarlos pasar mientras se retienen los interferentes. Por otra parte, la selección de fuerza de los eluentes también es importante en la extracción en fase sólida y en dispersión de matriz en fase sólida, desde el punto de vista que debe de ser débil cuando no se quiere fugar a los compuestos de interés, pero si otros compuestos de la matriz; debe de ser fuerte, cuando lo que queremos es recuperar a los analitos en un extracto concentrado.

En fin, lo anterior muestra que existen infinidad de combinaciones para lograr el desarrollo apropiado de métodos enfocados al análisis de trazas en muestras

complejas, como lo son las biológicas, de nuestro caso particular las vegetales. También, muestra las ventajas del uso de adsorbentes para la miniaturización de métodos. Finalmente, muestra las analogías existentes entre los procesos de extracción con adsorbentes y la cromatografía de líquidos.

## VII. REFERENCIAS

- ATSDR, 1995. *ATSDR - Resumen de Salud Pública: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) [Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PHA)]*,
- Barker, S.A., 2007. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of biochemical and biophysical methods*, 70(2), pp.151–62.
- Barker, S.A., 2000. Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 885(1-2), pp.115–127.
- Baumard, P., Budzinski, H. & Garrigues, P., 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: Application to mussels. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 359(6), pp.502–509.
- Baylis, A.D., 2000. Why glyphosate is a global herbicide: strengths, weaknesses and prospects. *Pest Management Science*, 56(4), pp.299–308.
- Becker, E.W., 1994. *Microalgae: Biotechnology and Microbiology* U. P. Cambridge, ed., USA.
- Beltrán E. 2014. Biodegradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos por microalgas verdes bajo diferentes temperaturas. Tesis , Facultad de Química UNAM
- Benfenati E., Fanelli R., Facchini G., Pierucci P. 1996. Identification of organic contaminants in leachates from industrial waste landfills. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 15(8), pp.305–310.
- Bhaskara, B.L. & Nagaraja, P., 2006. Direct Sensitive Spectrophotometric Determination of Glyphosate by Using Ninhydrin as a Chromogenic Reagent in Formulations and Environmental Water Samples. *Helvetica Chimica Acta*, 89(11), pp.2686–2693.
- Bogialli, S. & Di Corcia, A., 2007. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), pp.163–79.
- Canosa P., Rubi E., Cela R. 2007. Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 79(4), pp.1675–81.
- Canosa Rodríguez, M. del P., 2008. *Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenes. aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*. UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA.

- Catrinck, T.C.P.G. Dias A., Aguiar M., Fidencio P. 2014. A Simple and Efficient Method for Derivatization of Glyphosate and AMPA Using 9-Fluorenylmethyl Chloroformate and Spectrophotometric Analysis. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(7), pp.1194–1199.
- Cid, M.E. del, García, A.A. & Etayo, L.M., 1998. Estudio de microcontaminantes orgánicos en las aguas subterráneas. *Jornadas sobre la contaminación de agua subterránea: un problema pendiente*, pp.239–247.
- COFEPRIS, 2016. Catálogo de Plaguicidas.
- COFEPRIS, 2011. Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud de los Estados Unidos Mexicanos. , p.20.
- Durán Merás, I., Galeano Díaz, T. & Alexandre Franco, M., 2005. Simultaneous fluorimetric determination of glyphosate and its metabolite, aminomethylphosphonic acid, in water, previous derivatization with NBD-Cl and by partial least squares calibration (PLS). *Talanta*, 65(1), pp.7–14.
- FAO, 2010. *Specifications and Evaluation for Agricultural Pesticides: Glyphosate*,
- García Londoño, V.A., Reynoso, C.M. & Resnik, S.L., 2015. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) survey on tea (*Camellia sinensis*) commercialized in Argentina. *Food Control*, 50, pp.31–37.
- García-López, M., Canosa, P. & Rodríguez, I., 2008. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(3), pp.963–74.
- Glass, R.L., 1983. Liquid chromatographic determination of glyphosate in fortified soil and water samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31(2), pp.280–282.
- Gómez L. 2005. Desarrollo de un método analítico para la extracción y análisis de residuos de glifosato y su producto de degradación AMPA en jitomate. Tesis, Facultad de Química UNAM
- Gul O., Dervisoglu M., Mortas M., Aydemir O., İlhan E. 2015. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Circassian cheese by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, pp.82–86.
- Harris, D.C., 2013. *Análisis químico cuantitativo* 3ª edición. Reverté, ed.,
- Hernández, A. & Hansen, A., 2011. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*, 27(2), pp.115–127.
- Hernández, J.M., 2007. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. *Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*, 7(Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada), pp.44–52.

- Hernández, F y Beltrán, J., 1995. Análisis de plaguicidas en aguas. , pp.321–356.
- Hodgeson, J.W., 1990. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water By Liquid-Liquid Extraction and HPLC With Office of Research and Development Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Drinking Water By Liquid-Liquid Extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection. *Environmental monitoring systems laboratory office of research and development USEPA* , pp.1–22.
- Hogendoorn E.A.,Huls R.,Dijkman R.,Hoogerbrugge R. 2001. Microwave assisted solvent extraction and coupled-column reversed-phase liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography A*, 938(1-2), pp.23–33.
- Hogendoorn E.A.,Ossendrijver F.M.,Dijkman E.,Baumann R.1999. Rapid determination of glyphosate in cereal samples by means of pre-column derivatisation with 9-fluorenylmethyl chloroformate and coupled-column liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 833(1), pp.67–73.
- IARC, 2010. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. *IARC Monographs On The Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans*, 92, pp.1–868.
- Islas G.I., Rodríguez J.A., Pérez F.,Mendoza L. 2014. Determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in soils by HPLC with pre-column derivatization using 1,2-naphthoquinone-4-sulfonate. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37(9), pp.1298–1309.
- Iwata, K., Inayama, T. & Kato, T., 1990. Effects of *Spirulina platensis* on plasma lipoprotein lipase activity in fructose-induced hyperlipidemic rats. *Journal of Nutritional Science and vitaminology*, 36(2), pp.165–71.
- Jan M.R., Shah J.,Muhammad M., Ara B. 2009. Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1-3), pp.742–5.
- Jongeneelen, F.J., 1997. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Science of The Total Environment*, 199(1-2), pp.141–149.
- Kataoka H., Ryu S., Sakiyama N., Makita M. 1996. Simple and rapid determination of the herbicides glyphosate and glufosinate in river water, soil and carrot samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 726(1-2), pp.253–258.
- Kawai, S., Uno, B. & Tomita, M., 1991. Determination of glyphosate and its major metabolite aminomethylphosphonic acid by high-performance liquid

- chromatography after derivatization with p-toluenesulphonyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 540, pp.411–415.
- Kay, R.A., 1991. Microalgae as food and supplement. *Critical reviews in food science and nutrition*, 30(6), pp.555–73.
- Khrolenko, M. V & Wieczorek, P.P., 2005. Determination of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in fruit juices using supported-liquid membrane preconcentration method with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with p-toluenesulphonyl chl. *Journal of Chromatography. A*, 1093(1-2), pp.111–7.
- Kristenson, E., Ramos, L. & Brinkman, U., 2006. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(2), pp.96–111.
- Kumar, A., Malik, A.K. & Picó, Y., 2010. Sample preparation methods for the determination of pesticides in foods using CE-UV/MS. *Electrophoresis*, 31(13), pp.2115–2125.
- Kuusimäki L., Peltonen Y., Mutanen P., Peltonen K., Savela K. 2004. Urinary hydroxy-metabolites of naphthalene, phenanthrene and pyrene as markers of exposure to diesel exhaust. *International archives of occupational and environmental health*, 77(1), pp.23–30.
- Lee, R., 2008. *Phycology* 4<sup>o</sup> edición.,
- Lundgren, L.N., 1986. A new method for the determination of glyphosate and (aminomethyl)phosphonic acid residues in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34(3), pp.535–538.
- Mastandrea C., Chichizola C., Ludueña B., Sánchez H., Álvarez H., Gutiérrez A. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39(1), pp.27–36.
- Mayo, A., 2013. Effects kinetic of growth cultures temperature of unialga containing pH *Chlorella* bacteria and on the vulgaris. *Water Environment Research*, 69(1), pp.64–72.
- Miles, C.J. & Moye, H.A., 1988. Extraction of glyphosate herbicide from soil and clay minerals and determination of residues in soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(3), pp.486–491.
- Pensado L., Casias, M.C., Mejuto R. 2005. Application of matrix solid-phase dispersion in the analysis of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1077(2), pp.103–109.

- Peña Badenas, A., 2011. Estudio de sistemas de extracción en fase sólida para su aplicación en la determinación del plaguicida dimetoato. Universidad Politécnica de Valencia ,pp. 3-16
- QianK.,Tang T.,Shi T.,Wang F., Li J., Cao Y. 2009. Residue determination of glyphosate in environmental water samples with high-performance liquid chromatography and UV detection after derivatization with 4-chloro-3,5-dinitrobenzotrifluoride. *Analytica Chimica Acta*, 635(2), pp.222–6.
- Quinn, J.P., Peden, J.M.M. & Dick, R.E., 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(5), pp.511–516.
- Ramírez-Duarte, W., Mocha, P.R.E. & Barragán, I.S.R., 2007. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos.Grupo de Sanidad de peces Instituto de Acuicultura de los Llanos. Universidad de los Lanos , pp.34–43.
- Sahasrabuddhey, B., Jain, A. & Verma, K.K., 1999. Determination of ammonia and aliphatic amines in environmental aqueous samples utilizing pre-column derivatization to their phenylthioureas and high performance liquid chromatography. *The Analyst*, 124(7), pp.1017–1021.
- Salazar, N.J. & Aldana, M.L., 2011. Herbicida Glifosato : Usos , Toxicidad Y Regulación. *Revista de ciencias Biológicas Tecnia de la Salud de la Universidad de Sonora*, Volumen XI, pp.23–28.
- Seiber J.N.,Macchesney M., Kon R.,Leavitt R. 1984. Analysis of glyphosate residues in kiwi fruit and asparagus using high-performance liquid chromatography of derivatized glyphosate as a cleanup step. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32(3), pp.678–681.
- Snyder, L., & Kirkland, J.(1979). Introduction to Modern Liquid Chromatography (Third edit.) Wiley.
- Sun Y., Wang Chengyin.,Wen Q.,Wang G., Wang H., Hu H. 2010. Determination of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid in Water by LC Using a New Labeling Reagent, 4-Methoxybenzenesulfonyl Fluoride. *Chromatographia*, 72(7-8), pp.679–686.
- Sundaram, K.M.S. & Curry, J., 1997. A comparison of UV and fluorescence detectors in the liquid chromatographic analysis of glyphosate deposits after post-column derivatization. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 20(4), pp.511–524.
- Tfouni S.A.V.,Padovani G.,Reis R.,Furlani R.,Camargo M. 2014. Incidence of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil blends. *Food Control*, 46, pp.539–543.

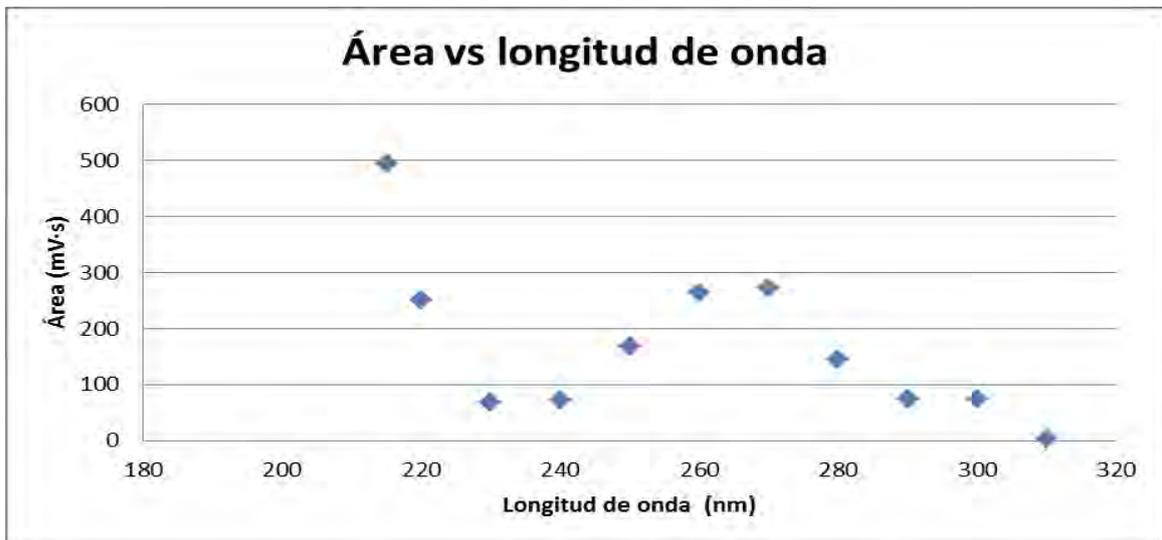
- Tsuji, M., Akiyama, Y. & Yano, M., 1997. Simultaneous Determination of Glufosinate and Its Metabolite, and Glyphosate in Crops. *Analytical Sciences*, 13(2), pp.283–285.
- Universidad Central de Venezuela, 2008. Guía de cromatografía. *Escuela de Química, Facultad de Ciencias*, p.11.
- US EPA, O. of P.P., Types of Pesticides.
- Vera-Ávila L.E., Cázares-Ibáñez E.A., Covarrubias-Herrera R. y Camacho-Frias E. (2002). Metodología en línea para la determinación de HAP's en agua al nivel de ultratrazas. *Int. Cont. Ambient.* 18(1), pp. 5-16.
- Yeakub, A. & Cole, R.B., 2001. SFE-plus-C 18 Lipid Cleanup and Selective Extraction Method for GC/MS Quantitation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Smoked Meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), pp.4192–4198.
- You, J. & Koropchak, J.A., 2003. Condensation nucleation light scattering detection with ion chromatography for direct determination of glyphosate and its metabolite in water. *Journal of Chromatography A*, 989(2), pp.231–238.
- Zwir-Ferenc, A. & Biziuk, M., 2006. Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), pp.677–690.

## ANEXO I

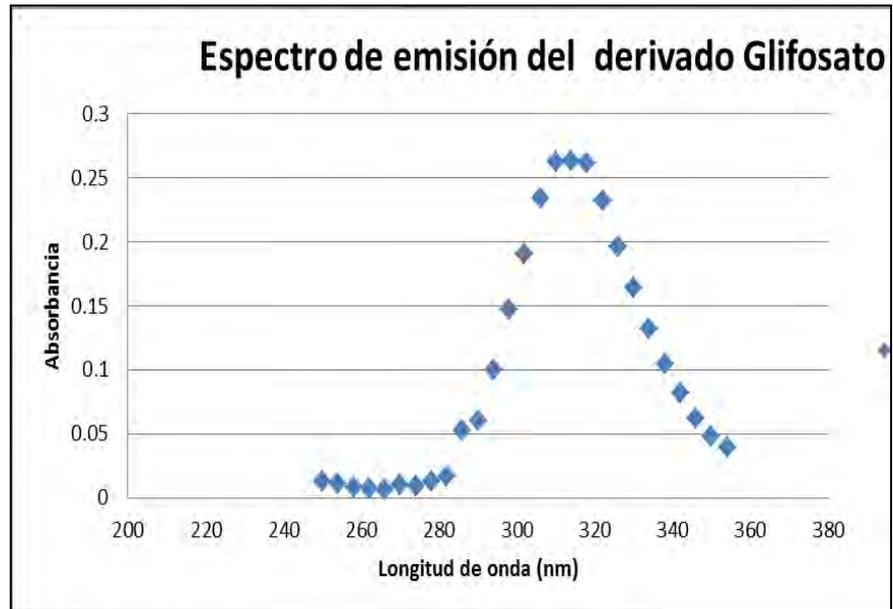
Elección de condiciones de detección por UV y fluorescencia para el derivado del compuesto Glifosato

### Respuesta de Glifosato a diferentes longitudes de onda. (Detección UV)

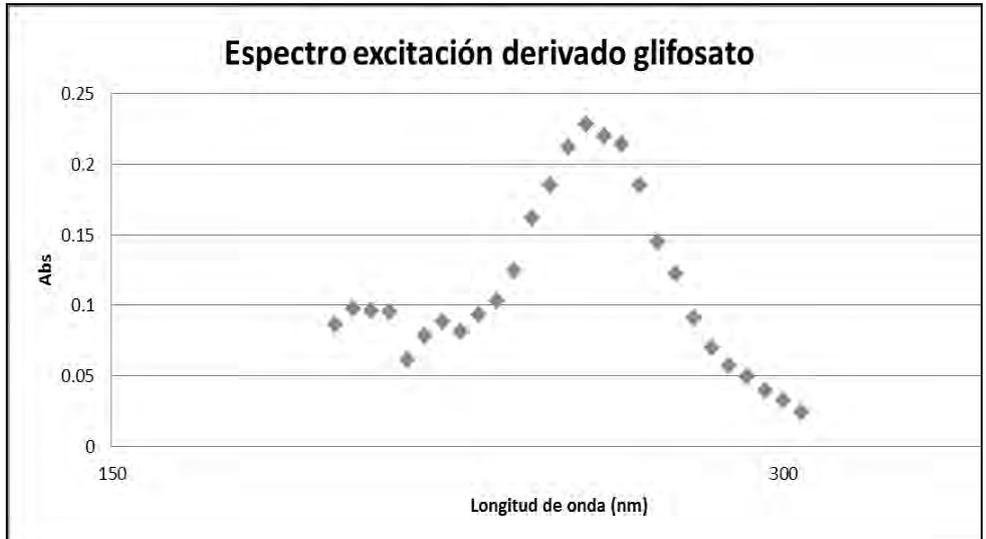
$\lambda$ (nm)	Area (mv·s)
215	493.299
220	251.224
230	68.471
240	72.791
250	169.106
260	264.160
270	272.750
280	144.474
290	73.693
300	74.505
310	2.985



Longitud de onda	Abs
250	0.013
254	0.011
258	0.008
262	0.007
266	0.006
270	0.01
274	0.009
278	0.013
282	0.017
286	0.053
290	0.06
294	0.1
298	0.147
302	0.191
306	0.234
310	0.262
314	0.263
318	0.261
322	0.232
326	0.196
330	0.164
334	0.132
338	0.105
342	0.082
346	0.062
350	0.048
354	0.039



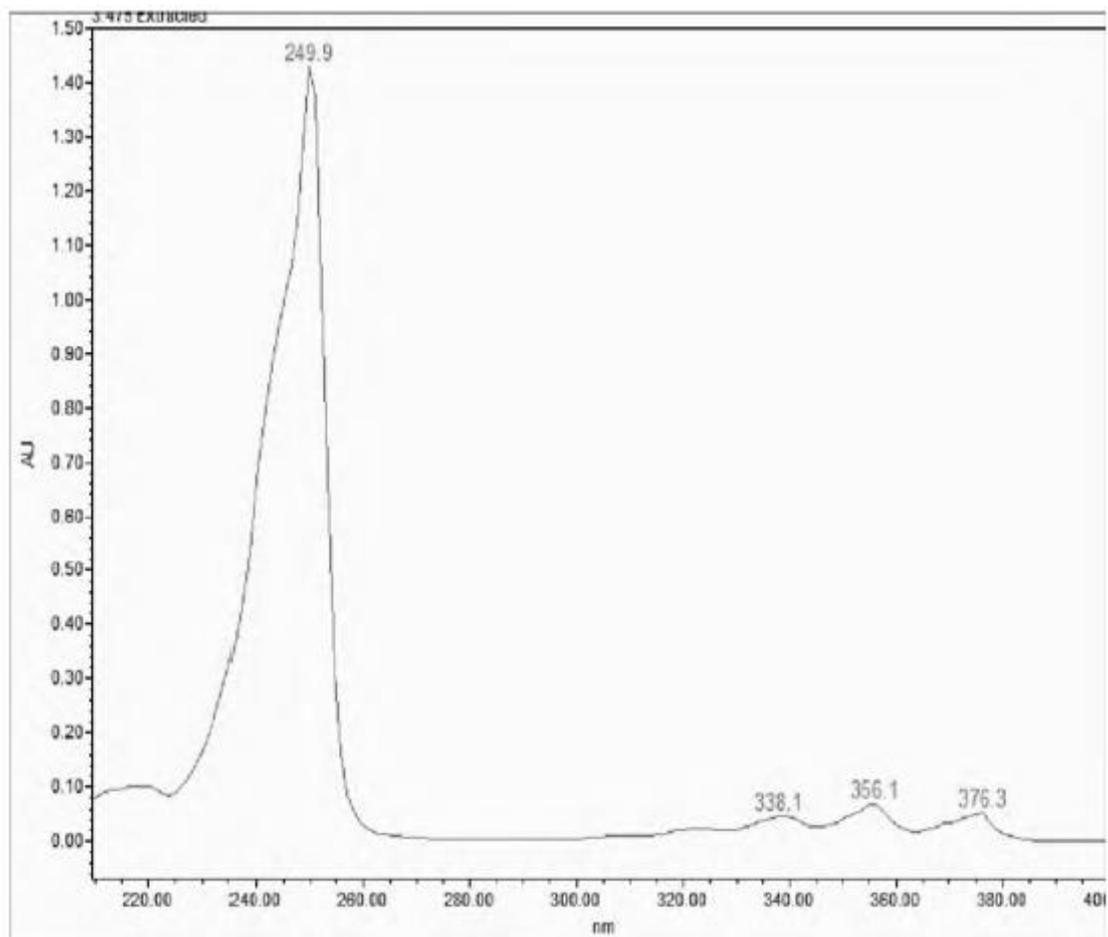
Longitud de onda	Abs
200	0.086
204	0.097
208	0.096
212	0.095
216	0.061
220	0.078
224	0.088
228	0.081
232	0.093
236	0.103
240	0.124
244	0.162
248	0.185
252	0.212
256	0.228
260	0.22
264	0.214
268	0.185
272	0.145
276	0.122
280	0.091
284	0.07
288	0.057
292	0.049
296	0.039
300	0.032
304	0.024



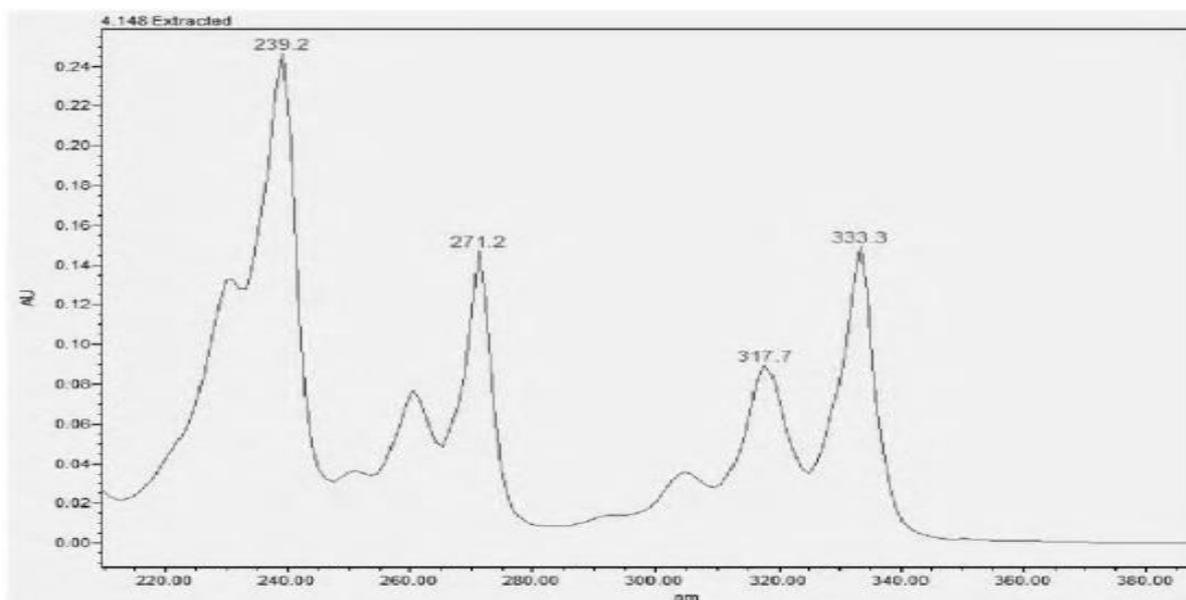
## ANEXO II

Espectros de absorción UV de los tres hidrocarburos aromáticos policíclicos utilizados en este trabajo

### Antraceno



## Pireno



## Benzo(a)antraceno

