

QD79
C45D4

Universidad de Los Andes
Facultad de Ciencias
Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM)
Postgrado en Química Analítica (PQA)

TESIS DOCTORAL

www.bdigital.ula.ve
“Tratamiento e Introducción de la Muestra en el
Análisis por Cromatografía de Gases”

Tesis presentada como
requisito parcial para la
obtención del grado de
Doctor en Química Analítica

MSc. Yelitza Delgado Cayama
Tutora Dra. María del Rosario Brunetto

Mérida – Venezuela
Junio 2010

C.C. RECONOCIMIENTO -

NO COMERCIAL- COMPARTIR IGUAL

Resumen

En los últimos 30 años, la preparación de muestras, tratamiento previo antes del análisis cromatográfico, ha evolucionado muy significativamente hasta el lugar destacado que tiene en la actualidad en estudios sobre la determinación de compuestos orgánicos a nivel de trazas en muestras de la vida real.

Tradicionalmente, la preparación de la muestra es necesaria por varias razones:

- ✓ mejorar el comportamiento cromatográfico del o los analitos
- ✓ mejorar la detectabilidad del o los analitos
- ✓ aislamiento del o los analitos de la matriz

Hoy en día, el primer objetivo se ha vuelto relativamente poco importante debido a la calidad y variedad de empaques de columnas tanto para cromatografía de gases (CG) como para cromatografía líquida (CL). Adicionalmente, la gran variedad de reactivos derivatizantes que permiten que analitos polares puedan ser determinados por CG.

Los otros dos objetivos: mejorar la detectabilidad y realizar una extracción eficaz de los analitos de la matriz, siguen siendo aún de gran actualidad.

Es importante señalar que en el procedimiento analítico, la preparación de la muestra es la etapa más tediosa, que consume más tiempo y que está sujeta a errores. En ese sentido, esta etapa afecta adversamente el

C.C. RECONOCIMIENTO - i

NO COMERCIAL- COMPARTIR IGUAL

rendimiento global de un análisis debido a pérdida o descomposición del o los analitos, así como también a la introducción de contaminantes extraños.

La tendencia actual está enfocada en lograr la automatización de todo el procedimiento analítico con el fin de disminuir el tamaño de las muestras necesarias, el uso de disolventes orgánicos, la generación de residuos y fundamentalmente una disminución del tiempo para lograr una mayor frecuencia de análisis y una reducción del costo por análisis.

Para ello, se cuenta con un desarrollo muy significativo de absorbentes adecuados, productos químicos, membranas, conexiones de bajos volúmenes muertos, cartuchos, mini-columnas, discos, etc. y adicionalmente con equipos auxiliares de bajo costo que frecuentemente se han comercializado.

En ese sentido, en esta Tesis se han desarrollado y puesto a punto nuevos métodos automáticos de análisis para la determinación de analitos de interés medioambiental, clínico y alimentario. Para ello se utilizaron diferentes estrategias para la introducción y tratamiento de la muestra previo a su determinación por CG. Los métodos propuestos son selectivos y reproducibles y son ejecutados con poca intervención del analista.

Los métodos propuestos son los siguientes:

➡ “Desarrollo de un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas e introducción de la muestra en línea con un automuestreador de espacio de cabeza para la determinación de alquilpirazinas en muestras de licor de cacao venezolanos”.

➡ “Determinación de solventes orgánicos tóxicos en muestras de orina por cromatografía de gases con detección por ionización en llama y con introducción de la muestra en línea con un automuestreador de espacio de cabeza con enfoque criogénico”.

➡ “Utilización de un sistema de inyección en flujo multijeringa para la extracción en fase sólida de plaguicidas órgano fosforados de muestras de agua y su determinación por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas”.

➡ “Extracción en fase sólida de cocaína y benzoilecgonina en un sistema de inyección en flujo multijeringa para su determinación en muestras de orina por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas”.

www.bdigital.ula.ve

Índice

	Pág.
Capítulo I. Introducción y Propuesta de Trabajo	1
1. Introducción	2
2. Tratamiento de la Muestra	9
2.1. Liberar a los analitos de la matriz	9
2.1.1. Hidrólisis	9
2.2. Eliminación de compuestos endógenos	10
2.2.1. Ultrafiltración	10
2.2.2. Extracción Simple	11
2.2.2.1. Extracción Líquido-Líquido (ELL)	11
2.2.2.2. Extracción Sólido-Líquido (ESL)	12
2.2.2.3. Extracción en Fase Sólida (EFS)	12
2.2.2.3.1. Extracción con cartuchos	14
2.2.2.3.2. Extracción con Disco	15
2.3. Aumento de sensibilidad y selectividad	16
2.3.1. Derivatización	16
2.3.1.1. Derivatización Asistida por Microondas	17
3. Introducción y Tratamiento de Muestra en Línea para Cromatografía de Gases	20
3.1. Espacio de Cabeza	20
3.1.1. EC Estático	21
3.1.2. EC Dinámico	23
3.1.3. Microextracción en Fase Sólida	26
3.2. Técnicas en Inyección en Flujo	29
3.2.1. Análisis por Inyección en Flujo(FIA)	30
3.2.2. Análisis en Flujo Multijeringa (MSFIA)	33
4. Automatización en el Tratamiento de la Muestra y su Acoplamiento a la Cromatografía de Gases	35
4.1. Materiales de Acceso Restringido (RAM)	36
4.2. Soportes de Partículas Grandes	38
5. Propuesta de Trabajo	43

6. Bibliografía	46
Capítulo II. Determinación de Alquilpirazinas por EC-CG-EM	55
Resumen	56
1. Introducción	57
2. Generalidades	59
2.1. Cacao	59
2.1.1. El cacao en Venezuela	59
2.1.2. Teobroma Cacao L	59
2.1.3. Variedad de Cacao	60
2.1.3.1 Cacao Criollo	60
2.1.3.2 Cacao Forastero	62
2.1.3.3 Cacao Trinitario	62
2.1.4. Calidad del cacao	63
3. Pirazinas	66
3.1. Mecanismos propuestos para la Formación de las Alquilpirazinas	67
3.2. Propiedades Físicoquímicas	68
4. Antecedentes del Problema a Investigar	70
5. Hipótesis	72
6. Objetivos	72
6.1. Objetivo General	72
6.2. Objetivos Específicos	72
7. Parte Experimental	73
7.1. Reactivos y Solventes	73
7.2. Preparación de las soluciones	73
7.3. Muestras de licor de Cacao	74
7.4. Instrumentación	74
7.5. Procedimiento para llevar a cabo el análisis de las Alquilpirazinas con el sistema EC-CG-EM	74
8. Resultados y Discusión de los Resultados	75
8.1. Optimización del sistema cromatográfico	75
8.2. Condiciones de trabajo del sistema de Introducción de la Muestra	76

8.2.1. Temperatura de Termostatización	77
8.2.2. Tiempo de Termostatización	77
8.2.3. Tiempo de Presurización	78
8.2.4. Tiempo de Inyección	79
8.2.5. Masa de licor de Cacao	80
8.2.6. Efecto Salino	81
9. Validación del Método	83
9.1. Intervalo líneal y efecto de matriz	84
9.2. Precisión, Exactitud del método	86
10. Diseño Factorial	89
11. Muestras Reales	97
11.1. Análisis Multivariado	98
11.2. Análisis de Componentes Principales	101
11.3. Análisis Discriminante para las diferentes variedades de cacao	102
12. Conclusiones	108
13. Bibliografía	109
Capítulo III. Determinación de Solventes Orgánicos Tóxicos por EC-CG-FID en orina humana	114
Resumen	115
1. Introducción	116
2. Generalidades	117
2.1. Toxicología de los Solventes	117
2.2. Solventes Orgánicos Tóxicos a Determinar	118
2.2.1. Benceno	118
2.2.2. Tolueno	119
2.2.3. Xilenos	119
2.3. Usos	119
2.4. Toxicidad	121
2.5. Síntomas de la Contaminación o intoxicación por BTXs	123
2.6. Metabolismo	124
3. Matrices Utilizadas para la Determinación de BTXs	125

4. Justificación del Trabajo	128
5. Antecedentes del Problema a Investigar	131
6. Hipótesis	134
7. Objetivos	135
7.1. Objetivo General	135
7.2. Objetivos Específicos	135
8. Metodología Propuesta	135
8.1. Sistema a Utilizar	135
9. Parte Experimental	136
9.1. Reactivos	136
9.2. Preparación de las Soluciones de Trabajo	137
9.3. Muestras de Orina	137
9.4. Instrumental	138
9.5. Optimización de los Parámetros Instrumentales	138
9.6. Procedimiento	139
9.7. Características Analíticas del Método	140
10. Resultados y Discusión de los Resultados	140
10.1. Optimización de los Parámetros Instrumentales	140
10.2. Condiciones del Cromatógrafo de Gases	141
10.2.1. Selección de la Columna Cromatográfica	142
10.2.2. Optimización de las Condiciones del Sistema de Detección	145
10.3. Optimización de las Condiciones de Trabajo del Automuestreador EC	146
10.3.1. Temperatura de Termostatización	146
10.3.2. Tiempo de Termostatización	149
10.3.3. Tiempo de Presurización	150
10.3.4. Tiempo de Inyección	150
10.3.5. Volumen de Muestra en el Vial	155
11. Validación del Método	158
11.1. Efecto de Matriz	158
11.2. Intervalo Lineal	160
11.3. Precisión	160
11.4. Exactitud	162
11.5. Límite de Cuantificación y de Detección	163

11.6. Análisis de Muestras de Orina	163
12. Conclusiones	164
13. Bibliografía	165
Capítulo IV. Determinación de Plaguicidas Organofosforados en aguas de Consumo Humano por MSFIA-CG-EM	171
Resumen	.172
1. Introducción	173
2. Generalidades	175
2.1. Plaguicidas	175
2.2. Clasificación de los pesticidas	175
2.3. Usos de los Pesticidas	175
2.4. Toxicidad	177
2.4.1. Efectos Indeseados sobre la Salud Humana	178
2.4.1.1. Efectos sobre el Organismo	179
2.5. Pesticidas Organofosforados	180
2.5.1. Propiedades Físicoquímicas	182
2.5.2. Vías de Exposición y Síntomas	182
2.5.3. Matrices Utilizadas para la Determinación de Pesticidas Organofosforados	185
2.5.4. Niveles de Pesticidas Organofosforados Reportados en la Literatura	185
3. Antecedentes del Problema a Investigar	185
4. Hipótesis	188
5. Objetivos	188
5.1. Objetivo General	188
5.2. Objetivos Específicos	189
6. Parte Experimental	189
6.1. Reactivos y Solventes	189
6.2. Preparación de Soluciones	189
6.3. Instrumentación	190
6.4. Procedimiento	191

7. Resultado y Discusión de los Resultados	193
7.1. Optimización del sistema MSFIA	193
7.1.1. Volumen de Muestra	193
7.1.2. Velocidad de Flujo	194
7.1.3. Eluyente	194
7.1.4. Volumen de Elución	195
7.1.5. Velocidad de flujo en la elución	196
7.2. Separación Cromatográfica	196
8. Validación del Método	198
8.1. Intervalo lineal y efecto de matriz	198
8.2. Precisión y Exactitud del Método	199
8.3. Muestras Reales	200
9. Comparación del método propuesto con otros publicados en la literatura	202
10. Conclusiones	202
11. Bibliografía	204

Capítulo V. Determinación de COC y BZE en Muestras de Orina Humana por CG-EM empleando un sistema MSFIA para el Tratamiento en Línea

Resumen	210
1. Introducción	211
2. Generalidades	213
2.1. Drogas de Abuso	213
2.1.1. Cocaína	214
2.1.1.1. Formas de Presentación	217
2.1.1.2. Formas de Adulteración	218
2.1.1.3. Vías de Administración	219
2.1.1.4. Metabolismo	220
2.1.1.5. Toxicidad	222
2.1.1.5.1. Dosis Letal	222
2.1.1.6. Matrices Utilizadas para la determinación de COC y sus metabolitos	223
2.1.1.7. Niveles de COC y BZE reportados en la literatura para muestras de orina	227
3. Antecedentes del Problema a Investigar	226

4. Justificación	233
5. Hipótesis	234
6. Objetivos	235
6.1. Objetivo General	235
6.2. Objetivos Específicos	235
7. Parte Experimental	235
7.1. Reactivos y Solventes	235
7.2. Preparación de las Soluciones	236
7.3. Preparación y Almacenamiento de la Muestras de Orina	236
7.4. Instrumental Utilizado	237
7.4.1. Tratamiento de la Muestra	237
7.4.2. Sistema Cromatográfico	238
7.4.3. Procedimiento	239
8. Resultados y Discusión de los Resultados	241
8.1. Estudio de la extracción en fase sólida de los analitos en el sistema MSFIA	242
8.2. Optimización del sistema MSFIA	244
8.3. Reacción de Derivatización de la Benzoilecgonina	245
8.3.1. Efecto del tiempo de irradiación	245
8.3.2. Efecto de la potencia de irradiación	246
8.4. Separación Cromatográfica	248
9. Validación del Método	250
10. Análisis de Muestras Reales	253
11. Validación del Método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector UV arreglo de diodos	253
12. Comparación del método propuesto con otros publicados en la literatura	257
13. Conclusiones	258
14. Bibliografía	259

Índice de Tablas

	Pág.
Capítulo I. Introducción y Propuesta de Trabajo	
Tabla 1. Técnicas de extracción de compuestos en muestras sólidas	12
Tabla 2. Reactivos derivatizantes más empleados en CG	16
Tabla 3. Constantes dieléctricas para diversos solventes	17

C.C. RECONOCIMIENTO -

NO COMERCIAL- COMPARTIR IGUAL

Tabla 4. Aportes significativos de las Técnicas en Flujo a lo largo de los años	31
--	----

Capítulo II. Determinación de Alquilpirazinas por CG-EM

Tabla 1. Características de la planta de Cacao	61
Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los analitos objeto de estudio	69
Tabla 3. Condiciones optimizadas del sistema EC-CG-EM	83
Tabla 4. Características analíticas de las rectas de calibrado para las alquilpirazinas y las muestras de licor de cacao en el intervalo de concentración estudiado, realizados en el sistema propuesto.	85
Tabla 5. Estudio de precisión del método para la determinación de alquilpirazinas	86
Tabla 6. Exactitud del método	87
Tabla 7. Factores estudiados y sus niveles en estudio	89
Tabla 8. Listado de los experimentos en orden aleatorio	90
Tabla 9. Estimaciones de los efectos de cada factor estudiado	91
Tabla 10. Tabla de ANOVA para la tetrametilpirazina	94
Tabla 11. Tabla de ANOVA para la 2-metilpirazina	95
Tabla 12. Tabla de ANOVA para la 2,3-dimetilpirazina	96
Tabla 13. Muestras de Cacao suministradas por el (INIA)	98
Tabla 14. Análisis de componentes principales	101

Capítulo III. Determinación de Solventes Orgánicos Tóxicos por EC-CG-FID en orina humana

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los analitos (BTXs) y sus estructuras	121
Tabla 2. Síntomas de contaminación por BTXs	123
Tabla 3. BTXs y sus metabolitos	124
Tabla 4. Niveles máximos permitidos de exposición laboral a BTXs ($\mu\text{g/L}$) en Estados Unidos	125
Tabla 5. Valores máximos aceptables de BTXs en agua potable en Venezuela	125
Tabla 6. Niveles de BTXs en sangre ($\mu\text{g/L}$)	127
Tabla 7. Niveles de BTXs en orina ($\mu\text{g/L}$)	127
Tabla 8. Valores límite biológicos para los metabolitos de BTXs en España y México	128
Tabla 9. Índices Biológicos de Exposición para BTXs en Argentina y U.S.A	129

Tabla 10. Parámetros optimizados del sistema EC-CG-FID-Enfoque Criogénico	157
Tabla 11. Características analíticas de las rectas de calibrado	161
Tabla 12. Estudio de la precisión del método para el benceno	161
Tabla 13. Estudio de la precisión del método para el tolueno	161
Tabla 14. Estudio de la precisión del método para los xilenos	162
Tabla 15. Estudio de recuperación de los analitos desde muestras de orina	163
Tabla 16. Resultados del análisis de BTXs en muestras de orina en µg/L	164

Capítulo IV. Determinación de Plaguicidas Organofosforados en Aguas de Consumo Humano por MSFIA-CG-EM

Tabla 1. Clasificación de los pesticidas en relación con la especie a combatir	176
Tabla 2. Caracterización de los plaguicidas según las normas establecidas por reglamento General de Plaguicidas de Venezuela	178
Tabla 3. Características Físicoquímicas de los pesticidas organofosforados en estudio	183
Tabla 4. Vías de Exposición y síntomas en el organismo humano	184
Tabla 5. Niveles de concentración de los pesticidas en estudio reportados en la literatura	186
Tabla 6. Procedimiento analítico para la limpieza y preconcentración de los POPs en muestras de agua de consumo	193
Tabla 7. Condiciones Optimizadas del sistema MSFIA–CG-EM	197
Tabla 8. Características analíticas de las rectas de calibrado para los POPs y agua enriquecida con los analitos en el intervalo de concentración estudiado.	198
Tabla 9. Estudio de precisión del método para la determinación de los POPs	200
Tabla 10. Exactitud del método	200
Tabla 11. Porcentaje de recuperación de POPs de muestras de agua para consumo humano enriquecidas	201

Capítulo V. Determinación de COC y BZE en Muestras de Orina Humana por CG-EM empleando un sistema MSFIA para el Tratamiento en Línea

C.C. RECONOCIMIENTO -

NO COMERCIAL- COMPARTIR IGUAL

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de la cocaína y sus metabolitos	216
Tabla 2. Características espectroscópicas de la cocaína y sus metabolitos	217
Tabla 3. Formas de Abuso y sus vías de administración	219
Tabla 4. Manifestaciones clínicas debido al consumo de la COC	223
Tabla 5. Composición Química de la Orina	225
Tabla 6. Niveles de concentración de COC y sus metabolitos en orina humana reportados en la literatura	227
Tabla 7. Procedimiento analítico para la limpieza y elución de COC y BZE en muestras de orina en el sistema MSFIA	240
Tabla 8. Características analíticas de las rectas de calibrado para la COC y BZE (patrones acuosos y orina) en el intervalo de concentración estudiado, realizados en el sistema propuesto	251
Tabla 9. Estudio de la precisión del método para la determinación de COC y BZE en orina.	251
Tabla 10. Estudios de recuperación de COC y BZE en muestras de orina	252
Tabla 11. Análisis de COC y BZE en muestras de orina humana	254
Tabla 12. Estudio de Comparación de medias.	

Índice de Figuras

	Pág.
Capítulo I. Introducción y Propuesta de Trabajo	
Figura 1. Componentes de un Cromatógrafo de Gases	3
Figura 2. Proceso Analítico	5
Figura 3. Diagrama esquemático de tratamiento de muestra	7
Figura 4. Distribución de tiempo requerido en cada una de las etapas de un método de análisis por cromatografía	8
Figura 5. Etapas de la Extracción en Fase Sólida	15

Figura 6. Etapas involucradas para llevar a cabo la introducción de la muestra empleando un EC	21
Figura 7. Representación esquemática del uso de un bucle de inyección en el sistema EC	23
Figura 8. Representación esquemática de un sistema clásico de purga y trampa	24
Figura 9. Configuración del sistema de purga y trampa incluyendo la TC	25
Figura 10. Diagrama esquemático de la instrumentación empleada en una trampa criogénica	26
Figura 11. Diagrama esquemático del sistema EC-CG estático con gradiente criogénico	26
Figura 12. Microextracción en Fase Sólida	27
Figura 13. Representación esquemática de las etapas involucradas al emplear MEFS-EC	28
Figura 14. Evolución de las técnicas en flujo en el tiempo	30
Figura 15. Sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)	31
Figura 16. Vista Frontal del sistema Multijeringa	34
Figura 17. Esquema de una partícula ISRP	37
Figura 18. Esquemas de una partícula RAM-ADS	38
Figura 19. Esquema de un soporte LPS	39
Figura 20. Esquema de productos Oasis®	41

Capítulo II. Determinación de Alquilpirazinas por CG-EM

Figura 1. Principales regiones de producción de cacao en Venezuela	60
Figura 2. Factores determinantes de la calidad del cacao	64
Figura 3. Generación de pirazinas	68
Figura 4. Reacción de Maillard. Mecanismo propuesto para la formación de pirazinas a partir de aminoácidos y azúcares	69
Figura 5. Efecto de la temperatura de termostatización en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao en 0,6 mL de metanol	77
Figura 6. Efecto del tiempo de termostatización en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲)	78

	Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao a la temperatura de termostatización establecida (105 °C).	
Figura 7.	Efecto del tiempo presurización en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao	79
Figura 8.	Efecto del tiempo de inyección en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao	80
Figura 9.	Efecto de la cantidad de muestra en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao	81
Figura 10.	Efecto salino en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲), Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao	82
Figura 11.	Cromatograma obtenido bajo las condiciones optimizadas para una (A) muestra de licor de cacao (B) solución estándar de 2-metilpirazina (a), 2,5-dimetilpirazina (b), 2,6- dimetilpirazina (c) Etilpirazina (d), 2,3- dimetilpirazina (e), Trimetilpirazina (f), Tetrametilpirazina (g) a 1,50 µg/ml para todos los analitos, con tiempo de retención de 9,57, 10,89, 11,05, 11,34, 11,48, 13,02, 14,93, min respectivamente (C) Muestra de licor de cacao enriquecida con 1,50 µg/ml para cada analito	84
Figura 12.	Gráficos de Pareto para cada una de las alquilpirazinas estudiadas	92
Figura 13.	Gráficos Probabilístico Normal para cada una de las alquilpirazinas estudiadas	93
Figura 14.	Gráfico de Residuales para la Tetrametilpirazina	94
Figura 15.	Gráfico de Residuales para la 2-metilpirazina	95
Figura 16.	Gráfico de Residuales para la 2,3-dimetilpirazina	96
Figura 17.	Relación de discriminación entre cacaos criollos en función de su contenido de dimetilpirazina	100
Figura 18.	Relación de discriminación entre cacaos criollos en función de su contenido de dimetil, trimetil y metilpirazinas	100
Figura 19.	Gráfico de componentes principales	102
Figura 20.	Relación de discriminación entre variedades de cacao en función del contenido etil y 2,5-dimetilpirazina	103

Figura 21.	Relación de discriminación entre las diferentes variedades de cacao en función de su contenido de dimetilpirazina	104
Figura 22.	Relación de discriminación entre las diferentes variedades de cacao en función de su contenido de tetrametilpirazina y metilpirazina	104
Figura 23.	Gráfico de Funciones discriminantes para la tetrametilpirazina y la trimetilpirazina	105
Figura 24.	Estudio del tiempo de Torrefacción para las diferentes variedades de cacao	106
Figura 25.	Estudio del tiempo de Torrefacción 2-metilpirazina (a), 2,5-dimetilpirazina (b), 2,6- dimetilpirazina (c) Etilpirazina (d), 2,3- dimetilpirazina (e), Trimetilpirazina (f), Tetrametilpirazina (g)	107

Capítulo III. Determinación de Solventes Orgánicos Tóxicos por EC-CG-FID en orina humana

Figura 1.	Diagrama esquemático del sistema instrumental	136
Figura 2.	Viales, tapas y septum a utilizar	139
Figura 3.	Cromatograma obtenido para mezcla de BTXs, etanol y sus metabolitos. Columna AT-502.2	143
Figura 4.	Cromatograma obtenido para 3 mL de orina enriquecida con BTXs a 5,00 µg/L	144
Figura 5.	Efecto de la temperatura de termostatización en la sensibilidad de detección	147
Figura 6.	Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 µg/L a una temperatura de termostatización de 100 °C	148
Figura 7.	Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 µg/L a una temperatura de termostatización de 90 °C	148
Figura 8.	Efecto del tiempo de termostización en la sensibilidad de detección	149
Figura 9.	Efecto del tiempo de presurización en la sensibilidad de detección	151
Figura 10.	Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 1000 µg/L bajo condiciones optimizadas y con un tiempo de muestreo de 0,5 min	152
Figura 11.	Efecto del tiempo de inyección en la sensibilidad de detección	153
Figura 12.	Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 µg/L con un tiempo de inyección de 1,5 min	154
Figura 13.	Efecto del volumen de muestra en el vial en la sensibilidad de detección, para viales de 22 mL (a) y de 9 mL (b)	156
Figura 14.	Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 0,625 µg/L bajo las condiciones optimizadas	157

Figura 15. Efecto de la cantidad de NaCl añadido a 3 mL de una mezcla acuosa de BTXs de 5,00 µg/L.	159
Figura 16. Efecto de la cantidad de NaCl añadido a 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 µg/L en orina.	159

Capítulo IV. Determinación de Plaguicidas Organofosforados en Aguas de Consumo Humano por MSFIA-CG-EM

Figura 1. Estructura General de los pesticidas organofosforados	181
Figura 2. Estructuras de los pesticidas organofosforados en estudio	183
Figura 3. Sistema por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) empleado para la preconcentración de los pesticidas organofosforados en aguas de consumo humano. El dibujo adjunto es una descripción de la unidad de extracción. El sistema esta constituido por: J1-J4, Jeringas, V1-V6, válvulas solenoides, BC Bucle de carga; Unidad de preconcentración (Disco C ₁₈), R ₁ metanol:acetato de etilo (60:40 v/v), R ₂ metanol: agua (80:20 v/v).	192
Figura 4. Estudio del volumen de muestra para llevar a cabo la preconcentración en el sistema MSFIA para el análisis de los plaguicidas organofosforados (♦), Diazinon, (■) Clorpirifo, (▲) Metilparation, (×) Malation.	194
Figura 5. Estudio de la velocidad de flujo para llevar a cabo la preconcentración en el sistema MSFIA para el análisis de los plaguicidas organofosforados (♦), Diazinon, (■) Clorpirifo, (▲) Metilparation, (×) Malation.	195
Figura 6. Estudio de volumen de elución en el sistema MSFIA para el análisis de los plaguicidas organofosforados (♦), Diazinon, (■) Clorpirifo, (▲) Metilparation, (×) Malation.	196
Figura 7. Cromatograma obtenido bajo las condiciones optimizadas para una muestra de agua enriquecida con los analitos (a) Diazinon, (b) Metil Paration, (c) Malation, (d) Clorpirifo, a una concentración de 1,0 µg/L	197

Capítulo V. Determinación de COC y BZE en Muestras de Orina Humana por CG-EM empleando un sistema MSFIA para el Tratamiento en Línea

Figura 1. Estructura de la Cocaína	215
Figura 2. COC y sus principales metabolitos	216
Figura 3. Metabolismo de la COC	221

Figura 4. Sistema por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) empleado para la determinación de COC y BZE en orina humana.	238
Figura 5. Efecto del volumen de muestra	245
Figura 6. Efecto del Tiempo de Irradiación	247
Figura 7. Efecto de la Potencia de Irradiación	248
Figura 8. Comparación de condiciones de derivatización: (A) Calentamiento por irradiación por microondas (90s, 630W), (B) Calentamiento convencional (30 min, 60°C)	248
Figura 9. Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas. Para un volumen de inyección de 0,100 mL de (A) solución patrón acuosa de COC y BZE de concentración 0,50 µg/mL para ambos analitos (B) muestra de orina enriquecida con los analitos en estudio (0,50 µg/mL)	249
Figura 10. Representación gráfica de la concentración de BZE en las muestras de orina utilizando ambas metodologías	254
Figura 11. Estudio comparativo entre ambos métodos.	256

www.bdigital.ula.ve

Glosario

CG	Cromatografía de Gases
ELL	Extracción Líquido-Líquido
ESL	Extracción Sólido-Líquido
EFS	Extracción en Fase Sólida
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida
TMCS	Trimetilclorosilano
MSTFA	N-Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida
EM	Espectrometría de Masas
EC	Espacio de Cabeza
MEFS	Microextracción en Fase Sólida
TC	Trampa Criogénica
PTFE	Politetrafluoroetileno
FIA	Análisis por Inyección en Flujo (Flow injection Analysis)
SFA	Análisis en Flujo Segmentado (Segmented Flow Analysis)
SIA	Análisis por Inyección secuencial (Sequential Injection Analysis)
MSFIA	Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa (Multisyringe Flow Injection Analysis)
MCFIA	Análisis en Flujo Multiconmutado
RAM	Materiales de Acceso Restringido (Restricted Access Material)
LPS	Soporte de Partículas Grandes (Large Particle Supports)
ISRP	Superficie Interna de Fase Reversa (Internal-Surface Reversed Phase)
ADS	Alquil Diol Sílica
INIA	Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas
CV	Coeficiente de Variación
L.D.	Límite de Detección
ACP	Análisis de Componentes Principales
BTXs	benceno, tolueno y los o-, m- y p-xilenos

FID	Detector por Ionización de Llama
SNC	Sistema Nervioso Central
VLB	Valores Límites Biológicos
IBE	Índice Biológico de Exposición
FAO	Consejo de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
OMS	Organización Mundial de la Salud
POPs	Plaguicidas Organofosforados
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
UE	Unión Europea
COC	Cocaína
BZE	Benzoilecgonina
EME	Éster Metílico de la Ecgonina
ECG	Ecgonina
NOR	Norcocaína
COE	Cocaetileno
EMIT	Inmunoensayo Enzimático
RIA	Radioinmunoensayo
d.i.	Diámetro Interno
SIM	Monitoreo de Ion Específico
MW	Microondas
UV	Ultravioleta
ϵ'	Constante dieléctrica

CAPÍTULO I

“Introducción General y Propuesta de Trabajo”

C.C. RECONOCIMIENTO - 1

NO COMERCIAL- COMPARTIR IGUAL

1. Introducción

La cromatografía de gases (CG) fue una de las primeras técnicas de separación que se desarrolló y que aun en nuestros días juega un papel importante en la identificación y cuantificación de muchos compuestos en diferentes matrices⁽¹⁾.

La importancia de esta técnica se basa en la excelente combinación de buena selectividad, resolución y precisión, además de un amplio intervalo dinámico de concentración y alta sensibilidad.

En CG la muestra se volatiliza, se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica y la elución de los analitos se produce por el flujo de un gas inerte (fase móvil) que no interacciona con las moléculas de los analitos, su única función es la de transportarlos a través de la columna⁽²⁾.

Con respecto a la fase estacionaria, ésta puede ser: (a) un sólido adsorbente; (b) un líquido retenido en un soporte sólido inerte (columna empacada) o impregnado en las paredes de una columna capilar (columna abierta)⁽³⁾.

Esta técnica (CG) es aplicada con excelentes resultados para compuestos orgánicos volátiles o compuestos susceptibles de ser volatilizados sin descomposición⁽⁴⁾. En ese sentido, la temperatura juega un papel decisivo en una separación por CG.

Un cromatógrafo de gases consta de varios componentes (Figura 1)

- ✓ Suministro de gas portador y controladores de flujo.
- ✓ Inyector
- ✓ Horno y columna de separación
- ✓ Detector

El gas portador es la fase móvil y se encarga de arrastrar la mezcla de los componentes desde que se introduce en el sistema cromatográfico hasta el detector, pasando a través de la columna donde se produce la separación. Debe ser químicamente inerte y no interaccionar ni con la columna ni con los

componentes de la mezcla, es decir, no afectar los procesos de partición o de adsorción que ocurren en la columna⁽³⁾.

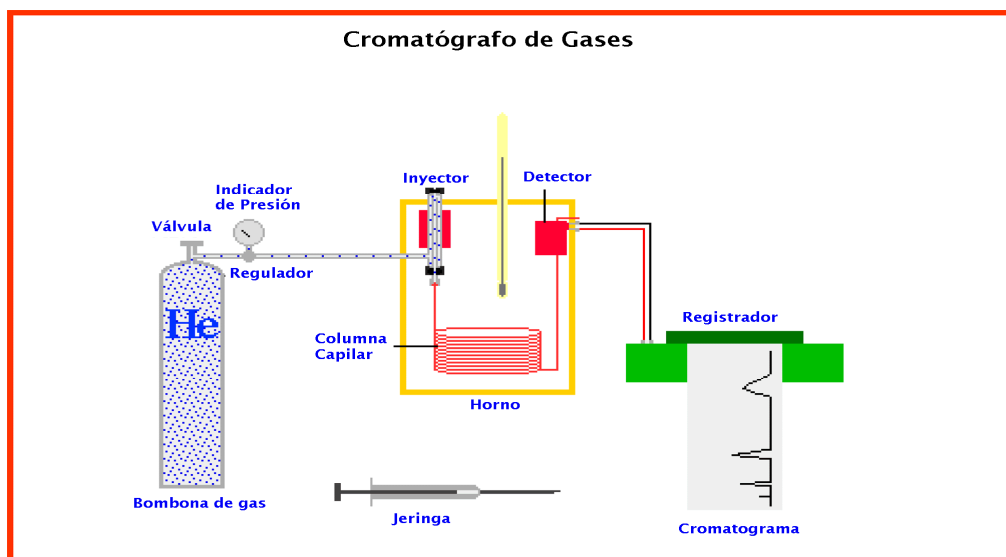


Figura 1. Componentes de un Cromatógrafo de Gases

Los gases más utilizados son hidrógeno, helio, nitrógeno y argón y su selección depende: de las características de la columna y del sistema de detección a utilizar.

Por otra parte, el gas portador debe estar exento de impurezas tales como agua, oxígeno e hidrocarburos que afectan a la columna o a los otros componentes del sistema. En ese sentido, con el suministro de gas portador se encuentran asociados además de los reguladores de presión, manómetros y medidores de flujo, existen filtros para eliminar todas las impurezas mencionadas⁽²⁾.

El inyector representa la puerta de entrada de los componentes de la mezcla al cromatógrafo. Tiene dos funciones, vaporizar y arrastrar a la cabeza de la columna la muestra mezclada con el gas portador. Las características de los inyectores así como los modos de inyección, se diferencian según el tipo de columnas que se utilice (capilar o de relleno). La inyección de la muestra se realiza

Delgado

con una microjeringa, de la que existen numerosos modelos adaptados a diversos sistemas y columnas.

La columna es el elemento esencial del cromatógrafo de gases, ya que en ella tienen lugar los procesos físico-químicos en los que se fundamenta la separación⁽³⁾.

Históricamente, las primeras columnas utilizadas en CG fueron las columnas de relleno, en las cuales la fase estacionaria era un sólido finamente dividido (cromatografía gas-sólido) o una película delgada de líquido colocada en un soporte sólido inerte (cromatografía gas-líquido)⁽²⁾. Hoy en día las columnas de relleno fueron sustituidas por las columnas capilares que son mucho más eficientes por tener menor diámetro y mayor longitud.

El fundamento de las separaciones mediante CG se basa en las diferencias en volatilidad de los componentes de la mezcla a separar y en su capacidad para ser adsorbidos o solubilizados en la fase estacionaria. En ese sentido, la temperatura juega un papel fundamental y por ello la columna se encuentra en un horno termostatzado.

El detector está ubicado a la salida de la columna y a través de él, pasa el gas portador con los analitos ya separados. Su misión es la de poner de manifiesto el paso de los analitos originando una señal eléctrica que, debidamente amplificada, es registrada o enviada para ser almacenada en un computador. El fundamento del detector es medir de forma continua una propiedad física o química del gas que circula permanentemente a su través. En éste se realizan dos funciones primordiales: indicar el momento exacto en que pasa un soluto (su máxima concentración) registrando los tiempos de retención para el análisis cualitativo. Adicionalmente, debe originar una señal proporcional a la cantidad de analito que pasa, para fines cuantitativos⁽¹⁾.

En CG existen algunos detectores convencionales universales o selectivos como⁽⁵⁾: Detector de Conductividad Térmica (TCD), Detector de Ionización a la Llama (FID), Detector de Captura Electrónica (ECD), Detector de Fotometría a la Llama (FPD). Estos detectores no dan información sobre la naturaleza de los compuestos eluidos. La identificación se basa en la determinación de los tiempos

de retención de los analitos en soluciones patrones, siendo esto una limitación. Sin embargo, para remediarlo se emplean detectores que permitan tener informaciones espectrales o relativas a la composición elemental de los analitos. Entre éstos se encuentran: Detector de Espectrometría de Masas (EM), Detector Infrarrojo por Transformadas de Fourier (FTIR), Detector de Emisión Atómica (AA).

Para llevar a cabo un análisis por CG, el analito debe poseer una apreciable volatilidad por debajo de los 350 °C y no debe encontrarse en solución acuosa, ya que esta deteriora la fase estacionaria de la columna. Por lo general, se requiere de un tratamiento previo de la muestra, antes de ser introducida al sistema cromatográfico⁽⁶⁾.

El tratamiento de la muestra es uno de los pasos más importantes del proceso analítico ya que permite convertir una matriz real, en una con formato más simple, apropiado para el análisis.

Se sabe que el proceso analítico (Figura 2) es el conjunto de operaciones comprendidas entre la muestra (sin tomar, sin medir, sin tratar) y los resultados expresados según los requerimientos⁽⁷⁾.



Figura 2. Proceso analítico

El muestreo, es el procedimiento mediante el cual se obtiene una muestra representativa del material a analizar. Por consiguiente, el muestreo es

considerado como una etapa fundamental ya que errores cometidos en éste conducen a resultados no confiables.

Al llegar la muestra al laboratorio el químico analítico debe enfrentarse al primer problema: elegir una porción de la muestra para realizar el análisis que represente a la misma en su totalidad. Una vez obtenida la muestra, ésta debe colectarse en un recipiente adecuado y en algunos casos analizarla lo más pronto posible.

La preparación de la muestra constituye el paso siguiente en el proceso global del análisis. Por lo general, este proceso es el que consume mayor tiempo. Los principios generales que se deben aplicar en esta etapa se detallan a continuación^(7,8):

- Debe realizarse sin perder ninguno de los analitos.
- Se debe transformar el analito a la mejor forma química para el método de ensayo que va a emplearse.
- Eliminar algunas interferencias de la matriz.
- Se debe llevar a cabo sin agregar nuevas interferencias (provenientes de reactivos o recipientes de reacción).
- La preparación de la muestra incluye, cuando es necesario, la dilución o concentración de los analitos (para que sus concentraciones se encuentren dentro del mejor intervalo para el método a aplicar).

Es importante señalar, que en muchas ocasiones hay que utilizar un criterio de selección de tratamiento de muestra, ya que se hace difícil cumplir todos los requisitos mencionados anteriormente y por lo tanto, se debe elegir el que proporcione los mejores resultados⁽⁸⁾. Por otra parte, se debe considerar que no sólo el tiempo requerido es el factor limitante del tratamiento, sino el riesgo de error que implica esta etapa.

Por esta razón, para realizar un análisis cromatográfico se hace necesario tomar en cuenta todas las variables involucradas en el tratamiento de muestra, que se mencionan a continuación:

- ✓ Disolver los analitos en un solvente conveniente compatible con el sistema cromatográfico seleccionado.
- ✓ Eliminar la mayoría de los compuestos que puedan interferir en el análisis.
- ✓ Preconcentrar a los analitos en el caso de análisis de trazas.
- ✓ Derivatizar a los analitos para mejorar su volatilidad, la discriminación cromatográfica o la sensibilidad en la detección⁽³⁾.

En ese sentido, este procedimiento involucra el uso de muchas técnicas analíticas (Figura 3) para lograr que la muestra a estudiar cumpla con las condiciones que exige un cromatógrafo de gases⁽⁹⁾.

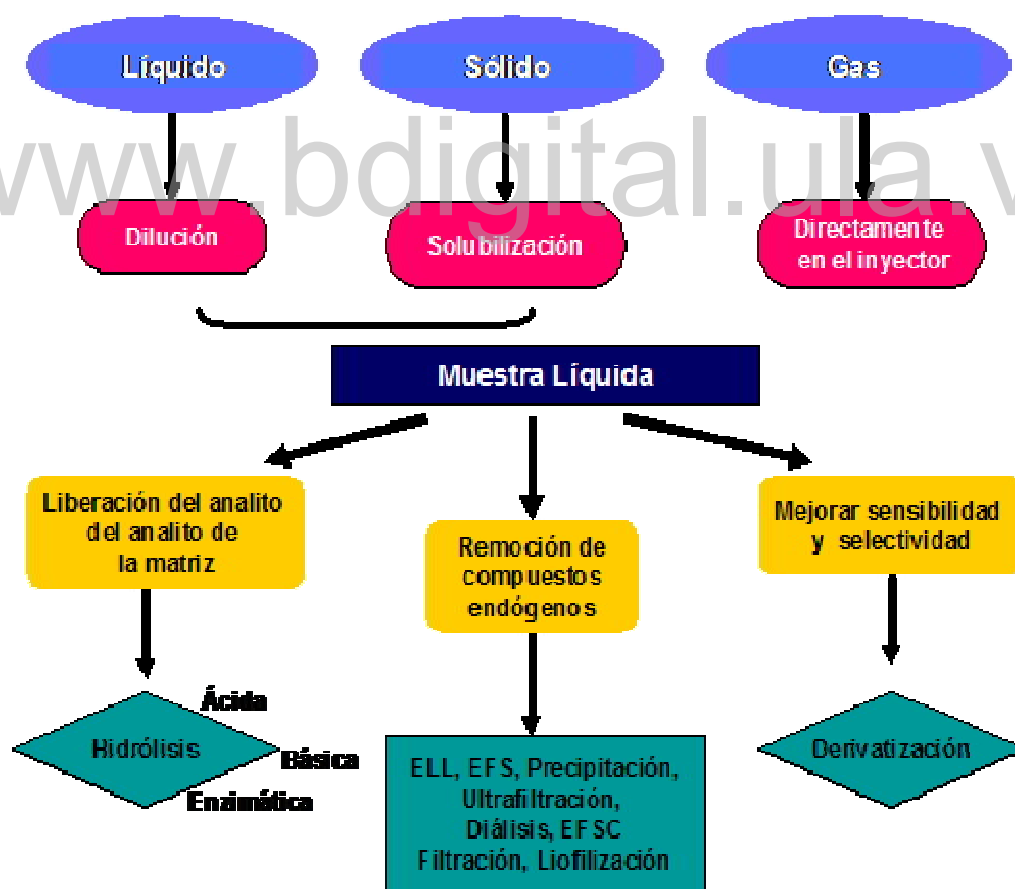


Figura 3. Diagrama esquemático de tratamiento de muestra.

Una vez culminado el tratamiento de la muestra, se procede a su introducción en el cromatógrafo de gases para su análisis. Finalmente, se realiza la etapa de tratamiento de datos que consiste en procesar matemáticamente los datos para obtener unos resultados que den el valor más probable de la información buscada, así como la incertidumbre que la acompaña.

Si observamos la Figura 3, podemos concluir que la etapa de tratamiento de la muestra puede involucrar muchas técnicas de separación para lograr una muestra que cumpla con las condiciones necesarias para su análisis por cromatografía de gases.

En ese sentido, los analistas han reconocido que la etapa de tratamiento de la muestra para CG es muy tediosa y consume mucho tiempo, el mayor en el proceso analítico como se puede ver claramente en la Figura 4. En ella podemos observar que esta etapa implica más del 50 % del tiempo requerido para llevar a cabo un análisis⁽⁸⁾.

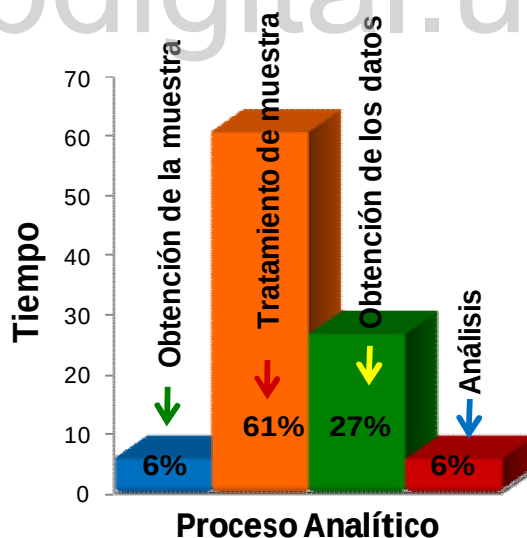


Figura 4. Distribución de tiempo requerido en cada una de las etapas de un método de análisis por cromatografía de gases

Por otra parte, esta etapa afecta adversamente el rendimiento global de un análisis por CG debido a pérdida o descomposición del o los analitos, así como también a la introducción de contaminantes extraños.

La tendencia actual está enfocada en simplificar la etapa de tratamiento de la muestra con el fin de disminuir el tiempo para lograr una mayor frecuencia de análisis y una reducción del costo por análisis.

Es por ello que en esta Tesis se presentan algunos desarrollos metodológicos para evaluar analitos de interés clínico, ambiental y alimentario donde se trata de simplificar la etapa de tratamiento de la muestra.

A continuación para mayor entendimiento del tema se hará una introducción sobre el tratamiento de la muestra basada en una extensa revisión bibliográfica.

2. Tratamiento de Muestra

En el diagrama de la Figura 3 podemos observar, que salvo para el caso de muestras gaseosas, se requiere que la muestra se encuentre en solución. Es por ello, que para poder definir un protocolo del procedimiento para el tratamiento de la muestra, en primer lugar es necesario conocer las propiedades físicoquímicas de los analitos a determinar y de la matriz donde están contenidos.

A continuación se realizará una breve descripción de cada una de las técnicas más utilizadas en el tratamiento de la muestra para un análisis cromatográfico.

2.1. Liberar a los analito de la matriz

2.1.1. Hidrólisis

Estas reacciones permiten liberar al analito de la matriz sin degradar la estructura del mismo.

La hidrólisis puede ser ácida, básica o enzimática. El tiempo necesario para llevar a cabo una hidrólisis ácida o básica suele ser corto, sin embargo las condiciones empleadas son generalmente severas (rango extremos de pH y

temperatura), por lo que se hace necesario verificar la estabilidad de los analitos en estudio bajo estas condiciones.

La principal ventaja de este método es su bajo costo, ya que no requiere de un equipo especial. Sin embargo, con él se pierden los productos de reacción volátiles, lo que introduciría un error sistemático si el analito es una de esas sustancias⁽¹⁰⁾.

Por otra parte, la hidrólisis también puede ser enzimática y suele emplearse para aislar un compuesto específico de una mezcla de productos orgánicos naturales o para convertir un compuesto en otro de menor peso molecular, el cual va a ser fácil de determinar cuantitativamente.

2.2. Eliminación de compuestos endógenos

En el análisis químico, la muestra muchas veces contiene especies que pueden interferir en la determinación de los analitos de interés, bien porque producen una señal indistinguible del analito o bien porque la atenúan, siendo preciso eliminarlas. Pocas técnicas analíticas están libres de interferencias, por lo que, una etapa importante en la mayoría de estos análisis es su eliminación. Para ello, se utilizan técnicas de separación y a continuación se describen algunas de las más utilizadas para cromatografía de gases.

2.2.1. Ultrafiltración

Es un proceso de separación por membrana, que es capaz de retener selectivamente solutos no ionizables.

Una ultrafiltración consiste por tanto, en el empleo de una membrana fina, resistente y selectiva que rechaza la mayor parte de las moléculas con un tamaño superior al límite de exclusión molecular del mismo. Así, pues esta técnica rechaza macromoléculas, coloides, virus y bacterias, mientras que las sales y los iones disueltos atraviesan la membrana. Esta retención implica moléculas de peso molecular comprendidas entre 300 y 500.000 Dalton.

Entre las aplicaciones más comunes, cabe destacar la eliminación de proteínas y otras macromoléculas sin necesidad de utilizar procesos de precipitación, permitiendo el empleo de volúmenes pequeños de muestra.

2.2.2. Extracción Simple

2.2.2.1. Extracción Líquido-Líquido (ELL)

La extracción líquido-líquido es, junto a la destilación, la operación básica más importante en la separación de mezclas homogéneas líquidas. Consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas. Una de las fases es dispersada en la otra para aumentar la superficie interfacial y aumentar el caudal de materia transferida.

En contraste con otras técnicas, la extracción tiene la ventaja de procurar separaciones más netas y más limpias.

El campo de aplicación de la extracción líquido-líquido es muy amplio no sólo como técnica de separación, sino en otros aspectos de la química analítica. Por ejemplo en procesos de concentración de una especie, previo a su determinación, cuando el método analítico a utilizar no tiene una sensibilidad suficiente para detectar y/o cuantificar concentraciones bajas de dicha especie.

En un proceso de extracción se deben tomar en cuenta una serie de factores, con el fin de conseguir una separación del analito cuantitativa y libre de impurezas.

Por otra parte, la gran variedad de disolventes disponibles y la posibilidad de emplear mezclas de los mismos, hace de la ELL una técnica muy útil y adecuada para el análisis de cualquier compuesto orgánico.

Si bien, la ELL es ampliamente utilizada, no está exenta de problemas. La formación de emulsiones, el manejo de grandes volúmenes de muestra, el empleo de disolventes tóxicos e inflamables, así como los riesgos de pérdidas o contaminaciones durante las distintas etapas hacen de ella una técnica lenta,

tediosa y es por ello que, en los últimos años ha sido desplazada poco a poco por la extracción en fase sólida⁽⁸⁾.

2.2.2.2. Extracción Sólido-Líquido (ESL)

La ESL es uno de los procesos de extracción más utilizados en el análisis de compuestos orgánicos en muestras sólidas.

Se basa en poner en contacto una cantidad determinada de muestra con un disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla se somete a diferentes procesos, más o menos agresivos en función de la fortaleza de las interacciones analito-matriz. En este punto, es importante tomar en cuenta que, aunque realizar un proceso exhaustivo asegura la extracción completa del analito, simultáneamente se extraerá una mayor cantidad de especies interferentes que podrían traer dificultades en la determinación final del analito.

En la Tabla 1 se resumen algunas de las técnicas empleadas para la extracción líquida de compuestos en muestras sólidas, junto con una breve descripción de las mismas, sus ventajas e inconvenientes⁽⁸⁾.

2.2.2.3. Extracción en Fase Sólida (EFS)

Los métodos cromatográficos son exigentes en lo que respecta a la naturaleza de las matrices en el seno de las cuales se encuentran los analitos a determinar. En el análisis de trazas o de microcontaminantes, la metodología de extracción en fase sólida, es más conveniente que el método clásico de extracción con solventes⁽¹¹⁾.

El fundamento de la EFS es similar al de la ELL, es decir, se basa en la diferente afinidad que presenta el analito por una fase sólida o por la propia muestra líquida. De esta manera, al hacer pasar la muestra a través de una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, entre otras) algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasarán inalterados. Posteriormente si los analitos de interés han quedado retenidos, éstos podrán ser eluidos con un pequeño volumen de solvente (preconcentración).

Esta técnica es ideal para la extracción de analitos presentes en muestras líquidas y para la purificación de extractos obtenidos mediante otras técnicas de extracción mencionadas anteriormente, evitando así los problemas asociados a la ELL.

Tabla 1. Técnicas de extracción de compuestos en muestras sólidas.

	Descripción	Ventajas	Inconvenientes
Extracción Soxhlet	La muestra se coloca en una carcasa porosa y el disolvente recircula continuamente a través de ella mediante un sistema de destilación-condensación	✓ Método estándar ✓ No es necesario filtrar el extracto ✓ Independiente del tipo de matriz ✓ Bajo costo	• Elevado tiempo de extracción (12-48 h) • Gran cantidad de disolvente (300-500 mL) • Es necesaria la evaporación del disolvente
Extracción con fluidos supercríticos	La muestra se coloca en un cartucho de alta presión y se extrae con un fluido supercrítico. Después de la despresurización, los analitos son recogidos en un pequeño volumen de un disolvente orgánico o sobre un soporte adecuado	✓ Rápido (30-60 min) ✓ Se puede conseguir alta selectividad modificando la presión, la temperatura. ✓ Baja cantidad de disolvente orgánico (5-10 mL) ✓ No es necesario filtrar ✓ Automático	• Tamaño de muestra limitado (<10 g) • Depende del tipo de matriz • Costo elevado
Extracción con microondas	La muestra se coloca junto con el disolvente en un reactor y la mezcla se calienta con energía de microondas	✓ Rápido (15 min) ✓ Bajo consumo de disolvente ✓ Automático (extracción secuencial de hasta 24 muestras) ✓ Fácil manejo	• Es necesario filtrar el extracto • Es necesario la adición de un solvente polar • Se requiere limpiar el extracto • Costo moderado
Extracción acelerada	La muestra se coloca en un cartucho y se presuriza con un disolvente caliente (por debajo de su punto de ebullición). Posteriormente el extracto es transferido a un vial de forma automática.	✓ Rápido (20-30 min) ✓ Baja cantidad solvente orgánico (30 mL) ✓ Control absoluto sobre los parámetros de la extracción (temperatura, presión y potencia) ✓ No se necesitan agentes desecantes	• Elevado costo • Depende el tipo de matriz

Sus características la hacen muy adecuada para:

Eliminación de interferencias: En aquellos casos en que se retenga los analitos de interés y no lo hagan otras especies constituyentes de la muestra que pueden actuar como posibles interferentes. El uso de la EFS para eliminar interferencias ha constituido un 50% de su empleo en general.

Preconcentración de analitos: se consigue cuando el analito presente en un volumen elevado de muestra queda retenido en la fase sólida y es posteriormente eluido con pequeños volúmenes de un solvente. Su uso se extiende hasta en un 30%, consiguiendo factores de preconcentración relativamente elevados.

Cambio de fase: es de gran interés en aquellos casos en que el analito se encuentra en una emulsión, suspensión o en un solvente inadecuado para la técnica a emplear en su determinación final. Así, una vez el analito ha sido retenido en el soporte sólido, se eluye con un disolvente apropiado.

Conservación y Transporte de la muestra: a este procedimiento se le conoce como muestreo de campo y resulta útil para el muestreo de gases y contaminantes orgánicos⁽⁸⁾.

La extracción en fases sólida se puede llevar a cabo empleando cartuchos o discos.

2.2.2.3.1. Extracción con Cartuchos

La fase sólida (sorbente) está colocada en un cartucho de vidrio o polietileno. Es similar a una pequeña columna donde la fase se empaca en forma de sándwich entre dos placas de polietileno con 20 μm de diámetro de poro y la fase líquida se hace fluir a través del mismo ya sea por succión o por presión⁽¹²⁾.

Para llevar a cabo la extracción, es necesario cumplir una serie de etapas. En primer lugar, el sorbente es acondicionado con un disolvente de propiedades similares a la muestra. Posteriormente un determinado volumen de muestra se pasa a través de él quedando así los analitos retenidos. Finalmente, luego de una etapa de lavado con diferentes solventes para eliminar posibles compuestos interferentes, los analitos son eluidos con un solvente adecuado (Figura 5).

La selectividad de esta técnica es muy amplia debido a que existen en el mercado una gran variedad de sorbentes bien sea polares, apolares, intercambio iónico y de exclusión molecular. Es importante señalar que la elección del sorbente a utilizar dependerá de las propiedades del analito, de su nivel de concentración y del disolvente en el que se encuentre.

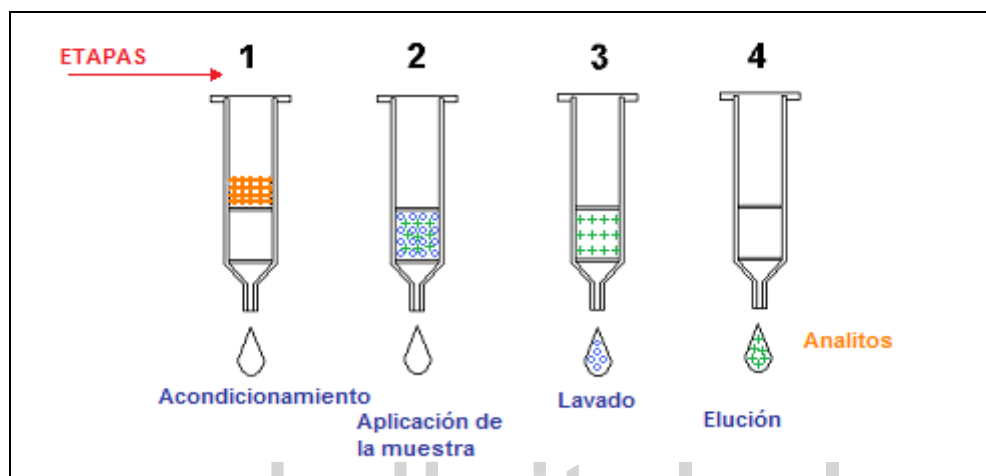


Figura 5. Etapas de la Extracción en Fase Sólida

2.2.2.3.1. Extracción con Discos

Una variante del procedimiento en columna, son los discos de extracción donde la fase extractante está dispuesta en forma de discos de 0,5 mm de grosor y de 25 a 90 mm de diámetro. Éstos permiten extraer rápidamente volúmenes importantes de muestra, lo cual, no es posible con una columna pequeña. Estos discos se emplean como un papel de filtro en un sistema de filtración al vacío. La recuperación del analito se hace por percolación. Esta técnica está destinada sobre todo a la retención de compuestos trazas dispersos en solución acuosa⁽¹¹⁾.

Al igual que los cartuchos, los discos son comercializados con diferentes fases, por lo que su elección depende de los analitos a estudiar.

2.3. Aumento de Sensibilidad y Selectividad

Como se mencionó anteriormente, los compuestos a estudiar por cromatografía de gases deben cumplir con la condición de ser volátiles o poseer una apreciable volatilidad a temperaturas por debajo de 350 - 400 °C. Sin embargo, en algunos casos los analitos a determinar no cumplen con estas características y para solventar esta situación se emplea una técnica de carácter específico como lo es la *Derivatización*.

2.3.1. Derivatización

Es el proceso por el cual el o los analitos son transformados en otra especie por una reacción química⁽¹³⁾. La derivatización previo al análisis cromatográfico se emplea por numerosas razones en la preparación de las muestras.

- Incrementa la volatilidad: la baja volatilidad puede deberse al tamaño de la molécula y a la fuerza de dispersión resultante que mantiene las moléculas juntas.
- Incrementa la sensibilidad: con respecto al sistema de detección empleado.
- Proporciona selectividad: acentúa las diferencias entre los componentes de la muestra.
- Proporciona estabilidad del analito: algunos compuestos pueden presentar descomposición térmica en el cromatógrafo de gases, por esta razón es necesario mantenerlos estables para ser analizados.
- Confirmar la presencia de un determinado analito: el derivado formado permite identificar al analito.

Lo más importante de la etapa de derivatización es que proporciona volatilidad a compuestos no volátiles o poco volátiles.

En la Tabla 2 se presentan algunos reactivos derivatizantes más empleados así como su rango de aplicación.

Los procesos de derivatización constituyen una forma sencilla de evitar procesos tediosos de limpieza de extractos. Sin embargo, los reactivos derivatizantes no suelen ser específicos y por lo tanto pueden reaccionar también

Delgado

con otros componentes de la muestra. Por ello, para asegurar un buen rendimiento de la reacción, el reactivo se debe añadir en exceso. Además, también juega un papel importante en la reacción el solvente empleado que debe estar libre de átomos que puedan interferir en la reacción^(15,16).

En conclusión, para obtener el mejor rendimiento en la reacción de derivatización se debe tener en cuenta: la naturaleza del solvente compatible con el reactivo derivatizante, la temperatura y el tiempo de reacción⁽¹⁵⁾.

Tabla 2. Reactivos derivatizantes más empleados en CG⁽¹⁴⁾

Reactivo derivatizante	Uso
Diazometano	Ácidos haloacéticos y clorofenoles
Trifluorometil-, pentafluoropropil- y heptafluorobutil- anhídridos	Reacciones con aminas, amidas, alcoholes, fenoles, tioles, glicoles y compuestos insaturados, formando compuestos volátiles
Bromuro de pentafluorobencilo	Reacciona con ácidos carboxílicos, fenoles, mercaptos y sulfonamidas
N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) con 1 % de trimetilclorosilano (TMCS)	Reacciona con aminas primarias secundarias, e hidrogenos provenientes de ácidos carboxílicos
Metil-butil-trifluoroacetamida (MBSTFA)	Reaccionan con grupos hidroxilo, carboxilo, tiol y amina (primarias y secundarias) para formar derivados volátiles
N-Metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) con 1% de TMCS	Reacciona con aminas y compuestos polares

En general la temperatura de la reacción se logra con procedimientos convencionales como calentamiento con baño termostatzado de agua y durante tiempos superiores a los 60 minutos. Una alternativa para disminuir el tiempo de la reacción es la de utilizar la radiación de microondas como forma de calentamiento que disminuye significativamente el tiempo del proceso de horas a minutos⁽¹⁷⁾.

2.3.1.1. Derivatización Asistida por Microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas localizadas dentro del espectro electromagnético en un intervalo de frecuencia que va de 300 a 300.000 MHz. Su radiación no posee características ionizantes, no produce cambios en la

estructura molecular y origina el movimiento de las moléculas debido a la migración de iones y a la rotación de dipolos.

El calentamiento de una muestra mediante la acción de las microondas depende del factor de disipación y su constante dieléctrica. Esta última proporciona una medida de la capacidad de una muestra para oponerse al paso de la radiación de microondas, lo que indica que la capacidad de absorción de esta radiación aumentará con el aumento de la constante dieléctrica.

Disolventes tales como el agua, ácidos minerales y algunos disolventes orgánicos tienen momentos dipolares que pueden interaccionar con el campo eléctrico aplicado, dando lugar a la rotación de dipolos o alineación de moléculas. Al dejar de aplicar el campo eléctrico, las moléculas vuelven a su estado de desorden en un tiempo denominado de relajación, durante el cual la energía absorbida se transforma en calor⁽⁸⁾.

Es importante mencionar que, la eficiencia del calentamiento depende de varios factores como la temperatura, la viscosidad y el tamaño de la muestra.

Viscosidad afecta la rotación molecular y por tanto la capacidad de absorber la energía de microondas. Así, si esta es elevada, la movilidad molecular es pequeña y por tanto baja la capacidad de alineación de las moléculas en el campo magnético, por lo que disminuye su factor de disipación.

Temperatura afecta a la rotación dipolar y a la conducción iónica

Tamaño de muestra afecta la distribución de temperatura de forma distinta que en los métodos clásicos de calentamiento. En los clásicos el calor se transmite por conducción a través del recipiente y por corrientes de convección en el seno de la disolución, por el contrario en el calentamiento por microondas el material es transparente a la radiación y es la muestra la que absorbe directamente dicha radiación, produciendo calentamientos en puntos concretos que llegan a originar gradientes de temperaturas importantes.

Por otra parte, la eficiencia de las microondas es muy pobre si los analitos de interés o el disolvente son apolares o tienen baja polaridad, si son volátiles y/o cuando los disolventes usados tienen una constante dieléctrica baja.

En la Tabla 3, se presentan algunas características importantes de los solventes más utilizados.

Un efecto interesante y aún poco explorado es el hecho de que la radiación microondas es selectiva, por lo que en una mezcla podría absorberse y por ello activarse selectivamente uno de los componentes.

Tabla 3. Constantes dieléctricas para diversos solventes

Solvente (punto de ebullición °C)	Constante dieléctrica (ϵ')
Agua (100)	80,4
Acetonitrilo (82)	37,5
Metanol (65)	32,6
Etanol (78)	24,3
Acetona (56)	20,7
2-Propanol (82)	18,3
Diclorometano (40)	9,1
Ácido acético (113)	6,2
Cloroformo (61)	4,8
Tolueno (111)	2,4
Hexano (64)	1,9

En el contexto de la etapa de tratamiento de la muestra para el análisis por CG, de la revisión bibliográfica, se ha podido constatar que todas las técnicas analíticas anteriormente resumidas han sido utilizadas y en muchos casos en forma manual. En consecuencia procedimientos tediosos, en algunos casos con bajas recuperaciones de los analitos, obteniéndose resultados marcados por una falta de exactitud.

La tendencia actual está enfocada en lograr la automatización de todo el procedimiento analítico con el fin de disminuir el tamaño de las muestras necesarias, el uso de disolventes orgánicos, la generación de residuos y fundamentalmente una disminución del tiempo.

Por esta razón, los instrumentos actuales, además de requerir de pequeñas cantidades de muestra, han favorecido la aparición de nuevos procedimientos que tienden a reducir en gran proporción los tiempos de preparación.

A continuación se detallará en la siguiente sección los tratamientos reservados a aquellas muestras destinadas al análisis por cromatografía de gases.

3. Introducción y Tratamiento de Muestra en Línea para Cromatografía de Gases

La técnica Espacio de Cabeza (EC) permite la introducción de la muestra en un cromatógrafo de gases sin la necesidad de ser tratada ya que consiste precisamente en separar a los analitos volátiles de la matriz.

3.1. Espacio de Cabeza

Esta técnica se basa en un procedimiento de extracción líquido-gas o sólido-gas, mediante el cual se determinan directamente los constituyentes volátiles de muestras sólidas o líquidas, analizando la fase de vapor que se encuentra en equilibrio termodinámico, con la muestra en un vial herméticamente cerrado.

Su fundamento se ilustra en dos variantes: modo *estático*, en donde la muestra se coloca en un recipiente herméticamente cerrado para que se establezca el equilibrio de los componentes volátiles entre ésta y el espacio de cabeza. Por otra parte, se encuentra el modo *dinámico*, en este caso, en lugar de emplear un recipiente cerrado, se hace pasar primero un gas portador a través de la muestra, para arrastrar los componentes volátiles hacia una trampa donde son adsorbidos y concentrados, para posteriormente ser desorbidas térmicamente y llevadas al cromatógrafo

El primer reporte de uso de EC *estático* con CG ocurrió en 1958⁽¹⁸⁾ y para el EC *dinámico* (purga y trampa) con CG fue en 1970⁽¹⁹⁾. En las últimas décadas ambas técnicas en combinación con CG han evolucionado significativamente. Así, tanto la teoría de EC como la transferencia de los analitos al CG han sido ampliamente desarrollados.

Termodinámicamente hablando, el espacio de cabeza es considerado un procedimiento extracción en fase gaseosa donde el solvente de extracción es un

gas. Esto permite minimizar el efecto de matriz, especialmente con analitos con bajos coeficientes de partición ($K_{g/s}$ o g/l).

Muchos investigadores han utilizado la técnica de EC para el tratamiento de la muestra previo a su introducción en el CG en sus tres modalidades a saber: EC-CG (estático), EC-CG (dinámico) y MEFS-EC. Es importante señalar que si bien la finalidad de las tres modalidades es la misma, la instrumentación es diferente⁽²⁰⁾. A continuación se explicará en detalle cada una de estas técnicas:

3.1.1. EC estático

La utilización de esta técnica en CG es simple por lo que se ha reportado en una gran variedad de aplicaciones⁽²¹⁾. Ésta permite, la introducción, en la columna cromatográfica, de los componentes volátiles de una muestra libre de la matriz no volátil⁽²²⁾. Es por ello, que seleccionando adecuadamente las condiciones de temperatura para el equilibrio de los analitos entre la fase sólida o líquida (muestra) con la fase gaseosa se puede aumentar la concentración de los mismos en el espacio de cabeza permitiendo así la determinación de analitos que se encuentran a niveles de trazas.

El procedimiento de muestreo consiste en tres etapas

- Etapa de Termostatización
- Etapa de Presurización
- Etapa de Inyección.

Durante la fase de *termostatización*, el vial que contiene la muestra se calienta por un período de tiempo a una temperatura determinada (temperatura de termostatización). En esta etapa, se genera una presión interna en el vial que corresponde a la suma de las presiones parciales de cada uno de los constituyentes volátiles de la muestra⁽²⁰⁾.

Posteriormente se realiza la etapa de inyección o muestreo para la cuál es necesario que la presión del espacio de cabeza en el vial sea superior a la de la cabeza de la columna cromatográfica con el fin de que se produzca un gradiente de presión y los analitos puedan entrar en la columna. Es por ello, que para

asegurar esta condición se requiere de una etapa de *presurización*. En esta etapa, se introduce un gas inerte en el vial a una presión determinada para que sirva de fuerza impulsadora, permitiendo la *inyección* de una alícuota del espacio de cabeza a la columna cromatográfica (tiempo de inyección o muestreo).

Un diagrama esquemático del funcionamiento de un automuestreador de espacio de cabeza en su modalidad estática se muestra en la Figura 6.

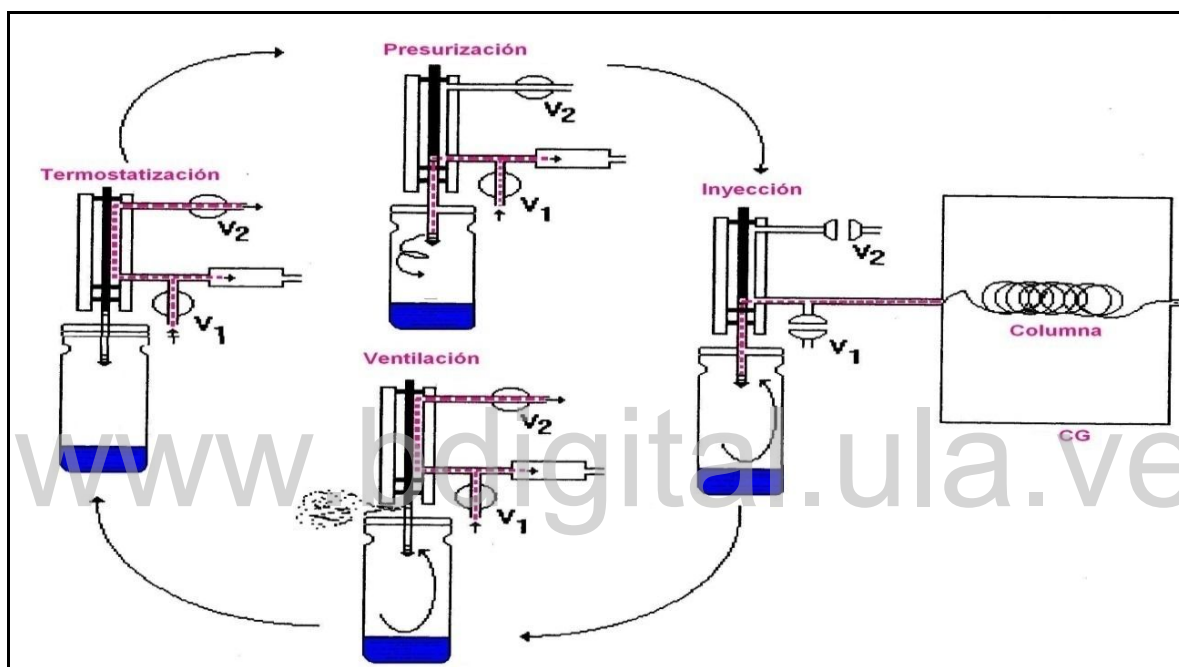


Figura 6. Etapas involucradas para llevar a cabo la introducción de la muestra empleando un EC⁽²⁰⁾

Con respecto, a la introducción de la muestra, ésta se puede realizar directamente al inyector del cromatógrafo de gases a través de una línea de transferencia o utilizando una jeringa de inyección. Sin embargo, en algunos casos, también se utilizan válvulas de inyección que permiten introducir cierto volumen de la muestra, a través de un bucle. Luego de la etapa de presurización, el bucle se llena con los analitos y finalmente, la válvula gira a la posición de inyección y el gas de arrastre transfiere el contenido del bucle a la columna cromatográfica para su separación y posterior detección (Figura 7)⁽³⁰⁾.

3.1.2. EC dinámico

El EC dinámico es una de las técnicas más utilizadas para la determinación de compuestos de bajo peso molecular en líquidos y sólidos viscosos de gran importancia en la industria química⁽²³⁾.

El ejemplo más importante, es la técnica clásica de purga y trampa que es una de las más sensibles para la detección de compuestos orgánicos volátiles de muestras sólidas o acuosas^(24,25).

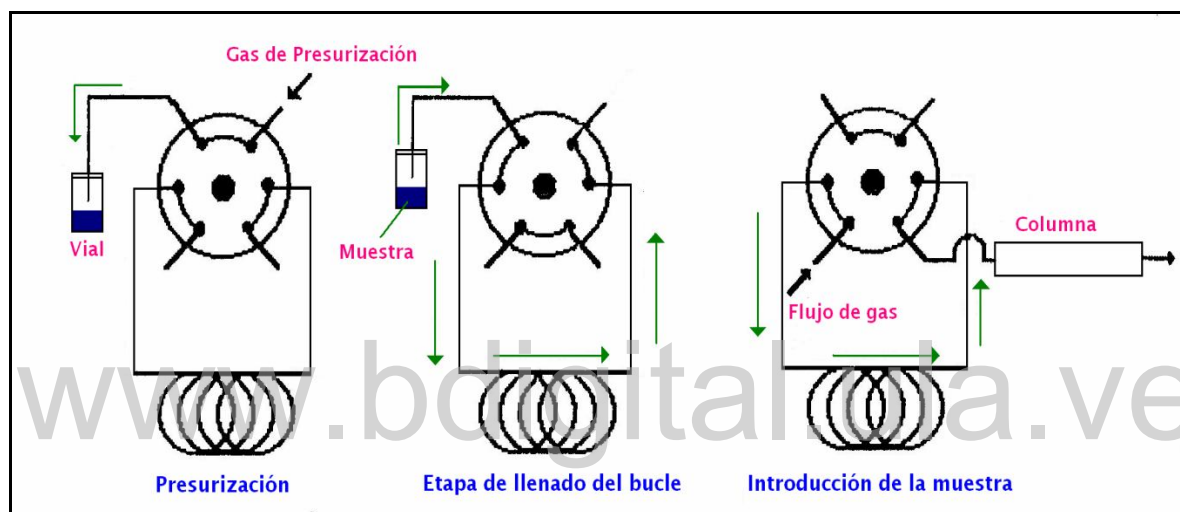


Figura 7. Representación esquemática del uso de una válvula de inyección para la introducción de la muestra en el sistema EC-CG⁽³⁰⁾.

En la Figura 8 se ilustra un montaje para purga y trampa (atrapamiento) de analitos volátiles. La técnica consiste en introducir la muestra en el compartimiento de purga, seguidamente se inicia el flujo del gas de purga para arrastrar los componentes volátiles de la muestra a la trampa (tubo empacado con material sorbente). Los compuestos retenidos en la trampa son posteriormente desorbidos térmicamente por inmersión de esta en agua caliente o por calentamiento eléctrico⁽²⁶⁾. En ese momento el gas de arrastre pasa a través de la trampa y transporta a los analitos al sistema cromatográfico.

Es importante señalar, que se requiere de una velocidad de flujo elevada para lograr la extracción total de los analitos presentes en la muestra en un tiempo

razonable. Adicionalmente, se requiere de una trampa de adsorción con suficiente capacidad para evitar la pérdida de la muestra durante el tiempo de purga.

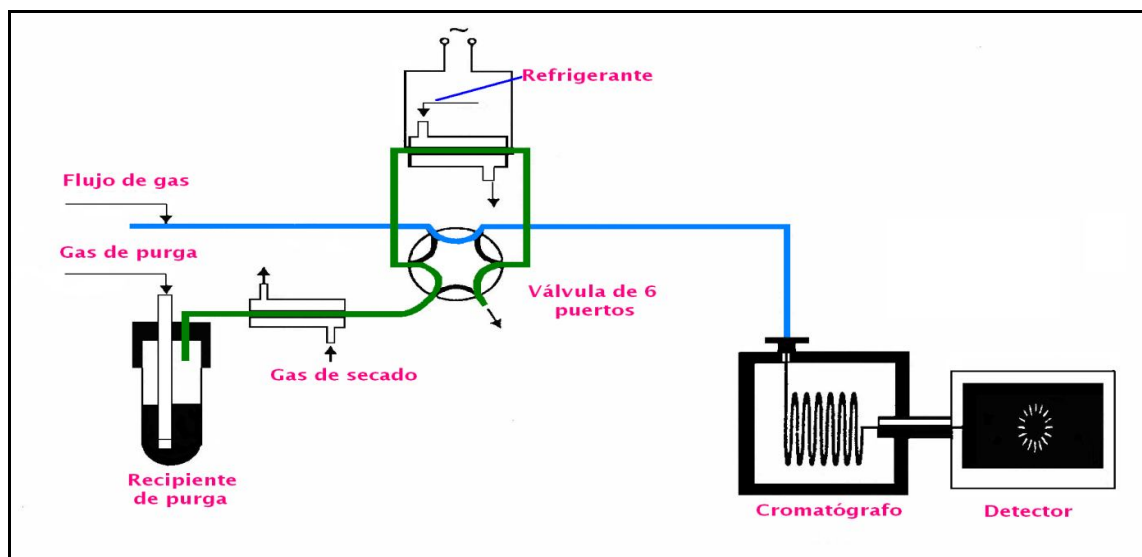


Figura 8. Representación esquemática de un sistema clásico de purga y trampa⁽²⁶⁾

En general, se utilizan mini columnas empacadas que permitan velocidades de flujo entre 20-30 mL/min tanto para la etapa de adsorción como para la de desorción. Este último es considerado quizás uno de los pasos más críticos de la técnica sobre todo cuando el sistema está acoplado a columnas capilares para las cuales una velocidad de flujo de 10 mL/min es ya muy elevada.

Por esta razón, para solventar este problema se ha hecho uso de los divisores de muestra (Splitter)^(27,28). Sin embargo, estos divisores reducen la sensibilidad del método, ya que una parte del gas es conducido a desecho y sólo una pequeña parte de la muestra es empleada para el análisis. Para solventar esta limitación se han empleado con frecuencia trampas criogénicas. Éstas se emplean con dos propósitos: el enriquecimiento de los analitos (preconcentración) y la obtención de picos más finos (eficiencia).

En la mayoría de las configuraciones reportadas en la literatura, se introduce la trampa criogénica después del tubo adsorbente antes de la columna

capilar como se muestra en la representación esquemática que se presenta en la Figura 9 y cuyo funcionamiento se detalla a continuación.

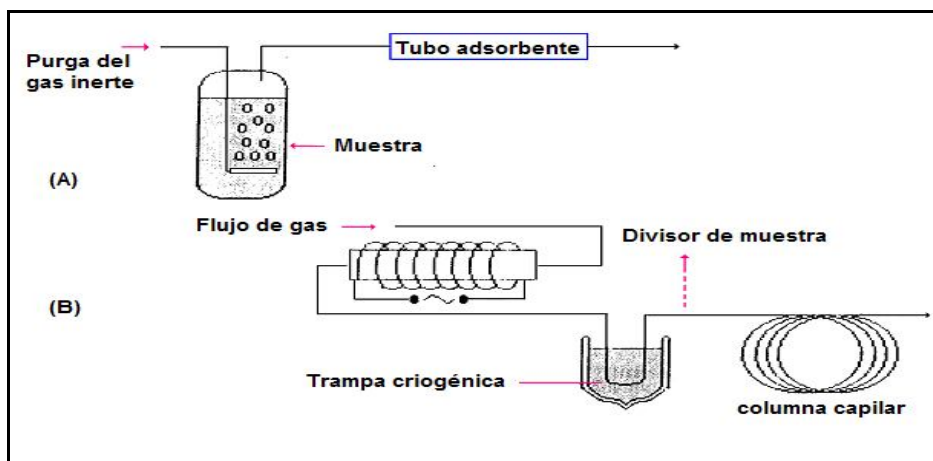


Figura 9. Configuración del sistema de purga y trampa incluyendo la trampa criogénica⁽²⁹⁾.

Al hablar de trampa criogénica (TC), es necesario conocer los principios físicos y las diferentes versiones de las mismas para definir la nomenclatura que permita clasificar las diferentes configuraciones instrumentales en un sistema propuesto. Hay una distinción hecha entre *condensación criogénica* y *enfoque criogénico* mientras que el término *trampa criogénica* es aplicado para ambos.

Condensación criogénica los compuestos volátiles son atrapados simplemente por condensación en una trampa que usualmente no contiene fase estacionaria. El sistema empleado es similar al que se mostró en la Figura 9.

Enfoque criogénico los compuestos volátiles son atrapados en la fase líquida de una columna a bajas temperaturas. Durante la introducción de la muestra los compuestos se disuelven en la fase líquida y migran lentamente con el flujo de la columna a baja temperatura.

Esta técnica, se puede emplear cuando se utilizan columnas capilares que puedan operar a bajas temperaturas es decir que permitan operarse bajo condiciones de temperatura donde la fase estacionaria aún sea cromatográficamente efectiva. Finalizada la etapa criogénica (con suministro de nitrógeno líquido) comienza rápidamente el programa de temperatura que requiera

Delgado

la separación cromatográfica⁽²⁹⁾. Este sistema permite introducir grandes volúmenes de muestra (5 mL o más), con un divisor de muestra splitless en una columna capilar⁽²⁴⁾. En la Figura 10 se puede observar con más detalle el sistema antes mencionado.

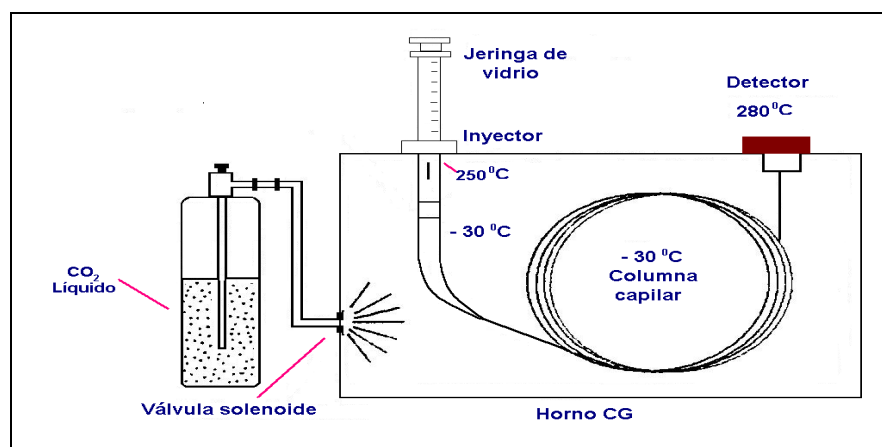


Figura 10. Diagrama esquemático de la instrumentación empleada en una TC⁽²⁴⁾

Otro sistema propuesto para la trampa criogénica es el empleo de una tubería de teflón (PTFE) que se coloca a manera de camisa en el primer segmento de la cabeza de la columna capilar⁽³⁰⁾. El enfriamiento se logra cuando se hace pasar nitrógeno líquido por esta camisa como gas de enfriamiento (Figura 11). El flujo del gas de enfriamiento se controla automáticamente a través de una válvula. Finalizada la introducción de la muestra, el gas de enfriamiento se detiene, y el gradiente de temperatura del horno del cromatógrafo comienza para la separación de los analitos en la columna.

3.1.3. Microextracción en Fase Sólida (MEFS)

La técnica de microextracción en fase sólida (MEFS)⁽³¹⁾ se utiliza tanto para el sistema EC–CG estático como el dinámico con el fin de mejorar la selectividad en el proceso de extracción de los analitos. También permite optimizar la sensibilidad del método ya que favorece la preconcentración de los mismos.

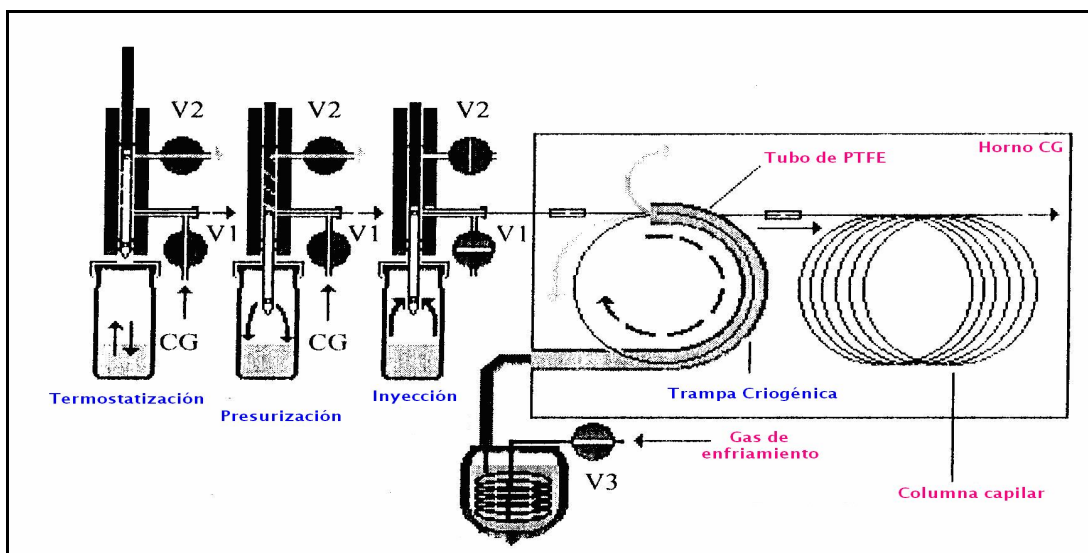


Figura 11. Diagrama esquemático del sistema EC-CG estático con gradiente criogénico⁽³⁰⁾

La MEFS se basa en la extracción de los analitos de la matriz de la muestra mediante una fibra de sílice fundida que está recubierta de un sorbente, en la mayoría de los casos polimérico, seguida de la desorción de los analitos mediante temperatura o un disolvente orgánico (Figura 12)⁽³²⁾.

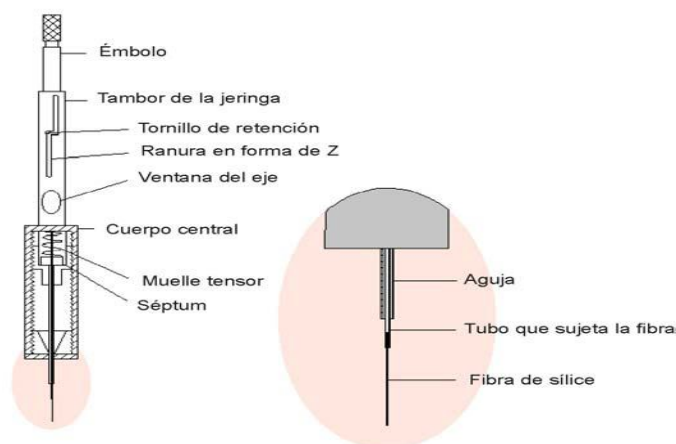


Figura 12. Microextracción en Fase Sólida

Para su empleo, se introduce una fibra de sílica cubierta con una superficie de fase estacionaria en la aguja de una jeringa de CG modificada. En el momento

Delgado

de la inyección, la aguja se introduce en la muestra líquida que se encuentra en el vial o se expone al espacio de cabeza por encima de la muestra en el vial (Figura 13(a,b)).

Se establece un tiempo de contacto, hasta que se alcance el equilibrio de extracción de los analitos entre la fase líquida o sólida del vial y la fibra ubicada en la aguja. Seguidamente, se realiza la inyección en el puerto de inyección del cromatógrafo. En ese momento, los analitos retenidos en la fibra se desorben térmicamente y el gas de arrastre los transfiere a la columna cromatográfica (Figura 13(c)).

Esta técnica presenta una serie de ventajas, ya que, es muy simple, presenta un bajo costo, puede ser automatizada, requiere pequeños volúmenes de muestra y generalmente no precisa del uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración, a diferencia de la ELL y la EFS^(32,33).

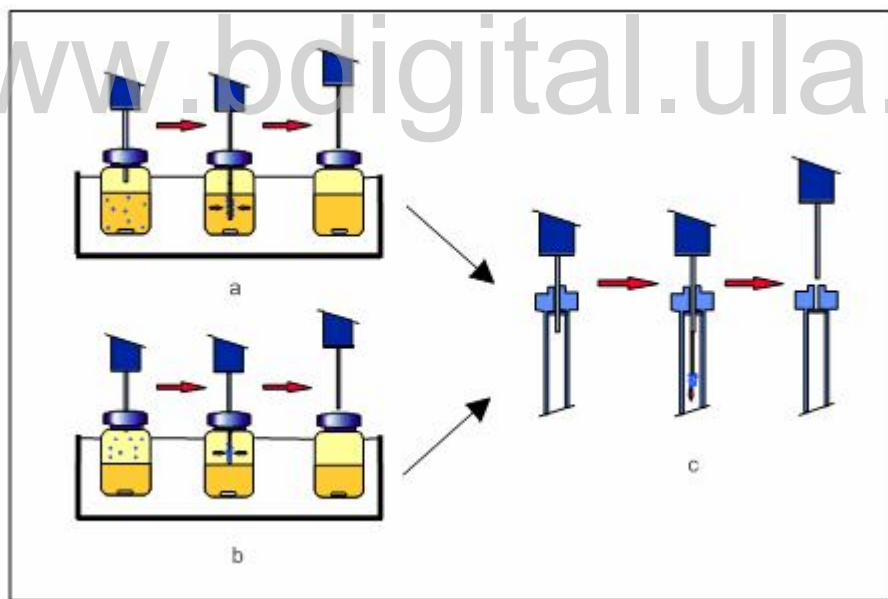


Figura 13. Representación esquemática de las etapas involucradas al emplear MEFS-EC

Sin embargo, es importante mencionar que el tiempo de exposición de la fibra en la muestra debe ser cuidadosamente optimizado para evitar acumulación

de contaminantes en la misma. Adicionalmente, requiere un tiempo adicional de varios minutos, para la desorción de los analitos.

Además, debido a la limitada capacidad de las fibras (la cantidad de recubrimiento es muy pequeña) en ocasiones no se obtienen bajos límites de detección, por lo que es necesario tomar en cuenta esta limitación en el momento de emplear la técnica.

3.2. Técnicas de Análisis en Flujo

Las técnicas de inyección en flujo también han sido incorporadas en los procedimientos de los tratamientos de las muestras y han permitido automatizar muchas de las técnicas de separación anteriormente descritas.

Desde sus inicios, el análisis por inyección en flujo (FIA) ha mostrado un significativo progreso, no sólo en términos de eficiencia, sino también en fiabilidad, rapidez y robustez. Esto se debe a que pueden adaptarse con sencillez a muchas necesidades sin cambios técnicamente complejos aunado a la simplicidad de su funcionamiento.

En la Figura 14 se presenta un diagrama que muestra la evolución de las técnicas en flujo en el tiempo.

Inicialmente Skeggs⁽³⁴⁾ en 1957 propuso el análisis en flujo segmentado (SFA), el cual se basó en un método continuo automatizado, que fue comercializado por Technicon con el nombre de “Autoanalizadores” y que se utilizó ampliamente en laboratorios clínicos y oceanográficos.

Este sistema se caracteriza por segmentar la muestra con burbujas de aire, las cuales deben ser eliminadas antes de llegar al detector. Sin embargo, aunque la técnica trajo consigo una serie de ventajas, la presencia de burbujas de aire significó una serie de inconvenientes para poder controlar con reproducibilidad la velocidad del flujo⁽³⁵⁾.

Por todas estas razones, la metodología SFA fue reemplazada gradualmente por técnicas de inyección en flujo “no” segmentado.

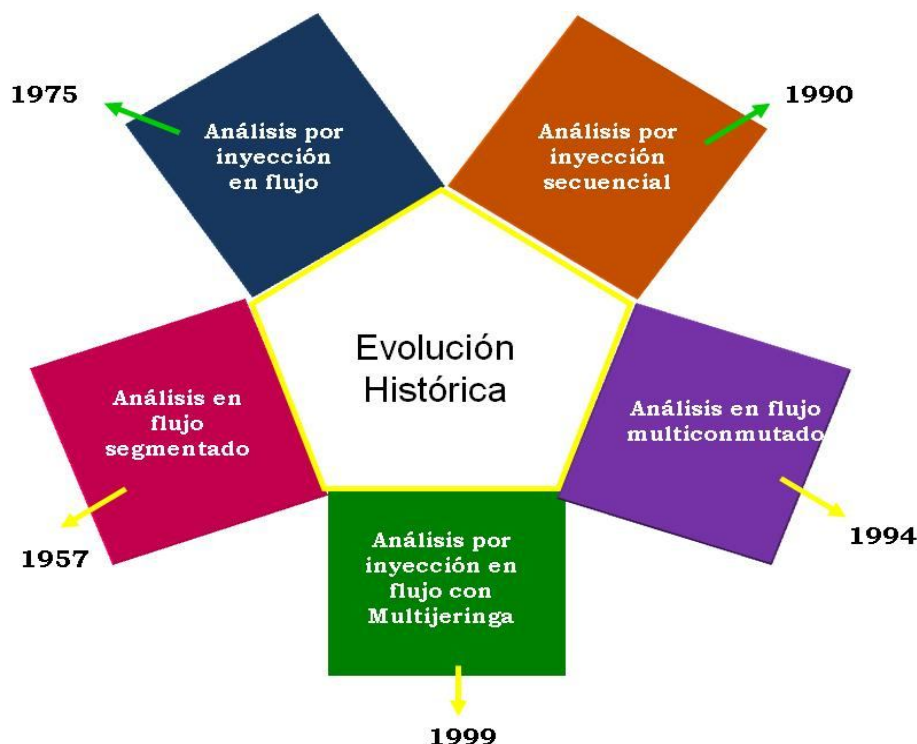


Figura 14. Evolución de las técnicas en flujo en el tiempo

3.2.1. Análisis por Inyección Flujo

El análisis por inyección en flujo (FIA) se desarrolló a mediados de los años 70 como una técnica eficaz, fue propuesto por Ruzicka y Hansen⁽³⁵⁾ en 1975 y desde su introducción ha presentado un progreso significativo.

Desde el punto de vista conceptual y práctico el FIA puede considerarse similar al SFA, sin embargo proporciona diferentes resultados⁽³⁶⁾.

A diferencia de SFA, la muestra no se aspira continuamente sino que se inyecta en un flujo portador de reactivos requeridos para llevar a cabo el método analítico, antes de pasar al detector⁽¹⁰⁾ (Figura 15).

La ventaja que presentan estos sistemas es que permiten llevar a cabo procesos físico-químicos adicionales, tal como una reacción química, una ELL, entre otras. Esto demuestra la versatilidad de los sistemas FIA que al compararlos con los sistemas SFA presentan ventajas como: mayor capacidad de muestra, el

gasto de reactivos es notablemente más bajo, además de proporcionar nuevas y atractivas posibilidades para realizar los análisis.

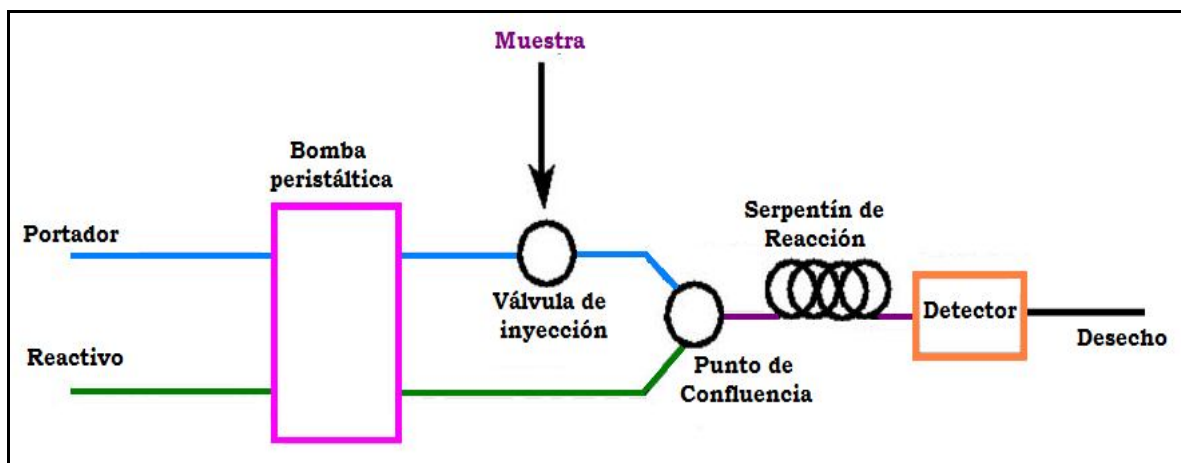


Figura 15. Sistema de análisis por inyección en flujo (FIA)

Desde la aparición del análisis en flujo segmentado y seguidamente el FIA, las técnicas de flujo han ido evolucionando, apareciendo otras nuevas tales como Análisis por Inyección Secuencial (SIA) propuesto por J. Ruzicka y G.D. Marshall en 1990⁽³⁷⁾ como alternativa al FIA, el Análisis en Flujo Multiconmutado propuesto en 1994 por B.F. Reis y Cols⁽³⁸⁾. Más recientemente el Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa, propuesto en 1999 por V. Cerdà⁽³⁹⁾, y los Sistemas Multibomba en 2002 propuestos por dos grupos de investigación de Portugal y Brasil⁽⁴⁰⁾. En la Tabla 4 se presentan los aportes más significativos, sus ventajas y desventajas.

Particularmente, las técnicas de flujo de nueva generación, tales como el Análisis por Inyección Secuencial (Sequential Injection Analysis, SIA) y el Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa (Multisyringe Flow Injection Analysis, MSFIA) ofrecen un gran potencial para automatizar el tratamiento de muestras de diferente naturaleza. Por esta razón a continuación trataremos brevemente la técnica de análisis por inyección en flujo con multijeringa (MSFIA)^(35,41) ya que es una de las utilizadas para realizar el tratamiento de la muestra en el marco de esta Tesis.

Tabla 4. Aportes más significativos de las Técnicas en Flujo a lo largo de los años

Técnicas en Flujo	Principio	Ventajas	Desventajas	Ref
Análisis en Flujo Segmentado (SFA)	Método continuo automatizado, que se caracteriza por segmentar la muestra con burbujas de aire, las cuales deben ser eliminadas antes de llegar al detector	Alta frecuencia de análisis de 80 inyecciones/hora	-La introducción y remoción de las burbujas de aire deben ser realizada de la misma manera y perfectamente reproducible. -La velocidad de flujo no es fácilmente controlada.	(34)
Análisis por Inyección en Flujo (FIA)	-Es una técnica eficaz para la automatización del tratamiento de la muestra. -En este caso la muestra es inyectada en un flujo portador de reactivos para llevar a cabo el método analítico, antes de pasar al detector	-Es una técnica muy versátil -Permite llevar a cabo procesos físico-químicos adicionales, tal como una reacción química, ELL, EFS, entre otras.	-El material con el que están hechas las tuberías empleadas en las bombas peristálticas no permiten el uso de solventes agresivos. -Alto consumo de reactivos	(36)
Análisis por Inyección Secuencial (SIA)	La técnica se basa en la inyección secuencial de la muestra y el reactivo en un canal. Seguidamente una porción bien definida es llevada al serpentín de espera y se mantiene allí. Luego la válvula cambia a la posición de inyección hacia el detector y un flujo de portador pasa en dirección contraria y lleva a los analitos hacia el serpentín de reacción y al detector.	-La versatilidad de la técnica está centrada en la válvula de selección. -El consumo de muestra y reactivos es drásticamente reducido. -Es muy versátil porque una configuración sencilla puede adaptarse para la determinación de multicomponentes usando varios reactivos y sistemas de detección	-Es necesario controlar la dispersión y la reproducibilidad, ya que son requisitos indispensables para obtener buenos resultados. -Se requiere del empleo de un software para controlar las variables involucradas en el proceso.	(42)
Análisis en Flujo Multiconmutado (MCFIA)	En estos sistemas las válvulas de seis puertos empleadas en SIA son reemplazadas por válvulas solenoides de conmutación de 3 puertos. Cada válvula actúa de manera independiente y permiten controlar la cantidad de muestra y reactivo.	-Reduce en gran proporción la cantidad de muestra y reactivos, ya que, solo se aspira la cantidad necesaria mientras la válvula se encuentra en la posición ON, por lo tanto, no se requiere de consumo adicional -Buena reproducibilidad -Permite realizar determinaciones multiparamétricas.	-Debido a que los volúmenes de muestra y reactivos son pequeños, el sistema de propulsión debe ser sincronizado con la micro-inyección, para evitar irreproducibilidad. -La disponibilidad de equipo es muy escasa, es decir, interfaces electrónicas o software que permitan controlar las válvulas	(38)
Análisis por Inyección en Flujo Multijeringa (MSFIA)	Es una técnica que integra las ventajas de varios de los sistemas de inyección en flujo descritos anteriormente (FIA y SIA)	-Permite emplear reactivos agresivos, debido al uso de jeringas de vidrio y teflón en sus conexiones. -Menor gastos de muestra y reactivos -La frecuencia de análisis es de 150-180 inyecciones/hora, dependiendo de la configuración	-Se requiere de un computador para controlar todas las variables involucradas.	(39)
Sistemas en Flujo Multibombas	Se basan en el uso de una serie de microbombas solenoides, que actúan a la vez de sistema impulsor de líquidos y de válvula de conmutación.	-Las partes de la microbomba están fabricadas con teflón por lo que gozan de una gran resistencia química. -Al tomar la muestra y/o reactivo las microbombas provocan movimientos turbulentos que hacen que la mezcla de ambos sea mejor que en los sistemas de flujo laminar.	-Los volúmenes de líquido que pueden dispensar las bombas serán un múltiplo de su volumen prefijado para cada toma (8,20,25,50 µl). -En las bombas de 8 µl se pueden encontrar desviaciones de ± 2 µl en el volumen dispensado por impulso de muestra.	(40)

3.2.2. Análisis en Flujo Multijeringa (MSFIA)

El sistema MSFIA integra las ventajas de varios de los sistemas de inyección en flujo propuestos hasta ese momento.

- Del FIA la adición paralela de muestra y reactivos.
- La robustez, la baja cantidad de muestra y reactivos que se necesita, además de la versatilidad del manifold del SIA.
- Por último el uso de válvulas de conmutación (MCFIA).

El elemento básico de MSFIA es una bureta, una adaptación de una jeringa automática, similar a la empleada para los sistemas SIA⁽³⁵⁾. La bureta está compuesta por cuatro jeringas, las cuales están conectadas a una barra de hierro que se mueve paso a paso por un motor (Figura 16). En la cabeza de cada jeringa se encuentra una válvula solenoide, la cual permite conectar al sistema (ON) o al depósito del reactivo (OFF), independientemente del desplazamiento del pistón. Además, existen dos direcciones de flujo opcionales para el suministro y otras dos para la toma de muestra o de reactivos. Estas válvulas solenoides reemplazan las válvulas de rotación convencionales empleadas en la cabeza de la jeringas de los sistemas SIA, en éstas los cambios de posición son mucho más rápidos (35 ms) y la conmutación puede llevarse a cabo sin necesidad de detener el pistón⁽³⁵⁾.

Algunas características importantes del MSFIA a resaltar son:

- La cabeza de los pistones se fabrican con PTFE por lo que permite emplear reactivos agresivos, solventes orgánicos ^(35,43,44).
- La cantidad de muestra y reactivos se inyectan hacia el sistema en el momento preciso, a través de las válvulas de conmutación y además, existe la posibilidad de regresar el líquido a su contenedor cuando no se requiera de éste. En ese sentido el consumo de muestra y reactivo durante un análisis es menor si lo comparamos con otras técnicas FIA.
- La toma secuencial de muestra y reactivos no requiere de un serpentín como en SIA, por lo que se incrementa la frecuencia de análisis a 150-180 inyecciones/hora.

- Es posible, introducir al sistema, diferentes volúmenes de muestras y reactivos con una buena precisión, dado que existe una gran variedad de jeringas, con una capacidad de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 y 25,0 mL, que pueden ser adaptadas a la bureta de la multijeringa, proporcionando más flexibilidad que en FIA^(43,45).

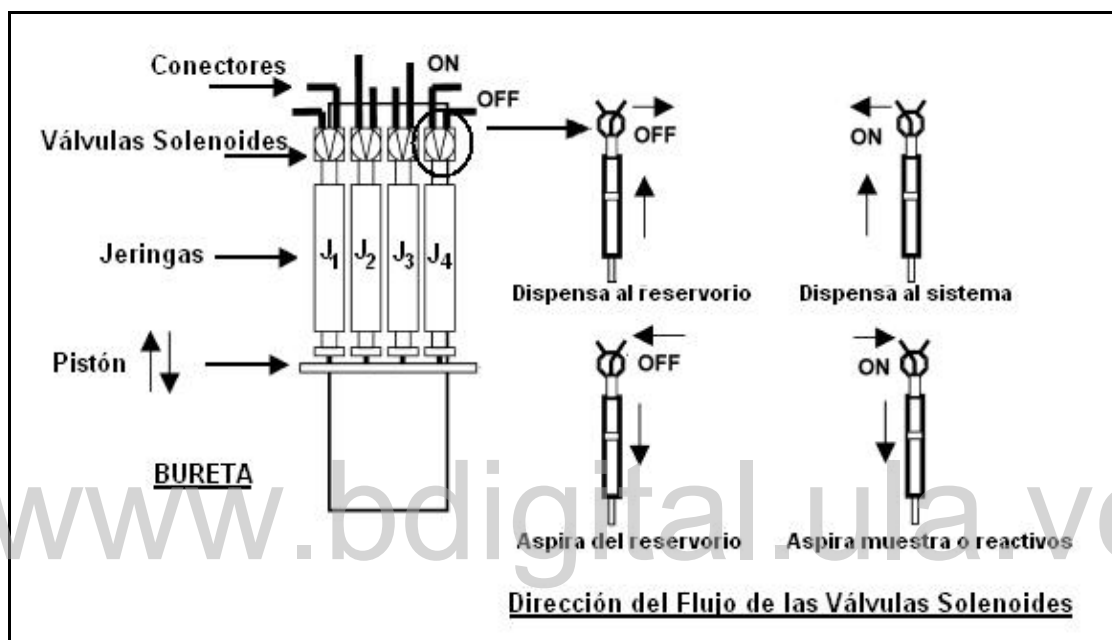


Figura 16. Vista Frontal del Sistema Multijeringa⁽³⁵⁾

Para llevar a cabo la automatización del sistema MSFIA es indispensable controlar la instrumentación a través de programas de computadoras. Una de las limitaciones que generalmente se encuentra en los paquetes de software comerciales, es que son muy específicos para ciertas configuraciones. Para evitar este inconveniente y tener que crear un programa para cada método analítico, fue desarrollado el software AUTOANALYSIS 5.0^(46,47). Las características principales de este programa se detallan a continuación⁽³⁵⁾:

- Sencillez en la definición de la secuencia de operaciones.
- La capacidad de modificar ciertas variables experimentales (tales como los volúmenes) una vez que el método ha comenzado, o mantener un cierto intervalo (tal como pH) por la adición de soluciones ácidas o básicas.

- El software permite una simulación virtual del procedimiento analítico antes de llevarlo a cabo e indica si es factible. Por ejemplo, tratar de inyectar una cierta cantidad de líquido que supera la capacidad de la bureta.
- Fácil integración de los datos experimentales.
- Tratamiento de la señal analítica

Estas características del programa han permitido la posibilidad de combinar las técnicas de flujo con los sistemas cromatográficos y con diferentes sistemas de detección (fluorimétricos, amperométricos, espectrofotométricos, absorción atómica, entre otros). El programa es suficientemente práctico como para combinar varias técnicas de flujo y desarrollar algunas aplicaciones que en algún momento no fueron consideradas.

Es por ello que las técnicas de flujo han recibido un especial interés para el tratamiento de la muestra previo al análisis por cromatografía de gases ya que han permitido automatizar muchas de las técnicas de separación involucradas en esta etapa del procedimiento analítico. Prueba de ello es el aumento significativo de trabajos reportados en la literatura especializada^(6,37,48-57)

A continuación hablaremos de cómo y porqué las técnicas FIA han permitido automatizar el tratamiento de la muestra para un análisis por cromatografía de gases.

4. Automatización en el Tratamiento de la Muestra y su Acoplamiento a la Cromatografía de Gases

Particularmente el MSFIA por sus características ha permitido automatizar la EFS en discos y columnas, una técnica muy utilizada en la preconcentración y limpieza de muestras previo a su análisis por CG^(31,57-60).

Este acoplamiento, particularmente la EFS en columna, era difícil de implementar por la sobrepresión generada debido a que los sistemas FIA trabajan a baja presión. Sin embargo, este problema ha sido solucionado con la salida al mercado de empaques de nuevos materiales como los de acceso restringido

(RAM, por sus siglas en inglés) y los soportes de partículas grandes (LPS, por sus siglas en inglés). Estos materiales poseen una propiedad común, la de exclusión de las macromoléculas mientras que los analitos son retenidos generalmente por interacciones hidrofóbicas o electrostáticas⁽⁶¹⁾. Adicionalmente, por sus características no generan altas presiones en el sistema (presiones < 2,5 MPa) haciendo posible su acoplamiento con las técnicas FIA de nueva generación^(60,62,63).

4.1. Materiales de Acceso Restringido (RAM)

El término de materiales de acceso restringido (Restricted Access Material, RAM) fue introducido por Desilets y Col⁽⁶⁴⁾ en 1991. Estos soportes han sido utilizados para simplificar la etapa de limpieza o purificación de las muestras biológicas.

Esta familia de soportes se puede clasificar de acuerdo al mecanismo de exclusión de las proteínas. Así, las macromoléculas pueden ser excluidas por una barrera física debido al diámetro de poro o por una barrera de difusión química creada por una red de proteínas (o un polímero) en la superficie externa de la partícula⁽⁶¹⁾.

Las columnas empacadas con materiales RAM se caracterizan porque, toleran la inyección directa y repetida de fluidos biológicos sin ningún tratamiento previo más que la centrifugación de las mismas⁽⁶¹⁾.

Entre los diferentes soportes RAM que existen en el mercado, los más populares son los soportes con superficie interna de fase reversa (ISRP, por sus siglas en inglés) y los de alquil-diol sílica (ADS).

El empaque ISRP fue introducido por Hagestam y Pinkerton⁽⁶⁵⁾ en 1985, son de base sílice y presenta partículas con una superficie interna del tipo fase invertida constituida por una fase oligopeptídica hidrofóbica (glicina-L-fenilalanina-L-fenilalanina, GFF) y una superficie externa hidrofílica formada por glicina producto de la hidrólisis enzimática de los péptidos con la enzima carboxipeptidasa (Figura 17).

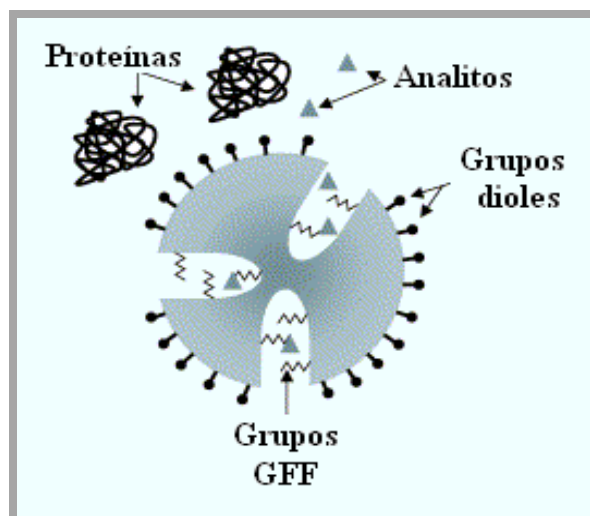


Figura 17. Esquema de una partícula ISRP⁽⁶⁵⁾

El tamaño de poro de estas partículas es de 8 nm, por lo que las moléculas de tamaño molecular >15.000 Dalton son excluidas por tamaño y, también por un mecanismo de repulsión debido a la carga negativa de los grupos glicina. Simultáneamente, las moléculas de menor tamaño pueden penetrar el poro y retenerse en la fase oligopeptídica estableciendo interacciones π con los grupos fenilo de la fenilalanina y por intercambio catiónico con los grupos glicina. Este tipo de fase no permite analizar sustancias muy lipofílicas o neutras.

En 1995, Boos y Col.^(66,67) introdujeron el empaque tipo ADS sintetizado a partir de soporte sílice. El tamaño de estas partículas es de $25\ \mu\text{m}$ y su tamaño de poro es de 6 nm. Esta fase posee una superficie externa de carácter hidrofílico (grupos dioles) que impide la interacción con las proteínas y que permite la exclusión de aquellas de tamaño molecular superior a 15.000 Dalton y, una superficie interna que tiene una fase enlazada hidrofóbica formada por cadenas carbonadas C_{18} , C_8 o C_4 , los cuales son los centros de adsorción de aquellas moléculas hidrofóbicas que por su tamaño pequeño penetran a través de los poros (Figura 18).

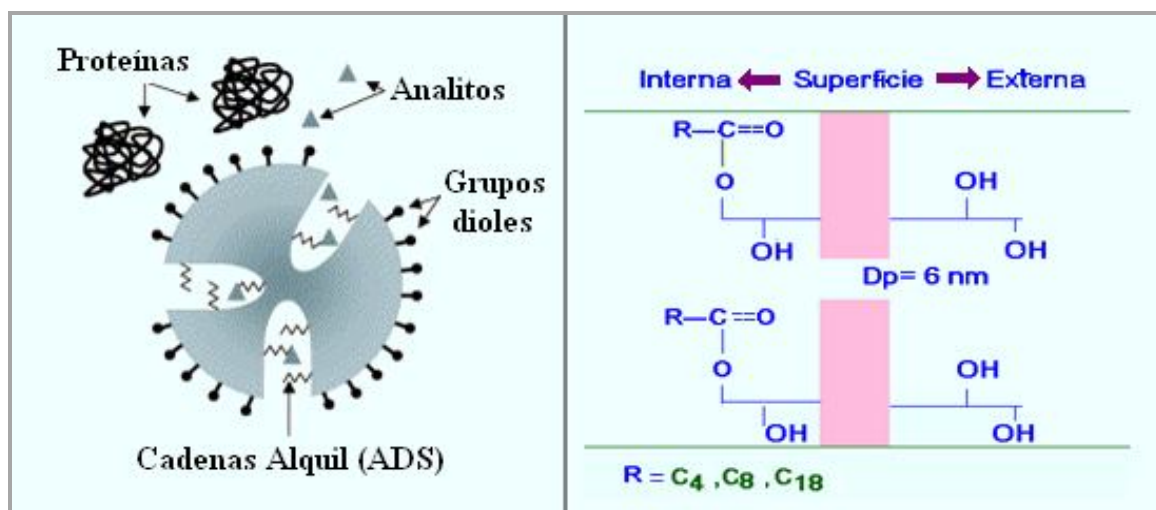


Figura 18. Esquemas de una partícula RAM-ADS⁽⁶⁶⁾

Por lo tanto, en los materiales RAM-ISRP y RAM-ADS el acceso de las proteínas a la fase interna del empaque se evita a través de una barrera de difusión física y la adsorción de éstas en el empaque se impide por la presencia de grupos dioles en la superficie externa de las partículas^(61,68).

De las columnas RAM-ADS disponibles comercialmente, la LiChrospher ADS-RP (C₁₈, C₈ o C₄) de Merck, ha permitido el análisis directo de una gran variedad de compuestos de interés clínico y farmacéutico en diversas matrices biológicas, tales como: plasma, suero, orina, saliva, leche, tejidos, etc⁽⁶¹⁾.

4.2. Soportes de Partículas Grandes (LPS)

Estos soportes de extracción están empacados con partículas cuyo diámetro es de 30 – 60 µm, lo que permite variar los flujos de elución sin generar alta presión en el sistema. Bajo estas condiciones, se logra la rápida exclusión de las proteínas y componentes endógenos hidrofílicos de la matriz, a través del soporte de extracción, mientras simultáneamente los analitos se retienen por medio de interacciones hidrofóbicas⁽⁶¹⁾.

En la Figura 19 se representa un esquema de una columna con este tipo de empaque.

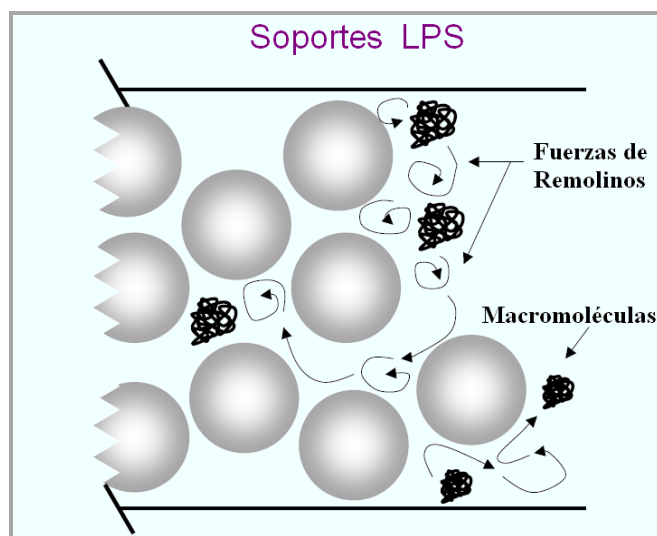


Figura 19. Esquema de un soporte LPS⁽⁶¹⁾

Diferentes fases estacionarias se han desarrollado para columnas empacadas con partículas adsorbentes de 30 – 60 μm , de las cuales se pueden distinguir principalmente dos tipos de fases: las partículas de sílice enlazadas a cadenas clásicas de alquilo (C_2 , C_8 y C_{18}), grupos fenilos o una fase mixta polar/apolar y las fases de partículas poliméricas. Sin embargo los sorbentes más utilizados son los poliméricos porque permiten trabajar en pH extremos, tienen propiedades de retención adecuadas y no poseen grupos silanol ionizables^(61,69).

En este sentido, con relación a los empaques poliméricos la Corporación Waters proporciona copolímeros neutros, pero también ácidos y básicos, según la carga del sustituyente de los anillos aromáticos del copolímero. Así, en el mercado existen cinco químicas de EFS para completar las necesidades de la preparación de muestra (Figura 20), como son: Oasis® HLB, Oasis® MCX/MAX y Oasis® WCX/WAX.

Las características principales de estos empaques Oasis® son las siguientes⁽⁷⁰⁾.

- Oasis HLB: sorbente de fase reversa con balance hidrofílico- lipofílico para todos los compuestos (por ejemplo, el profármaco y sus metabolitos polares).

- Oasis MCX: sorbente en modo mixto de fase reversa e intercambio catiónico para bases. Alta selectividad para compuestos básicos.
- Oasis MAX: sorbente mixto de fase reversa e intercambio aniónico para ácidos. Alta selectividad para compuestos ácidos.
- Oasis WCX: sorbente mixto de fase reversa e intercambio catiónico débil.
- Oasis WAX: sorbente mixto de fase reversa e intercambio aniónico débil.

Sin embargo, actualmente, el que ha tenido mayor aplicación es el Oasis® HLB⁽⁶¹⁾, ya que ha resultado más adecuado y versátil para la variedad de muestras y sustancias a analizar en un laboratorio químico/clínico/farmacéutico, y en particular, clínico/forense. Se han reportado resultados excelentes, con recuperaciones más altas y mejora en la reproducibilidad, comparados con los empaques convencionales. Además, el tratamiento de la muestra es sencillo y rápido.

El empaque Oasis® HLB pertenece a la segunda generación de empaques porosos, desarrollado por Waters e introducido al mercado en 1996, el cual se caracteriza por ser un relleno humectable, en el cual el secado del relleno no provoca un impacto sobre las recuperaciones⁽⁷⁰⁾.

Su composición consiste de una proporción equilibrada de dos monómeros: N-vinilpirrolidona (carácter hidrofílico) y divinilbenceno (carácter lipofílico) (Figura 20). La retención de compuestos polares se logra por interacciones dipolo-dipolo con los monómeros de N-vinilpirrolidona y la retención de compuestos no polares por fuerzas de Van der Waals con los monómeros de divinilbenceno. Las principales características de este empaque son las siguientes^(70,71):

- ✓ Tamaño medio de poro (nm): 8
- ✓ Área Superficial (m²/g): 800
- ✓ Tamaño medio de partícula: 30

La composición de esta columna ha permitido crear un relleno para EFS con una serie de características especiales, tales como resistencia a pHs extremos, extraordinaria retención de compuestos orgánicos polares y apolares y

una capacidad relativa tres veces mayor que la de los rellenos tradicionales de base sílice, como el C₁₈. Además, permite trabajar con altas concentraciones de solventes orgánicos.

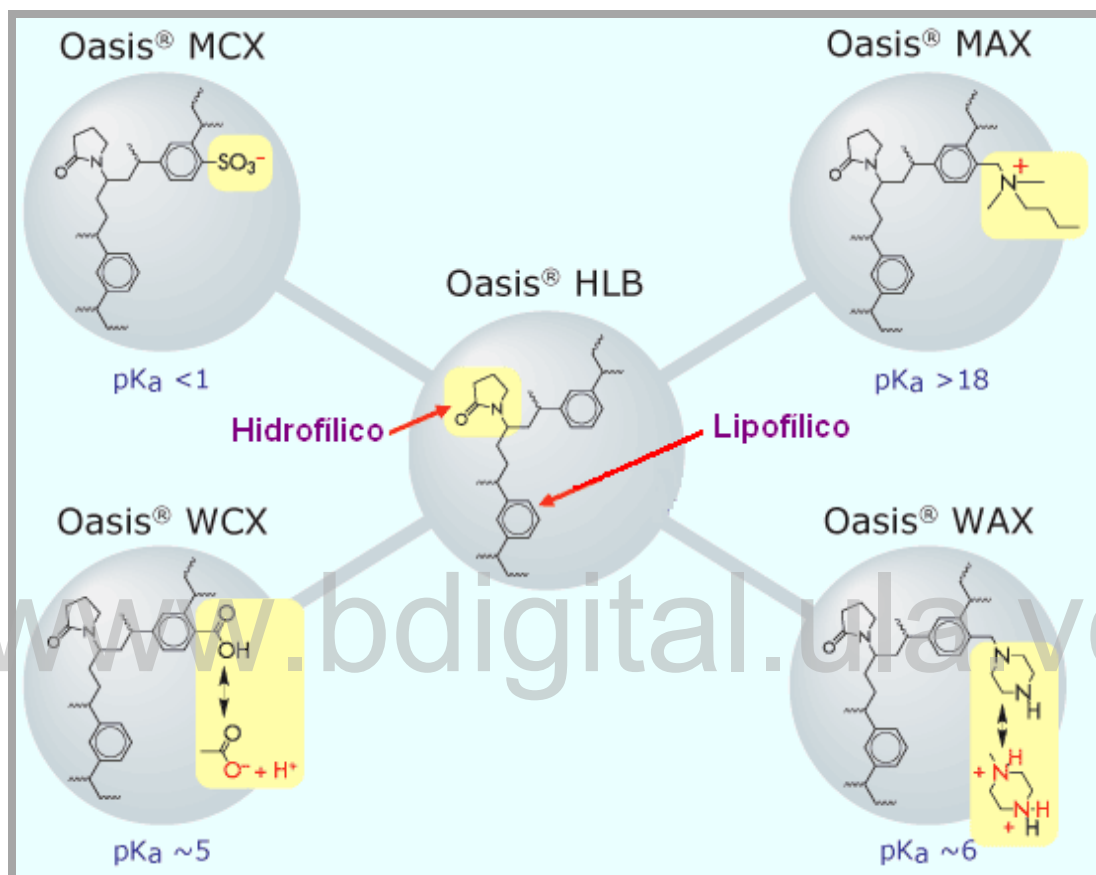


Figura 20. Esquema de productos Oasis®⁽⁶⁹⁾

Por lo tanto, es posible desarrollar procedimientos simultáneos de extracción para diversos compuestos, con un ligero cambio de pH o una modificación en la proporción del solvente orgánico durante el paso de elución. Por ello, es importante tener en cuenta la estructura y el pKa de los analitos a extraer, para así predecir como se podrían enlazar al sorbente⁽⁷¹⁾.

Finalmente, se puede afirmar que la óptima relación eficiencia/costo que proporcionan las técnicas de análisis en flujo de nueva generación para automatizar el tratamiento de la muestra en los análisis por CG las hacen altamente rentables y las sitúan como alternativas idóneas. Por todas estas razones, sin lugar a dudas, las técnicas de análisis en flujo de nueva generación han despertado un gran interés analítico.

En esta revisión bibliográfica presentamos diferentes alternativas para realizar el tratamiento de la muestra previo a la determinación por cromatografía de gases. Los tratamientos típicos incluyen diferentes técnicas analíticas con el objetivo principal extraer a los analitos de la matriz con un mínimo de interferentes y en condiciones que presenten la volatilidad requerida. La forma más común de llevar a cabo estos procedimientos ha sido la manual con todas las desventajas anteriormente discutidas.

Por ello en las últimas décadas una línea prioritaria en la Química Analítica es el desarrollo de dispositivos que incrementen el grado de automatización y, por tanto, reduzcan la participación humana en los procedimientos de análisis.

En ese sentido para esta Tesis nos planteamos como objetivo desarrollar y validar algunas metodologías por cromatografía de gases haciendo énfasis en automatizar el tratamiento y la introducción de la muestra en el sistema cromatográfico.

Para ello nos planteamos la siguiente Propuesta de Trabajo.

5. Propuesta de Trabajo

➡ En los últimos años se ha tratado de optimizar aquellas condiciones que proporcionen un cacao con un fuerte potencial aromático. Se sabe que la calidad de la almendra de cacao está relacionada con el aroma y sabor, los cuales a su vez dependen de factores edafoclimáticos, genotipo, manejo agronómico y de la tecnología poscosecha (fermentación y torrefacción)⁽⁷²⁾.

En la formación del aroma del cacao participan algunos compuestos precursores desarrollados durante la etapa de fermentación y de secado, mientras que otros, especialmente algunas pirazinas se forman en el tostado por lo que son consideradas únicamente de origen térmico⁽⁷³⁾.

Las pirazinas son los compuestos aromáticos mayoritarios en el cacao y representan el 25% de los productos identificados de la fracción aromática del chocolate. En ese sentido, es importante evaluar las pirazinas presentes en el cacao⁽⁷⁴⁾.

En la literatura encontramos que la técnica de cromatografía de gases acoplada a diferentes sistemas de detección es la más utilizada para el análisis de estos compuestos en muestras de cacao.

En la mayoría de ellos se realiza un tratamiento de la muestra que incluye una serie de etapas de extracción donde se emplean sistemas de arrastre con vapor o de destilación seguidos de extracciones líquido-líquido. En general para éstos métodos, el tratamiento de la muestra consumió mucho tiempo y en algunos casos se obtuvieron bajos porcentajes de recuperación para algunos de los analitos de interés⁽⁷⁴⁾.

Es por ello que, para uno de los trabajos de esta Tesis, se propuso:

➡ **Desarrollar un método para evaluar pirazinas en muestras de cacao por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas (CG-EM) con introducción de la muestra en línea empleando la técnica de espacio de cabeza (EC).**

➡ Algunos solventes orgánicos como el benceno, tolueno y xilenos son considerados agentes contaminantes, principalmente debido a las emisiones de vehículos automotores, al humo del tabaco y a la contaminación industrial⁽⁷⁵⁾.

Estos solventes son altamente tóxicos en el organismo humano a muy bajos niveles de concentración por lo que se requiere de estrategias que permitan determinarlos en matrices biológicas.

Muchos estudios se han dedicado a evaluar estos compuestos como contaminantes del medio ambiente y principalmente del cuerpo humano debido a que la liposolubilidad de muchos de ellos facilita su absorción luego de la exposición a la inhalación oral o dérmica^(76,77).

Por ello, es importante un control biológico que permita evaluar la exposición de los individuos a estos compuestos, en ese sentido, para esta Tesis se propuso:

➡ **Optimizar un método sencillo y sensible por cromatografía de gases con introducción de muestra en línea, para determinar benceno, tolueno y xilenos en muestras de orina humana de individuos expuestos laboralmente.**

➡ Los plaguicidas se utilizan universalmente para el control rápido y efectivo de plagas⁽⁷⁸⁾.

Usualmente, el producto activo de un plaguicida es obtenido por la industria química en un grado de pureza que oscila entre el 75 y el 98%, siendo el resto impurezas de fabricación⁽⁷⁹⁾.

Desde el punto de vista toxicológico, las formulaciones de plaguicidas incluyen sustancias transportadoras, diluyentes como agua o solventes orgánicos, aditivos e impurezas, que pueden tener potencial tóxico por sí mismas.

Es por esta razón, que el uso indiscriminado de los plaguicidas constituye un problema actual, debido a su estabilidad en el medio ambiente y su transformación en los organismos vivos.

En áreas de agricultura intensiva el agua es uno de los recursos que presenta un alto riesgo de contaminación por plaguicidas y particularmente los organofosforados son los principales contaminantes de ríos, lagunas, aguas superficiales y de consumo humano.

Por ello, los organismos competentes han impuesto una legislación muy estricta que establece para el agua de consumo humano un máximo de 0,1 µg/L de cada uno de estos plaguicidas sin que el total de los mismos sobrepase los 0,5 µg/L.

En ese sentido se necesita metodologías sensibles para poder evaluar estos compuestos en agua de consumo humano y por ello en este trabajo se propuso:

➡ **Desarrollar un método sensible y selectivo para determinar plaguicidas organofosforados en aguas destinadas para consumo humano por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y un sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para realizar la preconcentración en línea.**

➡ El desarrollo de procedimientos analíticos para la determinación cuantitativa de drogas de abuso en matrices biológicas es de interés constante para propósitos forenses, para el seguimiento de tratamientos médicos así como también para la investigación del metabolismo de las mismas.

La cocaína es un estimulante que actúa directamente sobre el sistema nervioso central, causando dependencia física, graves trastornos conductuales y riesgos nocivos para la salud. Existe una gran variedad de respuestas de los individuos hacia la COC y esta variabilidad es atribuida a diferencias en su farmacocinética y metabolismo. Una vez en el cuerpo, COC se metaboliza rápidamente en metabolitos hidrosolubles que se excretan por la orina como BZE (el principal metabolito de la COC) y en menor extensión como éster metílico de la ecgonina y ecgonina.

En la literatura se encuentran reportados numerosos procedimientos de análisis por cromatografía para la determinación de la COC y BZE en diferentes matrices biológicas. La cromatografía de gases es la técnica más utilizada debido a su gran selectividad y sensibilidad, sin embargo, se requiere de una etapa de tratamiento de la muestra (extraer a los analitos de la matriz) y derivatización de la BZE que permita transformarla en un analito con la volatilidad adecuada para éste análisis. Cada una de estas etapas si se realizan en forma manual involucran mucho tiempo⁽⁸⁰⁾.

Por esta razón, en los últimos tiempos, se ha tratado de automatizar la etapa de tratamiento de la muestra con el fin de proporcionar métodos rápidos de rutina para monitorear la droga en fluidos biológicos. En ese sentido, para esta Tesis se propuso:

➡ **Desarrollar un método para evaluar COC y BZE en muestras de orina humana, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM), con tratamiento de la muestra automatizado con un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) y posterior derivatización de la BZE asistida por microondas.**

6. Bibliografía

- (1) Santos, F. Galceran, M. **The Application of Gas Chromatography to Enviromental Analysis**. Trens in Analytical Chemistry. 21, 9+10, 672-685, 2002.
- (2) Skoog, D. Leary, J. **Análisis Instrumentales**. 3^{era} edición. Editorial MGCraw-Hill. Madrid, España. Capitulo 25, 1994.
- (3) Valcarcel, M. **Introducción a la Cromatografía**. Alhambra; 1^{era} edición España.1984.

- (4) Dean, R. A **Practical Guide to the Care, Maintenance, and Troubleshooting of Capillary Gas Chromatographic Systems**. 2^{da} edición. Heidelberg:Hüting. 1995.
- (5) Barquero, M. **Principios y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases**. 1^{era} edición. Costa Rica. 2006.
- (6) Dallüge, J. Hankemeier, T. Vreuls, R. Brinkman, U. **On-Line Coupling of Immunoaffinity-Based Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography for the Determination of s-Triazines in Aqueous Samples**. Journal of Chromatography A, 830, 377-386, 1999.
- (7) Robinson, J. Robinson, K. **Química Analítica Contemporánea**. Prentice Hall, 1^{era} edición, México. 2000.
- (8) Cámara, C. **Toma y Tratamiento de Muestra**. Editorial Síntesis, S.A. Madrid, España. 2002.
- (9) Valcárcel, M. Gómez, A. **Técnicas Analíticas de Separación**. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, España, 1988.
- (10) Harvey, D. **Química Analítica Moderna**. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A. U., Madrid, España. 2002.
- (11) Rouessac, F. Rouessac, A. **Análisis Químico**. McGraw-Hill Interamericana de España, S.A. U. Capitulo 21, 5^{ta} edición, Madrid, España, 2003.
- (12) Varian. **Bond Elut Certify™ Instruction Manual**. 24201 Frampton Avenue, Harbor City, CA 90710, USA.
- (13) Poole S. Dean T. Oudsema J. Pool C. **Sample Preparation for Chromatography Separation: An Overview**. Analytica Chimica Acta, 236, 3 – 42, 1990.
- (14) Blau, K. Halket, J. **Hanbook of Derivatives for Chromatography**. 2^{da} Edición. Editorial John Wiley & Sons. 1993.
- (15) Shareef, A. Angove, M., Wells, J. **Optimization of silylation using *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17_-**

- ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1108, 121–128, 2006.
- (16) Halket, J.M., Zaikin, V.G. **Derivatization in mass spectrometry. 1. Silylation.** Eur. J. Mass Spectrom. 9 (1) 2003.
- (17) Shareef, A. Parnis, C. Angove, M. Wells, J. Johnson, B. **Suitability of *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide as derivatization reagents for the determination of the estrogens estrone and 17 β -ethinylestradiol by gas chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1026, 295–300, 2004.
- (18) Bovijn, L. Pirotte, J. Beger, A. **Gas Chromatography 1958.** (Amsterdam Symposium), in D. H. Desty (Editor), Butterworths, London, 310, 1958.
- (19) Zlatkis, A. Lichtenstien, H. Tishbee, A. **Application Of Dicarbonyl-Rhodium- Trifluoroacetyl-D-Camphorate To Special Problems of Olefin Analysis by Gas – Liquid Chromatography.** Chromatographia 6, 223, 1973.
- (20) Kolb, B. **Headspace Sampling with Capillary Column.** Journal of Chromatography A. 842, 163-205, 1998.
- (21) Natishan, T. Wu, Y. **Residual Solvents Determination in the Antibiotic L-749,345 by Static Headspace Gas Chromatography.** Journal of Chromatography A. 800, 275-281, 1998.
- (22) Russo, M. **Static Headspace Gas Chromatography of Residual Solvents in Pharmaceutical Products.** Chromatographia. 39, 11/12, 1994.
- (23) Azenha, M. Vasconcelos, M. **Headspace Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography-Mass Detection Method for the Determination of Butyltin Compounds in Wines.** Analytica Chimica Acta. 458, 231-239, 2002.
- (24) Wasik, A. Rodriguez, I. Lobinski, R. **Interface for Time-Resolved Introduction of Gaseous Analytes for Atomic Spectrometry by Purge and Trap Multicapillary Gas Chromatography.** Spectrochimica Acta Part B. 53, 867-879, 1998.

- (25) Adlar, E. Davenport, J. *Journal of Chromatography* 17, 421-425, 1983.
- (26) Bandings, H. Jong, C. Dooper, R. **Automatic System for rapid analysis of volatile compounds by purge-and-cold-trapping capillary gas chromatography.** *Journal of High Resolution Chromatography*. 8(11), 755-763, 1985.
- (27) Adlar, E. Davenport, J. *Journal Chromatographia* 17, 421-425, 1983.
- (28) Blomberg, H. Roeraade, J. **Improved Thick Film Open Tubular Traps for The Enrichment Of Volatile Organic Compounds From Air And Water.** *Journal of High Resolution Chromatography*. 13, 509-512, 1990.
- (29) Djozan, D. Assadi, Y. **Optimization of the Gas Stripping and Cryogenic Trapping Method for Capillary Gas Chromatographic Analysis of Traces of Volatile Halogenated Compounds in Drinking Water** *Journal of Chromatography A*. 697, 525-532, 1995.
- (30) Jennings, W. **Comparison of Fused Silica and Others Glass Columns in Gas Chromatography.** Hüthling, Heidelberg. pp. 59, 1981.
- (31) Pawliszyn, J. **Applications of Solid Phase Microextraction.** The Royal Society of Chemistry, Cambridge. 1999.
- (32) Alpendurada, M. **Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis** *Journal of Chromatography A*, 889 (3), 2000.
- (33) Pawliszyn, J. **Solid Phase Microextraction, Theory and Practice.** Wiley-VCH, Nueva York, 1997.
- (34) Skeggs, **An automatic Method for Calorimetric Analysis.** L. American *Journal of Clinical Path*, 28, 311, 1957.
- (35) Ruzicka, J. Hansen, E. **Flow Injection Analysis: Part I. A New Concept of Fast Continuous Flow Analysis.** *Analytica Chimica Acta*. 78, 145-157, 1975.
- (36) Cerdà, V. Estela, J. **Automatic Pre-concentration and Treatment for The Analysis of Enviromental Samples Using Non-Chromatographic Flow Techniques.** *Inter. J. Environ. Anal. Chem.* 85, (4-5), 231-253, 2005.

- (37) Ruzicka, J. Marshall, G. **Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays.** *Analytica Chimica Acta* 237, 329-343, 1990.
- (38) Reis, B. Gine, M., Zagatto, E. Lima, J. Lapa, R. **Multicommution in Flow Analysis. Part 1. Binary Sampling: Concepts, Instrumentation and Spectrophotometric Determination of Iron in Plant Digests.** *Analytica Chimica Acta*, 293, 129-138, 1994.
- (39) Cerdà, V. Estela, J. Forteza, R. Cladera, A. Becerra, E. Altimira, P. Sitjar, P. **Flow Techniques in Water Analysis.** *Talanta* 50, 695, 1999.
- (40) Cerdà, V. **Introducción a los métodos de Análisis en Flujo.** 1era edición. Palma de Mallorca, España. Editorial SCWARE S.L., 2006.
- (41) Rocha, F. Resi, B. **A Flow System Exploiting Multicommution for Speciation of Inorganic Nitrogen in Waters.** *Analytica Chimica Acta*. 409, 227-235, 2000.
- (42) Van Staden, J. Stefan, R. **Chemical Speciation by Sequential Injection Analysis: An Overview.** *Talanta*. 64, 1109–1113, 2004.
- (43) De Armas, G. Ferrer, L. Miro, M. Cladera, A. Cerdà, V. Estela, J. **Time-Based Multisyringe Flow Injection System for the spectrofluorimetric Determination of Aluminium.** *Analytica Chimica Acta* 455, 149–157, 2002.
- (44) Semenova, N. Leal L, Forteza, R. Cerdà, V. **Multisyringe Flow Injection System for Total Inorganic Selenium Determination by Hydride Generation-Atomic Fluorescence Spectrometry.** *Analytica Chimica Acta*. 486, 217–225, 2003.
- (45) Ferrer, L. De Armas, G. Miró, M. Estela, J. Cerdà, V. **A Multisyringe Flow Injection Method for the Automated Determination of Sulfide in Waters Using a Miniaturised Optical Fiber Spectrophotometer.** *Talanta* 64, 1119–1126, 2004.
- (46) Horstkotte, B. Werner, E. Weidemeier, S. Elsholz, O. Cerdà, V. Luttman, R. **At-line Determination of Formaldehyde in Bioprocesses by Sequential Injection Analysis.** *Analytica Chimica Acta*. 559, 248-256, 2006.

- (47) Becerra, E. Cladera, A. Cerda, V. **Development of a Software for Automatic Flow Analysis Applied to Routine Samples.** Lab. Robotics Autom. 58, 131, 1999.
- (48) Kalberg, B. Thelander, S. **Extraction Based On The Flow-Injection Principle: Part I. Description Of The Extraction System.** Analytical Chimica Acta, 1, 98, 1978.
- (49) Ek, L. Fernández, J. Beeper, L. **In Automation in Analytical Chemistry,** 1967 Thecnicon Symposia, 1, 477, 1968.
- (50) Steele, D. Vassilaros, D. **On-Column Injection for Fused Silica Capillary Gas Chromatography Using a Rotary Valve** Journal of High Resolution Chromatography 6 (10), 561-563 1983.
- (51) Ballesteros, E. Gallego, M. Valcárcel, M. **On -Line Couplin of Gas Chromatograph to a Continuous Liquid-Liquid Extractor.** Analytical Chemistry. 62, 1587-1591, 1990
- (52) Ballesteros, E. Gallego, M. Valcárcel, M. **Automatic Gas Chromatographic Determination of N-Methylcarbamates in Milk with Electron Capture Detection.** Analytical Chemistry 65, 1773-1778, 1993.
- (53) Font, G. Mañes, J. Moltó, J. Picó, Y. **Solid-Phase Extraction in Multi-Residue Pesticide Analysis of Water.** Journal of Chromatography A, 642, 135-161, 1993.
- (54) Cárdenas, S. Gallego, M. Valcárcel, M. **A Partially Automated Pretreatment Module for Routine Analyses for Seventeen Non-Steroid Antiinflammatory Drugs in Race Horses Using Gas Chromatography/ Mass Spectrometry.** Analytical Chemistry. 68, 118-123, 1996.
- (55) De Armas, G. Miro, M. Cerdà, V. Estela, J. **Multisyringe Flow Injection Spectrofluorimetric Determination of Warfarin at Trace Levels With On-Line Solid-Phase Preconcentration.** Analytica Chimica Acta. 467 13-23, 2002.
- (56) Cerdà, A. Oms, M. Forteza, R. Cerda, V. **Sequential Injection Sandwich Technique for the Simultaneous Determination of Nitrate and Nitrite.** Analytica Chimica Acta, 371, 63-71, 1998.

- (57) Pons, C. Forteza, R. Cerdà, V. **Expert Multi-Syringe Flow-Injection System for the Determination and Speciation Analysis of Iron Using Chelating Disks in Water Samples.** *Analytica Chimica Acta*. 524, 79–88, 2004.
- (58) Pons, C. Forteza, R. Cerda, V. **The Use of Anion-exchange Disks in an Optrode Coupled to a Multi-syringe Flow- injection System for the Determination and Speciation Analysis of Iron in Natural Water Samples.** *Talanta*. 66, 210-217, 2005.
- (59) De Armas, G. Ferrer, L. Miro, M. Cerdà, V. Estela, J. **In-Line Membrane Separation Method for Sulfide Monitoring in Wastewaters Exploiting Multisyringe Flow Injection Analysis.** *Analytica Chimica Acta*, 524 (1-2), 89-96, 2004.
- (60) Obando, M. Estela, J. Cerdà, V. **Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (1) 212-217, 2008
- (61) Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J. **Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis.** *Journal of Chromatography B*. 801, 141-156, 2004.
- (62) Theodoridis, G. Zacharis, C. Voulgaropoulos, A. **Automated Sample Treatment by Flow Techniques prior to liquid-phase Separations.** *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70 (2), 243-252, 2007.
- (63) Economou, A. **Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment.** *Trends in Analytical Chemistry*. 24(5), 416–425, 2005.
- (64) Desilets, C. Rounds, M. Regnier F. **Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A*, 544, 25-39, 1991.

- (65) Hagestam, I. Pinkerton, T. **Internal Surface Reverse –phase Silica Support by Liquid Chromatography**. Analytical Chemistry. 57, 1757-1763, 1985.
- (66) Boos, K. Grimm, C. **High-performance liquid chromatographic integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumns packings**. Trends. Analytical Chemistry. 10 (3), 175-180, 1999.
- (67) Boos, K. Rudolphi, A. Vielhauer, S. Walfort, A. Lubda, D. Eisenbeiss, F. **Alkyk-diol Silica (ADS): Restricted Access Precolumn Packing for Direct Injection and Coupled Column Chromatography of Biofluids**. Fresenius Journal of Analytical Chemistry. 352, 684-690, 1995.
- (68) Dias N., Poole, C. **Mechanistic study of the sorption properties of Oasis® HLB and its use in solid-phase extraction**. Chromatographia. 56, 269-275, 2002.
- (69) Waters **Oasis®**. Milford, Massachusetts, 2008. Disponible en Internet: http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=513209.
- (70) Blahová, E. Brandšteterová, E. **Approaches in Sampling Handling Before HPLC Analysis of Complex Matrices**. Chemical Papers. 58 (5), 362-373, 2004.
- (71) Cros, E. **Factores condicionantes de la calidad del Cacao**. Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. pp. 16-32, 2002.
- (72) Lovera, J. R. **El cacao en Venezuela una historia**. 1^{era} Edición. Editorial Chocolates El Rey, C.A. Caracas, Venezuela. 17-29, 2000.
- (73) Barel, M. Leon, D. Vincent, J. **Influence du Temps de Fermentation du Cacaco Sur la Production des Pyrazines du Chocolat**. Café Cacao Thé. Vol XXIX, 4, 277-286. 1985.
- (74) Perbellini, L., Pasini, F., Romani, S., Princivale, A., Brugnone, F. **Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and m-xylene in biological samples from the general population**. Journal of Chromatography B. 778, 199-210, 2002.

- (75) Klaassen, C., Watkins, J. **Manual de Toxicología**. 5^a Edición. Mcgraw-Hill Interamericana. Madrid, España, 2000.
- (76) Lauwerys, R. **Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales**. 2^{da} edición 239, 2004
- (77) Matthews, G. **Métodos para la Aplicación de Pesticidas**. Editorial Continental, S.A. 2^{da} Edición. México. 1988.
- (78) Batista, A. **Nuevos Métodos Luminiscentes para la Determinación de Pesticidas en Aguas**. Departamento de Química. Universidad de Extremadura. Tesis Doctoral. 2001.
- (79) Ortega, R. Rodríguez, I. **Manual de Gestión del Medio Ambiente**. Editorial Mapfre S.A. España 342, 1994.
- (80) Brunetto, M.R. Delgado, Y. Gutiérrez, L. Galignani, M. Obando, M.A.. **Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 115–120, 2005.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo II

“Uso de la Técnica de Espacio de Cabeza para el Tratamiento e Introducción de la Muestra en Línea en el Análisis de Alquilpirazinas en Licor de Cacao por Cromatografía de Gases con Detección por Espectrometría de Masas”

C.C. RECONOCIMIENTO -

Resumen

El desarrollo del aroma de cacao es un fenómeno complejo que depende no sólo de la composición química de la almendra sino que también de como se realice el proceso de fermentación y de tostado. Es por ello que para poder evaluar el potencial aromático del cacao es necesario determinar algunos compuestos, entre ellos, las pirazinas que pueden estar presentes en el grano fermentado pero especialmente algunas de ellas sólo se forman durante la etapa de tostado por lo que son consideradas únicamente de origen térmico.

En este trabajo se desarrolló y validó un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) e introducción de la muestra en línea empleando la técnica de espacio de cabeza (EC) para la determinación de pirazinas en muestras de licores de cacaos venezolanos. La técnica de EC basada en un procedimiento de extracción en fase gaseosa permitió introducir directamente en la columna cromatográfica a los constituyentes volátiles de la muestra sólida de cacao prácticamente libres de la matriz evitando así las posibles interferencias de componentes endógenos de la misma.

Utilizando el método propuesto, se analizaron 120 muestras de licores de cacaos venezolanos. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de

la concentración de las pirazinas a medida que se incrementaba el tiempo y la temperatura de torrefacción.

Adicionalmente, se encontró que los cacaos criollos no contenían la etilpirazina por lo que éste compuesto podría ser un parámetro químico que permitiría discriminar entre éstos y las otras variedades estudiadas.

1. Introducción

En los últimos años se ha tratado de optimizar aquellas condiciones que proporcionen un cacao con un fuerte potencial aromático, es por ello que, algunos autores indican que la optimización de las condiciones de torrefacción del cacao, permitirían utilizar el máximo potencial aromático de la almendra. Se sabe que la calidad de la almendra de cacao está relacionada con el aroma y sabor, los cuales a su vez dependen de factores edafoclimáticos, genotipo, manejo agronómico y de la tecnología poscosecha (fermentación y torrefacción)⁽¹⁾.

Las reacciones bioquímicas durante la fermentación conducen a la formación de compuestos precursores de aroma. El desarrollo del aroma de cacao es un fenómeno complejo que depende de los parámetros de tostado y de la composición química del grano. Algunos de ellos están presentes en el grano fermentado, los demás y especialmente algunas pirazinas no se forman más que en el tostado por lo que son consideradas únicamente de origen térmico⁽²⁾.

Las pirazinas son los compuestos aromáticos mayoritarios en el cacao y representan el 25% de los productos identificados de la fracción aromática del chocolate. Por esta razón, es importante evaluar a las pirazinas presentes en el cacao y su contenido⁽³⁾.

En general, el análisis de estos compuestos en muestras de cacao se ha realizado por cromatografía de gases acoplada a diferentes sistemas de detección, tales como espectrometría de masas y detector termoiónico específico de nitrógeno.

En la mayoría de los casos se realiza un tratamiento de la muestra que incluye una serie de etapas de extracción donde generalmente se emplean sistemas de arrastre con vapor o de destilación seguidos de extracciones líquido-líquido. En ese sentido, el tratamiento de la muestra tiende a ser tedioso, emplea mucho tiempo y proporciona bajos porcentajes de recuperación para algunos de los analitos de interés⁽³⁾.

La técnica de Espacio de cabeza (EC) se basa en un procedimiento de extracción líquido-gas o sólido-gas, mediante el cual se determinan directamente los constituyentes volátiles de muestras sólidas o líquidas, analizando la fase de vapor que se encuentra en equilibrio termodinámico, con la muestra en un vial herméticamente cerrado.

Por ello, aprovechando las ventajas de esta técnica, en este trabajo se propone desarrollar un método por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas (CG-EM) con introducción de la muestra en línea empleando la técnica de espacio de cabeza (EC) directamente sobre las muestras sólidas.

2. Generalidades

2.1. Cacao

2.1.1. El cacao en Venezuela

En Venezuela, el cultivo comercial de la planta del cacao, se inició a fines del siglo XVI. La primera exportación comercial, se efectuó por el Puerto de la Guaira en 1.607, a bordo de la fragata "San Francisco" y tuvo como destino la ciudad de Cartagena.

El cacao venezolano, desde 1600 a 1820 ocupó el primer lugar de exportación. Muchas publicaciones internacionales lo señalan como el de más alta calidad en el mercado mundial. El cacao ha descendido en importancia relativa dentro de la economía venezolana, al punto de que en 1958 representó apenas el 0,4 % del valor total de las exportaciones nacionales. Sin embargo, la calidad del producto ha mantenido su prestigio en el mercado mundial y ocupa las mejores posiciones dentro de las clasificaciones comerciales⁽²⁾.

En la Figura 1 se muestran las principales zonas de producción de cacao en la actualidad.

Región Nor-oriental: Comprende los Estados Sucre, Monagas y Delta Amacuro, siendo el Estado Sucre, el principal productor de esta región.

Región Central: Comprende los Estados Miranda, Aragua, Carabobo y Yaracuy. El estado Miranda es el principal productor no sólo de esta región, sino del país.

Región Sur-Occidental: Comprende los Estados Táchira, Apure, Barinas, Mérida y Zulia, si bien es la zona que menor cantidad produce (11% del total nacional) , su cacao es uno de los de mayor calidad.

2.1.2. Teobroma Cacao L.

Diferentes especies de plantas tropicales pertenecen al género *Theobroma*. Se han reportado 22 especies, pero solamente una, el cacao (*Theobroma cacao* L., familia *Sterculiaceae*), presenta una significativa importancia comercial y por ésto ha sido estudiada con mayor profundidad⁽⁴⁾.

Theobroma cacao L. es el nombre científico que recibe el *árbol del cacao* o *cacaotero*. *Theobroma*, en griego, significa 'bebida de los dioses'; *cacao* viene del azteca 'cacahualt'. El nombre científico lleva añadida al final una *L.*, que es la inicial del apellido del naturalista sueco que clasificó la planta, Carl Von Linné.

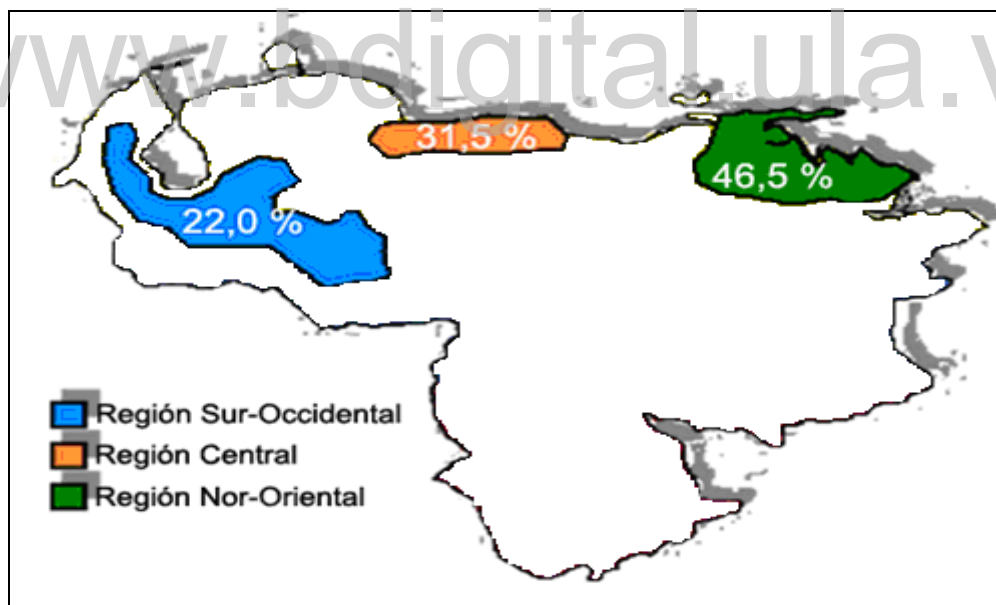


Figura 1. Principales regiones de producción de cacao en Venezuela

En la Tabla 1 se resumen las características más resaltantes de la planta del cacao.

2.1.3. Variedad de Cacao

Botánicamente, se reconocen tres grupos que corresponden exactamente a los cacaos que se encuentran en el mercado.

2.1.3.1. Cacao Criollo

Es el cacao genuino y fue bautizado por los españoles al llegar a México. Es un cacao reconocido de gran calidad, de escaso contenido tanino, reservado para la fabricación de los chocolates más finos. Este cacao excepcional se encuentra en pequeñas cantidades representando un 5-10 % de la producción mundial.

Tabla 1. Características de la planta de Cacao^(5,6).

	Características
Nombre científico	"Theobroma Cacao" (dado por Carl Von Linné, más conocido como Lineo)
Familia y especie	Esterculiáceas y Theobroma cacao L.
Origen	Trópicos húmedos de América, noroeste de América del Sur, zona amazónica
Cultivo	Crece entre los trópicos de Cáncer y Capricornio, en la zona comprendida entre 20° al norte y 20° al sur del Ecuador (Venezuela, Ecuador, Brasil, Perú y cuencas del Orinoco en Sudamérica). Esta planta necesita para su desarrollo, temperaturas medias anuales elevadas (21- 32 °C), y una gran humedad
Planta	El árbol, es normalmente pequeño, entre 4-8 m de alto, aunque si recibe sombra de árboles grandes, puede alcanzar hasta los 10 m. El tallo es recto, la madera de color claro, casi blanco, y la corteza es delgada, de color café.
Hojas	Simples, enteras y de color bastante variable (color café claro, morado o rojizo, verde pálido)
Flores	El Theobroma Cacao es "caulifloro", lo que significa que las flores crecen en las partes más viejas del tronco y de las ramas desprovistas de hojas. El cáliz es de color rosa; la corola es de color blancuzco, amarillo o rosa.
Fruto	El fruto crece de forma inusual: directamente del tronco y de las ramas más antiguas. De tamaño, color y formas variables, pero generalmente tienen forma de baya, de 30 cm de largo y 10 cm de diámetro y pesa aproximadamente 450 g cuando madura, elípticas y de color rojo, amarillo, morado o café. La pared del fruto es gruesa, dura o suave y de consistencia como de cuero. La pulpa es blanca, rosada o café, de sabor ácido a dulce y aromática. El contenido de semillas por baya es de 20 a 40 y son planas o redondeadas, de color blanco, café o morado, de sabor dulce o amargo.

Delgado

Semilla	Se encuentran cubiertas por una pulpa mucilaginosa de color blanco y de sabor agradable, su longitud puede variar de 15 a 30 mm, el ancho de 8 a 20 mm y el grosor de 5 a 15 mm. Se le denomina comúnmente "almendras". Constituye la materia prima fundamental para la elaboración del chocolate.
Cosecha	Se requieren de 5 a 6 meses entre la fertilización y la cosecha de los frutos. A pesar de que los frutos maduran a lo largo del año, normalmente se llevan a cabo dos cosechas en un año: la cosecha principal y la cosecha intermedia. La cosecha intermedia es en general menor que la cosecha principal, sin embargo, el tamaño relativo varía según cada país.

El árbol es frágil y de escaso rendimiento. Estos tienen mazorcas de color rojo o amarillo cuando maduran. Presenta diez surcos profundos, muy rugosa y punteada. Las paredes de la mazorca son relativamente delgadas y fáciles de cortar, las semillas son rojizas, de sección casi redonda y los cotiledones frescos son de color blanco o violeta pálido⁽⁷⁾.

2.1.3.2. Cacao Forastero

Es originario de la alta Amazonia. Se trata de un cacao normal, con el contenido de taninos más elevado. Es el más cultivado (80 % de la producción mundial) y proviene generalmente de África. El grano tiene una cáscara gruesa, es resistente y poco aromático. Para neutralizar sus imperfecciones, requiere un intenso tueste, de donde proceden el sabor y el aroma a quemado de la mayoría de los chocolates. Los mejores productores usan granos forasteros en sus mezclas, para dar cuerpo y amplitud al chocolate, pero la acidez, el equilibrio y la complejidad de los mejores chocolates proviene de la variedad criolla.

Las mazorcas de todos los forasteros del Amazonas son amarillas cuando están maduras y va de alargada a amelonada. La cáscara de la mazorca es relativamente gruesa, con una capa leñosa difícil de cortar. Por otra parte, las semillas son más o menos aplanadas y los cotiledones frescos son de un color violeta oscuro, algunas veces casi negro.

2.1.3.3. Cacao Trinitario

Es un cruce entre el criollo y el forastero, aunque su calidad es más próxima al del segundo. Como su nombre sugiere, es originario de Trinidad donde, después de un terrible huracán que en 1727 destruyó prácticamente todas las plantaciones de la isla, surgió como resultado de un proceso de cruce. De este modo, heredó la robustez del cacao forastero y el delicado sabor del cacao criollo. La característica más sobresaliente de esta variedad de cacao es su heterogeneidad⁽⁷⁾.

El Trinitario es considerado un cacao excelente, y se estima que su producción se encuentre entre un 10 a 15 %⁽⁷⁾.

2.1.4. Calidad del Cacao

Venezuela ha sido históricamente considerada como país productor de cacao de alta calidad, calificados como los más finos del mundo.

La calidad es uno de los aspectos de mayor importancia en el proceso productivo cacaotero, el cuidado y destreza con la que se traten las almendras de cacao en su preparación para el mercado, decidirá si son o no capaces de producir un cacao y un chocolate de buen sabor y aroma. Al igual que muchos otros productos vegetales, las primeras etapas de tratamiento son de vital importancia⁽⁸⁾.

La mayoría de los países que exportan grandes cantidades de productos agrícolas formulan reglas para su clasificación, la cual agrupa los productos de acuerdo con su calidad. La obtención de cacao de alta calidad exige una serie de requisitos que se inician con la escogencia del sitio de siembra, los suelos y de la forma en que se maneje la tecnología postcosecha.

Los estándares internacionales para cacao requieren que el cacao de calidad negociable sea fermentado, completamente seco, libre de granos con olor a humo, libre de olores anormales y de cualquier evidencia de adulteración. Adicionalmente, debe encontrarse razonablemente libre de insectos vivos, de granos partidos, fragmentos o partes de cáscara y razonablemente uniforme en tamaño. Los cinco factores determinantes en la calidad del cacao^(9,10) provienen de estos estándares que se muestran en la Figura 2.

A lo largo de los años, se ha discutido acerca de la influencia que puede presentar el genotipo en la calidad del cacao. Sin embargo, algunos autores le otorgan mayor importancia a las condiciones edafoclimáticas y al manejo postcosecha. Otros se dedicaron a estudiar el comportamiento de los cultivares, para lograr obtener la información necesaria y así establecer las bases que definen cuales variedades de cacao deben utilizarse y bajo que condiciones, con el fin de producir la materia prima que la industria exige.

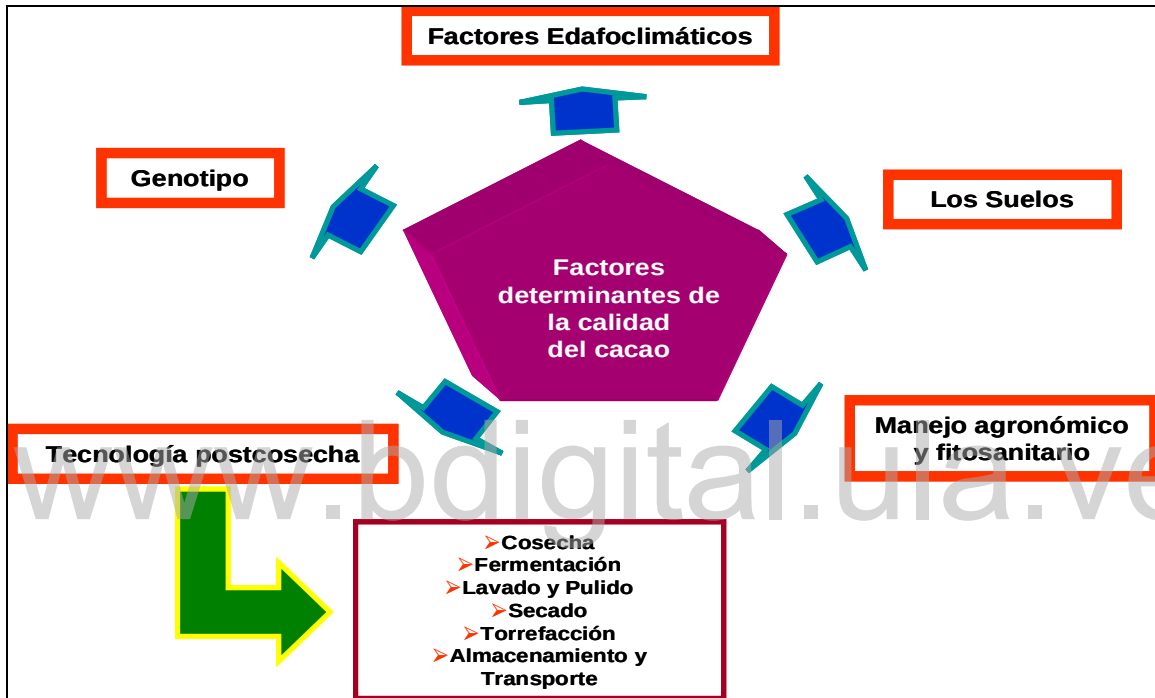


Figura 2. Factores determinantes de la calidad del cacao

Las condiciones climáticas particulares de cada año y de cada zona, determinan tanto la granulometría como el contenido en manteca y en menor proporción el aroma. Por otra parte, tienen una influencia sobre las condiciones de fermentación y secado y como consecuencia en la calidad final del producto.

Los factores climáticos críticos para el desarrollo del cacao son la temperatura y la lluvia. Mientras más altas sean las temperaturas durante el período de formación de los frutos, madurarán en menor tiempo y sus semillas serán más pequeñas.

Por otro parte, el cacao es una planta sensible a la escasez o exceso de agua por lo que se requiere de un buen drenaje, ya que, un exceso de ésta, puede provocar la asfixia de las raíces y la muerte de la planta.

En cuanto a las exigencias del suelo, el cacao requiere de suelos muy ricos en materia orgánica, profundos, arcillosos, con buen drenaje y topografía regular, con el fin de regular el tamaño de la semilla.

El proceso postcosecha también conocido como beneficio, puede definirse como el conjunto de prácticas interrelacionadas que tienen que ver con la transformación biológica que deben sufrir las almendras una vez cosechadas⁽⁹⁾.

En el cultivo del cacao el beneficio constituye parte fundamental y decisiva para obtener una buena calidad del grano, y permitir su correcta comercialización en el mercado nacional e internacional. El precio del producto y la rentabilidad del cultivo se incrementan con un buen beneficio, labor que representa entre el 15 y el 20% de los costos directos de producción.

Este proceso comprende: cosecha, fermentación, secado, clasificación y almacenamiento.

Sus principales objetivos comprenden:

- Descomponer y remover el mucílago azucarado que cubre el grano fresco.
- Acondicionar y facilitar las transformaciones bioquímicas que sufre el grano para desarrollar el sabor y aroma del chocolate
- Reducir el contenido de humedad del grano para facilitar su almacenaje.

El procesamiento postcosecha ha sido considerado crítico para todos los tipos de cacao y esencial para el desarrollo de un buen sabor y aroma a chocolate^(10,11).

Las semillas del Theobroma son ricas en almidón, proteínas, materias grasas y otros elementos que le confieren valor nutritivo.

La composición física y química del grano de cacao, depende adicionalmente de la formación de compuestos a través de reacciones complejas

Delgado

que ocurren, principalmente durante los procesos de fermentación y torrefacción⁽¹⁾.

La fermentación es quizás el proceso postcosecha más importante en relación con la calidad de los granos⁽³⁾. Consiste en la colocación de los granos recién cosechados en recipientes adecuados o pilas que deben cubrirse para crear un ambiente semicerrado. Así ocurre la eliminación de la baba o mucílago azucarado que recubre las almendras y dentro de ellas la muerte del embrión, transformación de los cotiledones y la formación de sustancias precursoras del sabor y aroma de chocolate⁽⁸⁾.

La torrefacción es el proceso que consiste en el tostado final de las semillas fermentadas y secas, el cual es necesario en el desarrollo típico del aroma de cacao. Las condiciones de tiempo-temperatura son críticas para obtener el aroma deseado, dependiendo particularmente de la variedad del cacao, aunque también influye el tamaño de la semilla. En la literatura se reportan temperaturas de torrefacción entre 70 y 140 °C. Utilizando la tecnología moderna, el cacao es tostado con el objetivo primordial de fomentar el desarrollo de los compuestos de carácter aromático⁽¹²⁾.

Un gran número de éstos compuestos son comunes en todos los tipos de cacaos, sin embargo, otros son específicos a genotipos determinados. Hasta la fecha, en el cacao tostado se han identificado unos 500 compuestos volátiles, distribuidos en 17 clases químicas. Van Straten⁽¹³⁾ y Flament⁽¹⁴⁾ realizaron la caracterización de estos compuestos en el aroma y en un 11 % se encuentran ácidos seguido por los ésteres e hidrocarburos con un 13 % y por último las pirazinas, son los compuestos predominantes con un 25 %.

Las pirazinas son las que contribuyen notablemente a establecer las características sensoriales que posee el cacao. Su considerable impacto sobre el aroma hace que puedan ser consideradas como un parámetro de calidad para la evaluación de la fracción volátil del cacao y el chocolate⁽¹⁵⁾.

Por esta razón, se hace necesario conocer un poco más acerca de estos compuestos y de su formación en las almendras de cacao.

3. Pirazinas

Las pirazinas son compuestos heterocíclicos nitrogenados y son ampliamente conocidas, porque contribuyen significativamente en el sabor y aroma de numerosos alimentos. Sin embargo, se encuentra muy poca información acerca de su origen. Algunos indican que son indudablemente de origen biosintético, producidas por reacciones enzimáticas, las cuales pueden ocurrir únicamente en la especie en la que éstas se encuentran. Otras pueden formarse por reacciones no enzimáticas entre moléculas que están presentes en una planta. Algunas se encuentran en alimentos luego de su cocción o se forman durante el proceso de tostado, probablemente por reacciones no enzimáticas entre precursores potenciales que se encuentran en los alimentos frescos⁽¹⁶⁾.

Como se mencionó anteriormente, las pirazinas corresponden al 25% de los productos identificados de la fracción aromática del chocolate y se forman durante la etapa del tostado de las almendras de cacao, a partir de aminoácidos libres y de derivados de monosacáridos. Estos precursores se producen durante la etapa de fermentación. Sin embargo, algunos autores indican, que ciertos microorganismos (*Bacillus subtilis*) presentes en la flora de la fermentación son capaces de sintetizar la tetrametilpirazina. En el curso de los tres primeros días de fermentación, el contenido de este compuesto es bajo y evoluciona poco, lo que indica una baja actividad del *B. subtilis*. Se observa luego un aumento de su concentración a partir del tercer día hasta el séptimo día y luego nuevamente una disminución. Esto concuerda con los resultados y observaciones realizadas por Ostovar y col.⁽¹⁶⁾, quienes no observaron la población de *B. subtilis* más que en los últimos estados de fermentación⁽³⁾.

3.1. Mecanismos propuestos para la formación de las Alquilpirazinas

Se han desarrollado muchas teorías acerca de cómo se forman las alquilpirazinas durante la etapa de tostado. Entre éstas se encuentran las propuestas de Rizzi⁽¹⁷⁾, Koehler⁽¹⁸⁾ y Vernin⁽¹⁹⁾ (a través de sistemas modelados),

que han permitido tener una idea del mecanismo de formación de las pirazinas durante la etapa de calentamiento. Ellos indican que los aminoácidos libres resultantes de la hidrólisis de las proteínas durante la fermentación, se condensan con los azúcares presentes para formar reductores. Estos reductores y otros compuestos dicarboxilados se condensan a la vez con los aminoácidos libres y conducen a la formación de dos moléculas de aminas que luego se condensan para formar las pirazinas. En la Figura 3 se muestra de forma esquemática el mecanismo de la formación de las pirazinas en las almendras de cacao.

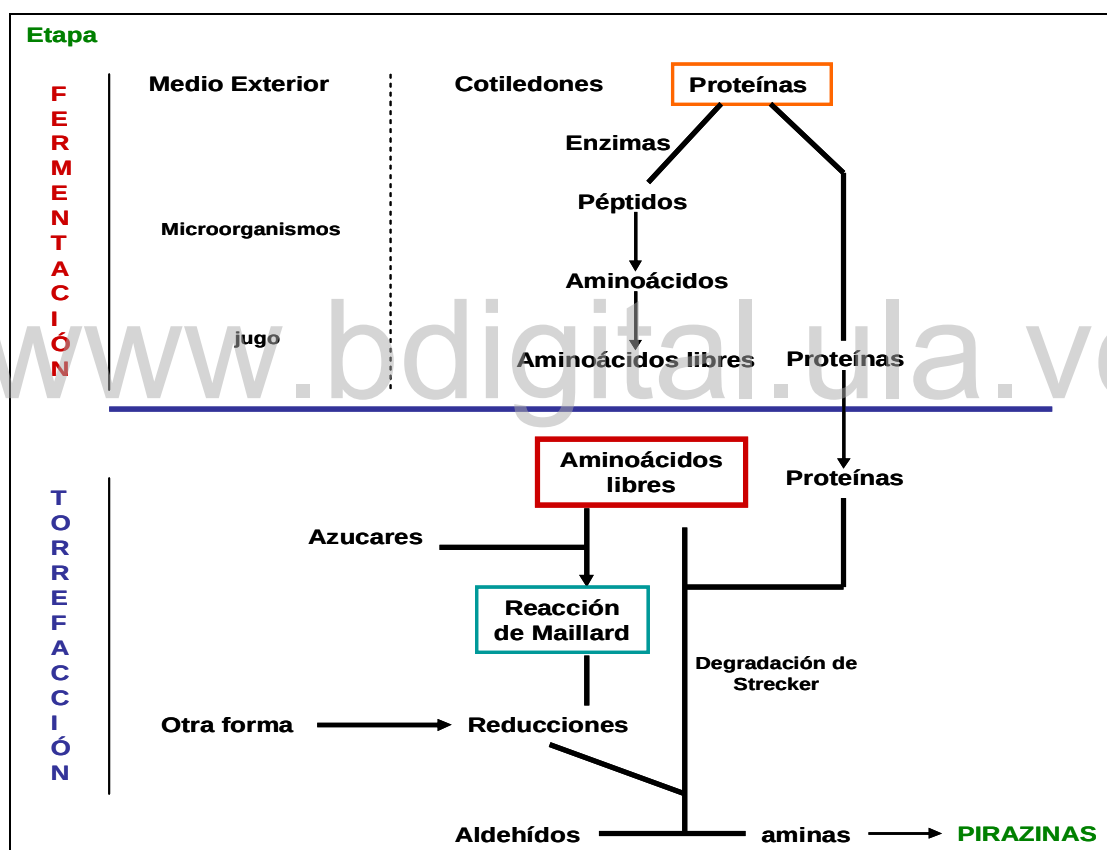


Figura 3. Generación de pirazinas

En ese sentido, la reacción de Maillard descrita por primera vez en 1912 por Luois Camilla Maillard contribuye a la formación de productos de aroma de muchos alimentos, entre ellos el cacao. En la Figura 4 se muestra el mecanismo

Delgado

propuesto para la formación de pirazinas a partir de aminoácidos y azúcares^(3,20,21).

Es importante señalar, que la distribución de aminoácidos y azúcares en las diferentes variedades de cacao, muestra que la presencia de éstos podrían ser independientes del origen de la semilla y sus concentraciones dependen, entre otras del tratamiento postcosecha⁽²³⁾.

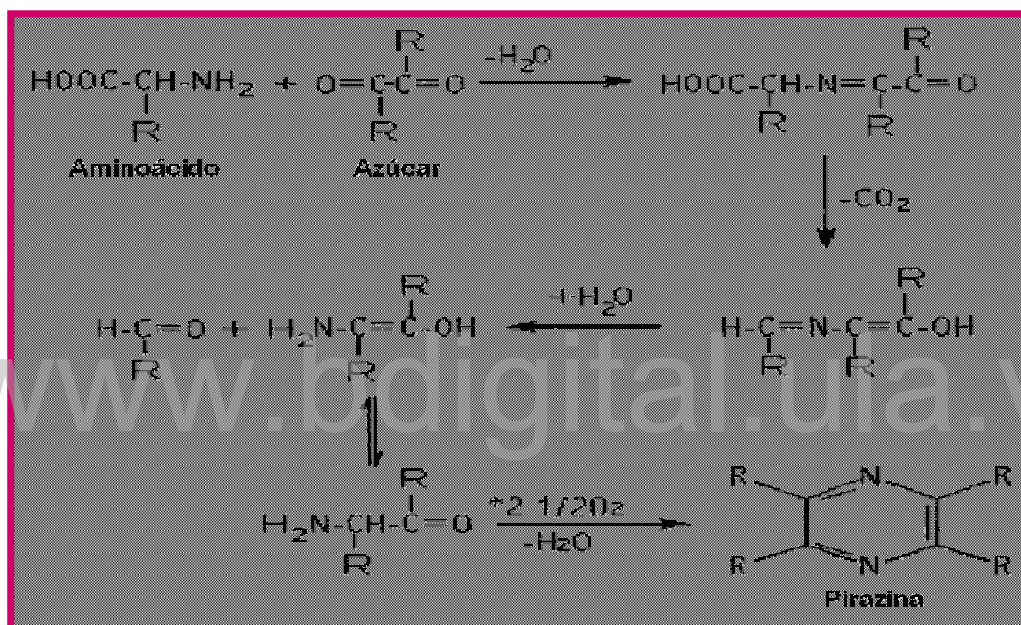


Figura 4. Reacción de Maillard. Mecanismo propuesto para la formación de pirazinas a partir de aminoácidos y azúcares⁽²¹⁾.

3.2. Propiedades Fisicoquímicas

En la Tabla 2 se muestran las estructuras de los compuestos objeto de estudio y un resumen de sus propiedades físicas y químicas. Además de los picos de mayor abundancia en el espectrómetro de masas (EM).

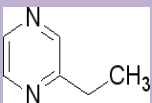
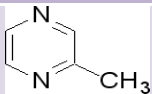
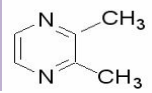
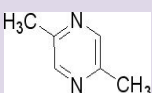
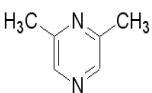
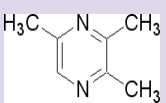
4. Antecedentes del Problema a Investigar

En los últimos años uno de los principales objetivos de los productores de cacao ha sido la de producir un cacao con un fuerte potencial aromático.

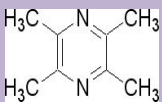
En ese sentido, algunos investigadores señalan que para este fin se deben optimizar fundamentalmente las condiciones de tostado del cacao en la etapa de torrefacción.

Es bien sabido que los precursores del aroma en los granos de cacao desarrollados en proceso de fermentación del cacao se convierten en aroma específico durante la torrefacción a través de la reacción de Maillard. Esta reacción produce, en particular una gran variedad de pirazinas cuya concentración puede variar dependiendo del tiempo y la temperatura del tratamiento térmico. Es por ello que para poder utilizar estos compuestos como indicadores de las mejores condiciones del tostado, es necesario contar con métodos selectivos y sensibles que permitan evaluar las pirazinas en las muestras de licor de cacao.

Tabla 2. Propiedades físicas y químicas de los analitos objeto de estudio

Compuesto	FM	Estructura	PM (g/mol)	PE (°C)	Solubilidad	Espectro de Masa (m/z)
Etilpirazina	$C_6H_8N_2$		108,14	152	Las pirazinas son solubles en agua, alcohol, éter y acetona	39, 67, 94
2-Metilpirazina	$C_5H_6N_2$		94,11	135		42, 108
2,3-dimetilpirazina	$C_6H_8N_2$		108,14	156		42,108
2,5- dimetilpirazina	$C_6H_8N_2$		108,14	155		80, 107
2,6- dimetilpirazina	$C_6H_8N_2$		108,14	154		67, 108
trimetilpirazina	$C_7H_{10}N_2$		122,17	171		42, 81,122

Delgado

tetrametilpirazina	$C_8H_{12}N_2$		136,19	190		54, 136
--------------------	----------------	---	--------	-----	--	---------

En la literatura encontramos numerosos procedimientos para la identificación y determinación de pirazinas en diferentes matrices, vino⁽²³⁾, cereal⁽²⁴⁾, café⁽²⁵⁾, manteca de cacao⁽²⁶⁾, chocolate⁽³⁾, licor de cacao^(15,27-32) donde la cromatografía de gases es la técnica más utilizada^(3,15,20,22,26,28-32).

En general estas metodologías se diferencian fundamentalmente en el procedimiento para el tratamiento de la muestra y en los sistemas de detección empleados. El EM es el detector más empleado, debido a que permite identificar los compuestos presentes en las muestras a través de sus espectros de masa.

Para cumplir con la etapa del tratamiento de la muestra se han empleado diferentes técnicas, tales como: destilación al vacío⁽³³⁾, destilación y extracción^(3,28,29), extracción continua sólido-líquido⁽³⁴⁾ o por fluido supercrítico^(32,35), seguidas de una etapa de preconcentración. Sin embargo, éstas técnicas no son selectivas y el licor de cacao no es una matriz sencilla por lo que los extractos obtenidos contienen las pirazinas junto a muchos compuestos interferentes que pueden llegar a ser incompatibles con el sistema cromatográfico⁽³⁶⁾.

Por otra parte, por lo general las técnicas de extracción se aplican de forma manual haciendo los procedimientos muy tediosos que consumen mucho tiempo y que proporcionan bajos porcentajes de recuperación de algunos de los analitos de interés^(3,32).

Considerando estas limitaciones, la técnica de Espacio de Cabeza (EC), podría ser considerada una excelente alternativa para este tipo de análisis. Ésta técnica presenta la ventaja de que la muestra puede introducirse en el sistema de análisis sin la necesidad de ser tratada, pues consiste precisamente en separar a los analitos volátiles de la matriz para ser introducidos al sistema cromatográfico.

Pini y col.⁽¹⁵⁾ proponen una alternativa para llevar a cabo el tratamiento de la muestra del licor de cacao utilizando un acoplamiento entre el sistema de espacio de cabeza con la microextracción en fase sólida (EC-MEFS) y su

separación y determinación por CG-EM y CG con emisión atómica como sistema de detección. Estos sistemas acoplados han sido ampliamente utilizados, debido a que proporcionan un gran potencial en la determinación de compuestos de aroma. Sin embargo, aunque la MEFS no requiere de manipulación por parte del operador, necesita grandes períodos de tiempo para llevar a cabo la extracción y luego la desorción de los analitos en el sistema cromatográfico.

Con el fin de disminuir el tiempo involucrado en el tratamiento de la muestra en este trabajo, se propone tomar en cuenta la ventaja que nos ofrece la técnica de espacio de cabeza (EC) para llevar a cabo el tratamiento y la introducción de la muestra en el análisis de alquilpirazinas en licor de cacao por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas.

Para ello, nos planteamos la siguiente hipótesis de trabajo

5. Hipótesis

Si se tiene en cuenta que:

- La técnica de espacio de cabeza permite llevar a cabo el tratamiento e introducción de la muestra, a través de una extracción (sólido - gas) cuantitativa de las alquilpirazinas del licor de cacao con un mínimo de interferencias.
- Una columna analítica AV –WAX de polietilenglicol proporciona una buena eficiencia y selectividad en la separación de las alquilpirazinas
- El espectrómetro de masas (EM) permite detectar e identificar a los analitos estudiados a través de sus espectros de masas.

“Se podrá optimizar un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas e introducción de la muestra en línea con un automuestreador de espacio de cabeza (EC) que permita determinar, a las alquilpirazinas en muestras de licor de cacaos venezolanos”

Para verificar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

- Desarrollar un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y tratamiento de la muestra en línea que permita cuantificar las alquilpirazinas en muestra de licor de cacao.

6.2. Objetivos Específicos

- Seleccionar la columna analítica y optimizar un método por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas que permita la detección y cuantificación de las alquilpirazinas
- Extraer cuantitativamente a los analitos del licor de cacao (Sólido-Gas) empleando la técnica de espacio de cabeza para el tratamiento de muestra.
- Aplicar la metodología desarrollada para la determinación de alquilpirazinas en muestras de licor de cacao venezolanos.

7. Parte Experimental

7.1. Reactivos y Solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y los solventes de grado HPLC. El metanol y el carbonato de sodio fueron suministrados por J.T. Baker (Phillipsburg, N.J. USA). Los patrones en metanol de las alquilpirazinas fueron, 2-metilpirazina (99 %), etilpirazina (98 %), 2,3-, 2,5-, 2,6-dimetilpirazina (99 %), 2,3,5-trimetilpirazina (99 %) y 2,3,5,6-tetrametilpirazina (99 %) fueron suministrados por Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los gases Nitrógeno (99,999 %), Aire (99,999 %) y Helio (99,999 %), fueron suministrados por AGA de Venezuela.

7.2. Preparación de Soluciones

Las soluciones patrones de cada una de las alquilpirazinas preparadas en metanol fueron de 500 mg/L para la 2,3-, 2,5-dimetilpirazina, 2-metilpirazina y etilpirazina, de 10 mg/L para la 2,6-dimetilpirazina y 1000 mg/L para la tetrametilpirazina. Las soluciones metanólicas se almacenaron bajo refrigeración a (-4 °C). Las soluciones de trabajo de menor concentración se prepararon por dilución de las soluciones en metanol.

Para llevar a cabo la el procedimiento de extracción sólido-gas, en el análisis de las alquilpirazinas a partir de las soluciones patrones, se colocó en el vial 0,3 g de perlas de vidrio silanizadas (Alltech) para simular el volumen de la matriz sólida.

7.3. Muestras de Licor de Cacao

Para la realización de este trabajo se emplearon muestras de licor de cacao suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Las muestras fueron suministradas en envases plásticos herméticamente cerrados que se guardaron bajo refrigeración a 4 °C hasta su análisis.

7.4. Instrumentación

La determinación de las alquilpirazinas se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000 (con analizador de trampa de iones); un automuestreador modelo VARIAN 8200 con un carrusel para 48 viales de volúmenes de 2,0 y 0,1 mL respectivamente. Los analitos fueron introducidos en línea al sistema cromatográfico empleando un automuestreador de EC Perkin Elmer Modelo HS-40 AUTOSYSTEM conectado al cromatógrafo a través de una línea de transferencia. Los viales del automuestreador de espacio de cabeza utilizados eran de vidrio con volúmenes de 22 mL, los cuales se sellaban herméticamente con septum de silicona con revestimiento de teflón y tapas de aluminio.

Para la separación de los analitos se empleó una columna AV- WAX de sílice fundida de polietilenglicol, 30 m x 0,25 mm de diámetro con un espesor de película de 0,25 μ m suministrada por VARIAN.

7.5. Procedimiento para llevar a cabo el análisis de las Alquilpirazinas con el sistema EC-CG-EM

En un vial del EC se colocaba: 0,3 g de perlas de vidrio silanizadas y 0,6 mL de la solución de los patrones metanólicos de las alquilpirazinas, o 0,3 g de muestra de licor de cacao enriquecida con los analitos. El vial se cerraba herméticamente y se agitaba en un vortex durante 60 segundos. Posteriormente el vial se introducía en la cámara de termostatización del automuestreador de espacio de cabeza (EC) y se termostatizaba a 105 °C durante 15 min (**Tiempo de termostatización**). Al terminar la etapa de termostatización, la aguja del EC descendía hasta pinchar el septum para presurizar el vial durante 3 min (**Tiempo de presurización**). Culminada la etapa de presurización comenzaba el tiempo de muestreo (o de inyección), así, una alícuota de la fase gaseosa del espacio de cabeza fluía durante 0,08 min (**Tiempo de inyección**) hacia la columna cromatográfica. Finalmente los analitos se separaban en la columna arrastrados por el gas portador a un flujo de 1,0 mL/min y se detectaban en el EM a la salida de la misma.

8. Resultados y Discusión de los Resultados

La optimización de las condiciones experimentales del sistema EC-CG-EM se realizó por el método univariado con el fin de encontrar un buen compromiso entre una buena resolución de las pirazinas en la columna seleccionada, tiempo de análisis y sensibilidad. Para establecer las mejores condiciones se propuso:

- Optimizar las condiciones de trabajo del sistema de introducción de la muestra (EC).
- Optimizar las condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases.

- ✓ Selección de la columna cromatográfica
- ✓ Optimizar las condiciones cromatográficas de separación para la columna seleccionada.
- Optimizar las condiciones del sistema de detección.

Para llevar a cabo la optimización se utilizaron soluciones patrones de las alquilpirazinas en metanol de concentración 1,00 mg/L y muestras de licor de cacao (Ghana) enriquecidas con los analitos a la misma concentración.

8.1. Optimización del Sistema Cromatográfico

Teniendo en cuenta la estructura molecular de las alquilpirazinas, se seleccionó para su separación una columna AV- WAX de sílice fundida de polietilenglicol, 30 m x 0,25 mm con un espesor de película de 0,25 μ m suministrada por VARIAN.

Se optimizaron todos los parámetros involucrados para obtener una buena resolución y la sensibilidad necesaria para su detección como: temperatura del inyector; programa de temperatura de la columna, flujo del gas portador, modalidad de impacto electrónico, temperatura de la línea de transferencia, de la trampa y del manifold en el EM.

Los mejores resultados obtenidos fueron: temperatura del inyector de 220 °C, programa de temperatura de 50 °C (2,0min) a 70 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, luego a 120 °C (1,0 min) a 4,0 °C/min, seguidamente a 200 °C (1,0 min) a 20°C/min, y el modo de inyección splitless con un tiempo de cierre para la válvula solenoide de 0,40 min.

Así mismo, parámetros como: la temperatura de la trampa de iones, la temperatura del manifold y la temperatura de la línea de transferencia fueron establecidos en 220, 50 y 220 °C respectivamente, con el fin de asegurar la limpieza de la trampa durante las sucesivas inyecciones.

8.2. Condiciones de trabajo del EC

Se evaluó el comportamiento de la señal analítica para cada alquilpirazina en la optimización de los parámetros que se detallan a continuación:

- ❖ Temperatura de termostatización
- ❖ Tiempo de termostatización
- ❖ Tiempo de presurización
- ❖ Masa del licor de cacao
- ❖ Tiempo de inyección del espacio de cabeza en el cromatógrafo

También fue necesario seleccionar una temperatura para la línea de transferencia que conduce la muestra gaseosa desde el automuestreador a la cabeza de la columna y una temperatura para la aguja que pinchaba el septum durante las etapas de presurización y muestreo.

8.2.1. Temperatura de Termostatización

La temperatura de termostatización se varió entre 80 – 110 °C. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5. En ella se observa que a medida que aumenta la temperatura hay un incremento del área de los picos de los analitos. Este comportamiento explica el hecho de que la constante de distribución ($K_{g/s} = \frac{[\text{analito}]_{\text{fase gaseosa}}}{[\text{analito}]_{\text{fase sólida}}}$) depende de la temperatura. Al aumentar la temperatura por lo general aumenta $K_{g/s}$ de los analitos en el vial, aumentando la concentración de éstos en la fase gaseosa (o espacio de cabeza) ya que se produce un desplazamiento del equilibrio termodinámico⁽⁴³⁾. Se estableció como temperatura de termostatización 105 °C. Temperaturas superiores se consideró que debían ser evitadas porque podría existir la posibilidad de generar la reacción de Maillard en el vial, obteniendo entonces un resultado erróneo al determinar las concentraciones de las alquilpirazinas.

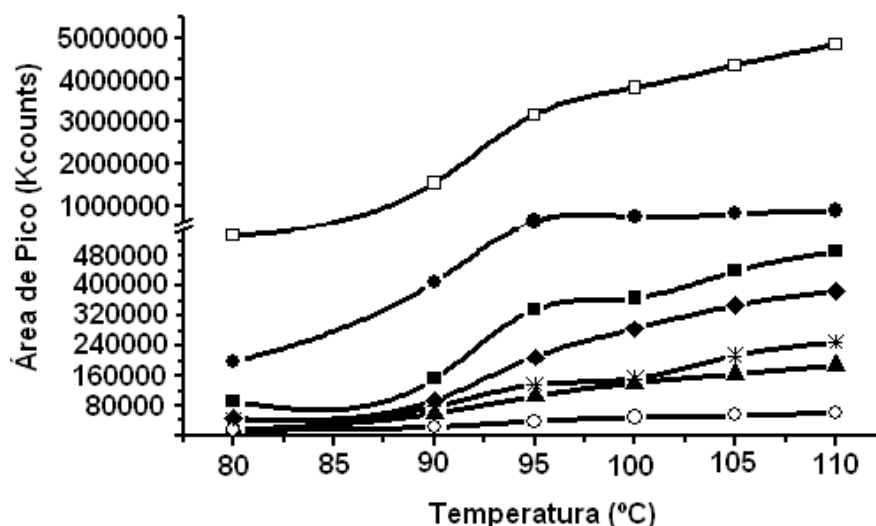


Figura 5. Efecto de la temperatura de termostatación en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6-dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3-dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao en 0,6 mL de metanol

8.2.2. Tiempo de Termostatación

El tiempo de termostatación juega un papel importante en la sensibilidad del método propuesto, ya que, como algunos autores lo afirman, un aumento en el tiempo de termostatación asegura el incremento de la concentración de los analitos en la fase gaseosa en el equilibrio. En este sentido, se varió el tiempo de termostatación entre 5 - 25 min. En la Figura 6 se presentan los gráficos obtenidos de las áreas de los picos las alquilpirazinas en función del tiempo de termostatación para una temperatura de termostatación fijada en 105 °C. Se puede observar un ligero incremento para algunas de las pirazinas en el área de pico con respecto al aumento del tiempo hasta un tiempo de 15 min. Para tiempos superiores a 15 min no se observan cambios significativos. Se fijó un tiempo de 15 min para el resto del análisis.

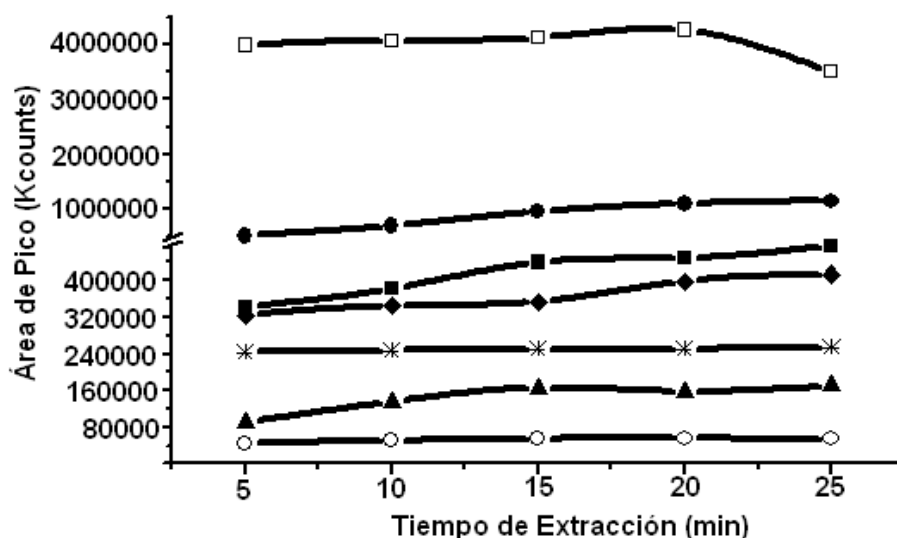


Figura 6. Efecto del tiempo de termostatación en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (•), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao a la temperatura de termostatación establecida (105 °C).

8.2.3. Tiempo de Presurización

El proceso de inyección se produce por un gradiente de presión desde el vial hacia la columna, por lo cual la presión en el espacio de cabeza debe ser mayor que la presión en la cabeza de la columna. Dependiendo de la volatilidad de los analitos, muchas veces, la presión del espacio de cabeza del vial después de la termostatación no es suficiente para que ocurra la inyección.

Es por ello, que en muchos casos es necesario presurizar el vial con un gas lo más inerte posible (nitrógeno en este caso) para aumentar la presión del espacio de cabeza. Además, la presión del espacio de cabeza influye en la forma de los picos, a mayor presión se realizará una inyección puntual mejorando la eficiencia de la separación lo que se traduce en la obtención de picos finos y simétricos.

Para ello se varió el tiempo de presurización entre 0,5 – 3,0 min. En la Figura 7 se muestran los resultados obtenidos. Se observa un incremento de la señal para la mayoría de los analitos a medida que el tiempo de presurización aumenta. Las mejores señales se obtuvieron cuando el vial se presurizaba con nitrógeno a 45 psi por 3 min.

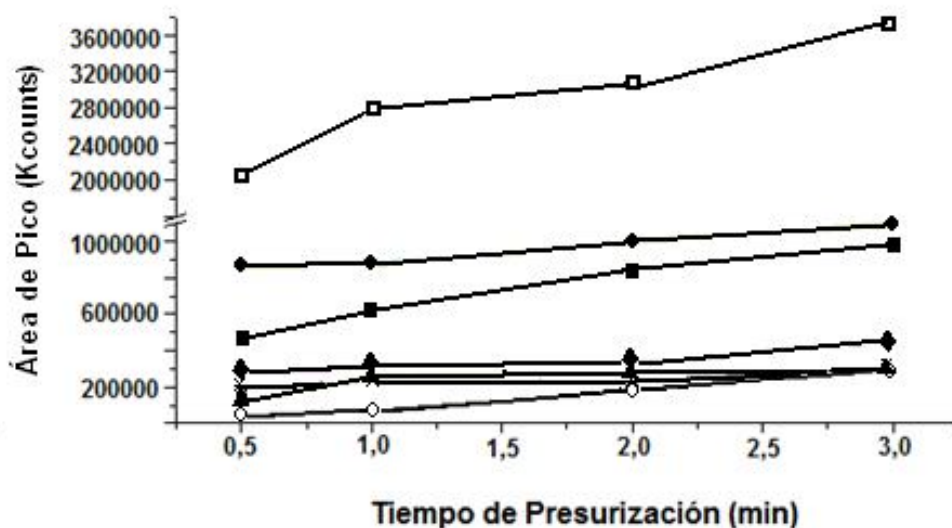


Figura 7. Efecto del tiempo presurización en la determinación de 2-metilpirazina (◆), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etipirazina (○), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao

8.2.4. Tiempo de Inyección

El volumen de inyección se establece fijando un tiempo de inyección o de muestreo. En tal sentido, se varió el tiempo de muestreo desde 0,04 a 0,1 min y se midieron las áreas de los picos de los analitos (Figura 8). Se observa un incremento del área de pico a medida que se incrementaba el volumen de inyección, sin embargo, a valores superiores a 0,08 min la señal disminuye y se observa poca reproducibilidad en la medida y picos con cola en el cromatograma. Por ello se seleccionó 0,08 min como el tiempo de inyección para el resto del análisis ya que proporcionaba la mejor eficiencia en la separación.

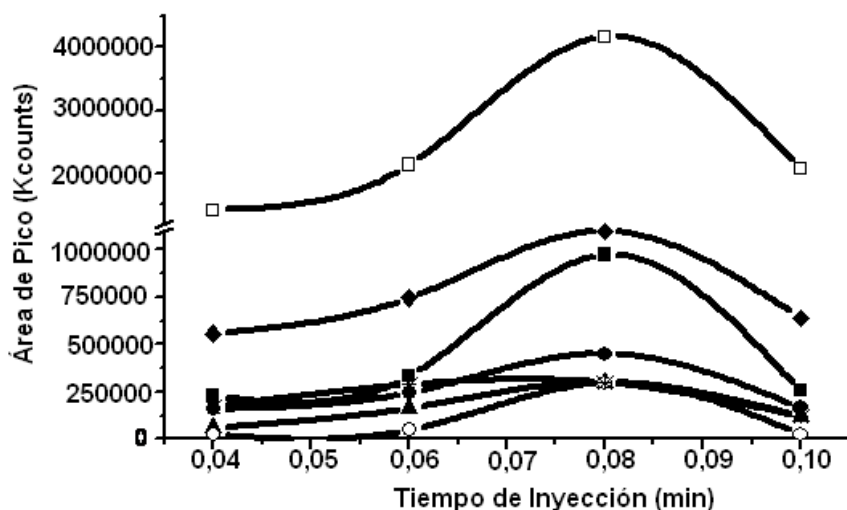


Figura 8. Efecto del tiempo de inyección en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2.5-dimetilpirazina (■), 2.6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (○), 2.3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao

8.2.5. Masa de Licor de Cacao

La sensibilidad del análisis depende del volumen de muestra que se coloca en el vial y del volumen del vial que determina el volumen del espacio de cabeza como se puede observar en la siguiente ecuación:

$$C_G = C_0 V_0 / [V_0 (K-1) + V_{EC}]$$

Donde, K es el coeficiente de partición, C_L y C_G son las concentraciones del analito en la fase líquida y gas respectivamente después del equilibrio, C_0 es la concentración original del analito en la muestra, V_0 es el volumen de la muestra y V_{EC} es el volumen del espacio de cabeza.

Si observamos la ecuación, podemos deducir que a medida que aumenta el volumen del vial, aumenta la dilución de los analitos en el espacio de cabeza. Por otra parte, aunque el volumen del vial no influye en el coeficiente de reparto (K), el hecho de aumentar el volumen de muestra permite disminuir el volumen del espacio de cabeza y así evitar la dilución de los analitos⁽⁴⁵⁾.

Para este estudio se emplearon viales de 22 mL y se estudió el volumen de muestra de licor de cacao de 0,10 – 0,40 g. En la Figura 9 se puede observar que para todos los analitos hay un aumento significativo de la señal hasta una cantidad de 0,3 g. Para valores superiores sólo en uno de los casos se observa un incremento, el resto de las alquipirazinas presentan una ligera disminución. Además, para valores superiores la señal perdía reproducibilidad. Por esta razón se seleccionó 0,3 g como el valor óptimo para llevar a cabo la determinación de alquilpirazinas en la matriz en estudio.

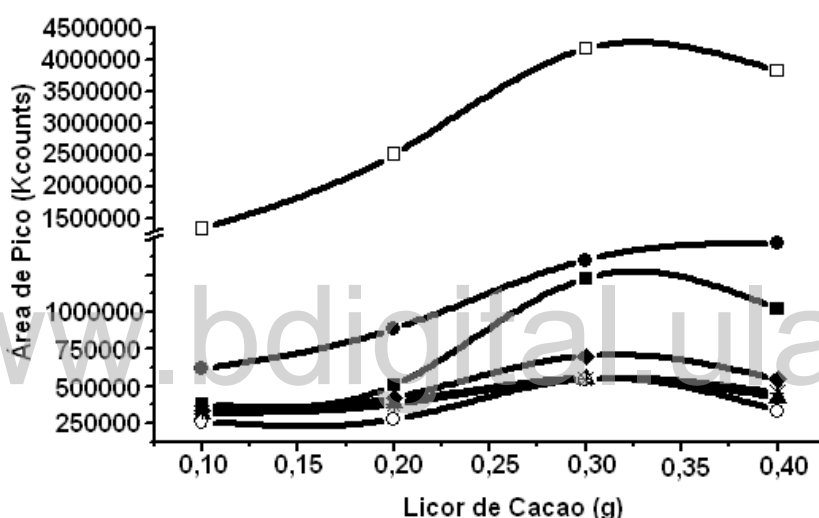


Figura 9. Efecto de la cantidad de muestra en la determinación de 2-metilpirazina (◆), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (○), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao

8.2.6.Efecto Salino

La adición de NaCl a los medios de extracción por lo general aumenta la eficacia de la extracción, ya que para la mayoría de los analitos provoca un incremento en sus coeficientes de actividad y desplaza el equilibrio de extracción⁽³⁷⁾. La magnitud de este efecto depende de la sal y el coeficiente de reparto de los compuestos estudiados. Este efecto salino también se evaluó, para ello a 0,3 g de licor de cacao en 0,6 mL de metanol, se le añadieron cantidades crecientes de NaCl en el intervalo 0,3 – 1,0 g. La Figura 10 muestra que las respuestas de la mayoría de los compuestos estudiados, no se ven afectadas por

Delgado

el efecto salino. Para el caso de la 2-metilpirazina, trimetilpirazina y tetrametilpirazina el área del pico disminuyó con el aumento de la cantidad de NaCl. Sin embargo, la influencia observada no era significativa y dado que la sensibilidad del método para todos los compuestos era muy alta no fue necesario añadir sal. Incluso sin la adición de sal el método garantiza la determinación de las pirazinas en muestras de cacao a los niveles de concentración necesarios. Por lo tanto, no se agregó NaCl para el resto de los análisis⁽¹⁷⁾.

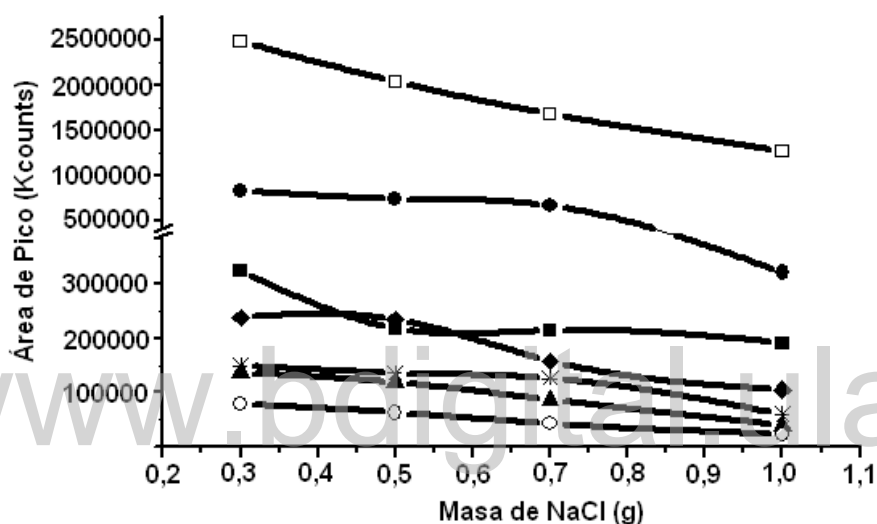


Figura 10. Efecto salino en la determinación de 2-metilpirazina (♦), 2,5-dimetilpirazina (■), 2,6- dimetilpirazina (▲) Etilpirazina (o), 2,3- dimetilpirazina (*), Trimetilpirazina (●), Tetrametilpirazina (□) 0,3 g de licor de cacao

Un resumen de las condiciones optimizadas del instrumental se muestran en la Tabla 3 y en la Figura 11 los cromatogramas obtenidos bajo estas condiciones. Se puede observar que existe una buena resolución entre los picos correspondientes a las alquilpirazinas, sin interferentes y en un tiempo de corrida satisfactorio.

Tabla 3. Condiciones optimizadas del sistema EC-CG-EM

Equipo	Parámetros	Valor
	Temperatura de Termostatación	105 °C
	Tiempo de Termostatación	15,0 min

Delgado

Automuestreador Espacio de Cabeza	Tiempo de Presurización	3,0 min
	Tiempo de Inyección	0,08 min
	Temperatura de la línea de Transferencia	120°C
	Temperatura de la aguja	120 °C
Cromatógrafo de gases	Temperatura del Inyector	220 °C
	Columna Capilar (AV-WAX) Polietilenglicol	(30 m x 0,25 mm) espesor de película 0,25 µm
	Programa de Temperatura de la columna	50 °C (2,0min) – 70 °C a (10,0 °C/min) – 120°C (1,0 min) a (4,0 °C/min) – 200 °C (10,0min) a (20 °C/ min)
	Flujo del gas portador	1,0 mL/min
	Volumen de inyección	Splitless (0,40) min
Espectrómetro de Masas	Modalidad	Impacto Electrónico
	Temperatura de la trampa	220°C
	Temperatura del manifold	50 °C
	Temperatura de la transferencia	220 °C
	Voltaje Electro multiplicador	1950V
	Corriente del filamento	20 µA

9. Validación del Método

9.1. Intervalo Lineal y Efecto de Matriz.

Para evaluar el efecto matriz en el análisis se realizaron curvas de calibración de soluciones patrones de alquilpirazinas en metanol a diferentes niveles de concentración y una curva de adición de estándar a partir de una

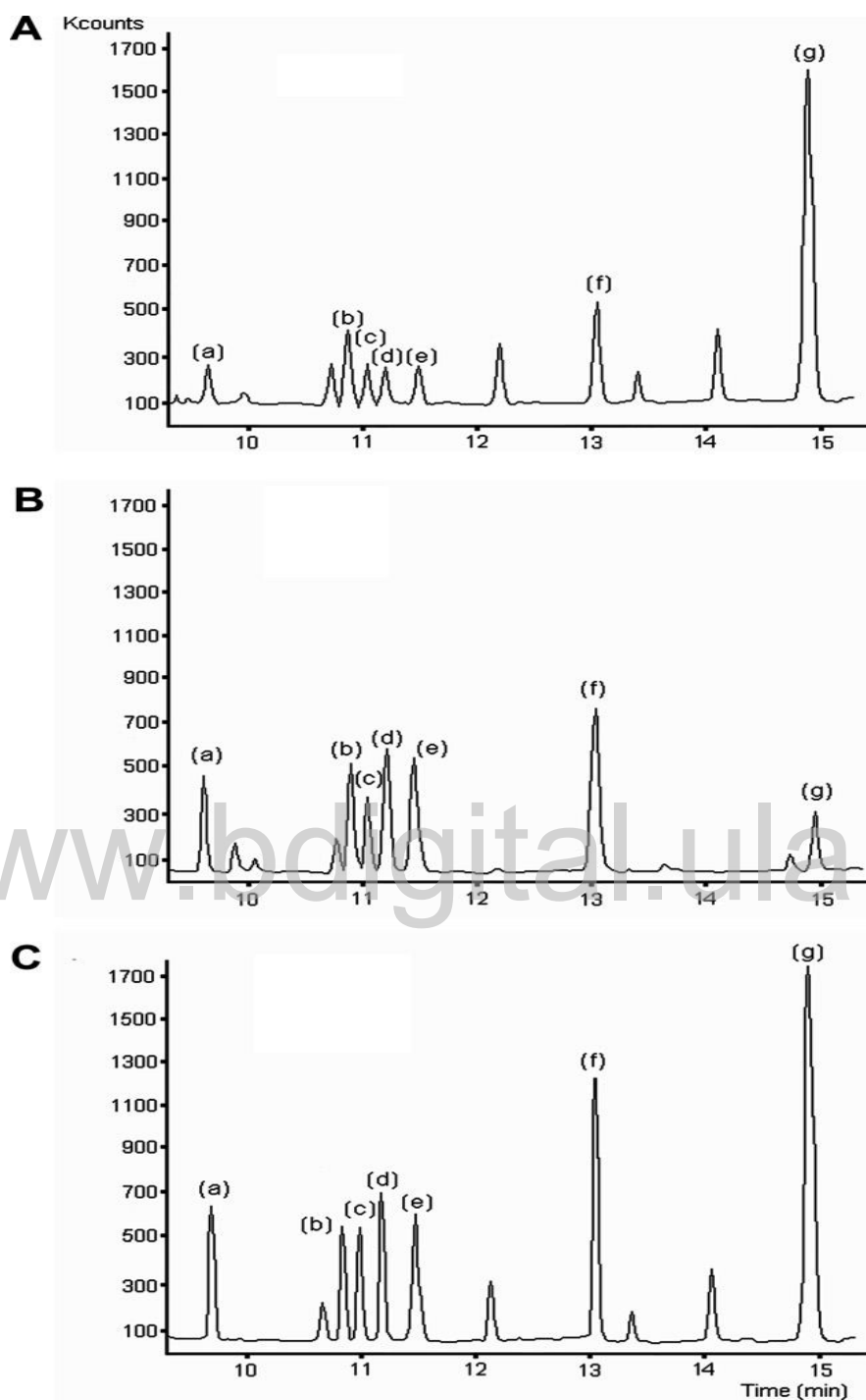


Figura 11. Cromatograma obtenido bajo las condiciones optimizadas (Tabla 3) para una (A) muestra de licor de cacao (B) solución estándar de 2-metilpirazina (a), 2,5-dimetilpirazina (b), 2,6-dimetilpirazina (c) Etilpirazina (d), 2,3-dimetilpirazina (e), Trimetilpirazina (f), Tetrametilpirazina (g) a 1,50 $\mu\text{g/ml}$ para todos los analitos, con tiempo de retención de 9.57, 10.89, 11.05, 11.34, 11.48, 13.02, 14.93, min respectivamente (C) Muestra de licor de cacao enriquecida con 1,50 $\mu\text{g/ml}$ para cada analitos

Delgado

muestra de licor de cacao de Ghana que contenía las alquilpirazinas a diferentes niveles de concentración. Cada curva de calibrado incluyó al menos una serie de seis puntos y un blanco, y se midieron un mínimo de tres veces cada uno.

En la Tabla 4 se presentan las ecuaciones de regresión lineal del área de pico de los analitos en función de la concentración ($\mu\text{g/mL}$). Las curvas de calibración son lineales para todas las pirazinas en el intervalo de concentraciones estudiado. Para todas las rectas de calibrado los coeficientes de determinación son $>0,9951$.

Tabla 4. Características analíticas de las rectas de calibrado para las alquilpirazinas y la muestras de licor de cacao en el intervalo de concentración estudiado, realizados en el sistema propuesto.

Compuesto	Matriz	Ecuación (a)	r(b)	CV (%)	Intervalo lineal ($\mu\text{g/mL}$)	L.D. ($\mu\text{g/mL}$)
2metilpirazina	Patrón	$A = 5,0 \times 10^5 C$	0,9966	3,10	0,06 - 8,00	0,02
	Cacao	$A = 4,8 \times 10^5 C + 99663$	0,9973	2,81	0,06 - 8,00	
2,5 dimetilpirazina	Patrón	$A = 6,5 \times 10^5 C$	0,9962	3,05	0,25 - 8,00	0,15
	Cacao	$A = 5,0 \times 10^5 C + 127315$	0,9986	3,24	0,25 - 8,00	
2,6 dimetilpirazina	Patrón	$A = 3,4 \times 10^5 C$	0,9986	2,42	0,10 - 3,00	0,05
	Cacao	$A = 3,2 \times 10^5 C + 28079$	0,9951	2,28	0,10 - 3,00	
etilpirazina	Patrón	$A = 2,8 \times 10^5 C$	0,9971	3,50	0,10 - 3,00	0,02
	Cacao	$A = 2,8 \times 10^5 C + 36018$	0,9953	3,23	0,10 - 3,00	
2,3 dimetilpirazina	Patrón	$A = 5,2 \times 10^5 C$	0,9992	1,84	0,25 - 8,00	0,03
	Cacao	$A = 5,2 \times 10^5 C + 57261$	0,9975	2,10	0,25 - 8,00	
2,3,5-trimetilpirazina	Patrón	$A = 6,8 \times 10^5 C$	0,9983	3,18	0,30 - 17,00	0,02
	Cacao	$A = 6,3 \times 10^5 C + 526370$	0,9961	2,71	0,30 - 17,00	
2,3,5,6-tetrametilpirazina	Patrón	$A = 5,4 \times 10^5 C$	0,9988	2,53	1,00 - 33,00	0,01
	Cacao	$A = 4,4 \times 10^5 C + 105646$	0,9967	3,28	1,00 - 33,00	

(a) Ecuación de regresión lineal, A: Área de pico, C: concentración de cada analito

Por otra parte, la comparación de las pendientes de las curvas de calibrados no mostraron diferencias estadísticamente significativas (t de student, $p = 0,05$; $n = 6$) para todos los casos. Este comportamiento permite concluir que no existe interferencia de matriz en el análisis y, de esta forma, es posible evaluar los

Delgado

niveles de alquilpirazinas en las muestras utilizando las curvas de calibrado de estándares de los analitos en metanol.

9.2. Precisión y Exactitud del Método

La precisión del procedimiento se estimó por la medición de las áreas de los picos de 5 réplicas de soluciones patrones de alquilpirazinas a diferentes niveles de concentración. Este estudio se llevó a cabo en un día y entre días para evaluar la estabilidad del sistema (Tabla 5).

Tabla 5. Estudio de precisión del método para la determinación de alquilpirazinas

Compuesto	Concentración	En un día (n=5) %C.V. ^a	Entre días (n=5) C.V. ^b %
2metilpirazina	0,25	3,10	3,38
	0,50	2,82	2,91
	1,00	1,92	2,10
	2,00	1,25	1,54
2,5 dimetilpirazina	0,25	2,84	3,25
	0,50	2,51	2,71
	1,00	2,40	2,35
	2,00	1,80	2,16
2,6 dimetilpirazina	0,20	3,24	3,53
	0,40	2,72	2,97
	0,75	2,13	2,30
	1,50	1,81	2,04
etilpirazina	0,20	3,41	3,35
	0,40	2,65	2,40
	0,75	1,90	2,21
	1,50	1,60	1,74
2,3 dimetilpirazina	0,25	2,92	3,24
	0,50	2,40	2,42
	1,00	1,72	1,70
	2,00	1,24	1,28
2,3,5-trimetilpirazina	0,50	2,20	2,48
	1,00	2,15	2,50
	2,00	1,64	1,82
	4,00	1,12	1,50
2,3,5,6-tetrametilpirazina	1,00	1,88	2,01
	4,00	1,50	1,54
	8,00	1,48	1,50
	16,00	1,20	1,16

La desviación estándar relativa de los resultados obtenidos en un día ($n=5$) y entre días fue inferior a 4% para todos los casos, asegurando así una buena estabilidad del sistema EC-CG-EM.

La exactitud del método se estimó una vez más realizando un estudio de recuperación. Para ello, se compararon las áreas de picos de los analitos obtenidas para las muestras de licor de cacao enriquecidas con las alquilpirazinas a diferentes niveles de concentración, con aquéllas obtenidas para las soluciones de patrones de los analitos en metanol al mismo nivel de concentración. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Exactitud del método

Compuesto	Concentración añadida (mg/L)	Recuperación (%)	CV. ($n=5$) (%)
2metilpirazina	0,25	95,45	2,20
	0,50	95,07	2,42
	1,00	93,04	1,88
	2,00	91,32	2,12
2,5 dimetilpirazina	0,25	101,20	2,64
	0,50	96,3 6	2,52
	1,00	96,14	0,70
	2,00	91,30	1,25
2,6 dimetilpirazina	0,20	96,74	1,28
	0,40	96,30	1,02
	0,75	101,44	1,70
	1,50	91,30	2,12
etilpirazina	0,20	95,28	3,12
	0,40	89,00	1,70
	0,75	108,84	1,32
	1,50	101,56	2,40
2,3 dimetilpirazina	0,25	101,48	2,20
	0,50	96,72	1,80
	1,00	96,50	2,32
	2,00	97,20	2,56
2,3,5-trimetilpirazina	0,50	95,01	2,80
	1,00	91,22	2,48
	2,00	95,45	2,10
	4,00	99,70	1,64
2,3,5,6-Tetrametilpirazina	1,00	92,60	3,10
	4,00	95,0 2	2,86
	8,00	99,16	3,24
	16,00	98,3 0	3,52

Los porcentajes de recuperación para todos los casos se encuentran entre 91 -101 % con un coeficiente de variación $<$ al 4 % que pueden ser considerados cuantitativos y satisfactorios. Estos porcentajes son superiores a los reportados en la literatura^(3,36) donde el tratamiento de muestra se realizó de forma manual. Adicionalmente, los resultados confirman la buena eficiencia de extracción sólido-gas realizada por el EC.

La optimización de los parámetros instrumentales de este procedimiento se realizó por el método univariado, es decir, variar un factor a la vez.

Para un sistema tan complejo donde son muchos los factores que afectan a los resultados experimentales, se necesitó evidentemente realizar un número muy importante de experiencias. Como resultado, se obtuvieron un gran número de datos que se tuvieron que interpretar con el fin de convertirlos en la información útil que buscábamos. Sin embargo, existe una herramienta que permite simplificar cada uno de los pasos requeridos para la evaluación de los resultados que es la **Quimiometría**.

La quimiometría trata, específicamente, de todos aquellos procesos que transforman señales analíticas y datos más o menos complejos, en información. Con esta herramienta se utilizan métodos de origen matemático, estadístico y otros procedentes del campo de la lógica formal para conseguir sus fines⁽⁴⁰⁾.

Permite relacionar la composición de las muestras con su calidad. Consiste en la medición de parámetros físico-químicos. Además, pueden existir una o más variables que quieran relacionarse con las variables que describen la composición por lo que, el objetivo que se persigue es la relación entre las matrices X e Y.

La relación entre matrices se establece mediante una ecuación o modelo matemático. Frecuentemente, no existen modelos que relacionen X e Y y que obedezcan a leyes bien establecidas. Por ello, los modelos que se construyen son, a menudo, modelos que se adaptan a la estructura de los datos. En ese sentido, es extremadamente importante que estos modelos sean válidos en el

campo de trabajo establecido. La validación de los modelos es pues una etapa fundamental y nunca debe obviarse en quimiometría.

- Donde y Como realizar la experiencia

A menudo, los datos registrados no son representativos del fenómeno que quiere estudiarse, no contienen suficiente variabilidad, la parte aleatoria es más relevante que la parte correspondiente a la variación sistemática o existen otras razones por las que las técnicas quimiométricas no puedan extraer información útil sobre el conjunto de datos.

Por lo tanto, se debe asegurar, que la información se encuentra efectivamente en los datos a analizar y es necesario programar con detalle las experiencias que se deben llevar a cabo.

Para ello se emplea, el diseño de experimentos que es la parte de la quimiometría que estudia dónde, cómo y cuando deben realizarse las experiencias para que contengan la información necesaria.

A continuación evaluaremos los resultados obtenidos de la optimización empleando el método univariado para determinar como influye cada parámetro con respecto a la concentración de las alquilpirazinas.

Para ello, se desarrollará un diseño experimental factorial fraccional que permitirá evaluar los resultados del procedimiento propuesto⁽⁴¹⁾.

10. Diseño Factorial

El término diseño experimental se utiliza habitualmente para describir las etapas de:

- Identificación de los factores que pueden influir en el resultado de un experimento
- Diseño de un experimento de modo que se minimicen los efectos de los factores incontrolados.
- Utilizar el análisis estadístico para separar y evaluar los efectos de los diversos factores implicados⁽⁴⁶⁾.

Delgado

En esta oportunidad se desarrollará un diseño factorial fraccional 2^{k-p} . Los factores y sus niveles se detallan en la Tabla 7.

Tabla 7. Factores estudiados y sus niveles en estudio

Factores	Nivel		Variable de Respuesta
	Bajo	Alto	
Temperatura de Termostatización (°C)	95,0	105,0	Área de Pico de las Alquilpirazinas
Tiempo de Termostatización (min)	10,0	15,0	
Tiempo de Presurización (min)	2,0	3,0	
Cantidad de muestra (g)	0,1	0,3	
Tiempo de Inyección (min)	0,06	0,08	

En base a los resultados obtenidos, se diseñó un experimento en el que los factores principales estaban orientados con las interacciones de orden 4, para poder identificar factores significativos y ahorrar experimentos. En ese sentido, puede ser suficiente un diseño de Resolución V, como es el caso de 2^{5-1} . Como resultado, se obtendrán 16 experimentos elementales que reducirá en gran proporción el hecho de llevar a cabo el experimento completo (2^5).

Tabla 8. Listado de los experimentos en orden aleatorio

	Temperatura de Termostatización (°C)	Tiempo de Termostatización (min)	Tiempo de Presurización (min)	Tiempo de Inyección (min)	Cantidad de Muestra (g)	Variable respuesta
1	105	10	3	0,08	0,1	Área para cada una de las alquilpirazina
1	95	10	2	0,08	0,1	
1	105	10	2	0,06	0,1	
1	105	15	2	0,08	0,1	
1	95	10	3	0,06	0,1	
1	95	10	3	0,08	0,3	
1	105	10	2	0,06	0,3	
1	95	15	3	0,06	0,1	
1	105	15	2	0,08	0,3	
1	95	15	2	0,08	0,3	
1	105	15	2	0,06	0,3	
1	95	15	3	0,08	0,1	
1	95	15	3	0,06	0,3	
1	105	10	2	0,08	0,3	
1	105	15	3	0,06	0,1	
1	95	10	2	0,06	0,3	

En la Tabla 8 se puede observar la matriz experimental para un diseño 2^{5-1} que consta de 16 experimentos elementales.

Analizar los resultados de un experimento factorial es igual que un análisis ANOVA multifactorial, por lo que se puede analizar como un ANOVA más. Al llevar a cabo el análisis, el Statgraphics proporciona las estimaciones de los efectos de cada factor que se resumen en la Tabla 9.

Tabla 9. Estimaciones de los efectos de cada factor estudiado

Pirazinas	Metil	2,3-dimetil	2,5-dimetil	2,6-dimetil	trimetil	Tetrametil
A temperatura de Termostatización	80203,0	201426,0	127264,0	144417,0	755484	2,12653E6
B tiempo de termostatización	22144,3	204494,0	-42000,2	52811,2	379446	-70910,1
C Tiempo de Presurización	80893,8	35871,8	-11702,8	31115,7	-26367,4	532650
D Tiempo de Inyección	-51799,6	101982,0	22463,0	67833,0	-75640,6	-9687,6
E Cantidad de Muestra	82869,5	76904,2	27860,8	-23687,7	-16540,6	564540
AB	87940,9	237422,0	50817,3	39260,3	174054	-171887,0
AC	40848,0	13836,6	123285,0	30352,9	164772,0	669264,0
AD	-4654,1	67940,6	9586,7	24178,2	180262,0	532235,0
AE	23774,8	13665,9	23109,4	-7505,9	217535,0	206688,0
BC	-22628,6	75508,4	-21882,8	25225,8	37860,6	-507797,0
BD	42973,7	75503,4	14945,6	-18267,6	250820,0	-253751,0
BE	7338,9	65565,1	-1501,2	15679,7	-140565,0	146139,0
CD	81362,1	171393,0	113972	6772,8	-119772,0	116592,0
CE	29790	14988,2	6985,8	31853,0	-76606,4	-202822,0
DE	-12346,7	48966,9	10776,2	-5914,1	144880,0	70810,8

Estos valores pueden observarse mejor a través de los gráficos de Pareto de estas estimaciones (Figura 12), que permitirán realmente reducir el número de efectos significativos a través de un análisis gráfico.

Estos gráficos indicaron que la temperatura de termostatización (A), el tiempo de presurización (C) y la cantidad de muestra (E) son las variables que afectan en mayor proporción los resultados. Por otra parte, las variables que influyen en menor proporción son el tiempo de termostatización (B) y el tiempo de inyección (D).

Otro gráfico que ayuda a discriminar entre efectos significativos y no significativos cuando no hay grados de libertad para hacer un test ANOVA es el gráfico probabilístico normal (Figura 13).

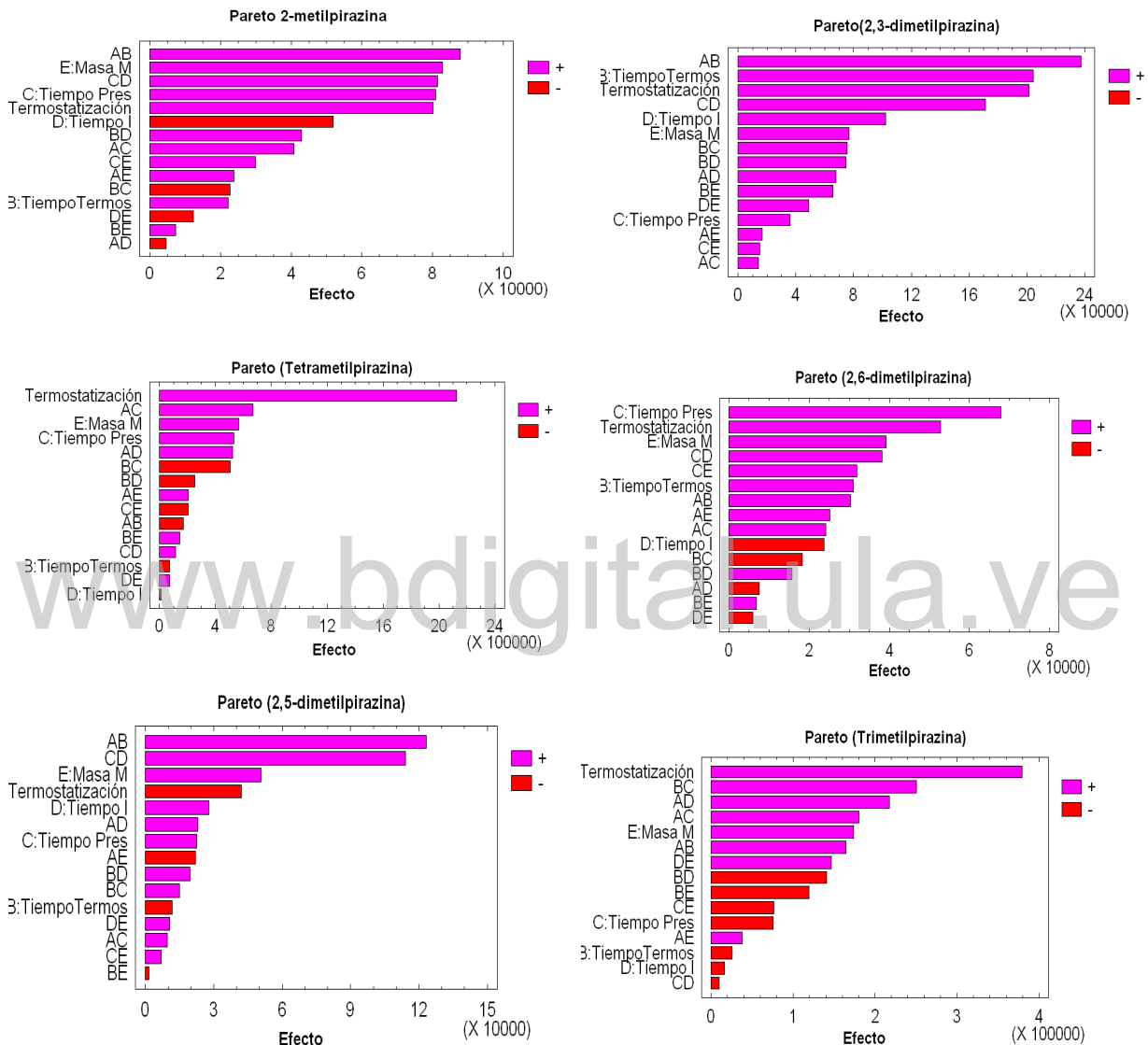


Figura 12. Gráficos de Pareto para cada una de las alquilpirazinas estudiadas.

Este gráfico está diseñado para que los efectos no significativos aparezcan alineados alrededor del 0 (cada efecto estimado está dividido por su desviación típica). Los puntos a la izquierda son los que tienen efectos (en valor absoluto)

más bajos. Además indican que los efectos más distanciados de la recta que pasa por el 0, son los más significativos.

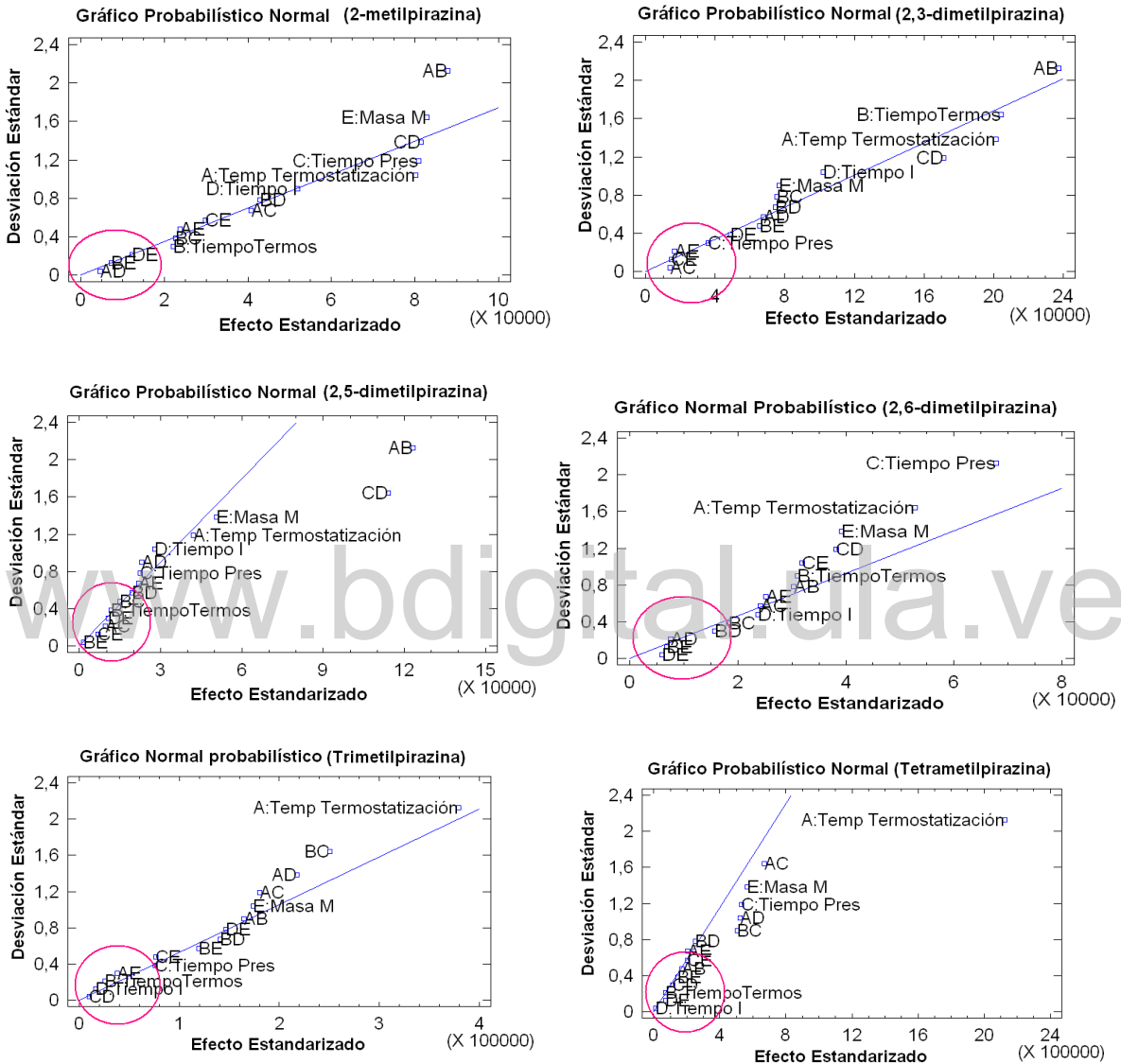


Figura 13. Gráficos Probabilístico Normal para cada una de las alquilpirazinas estudiadas

Los efectos que parecen ser los significativos, son la temperatura de termostatación (A), el tiempo de presurización (C) y la cantidad de muestra (E) y en menor proporción el tiempo de termostatación. Por lo tanto, se puede omitir

este factor, para así comenzar a tener grados de libertad que permitirán realizar el test de la tabla ANOVA.

En base a ello, se realizó el estudio de la Tabla de Anova 10 para cada una de las pirazinas, cuyos resultados se muestra a continuación:

Tabla 10. Tabla de ANOVA para la tetrametilpirazina

Tetrametilpirazina	Source Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A temperatura de Termostatización	1,49274E13	1	1,49274E13	437,46	0,0000
C Tiempo de Presurización	9,37117E11	1	9,37117E11	27,46	0,0063
E Cantidad de Muestra	4,72675E12	1	4,72675E12	138,52	0,0003
AB	8,87932E10	1	8,87932E10	2,60	0,1820
AC	1,63963E12	1	1,63963E12	48,05	0,0023
AD	9,84107E11	1	9,84107E11	28,84	0,0058
AE	4,76593E11	1	4,76593E11	13,97	0,0202
BC	9,24534E11	1	9,24534E11	27,09	0,0065
BD	2,11317E11	1	2,11317E11	6,19	0,0676
BE	5,43801E11	1	5,43801E11	15,94	0,0162
CE	6,89947E11	1	6,89947E11	20,22	0,0109

Los resultados indican que los efectos AB y BD no son significativos porque tienen un valor de P mayor a 0,05. Por ello, también pueden excluirse para minimizar el número de interacciones posibles en el caso de la tetrametilpirazina. Por otra parte es posible evaluar la gráfica de los residuales (Figura 14), donde no se aprecia ninguna anomalía clara que haga dudar de que las condiciones del modelo no se cumplan.

Para el caso de la 2-metilpirazina, luego de eliminar el efecto de interacción del tiempo de termostatización y las interacciones correspondientes (BC, BD y BE) debido a que estas variables tienen valores de $P > 0,05$, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 11.

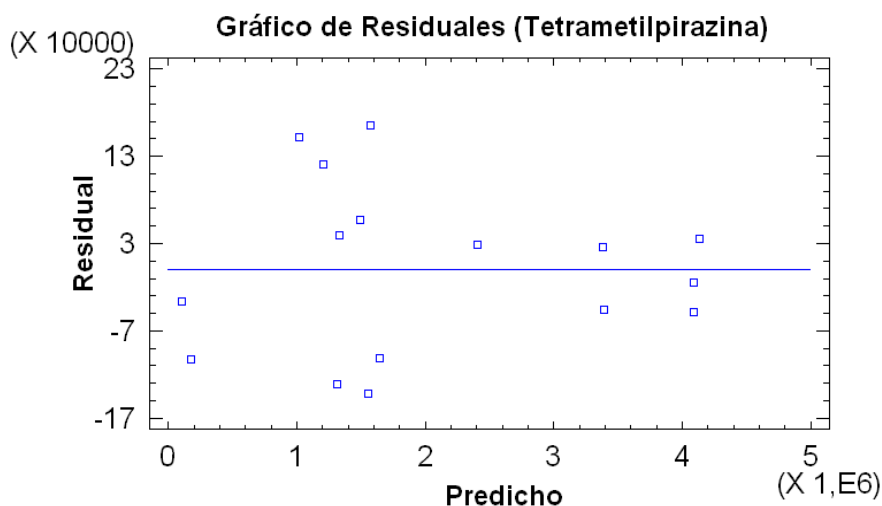


Figura 14. Gráfico de Residuales para la Tetrametilpirazina

Tabla 11. Tabla de ANOVA para la 2-metilpirazina

2-Metilpirazina	Source Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A temperatura de Termostatización	2,03088E10	1	2,03088E10	7,13	0,0320
C Tiempo de Presurización	2,06683E10	1	2,06683E10	7,26	0,0309
E Cantidad de Muestra	9,60017E10	1	9,60017E10	33,72	0,0007
AB	2,85092E10	1	2,85092E10	10,01	0,0158
CD	2,7928E10	1	2,7928E10	9,81	0,0166
CE	1,36365E10	1	1,36365E10	4,79	0,0448

Se puede observar que las interacciones más significativas son A, C y E. Por otra parte, en el gráfico de residuales que se muestra en la Figura 15 se observa el mismo comportamiento que para la tetrametilpirazina.

Con respecto a la 2,3-dimetilpirazina los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 12 y el gráfico de residuales en Figura 16.

Resultados similares se obtienen para las otras alquilpirazinas, donde se observa que la Temperatura es el factor más importante, ya que es el parámetro que contribuye en mayor proporción a alcanzar el equilibrio termodinámico entre la fase sólida (licor de cacao) y la gaseosa (espacio de cabeza). Por otra parte, el tiempo de presurización es otra variable significativa, ya que, contribuye

enormemente a llevar a cabo una inyección puntual mejorando la eficiencia y selectividad en los resultados.

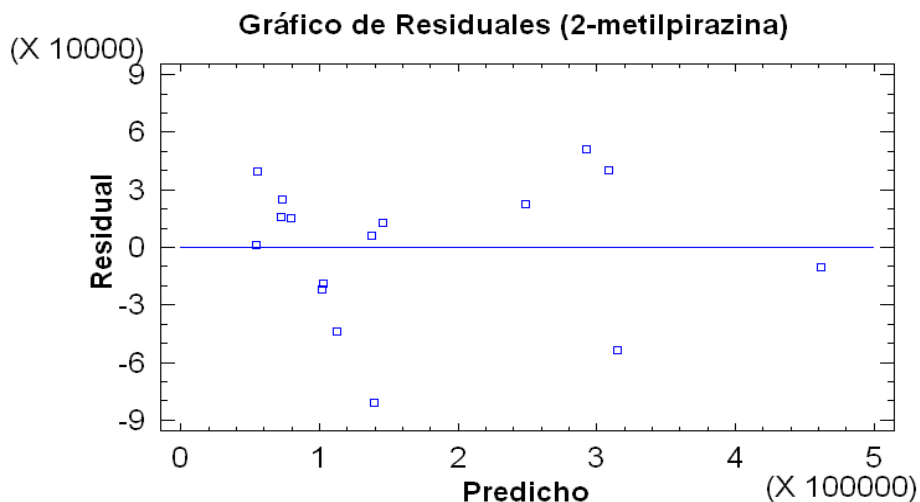


Figura 15. Gráfico de Residuales para la 2-metilpirazina

Tabla 12. Tabla de ANOVA para la 2,3-dimetilpirazina

2,3 dimetilpirazina	Source Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A temperatura de Termostatización	1,43068E11	1	1,43068E11	73,89	0,0033
B tiempo de termostatización	1,36933E11	1	1,36933E11	70,72	0,0035
C Tiempo de Presurización	2,82157E9	1	2,82157E9	14,46	0,0139
D Tiempo de Inyección	3,47392E10	1	3,47392E10	17,94	0,0241
E Cantidad de Masa	9,42053E10	1	9,42053E10	48,65	0,0060
AB	2,32933E11	1	2,32933E11	120,30	0,0016
BC	2,60817E10	1	2,60817E10	13,47	0,0350
BD	2,54419E10	1	2,54419E10	13,14	0,0361
BE	7,01706E10	1	7,01706E10	36,24	0,0092
CD	1,07711E11	1	1,07711E11	55,63	0,0050
DE	2,66923E10	1	2,66923E10	13,79	0,0340

Con respecto a la cantidad de muestra es un parámetro significativo, debido a que al aumentar éste, se disminuye el espacio de cabeza y se evita la dilución de los analitos en el espacio de cabeza, mejorando la sensibilidad del método.

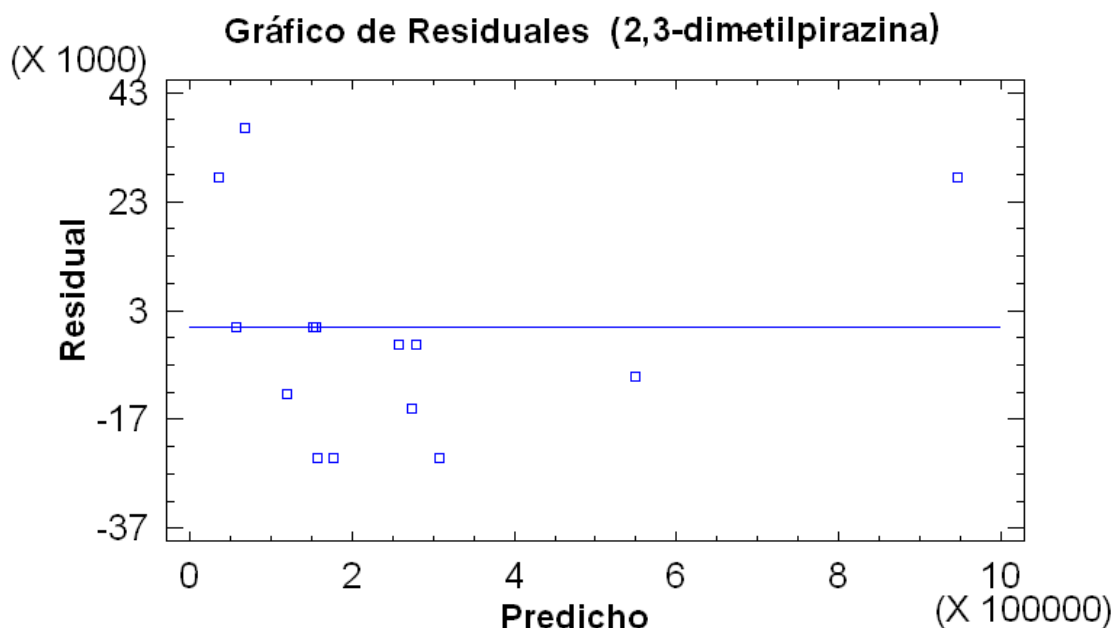


Figura 16. Gráfico de Residuales para la 2,3-dimetilpirazina

Es importante señalar que el tiempo de termostatización en esta oportunidad no proporcionó un efecto tan significativo como las otras variables. Esto puede deberse al hecho de que las alquilpirazinas son compuestos que se volatilizan rápidamente y se requiere de poco tiempo para alcanzar el equilibrio termodinámico, siempre y cuando se cuente con la temperatura de termostatización adecuada para extraer a los analitos de la matriz

Finalmente, el estudio quimiométrico confirmó que los valores óptimos para llevar a cabo el análisis, eran: una temperatura de termostatización de 105°C, con un tiempo de presurización de 3,0 min y 0,3 g de cantidad de muestra. Estas 3 variables son las que determinan significativamente los resultados obtenidos en este estudio.

11. Muestras Reales

Utilizando el método desarrollado se analizaron 120 muestras de cacao suministradas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) de la ciudad de Mérida, Venezuela.

Estas muestras de cacao fueron sometidas a diferentes tiempos de fermentación y a las temperaturas de torrefacción de 110 y 145 °C para los cacaos criollos, trinitarios y forasteros respectivamente (Tabla 13). El tiempo de torrefacción se varió de 10 a 30 min. Las muestras fueron tratadas de acuerdo al procedimiento descrito en este trabajo y se analizaron con el método propuesto para determinar el contenido de las alquilpirazinas

Los resultados obtenidos se evaluaron estadísticamente utilizando el programa Stargraphics Plus versión 5.0 con el fin estudiar su comportamiento.

En ese sentido, se realizó un estudio comparativo del contenido de alquilpirazinas entre cacaos criollos, forasteros y trinitarios, con el fin de determinar si existe discriminación entre variedades. Para ello se utilizaron dos herramientas estadísticas: el diseño experimental multifactorial y el análisis multivariado.

Tabla 13. Muestras de Cacao suministradas por el (INIA)

Variedad	País de origen	Año	Ciclo y Fermentación	Nombre
Criollo	Venezuela	2002-2004	I,II Ciclo y I, II fermentación	Criollo Mérida Zea Criollo Mérida San Juan Guasare Porcelana
			I,II Ciclo y I, II fermentación	
			I,II Ciclo y I, II fermentación	
			I,II Ciclo y I, II fermentación	
		2002-2003	I Ciclo y I fermentación	Pedregal producción propia
Trinitario	Venezuela	2004	---	Chuao
		2003-2004	I,II Ciclo y I, II fermentación	ICS – 1
Forastero	Venezuela	2003	---	Carioca Río Caribe
		2003-2004	I,II Ciclo y I, II fermentación	Pedregal Sur del Lago
		2002	---	Yaguaraparo Premiun
	Trinidad y Tobago	2003-2004	---	IMC – 67
		2004	--	Ghana

11.1. Análisis Multivariado

Para determinar la significancia de las variables se utilizan técnicas tales como: el *análisis de componentes principales*, *análisis por factores*, *análisis de regresión* y *análisis de correlación*. Para establecer la relación entre individuos o unidades experimentales se emplea el *análisis discriminante*, *por agrupación*, *multivariado de varianza*, entre otros.

Estas técnicas fueron aplicadas para las concentraciones de las pirazinas en el licor de cacao, como variable de respuesta a fin de evaluar la clasificación entre variedades. De esta forma, se podría establecer las muestras representativas de cada variedad y así realizar una comparación entre ellas.

Los cacaos criollos involucrados en este trabajo, son los conocidos como *antiguos*, cuyo cultivo se sitúa hacia la zona sur occidental de Venezuela y su relevancia radica, en el hecho de que son los de mayor pureza del país, razón por la cual se clasifican como los más finos a nivel mundial.

En la Tabla 13 se observa que hay una gran cantidad de muestras para el cacao criollo con respecto a las otras variedades, por ello inicialmente se realizó el estudio para esta variedad. La idea era poder establecer si había alguna diferencia significativa entre los criollos para seleccionar aquel que fuera representativo de esta variedad para realizar el estudio discriminante entre todas las variedades.

Para ello se realizó un estudio de análisis discriminante para las muestras de cacao criollo, para determinar si existía influencia de alguna de las variables establecidas, como período de cosecha y/o fermentación entre los mismos. (Figura 17 y 18).

Los resultados mostraron (Figura 17 y 18) que tanto Guasare como Mérida San Juan no presentaban variabilidad con respecto a la concentración de las alquilpirazinas. Sin embargo, Porcelana y Pedregal presentaban cierta variabilidad que podría ser atribuida por un lado al hecho de que Porcelana no posee un manejo agronómico controlado. Para el caso del Pedregal a su tendencia a la hibridización (cruce con trinitario), que afectaría la concentración de alquilpirazinas presentes por no ser un criollo puro.

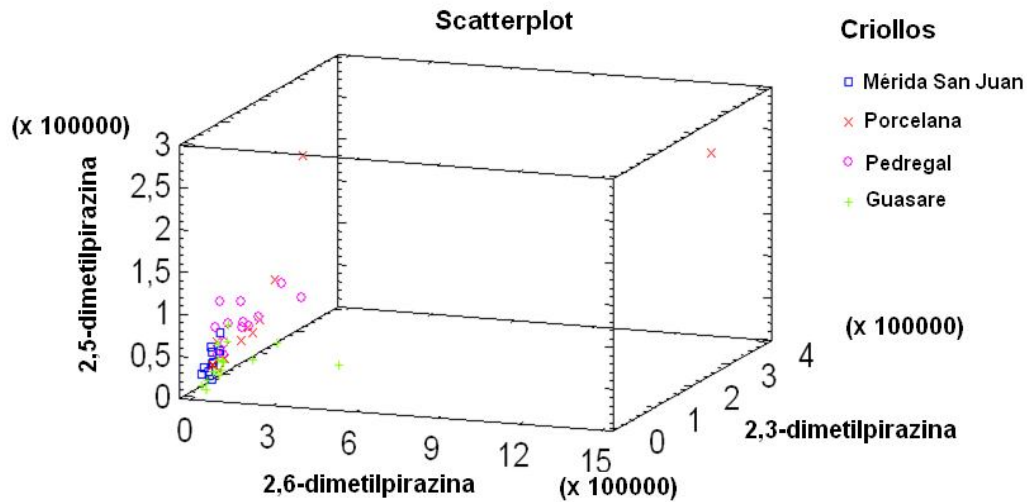


Figura 17. Relación de discriminación entre cacaos criollos en función de su contenido de dimetilpirazina

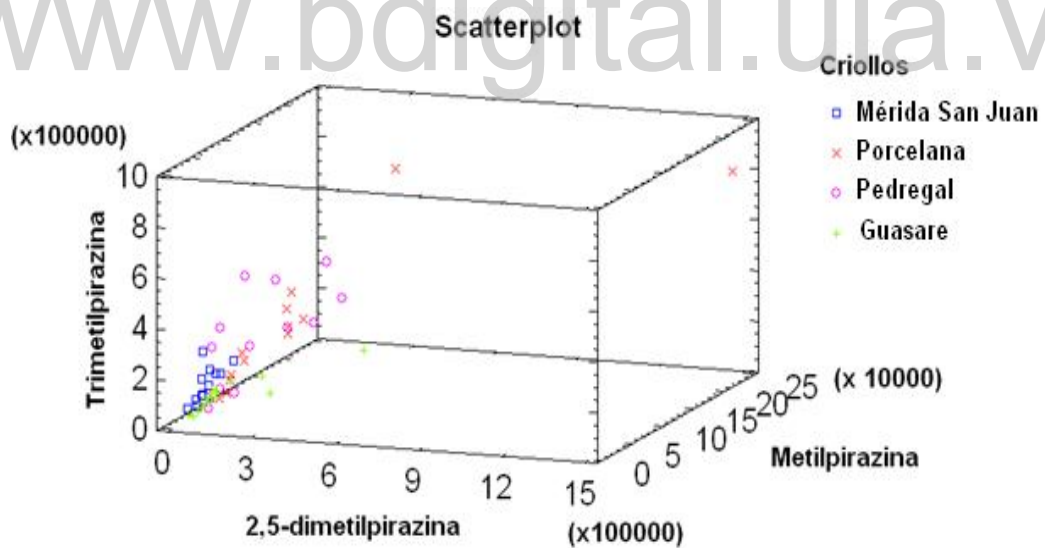


Figura 18. Relación de discriminación entre cacaos criollos en función de su contenido de dimetil, trimetil y metilpirazinas

Por lo tanto, para llevar a cabo el estudio entre variedades, se seleccionaron Guasare y San Juan en representación de los cacaos criollos.

11.2. Análisis de Componentes Principales

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Este estudio, se realiza con la finalidad de determinar cuáles son las variables que poseen mayor influencia en la clasificación del cacao de acuerdo a su variedad, con respecto a la concentración de las alquilpirazinas.

Los resultados obtenidos del análisis de componentes principales se muestran en la Tabla 14. En ella se observan los autovalores de cada componente principal, la proporción de varianza para cada una de ellos y la varianza acumulada. Los datos de varianza son muy importantes debido a que indican cuáles son los componentes principales.

Tabla 14. Análisis de componentes principales

Número de componentes	Autovalor	% de Varianza	Varianza acumulada
1	4,69552	67,079	67,079
2	1,23419	17,631	84,710
3	0,480804	6,869	91,579
4	0,300006	4,286	95,865
5	0,182932	2,613	98,478
6	0,0618933	0,884	99,362
7	0,0446549	0,638	100,000

En este caso, se extraen 2 componentes principales, y con ellos se explica el 84,710% de la variabilidad de los resultados. Al estudiar la correlación de ambos componentes principales con respecto a cada variedad, se observa que ambos componentes tienen una correlación positiva con los cacaos forasteros y trinitarios, más no con los criollos, con los cuales en todos los casos tiene correlación negativa. Este comportamiento se presenta en el gráfico de la Figura

19. En ella se observa una consistencia de los resultados entre los cacaos criollos, lo que no sucede con las otras variedades.

Sin embargo, estos resultados no arrojan un parámetro adecuado para la discriminación entre las variedades y por ello, se realizó también un análisis discriminante.

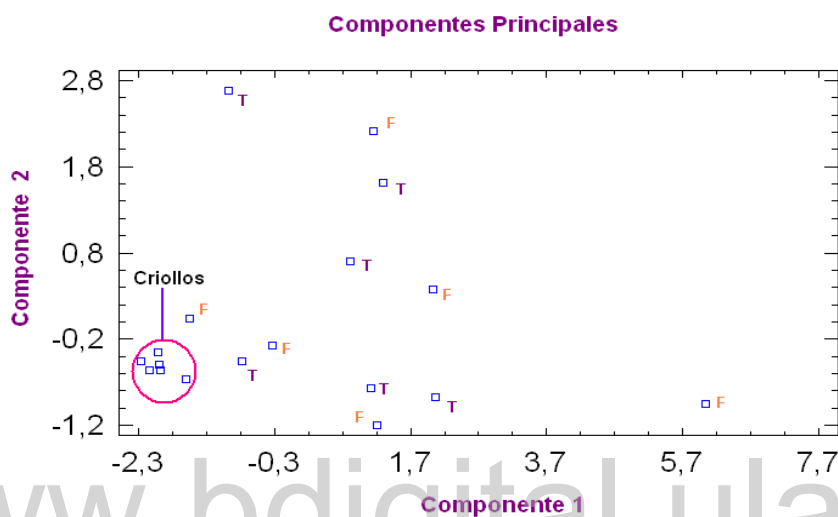


Figura 19. Gráfico de componentes principales

11.3 Análisis Discriminante para las diferentes variedades de cacao

Este procedimiento es diseñado para distinguir entre dos o más grupos de datos basados en un conjunto de variables cuantitativas observadas. Este análisis permitiría describir los casos observados de una manera tal que los separe en grupos tan bien como sea posible

Para ello se realizaron estudios entre las diferentes alquilpirazinas que permitieran discriminar entre las diferentes variedades. En la Figura 20 se presenta el gráfico de los resultados. En ella podemos observar que la etilpirazina está ausente en el cacao criollo, mientras que en los cacaos forateros y trinitarios se encuentra a diferentes niveles de concentración. Este comportamiento persiste cuando se comparan los niveles de la etilpirazina con las otras pirazinas estudiadas.

El resultado es muy interesante ya que la ausencia de la etilpirazina podría ser entonces un parámetro químico que permitiría discriminar entre el cacao criollo y las otras variedades.

Por otra parte, para las otras variedades (forastero y trinitario) no se observa un grupo definido que permita discriminar entre ellas.

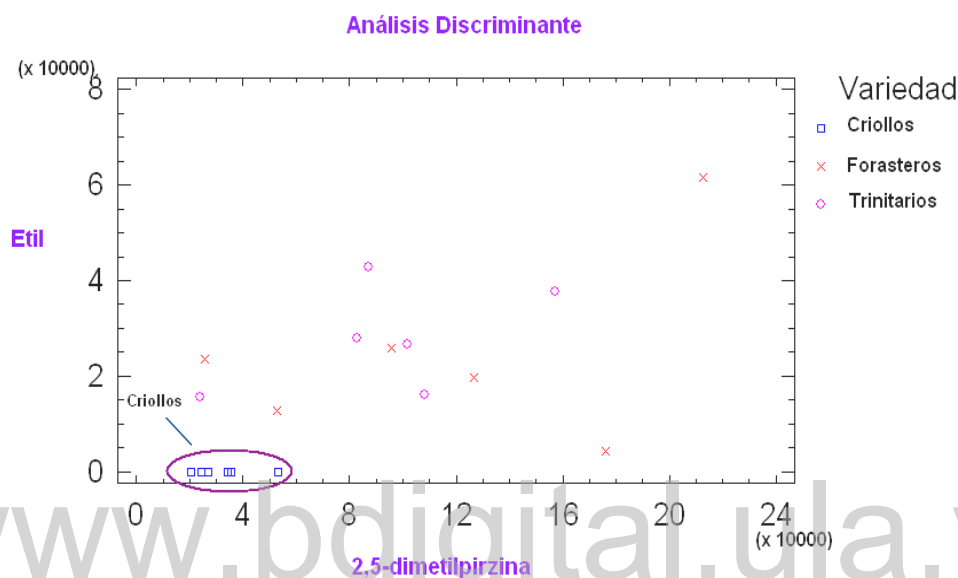


Figura 20. Relación de discriminación entre variedades de cacao en función del contenido etil y 2,5-dimetilpirazina

Adicionalmente, se realizó el mismo estudio para el resto de las alquilpirazinas estudiadas con el fin de establecer si existía alguna discriminación entre éstas en las diferentes variedades de cacao. Los resultados se muestran en las Figuras 21 y 22. En los gráficos no se visualiza una discriminación importante de las variedades de cacaos con respecto a la concentración de alquilpirazinas. Este comportamiento indicaría que en este caso la variabilidad en las muestras pudiera estar influenciada por otros factores no controlados.

Las funciones discriminantes son combinaciones lineales de las variables que también permiten separar los datos en diferentes grupos. Al representar gráficamente la trimetilpirazina y la tetrametilpirazina en un gráfico de funciones discriminantes se puede observar que la primera función separa los cacaos

criollos del resto del grupo. Mientras que para las otras variedades se observa una gran dispersión (Figura 23).

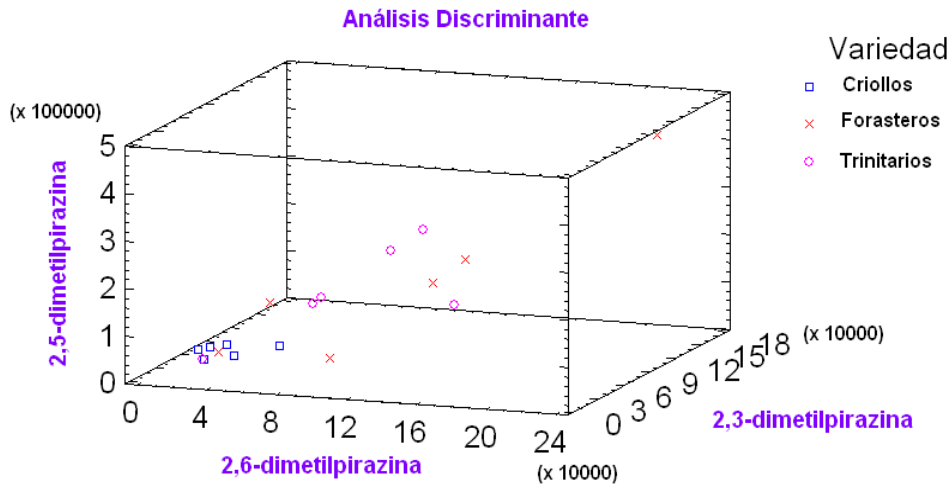


Figura 21. Relación de discriminación entre las diferentes variedades de cacao en función de su contenido de dimetilpirazina

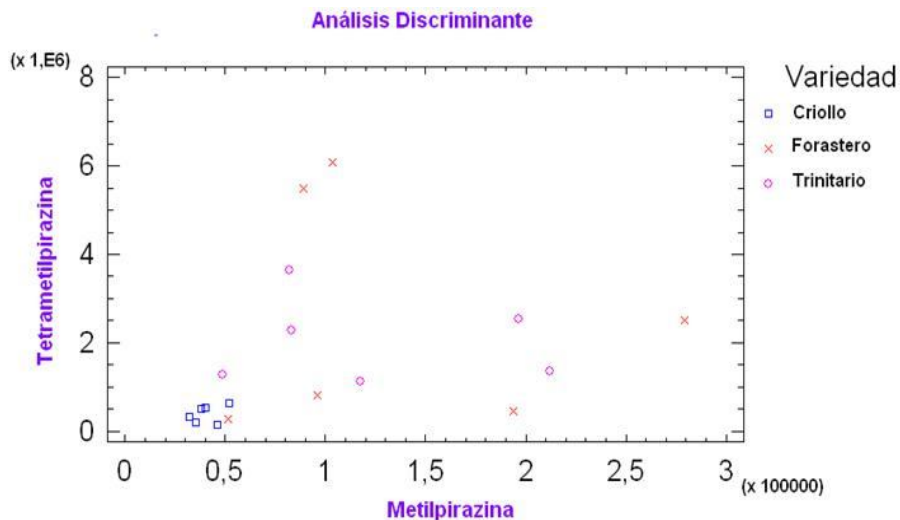


Figura 22. Relación de discriminación entre las diferentes variedades de cacao en función de su contenido de tetrametilpirazina y metilpirazina

Este gráfico puede servir de ayuda en el momento de determinar que variedad representa el cacao estudiado ya que discrimina al menos la variedad criolla del resto de las variedades.

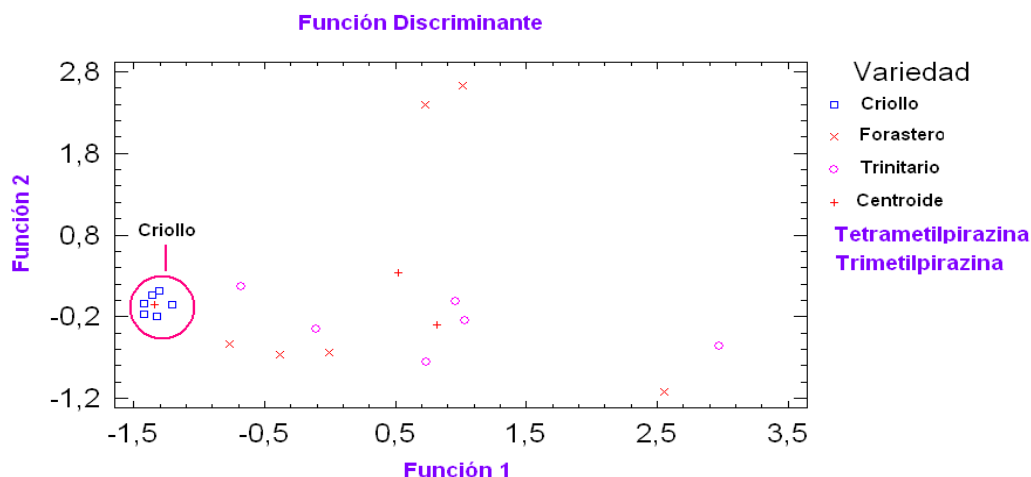


Figura 23. Gráfico de Funciones discriminantes para la tetrametilpirazina y la trimetilpirazina

Otro estudio importante fue el de establecer el comportamiento de las alquilpirazinas a medida que se incrementaba el tiempo de torrefacción de 20 a 30 min para las diferentes variedades de cacao. Para ello, se utilizó un diseño experimental multifactorial. Los resultados se muestran en la Figura 24. En ella se puede observar que la tendencia general fue a un incremento del área de pico de de las alquilpirazinas a medida que aumentaba el tiempo. También se observa una mayor tendencia para la tri- y tetra metilpirazinas mientras que para el resto de las alquilpirazinas la tendencia fue mucho menor. Sin embargo, para un tiempo de torrefacción de 20 min se nota que las diferencias en el área de pico para todas las alquilpirazinas no es muy significativa por lo que se consideró que este tiempo de torrefacción podría ser suficiente para su formación. Es importante señalar que estos resultados deben confirmarse con un estudio paralelo donde se evalúen las propiedades organolépticas de dichos licores de cacao para poder establecer así cual es la influencia de las alquilpirazinas en el sabor y aroma a chocolate.

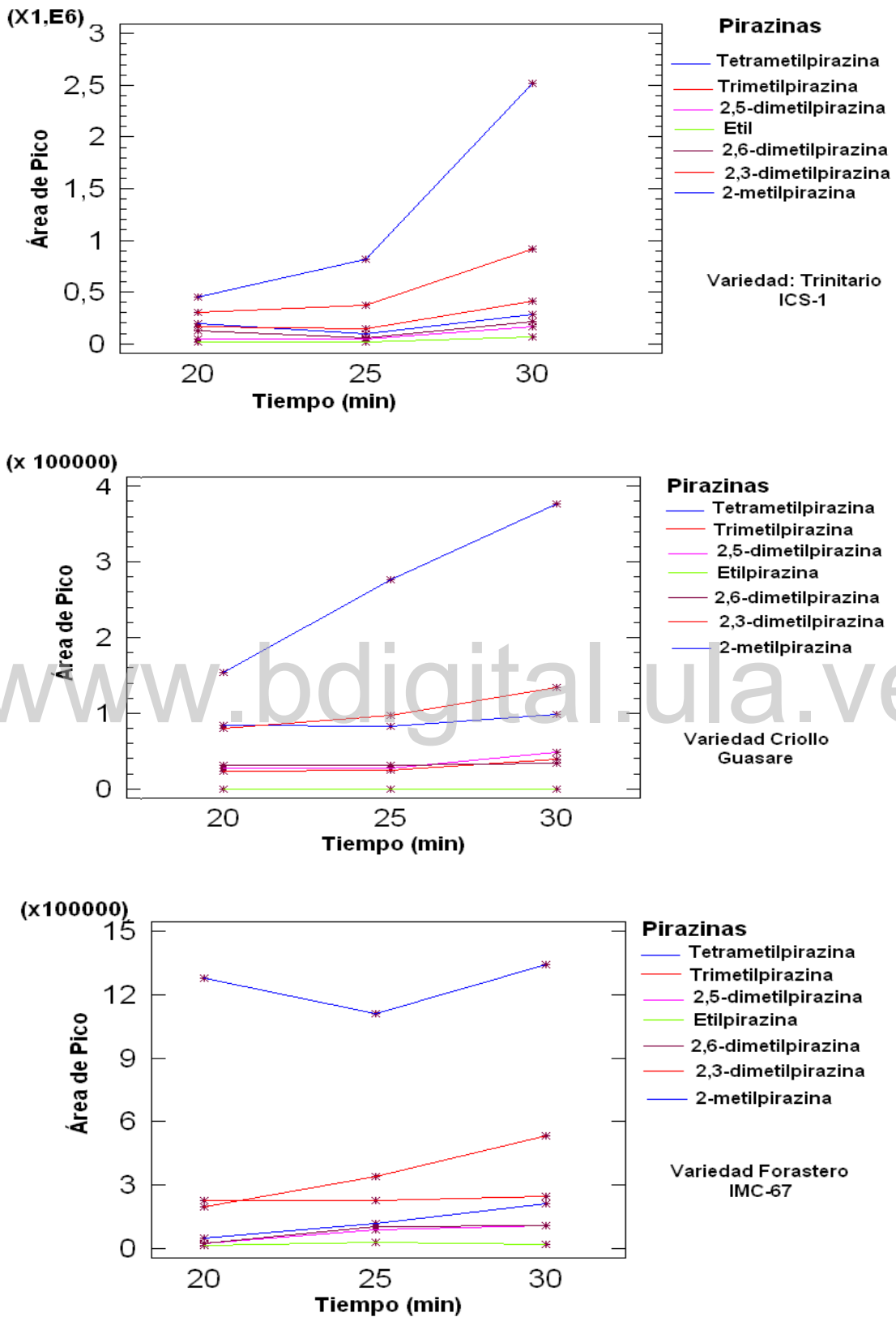
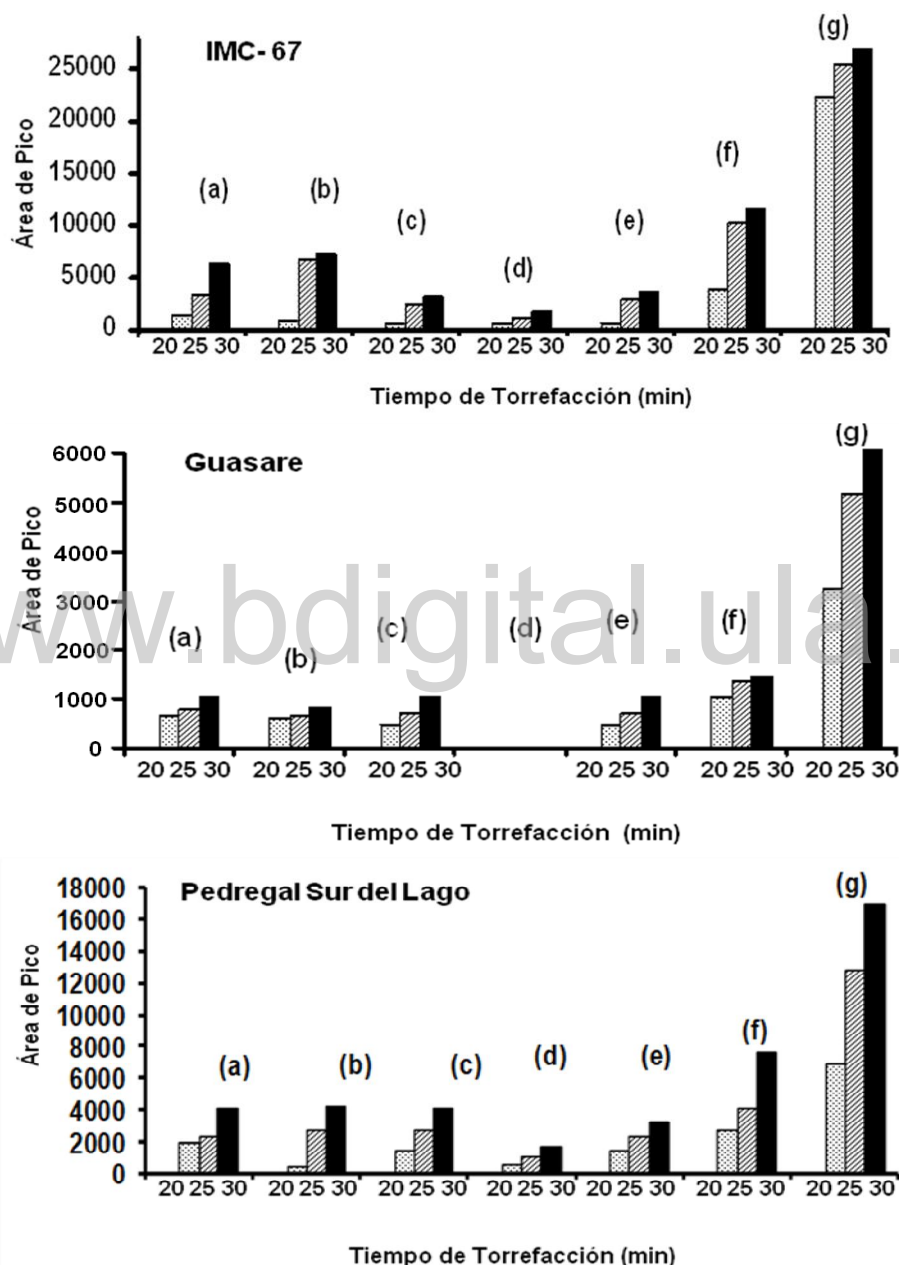


Figura 24. Estudio del tiempo de torrefacción para las diferentes variedades de cacao

Estos resultados se representaron también en un gráfico de barras donde se observa la misma tendencia, la tetrametilpirazina es la que se encuentra en mayor proporción. Por otra parte la etilpirazina es la que se encuentra en menor proporción y ausente en los cacaos criollos (Figura 25).



*área de pico (x10² Kcounts)

Figura 25. Estudio del tiempo de Torrefacción 2-metilpirazina (a), 2,5-dimetilpirazina (b), 2,6-dimetilpirazina (c) Etilpirazina (d), 2,3-dimetilpirazina (e), Trimetilpirazina (f), Tetrametilpirazina (g)

12. Conclusiones

El método propuesto evidencia que se pueden evaluar las pirazinas con exactitud y precisión en muestras de cacaos utilizando el sistema automuestreador de espacio de cabeza-cromatografía de gases-espectrofotómetro de masas (EC-CG-EM).

➤ La columna seleccionada permitió la separación de las pirazinas con una buena selectividad y eficiencia en un tiempo de análisis inferior al reportado en la literatura⁽¹⁷⁾.

➤ La técnica de espacio de cabeza permite realizar una extracción sólido-gas de los analitos objeto de estudio desde la muestra de cacao con un mínimo de interferencias.

➤ Las recuperaciones de los analitos a los diferentes niveles de concentración desde las muestras de licor indican que el proceso de extracción llevado a cabo a través de la técnica de espacio de cabeza es cuantitativo.

➤ El hecho de poder utilizar un automuestreador de EC permite realizar la etapa de tratamiento de la muestra simultáneamente con la etapa de separación de los analitos de la inyección previa, aumentando la frecuencia de análisis a 4 muestras/hora.

➤ Los resultados del estudio quimiométrico mostraron que se puede disminuir el número de experimentos realizados para la optimización del sistema instrumental, empleando las variables que presentan efectos significativos sobre los analitos de interés, como la cantidad de muestra, la temperatura de termostatación y el tiempo de presurización.

➤ Al llevar a cabo la evaluación estadística de los resultados fue posible determinar a través del análisis discriminante que la relación trimetilpirazina – tetrametilpirazina permitía distinguir a los cacaos criollos de las otras variedades.

➤ La ausencia de la etilpirazina en los cacaos criollos podría ser un parámetro que permitiría discriminar entre éstos y las otras variedades estudiadas.

➔ En las muestras de licor de cacao, se observó un aumento de las concentraciones de alquilpirazinas a medida que se incrementa el tiempo de torrefacción.

13. Bibliografía

- (1) Cros, E. **Factores condicionantes de la calidad del Cacao**. Memorias del Primer Congreso Venezolano del Cacao y su Industria. pp. 16-32. 2002
- (2) Lovera, J. R. **El cacao en Venezuela una historia**. 1^{era} Edición. Editorial Chocolates El Rey, C.A. Caracas, Venezuela. 2000, 17-29.
- (3) Barel, M. Leon, D. Vincent, J. **Influence du Temps de Fermentation du Cacaco Sur la Production des Pyrazines du Chocolat**. Café Cacao Thé. Vol XXIX, 4, 277-286. 1985.
- (4) Urquhart, D. **Cacao**. 1^{era} edición. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. Turrialba-Costa Rica. Capítulo 1. 1-18, 1963.
- (5) Wakao, H. **Estudio de la variación del contenido de alcaloides en cacao (*Theobroma cacao* L.) de producción nacional durante el proceso de beneficio**, Tesis: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Quito, 2-3, 2002.
- (6) <http://www.monografias.com>. Historia del Cacao.
- (7) Hunter, J. R. **The Status of Cacao (*Theobroma cacao*, *sterculiaceae*)**. The Western hemisphere. Economic Botany 44, 4:425-439. 1990.
- (8) Braudeau, J **El Cacao, Técnicas Agrícolas y Producciones Tropicales**. 1^{era} Edición, Editorial Blume, Barcelona, España, 1970, 9-27, 185-213.
- (9) Reyes, H. Carriles de Reyes, L. **El Cacao en Venezuela. Moderna Tecnología para su Cultivo**. Editorial Chocolates El Rey, C.A. Caracas, Venezuela. 2000, 17-29.

- (10) Cartay, R. y Ramos, G. **El cacao en Venezuela y sus perspectivas en el mercado internacional**. Agenda cacao, CONICIT-ULA-INIA. Proyecto N° 96001539, 2001.
- (11) Riegel, L. **Curso Manejo Postcosecha del Cacao**. Caucagua, Estado Miranda, Venezuela. 1-50, Mayo 2000
- (12) Clapperton, J. **Assessment of Cocoa Flavour and Fat Content. Proceeding on International Workshop o Conservation and Utilization of Cocoa Genetic Resource. In the 21st Century**. Cocoa Research Unit, University of the West Indies, 1993.
- (13) Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). **Manual del Cultivo de Cacao**. Manual N° 25 125-132. 1993
- (14) **Cocoa**. Encyclopedia of food Science, 1994.
- (15) Straten, V. **Cocoa. Volatile Components in Food**. 5^{ta} edición . División for Nutrition and Food Research, TNO, Zcist, 71. 1983.
- (16) Flament, I. **Coffe, Cocoa and Tea. Volatile compounds in food and berevages**. New York, 617. 1991.
- (17) Pini, G. Brito, E. Garcia, N. Valente, A. Augusto, F. **A Headspace Solid Phase Microextraction (HS-SPME) Method for the Chromatographic Determination of Alkylpyrazines in Cocoa Samples**. J Braz. Chem. Soc. 15 (2), 267. 2004.
- (18) Takken, H. Van der Linde, L. Boelens, M. Van Dort, J. **Olfactive Properties of a Number of Polysubstituted Pyrazines**. J. Agric. Food Chem. 23 (4), 638, 1975.
- (19) Ostovar, K. Keeney, P. **Isolation and Characterization of micro-organisms Involved in the Fermentation of Trinidad Cacao beans**. J. of Food Science, 38 (4), 611, 1973.
- (20) Rizzi, P. **A Mechanistic Study of Alquilpyrazines Formation in Model Systems**. J. of Agricultural and Food Chemistry, 20 (5), 1081. 1972.
- (21) Koehler, P. Mason, M. Newell, J. **Formation of Pyrazine Compounds in Sugar-amino acid Model System**. J. Agric. Food Chem. 17 (2), 393. 1969.

- (22) Vernin, G. **Récents Progrès dans les Arômes Alimentaires : le rôle des Hétérocycles**. Industries Alimentaires et Agricoles. 97 (5), 433, 1980.
- (23) Arnoldi, A. Arnoldi, C., Baldi, O. Griffini, A. **Flavor Components in the Maillard Reaction of Different Amino Acids with Fructose in Cocoa Butter-Water. Qualitative and Quantitative Analysis of Pyrazines**. J. Agric. Food Chem. 36, 988. 1988.
- (24) Maga, J. Sizer, C. **Pyrazines in Foods. A Review**. J. Agric. Food Chem. 21(1), 23, 1973.
- (25) Cros, M. Georges, G. **Tude Préliminaire de L'optimization de Paramètres de Torrefaction du Cacao. Consommation des Précurseurs d'arôme, Développement des Pyrazines, qualité organoleptique**. Café Cacao Thé. 36 (4), 285. 1992.
- (26) Ortega, L. López, R. Cacho, J. Ferreira, V. **Use of Solid-Liquid Distribution Coefficients to Determine Retention Properties of Porapak-Q Resins. Determination of Optimal Conditions to Isolate alkyl-methoxypyrazines and beta-damascenone from Wine**. Journal of Chromatography A. 931, 31, 2001.
- (27) Lasekan, O. Feijao, J. Salva, T. **Volatile Flavour Compounds of Cooked Acha (*Digitaria exilis* Stapf)**. Food Chemistry. 73, 333. 2001.
- (28) Hashim, L. Chaveron, H. **Use of Methylpyrazine ratios to Monitor the Coffee Roasting**. Food Research International. 28 (6), 619. 1996.
- (29) Arnoldi, A. Arnoldi, C. Baldi, O. Griffini, A. **Flavour Components in the Maillard Reaction of Different Amino Acids with Fructose in Cocoa Butter –Water. Qualitative and Quantitative Analysis of Pyrazine**. J. Agric. Food Chem. 36, 988, 1988.
- (30) Holm, C. **Pyrazines and Organic Acids in Cocoa: Their Analysis and Effect on Chocolate Flavour**. Thesis. Queensland University of Technology, Brisbane, 1991.
- (31) Hashim, L. Chaveron, H. **Extraction and Determination of Methylpyrazines in Cocoa Beans Using Coupled Steam Distillation-microdistillator**. Food Research International. 27, 537. 1994.

- (32) Bonhevi, J. Ventura, F. **Factores Affecting the Formation of Alkylpirazines during Roasting Treatment in Natural and Alkalinized Cocoa Powder.** J. Agric. Food Chem. 50, 3743. 2002.
- (33) Jinap, M. Jamilah, B. Nazamid, S. **Effect of Polyphenol Concentration on Pyrazine Formation during Cocoa Liquor Roasting.** Food Chemistry. 85, 73, 2004.
- (34) Jinap, M. Jamilah, B. Nazamid, S. Oliveira, A. Pereira, N. Marsaioli, A. Augusto, F. **Sensory Properties of Cocoa Liqueur as Affect by Polyphenol Concentration and Duration of Roasting.** Food Quality and Preference. 15, 403. 2004.
- (35) Sanagi, M. Pik, W. Md, S. **Supercritical Fluid Extraction of Pyrazines in Roasted Cocoa Beans. Effect of pod Storage Period.** Journal of Chromatography A. 785, 361, 1997.
- (36) Counet, C. Callemien, D. Ouwerx, C. Collin, S. **Use of GC- Olfactometry to Identify Key Odorant compounds in dark chocolate. Comparison of samples before and after conching.** J. Agric Food Chem. 50, 2385-2391, 2002.
- (37) Schnermann, P. Schieberle, P. **Evaluation of Key Odorants in Milk Chocolate and Cocoa Mass by Aroma Extract Dilution Analyses** J Agric. Food Chem. 45, 867-872. 1997.
- (38) Reineccius, G. Keeney, P. Weisberger, W. **Factors Affecting the Concentration of Pyrazines in Cocoa Beans.** J. Agric. Food Chem. 20, 202. 1972.
- (39) Luna, F. Crouzillat, D. **Chemical Composition and Flavor of Ecuadorian Cocoa Liquor.** J Agric. Food Chem. 50, 3527-3532. 2002.
- (40) Kolb, B. **Headspace Sampling with Capillary Column.** Journal of Chromatography A. 842, 163-205, 1998.
- (41) Russo, M. **Static Headspace Gas Chromatography of Residual Solvents in Pharmaceutical Products.** Chromatographia. 39, 11/12, 1994.

- (42) Ghaoui, L. **Analysis of semivolatile organic compounds by headspace gas chromatography.** Journal of Chromatography. Vol 642, 389-394, 1993.
- (43) Penton, Z. **Optimización of Conditions in Statisc Headspace GC.** Journal of High Resolution Chromatography. Vol 834, 15, 1992.
- (44) Valcárcel, M., Hens, G. **Técnicas Analíticas de Separación.** Ed. Reverté, S.A. 1988.
- (45) Kolb, B. **Applied Headspace Gas Chromatography.** Perkin-Elmer Bodenseewerk. Überlingen, FRG. Ohn Wiley & Sons. 1978.
- (46) Miller, J. Miller, J. **Estadística y Quimiometría para Química Analítica.** 4^{ta} edición. Pearson Educación, S.A. Madrid, 2002.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo III

“Desarrollo de un método por cromatografía de gases con detección por ionización en llama con introducción de la muestra en línea para el análisis de BTXs en muestras de orina humana”

Resumen

La exposición a solventes orgánicos se ha caracterizado como un problema de Salud Pública, por su gran utilización en la industria, por las formas inapropiadas de su manipulación y disposición las cuales generan contaminación ambiental y laboral. Entre los solventes más estudiados existe un grupo de ellos que normalmente se determinan en conjunto y que son de gran interés en cuanto a contaminación ambiental y toxicidad se refiere. Éstos son: benceno, tolueno y los *o*-, *m*- y *p*-xilenos, identificados con las siglas BTXs y su análisis en orina humana es necesario para diagnosticar la exposición intencional o accidental a estos solventes.

En este trabajo se describe un método para la determinación de benceno, tolueno y xilenos (BTXs) en orina por cromatografía de gases con detección por ionización de llama (FID). La preparación e introducción de la muestra se realizó en un automuestreador de espacio de cabeza que tiene la ventaja de incluir un enfoque criogénico para el enriquecimiento de los BTXs antes de la separación cromatográfica. El método propuesto permitió alcanzar límites de detección satisfactorios de 0,040, 0,035, 0,225, 0,080 y 0,080 $\mu\text{g/L}$ para el benceno, tolueno y *p* -, *o*-, *m*- xilenos respectivamente. Finalmente, el utilizar un automuestreador de espacio de cabeza permitió realizar la etapa de tratamiento de la muestra simultáneamente con la etapa de separación de los analitos de la inyección previa, aumentó la frecuencia de análisis a 10 muestras/hora. Utilizando el método propuesto se analizaron muestras de orina de trabajadores expuestos laboralmente de algunas estaciones de servicio de la ciudad de Mérida. En todos los casos se detectaron los analitos estudiados (BTXs).

1. Introducción

Los solventes orgánicos como el benceno, tolueno, xilenos, entre otros, tienen propiedades altamente tóxicas y, a pesar de ello, se utilizan ampliamente en la industria para la fabricación de plásticos, resinas, fibras sintéticas, lubricantes, pinturas, detergentes además de que se encuentran presentes en el tabaco y en la mayoría de los derivados del petróleo.

En este sentido, muchos de ellos son considerados también como agentes contaminantes, principalmente debido a las emisiones de vehículos automotores, al humo del tabaco y a la contaminación industrial⁽¹⁾.

Por esta razón, los seres humanos se encuentran constantemente expuestos a estos compuestos y particularmente a las fuentes ya mencionadas, incluyendo además las estaciones de servicio (o gasolineras).

Los efectos tóxicos de estos compuestos sobre el cuerpo humano pueden ir desde irritaciones de la piel y de las membranas mucosas, hasta originar cáncer, además de atacar al sistema nervioso central (SNC), el cual es el mayor blanco de los solventes orgánicos⁽²⁾.

Muchos estudios se han dedicado a evaluar estos compuestos como contaminantes del medio ambiente y principalmente del cuerpo humano debido a que la liposolubilidad de muchos de ellos facilita su absorción luego de la exposición a la inhalación oral o dérmica.

Por lo antes expuesto es importante un control biológico que permita evaluar la exposición de los individuos a estos compuestos.

Es por ello, que en este trabajo se propone optimizar un método sencillo y sensible para determinar BTXs en muestras de orina humana de individuos expuestos o no laboralmente.

2. Generalidades

Los solventes son un grupo heterogéneo de compuestos químicos que pueden disolver otros químicos. Esa propiedad los hace útiles en aplicaciones ocupacionales y del hogar en una variedad de propósitos, incluyendo limpieza y desengrase. Por otra parte otros han encontrado uso como productos comerciales o también como agentes desengrasantes en aplicaciones industriales.

El agua es el solvente más común, sin embargo, existen otros solventes conocidos como orgánicos, los cuales son hidrocarburos, lipofílicos que son capaces de extraer, disolver o suspender grasas, aceites y ceras⁽²⁾.

2.1. Toxicología de los Solventes

Muchos solventes muestran volatilidad apreciable en condiciones de uso y en consecuencia el trabajador o las personas que los manipulan pueden quedar expuestos a sus vapores.

El peligro potencial planteado como resultado de exposición a un solvente está en función de la relación entre dosis y respuesta.

En circunstancias ideales, la dosis es la concentración de la forma tóxica de la sustancia química en su receptor fisiológico. Puesto que esa información por lo general no está disponible, el mejor estimado de la dosis es la concentración sanguínea de la sustancia química y muchas veces por extrapolación es posible hacer un estimado exacto de las cifras corporales a partir de la concentración en la orina⁽³⁾.

La volatilidad de algunos solventes orgánicos indica que una vía de exposición importante es a través del aparato respiratorio⁽³⁾.

Por otra parte, la liposolubilidad de muchos solventes orgánicos facilita su absorción luego de la exposición dérmica o a la inhalación oral. Una vez que es absorbido, la disposición y el metabolismo de un solvente son afectados por la ruta de exposición y por sus propiedades físicas y químicas.

El sistema nervioso central (SNC) es el mayor blanco de los solventes orgánicos. En ese sentido, en humanos que abusen crónicamente de solventes,

puede ocurrir un daño permanente al SNC, pero los efectos de exposición a bajas dosis aun no están claros⁽²⁾.

2.2. Solventes Orgánicos Tóxicos a Determinar

En la literatura consultada pudimos constatar que entre los solventes más estudiados existe un grupo de ellos que normalmente se determinan en conjunto y que son de gran interés en cuanto a contaminación ambiental y toxicidad se refiere. Estos son: benceno, tolueno y los *o*-, *m*-, y *p*-xilenos, identificados con las siglas BTXs.

Estos compuestos orgánicos volátiles (BTXs) son de particular interés en el estudio de la calidad del aire en espacios donde las personas pasan en promedio cerca del 90% del día. La contaminación resulta de: el humo del tabaco, materiales de construcción o equipamiento, pinturas, adhesivos, otros productos de consumo y procesos de quema. Por otra parte, las principales fuentes de estos contaminantes en el ambiente externo, lo cual también contribuye a la contaminación del aire interior vía ventilación, son las emisiones industriales y extractores de automóviles⁽⁴⁻⁶⁾.

A continuación se presenta una breve descripción de cada uno de los solventes a estudiar en el presente trabajo.

2.2.1. Benceno

Es el hidrocarburo aromático por excelencia y su consumo mundial se cifra en varios miles de millones de litros. Es un líquido incoloro de aroma dulce que se evapora al aire rápidamente y es poco soluble en agua. Es sumamente inflamable y se forma tanto de procesos naturales como de actividades humanas. Sus múltiples aplicaciones hacen de él un elemento imprescindible en la química industrial. Si bien sus empleos como disolvente se han restringido como consecuencia de su carcinogenicidad, sigue siendo uno de los productos comerciales más valiosos. Como otros solventes aromáticos, el benceno causa

depresión aguda del SNC, pero su capacidad de producir “discrasias sanguíneas” es aparentemente única⁽⁷⁾.

2.2.2. Tolueno

El tolueno, o metilbenceno, es un líquido inflamable muy volátil de olor característico, agradable y con solubilidad similar a la del benceno. Industrialmente se obtiene por destilación del petróleo, o mediante alquilación del benceno. La forma comercial más común del tolueno es el *toluol*, mezcla de hidrocarburos aromáticos rica en tolueno, pero que entre otros contaminantes, también contiene benceno y otros alquilbencenos⁽⁷⁾.

2.2.3. Xilenos

El xileno es un solvente orgánico producto de la adición de dos grupos metilos al benceno durante la destilación del alquitrán del carbón y productos del petróleo. El xileno comercial es una mezcla de los tres isómeros: o-, m- y p-xileno, siendo el m-xileno, casi siempre, el principal constituyente de la mezcla. Estas mezclas usualmente contienen etilbenceno y pequeñas cantidades de tolueno, fenol, trimetilbenceno, y otros hidrocarburos no aromáticos⁽⁷⁾.

2.3. Usos

El uso de BTXs es muy variado. Por ejemplo, para el caso del benceno, se puede destacar que se utiliza para la fabricación de medicamentos, tintes, detergentes plásticos, explosivos, además tiene aplicaciones como disolvente y se utiliza como punto de partida en la síntesis de otros compuestos aromáticos. Cabe señalar también que es de especial interés su empleo como disolvente de lacas, ceras, aceites, entre otros. Por otra parte, en terapéutica veterinaria sigue empleándose como parasitocida en las heridas. Con respecto al tolueno se puede decir que es un excelente solvente para pinturas, lacas, gomas y es un popular reemplazo para los solventes derivados del benceno que son aun más tóxicos. Otra aplicación industrial incluye su uso como materia prima en la producción

química⁽⁷⁾. En cuanto a los xilenos se tiene que sus aplicaciones industriales incluyen, además de su uso como solvente, su utilización como agente limpiante y desgrasante también como combustible para aviones. Es también un material de partida e intermediario para una variedad de procesos químicos⁽⁸⁾.

En la Tabla 1 se muestran las estructuras de los compuestos objeto de estudio y un resumen de sus propiedades físicas y químicas más relevantes.

2.4. Toxicidad

El benceno y en general también sus homólogos y derivados incluyendo el tolueno y xilenos, tienen algunos efectos tóxicos similares. Sin embargo, el benceno es el que presenta mayor toxicidad de los cuatro citados y es el que más efectos perjudiciales tiene.

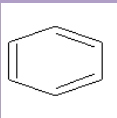
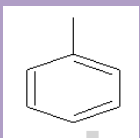
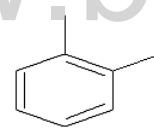
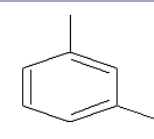
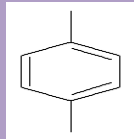
En general, son irritantes pulmonares y por ello siempre ha de valorarse el riesgo de neumonías químicas hemorrágicas y de posteriores complicaciones por infección cuando se hayan producido fenómenos de aspiración.

Otro tipo de lesiones que podrían producir estos solventes son las dérmicas, las zonas de piel constantemente expuestas desarrollan dermatitis químicas irritativas, que con facilidad se complican con cuadros alérgicos⁽⁷⁾.

El benceno es tóxico al SNC e irritante de membranas mucosas y de los ojos. Éste se disuelve en los lípidos del SNC, afectando el funcionamiento de las neuronas. La exposición crónica produce lesiones en la corteza y sustancia blanca, con proliferación de la microglia atrofia cortical, lo que se expresa en la clínica como psicosis orgánicas⁽⁷⁾.

Cabe señalar que el benceno, además de las propiedades altamente tóxicas, tiene propiedades carcinógenas y es por ello que ha sido ampliamente estudiado. A continuación, se detallan algunos efectos tóxicos adicionales que presenta la exposición al benceno.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de los analitos (BTXs) y sus estructuras^(7,8)

Compuesto	F.M.	Estructura	PM (g/mol)	P.E. (°C)	Solubilidad	Propiedades
Benceno	C ₆ H ₆		78,10	80,1	Muy poco soluble en agua (0,188 p/p a 25 °C), es extremadamente soluble en disolventes orgánicos (alcohol, cloroformo, éter, disulfuro de carbono)	Líquido de olor agradable característico, incoloro, inflamable y que arde con llama oscura. Es extremadamente volátil a temperatura ambiente, por lo que la vía principal de absorción es la respiratoria. Sus vapores son más pesados que el aire (d. 2,77), con el que forma mezclas explosivas. Es muy estable químicamente, lo que le convierte en un útil disolvente de reactantes químicos.
Tolueno	C ₇ H ₈		92	110,1	Soluble en etanol, benceno, cloroformo, éter, dietil éter, acetona, ácido acético glacial. Prácticamente insoluble en agua (526 mg/L a 25 °C)	Líquido incoloro e inflamable tiene olor dulce y penetrante detectable a una concentración alrededor de 0,8 ppm, mientras que el 46% de tolueno es detectado alrededor de 2,7ppm
Xileno (o-, m-, p-)	C ₈ H ₁₀	  	106,17	137	Prácticamente insoluble en agua. Soluble en alcohol absoluto, éter y otros líquidos orgánicos.	Líquido incoloro e inflamable a temperatura ambiente (es sólido a temperaturas por debajo de 14 °C) tiene un olor parecido al del benceno detectable a 1 ppm. El líquido es moderadamente volátil

Afectación hematológica. Su toxicidad crónica se debe a su acción sobre la médula ósea, que parece causada por lo menos en parte por su transformación en derivados fenólicos, lo que la convierte en un órgano sensible a la exposición prolongada. Las alteraciones hematológicas características de la intoxicación

crónica por benceno son el desarrollo de neoplasias, leucemias y aplasias medulares. La alteración más precoz que se produce en personas expuestas es la disminución de linfocitos en extensiones de sangre periférica, que parecen ser las células más sensibles a su acción tóxica. El siguiente grupo de células que disminuyen son los hematíes, pudiéndose producir anemias clínicamente significativas. Estos efectos, reversibles en un período variable tras cesar la exposición, pueden ser los antecedentes a los cuadros leucémicos y la anemia aplásica, mencionados anteriormente.

Hepatopatías y nefropatías. Tanto en la intoxicación aguda, como en la crónica se produce la afectación de estos dos órganos. Las elevadas concentraciones de fenol, que se producen como consecuencia del proceso biotransformativo, son una de las causas de estas lesiones debido a que éste es un potente precipitante de proteínas. La formación de epóxidos, que a su vez forman aductos con el ADN, y los fenómenos de preoxidación de membranas también se consideran que están implicados en este efecto tóxico. Por último, la propia acción del benceno sobre las membranas de la célula, es un factor más de toxicidad⁽⁷⁾.

Carcinogenicidad. El benceno es uno de los carcinógenos mejor estudiados, pues el elevado número de personas expuestas laboralmente ha sido suficiente como para poder establecer claramente sus acciones. Es mutágeno y genotóxico. El mecanismo de acción parece basarse en la producción de epóxidos durante la hidroxilación aromática, que a su vez interaccionarían con el material genético de la célula. Los epóxidos reaccionan en la célula con moléculas de agua dando diolepóxidos. La carcinogenicidad de éstos reside en dos propiedades:

- a) Las bases orgánicas que componen el ADN son moléculas aromáticas planas. En consecuencia, los hidrocarburos aromáticos, especialmente los policíclicos, se adaptan bien entre bases adyacentes de la hélice de ADN.
- b) El grupo epóxido debido a su tensión inherente de anillo, es un potente agente alquilante, capaz de reaccionar con los puntos nucleófilos del ADN⁽⁷⁾.

2.5. Síntomas de la contaminación o intoxicación por BTXs

Luego de conocer los efectos tóxicos que puede producir la exposición a estos solventes orgánicos siempre surge la interrogante de cómo una persona puede saber si está o no contaminada con alguno de éstos. Para ello se han definido los síntomas o manifestaciones clínicas que se presentan en el organismo debido a la contaminación con alguno de estos solventes. La siguiente tabla resume estos síntomas.

Tabla 2. Síntomas de contaminación por BTXs ⁽⁸⁾

Solvente	Síntomas
Benceno	Después de una exposición corta a concentraciones bajas, por ingestión o por inhalación, se han detectado los siguientes síntomas: vértigo, debilidad, euforia, dolor de cabeza, náuseas y vómito. Si la exposición es más severa, a estos síntomas se suman la pérdida del apetito, visión borrosa, nerviosismo, conducta violenta, delirio, vértigo y muerte.
Tolueno	La exposición crónica al tolueno produce cambios en la personalidad y daño cerebral caracterizado por pérdida de la memoria, alteraciones en el control afectivo, visión borrosa y ceguera transitoria. En serigrafistas se han reportado casos de encefalopatía tóxica, en pintores, encefalopatía tóxica leve y disminución en el tiempo de reacción y en zapateros, dermatitis.
Xileno	Una exposición sobre las 2000 ppm de xileno en aire causa conjuntivitis, irritación nasal y dolor de garganta. Puede producir además dermatitis grasosa ante una prolongada exposición cutánea.

2.6. Metabolismo

En el organismo humano, BTXs se metaboliza y gran parte de los metabolitos se excretan por la orina.

En ese sentido, el benceno tiene un mecanismo de metabolización muy complejo y del que resultan numerosos metabolitos, alguno de los cuales han sido propuestos como biomarcadores para la exposición a este solvente⁽⁹⁾. Entre éstos se encuentran dos metabolitos urinarios de menor importancia llamados ácido S-fenilmercaptúrico y ácido *trans,trans*-mucónico. En la literatura se encuentra que algunos investigadores han estudiado la exposición de individuos al benceno, monitoreando a estos metabolitos en la orina. Ellos concluyen que la presencia de los mismos en la orina confirman que los individuos han sido expuestos a niveles

considerables de benceno, por lo que, sí existe una buena correlación entre la exposición y los niveles de ambos metabolitos determinados en orina⁽⁴⁾. Sin embargo, el benceno no metabolizado es también excretado en la orina, y puesto que aun no se ha identificado ninguna fuente fisiológica para el benceno, éste es un biomarcador específico. Por otra parte, también se ha demostrado una buena correlación entre la concentración de benceno en orina y el nivel de exposición⁽⁹⁾.

En lo que respecta al tolueno, en su proceso metabólico éste es oxidado, luego conjugado con glicina y excretado por la orina como ácido hipúrrico. Por su parte, los isómeros *o*-, *m*-, y *p*-xileno también son oxidados a ácido *o*-, *m*-, y *p*-tolúico y luego excretados por la orina como ácido *o*-, *m*-, y *p*-metilhipúrrico⁽⁵⁾. Es importante señalar que si bien se ha realizado la determinación en orina de los metabolitos de BTXs con el fin de establecer la exposición humana a estos compuestos, desafortunadamente, el análisis de los mismos puede llegar a ser un proceso muy largo y tedioso. Así, en ciertos casos, sólo se puede determinar uno de los metabolitos por cada análisis, y no a todos simultáneamente. Es por ello que siempre existe la necesidad de desarrollar metodologías alternas que permitan determinar directamente a los compuestos no metabolizados⁽¹⁰⁾.

En la Tabla 3 se presenta un resumen de los metabolitos correspondientes a cada analito.

Tabla 3. BTXs y sus metabolitos

Analito	Metabolito
Benceno	Ácido S-fenilmercaptúrico Ácido <i>trans,trans</i> -mucónico
Tolueno	Ácido hipúrrico
Xileno	Ácidos metilhipúrricos

3. Matrices Utilizadas en la Determinación de BTXs

La importancia del estudio de estos solventes radica en la toxicidad que presentan y la frecuente exposición a los mismos a la que está sometido el ser humano. La gran diversidad de fuentes de contaminación y de rutas de exposición

Delgado

a BTXs han contribuido a que estos compuestos hayan sido ampliamente estudiados en diferentes tipos de matrices.

Debido a la alta volatilidad de estos solventes, entre las matrices más estudiadas están las del tipo ambiental. Efectivamente, en la literatura se encontraron varios trabajos destinados a desarrollar metodologías para la determinación de BTXs en los que se estudiaron matrices tales como aire^(6,11-17), aguas⁽¹⁸⁻²²⁾ incluyendo agua subterránea⁽²³⁾ y biota marina⁽²⁴⁾.

El estudio de matrices del tipo ambiental es muy importante en la actualidad debido a que existen regulaciones para los niveles de estos solventes en varios tipos de ambiente. Por ejemplo, en la Tabla 4, se resumen los niveles máximos permitidos de exposición laboral a BTXs (en µg/L) en Estados Unidos, tanto para una jornada de trabajo completa (8 ó 10 horas) como para exposiciones de corto tiempo y también para valores límites de umbral.

Tabla 4. Niveles máximos permitidos de exposición laboral a BTXs (µg/L) en Estados Unidos⁽⁸⁾.

Solvente	Estándares de OSHA ^a		Recomendaciones de NIOSH ^b		Valores Límites de Umbral	
	8h	15min	10h	15min	8h	15min
Benceno	1000	5000	100	1000	500	2500
Tolueno	200.000	500.000	100.000	150.000	50.000	---
Xilenos	100.000	150.000	---	---	100.000	150.000

^aOccupational Safety and Health Administration, ^b The National Institute for Occupational Safety and Health

Por otra parte, existen otros valores de BTXs y sus metabolitos que deben considerarse. Por ejemplo, existe una regulación legal en Venezuela que controla los niveles de estos analitos en agua potable⁽²⁵⁾. La Tabla 5 refleja estos valores.

Tabla 5. Valores máximos aceptables de BTXs en agua potable en Venezuela

Componente	Valor Máximo Aceptable (µg/L)
Benceno	10
Tolueno	700
Xileno	500

En lo que respecta a las matrices de origen biológico, las más utilizadas para evaluar la exposición a BTXs han sido sangre y orina. Una vez que el individuo presenta síntomas de intoxicación o contaminación por alguno de los solventes en estudio, es propio hacer una evaluación de éstos en fluidos biológicos. Es por ello que se han desarrollado numerosas metodologías que permiten llevar a cabo dicha evaluación o determinación tanto en sangre^(1,26,27) como en orina^(1,4,5,9,10,28-30).

Otros casos en los que han sido útiles muestras de fluidos biológicos son los forenses⁽²⁷⁾. Muestras de este tipo son requeridas cuando la persona ha muerto quemada con gasolina o kerosén, por ejemplo.

En cuanto a los niveles de BTXs reportados en la literatura para muestras de sangre y orina podemos decir que dependen de las fuentes de exposición. En ese sentido, existen actualmente numerosas fuentes de exposición a BTXs. En primer lugar, está la exposición inherente al hecho de trabajar en un lugar donde se esté en contacto directo con el vapor de estos solventes (plantas petroleras, de pinturas, estaciones de servicio) conocida como exposición laboral. En segundo lugar está la exposición no laboral, más frecuente y cotidiana, pues el fumar y estar expuesto a las emisiones de los automóviles y plantas industriales son parte de estas fuentes de exposición. Es por ello que el hecho de no laborar en lugares como los antes mencionados no es una garantía de que no se está expuesto a estos solventes.

En las Tablas 6 y 7 se resumen algunos niveles de concentración encontrados para BTXs en muestras de sangre y de orina reportados en la literatura.

Por otra parte, están los Valores Límite Biológicos (VLB) establecidos y regulados por las leyes de salud de diferentes países, de los metabolitos (o marcadores biológicos) correspondientes a cada analito, tanto en sangre como en orina según corresponda. En la Tabla 8 se encuentran estos valores para España y México.

Tabla 6. Niveles de BTXs en sangre (µg/L)

Grupo Estudiado	N° Suj.	Benceno	Tolueno	Xilenos	Ref.
MF (hombre 47a)	1	---	---	(o) 154 (m) 250 (p) 59,3	28
MF (hombre 59a)	1	---	---	(o) 84,7 (m) 98,0 (p) 46,5	
MF (mujer 37a)	1	---	---	(o) 24,2	
MF (hombre 46a)	1	---	---	(o) 66,0	
No Fumadores Fumadores	10 15	0,087 0,246	0,428 0,780	(m) 0,535 (m) 0,411	1

(o): orto xileno, (m): meta xileno, (p): para xileno

Tabla 7. Niveles de BTXs en orina (µg/L)

Grupo Estudiado	N Suj.	Benceno	Tolueno	Xilenos	Ref.
No Fumadores Fumadores	10 15	0,066 0,125	0,416 0,259	(m) 0,099 (m) 0,079	1
No Fumadores	2	0,011–0,014	---	---	9
No fumadores Fumadores	11 12	0,183 0,444	0,775 1,353	0,480 1,020	10
Estudiantes de Medicina, Universidad de Milán	2	0,092	0,150	(m+p) 0,078 (o) 0,034	30

(o): orto xileno, (m): meta xileno, (p): para xileno

Otro valor interesante de considerar se denomina Índice Biológico de Exposición (IBE). Los IBE son valores de preferencia que sirven como una guía para la evaluación de riesgos potenciales para la salud en la práctica de la higiene industrial. Los IBE representan los niveles de los biomarcadores que son más frecuentemente observados en las muestras recogidas de un trabajador sano que ha estado expuesto por inhalación a las sustancias químicas tóxicas con las que trabaja⁽³³⁾.

Tabla 8. Valores límite biológicos para los metabolitos de BTXs en España y México^(31,32)

Agente Químico	Marcador Biológico	Valores Límite Biológicos España	México
Benceno	Ácido S-fenilmercaptúrico en orina	120 µg/g de creatinina	---
	Ácido t,t-mucónico en orina	4500 µg/g de creatinina	---
	Fenoles totales en orina	---	50x10 ³ µg/g de creatinina
Tolueno	o-Cresol en orina	500 µg/L	---
	Ácido Hipúrrico en orina	1600x10 ³ µg/g de creatinina	2500x10 ³ µg/g de creatinina
	Tolueno en sangre	50 µg/L	1000 µg/L
Xileno	Ácido metilhipúrrico en orina	1500x10 ³ µg/g de creatinina	1500x10 ³ µg/g de creatinina

Los IBE no indican una distinción clara entre una exposición prolongada o no. Debido a la variabilidad biológica es posible que la medición aislada supere el IBE sin incurrir por ello en un incremento de un riesgo para la salud. Pero sin embargo, si las mediciones de muestras obtenidas de un trabajador en diferentes ocasiones persisten excediendo el IBE, o si la mayoría de las mediciones en muestras obtenidas de un grupo de trabajadores del mismo lugar de trabajo excede el IBE, la causa de los valores excesivos debe ser investigada y se deben tomar acciones adecuadas para reducir la exposición⁽³³⁾.

La Tabla 9 resume los IBE para BTXs establecidos en Argentina y Estados Unidos.

4. Justificación del Trabajo

La exposición a BTXs a la que está sometido actualmente el hombre puede o no ser alarmante dependiendo del ambiente laboral donde se encuentra.

La mayor contaminación se presenta cuando se está directamente expuesto a los vapores de estos solventes en lugares cerrados (exposición laboral principalmente). Sin embargo, todo individuo está hoy expuesto a estos agentes tóxicos para el cuerpo humano ya que otra fuente de contaminación se presenta al

Delgado

fumar cigarrillos o bien estar expuesto al humo de éstos sin la necesidad de ser fumadores, pues BTXs están entre los componentes del cigarrillo.

Tabla 9. Índices Biológicos de Exposición para BTXs en Argentina y U.S.A. ^(8,33)

Agente Químico	Marcador Biológico	IBE	
		Argentina	U.S.A.
Benceno	Ácido S-fenilmercaptúrico en orina	---	25 µg/g de creatinina
	Ácido t,t-mucónico en orina	---	500 µg/g de creatinina
	Fenol total en orina	50x10 ³ µg/L	---
	Benceno en aire exhalado	80 µg/L	---
Tolueno	Ácido hipúrrico en orina	2500x10 ³ µg/g de creatinina	1650x10 ³ µg/g de creatinina
	Tolueno en sangre venosa	1000 µg/L	---
	Tolueno en aire exhalado	20x10 ³ µg/L	---
Xileno	Ácido metilhipúrrico en orina	1500x10 ³ µg/g de creatinina	1500x10 ³ µg/g de creatinina

Otra fuente de contaminación con BTXs (componentes de la gasolina) son las emisiones de los vehículos automotores que cada día son mayores y menor es el control o regulación por parte de organismos competentes que puedan evitar o minimizar este mal.

En conclusión, de acuerdo a las razones ya mencionadas, la población expuesta a la contaminación por BTXs no está compuesta sólo por personas que trabajan diariamente en contacto con los vapores de éstos, ni tampoco por los fumadores, sino que todos, ancianos, adultos, adolescentes, jóvenes, niños, fumadores o no, en sus actividades diarias, están expuestos a dicha contaminación. Es por ello que el desarrollo de metodologías rápidas, sencillas, sensibles y precisas que permitan el análisis simultáneo de BTXs en muestras biológicas es siempre de constante interés.

Es importante destacar que no sólo importa evaluar los niveles de estos compuestos en muestras provenientes de personas expuestas laboralmente sino que también es necesario realizar monitoreos preventivos de manera que puedan

tomarse a tiempo medidas necesarias para contrarrestar intoxicaciones de esta índole.

Por otra parte, la evaluación de BTXs en orina de la población en general también es importante para establecer valores de referencia para la comparación con aquéllos obtenidos para los individuos ocupacionalmente expuestos.

En lo que respecta a las muestras, la sangre y la orina son las matrices biológicas más utilizadas para el análisis de estos compuestos. Sin embargo, algunos autores consideran que las muestras de orina son más apropiadas para la determinación de BTXs por la estabilidad que presentan los mismos en estas muestras.

En ese sentido, Fustinoni y colaboradores⁽³⁰⁾ estudiaron la estabilidad de BTEX en la orina. Para ello realizaron los análisis a 0, 2, 4, 7, 11, 16, 23, 30 y 60 días luego del momento de la recolección de la muestra de orina que estaba almacenada a -20°C . Los resultados fueron similares para los diferentes tipos de exposiciones que estudiaron y para cada solvente únicamente se observaron pequeñas fluctuaciones alrededor del valor real, pero no hubo disminución de la concentración con el tiempo.

Otro estudio de estabilidad de los analitos en orina se hizo durante el desarrollo de una metodología para la determinación específica de benceno⁽⁹⁾. En este caso se recolectaron las muestras de orina en 18 botellas, de las cuales se analizaron seis inmediatamente, seis luego de estar almacenadas durante tres días a -4°C y las otras seis luego de un mes de almacenadas a -20°C . Comparado a las botellas que no se refrigeraron, los porcentajes de recuperación fueron de 99% y 98%, respectivamente.

Finalmente, de ambos estudios se concluye que, almacenando las muestras de orina a -20°C , se garantiza la estabilidad de BTXs durante un período de hasta 60 días; lo cual representa una gran ventaja.

Por otra parte, otra de las ventajas que presenta el trabajar con muestras de orina, según algunos autores⁽⁹⁾, es el hecho de que para la recolección de las mismas no se utiliza un procedimiento de muestreo invasivo como es el caso de la toma de muestras de sangre.

En los últimos tiempos, el Laboratorio de Espectroscopia Molecular, de la Facultad de Ciencias, en la Universidad de Los Andes, ha recibido una importante demanda para evaluar solventes orgánicos tóxicos en fluidos biológicos ya que este tipo de análisis no se realiza en ningún Laboratorio a nivel regional y posiblemente tampoco a nivel nacional.

En ese sentido, nos propusimos desarrollar un método sensible y selectivos para evaluar a los BTXs en orina, pero fundamentalmente automatizado para que sirviera como método de rutina.

5. Antecedentes del Problema a Investigar

En la revisión bibliográfica realizada se encontró que se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de BTXs en fluidos biológicos como: sangre total ^(1,26,27), plasma sanguíneo ⁽²⁶⁾ y orina ^(1,4,5,9,10,28-30).

Sin embargo, debido a que la matriz a estudiar en este trabajo será la orina, la discusión que se presenta a continuación está centrada fundamentalmente en este fluido biológico.

En general, las técnicas más reportadas en la literatura para el análisis de BTXs en orina han sido la electroforesis capilar ⁽⁵⁾ y la cromatografía líquida de alta resolución ^(4,34-36). Sin embargo, estos métodos tienen una etapa de tratamiento de la muestra laboriosa que consume tiempo.

Es importante destacar una vez más, que BTXs también se excretan por la orina sin metabolizar y es por ello que la evaluación de éstos o de alguno de sus componentes en muestras de orina también ha sido reportada ^(1,9,10,28,30). En ese sentido, se ha encontrado que existe una buena correlación entre los niveles de estos compuestos en orina y la exposición a los mismos ^(1,9).

Kivistö y colaboradores ⁽³⁷⁾ determinaron los niveles de los metabolitos del benceno en orina, y benceno en sangre y orina para muestras de una población de trabajadores de una planta de producción de benceno. Los autores concluyen que en general, los resultados obtenidos en todos los casos eran similares. Por su parte Ghittori y colaboradores ⁽³⁵⁾ realizaron un estudio sobre la evaluación de la

exposición ocupacional al benceno analizando una población de 145 individuos expuestos al analito en una planta química. Ellos también analizaron tanto a los metabolitos como al benceno sin metabolizar en muestras de orina. Finalmente concluyen que cualquiera de los analitos estudiados pueden ser utilizados para monitorear la exposición de los individuos a bajas concentraciones de benceno. Esto confirma nuevamente lo mencionado anteriormente con respecto a la correlación.

Cabe destacar que para la determinación de BTXs sin metabolizar en muestras de orina, la mayoría de los métodos publicados utilizan la técnica de cromatografía de gases debido a que los solventes orgánicos en estudio son considerablemente volátiles.

En ese sentido, luego de un análisis de los trabajos reportados en la literatura consultada, puede concluirse que las metodologías empleadas para la determinación de BTXs se diferencian fundamentalmente en: los sistemas de introducción de muestra y en los sistemas de detección empleados en cromatografía de gases.

La técnica de introducción de muestra más utilizada fue la llamada Espacio de Cabeza (EC) que muchos utilizaron en forma manual. Esta técnica presenta la ventaja de que la muestra puede introducirse al sistema de análisis sin necesidad de ser tratada, pues consiste precisamente en separar a los analitos volátiles de la matriz para ser introducidos al sistema cromatográfico.

Perbellini y col.⁽¹⁾ desarrollaron un método para la determinación simultánea de BTm-X en sangre y orina utilizando la técnica de EC acoplada a CG y con detección por EM. Para el análisis utilizaban 7 mL de muestras de orina provenientes de 25 trabajadores madereros ocupacionalmente no expuestos, diez de ellos eran fumadores y quince no fumadores. Ellos reportaron que la sensibilidad de los espectrómetros de masas actuales es suficiente para obtener los límites de detección en orina de 13 ng/L para benceno, tolueno y *m*-xileno.

Fustinoni y su grupo de colaboradores⁽³⁰⁾ por su parte determinaron niveles de BTXs en orina, con un sistema similar al anterior, EC-CG-EM, con la diferencia de que utilizaron la microextracción en fase sólida (MEFS) para el muestreo de los

analitos presentes en el espacio de cabeza del vial, con el fin de mejorar la sensibilidad. Para ello la fibra fue expuesta, durante 15 minutos, directamente en el espacio de cabeza sobre la muestra. Posteriormente, la fibra se sometía a una desorción térmica durante 3 minutos en el inyector. Utilizando MEFS se lograba preconcentrar los analitos y por ello, bajo estas condiciones, los límites de detección alcanzados para benceno, tolueno y xileno fueron: 25, 34, 12 y 15 ng/L, respectivamente. El tiempo empleado en el tratamiento e introducción de la muestra fue de aproximadamente 40 min.

Por su parte, Hung, Lee y Chen⁽¹⁰⁾ determinaron BTXs en orina de individuos fumadores y no fumadores por desorción térmica-cromatografía de gases (DT-CG). Ellos usaron un separador térmico dinámico para purgar los analitos desde la orina hasta el adsorbente sólido contenido en el tubo de desorción. Como sistema de detección utilizaron un detector por ionización de llama (FID). El separador térmico dinámico usado para purgar los compuestos orgánicos volátiles de la muestra de orina proporcionó un paso del tratamiento de la muestra fuera de línea con el fin de evitar que la llama del detector FID se apagara debido a la gran cantidad de vapor de agua purgada de las muestras de orina. Los límites de detección obtenidos en este trabajo fueron: 15, 8, 50, y 20 ng/L para benceno, tolueno, *m*-xileno y *p*-xileno, respectivamente.

Otros métodos para la determinación únicamente de benceno en muestras de orina también han sido publicados. En ese sentido, Kok y Ong⁽³⁸⁾ y Kivisto y colaboradores⁽³⁷⁾ determinaron benceno en sangre y orina utilizando un método que utilizaba el sistema EC-CG y detección por fotoionización. Los límites de detección alcanzados por Kok y Ong, para el benceno en sangre y orina fueron 54 y 43 ng/L respectivamente; resultados similares obtuvieron Kivisto y colaboradores. Del mismo modo Perbellini y colaboradores⁽³⁹⁾ y Ghittori y colaboradores⁽⁴⁰⁾ también reportaron métodos que permitían la determinación de benceno para diferentes poblaciones pero utilizando la técnica de introducción de la muestra de purga y trampa. Los límites de detección alcanzados en estos trabajos para el benceno se encuentran en el intervalo desde 15 a 50 ng/L.

Finalmente, luego de un análisis crítico de los métodos reportados en la literatura pudimos concluir que la técnica EC y la de MEFS acopladas a la CG permiten la determinación de BTXs siempre y cuando se utilicen sistemas de detección lo suficientemente sensibles como los de fotoionización o el de EM.

Sin embargo, si no se cuentan con estos detectores, es necesario pensar en otras estrategias para la evaluación de estos analitos en muestras de orina. Por ejemplo, la introducción de una trampa criogénica en la cabeza de la columna es una buena alternativa para poder concentrar a BTXs en el sistema.

También pudimos constatar que la técnica de EC se utilizó en muchos casos en forma manual o acoplada a MEFS que hacía que la etapa de extracción de los BTXs consumiera mucho tiempo (> a 40 min).

Por lo anteriormente expuesto y teniendo en cuenta la infraestructura que tiene el Laboratorio de Espectroscopia Molecular para la realización de este trabajo, nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo.

6. Hipótesis de Trabajo

Si se toma en cuenta:

- La posibilidad de poder separar BTXs por cromatografía de gases utilizando una columna capilar
- La importancia de la técnica de espacio de cabeza en la extracción de los analitos volátiles de la matriz
- La posibilidad de preconcentrar los analitos por retención de los mismos en la cabeza de la columna utilizando un sistema de enfoque criogénico
- La capacidad del detector de ionización de llama de detectar compuestos carbonados

“Se podrá optimizar un método por CG con detección por FID, con introducción de la muestra en línea con un automuestreador de EC y preconcentración de los analitos por enfoque criogénico que permita determinar BTXs en muestras de orina humana de individuos expuestos o no laboralmente”.

Para cumplir con esta hipótesis se plantean los siguientes objetivos

7. Objetivos

7.1. Objetivo General

- Desarrollar un método por cromatografía de gases con detección por FID con introducción de la muestra en línea para el análisis de BTXs en muestras de orina humana.

7.2. Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones del sistema EC-CG-FID para llevar a cabo la introducción y preconcentración de los analitos de interés.
- Seleccionar la columna analítica y optimizar un método por cromatografía de gases y detección por ionización en llama que permita la detección y cuantificación de los analitos en estudio.
- Aplicar la metodología desarrollada a la determinación de los mismos en muestras de orina de individuos expuestos y no expuestos laboralmente.

8. Metodología Propuesta

8.1. Sistema a Utilizar

Para la determinación de BTXs en muestras de orina se propone utilizar un sistema formado por los siguientes componentes: un automuestreador automático

Delgado

de espacio de cabeza (EC) conectado a través de una transferencia capilar al inyector de un cromatógrafo de gases (CG). Una columna capilar conectada por un lado al inyector y por el otro a un detector de ionización de llama (FID). Para poder alcanzar la sensibilidad necesaria para determinar los analitos a los niveles de concentración en que se encuentran en las muestras de orina se acoplará un sistema de enfoque criogénico en la cabeza de la columna. En la Figura 1 se muestra un diagrama del sistema a utilizar.

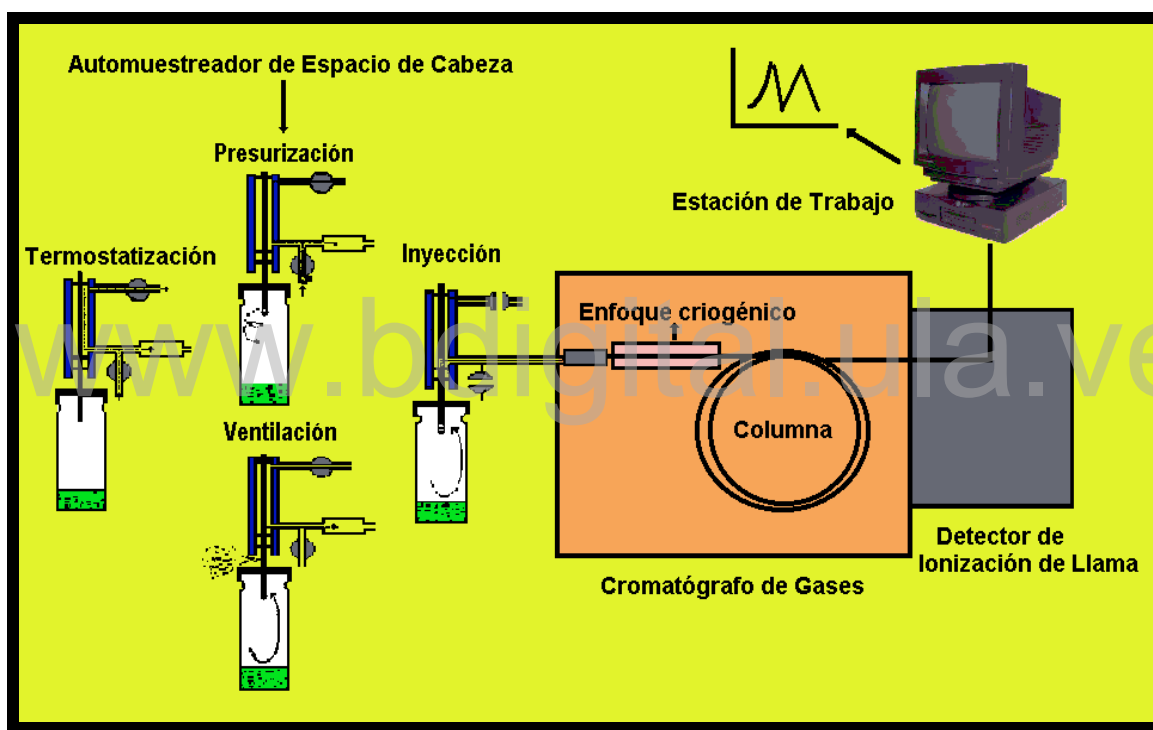


Figura 1. Diagrama esquemático del sistema instrumental

9. Parte Experimental

9.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron grado analítico, el cloruro de sodio de 99,99 % de pureza fue suministrado por Prolabo Venezolana. Los solventes fueron

C.C. RECONOCIMIENTO -

grado HPLC, el benceno, tolueno, etanol, acetona y acetato de etilo fueron suministrados por J.T. Baker (Phillisburg, N.J. USA). Los xilenos (orto, meta y para xilenos) de 99,98 % de pureza fueron suministrados por Sigma (San Luis, M.O., USA). El agua utilizada se purificó en un sistema Milli-Q SP TOC (Water, Millipore, Milford MA, USA).

9.2. Preparación de las Soluciones de Trabajo

Las soluciones patrones de cada uno de los solventes estudiados, de $100 \times 10^{-3} \mu\text{g/L}$ de concentración, se prepararon en metanol y se almacenaron bajo refrigeración (-4°C). Las soluciones de trabajo de menor concentración se prepararon por dilución de las soluciones patrones en agua. Es importante señalar que cada una de las soluciones se agitaba durante 3 minutos en el Vortex antes de su uso con el fin de asegurar la homogeneidad del sistema.

9.3. Muestras de Orina

Para el desarrollo del método se utilizó un pool de orina que se obtuvo a partir de 60 muestras de orina de individuos voluntarios sanos expuestos y no expuestos a BTXs.

Las muestras se tomaron directamente en frascos de polietileno individuales de 60 mL disponibles para esta función y se almacenaron bajo refrigeración (-4°C). Posteriormente en el momento de su uso, se formó el pool transfiriendo las 60 muestras a una botella de vidrio de 1 litro que se homogeneizó y se almacenó bajo refrigeración (-4°C) hasta su utilización.

Por otra parte, las muestras reales a analizar por el procedimiento propuesto se tomaron siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente y se almacenaban bajo refrigeración a -20°C . En el momento del análisis, la muestra de orina se dejaba que alcanzara la temperatura ambiente y 3 mL de la misma se transferían a un vial que contenía 1,000 g de NaCl y se cerraba herméticamente con el septum de teflón.

9.4. Instrumental

Para la determinación de BTXs en muestras de orina se utilizó un sistema formado por los siguientes componentes: un automuestreador automático de espacio de cabeza (EC) Perkin-Elmer Modelo HS-40 conectado a través de una transferencia capilar de sílice fundida, al inyector de un cromatógrafo de gases (CG) Perkin-Elmer Modelo AutoSystem. Una columna AT- 502.2 de sílice fundida (Alltech, Deerfield, Illinois, USA) de 30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro interno y con un espesor de film de 3,0 μm conectada por un lado al inyector del CG y por el otro a un detector de ionización de llama (FID).

Para optimizar la sensibilidad del método se realizó una preconcentración de los analitos en la cabeza de la columna. Para ello se acoplaron al sistema dos accesorios del automuestreador de espacio de cabeza HS-40, un enfoque criogénico que trabaja con nitrógeno líquido y una trampa de secado constituida por una microcolumna de LiCl. En la Figura 1 se muestra un diagrama del sistema utilizado.

Los viales del automuestreador de espacio de cabeza utilizados eran de vidrio con volúmenes de 9 y 22 mL, los cuales se sellaban herméticamente con septum de silicona con revestimiento de teflón y tapas de aluminio, como los que se presentan en la Figura 2.

9.5. Optimización de los Parámetros Instrumentales

La optimización de los parámetros instrumentales del sistema se realizó por el método de variar un parámetro a la vez y a partir de soluciones patrones de benceno, tolueno y xilenos en agua de concentración 5,00 $\mu\text{g/L}$ y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a la misma concentración.



Figura 2. Viales, tapas y septum a utilizar

9.6. Procedimiento

En un vial del EC que contenía 1,00 g de NaCl se introducían 3 mL de la solución acuosa de BTXs o de la muestra de orina enriquecida con los analitos. El vial se cerró herméticamente con un septum de silicona con revestimiento de teflón y una tapa de aluminio y se agitó en un vortex durante 20 segundos. Posteriormente el vial se introdujo en la cámara de termostatización del automuestreador de EC y se termostató a 90 °C durante 15 min (**Tiempo de termostatización**). Faltando 0,5 min para finalizar la etapa de termostatización se activó el enfoque criogénico enfriándose la cabeza de la columna durante 5 min (**Tiempo precriogénico**). Al terminar la etapa de termostatización, la aguja del EC descendió hasta pinchar el septum para presurizar el vial durante 3 min (**Tiempo de presurización**). Finalizada la etapa de presurización comienza el tiempo de muestreo (o de inyección), así, una alícuota de la fase gaseosa del espacio de cabeza fluyó durante 1,5 min (**Tiempo de inyección**) hacia la columna cromatográfica. Cuando aún restaba 0,1 min para que terminara el tiempo de inyección se desactivó el enfoque criogénico (**Tiempo postcriogénico**) y la cabeza de la columna recupera nuevamente la temperatura del programa establecido. Finalmente los analitos se transportaron en la columna por el gas portador a un flujo de 7,76 mL/min donde se separaron y se detectaron en el FID a la salida de la misma.

9.7. Características Analíticas del Método

Para acceder a las características analíticas del método se realizaron estudios de precisión y exactitud.

La precisión del método se evaluó analizando cinco réplicas de soluciones patrones de BTXs y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a diferentes niveles de concentración (0,625; 1,250; 2,500 y 5,000 $\mu\text{g/L}$).

Del mismo modo la estabilidad de todo el sistema cromatográfico se evaluó realizando los estudios de precisión durante un mismo día y en días diferentes.

El efecto de la matriz en el análisis se evaluó realizando una curva de adición de estándar de BTXs en las muestras de orina. Para ello se analizaron por el método propuesto 5 muestras de orina humana enriquecidas con los analitos en el intervalo de concentración de 0,050 a 5,000 $\mu\text{g/L}$ y un blanco.

La exactitud del método se estimó realizando un análisis de recuperación de los analitos de muestras de orina enriquecidas con BTXs a diferentes niveles de concentración entre 0,625 - 5,00 $\mu\text{g/L}$. Cada una de estas muestras se analizaron por triplicado y se evaluaron con la curva de calibración de soluciones patrones de los analitos.

10. Resultados y Discusión de los Resultados

10.1. Optimización de los Parámetros Instrumentales

La optimización de los parámetros instrumentales se realizó de manera de obtener un compromiso que permitiera la detección BTXs al nivel de concentración en que se encuentran en las muestras de orina, con una máxima resolución con respecto a otros componentes de la muestra y en un tiempo de análisis corto.

Para ello se utilizó el método de variar un parámetro a la vez y en un sistema como el que se presenta en la Figura 1, significó:

- ✦ Optimizar las condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases
 - ✓ Seleccionar la columna cromatográfica

- ✓ Optimizar las condiciones cromatográficas de la separación en la columna seleccionada
- ✓ Optimizar las Condiciones del sistema de detección: detector de ionización de llama (FID)
- ✶ Optimizar las condiciones de trabajo del Automuestreador de Espacio de Cabeza

10.2. Condiciones del Cromatógrafo de Gases

En el cromatógrafo de gases se realizó la separación de los diferentes solventes orgánicos en estudio utilizando la columna seleccionada.

La selección del gas portador o de arrastre juega también un papel importante en cuanto a sensibilidad se refiere. En este sentido se estudió, para la columna seleccionada, el efecto de utilizar como gas de arrastre N_2 o He. De este estudio se concluyó que el uso de N_2 no afectaba la fase estacionaria de la columna ni la sensibilidad del detector, además no alteraba la naturaleza de los analitos. Por lo antes expuesto se decidió trabajar con nitrógeno como gas portador debido a su bajo costo frente al del helio.

Una vez seleccionada la columna más adecuada y la naturaleza del gas portador, los parámetros involucrados que permitieron una buena optimización fueron:

- ✓ **El flujo del gas portador**
- ✓ **La temperatura de la columna** (que actúa sobre el tiempo de retención de los analitos que determina lo fino de los picos cromatográficos)
- ✓ **El volumen de muestra a inyectar** (que influye en la eficiencia de la columna y que logró establecerse cuando se optimizaron las condiciones de trabajo del automuestreador EC)

Asimismo debe fijarse una **temperatura del inyector** tal que evite la condensación de las especies que son arrastradas desde el vial del automuestreador EC⁽⁴⁹⁾.

10.2.1. Selección de la Columna Cromatográfica

Este estudio permitió seleccionar una columna que permitiera retener a los analitos (BTXs) con una buena resolución y un tiempo de análisis corto.

La columna cromatográfica estudiada fue:

- ☑ **Columna de sílice fundida AT-502.2 de 6% cianopropilfenil, 94% metilpolixiloxano (Alltech) de 30 m de longitud x 0,53 mm de diámetro interno y con un espesor de film de 3,0 μm .**

La cual posee una fase estacionaria de polaridad intermedia y para ella se optimizaron los parámetros involucrados en mejorar la resolución y sensibilidad. En este punto es importante señalar que en estudios preliminares realizados para muestras de orina pudimos constatar la presencia de ciertos compuestos presentes en la muestra como consecuencia del consumo de alguna bebida alcohólica. Por esta razón se procedió a estudiar la posible interferencia correspondiente a alguno de los principales metabolitos del etanol, acetona y acetato de etilo, o al mismo alcohol en la muestra que podían interferir en la separación.

En ese sentido, estos compuestos se tuvieron en cuenta en el momento de optimizar las variables involucradas en la separación en la columna cromatográfica seleccionada como: la naturaleza y flujo del gas portador; temperatura del inyector; programa de temperatura de la columna; temperatura del detector; relaciones de gases para el encendido de la llama en el caso del detector FID; cantidad de la muestra inyectada, que se detallan a continuación.

- ✓ Temperatura del inyector: 150 °C.
- ✓ Temperatura de la columna (u horno): 40 °C (5 min) hasta 100 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, de 100 °C hasta 200 °C (2 min) a una velocidad de 15 °C/min.
- ✓ Temperatura del detector: 200 °C.
- ✓ Flujo del gas portador: 7,76 mL/min.

En las Figura 3 y 4 se muestran los cromatogramas obtenidos para soluciones de patrones acuosos de BTXs y de posibles interferentes (Figura 3) y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a los mismos niveles de concentración (Figura 4).

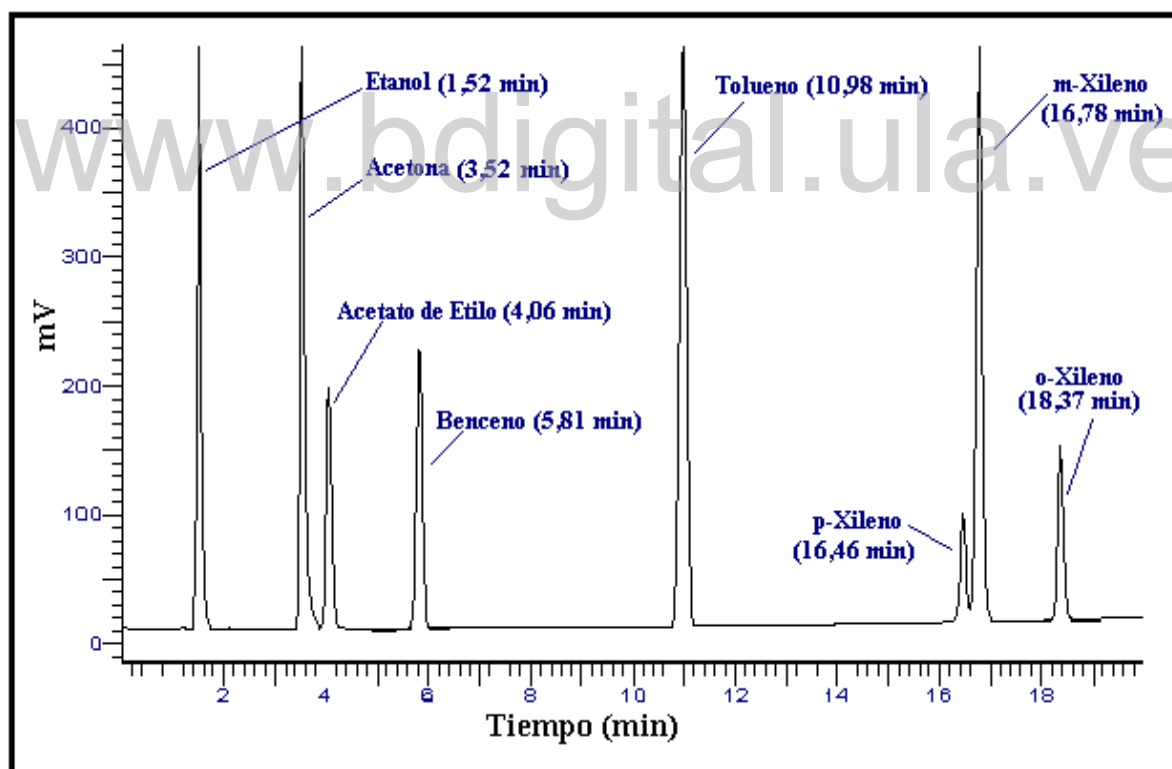


Figura 3. Cromatograma obtenido para mezcla de BTXs, etanol y sus metabolitos. Columna AT-502.2. Condiciones: Temperatura del inyector: 150 °C. Temperatura de la columna (u horno): 40 °C (5 min) hasta 100 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, de 100 °C hasta 200 °C (2 min) a una velocidad de 15 °C/min. Temperatura del detector: 200 °C. Flujo del gas portador: 7,76 mL/min.

Se puede observar, que con la columna seleccionada se logró obtener una buena resolución entre los BTXs, libre de interferencias y en un tiempo de análisis satisfactorio.

En conclusión, la columna AT-502.2 fue seleccionada para el resto del análisis. Cabe destacar que una vez integrado el sistema completo EC-TC-CG-FID algunas de las condiciones cromatográficas podrían ser nuevamente optimizadas.

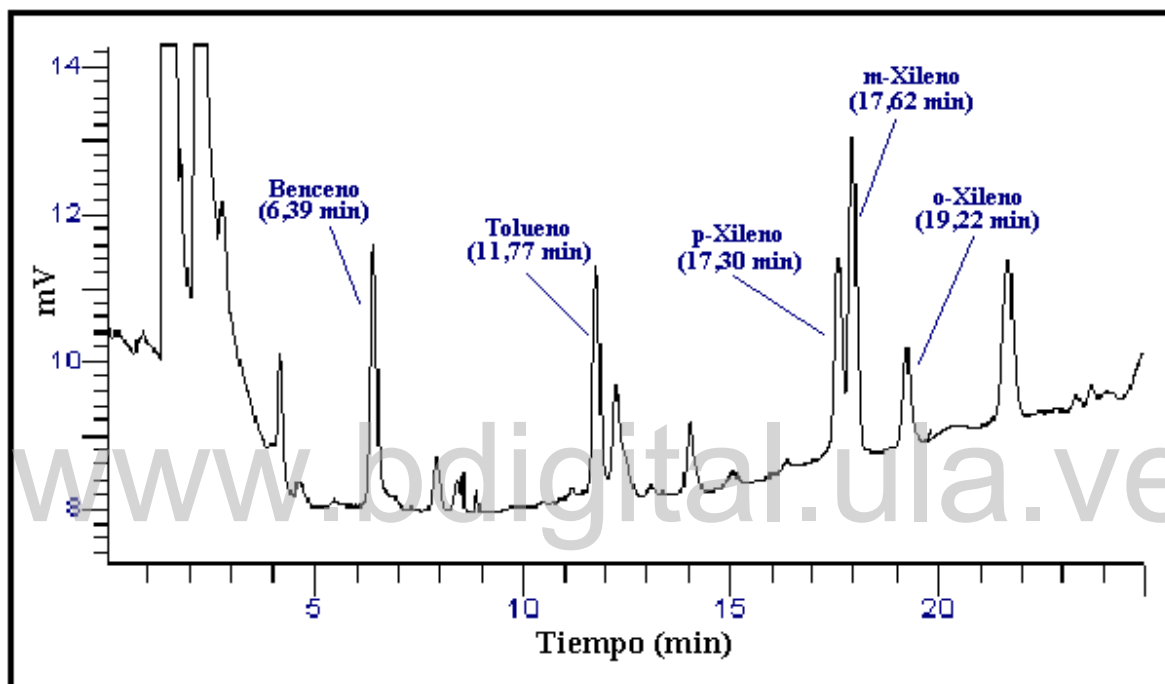


Figura 4. Cromatograma obtenido para 3 mL de orina enriquecida con BTXs a 5,00 $\mu\text{g/L}$. Condiciones: Temperatura del inyector: 150 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura de la columna (u horno): 40 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) hasta 100 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de 3 $^{\circ}\text{C/min}$, de 100 $^{\circ}\text{C}$ hasta 200 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) a una velocidad de 15 $^{\circ}\text{C/min}$. Temperatura del detector: 200 $^{\circ}\text{C}$. Flujo del gas portador: 7,76 mL/min.

10.2.2. Optimización de las Condiciones del Sistema de Detección

El sistema de detección empleado para la realización de este trabajo fue un detector de ionización de llama (FID). Su funcionamiento consiste en ionizar en una llama, formada por dos gases (hidrógeno y aire sintético), las especies carbonadas. Estas especies ionizadas generan una diferencia de corriente entre dos electrodos del detector que luego es registrada como una señal para la obtención del cromatograma.

La sensibilidad de este detector se determina al establecer la mejor relación entre el flujo de los dos gases que forman la llama y que determinan la temperatura de la misma. Esta relación se estableció en 1/10 de hidrógeno/aire, fijando un flujo de 44,6 mL/min y 420,3 mL/min para el hidrógeno y el aire, respectivamente. Además, se logró un buen compromiso en cuanto a sensibilidad se refiere al fijar la temperatura del bloque del detector en 200 °C.

11.2. Optimización de las Condiciones de Trabajo del Automuestreador EC

Los parámetros estudiados fueron:

- ✓ **Temperatura de termostatización**
- ✓ **Tiempo de termostatización**
- ✓ **Tiempo de inyección**
- ✓ **Tiempo de presurización**
- ✓ **Volumen de muestra en el vial**

Es importante señalar que, dependiendo de la sensibilidad alcanzada en el procedimiento, el tiempo de inyección puede ser elevado. Es por ello que con el fin de introducir en la columna segmentos puntuales de la muestra se necesitó utilizar una trampa criogénica o enfoque criogénico. Es por ello que se optimizaron otros dos parámetros del EC que tienen que ver con la preconcentración en línea por enfoque criogénico, como son:

- ✓ **Tiempo precriogénico**
- ✓ **Tiempo postcriogénico**

Por otra parte, fue necesario fijar también: una temperatura para la línea de transferencia que conduce la muestra gaseosa del automuestreador a la cabeza de la columna y una temperatura para la aguja que pincha el septum durante las etapas de presurización y muestreo.

El procedimiento de optimización se realizó, una vez más, por el método de variar un parámetro a la vez y utilizando soluciones patrones de los solventes orgánicos y muestras de orina enriquecidas con los analitos a diferentes niveles de concentración. Cabe señalar que se comenzó con condiciones de trabajo preliminares, las cuales se establecieron teniendo en cuenta las características físicas y químicas de los analitos a estudiar y, además, en base a algunos datos tomados de la literatura^(4-6,15).

Las condiciones iniciales se detallan a continuación:

- ✓ Temperatura de termostatización: 100 °C.
- ✓ Tiempo de termostatización: 20 min.
- ✓ Tiempo de inyección: 0,05 min
- ✓ Tiempo de presurización: 3 min
- ✓ Volumen de muestra en el vial: 2 mL.

La temperatura de la línea de transferencia y la temperatura de la aguja del EC se fijaron en 150 °C para evitar la condensación de los analitos en las mismas.

Por otra parte, los septum seleccionados para este trabajo fueron de teflón con revestimiento de silicona los cuales no mostraron afinidad para los analitos estudiados.

10.3.1. Temperatura de Termostatización

La temperatura de termostatización se varió entre 60 y 100 °C. Los resultados se muestran en la Figura 5 donde se graficaron las áreas de los picos de BTXs como función de la temperatura de termostatización.

Se puede observar que para todos los analitos hay un aumento en el área de pico a medida que aumenta la temperatura. Este comportamiento se debe a que el coeficiente de reparto (K g/l) depende de la temperatura. Al aumentar la temperatura por lo general aumenta K g/l de los analitos en el vial, aumentando la concentración de éstos en la fase gaseosa (o espacio de cabeza) ya que se

produce un desplazamiento del equilibrio termodinámico. Sin embargo, el aumento del K g/l para cada uno de los analitos no se realiza en la misma proporción.

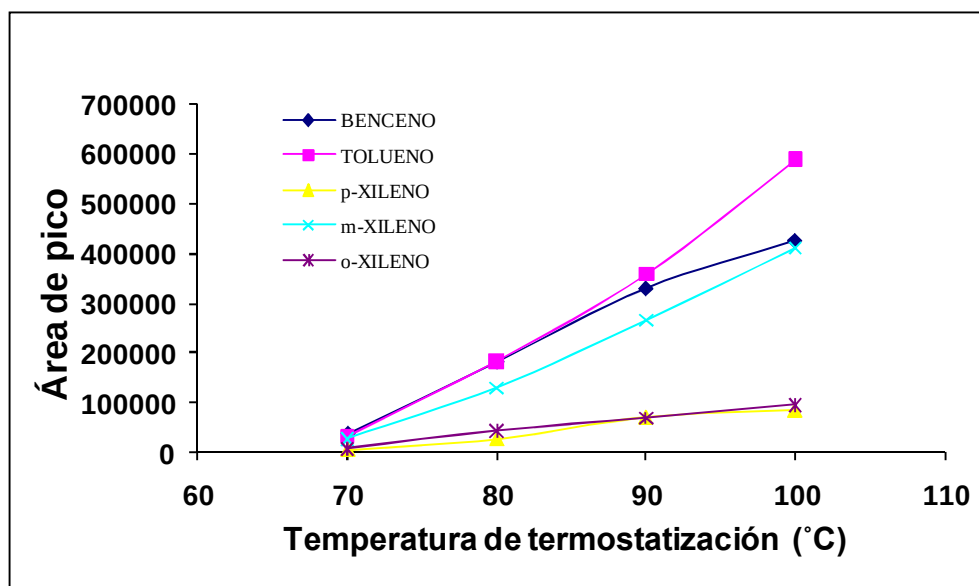


Figura 5. Efecto de la temperatura de termostatación en la sensibilidad de detección

Por otra parte, es importante tener en cuenta que las muestras de orina contienen un alto porcentaje de agua y durante la etapa de termostatación también genera vapor de agua en el espacio de cabeza y éste, por lo general, es incompatible con la fase estacionaria de la columna cromatográfica^(41,42), como lo es en este caso. En ese sentido, en la Figura 6 y 7 se muestran los cromatogramas obtenidos para una mezcla de los analitos a una concentración de 5,00 µg/L, realizados a las temperaturas de termostatación de 100 y 90 °C respectivamente. En ellas se puede observar alguno de los efectos que tiene el aumento de la cantidad de vapor de agua en el espacio de cabeza, como lo es la deformación de los picos cromatográficos (Fig 6).

En conclusión, se estableció la temperatura de termostatación de 90 °C para el resto del análisis como el mejor compromiso entre la sensibilidad y preservar la vida útil de la columna.

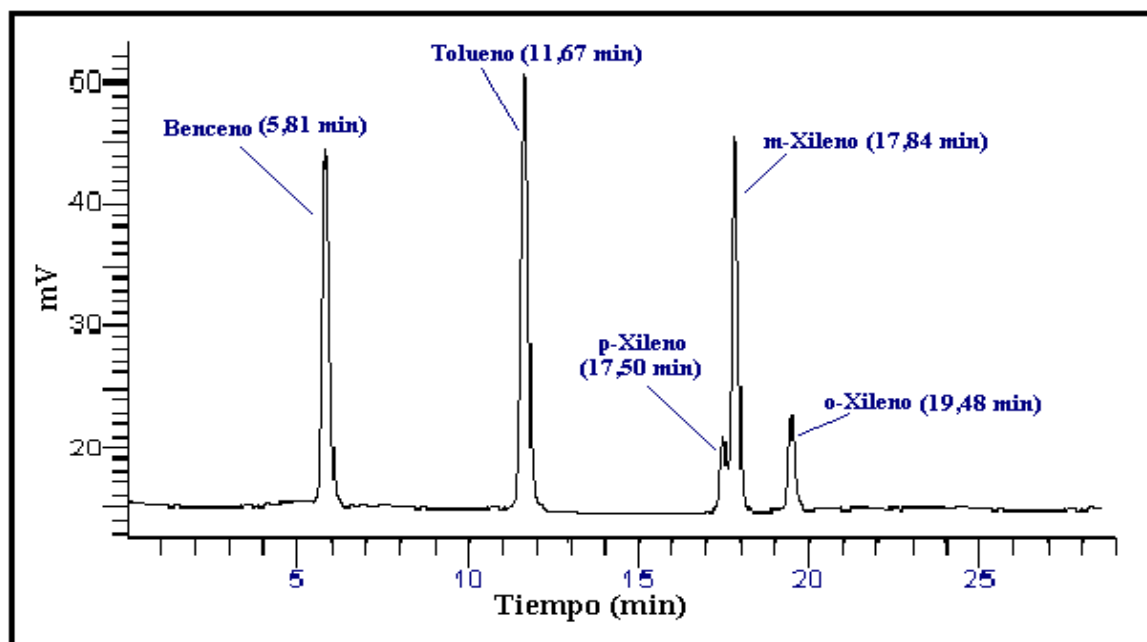


Figura 6. Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 $\mu\text{g/L}$ a una temperatura de termostatación de 100 °C. Condiciones: Temperatura del inyector: 150 °C. Temperatura de la columna (u horno): 40 °C (5 min) hasta 100 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, de 100 °C hasta 200 °C (2 min) a una velocidad de 15 °C/min. Temperatura del detector: 200 °C. Flujo del gas portador: 7,76 mL/min.

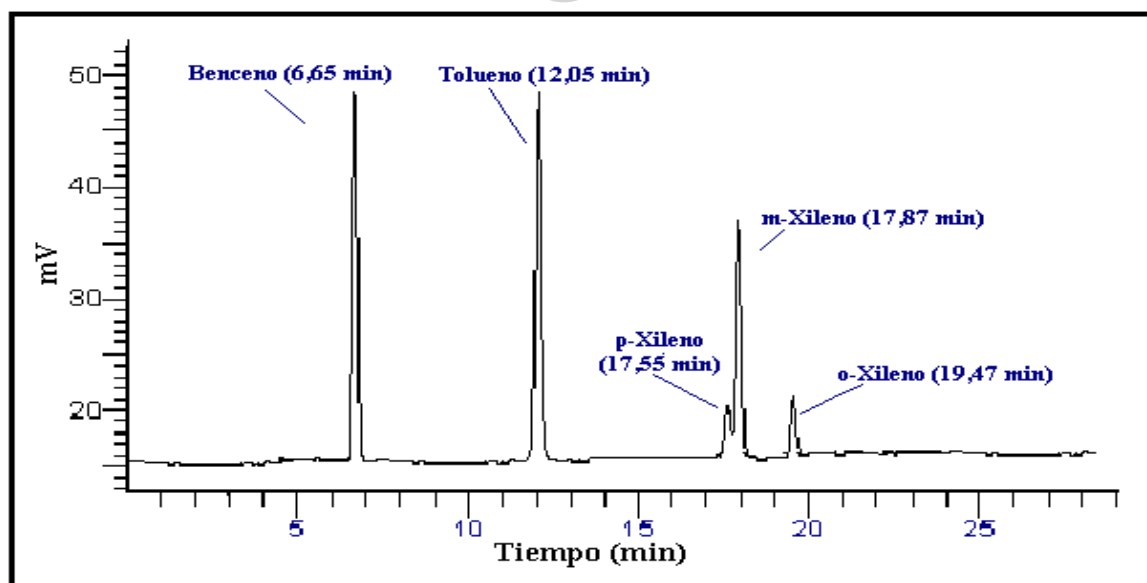


Figura 7. Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 $\mu\text{g/L}$ a una temperatura de termostatación de 90 °C. Condiciones: Temperatura del inyector: 150 °C. Temperatura de la columna (u horno): 40 °C (5 min) hasta 100 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, de 100 °C hasta 200 °C (2 min) a una velocidad de 15 °C/min. Temperatura del detector: 200 °C. Flujo del gas portador: 7,76 mL/min.

10.3.2. Tiempo de Termostatización

El tiempo de termostatización también juega un papel importante en la sensibilidad del método propuesto, ya que, como algunos autores^(13,14) lo afirman, un aumento en el tiempo de termostatización asegura el incremento de la concentración de los analitos en la fase gaseosa en el equilibrio, pues se logra un desplazamiento del equilibrio hacia esta fase. Es este sentido, se varió el tiempo de termostatización entre 5 y 20 min. En la Figura 8 se presentan los gráficos obtenidos de las áreas de los picos de BTXs en función del tiempo de termostatización para una temperatura de termostatización fijada en 90 °C.

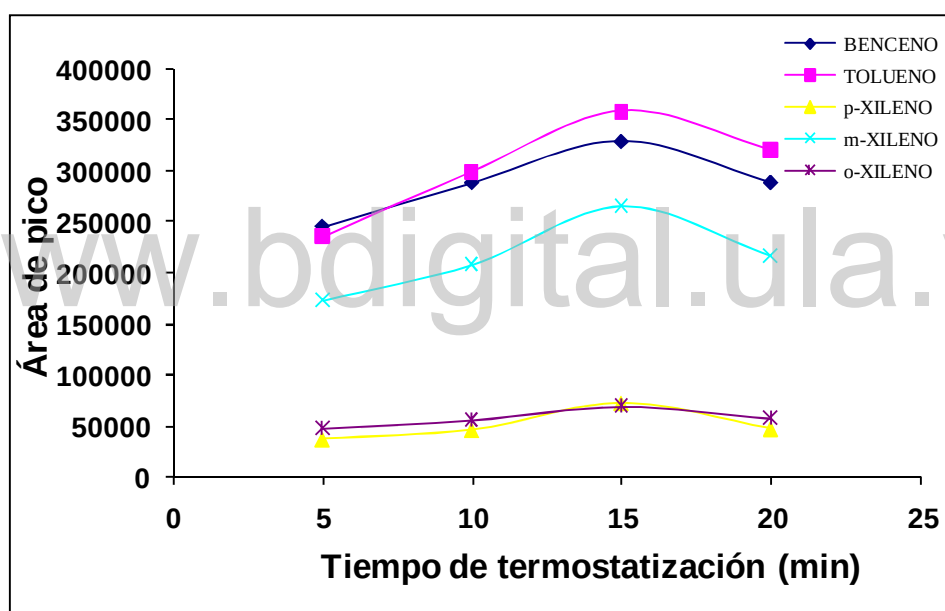


Figura 8. Efecto del tiempo de termostatización en la sensibilidad de detección

Se puede observar que, en efecto, la tendencia fue para todos los casos de un aumento del área del pico al aumentar el tiempo de termostatización hasta los 15 min y una ligera disminución para valores superiores. Este comportamiento puede deberse a una dilución de BTXs en el espacio de cabeza debido al aumento del vapor de agua en el mismo como consecuencia de un aumento del tiempo de termostatización. En ese sentido, teniendo en cuenta que a los 15 min ya se

alcanzaba el equilibrio líquido-gas para todos los analitos en el vial, se fijó éste como tiempo de termostatización para el resto del análisis.

10.3.3. Tiempo de Presurización

En el automuestreador de espacio de cabeza estático, el volumen de inyección se fija estableciendo un tiempo de inyección o de muestreo. El proceso de inyección en la columna se produce por un gradiente de presión desde el vial hacia la columna, por lo cual la presión en el espacio de cabeza debe ser mayor que la presión en la cabeza de la columna. Dependiendo de la volatilidad de los analitos, muchas veces, la presión del espacio de cabeza del vial después de la termostatización no es suficiente para que en la etapa de inyección ocurra.

Es por ello que se presenta la necesidad de llevar a cabo una etapa de presurización del vial con un gas inerte (nitrógeno en este caso) para aumentar la presión del espacio de cabeza. Es importante destacar que la presurización influye también en la forma de los picos ya que, en la etapa de muestreo, si la presión del vial es lo suficientemente elevada generará una inyección puntual en la cabeza de la columna, lo que se traduce en la obtención de picos finos y simétricos. Por otra parte, un tiempo de presurización muy elevado conduce a la dilución de los analitos en el espacio de cabeza.

Es por ello que, se estudió la variación de la señal del detector así como del área de pico en función del tiempo de presurización, el cual se varió entre 0,5 y 3 min. La Figura 9 representa los resultados que se obtuvieron.

Como puede observarse, una presurización del vial durante un tiempo de 3 min proporcionó buena sensibilidad para todos los analitos, por lo que se estableció éste como tiempo de presurización definitivo.

10.3.4. Tiempo de Inyección

El volumen de inyección se establece fijando un tiempo de inyección o de muestreo. En tal sentido, se varió el tiempo de muestreo desde 0,05 a 1,5 min y se midieron las áreas de los picos de los analitos. Se pudo comprobar para todos los

analitos que la señal de absorbancia aumentaba a medida que aumenta el tiempo de muestreo. Sin embargo, en todos los casos, a valores superiores 0,5 min los picos cromatográficos se ensanchaban ya que no se lograba una inyección puntual en el sistema y las áreas se hacían irreproducibles.

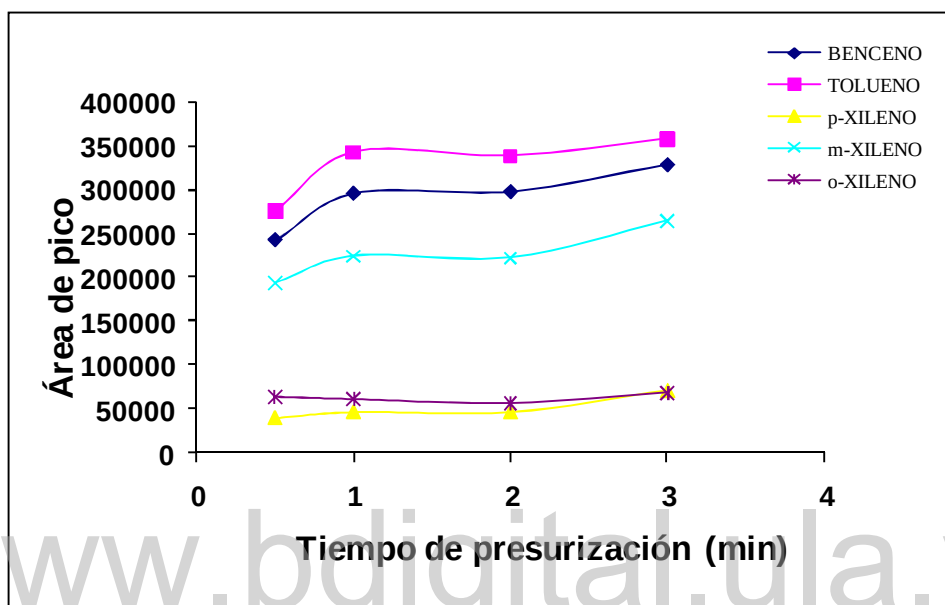


Figura 9. Efecto del tiempo de presurización en la sensibilidad de detección

En cromatografía de gases, la cantidad de muestra a inyectar depende de la capacidad de la columna definida como la máxima cantidad de muestra que se le puede inyectar sin que se sature la misma. Por su parte, la capacidad de la columna es función de la cantidad de fase estacionaria que esta posea, que para el caso de las columnas capilares depende del espesor del film y de la longitud de la columna.

Asimismo, la cantidad de muestra a inyectar influye en la eficiencia de la columna, es decir, en poder obtener picos finos y simétricos que permita una buena resolución entre los mismos⁽²⁹⁾. Para este caso en particular, debido a la baja concentración en que se encuentran los analitos en la orina, el poder inyectar una mayor cantidad de muestra disminuiría el límite de detección del procedimiento.

En consecuencia, para tiempos de muestreo superiores a 0,5 min la columna pierde eficiencia, lo que se manifiesta en un ensanchamiento de los picos con pérdida de resolución entre los analitos. Se pudo constatar que el ensanchamiento no se debía a una saturación de la columna sino al hecho de que la muestra no se inyectaba puntualmente. Este ensanchamiento de banda produjo una disminución en la señal analítica, un ensanchamiento de los picos cromatográficos y en consecuencia una pérdida de resolución entre los analitos estudiados.

En la Figura 10 se presenta un cromatograma obtenido bajo las condiciones optimizadas para un tiempo de muestreo de 0,5 min, que comprueba lo anteriormente dicho.

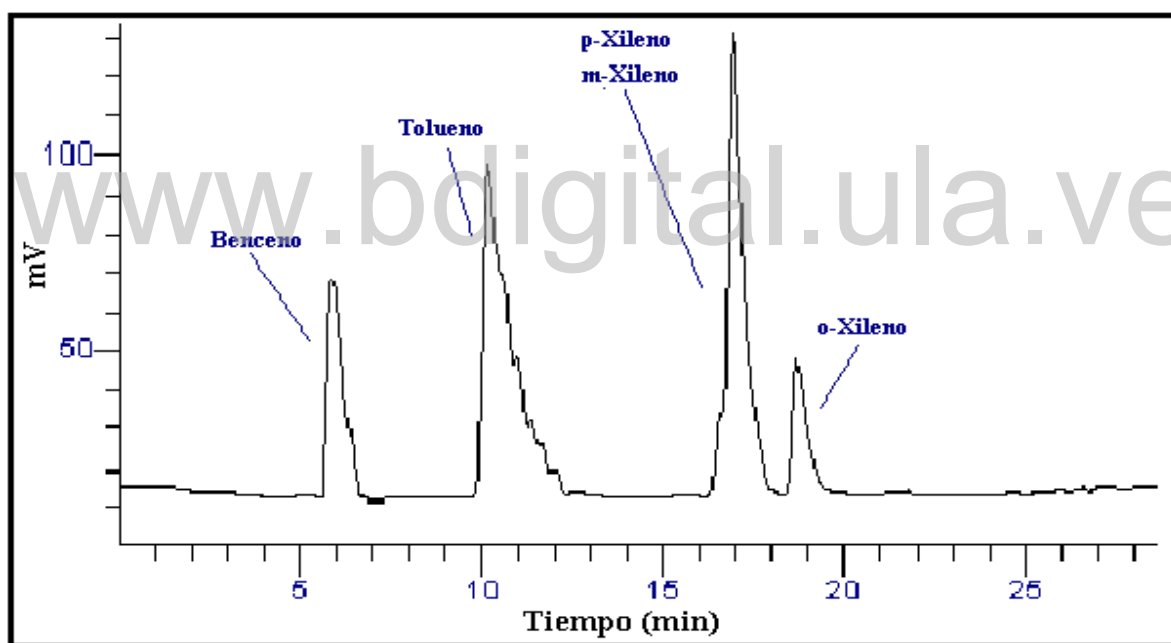


Figura 10. Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 1000 $\mu\text{g/L}$. Condiciones: Temperatura del inyector: 150 $^{\circ}\text{C}$. Temperatura de la columna (u horno): 40 $^{\circ}\text{C}$ (5 min) hasta 100 $^{\circ}\text{C}$ a una velocidad de calentamiento de 3 $^{\circ}\text{C/min}$, de 100 $^{\circ}\text{C}$ hasta 200 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) a una velocidad de 15 $^{\circ}\text{C/min}$. Temperatura del detector: 200 $^{\circ}\text{C}$. Flujo del gas portador: 7,76 mL/min. Con un tiempo de muestreo de 0,5 min

Para poder solventar este problema, se introdujo en el sistema un enfoque criogénico en la cabeza de la columna, que consiste en un dispositivo que permite enfriar la cabeza de la columna a bajas temperaturas, con nitrógeno líquido,

durante la etapa de muestreo. Esto impide que la muestra fluya en la columna durante el tiempo de muestreo, evitando así el ensanchamiento de los picos. De esta forma, se pueden preconcentrar, por enfriamiento, los analitos en la cabeza de la columna, logrando una inyección puntual, aunque se aumente el tiempo de inyección.

En ese sentido, utilizando el enfoque criogénico se varió el tiempo de inyección entre 0,5 y 2,0 min y en la Figura 11 se representa el gráfico del área de pico en función del tiempo de inyección. Se puede observar que el área de pico para todos los analitos aumenta a medida que se incrementa el tiempo de muestreo.

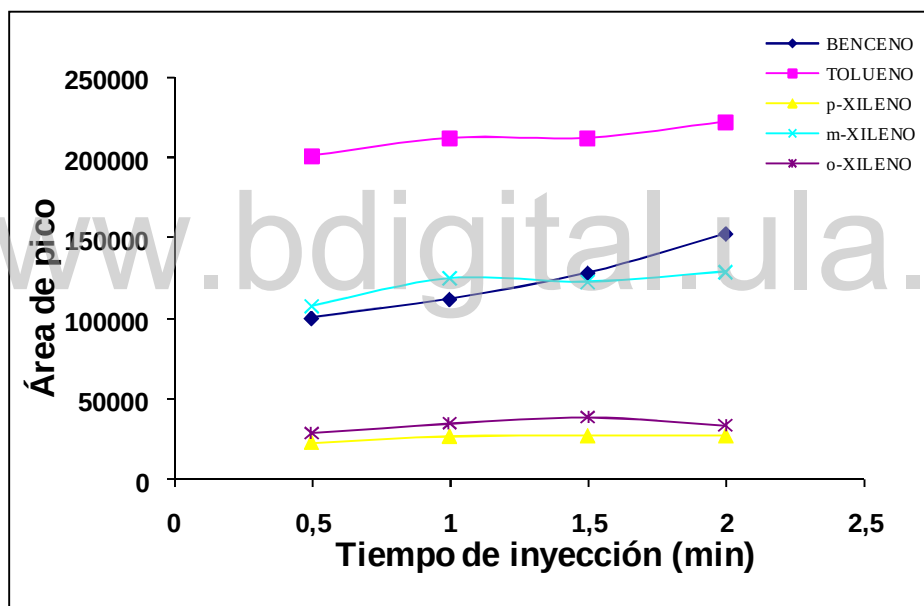


Figura 11. Efecto del tiempo de inyección en la sensibilidad de detección

Por otra parte, en la Figura 12 se muestra un cromatograma obtenido con enfoque criogénico para un tiempo de muestreo de 1,5 min. En él, se puede observar los picos finos correspondientes a BTXs con una buena resolución.

Cabe destacar que el uso del enfoque criogénico introdujo dos nuevos parámetros que son los tiempos pre y postcriogénico, que corresponden a los tiempos de enfriamiento antes y durante la inyección. El tiempo precriogénico

Delgado

determina la temperatura de enfriamiento que alcanza la cabeza de la columna y el postcriogénico el tiempo en que permanece a esa temperatura. Por consiguiente, éstos están relacionados con el tiempo de presurización y con el tiempo de inyección. Por otra parte, la temperatura que debe alcanzar la cabeza de la columna debe ser suficiente para evitar el desplazamiento de los analitos en la columna durante el tiempo de muestreo. Sin embargo, no debe ser demasiado baja que pueda producir la ruptura de la misma. Un buen compromiso se logró estableciendo 5,0 y 0,1 min como tiempo pre y postcriogénico, respectivamente.

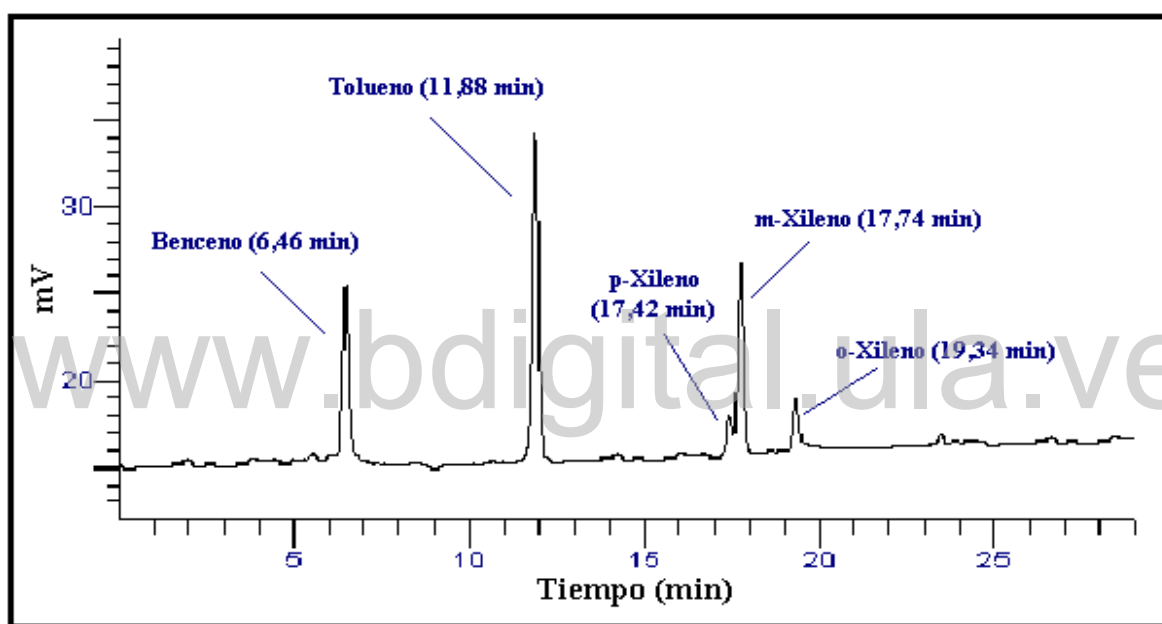


Figura 12. Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 $\mu\text{g/L}$. Condiciones: Temperatura del inyector: 150 °C. Temperatura de la columna (u horno): 40 °C (5 min) hasta 100 °C a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min, de 100 °C hasta 200 °C (2 min) a una velocidad de 15 °C/min. Temperatura del detector: 200 °C. Flujo del gas portador: 7,76 mL/min. Con un tiempo de inyección de 1,5 min

Adicionalmente, esta preconcentración se vió favorecida por el uso de una trampa de agua situada en la cabeza de la columna para secar la muestra del espacio de cabeza que se introducía en la misma. De esta forma, el enfoque criogénico permitió realizar una inyección puntual evitando el ensanchamiento de los picos cromatográficos. En consecuencia se fijó como tiempo de inyección 1,5 min.

10.3.5. Volumen de Muestra en el Vial

La sensibilidad del análisis depende del volumen de muestra que se coloca en el vial y del volumen del vial que determina el volumen del espacio de cabeza. A medida que aumenta el volumen del vial, mayor es la dilución de los analitos en el espacio de cabeza. Por otra parte, aunque el volumen del vial no influye en el coeficiente de reparto (K), el hecho de aumentar el volumen de muestra permite disminuir el volumen del espacio de cabeza y así evitar la dilución de los analitos⁽⁴⁶⁾.

En este caso se estudiaron viales con volúmenes de 22 y 9 mL. En la Figura 13 se muestra el comportamiento de las áreas de los picos de los analitos cuando se varió el volumen de la muestra desde 0,5 a 5,0 mL para una solución acuosa de BTXs a 1000 µg/L desde 0,5 a 5,0 mL para los viales de 22 mL (a), y desde 1,0 a 3,0 mL en los viales de 9 mL (b) a una concentración de BTXs de 5,00 µg/L.

Se puede observar, para los viales de 22 mL (Figura 13.a), que para todos los analitos hay un aumento significativo de la señal hasta un volumen de 3,0 mL y para valores superiores el aumento es menor.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Meuleman y col.⁽⁴⁴⁾ y Penton y col.⁽⁴²⁾. Por otra parte, para valores superiores a 3 mL, la señal perdía reproducibilidad. En consecuencia un volumen de muestra de 3 mL se fijó para la realización de este trabajo.

Sin embargo, para lograr una mayor sensibilidad del método fue necesario reducir el espacio de cabeza puesto bajo las mismas condiciones de trabajo optimizadas. En la Figura 13. b se puede observar que el uso de los viales de 9 mL mejoró la sensibilidad, ya que los valores de las áreas de los picos de los analitos fueron mayores para una mezcla de BTXs de menor concentración (tres ordenes de magnitud).

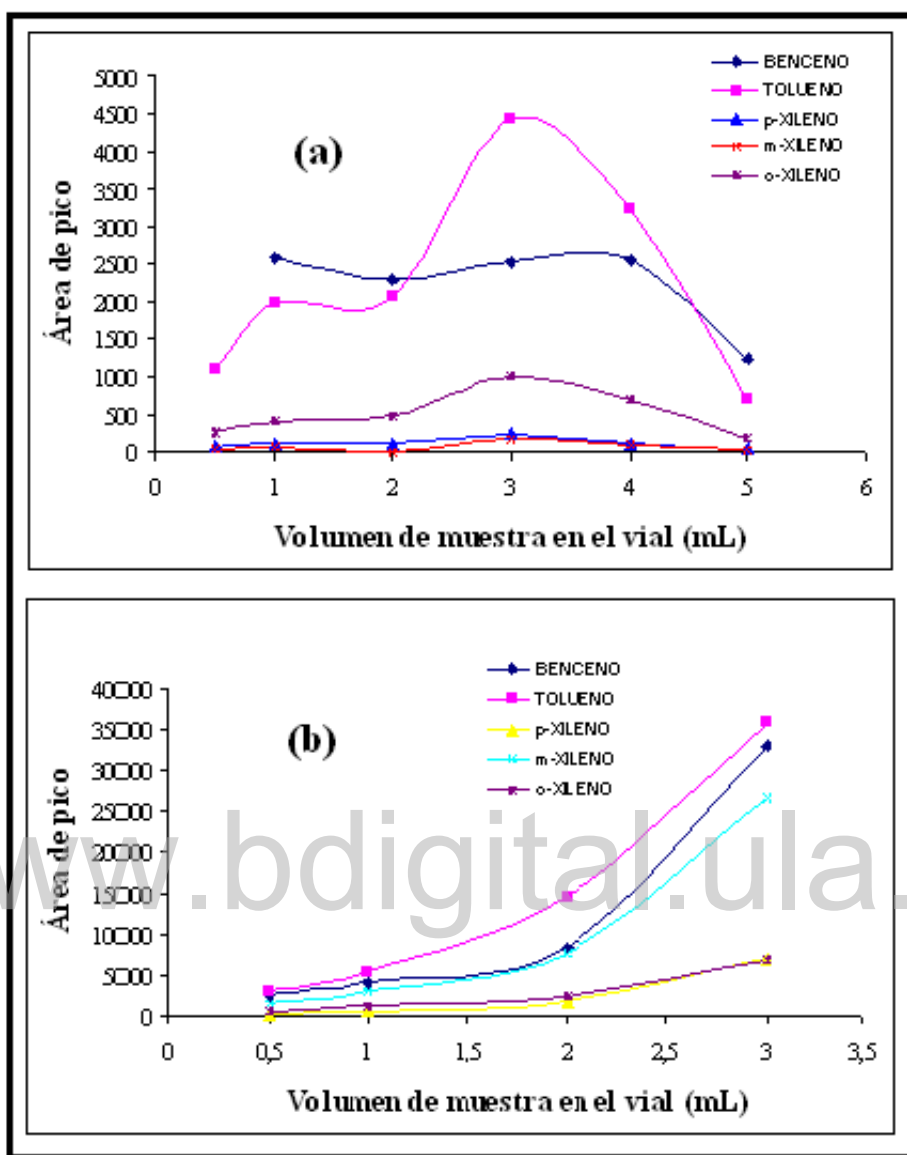
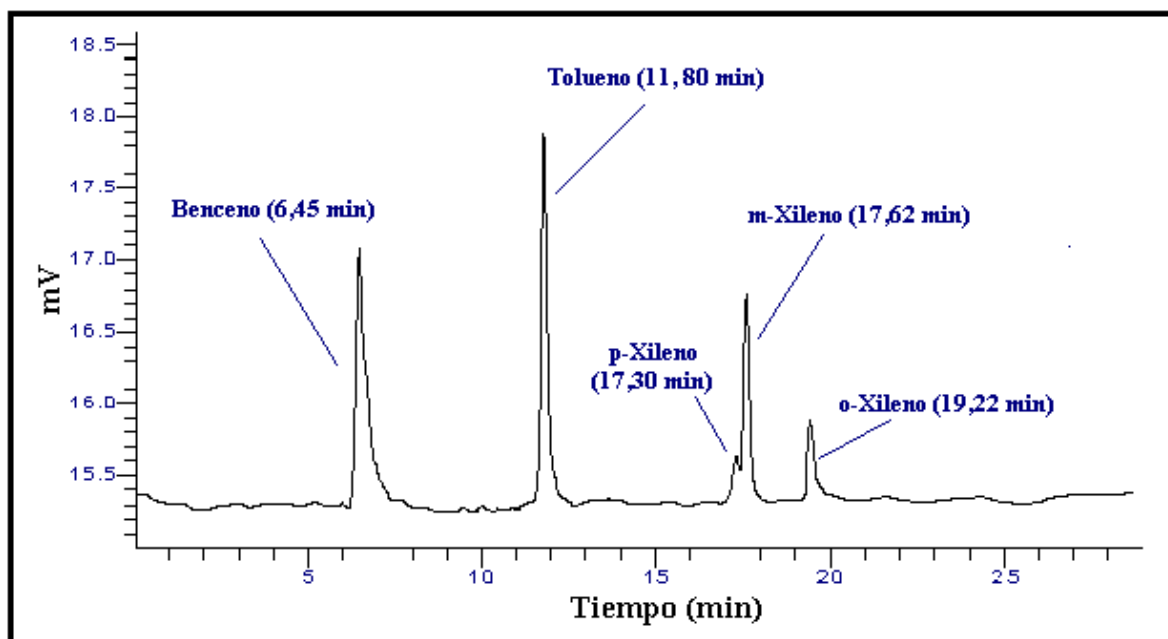


Figura 13. Efecto del volumen de muestra en el vial en la sensibilidad de detección, para viales de 22 mL (a) y de 9 mL (b)

En conclusión, en la Tabla 10 se resumen las condiciones optimizadas del procedimiento y en la Figura 14 se muestra un cromatograma obtenido bajo estas condiciones optimizadas.

Tabla 10. Parámetros optimizados del sistema EC-CG-FID-Enfoque Criogénico

Equipo	Parámetro	Valor
Automuestreador de Espacio de Cabeza	Temperatura de la aguja	150 °C
	Temperatura de la transferencia	150 °C
	Temperatura de termostatación	90 °C
	Tiempo de termostatación	15,0 min
	Tiempo de presurización	3,0 min
	Tiempo de inyección	1,5 min
	Válvula de alta presión	70,0 psi
	Volumen de muestra	3,0 mL
	Tiempo pre-criogénico	5,0 min
	Tiempo post-criogénico	0,1 min
	Presión de N ₂ del enfoque criogénico	60,0 psi
Cromatógrafo De Gases	Programa de Temperatura de la Columna	40 °C(5') 3 °C/min 100°C 20 °C/min 200 °C(2')
	Temperatura del Inyector	150 °C
	Flujo del Gas Portador (N ₂)	7,76 mL/min
Detector de Ionización de llama	Flujo del Hidrógeno	44,60 mL/min
	Flujo del Aire Sintético	420,30 mL/min
	Temperatura Atenuación	200 °C

**Figura 14.** Cromatograma obtenido para 3 mL de una mezcla de BTXs de 0,625 µg/L bajo las condiciones optimizadas de la Tabla 10

11. Validación del Método

11.1. Efecto de Matriz

La adición de sales a muestras acuosas de compuestos orgánicos volátiles por lo general aumenta el K (g/l) de los mismos, exaltando así la sensibilidad por un aumento de su concentración en el espacio de cabeza⁽⁴²⁾.

Particularmente, para el caso de los hidrocarburos, la fuerza iónica del medio influye sobre la solubilidad de los mismos. En ese sentido, el aumento de la fuerza iónica de la solución disminuye la solubilidad de hidrocarburos en la misma, favoreciendo de este modo su pase a la fase gaseosa del espacio de cabeza⁽³⁰⁾.

Las muestras en las que se evaluaron el contenido de BTXs son muestras de orina que contienen un alto contenido salino. Particularmente el NaCl es la sal que se encuentra en mayor proporción y es por ello que se realizó un estudio de la influencia de esta sal sobre la concentración de los analitos en el espacio de cabeza.

Para estudiar este efecto, se enriquecieron con diferentes cantidades de NaCl, tanto a patrones acuosos de BTXs como a muestras de orina enriquecidas con los analitos y se analizaron por el método propuesto.

Para ello se colocaban 3 mL del patrón o de la muestra de orina enriquecidas con BTXs a 5,00 µg/L de concentración en un vial de 9 mL que contenía cantidades crecientes de NaCl desde 0 a 1 g. Todos los viales se sometieron al procedimiento propuesto y se midieron las áreas de los picos de los analitos para cada caso. En las Figuras 15 y 16 se muestran los resultados obtenidos para BTXs en agua y orina, respectivamente.

En ambas figuras se puede observar en general que existe una tendencia a aumentar el área del pico a medida que aumenta la cantidad de NaCl hasta un valor de 0,400 g y una constancia para valores superiores. Este comportamiento, como se dijo anteriormente, se debe a que el K (g/l) de cada analito aumenta con el aumento de NaCl. Sin embargo dependiendo de la estructura y del peso molecular de cada analito este comportamiento ocurre en mayor o menor

extensión. Así puede observarse que los analitos que se ven menos afectados por este efecto salino son los *o*- y *p*- xileno, mientras que el efecto es mayor para el benceno, tolueno y *m*-xileno. Estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura⁽⁴²⁾.

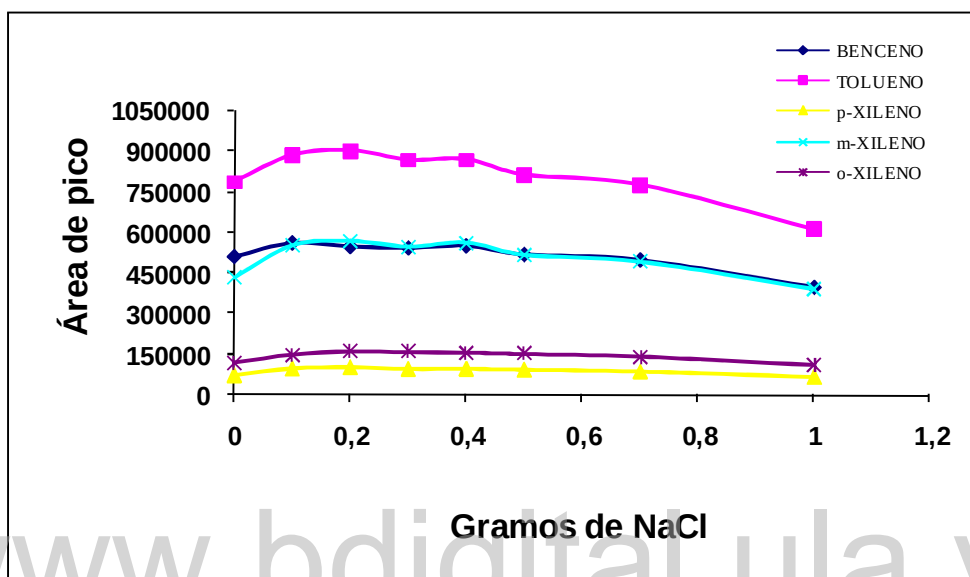


Figura 15. Efecto de la cantidad de NaCl añadido a 3 mL de una mezcla acuosa de BTXs de 5,00 µg/L

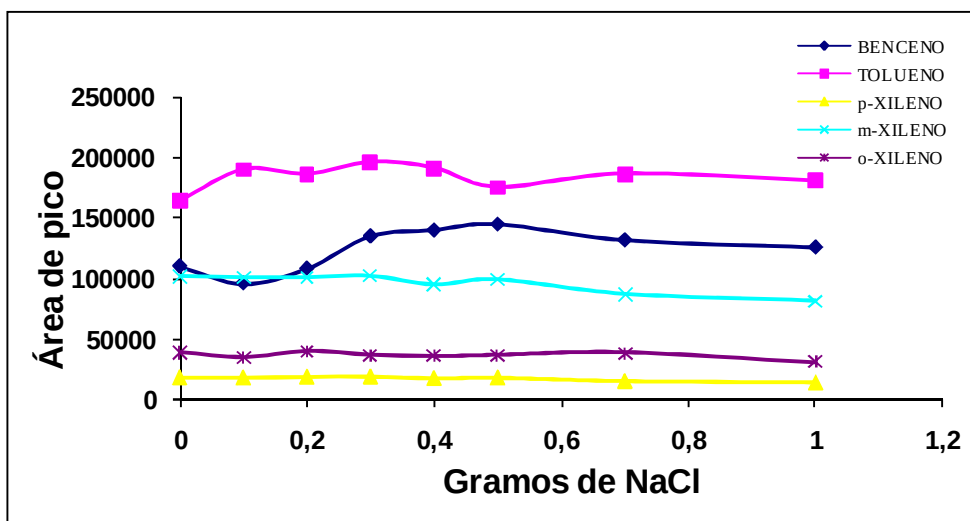


Figura 16. Efecto de la cantidad de NaCl añadida a 3 mL de una mezcla de BTXs de 5,00 µg/L en orina.

En conclusión, en vista de que existe un efecto matriz sobre la señal de los analitos, para unos en mayor y para otros en menor extensión, se decidió saturar las soluciones de patrones y muestras con NaCl agregando 1,00 g de la sal en cada vial que contiene 3 mL de la muestra.

Posteriormente, para verificar la corrección del efecto de la matriz en el análisis, se realizaron curvas de calibración de soluciones patrones de BTXs y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a los mismos niveles de concentración por el método de adición de estándar; en ambos casos se saturaron las soluciones con 1,00 g de NaCl. Para todos los casos los intervalos de concentración estudiados fueron: 0,10 – 5,00 µg/L. Cada gráfico de calibración incluyó una serie de 5 puntos y un blanco medidos un mínimo de tres veces cada uno. En la Tabla 11 se muestran las ecuaciones de regresión lineal del área de pico en función de la concentración de cada analito. Se puede observar que para todos los casos las pendientes de las curvas de los patrones y la de las muestras de orina enriquecidas con los analitos no difieren significativamente (prueba t de Student: en todos los casos $t_{\text{tabulada}} > t_{\text{calculada}}$, para un 99 % de probabilidad). Este comportamiento nos permite concluir que no existe interferencia de la matriz en el análisis y que se pueden evaluar los niveles de concentración de BTXs en las muestras de orina utilizando la curva de calibración de los patrones acuosos.

Tabla 11. Características analíticas de las rectas de calibrado

Analito	Matriz	Ecuación de regresión lineal $A = mC + b$ *	R^2	Intervalo dinámico (µg/L)
Benceno	Estándar	$A = 18677 C$	0,9956	0,10 - 5,0
	Orina	$A = 18511 C + 108253$	0,9958	0,10 - 5,0
Tolueno	Estándar	$A = 13151 C$	0,9986	0,10 - 5,0
	Orina	$A = 13266 C + 15593$	0,9998	0,10 - 5,0
p-Xileno	Estándar	$A = 1701,6 C$	0,9953	0,20 - 5,0
	Orina	$A = 1757,4 C + 3797,7$	0,9920	0,20 - 5,0
m-Xileno	Estándar	$A = 13505 C$	0,9996	0,10 - 5,0
	Orina	$A = 13487 C + 20706$	0,9990	0,10 - 5,0
o-Xileno	Estándar	$A = 4435,8 C$	0,9939	0,10 - 5,0
	Orina	$A = 4414,2 C + 5390$	0,9994	0,10 - 5,0

* A: área del pico en unidades arbitrarias; m: pendiente de la recta de calibrado; C: Concentración del analito en µg/L y b: corte en el origen

11.2. Intervalo Lineal

El intervalo de concentraciones estudiado bajo las condiciones óptimas del procedimiento (Ver Tabla 10) fue lineal para todos los analitos entre 0,2 y 5,0 µg/L de concentración. En la Tabla 11 se puede observar que el coeficiente de regresión lineal al cuadrado (R^2) fue superior a 0,9939 para todos los casos.

11.3. Precisión

La precisión del procedimiento se estimó por la medición de las áreas de los picos de 5 réplicas de soluciones patrones de BTXs y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a diferentes niveles de concentración. En las Tablas 12, 13 y 14 se presentan los resultados obtenidos para los análisis realizados durante un mismo día y en días diferentes.

Tabla 12. Estudio de la precisión del método para el benceno

Matriz	Concentración (µg/L)	D.E.R ^a (n=5) %	Concentración (µg/L)	D.E.R ^b (n=5)%
Estándar acuoso	0,625 ± 0,03	4,8	0,625 ± 0,03 ^b	5,6
	1,25 ± 0,06	4,8	1,25 ± 0,07	5,6
	2,50 ± 0,09	3,9	2,50 ± 0,09	3,6
	5,00 ± 0,05	1,0	5,00 ± 0,08	1,6
Orina	0,625 ± 0,03	4,8	0,625 ± 0,03	5,0
	1,25 ± 0,05	4,2	1,25 ± 0,05	4,0
	2,50 ± 0,12	4,8	2,50 ± 0,14	5,6
	5,00 ± 0,09	1,8	5,00 ± 0,11	2,2

Tabla 13. Estudio de la precisión del método para el tolueno

Matriz	Concentración (µg/L)	D.E.R ^a (n=5) %	Concentración (µg/L)	D.E.R ^b (n=5)%
Estándar	0,625 ± 0,03	4,8	0,625 ± 0,03	4,8
	1,25 ± 0,05	4,0	1,25 ± 0,06	4,8
	2,50 ± 0,07	2,8	2,50 ± 0,10	4,0
	5,00 ± 0,06	1,2	5,00 ± 0,08	1,6
Orina	0,625 ± 0,02	3,2	0,625 ± 0,03	4,8
	1,25 ± 0,06	4,8	1,25 ± 0,07	5,6
	2,50 ± 0,10	4,0	2,50 ± 0,11	4,4
	5,00 ± 0,08	1,6	5,00 ± 0,10	2,0

Tabla 14. Estudio de la precisión del método para los xilenos

Analito	Matriz	Concentración (µg/L)	D.E.R ^a (n=5) %	Concentración (µg/L)	D.E.R ^b (n=5) %
p-Xileno	Estándar	0,625 ± 0,01	3,2	0,625 ± 0,02	3,2
		1,250 ± 0,01	0,8	1,250 ± 0,03	2,4
		2,50 ± 0,02	0,9	2,50 ± 0,03	1,2
		5,00 ± 0,04	0,8	5,00 ± 0,05	1,0
	Orina	0,625 ± 0,02	3,2	0,625 ± 0,03	4,8
		1,25 ± 0,04	3,2	1,25 ± 0,05	4,0
		2,50 ± 0,05	2,0	2,50 ± 0,07	2,8
		5,00 ± 0,04	0,8	5,00 ± 0,08	1,6
m-Xileno	Estándar	0,625 ± 0,02	3,2	0,625 ± 0,02	3,2
		1,25 ± 0,02	1,6	1,25 ± 0,03	2,4
		2,50 ± 0,10	4,0	2,50 ± 0,09	3,6
		5,00 ± 0,12	2,5	5,00 ± 0,14	2,8
	Orina	0,625 ± 0,03	4,8	0,625 ± 0,03	4,8
		1,25 ± 0,05	4,0	1,25 ± 0,07	5,6
		2,50 ± 0,11	4,4	2,50 ± 0,12	4,8
		5,00 ± 0,15	3,0	5,00 ± 0,14	2,8
o-Xileno	Estándar	0,625 ± 0,01	1,6	0,625 ± 0,02	3,2
		1,25 ± 0,05	4,0	1,25 ± 0,06	4,0
		2,50 ± 0,04	1,6	2,50 ± 0,04	1,6
		5,00 ± 0,09	1,8	5,00 ± 0,10	2,0
	Orina	0,625 ± 0,02	3,2	0,625 ± 0,03	4,8
		1,25 ± 0,04	3,2	1,25 ± 0,07	5,6
		2,50 ± 0,06	2,4	2,50 ± 0,06	2,4
		5,00 ± 0,10	2,0	5,00 ± 0,12	2,5

Para las tres Tablas se expresa $\bar{X} \pm s$ que corresponde al valor de la media del área $\pm$ la desviación estándar para N=5, (a): en un mismo día y (b): en días diferentes.

Se puede concluir que existe una buena precisión del método, la desviación estándar relativa (n=5) en un día tanto para los patrones acuosos como para las muestras de orina enriquecidas fueron menores del 4,8 % en todos los casos. Del mismo modo el hecho de que la desviación estándar relativa evaluada en días diferentes (n=5) fuera menor que 5,6 % asegura una buena estabilidad de todo el sistema cromatográfico utilizado.

11.4.Exactitud

La exactitud del método se evaluó realizando estudios de recuperación. Para ello se evaluaron por el método propuesto 9 muestras de orina enriquecidas con BTXs a 3 niveles de concentración (0,625, 1,25 y 5,0 µg/L) y se evaluaron con

Delgado

las curvas de calibrado (ver Tabla 11). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 15. En esta se puede observar que los porcentajes de recuperación para todos los casos se encuentran entre 95,3 y 105,0 % que pueden ser considerados cuantitativos y satisfactorios.

Tabla 15. Estudio de recuperación de los analitos desde muestras de orina

Analito	Concentración Añadida ($\mu\text{g/L}$)	% Recuperación
Benceno	0,625	95,8
	1,25	102,2
	5,00	99,8
Tolueno	0,625	99,9
	1,25	97,7
	5,00	105,0
p-Xileno	0,625	97,1
	1,25	104,7
	5,00	105,0
m-Xileno	0,625	97,5
	1,25	95,5
	5,00	99,3
o-Xileno	0,625	95,3
	1,25	95,7
	5,00	95,7

11.5 Límite de Cuantificación y de Detección

El límite de cuantificación del procedimiento descrito fue de 0,10, 0,10, 0,200, 0,10 y 0,15 $\mu\text{g/L}$ para benceno, tolueno, p-, m- y o- xileno respectivamente. Por otra parte, el límite de detección del método definido como la concentración del analito que permite obtener un área del pico tres veces la señal del ruido de fondo fue de: 0,030 $\mu\text{g/L}$ para benceno, tolueno, m- y o- xilenos y de 0,060 $\mu\text{g/L}$ para p-xileno.

11.6. Análisis de Muestras de Orina

Utilizando el método propuesto se analizaron muestras de orina de trabajadores de algunas estaciones de servicio de la ciudad de Mérida.

La selección de estas muestras se justifica en el hecho de que estos individuos se consideran que están expuestos laboralmente. La manera más probable de exponerse es respirando los vapores de la gasolina en las estaciones de servicio cuando se llena el tanque del automóvil.

Se sabe que la gasolina de automóvil se deriva del petróleo en el proceso de refinación y contiene más de 150 productos químicos incluyendo pequeñas cantidades de benceno, tolueno y xilenos. Sin embargo, la gasolina es una mezcla manufacturada y su composición efectiva depende de la manera como se manufactura, de la fuente de petróleo crudo y del fabricante.

En la Tabla 16, se presentan los resultados obtenidos. Se puede observar que en todos los casos se detectaron los analitos estudiados (BTXs).

Tabla 16. Resultados del análisis de BTXs en muestras de orina en µg/L

Muestra	Benceno	Tolueno	p-Xileno	m-Xileno	o-Xileno
1	1,46	0,42	6,43	35,40	1,24
2	0,78	0,28	3,55	8,50	0,66
3	1,12	0,48	5,03	7,61	1,60
4	0,82	0,57	3,39	12,77	1,59
5	0,83	0,70	2,81	3,63	-
6	1,32	0,64	4,14	23,29	1,67
7	-	0,22	0,85	1,02	-
8	0,42	1,07	5,06	11,36	2,26
9	-	2,34	4,68	1,71	0,93
10	-	2,32	-	6,07	1,89

Muestras 1, 2, 3 y 4 de individuos de E/S Alto Chama; 5, 6, 7 y 8 de individuos de E/S Las Tapias; 9 y 10 de individuos de E/S Urdaneta

Es importante destacar que el análisis de estas muestras constituye únicamente un estudio preliminar cuyo fin era el comprobar que el método es válido para evaluar BTXs en muestras de orina.

12. Conclusiones

En este trabajo se desarrolló un método sensible, preciso y exacto para la determinación de BTXs en muestras de orina humana.

➡ La selección de la columna AT 502.2 de sílice fundida, con el programa de temperatura optimizado, permitió la separación de los analitos objeto de estudio con una buena resolución y un tiempo de análisis satisfactorio.

➡ La utilización de la técnica de espacio de cabeza permitió extraer cuantitativamente a BTXs de la matriz con un mínimo de interferencias.

➡ El tratamiento de la muestra determinó que el único efecto de matriz existente es el salino debido al alto contenido de sales que presenta la muestra. Sin embargo, se comprobó que se puede evaluar BTXs en muestras de orina utilizando una curva de calibración preparada a partir de soluciones patrones de los analitos saturadas con 1,0 g de NaCl.

➡ El acoplamiento al sistema de un enfoque criogénico en línea permitió disminuir el límite de detección del método a valores por debajo del nivel de BTXs que se puede encontrar en las muestras de orina.

➡ Finalmente, el utilizar un automuestreador de EC que permite realizar la etapa de tratamiento de la muestra en línea simultáneamente con la etapa de separación de los analitos de la inyección previa, mejoró la frecuencia de análisis.

13. Bibliografía

- (1) Perbellini, L. Pasini, F. Romani, S. Princivale, A. Brugnone, F. **Analysis of benzene, toluene, ethylbenzene and *m*-xylene in biological samples from the general population.** Journal of Chromatography B. 778, 199-210, 2002.
- (2) Lauwerys, R. **Toxicología Industrial e Intoxicaciones Profesionales.** 2^{da} edición 239, 2004
- (3) Klaassen, C. Watkins, J. **Manual de Toxicología.** 5^a Edición. Mcgraw-Hill Interamericana. 2001.

- (4) Melikian, A. Qu, Q. Shore, R. Li, G. Li, H. Jin, X. Cohen, B. Chen, L. Li, Y. Yin, S. Mu, R. Zhang, S. Wang, Y. **Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and *trans-trans*-muconic acid.** Journal of Chromatography B. 778, 211-221, 2002.
- (5) Fujii, T. Kawabe, S. Horike, T. Taguchi, T. Ogata, M. **Simultaneous determination of the urinary metabolites of toluene, xylene and styrene using high-performance capillary electrophoresis Comparision with high-performance liquid chromatography.** Journal of Chromatography B. 730, 41-47, 1999.
- (6) Ele, K. Jermann, E. Begerow, J. Dunemann L. **Determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in indoor air at environmental levels using diffusive samplers in combination with headspace solid-phase microextraction and high-resolution gas chromatography-flame ionization detection.** Journal of Chromatography A. 826, 191-200, 1998.
- (7) Ladrón de G. Moya P. **Toxicología Médica Clínica y Laboral.** Mcgraw-Hill Interamericana. Capítulo 53. 1995.
- (8) Ellenhorn, M. Barceloux, D. **Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning.** Elsevier. U.S.A. 1988.
- (9) Ljungkvist, G. Lärstad M. Mathiasson, L. **Specific determination of benzene in urine using dynamic headspace and mass-selective detection.** Journal of Chomatography B. 721, 39-46, 1999.
- (10) Hung, I. Lee, S. Chen, R. **Simultaneous determination of benzene, toluene, etylbenzene, and xylenes in urine by thermal desorption-gas chromatography.** Journal of Chromatography B. 706, 352-357, 1998.
- (11) Joos, P. Godoy, A. De Jong, R. de Zeeuw, J. Van Grieten, R. **Trace análisis of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers in environmental simples by low-pressure gas chromatography-ion trap mass espectrometry.** Journal of Chromatography A. 985, 191-196, 2003.
- (12) Tuduri, L. Desauziers, V. Fanlo, J.L. **Dynamic versus static sampling for the quantitative analysis of volatile organic compounds in air with**

- polydimethylsiloxane-Carboxen solid-phase microextraction fibers.** Journal of Chromatography A. 963, 49-56, 2002.
- (13) Czaplicka, M. Klejnowski, K. **Determination of volatile organic compounds in ambient air Comparison of methods.** Journal of Chromatography A. 976, 369-376, 2002.
- (14) Yamamoto, N. Okayasu, H. Hiraiwa, T. Murayama, S. Maeda, T. Morita, M. Suzuki, K. **Continuous determination of volatile organic compounds in the atmosphere by an automated gas chromatographic system.** Journal of Chromatography A. 819, 177-186, 1998.
- (15) Haser, B. Popp, Peter. **Combining membrane extraction with mobile gas chromatography for the field analysis of volatile organic compounds in contaminated waters.** Journal of Chromatography A. 909, 3-12, 2001.
- (16) Wang, J. Chen, S. Chew, C. **Automated gas chromatography with cryogenic/sorbent trap for the measurement of volatile organic compounds in the atmosphere.** Journal of Chromatography A. 863, 183-193, 1999.
- (17) Yassaa, N. Meklati, B. Y. Cecinato, A. **Analysis of volatile organic compounds in the ambient air of Algiers by gas chromatography with a γ -cyclodextrin capillary column.** Journal of Chromatography A. 846, 287-293, 1999.
- (18) Martínez, E. Lacorte, S. Liobert, I. Viana, P. Barceló, D. **Multicomponent analysis of volatile organic compounds in water by automated purge and trap coupled to gas chromatography-mass spectrometry.** 959, 181-190, 2002.
- (19) Nardi, L. **Capillary extractors for “negligible depletion” sampling of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes by in-tube solid-phase microextraction.** Journal of Chromatography A. 985, 85-91, 2003.
- (20) Huybrechts, T. Dewulf, J. Moerman, O., Van Langenhove, H. **Evaluation of purge-and-trap-high-resolution gas chromatography-mass spectrometry for the determination of 27 volatile organic compounds**

- in marine water at the ng l⁻¹ concentration level. Journal of Chromatography A. 893, 367-382, 2000.
- (21) Guo, X., Mitra, S. **Development of pulse introduction membrane extraction for analysis of volatile organic compounds in individual aqueous samples, and for continuous on-line monitoring.** Journal of Chromatography A. 826, 39-47, 1998.
- (22) Przyjazny, A., Kokosa, J.M. **Analytical characteristics of the determination of benzene, toluene ethylbenzene and xylenes in water by headspace solvent microextraction.** Journal of Chromatography A. 977, 143-153, 2002.
- (23) Rosell, M. Lacorte, S. Ginebreda, A. Barceló, D. **Simultaneous determination of *tert*-butyl ether and its degradation products, other gasoline oxygenates and benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in Catalanian groundwater by purge-and-trap-gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A. 995, 171-184, 2003.
- (24) Roose, P. Brinkman, U.A.T. **Determination of volatile organic compounds in marine biota.** Journal of Chromatography A. 799, 233-248, 1998.
- (25) **Gaceta Oficial de la República de Venezuela.** Viernes 13 de febrero de 1998. Año CXXV – Mes V. Número 36.395.
- (26) Lui, S. Pleil, J. D. **Optimized determination of trace jet fuel volatile organic compounds in human blood using in-field liquid-liquid extraction with subsequent laboratory gas chromatographic-mass spectrometric analysis and on-column large-volume injection.** Journal of Chromatography B. 752, 159-171, 2001.
- (27) Hattori, H. Iwai, M. Kurono, S. Yamada, T. Watanabe-Suzuki, K. Ishii, A. Seno, H. Suzuki, O. **Sensitive determination of xylenes in whole blood by capillary gas chromatography with cryogenic trapping.** Journal of chromatography B. 718, 285-289, 1998.

- (28) Perbellini, L. Buratti, M. Fiorentino, M. Fustinoni, S. Pasini, F. Magnaghi, S. **Matrix interferences in the analysis of benzene in urine.** Journal of Chromatography B. 724, 257-264, 1999.
- (29) Wahl, H. Hoffmann, A. Luft, D. Liebich, H. **Analysis of volatile organic compounds in human urine by headspace gas chromatography-mass spectrometry with a multipurpose sampler.** Journal of Chromatography B. 847, 117-125, 1999.
- (30) Fustinoni, S. Giampiccolo, R. Pulvirenti, S. Buratti, M. Colombi, A. **Headspace solid-phase microextraction for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in urine.** Journal of Chromatography B. 723, 105-115, 1999.
- (31) NOM-047-SSA1-1993. **Establece Los Límites Biológicos Máximos Permisibles De Disolventes Orgánicos En El Personal Ocupacionalmente Expuesto.** 1996.
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/047ssa13.html>
- (32) Mercado, F. **Bioética en la práctica del monitoreo biológico de la exposición química laboral.** Revista Latinoamericana de la Salud en el Trabajo. 3(1), 2003.
- (33) Albiano, N. Epelman, N. **Toxicología Laboral: criterios para la vigilancia de los trabajadores expuestos a sustancias químicas peligrosas.** Buenos Aires, 1999.
- (34) Lee, B. New, A. Kok P. Ong H. Shi C. Ong C. **Urinary trans, trans-muconic acid determined by liquid chromatography: application in biological monitoring of benzene exposure.** Clinical. Chemistry. 39(9) 1788-1792. 1993.
- (35) Ghittori, S. Maestri, L. Fiorentino, M.L. Imbriani, M. **Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis,** Int. Arch. Occup. Environ. Health, 67(3), 195-200. 1995.
- (36) Melikian, A. O'Connor, R. Prahalad, A.K. Hu, P. Li, H. Kagan, M. Thompson, S. **Determination of the urinary benzene metabolites S-Phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid**

- chromatography-tandem mass spectrometry**, Carcinogenesis, 20(4), 719-726. 1999.
- (37) Kivistö, H. Pekari, K. Peltonen, K., Svinhufvud, J. Veidebaum, T. Sorsa, M. Aitio, A. **Biological monitoring of exposure to benzene in the production of benzene and in a cokery**, Sci. Total Environ. 199 (1-2), 49-63. 1997.
- (38) Kok, P.W. Ong, C.N. **Blood and Urinary Benzene Determined by Headspace Gas-Chromatography with Photoionization Detection-Application in Biological Monitoring of Low-Level Nonoccupational Exposure**. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 66, 195. 1994.
- (39) Perbellini, L. Faccini, G.B., Pasini F. **Enviromental and occupational exposure to benzene by análisis of breath and blood**. Brit. J. Ind. Med. 45, 345, 1988.
- (40) Ghittori, S. Maestri, L. Fiorentino, M.L. Cordioli, M. Imbriani, M. **Urinary-Excretion of Unmetabolized Benzene as an Indicator of Benzene Exposure**. J. Toxicol. Environ. Health, 38, 233, 1993.
- (41) Ghaoui, L. **Analysis of semivolatile organic compounds by headspace gas chromatography**. Journal of Chromatography. 642, 389-394, 1993.
- (42) Penton, Z. **Optimizaci3n of Conditions in Statisc Headspace GC**. Journal of High Resolution Chromatography. 834, 15, 1992.
- (43) Valcárcel, M., Hens, G **Técnicas Analíticas de Separaci3n**. Ed. Reverté, S.A. 1988.
- (44) Meuleman, C. Laiño, C. Lansens, P. Baeyens, W. **A study of the Behavior of Methylmercury Compounds in Aqueous Solutions and of Gas/Liquid Distribution Coefficents Using Headspace Analysis**. W. Wat. Res, 27(9), 1431, 1993.

Capítulo IV

“Determinación de plaguicidas organofosforados en aguas de consumo humano, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la preconcentración en línea”

Resumen

El agua es uno de los recursos que presenta un alto riesgo de contaminación por plaguicidas debido a que se encuentra continuamente expuesto a la llegada de estas sustancias. Los límites tolerables para plaguicidas contenidos en aguas destinadas para consumo humano están establecidos por diferentes Organismos Internacionales y Gubernamentales y son inferiores a $0,5 \mu\text{g/L}$. Por ello, se necesitan metodologías sensibles que permitan evaluar plaguicidas a estos niveles de concentración. En el presente trabajo se desarrolló un método selectivo y reproducible para evaluar plaguicidas organofosforados (POPs) en aguas de consumo humano por cromatografía de gases (CG) con detección por espectrometría de masa (EM). La extracción en fase sólida de los POPs en disco, se realizó en un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) que permitió la automatización del procedimiento analítico con un importante ahorro de solventes y tiempo, una mayor frecuencia de análisis, una reducción en la generación de residuos y del coste por análisis.

7. Introducción

El descubrimiento de los plaguicidas orgánicos en 1940 proporcionó al hombre nuevas y poderosas herramientas para su lucha incesante contra las plagas. En nuestros días su uso se reconoce en todo el mundo como un método efectivo, relativamente simple y rápido para su control⁽¹⁾.

Usualmente, el producto activo de un plaguicida es obtenido por la industria química en un grado de pureza que oscila entre el 75 y el 98%, siendo el resto impurezas de fabricación. El producto técnicamente puro no suele emplearse de modo directo en agricultura, de ahí que se utilicen las denominadas formulaciones que contienen la materia activa más o menos diluida en un soporte sólido o disolvente líquido, junto con sustancias coadyuvantes que mejoran su acción⁽²⁾.

Es importante señalar que desde el punto de vista toxicológico, estas formulaciones de plaguicidas incluyen sustancias transportadoras, diluyentes como agua o solventes orgánicos, aditivos e impurezas, que pueden tener potencial tóxico por sí mismas.

Es por esta razón, que la contaminación del ambiente por las sustancias químicas que son arrastradas fuera de las áreas de tratamiento ha conducido a críticas respecto al uso de los plaguicidas y naturalmente provoca gran preocupación cuando se observan los efectos que traen consigo no solo en las zonas tratadas sino en las zonas no tratadas donde se manifiestan efectos a largo plazo cuando se emplean plaguicidas químicos más persistentes⁽¹⁾.

La contaminación del agua por plaguicidas se produce al ser arrastrados por el agua de los campos de cultivo hasta los ríos y mares donde se introducen en las cadenas alimenticias provocando la muerte de varias formas de vida necesarias en el balance de algunos ecosistemas. Es por ello que constituyen un problema actual, debido a su estabilidad en el medio ambiente, su concentración y transformación en los organismos vivos.

En áreas de agricultura intensiva el agua es uno de los recursos que presenta un alto riesgo de contaminación por plaguicidas debido a que se encuentra continuamente expuesto a la llegada de estas sustancias. Ortega y col.⁽³⁾ señala que los residuos se incorporan a los acuíferos y a las aguas

superficiales por ir disueltos o en suspensión en las aguas de retorno utilizadas en los regadíos.

Entre los plaguicidas que se encuentran como principales contaminantes de ríos, lagunas, aguas superficiales y de consumo humano, se encuentran los organofosforados. Estos son ampliamente utilizados en la agricultura y aunque se degradan rápidamente en el medio ambiente, son altamente tóxicos, ya que pueden afectar la salud humana causando daños neurológicos permanentes. Es por ello, que la legislación de la Unión Europea establece para el agua de consumo humano un máximo de 0,1 µg/L de cada uno de estos plaguicidas sin que el total de los mismos sobrepase los 0,5 µg/L.

Muchas metodologías han sido desarrolladas para lograr determinar al metil paration, malation, diazinon y clorpirifo en diferentes matrices y específicamente en aguas de consumo humano. Sin embargo, se requiere de una etapa previa de preconcentración, ya que éstos se encuentran en las aguas a muy bajos niveles de concentración.

En los últimos años, las técnicas en flujo han contribuido enormemente en el tratamiento de las muestras. En 1999, Cerdà y col.⁽⁴⁾, propusieron un sistema que integraba las ventajas que ofrecía el FIA y el SIA para el desarrollo de nuevas metodologías, entre las que se encuentran un bajo consumo de reactivos y una alta frecuencia de análisis. Además, la reciente tendencia en el uso de discos para llevar a cabo la EFS, permiten acelerar el procedimiento permitiendo eliminar a los componentes indeseados de la matriz, debido a su mayor área transversal y disminución en la presión que puedan proporcionar al sistema.

En ese sentido en el presente trabajo se propone desarrollar un método sensible y selectivo para determinar plaguicidas organofosforados en aguas destinadas para consumo humano por cromatografía de gases con detección por Espectrometría de Masas y un sistema de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para realizar la preconcentración en línea.

8. Generalidades

2.1. Plaguicidas

Según la OMS, un plaguicida es cualquier sustancia o mezclas de sustancias, de carácter orgánico o inorgánico, que está destinada a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren en cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, productos de madera o alimentos para animales, también aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos.

Con el uso y el abuso de estos venenos los científicos comprobaron que no sólo matan la plaga para lo que fueron previstos, sino que también generan residuos al emplearlos en los cultivos, que afectan al medio ambiente y a muchos seres vivos⁽⁵⁾.

2.2. Clasificación de los Plaguicidas

La clasificación de los plaguicidas según su modo de acción es a veces de mayor importancia práctica que una basada en su estructura química. Por esta razón, en la Tabla 1 se presentan los diferentes tipos de plaguicidas en relación a la especie a combatir⁽²⁾.

2.3. Uso de los Plaguicidas

Para que un plaguicida sea aceptable para su uso como tal, debe reunir las siguientes cualidades:

- ✓ Efectividad en la destrucción de la plaga contra la que se aplica.
- ✓ Selectividad en su acción sobre su objetivo, en cuyo caso no puede perjudicar la flora o fauna beneficiosa.
- ✓ Economía, proporcionando mayores beneficios que los gastos que ocasiona su uso.

Delgado

- ✓ Seguridad, en el sentido de no suponer un peligro para la salud del hombre, animales domésticos, ni representar una elevada fitotoxicidad.
- ✓ Estabilidad durante el tiempo necesario para el desarrollo de su acción.
- ✓ Posibilidad de formulación a los efectos de aplicabilidad, estabilidad y efectividad.

Tabla 1. Clasificación de los Plaguicidas en relación con la especie a combatir

Tipos	Definición	Fuente	Presentación
Insecticidas Minerales	Los plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas en su sentido más amplio.	Minerales	Compuestos arsenicales Compuestos fluorados Azufre Derivados del selenio
		Orgánicos sintéticos	Organofosforados Organoclorados Carbamatos
		A Base de Aceites Minerales	Aceites antracénicos Aceites de petróleo
		De Origen Vegetal	Nicotina Piretrina Rotenona
Herbicidas	Son productos químicos que contaminan y que tiene algún riesgo en su aplicación para las demás plantas, fauna y personas. Sin embargo, son eficaces para malas hierbas perennes muy duras de matar.	Minerales	Sales de NH_4^+ , Ca^{++} , Cu^{++} , Fe^{+++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ , en forma de sulfatos, nitratos, cloruros, cloratos.
		Orgánicos	Fitohormonas Derivados de la urea Triazinas y Diazinas Derivados de los fenil Derivados de la oxiquinoleína Derivados de las tiadiazinas y tiadiazoles
		Otros	Paraquat Diquat Piclorame
Fungicidas	Son usados extensamente en la industria, la agricultura, el hogar y el jardín para un número de propósitos que incluyen: protección de las semillas de granos durante su almacenamiento, transportación y la germinación.	Minerales	Sales de cobre Compuestos arsenicales Aceites minerales
		Organometálico	Derivados órganomercuriales
		Orgánicos	Carbamatos y ditiocarbamatos Derivados del benceno Amicidas Benzonitrilos
Rodenticida	Se emplea para controlar o eliminar roedores	Derivados Cumarínicos	Warfarinas Sales de talio

Su uso está destinado a los siguientes fines:

- ✓ Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales o prevenir su acción.
- ✓ Favorecer o regular la producción vegetal, con excepción de los nutrientes y los destinados a la enmienda de suelos.
- ✓ Conservar los productos vegetales, incluida la protección de las maderas.
- ✓ Destruir los vegetales indeseables.
- ✓ Hacer inofensivos, destruir o prevenir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan a los vegetales.
- ✓ Destruir parte de los vegetales o prevenir un crecimiento indeseable de los mismos.

Debido a todas estas características el uso de plaguicidas en la agricultura está muy extendido, pues se los considera esenciales para lograr mejores condiciones de cultivo. Sin embargo la lista de sustancias utilizadas en esta actividad incluye algunas peligrosas, lo cual ha llevado a organizaciones como el Consejo de la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) o la Organización Mundial de la Salud (OMS) a insistir en la necesidad de adoptar precauciones en su manipulación y venta.

2.4. Toxicidad

La clasificación toxicológica de los plaguicidas en las categorías de baja peligrosidad, nocivos, tóxicos o muy tóxicos se realiza atendiendo básicamente a su toxicidad aguda, expresada en DL-50 (dosis letal al 50 por 100) por vía oral o dérmica para la rata, o en CL-50 (concentración letal al 50 por 100) por vía respiratoria para la rata, atendiendo principalmente a las vías de acción más importantes de cada compuesto.

A continuación se detallan las categorías y el grado de toxicidad para cada una de ellas:

- ✓ De baja peligrosidad: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea no manifiestan riesgos apreciables.

- ✓ Nocivos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan traer consigo riesgos de gravedad limitada.
- ✓ Tóxicos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan proporcionar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.
- ✓ Muy tóxicos: los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan traer riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte⁽⁶⁾.

El Reglamento General de Plaguicidas de Venezuela⁽⁷⁾ indica en su artículo 5° que los plaguicidas se clasifican de acuerdo a su dosis letal media oral aguda (DL-50). Y en su Artículo 6° indica que los envases donde se ofrezcan al público los plaguicidas, deben ser identificados a través de una franja claramente visible e indeleble que ocupe al menos una quinta parte del cuerpo de los mismos con diferentes colores. En la Tabla 2 se resumen dichas características.

De esta manera, es posible darse cuenta que, aunque resulta innegable que los plaguicidas han beneficiado la producción agrícola y el combate de enfermedades humanas y animales, como la malaria, la fiebre amarilla, el dengue y numerosas parasitosis externas e internas, el uso continuo y desaprensivo de agrotóxicos y la ausencia de normas efectivas de prevención han determinado la aparición de problemas que inciden sobre la salud humana y la supervivencia de numerosas especies.

Tabla 2. Caracterización de los plaguicidas según las normas establecidas por reglamento General de Plaguicidas de Venezuela

Clasificación	Dosis Letal (mg/kg)	Identificación (etiqueta)
Extremadamente tóxico	1,0-100,0	Rojo Vivo
Altamente tóxico	101,0-250,0	Amarillo
Moderadamente tóxicos	251,0-1400,0	Azul
Ligeramente tóxico	< 1400,0	Verde

2.4. 1. Efectos indeseados para la Salud Humana

Simultáneamente con el aumento del uso de plaguicidas, aumentaron significativamente los accidentes y enfermedades asociadas. Según datos de la

OMS, anualmente se intoxican dos millones de personas por exposición directa o indirecta a plaguicidas. De ese total, las 3/4 partes de afectados pertenecen a los países subdesarrollados, donde únicamente se utiliza el 25% de la producción mundial de plaguicidas. Aunque existen dificultades para obtener registros y estadísticas fiables, es consensualmente aceptado que el número de accidentes asociados al trabajo agrícola es similar o ligeramente superior a los registrados en el área de la construcción⁽⁷⁾.

El contacto con plaguicidas y su entrada al organismo -a través de la piel, la respiración y/o por ingestión- se produce por exposición laboral y en el hogar debido a usos y aplicaciones incorrectos, falta de medidas preventivas y de protección, almacenamiento inadecuado, reutilización de envases (comederos de animales, almacenamiento y traslado de agua) y fumigaciones aéreas. Se han detectado residuos de organoclorados y organofosforados en personas donde la única probabilidad de encuentro con plaguicidas es por ingestión.

2.4. 1. 1. Efectos sobre el organismo

Los mecanismos de acción de los plaguicidas sobre el organismo presentan entre sí grandes diferencias. Para algunos productos estos mecanismos son bien conocidos, incluso a nivel molecular, pero para otros son prácticamente desconocidos. Por otra parte, incluso dentro de una misma familia química pueden encontrarse compuestos que pueden ser clasificados desde escasamente peligrosos hasta muy tóxicos. Todo ello hace muy difícil establecer generalidades en lo concerniente a la toxicidad de los mismos⁽⁷⁾.

- ✓ Los efectos agudos (vómitos, diarrea, aborto, cefalea, somnolencia, alteraciones, convulsiones, coma, muerte) están asociados a accidentes donde una única dosis alta es suficiente para provocar los efectos que se manifiestan tempranamente.
- ✓ Los crónicos (cánceres, leucemia, necrosis de hígado, malformaciones congénitas, neuropatías periféricas, a veces solo malestar general, cefaleas persistentes, dolores vagos) se deben a exposiciones repetidas y los síntomas o signos aparecen luego de un largo tiempo (hasta años) de

contacto con el pesticida, dificultando su detección. Dado que su biotransformación es muy lenta, los plaguicidas provocan efectos acumulativos en las personas expuestas.

Por lo tanto, los efectos indeseados producidos dependen del pesticida, la dosis, la vía y el tiempo de exposición. Por ejemplo, si se habla de los insecticidas minerales, puede decirse que muchos compuestos organoclorados afectan al sistema nervioso central (depresión, narcosis), así como al hígado y al riñón. Mientras que los compuestos organofosforados y los carbamatos también afectan principalmente al sistema nervioso central, en este caso mediante un proceso de inhibición de la enzima colinesterasa. Los POPs actúan en forma irreversible. Lo que establece que la toxicidad de estos compuestos siguen el siguiente orden:

Organofosforados > Organoclorados > Carbamatos

El control ambiental permite estimar el riesgo de exposición en función de la concentración del tóxico en aire, suponiendo que la penetración en el organismo tiene lugar tan sólo por inhalación, pero en el caso de los plaguicidas, cuya posibilidad de entrada por otras vías está confirmada, puede ser más interesante obtener información del verdadero grado de exposición personal a través de un control biológico.

Al hablar de los plaguicidas se han destacado los efectos que estos traen a los seres vivos, es por esta razón, que se hará especial atención a los plaguicidas organofosforados por ser los más tóxicos dentro de su clasificación.

2.5. Plaguicidas Organofosforados

Las investigaciones sobre los POPs datan de 1932, año en que Lange y Krueger sintetizaron los dimetil y dietil fosfofluoridatos, y describieron por vez primera los efectos nocivos de éstos sobre los seres vivos. Se convirtieron entonces en un amplísimo grupo de compuestos de síntesis, en general altamente tóxicos, con un precedente en los gases de guerra, a menudo conocidos bajo el apelativo de 'gases nerviosos', entre los que se encuentran el sarin, tabun y

soman, y que se desarrollaron de manera especial a partir de la Segunda Guerra Mundial.

El hecho de que la inhalación de los vapores de estos plaguicidas causarían una persistente sensación de ahogo y visión borrosa fue lo que llevó al alemán Schrader, a explorar la actividad insecticida de estos compuestos⁽⁸⁾. Y esta característica dió el motivo de que ya en 1959 se hubieran sintetizado alrededor de 50.000, al revelarse como útiles elementos en la lucha contra las plagas, por lo que forman parte, como ingredientes activos, de muchas formulaciones comerciales (en los que se integran distintos componentes, para obtener una mayor eficacia del ingrediente activo).

Al hablar de POPs en general, son sustancias biodegradables en la naturaleza, sin tendencia a acumularse en las grasas del organismo, pero con gran actividad neurotóxica que pueden producir intoxicaciones agudas de gravedad. Sin embargo, a pesar de su toxicidad son los insecticidas, junto con los carbamatos, más ampliamente utilizados en la actualidad.

La fórmula estructural general de estos compuestos, se muestra en la Figura 1. En la que R_1 y R_2 son radicales alquilo, generalmente metilo o etilo, el grupo X es característico de cada especie química, siendo frecuentemente un radical arilo, y suele contribuir de forma importante a sus propiedades físicas, químicas y biológicas

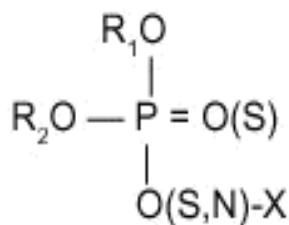


Figura 1. Estructura General de los plaguicidas organofosforados

Estos compuestos, en general, son marcadamente apolares, lo que significa que desde el punto de vista químico la mayoría son escasamente solubles en

agua, aunque con grandes diferencias de un compuesto a otro, y desde el punto de vista biológico tienden a disolverse en grasas. Por tal motivo, la piel, donde se encuentra una importante capa de tejido con elevado contenido lipídico, puede constituirse en una importante vía de entrada. La estabilidad de los organofosforados depende del pH del medio; a pH fuertemente alcalino se descomponen, lo que puede ser utilizado para destruirlos⁽⁷⁾.

2.5. 1. Propiedades Fisicoquímicas

En la Tabla 3 y en la Figura 2 se resumen las características físicas y químicas de los plaguicidas organofosforados a estudiar, además de los iones de mayor abundancia en el espectrómetro de masas (EM), así como las estructuras de los mismos.

2.5.2. Vías de Exposición y Síntomas

En el ámbito laboral, la exposición puede tener lugar por las tres vías clásicas: *digestiva*, *inhalatoria* y *dérmica*. La vía digestiva directa se suele considerar como accidental (ingestión de una solución por error o con fines suicidas, o de alimentos directa o indirectamente contaminados).

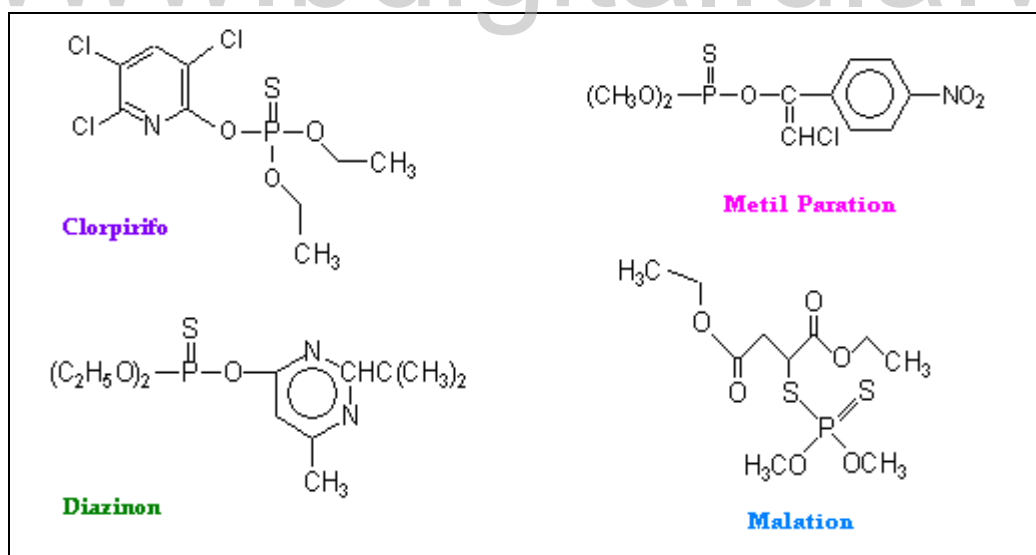
Desde hace muchos años, es bien conocido que las vías inhalatoria y la dérmica están muy estrechamente relacionadas con la exposición en las distintas operaciones en que se pueden manipular este tipo de productos por parte de operarios con distintas actividades o de personas que accidentalmente pueden entrar en contacto con ellos sin manipularlos.

En la Tabla 4 se presentan en forma resumida las vías de exposición y síntomas que presenta el individuo, para cada uno de los plaguicidas estudiados.

Al observar las vías de exposición de estos plaguicidas, la mayor parte se basan en la exposición laboral. Sin embargo, es necesario recordar que estos plaguicidas son aplicados en el medio ambiente en el que todos nos desarrollamos, por lo que pueden presentarse intoxicaciones, no laborales, debido al consumo de alimentos o aguas contaminadas con los mismos.

Tabla 3. Características Físicoquímicas de los POPs en estudio^(9,10).

Compuesto	Formula molecular	PM (g/mol)	P.E. (°C)	Características	Solubilidad	Espectro de Masa (m/z)
Metil-paration	C ₈ H ₁₀ NO ₅ PS	263,21	119	Líquido amarillento	Insoluble en agua, soluble en metanol, diclorometano, acetato de etilo	109, 125, 263
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304,30	--	Líquido incoloro, oleoso, de olor característico. Se descompone al calentar intensamente por encima de 120 °C.	Solubilidad en agua, g/100 ml a 20°C: ninguna	137, 179, 304
Malation	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,36	156 - 157	Líquido color ámbar	Soluble en solventes orgánicos	93, 125, 173
Clorpirifo	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350,59	--	Cristales blancos, que funden entre 42-43 °C	Insoluble en agua. Soluble en solventes orgánicos	81, 109, 197, 270, 298, 335

**Figura 2.** Estructuras de los plaguicidas organofosforados en estudio

Por estas razones, muchos de estos han sido prohibidos, ya que, presentan alta persistencia en el ambiente, gran capacidad de contaminar cadenas tróficas y

Delgado

causar grave contaminación en suelos, aguas superficiales, aguas subterráneas, daño a la vida silvestre, fauna, aves, peces y la reducción de una importante población de insectos, controladores de plagas y otros organismos benéficos indispensable para el equilibrio de los ecosistemas⁽¹¹⁾.

Tabla 4. Vías de Exposición y síntomas en el organismo humano

Compuesto	Vía de Exposición	Signos y Síntomas de la Exposición
Metil paration	Contacto con la piel: provoca irritación en la piel Absorción Cutánea: Tóxico si se absorbe por la piel Contacto con los ojos: provoca irritación en los ojos Inhalación: Tóxico si se inhala. Ingestión: Tóxico	Efectos bronco-constricción y aumento de la secreción de las glándulas bronquiales, espasmo abdominal con vómito y diarrea, Efectos nicotínicos que incluyen taquicardia, contracciones espasmódicas de los músculos finos, en los casos más severos del diafragma y músculos respiratorios. Las manifestaciones en el sistema nervioso central incluyen cefalea, fatiga, vértigo, ansiedad, confusión, convulsiones, depresión del centro respiratorio, coma.
Diazinon	Contacto con la piel: provoca irritación en la piel Absorción Cutánea: Puede ser mortal en caso de absorción por la piel Contacto con los ojos: Provoca irritación en los ojos Inhalación: Puede ser mortal. El producto irrita las membranas mucosas y el tracto respiratorio superior. Ingestión: puede ser mortal	Los inhibidores de colinesterasa pueden provocar abundante salivación y secreción pulmonar, lagrimeo, visión borrosa, diarrea, temblor, sudoración, reducción de la frecuencia cardíaca y/o descenso de la presión sanguínea La exposición puede provocar: salivación, temblores, falta de coordinación, diarrea, náuseas, dolor de cabeza, fatiga, mareos, somnolencia, respiración irregular, espasmos musculares. Alteraciones de las pupilas En caso de absorción por el cuerpo: da lugar a la formación de metahemoglobina, que en concentración suficiente, provoca cianosis. El ataque puede tardar entre 2 a 4 horas en manifestarse
Malation	La sustancia puede absorberse en el cuerpo por inhalación, a través de la piel y por ingestión. Respecto a la inhalación, la evaporación a 20°C es despreciable pero una concentración peligrosa de partículas aerotransportadas durante el rociado puede, sin embargo, ser perjudicial.	Inhibidor indirecto de la colinesterasa. Es altamente peligroso si se ingiere
Clorpirifo	Perjudicial por ingestión e inhalación. Causa daños en contacto con la piel.	Larga exposición puede causar cáncer, daños en el riñón y en el hígado, por lo que su uso ha sido restringido en diferentes países. El nivel de exposición debe ser menor a 0,3 mg/m³

2.5.3. Matrices Utilizadas para la determinación de POPs

La muestra mas utilizada para la determinación de organofosforados y sus metabolitos es orina de 24 h, colectada en envase de vidrio y conservada bajo refrigeración. También, como índice de la intoxicación, puede determinarse la actividad de las colinesterasas sanguíneas: plasmática o eritrocitaria.

En los últimos años la determinación de residuos se realiza, por un lado, en distintos tipos de alimentos, principalmente de origen vegetal, productos cárnicos y aguas de bebida, muestras ambientales como aguas superficiales y suelos.

Esto se debe a que los plaguicidas organofosforados han sido detectados en niveles superiores a los permitidos en aguas de consumo. Trayendo consigo especial atención de los organismos internacionales quienes han establecidos niveles de tolerancia de 0,1-100 µg/L, ya que son extremadamente tóxicos.

2.5.4. Niveles de POPs reportados en la Literatura

En los últimos años, se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de plaguicidas organofosforados en muestras de agua. En la Tabla 5, se resumen los niveles de concentración del metil paration, diazinon, malation y clorpirifio en dicha matriz. Se puede observar que las concentraciones son muy bajas, por lo que se requiere de metodologías sensibles y selectivas para lograr su determinación.

9. Antecedentes del Problema a Investigar

Los POPs son aplicados indiscriminadamente en el medio ambiente en el que todos nos desarrollamos por lo que pueden presentarse intoxicaciones no laborales, debido al consumo de aguas o alimentos contaminados⁽¹²⁾. Esto justifica la constante demanda para el desarrollo de métodos de análisis para la determinación de POPs en aguas de consumo humano.

Tabla 5. Niveles de concentración de los plaguicidas en estudio reportados en la literatura

Matriz	Método	Metil Paration µg/L	Diazinon µg/L	Malation µg/L	Clorpirifos µg/L	Ref
Aguas de consumo, superficiales	CG-DNP	0,006	0,005	0,008	0,005-0,012	12
Agua	CG-FID	0,10	0,08	0,12	--	13
Aguas de consumo humano	CLAR	0,048	--	0,190	--	14
Agua superficiales	CG-DCE	0,20	--	0,40	--	15
Muestras Acuosas	CG-FID	0,49	--	0,280	--	16
Muestras de Agua	CG-EM	0,060	0,030	0,300	0,040	17

En la literatura encontramos que existen numerosos procedimientos analíticos para la determinación de POPs en muestras de agua⁽¹²⁻²⁸⁾. Teniendo en cuenta la polaridad, volatilidad y degradación térmica de los POPs algunos autores han realizado su determinación por cromatografía de gases (CG)^(16,18,20,24,25,27,28-30) o por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)^(14,18,21,26,27). Sin embargo, la CG ha sido la más utilizada debido a su excelente capacidad de separación, su alta frecuencia de análisis y a la amplia gama de detectores sensibles y selectivos de la que dispone. En los últimos años, la detección por espectrometría de masas ha sido la más utilizada por su alta capacidad de identificación^(16,25,29,30).

La Legislación de la Unión Europea (UE) establece para aguas de consumo humano un máximo de 0,1 µg/L de cada uno de estos plaguicidas sin que el total de los mismos sobrepase los 0,5 µg/L. Es por ello que se necesitan métodos de análisis muy sensibles, con límites de detección por debajo de 0,1 µg/L⁽³¹⁾.

En ese sentido, para el análisis de POPs en muestras de agua se requiere de una etapa de preparación con el fin de aislar los analitos de la matriz y preconcentrarlos para alcanzar la sensibilidad necesaria para detectarlos a los niveles de concentración permitidos.

El acoplamiento en línea de la etapa de tratamiento de la muestra con la separación y detección evita la contaminación de fuentes externas. Para esta

automatización se prefiere en general la extracción en fase sólida (EFS)^(14,18) en lugar de la extracción líquido-líquido (ELL)^(15,28) ya que minimiza algunos inconvenientes de la ELL asociados al uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos⁽²⁷⁾.

Para la EFS se han empleado sorbentes de diferente naturaleza bajo la forma de cartuchos, columnas o discos, estos últimos permiten una extracción más rápida de la muestra y por lo tanto una reducción del tiempo de extracción. Esto se logra gracias al menor tamaño de las partículas del disco y a la reducción de los volúmenes muertos, lo que significa menor cantidad de eluyente. Estas ventajas son las responsables de la creciente utilización de discos de extracción para análisis de trazas de analitos en muestras medioambientales⁽³²⁾.

Por otra parte, para la automatización de la EFS, la técnica de Análisis por Inyección en Flujo con Multijeringa (MSFIA) ha jugado un rol importante en la automatización del tratamiento de la muestra en diferentes metodologías de análisis ya que permiten procedimientos rápidos, con baja cantidad de muestra, bajo consumo de solventes y baja generación de residuos^(4,33).

Es por ello que en el presente trabajo nos propusimos desarrollar un método sensible y selectivo por cromatografía de gases (CG) con detección por espectrometría de masas (EM) para la determinación de POPs en aguas destinadas para consumo humano. Para la extracción en fase sólida (EFS) de los POPs en disco, se propuso utilizar la técnica MSFIA que es un equipo no muy costoso, que podría simplificar el procedimiento de extracción y reducir significativamente el tiempo de esta etapa.

Para ello nos propusimos la siguiente hipótesis de trabajo.

10. Hipótesis de Trabajo

Si se tiene en cuenta que:

- La técnica MSFIA permite acoplar un módulo de extracción en disco para llevar a cabo la extracción, preconcentración y elución de los POPs para su determinación en el sistema cromatográfico.
- Un disco C₁₈ permite la retención selectiva de los POPs mientras que los interferentes son llevados a desecho.
- Existen mezclas de solventes orgánicos que permiten eluir cuantitativamente los POPs desde el disco.
- Una columna analítica DB-5 5% fenil metilpolisiloxano proporciona una buena eficiencia y selectividad en la separación de los POPs
- El espectrómetro de masas (EM) permite detectar e identificar a los POPs a través de sus espectros de masas.

“Se podrá desarrollar un método cuantitativo rápido y preciso para determinar POPs en aguas de consumo humano, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG/EM) utilizando un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la extracción y preconcentración de los analitos en línea.”

Para verificar esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

11. Objetivos

5.1. Objetivo General

- ❖ Desarrollar un método por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas y preconcentración en línea que permita cuantificar los POPs en muestras de agua de consumo humano.

5.2.Objetivos Específicos

- Optimizar las condiciones del sistema MSFIA para llevar a cabo la preconcentración de los analitos de interés por EFS en disco.
- Extraer cuantitativamente a los POPs, del disco C₁₈
- Seleccionar la columna analítica y optimizar un método por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas que permita la detección y cuantificación de los POPs.
- Aplicar la metodología desarrollada para la determinación de los POPs en muestras de agua de chorro de los Laboratorios de la Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, España.

12. Parte Experimental

6.1.Reactivos y Solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y los solventes de grado HPLC. El acetato de etilo y el metanol fue suministrado por J.T. Baker (Phillipsburg, N.J. USA). Los patrones de los plaguicidas organofosforados (malation, metil paration, clorpirifo y diazinon) (99,9%) fueron suministrados por Sigma-Aldrich Chimie S.A.r.l. (Francia).

Los gases Nitrógeno (99,999 %), Aire (99,999 %) y Helio (99,999 %), fueron suministrados por Carburos Metálicos (España).

6.2.Preparación de Soluciones

Las soluciones patrones de cada uno de los plaguicidas organofosforados (malation, metil paration, clorpirifo y diazinon) preparadas en metanol fueron de 1000 mg/L. Las soluciones de trabajo de menor concentración se prepararon por dilución de las soluciones en metanol en agua. Las soluciones se almacenaron bajo refrigeración a (-4 °C).

6.3. Instrumentación

Para la realización de este trabajo se utilizó el instrumental que se detalla a continuación. Un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2100 y a un automuestreador VARIAN modelo 8400 con un carrusel para 48 viales de 2,0 y 0,1 mL respectivamente.

La separación de los plaguicidas se realizó en una columna capilar Varian DB-5, de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno y con un espesor de película de 0,25 μm .

Para la extracción en fase sólida de los plaguicidas se utilizó un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) que se muestra en la Figura 3. El sistema MSFIA es una propuesta descrita en 1999 por Cerdà y col.⁽⁴⁾. Se utilizó un módulo multijeringa (Crison, Barcelona, España) compuesto por una bureta, equipada con cuatro jeringas (Hamilton, Suiza) J₁ – J₄ de 10, 10, 2,5 y 5,0 mL, respectivamente. El sistema incluyó seis válvulas solenoides adicionales (Takasago, Japón) V1-V6 cuatro de ellas ubicadas en la cabeza de cada jeringa las cuales permitieron conectar al sistema en la posición ON o al depósito del reactivo en OFF, independientemente del desplazamiento del pistón. La válvula V5 dirigió la zona aspirada desde la muestra de agua al bucle de carga (BC), después de lo cual el flujo fue invertido y el segmento aspirado era conducido hacia el sistema. La válvula V2 proporcionaba aire para secar el disco luego de la etapa de preconcentración. La V3 proveía la mezcla metanol:acetato de etilo (60:40, V/V) que se utilizó para la elución de los POPs y adicionalmente en el sistema se colocó una válvula V6 que en su posición ON direccionaba el eluido hacia el vial del automuestreador del CG-EM. Finalmente, la válvula V4 suministraba una mezcla metanol:agua (80:20, V/V) para la limpieza del disco para una nueva inyección.

Para la construcción de todo el sistema se utilizó tubería de politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno, salvo, para la construcción del bucle para el cual se utilizaron 565 cm de tubería de PTFE de 1,5 mm de diámetro interno para un volumen final de 10 mL.

El control instrumental del sistema MSFIA se realizó con el software AUTOANALYSIS 5.0 (Sciware, Palma de Mallorca, España)⁽³⁵⁾.

La extracción en fase sólida se realizó en un disco Empore C₁₈ 3M inserto en un dispositivo cilíndrico (Figura. 3). El dispositivo constaba de dos cilindros y el disco se colocaba sobre un anillo de polietileno de 8 mm de d.i. para evitar su distorsión.

6.4.Procedimiento

El procedimiento automatizado desarrollado para la extracción en fase sólida de los POPs en disco en el sistema MSFIA se resume en la Tabla 6

Inicialización del sistema: se dispensaban las jeringas de su contenido para ajustar los pistones (**Paso 1**).

Procedimiento directo: el BC se cargaba con 10 mL de la muestra de agua mediante la activación de la válvula V1 en la posición ON y la V5 en posición OFF (**Paso 2**). Seguidamente la V5 cambiaba a la posición ON y la muestra de agua fluía a través del disco de extracción a un caudal de 1,8 mL/min (**Paso 3**). Posteriormente una vez ajustados los pistones (**Paso 4**), se activaba la válvula V2 para dejar pasar aire para secar el disco eliminando las trazas de agua (**Paso 5**). Seguidamente con V2 en la posición OFF, se activaba la V3 para propulsar la solución metanol:acetato de etilo (60:40, V/V) a un caudal de 0,6 mL/min que eluía los POPs desde el disco hacia el vial del automuestreador del CG-EM con la válvula V6 en posición ON (**Paso 6**). Finalmente, se activaba la válvula V4 para propulsar la solución metanol-agua (80:20; V/V) a través del disco para acondicionarlo para una nueva inyección (**Paso 7**).

La separación de los POPs por CG con detección por EM se realizó bajo las condiciones optimizadas que se detallan en la Tabla 7.

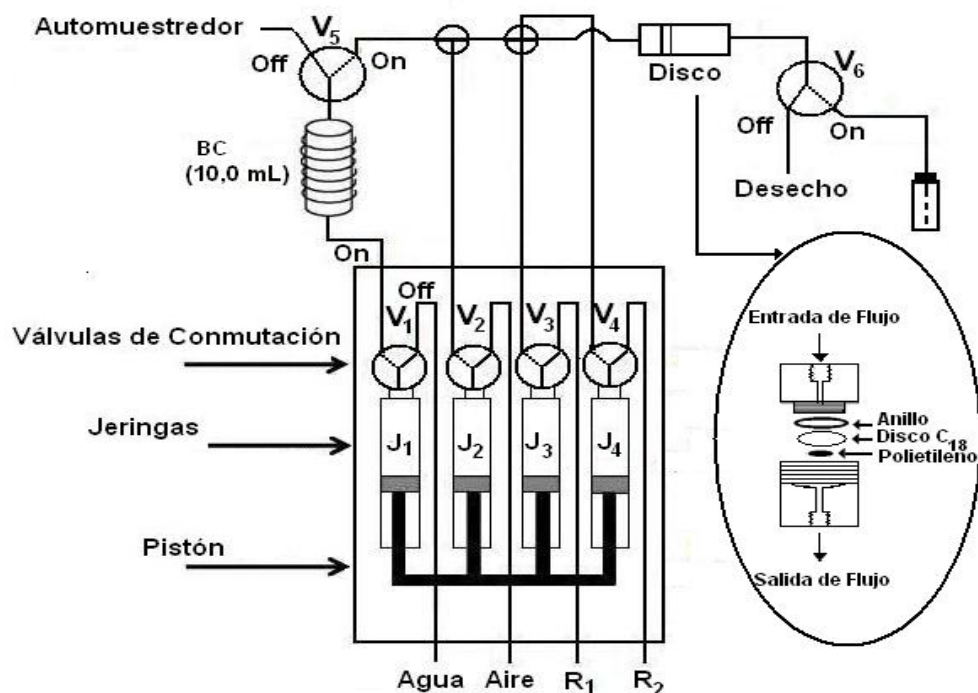


Figura 3. Sistema por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) empleado para la preconcentración de los pesticidas organofosforados en aguas de consumo humano. El dibujo adjunto es una descripción de la unidad de extracción. El sistema está constituido por: J1-J4, Jeringas, V1-V6, válvulas solenoides, BC Bucle de carga; Unidad de preconcentración (Disco C₁₈), R₁ metanol:acetato de etilo (60:40 v/v), R₂ metanol: agua (80:20 v/v).

Tabla 6. Procedimiento analítico para la limpieza y preconcentración de los POPs en muestras de agua de consumo

Paso	Tiempo (min)	Descripción	Operación	Flujo (mL/min)	Posición de las Válvulas					
					V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₅	V ₆
1	0,30	Ajuste de los pistones	Dispensar 10mL	30,0	Off	Off	Off	Off	Off	Off
2	2,0	Llenado del BC	Inicio del Ciclo Aspirar 10,0 mL	5,0	On	Off	Off	Off	Off	Off
3	5,0	Introducción de la muestra en el disco	Dispensar 10,0mL	1,8	On	Off	Off	Off	On	Off
4	0,08	Ajuste de los pistones	Aspirar 2,6 mL	30,0	Off	Off	Off	Off	Off	Off
5	1,0	Secado del disco	Dispensar 1 mL	1,0	Off	On	Off	Off	Off	Off
6	1,0	Elución de los analitos en el vial	Dispensar 0,6mL	0,6	Off	Off	On	Off	Off	On
7	1,0	Limpieza y acondicionamiento del disco	Dispensar 1 mL	1,0	Off	Off	Off	On	Off	Off
8			Fin del Ciclo							

7. Resultados y Discusión de Los Resultados

La optimización de los parámetros instrumentales se llevó a cabo empleando el método univariado que consiste en variar un parámetro a la vez. En ese sentido, para el sistema propuesto se optimizaron todas aquellas variables involucradas en la etapa de extracción en fase sólida en el disco C₁₈ en el sistema MSFIA para lograr la preconcentración de los POPs al nivel necesario para su determinación por CG-EM. Para ello se optimizaron: el volumen de la muestra de agua y la velocidad del flujo en la etapa de preconcentración; la naturaleza y proporción de la fase de elución de los POPs y la velocidad del flujo de elución. También se optimizaron las condiciones de trabajo en el CG así como también las condiciones del EM para lograr la sensibilidad necesaria para la detección de los POPs a los niveles de concentración permitidos. Para realizar la optimización de todos los parámetros instrumentales se utilizaron muestras de agua enriquecidas con los POPs a la concentración de 1,0 µg/L.

7.1. Optimización del Sistema MSFIA

7.1.1. Volumen de Muestra

Para la optimización del volumen de muestra se midieron las áreas de los picos de los analitos para cada uno de los volúmenes estudiados en el intervalo de 2,0 a 12 mL. Los resultados se muestran en la Figura 4. Se puede observar que hay un incremento del área de pico a medida que se incrementa el volumen de muestra, sin embargo, a valores superiores a 10 mL la señal se mantenía en todos los casos. Este comportamiento podía atribuirse a que para volúmenes superiores a 10 mL se superaba la capacidad de carga del disco por lo que los analitos no son retenidos y son llevados a desecho. Por ello se estableció un volumen de 10 mL de muestra como el volumen de preconcentración.

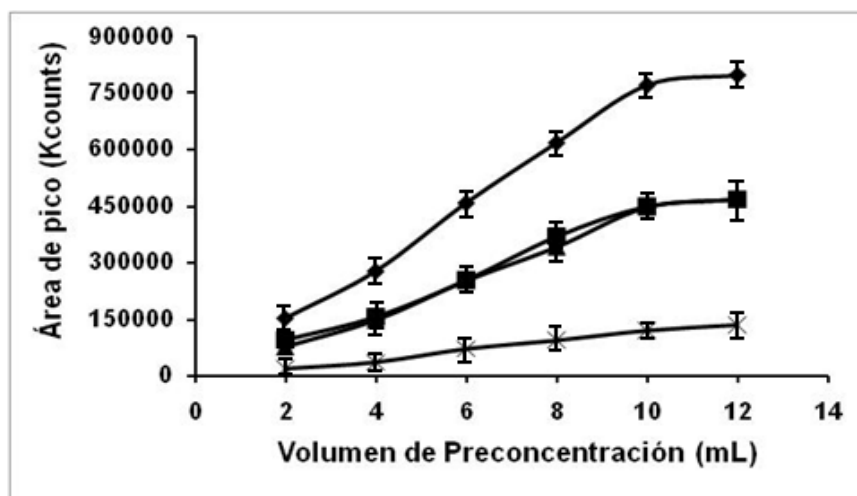


Figura 4. Estudio del volumen de muestra para llevar a cabo la preconcentración en el sistema MSFIA para el análisis de los plaguicidas organofosforados (♦), Diazinon, (■) Clorpirifo, (▲) Metilparation, (×) Malation.

7.1.2. Velocidad de Flujo

Se estudió también la velocidad del flujo de preconcentración en el intervalo de 1,0 a 2,5 mL/min. Los resultados obtenidos (Figura 5) indicaron que no se observaban diferencias significativas entre las áreas de los picos de POPs para los flujos entre 1,0 y 1,8 mL/min. Sin embargo, para flujos superiores se observaba una disminución de la señal lo que indicaba que parte de los analitos se perdían. Se estableció un flujo 1,8 mL/min para el resto de los análisis como un buen compromiso entre sensibilidad del método y tiempo requerido en la etapa de tratamiento de muestra.

7.1.3. Eluyente

En base a la revisión bibliográfica realizada, algunos autores emplean acetato de etilo para la elución de los POPs⁽²⁰⁾, sin embargo, este eluyente deteriora algunos componentes del sistema, tales como conectores y la base donde se encuentra el disco de preconcentración que es de polimetilmetacrilato. Por estas razones, en este trabajo, se decidió usar una mezcla de metanol:acetato de etilo (60:40 v/v), que permitió obtener una buena recuperación de los POPs y sin interferentes.

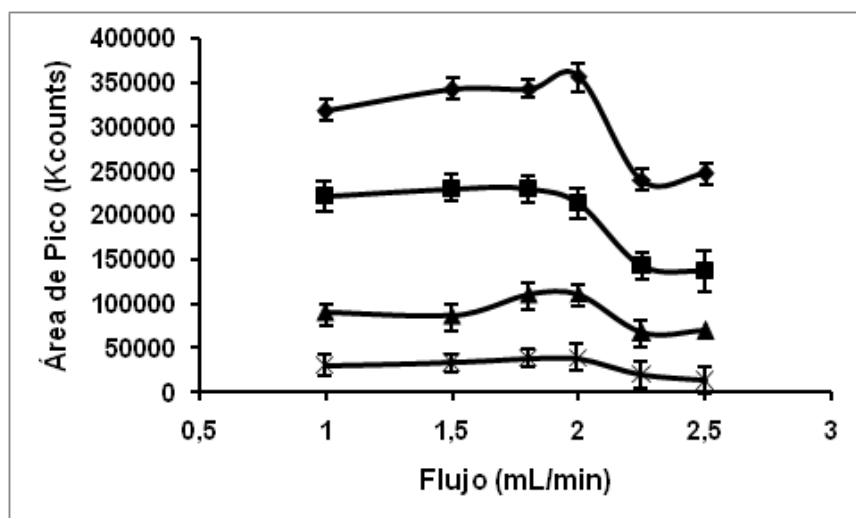


Figura 5. Estudio de la velocidad de flujo para llevar a cabo la preconcentración en el sistema MSFIA para el análisis de los plaguicidas organofosforados (◆), Diazinon, (■) Clorpirifó, (▲) Metilparation, (×) Malation.

7.1.4. Volumen de Elución

El volumen de elución, es un parámetro importante ya que está relacionado con la sensibilidad del método y con el tiempo de tratamiento de la muestra. En ese sentido, determina, si es necesario tener que hacer una reducción del volumen del solvente del eluido para lograr la sensibilidad requerida. Para ello se evaluaron los volúmenes de elución comprendidos entre 0,5 - 1,0 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6 que indican que el área de los picos de POPs es inversamente proporcional al volumen de elución, es decir, hay un incremento en el área a medida que disminuye el volumen de elución. Se estableció un volumen de 0,6 mL como un buen compromiso entre sensibilidad y volumen de los viales de los que disponíamos para el automuestreador. Se sabe que el volumen de muestra en el vial del automuestreador determina la altura de la muestra en el mismo, factor que es importante para que la aguja del automuestreador automático realice una inyección reproducible y exacta con relación al volumen de inyección que se establezca en el CG.

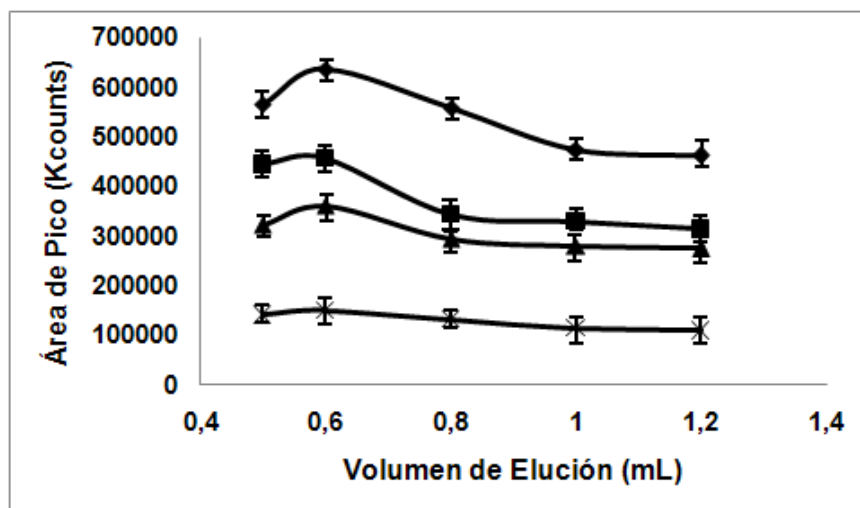


Figura 6. Estudio de volumen de elución en el sistema MSFIA para el análisis de los plaguicidas organofosforados (♦), Diazinon, (■) Clorpirifó, (▲) Metilparation, (×) Malation.

7.1.5. Velocidad de Flujo de Elución

La velocidad del flujo de elución es un parámetro que asegura que todos los POPs sean eluidos del disco sin pérdidas de los mismos. Un flujo del eluyente 0,6 mL/min durante un minuto aseguró la extracción cuantitativa de los POPs y se fijó para el resto del análisis.

Finalmente se evaluó también el tiempo de vida del disco. Para este estudio, se realizó el procedimiento de extracción de sucesivas inyecciones de muestras estándares de los POPs en agua, en un mismo disco. Los resultados indicaron que después de 20 inyecciones, los porcentajes de recuperación de los POPs comenzaban a disminuir y por ello se estableció un tiempo de vida del disco de hasta 20 extracciones de muestras de agua. En este punto es importante señalar que el reemplazo del disco en el dispositivo era muy sencillo, no consumía tiempo y no afectaba las determinaciones posteriores.

7.2. Separación Cromatográfica

Un resumen de las condiciones optimizadas del sistema cromatográfico se muestran en la Tabla 7 y en la Figura 7 se presenta un cromatograma cuando se trató por todo el procedimiento descrito una muestra de 10 mL de agua

enriquecida con los POPs a una concentración de 1,0 $\mu\text{g/L}$. En ella podemos observar que existe una buena resolución entre los POPs estudiados, sin interferencias y en un tiempo de análisis satisfactorio.

Tabla 7. Condiciones Optimizadas del sistema MSFIA–CG-EM

Equipo	Parámetros	Valor
MSFIA	Volumen de Preconcentración	10 mL
	Flujo de Preconcentración	1,8 mL/min
	Volumen de Elución	0,6 mL
	Mezcla de Elución (Metanol : Acetato de etilo v/v)	60:40
Automuestreador	Volumen de Inyección	1,0 μL
Cromatógrafo de gases	Temperatura del Inyector	220 °C
	Columna Capilar (DB-5) 5% fenil metilpolisiloxano	(30 m x 0,25 mm) espesor de película 0,25 μm
	Programa de Temperatura de la columna	100 °C (1.0 min) a 280 °C (2.0 min) at 10°C/min)
	Flujo del gas portador	1,0 mL/min
	Volumen de inyección	Splitless (0,40) min
Espectrómetro de Masas	Modalidad	Impacto Electrónico
	Temperatura de la trampa	220°C
	Temperatura del manifold	50 °C
	Temperatura de la transferencia	220 °C
	Corriente del filamento	20 μA

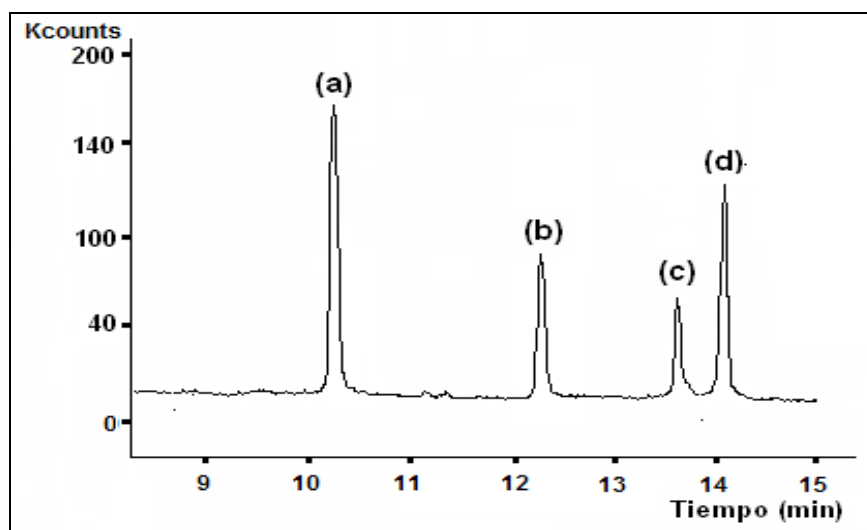


Figura 7. Cromatograma obtenido bajo las condiciones optimizadas (Tabla 7) para una muestra de agua enriquecida con los analitos (a) Diazinon, (b) Metil Paration, (c) Malation, (d) Clorpirifo, a una concentración de 1,0 $\mu\text{g/L}$.

8. Validación del Método

Para llevar a cabo la validación analítica del método se realizaron estudios de linealidad, exactitud y precisión.

8.1. Intervalo Lineal y Efecto de Matriz

Para establecer el intervalo lineal de trabajo se realizaron curvas de calibrado de soluciones patrones de los POPs y de muestras de aguas enriquecidas a diferentes niveles de concentración. Cada curva de calibrado incluyó al menos una serie de cinco puntos y un blanco y se midieron un mínimo de tres veces cada uno. Todas las muestras se procesaron por el método propuesto y se evaluaron en el sistema cromatográfico optimizado. En la Tabla 8 se presentan los intervalos de concentración estudiados así como las ecuaciones de regresión lineal del área de pico en función de la concentración, para ambas curvas.

Tabla 8. Características analíticas de las rectas de calibrado para los POPs y agua enriquecida con los analitos en el intervalo de concentración estudiado.

Compuesto	Matriz	Ecuación $A = mC + b^*$	r^2	Intervalo Dinámico ($\mu\text{g/L}$)	Límite de Detección ($\mu\text{g/L}$)
Diazinon	Patrón	$A = 12702,0 C$	0,9970	0,075 - 5,0	0,01
	Agua Enriquecida	$A = 12543,5 C$	0,9988	0,075 - 5,0	
Metil Paration	Patrón	$A = 59995,6 C$	0,9986	0,15 - 5,0	0,05
	Agua Enriquecida	$A = 60965,1 C$	0,9998	0,15 - 5,0	
Malation	Patrón	$A = 49447,4 C$	0,9920	0,15 - 15,0	0,05
	Agua Enriquecida	$A = 50201,5 C$	0,9988	0,15 - 5,0	
Clorpirifo	Patrón	$A = 89266,0 C$	0,9970	0,075 - 5,0	0,01
	Agua Enriquecida	$A = 90027,0 C$	0,9994	0,075 - 5,0	

Se puede observar que las curvas de calibración son lineales en el intervalo de concentración estudiado. Por otra parte, la comparación de las pendientes de

las curvas de calibración y de las de adición estándar no presentaron diferencias significativas (t de Student, $p < 0,05$; $n=5$). Esto indica que se pueden determinar los POPs en las muestras de agua de consumo humano utilizando una curva de calibrado de estándares de POPs.

Se evaluaron el límite de detección y el límite de cuantificación del método. El límite de detección definido como la relación señal a ruido (S/R) de 3:1 y el límite de cuantificación definido como la menor cantidad de analito que puede ser determinada cuantitativamente con una exactitud y precisión aceptables. Los resultados se muestran en la Tabla 8 y de acuerdo a los valores obtenidos podemos concluir que el método permite evaluar los POPs en muestras de agua destinadas para consumo humano dentro de los límites permitidos.

8.2. Precisión y Exactitud

Se determinó la precisión intraensayo e interensayo midiendo el área de pico de cinco réplicas de soluciones estándares de diazinon, metil paration, clorpirifo y malation y de muestras de agua enriquecidas con los POPs a diferentes niveles de concentración durante un día y en cinco días diferentes. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9, se puede observar que la desviación estándar relativa en un día tanto para los patrones como para las muestras de agua enriquecidas fueron menores del 4,3%, y entre días menores a 5,0%, lo que demostraba la buena estabilidad y repetibilidad del sistema descrito.

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación. Para ello se comparó el área de los picos de los POPs de las muestras de agua enriquecidas con los analitos, con las obtenidas de las soluciones estándares de los POPs, a los mismos niveles de concentración. Los resultados obtenidos (Tabla 10) indicaron que los porcentajes de recuperación para todos los casos estuvieron comprendidos entre 91,7 – 103,5% con un coeficiente de variación $< 3,10\%$. Estos valores pueden ser considerados cuantitativos y satisfactorios y demuestran la excelente eficiencia de extracción de los discos C_{18} utilizados. Por otra parte, estos resultados concuerdan con los reportados en la literatura^(13,22). Además, es importante resaltar que el realizar la EFS de los POPs en un disco inserto en un

Delgado

sistema de inyección en flujo multijeringa hace que el tratamiento de la muestra sea más sencillo que se traduce en una disminución significativa en el tiempo de análisis, en el consumo de disolventes y, por ende, en los costos del mismo.

Tabla 9. Estudio de precisión del método para la determinación de los POPs

Compuesto	Matriz	Concentración (µg/L)	C.V. ^a %	Concentración (µg/L)	C.V. ^b %
Diazinon	Patrón	0,075	3,8	0,075	4,6
		0,150	2,8	0,150	3,6
		0,300	1,7	0,300	1,6
Metil Paration	Patrón	0,150	4,2	0,150	4,5
		0,300	4,1	0,300	3,9
		0,600	3,9	0,600	4,0
Malation	Patrón	0,150	4,1	0,150	5,0
		0,300	4,3	0,300	3,5
		0,600	2,1	0,600	4,2
Clorpirifo	Patrón	0,075	3,2	0,075	3,7
		0,150	2,4	0,150	2,8
		0,300	2,8	0,300	3,0

^aen un día, ^b entre días

Tabla 10 Exactitud del método

Compuesto	Concentración añadida (µg/L)	Recuperación (%)	% CV (n=5)
Diazinon	0,075	100,52	2,80
	0,150	96,35	2,20
	0,300	102,80	1,80
Metil Paration	0,150	94,71	3,10
	0,300	102,84	2,28
	0,600	91,70	2,10
Malation	0,150	96,00	2,00
	0,300	101,39	2,20
	0,600	103,50	1,80
Clorpirifo	0,075	94,70	3,10
	0,150	96,47	2,28
	0,300	95,70	2,10

8.3. Muestras Reales

Utilizando el método propuesto se analizaron muestras de agua de chorro pertenecientes a los Laboratorios de la Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, España. En cada sitio se tomaron alrededor de 100 mL de muestra y en el momento de realizar el análisis, todas las muestras de agua se filtraron a

Delgado

través de filtros de 0,45 μm (support®-450 Membrana, Waters, USA) y 10 mL de éstas se preconcentraron en el MSFIA y se analizaron por CG-EM. Los resultados obtenidos indicaron que no había presencia de los POPs en las muestras analizadas. Por ello, se enriquecieron las muestras de agua con los POPs en el intervalo de concentración 0,15-5,00 $\mu\text{g/L}$. En la Tabla 11 se presentan los porcentajes de recuperación para todos los POPs que oscilaron entre 89,6 y 102,3 %. Estos resultados confirman que el método propuesto permite evaluar a los POPs en muestras de agua para consumo humano a los valores permitidos establecidos por la legislación de la Comunidad Europea.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación de POPs de muestras de agua para consumo humano enriquecidas

Muestra	Concentración agregada ($\mu\text{g/L}$)	Diazinon	Metil Parathion	Malathion	Clorpirifos
1	0,150	0,145 ^a	0,142 ^a	0,144 ^a	0,145 ^a
		96,4 $\pm$ 3,2 ^b	94,7 $\pm$ 2,9 ^b	96,0 $\pm$ 3,2 ^b	96,5 $\pm$ 3,4 ^b
2	0,300	0,307	0,308	0,304	0,287
		102,3 $\pm$ 3,3	102,8 $\pm$ 3,5	101,4 $\pm$ 3,2	95,7 $\pm$ 3,1
3	0,600	0,589	0,550	0,611	0,597
		98,2 $\pm$ 3,0	91,7 $\pm$ 3,3	101,8 $\pm$ 2,9	99,5 $\pm$ 3,6
4	0,750	0,745	0,739	0,754	0,744
		99,3 $\pm$ 3,4	98,5 $\pm$ 3,4	100,5 $\pm$ 3,0	99,2 $\pm$ 3,1
5	1,000	1,010	0,978	0,896	0,983
		101,0 $\pm$ 3,4	97,8 $\pm$ 3,2	89,60 $\pm$ 3,3	98,30 $\pm$ 3,3
6	1,250	1,256	1,237	1,248	1,240
		100,5 $\pm$ 3,4	98,9 $\pm$ 3,4	99,8 $\pm$ 3,1	99,2 $\pm$ 3,3
7	1,500	1,429	1,502	1,492	1,476
		95,3 $\pm$ 3,3	100,1 $\pm$ 3,1	99,5 $\pm$ 3,1	98,4 $\pm$ 2,9
8	2,000	1,965	1,972	2,032	1,917
		98,3 $\pm$ 3,4	98,6 $\pm$ 3,4	101,6 $\pm$ 3,7	95,9 $\pm$ 3,3
9	4,000	4,021	3,954	3,899	3,931
		100,5 $\pm$ 3,1	98,9 $\pm$ 3,4	97,5 $\pm$ 3,7	98,3 $\pm$ 3,3
10	5,000	4,788	5,085	4,934	4,886
		95,8 $\pm$ 3,4	101,7 $\pm$ 3,4	98,7 $\pm$ 3,5	97,7 $\pm$ 3,7

^aConcentración añadida ($\mu\text{g/L}$)

^b% Recuperación (n=3)

9. Comparación del método propuesto con otros publicados en la literatura

Al comparar el método propuesto con otros métodos reportados en la literatura se observa que en estos últimos la etapa de extracción se realiza en muchos casos en forma manual, empleando cartuchos⁽³⁶⁾, discos⁽³⁷⁾ o fibras (Microextracción en Fase Sólida (MEFS))⁽³⁰⁾, donde cada procedimiento es tedioso, involucra una serie de etapas donde se consume tiempo y cantidades importantes de solventes, además de estar sujetos a errores durante el proceso.

Adicionalmente, es importante señalar, que en muchos casos para realizar la EFS se requiere de grandes volúmenes de agua (500, 1000 mL) para llevar a cabo la preconcentración. Si bien, esta matriz no es limitante, para la elución de los analitos se requiere de cantidades elevadas de solvente orgánico (5, 10, 20 mL)^(36,37); involucrando una etapa adicional de evaporación de solvente que puede consumir hasta 15 min adicionales en el tratamiento de la muestra. Sin embargo, en el sistema propuesto, el consumo de solventes es muy bajo, debido a que éste dispensa solo la cantidad necesaria para llevar a cabo cada etapa del tratamiento. No se requiere de una etapa adicional de evaporación del solvente, ya que el volumen de elución es suficientemente bajo (0,6 mL) como para llenar directamente el vial que va al sistema cromatográfico.

Por otra parte, si lo comparamos con aquéllos métodos que utilizan la MEFS⁽³⁰⁾ para realizar el tratamiento de la muestra, la exposición de la fibra para la extracción de los analitos involucra un tiempo de 40 min y 4 min adicionales para la desorción de los mismos en el sistema cromatográfico.

10 Conclusiones

- ➔ El método desarrollado para la determinación de POPs en muestras de agua para consumo humano representa una buena alternativa a los ya existentes.
- ➔ La recuperación de los analitos desde las muestras de agua después de la extracción en disco en el sistema MSFIA fueron cuantitativas e independientes de la matriz investigada. En ese sentido, el método no requiere de la adición de un

patrón interno y la calibración puede realizarse simplemente con soluciones estándares de los POPs.

➡ La sensibilidad alcanzada permite evaluar los POPs en muestras de agua ajustado a los valores permitidos por la Comunidad Europea en aguas para consumo humano.

➡ El sistema de EFS-MSFIA propuesto puede considerarse una herramienta verde ya que garantiza bajo consumo de solventes orgánicos tóxicos y baja generación de residuos tóxicos.

➡ Se evaluó el tiempo de vida del disco de extracción y los resultados indicaron que permite realizar 20 análisis por disco con una precisión y exactitud satisfactoria.

➡ La separación por CG y detección por EM se realizó en 14 min sin la presencia de interferentes y se empleó 8 min en todo el procedimiento de extracción. Sin embargo, la posibilidad de superponer la etapa de extracción de los POPs con la de la separación por CG-EM de la inyección anterior, permitió que se pudiera analizar una muestra cada 6 minutos lo que corresponde a una frecuencia de análisis de 10 muestra/hora.

➡ Además, es importante resaltar que el realizar la EFS de los POPs en un sistema MSFIA hace que el tratamiento de la muestra sea más sencillo y rápido lo que se traduce en una disminución significativa en el tiempo de análisis, en el consumo de disolventes y, por ende, en los costos del análisis.

➡ Finalmente, los resultados obtenidos indican que el método propuesto puede ser utilizado como método de rutina para el monitoreo de la calidad del agua de consumo humano en lo que a plaguicidas POPs se refiere.

11. Bibliografía

- (1) Matthews, G. **Métodos para la Aplicación de Pesticidas**. Editorial Continental, S.A. 2da Edición. México. 1988.

- (2) Batista, A. **Nuevos Métodos Luminiscentes para la Determinación de Pesticidas en Aguas.** Departamento de Química. Universidad de Extremadura. Tesis Doctoral. 2001.
- (3) Ortega, R. Rodríguez, I. **Manual de Gestión del Medio Ambiente.** Editorial Mapfre S.A. España 342, 1994.
- (4) Cerdà, V. Estela, J. Forteza, R. Cladera, A. Becerra, E. Altimira, P. Sitjar, P. **Flow Techniques in Water Analysis.** Talanta 50, 695, 1999.
- (5) Wais, B. Thiel, I. Gentile, G. **Contaminación en Ríos y Lagos.** Editorial Lumen, Buenos Aires-Argentina. 48, 1997.
- (6) O.M.S. **Toxicology of Pesticides.** Interim Document 9. Copenhagen 1982. (Notas Técnicas de Prevención) Barcelona-España.
- (7) Reglamento General de Pesticidas. Gaceta Oficial N° 28.673 de 10 de Julio de 1968. Editorial la Torre, Caracas, Venezuela. 1968.
- (8) Gallo MA, Lawryk NJ. **Organic Phosphorus Pesticides.** En: Hayes WJ, Laws ER, editores. Handbook of pesticide toxicology. San Diego: Academic Press; 1991; 917-1.123.
- (9) Hawley, G., **Diccionario de Química y Productos Químicos.** 2da. Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. 1991.
- (10) The Agrochemicals Handbook. 2da. Edición. Royal Society of Chemistry Services. Nottingham NG72RD, Inglaterra, 1988.
- (11) Rozas, M. **Plaguicidas en Chile, la Guerra Química y sus Víctimas.** Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. Instituto de Ecología Política. Santiago de Chile – Chile. 48, 1995.
- (12) Tolosa, I. Douy, B. Carvalho, F. **Comparison of the Performance of Graphitized Carbon Black and Poly(styrene-divinylbenzene) Cartridges for the Determination of Pesticides and Industrial Phosphates in Environmental Waters.** Journal of Chromatography A, 864, 121-136. 1999.
- (13) Ballesteros, E. Parrado, M. **Continuous Solid-phase Extraction and a Gas Chromatographic Determination of Organophosphorus Pesticidas in Natural and Drinking Waters.** Journal of Chromatography A, 1029, 267-273. 2004.

- (14) Lacorte, S. Barceló, D. **Improvements in the Determination of Organophosphorus Pesticides in Ground and Wastewater Samples from Interlaboratory Studies by Automated On-line Liquid-solid Extraction Followed by Liquid Chromatography-diode Array Detection.** Journal of Chromatography A, 725, 85-92. 1996.
- (15) Sankararamakrishnan, N. Kumar, A. Sanghi, R. **Organochlorine and Organophosphorous Pesticide Residues in Ground Water and Surface Waters of Kanpur, Uttar Pradesh, India.** Environment International 31, 113– 120, 2005
- (16) Wei, Z. Jiang, G. Liu, J. Cheng, W. **Application of Solid-phase Microextraction for the Determination of Organophosphorous Pesticides in Aqueous Samples by Gas Chromatography with Flame Photometric Detector.** Talanta, 55, 807-814, 2001.
- (17) Goncalves, C. Alpenduraba, F. **Solid-phase Micro-extraction Gas-chromatography (tandem) Mass Spectrometry as a Tool for Pesticides Residue Analysis in Water Samples at High Sensitivity in Selectivity with Confirmation Capabilities.** Journal of Chromatography A, 1026, 239-250. 2004.
- (18) Aguilar, C. Borrull, F. Marcé, R. Barceló, D. **Monitoring of Pesticides In River Water Based on Samples Previously Stored In Polymeric Cartridges Followed by On-Line Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Diode Array Detection and Confirmation By Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry.** Analytica Chimica Acta 386 237-248, 1999.
- (19) Matskova, K. Lehotay, S. **Evaluation Of Common Organic Solvents For Gas Chromatographic Analysis and Stability of Multiclass Pesticide Residues.** Journal of Chromatography A, 1040, 259–272, 2004.
- (20) Pocurull, E. Aguilar, C. Borrull, F. Marce, R. **On-Line Coupling Of Solid-Phase Extraction to Gas Chromatography with Mass Spectrometric Detection to Determine Pesticides in Water.** Journal of Chromatography A, 818, 85–93, 1998.

- (21) Aguilar, C. Borrull, F. Marcé, R. **On-Line and Off-Line Solid-Phase Extraction With Styrene- Divinylbenzene-Membrane Extraction Disks for Determining Pesticides in Water by Reversed-Phase Liquid Chromatography- Diode- Array Detection.** Journal of Chromatography A, 754, 77-84, 1996.
- (22) Tolosa, I. Readman, J. Mee, L. **Comparison of the Performance of Solid-phase Extraction Techniques in Recovering Organophosphorus and Organochlorine Compunds from Water.** Journal of Chromatography A, 725, 93-106. 1996.
- (23) Pichón, V. **Multiresidue Solid-phase Extraction for Trace Analysis of Pesticides and their Metabolites in Environmental Water.** Analysis Magazine, 26 (6), 91-98, 1998.
- (24) Wolska, L. Wiergowski, M. Galer, K. Gorecki, T. **Sample Preparation for GC Analysis of Selected Pesticides in Surface Water.** Chemosphere, Vol. 39, No. 9, pp. 1477-1486, 1999.
- (25) Mmualafe L.C. Torto N. Huntsman-Mapila P. Mbongwe B. **Headspace solid phase microextraction in the Determination of Pesticides in Water Samples from the Okavango Delta with Gas Chromatography-Electron Capture Detection and Time-of-flight Mass Spectrometry.** Microchemical Journal 91: 239-244, 2009.
- (26) Padrón Sanz C. Halko R. Sosa Ferrera Z. Santana Rodriguez J.J. **Micellar Extraction of Organophosphorus Pesticides and their Determination by Liquid Chromatography.** Analytical Chimica Acta 524: 265-270, 2004.
- (27) Kuster M., López De Alda M., Barceló D. **Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometric Analysis and Regulatory Issues of Polar Pesticides in Natural and Treated Waters** Journal of Chromatography A. 1216 (3), 520-529, 2009.
- (28) Viñas P. Campillo N. López-García I. Aguinaga N. Hernández-Cordoba M. **Determination of Pesticides in Waters by Capillary Gas Chromatography with Atomic Emission Detection.** Journal of Chromatography A. 978(1-2), 249-256, 2002.

- (29) Beceiro-González E. Concha-Graña E. Guimares A. Goncalves C. Muniategui-Lorenzo S. Alpendurada M.F. **Optimisation and validation of a solid-phase microextraction method for simultaneous determination of different types of pesticides in water by gas chromatography–mass spectrometry** Journal of Chromatography A. 1141 (2): 165-173, 2007.
- (30) Bagheri, H. Ayazi, Z. Abanezhad, E. **A sol-gel-based amino functionalized fiber for immersed solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from environmental samples.** Microchemical Journal 94 1–6, 2010.
- (31) European Community, Brussels. EC Council Directive 98/83/EC of November 3 on the quality of water intended for human consumption, *Off. J. Eur. Communities* 330: 32, 1998.
- (32) Barcelo D. Chiron S. Lacorte S. Martinez E. Salau J.S. Hennion M.C. **Solid-phase sample preparation and stability of pesticides in water using Empore disks.** Trends in Analytical Chemistry. 13 (9), 352-361, 1994.
- (33) Miró, M. Cerdà, V. Estela, J. **Multisyringe Flow Injection Analysis: Characterization and Applications.** Trends in Analytical Chemistry. 21 (3), 199-210, 2002.
- (34) Cerdà V., **Introducción a los métodos de análisis en flujo.** Sciware, S.L. 2006.
- (35) Becerra, E. Cladera, A. Cerdà, V. **Development of a Software for Automatic Flow Analysis Applied to Routine Samples.** Lab. Robotics Autom. 58: 131-140, 1999.
- (36) Guardia Rubio, M. Ruiz Medina, A. Pascual Reguera, M.I. Fernández de Córdova, M.L. **Multiresidue analysis of three groups of pesticides in washing waters from olive processing by solid-phase extraction-gas chromatography with electron capture and thermionic specific detection.** Microchemical Journal 85 257–264, 2007
- (37) Fatta D. Michael, C. Canna-Michaelidou St. Christodoulidou M. Kythreotou, N. Vasquez, M. **Pesticides, volatile and semivolatile organic**

compounds in the inland surface waters of Cyprus. Desalination 215 (2007) 223–236.

www.bdigital.ula.ve

Capítulo V

“Determinación de cocaína y benzoilecgonina en orina humana por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para el tratamiento de la muestra en línea”

Resumen

En este trabajo, se desarrolló un método sensible y selectivo para determinar cocaína (COC) y benzoilecgonina (BZE) en muestras de orina humana por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM). La extracción de analitos desde las muestras de orina se logró en una columna de Oasis HLB (20 mm x 3,9 mm ID, d.p = 25 μ m; Waters), incorporada en un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA), utilizado para el tratamiento de la muestra. Para mejorar la volatilidad de BZE se realizó una reacción de derivatización en línea con N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% trimetilclorosilano (TMCS) asistida por irradiación con microondas con el fin de reducir el tiempo de reacción. Los resultados mostraron que el método propuesto es una buena alternativa para el análisis de COC y BZE en muestras de orina, ya que ofrece ventajas en comparación con los descritos en la literatura, que incluyen la simplicidad en el tratamiento de la muestra, la sensibilidad y la selectividad necesaria para determinar los analitos de interés a los bajos niveles de concentración en los que se encuentran en la orina y la alta frecuencia de análisis.

1. Introducción

El abuso de drogas ilícitas es un problema de salud pública serio que afecta a casi todas las comunidades y familias del mundo. El uso de drogas ilícitas representa un problema social y entre ellas, la cocaína (COC) es una de las más utilizadas⁽¹⁾.

La COC es un potente estimulante del sistema nervioso central y muchas muertes se han producido después de su uso recreativo y/o abuso. Esto explica el interés permanente en el desarrollo y optimización de metodología analítica rápida, sencilla, de alta fiabilidad y precisión, a fin de cuantificar COC en muestras biológicas ante la sospecha del consumo de la misma.

La COC es una droga lipofílica que en el cuerpo humano se metaboliza rápidamente en metabolitos hidrosolubles que se excretan por la orina como benzoilecgonina BZE (el principal metabolito de la cocaína) y en menor extensión como éster metílico de la ecgonina (EME) y ecgonina (ECG)⁽²⁾.

En la literatura se han reportado muchos métodos para el análisis de esta droga y sus metabolitos en diferentes matrices biológicas tales como sangre, orina, pelo, sudor, meconio, saliva, y el líquido amniótico. Sin embargo, la prueba de detección inicial de la cocaína se realiza generalmente en la orina, porque las muestras son fáciles de obtener y la prueba no es invasiva⁽³⁾.

Un procedimiento típico para la determinación de drogas de abuso implica dos pasos: detección y confirmación. Usualmente la detección de la droga se realiza mediante un inmunoensayo y la posterior confirmación de un resultado positivo empleando métodos cromatográficos o por electroforesis capilar. Para todos los casos es necesario realizar una etapa previa de tratamiento de la muestra (matriz que contiene a los analitos) para adecuarla a los requisitos de la técnica utilizada en la determinación.

Para el caso en particular del tratamiento de la muestra de orina se han utilizado diferentes técnicas de separación con el fin de extraer la COC y BZE y en ese sentido se ha realizado por extracciones líquido-líquido^(4,5) o en fase sólida en cartuchos con sorbentes de distinta naturaleza⁽⁶⁻¹⁰⁾. Sin embargo estos

procedimientos de extracción se han realizado durante mucho tiempo y se realizan aún en forma manual siendo muchas veces procedimientos que involucran muchas etapas y que consumen tiempo, además de que implica mano de obra intensiva y está sujeto a errores.

En los últimos años, en la literatura especializada encontramos numerosos trabajos dirigidos a diseñar sistemas automatizados para realizar el tratamiento de la muestra en línea con la determinación de los analitos. Estos sistemas por lo general minimizan el consumo de reactivos, de disolventes y de muestras y mejoran la frecuencia de los análisis.

Es por ello que en la búsqueda de nuevos métodos alternos para el análisis de drogas de abuso en general y de la COC en particular que se adapten a aquéllos Laboratorios que no cuentan con una infraestructura costosa de última generación nos propusimos para este trabajo:

El desarrollo de un método para evaluar COC y BZE en muestras de orina humana, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM), realizando el tratamiento de la muestra en línea en un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) acoplado a un horno de microondas doméstico para realizar la derivatización de BZE asistida por microondas.

13. Generalidades

2.1. Drogas de Abuso

El abuso de drogas ilícitas o bien de otras sustancias lícitas, se puede definir como el uso de un producto químico para conseguir un efecto farmacológico deseado en una forma impropia. Se establece así un patrón patológico de uso y un deterioro de la actividad social o laboral⁽¹¹⁾. En ese sentido, su uso compulsivo produce: dependencia psicológica (satisfacción y deseo vehemente de consumir), dependencia fisiológica y tolerancia (necesidad de aumentar la dosis para obtener los efectos deseados).

Este comportamiento se debe a que algunas drogas como la marihuana y la heroína tienen una estructura similar a la de los neurotransmisores que el cerebro produce de manera natural. Debido a esta semejanza, este tipo de droga puede “engañar” a los receptores del cerebro, logrando activar las células nerviosas para que envíen mensajes anormales.

Otras drogas como la cocaína y las metanfetaminas, pueden hacer que las células nerviosas liberen cantidades exageradas de neurotransmisores naturales o pueden bloquear el reciclaje normal de estas sustancias químicas del cerebro, lo cual es necesario para inhibir la señal entre las neuronas. Esto da como resultado un mensaje sumamente amplificado, que a su vez dificulta los canales normales de comunicación.

Tomando en cuenta las características antes mencionadas las drogas han sido clasificadas en función de sus efectos farmacológicos sobre el organismo. Dentro de esta clasificación se encuentran:

- Depresores del sistema nervioso central (SNC): inhiben el funcionamiento del SNC, disminuyendo la actividad nerviosa y el ritmo de las funciones corporales. Entre los efectos que producen se encuentran relajación, somnolencia, sueño e incluso coma. Ejemplos de estas sustancias los constituirían el alcohol, los diversos tipos de opiáceos (heroína, morfina, metadona) ciertos psicofármacos (como por ejemplo las benzodiacepinas o los barbitúricos).

- Estimulantes: producen una activación general del sistema nervioso central, dando lugar a un incremento de las funciones corporales. Se establece una distinción entre estimulantes mayores (tales como la cocaína o las anfetaminas) y menores (como la nicotina o la cafeína).
- Alucinógenos: también conocidos como perturbadores. Producen un estado de conciencia alterado, deforman la percepción y evocan imágenes sensoriales sin entrada sensorial. Ejemplos de estas sustancias los constituirían el LSD o las drogas de síntesis (que por los efectos que producen serían consideradas como sustancias mixtas estimulantes-alucinógenas)⁽¹²⁾.

Muchas de estas sustancias actúan directamente sobre el sistema nervioso central, causando graves trastornos conductuales, psíquicos y riesgos nocivos para la salud⁽¹³⁾. Se ha observado en los últimos años que el consumo de cocaína se ha extendido a todas las clases sociales incluidas las más bajas y entra dentro del consumo recreativo de drogas. En efecto, la cocaína es, luego del cannabis, la sustancia ilegal más consumida por la población en general y esto hace necesario conocer acerca de su consumo en nuestra sociedad.

2.1.1. Cocaína

La COC es una droga estimulante y altamente adictiva. Se obtiene de las hojas del arbusto *Erythroxylon coca*, planta originaria de los Andes, que se cultiva en América del Sur, en Indonesia y en algunos estados africanos. Es un arbusto de la familia de las eritroxiláceas, con hojas alternas, aovadas y enteras, flores blanquecinas y fruto de baya pequeña y roja, crece hasta una altura media de un metro y contiene entre 14 a 17 alcaloides distintos⁽¹⁴⁾

En 1855 un químico alemán de apellido Wohler aísla de las hojas de coca un alcaloide al que llama *erythroxyline* por el nombre genérico de la planta. Unos años más tarde, en 1859, empleando alcohol, ácido sulfúrico, bicarbonato de sodio y éter, otro químico alemán de nombre Albert Niemann purifica y aísla directamente de las hojas de coca el alcaloide al que se conoce desde entonces con el nombre de *cocaína*. Hasta mediados del siglo XIX la COC y sus derivados

gozan de gran prestigio como estimulantes de uso terapéutico. Tiempo después, esos mismos beneficios comienzan a percibirse como "riesgos seductores" que acabarían siendo una "amenaza para la sociedad".

La COC es una amina terciaria liposoluble con un pKa de 8,6⁽¹⁵⁾. Se define como un alcaloide y tiene las características clásicas de éstos: base nitrogenada capaz de formar sales con ácidos orgánicos o inorgánicos; origen vegetal y actividad farmacológica definida.

Químicamente es un derivado del tropano, perteneciendo al mismo grupo químico de otros alcaloides importantes como la atropina y la escopolamina. El núcleo químico fundamental es el Nor-Tropano. De él deriva el tropano que tiene un metilo (CH₃) ligado al nitrógeno. Del tropano deriva la ecgonina, que puede formar ésteres con los alcoholes mediante su radical ácido y con los ácidos mediante su radical alcohol. El éster doble, con alcohol metílico y con ácido benzoico, es la COC (Figura 1).

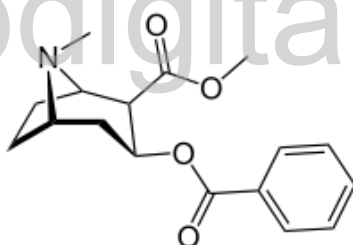


Figura 1. Estructura de la Cocaína

Existe una gran variedad de respuestas de los individuos hacia la COC y esta variabilidad es atribuida a las diferencias farmacocinéticas y al metabolismo⁽¹⁶⁾. Como se puede observar en la Figura 1, la molécula de COC tiene dos grupos funcionales ésteres susceptibles a la hidrólisis catalizada por las enzimas esterasa del cuerpo humano. Los principales metabolitos reportados en la literatura son la Benzoilecgonina (BZE), el Éster Metílico de la Ecgonina (EME) y la Norocaína (NOR)⁽¹⁷⁾.

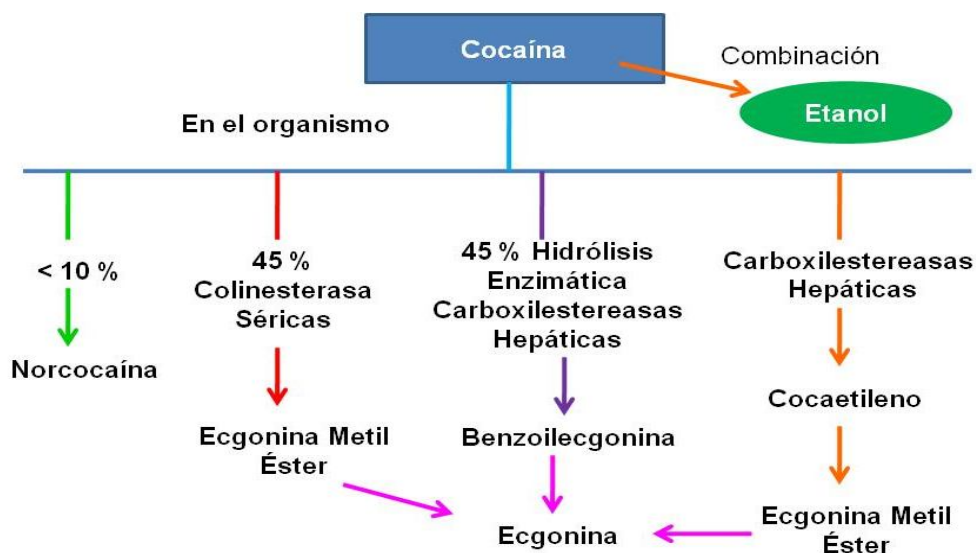


Figura 2. COC y sus principales metabolitos

En la Tabla 1 y 2 se resumen las propiedades físicas y químicas de la cocaína y sus metabolitos así como las características espectroscópicas de los mismos.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas de la cocaína y sus metabolitos ⁽¹⁸⁻²¹⁾

Compuesto	Estructura	FM	PM (g/mol)	P. F. (°C)	Solubilidad	Propiedades
Cocaína (COC)		$C_{17}H_{21}NO_4$	303,4	98 195	Soluble en alcohol, cloroformo y éter, ligeramente soluble en agua	Cristales incoloros a blanco o polvo cristalino blanco
Benzoil-ecgonina (BZE)		$C_{16}H_{19}NO_4$	289,34	195	Soluble en alcohol y en agua caliente, insoluble en éter	--
Éster metílico de la ecgonina (EME)		$C_{16}H_{17}NO_3$	199	--	--	--
Norcocaína (NOR)		$C_{16}H_{17}NO_3$	289	--	Soluble en metanol	Polvo blanco con un toque amarillento.

Tabla 2. Características espectroscópicas de la cocaína y sus metabolitos^(18,21,22)

Compuesto	Espectro de Absorción en el Ultravioleta (nm)	Infrarrojo	Espectrometría de Masas m/z (Picos de mayor abundancia)
Cocaína	En etanol: Máximo en 230, 274 y 281. Mínimo 217, 260 y 279. En ácido sulfúrico (0,1N) máximo en 233 y 275. inflexión a 281.	En KBr están en 1275cm ⁻¹ , 1700cm ⁻¹ , 1106cm ⁻¹ y 1728cm ⁻¹ .	82, 182, 303
Clorhidrato de cocaína	En agua: máximo 233 y 274, mínimo a 211 y 261	--	105 , 94
Benzoilecgonina	En etanol: similar a la COC 234 y 275	--	Derivatizada con BSTFA con 1% de TMCS (CG/EM) 82 , 240
Ester metílico de la ecgonina	Presenta un bajo coeficiente de extinción molar	--	82, 96 y 199
Norcocaína	--	--	168, 136 y 68

2.1.1.1. Formas de Presentación

Existen diferentes formas de abuso de la COC, la más antigua consiste en masticar las hojas de la planta, que produce en la lengua del individuo una ligera sensación de embotamiento o anestesia local.

En los últimos tiempos, estas hojas generalmente son procesadas para obtener *sulfato de coca o pasta base* también denominada *basuko*⁽²³⁾. La pasta de coca es un producto intermedio en la fabricación del clorhidrato de cocaína, que contiene alrededor del 50% de sulfato de cocaína y otros alcaloides además de contaminantes como el kerosén y el ácido sulfúrico provenientes del refinamiento. Su aspecto es el de un polvo chocolate de carácter terroso y se consume en cigarrillos mezclado con tabaco o marihuana⁽²⁴⁾.

La presentación más común de la COC es el *clorhidrato de cocaína* el cual es un polvo blanco, cristalino, soluble en agua y con efectos anestésicos al contacto con la piel y mucosas. Además tiene efectos vasoconstrictores. Esta última propiedad es la que explica su único empleo médico actual en el campo de la cirugía de fosas nasales. Aparte de esto no posee ningún otro uso médico.

Si el clorhidrato de cocaína es mezclado con una solución alcalina (amoníaco, hidróxido de sodio o bicarbonato de sodio) se filtra el precipitado o se disuelve con éter y se deja que éste se evapore, se obtiene la cocaína base. La *base libre* es un polvo blanco-parduzco⁽²²⁾, mientras que el crack precipita en forma de pasta, que una vez seca tiene aspecto de porcelana y se suele presentar como gránulos de 125 a 300 mg. Ambas son calentadas para su consumo sin embargo es el crack la forma que generalmente se fuma ya que la base es más volátil, vaporizándose a bajas temperaturas en contraste con el clorhidrato de cocaína que se descompone antes de volatilizarse cuando se calienta.

2.1.1.2. Formas de Adulteración

La COC es quizá la droga más sujeta a sufrir adulteraciones. En algunos laboratorios se han examinado muestras diferentes de COC circulantes en el mercado clandestino y han determinado que todas estaban adulteradas en proporciones que iban del 30 al 40%⁽²⁵⁾.

Hay dos tipos de "cortes" o adulterantes para la COC. Los cortes inactivos sirven para dar peso: lactosa, talco, bórax, manitol (que es un laxante) o cualquier otra cosa que se parezca a la COC y no tenga efectos colaterales perceptibles de manera inmediata. Para compensar la potencia pérdida en la adulteraciones, se le añaden también cortes activos, que pueden ser de dos clases: excitantes (anfetaminas en polvo) para que tenga una subida fuerte y congelantes (novocaína o benzocaína) para imitar el efecto característico de adormilar la boca de la auténtica cocaína⁽²⁵⁾.

Se cree que un modo elemental de detectar la adulteración es probando la droga; se supone ingenuamente que al contacto con los labios y la lengua, la COC los adormece. Esto nunca es una garantía porque como ya se señaló, el efecto puede estar provocado por lidocaína o procaína. La presencia de grumos también es un mito, en realidad estos grumos se deben a la humedad y se forman con todas las sustancias con las que pueda estar adulterada.

La prueba más efectiva para detectar adulterantes se realiza a nivel térmico: la COC se funde entre los 192 – 197 °C, así es que cualquier ingrediente

Delgado

que llegue a fundirse antes o después, no puede ser COC. Finalmente, la inmensa mayoría de los consumidores no sabe reconocerla por la sencilla razón de que nunca la ha visto ni la ha probado pura.

2.1.1.3. Vías de Administración

Las formas de abuso de COC son de gran interés, ya que condicionan la farmacocinética, la actividad farmacológica, la toxicidad y el grado de adicción de la droga (Tabla 3).

Tabla 3. Formas de Abuso y sus vías de administración⁽¹⁴⁾

Tipo de Sustancia	Conc. de Cocaína	Vía de Administración	Velocidad de Aparición de Efectos	Conc. Máxima en Plasma	Duración de Efectos	Dependencia
Hojas de Coca	0,5-1,5 %	Mascado Infusión	Lenta	60 min	30-60 min	No
Clorhidrato de Cocaína	12 - 75%	Intranasal (esnifar)	Rápida	5 -10 min	30-60 min	Si Largo Plazo
	12 - 75%	Endovenosa Intramuscular Subcutánea	Rápida	30 - 45 s	10-20 min	Si Corto Plazo
Pasta de Coca	40 - 85% Sulfato de Cocaína	Fumada	Muy Rápida	8 -10 s	5 -10 min	Si Corto Plazo
Cocaína Base	30 - 80%	Inhalada- Fumada	Muy Rápida	8 -10 s	5-10 min	Si Corto Plazo

El esnifado es un modo muy común de consumo del clorhidrato de cocaína. Debido a la intensa vascularización de la mucosa de la nasofaringe la absorción es rápida así como sus efectos (locuacidad, sensación de energía) que duran entre 20 y 40 minutos. El clorhidrato también puede ser administrado por vía intravenosa demorando solo 16 segundos en llegar al cerebro y produciendo sus efectos máximos en 30 segundos.

Por otra parte, la cocaína base y la pasta de coca (fumada) se difunden muy rápidamente de los pulmones al cerebro; sus efectos son inmediatos (5

segundos), muy intensos (se dice que 10 veces superiores a la cocaína suministrada por vía intravenosa o esnifada) y muy fugaces (4 minutos).

Es importante señalar que, en base a los valores suministrados en la Tabla 3 la cantidad relativa de COC que se absorbe a nivel sistémico depende fundamentalmente de la vía de administración y los tiempo de vida media de la COC depende de cada individuo y fundamentalmente de los niveles de colinesterasa relacionados con la cinética de eliminación del alcaloide⁽²⁵⁾.

2.1.1.4. Metabolismo

Un aspecto muy bien estudiado es el metabolismo de la COC en humanos. Lo que ha permitido la identificación en la orina de aproximadamente 15 metabolitos de esta droga, que provienen de procesos metabólicos tales como hidrólisis y N-desmetilación (Figura 3). Como se puede apreciar el metabolismo de la COC es muy amplio, excretándose no transformada solamente del 1 al 9% de la dosis. El metabolito principal es la BZE que puede formarse por la acción de una carboxilesterasa hepática ó por hidrólisis química espontánea a pH superiores a 7,0. Se estima que alrededor del 55% de las dosis se excretan en la orina en forma de este analito, aunque dicha eliminación es dependiente del pH urinario. La BZE es el metabolito más utilizado para monitoriar los tratamientos de rehabilitación. Puede ser detectada en orina 3-4 días después del último consumo y por supuesto dependerá de la cantidad de COC consumida, del valor de corte que se establezca o de la sensibilidad de la prueba.

El segundo metabolito en importancia es el Ester Metílico de la Ecgonina (EME) que se forma por acción de una colinesterasa plasmática y/o hepática y representa aproximadamente el 26 % de las dosis de COC administrada. Además, la EME puede generarse por hidrólisis no metabólica (in vitro) de la COC en muestras mal conservadas y se favorece a valores de pH superiores a 7,0.

La Norcocaína (NOR) se forma por acción del metabolismo oxidativo del nitrógeno tropano de la COC y se ha encontrado en la orina del 2-6% de las dosis. La NOR es un metabolito farmacológicamente activo que ha estado asociado a la

hepatotoxicidad que produce la COC tanto en animales de experimentación como en el hombre.

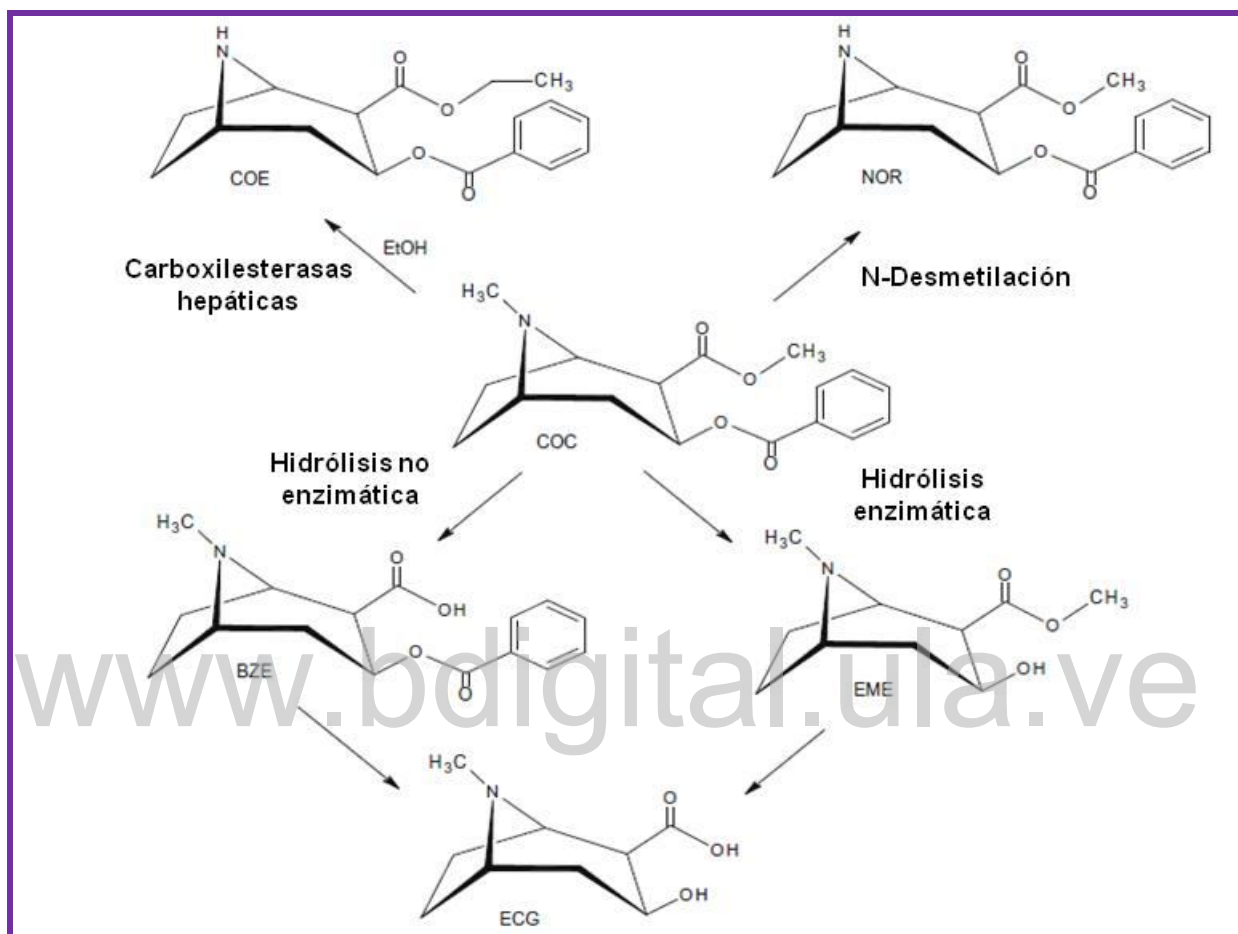


Figura 3. Metabolismo de la COC

La combinación de alcohol y COC supone un riesgo y un aumento de la morbi-mortalidad asociada a esta droga, debido a su transesterificación con el etanol para formar cocaetilo (COE) que tiene un comportamiento farmacológico idéntico al de la COC. Esta reacción está mediada por una de dos carboxiesterasas hepáticas microsomales no específicas, la cual en ausencia de etanol cataliza la hidrólisis de la COC a BZE (la otra es la responsable del paso de la COC a EME).

La interacción entre el etanol y la COC ha recibido gran atención en los últimos años, debido a que es una mezcla muy frecuente entre los consumidores y

drogodependientes, y desde un punto de vista toxicológico presenta matices muy interesantes, ya que incrementa notablemente el riesgo de daño cardíaco asociado normalmente al consumo de COC, incrementándose además la hepatotoxicidad e inmunotoxicidad producida por la misma, y se ha observado un incremento notable de muertes súbitas en contraste con el uso únicamente de COC.

Con todo lo antes expuesto se ha demostrado que la COC es un analito muy inestable, que puede ser degradado rápidamente por acción enzimática y que su hidrólisis química espontánea se favorece a pH alcalinos. Sin embargo aunque la vida media del alcaloide se encuentre entre 19 - 168 minutos sus metabolitos pueden durar hasta 5 días en el plasma y hasta 7 días en la orina luego del último consumo.

2.1.1.5. Toxicidad

La intoxicación aguda por COC se caracteriza por trastornos cardiovasculares, respiratorios y neurológicos. Debido a que esta intoxicación se basa en una estimulación severa del SNC.

Los riesgos a la salud existen independientemente de si la COC se inhala (aspira), se inyecta o se fuma. En la Tabla 4 se resumen las manifestaciones clínicas más comunes debido al consumo de esta droga.

2.1.1.5.1. Dosis Letales

La dosis letal es difícil de cuantificar puesto que varía según la vía de administración y es necesario considerar las variaciones individuales y la susceptibilidad a la droga⁽²⁷⁾.

Tomar una sola dosis de COC no es un patrón de uso característico en el mundo real. Una sesión de uso ilícito implica a menudo tomar múltiples dosis a lo largo de muchas horas.

Es importante señalar, que las sobredosis con COC son realmente raras, estimándose que tiene una dosis letal de alrededor de 1,0 g. Sin embargo,

Delgado

personas susceptibles han fallecido con dosis tan pequeñas como 0,03 g⁽²⁸⁾. Por otra parte, los drogodependientes son capaces de tolerar dosis tan altas como 5,0 g.

Tabla 4. Manifestaciones clínicas debido al consumo de la COC⁽²⁶⁾

	Efecto
Aparato Cardiovascular	Palpitaciones, taquicardia, arritmias (fibrilación auricular la más frecuente; taquicardia ventricular y fibrilación ventricular que es la causa más frecuente de muerte súbita por cocaína), hipertensión e infarto al miocardio
Aparato respiratorio	Respiración irregular
Aparato Digestivo	Anorexia, náuseas, vómitos, diarreas y las más graves aunque raras las de origen isquémico (úlceras gastroduodenales con hemorragia y perforación; colitis isquémicas entre otras).
Neurológicas	Cefalea (la complicación más frecuente); hemorragia cerebral, Convulsiones.
Sistema Nervioso Central	Ansiedad a medida que desaparecen los efectos euforizantes, confusión, irritabilidad, alucinaciones visuales y táctiles,, alteraciones de la percepción, reacciones paranoides y convulsiones. El cocainómano puede sufrir reacciones adversas añadidas por mezclar la cocaína con otras drogas: con heroína benzodiacepinas y/o alcohol.
Efectos Físicos	Constricción de los vasos sanguíneos periféricos, pupilas dilatadas y aumento en la temperatura del cuerpo, la frecuencia cardíaca y la tensión arterial. Algunos usuarios de cocaína reportan tener sensaciones de intranquilidad, irritabilidad y ansiedad, tanto durante el uso como entre períodos de uso.

2.1.1.6. Matrices Utilizadas para la determinación de COC y sus metabolitos

Hoy en día, existen diversas técnicas analíticas que se aplican para el control de drogas de abuso en diferentes muestras biológicas. La COC se puede determinar de forma individual o simultáneamente con otros fármacos en una amplia rango de matrices. Entre las más utilizadas se encuentra la orina, la sangre, el pelo, el sudor y la saliva.

La prueba de detección inicial de la COC se realiza generalmente en la orina debido a que la misma presenta ciertas ventajas con respecto a las muestras de sangre. Entre ellas se pueden destacar:

- ✓ La muestra se obtiene con facilidad.

- ✓ La concentración de las drogas es más elevada en la orina⁽²⁹⁾. En este caso la concentración de COC (aunque considerablemente más baja que su mayor metabolito la BZE) es más alta que en el plasma y es posible detectarla a través de métodos convencionales⁽¹⁸⁾.
- ✓ Los metabolitos de las drogas se excretan durante un período más prolongado a través de la orina (en ocasiones hasta días y semanas)⁽²⁹⁾.

Dado que la COC tiene un tiempo de vida media corto, alrededor de 1 hora, se suele medir la BZE, que tiene una vida media de eliminación en orina más prolongada y tienen un límite inferior de detección de aproximadamente 300 ng/mL llevando a cabo el análisis por inmunoensayo. Sin embargo, para evitar los falsos positivos, estos resultados se confirman con frecuencia empleando la CG-EM, que permite detectar BZE a muy bajos niveles de concentración⁽²³⁾. Por lo tanto la presencia de este metabolito es una prueba que garantiza que el individuo ha consumido la droga.

Algunos autores⁽³⁰⁾ indican que la administración crónica de la droga puede traer como resultado acumulación y eliminación prolongada durante la abstinencia, por lo que sugieren que la COC en orina puede ser detectada por un largo período de tiempo si ha sido administrada en altas dosis.

La orina contiene de 95 a 99 % de agua y de 1 a 5 % de solutos, presenta una coloración ámbar y un pH entre 4,8-7,4. En lo que respecta al volumen excretado los límites normales se encuentran entre 600 – 2500 mL/24h (promedio de 1200 mL). En la Tabla 5 se muestra la composición química de la orina en un lapso de 24 horas (estos valores depende en gran parte de la calidad y cantidad de material de desecho excretado)⁽²⁹⁾

Por otra parte, en sangre, después del uso de la COC el tiempo de detección en el sistema circulatorio está limitado principalmente por la deesterificación rápida de la droga, por esta razón ésta presenta un tiempo de vida media de 11- 41 min⁽³⁰⁾.

Tabla 5. Composición Química de la Orina

Composición Química de la Orina	
Densidad Específica	1,003 – 1,030
Constituyentes Orgánicos	
Ácido Ascórbico	15-50 mg
Urea	20-25 g
Amilasa	2 a 34 Unidades/2h
Glucosa	150 mg/24h
Albúmina	15-150 mg/24h
Ácido Úrico	250 a 750 mg /24 h (dieta normal)
Creatina, como creatinina:	Hombres adultos < 0,8 a 1,8 g Mujeres Adultas 0,6 a 1,6 g
Constituyentes Inorgánicos	
Cloruros	150-270 mEq ó 10 - 15 g
Sodio	>40 a 220 mEq/L (varía con la ingesta)
Potasio	25-125 mEq/24 h (varía con la ingesta)
Calcio	100 a 300 mg/ 24 h (dieta normal)
Magnesio	6,0 a 10,0 mEq /24h
Plomo	< 0.08 µg/mL o 120 µg/24 h
Azufre	0.7 - 3.5 g
Fósforo	0.6-1.2 g
Iodo	50-250 µg
Proteínas	
Proteínas Adultos	10 a 140 mg/L 1 a 14 mg/100 mL

Las muestras de sangre que presuntamente contengan COC, deben ser refrigeradas y analizadas lo más pronto posible, pues parte del tóxico se hidroliza durante el almacenamiento⁽¹⁸⁾. Es posible una pérdida de 10 a 30 % en 24 horas si estas son congeladas convencionalmente o en hielo seco. La adición inmediata de NaF^(30,31), utilizado en la mayoría de los casos, a una concentración final de 2 %(p/v), podría prevenir completamente la hidrólisis por 2 h a 37 °C y por seis semanas a -15 °C.

En los últimos tiempos, el pelo humano ha sido utilizado como matriz para la determinación de drogas de abuso en general y de COC en particular⁽³²⁻³⁴⁾. La principal ventaja de esta prueba, es que la droga se puede detectar en esta matriz por un período de tiempo más largo que en el caso de sangre y orina. Además, la toma de la muestra no es invasiva, es fácil de realizar y los niveles de

concentración tanto de la COC como de su metabolito son superiores a los reportados para fluidos biológicos.

Es importante mencionar que, el tratamiento de muestra es bastante tedioso ya que involucra varias etapas: lavado (eliminar la contaminación externa), digestión para extraer a los analitos de la matriz, extracción y derivatización (en caso de que el análisis se realice por CG con EM como sistema de detección) aumentando de esta manera el tiempo de análisis y el costo del mismo.

Por otra parte, la determinación de la COC en muestras de saliva y sudor ha sido utilizada fundamentalmente con énfasis en aplicaciones forensicas⁽³⁵⁾. Con respecto a la toma de muestra de saliva esta es no invasiva y fácil de tomar, sin embargo, para llevar a cabo este estudio es necesario tomar en cuenta varios factores, entre los que se pueden mencionar que la cantidad de muestra es limitada, la concentración de los analitos es mucho más bajas que en otras matrices, la variabilidad en el pH de la muestra y además la posible contaminación de la muestra con residuos en la cavidad oral o nasal, hace que los resultados obtenidos sean correlacionados con los niveles en plasma⁽³⁶⁾.

2.1.1.7. Niveles de COC y BZE reportados en la literatura para muestras de orina

Los niveles cuantitativos de sustancias de abuso en la orina se han utilizado para definir la prevalencia del uso de las mismas, ofreciendo una nueva e importante información que va más allá del alcance de los resultados cualitativos.

Es por esta razón, que durante los últimos años ha crecido el interés por usar el análisis cuantitativo de orina para el análisis de COC y BZE, ya que pueden proporcionar nueva información acerca de la salud de los individuos; contribuyendo enormemente al desarrollo de nuevas estrategias que permitan desarrollar programas preventivos, informativos y a su vez tratamientos de desintoxicación (farmacoterapias)

Es importante señalar, que para ello se hace necesario conocer cuáles son los niveles de concentración de estas sustancias en las diferentes matrices a estudiar, o en particular en la orina (Tabla 6). Estos valores indican que para llevar

Delgado

a cabo la identificación y cuantificación de los analitos, se requieren de metodologías que proporcionen una buena selectividad y sensibilidad ya que los límites de detección son bastantes bajos.

Tabla 6. Niveles de concentración de COC y sus metabolitos en orina humana reportados en la literatura

Grupo estudiado	Nº Suj.	COC µg/mL	BZE µg/mL	% Recup.	Ref
Muestras Clínicas*	29	0,004-40,13	0,106-3361	92,6-106,8	31
Muestras Clínicas*	5	ND - 0,363	0,289-9,197	--	37
Traficantes	64	--	0,069-4,045	--	6
Muestras	20	0,05 (LD)	--	88,6-91,2	7
Individuos Consumidores	20	0,05 (LD)	--	74,49	38

3. Antecedentes del Problema a Investigar

Para la determinación de COC y sus metabolitos en la literatura, se han reportado numerosos métodos que utilizan diversas técnicas analíticas para poder evaluarlos en diferentes matrices biológicas.

Inicialmente, los métodos más utilizados para el monitoreo de drogas de abuso en general son los inmunoensayos (inmunoensayo enzimático (EMIT)⁽³⁹⁾, radioinmunoensayo (RIA)^(40,41) o inmunofluorescencia⁽³¹⁾). Éstos presentan la ventaja de ser pruebas rápidas y económicas, sin embargo, pueden dar lugar a falsos positivos. Sustancias de estructura similar a la droga que se está analizando, pueden reaccionar con el anticuerpo de medida dando lugar a resultados erróneos.

Para el caso de la COC, la mayoría de los inmunoensayos son elaborados para detectar a su mayor metabolito la BZE. Por ello, pueden dar resultados positivos de 1 a 3 días después del consumo. Sin embargo, en los consumidores crónicos el período de detección puede extenderse de 10 a 22 días después de la última dosis.

Por otra parte, existe la posibilidad de obtener falsos positivos si el individuo ha consumido medicamentos que contengan lidocaína u otros anestésicos locales.

Por este motivo y dadas las implicaciones legales que presentan este tipo de análisis, cuando una prueba de inmunoensayo es positiva debe realizarse un segundo análisis por un método que permita confirmar el resultado⁽⁴²⁻⁴⁴⁾. Los métodos más utilizados para este propósito utilizan las técnicas de separación, entre las que encontramos la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) y la Cromatografía de Gases, acopladas a diferentes sistemas de detección⁽⁴⁵⁾. Estas técnicas permiten la identificación y cuantificación de esta droga y sus metabolitos, con la sensibilidad y selectividad necesarias para evaluarlos a los bajos niveles en los cuales se encuentran en las diferentes matrices, tales como la sangre⁽⁴⁵⁻⁴⁷⁾, orina^(6,7,48), uñas⁽⁴⁹⁾, cabello⁽⁵⁰⁻⁵²⁾, saliva⁽³⁷⁾ entre otros.

En ese sentido, se han desarrollado numerosos procedimientos para la determinación de COC y sus metabolitos empleando CLAR, debido a que esta ofrece una buena selectividad y bajos límites de detección sin necesidad de llevar a cabo la derivatización de la BZE. Para ello, ésta técnica ha sido acoplada a diferentes sistemas de detección como Ultravioleta^(53,54), Fluorescencia⁽⁵²⁾ y hoy en día a la espectrometría de masas^(55,43,47,48), debido a su gran versatilidad, selectividad y alta sensibilidad⁽⁴¹⁾. Sin embargo, si bien el detector de espectrometría de masas es muy específico ya que permite la identificación de cada uno de los analitos mediante su espectro de masas, por su costo elevado no es accesible a la mayoría de los laboratorios de análisis.

Por el contrario, la CG es una técnica que está presente en la mayoría de los laboratorios y es la técnica más utilizada para la determinación de drogas de abuso en métodos de referencia en estudios forensicos y toxicológicos⁽⁵⁶⁾ porque proporciona un alto nivel de selectividad y de sensibilidad. La COC ha sido evaluada empleando EM^(6,7,30,32,36,37,56) o ionización en llama (FID)^(56,57) como sistemas de detección. Sin embargo, debido a la baja tasa de eliminación de esta droga en orina, algunos estudios han demostrado la utilidad de los procedimientos de análisis cuantitativo de BZE, ya que los mismos permiten evaluar la eficacia de los programas de desintoxicación y así determinar si la cantidad de COC

consumida ha sido reducida. Por esta razón, para determinar simultáneamente COC y BZE por CG es necesario realizar una etapa de derivatización previa con el fin de mejorar la volatilidad de la BZE⁽⁵⁸⁾.

La determinación de COC y sus metabolitos se ha reportado en diferentes matrices biológicas tales como sangre, orina, pelo, sudor, meconio, saliva, y líquido amniótico⁽³⁾. Sin embargo, como lo dijimos con anterioridad, la prueba de detección inicial de COC se realiza generalmente en la orina.

Para llevar a cabo la determinación de COC y BZE en orina es necesario primeramente extraer a los analitos de esta matriz cuyos componentes endógenos pueden interferir en el análisis. En general esta no ha sido una tarea fácil debido a las diferencias de polaridad entre COC y BZE. En ese sentido, frecuentemente se han empleado técnicas de extracción bien sea extracción líquido-líquido (ELL)⁽⁵⁹⁾ o en fase sólida (EFS)^(6,9,46).

A manera de ejemplo, Saito y col⁽⁷⁾ describieron un procedimiento por CG para el análisis de efedrinas, opiáceos, anfetaminas, cocaína y sus metabolitos en muestras de orina utilizando como sistema de detección la EM. Para ello los analitos fueron extraídos de la matriz añadiendo glucoronidasa (hidrólisis enzimática) y ajustando el pH 5,0 con ácido acético. Los tubos se cerraban y se encubaban durante 2 h a 45 °C, posteriormente se enfriaban a temperatura ambiente y se centrifugaban por 10 min. El sobrenadante se transfería a otro tubo y se ajustaba el pH a 9,0 con una solución de NH₄OH al 10% y se le añadía una mezcla de éter-cloroformo (4:1; v:v). La capa orgánica se transfería a otro tubo y se le añadía ácido acético para finalmente evaporar a sequedad con una corriente de nitrógeno puro y seco. El residuo se sometía a una reacción de derivatización de BZE con anhídrido pentafluoropropiónico (PFPA/PFPOH) a 70°C durante 40 min. Finalmente se evaporaba a sequedad y el derivado se reconstituía en acetato de etilo y se inyectaba en el sistema cromatográfico. Como podemos observar es un tratamiento de la muestra tedioso, que consume mucho tiempo, aproximadamente 3 horas.

La EFS también ha sido ampliamente utilizada para estos análisis en vista de que cuenta con una amplia gama de sorbentes de diferente naturaleza y en los

últimos años el empleo de cartuchos de empaque mixto (C_4 , C_8 , C_{18} con intercambiador catiónico)^(6,37,48) que permiten extraer a los analitos, además de su empleo en un amplio intervalo de pH.

Por lo general, para llevar a cabo la EFS se requiere de una serie de etapas que involucran, acondicionamiento del cartucho, introducción de la muestra, lavado para eliminar las interferencias y elución de los analitos de interés. Además las condiciones de cada etapa deben ser optimizadas cuidadosamente para lograr la máxima retención de los analitos y la eliminación de las interferencias.

Marchei y col.⁽⁶⁾ llevaron a cabo la detección de COC, heroína y sus metabolitos, empleando un método inmunológico y confirmando los resultados por CG-EM. Los analitos se extraían de la muestra de orina preparada en buffer fosfato pH 6,0 empleando EFS con cartuchos Bond Elut Certify (empaque mixto). Inicialmente el cartucho se acondicionaba con metanol y buffer fosfato (pH 6,0), se lavada con ácido acético 1 M y metanol, posteriormente se introducía la muestra y finalmente los analitos se eluían con una mezcla de acetato de etilo- 2% hidróxido de amonio. El eluido se evaporaba a sequedad con una corriente de nitrógeno y el residuo se sometía a la reacción de derivatización de BZE empleando BSTFA-1% TMCS en acetonitrilo a 70°C durante 30 min.

Como se puede observar, una vez más es un procedimiento manual tedioso que consume mucho tiempo.

En los últimos años, en la literatura especializada encontramos numerosos trabajos dirigidos a diseñar sistemas automatizados para integrar el tratamiento de la muestra en línea con la determinación de los analitos. Estos sistemas por lo general minimizan el consumo de reactivos, de disolventes y de muestras y mejoran la frecuencia de los análisis.

En ese sentido, se han utilizado las técnicas de flujo continuo con el fin de poder utilizar la EFS como técnica de tratamiento de la muestra en métodos de análisis de rutina⁽⁶⁰⁾.

Una de las principales ventajas de la combinación de técnicas de flujo con las técnicas cromatográficas es que los equipos de análisis en flujo no son muy costosos. No obstante, también tiene sus limitaciones derivadas de la

incompatibilidad del uso de eluyentes orgánicos con las tuberías (tygon y vigon) de las bombas peristálticas así como el alto consumo de muestra y reactivos.

Para solventar estos inconvenientes Cerdà y col.⁽⁶⁰⁾ en 1999 proponen el empleo de sistemas de análisis por inyección en flujo multijeringa (MSFIA). La versatilidad del MSFIA permite su acoplamiento a diferentes sistemas de extracción bien sea líquido-líquido o en fase sólida, logrando la preconcentración y limpieza de las muestras con la mínima participación por parte del operador. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que las técnicas de flujo normalmente operan a bajas presiones y el acoplamiento directo con una columna convencional de CLAR no es posible^(61,62).

A fin de resolver este problema, en la literatura se han reportado algunas aplicaciones de SIA y MSFIA empleando columnas cromatográficas con empaques especiales (RAM, OASIS HLB) con diámetro de partículas de 25 - 60 μm , las cuales se pueden conectar directamente a los sistemas de flujo sin causar sobrepresión en el mismo.

Es importante señalar, que el empaque de la precolumna OASIS HLB (Waters) consiste de una proporción equilibrada de dos monómeros: N-vinilpirrolidona (carácter hidrofílico) y divinilbenceno (carácter lipofílico) que permite la retención de compuestos de diferente polaridad. Lo que indica que esta columna sería una buena alternativa para retener a la COC y la BZE debido a las diferentes características fisicoquímicas que las mismas presentan.

Por otra parte, para lograr la sensibilidad y selectividad adecuada, una vez llevado a cabo la extracción de los analitos desde las muestras de orina se requiere de una etapa adicional de derivatización para la BZE con el fin de mejorar su volatilidad ya que en su estructura molecular presenta grupos polares. Generalmente el procedimiento se realiza por una reacción de silanización^(54,63,64). Entre los reactivos utilizados para este propósito, la N,O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) + trimetilclorosilano (TMCS) es uno de los más ampliamente utilizados para la identificación y cuantificación de BZE⁽⁶⁵⁾. La eficiencia de este procedimiento de derivatización depende de una serie de factores, incluidas las condiciones de reacción, tales como, el uso de solventes,

temperatura y tiempo de calentamiento⁽⁶⁶⁾. Para el caso de BZE, en la literatura se han reportado numerosos procedimientos en los cuales se reportan temperaturas de calentamiento entre 60-80°C por periodos de tiempo que van de 30-60 min^(6,67,68) y el empleo de acetonitrilo como solvente⁽⁶⁾.

Es importante señalar que algunos autores indican que la reacción de derivatización con BSTFA+1% TMCS no es selectiva y el empleo de un solvente que posea grupos funcionales susceptibles a ser derivatizados puede disminuir en gran proporción el rendimiento de la reacción con la BZE. Por tal motivo, generalmente se emplea piridina, acetonitrilo, acetato de etilo como medios para llevar a cabo dicha reacción⁽⁶⁷⁾.

Adicionalmente, de la revisión bibliográfica se ha podido constatar que se han llevado a cabo reacciones de derivatización de diferentes compuestos empleando la radiación asistida por microondas, lo que ha traído consigo una disminución sustancial en el tiempo de reacción logrando llevar a cabo procesos de derivatización que tardan horas a unos pocos minutos⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾. Sin embargo, hasta ahora esto no se ha utilizado para la BZE, que permitiría disminuir muy significativamente el tiempo involucrado en la etapa de tratamiento de muestra en un análisis por CG.

Por todo lo expuesto, en el presente trabajo se formuló la propuesta de desarrollar un método para evaluar COC y BZE en muestras de orina humana, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM), con tratamiento de la muestra en línea en un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) de última generación acoplado a un horno de microondas doméstico para asistir la reacción de derivatización de BZE.

4. Justificación

La drogadicción se caracteriza por ser un problema complejo de múltiples causas, que incide en los diversos ámbitos de acción del desarrollo humano. Ello afecta a sectores fundamentales de la sociedad como la familia, la escuela, el ámbito laboral y la comunidad.

El consumo de drogas es una realidad y es por ello que se han llevado a cabo esfuerzos para tratar de cubrir tres áreas fundamentales: Prevención Integral; Tratamiento, Rehabilitación y Reincorporación Social.

La Prevención Integral es el área hacia donde se dirigen los mayores esfuerzos, en procura de fortalecer al individuo y a la familia con el fin de aminorar el impacto del consumo de drogas en la sociedad.

Es importante destacar, la necesidad de capacitar y actualizar al recurso humano, que ejecuta planes, programas y proyectos, además de reforzar la investigación y la generación de nuevos conocimientos; así como la coordinación, unificación de criterios y la difusión de resultados.

El problema del consumo de drogas es complejo y cambiante. Además hay escasos sistemas estadísticos confiables que permitan estudiar la prevalencia del uso de las drogas en los distintos niveles de la población. Por lo que se hace necesario desarrollar líneas de investigaciones aplicadas a la detección de nuevas drogas, tendencias y patrones de consumo.

Una de las líneas de investigación del Laboratorio de Espectroscopia Molecular (LEM) en los últimos años, ha sido precisamente el desarrollo de metodologías que permitan evaluar drogas de abuso en diferentes matrices biológicas (pelo, plasma y orina). En todo momento, nos hemos orientado al desarrollo de procedimientos que simplifiquen el tratamiento de la muestra con el fin de obtener resultados confiables en el menor tiempo posible y a bajo costo.

Por esta razón, el desarrollo de este trabajo trata de complementar la información obtenida en otros trabajos anteriores, empleando sistemas de nueva generación que minimizan la manipulación de la muestra por parte del operador y además permiten obtener límites de detección mucho más bajos, sobre todo para

la determinación de la COC cuya concentración es 10 veces más baja que su metabolito (BZE).

5. Hipótesis

Para llevar a cabo este trabajo se planteó la siguiente Hipótesis de Trabajo Si se tiene en cuenta que:

- ✓ Una precolumna OASIS HLB, bajo ciertas condiciones experimentales puede retener a los analitos de interés, mientras que los compuestos endógenos de la matriz son llevados a desecho.
- ✓ La técnica de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) permite automatizar la etapa de EFS de los analitos de interés.
- ✓ La reacción de derivatización con N-(terbutildimetil silil) metil trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% de trimetilclorosilano (TMCS) permite aumentar la volatilidad del metabolito de la cocaína, garantizando la evaluación del mismo.
- ✓ La reacción de derivatización puede llevarse a cabo asistida por microondas.
- ✓ Una columna analítica DB-5 5% fenil metilpolisiloxano proporciona una buena eficiencia y selectividad en la separación de la COC y su metabolito.
- ✓ El espectrómetro de masas (EM) permite detectar e identificar a los analitos estudiados a través de sus espectros de masas.

“Se podrá desarrollar un método cuantitativo rápido y preciso utilizando un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para el tratamiento en línea y derivatización asistida por microondas (MW) para determinar cocaína y benzoilecgonina en muestras de orina humana, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM)”.

Para cumplir con esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

6. Objetivos

6.1. Objetivo General

- ❖ Desarrollar un método por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-EM) con tratamiento de muestra en línea para la determinación de COC y BZE en muestras orina humana.

6.2. Objetivos Específicos

- ❖ Optimizar las condiciones del sistema MSFIA para llevar a cabo el tratamiento y preconcentración de los analitos de interés.
- ❖ Seleccionar una precolumna con un empaque que permita extraer cuantitativamente a la COC y la BZE de las muestras de orina.
- ❖ Estudiar los parámetros involucrados en la reacción de derivatización asistida por microondas (solvente, tiempo y potencia)
- ❖ Seleccionar la columna analítica y optimizar un método por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas que permita la detección y cuantificación de los analitos en estudio.
- ❖ Aplicar la metodología desarrollada para la determinación de COC y sus metabolitos en muestras de orina humana reales.

7. Parte Experimental

7.1. Reactivos y Solventes

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y los solventes de grado HPLC. El fosfato diácido de potasio (99,9 %) y el ácido fosfórico (85,9 %) fueron suministrados por J.T. Baker (Phillsburg, N.J., U.S.A) y el fosfato monoácido de sodio (99,9 %) por Mallinckrodt (New Jersey, U.S.A.). El acetonitrilo y metanol fue suministrado por J.T. Baker (Phillisburg, NJ, USA). El reactivo derivatizante *N*-O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% de Trimetilclorosilano (TMCS), el Clorhidrato de Cocaína (98 %) y la Benzoilecgonina (98 %) fueron

proporcionados por Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) El agua utilizada se purificó en un sistema Milli-Q SP TOC (Waters, Millipore, Milliford, MA, U.S.A).

7.2. Preparación de Soluciones

Se prepararon soluciones de COC y BZE de 50 µg/mL en acetonitrilo a partir de los patrones de ambos analitos de 1000 µg/mL (en metanol).

Los estándares de calibración de los analitos de 10 µg/mL se prepararon en buffer fosfato pH = 6,0 a partir del patrón de 50 µg/mL y almacenados bajo refrigeración a 4 °C. Las soluciones de trabajo de menor concentración se preparaban semanalmente por dilución de estos estándares.

7.3. Preparación y Almacenamiento de las Muestras de Orina

La optimización del método se realizó a partir de un concentrado de orina de 100 individuos voluntarios no consumidores.

Para evaluar el procedimiento propuesto se analizaron 18 muestras de orina de personas sospechosas de abuso a la cocaína.

Las muestras de orina (30-40 mL) fueron recogidas en envases plásticos estándar y a cada uno se les agregó una solución saturada de NaF (50 µL) y se almacenaron a -70 ° C hasta el momento del análisis a fin de evitar el deterioro potencial de la cocaína. De esta forma, la hidrólisis enzimática de la COC a BZE se inhibe in vitro con NaF, mientras la degradación enzimática de la COC a baja temperatura es insignificante⁽⁶⁷⁾. En el momento de su uso las muestras se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos para remover cualquier material precipitado. Posteriormente, a 1 mL de la muestra de orina en un tubo de centrífuga se le adicionaron 3 mL de una solución de buffer fosfato 10 mM, pH 6,5 (1:3 v / v), se agitó en un Vortex durante 20 segundos, y se centrifugó a 12.000 x g durante 5 min. El sobrenadante se separó y se filtró con membranas de 0,22 µm (support®-450 Membrana, Waters, USA) para evitar la presencia de cualquier tipo de material en suspensión que pudiera ocasionar una obstrucción de los poros del material de empaque de la precolumna o en las conexiones del sistema.

Finalmente, un volumen de 100 μ L de filtrado estaba listo para ser inyectado en la precolumna Oasis® HLB.

7.4. Instrumental Utilizado

7.4.1. Tratamiento de la muestra

Para la realización de este trabajo se utilizó el sistema que se muestra en la Figura 4. que consistió de una bureta con velocidad programable (MicroBU2030; Cryson, Allela, Barcelona) equipada con cuatro jeringas bidireccionales de alta precisión (J1-J4) (Hamilton, Switzerland), aunque para el sistema sólo tres de ellas fueron utilizadas J1(10,0 mL), J2 (5,0 mL) y J3 (5,0 mL). Además cada una de ellas en la parte superior tenía una válvula solenoide de 3 puertos (V1-V3) (N-Research, Caldway, NJ). Dependiendo de la posición de la válvula solenoide el líquido que contiene la jeringa era aspirado o dispensado hacia el sistema (posición On) o al reservorio (posición Off). Adicionalmente dos válvulas de conmutación (V4-V5) fueron conectadas y controladas a través de la bureta (Takasago Electric, Nagoya, Japan). Todo el proceso estaba controlado a través de un computador conectado a una interfase RS232C.

Para todo el sistema se utilizó tubería politetrafluoroetileno (PTFE) de 0,8 mm de diámetro interno (d.i.). Todas las conexiones fueron de 40 mm de longitud para evitar sobrepresión en el sistema, excepto el lazo, en el cual se emplearon 200 mm x 0,8 mm d.i. con el fin de obtener un volumen de 0,100 mL para la toma de la muestra. Todos los conectores T fueron hechos de PTFE, el cual resiste mejor el uso de solventes orgánicos. Para la extracción en fase sólida de COC Y BZE desde la muestra de orina se utilizó una precolumna Oasis® HLB (20 mm x 3.9 mm d.i., 25 μ m de diámetro de partícula) (Waters, USA) la cual se acopló directamente al sistema en flujo sin generar sobrepresión en el sistema. Para controlar las condiciones de la reacción de derivatización se empleó un horno de microondas doméstico (LG Intelowave, MS-0745V). Todo el control de sistema y la adquisición de datos se realizó empleando el paquete de Software Autoanalysis 5.0 (Sciware, Palma de Mallorca, Spain).

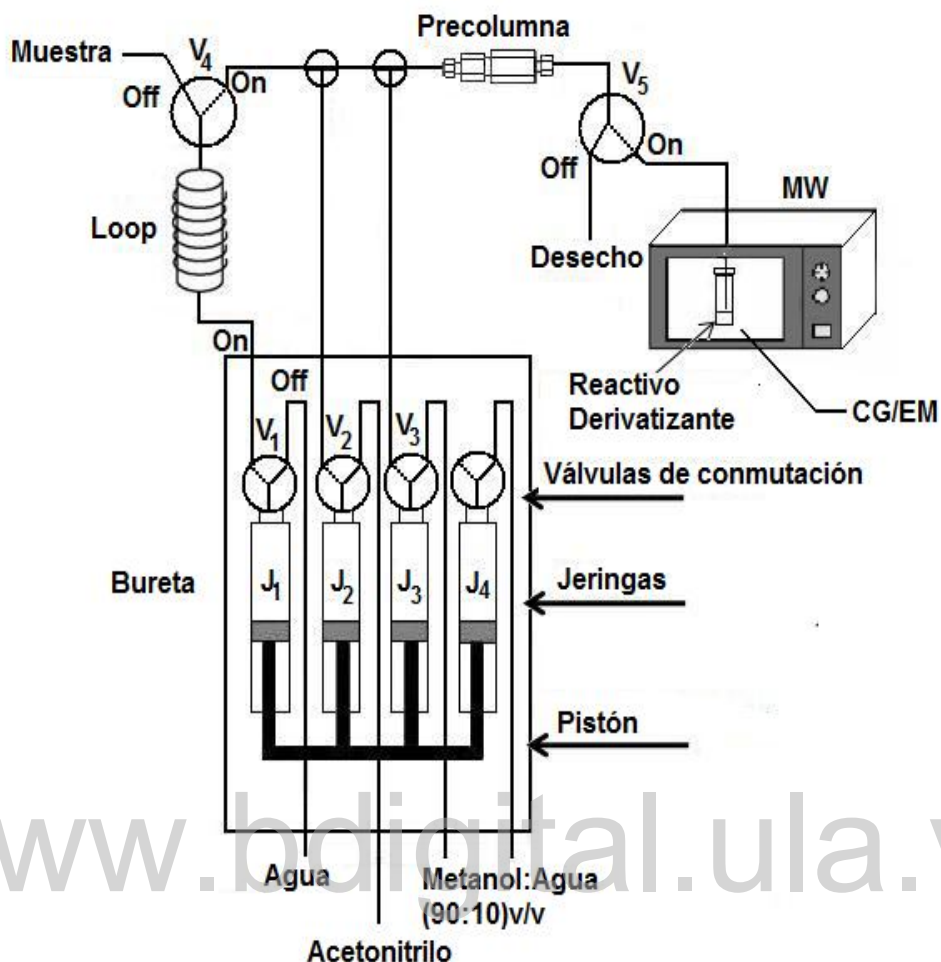


Figura 4. Sistema por inyección en flujo multijeringa (MSFIA) empleado para la determinación de COC y BZE en orina humana.

7.4.2. Sistema Cromatográfico

La determinación e identificación de COC y BZE por CG-EM se realizó utilizando el instrumental que se detalla a continuación:

El sistema cromatográfico estaba constituido por un cromatógrafo de gases VARIAN modelo 3800 acoplado a un espectrómetro de masas VARIAN Saturno 2000 (con un analizador de trampa de iones) y a un automuestreador VARIAN modelo 8200 con un carrusel para 48 viales.

Para el procesamiento de los datos y control de los parámetros instrumentales del sistema se utilizó un computador Dell (OptiPlex Gxa) equipado

con el software correspondiente. La identificación de los analitos se realizó utilizando las librerías WILEY y NIST integradas al software del equipo.

La separación de los analitos se realizó en una columna capilar de sílice fundida con un 5 % fenil, 95 % metilpolisiloxano, (VA-5MS) de 30 m x 0,25 mm con un espesor de película de 0,25 μm suministrada por VARIAN. El programa de temperatura del horno que permitió la mejor resolución de los analitos fue: 55 °C (3 min) hasta 290 °C (15 min) con una rampa de temperatura de 25 °C/min. Se utilizó Helio como gas portador a un flujo de 1 mL/min.

El inyector se utilizó bajo la modalidad de splitless (división controlada de la muestra) a una temperatura programada de 55 °C (2 min) con una rampa de 200 °C/min para una temperatura final de 325 °C (15 min). Bajo estas condiciones el sistema permite inyectar al menos 9 μL de muestra en la línea de entrada de CG, a una temperatura por debajo del punto de ebullición del disolvente.

La modalidad utilizada para el detector de masas fue la de impacto electrónico (70 eV). La temperatura de la línea de transferencia, manifold y trampa de iones fueron de 200 °C, 40 °C y 200 °C respectivamente. Los iones seleccionados para llevar a cabo el monitoreo de ion específico (SIM) fueron: m/z 82, 182 and 303 para COC; m/z 82, 240 and 361 para BZE-O-TMS (derivado).

7.4.3. Procedimiento

Los detalles sobre el funcionamiento del sistema MSFIA se enumeran en la Tabla 7. Todo el procedimiento consta de 9 pasos.

Inicialización del sistema. Con todas las válvulas en posición “off”, las jeringas se llenaban con las soluciones contenidas en los depósitos respectivos a un flujo 5,0 mL/ min; S1 (agua), S2 (acetonitrilo); S3 (metanol / agua 90:10, v / v).

Procedimiento directo. Inicialmente la precolumna OASIS HLB se acondicionaba con 5 mL de la mezcla metanol: agua (90:10) v/v suministrada por la jeringa 3 (J3) [Paso 1]. A continuación, la jeringa 1 (J1) suministraba un volumen de 1,0 mL de agua a través del sistema para eliminar el residuo de metanol que estaba presente en el volumen muerto de la precolumna después de la etapa de

Delgado

acondicionamiento [**Paso 2-4**]. Posteriormente J1 conectada a la V4 en posición (off) aspiraba la muestra y llenaba el lazo (0,100 mL) [**Paso 5**]. Seguidamente, esta misma jeringa (J1) pero con la válvula V4 en posición “on” se encargaba de introducir la muestra en la precolumna OASIS [**Paso 6**] y bajo las mismas condiciones a continuación se lavaba la columna con 2 mL de agua con el fin de eliminar la mayor cantidad de compuestos endógenos, mientras que los analitos eran retenidos en la precolumna [**Paso 7**]. A continuación la jeringa 2 (J2) (acetonitrilo) con la válvula V5 en posición “off” suministraba acetonitrilo a la precolumna para eliminar toda el agua presente en el volumen muerto de la precolumna y que podía interferir durante la reacción de derivatización [**Paso 8**]. Igualmente, la jeringa 2 (J2) pero con la válvula V5 en posición “on” se encargaba de introducir al sistema el solvente orgánico (acetonitrilo) para eluir los analitos desde la precolumna [**Paso 9**] hacia el vial que contenía el reactivo derivatizante (BSTFA + 1% TMCS) y estaba situado en el horno de microondas donde se llevaba a cabo la reacción de derivatización. Finalmente, se realizaba la separación de los analitos por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas. La secuencia del procedimiento se repetía tres veces [**Paso 3-9**] para cada muestra. Todo el procedimiento en general, tratamiento de cada muestra y la etapa de derivatización se realizaban en 7,50 min.

Tabla 7. Procedimiento analítico para la limpieza y elución de COC y BZE en muestras de orina en el sistema MSFIA

Paso	Tiempo (min)	Descripción	Operación	Flujo (mL/min)	Posición Válvulas				
					V1	V2	V3	V4	V5
1	10.0	Acondicionamiento OASIS HLB ^a	Dispensar 5.0 mL	0.6	off	off	on	off	off
2- 4	1.4	Inicio del ciclo							
		Ajuste Jeringas	Aspirar 5.0 mL	30.0	off	off	off	off	off
		Lavado precolumna	Dispensar 0.8 mL	0.6	on	off	off	on	off
5	1.5	Toma de muestra	Aspirar 0.1 mL	1.0	on	off	off	off	off
6	2.0	Introducción de la muestra	Dispensar 0.3 mL	0.6	on	off	off	on	off
7	5.0	Limpieza (retention COC y BZE)	Dispensar 1.8 mL	0.6	on	off	off	on	off
8-10	6.0	Elución (desecho)	Dispensar 0.1 mL	0.6	off	on	off	off	off
		Elución al vial	Dispense 0.5 mL	0.6	off	on	off	off	on
		Final del ciclo (Próxima inyección)							

8. Resultados y Discusión de los Resultados

La optimización de los parámetros instrumentales se llevó a cabo empleando el método univariado, es decir, un parámetro a la vez y en el sistema propuesto se realizaron los siguientes estudios:

- (a)** Optimizar las condiciones de trabajo del sistema MSFIA. Optimizar todos los parámetros involucrados en la EFS de los analitos desde las muestras de orina.
 - ✓ Volumen y velocidad del flujo de introducción de la muestra.
 - ✓ Etapa de limpieza de la muestra, con el fin de eliminar la mayoría de los compuestos endógenos sin pérdida de los analitos.
 - ✓ Elución de los analitos de la precolumna OASIS HLB. Volumen y Velocidad del Flujo del solvente de elución.
- (b)** Optimizar las condiciones de trabajo en el cromatógrafo de gases.
 - ✓ Selección de la columna cromatográfica
 - ✓ Optimizar las condiciones cromatográficas de separación para la columna seleccionada.
- (c)** Establecer las mejores condiciones para llevar a cabo la etapa de derivatización asistida por microondas
 - ✓ Potencia de Irradiación
 - ✓ Tiempo de Irradiación
- (d)** Optimizar las condiciones del sistema de detección (espectrómetro de masas)

Para la optimización de los parámetros instrumentales se utilizaron soluciones patrones de los analitos en buffer fosfato 20 mM (pH 6,0), a una concentración de 0,5 µg/mL.

8.1. Estudio de la extracción en fase sólida de los analitos en el sistema MSFIA

Para realizar la EFS de los analitos objeto de estudio, limpieza y preconcentración se utilizó un sistema MSFIA. La extracción se realizó en una precolumna OASIS HLB. El empaque está constituido de una fase sólida polimérica que posee dos monómeros con superficies químicamente diferentes. La retención de los compuestos polares se logra mediante interacciones dipolo-dipolo con el monómero de N-vinilpirrolidona y la retención de los compuestos no polares por las fuerzas de Van der Waals con el monómero divinilbenceno. Además, el tamaño de los poros es de aproximadamente 25 μm , lo que permite conectarla directamente al sistema en flujo sin generar alta presión.

Se sabe que el COC es una molécula relativamente hidrofóbica y BZE resulta de la hidrólisis del éster metílico presente en la estructura de COC que es una especie anfotéricos^(58,73). Por esta razón, es necesario tener en cuenta el pH de las muestras a fin de obtener una buena recuperación de los analitos. En ese sentido, se optimizaron todos aquéllos parámetros experimentales con el fin de obtener la máxima eficiencia en la extracción y el mejor rendimiento en la reacción de derivatización.

Para la realización de los estudios de optimización de los parámetros instrumentales, la precolumna se conectaba directamente al detector UV arreglo de diodos a la longitud de onda de 235 nm y se estudió el perfil de elución de los constituyente de la orina, de COC y BZE,

Para ello se utilizaron soluciones patrones de los analitos de concentración 0,5 $\mu\text{g/mL}$ preparadas en una solución de buffer fosfato 20 mM (pH 6,5), muestras de orina enriquecidas con los analitos a la misma concentración y un blanco de orina. Las muestras de orina fueron diluidas (1:3 v/v) con la misma solución buffer. Para monitoriar el comportamiento de retención de los analitos y el perfil de elución de la matriz, se inyectaron 0,100 mL de la muestra en la precolumna de Oasis ®HLB y se utilizó inicialmente la misma solución de buffer fosfato 20 mM como fase móvil de extracción a un flujo de 0,6 mL/min. Los resultados obtenidos indicaron que los compuestos endógenos provenientes de la matriz terminaban de

eluir en un tiempo de 3,0 min mientras que COC y BZE permanecían fuertemente retenidos en la precolumna ya que no fueron detectados durante un tiempo de corrida de 10 min. Estos resultados en un principio resultaron ser satisfactorios en lo que respecta a las condiciones para la EFS. Sin embargo no fueron reproducibles en la etapa de derivatización debido a que la presencia de sales disminuían la selectividad de la reacción entre el reactivo derivatizante y BZE.

Para evitar esto, se ensayó el agua como fase móvil de extracción con el fin de disminuir el contenido de sales de la muestra eluída que seguiría posteriormente la etapa de derivatización. Los resultados indicaron buenos porcentajes de recuperación COC y BZE y una reproducibilidad y sensibilidad satisfactorias para la BZE en la etapa de derivatización. En conclusión, se seleccionó el agua como fase móvil de extracción para posteriores estudios, circulando a 0,6 mL/min, durante un tiempo de lavado de 3,0 min. Bajo estas condiciones se aseguraba la eliminación de la mayoría de los componentes endógenos de la matriz sin pérdida de los analitos estudiados.

Una vez establecido el tiempo de lavado, se procedió a optimizar el solvente más adecuado para llevar a cabo la elución de los analitos desde la precolumna. Para ello, era necesario seleccionar un disolvente con un gran poder de elución para comprimir los picos de los analitos durante la etapa de elución, pero a su vez debía ser aprótico y no contener átomos de hidrógeno activos, que pudiesen interferir posteriormente en la etapa de derivatización con BSTFA + 1% TMCS⁽⁷¹⁾.

Los solventes como hexano, diclorometano, metanol y acetonitrilo, han sido frecuentemente utilizados como disolventes de extracción en la determinación de BZE y COC^(5,73). Sin embargo, para la reacción de derivatización de BZE asistida por microondas se debía tener en cuenta que la transferencia de energía de la radiación no se produce por convección o conducción como en la calefacción convencional, sino por pérdidas dieléctricas. Esto indica que una muestra al calentarse mediante microondas depende de sus propiedades dieléctricas, del factor de pérdida dieléctrica (ϵ'') y de la constante dieléctrica (ϵ'). Por lo tanto un

valor de ε' elevado proporciona una buena sensibilidad de la energía de microondas⁽⁷²⁾.

Tomando en cuenta lo antes expuesto, los solventes que tienen una mayor constante dieléctrica son el metanol y acetonitrilo^(6,67,74). Sin embargo, el metanol, tiene un grupo hidroxilo susceptible de ser derivatizado por lo que no fue seleccionado como solvente de elución. En este trabajo, los analitos se eluyeron con acetonitrilo circulando a un flujo de 0,6 mL/min durante 0,8 minutos lo que permitió tener una recuperación cuantitativa de los analitos durante la etapa de elución.

8.2. Optimización del Sistema MSFIA

En el sistema MSFIA, se optimizaron todos aquellos parámetros involucrados en el proceso analítico con el fin de obtener buenas recuperaciones de COC y BZE presentes en las muestras de orina así como también la máxima sensibilidad y una reproducibilidad satisfactoria en los resultados.

Para ello se estudiaron los flujos de introducción de la muestra y de elución de los analitos en el intervalo entre 0,5 -0,8 mL/min. Los resultados indicaron que un flujo de 0,6 mL/min era el más adecuado para ambos casos como un buen compromiso entre sensibilidad del método y frecuencia de análisis. Para flujos más altos los resultados eran poco reproducibles y se incrementaba la presión del sistema.

Con el fin de lograr una buena sensibilidad para la detección de COC y BZE se estudió también el volumen de muestra a inyectar en el intervalo 0,050-0,500 mL. En la Figura 5 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que el área de los picos de COC y BZE aumentaban directamente proporcional al volumen de inyección. Sin embargo para valores $\geq 0,500$ mL las áreas de los picos de los analitos eran poco reproducibles. Por ello, para el resto del análisis, se fijó un volumen de inyección de 0,100 mL ya que era suficiente para evaluar la concentración de COC y BZE a los niveles de concentración en que se encuentran en las muestras de orina. Sin embargo, se debe señalar que si se necesitara

mejorar la sensibilidad del método se podrían inyectar volúmenes superiores hasta 0,500 mL.

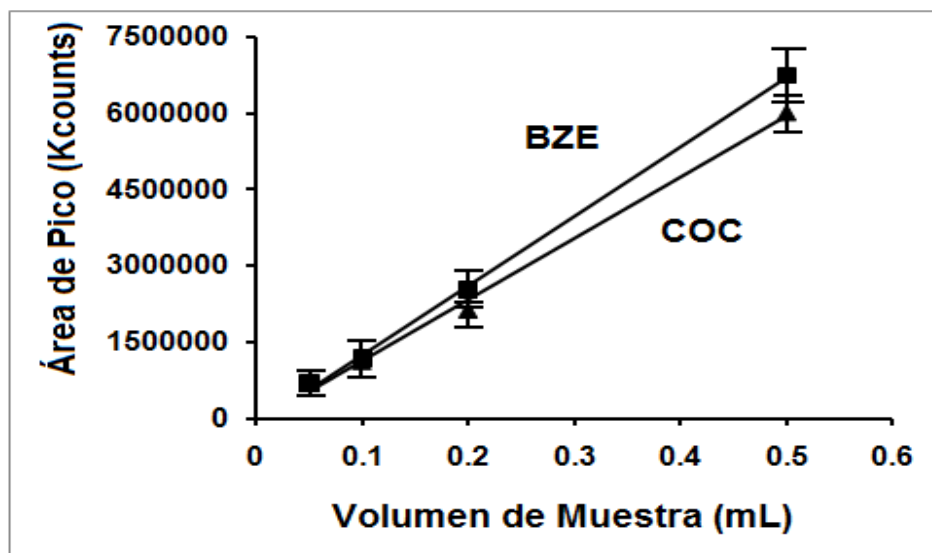


Figura 5. Efecto del volumen de muestra

8.3. Reacción de Derivatización de la Benzoylecgonina

Para llevar a cabo el análisis de COC y BZE por CG-EM, se requiere de una etapa adicional, que consiste en la derivatización de la BZE con el fin de mejorar su volatilidad. En la literatura se han utilizado para ello una gran variedad de reactivos derivatizantes bajo diferentes condiciones experimentales^(6,7,76). La silanización es el procedimiento más utilizado, empleando BSTFA + 1% TMCS bajo ciertas condiciones de tiempo (30-60 min) y temperatura (60-80°C).

Generalmente estas reacciones se llevan a cabo empleando baños de agua para realizar un calentamiento convencional durante tiempos entre 30 y 60 min lo que implica mayores tiempos en la etapa de preparación de la muestra. En ese sentido, con el fin de disminuir el tiempo de la reacción de derivatización para poder lograr la automatización del procedimiento para el tratamiento de la muestra, se propuso emplear la radiación de microondas como forma de calentamiento.

En la literatura, diferentes investigadores han reportado el uso de esta técnica para llevar a cabo la derivatización de diferentes compuestos con BSTFA + 1% TMCS como reactivo derivatizante ^(70,71) y como resultado lograban disminuir el tiempo de reacción de horas a minutos.

Por esta razón, realizamos estudios para establecer las condiciones óptimas de la reacción de derivatización de la BZE con BSTFA + 1% TMCS. Los parámetros que se estudiaron fueron el tiempo de irradiación por microondas y el nivel de potencia.

8.3.1. Efecto del tiempo de irradiación

Para evaluar el efecto del tiempo de irradiación de microondas sobre la reacción se seleccionaron cuatro tiempos de irradiación (60, 90, 120 y 240 s) con una potencia de 700 W. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 6.

Se puede observar para la BZE un aumento en el área de pico con un tiempo de irradiación de 90 s. A valores superiores no se muestran cambios significativos en las áreas, pero el empleo de tiempo superiores a 120 s, no son recomendados por razones de seguridad (sobrepresión en el vial que contiene la muestra y/o ruptura del mismo). Por otra parte, este valor significaba un buen compromiso entre tiempo de reacción, frecuencia de análisis y fundamentalmente permitía la automatización del proceso. Por lo tanto, se estableció como tiempo óptimo de irradiación 90 s. Adicionalmente se comprobó que no existía reacción entre la COC y el reactivo derivatizante ya que el área del pico correspondiente a COC permanecía constante durante todos los estudios.

8.3.2. Efecto de la potencia de irradiación

Para estudiar el efecto de la potencia se fijó 90 s como tiempo óptimo de irradiación, y se varió la potencia a: 240, 490, 630, y 700 W. Los resultados experimentales se muestran en la Figura 7 donde se representa la variación de las áreas de los picos de COC y BZE en función de la potencia del horno de microondas. Se puede observar un aumento del área del pico de BZE a medida

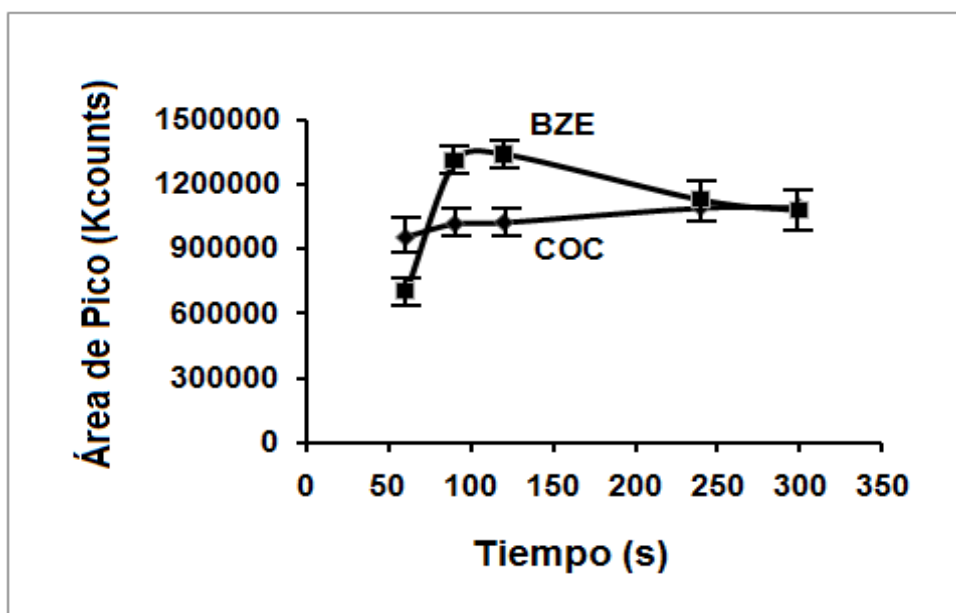


Figura 6. Efecto del Tiempo de Irradiación

que aumenta potencia de microondas hasta un valor de 700 W. Para valores superiores se observó una ligera disminución en la señal y pérdida de reproducibilidad en la medida. Por esa razón, se seleccionó una potencia de 630 W que garantiza la temperatura necesaria para que la reacción se lleve a cabo. Finalmente, es importante mencionar una vez más que la COC no se ve afectada por las condiciones establecidas (630 W, 90 s).

Adicionalmente, paralelamente se realizó la reacción de derivatización utilizando la forma de calentamiento convencional con el fin poder comprobar si el calentamiento por irradiación por microondas disminuía la eficiencia de la reacción. Para ello, se realizó la reacción de derivatización en un baño termostatzado a 60 °C durante 30 min. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 8 donde se puede observar que la velocidad de la reacción de silanización puede incrementarse significativamente mediante el uso de calentamiento via microondas, sin alterar el producto ni disminuyendo el rendimiento de la reacción de derivatización de BZE. Las áreas de los picos del

derivado de la BZE son significativamente superiores, la pendiente de la recta de calibrado (A) es mayor a la de la recta (B).

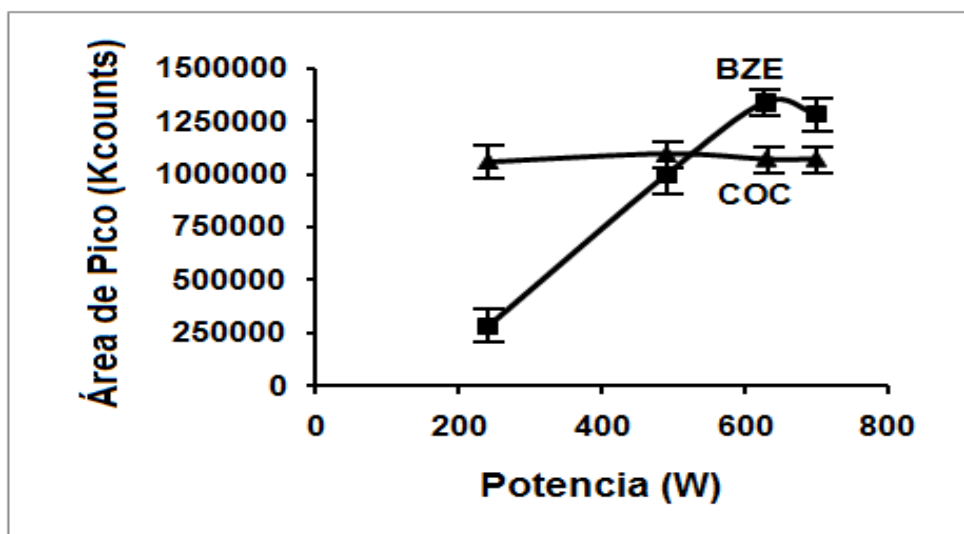


Figura 7. Efecto de la Potencia de Irradiación

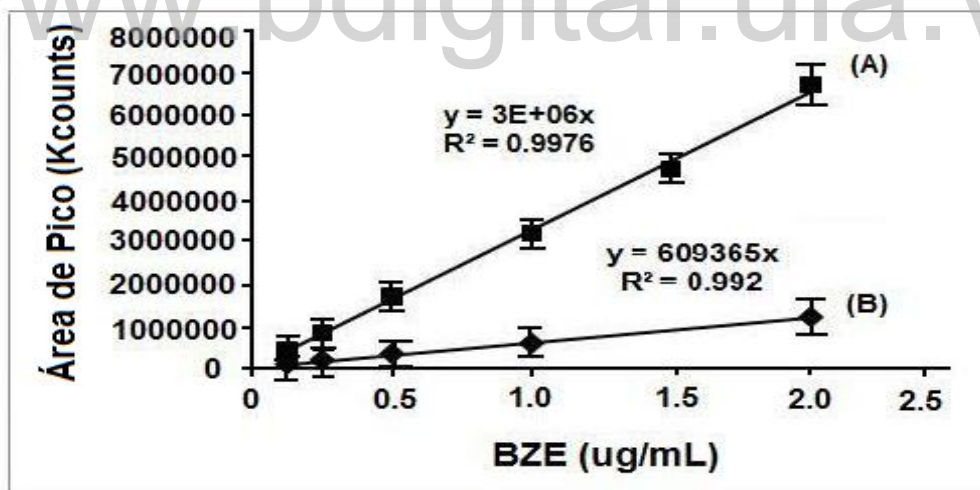


Figura 8. Comparación de condiciones de derivatización: (A) Calentamiento por irradiación por microondas (90s, 630W), (B) Calentamiento convencional (30 min, 60°C)

8.4. Separación Cromatográfica

Una vez optimizadas las condiciones para el tratamiento de la muestra en el sistema MSFIA-MW, la solución de los analitos se inyectó en el sistema

cromatográfico bajo las condiciones optimizadas de la Tabla 7. En la Figura 9 se muestran los cromatogramas obtenidos para una solución patrón de COC y BZE de concentración 0,5 $\mu\text{g/mL}$ y de una muestra de orina enriquecida con los analitos a los mismos niveles de concentración y tratada por el procedimiento optimizado antes descrito. En estos se pueden observar, que no existe ninguna interferencia por parte de la matriz en la determinación, además de una buena separación entre los analitos. Los tiempos de retención fueron de 12,75 y 12,94 min para COC y BZE respectivamente. Adicionalmente en la figura se muestran los espectros de masa que identificaron a cada uno de los analitos.

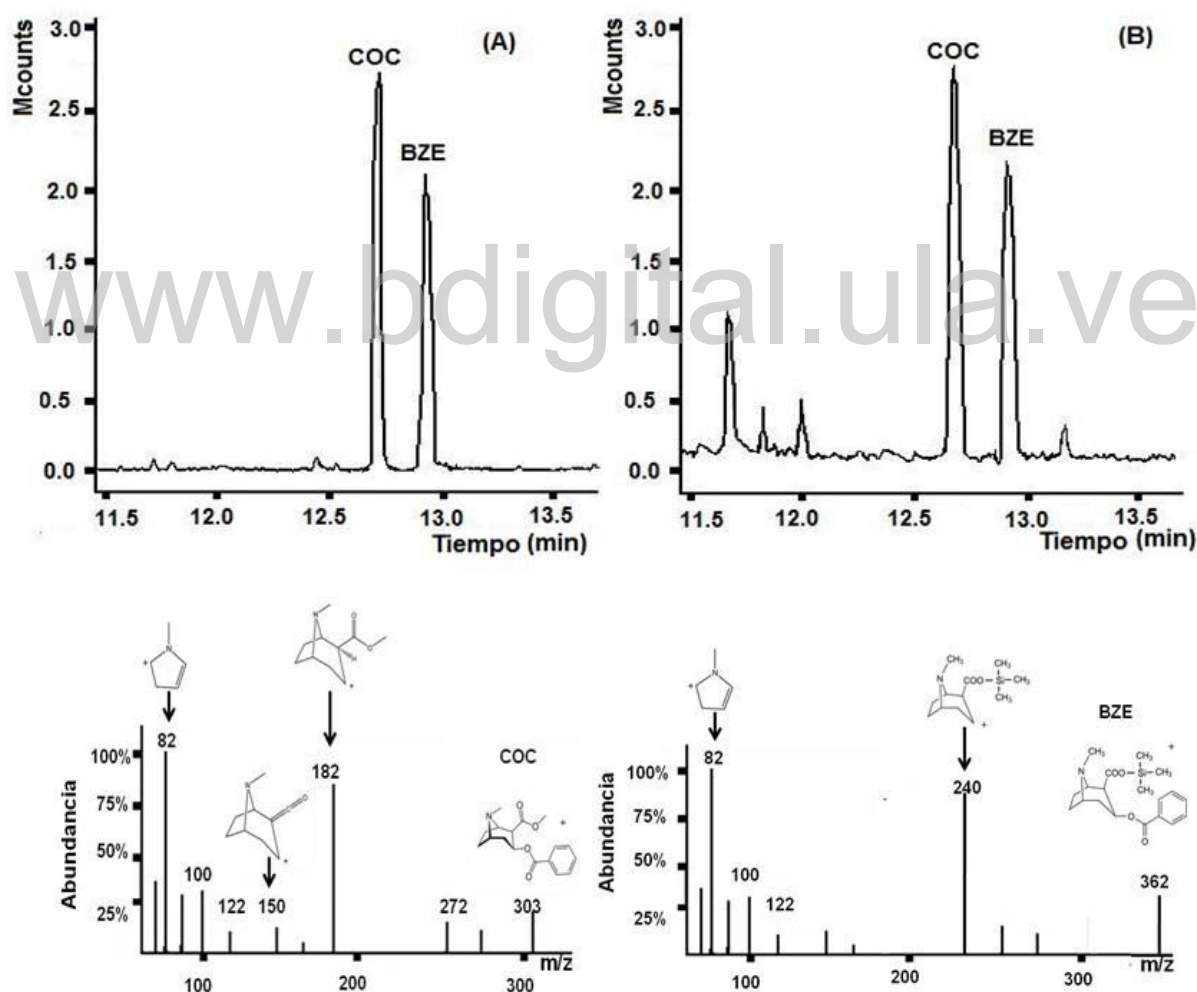


Figura 9. Cromatogramas obtenidos bajo las condiciones optimizadas (Tabla 7). Para un volumen de inyección de 0,100 mL de (A) solución patrón acuosa de COC y BZE de concentración 0,50 $\mu\text{g/mL}$ para ambos analitos (B) muestra de orina enriquecida con los analitos en estudio (0,50 $\mu\text{g/mL}$)

Tabla 7. Condiciones optimizadas de todo el sistema

EQUIPO	PARÁMETROS	VALOR
MSFIA	Volumen de inyección	0,100 mL
	Flujo de introducción de la muestra	0,6 mL/min
	Fase móvil de lavado	Agua
	Flujo de la fase móvil de lavado	0,6 mL/min
	Tiempo de lavado	3 min.
	Solvente de elución	Acetonitrilo
	Flujo de elución	0,6 mL/min
	Volumen de elución	0,6 mL
	Reactivo derivatizante de BZE	BSTFA + 1% TMCS
	Tiempo de irradiación por microondas	90 s
	Potencia de irradiación	630 W
Automuestreador	Volumen de inyección	9 µL
Cromatógrafo de gases	Modalidad de inyección	splitless
	Programa de temperatura del inyector	55 °C(2min)→325 °C (15 min) a 200 °C/min
	Columna Capilar (VA-5MS) 5% fenil metilpolisiloxano	(30 m x 0,25 mm) espesor de película 0,25 µm
	Programa de temperatura de la columna	55 °C (3 min) a 290 °C (15 min) a25°C/min
	Gas portador	Helio
	Flujo del gas portador	1,0 mL/min
	Volumen de inyección	Splitless (0,40) min
Espectrómetro de Masas	Modalidad	Impacto Electrónico (70 eV)
	Temperatura de la trampa	200°C
	Temperatura del manifold	40 °C
	Temperatura de la transferencia	200 °C
	Corriente del filamento	20 µA

Por otra parte, con el fin de evaluar el efecto “carry-over” en el procedimiento se realizaron inyecciones de blancos de orina inmediatamente después de haber inyectado muestras con la concentración de los analitos más altas evaluadas en el método. Los cromatogramas obtenidos no mostraron ningún pico correspondiente a COC y BZE demostrando que no había efecto memoria en el sistema.

9. Validación del Método

La validación del método propuesto se realizó evaluando la linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y los límites de cuantificación para COC y BZE así como también el efecto de matriz.

Para evaluar la linealidad del método, se realizaron curvas de calibrado de soluciones patrones acuosas de COC y BZE y de muestras de orina enriquecidas con los analitos a los mismos niveles de concentración. Los intervalos de concentración estudiados fueron: 0,03-2,00 µg/mL y 0,01-3,00 µg/mL para COC y BZE respectivamente. En la Tabla 8, se muestran las ecuaciones de regresión lineal del área del pico de los analitos en función de la concentración obtenida para todos los casos. Estos datos fueron obtenidos al realizar curvas de calibración usando el método de adición estándar. Cada gráfico de calibración incluye una serie de seis puntos y un blanco medidos un mínimo de tres veces. Si se observan los coeficientes de regresión lineal ($> 0,9945$ para todos los casos) se puede concluir que existe una muy buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado.

Por otra parte, para evaluar el efecto de la matriz en el análisis, se llevó a cabo un estudio estadístico (t Student) con el fin de comparar las pendientes de las rectas de calibrado de las soluciones patrones acuosas y aquellas correspondientes a las de adición de estándar. Los resultados mostraron que no existía diferencia significativa entre las curvas de regresión de patrones acuosos y de muestras de orina enriquecida con COC y BZE ($P < 0,05$).

Este comportamiento nos permitió concluir que no existía interferencia de la matriz en el análisis y que se podía evaluar los niveles de concentración de COC y

Delgado

BZE en las muestras de orina utilizando la curva de calibración de los patrones acuosos.

Tabla 8. Características analíticas de las rectas de calibrado para la COC y BZE (patrones acuosos y orina) en el intervalo de concentración estudiado, realizados en el sistema propuesto.

Compuesto	Matriz	Ecuación ^a	r ^b	C.V.	Intervalo dinámico (µg /mL)
COC	Patrón Acuoso	$A = 2,78 \times 10^6 C$	0,9960	2,12	0,03-2,00
	Orina	$A = 8,82 \times 10^5 + 2,76 \times 10^6 C$	0,9962	2,45	0,03-2,00
BZE	Patrón Acuoso	$A = 2,96 \times 10^6 C$	0,9961	2,36	0,01-3,00
	Orina	$A = 2,82 \times 10^6 + 2,85 \times 10^6 C$	0,9945	2,83	0,01-3,00

A: Área de pico, C: concentración
C.V. Coeficiente de Variación (n=3)
R: coeficiente de correlación

La precisión del método durante un día y entre días se evaluó para soluciones patrones acuosas de COC y BZE y para muestras de orina enriquecidas con los analitos a diferentes niveles de concentración. Las muestras fueron analizadas por el procedimiento propuesto durante un día (n=5) y para días diferentes (n=5). Los resultados se resumen en la Tabla 9 donde se expresa la precisión por los coeficientes de variación que fueron < 4,0% para todos los casos lo que indicaba una buena precisión del método y aseguraba una buena estabilidad del sistema MSFIA-MW-CG-EM utilizado.

Tabla 9. Estudio de la precisión del método para la determinación de COC y BZE en orina.

Compuesto	Matriz	En un día (n=5)	C.V.(%)	Entre días (n=5)	C.V. (%)
COC	Patrón Acuoso	0,125±0,002	1,60	0,125±0,005	4,00
		0,250±0,006	2,40	0,250±0,009	3,60
		0,500±0,004	0,80	0,500±0,008	1,60
	Orina	0,125±0,004	3,20	0,125±0,006	4,80
		0,250±0,006	2,40	0,250±0,005	2,00
		0,500±0,008	1,60	0,500±0,014	2,80
BZE	Patrón Acuoso	0,500±0,010	2,00	0,500±0,012	2,40
		1,000±0,009	0,90	1,000±0,009	0,90
		2,000±0,017	0,85	2,000±0,022	1,10
	Orina	0,500±0,009	1,80	0,500±0,011	2,20
		1,000±0,008	0,80	1,000±0,012	1,20
		2,000±0,022	1,10	2,000±0,034	1,70

La exactitud del método se estimó realizando estudios de recuperación de COC y BZE desde muestras de orina. Para ello se analizaron por el método propuesto muestras de orina enriquecidas con COC y BZE a diferentes niveles de concentración. Para todos los casos los valores de los % de recuperación estuvieron comprendidos en el intervalo 94,68 y 99,18 % (Tabla 10) con una desviación estándar relativa < 2,34 % (n=5). Estos resultados nos prueban una buena exactitud del método, ya que los valores de los porcentajes de recuperación son cuantitativos. Por otra parte la buena exactitud del procedimiento descrito nos confirma la excelente eficiencia de extracción de la precolumna OASIS HLB empleada para el tratamiento de la muestra.

Tabla 10. Estudios de recuperación de COC y BZE en muestras de orina

Compuesto	Concentración añadida (µg/mL)	% Recuperación	C.V. (n=5) (%)
COC	0,125	98,73	2,15
	0,250	95,20	2,02
	0,500	98,39	1,94
BZE	0,500	94,68	2,34
	1,000	99,18	1,82
	2,000	95,98	1,76

El límite de detección definido como la concentración del analito que permite un área de pico tres veces la desviación estándar (3σ) del blanco fue de 0,01 µg/mL y 0,003 µg/mL para la COC y BZE respectivamente. El límite de cuantificación definido como la concentración del analito que permite un área de pico 10 veces la desviación estándar (10σ) del blanco fue de 0,03 µg/mL para la COC y 0,01 µg/mL para la BZE. Es importante señalar, que estos valores fueron obtenidos para un volumen de inyección de la muestra de 0,100 mL, que permitió evaluar satisfactoriamente a ambos analitos en muestras de orina analizadas. Sin embargo, si se necesitara mejorar la sensibilidad del método se podría aumentar el volumen de inyección hasta valores de 500 µL.

10. Análisis de Muestras Reales

Para evaluar el método propuesto se analizaron 18 muestras de orina pertenecientes a individuos consumidores en rehabilitación. Las muestras fueron suministradas por la Fundación José Félix Rivas, Mérida, Venezuela, cuya misión es ejecutar programas y proyectos en materia de prevención, tratamiento, rehabilitación social, vigilancia, investigación y capacitación que benefician a las personas en situación de riesgo y / o uso ilícito de drogas y adicciones. En todos los casos se obtuvo un consentimiento informado de cada uno de los pacientes evaluados.

Para el análisis, las muestras fueron preparadas según el método propuesto y se analizaron un mínimo de tres veces cada una.

Los resultados indicaron que en 12 muestras se confirmó positivo por cocaína y/o su metabolito. Las concentraciones medias encontradas estaban en el intervalo de concentración: 0,12 - 0,79 μg de COC/mL y 0,36 - 2,46 μg BZE/mL. Esto nos confirma, por un lado que la sensibilidad del método es adecuada para evaluar COC y BZE en muestras de orina de individuos bajo tratamientos de rehabilitación. Adicionalmente se pudo comprobar que efectivamente la COC se metaboliza en el organismo humano en su principal metabolito en orina BZE. Por lo tanto, la presencia de BZE en la muestra de orina es un indicativo inequívoco del consumo de la droga.

11. Validación del Método por Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector UV arreglo de diodos

El método desarrollado también se validó analizando las muestras reales utilizando un método desarrollado en el Laboratorio de Espectroscopia Molecular⁽⁵³⁾ por cromatografía líquida de alta resolución con detección UV arreglo de diodos y con tratamiento de la muestra en línea en un sistema de columnas acopladas.

Delgado

Para ello se escogieron de forma aleatoria 7 muestras de orina que habían sido analizadas por el método propuesto y se analizaron por el método por cromatografía líquida. Los resultados se muestran en la Tabla 11 y en la Figura 10 se muestra el gráfico de correlación de los valores obtenidos para ambos métodos.

Tabla 11. Análisis de COC y BZE en muestras de orina humana

Muestras	Método Propuesto (MSFIA-MW-CG-EM) BZE ($\mu\text{g/mL}$)	Método Estándar (HPLC-UV) BZE ($\mu\text{g/mL}$)
1	$2,65 \pm 0,03$	$2,46 \pm 0,04$
2	$0,69 \pm 0,02$	$0,73 \pm 0,04$
3	$0,96 \pm 0,04$	$1,03 \pm 0,06$
4	$0,38 \pm 0,03$	$0,37 \pm 0,05$
5	$0,58 \pm 0,01$	$0,56 \pm 0,02$
6	$0,28 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$
7	$0,49 \pm 0,05$	$0,48 \pm 0,03$

Este gráfico muestra, que existe una buena correlación entre los resultados obtenidos por ambos métodos ($r^2 = 0,9950$).

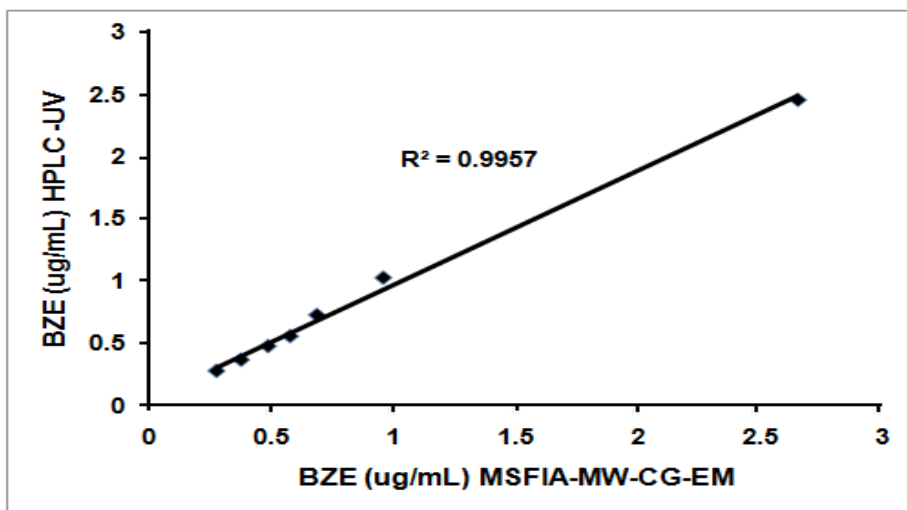


Figura 10. Representación gráfica de la concentración de BZE en las muestras de orina utilizando ambas metodologías.

Adicionalmente los resultados obtenidos de esta validación se evaluaron estadísticamente. Para ello se empleó el programa Stargraphics Plus y se realizó

Delgado

un estudio comparativo entre las dos series de datos obtenidos para cada uno de los métodos (Tabla 12), con el fin de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas entre los resultados.

Con este test se determinó si el valor de la media para las diferentes muestras pareadas era estadísticamente igual a cero, lo cual indicaba si los dos métodos aportaban iguales resultados.

Método 1: 7 valores 0,28 hasta 2,65 (MSFIA-MW-CG-EM)

Método 2: 7 valores 0,28 hasta 2,46 (CLAR-UV)

Tabla 12. Estudio de Comparación de medias.

	Medidas	Medias
Metodo 2	7	0,84286
Metodo 1	7	0,861429

Se aplicó un procedimiento de comparación múltiple a la Tabla 12 para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Los resultados indicaron que no hay diferencias estadísticamente significativas entre ningún par de medias a un nivel de confianza del 95,0%. Además indicó que es un grupo homogéneo.

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Método 1 - Método 2	0,0171429	0,917032

Se llevó a cabo un estudio de contraste de varianza: Y para ello se planteó una prueba de Hipótesis

H_0 = la desviación típica entre cada una de los métodos es igual: $\mu_1 = \mu_2$

H_1 = existen diferencias significativas entre las desviaciones: $\mu_1 \neq \mu_2$

Los resultados obtenidos son los siguientes:

Contraste C de Cochran: 0,541002 P-valor = 0,846932

Contraste de Bartlett: 1,00338 P-valor = 0,846714

C.C. RECONOCIMIENTO -

Contraste de Hartley: 1,17866

Test de Levene: 0,000533982 P-valor = 0,981944

El Test de Levene, comprobó la hipótesis nula de que la desviación típica dentro de cada una de las 2 columnas es la misma. De particular interés están los tres p-valores, dado que el menor de los p-valores es superior o igual a 0,05, no hay diferencia estadísticamente significativa entre las desviaciones típicas para un nivel de confianza del 95,0%.

Para sustentar este resultado se muestra el gráfico correspondiente al Scatterplot (Dispersión de la Muestra) en la Figura 11. Se puede observar que no hay variabilidad entre los resultados al comparar ambas metodologías

Gráfico de Dispersión según Muestra

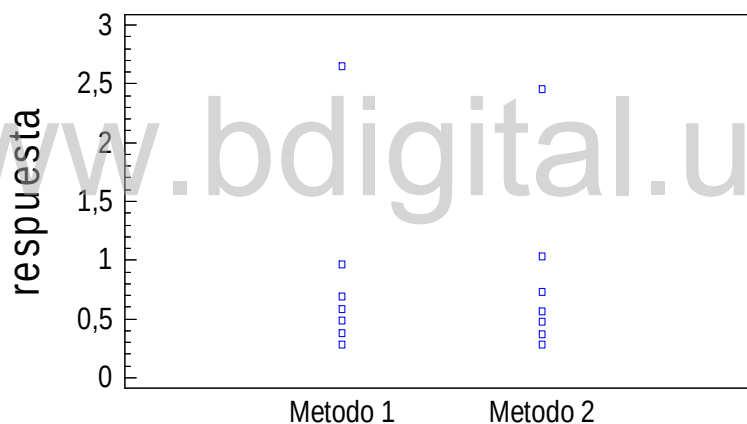


Figura 11. Estudio comparativo entre ambos métodos.

En conclusión, los resultados indican que no hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos para ambas metodologías.

12.Comparación del método propuesto con otros publicados en la literatura

Comparando el método propuesto con otros métodos por CG-EM reportados en la literatura, encontramos algunos con niveles muy bajos en

C.C. RECONOCIMIENTO -

Delgado

términos de automatización del procedimiento. En algunos de ellos el procedimiento de derivatización de BZE se realiza con calentamientos convencionales^(6,7,66) mientras que en otros, se realiza la extracción de los analitos utilizando procedimientos manuales^(5,6,7,47,58,76,77). En ambos casos el tratamiento de la muestra de orina previo a la determinación por CG-EM fue muy tedioso y consumió mucho tiempo.

También en la literatura encontramos métodos por CG-EM con el tratamiento previo de la muestra automatizado pero que utilizan equipos comerciales sumamente costosos⁽⁷⁷⁾.

Si comparamos el método propuesto con aquéllos por cromatografía líquida de alta resolución y con EFS de COC y BZE en un sistema de columnas acopladas, estos métodos tienen el inconveniente de requerir bombas de alta presión y gradientes de elución para poder separar dos analitos con características fisicoquímicas muy diferentes. En ese sentido, hay un consumo de solventes orgánicos importante y se generan abundantes desechos producidas en la etapa de preparación de la muestra por lo que éstos métodos podrían contaminar el medioambiente. Por el contrario, el sistema MSFIA propuesto para realizar la EFS de COC y BZE en nuestro método puede considerarse como un método verde, que contamina poco el medioambiente. El MSFIA sólo dispensa volúmenes de muestra y solventes bien definidos cuando es necesario. La presencia de válvulas solenoides en cada una de las jeringas dispensadoras garantiza un mínimo consumo de muestras y solvente. Además, es importante resaltar el bajo costo del módulo de multijeringas en comparación con los sistemas binarios de bombas de alta presión que se utilizan en cromatografía líquida.

Por otra parte, el sistema MSFIA es muy versátil para su acoplamiento con otras técnicas analíticas⁽⁷⁸⁾. En el método propuesto el MSFIA se acopló a un horno de microondas doméstico que permitió automatizar la reacción de derivatización de BZE, reduciendo significativamente el tiempo y el costo del análisis.

Finalmente, la automatización de la EFS en los métodos por cromatografía líquida^(53,79) permiten una frecuencia de análisis de 4 muestras por hora. El método

aquí propuesto permite superponer el tratamiento de la muestra con la determinación por GC-MS de la inyección anterior por lo que se puede inyectar una muestra cada seis minutos (10 muestras por hora).

13. Conclusiones

- El método propuesto para llevar a cabo el tratamiento de la muestra en línea, demostró ser una excelente alternativa para la determinación de COC y BZE en muestras de orina.
- La precolumna OASIS HLB proporcionó la selectividad necesaria para la retención de COC y BZE que son compuestos con características fisicoquímicas muy diferentes. Los porcentajes de recuperación entre 94,68-99,18% para todos los casos lo confirmaron.
- El sistema MSFIA permitió llevar a cabo el tratamiento de la muestra en línea en un tiempo de 6,0 min.
- El empleo de microondas para asistir la reacción de derivatización de la BZE permitió disminuir el tiempo de reacción de 30 min a 1.5 min.
- El uso del sistema MSFIA-MW permitió disminuir el tiempo de tratamiento de muestra de 90,0 min (manual)⁽⁷⁾ a 7,5 minutos. Además, facilitó el acoplamiento de la etapa de derivatización de BZE aumentando significativamente la frecuencia de análisis a 10 muestras/hora.
- Se comprobó que no había efecto de matriz, por lo que las muestras de orina pueden ser evaluadas con una curva de calibración preparada a partir de estándares acuosos de los analitos.
- La precisión del método fue menor del 4% en un día y entre días, lo que indicó una buena estabilidad del sistema MSFIA-MW-CG-EM.
- Los resultados obtenidos fueron validados también empleando un método por CLAR-UV arreglo de diodos. Los resultados obtenidos fueron evaluados estadísticamente y mostraron que no existían diferencias significativas entre

ambos métodos, confirmando así la exactitud y veracidad de los resultados obtenidos por el método propuesto.

➤ El instrumental del sistema MSFIA no es muy costoso y adicionalmente su uso disminuye el consumo de muestras y reactivos por lo que se reduce significativamente el costo del análisis.

➤ Finalmente la sensibilidad y precisión alcanzada en el método propuesto así como la alta frecuencia de análisis hace que pueda ser utilizado como un método de rutina para estudios farmacocinéticos así como también de seguimiento de tratamientos clínicos.

14. Bibliografía

- (1) Dewey, M. Ashby, H. Kushner, L. et al. **A novel strategy for the treatment of cocaine addiction**. Synapse; 30 (2):119-29, 1998.
- (2) Kogan, M.; Verebey, K.; DePace, A.; Resnick, R.; Mulé, S. **Quantitative Determination of Benzoyllecgonine and Cocaine in Human Biofluids by Gas-Liquid Chromatography**. Analytical Chemistry, 49 (13), 1965-1969, 1977.
- (3) Goldstein, R. DesLauriers, C. Burda, A. **Cocaine: History, Social Implications, and toxicity – A review**. Seminars in Diagnostic Pathology. 26 (1), 10-17, 2009.
- (4) Isenschmid, D.S. Levine, B.S. Caplan, Y.H **Method for the Simultaneous Determination of Cocaine, Benzoyllecgonine, and Ecgonine Methyl Ester in Blood and Urine Using GC/EIMS with Derivatization to Produce High Mass Molecular Ions** Journal of Analytical Toxicology. 12, 242–245, 1988.
- (5) Garside, D. Goldberger, B. Preston, K. Cone, E. **Rapid Liquid-Liquid Extraction of Cocaine from Urine for Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis**. Journal of Chromatography B, 692, 61-65, 1997.

- (6) Marchei, E. Colone, P. Nastasi, G. Calabró, C. Pellegrini. M. Pacifici, R. Zuccaro, P. Pichini, S. **On-site screening and GC-MS analysis of cocaine and heroin metabolites in body-packers urine.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48 383–387, 2008.
- (7) Saito, T. Mase, H. Takeichi, S. Inokuchi, S. **Rapid simultaneous determination of ephedrine, amphetamines, cocaine, cocaine metabolites, and opiates in human urine by GC-MS.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43, 358–363, 2007.
- (8) Giovanni De, N. Strano Rossi, S. **Simultaneous Detection of Cocaine and Heroin Metabolites in Urine by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry.** Journal of Chromatography B, 658, 69-73, 1994.
- (9) Panganiban, K. Jacob, P. Everhart, T. Tisdale, E. Batki, S. Mendelson, J. Jones, R. **Sulfonium Salts as Derivatizing Agents. 3. Quantitation of the Cocaine Metabolite Benzoylcegonine in Urine Using Gas Chromatography with Ion-pair Extraction/on-column Alkylation.** Journal of Analytical Toxicology. 23, 581-585, 1999.
- (10) Pichini, S. Pujadas, M. Marchei, E. Pellegrini, M. Fiz, J. Pacifici, R. Zuccaro, P. Farré, M. De la Torre, R. **Liquid chromatography-atmospheric pressure ionization electrospray mass spectrometry determination of "hallucinogenic designer drugs" in urine of consumers.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 47,335–342, 2008.
- (11) González, R. **Pruebas toxicológicas de drogas de abuso.** Cont. Quim 1(2) 8-9, 2006.
- (12) Goodman, A., Goodman, L., Rall, T., Murad, F. **Las bases Farmacológicas de la Terapéutica,** 7ª. Edit. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina, pp. 510-530, 1986.
- (13) Ladrón, J. **Toxicología Médica.** Editorial Interamericana McGraw- Hill, Capítulo 73. pp. 605-615,1995.
- (14) Pascual, F. **Aproximación histórica a la Cocaína. De la Coca a la Cocaína.** Adicciones. 13 (2), 2004.

- (15) Lakoski, J., Galloway, M., White, F. **COCAINE Pharmacology, Physiology and Clinical Strategies**. Capitulo 1 y 2. CRC Press, Boca Ratón Ann Arbor London. Florida, 1-15, 1992.
- (16) Dean, R., Christian, C., Sample, R., Bosron, W. **Human liver cocaine esterases: ethanol-mediated formation of ethylcocaine**. FASEB J. 5, 2735-2739, 1991.
- (17) Jufer, R.; Walsh, S.; Cone, E. **Cocaine and Metabolite Concentrations in Plasma During Repeated Oral Administration: Development of a Human Laboratory Model of Chronic Cocaine Use**. Journal of Analytical Toxicology, 22, 435-441, 1998.
- (18) Mulé, S. **COCAINE. Chemical, Biological, Clinical, Social and Treatment Aspects**. CRC Press Inc, Brooklyn, New York, 1976.
- (19) Hawley, G., **Diccionario de química y productos químicos**. Segunda Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España. 1991.
- (20) Handbook of Chemistry and Physics. 57th, Edit., CRC Press, Cleveland, Ohio. 1976-1977.
- (21) The Merck Index. **An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals**. 10th Published by Merck & CO., Inc., Rahway. N.J., USA. 1983.
- (22) Clarke, E.G.C. **Isolation and Identification of Drugs**. Tomo I, III. 268-269, 736.
- (23) Warner, E. **Cocaine abuse**. Ann Intern Med; 119(3):226-35, 1993.
- (24) Shannon M. **Clinical toxicity of cocaine adulterants**. Ann Emerg Med 17(11):1243-7, 1988
- (25) Matthew, J., **Diagnosis and treatment of human poisoning**. Medical Toxicology, Elsevier, pp. 649, 1988.
- (26) Díaz-Flores, Rodríguez, E. Díaz – Romero C. **Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones**. 2da. Edición, Editorial Elsevier Cap. 47, 446 – 452, 2006.
- (27) Calabrese, A., Astolfi, E. **TOXICOLOGÍA**. Editorial Kapelus, Moreno 372. Buenos Aires, Argentina, 262-264, 1972.

- (28) Blum, R., Ed, A. **A history of Stimulants, in Drugs I.** Society and Drugs, Jossey- Bass, San Francisco, 98, 1969.
- (29) Fischbach. **Manual de Pruebas Diagnosticas.** Capítulo 3, 5^{ta} Ed. McGraw-Hill Interamericana. pp. 214, 1997.
- (30) Okeke, C., Wynn, J., Patrick, K. **Simultaneous Analysis of Cocaine, Benzoylecgonine, and Ecgonine in Plasma Using an Exchange Resin and Gas Chromatography-Mass Spectrometry.** Chromatographia, 38, (1/2), 52-56, 1994.
- (31) Ursitti, F. Klein, J. Koren G. **Confirmation of cocaine use during pregnancy a critical review.** Ther Drug Monit, 23 (4), 347-353, 2001.
- (32) Cone, E., Yousefnejad D., Darwin, W., Maguire, T. **Testing human hair for drugs of abuse. II Identification of unique cocaine metabolites in hair of drug of abusers and evaluation of decontamination procedures.** Journal of Analytical Toxicology. 16: 291-296, 1991.
- (33) Henderson, G., Harkey, M., Reese, J. **Analysis of hair for cocaine. Hair testing for drugs of abuse:** International Research on Standards and Technology, 91-120, 1995.
- (34) Pujol, M. Crimele, V. Tritsch, P.J. Villain, M. Kintz, M. **Evaluation of the IDS One-Step™ ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair.** Forensic Science International. 170, 189-192, 2007.
- (35) Kidwell, D., Holland, J., Athanaselis, S. **Testing for drugs in saliva and sweat.** Journal of Chromatography B, 713: 111-135, 1998.
- (36) Cognard, E. Bouchonnet, S. Staub, C. **Validation of a gas chromatography—ion trap tandem mass spectrometry for simultaneous analyse of cocaine and its metabolites in saliva.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41, 925–934, 2006.
- (37) Wang, W., Darwin, W., Cone, E. **Simultaneous Assay of Cocaine, Heroin and Metabolites in Hair, Plasma, Saliva and Urine by Gas Chromatography-mass Spectrometry.** Journal of Chromatography B, 660, 279-290, 1994.

- (38) Farina, M. Yonamine, M. Silva, O. **One-step liquid–liquid extraction of cocaine from urine samples for gas chromatographic analysis.** Forensic Science International 127, 204–207, 2002.
- (39) Levine, B. **Principles of Forensic Toxicology**, American Association for Clinical Chemistry Inc., Washington, DC, USA, 2003.
- (40) Cirimele, V. Kintz, P. Lohner, S. Ludes, B. **Enzyme immunoassay validation for the detection of buprenorphine in urine.** Journal of Analytical Toxicology. 27 103–105, 2003.
- (41) Pizzolato, T Lopez de Alda, M. Barcelo, D. **LC-based analysis of drugs of abuse and their metabolites in urine.** Trends in Analytical Chemistry, 26 (6), 2007.
- (42) Isenschmid, D., Levine, B., Caplan, Y. **A Method for the Simultaneous Determination of Cocaine, Benzoylecgonine, and Ecgonine Methyl Ester in Blood and Urine Using CG/EIMS with Derivatization to Produce High Mass Molecular Ions.** Journal of Analytical Toxicology, 12, 242–245, 1988.
- (43) Cailleux, A., Le Bouil, A., Auger, B., Bonsergent, G., Turcant, A., Allain, P. **Determination of Opiates and Cocaine and its Metabolites in Biological Fluids by High–performfance Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry.** Journal of Analytical Toxicology, 23, 620–624, 1999.
- (44) Janicka, M. Kot-Wasik, A. Namiesnik J. **Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples.** Trends in Analytical Chemistry. Article in Press 2010.
- (45) Jones, A. Holmgren, A. Kugelberg F. **Concentrations of cocaine and its major metabolite benzoylecgonine in blood samples from apprehended drivers in Sweden.** Forensic Science International 177, 133–139, 2008.
- (46) Álvarez, I. Bermejo, A. Tabernero, M. Fernández, P. López P. **Determination of cocaine and cocaethylene in plasma by solid-phase**

- microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, 845, 90–94, 2007.
- (47) Johansen, S. Bhatia, M. **Quantitative analysis of cocaine and its metabolites in whole blood and urine by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, 852, 338–344, 2007.
- (48) Berg, T. Lundanes, E. Christophersen, A. Strand, D. **Determination of Opiates and Cocaine in urine by high pH mobile phase reversed phase UPLC-MS/MS.** Journal of Chromatography B, 2008.
- (49) Valente-Campos, S. Yonamine, M. Moraes, R. Alves, O. **Validation of a method to detect cocaine and its metabolites in nails by gas chromatography–mass Spectrometry.** Forensic Science International 159, 218–222, 2006.
- (50) Lachenmeier, K. Musshoff, F. Madea, B. **Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation.** Forensic Science International 159, 189–199, 2006.
- (51) Cordero, R. Paterson, S. **Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC–MS.** Journal of Chromatography B, 850 423–431, 2007.
- (52) Mercolini, L. Mandrioli, R. Saladini, B. Conti, M. Baccini, C. Raggi, M. **Quantitative Analysis of cocaine in human hair by HPLC with fluorescence detection.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48, 456–461, 2008.
- (53) Brunetto, M.R. Delgado, Y. Gutiérrez, L. Galignani, M. Obando, M.A.. **Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37, 115–120, 2005.

- (54) Stoll, D. Paek, C. Carr, P. **Fast gradient elution reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode-array detection as a high-throughput screening method for drugs of abuse I. Chromatographic conditions.** Journal of Chromatography A, 1137, 153–162, 2006.
- (55) Chen, C. Shen, C. Yan-Zin, Y. Maw-Rong Lee, C.. **High throughput screening various abused drugs and metabolites in urine by liquid chromatography–heated electrospray ionization/tandem mass spectrometry.** Talanta 77 1351–1357, 2009.
- (56) Fish, F., Wilson, W. **Gas Chromatographic Determination of Morphine and Cocaine in Urine.** Journal of Chromatography, 40, 164, 1969.
- (57) Skimner, R., Gallaher, E., Knight, J., Bonelli, E. **The Gas Chromatography-Mass Spectrometer as a New and Important Tool in Forensic Toxicology.** Journal of. Forensic Science. 17, 189, 1972.
- (58) William, C.L., Laizure, S.C., Parker, R.B., Lima, J.J. **Quantitation of cocaine and cocaethylene in canine serum by high-performance liquid chromatography.** J. Chromatogr., 681, 271-276, 1996.
- (59) Moffat, A. **Clarke's Isolation and Identification of Drugs.** 2^{da} Edición. The Pharmaceutical Press: London 1986.
- (60) Cerdà, V. Estela, J. Forteza, R. Cladera, A. Becerra, E. Altimira, P. Sitjar, P. **Flow Techniques in Water Analysis.** Talanta 50, 695, 1999.
- (61) Ruzicka, J. Marshall, G. **Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays** Analytica. Chimica. Acta 237, 329-343, 1990.
- (62) Economou, A. **Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment.** Trends in Analytical Chemistry. Vol. 24(5), 416–425, 2005.
- (63) Souverain, S., Rudaz, S., Veuthey, J. **Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis.** Journal of Chromatography B. 801, 141-156, 2004.

- (64) Stephens, B.G., Jentzen, J.M., Karch, S., Mash, D.C., Wetli, C.V. **Criteria for the interpretation of cocaine levels in human biological samples and their relation to cause of death.** Am. J. Forensic Med. Pathol. 25, 1-10, 2004.
- (65) Weis, R.D., Gawin, F.H. **Protracted determination of cocaine metabolites in long-term, high-dose cocaine abusers.** Am. J. Med. 85, 879-880, 1988.
- (66) De la Torre, R., Ortuño, J., González, M.L., Farré, M., Cami, J., Segura, J. **Determination of cocaine and its metabolites in human urine by gas chromatography/mass spectrometry after simultaneous use of cocaine and ethanol.** J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 13, 305-312, 1995.
- (67) Virag, L., Mets, B., Jamdar, S. **Determination of cocaine, norcocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester in rat plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.** J. Chromatogr. B, 681, 263-269, 1996.
- (68) Shareef, A. Angove, M., Wells, J. **Optimization of silylation using *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *N,O*-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 β -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, 1108, 121-128, 2006.
- (69) Halket, J.M. Zaikin, V.G. **Derivatization in mass spectrometry--1. Silylation** Eur. J. Mass Spectrom. 9, 1, 2003.
- (70) Zuo, Y. Zhang, K. Lin, Y. **Microwave-accelerated derivatization for the simultaneous gas chromatographic-mass spectrometric analysis of natural and synthetic estrogenic steroids.** Journal of Chromatography A, 1148 (2007) 211-218
- (71) Strassnig, S. Gfrerer, M. Lankmayr, E.P. **Microwave-assisted derivatization of 2,5-hexanedione in urine: evaluation using GC-MS and GC-ECD** Journal of. Chromatography. B 813, 151-158, 2004.

- (72) Amendola, L. Garribba, F. Botre, F. **Determination of endogenous and synthetic glucocorticoids in human urine by gas chromatography-mass spectrometry following microwave-assisted derivatization** *Analytica Chimica Acta* 489 (2003) 233-243.
- (73) Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F. **New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds.** *J. Chromatogr. A*, 1152, 14-31, 2007.
- (74) Needleman, S., Goodin, K., Severino, W. **Liquid-liquid extraction systems for THC-COOH and benzoylecgonine.** *J. Anal. Toxicol.*, 4, 179-181, 1991.
- (75) Madej, K. **Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds.** *Trends in Analytical Chemistry*, 28 (4), 436-446, 2009.
- (76) Fernández, P., Lafuente, N., Bermejo, A.M., López-Rivadulla, M., Cruz, A. **HPLC determination of cocaine and benzoylecgonine in plasma and urine from drug abusers.** *J. Anal. Toxicol.* 20, 224-228, 1996.
- (77) Lewis, R.J., Johnson, R.D., Angier, M.K., Ritter, R.M. **Determination of cocaine, its metabolites, pyrolysis products, and ethanol adducts in postmortem fluids and tissues using Zymark® automated solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry.** *J Chromatogr. B.* 806, 141-150, 2004.
- (78) Miró, M., Cerdà, V., Estela, J.M. **Multisyringe flow injection analysis: characterisation and applications.** *Trends Anal. Chem.*, 21, 199-210, 2002.
- (79) Larsen, A.K. Jr., Tebbett, I.R. **Direct analysis for cocaine in urine by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a column-switching technique.** *J. Forens. Sci.*, 37, 636-639, 1992.

CONCLUSIONES FINALES

C.C. RECONOCIMIENTO -

Conclusiones Finales

Como se ha demostrado a lo largo de esta memoria, la presente Tesis Doctoral ha supuesto la elaboración de diversos métodos de análisis cuantitativo por cromatografía de gases que han sido aplicados con éxito a la determinación de analitos de interés medioambiental, alimentario y toxicológico.

En términos generales, las metodologías desarrolladas han contribuido significativamente a la simplificación y automatización del tratamiento e introducción de la muestra para el análisis por cromatografía de gases.

En ese sentido, en el desarrollo de cada uno de ellos, se prestó mucha atención en que el procedimiento implicara una mínima manipulación de las muestras, reduciendo al máximo la exposición de los disolventes al operador o del entorno ambiental del laboratorio contribuyendo con el medio ambiente en pro de una química verde.

Todos los sistemas automatizados fueron fiables, característica que fue evaluada mediante métodos de contraste, ensayos de recuperación y las mediciones de reproducibilidad. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron satisfactorios en todos los casos, indicando que no había pérdidas significativas de los analitos durante el análisis, ni interferencias debidas a la matriz de la muestra.

En términos de nuevos métodos de análisis desarrollados, bien a partir de la modificación o adaptación mediante automatización de métodos preexistentes, bien de manera completamente original, se encuentran los logros que se detallan a continuación.

➡ Se optimizó una estrategia automática para el tratamiento e introducción de la muestra para la determinación de alquilpirazinas en licor de cacao empleando la técnica de Espacio de Cabeza.

✓ El empleo de ésta técnica, permitió realizar una extracción en fase gaseosa de las alquilpirazinas desde una muestra sólida, tan compleja como lo es el licor de cacao, sin la necesidad de realizar etapas adicionales de extracción como las empleadas en otros trabajos reportados en la literatura.

✓ La exactitud del método fue muy satisfactoria debido a la mínima manipulación de la muestra por parte del analista que disminuyó en gran medida los errores sistemáticos involucrados en el proceso.

✓ Se incrementó la sensibilidad del método ya que el procedimiento permitió variar de una manera sencilla la cantidad de muestra sólida en el vial.

✓ La optimización de los parámetros instrumentales realizada por el método univariado de variar un factor a la vez fue confirmada evaluando los resultados utilizando la Quimiometría.

✓ Los resultados del estudio quimiométrico mostraron que se puede disminuir el número de experimentos realizados para la optimización del sistema instrumental, empleando las variables que presentan efectos significativos sobre los analitos de interés, como la cantidad de muestra, la temperatura de termostatación y el tiempo de presurización.

✓ Se aplicó el procedimiento desarrollado para el análisis de 120 muestras de cacaos Criollos, Trinitarios y Forasteros que habían sido sometidas a diferentes tiempos de fermentación, a las temperaturas de torrefacción de 110 y 145 °C y a un tiempo variable de torrefacción entre 10 y 30 min.

✓ Se evaluaron estadísticamente los resultados obtenidos para determinar si las alquilpirazinas podrían ser un parámetro químico que diferenciara entre las variedades de cacao Criollo, Trinitario y Forastero.

✓ Los resultados demostraron que:

✚ La concentración de alquilpirazinas aumentaba a medida que se incrementaba el tiempo de torrefacción.

Delgado

- El contenido de alquilpirazinas con relación a las variables período de cosecha y/o fermentación no variaba para el cacao Criollo Guasare y Mérida San Juan.
- Para Porcelana y Pedregal presentaron cierta variabilidad atribuida al hecho de que Porcelana no posee un manejo agronómico controlado y a la tendencia de hibridización del Pedregal (cruce con Trinitario).
- Se seleccionaron Guasare y San Juan, en representación de los cacaos Criollos, para el estudio entre variedades.
- La relación trimetilpirazina –tetrametilpirazina permitía distinguir la variedad Criollo de las Trinitario y Forastero.
- La etilpirazina podría ser un parámetro químico que permitiría discriminar entre las variedades Trinitario y Forastero con respecto a la Criollo donde este compuesto estuvo ausente para todos los casos.
- Se desarrolló un procedimiento automatizado, rápido y altamente sensible para la determinación de solventes orgánicos benceno, tolueno y xilenos (BTXs)) en muestras de orina.
- ✓ Aprovechando las potencialidades de la técnica de espacio de cabeza, para este estudio se utilizó el sistema EC-CG-FID.
- ✓ Se utilizó un enfoque criogénico en el automuestreador Espacio de Cabeza como una buena alternativa para concentrar a los analitos en el sistema, aumentando significativamente la sensibilidad del método.
- ✓ El tratamiento de la muestra determinó que el único efecto de matriz existente era el salino debido al alto contenido de sales que presentaba la muestra.
- ✓ Se comprobó que se podía evaluar benceno, tolueno y xilenos en muestras de orina utilizando una curva de calibración preparada a partir de soluciones patrones de los analitos saturadas con 1,0 g de NaCl.

✓ Con relación a otros métodos reportados en la literatura, se mejoró significativamente la frecuencia de análisis a 10 muestras/hora ya que el haber utilizado un automuestreador de EC en línea permitió realizar la etapa de tratamiento de la muestra simultáneamente con la etapa de separación de los analitos de la inyección previa.

✓ Utilizando el método propuesto se analizaron muestras de orina de trabajadores expuestos laboralmente en algunas estaciones de servicio de la ciudad de Mérida. Para todos los casos se detectaron los analitos estudiados (BTXs).

➡ Se desarrolló un método rápido y reproducible para evaluar plaguicidas organofosforados (POPs) en aguas de consumo humano por cromatografía de gases (CG) con detección por espectrometría de masa (EM).

✓ La extracción en fase sólida de los POPs se realizó en disco en un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) que permitió la automatización del procedimiento analítico con una mayor frecuencia de análisis.

✓ Con el MSFIA se minimizó el consumo de solventes y, por tanto la generación de residuos, facilitado por el empleo de válvulas solenoides de tres vías que impulsaban los líquidos hacia el sistema solamente en las cantidades y en el momento que la metodología lo requería. Esta capacidad se tradujo en un menor coste por análisis y constituyó una alternativa respetuosa con el medio ambiente.

✓ Se contó con un software que permitió el control automático de la técnica MSFIA que le confirió una elevada reproducibilidad al método. Así mismo, se consiguió reducir significativamente el grado de manipulación de las muestras por parte del analista, reduciendo los errores humanos.

✓ El tiempo de análisis fue muy satisfactorio si lo comparamos con los métodos reportados en la literatura donde la extracción de los POPs se realizó por extracción líquido-líquido.

✓ La separación por CG y detección por EM se realizó en 14 min y se empleó 8 min en todo el procedimiento de extracción. La posibilidad de superponer la etapa de extracción de los POPs con la de la separación por CG-EM de la inyección anterior, permitió que se pudiera analizar una muestra cada 6 minutos lo que corresponde a una frecuencia de análisis de 10 muestra/hora.

➡ Se desarrolló un método para determinar COC y su principal metabolito BZE en orina por CG con detección por EM.

✓ Se utilizó una precolumna Oasis® HLB que permitió realizar la extracción en fase sólida de los analitos con la técnica MSFIA ya que no generaba sobrepresión en el sistema.

✓ El sistema MSFIA permitió también la automatización de la reacción de derivatización de la BZE necesaria para su detección por EM.

✓ Como método de calentamiento para la reacción de derivatización de la BZE se utilizó irradiación por microondas que redujo significativamente el tiempo de reacción de 30 min (calentamiento a 60° con baño de agua termostatzado) a 90 segundos (Potencia de irradiación: 630 W).

✓ El uso del sistema MSFIA-MW permitió disminuir el tiempo de tratamiento de muestra reportado en la literatura de 90,0 min (procedimiento manual) a 7,5 minutos. Adicionalmente facilitó el acoplamiento de la etapa de derivatización de BZE aumentando significativamente la frecuencia de análisis a 10 muestras/hora.

✓ Utilizando el método propuesto se analizaron 18 muestras de orina pertenecientes a individuos consumidores en rehabilitación. Los resultados indicaron que en 12 muestras se confirmó positivo por cocaína y/o su metabolito.

Las concentraciones medias encontradas estaban en el intervalo de concentración: 0,12 - 0,79 μg de COC/mL y 0,36 - 2,46 μg BZE/mL.

www.bdigital.ula.ve

Producción Científica

I.- Cursos realizados fuera del Programa de Formación del Doctorado

- 1.- Programa de Actualización de Docentes (PAD) del Vicerrectorado Académico de la Universidad de Los Andes, Taller “Microenseñanza”. Profesora Nancy Pestana. Universidad de Los Andes, Mérida, **Venezuela 2004**.
- 2.- “Garantía de Calidad en Laboratorios de Análisis”, Facultad de Ciencias. Laboratorio de Investigaciones y Análisis Químico Industrial y Agropecuario (LIAQIA). Dr. Guillermo Bianchi. Universidad de Los Andes, Mérida, **Venezuela, 2004**.
- 3.- “La automatización de métodos analíticos mediante técnicas de flujo” (Curso: teórico-práctico) Laboratorio de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente. Dr. Víctor Cerdà. Universidad de Las Islas Baleares, Palma de Mallorca, **España, 2005**.
- 4.- Validación de Métodos Analíticos, VII Congreso Venezolano de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida, **Venezuela, 2005**.
- 5.- “Introducción a los Métodos de Análisis en Flujo”, Laboratorio de Espectroscopia Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, **2006**. Prof. Dr. Víctor Cerdà de la Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, **España**.
- 6.- “Componente Docente Básico (Programa de Actualización de los Docente)”, Vicerrectorado Académico de la Universidad de Los Andes, Mérida, **Venezuela, 2006**.
- 7.- “Validación en Cromatografía”, Prof. Dr. Fernando Lanças, Instituto Internacional de Cromatografía, Universidad de San Carlos, San Pablo, **Brasil, 2007**.
- 8.- “Gestión de Calidad”, Prof. Dr. Igor Olivares Instituto Internacional de Cromatografía, Universidad de San Carlos, San Pablo, **Brasil, 2007**.
- 9.- “Introducción a la Quimiometría”, Prof. Dr. José Chirinos, Escuela de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela, Caracas, **Venezuela, 2008**.

Delgado

- 10.- Programa de Formación de Tutores “Proforte”, Facultad de Ciencias Económicas y Sociales, Centro de Investigaciones y Desarrollo Empresarial (CIDE), Universidad de Los Andes, Mérida, **Venezuela, 2009.**
- 11.- Cromatografía de Gases Acoplada a la Espectrometría de Masas (GC-MS). Profa. Dra. Elena Stashenko, Centro de Investigación en Biomoléculas y Laboratorio de Cromatografía, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, **Colombia, 2009.**

II.- Pasantía

Laboratorio de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente, Prof. Dr. Víctor Cerdà, Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca, **España. 16 de abril a 30 de Julio de 2005.**

III.- Comunicaciones presentadas en Congresos Internacionales

- 1.- Rosario Brunetto, **Yelitza Delgado**, Lubin Gutiérrez, Máximo Galignani, Marleny A. Araque Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Carlos Romero, Eliana Rivas, “Determinación de pirazinas en licores de cacaoos venezolanos por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas e introducción de la muestra por espacio de cabeza”, **IX Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA-9)**, La Habana, Cuba, **8 al 11 de Marzo del 2005.**
- 2.- **Yelitza Delgado**, Rafael Forteza, Rosario Brunetto, Máximo Galignani, Víctor Cerdà*, “Determinación de plaguicidas organofosforados en aguas, por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (GC/MS) utilizando un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para la preconcentración en línea”, **11as Jornadas de Análisis Instrumental**, Barcelona, España, **15-17 de Noviembre 2005.**

IV.- Memorias in extenso de Congresos Nacionales

- 1.- Brunetto, María del Rosario, Dariana Zambrano, **Delgado, Yelitza**, Galignani, Máximo, Burguera, José Luis, Burguera, Marcela, “Determinación de solventes orgánicos tóxicos en muestras de orina por cromatografía de gases e introducción de la muestra por espacio de cabeza”, **VII Congreso Venezolano de Química**, Mérida, Venezuela. **6-10 de Noviembre de 2005.**
- 2.- Rosario Brunetto, **Yelitza Delgado**, Lubin Gutiérrez, Máximo Galignani, Yaritza Contreras, Marleny A. Araque Alexis Zambrano, Álvaro Gómez,

Gladys Ramos, Carlos Romero, Eliana Rivas, Sattfel Dugarte, “Desarrollo de un método para la determinación de pirazinas en licores de cacaos venezolanos por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas e introducción de la muestra en línea”, **VII Congreso Venezolano de Química**, Mérida, Venezuela. **6-10 de Noviembre de 2005**.

- 3.- María del Rosario Brunetto, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Libia Contreras Méndez, Dina Torres Izarra, Carlos Ayala Montilla, Máximo Galignani, “Determinación de cocaína y benzoilecgonina en orina humana por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-EM) utilizando un sistema de inyección en flujo multijeringa (MSFIA) para el tratamiento de la muestra en línea”, **IX Congreso Venezolano de Química**, Cumaná, Venezuela. **01-05 de Junio de 2009**.

V.- Publicaciones

- 1.- María del Rosario Brunetto, **Yelitza Delgado Cayama**, Lubin Gutiérrez, Máximo Galignani, Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Carlos Romero, “Headspace gas chromatography-mass spectrometric determination of alkylpyrazines in cocoa liquor samples”, **Journal of Food Chemistry**, 112, (1): 253-257, 2009.
- 2.- María del Rosario Brunetto, **Yelitza Delgado**, Sabrina Clavijo, Yaritza Contreras, Dina Torres, Carlos Ayala, Máximo Galignani, Rafael Forteza, Víctor Cerdà Martin, “Analysis of cocaine and benzoylecgonine in urine by using MSFIA-GC-MS system”, **Journal of Separation Science**. (En prensa 15/03/2010).
- 3.- **Yelitza Delgado**, Rafael Forteza, Víctor Cerdà Martin María del Rosario Brunetto, Máximo Galignani, “Utilización de un sistema de inyección en flujo multijeringa para la extracción en fase sólida de plaguicidas órgano fosforados de muestras de agua y su determinación por CG/EM”, **Ciencias** (Enviado a Publicación 8/04/2010).

VI.- Premios y distinciones

VI.1.- Premios

Programa de Promoción al Investigador (PPI)

➔ Clasificada en el Programa de Promoción del Investigador en Ciencias Físicas, Matemáticas y Químicas en el año **2005**.

Nº PPI: 7059 Nivel: **Candidato**

Delgado

➔ Clasificada en el Programa de Promoción del Investigador en Ciencias Físicas, Matemáticas y Químicas en el año **2009**.

Nº PPI: 7059 Nivel: I

Premio al Estimulo al Investigador (PEI) del Vicerrectorado Académico de la Universidad de Los Andes

➔ Año: **2005** (36 puntos)

➔ Año: **2007** (65 puntos)

➔ Año: **2009** (191 puntos)

VI.2.- Distinciones

➔ **Mención de Honor al Grupo de Investigadores:** Rosario Brunetto, Lubin Gutiérrez, Yelitza Delgado y Máximo Galignani, "Por sus trabajos de aplicación de la Química Analítica en el área del Cacao y Chocolatería" en la **IX Conferencia Internacional sobre Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA-9)** La Habana, Cuba. 8 al 11 de Marzo del **2005**.

➔ **Coordinador(a) de la Sesión Oral** en el área de **Química Analítica**. IX Congreso Venezolano de Química y I Congreso Internacional. **01-05 de Junio de 2009**. Cumaná - Venezuela

VII.- Productividad en colaboración con otras líneas de investigación del Laboratorio

VII.1.- Comunicaciones presentadas en Congresos Internacionales

- 1.- Rosario Brunetto, Lubin Gutiérrez, **Yelitza Delgado**, Máximo Galignani, Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos "Desarrollo de un método por cromatografía líquida de alta resolución con tratamiento de la muestra en línea para la determinación de teobromina y cafeína en almendras de cacao Venezolano", **X Congreso Latinoamericano de Cromatografía (COLACRO X)**, Campos de Jordao, Sao Pablo, Brasil. **18 - 22 de Octubre del 2004**.
- 2.- Rosario Brunetto, Lubin Gutiérrez, **Yelitza Delgado**, Máximo Galignani, Marleny A. Araque Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Carlos Romero, Eliana Rivas, Sattel Dugarte, "Determinación de teobromina y cafeína en almendras de cacao venezolano fermentado", **IX Conferencia**

Internacional sobre Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICTA-9), La Habana, Cuba. **8 al 11 de Marzo del 2005.**

- 3.- Brunetto, María del Rosario; Contreras, Libia Yaritza; Obando,; María Antonieta; Torres Izarra, Dina, Galignani, Máximo; **Delgado Cayama, Yelitza**; Alarcón, Oscar Marino; Nieto, Edgar; Salinas, Rafael, “Utilización De Una Fase Micelar Para La Inyección Directa De La Muestra De Plasma Humano Para La Determinación De Vitaminas K Por Cromatografía Líquida De Reparto En Fase Reversa Y Detección Por Fluorescencia”, **XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Ciencias Afines (COLACRO XI)**, Mérida, Yucatán, México. **26 al 30 de Junio del 2006.**
- 4.- Brunetto, María del Rosario, **Delgado, Yelitza**, Sabrina Clavijo, Lubín Gutiérrez, Máximo Galignani, Yaritza Contreras, Alexis Zambrano, Gladys Ramos, Carlos Romero, Satfel Dugarte, “Determinación de Triglicéridos en Muestras de Manteca de Cacao”, **XXVII Congreso Latinoamericano de Química, VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química**, La Habana, Cuba. **16-20 de Octubre del 2006.**
- 5.- Brunetto, María del Rosario, Sabrina Clavijo, **Delgado, Yelitza**, Lubín Gutiérrez, Alexis Zambrano, Gladys Ramos, Carlos Romero, Satfel Dugarte, “Determinación de Ácidos Grasos en Manteca de Cacao por Cromatografía de Gases”, **XXVII Congreso Latinoamericano de Química, VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química**, La Habana, Cuba. **16-20 de Octubre del 2006.**
- 6.- Rosario Brunetto, Alexis Buitrago, Yaritza Contreras, Máximo Galignani, **Yelitza Delgado**, Laura Calderón, Antonieta Obando, Fernando Ovalles, Andrés León, Sarín Colón, “Desarrollo de un método para la determinación de fármacos antihipertensivos en plasma sanguíneo”, **XXVII Congreso Latinoamericano de Química, VI Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química**, La Habana, Cuba. **16-20 de Octubre del 2006.**
- 7.- María del Rosario Brunetto, Yaritza Contreras Méndez, Máximo Galignani, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Dina Torres Izarra, “Determination Of Losartan, Telmisartan And Valsartan By Direct Injection Of Human Urine Into A Column-Switching Liquid Chromatographic System With Fluorescence Detection”, **XII Congreso Latinoamericano de Cromatografía (COLACRO XII)**, Florianópolis, Brasil. **27-30 de Octubre 2008.**

- 8.- Fernando Ovalles, Rebeca Rondón, **Yelitza Delgado**, Yaritza Contreras, Maria del Rosario Brunetto, Máximo Gallignani, "Flow Analysis-Fourier Transform Infrared Spectrometric Determination Of Furosemide In Pharmaceuticals" **XII Congreso Latinoamericano de Cromatografía (COLACRO XII)**, Florianópolis, Brasil. **27-30 de Octubre 2008**.

VII.2.- Memorias in extenso de Congresos Nacionales

- 1.- Alexis Zambrano, Carlos Romero, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Satfel Dugarte, Eliana Rivas, Carlos La Cruz, Rosario Brunetto, Máximo Gallignani, Lubin Gutiérrez, **Yelitza Delgado**, "Determinación de azúcares en muestras de cacao durante la fermentación y torrefacción", **VII Congreso Venezolano de Química**, Mérida- Venezuela. **6-10 de Noviembre de 2005**.
- 2.- Rosario Brunetto, Lubin Gutiérrez, **Yelitza Delgado**, Angélica Villarreal, Máximo Gallignani, Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Carlos Romero, Eliana Rivas, Satfel Dugarte, "Desarrollo de un método por Cromatografía Líquida para la determinación teobromina, teofilina y cafeína en almendras de cacao venezolano fermentado", **VII Congreso Venezolano de Química**, Mérida- Venezuela. **6-10 de Noviembre de 2005**.
- 3.- María del Rosario Brunetto □, Yaritza Contreras Méndez, Dina Torres Izarra, Máximo Gallignani, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, "Utilización de una Fase Micelar para la Inyección Directa de Muestras de Plasma Humano en la Determinación de Vitaminas K por Cromatografía Líquida de Reparto en Fase Reversa con Detección por Fluorescencia", **VIII Congreso Venezolano de Química**, Caracas- Venezuela. **24-28 de Junio de 2007**.
- 4.- María del Rosario Brunetto□, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Lubin Gutiérrez García, Máximo Gallignani, Libia Contreras Méndez, Dina Torres Izarra, Alexis Zambrano, Gladys Ramos, "Desarrollo de un Método para la Determinación de Triglicéridos en Manteca de Cacao", **VIII Congreso Venezolano de Química**, Caracas- Venezuela. **24-28 de Junio de 2007**.
- 5.- María del Rosario Brunetto; Orly Rivas Dugarte; Lubin Gutiérrez García; Máximo Gallignani; Alexis Buitrago Díaz; **Yelitza Delgado Cayama**; Yaritza Contreras Méndez; Alexis Zambrano, Gladys Ramos, "Desarrollo de un Método para la Determinación de Aminoácidos en Muestras de Cacao", **VIII Congreso Venezolano de Química**, Caracas- Venezuela. **24-28 de Junio de 2007**.

- 6.- María del Rosario Brunetto, Alexis Buitrago, Yaritza Contreras, Máximo Gallignani, **Yelitza Delgado**, Laura Calderón, Antonieta Obando, Fernando Ovalles, Andrés León, Sarín Colón, “Desarrollo de un Método para la Determinación de Fármacos Antihipertensivos en Plasma Sanguíneo Humano”, **VIII Congreso Venezolano de Química**, Caracas- Venezuela. **24-28 de Junio de 2007.**
- 7.- María del Rosario Brunetto, Yaritza Contreras Méndez, Dina Torres Izarra, Máximo Gallignani, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Oscar Marino Alarcón, Edgar Nieto, Rafael Salinas, “Desarrollo de un Método para la Determinación de Vitaminas liposolubles en Muestras de Plasma por Cromatografía Líquida de alta Resolución con Introducción de la Muestra en Línea”, **VIII Congreso Venezolano de Química**, Caracas- Venezuela. **24-28 de Junio de 2007.**
- 8.- María del Rosario Brunetto, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Lubin Gutiérrez García, Máximo Gallignani, Dina Torres Izarra, Alexis Zambrano, Gladys Ramos, “Determinación de Ácidos Grasos en Manteca de Cacao Por Cromatografía de Gases con Detección por Ionización en Llama y Confirmación por Espectrometría de Masas”, **VIII Congreso Venezolano de Química**, Caracas- Venezuela. **24-28 de Junio de 2007.**
- 9.- María del Rosario Brunetto, Sabrina Clavijo Roa, **Yelitza Delgado Cayama**, Dina Torres Izarra, Libia Contreras Méndez, Carlos Ayala Montilla, Máximo Gallignani. “Optimización de las condiciones de reacción en la siliación asistida por microondas para la determinación de atenolol en orina por cromatografía de gases y detección por espectrometría de masas”, **IX Congreso Venezolano de Química**, Cumaná, Venezuela. **01-05 de Junio de 2009.**
- 10.- María del Rosario Brunetto, Dina Torres Izarra, Libia Contreras Méndez, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Carlos Ayala Montilla, Máximo Gallignani, “Desarrollo de un método para la determinación de losartan, valsartan y telmisartan en muestras de plasma humano por cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia”, **IX Congreso Venezolano de Química**, Cumaná, Venezuela. **01-05 de Junio de 2009.**
- 11.- María del Rosario Brunetto, Libia Contreras Méndez, Dina Torres Izarra, **Yelitza Delgado Cayama**, Sabrina Clavijo Roa, Máximo Gallignani, “Desarrollo y validación de un método por cromatografía líquida de alta

resolución con columnas acopladas para la determinación de lamotrigina en suero humano”, **IX Congreso Venezolano de Química**, Cumaná, Venezuela. **01-05 de Junio de 2009**.

- 12.- María del Rosario Brunetto, Libia Contreras Méndez, Dina Torres Izarra, Sabrina Clavijo Roa, **Yelitza Delgado Cayama**, Carlos Ayala, Fernando Ovalles, Máximo Galignani, “Determinación de losartan, valsartan y telmisartan por inyección directa de muestras de orina humana en un sistema de cromatografía líquida de alta resolución de columnas acopladas con detección por fluorescencia”, **IX Congreso Venezolano de Química**, Cumaná, Venezuela. **01-05 de Junio de 2009**.

VII.3.-Publicaciones

- 1.- María del Rosario Brunetto, Lubin Gutiérrez, **Yelitza Delgado**, Máximo Galignani, Alexis Zambrano, Álvaro Gómez, Gladys Ramos, Carlos Romero, “Determination of theobromine, theophylline and caffeine in Venezuelan cocoa by a high-performance liquid chromatographic method with on-line sample cleanup in a switching-column system”, **Journal of Food Chemistry** 100(1): 459-467, 2007.
- 2.- María del Rosario Brunetto, Libia Yaritza Contreras Méndez, Dina Saraí Torres Izarra, Máximo Galignani, **Yelitza Delgado Cayama**, María Antonieta Obando, Oscar Marino Alarcón, Edgar Nieto y Rafael Salinas, “Utilización de una fase micelar para la inyección directa de muestras de plasma humana en la determinación de vitaminas K y Menaquinona-4 por cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa con detección por fluorescencia”, **Ciencia** 15(3): 434-443, 2007.
- 3.- María del Rosario Brunetto, Yaritza Contreras, Sabrina Clavijo, Dina Torres, **Yelitza Delgado**, Fernando Ovalles, Carlos Ayala, Máximo Galignani, José Manuel Estela, Víctor Cerdà Martín, “Determination of losartan, telmisartan, and valsartan by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatographic system with fluorescence detection”, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 50 (2): 194-199, 2009.
- 4.- María del Rosario Brunetto, Yaritza Contreras, **Yelitza Delgado**, Máximo Galignani, José Manuel Estela, Víctor Cerdà Martín, “Development and Validation of a Rapid Column-Switching High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Lamotrigine in Human Serum”, **Journal of Chromatographic Science**, 47: 478-484, 2009.